

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
ФАКУЛЬТЕТ ХІМІЇ ТА ФАРМАЦІЇ

Л. В. Еберле, А. О. Кобернік

Фізико-хімічна фармакологія

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
для проведення лабораторних занять з курсу

ОДЕСА
ОНУ
2021

УДК 573.7:612.603

Рекомендовано вченою радою
факультету хімії та фармації ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 9 від 17.03.2021 р.

Рецензенти:

Г. В. Майкова, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фізіології людини та тварин Одеського національного університету імені І. І. Мечникова;

І. Ю. Борисюк, доктор фармацевтичних наук, завідувач кафедри технології ліків Одеського національного медичного університету.

Еберле Л. В.

Фізико-хімічна фармакологія : метод. вказівки /
Л. В. Еберле, А. О. Кобернік. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім.
І. І. Мечникова, 2021. – 54 с.

Методичні вказівки для проведення лабораторних занять з курсу «Фізико-хімічна фармакологія» призначені для організації роботи студентів з метою обґрунтування понять фізико-хімічної фармакології як науки про ліки. Методичні вказівки вміщують короткий опис теоретичного матеріалу, методику виконання лабораторних робіт, перелік контрольних запитань до самостійної роботи з кожного розділу.

Призначені для студентів вищих навчальних закладів, які навчаються за спеціальністю 102 «Хімія, Фармацевтична хімія» та 226 «Фармація, Промислова фармація»

УДК 573.7:612.603

© Еберле Л. В., Кобернік А. О., 2021
© Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2021

ЗМІСТ

ВСТУП		6
Тема 1.	Швидкість вивільнення речовини з твердої лікарської форми	7
	Лабораторна робота 1. Визначення швидкості вивільнення речовини з таблетки (Тест «Розчинення»)	9
	Контрольні запитання для перевірки знань	11
Тема 2.	Механізм дії сучасних протизапальних препаратів при запаленнях різного генезу	13
	2.1 Циклооксигеназний та ліпооксигеназний шляхи метаболізму арахідонової кислоти	15
	2.2. Загальна характеристика сімейства TRP каналів.	18
	2.3 TRPA1 - рецептор. Структура та фізіологічні функції рецептора TRPA1	20
	Лабораторна робота 2. Методика індукування трипсинового запалення у щурів	22
	Лабораторна робота 3. Методика індукування зимозанового запалення у щурів	25
	Лабораторна робота 4. Методика індукування алілізотіоціанат-індукованого запалення	26
	Контрольні запитання для перевірки знань	28
Тема 3.	Механізм дії аналгетичних препаратів на термічних та хімічних моделях болю	30
	3.1 Ноцицептивна система. Передача больового сигналу	30
	3.2 TRPV1- рецептор. Модулятори TRPV1 рецептора	32
	Лабораторна робота 5. Дослідження аналгетичної активності на моделі термічного подразнення хвоста у щурів	34

	Лабораторна робота 6. Дослідження аналгетичної активності при термічному подразненні у тесті «гаряча пластина»	36
	Лабораторна робота 7. Дослідження аналгетичної активності при хімічному подразненні у «капсаїциновому» тесті	39
	Лабораторна робота 8. Дослідження аналгетичної активності при хімічному подразненні у «формаліновому» тесті	40
	Контрольні запитання для перевірки знань	42
Тема 4.	Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів	44
	Лабораторна робота 9. Методика проведення експерименту по встановленню гострої токсичності	47
	Лабораторна робота 10. Методика проведення експерименту по встановленню підгострої і хронічної токсичності	48
	Контрольні запитання для перевірки знань	50
	СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	51

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ЛП – лікарські препарати
- ЛЗ – лікарські засоби
- ЛФ – лікарська форма
- ФЗ – фармакологічні засоби
- ДР – допоміжні речовини
- НД – нормативна документація
- ФЛА – фермент фосфоліпаза А
- ЦОГ – циклооксигеназа
- ЛОГ – ліпооксигеназа
- TRP – (transient receptor potential) рецептори перехідного потенціалу
- НПЗЗ – не стероїдні протизапальні засоби
- БАР – біологічно активні речовини
- ЛТ – лейкотрієни
- ПГ – простагландіни
- АІТЦ – алілізотіоціанат
- ДФУ – державна фармакопея України

ВСТУП

Фізико-хімічна фармакологія це наука, що вивчає структуру, фізичні, хімічні і фізико-хімічні властивості активних речовин і їх мішені з метою встановлення загальних закономірностей, кількісного описання та пояснення механізмів реалізації процесів.

Фізико-хімічна фармакологія тісно пов'язана з іншими науками: фармацевтичною хімією – наукою про хімічну будову і фізико-хімічні властивості лікарських речовин; медичною хімією – наукою, що охоплює дослідження хімічного механізму дії ліків на молекулярному рівні; фармакогнозією – наукою про сировину рослинного та тваринного походження для отримання лікарських засобів.

В останні роки збільшується кількість досліджень, які стосуються вивчення всіх аспектів всмоктування, розподілу, метаболізму, елімінації ліків, а також біологічної відповіді організму на їх ведення. Така зацікавленість до даної проблеми представників різних галузей науки обумовлена перш за все тим, що рішення дозволяє підійти до розуміння самої суті біологічно активних речовин – до молекулярного механізму їх дії. В свою чергу такі знання дають можливість вирішити цілий ряд питань, пов'язаних з конструюванням, скринінгом та впровадженням в медичну практику нових фармако-терапевтичних засобів.

Стан даного наукового напрямлення характеризується великою кількістю фактів, але недостатньою систематизацією і узагальненням, частою відсутністю або неточністю кількісних даних, слабкою розробкою теоретичних питань та методів дослідження.

В методичних вказівках для проведення лабораторних занять з курсу «Фізико-хімічна фармакологія» наведені численні матеріали та методи для встановлення швидкості вивільнення речовин з лікарської форми для дослідження та розуміння основних механізмів дії сучасних знеболюючих та протизапальних препаратів, вивчення токсичності дії потенційних лікарських засобів.

ТЕМА 1. ШВИДКІСТЬ ВИВІЛЬНЕННЯ РЕЧОВИНИ З ТВЕРДОЇ ЛІКАРСЬКОЇ ФОРМИ

У зв'язку з розширенням фармацевтичного ринку за рахунок дженериків виникають питання оцінки ідентичності їх дії в порівнянні з оригінальними препаратами і необхідністю проведення досліджень з визначення їх взаємозамінності, оскільки ефективність, безпека, а також вираженість побічних ефектів відтворених лікарських препаратів (ЛП) можуть істотно відрізнятись [1, 2].

Основними причинами цього є відмінності у фармацевтичній технології виробництва ЛП, у використанні допоміжних речовин (ДР), властивості субстанцій, упаковці препарату, умов його зберігання, транспортування та ін. Безпека застосування відтвореного ЛП залежить і від наявності в нормативних документах (НД) певних показників якості, які найбільш повно відображають фізико-хімічні властивості лікарського засобу (ЛЗ).

В лікарських засобах для перорального застосування (таблетки, драже, капсули, гранули) легко та швидко можна оцінити якість, ефективність та безпечність [3].

Одним з найважливіших критеріїв якості цих твердих пероральних лікарських форм (ЛФ) є тест «Розчинення».

Тест «Розчинення» призначений для визначення кількості фармакологічно-діючої речовини, яка за певний проміжок часу має вивільнитися в середу розчинення з твердої дозованої форми.

Абсорбція фармакологічного засобу (ФЗ) з твердої дозованої форми при пероральному введенні залежить від його вивільнення з ЛП, розчинення або солюбілізації у фізіологічних умовах і проникності в шлунково-кишковому тракті. Внаслідок критичного характеру перших двох з цих ступенів, розчинення *in vitro* може бути використано для передбачення властивостей фармакологічних засобів *in vivo*.

Методика тесту «Розчинення» повинна виявляти зміни безпосередньо в самій лікарській формі, а також ті зміни, які можуть впливати на ефективність і безпеку лікарських засобів. Істотним

недоліком, який має тест «Розчинення», є його довгочасність. Час, необхідний для виконання визначень цього типу, залежить від розчинності лікарської речовини і від методу аналізу, що використовуються для кількісного визначення речовини в розчині [4, 5].

Залежно від швидкості розчинення лікарських речовин у лікарських формах розрізняють наступні групи готових лікарських препаратів [6]:

1 група: таблетки без оболонки, покриті шлунково-розчинною (простою) оболонкою і капсули;

2 група: шлунково-резистентні таблетки і капсули;

3 група: таблетки і капсули з модифікованим розчиненням (вивільненням).

Прилади для визначення швидкості розчинення. Використовують вітчизняний прилад «Обертаючий кошик» 545-АК-7, прилад фірми «Ервека» (рис 1.).



(А)



(Б)



(В)

Рис.1 Прилад «Обертаючий кошик» та основні його частини

А) Прилад «Обертаючий кошик»;

Б) Стандартний кошик;

В) Кошик для супозиторіїв.

У даному приладі, для запобігання зміни положення зразка, було виготовлено циліндричну ємність з напівсферичним дном, що дозволяє зафіксувати положення досліджуваного зразка ЛЗ [7].

Лабораторна робота 1

Визначення швидкості вивільнення речовини з таблетки (Тест «Розчинення»)

Мета заняття: вивчення кінетики вивільнення активних речовин з дослідних таблеток через різні проміжки часу (2, 6, 12 місяців) після виготовлення за температури 20 ± 5 °С.

Матеріали та обладнання: зразки досліджуваних лікарських засобів, прилад «Обертаючий кошик», спектрофотометр, скляні стакани, піпетки, паперовий фільтр «синя стрічка», розчин натрію гідрокарбоната, розчин хлористоводневої кислоти (0,1 моль / л).

Методика визначення розпаданя. Збирають прилад, поміщають в посудину зазначений об'єм середовища для розчинення, нагрівають його до температури $37,0 \pm 0,5$ °С. У кожному окрему лунку приладу «Обертаючий кошик» поміщають по одному зразку. Опускають кошик в посудину з рідиною і включають прилад. Після закінчення встановленого часу кошик виймають і досліджують стан таблеток і капсул. Всі зразки повинні повністю розпастися за певний проміжок часу, який вказаний в інструкції.

Слід вжити заходів для недопущення присутності бульбашок повітря на поверхні препарату. Обертання лопаті або кошику з вказаною швидкістю (± 4 %) починають негайно після внесення досліджуваного зразка в середовище.

Відбір проб та оцінка результатів. В зазначений час або через вказані інтервали, здійснюють відбір проб по 1 мл зазначеного об'єму з області між поверхнею середовища розчинення і верхньою частиною кошику на відстані не ближче 10 мм від стінки посудини (виключаючи ті випадки, коли використовуються безперервні вимірювання (відібрана рідина при цьому повертається назад в посудину) або коли відбирається тільки одна порція рідини, слід компенсувати відібраний об'єм рідини додаванням рівного об'єму середовища розчинення або відповідними змінами в розрахунках).

