

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ

ФАРМАЦЕВТИЧЕН ФАКУЛТЕТ

**КАТЕДРА „ФАРМАКОЛОГИЯ И ЛЕКАРСТВЕНА
ТОКСИКОЛОГИЯ“**



Д-р НИНА ДИМИТРОВА ДОНЧЕВА

**СРАВНИТЕЛНО ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ИЗСЛЕДВАНЕ
НА АНАЛГЕТИЧНО И ПРОТИВОВЪЗПАЛИТЕЛНО
ДЕЙСТВИЕ НА СРЕДСТВА,
ПРИЛАГАНИ ЗА СЪПЪТСТВАЩА ТЕРАПИЯ
НА БОЛКАТА**

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователна и научна степен „доктор“

Шифър на специалността „Фармакология“

Научен ръководител:

Проф. д-р Дамянка П. Гетова-Спасова, дмн

Пловдив, 2016

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	6
ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	9
1. Участие на глутаматната невромедиация и цитокини в реакциите на болка и възпаление.	9
1.1. Възпаление	9
1.2. Глутамат	10
1.3. Интерлевкин-6.....	11
1.4. Тумор-некротизиращ фактор алфа.....	12
2. Съвременни подходи за третиране на периферната болка и възпаление с препарати различни от традиционните НСПВС.....	13
2.1. Бенфотиамин	14
2.2. Алфа (α) – липоева киселина	17
2.3. Габапентин	20
2.4. Кетамин.....	25
3. Методи за изследване на болка и възпаление.....	28
3.1. Методи за изследване на остра болка и възпаление	28
3.2. Модели за изследване на хронична болка.....	39
3.3. Други модели на невропатия	45
ОБОБЩЕНИЕ	46
ЦЕЛ	47
ЗАДАЧИ	47
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	48
I. Експериментални групи	48
II. Методи	53
III. Статистически анализ на получените резултати	58
РЕЗУЛТАТИ	59
1. Влияние на дозата върху аналгетичния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при теста „гореща плоча“ (hot-plate test) при еднократно третиране.....	59
2. Влияние на дозата върху аналгетичния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при при тест с механичен болков стимул (аналгезиметър тест) при еднократно третиране.....	62

3. Влияние на дозата върху аналгетичния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при тест с химичен болков стимул при еднократно третиране.	64
4. Влияние на дозата върху противовъзпалителния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при карагенинов модел на възпаление при еднократно третиране.....	67
5. Влияние на дозата върху аналгетичния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при теста „гореща плоча“ (hot-plate test) при многократно 14-дневно третиране.	70
6. Влияние на дозата върху аналгетичния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при тест с механичен болков стимул (аналгезиметър тест) при многократно 14-дневно третиране.	73
7. Влияние на дозата върху аналгетичния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при тест с химичен болков стимул при многократно 14-дневно третиране.	76
8. Влияние на дозата върху противовъзпалителния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при карагенинов модел на възпаление при 14-дневно многократно третиране	79
9. Сравняване на аналгетичния ефект на бенфотиамин, α -липоева киселина, габапентин и кетамин при модел на невропатна болка при тест с топлинен болков стимул.	81
10. Сравняване на аналгетичния ефект на бенфотиамин, α -липоева киселина, габапентин и кетамин при модел на невропатна болка при тест с механичен болков стимул.	82
11. Ефекти на бенфотиамин, α -липоева киселина, габапентин и кетамин при многократно третиране върху серумното ниво на IL-6 при липополизахарид-индуциран модел на възпаление.	83
12. Ефекти на бенфотиамин, α -липоева киселина, габапентин и кетамин при 14-дневно многократно третиране върху серумното ниво на TNF- α при липополизахарид-индуциран модел на възпаление.	85
ОБСЪЖДАНЕ	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	106
ИЗВОДИ	109
ПРИНОСИ	110
ЛИТЕРАТУРА	111

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА БЪЛГАРСКИ ЕЗИК

АЛА – алфа липоева киселина
АТФ – аденозинтрифосфат
ГАМК – гама-аминомаслена киселина
МАО – моноаминооксидаза
НСПВС – нестероидни противовъзпалителни средства
СПИН – синдром на придобита имунна недостатъчност
цАМФ – цикличен аденозинмонофосфат
ЦНС – централна нервна система

