

Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет

Узгоджено

Проректор з науково-педагогічної роботи
(інноваційної та науково-дослідної)

Національного фармацевтичного університету

МОЗ України

проф. А.Л.Загайко



» серія 2019 р.

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВИВЧЕННЯ
АДИКТИВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ХІМІЧНИХ РЕЧОВИН
ТА ЇХ ЗДАТНОСТІ ВИКЛИКАТИ ФІЗИЧНУ ЗАЛЕЖНІСТЬ**

Харків – 2019

УДК 615.015.6:57.084.1

Установи-розробники:

Національний фармацевтичний університет МОЗ України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Укладачі:

д. мед. н., професор	Штриголь С. Ю.	тел. (057) 706-30-69
к. фарм. н., доцент	Подольський І. М.	тел. (0572) 67-92-04
к. мед. н., доцент	Штриголь Д. В.	тел. (057) 705-11-71
к. фарм. н.	Цивунін В. В.	тел. (057) 706-30-69

Рецензенти:

д. мед. н., професор, заслужений діяч науки і техніки України, головний науковий співробітник відділу медичної хімії ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» Лук'янчук В. Д.

д. фарм. н., професор, завідувач кафедри медичної та біоорганічної хімії Харківського національного медичного університету МОЗ України Сирова Г. О.

Голова експертної проблемної комісії МОЗ і НАМН України «Фармація»: академік НАН України, професор, д. фарм. н., д. хім. н. Черних В. П.

Методичні рекомендації з експериментального вивчення адиктивного потенціалу хімічних речовин та їх здатності викликати фізичну залежність : метод. рек. / С. Ю. Штриголь, І. М. Подольський, Д. В. Штриголь, В. В. Цивунін. – Харків, 2019. – 42 с.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Загальні аспекти планування експерименту у методиках виявлення адиктивного потенціалу хімічних речовин та їх здатності викликати фізичну залежність	8
1.1. Характеристика фармакологічної речовини	8
1.2. Розчинники і розбавники	8
1.3. Дози, шляхи і режими введення	8
1.4. Експериментальні тварини	9
1.5. Умови проведення дослідження	9
1.6. Тривалість дослідження	9
1.7. Рекомендації щодо вибору препарату порівняння	10
РОЗДІЛ 2. Методики виявлення адиктивного потенціалу хімічних речовин	11
2.1. Загальні положення	11
2.2. Загальна характеристика методик визначення адиктивного потенціалу	12
2.2.1. Умовна реакція переваги місця (УРПМ)	12
2.2.1.1. <i>Мета і задачі експерименту</i>	12
2.2.1.2. <i>Обладнання, інструменти і реактиви</i>	12
2.2.1.3. <i>Опис методу</i>	12
2.2.1.4. <i>Можливості та обмеження методу, його прогностичне значення</i>	14
2.2.2. Ініціація внутрішньовенного самовведення у мишей (PBC)	15
2.2.2.1. <i>Мета і задачі експерименту</i>	15
2.2.2.2. <i>Обладнання, інструменти і реактиви</i>	15
2.2.2.3. <i>Опис методу</i>	15
2.2.2.4. <i>Можливості та обмеження методу, його прогностичне значення</i>	16
2.2.3. Лікарське диференціювання	16
2.2.3.1. <i>Мета і задачі експерименту</i>	16
2.2.3.2. <i>Обладнання, інструменти і реактиви</i>	17
2.2.3.3. <i>Опис методу</i>	17
2.2.3.4. <i>Можливості та обмеження методу, його прогностичне значення</i>	18
2.2.4. Внутрішньовенне самовведення у щурів (підтримання) ..	18
2.2.4.1. <i>Мета і задачі експерименту</i>	18
2.2.4.2. <i>Обладнання, інструменти і реактиви</i>	18
2.2.4.3. <i>Опис методу</i>	19
2.2.4.4. <i>Можливості та обмеження методу, його прогностичне значення</i>	20

2.2.5.	Реакція електричної самостимуляції (РЕС) системи «нагороди» мозку	21
2.2.5.1.	<i>Мета і задачі експерименту</i>	21
2.2.5.2.	<i>Обладнання, інструменти і реактиви</i>	21
2.2.5.3.	<i>Опис методу</i>	22
2.2.5.4.	<i>Можливості та обмеження методу, його прогностичне значення</i>	22
РОЗДІЛ 3. Методики дослідження здатності хімічних речовин викликати фізичну залежність		
3.1.	Загальні положення	24
3.2.	Специфічні ознаки синдрому відміни	24
3.3.	Загальна характеристика методик дослідження здатності хімічних сполук викликати фізичну залежність	26
3.3.1.	Метод оцінки розвитку спонтанного синдрому відміни (без провокації)	26
3.3.1.1.	<i>Мета і задачі експерименту</i>	26
3.3.1.2.	<i>Планування експерименту</i>	24
3.3.1.3.	<i>Опис методу</i>	27
3.3.1.4.	<i>Можливості та обмеження методу, його прогностичне значення</i>	27
3.3.2.	Метод оцінки розвитку синдрому відміни з провокацією відповідним фармакологічним агентом	27
3.3.2.1.	<i>Мета і задачі експерименту</i>	27
3.3.2.2.	<i>Вибір специфічного індуктора абстинентного синдрому</i>	28
3.3.2.3.	<i>Планування експерименту</i>	29
3.3.2.4.	<i>Опис методу</i>	29
3.3.2.5.	<i>Можливості та обмеження методу, його прогностичне значення</i>	30
3.3.3.	Комбінований протокол експерименту з оцінки розвитку синдрому відміни	30
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування необхідності формування групи тварин синхронного контролю ефектів індуктора абстиненції		
4.1.	Загальні положення	32
4.2.	Власні дослідження поведінкових та нейротропних ефектів налоксону	32
4.2.1.	Мета, загальні положення, матеріали та методи	32
4.2.2.	Загальні результати та їх обговорення	34
4.2.3.	Загальні висновки та рекомендації з власних досліджень	37
ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ		38

ВСТУП

Загальновідомо, що застосування деяких лікарських препаратів та хімічних речовин, особливо тих, що впливають на центральну нервову систему (ЦНС), призводить до розвитку залежності. У світі налічується понад 1 млрд. людей, що вживають психоактивні речовини [1]. Важливим є визначення такої небезпечної побічної дії ліків вже на етапі доклінічних досліджень.

Методичні рекомендації містять сучасні підходи до експериментального визначення здатності досліджуваних лікарських препаратів і хімічних речовин викликати залежність. Проте насамперед доцільно визначити суть досліджуваних явищ, гармонізуючи її із сучасним наркологічним розумінням залежності.

У виданому ВООЗ чинному міжнародному класифікаторі хвороб 10 перегляду (МКХ-10, ICD-10) [2] вказано, що залежність являє собою комплекс поведінкових, пізнавальних та фізіологічних симптомів, що виникає після повторного вживання певних речовин та зазвичай включає сильне бажання прийняти їх; труднощі контролю їх використання; стійке продовження їх застосування незважаючи на згубні наслідки; перевагу вживанню психоактивних речовин іншим видам діяльності та виконанню обов'язків; зростання припустимих меж застосування та інколи – стан абстиненції. Синдром залежності може розвиватися стосовно конкретних речовин (тютюну, алкоголю, діазепаму тощо), класу речовин (як-от опіюїдних анальгетиків або широкого кола фармакологічно різнорідних психоактивних речовин).

Широко використовуються такі терміни: зловживання (abuse), залежність (dependence), пристрасть (addiction).

Зловживання ліками (abuse) визначається як навмисне, нетерапевтичне застосування лікарського продукту або речовини, навіть один раз, для досягнення бажаного психологічного або фізіологічного ефекту. Отже, потенціал зловживання відноситься до ймовірності того, що зловживання відбудеться з конкретним лікарським продуктом або речовиною, які впливають на ЦНС. Бажані психологічні ефекти можуть включати ейфорію, галюцинації та інші перцептивні спотворення, зміни у пізнанні та зміни настроя [3].

Поняття «залежність» (dependence) може належати до фізичної або психологічної залежності. Фізична залежність (physical dependence) є станом, що розвивається в результаті фізіологічної адаптації у відповідь на повторне вживання наркотиків, що виявляється ознаками та симптомами абстиненції після різкого припинення або значного зменшення дози препарату. Психологічна або психічна залежність (psychological or psychic dependence) –

стан, у якому порушується контроль над вживанням певних речовин (здатність створювати позитивні відчуття, що збільшують ймовірність вживання) або психологічний дистрес, що виникає за відсутності препарату [3].

Термін «пристрасть» (addiction) останнім часом прирівнюється до поняття «порушення використання речовин»: Substance Use Disorders (Addiction) [4]. Відповідно до запропонованих American Addiction Center діагностичних критеріїв, діагноз розладу вживання незалежно від конкретної речовини базується на виявленні специфічної поведінки, пов'язаної з використанням цієї речовини. У клінічній практиці ці види поведінки поділяються на чотири основні категорії:

1. *Порушення контролю.* Це використання препарату (речовини) протягом більш тривалого часу або більших кількостей, ніж передбачалося; безуспішне бажання зменшити використання; витрачання надмірного часу на отримання/використання/відновлення після вживання; настільки інтенсивний потяг, що складно думати про щось інше.

2. *Соціальні порушення.* Це продовження використання препарату (речовини) незважаючи на проблеми з роботою, школою або сімейними/соціальними зобов'язаннями; вживання певних речовин, незважаючи на наявність міжособистісних проблем через це, втрата дружби тощо; зменшення важливих видів соціальної активності через вживання.

3. *Ризикове використання.* Ключовим питанням цього критерію є відмова від використання речовини, незважаючи на шкоду, яку вона завдає. Таке використання має місце при неодноразовому вживанні відповідних препаратів (речовин) у фізично небезпечних ситуаціях (наприклад, використання алкоголю або інших психоактивних речовин під час керування автомобілем); продовження використання таких речовин навіть за усвідомлення, що це викликає або погіршує фізичні та психологічні проблеми. Прикладом може бути людина, яка продовжує палити сигарети, незважаючи на наявність бронхіальної астми або хронічного обструктивного захворювання легень.

4. *Толерантність та відміна.* Це класичні показники прогресивної залежності, особливо важливі поняття як такі. Толерантність виникає, коли потрібно збільшити кількість речовини для досягнення того ж бажаного ефекту. "Бажаним ефектом" може бути прагнення уникнути симптомів відміни. З іншого боку, це може бути бажання сп'яніння. Люди відчувають толерантність по-різному, тобто відрізняються за чутливістю до різних речовин. Відміна – реакція організму на різке припинення прийому препарату. Результиуючий кластер (суб'єктивно неприємний, іноді

небезпечний для організму) – симптоми, що є специфічними для кожного препарату, кожної категорії речовини. За наявності симптомів абстиненції є підстави для висновку як про використання субстанції, так і про відміну речовини.

Отже, терміни «абстиненція», «відміна», «скасування», «зняття» (withdrawal) означають реакцію організму на різке припинення прийому препарату (речовини).

У клінічній практиці за наявності принаймні 2 з цих 4 критеріїв правомірним є діагноз «розлад використання речовини». Тяжкість наркоманії визначається за кількістю виконаних критеріїв.

