

УДК 612.014.4:612.821.8:57.081.22:57.084.1:577.25

МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДОКЛИНИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫСАХ И МЫШАХ

Чайка А. В., Чертаев И. В., Хусаинов Д. Р.

*ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Симферополь,
Россия
E-mail: andrew.chajka@yandex.ru*

В обзоре обобщены литературные данные относительно экспериментальных доклинических методов оценки изменения болевой чувствительности лабораторных крыс и мышей под действием различных факторов. Подробно описана методика болевых тестов «электростимуляция», «горячая вода», «горячая пластина» и «формалиновый тест». Представлена краткая характеристика механизмов формирования болевого ответа в каждом тесте.

Ключевые слова: механизмы боли, тест «электростимуляция», тест «горячая пластина», тест «горячая вода», «формалиновый тест».

ВВЕДЕНИЕ

Экспериментальное изучение боли помогает понять ее механизмы, особенности и физиологические проявления, что имеет существенное значение для физиологии, практической биомедицины и фармакологии. Понять причины и механизмы болевого ощущения, найти необходимое обезболивающее средство, изучить влияние боли на организм легче всего в доклиническом лабораторном эксперименте [1]. При этом проведение доклинического тестирования на животных является обязательным этапом исследований, который необходимо проводить при поиске новых анальгетиков, прежде чем можно будет перейти к их клиническим испытаниям. Чтобы вызвать болевое ощущение у животного, обычно используют модели боли, основанные на использовании разнообразных механических, электрических, температурных и химических раздражителей.

Цель данного обзора – обобщить имеющиеся литературные сведения о методах экспериментального доклинического тестирования анальгетического действия различных факторов на лабораторных крысах и мышах.

ТЕСТ «ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИЯ»

Тест «электростимуляция» (электрокожная стимуляция) – это один из широко используемых приёмов для создания экспериментальной аверсивной ситуации [2, 3]. Одними из первых этот метод применили O'Kelly L.I. и Steckle L.C. (1939) [4].

Хотя электрический ток является искусственным стимулом, преимущество его использования заключается в легкой воспроизводимости результатов и провоцировании ярко выраженных поведенческих эффектов в ответ на данный болевой раздражитель [5].

Механизм формирования болевого ответа

При использовании пороговых значений тока исключается эмоциональная составляющая ноцицептивного ответа, реакция является преимущественно спинальным рефлексом, однако присутствует также супраспинальный компонент – прыжок животного. Исследования продемонстрировали центральную роль дофаминергических нейронов в модуляции восприятия боли в супраспинальных структурах [6]. Посредством электростимуляции структур головного мозга было показано участие базальных ганглиев, островка, передней поясной извилины, таламуса и серого вещества близ водопроводной области в регуляции болевой чувствительности [6, 7]. В экспериментах по исследованию боли с помощью сканирования мозговой ткани, после введения меченого предшественника дофамина, было обнаружено увеличение выработки медиатора во время болевых раздражений, а его количество определяет уровень болевого порога [8]. Важную роль в модуляции болевого ответа также играют эндогенные опиаты, ацетилхолин, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) [9]. Так, считается, что обезболивающий эффект опиатов вызван угнетением в клетке функций аденилатциклазы, уменьшением образования циклического аденозинмонофосфата и, как следствие, торможением выделения медиаторов (дофамин, ацетилхолин) в синаптическую щель. Доказано, что активация холинэргической системы усиливает действие опиатов, а блокада – ослабляет. Связывание ацетилхолина с определенными центральными μ -рецепторами стимулирует высвобождение опиоидных пептидов. ГАМК регулирует болевую чувствительность, подавляя эмоционально-поведенческие реакции на боль, что обеспечивает адаптацию организма к болевому стрессу [9].

Подготовка к эксперименту

Тестовая установка. Камера 20x30x20 см, пол которой является высокопроводимой медной площадкой. На площадку подаётся ток от электростимулятора (ЭСЛ-2 или другого), генерирующего прямоугольные одиночные импульсы длительностью 10 мс с частотой 40 Гц с возможностью постепенного увеличения напряжения электрического тока (рис. 1).

Проведение эксперимента

Лабораторную крысу или мышь помещают в тестовую установку, предварительно смочив лапки физиологическим раствором для лучшей электропроводимости, и производят постепенное равномерное увеличение напряжения электрического тока до момента фиксирования болевой реакции (рис. 2) или достижения максимального значения напряжения тока на измерительной шкале электростимулятора. *Регистрируемым показателем* является напряжение тока (в вольтах), вызывающее ноцицептивный ответ животного. Реакции животного на удар электрическим током классифицируются как [2]:

а) отсутствие ответа;

- б) вздрагивание (внезапное напряжение мускулатуры или прижатие к полу, при котором лапы остаются на решетке);
- в) прыжок (сильная реакция, при которой все четыре лапы одновременно отрываются от решетки);
- г) голосовые реакции, или вокализация (писк).