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА АНГЛИЙСКИ ЕЗИК

AGEs – крайни продукти на гликирането
ALA – алфа липоева киселина
AMPA – α -амино-3-хидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионова киселина
AP-1 – активатор протеин едно
B1 – витамин B1
B6 – витамин B6
B12 – витамин B12
Ca – калций
CAR – карагенин
cGMP – цикличен гуанозин монофосфат
CGRP – калцитонин – ген свързан пептид
COX-2 – циклооксигеназа две
D2 – допаминови рецептори тип две
DHLA – дихидро липоева киселина
ELISA – ензим-свързан имуносорбентен тест
GBP – габапентин
HIV – човешки имунодефицитен вирус
5-HT – 5-хидрокситриптамин
IL-1 α – интерлевкин едно алфа
IL-1 β – интерлевкин едно бета
IL-4 – интерлевкин четири
IL-5 – интерлевкин пет

IL-6 – интерлевкин шест
IL – 8 – интерлевкин осем
IL-10 – интерлевкин десет
IL-12 – интерлевкин дванадесет
IL-13 – интерлевкин тринадесет
IL-1Ra – интерлевкин едно рецепторен антагонист
INF- γ – интерферон гама
iNOS – индуцируема азотен оксид синтаза
KA – каинат
LD 50 – средна летална доза
LPS – липополизахарид
LT-B4 – левкотриен Б четири
MCP-1 – моноцитен хемотаксичен пептид едно
Na⁺ – натрий
NA – норадреналин
NF- κ B – нуклеарен фактор капа Б
NK-1 – неврокинин-1
NMDA – N-methyl-D-aspartat
NO – азотен оксид
PG E₂ – простагландин Е две
RNS – реактивни азотни видове
ROS – реактивни кислородни радикали
SH – сулфхидрилни групи
SP – субстанция П
TGF- β – трансформиращ растежен фактор бета
TLR-4 – тол-подобен рецептор четири
TNF- α – тумор некротизиращ фактор алфа
TNF-RI – тумор некротизиращ фактор рецептор тип едно
TNF-RII – тумор некротизиращ фактор рецептор тип две
TrpA1 – преходно потенциален рецепторен катионен канал субфамилия А
TXB – тромбосан Б

ВЪВЕДЕНИЕ

Болката е субективно неприятно сензорно и емоционално преживяване, което се дължи на актуално или потенциално увреждане на тъканите. Болката се класифицира по различни критерии: според продължителността, патофизиологията и анатомичната локализация. Според продължителността си болката може да бъде остра или хронична. Според патофизиологичните механизми, които я предизвикват, болката се класифицира като ноцицептивна или невропатна. При класическата ноцицептивна болка е налице интактна нервна система, докато невропатния тип болка не изисква директно дразнене на ноцицептора и най-често се дължи на увреждане на нервната система. Според международната асоциация за изучаване на болката (IASP), невропатната болка се дефинира като болка, причинена от първична лезия или дисфункция на периферната или централната нервна система (Chong MS, Vajwa ZH, 2003).

Първата стъпка в лечението на болката е нейното определяне като ноцицептивна или невропатна, защото двата вида болка се повлияват от различни медикаменти (Миланов И, 2009). За лечението на ноцицептивната болка се използват аналгетици (опиоидни и неопиоидни) и нестероидни противовъзпалителни средства (НСПВС).

Невропатната болка се повлиява основно от антидепресанти, които засилват ендогенната модулация на болката чрез десцендиращата булбо-спинална норадренергична и серотонинергична инхибиция и антиконвулсанти, които потискат абнормната невронна хипервъзбудимост и ектопичното генериране на импулси в аксона. Патофизиологичните механизми на невропатната болка са все още ненапълно изяснени и лечението често е незадоволително.

Европейската асоциация на неврологичните дружества препоръчва за лечението на невропатна болка на първо място трицикличните антидепресанти, габапентин и прегабалин (Attal N et al, 2006). Клиничната ефективност на тези медикаменти е свързана с около 50% намаляване на болката и висока честота на нежелани лекарствени реакции, което обуславя търсенето на алтернативни медикаменти.