Таким чином, певні термінологічні розбіжності не суперечать одна одній, і поняття «пристрасть», «залежність» та «адикція» фактично є синонімами. Важливо визначити, є залежність психічною або фізичною. Адикція як прояв психічної залежності можлива без фізичної залежності (наприклад, перша стадія формування алкоголізму або наркоманії).

Для виявлення здатності певної речовини викликати залежність в експерименті на тваринах необхідно виявити як потяг останніх до її використання, так і наявність синдрому відміни при припиненні її введення (споживання).

Розділ 1. Загальні аспекти планування експерименту у методиках виявлення адиктивного потенціалу хімічних речовин та їх здатності викликати фізичну залежність

1.1. Характеристика фармакологічної речовини

Адекватне планування досліджень вимагає наявності як мінімум такої інформації: а) рецепторні системи, з якими взаємодіє досліджувана речовина; б) фармакокінетичні властивості (період напіввиведення, проникнення крізь гематоенцефалічний бар'єр, біодоступність при основних шляхах введення); в) передбачуване терапевтичне застосування. Плануванню експериментів також сприяє знання ефектів речовини, які були виявлені в попередніх дослідженнях (наприклад, інформація про вплив на різні нейрохімічні системи, наявність психотропної активності) [5, 6].

1.2. Розчинники і розбавники

Поведінка, що полягає в основі методів оцінки адиктивного потенціалу, вимагає використання максимально інертних розчинників, що не мають місцевоподразнювальної та системної пригнічувальної дії. При дослідженні водонерозчинних речовин за допомогою методу лікарського диференціювання або реакції самостимуляції припустимо використання ліпідних суспензій або суспензій на основі 1% водного розчину Твін-80, що, однак, вимагає взяття зразків крові для проведення аналізу досягнутої концентрації речовини в крові та порівняння її з рівнем, необхідним для прояву терапевтичних ефектів. Нерозчинність речовини обмежує можливість використання методу внутрішньовенного самовведення, який в такому випадку може бути замінений при дослідженні на реакцію електричної самостимуляції.

1.3. Дози, шляхи і режими введення

Кожну речовину необхідно досліджувати в діапазоні доз, достатньому для обґрунтованого висновку про наявність або відсутність у неї адиктивного потенціалу. Нижня межа діапазону досліджуваних доз визначається двома факторами:

а) співвідношенням афінітету речовини до рецептора-мішені та концентрацією вільної (не зв'язаної з білками) речовини, що досягається у позаклітинному просторі;

б) типом взаємодії речовини і рецептора-мішені.

Для речовин-агоністів досліджуваний діапазон доз зазвичай значно ширше, ніж для антагоністів.

Верхня межа діапазону доз визначається за досягненням рівня, при якому речовина починає викликати неспецифічні зміни поведінки (наприклад, зниження частоти оперантної реакції).

Для реакції самовведення діапазон досліджуваних доз визначається періодом напіввиведення речовини і величиною разової дози (тобто дозою, що відповідає одиничній ін'єкції).

При дослідженні здатності хімічної речовини викликати фізичну залежність, а також для методів умовної реакції переваги місця, лікарського диференціювання та реакції самостимуляції допустимі різні шляхи і режими введення. Для реакції самовведення найкращим є внутрішньовенний шлях введення.

1.4. Експериментальні тварини

Рекомендовані дослідження можуть бути виконані як на мишах, так і на щурах. Наявність додаткової інформації про досліджуваній речовині може допомогти у виборі виду, лінії і статі тварин (наприклад, відсутність рецептора-мішені у мишей або наявність додаткових форм таргетних рецепторів у щурів).

Переважає більшість публікацій, що стосуються виявлення у сполук здатності викликати синдром відміни, свідчать на користь використання мишей як більш зручного та цілком достатнього для поставленої мети біологічного виду.

1.5. Умови проведення дослідження

Дослідження слід проводити в стандартних, контрольованих лабораторних умовах із дотриманням усіх вимог нормативних документів, що регламентують такий тип робіт, у тому числі правила утримання і використання лабораторних тварин.

1.6. Тривалість дослідження

Дослідження з використанням методів лікарського диференціювання або реакції самостимуляції мають на увазі одноразові введення досліджуваних речовин. Однак з огляду на те, що різні дози речовин досліджують на одних і тих самих тваринах, а також на необхідність обмежувати частоту повторних тестувань, тривалість таких експериментів досягає 4-6 тижнів. Для реакції внутрішньовенного самовведення у мишей тривалість експерименту не перевищує 1 тиждень, у той час як дослідження реакції самовведення у щурів вимагає щонайменше 3 місяців.

При дослідженні здатності хімічних сполук викликати фізичну залежність тривалість введення досліджуваної речовини має бути достатньою для розвитку відповідних фізіологічних адаптаційних змін. Для широкого кола психоактивних речовин зазвичай рекомендовано введення речовини протягом щонайменше 28 днів, але у випадку сполук з доведеним опіодергічним механізмом дії можливе скорочення тривалості введення до 14 днів [7] або навіть менше (при введенні прогресуючих доз, особливо при зіставленні з препаратом порівняння морфіном [8]).

1.7. Рекомендації щодо вибору препарату порівняння

Вибір препаратів порівняння є важливим етапом розробки дослідницької програми для прогнозування адиктивного потенціалу нового лікарського засобу. Традиційно виділяють кілька основних типів адиктивних засобів (психостимулятори, опіати, седативні і снодійні, галюциногени). Найбільш інформативною є близькість досліджуваної речовини до одного або більше класів відомих адиктивних засобів (хімічна структура, загальні рецептори-посередники, активація одних і тих самих структур і проєкцій у ЦНС, однакові нейрохімічні зміни, схожі фармакологічні ефекти на системному рівні). За відсутності такої інформації за основу може бути взята сфера передбачуваного терапевтичного застосування речовини (наприклад, для нових анальгетиків препаратами порівняння можуть бути опіати).

Розділ 2. Методики виявлення адиктивного потенціалу хімічних речовин

2.1. Загальні положення

Теоретичну основу доклінічної оцінки адиктивного потенціалу складає фізіологічна концепція патогенезу нарко- і токсикоманій, згідно з якою нейробіологічна природа адиктивного ефекту фармакологічних засобів пов'язана з їх впливом на системи «винагороди» та «покарання» мозку. Фізіологічною основою адиктивного потенціалу фармакологічного агента є наявність у нього підкріплювальних властивостей. Під підкріпленням розуміють процес, за якого ймовірність певної поведінкової реакції (наприклад, поведінка пошуку наркотика) збільшується завдяки подіям, що настають за нею. Стимул (у тому числі фармакологічна речовина), який збільшує ймовірність поведінки, після якого вона настає, називається підкріплювальним стимулом. Надання позитивно-підкріплювальних стимулів збільшує ймовірність поведінки, за якою вони слідуєть. Ймовірність конкретної поведінкової реакції також збільшується, якщо вона веде до зменшення або попередження негативно-підкріплювальних стимулів. Фармакологічні речовини можуть виявляти як позитивно-, так і негативно-підкріплювальні властивості. В останньому випадку мова йде про речовини, здатні викликати залежність, припинення введення яких призводить до розвитку синдрому відміни. Аверсивні властивості синдрому відміни краще всього купуються введенням самої речовини. Хоча розвиток як фізичної залежності, так і толерантності наявні в діагностичних критеріях лікарської залежності, виразність адиктивного потенціалу визначається насамперед позитивно-підкріплювальними властивостями хімічної речовини [6].

З метою вивчення адиктивного потенціалу на основі експериментальних досліджень виявляють фармакологічні властивості речовин, що розглядаються як специфічні предиктори здатності психоактивних сполук викликати патологічну пристрасть:

1. Наявність у речовин первинно-підкріплювальних властивостей. Ці властивості виявляються в дослідженнях з вироблення та підтримання поведінкової реакції внутрішньовенного самовведення (РВС), за якої безумовним підкріплювальним подразником є речовина [9, 10].

2. Наявність у речовинах інтероцептивних стимульних властивостей, схожих з такими у відомих речовин з високим адиктивним потенціалом. Ці властивості виявляються в дослідженнях з лікарського диференціювання [9, 11].

3. Наявність у речовин здатності викликати активацію системи позитивного підкріплення (системи «винагороди») [12]. Цю властивість виявляють за зміною показників реакції електричної самостимуляції (РЕС) мозку [13].

2.2. Загальна характеристика методик визначення адиктивного потенціалу

2.2.1. Умовна реакція переваги місця (УРПМ)

2.2.1.1. Мета і задачі експерименту

Мета експерименту – отримання в режимі експрес-тестування даних щодо «атракативних» або «аверсивних» мотиваційних властивостей досліджуваної речовини при введенні тваринам. Основною парадигмою цього тесту є асоціація конкретного середовища з введенням досліджуваної речовини, яка поєднується з асоціацією іншого середовища, у якому введення сполуки не відбувається (вводиться розчинник) [14]. Якщо тварина піддається ефекту адиктивної речовини в певному місці, наприклад в одній з камер дво- або багатокамерної установки або ділянці «відкритого поля», що має специфічні дискримінативні стимульні властивості (тактильні, світлові, нюхові та ін.), то тварина воліє знаходитись в цьому місці, якщо їй надається вибір [15].

Завданнями експерименту є доказ здатності хімічної сполуки при введенні викликати у тварини асоціацію з певними умовами навколишнього середовища.

2.2.1.2. Обладнання, інструменти і реактиви

Експериментальний прилад зазвичай являє собою камеру з трьома відсіками, причому зовнішні відсіки мають різні характеристики (наприклад, білий або чорний колір стін, горизонтально сітчаста та перехресно сітчаста підлога, соснова або кукурудзяна тирса та ін.). Центральний відсік не має особливих характеристик і не пов'язаний з введенням речовин, а отвори між відсіками можуть бути відкриті, щоб дозволити тварині вільно переходити між ними. Можливо застосування приладу з двома відсіками (без центрального).

2.2.1.3. Опис методу

Протягом декількох днів, що передують навчанню, проводять габітуацію тварин. Вільний доступ до всіх відсіків дозволяє тварині при звичаїтись до приладу, усуваючи новизну як додаткову змінну.

Оскільки більш інформативним є дизайн експерименту з урахуванням початкових преференцій тварин до тих чи інших умов середовища

(конкретного відсіку), доцільно провести попередні дослідження [14]. Преференції кожної окремої тварини щодо конкретного середовища оцінюють перед навчанням шляхом її вміщення в прилад і реєстрації кількості часу, проведеного в кожному з відсіків. Як компартмент, який буде асоційований із введенням досліджуваної сполуки, обирається той, у якому тварина на цьому етапі проводила менше часу.

Період фармакологічного обумовлення триває 4 дні. Кожен день проводять дві сесії вироблення умовного рефлексу на місце. Перша сесія є диференціовальною. Перед вміщенням в один з відсіків (відсіки камери розділені перегородкою) на 20-45 хв (у залежності від термінів дії препарату) тваринам вводять розчинник. Під час другої сесії вводять досліджувану сполуку з потенційно «атракативними» або «аверсивними» мотиваційними властивостями (в контрольній групі – розчинник) перед вміщенням тварини в протилежний відсік на 20-45 хвилин. Тварин після введення розміщують у випадковому порядку в тому чи іншому відсіку таким чином, що половину групи вміщують у даний відсік після введення речовини, а іншу половину – після введення розчинника [15].