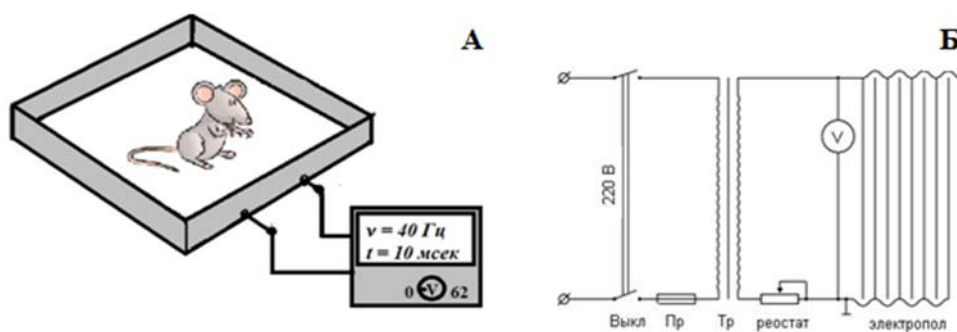


Рис. 1. Установка теста «электростимуляция».

Примечание: А. Схема измерения порога болевой реакции. Б. Схема прибора для определения болевой чувствительности у животных. Выкл – выключатель; Пр – предохранитель; Тр – трансформатор.

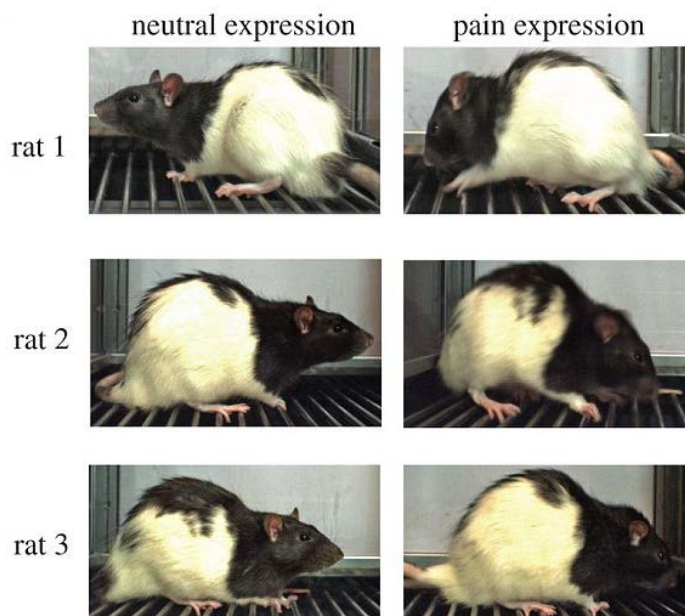


Рис. 2. Поведение крыс в тесте «электростимуляция» [10]: neutral expression – до подачи тока на решётку, pain expression – болевая реакция.

Обычно болевые реакции не наблюдаются при малых интенсивностях тока (10–20 В). Реакция вздрагивания появляется при 30 В и переходит в локальное подергивание и бег при более высоких интенсивностях тока. Реакции подпрыгивания и писк вызываются ударами тока, зачастую превышающими 50–70 В [2].

ТЕСТ «ГОРЯЧАЯ ВОДА» (ТЕСТ ТЕПЛОВОЙ ИММЕРСИИ ХВОСТА ПРИ ПОГРУЖЕНИИ В ГОРЯЧУЮ ВОДУ)

В отличие от других болевых тестов, данный метод чувствителен к действию слабых анальгетиков, а также позволяет проводить многократные эксперименты на одних и тех же животных [11]. В разработку данного теста внесли свой вклад многие исследователи, такие как Ben-Bassat J., Sewell R. и др. [11, 12].

Генез болевой реакции

Тест тепловой иммерсии хвоста основан на спинальном флексорном рефлексе в ответ на погружение хвоста в горячую воду [11]. Вследствие того, что площадь раздражения большая и нагревание кожной поверхности протекает стремительно, то не происходит активации терморецепторов, а сразу активируются С-волокна полимодальных ноцицепторов, А δ -волокна полимодальных ноцицепторов, полимодальные ноцицепторы и высокопороговые механорецепторы [2].

Болевая чувствительность значительно ниже у самок, чем у самцов [13]. Так, блокада опиоидных рецепторов налоксоном повышает болевой порог у самок, но понижает – у самцов, что, вероятно, связано с различиями в уровне андрогенов у животных [12]. А у новорождённых крысят анальгезию обеспечивает окситоцин [10].

Подготовка к эксперименту

Экспериментальная установка представляет собой ёмкость с горячей водой температурой от 45 до 55 °С (зачастую 52 °С) [14]. Постоянная температура поддерживается термостатом. В качестве *экспериментальных животных* используются крысы и мыши.