Експериментални изследвания върху лабораторни животни установяват периферни и централни патофизиологични процеси в механизма на невропатната болка. Директното увреждане на нерва предизвиква локален инфламаторен отговор и освобождаване на редица медиатори – хистамин, брадикинин, серотонин, аденозин трифосфат, PG E2, LT-B4, IL-4, IL-6, TNF- α . Експериментални проучвания показват, че NO е важен медиатор, отговорен за развитието на хипералгезията в централната нервна

система. Увредените ноцицептивни неврони освобождават калцитонин-ген свързан пептид (CGRP) и субстанция Р (SP). Тези невропептиди предизвикват вазодилатация и секреция на инфламаторни медиатори от мастоцитите и левкоцитите (неврогенно възпаление). В резултат на това, ноцицепторите, които са неактивни и нереагиращи при нормални условия могат да покажат повишена чувствителност (понижен праг на стимулация и по-продължителен отговор при стимулация) с развитие на спонтанни разряди.

Глутаматът е възбуден медиатор в ЦНС, който активира две групи рецептори – йонотропни и метаболотропни. От глутаматните рецептори NMDA участват в хроничните болкови синдроми. Те се откриват в задния рог на гръбначния мозък и в първичните аферентни неврони, които инервират периферните нерви. Стимулирането на NMDA рецепторите в гръбначния мозък индуцира освобождаването на невромедиаторите субстанция Р и калцитонин ген-свързания пептид, които усилват ноцицептивните стимули и действат проноцицептивно. Кетаминът повлиява периферна и централна невропатна болка чрез некомпетитивен антагонизъм на NMDA рецепторите, като потиска рецепторната активност и проводимостта на натриевите и калиеви йонни канали в гръбначния мозък, когато са отворени (Macres S, Richeimer S, Duran P, 2004).

Витамин В1 играе ключова роля в окислителното разграждане на глюкозата, процес, който доставя енергия за нервните клетки. При по-високи нива на глюкоза в организма е завишена и потребността от Витамин В1. Участвайки в ензимна система, генерираща енергия, в метаболизма на въглехидрати и мастни киселини, тиаминът и неговият мастноразтворим аналог бенфотиамин се използват за лечение на възпалителни и дегенеративни процеси на периферните нерви като диабетна полиневропатия, алкохолни и постинфекциозни полиневрити, радикулити и травматични увреждания на ЦНС.

В резултат на хипергликемията при захарен диабет в стената на кръвоносните съдове се натрупват т. нар. „крайни продукти на гликирането“. Този процес води до ендоневрална хипоксия и исхемия и е свързан с увеличено производство на свободни кислородни радикали, които увреждат периферните нерви, както и с изчерпване на антиоксидантите, като глутатион. Алфа-липоевата киселина е ендегенна субстанция, като основните и биологични ефекти са свързани предимно със силните и антиоксидантни свойства. Основно терапевтично показание на алфа-липоевата киселина е сетивни нарушения при диабетна полиневропатия (парастезии, чувство на

парене, болка, изтръпване, мравучкане). При редица експериментални проучвания е установено, че алфа-липоевата киселина намалява плазмените нива на проинфламаторни протеини, като IL-6, TNF- α и iNO синтаза.

Съвременните усилия са насочени към предотвратяване развитието на невропатната болка и адекватен и предсказуем контрол на съществуваща вече такава. За тази се прилагат кетамин, габапентин, бенфотиамин и алфа-липоева киселина.

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Участие на глутаматната невромедиация и цитокини в реакциите на болка и възпаление.

1.1. Възпаление

Възпалението е комплексен защитен механизъм, при който се наблюдава миграция на левкоцити в увредените тъкани с цел унищожаване агентите, които могат да причинят потенциално тъканно увреждане.

Острото възпаление е ограничен защитен отговор, който се наблюдава предимно при инфекции, докато хроничното възпаление е персистиращо явление, което може да доведе до тъканно увреждане. Един отличителен белег на острото възпаление е, че първоначално левкоцитната инфилтрация е предимно неутрофилна, но след 24 до 48 часа преобладават моноцитни клетки. Острофазовият отговор се индуцира бързо при възпаление, инфекция и нараняване. Тази реакция участва във възстановяването на организма при възпаление.