Важливими методологічними аспектами, які слід враховувати в дослідженнях УРПМ (conditioned place preference, CPP), є фармакокінетичні властивості сполуки, кількість сеансів навчання та сенсорні модальності, які використовуються для того, щоб відрізнити середовища компартментів. Як правило, лікарські засоби, які мають повільний початок і тривалий період дії (наприклад, фенобарбітал), не є добрими «підкріплювачами», і, отже, не можуть ефективно викликати УРПМ. Для лікарських засобів, що мають потужні «нагороджувальні» властивості, необхідно менше сеансів навчання для формування УРПМ (наприклад, амфетамін), тоді як хімічні речовини з більш слабкими «нагороджувальними» властивостями потребують більше сеансів навчання (наприклад, нікотин). Нарешті, сенсорні модальності повинні бути придатними для використовуваних видів тварин. Наприклад, візуальні стимули є поганим вибором для щурів-альбіносів, тимчасом як застосування нюхових сигналів є кращим для щурів цієї лінії. Тактильні та слухові сигнали також є гарним вибором при використанні гризунів [14].

Заключне тестування вироблення УРПМ проводять через 72 години після останнього сеансу фармакологічного обумовлення. Тестування тварин виконується в неманіпульованому стані. Воно полягає у розміщенні тварини в центральному компартменті, а потім, після відкриття отворів в обидва зовнішні відсіки, реєстрації часу, який тварина проводить у кожному з зовнішніх відсіків протягом сеансу (15 хвилин). Реєструється відсоток часу, проведений у кожній камері під час тестування.

Умовна реакція переваги місця виявляється, якщо тварини проводять значно більше часу (більше 2/3 від загальної тривалості сеансу) в компартменті, який асоційований з уведенням досліджуваної сполуки, порівняно з відсіком, у якому під час тренувальних сесій вводили розчинник, тобто експериментальна маніпуляція чинила «нагороджувальний» ефект на емоційний стан тварини. З іншого боку, якщо тварини проводять достовірно більше часу в компартменті, асоційованому з введенням розчинника, порівняно з відсіком, у якому відбувалось введення досліджуваної речовини, то це вважається розвитком умовної реакції уникання місця – УРУМ (conditioned place aversion, CPA). При аналізі результатів альтернативним показником може виступати кількість тварин у групі з виробленою УРПМ або УРУМ.

2.2.1.4. Можливості та обмеження методу, його прогностичне значення

Поведінкові ефекти хімічних речовин, що досліджуються в тесті умовної реакції переваги місця, залежать від виду тварин та їх лінії, шляху введення, часового інтервалу введення сполуки, дози і використовуваного приладу.

Відомо, що психостимулятори та опіати надійно формують УРПМ в цьому тесті. Наприклад, встановлено, що системне введення кокаїну, амфетаміну та нікотину формує УРПМ після двох-трьох сеансів навчань у щурів і мишей [16-18]. Крім того, УРПМ була встановлена для опіатів, таких як морфін, героїн і бупренорфін, а також препаратів з інших класів, включаючи депресанти ЦНС етанол та діазепам, агоніст каннабіноїдних рецепторів дельта-9-тетрагідроканнабінол (ТГК), агоніст α_2 -адренорецепторів клонідин [19-22].

Більшість відомих психотропних препаратів формують як УРПМ, так і УРУМ, залежно від уведеної дози. Наприклад, нікотин виробляє УРПМ у щурів, яким вводили дози від 0,4 до 0,8 мг/кг, тоді як вищі дози формують УРУМ [16, 23]. Подібні результати були виявлені також з іншими препаратами, такими як морфін і апоморфін [24, 25]. У тварин із модельною залежністю від лікарських засобів синдром відміни зазвичай викликає УРУМ.

Тест «Умовна реакція переваги місця» дозволяє надійно виявити прогностичні показники наявності «нагороджувальних» властивостей досліджуваної хімічної речовини за відносно нескладних методичних процедур та невеликих затратах часу [14, 15].

2.2.2. Ініціація внутрішньовенного самовведення у мишей (PBC)

2.2.2.1. Мета і задачі експерименту

Мета експерименту – отримання в режимі експрес-тестування даних про первинно-підкріплювальні властивості досліджуваної речовини. Завданнями експерименту є доказ ініціації PBC досліджуваної речовини, виявлення залежності «разова доза – ефект», визначення параметрів активності та ефективності підкріплювального ефекту в порівнянні з еталонною адиктивною речовиною [6]. Головна перевага методу – швидкість отримання результатів, що зумовлено використанням природної орієнтовно-дослідницької реакції мишей (визирання в отвір при вміщенні в затінену камеру), яка сприяє виробленню оперантної реакції. При поєднанні з інфузією розчину адиктивної сполуки дослідницька реакція не згасає, а, навпаки, активується, оскільки досліджуваний препарат має «атракативні» мотиваційні властивості.

2.2.2.2. Обладнання, інструменти і реактиви.

Експериментальні тварини: миші-самці масою 18-24 г. Експериментальний пристрій повинен забезпечувати можливість розміщення двох мишей в суміжних камерах, розміри яких (наприклад, 8×8×8 см) дозволяють тваринам зберігати відносну свободу рухів, зокрема, здійснювати визирання в отвір передньої стінки камери, незважаючи на фіксацію хвоста. Отвір діаметром 1,4 см розташований на висоті 1,4 см від підлоги і забезпечений інфрачервоним датчиком для реєстрації реакції визирання. Фотодатчик через інтерфейс пов'язаний з комп'ютером, який керує роботою двошприцевого мікроін'єктора з кроковими двигунами, здійснюючи короточасну ін'єкцію заданого об'єму розчину досліджуваного препарату (1,6 мкл на ін'єкцію) у відповідь на кожне визирання. Задня стінка кожного боксу прорізана вертикальної щілиною шириною 0,5 см [6].

Тварин розміщують у боксі з урахуванням таких вимог:

- 1) миша повинна вільно визирати в отвір на передній стінці;
- 2) забезпечений доступ для пункції латеральних хвостових вен (хвіст виводять через щілину в задній стінці за межі боксу і фіксують до горизонтальної поверхні липкою стрічкою);
- 3) виключена можливість висмикування голки і пошкодження катетера тваринам під час експерименту.

2.2.2.3. Опис методу

Протокол дослідження включає вихідне тестування орієнтовно-дослідницької активності та подальшу сесію ініціації (формування) PBC [6]. Завданням вихідного 10-хвилинного тестування є оцінка індивідуальної

орієнтовно-дослідницької реакції мишей і подальший підбір за рівнем активності пар тварин (рівень активності в парі повинен бути якомога ближчим) для сесії ініціації РВС.

Як свідчить досвід, формування РВС еталонних адиктивних речовин (морфін, кокаїн, амфетамін) відбувається протягом 10-20 хв, тому загальна тривалість сесії ініціації РВС досліджуваних речовин становить 30 хв. Попередньо відібрані пари мишей вміщують в експериментальні бокси і після короткочасної адаптації в латеральні хвостові вени обох мишей вводять голки, приєднані до ін'єкторів через поліетиленові катетери. Під час сесії вироблення РВС «активна» миша (АМ) отримує ін'єкції досліджуваного розчину після кожного визирання. «Контрольна» миша (КМ) отримує ін'єкції в ритмі визирання АМ без зв'язку з власними визираннями. Таким чином, обидві миші отримують однакову кількість ін'єкцій з однаковим розподілом в часі і, відповідно, однакову дозу препарату, що дозволяє при оцінці ефекту і порівнянні даних у АМ і КМ «зрівняти» дію препаратів на рухову і дослідницьку активність. Після закінчення сесії голки виймають і тварин повертають до загальної клітки. Висновок про позитивно-підкріплювальні ефекти досліджуваної сполуки засновують на розбіжності кількості визирань (КВ) АМ і КМ. Якщо за період сесії вироблення РВС КВ АМ перевищує КВ КМ, роблять висновок про мотиваційно позитивні (позитивно-підкріплювальні) ефекти сполуки. Якщо КВ АМ менше КВ КМ, ефект сполуки розцінюють як «аверсивний» (що викликає неприязнь).

2.2.2.4. Можливості та обмеження методу, його прогностичне значення

Метод відрізняється високою чутливістю і дозволяє виявити позитивно-підкріплювальні властивості не лише опіатів, кокаїну, амфетаміну, а й таких речовин, як етанол, нікотин, кофеїн і навіть розчинники (толуол). При цьому метод досить специфічний, тому що речовини, позбавлені адиктивного потенціалу (негативний контроль), не сприяють ініціації РВС на цій моделі. При наявності багатоканальної установки метод дозволяє провести повноцінне дослідження залежності «доза-ефект» протягом кількох днів. Обмеження методу пов'язані з неможливістю дослідження підтримки РВС через неможливість проведення більш 2-3 повторних венепункцій [6].

2.2.3. Лікарське диференціювання

2.2.3.1. Мета і задачі експерименту

Метою є оцінка диференціювальних стимульних властивостей досліджуваної речовини. Для цього тваринам, попередньо навченим

розрізняти інтероцептивні ефекти різних адиктивних речовин, вводять досліджувану речовину та оцінюють імовірність поведінкової реакції, характерної для введення «тренувальної» адиктивної сполуки [6].

Основним завданням експерименту є виявлення загальних диференціювальних стимульних властивостей досліджуваної сполуки і адиктивної речовини порівняння.

2.2.3.2. *Обладнання, інструменти і реактиви*

Вироблення і аналіз лікарського диференціювання проводять в оперантних камерах Скіннера, обладнаних двома педалями (або двома отворами для реєстрації визирвань) і пристроєм автоматичної подачі харчових пелет (або питної рідини – води чи молока).

2.2.3.3. *Опис методу*

Спочатку щурів (можливо також використання мишей), у яких було обмежено споживання їжі (або води), навчають натискати на кожну з двох наявних в оперантній камері педалей (або визирвань в отвори) для отримання харчових пелет відповідно до режиму підкріплення «фіксоване співвідношення 10» (ФС 10). Після вироблення оперантної навички починають вироблення диференціювання. Перед початком щоденної сесії тварини отримують ін'єкцію адиктивної речовини (наприклад, 3,2 мг/кг морфіну, 10 мг/кг кокаїну тощо) або її розчинника. Тренувальні сесії з введеннями адиктивної речовини або розчинника чергують у випадковому порядку. Під час тренувальних сесій лише одна з двох педалей «активна», тобто натискання на неї приводять до отримання підкріплення. Для кожного щура натискання на одну з педалей підкріплюють після ін'єкції розчинника, а натискання на іншу педаль – після ін'єкції «тренувальної» речовини. Експериментальні сесії відрізняються від тренувальних лише тим, що під час цих сесій обидві педалі «активні», тобто тваринам надають можливість вибору педалі для отримання підкріплення.

Досліджувана речовина вводиться не частіше за 2 рази на тиждень перед початком експериментальних сесій. Мінімальний інтервал між послідовними експериментальними сесіями повинен складати щонайменше 72 год (визначається на підставі даних про фармакокінетику досліджуваної речовини). Тестування фармакологічних агентів проводять лише за умови дотримання таких критеріїв під час останніх двох тренувальних сесій кожного типу:

- 1) вибір педалі відповідав ін'єкції;
- 2) відсоток натискань на «правильну» педаль перевищував 90% від загальної кількості натискань на обидві педалі за сесію;

3) загальна частота оперантної реакції перевищує заздалегідь обумовлений пороговий рівень (наприклад, 0,4 натискання в секунду).