Проведение эксперимента

Животное фиксируют в пенале и успокаивают поглаживанием, если оно чрезмерно активно. Болевое раздражение моделируют погружением хвоста в горячую воду температурой от 45 до 55 °С [14]. Регистрируют латентный период отдергивания хвоста (рис. 3). Как правило, его величина в контрольной группе находится в диапазоне от 3 до 30 секунд (чаще всего от 7 до 12 секунд) [14]. Во избежание повреждения тканей не следует нагревать хвост более 30 секунд. Критерием анальгетического эффекта считают достоверное увеличение латентного периода реакции после введения вещества. Согласно Sewell R.D., анальгетический эффект вещества наиболее ярко выражен спустя 20 мин после инъекции [11].

Особенности и ограничения метода

1. Анальгетический эффект того или иного вещества зависит от температуры воды в тесте. Например, морфин и напроксен эффективны во всём диапазоне температур, а ибупрофен и хлорпромазин только при 45 °С (табл. 1) [15].

2. Уровень болевого порога зависит от многих факторов, в т. ч. от пола и возраста лабораторных животных [15].

3. При многократном действии стимула может развиваться привыкание или выработается условный рефлекс отдергивания хвоста ещё до достижения порога болевых ощущений [14].

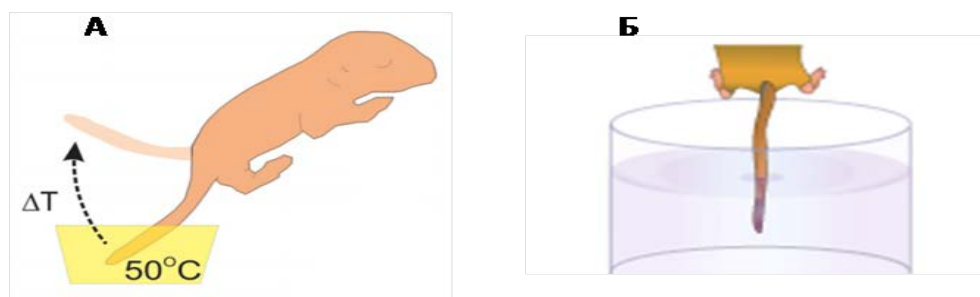


Рис. 3. Регистрация болевой реакции у новорождённых (А) и половозрелых (Б) крыс [10, 16].

Таблица 1

Влияние различных веществ на величину латентного периода (в секундах) по Luttinger D. (1985) [15]

Фармакологическая группа	Вещество	Доза (мг/кг)	Температура воды		
			45°C	50°C	55°C
Опиаты	Морфин	3	33±0,8	8,7±1,6	2,7±0,4
	Налорфин	30	7,6±2,5	3,0±0,7	0,9±0,1
Ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ)	Напроксен	300	43,2±4,9	3,7±0,9	2,9±0,6
	Зомепирак	1000	16,0±7,1	-	-
	Ибупрофен	300	11,6±3,0	-	-
Психотропные вещества	d-амфетамин	3	9,8±4,6	-	-
	Хлопромазин	10	15,9±5,3	-	-
Контроль	Физраствор	-	11,0±1,5	2,5±0,4	0,9±0,1

ТЕСТ «ГОРЯЧАЯ ПЛАСТИНА»

«Горячая пластина» – это поведенческая модель ноцицепции, используемая для скрининга анальгетического эффекта различных веществ, регистрирующая изменение болевого порога [17]. Первоначальную методику эксперимента предложили Woolfe G. и MacDonald A.D. (1944) [18].

Особенности поведения животных в тесте «горячая пластина»

Espejo E.F. и Mig D. (1993) выделили 12 типов поведения грызунов в тесте горячая пластина (табл. 2) [17]. Важно, что животное в последующей серии

экспериментов придерживается той же поведенческой реакции, которая была продемонстрирована в первый раз.

Ряд наблюдений показал, что восприятие боли меняется при воздействии различных стресс-факторов. Это явление известно как стресс-индуцированная гипоалгезия [19]. Так, у лабораторных грызунов, после воздействия принудительного плавания, наблюдается снижение болевой чувствительности, не связанное с влиянием на гистаминовую систему.

Таблица 2

Особенности поведения животных в тесте «горячая пластина»

Тип поведения	Краткая характеристика
Пассивное обнюхивание	Животное остаётся на одном месте и обнюхивает окружающую обстановку. Голова приподнята вверх.
Активное обнюхивание	Животное активно передвигается и обнюхивает всё вокруг
Стойки	Вертикальная двигательная активность (стойки) без опоры на стенки
Облизывание передних лап	Животное вылизывает передние лапы
Облизывание задних лап	Животное облизывает одну из задних лап. Голова повернута назад.
Постукивание лапами	Животное быстро поднимает и опускает заднюю лапу
Грумминг	Животное умывается с помощью передних лап
Чистка тела	Животное вылизывает свой мех и/или гениталии
Отдёргивание задней ноги	Животное отдёргивает заднюю лапу, и некоторое время её не опускает
Стойки с упором	Животное опирается передними лапами на стенки тестовой установки
Прыжки	Животное подпрыгивает над полом тестовой установки
Замирание	Животное замирает и ждёт угрозы извне. Голова обычно поворачивается из стороны в сторону.