Хроничното възпаление хистологично е свързано с присъствието на мононуклеарни клетки като макрофаги и лимфоцити. Отговорът в острата фаза включва изменения в концентрациите на много плазмени протеини, известни като острофазови протеини. Цитокините, които се продуцират при възпалителните процеси стимулират производството на тези острофазови протеини. Тези провъзпалителни цитокини са IL-6, IL-1 β , TNF- α , INF- γ , TGF- β и IL-8. Установено е, че при мишки, които не са в състояние да експресират IL-6 (knockout mice), ролята на IL-6 в стимулиране производството на острофазови протеини зависи от естеството на възпалителния стимул: отговорът в по-голяма степен е инхибиран при възпаление, предизвикано с терпентин и е нормален при липополизахарид-индуцирано възпаление (LPS). Това показва, че LPS предизвиква производство на други цитокини, способни да стимулират производството на острофазови протеини.

Бактериалният липополизахарид, структурен компонент на бактериалната клетъчна стена, е мощен инициатор на възпалителен отговор при бактериални инфекции. Свързването му с CD14 рецептора на клетъчните мембрани на моноцити и макрофаги предизвиква освобождаване на проинфламаторни цитокини и хемокини като IL-1 α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-12 и TNF- α , водещи до цитотоксичност (Goraca A, 2009).

1.2. Глутамат

Глутаматът е медиатор с възбуждащо действие в ЦНС, който активира няколко вида рецептори, разположени пре- и постсинаптично. Глутаматергичните рецептори се разделят на две групи – йонотропни и метаболотропни.

Йонотропни рецептори са N-methyl-D-aspartate (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) и kainate (KA). Те представляват йонни канали, които при активиране се отварят и водят до навлизане на натриеви йони в клетката. Този инфлукс активира интрацелуларна сигнална каскада. NMDA рецепторите са съставени от две NR1 и две NR2 субединици. NR1 субединицата е свързващо място за глутаматния агонист глицин, а NR2 субединицата свързва глутамата. В NMDA рецептора са идентифицирани още две свързващи места- фенциклидин-свързващо и кетамин-свързващо място.

Метаболотропните рецептори са три вида и са G-протеин свързани. Рецепторите от I група стимулират хидролизата на фосфоинозитидите в клетъчната мембрана. Рецепторите от II и III група инхибират ензима аденилатциклаза, който участва в образуването на цАМФ от АТФ (Machado-Vieira R et al, 2009).

Предполагат се няколко механизма в развитието на невропатната болка: 1) разрастване на $A\beta$ фибрите към повърхностния слой на задния рог на гръбначния мозък, 2) ектопичен разряд на ганглия на задния рог на гръбначния мозък, 3) спинална чувствителност (Yamamoto T, 2008). Множество клинични данни сочат, че хроничната болка, дължаща се на увреждане на нерв или меки тъкани води до чувствителност на ЦНС, медирана частично от възбудните аминокиселини глутамат и аспартат.

Съществуват убедители доказателства, че NMDA рецепторите медираат продължителните болкови реакции при експериментални модели и различни симптоми на хронична болка при клинични проучвания. В съответствие с това антагонисти на NMDA рецепторите, като кетамин, декстрометорфан и амантадин могат да се използват за лечение на хронична болка (Fisher K et al, 2000). NMDA-рецепторът е лиганд-опериращ йонен канал, който медира инфлукса на Ca^{2+} йони когато е активиран. NMDA-рецепторният комплекс има множество места за свързване на различни лиганди, които регулират неговата активност. Такива са: стрихнин-нечувствително глицин свързващо място; фенциклидиново свързващо място; свързващо място за полиамини; редокс-модулиращо място и протон-чувствително място. Частичната деполяризация на неврона след активиране от глутамат води до освобождаване на магнезий и позволява калция да навлезе в неврона.