2.2.3.4. Можливості та обмеження методу, його прогностичне значення

Метод лікарського диференціювання має ряд характерних особливостей. Поведінка диференціювання легко виробляється і залишається стабільною протягом дуже тривалого періоду часу (не менше одного року). Метод дозволяє оцінювати залежність ефекту від дози, яка практично завжди має дуже чіткий характер. Стимульні властивості речовин, які оцінюються за допомогою цього методу, відрізняються високим ступенем специфічності, що зводить до мінімуму ймовірність хибнопозитивних результатів. Основним недоліком методу є обмежений набір «тренувальних» речовин, тобто речовин порівняння. Іншими словами, метод може бути малопридатний для аналізу інтероцептивних властивостей нових речовин, не схожих на вже відомі [6].

2.2.4. Внутрішньовенне самовведення у щурів (підтримання)

2.2.4.1. Мета і задачі експерименту

Традиційно вважається, що першим кроком в аналізі будь-якої форми медикаментозної та немедикаментозної залежності є вивчення первинно-підкріплювальних властивостей стимулів, найбільш ймовірно пов'язаних з формуванням і підтриманням залежності [6]. Для більшості адиктивних речовин, таких як героїн, кокаїн, алкоголь, наявність позитивних первинно-підкріплювальних властивостей є необхідною і достатньою умовою для формування стійкої адиктивної поведінки, про що свідчить велика кількість як клінічних, так і експериментальних даних, отриманих на різних видах лабораторних тварин (мави, щури, миші тощо.). Однією з найбільш використовуваних процедур, що дозволяє виявити наявність позитивних первинно-підкріплювальних властивостей, є процедура, при якій оцінюється здатність досліджуваної речовини заміщувати еталонні адиктивні сполуки (кокаїн, морфін, етанол та ін.), підтримуючи заздалегідь вироблену реакцію самовведення.

2.2.4.2. Обладнання, інструменти і реактиви

Установка для проведення експерименту являє собою стандартну оперантну камеру Скіннера, забезпечену двома педалями або отворами для визирання. Одна педаль (або отвір) є «активною», тобто натискання (або визирання) веде до інфузії розчину речовини. Друга педаль (або отвір) необхідна для контролю неспецифічної активності тварини. Для інфузій розчинів речовин використовують мікродозатори з регульованою швидкістю

подачі розчинів (від секунди до 10-20 с) і об'ємом разових інфузій (10-400 мкл/кг). Оптимальні параметри (об'єм інфузії і доза речовини на інфузію) підбираються індивідуально для кожного препарату. Зазвичай внутрішньовенні інфузії поєднують з пред'явленням світлових стимулів, що сигналізують про фармакологічне підкріплення оперантної реакції. Протягом періоду спрацювання ін'єктора оперантні реакції фіксуються, але не приводять до активації ін'єктора. Для забезпечення свободи переміщення тварини в оперантній камері застосовують шарнірний з'єднувальний пристрій, який перешкоджає перекручуванню сполучних трубок від катетера до ін'єктора.

2.2.4.3. Опис методу

Однією з важливих умов вироблення внутрішньовенного самовведення речовин є попереднє навчання тварин певній оперантній реакції (наприклад, натисканню на педаль або визиранню в отвір) для отримання харчового або водного підкріплення з подальшим його заміщенням на внутрішньовенне введення речовини. Слід зазначити, що оперантна відповідь типу визирання є більш природною для щурів, ніж натискання на педаль, і виробляється швидше. Додатковою умовою самовведення деяких речовин вважається харчова депривація (обмеження вільного доступу тварин до їжі поза експериментом). Наприклад, показано, що у щурів, які отримують їжу *ad libitum*, не виробляється РВС нікотину, тоді як тварини в умовах харчової депривації самовводили нікотин. У межах даної процедури щурам (220-270 г), заздалегідь навченим оперантній реакції за отримання харчового (або водного) підкріплення, імплантують в яремну вену силіконові катетери, фіксуючи їх на спині тварин. З метою профілактики післяопераційних ускладнень тваринам призначають антибіотик (протягом 5 днів після операції). Під час щоденного огляду імплантовані катетери промивають 0,05 мл розчину гепарину (20 ОД/мл). Через 7 днів після операції тварин вміщують в оперантні камери і починають формування РВС. Реєструють кількість отриманих інфузій, а також кількість натискань на «активну» і «неактивну» педалі (або визирання в отвори). Протокол дослідження передбачає щоденні експериментальні сесії, обмежені в часі (1-3 години). Зазвичай період вироблення реакції самовведення еталонних адиктивних сполук займає 5-8 днів, за які більшість тварин (60-80%) навчаються. У подальших дослідженнях з підтримки самовведення при заміні еталонної речовини на досліджувану використовують тільки тварин зі стабільним рівнем споживання еталонної адиктивної речовини (коливання реєстрованих параметрів не більше 15% від середнього рівня протягом трьох послідовних експериментальних сесій). Тести заміни на досліджувану сполуку еталонної

адиктивної речовини зазвичай проводять протягом 4-5 послідовних днів або так довго, скільки буде необхідно для згасання заздалегідь виробленої реакції у контрольної групи тварин, які отримують розчинник замість досліджуваної речовини [6].

2.2.4.4. Можливості та обмеження методу, його прогностичне значення

Згідно з класичним визначенням феномена підкріплення, позитивні первинно-підкріплювальні стимули характеризуються в першу чергу здатністю збільшувати ймовірність повторення поведінкової реакції, яка передувала їх пред'явленню. На цьому принципі ґрунтуються практично всі експериментальні моделі самовведення наркотиків, в яких отримання наркотику (шляхом парентеральної інфузії, пред'явленням рідкої або твердої форми для орального прийому або газоподібної форми для інгаляційного введення) настає практично відразу за виконанням певної поведінкової реакції (наприклад, натискання на педаль в експериментах на щурах або мавпах). Очевидно, що подібний опис приблизно відповідає поведінці споживання наркотиків людиною в «природних» умовах. Завдяки цьому вважають, що моделі самовведення мають максимальну валідність («зовнішня відповідність»), а принцип позитивного підкріплення може застосовуватись для аналізу різних форм адиктивної поведінки. Дійсно, лабораторні тварини, а також люди в умовах експерименту легко навчаються виконанню заздалегідь заданої поведінкової реакції і підтримують її відповідно до закономірностей позитивного підкріплення. Практично всі фармакологічні агенти, для яких встановлено адиктивний потенціал і які викликають лікарську залежність у людини (опіати, психостимулятори, седативні і снодійні, деякі галюциногени, алкоголь тощо), самовводяться в умовах експерименту. Слід особливо відзначити, що наявність позитивних первинно-підкріплювальних властивостей не еквівалентна здатності речовини викликати ейфорію або інші емоції позитивної модальності. Єдиною більш-менш спільною властивістю всіх позитивно-підкріплювальних стимулів (включаючи адиктивні речовини) є активація мезокортіколімбічної системи «нагороди» мозку, що виявляється, наприклад, підвищенням вивільнення дофаміну у вентральних відділах смугастого тіла і зниженням порогу електричної самостимуляції мозку.

Часова структура самовведення адиктивної речовини визначається в першу чергу фармакокінетичними властивостями останньої. Наприклад, у лабораторних щурів період напіввиведення нікотину становить близько 40 хв, а кокаїну – близько 10 хв. Тому для підтримки певної концентрації кокаїну в плазмі крові та мозку потрібні більш часті ін'єкції, ніж для

підтримки стабільної концентрації нікотину. Більш того, введення нікотину індукує процеси десенситизації нікотинових рецепторів, що також збільшує «рефрактерний» період. Це відокремлює послідовні реакції самовведення нікотину і визначає таку відмінну рису самовведення нікотину, як низька частота оперантної реакції та, відповідно, отримання ін'єкцій нікотину. Таке пояснення низької частоти самовведення нікотину повністю узгоджується з класичними уявленнями про можливість застосування методів самовведення для дослідження адиктивної потенціалу речовин тільки з відносно коротким періодом напіввиведення. Наприклад, раніше були неодноразово відзначені труднощі вироблення самовведення бензодіазепінових седативних засобів із тривалим періодом напіввиведення. Все це визначає також одне з головних обмежень методу, таке як неможливість порівняльної оцінки ступеня виразності адиктивного потенціалу різних речовин, оскільки рівень реакції, що підтримується адиктивними речовинами, більшою мірою віддзеркалює фармакокінетичні особливості їх дії [6].

2.2.5. Реакція електричної самостимуляції (РЕС) системи «нагороди» мозку

2.2.5.1. Мета і задачі експерименту

Активація реакції самостимуляції при введенні адиктивної речовини є невід'ємною ланкою доказів єдиної мішені для електричної (РЕС) і фармакологічної (досліджувана речовина) стимуляції і розглядається як експериментальне підтвердження того, що фармакологічна речовина здатна активувати ендогенні системи «нагороди» [6]. Існує велика кількість модифікацій методу електричного самоподразнення мозку. Вони ґрунтуються як на особливостях оперантної (інструментальної) поведінки, так і на вимогах, що диктуються необхідністю дослідження конкретного фармакологічного агента. Незважаючи на різноманіття експериментальних підходів, для звичайних скринінгових цілей при дослідженні адиктивного потенціалу фармакологічних агентів за допомогою РЕС найбільш інформативним і коректним визнано використання методик, що дозволяють оцінювати збудливість нервового субстрату системи «нагороди» за мінімальною (пороговою) інтенсивністю «нагороджувальної» стимуляції, достатньої для підтримки умовної інструментальної реакції.

2.2.5.2. Обладнання, інструменти і реактиви

Дослідження проводять на самцях щурів масою 150-300 г залежно від використовуваного атласу мозку щурів. РЕС досліджують в оперантній камері Скіннера, обладнаної як мінімум однією педаллю (кількість педалей залежить від використовуваної методики).

Для PEC необхідним є джерело електричних імпульсів (наприклад, стимулятор ЕС-51), який дозволяє здійснювати стимуляцію постійним струмом у широкому амплітудному та/або частотному діапазоні. Електроди імплантують за стереотаксичними координатами в медіальний передньомозковий пучок або вентральну тегментальну область (вентральна покривка) середнього мозку. Імплантація електродів у вентральну тегментальну область рекомендується в зв'язку з низькою ймовірністю виникнення аверсивних реакцій при електричному подразненні цієї структури. Можуть використовуватися моно- або біполярні електроди. Останні кращі внаслідок вищої селективності стимуляції. При використанні монополярних електродів встановлюють додатковий індіферентний електрод у нескрізному отворі в лобовій кістці.