Зразок вважається повністю розчиненим, якщо крім фрагментів нерозчинної оболонки таблетки (капсули) на сітці немає інших

матеріалів, а залишок являє собою м'яку масу, яка не має відчутно твердого ядра.

Таблиця 1

Норми розпадання (розчинності) лікарських форм [5]

Лікарська форма (середя для визначення розпадання)	Норми розпадання
Пресовані таблетки (середя - вода)	Не більше 15 хвилин
Таблетки, вкриті оболонками, розчинними в шлунку (середя - вода)	Не більше 30 хв (якщо немає інших вказівок)
Кишково-розчинні таблетки	Не повинні розпадатися протягом 1 год в розчині кислоти хлористо-водневої (0,1 моль / л) і після промивання водою повинні розпадатися в розчині натрію гідрокарбоната (рН від 7,5 до 8,0) протягом не більше 1 год
Сублігвальні таблетки (середя - вода)	Не більше 30 хв
Таблетки для приготування розчинів (середя - вода)	Не більше 5 хв

Крім візуальної інтерпретації розчинення лікарського засобу досліджують **ступень розчинення** твердої дозованої форми, яка повинна перейти в розчин за певний період часу.

Методи оцінки розчинення лікарських речовин незамінні при порівнянні різних лікарських форм з однієї речовини і при контролі якості у виробничому процесі.

Під час розчинення відбуваються два процеси: вивільнення молекул з кристалічних зв'язків та їх дифузія в розчинник. Швидкість

розчинення представлена часом, необхідним на вивільнення молекули з кристалічного зв'язку, і часом, необхідним на дифузію. Її можна обчислити за наступним рівнянням:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{K \cdot D}{D + K + h} \cdot O \cdot (C_s - C),$$

(формула 1)

де dm / dt – кількість речовини, що переходить в розчин за одиницю часу;

K – константа швидкості;

O – поверхня розчиненої речовини;

C_s – насичена концентрація даної речовини;

C – концентрація даної речовини в певний час;

D – коефіцієнт дифузії;

h – товщина дифузійного шару.

Контрольні запитання для перевірки знань:

1. Роль наповнювачів у готових лікарських формах. Класифікація наповнювачів.
2. Вплив консервантів та стабілізаторів на можливі хімічні перетворення біологічно активної речовини.
3. Вплив умов транспортування та зберігання на стабільність лікарських засобів.
4. Терміни зберігання лікарських засобів. На які три групи можна поділити ЛЗ?
5. Що таке субстанції? Які показники якості вводять до аналітично-нормативного документу на них?
6. Класифікація лікарської форми на групи за агрегатним станом і консистенцією.
7. Які особливості для стандартів якості ЛФ порівняно з ЛЗ?
8. Які методи використовують для ідентифікації ЛЗ?
9. Назвати типи домішок, які можуть міститись у субстанціях лікарських засобів.

10. Основні критерії фармакопейного аналізу стосовно вибраного методу дослідження ЛЗ.
11. Що таке біоеквівалентність лікарського засобу?
12. Лікарські препарати із модифікованим вивільненням біологічно-активних речовин.
13. Якими фізичними та фізико-хімічними методами проводять ідентифікацію лікарських засобів?
14. Охарактеризувати фармакопейне поняття «розчинності».
15. Для ідентифікації яких ЛЗ використовують елементний аналіз, а для яких функціональний?
16. Перелічити причини та джерела появи домішок у лікарських препаратах.
17. Навести перелік показників, за якими визначають доброякісність для кожної ЛР згідно з ДФУ.

ТЕМА 2. МЕХАНІЗМ ДІЇ СУЧАСНИХ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ ПРИ ЗАПАЛЕННЯХ РІЗНОГО ГЕНЕЗУ

Запалення – це типовий патологічний процес, який сформувався в ході еволюції, як захисна пристосувальна реакція організму на вплив патогенних факторів, спрямована на локалізацію, знищення і видалення флогогенного агента.

Морфологічно запалення характеризується поєднанням трьох основних стадій: альтерації, ексудації і проліферації. Саме від вираженості тієї чи іншої стадії залежить тип запального процесу.

I стадія – **альтерація** – являється початковим моментом і пусковим механізмом запалення та поділяється на первинну і вторинну альтерацію.

Альтерація проявляється в зміні структури клітин, тканин і органів, що супроводжується порушенням їхньої життєдіяльності. Вона знаходить своє відображення у зміні функцій та структур тканин, охоплюючи всю суму дистрофічних процесів, некробіоз та некроз тканини. Альтерація виникає, у відповідь на пряму дію флогогенного фактора. Вона ніби пролонгує дію причини, яка викликала запалення [9, 10].

II стадія – **ексудація** – охоплює низку послідовностей, серед яких відзначається: 1) розлад місцевого кровообігу і зміни кровотворення в осередку запалення; 2) власне ексудація – вихід з рідкої частини крові, електролітів, білків та клітин лейкоцитів із судин в тканини; 3) еміграція лейкоцитів в осередок запалення. В результаті ексудації утворюється набряк – скупчення рідини в інтерстиціальних сполучнотканинних порожнинах.

III стадія – **проліферація** – є заключною ланкою запального процесу. Руйнівні процеси поступово змінюються відновними. Це, насамперед, розмноження клітин і компенсування дефекту. Водночас з розмноженням клітин навіть дещо випереджаючи його, відбувається припинення запального процесу: 1) інгібування ферментів; 2) дезактивація запалення; 3) виведення токсичних продуктів [11, 12, 13].

В осередку запалення під дією різних пошкоджуючих чинників активується фермент фосфоліпаза А (ФЛА), під впливом якої з фосфоліпідів клітинних мембран вивільняється арахідонова кислота.

Розщеплення арахідонової кислоти (АК) може відбуватися декількома шляхами: перший – це циклооксигеназний, з утворенням простагландинів, другий – ліпоксигеназний, з утворенням лейкотрієнів (рис 2).

Ліпоксигеназний шлях перетворення арахідонової кислоти є необхідним для підтримки тканинного та органного гомеостазу і може функціонувати як критичний регулятор виживання й апоптозу клітин. Цей шлях перетворення АК каталізується ферментами з родини ліпоксигеназ, які окислюють АК до гідропероксидних інтермедіатів [8]. Одним із них є гідропероксиейкозатетраєнова кислота (5-НРЕТЕ), яка в процесі швидкої деградації та ізомеризації подвійних зв'язків за участю 5-ліпоксигенази формує короткоіснуючу сполуку епоксидної природи – лейкотриєн А₄, який під час ферментативного гідролітичного розщеплення цитозольною гідролазою перетворюється на лейкотриєн В₄ [8].

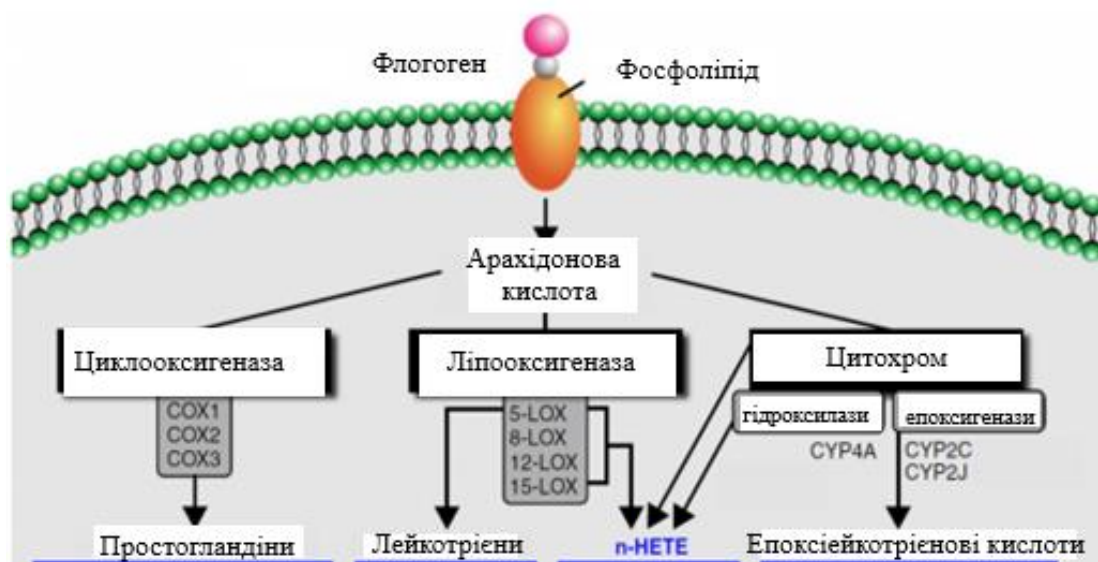


Рис. 2. Каскад метаболізму арахідонової кислоти [16]

Відкриття двох різних ізоформ ЦОГ: ЦОГ-1 і ЦОГ-2, є доказом того, що продукти окислення арахідонової кислоти потенціюють

запальні процеси та стимулюють синтез клітинних медіаторів протягом запальної реакції. Пошкодження тканин, незалежно від причин, що його викликало, може призвести до запалення. Але перебіг запального процесу, наприклад, бактеріального чи алергічного, значно відрізняється один від одного та має свій механізм перебігу. Тому, для фармакологічної корекції запалення існує цілий арсенал лікарських засобів, які різняться по між собою за напрямом дії [14, 15, 16].

На сьогоднішній день, найбільш поширеними є препарати за такими напрямками як:

- інгібітори циклооксигенази;
- інгібітори ліпооксигенази;
- інгібітори депо-залежних Ca^{2+} каналів (TRP - рецептори)

2.1 Циклооксигеназний та ліпооксигеназний шляхи метаболізму арахідонової кислоти

Циклооксигеназа – це фермент (офіційна назва – простагландин-ендопероксид-синтаза, PTGS), що відповідає за утворення протаноїдів з арахідонової кислоти.

Циклооксигеназа (ЦОГ) перетворює арахідонову кислоту в простагландин H_2 (PGH_2), який, у свою чергу, перетворюється в серію кінцевих активних продуктів (тромбоксан, простациклін, простагландин) в різних типах клітин.

Тромбоксан A_2 (TXA_2) є сильнодіючим судинно-звужуючим компонентом, а також стимулятором скупчення тромбоцитів. Простациклін (PGI_2), потрапляючи до ендотелію судин, інгібує скупчення тромбоцитів.

Простагландини PGE_2 і PGI_2 є потужними судинорозширювальними речовинами, на частку яких припадає збільшення кровопостачання в ділянках запалення [8]. З іншого боку, судинорозширювальні властивості PGE_2 і PGI_2 сприяють підвищенню секреції слизу, зниженню кислотності і вмісту пепсину в шлунку, тим самим захищаючи цілісність слизової оболонки шлунка.