Подготовка к эксперименту

Конструкция *тестовой установки* представляет собой ящик (цилиндр) с медным или стеклянным полом, температура которого поддерживается на постоянном уровне (в основном 52–55 °С, реже 45–50 °С) или линейно повышается (от 42–45 °С) [20–23] (рис. 4).

Эталонными анальгетиками для этого теста считаются гидрохлорид морфина (5–10 мг/кг), гидрохлорид кодеин (30 мг/кг), гидрохлорид феназон (30 мг/кг) и петидин (демерол) (400 мг/кг) при вводе подкожно [31].



Рис. 4. Различные варианты тестовой установки [20-23].

Проведение эксперимента

Регистрируют время с момента помещения животного на горячую поверхность до появления поведенческого ответа на ноцицептивную стимуляцию [17]:

- облизывание задней лапы,
- отдёргивание задней лапы,
- прыжковые реакции.

Облизывание задней лапы является наиболее распространённым и надёжным показателем [17].

Максимальное время тестирования составляет 1 мин, во избежание повреждения тканей [18]. Критерием анальгетического эффекта считают достоверное увеличение латентного периода реакции после введения вещества [14].

На болевой ответ более эффективно воздействуют анальгетики центрального действия, чем периферические (аспирин, фенилуксусная кислота) [24]. Разные группы анальгетиков по-разному влияют на поведенческие реакции. Опиоиды обычно удлиняют латентный период реакции облизывания конечности, а нестероидные противовоспалительные средства (аспирин или парацетамол) – прыжковую реакцию, особенно если температура поверхности 50°C и ниже или температура линейно повышается от 43 до 52°C со скоростью 2,5°C/мин [14, 18].

Преимущества теста

1. Валидность теста была доказана даже при наличии значительных моторных нарушений [25].
2. Тест чувствителен к слабым анальгетикам, таким как аспирин и парацетамол [18].

Недостатки метода

1. Седативные препараты, миорелаксанты и психотомиметики вызывают неадекватные болевые реакции у животных [24].
2. Реакция на вещества смешанного опиатного агонистического-антагонистического действия не является надёжным показателем в пределах данного теста [26].
3. Тестирование необходимо проводить не чаще одного раза в день, а по возможности и в неделю, во избежание сокращения латентного периода реакции [14].

ФОРМАЛИНОВЫЙ ТЕСТ

Тест разработан Dubuisson D. и Dennis S.G. (1977) [27] и предполагает регистрацию ноцицептивной реакции грызунов на умеренную, непрерывную боль, вызванную повреждением тканей формалином [27–29]. В этом смысле «формалиновый тест» отличается от большинства традиционных тестов на ноцицепцию, которые полагаются на краткие стимулы пороговой интенсивности. Считается [27], что тест обеспечивает более эффективную модель клинической боли, чем тесты с фазными механическими или температурными раздражителями.

Механизм развития ноцицептивного ответа

В ответ на введение формалина развиваются две болевые фазы [27]. Первая фаза длится в течение 3–5 мин. с начала инъекции, что связано с химическим воздействием на ноцицепторы и активацией С-волокон. Затем на протяжении 10–15 мин. болевой ответ практически отсутствует. Вторая фаза начинается спустя 15–20 мин. после инъекции и длится 20–40 мин, что связано с воспалительной реакцией. Субстанция Р и брадикинин участвует в первой фазе, в то время как гистамин, серотонин, простагландины и брадикинин – во второй [27]. Также одним из механизмов ноцигенного действия формалина является активация TRPA1 каналов, реагирующих в норме на холод и стимулирующих развитие воспаления [14].

Опиоидные анальгетики блокируют обе фазы болевого ответа. Нестероидные противовоспалительные средства подавляют только вторую фазу, а местные анестетики – только первую [30].

Подготовка к эксперименту

Выбор концентрации формалина. Концентрация формалина может быть от 0,05 до 15 % (чаще используют 2–5 % раствор) [27]. Использование формалина в большей концентрации нежелательно, т.к. вызывает у крыс ярко выраженный «эффект замирания» и низкий уровень проявления поведенческих болевых реакций. Формалин в концентрации ниже 1 % может иметь преимущества по сравнению с обычными концентрациями. Так, концентрация формалина до 0,25 % может быть достаточной, чтобы вызвать двухфазный ноцицептивный ответ. При введении формалина в низких концентрациях наблюдается субмаксимальный болевой ответ, без порогового эффекта. Это не только облегчает обнаружение слабых анальгетиков, но также делает возможным выявление гипералгезии и, кроме того, наносит минимальные повреждения периферическим тканям [27].