2.2.5.3. Опис методу

Через 5-7 днів після операції приступають до вироблення та стабілізації PEC при таких параметрах подразнення: прямокутні біполярні імпульси частотою 100 Гц, тривалість імпульсу 0,1 мсек, тривалість серії імпульсів 500 мсек, амплітуда імпульсів у діапазоні 70-300 мкА для монополярної стимуляції або 10-100 мкА для біполярної стимуляції. Формування PEC здійснюється за допомогою методів «послідовного наближення» до необхідної поведінкової реакції (наприклад, натискання на педаль). Наприклад, після вміщення тварини в оперантну камеру послідовно підкріплюють «нагороджувальною» стимуляцією спочатку перебування в частині камери, найбільш близької до «підкріплювальної» педалі, потім кожен рух у напрямку до педалі, дослідження педалі, торкання педалі та ін. Після вироблення навички натискання на педаль (1-2 сесії) протягом 3-4 щоденних сесій визначають амплітуду стимуляції, яка підтримує частоту оперантної реакції 40-60 натискань за хвилину. Як правило, за вдалої імплантації електродів на вироблення і стабілізацію PEC потрібно 4-6 експериментальних сесій тривалістю 30-40 хвилин. Для аналізу підкріплювальних властивостей PEC використовують процедуру визначення порогової інтенсивності електричної стимуляції (за амплітудою або частотою імпульсів) за допомогою методик автотитрування або психофізичного визначення порогів.

2.2.5.4. Можливості та обмеження методу, його прогностичне значення

Наразі практично для всіх відомих речовин з адиктивним потенціалом доведена здатність активувати PEC. Перелік вивчених адиктивних засобів включає опіати (морфін, героїн), психостимулятори (кокаїн, амфетаміни),

галюциногени (фенциклідин), барбітурати, бензодіазепіни, етанол, нікотин та ін.

Під впливом фармакологічних агентів принципово можливо кілька варіантів зміни параметрів PEC. Після введення різних адиктивних речовин спостерігається зниження порогової інтенсивності PEC, що віддзеркалює підвищення збудливості нейронального субстрату. У той же час інші параметри PEC, такі як частота самоподразнення за експериментальну сесію, можуть як підвищуватись (психостимулятори, низькі дози опіатів), так і знижуватись (етанол, барбітурати). Результати експериментів щодо PEC дозволяють провести аналіз залежностей «доза–ефект» і «час–ефект» для досліджуваних речовин, а також порівняти ефективність речовин відносно еталонних препаратів. З огляду на те, що вживлення електродів для дослідження PEC проводиться у суворо контрольованих умовах (стереотаксична методика, гістологічна верифікація положення електроду після експерименту), ця методика дозволяє інтерпретувати ефекти досліджуваної речовини як здатність активувати нейроанатомічний субстрат, спільний для всіх відомих наркотиків [6].

Розділ 3. Методики дослідження здатності хімічних речовин викликати фізичну залежність

3.1. Загальні положення

Фізіологічною основою розвитку фізичної залежності є адаптаційні зміни активності нейромедіаторних систем при тривалому введенні їх агоністів або антагоністів. З цими адаптаційними змінами пов'язане явище розвитку «толерантності» (tolerance), тобто зниження фармакологічного ефекту хімічної речовини при повторних введеннях. Наприклад, дослідження показали, що коли тваринам вводять опіати, адаптація починає відбуватися після першої дози, і друга доза має помітно менший ефект від першої. Після декількох днів прийому препарату раптове припинення призводить до синдрому відміни (withdrawal syndrome) в залежності від тривалості лікування та рівня доз. Однак адаптація, пов'язана з відміною лікарського засобу, відрізняється від адаптації, що призводить до патологічної пристрасті або адикції (addiction), в основі якої полягає втрата контролю над нестримним бажанням приймати препарат навіть за умови несприятливих наслідків. Це очікувана фармакологічна реакція, яка може зустрічатися і серед наркоманів, але вона значною мірою відрізняється від нав'язливої поведінки пошуку нової дози лікарського засобу.

В експериментальних дослідженнях здатності хімічної сполуки викликати фізичну залежність можливо використовувати два основні протоколи, які понад 40 років широко застосовуються для вивчення цього феномену. Ці протоколи базуються на виявленні симптомів, характерних для абстиненції, при раптовому припиненні введення чергової дози досліджуваної сполуки після тривалого введення. Принципово протоколи відрізняються тільки тим, чи абстиненція моделюється припиненням введення речовини (спонтанна), чи введенням відповідного специфічного індуктора (провокована або індукована).

3.2. Специфічні ознаки синдрому відміни

У методиках дослідження здатності хімічних сполук викликати фізичну залежність основним критерієм вважається зміна загального стану тварин внаслідок розвитку специфічних ознак абстинентного синдрому.

Ознаки розвитку синдрому відміни у тварин (табл. 3.1) є специфічними для різних класів психоактивних речовин і формування набору цих ознак для дослідження є важливим етапом планування експерименту.

**Основні ознаки синдрому відміни, що спостерігаються
у шурів та/або мишей, з віднесенням до нейромедіаторів / рецепторів**

Ознака	Нейромедіатор / рецепторний сайт
Струшування «мокрого собаки»	серотонін [26]; дофамін [27]; ацетилхолін [28] μ-рецепторний сайт [29]
Стрибки	σ- та фенциклідин-рецепторний сайт [30]
Стійки	дофамін [31] μ-рецепторний сайт [32]
Підвищення рухової активності	дофамін [31]; дофамін-ацетилхолін [27, 31] μ-рецепторний сайт [32]
Стукіт зубами	дофамін [27]
Скрегіт зубами	дофамін [33]; ацетилхолін [27]
Грумінг	дофамін [31]
Пілорекція	ацетилхолін [34] μ-рецепторний сайт [35]
Підвищення гастроінтестинальної активності	серотонін [36]; дофамін [27]

Найбільш детально специфічні ознаки розвитку абстиненції досліджені для речовин з доведеними опіоїдергічними властивостями (морфін, фентаніл та ін.). Найбільш характерними для розвитку абстинентного синдрому після тривалого введення опіоїдергічних сполук є такі ознаки: стрибки, струшування «мокрого собаки», здригання, скрегіт зубами, порушення пози, спроба втечі, пілоерекція, диспное, діарея, птоз, писк, «корчі» [37]. При цьому стрибки вважають «домінантним» симптомом, що свідчить на користь важкого перебігу абстинентного синдрому. Тремор за типом «барабанного бою», струшування «мокрого собаки», скрегіт зубами, діарея, птоз та інші прояви відносять до «рецесивних» ознак, що відповідають легкому перебігу синдрому відміни [38]. Також важливим симптомом опіоїдної залежності за цих умов є швидке зниження маси тіла [38].

Для речовин, що взаємодіють з бензодіазепіновим та барбітуратним сайтами ГАМК_A-рецепторів, характерними є такі ознаки: каудальна поза, тремор та значно виразніша стартл-реакція (*startle response*) [39]. Але існують свідчення, що зазначені реакції дуже складно експериментально досліджувати та диференціювати у випадку спонтанної абстиненції внаслідок надто довгого періоду напіввиведення речовин зазначених класів. Проте у

випадку застосування провокації відповідними антагоністами вони чітко спостерігаються.

Для речовин, що за прогнозами можуть впливати на канабіноїдні рецептори (наприклад, Δ^9 -тетрагідроканабінол), характерними ознаками абстиненції можуть бути наявність тремору кінцівок, здригання голови та царапання тіла або голови (*scratching behavior*) [40-42].

Слід зауважити, що існують певні класи психоактивних речовин, для яких складно підібрати специфічні ознаки розвитку синдрому відміни в експериментальних умовах. У такому випадку виходять з того, що зазвичай синдром відміни характеризується симптоматикою, прояви якої протилежні фармакологічній дії речовини.

3.3. Загальна характеристика методик дослідження здатності хімічних сполук викликати фізичну залежність

3.3.1. Метод оцінки розвитку спонтанного синдрому відміни (без провокації)

3.3.1.1. Мета і задачі експерименту

Мета експерименту – отримання в режимі експрес-тестування даних про здатність хімічної речовини після тривалого введення викликати синдром відміни внаслідок неотримання чергової дози речовини [43].

Завданнями експерименту є доказ розвитку абстинентного синдрому після раптового припинення введення речовини в порівнянні з еталонною речовиною або без неї.

3.3.1.2. Планування експерименту

Експериментальні тварини: зазвичай миші-самці масою 18-24 г.

Тварин випадковим чином розподіляють на такі групи:

1 – група тварин, яка протягом експерименту щодня в один і той самий час (або згідно з режимом) одержує досліджувану сполуку у визначеній (умовноефективній) дозі.

2 – група тварин, яка протягом експерименту щодня в один і той самий час (або згідно з режимом) одержує препарат порівняння у визначеній дозі (дані літератури).

3 – група тварин, яка протягом експерименту щодня в один і той самий час (або згідно з режимом) одержує розчинник (зазвичай ізотонічний розчин з розрахунку 10 мл/кг).

Експеримент можливо проводити і за відсутності групи тварин, що одержують препарат порівняння. Якщо в експерименті планується досліджувати не одну речовину або більше однієї дози досліджуваної

сполуки чи препарату порівняння, додатково формується необхідна кількість груп. Загальна кількість тварин у кожній групі має бути щонайменше 6-8.

3.3.1.3. Опис методу

Через 24 години після останнього введення речовини досліджують загальний стан тварин при розміщенні їх в індивідуальних прозорих боксах та виявляють специфічні ознаки синдрому відміни, характерні для даного класу психоактивних сполук (табл. 3.1). Після цього реєструють рухову активність (тест «відкритого поля») та вивчають вплив на м'язовий тонус та координацію рухів (у ротарод-тесті).

Критерієм розвитку синдрому відміни вважають зміни рухової активності та загального стану тварин відносно контрольної групи, що замість речовини одержувала розчинник. Виразність синдрому відміни оцінюють у порівнянні з групою тварин, що одержувала препарат порівняння.

Якщо у групи тварин, що одержували досліджувану сполуку, були відмічені певні ознаки абстиненції, одразу після досліду вводять наступну дозу речовини і додатково спостерігають, чи купуються відмічені зміни загального стану мишей черговим введенням.

3.3.1.4. Можливості та обмеження методу, його прогностичне значення

Метод відрізняється високою чутливістю і дозволяє виявити здатність сполуки викликати фізичну залежність. При цьому метод досить специфічний, тому що позбавлені такої здатності речовини (негативний контроль) не викликають розвитку ознак абстинентного синдрому.

До обмежень методу можливо віднести той факт, що ознаки спонтанної абстиненції (внаслідок неотримання чергової дози хімічної речовини) не завжди яскраво виражені, оскільки зворотні адаптаційні реакції нейромедіаторних систем виникають одразу після зниження концентрації речовини у міжклітинному просторі та вивільнення рецепторів [6].

3.3.2. Метод оцінки розвитку синдрому відміни з провокацією відповідним фармакологічним агентом

3.3.2.1. Мета і задачі експерименту

Мета експерименту – отримання в режимі експрес-тестування даних про здатність хімічної речовини після тривалого введення викликати синдром відміни, індукований специфічним фармакологічним агентом [43].

Завданнями експерименту є доказ розвитку абстинентного синдрому після провокації специфічним фармакологічним агентом порівняно з еталонною речовиною або без неї.

3.3.2.2. Вибір специфічного індуктора абстинентного синдрому

Логіка вибору специфічного індуктора абстинентного синдрому для конкретної психоактивної сполуки базується на типі впливу досліджуваної сполуки на рецептори, з якими вона зв'язується (агонізм чи антагонізм). Для індукції абстинентного синдрому обирається речовина, яка здатна блокувати взаємодію досліджуваної сполуки з рецептором або викликати протилежний ефект.