В нирках, PGE₂ і PGI₂ збільшують приплив крові у відповідь на фактори, що викликають звуження кровоносних судин, і сприяють модуляції швидкості клубочкової фільтрації [16].

ЦОГ-1 у багатьох тканинах відіграє важливу роль в гомеостазі тканини. ЦОГ-2, яка знаходиться в різних клітинах і тканинах, є індукованою ізоформою, експресію якої стимулюють фактори росту цитокінів та пухлинних промоутерів.

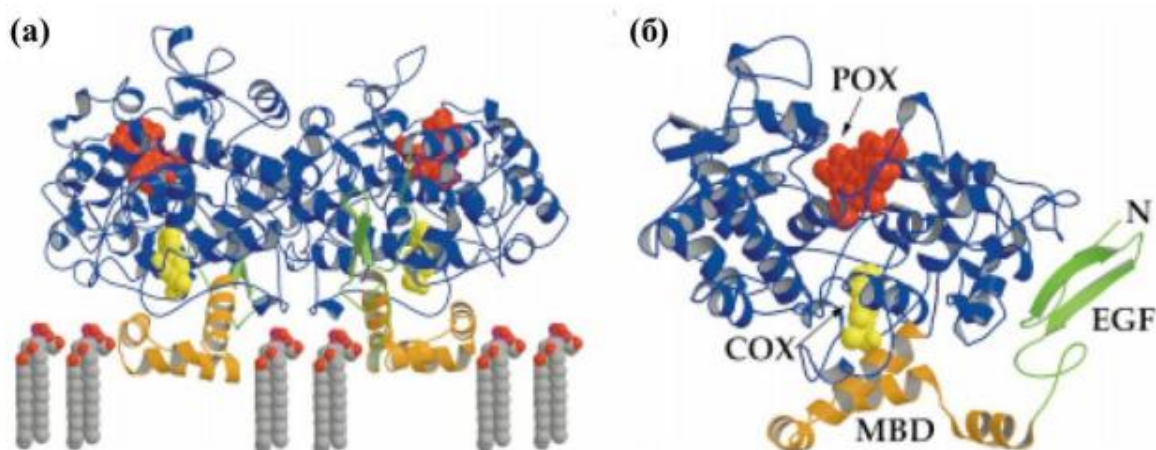


Рис. 3. Структура циклооксигенази - 1 [16]

а – стрічкове зображення циклооксигенази-1, асоційоване з мембраною-мішенню; **б** – структура мономера циклооксигенази-1.

Примітка: EGF – епідермальний фактор росту; COX – циклооксигеназний активний центр; POX – пероксидазний активний центр; МВР – домен зв'язування з мембраною.

ЦОГ-2 є індукцибельним ферментом, швидкість синтезу якого змінюється в залежності від умов існування організму, а регуляція здійснюється на генетичному рівні під дією індукторів, в ролі яких виступають відповідні субстрати і метаболіти.

Доведено, що ЦОГ-1 і ЦОГ-2 виконують практично однакові дії і є модуляторами запальних реакцій. Недавні дослідження показали, що ЦОГ-2, незалежно від зовнішніх обставин, виділяються в деяких тканинах, включаючи тканини мозку і нирок [12]. Крім того, ЦОГ-2

виконує захисну функцію при астмі і бронхоспазмах у пацієнтів з підвищеною чутливістю до аспірину. ЦОГ-2 може також відігравати важливу роль у гомеостазі інших функцій і органах, у тому числі в нирках, відновлення шлункової тканини, серцево-судинної системи, а також відновленні кісток [15]. Відомо, що ЦОГ-2, бере участь в процесах овуляції і неонатальному розвитку; це особливо важливо для нормального розвитку нирок у ембріонів.

Пригнічення ЦОГ розглядається як один з основних механізмів протизапальної активності НПЗЗ, так як при селективному інгібуванні даної ЦОГ-2 можна значно зменшити кількість побічних ефектів, супутніх інгібуванню ЦОГ-1 [12]. Важливим і найбільш обговорюваним аргументом потенційних недоліків селективних інгібіторів ЦОГ-2, є те, що зниження синтезу PGI₂, викликає розширення судин і пригнічує скупчення тромбоцитів, шляхом зупинення провадження тромбоксану A₂ (TXA₂), який викликає звуження судин і стимулює скупчення тромбоцитів.

Ліпооксигеназа (ЛОГ) – фермент, який містить негемоване залізо (Fe²⁺/Fe³⁺) та каталізує включення однієї молекули кисню в поліненасичені жирні кислоти з двома та більше ізольованими подвійними зв'язками. В неактивному стані ЛОГ локалізована в цитоплазмі, а ЛОГ-5 може розташовуватись в середині ядра (рис. 4).

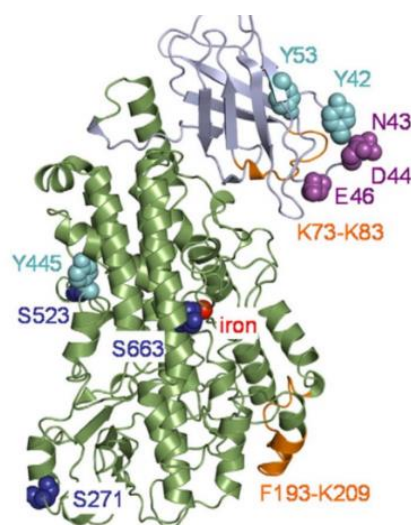


Рис. 4. Структура 5-ліпоксигенази [16]

Окиснення арахідонової кислоти під дією 5-ліпооксигенази супроводжується приєднанням молекули кисню в положенні 5, в результаті утворюється 5-гідроперексид з подальшим перетворенням в 5-оксидоарахідонову кислоту, тобто лейкотриєнів А, який є попередником інших ЛТ. Кінцевими продуктами ліпооксигеназного шляху окислення АК являються різні біологічно активні ліпідні медіатори, в том числі, лейкотриєни, ліпоксини, гепоксиліни, еоксини, протектини и т. д.

Ферменти, які беруть участь у метаболізмі АК, є мішенями дії широкого спектру природних і синтетичних фармакологічних агентів. В даний час численні фармакологічні агенти, особливо природного походження, здатні успішно пригнічувати метаболізм АК та активно використовуються в терапії цілого ряду запальних, алергічних та інфекційних захворювань [22, 25].

Представниками нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ) з вираженою протизапальною активністю є: ацетилсаліцилова кислота, лізінмоноацетілсаліцилат, дифлунізал, фенілбутазон, клофезон, індометацин, суліндак, етодолак, диклофенак, піроксикам, теноксикам, лорноксикам, мелоксикам, набуметон, ібупрофен, напроксен, флурбипрофен, кетопрофен, тіапрофенова кислота, фенпрофен, целекоксиб.

До НПЗЗ зі слабкою протизапальною активністю відносяться: мефенамінова кислота, етофенамат, метамізол, амінофеназон, пропіфеназон, кеторолак, парацетамол та ін.

2.2. Загальна характеристика сімейства TRP каналів

Рецептори перехідного потенціалу (Transient Receptor Potential – TRP) – важливий елемент сенсорних систем, що відносяться до суперсімейства інтегральних мембранних білків, виконуючих функцію іонних каналів.

TRP канали експресуються в різних тканинах і органах, і беруть участь у безлічі фізіологічних процесів – від сприйняття різноманітних стимулів до іонного гомеостазу. В основному представники сімейства є неселективними іонними каналами, однак,

деякі з них вибірково проникливі тільки для іонів Ca^{2+} або сильно гідратованих іонів Mg^{2+} [18, 19].

Сімейство TRP поділяється на сім підродин, згрупованих за структурною гомологією: TRPC (традиційні, канонічні), TRPV (ванілоїдні), TRPM (меластатинові), TRPA (анкіринові), TRPP (поліцистинові) та TRPML (муколіптинові) і TRPN рецептори (NOMPC-like, no mechanoreceptor potential C – подібні канонічним, проте не здатних сприймати механічний вплив), виявлених тільки у безхребетних і риб [20].

TRP ген був вперше описаний в процесі дослідження зорової системи *Drosophila melanogaster*. Під дією тривалого світлового роздратування у мутантних слабо зрячих мух спостерігалася нестійка електроретинограма на відміну від особин дикого типу. Подібний ефект був названий тимчасовим рецепторним потенціалом (Transient Receptor Potential – TRP). Через двадцять років американські учені клонували *trp* ген, що відповідає за нестабільний зір дрозофіл. Аналіз його нуклеотидної послідовності показав структурну подібність закодованого білку з катіонними каналами, а детальне дослідження струму, що індукується світлом в *trp* мутантах, свідчить, що носіями електричного заряду є катіони Ca^{2+} [21, 22].

Мономерний TRP білок складається з шести трансмембранних сегментів (S1 – S6) і петлі між сегментами S5 і S6, яка формує пору. Внутрішньоклітинні N- і С-кінцеві ділянки білка розрізняються по довжині і в залежності від доменів, що в них знаходяться (рис. 5).

На теперішній час відомо більше 100 *trp* генів у різних живих організмів. Гомологія амінокислотних послідовностей TRP каналів, що належать до одного біологічного виду, становить, як правило, 35 %, однак, для певних пар представників (TRPC6 і TRPC7, TRPM4 і TRPM5, TRPV5 і TRPV6) гомологія може досягати 50 % - 80 %.

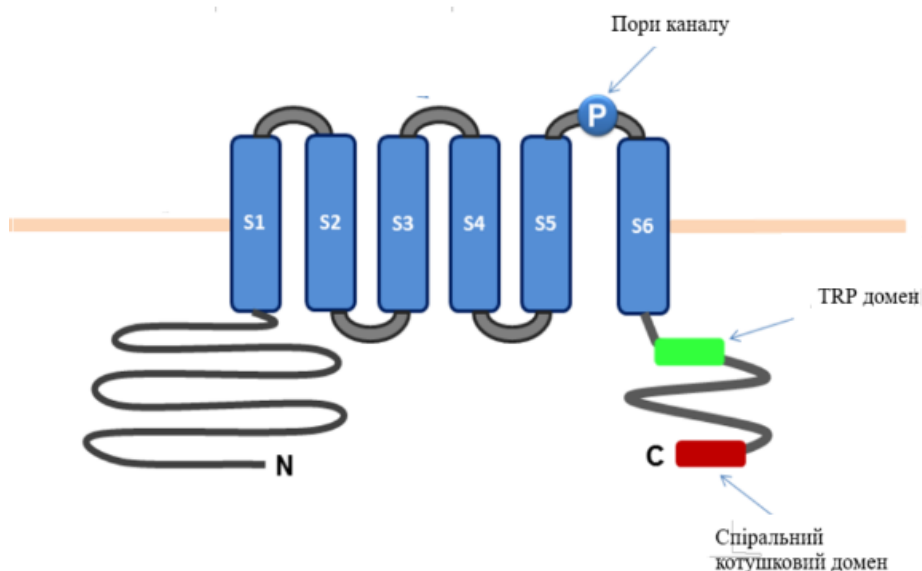


Рис. 5. Структура TRP іонних каналів

TRP канали експресуються практично в усіх збудливих і незбудливих тканинах. Деякі з них поширені повсюдно, інші зустрічаються тільки в певних клітинах. Роль TRP каналів в фізіологічних процесах варіюється від сенсорних функцій (наприклад, дія феромонів, трансдукція смакових відчуттів, ноцицепція і температурна чутливість) і підтримки гомеостазу (наприклад, Ca^{2+} і Mg^{2+} реабсорбція і осморегуляція) до скорочення м'язів і вазомоторного контролю [23].