Условия тестирования. Стресс-факторы окружающей среды (звуки, запахи, новая обстановка) маскируют болевой ответ в первой фазе. Поэтому эксперимент проводится в знакомой для грызунов обстановке с устранением всех возможных стрессорных агентов [27].

У мышей поведенческий ответ во второй фазе зависит от температуры окружающей среды. Для получения чётких результатов она должна быть не менее 22–23°C [27].

Проведение эксперимента

Острую воспалительную реакцию вызывают введением формалина в дозе 50 мкл для крыс и 20 мкл для мышей [14]. Формалин рекомендуется вводить в заднюю лапу, так как естественный груминг грызунов редко включает задние лапы, что обеспечивает более достоверную регистрацию болевых реакций [27]. Зачастую инъекции осуществляют в дорсальную или подошвенную часть лапы (субплантарно), однако возможно инъецирование и в другие части тела, например, формалин вводят в область тройничного нерва для оценки орофациальной боли (рис. 5) [26, 31, 32].

Регистрируют число болевых реакций (постукивание лапой об пол, покусывание лапы и т. д.) в течение 60 мин. В зависимости от введенной концентрации формалина можно зарегистрировать 4 типа поведенческих реакций [2, 26, 33]: 0 – отсутствие реакции; 1 – лапа остается на земле, но животное на нее не опирается; 2 – лапа поднята; 3 – животное облизывает или грызет лапу либо встряхивает ей (рис. 6). Вздрагивание или подёргивание инъецированной лапой являются альтернативными показателями болевого ответа, которые, по мнению Wheeler-Aceto H. и Cowan A., более надёжны, чем облизывание или покусывание лапы [29].

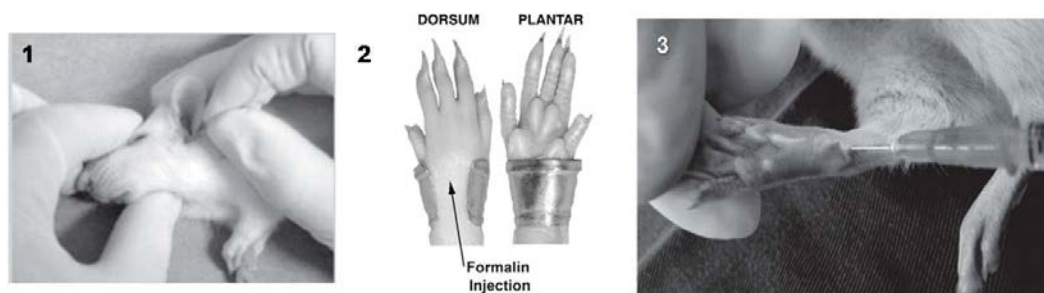


Рис. 5. Инъекция грызунам формалина [26, 31, 32]: 1 – в область тройничного нерва, 2 – в дорсальную поверхность лапы, 3 – под подошвенный апоневроз.



Рис. 6. Болевые поведенческие реакции у крыс [26, 33]: 1 – лапа остается на земле, но животное на неё не опирается; 2 – лапа поднята, 3 – лапа облизывается, грызётся.

Сходные поведенческие реакции можно регистрировать при введении в качестве раздражающего агента капсаицина (0,1 %), серотонина (0,1 %) или глутамата (0,5 моль/л) [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее распространенным болевым раздражителем в экспериментальном доклиническом тестировании различных факторов является электрический ток в тесте «электростимуляция». Преимущество этого теста заключается в легкой воспроизводимости результатов и провоцировании ярко выраженных поведенческих эффектов. В отличие от других болевых тестов, тест «горячая вода» чувствителен к действию слабых анальгетиков, а также позволяет проводить многократные эксперименты на одних и тех же животных, а валидность теста «горячая пластина» была доказана даже при наличии значительных моторных нарушений. Формалиновый тест обеспечивает более эффективную модель клинической боли, чем тесты с фазными механическими или температурными раздражителями. Не стоит забывать, что лабораторные животные достаточно быстро обучаются «ложным» реакциям в ответ на воздействие болевых раздражителей. Поэтому болевые тесты не стоит использовать чаще, чем один раз в день, а по возможности и раз в неделю, во избежание искажения экспериментальных данных.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания № 2015/701 на выполнение государственных работ в сфере научной деятельности в рамках проекта «Обоснование применения оздоровительно-превентивных технологий на основе действия низкоинтенсивных факторов различной природы» базовой части государственного задания Минобрнауки России.