Найбільш детально це питання досліджено відносно опіоїдної системи мозку. Для індукції абстинентного синдрому у випадку речовин з морфіноподібною дією застосовують широке коло речовин, які виявляють властивості як антагоністів, так і оборотніх агоністів – налоксон, налтрексон, дипренорфін, налорфін, налоксоназін, 6β -налтрексол. Ці сполуки у широкому діапазоні доз викликають розвиток абстинентного синдрому у морфіно- та фентанілзалежних тварин, інтенсивність ознак якого має дозозалежний характер. Ретельно дослідженими є відмінності здатності зазначених сполук викликати синдром відміни, при цьому важливим аспектом є також доза опіоїдєргічної сполуки – що вона вища, то менша доза індуктора викликає інтенсивний абстинентний синдром [44, 45].

Для провокування синдрому відміни при дослідженні сполук з доведеним опіоїдєргічним механізмом дії найбільш зручним і найуживанішим є налоксон у дозах 5-10 мг/кг. Методичні рекомендації [6, 43] пропонують застосовувати дозу 10 мг/кг.

Для речовин, що є агоністами бензодіазепінового сайту ГАМК_A-рецепторів, як специфічний індуктор застосовують флумазеніл (найчастіше 20 мг/кг) [39].

Після тривалого введення речовин з барбітуратоподібною дією (агоністи барбітуратного сайту ГАМК_A-рецепторів) розвиток абстинентного синдрому індують введенням бемеґрїду (антагоніста зазначеного сайту) в дозі 20 мг/кг [39].

З метою індукції синдрому відміни речовин, що є агоністами СВ1-канабіноїдних рецепторів, застосовують рімонабант (який у більшості публікацій фігурує під шифром SR141716A) у діапазоні доз 1-10 мг/кг [40-42, 46].

Для психоактивних речовин, які реалізують механізм дії із залученням інших нейромедіаторних систем, для провокації абстинентного синдрому підбирають відповідний фармакологічний агент. Це може бути будь-яка сполука з доведеною в експерименті здатністю зв'язуватись з рецепторами нейромедіаторної системи, на яку впливає досліджувана речовина, та викликати протилежний ефект.

3.3.2.3. *Планування експерименту*

Експериментальні тварини: зазвичай миші-самці масою 18-24 г.

Тварин випадковим чином розподіляють на такі групи:

1 – група тварин, яка протягом експерименту щодня в один і той самий час (або згідно з режимом) одержує досліджувану сполуку у визначеній (умовноефективній) дозі.

2 – група тварин, яка протягом експерименту щодня в один і той самий час (або згідно з режимом) одержує препарат порівняння у визначеній дозі (дані літератури).

3 – група тварин негативного контролю, яка протягом експерименту щодня в один і той самий час (або згідно з режимом) одержує розчинник (зазвичай ізотонічний розчин з розрахунку 10 мл/кг).

4 – група тварин контролю власних ефектів індуктора абстинентного синдрому, яка протягом експерименту щодня в один і той самий час (або згідно з режимом) одержує розчинник, а в останній день замість розчинника одержує відповідну дозу індуктора.

Експеримент можливо проводити і за відсутності групи тварин, що одержують препарат порівняння, але обов'язково формується група тварин, що за аналогічною схемою одержують розчинник, та група контролю власних ефектів індуктора абстинентного синдрому для даного класу психоактивних речовин. Це важливо з огляду на те, що власні ефекти індуктора можуть нагадувати певні симптоми абстинентного синдрому [38, 47]. Важливо, щоб зазначена група мала аналогічний з іншими групами тварин досвід габітуації.

3.3.2.4. *Опис методу*

Безпосередньо перед останнім введенням речовин тварин зважують. Через 30-60 хвилин після введення останньої дози досліджуваної сполуки, препарату порівняння та розчинника (у групі контролю власних ефектів індуктора абстинентного синдрому) тваринам вводять обраний для провокації синдрому відміни фармакологічний агент. Протягом 15-30 хвилин досліджують загальний стан тварин в усіх групах (у тому числі в групі негативного контролю) при розміщенні їх в індивідуальних прозорих боксах та виявляють специфічні ознаки синдрому відміни, характерні для даного класу психоактивних сполук. Після цього реєструють рухову активність (тест «відкритого поля») та вивчають вплив на м'язовий тонус і координацію рухів (ротарод-тест). Наприкінці експерименту тварин повторно зважують з метою виявлення можливого зниження маси тіла, що є однією з ознак важкого перебігу абстинентного синдрому.

Критерієм розвитку синдрому відміни вважають зміни загального стану тварин і рухової активності відносно тварин групи негативного контролю та групи контролю власних ефектів індуктора абстинентного синдрому. Виразність синдрому відміни оцінюють у порівнянні з групою тварин, що одержувала препарат порівняння

3.3.2.5. Можливості та обмеження методу, його прогностичне значення

Метод оцінки розвитку синдрому відміни з провокацією відповідним фармакологічним агентом має суттєву перевагу перед методом з використанням спонтанної абстиненції, оскільки дозволяє значно підвищити чутливість виявлення специфічних ознак. Але власні фармакологічні ефекти індуктора можуть призводити до інтерференції результатів дослідження, що вимагає диференціювати ефекти досліджуваної сполуки та речовини, що застосовується з метою провокації абстинентного синдрому.

3.3.3. Комбінований протокол експерименту з оцінки розвитку синдрому відміни

Оригінальним варіантом експерименту є комбінація обох підходів, тобто і спонтанної абстиненції, і провокації відповідним фармакологічним агентом. Тварин після тривалого курсу введення тестують безпосередньо перед передостаннім введенням сполуки (через 24 години після попереднього) задля виявлення синдрому відміни внаслідок неотримання чергової дози речовини, а наступного дня (після останнього введення сполуки) провокують абстинентний синдром ін'єкцією фармакологічного індуктора абстинентного синдрому і досліджують поведінку та стан тварин. Але у цьому випадку при проведенні поведінкових тестів необхідно враховувати вплив габітуації (звикання) на досліджувані показники, що потребує синхронного дослідження контрольних і піддослідних груп.

Загальний протокол дослідження має виглядати так:

1) тривале введення досліджуваної сполуки, препарату порівняння (якщо є) та розчинника (двом контрольним групам за аналогічною схемою);

2) безпосередньо перед передостаннім введенням сполук (через 24 години після попереднього) досліджують загальний стан тварин на наявність специфічних ознак спонтанної абстиненції, рухову активність та вплив на м'язовий тонус та координацію рухів;

3) у випадку наявності характерних для синдрому відміни ознак (після передостаннього введення досліджуваної речовини знову спостерігають за тваринами) нівелювання проявів абстиненції черговим введенням речовини свідчить на користь розвитку фізичної залежності.

- 4) перед останнім уведенням речовин тварин зважують;
- 5) через 30-60 хвилин після введення останньої дози досліджуваної сполуки, препарату порівняння та розчинника (у групі контролю власних ефектів індуктора абстинентного синдрому) тваринам вводять обраний для провокації синдрому відміни фармакологічний агент.
- 6) протягом 15-30 хвилин досліджують загальний стан тварин в усіх групах (у тому числі в групі негативного контролю) при розміщенні їх в індивідуальних прозорих боксах та виявляють специфічні ознаки синдрому відміни, характерні для даного класу психоактивних сполук.
- 7) реєструють рухову активність (тест «відкритого поля») та вивчають вплив на м'язовий тонус і координацію рухів (ротарод-тест);
- 8) тварин повторно зважують з метою виявлення можливого зниження маси тіла.

Розділ 4. Обґрунтування необхідності формування групи тварин синхронного контролю ефектів індуктора абстиненції

4.1. Загальні положення

У дослідженнях здатності хімічних речовин викликати розвиток фізичної залежності налоксон застосовується як повний антагоніст опіїдних рецепторів усіх підтипів з добре відомими фармакологічними властивостями. Але чинні методичні рекомендації [6, 47] не дають жодних коментарів щодо власних ефектів налоксону при провокації синдрому відміни, які можуть бути помилково трактовані як прояви абстиненції. У літературі зустрічаються поодинокі публікації щодо впливу введення налоксону на поведінку тварин [48-52], але ці дані мають суперечливий характер і не дають системного бачення цього питання.

Аналіз великої кількості літературних джерел показав, що дослідники зазвичай нехтують таким важливим питанням як формування додаткової групи тварин для контролю здатності індуктора абстинентного синдрому викликати зміни загального стану та активності тварин, що можуть бути помилково віднесені до ознак синдрому відміни.

Спасов А.А. зі співавторами [38] при дослідженні наркогенного потенціалу нових агоністів опіатних рецепторів у дизайні експерименту враховував зазначений аспект. Цікаво, що у групі мишей, що одержували тільки налоксон у дозі 25 мг/кг (контроль власних ефектів налоксону), у 33,3% тварин спостерігався розвиток тремору, який належить до специфічних ознак абстиненції. Саме це дозволило кількісно диференціювати спостережувану ознаку у структурі показника групи досліджуваної сполуки.

Цитована публікація спонукала нас провести власні дослідження зазначеного питання.

4.2. Власні дослідження поведінкових та нейротропних ефектів налоксону

4.2.1. Мета, загальні положення, матеріали та методи

Метою даного дослідження було виявити власні ефекти налоксону у тесті відкритого поля, ротарод-тесті та його здатність викликати специфічні ознаки, характерні для абстинентного синдрому, при ізольованому введенні мишам.

Дослідження було проведено на рандомбредних мишах-самцях масою 20-24 г відповідно до директиви Ради ЄС 2010/63/EU про дотримання законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментальної та іншої наукової мети [53]. Під час експерименту тварин утримували в стандартних умовах віварію ЦНДЛ НФаУ за природнього світлового режиму «день-ніч» з вільним доступом до води та їжі [54].

Експеримент проводили у два етапи:

1) у перший день усі тварини внутрішньошлунково одержували відповідний об'єм дистильованої води із розрахунку 0,1 мл/ 10 г маси тіла, після чого їх досліджували у тесті відкритого поля [43] та ротарод-тесті [55].

2) наступного дня у той же час мишей зважували та вводили їм внутрішньошлунково аналогічну кількість дистильованої води, а через 20 хв тваринам двох піддослідних груп внутрішньоочеревинно вводили налоксон у дозах 5 мг/кг або 10 мг/кг. Протягом 30 хв після ін'єкції налоксону спостерігали за мишами, які перебували в окремих прозорих контейнерах, з метою виявлення змін загального стану, після чого досліджували у тесті відкритого поля та ротарод-тесті. Наприкінці експерименту кожен тварину повторно зважували.

Мишей випадковим чином розподілили на три групи:

I – група інтактного контролю, що одержувала дистильовану воду і на першому, і на другому етапі, n=8;

II – група, що на другому етапі одержувала налоксон у дозі 5 мг/кг, n=8;

III – група, що на другому етапі одержувала налоксон у дозі 10 мг/кг, n=5.

Конкурентний блокатор опіоїдних рецепторів налоксон (Налоксон-3Н, серія 04661016, ТОВ “Здоров’я народу”, Україна) вводили у вищенаведених дозах внутрішньоочеревинно у вигляді 0,04% розчину для ін'єкцій.