2.3. TRPA1 – рецептор. Структура та фізіологічні функції рецептора TRPA1

Одним із способів вивчення механізмів сприйняття запалення і болю є дослідження іонних каналів і рецепторів, що беруть участь у передачі больового сигналу запального генезу. Больові сигнали мають різну природу і можуть надходити як з навколишнього середовища, так і від внутрішніх органів. Серед всіх експресуємих сенсорною системою рецепторів, що сприймають потенційно шкідливі стимули, в передачі практично всіх видів больових сигналів бере участь рецептор TRPA1. Він ідентифікує шкідливу дію навколишнього середовища (хімічне подразнення, механічний вплив і низькі температури), що викликає гострий біль; а також активується

під дією зміни внутрішнього середовища організму, тобто при запаленні, яке часто супроводжується хронічним болем.

Рецептор TRPA1 відіграє роль регулятора нейрогенного запалення. Він експресується в чутливих нейронах, іннервує різні тканини, такі як шкіра, епітелій кишечника і легень, слизова сечового міхура. При місцевому застосуванні агоністи TRPA1 викликають печіння, механічну і термічну гіперчутливість, а також нейрогенне запалення [23].

Рецептор TRPA1 є одним з учасників шляху передачі больових сигналів при запаленні і нейропатіях, поряд з рецепторами тирозинкінази і TRPV1. TRPA1 грає важливу роль хемосенсорів, а також бере участь в сприйнятті термічних і механічних впливів (рис. 6).

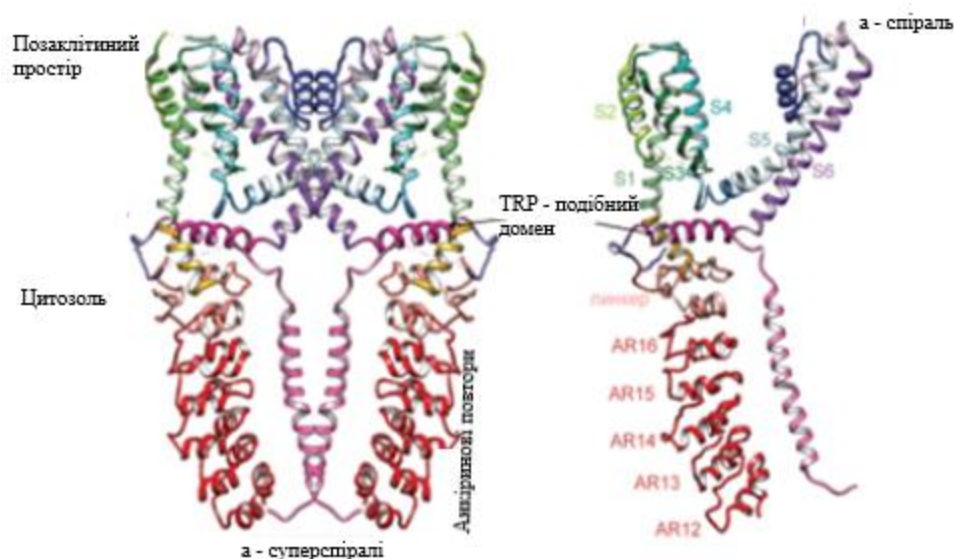


Рис. 6. Стрічкова структура субодиниці TRPA1 [23]

Агоністи TRPA1. Електрофільні агоністи TRPA1 активують рецептор за допомогою модифікації трьох цистеїнів і лізину, розташованих між анкіриновим доменом і S1 трансмембранним сегментом. До речовин, що зв'язуються з цими амінокислотними залишками, відносяться гострі компоненти їстівних рослин (алліцин з часнику), дратівливі компоненти сльозогінного газу (хлорацетофенону), α -, β -ненасичені карбонільні сполуки

(метілвінілкетон), продукти окисного стресу і перекисного окислення ліпідів), аллілізотіоціанат (васабі, гірчиця) та інші сполуки [18, 22].

Антагоністи TRPA1. До природних антагоністів людського TRPA1 відносяться камфора, базилік, полин, розмарин і 1,8-цинеол, який міститься в кардамоні, евкаліпті лимонному, шавлії, м'яті та ін. [25].

Першим запатентованим антагоністом TRPA1 було похідне ксантину, HC030031, яке діє на рецептор в мікромольних концентраціях. HC-030031 є еталонною сполукою і використовується в якості фармакологічного інструменту для підтвердження участі TRPA1 в різних патологічних процесах. HC-030031 селективно інгібує рецептор у багатьох ноцицептивних моделях, і на його основі було синтезовано велику кількість антагоністів [18].

Лабораторна робота 2

Методика індукування трипсинового запалення у щурів

Трипсинова модель запалення належить до групи запальних процесів короткої дії, використання якої призводить до активації протеїназ-активуючих 2-рецепторів, які, у свою чергу, призводять до синтезу циклооксигенази-2.

Мета заняття: змоделювати трипсиновий запальний процес, дослідити закономірності його розвитку за умов лікування та без застосування терапії.

Матеріали та обладнання: трипсин, штангельциркуль, плетизмометр, білі щурі лінії Вістар, Долгіт крем, Диклофенак – віола, аналітичні ваги, шпатель, мірна ємність, інсуліновий шприц.

Принцип роботи. Досліди мають проводитися на статеві дозрілих білих щурах лінії Вістар вагою 200 - 220 г, які утримуються на стандартному раціоні віварію при вільному доступі до води та їжі.

Запальну реакцію викликають субплантарним (під плантарний апоневроз) введенням 0,1 мл 0,5 % водного розчину трипсину в задню праву кінцівку тварин (рис. 7).



Рис. 7. Субплантарне введення запального агента в кінцівку щура

Спостереження за морфологічними змінами кінцівок тварин проводяться до ін'єкції флогогену та через 1, 2, 3, 4, та 6 год після введення запального агента.

Оцінку результатів експериментального дослідження визначають на підставі динаміки зміни таких показників, як: об'єм та товщина уражених кінцівок. Об'єм уражених кінцівок щурів визначали методом волюметрії за допомогою механічного плетизмометра, товщину фіксували електронним штангенциркулем) (рис. 8).



(А)



(Б)

Рис. 8. Вимірювання об'єму (А) та товщини (Б) уражених кінцівок щурів

Значення товщини ураженої кінцівки виражають графічно у відсотках відносно вихідних даних. Приріст об'єму та антиексудативну активність кожного дослідного фармакологічного засобу розраховували за формулами 2 та 3, згідно з показниками плетизмометра.

Приріст об'єму (ПО) кінцівки розраховували за формулою:

$$ПО = \left(\frac{O - I}{I} \right) * 100 \quad (\text{формула 2})$$

O – величина об'єму лапи після введення індуктора запалення;

I – величина об'єму лапи до введення індуктора запалення.

Антиексудативну активність (АА) розраховували за формулою:

$$АА = 100 - \left(\frac{O - I}{I} \text{ (д)} : \frac{O - I}{I} \text{ (к)} \right) * 100 \quad (\text{формула 3})$$

O – величина об'єму лапи після введення індуктора запалення;

I – величина об'єму лапи до введення індуктора запалення;

д – дослідна група;

к – контрольна група.

Значення товщини ураженої кінцівки виражали у відсотках відносно вихідних даних.

Для постанови експерименту необхідно сформувати три групи тварин по 6 щурів у кожній групі:

1 група тварин – контрольна (без базисного лікування);

2 група тварин – дослідна, має отримувати трансдермальні аплікації 5 % мазі ібупрофену (Долгіт-крем);

3 група тварин – дослідна, має отримувати трансдермальні аплікації Диклофенак – віола.

Аплікації фармакологічних засобів додатково наносяться після кожного вимірювання товщини та об'єму кінцівки тварин в дозі 200 мг/см².

Експерименти на тваринах проводяться відповідно до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших дослідних цілях» (Страсбург, Франція, 1986).

Лабораторна робота 3

Методика індукування зимозанового запалення у щурів

Зимозан – структурний полісахарид, який міститься в клітинних оболонках дріжджів, здатний провокувати локальну гостру запальну реакцію.

Зимозан здатний дезорієнтувати і транслокалізувати мембрани фосфоліпідів, що провокує потік кальцію всередину клітини та гідроліз мембранних фосфоліпідів, в результаті чого відбувається звільнення арахідонової кислоти по ліпооксигеназному шляху метаболізму з утворенням лейкотрієнів (ЛТ) та інших продуктів. Лейкотрієни відносяться до класу медіаторів, які синтезуються з фосфоліпідів клітинних мембран у процесі збудження клітини. В цьому відношенні вони відрізняються від гістаміну, серотоніну, брадикініну, кініну, ПГ, які знаходяться в гранулах базофілів. ЛТ є активними медіаторами запальної реакції, які порушують метаболізм арахідонової кислоти, підвищують проникність судинної стінки і впливають на імунні і алергічні реакції організму.

Мета заняття: змоделювати зимозановий запальний процес, дослідити закономірності його розвитку за умов лікування та без застосування терапії.

Матеріали та обладнання: трипсин, штангельциркуль, плетизмометр, білі щурі лінії Вістар, Долгіт крем, Диклофенак – віола, аналітичні ваги, шпатель, мірна ємність, інсуліновий шприц.

Принцип роботи. Гостру запальну реакцію викликати субплантарним (під плантарний апоневроз) введенням 0,1 мл 2 % розчину зимозану, який специфічно сприяє утворенню та виділенню лейкотрієнів (ЛТ) за участю ліпооксигенази (ЛОГ) (рис. 7).

Значення товщини ураженої кінцівки виражають у відсотках відносно вихідних даних. Приріст об'єму та антиексудативну активність досліджуваних зразків мазей визначається за здатністю зменшувати розвиток набряку у порівнянні з контрольною групою та розраховується за формулами 2 та 3 (див. стор. 21 – 22).