NMDA рецептори се откриват във висока концентрация в хипокампа и играят ключова роля в процесите на централна сенситизация към болкови стимули, известен като „wind-up” феномен, водещ до хипералгезия. В развитието на невропатната болка са въввлечени няколко механизма, включващи първична и вторична хипералгезия, периферна и централна сензитизация и „wind-up“ феномен. Невромедиаторите, които играят ключова роля в тези процеси са неврокинини и глутамат (Laird et Gidal, 2000). От глутаматните субтипове рецептори основна роля имат AMPA и NMDA рецепторите. Последните при липса на магнезиева блокада стимулират инфлукса на Ca йони в клетката. Тези калциеви йони действат като вторични посредници, които активират протеин киназа C, експресията на прото-онкогени (c-fos, c-jun) и продукцията на азотен окис. Следователно активирането на NMDA рецепторите повишава възбудимостта на ноцицептивната система. Основанията за използването на антиконвулсантите за лечение на невропатна болка се базират на подобните патофизиологични механизми на епилепсията и невропатни болкови модели.

1.3. Интерлевкин-6

IL-6 е открит през 1986 г. като В клетъчен диференциращ фактор, който превръща активираните В клетки в имуноглобулин – произвеждащи клетки. IL-6 се получава от различни видове клетки, като Т-клетки, В-клетки, моноцити, фибробласти, кератиноцити, ендотелни клетки, мезангиални клетки, адипоцити и някои туморни клетки. IL-6 осъществява своите биологични действия чрез две молекули: IL-6R (известен също като IL-6R α) и gp 130 (IL-6R β). IL-6 повишава производството на IgM, IgG и IgA от В-клетките.

IL-6 е с двойно действие: при остро възпаление действа като защитен антиинфламаторен механизъм, а при хронично възпаление е с проинфламаторно действие. Използвайки IL-6 трансгенни мишки, Xing и сътр. (1998) установяват противовъзпалителната компонента в действието на IL-6 при локални и системни остри възпалителни реакции. Те доказват, че IL-6 е от решаващо значение за контролиране нивото на проинфламаторните цитокини при локални и системни остри възпалителни реакции. В допълнение, IL-6 стимулира производството на IL-1 рецепторен антагонист (IL-1Ra), който е противовъзпалителен медиатор (Gabay C, 1997). Следователно IL-6 може да има защитен антиинфламаторен ефект.

IL-6 участва в широк спектър от биологични реакции, като имунни отговори, хемопоеза и остро фазови реакции. Свръхпроизводство на IL-6 е свързано с

патогенезата на различни заболявания, включително хронични възпалителни заболявания и рак. Счита се, че IL-6 играе важна роля при преминаването от остро в хронично възпаление чрез активиране пътя на транс-сигнализация (Kaplanski G, 2003). Бъдещите проучвания за изясняване на молекулярните механизми в действието на IL-6 и използването на инхибитори на IL-6 сигнализицията ще предоставят информация за по-добро разбиране на молекулярните механизми на заболяванията и развитието на нови терапевтични методи.

IL-6 участва в натрупването на неутрофили във възпалителното огнище (Mihara M, 2012). IL-6 оказва своето действие чрез свързване с рецептор и инициране на класическия път на сигнализация или чрез свързване с разтворим рецептор и инициране на пътя на транс-сигнализация (Gabay C, 2006). IL-6 предизвиква не само острофазови реакции, но води и до развитие на специфични клетъчни и хуморални имунни отговори, включващи крайния стадий на В клетъчна диференциация, имуноглобулинова секреция и Т клетъчна активация. Счита се, че IL-6 играе важна роля при преминаването от остро в хронично възпаление чрез активиране пътя на транс-сигнализация (Kaplanski G, 2003).

IL-6 играе ключова роля и при хронично възпаление. Повишени нива на IL-6 са установени при редица възпалителни заболявания като ревматоиден артрит, системен лупус еритематозес, анкилозиращ спондилит, псориазис, болест на Крон. Експресия на IL-6 се повишава в мястото на възпаление и блокирането на IL-6 сигнализицията е ефективен подход за профилактика и лечение на хронични възпалителни заболявания.