Одержані результати наведено у формі середньої арифметичної та стандартної похибки ($M \pm m$). Результати обробляли статистично з використанням програмного забезпечення «STATISTICA® 10.0». Достовірність міжгрупових відмінностей встановлювали за допомогою параметричного t-критерію Ст'юдента при нормальному розподілі та непараметричного U-критерію Манна-Вітні при його відсутності, або за кутовим перетворенням Фішера при обліку результатів в альтернативній формі. Статистично значущими вважали результати за $p < 0,05$.

4.2.2. Загальні результати та їх обговорення

На першому етапі дослідження після введення усім трьом групам мишей дистильованої води поведінкові показники тварин досліджено у тесті відкритого поля (табл. 4.1) та ротарод-тесті (табл. 4.2).

На другому етапі одразу після ін'єкції налоксону тварин дослідних груп поодиноці вміщували у прозорі контейнери та спостерігали протягом 30 хв за їх станом (табл. 4.3).

Стрибків («домінантних» ознак опіоїдної абстиненції, у якій беруть участь μ -рецептори [56]), не було в жодній тварини ані в групі інтактного контролю, ані під впливом налоксону в обох досліджуваних дозах. Але у тварин піддослідних груп мали місце інші («рецесивні») ознаки опіоїдної абстиненції. Так, на тлі введення налоксону в дозі 5 мг/кг у 2 мишей з 8 (25%) спостерігали поодинокі здригання голови. У групі, що одержувала 10 мг/кг налоксону, цей симптом мав місце у 2 мишей з 5 (40%). Виразнішим був розвиток блефароптозу або напівптозу у тварин піддослідних груп. Якщо під впливом дози налоксону 5 мг/кг цю ознаку спостерігали у 50% мишей, то на тлі дози 10 мг/кг – у 100% тварин. Цей феномен, можливо, обумовлений дією налоксону на μ_2 -рецептори [56]. Інші ознаки опіоїдної абстиненції були відсутні у тварин піддослідних груп протягом терміну спостереження. Це дозволяє зробити висновок, що налоксон не індукує їх розвиток.

Результати другого етапу дослідження тварин у тесті відкритого поля наведено у табл. 4.1.

Оскільки дослідження проводили наступного дня після визначення початкових показників, цілком закономірним є вплив габітуації на результати мишей групи інтактного контролю. Спостерігали зниження кількості перетнутих квадратів на 35,0% ($p < 0,05$); недостовірне, але суттєве (на 36,6%) зменшення кількості вертикальних стійок, достовірне зменшення кількості обстежених отворів на 36,2% ($p < 0,05$), суми показників орієнтовно-дослідницької активності на 36,6% ($p < 0,05$), а також суми всіх показників на 35,7% ($p < 0,05$). При цьому показники вегетативного супроводу емоційних реакцій залишились на рівні першого етапу дослідження.

На тлі дії налоксону в дозі 5 мг/кг зміни мали аналогічний напрям, але носили виразніший характер (табл. 4.1): локомоторна активність знизилась на 42,1% ($p < 0,05$), кількість обстежених отворів – на 49,5% ($p < 0,01$), сума показників орієнтовно-дослідницької активності – на 46,5% ($p < 0,01$), сума всіх показників – на 44,3% ($p < 0,01$). Вищий рівень статистичної значущості зменшення показників порівняно з інтактним контролем свідчить, що його неможливо пояснити виключно феноменом габітуації, тобто налоксон у дозі 5 мг/кг чинить певний седативний вплив.

У дозі 10 мг/кг налоксон чинив ще виразніший седативний вплив (табл. 4.1): кількість перетнутих квадратів знизилась на 62,1% ($p < 0,01$), кількість вертикальних стійок – на 82,1% ($p < 0,05$), кількість обстежених отворів – на 73,7% ($p < 0,01$), сума показників орієнтовно-дослідницької активності – на 74,7% ($p < 0,01$), а сума всіх показників – на 68,4% ($p < 0,01$).

Таблиця 4.1

**Дозозалежні ефекти налоксону у тесті відкритого поля у мишей,
M±m (n=21)**

Показник	Етап	Група, кількість тварин		
		Інтактний контроль n=8	Налоксон, 5 мг/кг n=8	Налоксон, 10 мг/кг n=5
I. Локомоторна активність				
перетнуто квадратів	1	54,0±5,4	44,9±6,0	24,8±3,3
	2	35,1±3,5*(-35,0%)	26,0±3,6*(-42,1%)	9,4±3,5**(-62,1%)
II. Орієнтовно-дослідницька активність				
кількість стійок	1	13,1±1,9	3,5±0,8	5,6±1,6
	2	8,3±1,4(-36,6%)	3,1±1,0(-11,4%)	1,0±0,6*(-82,1%)
обстежено отворів	1	44,5±3,8	44,0±4,7	42,6±6,0
	2	28,4±4,9* (-36,2%)	22,2±3,7** (-49,5%)	11,2±3,5** (-73,7%)
сума	1	57,7±4,7	47,5±4,8	48,2±7,0
	2	36,6±4,5* (-36,6%)	25,4±3,9** (-46,5%)	12,2±4,0** (-74,7%)
III. Вегетативний супровід емоційних реакцій				
болюси	1	0,6±0,4	0,1±0,1	0,4±0,4
	2	0,3±0,3	0,8±0,4	1,2±0,4
уринації	1	0,1±0,1	0,3±0,2	0
	2	0	0	0
грумінг	1	1,1±0,5	0,9±0,7	0,6±0,2
	2	1,0±0,5	0	0,6±0,4
сума	1	1,9±0,7	1,3±0,8	1,0±0,6
	2	1,3±0,5	0,8±0,4	1,8±0,6
Сума всіх активностей				
I+ II + III	1	113,5±9,2	93,6±8,1	74,0±9,5
	2	73,0±6,8** (-35,7%)	52,1±7,2** (-44,3%)	23,4±7,8** (-68,4%)

Примітка: *, ** – $p < 0,05$ та $p < 0,01$ відносно показників цієї ж групи на попередньому етапі дослідження.

Таким чином, однакове зменшення всіх субтестів тесту відкритого поля під час наступного досліду з налоксон частково може пояснюватися габітуацією, частково – наявністю в налоксону відомого седативного ефекту [57], який має виразний дозозалежний характер.

У тесті стрижня, що обертається (табл. 4.2), порушень координації рухів і тону м'язів не виявлено ані у тварин групи інтактного контролю, ані на тлі введення налоксону в обох досліджених дозах.

**Вплив налоксону на координацію рухів та м'язовий тонус мишей
у ротарод-тесті (n=21)**

Час падіння	Кількість мишей, що впали зі стрижня, абс./%					
	Інтактний контроль n=8		Налоксон, 5 мг/кг n=8		Налоксон, 10 мг/кг n=5	
	1 етап	2 етап	1 етап	2 етап	1 етап	2 етап
до 1 хв	0/0%	1/12,5%	1/12,5%	2/25,0%	1/20%	2/40%
до 2 хв	1/12,5%	3/37,5%	2/25,0%	3/37,5%	3/60%	2/40%
до 3 хв	3/37,5%	5/62,5%	4/50,0%	5/62,5%	2/40%	3/60%
до 5 хв	5/62,5%	6/75,0%	5/62,5%	7/87,5%	4/80%	4/80%

При повторному зважуванні тварин наприкінці експерименту жодного випадку зменшення маси тіла не виявлено (табл. 4.3).

Загалом аналіз літературних джерел свідчить на користь неоднорідних та інколи навіть суперечливих фармакологічних властивостей налоксону. Але одержані результати добре узгоджуються з даними про зниження реакції на стрес на тлі налоксону [48], а також його седативні [57] та анксиолітичні властивості [49, 52], що пов'язують з модулювальним впливом на ГАМК-ергічну систему.

**Дозозалежний вплив налоксону на розвиток специфічних ознак,
характерних для абстинентного синдрому у мишей (n=21)**

Ознака	Кількість тварин у групі, що мали ознаку, абс./%		
	Інтактний контроль n=8	Налоксон, 5 мг/кг n=8	Налоксон, 10 мг/кг n=5
Стрибки	0/0%	0/0%	0/0%
Зменшення маси тіла	0/0%	0/0%	0/0%
Здригання голови	0/0%	2/25%*	2/40%**
Блефароптоз або напівптоз	0/0%	4/50%**	5/100%**

Примітка: *, ** – $p < 0,05$ та $p < 0,01$ відносно показників групи інтактного контролю за кутовим перетворенням Фішера.

Таким чином, проведене дослідження виявило здатність налоксону викликати у мишей певні зміни стану (блефароптоз, здригання голови), що

можуть бути помилково трактовані як «рецесивні» ознаки абстинентного синдрому. «Домінантних» ознак абстиненції (стрибків) налоксон *per se* не викликає. Ці властивості антагоніста опіїдних рецепторів доцільно враховувати при дослідженнях здатності хімічних речовин з доведеним опіїддергічним механізмом знеболювальної дії викликати фізичну залежність. Доведено дозозалежний седативний вплив налоксону у тесті відкритого поля, що також варто брати до уваги у психофармакологічних дослідженнях. Отже, з метою диференціації проявів абстинентного синдрому від власних поведінкових та нейротропних ефектів налоксону у мишей доцільно використовувати додаткову групу тварин, яка одержує лише налоксон у відповідній дозі.

4.2.3. Загальні висновки та рекомендації з власних досліджень

1. Досліджено власні ефекти налоксону у дозах 5 мг/кг та 10 мг/кг у тесті відкритого поля та ротарод-тесті, які широко застосовуються для оцінки адиктивного потенціалу перспективних сполук анальгетичної дії.

2. Доведено здатність налоксону викликати зміни стану тварин, а саме поодинокі здригання голови, блефароптоз і напівптоз, що можуть помилково трактуватись як прояви абстиненції.

3. Показано, що в тесті відкритого поля на тлі налоксону відбувається дозозалежне зниження показників локомоторної активності та орієнтовно-дослідницьких реакції при незмінних показниках емоційного стану тварин.

4. На м'язовий тонус мишей і координацію рухів у ротарод-тесті налоксон не впливає.

5. Одержані результати спонукають диференціювати власні ефекти налоксону та прояви синдрому відміни лікарських препаратів та хімічних сполук.

6. З метою підвищення якості експериментальних фармакологічних досліджень в аспекті виявлення здатності хімічних сполук викликати розвиток фізичної залежності методом провокації синдрому відміни за допомогою фармакологічних індукторів, зокрема налоксону, обов'язково формувати поряд із групою негативного контролю додаткову групу контролю власних ефектів речовини, що застосовується для провокації абстинентного синдрому.

ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Психіатрія і наркологія : підручник / В. Л. Гавенко та ін.; за ред. В. Л. Гавенка, В. С. Бітенського. 2-ге вид., переробл. і допов; К.: ВСВ «Медицина», 2015. 512 с.
2. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10)-2015-WHO. Chapter V: Mental and behavioural disorders (F00-F99). Available from: <https://icd.who.int/browse10/2015/en#/F10>.
3. Assessment of Abuse Potential of Drugs. Guidance document / U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, January 2017. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/assessment-abuse-potential-drugs>.
4. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing, 2013. 992 p.
5. СТ-Н МОЗУ 42-6:0:2014 «Доклінічні дослідження безпеки як підґрунтя клінічних випробувань за участю людини та реєстрації лікарських засобів (ICH M3(R2))». Київ, ДЕЦ МОЗ України, 2014. Режим доступу: http://www.dec.gov.ua/site/file_uploads/ua/clinical_trials/n1.pdf
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А. Н. Миронов и др. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
7. Штриголь С. Ю., Подольський І. М., Каврайський Д. П. Поведінкові та нейротропні ефекти налоксону у мишей. *Клінічна фармація*. 2017. Т. 21, № 3. С. 29–34.
8. Koga Y., Inukai T. Characterization of Withdrawal Syndrome of Morphine-Dependent Rats Prepared by Intermittent Infusion Technique. *Psychopharmacology*. 1981. Vol. 73. P. 230–235.
9. Beardsley P. M. Assessing dependency and abuse potential. *Nonclinical Drug Safety Assessment: Practical Considerations for Successful Registration*. Eds. Sietsema W.K., Schwen R. Falls Church, VA: FDAnews, 2007. P. 441–463.
10. Young A. M., Herling S. Drugs as reinforcers: studies in laboratory animals. *Behavioral analysis of drug dependence*. Eds. Goldberg S. R., Stolerman I. P. Orlando: Academic Press, 1986. P. 9–67.
11. Schuster C. R., Johanson C. E. Relationship between the discriminative stimulus properties and subjective effects of drugs. *Psychopharmacol. Ser.* 1988. Vol. 4. P. 161–175.
12. Lüscher C., Ungless M. A. The Mechanistic Classification of Addictive Drugs. *PLoS Med.* 2006. Vol. 3. P. 437.
13. Wise R. A. Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu. Rev. Neurosci.* 1996. Vol. 19. P. 319–340.

14. Prus A. J., James J. R., Rosecrans J. A. Conditioned Place Preference / In: Buccafusco J. J., editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5229/>
15. Экспериментальное доклиническое изучение аддиктивного потенциала фармакологических средств методические рекомендации № 2000/112 / Э. Э. Звартау и др. Институт фармакологии им. А.В. Вальдмана СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, 2001. Режим доступа: <http://www.alppp.ru/law/hozjajstvennaja-dejatelnost/promyshlennost/34/eksperimentalnoe-doklinicheskoe-izuchenie-addiktivnogo-potenciala-farmakologicheskikh-sreds.html>.
16. Fudala P. J., Teoh K. W., Iwamoto E. T. Pharmacologic characterization of nicotine-induced conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav*. 1985. № 22. P. 237–241.
17. Busse G. D., Riley A. L. Cocaine, but not alcohol, reinstates cocaine-induced place preferences. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004. № 78. P. 827–833.
18. Masukawa Y., Suzuki T., Misawa M. Differential modification of the rewarding effects of methamphetamine and cocaine by opioids and antihistamines. *Psychopharmacology (Berl.)*. 1993. № 111. P. 139–143.
19. Asin K. E., Wirtshafter D. Clonidine produces a conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology (Berl.)*. 1985. № 85. P. 383–385.
20. Suzuki T., Misawa M. Sertindole antagonizes morphine-, cocaine-, and methamphetamine-induced place preference in the rat. *Life Sci*. 1995. № 57. P. 1277–1284.
21. The role of mu- and kappa-opioid receptors in cocaine-induced conditioned place preference / T. Suzuki et al. *Jpn J Pharmacol*. 1992. № 58. P. 435–442.
22. Morphine-induced place preference: Involvement of cholinergic receptors of the ventral tegmental area / A. Rezaïof et al. *Eur J Pharmacol*. 2007. № 562. P. 92–102.
23. Le Foll B., Goldberg S. R. Control of the reinforcing effects of nicotine by associated environmental stimuli in animals and humans. *Trends Pharmacol Sci*. 2005. № 26. P. 287–293.
24. Van der Kooy D., Swerdlow N. R., Koob G. F. Paradoxical reinforcing properties of apomorphine: Effects of nucleus accumbens and area postrema lesions. *Brain Res*. 1983. № 259. P. 111–118.
25. Bechara A., Zito K. A., Van der Kooy D. Peripheral receptors mediate the aversive conditioning effects of morphine in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1987. № 28. P. 219–225.

26. Bedard P., Pycock C. J. 'Wet-Dog' shake behaviour in the rat: A possible quantitative model of central 5-hydroxytryptamine activity. *Neuropharmacology*. 1977. Vol. 16 (10). P. 663–670.
27. Dopamine microdialysis in the nucleus accumbens during acute and chronic morphine, naloxone-precipitated withdrawal and clonidine treatment / E. Pothos, P. Rada, G. P. Mark, B. G. Hoebel. *Brain Res.* 1991. Vol. 566 (1–2). P. 348–350.
28. Wei E., Loh H. H., Way L. Brain sites of precipitated abstinence in morphine-dependent rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1973. Vol. 185 (1). P. 108–115.
29. Further studies of the role of opioid receptors in the nigra in the morphine withdrawal syndrome / A.A. Baumeister et al. *Neuropharmacology*. 1992. Vol. 31 (9). P. 835–841.
30. Cappendijk S. L. T. Modulators of drug dependence phenomena: Factors affecting morphine withdrawal syndrome and cocaine-intake in rodents. Instituut voer Verslavings Onderzoek Rotterdam; Erasmus Universiteit Rotterdam. Thesis Rotterdam, 1995. 128 p.
31. 5-HT₃ receptor antagonists inhibit morphine-induced stimulation of mesolimbic dopamine release and function in the rat / Q. Pei, T. Zetterström, R. A. Leslie, D. G. Grahame-Smith. *European Journal of Pharmacology*. 1993. Vol. 230 (1). P. 63–68.
32. Ukai M., Toyoshi T., Kameyama T. DAGO ([d-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly-ol]enkephalin) specifically reverses apomorphine-induced increase in rearing and grooming behaviors in the mouse. *Brain Res.* 1991. Vol. 557 (1–2). P. 77–82.
33. Increase in rat striatal extracellular dopamine and vacous chewing produced by two σ receptor ligands / S. L. Patrick et al. *European Journal of Pharmacology*. 1993. Vol. 231 (2). P. 243–249.
34. Krane R. J., Goldstein I., de Tejada I. S. Impotence. *New England Journal of Medicine*. 1989. Vol. 321 (24). P. 1648–1659.
35. Maldonado R., Negus S., Koob G. F. Precipitation of morphine withdrawal syndrome in rats by administration of mu-, delta- and kappa-selective opioid antagonists. *Neuropharmacology*. 1992. Vol. 31 (12). P. 1231–1241.
36. Neal B. S., Sparber S. B. Mianserin attenuates naloxone-precipitated withdrawal signs in rats acutely or chronically dependent upon morphine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1986. Vol. 236 (1). P. 157–165.
37. Morgan M. M., Christie M. J. Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. *British Journal of Pharmacology*. 2011. Vol. 164 (4). P. 1322–1334.

38. Спасов А. А., Гречко О. Ю., Елисеева Н. В. Сравнительное изучение наркогенного потенциала опиоидных агонистов. *Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН*. 2009. № 3 (23). С. 22–25.
39. Carisoprodol Tolerance and Precipitated Withdrawal / M. B. Gatch, J. D. Nguyen, T. Carbonaro, M. J. Forster. *Drug and alcohol dependence*. 2012. Vol. 123 (1–3). P. 29–34.
40. Cook S. A., Lowe J. A., Martin B. R. CB1 Receptor Antagonist Precipitates Withdrawal in Mice Exposed to Δ 9-Tetrahydrocannabinol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1998. Vol. 285 (3). P. 1150–1156.
41. Novel behavioral assays of spontaneous and precipitated THC withdrawal in mice / K. R. Trexler et al. *Drug and alcohol dependence*. 2018. Vol. 191. P. 14–24.
42. Tsou K., Patrick S. L., Walker J. M. Physical withdrawal in rats tolerant to delta 9-tetrahydrocannabinol precipitated by a cannabinoid receptor antagonist. *European journal of pharmacology*. 1995. Vol. 280 (3). P. 13–15.
43. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays / H.G. Vogel (ed.). 3rd Edition, Springer, Berlin, Heidelberg, NewYork, 2008. 2068 p.
44. Walker E. A., Sterious S. N. Opioid antagonists differ according to negative intrinsic efficacy in a mouse model of acute dependence. *British Journal of Pharmacology*. 2005. Vol. 145 (7). P. 975–983.
45. The Relative Potency of Inverse Opioid Agonists and a Neutral Opioid Antagonist in Precipitated Withdrawal and Antagonism of Analgesia and Toxicity / S. Sirohi, S. V. Dighe, P. A. Madia, B. C. Yoburn. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009. Vol. 330 (2). P. 513–519.
46. Spontaneous and rimonabant-precipitated cannabinoid withdrawal in Δ 9-tetrahydrocannabinol and AM2389-treated mice / G. Chopda et al. *The FASEB Journal*. 2014. Vol. 28, Suppl. 1. № 838.5.
47. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. О. В. Стефанова. К. : Авіценна, 2001. 528 с.
48. Nadorova A. V. Kozlovskaja M. M., Seredenin S. B. Naloxone Effects on Behavior of Inbred Mice with Different Response to Emotional Stress in Open Field Test. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2009. Vol. 148 (4). P. 609–611.
49. Effects of phenazepam on the behavior of C57BL/6 and BALB/c mice in the open field test after naloxone pretreatment / S. B. Seredenin, A. V. Nadorova, L. G. Kolik, M. A. Yarkova. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2013. Vol. 155 (3). P. 346–349.

50. Increased elevated plus maze open-arm time in mice during naloxone-precipitated morphine withdrawal / S. R. Hodgson, R. S. Hofford, C. J. Norris, S. Eitan. *Behavioural pharmacology*. 2008. Vol. 19 (8). P. 805–811.
51. Belzung C., Agmo A. Naloxone blocks anxiolytic-like effects of benzodiazepines in Swiss but not in Balb/c mice. *Psychopharmacology*. 1997. Vol. 132 (2). P. 195–201.
52. Belzung C., Agmo A. Naloxone potentiates the effects of subeffective doses of anxiolytic agents in mice. *European journal of pharmacology*. 1997. Vol. 323 (2–3). P. 133–136.
53. Council Directive 2010/63/EU of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*. 2010. L 276. P. 33–79.
54. Deacon R. M. Housing, husbandry and handling of rodents for behavioral experiments. *Nature Protocols*. 2006. Vol. 1 (2). P. 936–946.
55. The Behavioral Assessment of Sensorimotor Processes in the Mouse: Acoustic Startle, Sensory Gating, Locomotor Activity, Rotarod, and Beam Walking / P. Curzon et al. In: Buccafusco J. J., editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5236/>
56. Suzuki T., Hayashi Y., Misawa M. The role of mu1 receptor in physical dependence on morphine using the mu receptor deficient CXBK mouse. *Life Sciences*. 1992. Vol. 50 (12). P. 849–856.
57. Sadeghi M., Movafegh A., Nouralishahi B. The effect of an intravenous bolus of ultra-low-dose naloxone on intraoperative sedation, post-operative pain intensity and morphine consumption in cesarean section patients under spinal anesthesia. *Research Journal of Biological Sciences*. 2008. Vol. 3 (10). P. 1223–1226.