Список литературы

1. Кассиль Г. Н. Наука о боли. 2-е дополненное издание / Г.Н. Кассиль. – Москва: Наука, 1975. – 400 с.
2. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д.П. Хьюстон. – Москва: Высш. шк., 1991. – 399 с.
3. Masterson, F.A. Techniques of electric shock motivation // Methods in psychobiology / F.A. Masterson, B.A. Campbell – 1972. – V. 2. – P. 21–58.
4. O'Kelly L.I. A note on long enduring emotional responses in the rat / L.I. O'Kelly, L.C. Steckle // The Journal of Psychology. – 1939. – V. 8, № 1. – P. 125–131.
5. Campbell B.A. Punishment and aversive behavior / B.A. Campbell, R.M. Church. – New York: Appleton-Century-Crofts and Fleschner Publishing Company, 1969. – 597 p.
6. Potvin S. Human evidence of a supra-spinal modulating role of dopamine on pain perception / S Potvin., S. Grignon, S. Marchand // Synapse. – 2009. – V. 63, Iss. 5. – P. 390–402.
7. Scott D.J. Variations in the human pain stress experience mediated by ventral and dorsal basal ganglia dopamine activity / D.J. Scott, M.M. Heitzeg, R.A. Koeppe, C.S. Stohler, J.K. Zubieta // The Journal of Neuroscience. – 2006. – № 26(42). – P. 10789–10795.
8. Wood P.B. Role of central dopamine in pain and analgesia / P.B Wood // Expert Review of Neurotherapeutics. – 2008. – V. 8, № 5. – P. 781–797.
9. Нейрофизиологические механизмы восприятия боли: Dendrit – лекции, учебники, справочники для студентов-медиков. [Электронный ресурс]. URL: <http://dendrit.ru/page/show/mnemonic/neyrofizyologicheskie-mehanizmy-vospriya> (дата обращения 20.09.2015).
10. Basic Neurological Screening. Tail Immersion Test: UCLA Behavioral Testing Core Facility [Электронный ресурс]. – URL: <http://btc.psych.ucla.edu/neuroscreen.htm> (дата обращения 12.08.2015)
11. Sewell R.D.E. Antinociceptive activity of narcotic agonist and partial agonist analgesics and other agents in the tail-immersion test in mice and rats / R.D.E. Sewell, P.S.J. Spencer // Neuropharmacology. – 1976. – V. 15, № 11. – P. 683–688.

12. Ben-Bassat J. Analgesimetry and ranking of analgesic drugs by the receptacle method / J. Ben-Bassat, E. Peretz, F.G. Sulman // *Arch Int Pharmacodyn Ther.* – 1959. – V. 122. – P. 434–447.
13. Molina N. Sex-related differences in the analgesic response to the rat tail immersion test / N. Molina, M.T. Bedran-de-Castro, J.C. Bedran-de-Castro // *Brazilian journal of medical and biological research.* – 1994. – V. 27, № 7. – P. 1669–1672.
14. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А.Н. Миронова [и др.] – Москва: Гриф и К, 2012. – 944 с.
15. Luttinger D. Determination of antinociceptive efficacy of drugs in mice using different water temperatures in a tail-immersion test / D. Luttinger // *Journal of pharmacological methods.* – 1985. – V. 13, № 4. – P. 351–357.
16. Mazzuca M. Newborn analgesia mediated by oxytocin during delivery / M. Mazzuca, M. Minlebae, A. Shakirzyanova, R. Tyzio, G. Taccola, S. Janackova, S. Gataullina, Y. Ben-Ari, R. Giniatullin, R. Khazipov // *Frontiers in cellular neuroscience.* – 2011. – V. 5. – P. 1–9.
17. Espejo E.F. Structure of the rat's behaviour in the hot plate test / E.F. Espejo, D. Mir // *Behavioural brain research.* – 1993. – V. 56, № 2. – P. 171–176.
18. Hunskaar S. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics / S. Hunskaar, O.G. Berge, K. Hole // *Behavioural brain research.* – 1986. – V. 21, № 2. – P. 101–108.
19. Ibrionke G.F. Forced Swimming Stress-Related Hypoalgesia: Nondependence on the Histaminergic Mechanisms / G.F. Ibrionke, K.S. Rasak // *Neurophysiology.* – 2013. – V. 45, № 4. – P. 340–343.
20. ИТС Hot Cold Plate Analgesia Meter for Mice and rats: Life Science [Электронный ресурс]. – URL: <http://wjrparks.com/dev12/hot-cold-plate-analgesia-meter/> (дата обращения 12. 09. 2015).
21. Model MK-350D. Hot Plate Analgesia Meter: Muromachi Kikai Co., Ltd [Электронный ресурс]. – URL: <http://muromachi.com/en/archives/english/1724/> (дата обращения 19. 09. 2015).
22. Ugo Basile Hot/Cold Plate: Otto Environmental [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.ottoenvironmental.com/ugo-basile-hotcold-plate> (дата обращения 27. 0. 2015).
23. Tjølsen A. The increasing-temperature hot-plate test: an improved test of nociception in mice and rats / A. Tjølsen, J.H. Rosland, O.G. Berge, K. Hole // *Journal of pharmacological methods.* – 1991. – V. 25, № 3. – P. 241–250.
24. Vogel, G.H. Analgesic, anti-inflammatory, and antipyretic activity / G.H. Vogel, W.H. Vogel // *Drug Discovery and Evaluation.* – Springer Berlin Heidelberg, 1997. – P. 360–420.
25. Plummer J.L. Assessment of antinociceptive drug effects in the presence of impaired motor performance / J.L. Plummer, P.L. Cmielewski, G.K. Gourlay, H. Owen, M.J. Cousins // *Journal of pharmacological methods.* – 1991. – V. 26, № 1. – P. 79–87.
26. Formalin test: Physiological Research [Электронный ресурс]. – URL: <http://physiologicalresearch.weebly.com/formalin-test.html> (дата обращения 22.09.2015).
27. Tjølsen A. The formalin test: an evaluation of the method / A. Tjølsen, O.G. Berge, S. Hunskaar, J.H. Rosland, K. Hole // *Pain.* – 1992. – V. 51, № 1. – P. 5–17.
28. Ellis, A. The rat formalin test: Can it predict neuropathic pain treatments? / A. Ellis, N. Benson, I. Machin, L. Corradini // *Proceedings of Measuring Behavior 2008*, eds. A.J. Spink [et al.]. – Maastricht, The Netherlands, August 26-29, 2008. – P. 324–325.
29. Wheeler-Aceto H. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics / H. Wheeler-Aceto, A. Cowan // *Psychopharmacology.* – 1991. – V. 104. – P. 35–44.
30. Hunskaar S. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain / S. Hunskaar., K. Hole // *Pain.* – 1987. – V. 30, № 1. – P. 103–114.
31. Gameiro G.H. Influence of ethanol and morphine on pain perception evoked by deep tissue injury / G.H. Gameiro, M.T. Arthuri, C.H. Tambeli, M.C.F.D.A. Veiga // *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* – 2004. – V. 40, № 3. – P. 316–325.
32. Yaksh T.L. An automated flinch detecting system for use in the formalin nociceptive bioassay / T.L. Yaksh, G. Ozaki, D. McCumber // *Journal of applied physiology.* – 2001. – V. 90, № 6. – P. 2386–2402.
33. Melzack R. The tragedy of needless pain / R. Melzack // *Scientific American.* – 1990. – V. 262, № 2. – P. 27–33.