Для постанови експерименту необхідно сформувати три групи тварин по 6 щурів в кожній групі:

1. група тварин – контрольна (без базисного лікування);
2. група тварин – дослідна, отримуватиме трансдермальні аплікації 5 % маззю ібупрофену (Долгіт-крем);
3. група тварин – дослідна, має отримувати трансдермальні аплікації маззю Вольтарен.

Спостереження за морфологічними змінами кінцівок тварин проводяться до ін'єкції флогогену та через 1, 2, 3, 4, та 6 год після введення запального агенту.

Лабораторна робота 4

Метод індукування алілізотіоціанат-індукованого запалення

Відкриття представників родини TRP рецепторів надало ряд нових потенційних терапевтичних мішеней для лікування гострого болю запального генезису. Здатність впливати на TRP-канали дає можливість моделювати запалення та вивчати активність нових та вже існуючих протизапальних та знеболюючих препаратів.

Алілізотіоціанат є агоністом TRPA1-каналів, який активує їх периферичні рецептори за рахунок зв'язування з трьома залишками цистеїна та лізіна в N-кінцевій зоні рецептора, тим самим

викликаючи відчуття гострого болю та розвиток запального процесу у експериментальних тварин.

Мета заняття: змоделювати алілізотіоціанат-індукований запальний процес, дослідити закономірності його розвитку за умов лікування та без застосування терапії, а також за умов профілактичного нанесення дослідних зразків лікарських засобів.

Матеріали та обладнання: алілізотіоціанат, штангельциркуль, плетизмометр, білі щурі лінії Вістар, Долгіт крем, 2% мазь анестезину, аналітичні ваги, шпатель, мірна ємність, інсуліновий шприц.

Принцип роботи. Алілізотіоціанат-індуковане запалення викликають шляхом субплантарного введення 30 мкл розчину АІТЦ (100 мкг/кінцівку) у 1,2-пропіленгліколі під плантарний апоневроз задньої кінцівки щурів.

Динаміку зміни запального процесу оцінюють до початку експерименту та через 1, 2, 3, 4 та 6 годин після введення флогогенного агента шляхом вимірювання морфологічних показників – об'єму та товщини ураженої кінцівки. Лікарські засоби додатково наносилися на уражену кінцівку після кожного заміру її об'єму. Значення товщини ураженої кінцівки в кожен момент часу виражають у відсотках по відношенню до контролю, а приріст об'єму і протинабрякову активність розраховують за формулами 2 та 3.

Для постанови експерименту необхідно сформувати п'ять груп тварин по 3 щура в кожній групі:

1. група тварин – контрольна (без базисного лікування);
2. група тварин – дослідна, отримуватиме профілактичні (за 1 добу до експерименту) аплікації 5% мазь ібупрофену (Долгіт-крем) з подальшим лікуванням після введення флогогену;
3. група тварин – дослідна, має отримувати трансдермальні аплікації Долгіт-крему після введення флогогену;
4. група тварин – дослідна, отримуватиме профілактичні (за 1 добу до експерименту) аплікації 2% мазі Анестезину з подальшим лікуванням після ін'єкції запального агента;

5. група тварин – дослідна, має отримувати трансдермальні аплікації 2 % мазі Анестезину після ведення флогогену.

Контрольні запитання для перевірки знань:

1. Дайте визначення поняття «запалення»?
2. Які є основні зовнішні ознаки запалення? Пояснити механізм їх появи.
3. Основні медіатори запалення, їх походження, принципи класифікації?
4. З яких компонентів складається патогенез запалення?
5. Яке значення медіаторів запалення в розвитку вторинної альтерації?
6. Що таке циклооксигеназний шлях метаболізму арахідонової кислоти?
7. Загальна характеристика сімейства TRP каналів. Вказати локалізацію TRP каналів в організмі людини?
8. Які функції виконують профілактичні аплікації 2 % мазі анестезину за умов алілізотіоціанат-індукованого запалення.
9. Метаболізм арахідонової кислоти по ліпооксигеназному шляху перетворення.
10. Яка структура іонних каналів TRP-рецепторів?
11. Які медіатори запалення є похідними арахідонової кислоти? Як вони утворюються і як діють?
12. Що таке цитокіни? Яку роль вони відіграють у патогенезі запалення?
13. Що таке ексудація? Які механізми лежать в основі виходу рідкої частини крові з судин у запалену тканину?
14. Які порушення обміну речовин закономірно виникають у вогнищі запалення?
15. Які агоністи TRPA1 відомі в сучасній фармакології?
16. У чому полягає сутність стадії проліферації в патогенезі запалення?
17. Що таке “білки гострої фази запалення”? Що є причиною підвищення їхньої кількості при запаленні?

18. Структура та фізіологічні функції рецептора TRPA1?
19. Антагоністи TRPA1 та їх представники.
20. Що є причиною підвищення проникності судинної стінки у вогнищі запалення?
21. Який шлях метаболізму викликає ін'єкція трипсину в субплантарний апоневроз лабораторних щурів?

ТЕМА 3. МЕХАНІЗМ ДІЇ АНАЛГЕТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ТЕРМІЧНИХ ТА ХІМІЧНИХ МОДЕЛЯХ БОЛЮ

3.1 Ноцицептори. Передача больового сигналу

Більшість гострих та хронічних захворювань супроводжуються болем, який знижує якість життя людини, його соціальну адаптацію, викликаючи постійні страждання. Саме больові синдроми є однією з основних причин звернення людей за лікарською допомогою. Згідно з формулюванням міжнародного комітету експертів, біль – це неприємне сенсорне і емоційне переживання, пов'язане з потенційним пошкодженням тканини. [26].

Біль може бути класифікований різними способами.

1) По локалізації біль буває:

- соматичним поверхневим (в разі пошкодження шкірних покривів);
- соматичним глибоким (при пошкодженні кістково-м'язової системи);
- вісцеральним (при пошкодженні внутрішніх органів).

2) За місцем ушкодження структур нервової системи виділяють біль:

- нейропатичний, що виникає при пошкодженні периферичних нервів;
- центральний, що виникає при пошкодженні структур ЦНС.

3) При неспівпадині болю з місцем ушкодження:

- проєктний (наприклад, при стисненні спинномозкових нервових закінчень біль проєктується в інших зонах тіла);
- відображений (виникає внаслідок ушкодження внутрішніх органів і локалізується у віддалених поверхневих ділянках тіла, тобто біль відбивається по відношенню до шкірної поверхні).

4) За часовими характеристиками біль буває:

- гострий (нерозривно пов'язаний з пошкодженням і, як правило, є симптомом якого-небудь захворювання, зникає при усуненні пошкодження);

- хронічний (триває деякий період часу навіть після усунення причини його виникнення, часто набуває статус самостійної хвороби) [26, 27].

Процес сприйняття інтенсивних термічних, механічних або хімічних стимулів групою периферичних нервових волокон називається ноцицепцією, а волокна – ноцицепторами [28]. Ноцицептори мають дві аксональні гілки: периферичну і центральну; їх тіла знаходяться в спинномозкових вузлах (DRG), вузлуватих гангліях (NG) або тригемінальному вузлі (TG) (рис. 9). Залежно від розташування тіла клітини периферична гілка іннервує тіло людини або обличчя, а центральна гілка іннервує спинний мозок.

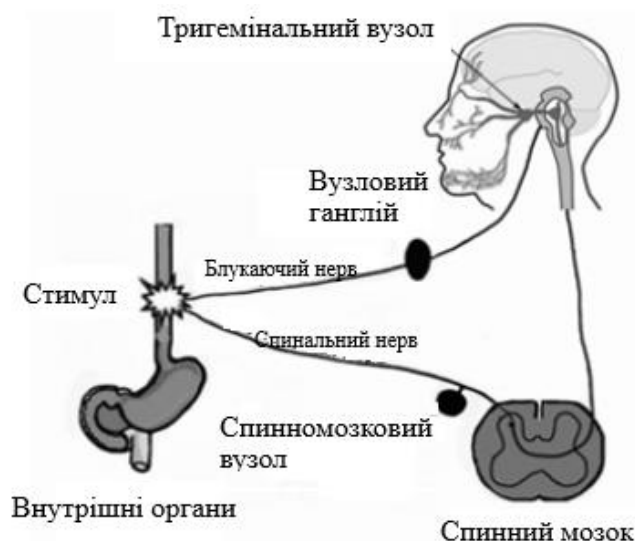


Рис. 9. Схема ноцицептивних шляхів [28]

Ноцицептори збуджуються тільки під дією потенційно шкідливих стимулів і діляться на два класи. До першого належать мієлінізовані чутливі нейрони середнього діаметра (A δ), які передають сигнали про гострий біль. Ці нейрони значно відрізняються від високо провідних A β волокон великого діаметра, які відповідають за сприйняття безболісних механічних стимулів (наприклад, легкий дотик). До другого класу ноцицепторів відносяться немієлінізовані «C» волокна маленького діаметру, які передають сигнали про «вторинний» або повільний біль.

Немієлінізовані «С» волокна в основному полімодальні, тобто сприймають як термічні, так і механічні стимули. Особливий інтерес представляють термочутливі немієлінізовані ноцицептори, що відповідають на механічний вплив при пошкодженні («тихі» ноцицептори) [29]. Ці нейрони також чутливіші до хімічних стимулів (капсаїцину або гістаміну), ніж полімодальні, і, найімовірніше, активуються під дією хімічного середовища в осередку запалення. Крім того, «тихі» ноцицептори реагують на різні алергени, що викликають свербіж. Однак не всі «С» волокна є ноцицепторами. Частина нейронів відповідає на зниження температури або приємні дотики, наприклад, прогладжування волосків на шкірі [30].

Центри болю (тіла нейронів в ЦНС) – таламус, сенсомоторні області кори, лобова кора. Антиноцицептивна система – система придушення больових відчуттів – складається з 4 відділів: опіатного, каннабіоїдного, гліцинового і ГАМК-ергічного.

У 1997 році були відкриті нові больові хеморецептори – ванілоїдні рецептори TRPV1, що локалізуються на шкірі, глибоких тканинах і внутрішніх органах, за винятком тканини мозку і печінки. Іонні канали TRPV1-рецепторів здатні активуватися за дії різних екзогенних та ендогенних чинників.

3.2 TRPV1 – рецептор. Модулятори TRPV1 рецептора

Одним із сучасних підходів до лікування багатьох запальних та больових станів є використання високоселективних агентів, здатних специфічно блокувати рецептори, які безпосередньо сприймають больові стимули (медіатори запалення). До таких рецепторів відносяться TRP-рецептори, а саме: ванілоїдні рецептори TRPV1 та анкіринові рецептори TRPA1.

Відомо, що обидва ці рецептори відносяться до неселективних кальцій-проникних катіонних каналів, які беруть участь у регуляції внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, відіграючи важливу сигнальну роль у нервових клітинах. Показано, що TRPA1- та TRPV1-канали здатні взаєморегулювати свою активність, і активація

одного з них може підсилювати або пригнічувати чутливість іншого до відповідних селективних агоністів [19].