1.4. Тумор-некротизиращ фактор алфа

Сред множеството възпалителни маркери, тумор некротизиращия фактор алфа (TNF- α) се очертава ключов цитокин, който оказва влияние върху междинния метаболизъм. Първоначално TNF- α е описан като катехин, протеин, който участва в развитието на кахексията (Beutler and Cerami, 1986). По-късни изследвания описват проатерогенни промени в липидния метаболизъм, причинени от този цитокин (Feingold, 1998). Установено е, че при лечението на сепсис със средства, блокиращи действието на TNF- α се наблюдава влошаване на състоянието, докато в случаи на хронично възпаление, например ревматоиден артрит, тази терапия е много полезна (Barrera, 2002). Той принадлежи към семейство пептидни медиатори, включващи най-малко 19 цитокина, вкл. лимфотоксин- α , Fas лиганд и CD40 лиганд. TNF- α има важни проинфламаторни свойства и играе решаваща роля при вродения и придобит имунитет,

клетъчната пролиферация и апоптотичните процеси. Цитокинът се произвежда от различни видове клетки, включително макрофаги, моноцити, Т-клетки, гладкомускулни клетки, адипоцити и фибробласти. Биологичните отговори на TNF- α са медиирани от свързването му с два структурно обособени рецептори: тип I (тумор некротизиращ фактор рецептор тип I (TNF-RI); p55) и тип II (TNF-RII, p75), които се намират върху мембраната на всички видове клетки, с изключение на еритроцити. Двата рецептора се различават по афинитет и вътреклетъчни сигнални пътища. Свързването с TNF-RI води до активиране на апоптотичния път или провъзпалителния път чрез стимулиране на NF- κ B.

2. Съвременни подходи за третиране на периферната болка и възпаление с препарати различни от традиционните НСПВС.

Много клинични и експериментални проучвания показват, че повечето симптоми на невропатната болка слабо се повлияват от традиционните противоболкови средства като аналгетици-антипиретици, НСПВС и опиоидни аналгетици.

Много лекарства от други фармакологични групи намират приложение при лечение на хроничната болка: антиконвулсанти, като карбамазепин, валпроева киселина и фенитоин; трициклични антидепресанти, като амитриптилин и нортриптилин. Главните неудобства при антиконвулсантите са техния потенциал за лекарствени взаимодействия чрез индукция на чернодробните ензимни системи или резултат от инхибиране на чернодробни ензими от други лекарства. В допълнение, някои от използваните понастоящем лекарства имат сериозни нежелани реакции, като идиосинкразия или токсични реакции.

С нарастване на доказателствата за ефикасността на габапентина при различни болкови синдроми, особено невропатна болка, той може да бъде потенциално полезен поради относителна липса на сериозни нежелани лекарствени реакции, липса на взаимодействие с други лекарства и липса на лекарствена зависимост. Collins и сътрудници (2000) сравняват ефикасността и токсичността на антиконвулсанти (вкл. габапентин) и антидепресанти при две невропатни болкови състояния при пациенти – диабетна невропатия и постхерпетична невралгия. Те установяват, че няма статистически значима разлика в ефикасността между габапентин и другите антиконвулсанти. Горните данни показват, че габапентина е ефикасен при лечението на невропатна болка с липса на значима разлика в незначителните нежелани лекарствени реакции и ниска склонност към сериозни нежелани реакции, сравнен с други

антиконвулсанти и антидепресанти. Следователно габапентина е полезно средство в мултимодалния подход при лечението на невропатната болка.

Активирането на NMDA рецепторите играе важна роля в развитието на спиналната сенситизация и NMDA рецепторните антагонисти като кетамин, проявяват антиноцицептивен ефект при невропатна болка както при експериментални, така и при клинични проучвания (Kiefer et al, 2008; Mei et al, 2009).