METHODS OF EXPERIMENTAL PRE-CLINICAL TESTING OF ANALGESIC EFFECT OF VARIOUS FACTORS ON LABORATORY RATS AND MICE

Chajka A. V., Cheretaev I. V., Khusainov D. R.

*V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia
E-mail: andrew.chajka@yandex.ru*

Experimental study of pain helps to understand the mechanisms, characteristics, physiological manifestation of pain and is important for physiology of pain, practice of biomedicine and pharmacology. To understand the causes and mechanisms of pain, to find the necessary pain medication, to study the impact of pain on the body easier in a laboratory experiment, in relevant pre-clinical pain models than in the clinical practice.

To cause pain to the animal, typically use mechanical, electrical, thermal, chemical stimuli. This review summarizes literature data concerning experimental methods to assess changes in pain sensitivity in rodents under the influence of various factors. A detailed procedure following pain tests: «electrical stimulation», «tail-flick test», «hot plate test», «formalin test». Also we are presented a brief description of the formation mechanisms of pain response.

The most usable pain stimulus in all laboratories of the world is an electric current. It has the advantage of easy reproducibility and provoking pronounced behavioral effects. Unlike other painful tests, the «tail-flick test» is sensitive to the effects of weak analgesics, and also allows multiple experiments on the same animals, and the validity of the test «hot plate» has been proven even in the presence of significant motor disorders. Then, as «formalin test» provides a more effective model for clinical pain than tests with slip-ring mechanical or thermal stimuli.

Don't forget that laboratory animals quickly learn the «false» reactions in response to painful stimuli. So, painful tests should not be used more than once a day, or even once a week, to avoid distortion of the experimental data.

Keywords: mechanisms of pain, test of electrical stimulation, hot plate test, tail-flick test, formalin test.

References

1. Kassil G.N., *Nauka o boli*, 400 p. (Nauka, Moskva, 1975).
2. Buresh Ya., Bureshova O. and Khyuston D.P., *Metodiki i osnovnye eksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya*, 399 p. (Vyssh. shk., Moskva, 1991).
3. Masterson F.A. and Campbell B.A., Techniques of electric shock motivation, *Methods in psychobiology*, **2**, 21 (1972).
4. O'Kelly L.I. and Steckle L.C., A note on long enduring emotional responses in the rat, *The Journal of Psychology*, **8 (1)**, 125 (1939).
5. Campbell B.A. and Church R.M., *Punishment and aversive behavior*, 597 p. (Appleton-Century-Crofts and Fleschner Publishing Company, New York, 1969).
6. Potvin S., Grignon S. and Marchand S., Human evidence of a supra-spinal modulating role of dopamine on pain perception, *Synapse*, **63 (5)**, 390 (2009).
7. Scott D.J., Heitzeg M.M., Koeppe R.A., Stohler C.S. and Zubieta J.K., Variations in the human pain stress experience mediated by ventral and dorsal basal ganglia dopamine activity, *The Journal of Neuroscience*, **26 (42)**, 10789 (2006).