TRPV1-рецептори відіграють важливу роль в ряді патологічних станів: при болях запального характеру, невропатичних і вісцеральних болях, панкреатитах та мігренях, захворюваннях дихальних шляхів. TRPV1-канали відносяться до полімодальних рецепторів, чутливих до високих температур (понад 43 °C), зміни рН (ацидоз і алкалоз), «ендованілоїдів» (анандаміди, метаболіти арахідонової кислоти тощо). З іншого боку, TRPV1-канали чутливі до дії таких різних «пекучих» рослинних продуктів, як капсаїцин (з гострого перцю), резинфератоксин (з рослини евкаліпту), піперин, їдкий інгредієнт чорного перцю), гінгерол і зінгерол (з імбиру), камфора, а також євгенол (з гвоздичної олії). TRPV1-канали можуть активуватися низкою хімічних агентів – етанолом, отрутою медуз і павуків та деякими іншими сполуками. Сучасні дані, отримані в експериментах *in vivo* та *in vitro*, дозволяють вважати TRPV1 важливим полімодальним рецептором, який об'єднує численні сигнали фізичних та хімічних стимулів під час запалення або пошкодження тканин в єдину ноцицептивну відповідь [20].

Активація TRPV1 призводить до підвищеної чутливості до больових стимулів або до появи больових відчуттів у відповідь на не болючі подразники, зниження температури тіла, посилення потовідділення. Дослідження аналгетичної активності в селективному тесті з агоністом TRPV1 – капсаїцином («капсаїциновий тест») є необхідним у вивченні специфічної фармакологічної активності. Механізм індукування болю даною сполукою наступний: капсаїцин, зв'язуючись із TRPV1 рецепторами, викликає збільшення внутрішньоклітинного кальцію, що призводить до вивільнення нейропептидів, таких як субстанція Р та пептид CGRP, який пов'язаний із геном кальцитоніну. Вивільнення вказаних пептидів забезпечує передачу сигналу до наступного нейрону, і, в кінцевому рахунку, подразнення передається до головного мозку [19, 21].

Агоністи та антагоністи TRPV1 іонних каналів широко використовуються як фармакологічні інструменти для досліджень

механізму дії лікарських препаратів різних груп, насамперед, анестетиків.

Лабораторна робота № 5

Дослідження анальгетичної активності на моделі термічного подразнення хвоста у щурів

Мета заняття: в тесті теплової імерсії хвоста встановити анальгетичну активність дослідних зразків мазі при аплікації засобів за різні проміжки часу до початку експерименту.

Матеріали та обладнання: білі щурі лінії Вістар, Долгіт крем, 2 % мазь анестезину, аналітичні ваги, шпатель, мірна ємність, термостат.

Принцип роботи. На відміну від інших больових тестів, даний метод чутливий до дії слабких анальгетиків, а також дозволяє проводити багаторазові експерименти на одних і тих же тваринах.

Таблиця 2

Вплив різних речовин на величину латентного періоду (в секундах)

Фармакологіч на група	Речовина	Доза (мг/кг)	Температура води		
			45°C	50°C	55°C
Опіати	Морфін	3	33±0,8	8,7±1,6	2,7±0,4
	Налорфін	30	7,6±2,5	3,0±0,7	0,9±0,1
Інгібітори ЦОГ	Напроксен	300	43,2±4,9	3,7±0,9	2,9±0,6
	Зомепірак	1000	16,0±7,1	-	-
	Ібупрофен	300	11,6±3,0	-	-
Психотропні речовини	d-амфетамін	3	9,8±4,6	-	-
	Хлопромазин	10	9,8±4,6	-	-
Контроль	Физраствор	-	11,0±1,5	2,5±0,4	0,9±0,1

Тест теплової імерсії хвоста заснований на спинальному флексорному рефлексі у відповідь на занурення хвоста в гарячу воду. Внаслідок того, що площа подразнення є великою, нагрівання

поверхні шкіри протікає стрімко, в результаті чого не відбувається активація терморецепторів, а відразу активуються С-волокна полімодальних ноцицепторів, А δ -волокна полімодальних ноцицепторів, полімодальні ноцицептори і високопорогові механорецептори [2]. В таблиці 1 представлені дані впливу різних речовин на величину латентного періоду.

Критерієм аналгетичного ефекту вважають достовірне збільшення латентного періоду реакції після трансдермального введення лікувального засобу.

Аплікації дослідних зразків мазей проводяться за різні проміжки часу (5, 10, 15, 20 та 30 хв) до початку експерименту.

Експерименти проводяться виключно з використанням статевозрілих щурів. Тварину фіксують у пеналі і заспокоюють. Болюче подразнення моделюють зануренням хвоста в гарячу воду температурою від 45 до 55 °С. Визначення здійснюють за часом латентного періоду початкового порогу больової чутливості у тварин під впливом ноцицептивного подразника (гарячої води) з урахуванням латентного періоду відповідної реакції в секундах (витагування хвоста з гарячої води) (рис. 10)



Рис. 10. Реєстрація больової реакції в тесті «гаряча вода»

Як правило, величина порогу больової чутливості в контрольній групі знаходиться в діапазоні від 3 до 30 секунд (найчастіше від 7 до 12 секунд). *Щоб уникнути пошкодження тканин не слід нагрівати хвіст більше 30 секунд!*

Аналгетичну активність визначали за здатністю досліджуваних мазей змінювати поріг больової чутливості експериментальних тварин у порівнянні із контрольною групою.

Лабораторна робота № 6 **Дослідження аналгетичної активності при термічному подразненні у тесті «гаряча пластина»**

Мета заняття: встановити аналгетичну активність дослідних зразків мазі в тесті «гаряча пластина» при аплікації засобів за різні проміжки часу до початку експерименту.

Матеріали та обладнання: статевозрілі миші, Долгіт крем, 2 % мазь анестезину, аналітичні ваги, шпатель, мірна ємність, тестова установка «гаряча пластина».

Тест «Гаряча пластина» – це поведінкова модель ноцицепції, яка використовується для скринінгу аналгетичного ефекту різних речовин та реєстру зміни больового порогу.

Конструкція тестової установки являє собою ящик (циліндр) з мідною або скляною підлогою, температура якої підтримується на постійному рівні (в основному 52-55 °С, рідше 45-50 °С) (рис. 11).

Тест «гаряча пластина» є базисним для дослідження аналгетичної активності, і використовується для виявлення аналгетичної ефективності сполук, які пригнічують соматичний поверхневий біль (табл. 2). Ряд спостережень показав, що сприйняття болю змінюється при впливі різних стрес-факторів. Це явище відоме як стрес-індукована гіпоалгезія. Так, у лабораторних гризунів, після впливу примусового плавання, спостерігається зниження больової чутливості, не пов'язане з впливом на гістамінову систему.



Рис. 11. Тестова установка «гаряча пластина»

Таблиця 3

Особливості поведінки тварин в тесті «гаряча вода»

Тип поведінки	Коротка характеристика
Пасивне обнюхування	Тварина залишається на одному місці і обнюхує навколишнє оточення. Голова піднята вгору
Активне обнюхування	Тварина активно пересувається і обнюхує все навколо
Стійки	Вертикальна рухова активність (стійки) без опори на стіни
Облизування передніх лап	Тварина вилизує передні лапи
Облизування задніх лап	Тварина облизує одну із задніх лап. Голова повернена назад
Постукування лапами	Тварина швидко піднімає і опускає задню лапу
Грумінг	Тварина вмивається за допомогою передніх лап
Чистка тіла	Тварина вилизує своє хутро або геніталії
Відсмикування задньої	Тварина відсмикує задню лапу, і деякий

ноги	час її не опускає
Стрибки	Тварина підстрибує над підлогою тестової установки
Завмирання	Тварина завмирає і чекає загрози ззовні. Голова повертається з боку в бік

Дана методика дозволяє визначати такі показники, як: аналгетичну активність досліджуваного об'єкту, піковий час аналгезії, тривалість аналгезії.

Принцип роботи. Для визначення аналгетичної активності в тесті «гаряча пластина» досліджувані зразки знеболюючого засобу наносять на задні кінцівки тварин за 5, 10, 15, 20 та 30 хв до початку експерименту і по черзі поміщають на пластину, нагріту до 55 °С (*Hot plate-метр, Columbus Instruments, США*).

Реєстрація часу з моменту поміщення тварини на гарячу поверхню до появи поведінкової відповіді на ноцицептивну стимуляцію: (облизування задньої лапи, відсмикування задньої лапи, стрибкові реакції) проводять впродовж 60 секунд. Показником аналгетичної активності вважали латентний час – тобто час в секундах до початку оборонного рефлексу тварин. Облизування задньої лапи є найбільш поширеним і надійним показником. *Максимальний час тестування складає 1 хв, щоб уникнути пошкодження тканин!*

Аналгетичну активність визначали за здатністю досліджуваних мазей змінювати поріг больової чутливості експериментальних тварин у порівнянні із контрольною групою.

На больову відповідь більш ефективно впливають анальгетики центральної дії, ніж периферичні (аспірин, фенилуксусна кислота). Різні групи анальгетиків по-різному впливають на поведінкові реакції. Опіодні засоби зазвичай подовжують латентний період реакції облизування кінцівки, а нестероїдні протизапальні засоби (аспірин або парацетамол) стрибкову реакцію, особливо якщо температура поверхні 50 °С і нижче або температура лінійно підвищується від 43 до 52 °С зі швидкістю 2,5 °С/ хв.

Лабораторна робота 7

Дослідження аналгетичної активності при хімічному подразненні у «капсаїциновому» тесті

Мета заняття: встановити аналгетичну активність дослідних зразків мазі в «капсаїциновому» тесті при аплікації засобів за різні проміжки часу до початку експерименту.

Матеріали та обладнання: статевозрілі миші, Долгіт крем, капсаїцин, інсуліновий шприц, 2 % мазь анестезину, аналітичні ваги, шпатель, мірна ємність, прозорий бокс для тварин, секундомір.

На теперішній час вивчений цілий ряд рецепторів з сімейства білків TRP-іонних каналів. Найбільш відомим представником цієї групи є рецептор капсаїцину TRPV1, відкриття якого стало важливим етапом у вивченні природи больових відчуттів на молекулярному рівні. TRPV1 рецептори знаходяться головним чином в ноцицептивних нейронах в периферичній нервовій системі, але вони також були описані в багатьох інших тканинах, в тому числі центральній нервовій системі. Чутливість ноцицептивних рецепторів TRPV1 може бути активована різноманітними екзогенними і ендогенними фізичними і хімічними подразниками. Активація TRPV1 призводить до підвищеної чутливості на больові стимули (гіпералгезія) або больові відчуття у відповідь на не болючі подразники (алодинія), зниження температури тіла, посилення потовиділення. Дослідження анальгетичної активності в селективному тесті з агоністом TRPV1 капсаїцином (капсаїциновий тест) є необхідним у вивченні специфічної фармакологічної активності дослідних зразків лікарських засобів.