2.1. Бенфотиамин

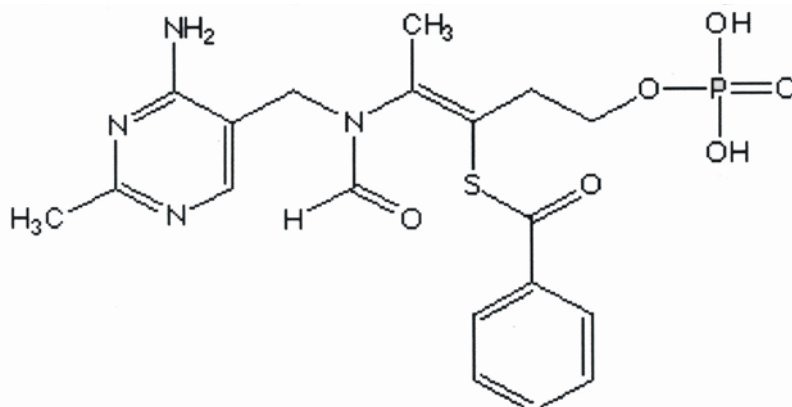
Тиаминът (витамин В1) е първият открит витамин от групата на В витамините и е изолиран през 1926 г. от двама холандски учени (Jansen et Donath, 1926) (фиг. 1). Неговата активна форма, тиамин дифосфат, е есенциален кофактор за много метаболитни реакции, като метаболизма на глюкозата, също така е модулатор на нервното и нервно-мускулното предаване (Frank et al, 2007). Дефицитът на тиамин или дефект в неговия интрацелуларен транспорт води до няколко заболявания: бери-бери, синдром на Wernicke-Korsakoff и тиамин-свързана мегалобластна анемия (Neufeld et al, 2001). Изразен тиаминов дефицит се наблюдава при алкохолици, а също така и при пациенти с диабетна периферна невропатия (Abbas et Swai, 1997). Известно е, че свободния тиамин се транспортира през плазмата и биомембраните чрез специфични пренасящи структури, но скоростта на този транспорт обикновено е бавна (Rindi et Lafarenza, 2000).

През 1950 година се синтезират група липидоразтворими производни на тиамина, наречени „алитиамин“, тъй като са изолирани от растението *Allium sativum* (Fujiwara, 1954; Bitsch et al., 1991). Тези аналози се отличават от водоразтворимия тиамин с по-бърза резорбция и с по-висока концентрация в плазмата и тъканите (Fujiwara, 1976; Baker H, Frank O, 1976). Веднъж навлезли в клетките, тези липофилни аналози бързо се превръщат в тиамин чрез ензимни или неензимни процеси.

Настоящем две липофилни дисулфидни производни се използват като терапевтични агенти: тиамин тетраhydroфурфурил дисулфид („фурсултиамин“) (Lonsdale D, 2004) и О-изобутирилтиамин дисулфид („сулбутиамин“). Сулбутиаминът е психотропно лекарство, използвано за симптоматично лечение на функционална астения (Van Reeth O, 1999). Установено е, че хроничното приложение на сулбутиамин (52 мг/кг, интраперитонеално) повишава нивата на тиамин, тиамин монофосфат, тиамин дифосфат и тиамин трифосфат както в мозъка на плъхове, така и в периферните тъкани (Bettendorff L et al, 1990). Не са установени специфични ефекти на

фурсултиамина върху мозъчните функции, но той осъществява позитивен инотропен ефект върху сърдечния мускул (Shinozaki H, 1976).

Бенфотиаминът (S-бензоилтиамин O-монофосфат) е третото производно с добра бионаличност от тиамина. За разлика от споменатите вече производни, бенфотиаминът не е дисулфид, а S-ацил дериват. Редица автори установяват, че той предпазва от развитие и прогресия на усложненията при захарен диабет. Те предполагат, че бенфотиаминът блокира три пътя на хипергликемичното увреждане, вероятно чрез активиране на ензима транскетолаза и намаляване на глицералдехид 3-фосфата и фруктоза 6-фосфата (Hammes HP et al, 2003; Wu et Ren, 2006). При експериментални изследвания върху мишки Volvert и съавт. (2008) установяват, че пероралното прилагане на бенфотиамин статистически значимо увеличава нивата на тиамин, тиамин монофосфат и тиамин дифосфат в кръвта и черния дроб, но не и в мозъчната тъкан. Те предполагат, че лечебните ефекти на бенфотиамина се отнасят само за периферните тъкани, но не и за централната нервна система. През последните години се наблюдава засилен интерес към терапевтичния потенциал на бенфотиамина при увреждане на периферните тъкани, като диабетна и алкохолна невропатия (Hammes et al, 2003).