8. Wood P.B., Role of central dopamine in pain and analgesia, *Expert Review of Neurotherapeutics*, **8** (5), 781 (2008).
9. Nejrofiziologicheskie mekhanizmy vospriyatiya boli, *Dendrit – leksii, uchebniki, spravochniki dlya studentov-medikov* (dendrit.ru, 2015).
10. Basic Neurological Screening. Tail Immersion Test, *UCLA Behavioral Testing Core Facility* (Los Angeles, CA, USA, 2015).
11. Sewell R.D.E. and Spencer P.S.J., Antinociceptive activity of narcotic agonist and partial agonist analgesics and other agents in the tail-immersion test in mice and rats, *Neuropharmacology*, **15** (11), 683 (1976).
12. Ben-Bassat J., Peretz E. and Sulman F.G., Analgesimetry and ranking of analgesic drugs by the receptacle method, *Arch Int Pharmacodyn Ther.*, **122**, 434 (1959).
13. Molina N., Bedran-de-Castro M.T. and Bedran-de-Castro J.C., Sex-related differences in the analgesic response to the rat tail immersion test, *Brazilian journal of medical and biological research*, **27** (7), 1669 (1994).
14. Mironova A.N., *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast pervaya*, 944 p. (Grif i K, Moskva, 2012).
15. Luttinger D., Determination of antinociceptive efficacy of drugs in mice using different water temperatures in a tail-immersion test, *Journal of pharmacological methods*, **13** (4), 351 (1985).
16. Mazzuca M., Minlebae M., Shakirzyanova A., Tyzio R., Taccola G., Janackova S., Gataullina S., Ben-Ari Y., Giniatullin R. and Khazipov R., Newborn analgesia mediated by oxytocin during delivery, *Frontiers in cellular neuroscience*, **5**, 1 (2011).
17. Espejo E.F. and Mir D., Structure of the rat's behaviour in the hot plate test, *Behavioural brain research*, **56** (2), 171 (1993).
18. Hunskaar S., Berge O.G. and Hole K., A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics, *Behavioural brain research*, **21** (2), 101 (1986).
19. Ibrionke G.F. and Rasak K.S., Forced swimming stress-related hypoalgesia: nondependence on the histaminergic mechanisms, *Neurophysiology*, **45** (4), 340 (2013).
20. IITC Hot Cold Plate Analgesia Meter for Mice and rats, *IITC Life Science* (Woodland Hills, CA, USA, 2015).
21. Model MK-350D. Hot Plate Analgesia Meter, *Muromachi Kikai Co., Ltd* (Tokyo, Japan, 2015).
22. Ugo Basile Hot/Cold Plate, *Otto Environmental* (Greenfield, WI, USA, 2015).
23. Tjølsen A., Rosland J.H., Berge O.G. and Hole K., The increasing-temperature hot-plate test: an improved test of nociception in mice and rats, *Journal of pharmacological methods*, **25** (3), 241 (1991).
24. Vogel G.H. and Vogel W.H., *Analgesic, anti-inflammatory, and antipyretic activity*, in: Drug Discovery and Evaluation. Pharmacological assays, 360 (1997).
25. Plummer J.L., Cmielewski P.L., Gourlay G.K., Owen H. and Cousins M.J., Assessment of antinociceptive drug effects in the presence of impaired motor performance, *Journal of pharmacological methods*, **26** (1), 79 (1991).
26. Formalin test, *Physiological Research* (2015).
27. Tjølsen A., Berge O.G., Hunskaar S., Rosland J.H. and Hole K., The formalin test: an evaluation of the method, *Pain*, **51** (1), 5 (1992).
28. Ellis A, Benson N., Machin I. and Corradini L., The rat formalin test: Can it predict neuropathic pain treatments?, *Proceedings of Measuring Behavior 2008, 6th International Conference on Methods and Techniques in Behavioral Research*, edited by Spink A.J. (Maastricht, The Netherlands, 2008), p. 324.
29. Wheeler-Aceto H. and Cowan A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics, *Psychopharmacology*, **104**, 35 (1991).
30. Hunskaar S. and Hole K., The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain, *Pain*, **30** (1), 103 (1987).
31. Gameiro G.H., Arthuri M.T., Tambeli C.H. and Veiga M.C.F.D.A., Influence of ethanol and morphine on pain perception evoked by deep tissue injury, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **40** (3), 316 (2004).
32. Yaksh T.L. Ozaki G. and McCumber D., An automated flinch detecting system for use in the formalin nociceptive bioassay, *Journal of applied physiology*, **90** (6), 2386 (2001).
33. Melzack R., The tragedy of needless pain, *Scientific American*, **262** (2), 27 (1990).

Поступила в редакцию 22.10.2015 г.