Принцип роботи. Досліджувані зразки знеболюючого засобу наносять на задні кінцівки тварин за різні проміжки часу (5, 10, 15, 20 та 30 хв) до початку експерименту. Біль у експериментальних тварин викликають субплантарним введенням 20 мкл (6 мкг/кінцівку) розчину капсаїцину у 1,2-пропіленгліколі. Після введення подразнюючого агенту лапи тварини протирають етанолом, для запобігання роздратування капсаїцином екзогенних покривів шкіри.

Одразу після ін'єкції розчину флогогену кожну тварину поміщають у прозорий бокс та протягом 5 хвилин фіксують час, витрачений твариною на облизування ураженої кінцівки. Інтенсивність больової реакції оцінюють за тривалістю патернів облизування (в секундах) (рис. 12).



Рис. 12. Больові поведінкові реакції у щурів (облизування задньої кінцівки).

Аналгетичну активність визначають за здатністю досліджуваних мазей змінювати поріг больової чутливості експериментальних тварин у порівнянні із контрольною групою.

Лабораторна робота 8

Дослідження аналгетичної активності при хімічному подразненні у «формаліновому» тесті

Мета заняття: встановити аналгетичну активність дослідних зразків мазі у формаліновому тесті при аплікації засобів за різні проміжки часу до початку експерименту.

Матеріали та обладнання: статевозрілі миші, Долгіт крем, формалін, інсуліновий шприц, 2 % мазь анестезину, аналітичні ваги, шпатель, мірна ємність, прозорий бокс для тварин, секундомір.

Формаліновий тест передбачає реєстрацію ноцицептивної реакції гризунів на помірний, безперервний біль, викликаний пошкодженням тканин формаліном. У цьому сенсі «формаліновий тест» відрізняється від більшості термічних тестів, які ґрунтуються на коротких стимулах порогової інтенсивності. Вважається, що тест забезпечує більш ефективну модель клінічного болю, ніж тести з фазними механічними або температурними подразниками.

У відповідь на введення формаліну розвиваються дві больові фази. Перша фаза триває протягом 3-5 хв з початку ін'єкції, що пов'язано з хімічним впливом на ноцицептори і активацією С-волокон. Потім протягом 10-15 хв больова відповідь практично відсутня. Друга фаза починається через 15-20 хв. після ін'єкції і триває 20-40 хв, що пов'язано з запальною реакцією. Субстанція Р і брадикінін бере участь у першій фазі, в той час як гістамін, серотонін, простагландини і брадикінін – у другій. Також одним з механізмів ноцігенної дії формаліну є активація TRPA1-каналів, що реагують в нормі на холод і стимулюють розвиток запалення.

Опіоїдні анальгетики блокують обидві фази больової відповіді. Нестероїдні протизапальні засоби пригнічують тільки другу фазу, а місцеві анестетики – тільки першу.

Принцип роботи. Концентрація формаліну може бути від 0,05 до 15 % (частіше використовують 2-5 % розчин). Використання формаліну в більшій концентрації небажано, тому що викликає у мишей виражений «ефект завмирання» і низький рівень прояву поведінкових больових реакцій. Формалін в концентрації нижче 1 % може мати переваги в порівнянні зі звичайними концентраціями. Концентрація формаліну до 0,25 % може бути достатньою, щоб викликати двофазну ноцицептивну відповідь. При введенні формаліну в низьких концентраціях спостерігається субмаксимальна больова відповідь без порогового ефекту. Це не тільки полегшує виявлення слабких анальгетиків, але також робить можливим виявлення гіпералгезії і, крім того, завдає мінімальні пошкодження периферичних тканин [27].

Тестування проводиться з дотриманням певних умов, а саме в знайомій для гризунів обстановці з усуненням всіх можливих стресових агентів навколишнього середовища (звуків, запахів, освітлення), які можуть маскувати больову відповідь в першій фазі.

Формалін рекомендується вводити в задню лапу тварин, так як природний грумінг гризунів рідко включає задні кінцівки, що забезпечує більш достовірну реєстрацію больових реакцій. Найчастіше ін'єкції здійснюють в дорсальну частину лапи (субплантарно під плантарний апоневроз). Реєстрацію больових реакцій (постукування лапою об підлогу, покусування лапи та ін.) в першій фазі проводять протягом 5 хвилин після ін'єкції флогогену, в другій фазі – 15-20 хвилин після введення формаліну.

Залежно від введеної концентрації формаліну можна зареєструвати 4 типи поведінкових реакцій:

- 1 - відсутність реакції;
- 2 - лапа залишається на землі, але тварина на неї не спирається;
- 3 - лапа піднята;
- 4- тварина облизує або гризе лапу.

Аналгетичну активність досліджуваних зразків мазі в формаліновому тесті можна представити у вигляді середнього латентного часу групи в залежності від відсоткового пригнічення больової реакції (ПБР), яка розраховується за формулою:

$$\text{ПБР} = \frac{(T_{\text{контр.}} - T_{\text{досл.}})}{T_{\text{контр.}}} * 100$$

(формула 4)

де T – час больової реакції.

Ефективність ЛЗ можна оцінювати за здатністю досліджуваних зразків змінювати поріг больової чутливості експериментальних тварин у порівнянні із контрольною групою.

Контрольні запитання для перевірки знань:

1. Класифікація болі, які існують класифікації?
2. Що таке ноцицептори ? Структура ноцицепторів.

3. Назвіть центри болю та їх локалізацію в організмі.
4. Що таке антиноцицептивна система? За що відповідає антиноцицептивна система?
5. Модулятори TRPV1-рецепторів синтетичного та природного походження.
6. Де локалізовані в організмі людини іонні канали TRPV1-рецепторів?
7. На якому рефлексі заснований тест «теплова імерсія хвоста»?
8. Назвіть антагоністи та агоністи TRPV1-рецепторів.
9. В якому аналгетичному тесті досліджують пригнічення соматичного поверхневого болю?
10. Назвіть особливості поведінки тварин в тесті «гаряча пластина».
11. Опишіть механізм дії капсаїцину при субплантарному введенні його досліджуваним тваринам.
12. Формаліновий тест, його характеристика та фази.

ТЕМА 4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ПОТЕНЦІЙНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Токсичність – здатність речовин, діючи на біологічні системи, викликати їх пошкодження, порушуючи фізіологічні функції організму, а при важких ушкодженнях призводити до загибелі.

Вимірювання токсичності означає визначення кількості речовини, яка здатна викликати різні форми токсичного процесу. Чим в меншій кількості речовина ініціює токсичний процес, тим вона більш токсична.

Ступінь токсичності речовини характеризується величиною **токсичної дози, токсичної концентрації, токсодози**, дії яких викликають різні несприятливі ефекти (порушують працездатність, викликають захворювання або смерть).

Токсична доза (D) – кількість речовини, що потрапила у внутрішні середовища організму і викликала токсичний ефект. Вона виражається в одиницях маси токсиканту на одиницю маси організму (мг / кг).

Токсична концентрація (C) – кількість речовини, що знаходиться в одиниці об'єму (маси) якогось об'єкта навколишнього середовища (води, повітря, ґрунту), при контакті з яким розвивається токсичний ефект. Вона виражається в одиницях маси токсиканта на одиницю об'єму середовища (повітря, води) – (мг/л; г/м³) або одиницю маси середовища (ґрунту, продовольства) – (мг/кг).

При визначенні токсикологічних характеристик речовин (лікарських засобів) визначення гострої токсичності, як правило, є першим етапом, метою якого є одержання інформації щодо небезпечності досліджуваної речовини для здоров'я в умовах короткотривалої дії. Ці дані можуть братись за основу для визначення класу токсичності і є першим кроком до встановлення режимів дозування при проведенні досліджень гострої, хронічної, специфічної токсичності та інших випробувань, а також надавати первинну інформацію про токсичну дію речовини або фармакологічного препарату [30].

Визначення параметрів гострої токсичності дозволяє отримати необхідну інформацію для вирішення наступних завдань:

- встановлення рівня токсичності досліджуваної фармакологічної речовини та отримання даних щодо її токсикодинаміки;
- визначення співвідношення між дозою та негативними ефектами;
- визначення видової та статевої чутливості лабораторних тварин щодо дії досліджуваної речовини;
- встановлення параметрів токсичності для визначення доз при проведенні гострих та хронічних експериментів та дослідження спеціальних видів токсичності;
- порівняльна оцінка токсичності досліджуваної речовини з найактивнішим з існуючих прототипів або аналогом, які використовуються в практичній медицині.

Вирішення цих завдань вимагає визначення основних параметрів токсичності речовин, а саме: середньо-смертної дози та її стандартної помилки ($LD_{50} \pm m$).

Середня смертельна доза (LD_{50}) – це статистично розрахована доза речовини, введення якої викликає загибель 50 % стандартної групи піддослідних тварин протягом певного терміну спостереження. Величина LD виражається відношенням маси (об'єму) досліджуваної речовини до одиниці маси тіла тварини (мг/кг, мл/кг та ін.) [30, 31].

Вибір доз може базуватись на результатах попередніх пошукових досліджень. Кількість окремих дозових рівнів і проміжки між ними повинні забезпечувати можливість віднесення досліджуваної речовини за токсичністю до конкретного класу і бути достатніми для побудови кривої «доза – ефект» та визначення DL_{50} . Згідно з класифікацією речовин за токсичністю виділяють шість класів токсичності: надзвичайно токсичні, високотоксичні, помірно токсичні, малотоксичні, практично нетоксичні, відносно нешкідливі (табл. 3).

Дослідження токсичності нових речовин проводяться як на лінійних (щури ліній Wistar, Sprague-Dawley та ін.; миші ліній CBA, C57B1/6 та ін.), так і нелінійних тваринах. Число тварин в групі

Класифікація речовин за токсичністю [30]

Клас токсичності	Ступінь токсичності	DL ₅₀ , мг/кг маси тіла			
		Внутрішньо-шлункове введення	Нанесення на шкіру	Підшкірне введення	Внутрішньо-очеревинне введення
I	Надзвичайно токсичні	<1	<5	<0,3	<0,2
II	Високотоксичні	1 - 5	5 - 43	0,4 - 15	0.3 - 10
III	Помірно токсичні	50 - 500	44 - 340	16 - 150	11 - 100
IV	Малотоксичні	500 - 5000	350 - 2810	151 - 1500	101 - 1000
V	Практично нетоксичні	5000 - 15000	2820 - 22590	1501 - 4500	1001 - 3000
VI	Відносно нешкідливі	> 15 000	> 22 600	>4 500	>3 000

залежить від цілей дослідження, набору проведених тестів, їх сумісності (можливості одночасного проведення на одній і тій же тварині), очікуваної дисперсії результатів вимірів, але не повинно бути менше 10 особин в групі.

Способи введення досліджуваних речовин повинні бути такими же, як і передбачуваний шлях його попадання в організм людини: активні речовини, що входять до складу ін'єкційних форм і розчинів вводять парентерально, ЛЗ для прийому всередину вводяться в складі корму або внутрішньошлунково через зонд; для місцевого застосування – наносять на шкіру; аерозольні засоби досліджуються при інгаляційному введенні [30].

Кількість досліджуваних речовин розраховують:

- на одиницю маси тіла тварини при парентеральному або ентеральному введенні;
- на площу поверхні при нанесенні на шкіру;
- через об'ємну концентрацію в м³ при інгаляційному впливі.

Тривалість спостережень за станом тварини після одноразового (або багаторазового протягом 24 год) введення фармакологічної речовини складає не менше 14 днів. Але цей період не є жорстко фіксованим, оскільки визначається токсичними реакціями, швидкістю їх настання та тривалістю періоду відновлення, і, отже, при необхідності може бути пролонгований. Терміни виникнення та зникнення токсичних проявів, а також загибелі є важливими показниками для встановлення токсичної дії досліджуваних зразків лікувальних засобів.

Лабораторна робота 9

Методика проведення експерименту по встановленню гострої токсичності

Мета заняття: визначення переносимих токсичних і летальних доз досліджуваних речовин і причин загибелі тварин після одноразового введення досліджуваного зразку речовини.

Матеріали та обладнання: експериментальні тварини, досліджувані зразки речовини, шприц, зонд для перорального введення засобу, 40 % водно-етанольна суміш.

Принцип роботи: Введення 40 % водно-етанольної суміші тваринам проводиться одноразово або дрібно протягом доби. Тварини дослідних груп отримують матеріал не менш ніж в трьох послідовно зростаючих дозах. Діапазон зміни доз зразка, який тестується повинен поширюватися від імовірно токсичної дози до імовірно безпечної.

Таблиця 5

Доза, мг/кг	ЛД ₅₀ , мл/кг маси тіла								
	20	40	60	80	100	120	140	160	Сума
Кількість загиблих тварин									

Тварини контрольної групи (груп) отримують носій дослідного зразка (дисперсійне середовище) або його хімічний аналог традиційного ступеня дисперсності при його наявності в еквівалентних кількостях з використанням ідентичного методу введення.

Після введення дослідного матеріалу тварин поміщають в клітки. У наступний період часу (14 днів) доступ до їжі і води не обмежують. Протягом усього періоду експерименту здійснюють спостереження за тваринами і фіксацію інтегральних фізіологічних і поведінкових реакцій.

Щодня визначають число загиблих тварин в кожній групі. Загиблих тварин в день загибелі піддають розтину з метою встановлення безпосередньої причини смерті і виявлення розвинулися посмертних патологічних змін.

Тварин, які вижили на 15-й день експерименту, піддають евтаназії шляхом інгаляції CO₂ в спеціальних камерах з подальшим вивченням макроскопічних та мікроскопічних показників внутрішніх органів.

Перевірку достовірності відмінності між контрольною групою і групами, які отримували дослідний матеріал, проводиться з використанням критеріїв непараметричної статистики – тестів Манна-Уїтні та за методом Спірмена-Кербера.

Лабораторна робота 10

Методика проведення експерименту по встановленню підгострої і хронічної токсичності

Мета заняття: є отримання інформації про основні токсичні ефекти дослідних зразків, латентний період розвитку ефектів в залежності від дози і ефектів.

Матеріали та обладнання: експериментальні тварини, досліджувані зразки речовини, шприц, зонг для перорального введення засобу, рослинні екстракти.

Принцип роботи: На основі результатів попередньої характеристики гострої токсичності експериментальним тваринам щодня вводять високу, низьку і середню дозу дослідного зразку ЛЗ. Протягом усього експерименту тварини отримують стандартний корм в режимі вільного доступу. Доступ до води також не обмежують.

Протягом усього експерименту щодня зважують тварин на технічних вагах з точністю ± 1 г. Визначають абсолютний і відносний приріст маси тіла тварин протягом кожного тижня і за весь період експерименту в цілому.

Щодня перевіряють наявність загиблих тварин в кожній з груп. Загиблих тварин в день виявлення піддають розтину з метою встановлення причини смерті і виявлення посмертних змін в морфології внутрішніх органів.

Таблиця 6

Доза, мг/кг	LD ₅₀ , мг/кг маси тіла								
	30	90	150	210	270	330	390	450	Сума
Кількість загиблих тварин									

Після закінчення періоду введення дослідних матеріалів і контрольних препаратів тварин всіх груп піддають евтаназії. Тварин зважують, видаляють внутрішні органи і визначають їх масу на лабораторних вагах з точністю $\pm 0,01$ г. Біоптати органів відбирають для морфологічного дослідження згідно з планом експерименту. Результати лабораторних аналізів піддають статистичній обробці з метою встановлення відмінностей в показниках між експериментальними групами тварин.

Контрольні запитання для перевірки знань:

1. Що таке токсичність? Як проводять вимірювання токсичності?
2. Якою величиною характеризується ступінь токсичності речовини?
3. Дайте визначення терміну «токсична доза» та «токсична концентрація».
4. Назвіть основні параметри гострої токсичності.
5. Середня смертельна доза (LD_{50}). В чому виражається величина LD_{50} ?
6. Класифікація речовин за токсичністю.
7. Як розраховують кількість досліджуваних речовин для LD_{50} за різних способів ведення.
8. Тривалість дослідження для встановлення підгострої і хронічної токсичності.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Тихонов О. І., Ярних Т. Г. Аптечна технологія ліків : підручник для студ. фарм. ф-тів ВМНЗ України III – IV рівнів акредитації. Вид. 4-те, випр. та допов. Вінниця : Нова Книга, 2016. - 536 с.
2. Деримедведь Л. В., Перцев И. М. Взаимодействие лекарств и эффективность фармакотерапии : справ. пособие для врачей и фармацевтов. Харьков : Мегаполис, 2002. - 784 с.
3. Гордеева В. В. Лекарственные формы с регулируемым высвобождением. Часть 1. Системы доставки: учебное пособие. Иркутск : ИГМУ, 2012. - 51 с.
4. Давтян Л. Л. Лікарська взаємодія та безпека ліків : навч. посіб. К.: Авіцена, 2011. - 744 с.
6. Сысуев Б. Б. Современное состояние исследований разработок в области инновационных лекарственных форм и их модификации. Вестник ВолгГМУ. 2014. Вып. 4 (52). С. 7-12.
7. Фармацевтичні та медико-біологічні аспекти ліків : навч. посіб.- 2-е вид., перероб. та доп. - Вінниця : Нова книга, 2007. - 728 с.
8. Кулинский В. И. Биохимические аспекты воспаления. Сибирский медицинский журнал. 2007. Т. 68. № 1. С. 95 - 102.
9. Руднов В. А. От локального воспаления к системному: выход на новые представления патогенеза критических состояний и перспективы терапии. Интенсивная терапия. 2006. Т. 3 № 1. С. 5 - 8.
10. Буланкина И. А., Арсентьева Н. И., Лебединский В. Ю. Сопоставительный анализ и закономерности изменений струпа и биомеханических свойств кожи в очаге асептического воспаления. М.: Медицина, 2007. № 3. 36 с.
11. Белоцкий С. М., Авталион Р. Р., Белоцкий С. М. Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты. М : Бином, 2008. 240 с.
12. Маянский Д. Н. Хроническое воспаление. Патогенез воспаления. М.: Медицина. 1991. 272 с.

13. Насонов Е. Л. Специфические ингибиторы ЦОГ-2: решенные и нерешенные проблемы. Клиническая фармакология и терапия, 2000. № 1. С. 57 - 64.
14. Сергеева М. Г. Каскад арахидоновой кислоты. М.: Народное образование. 2006. 256 с.
15. Симонова О. В., Немцов Б. Ф. Клиническое применение нестероидных противовоспалительных препаратов. Учебное пособие для медицинских вузов. М: Медицина. 2007. 123 с.
16. Gretzer B., Maricic N., Respondek M. Effects of specific inhibition of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 in the rat stomach with normal mucosa and after acid challenge. Br. J. Pharmacol. 2001. Vol. 132. № 7. P. 1565 - 1573.
17. Kuhn H., Banthiya S., van Leyen K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. Biochim.Biophys. Acta. 2015. V. 1851. P. 308 - 330.
18. Premkumar L. S. Transient receptor potential channels as targets for phytochemicals. ACS Chem. Neurosci. 2014. V. 5. № 11. P. 1117 - 1130.
19. Julius D. TRP channels and pain. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2013. Vol. 29. P. 355 - 384.
20. Brito R. TRPV1: a potential drug target for treating various diseases Cells. Nature. 2014. Vol. 3. № 2. P. 517 - 545.
21. Morales-Lázaro S. L. A painful link between the TRPV1 channel and lysophosphatidic acid. Life Sciences. 2015. V. 125. P. 15 - 24.
22. Wu L. J., Sweet T. B., Clapham D. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. Pharmacol Rev. 2010. Vol. 62, № 3. P. 381 - 404.
23. Paulsen C. E., Armache J. P., Gao Y. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. Nature. 2015. Vol. 525. № 7570. P. 511 - 517.
24. Moran M. M., McAlexander M. A., Bíró T. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. Nat. Rev. Drug Discov. 2011. Vol. 10, № 8. P. 601 - 620.

25. Paulsen C. E. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature*. 2015. Vol. 520, № 7548. P. 511 - 517.

26. Nagata K. et al. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *Neurosci*. 2005. Vol. 25, № 16. P. 4052 - 4061.

27. Алексеев В. В., Баринов А. Н., Кукушкин М. Л. Боль. Руководство для врачей и студентов. М.: МЕДпресс-информ. 2009. 303 с.

28. Кукушкин М. Л. Хроническая боль: механизмы развития. М.: Медицина 2010. №4. С. 23 - 28.

29. Кукушкин М. Л., Хитров Н. К. Общая патология боли.- М.: Медицина. 2004. 144 с.

30. Стефанов О. В. Доклинические исследования лекарственных препаратов. К.: Авиценна, 2001. 528 с.

31. Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии. 2011. 23 с.

Навчальне видання

Еберле Лідія Вікторівна
Кобернік Альона Олександрівна

Фізико-хімічна фармакологія

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
для проведення лабораторних занять з курсу

В авторській редакції

Підп. до друку 25.10.2021. Формат 60x84/16.
Ум.-друк. арк. 3,14. Тираж 12 пр.
Зам. № 2401.

Видавець і виготовлювач
Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова

Україна, 65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12
Тел.: (048) 723 28 39. E-mail: druk@onu.edu.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.