Фигура 1. Структурна формула на бенфотиамин

2.1.1. Фармакокинетика.

Като липидоразтворим аналог на тиамина, бенфотиаминът съдържа отворен тиазол пръстен и преминавайки през мукозните мембрани чрез процес на редукция се превръща в биологично активен тиамин, който впоследствие се конвертира в активната форма-тиаминдифосфат (Baker et Frank, 1976). През 1961 г. Wada T и съавт. установяват, че бенфотиамина се резорбира бързо след орален прием и води до повишени плазмени нива на тиамин и тиамин дифосфат при животни, в сравнение с

еквивалентни дози тиамин. Няколко години по-късно други автори установяват експериментално, че бенфотиаминът, приложен перорално първо се дефосфорилира в чревните мукозни клетки от алкалната фосфатаза до S-бензоилтиамин. Полученият S-бензоилтиамин е по-липофилен и лесно дифузира през мембраните на чревните и ендотелните клетки и навлиза в кръвното русло. Като липоразтворим аналог на тиамин, бенфотиаминът има от 3 до 5 пъти по-добра резорбция, преминава през липофилните клетъчни мембрани пропорционално на приетата доза и има 5кратно по-висока вътреклетъчна бионаличност (Greb et Bitsch, 1998). Експериментални проучвания доказват, че бенфотиаминът е по-малко токсичен (LD 50) в сравнение с водноразтворимия тиамин хидрохлорид (Bitsch R, 1989).

2.1.2. Фармакодинамика.

Значителна част от S-бензоилтиамина се натрупва в еритроцитите, където се превръща в свободен тиамин чрез превръщане на S-бензоил групата в SH групи на глутатиона. В черния дроб останалата част се хидролизира до тиамин и бензоена киселина от тиоестеразите в хепатоцитите. Активната форма на бенфотиамина, тиаминдифосфат, е коензим на транскетолазата, пируват дехидрогеназата и α -кетоглутарат дехидрогеназния комплекс – ензими, които играят основна роля в интрацелуларния метаболизъм на глюкозата. Транскетолазата свързва излишните количества фруктозо-6-фосфат и глицералдехид-3-фосфат, получени при гликолизата в пентозо-фосфатния цикъл, елиминирайки по този начин от цитозола тези два увреждащи метаболита. Транскетолазната активност в еритроцитите често се използва като маркер за дефицита на тиамин (Nixon PF et al, 1990). Пируват дехидрогеназата е отговорен за оксидативното декарбоксилиране на пирувата (краен продукт на гликолизата) до acetyl-CoA, който се включва по-нататък в цикъла на Кребс. По този начин дефицитът на тиамин води до натрупване на пируват и лактат в клетките. α -кетоглутарат дехидрогеназния комплекс участва в цикъла на Кребс и е отговорен за превръщането на α -кетоглутарата в сукцинил-CoA. Дефицитът на тиамин нарушава функцията на този важен за метаболизма на глюкозата ензим (Butterworth RF et al, 1993).

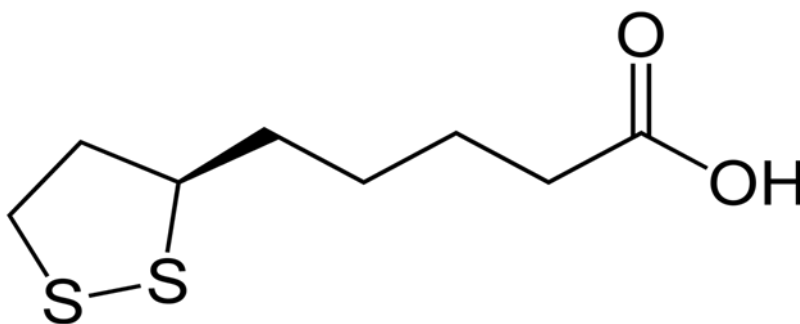
2.1.3. Бенфотиамин при лечение на невропатна болка

Известно е, че витамин B1 е ефективен адювантен медикамент за лечение на невропатна болка. Бенфотиаминът като негов липоразтворим аналог показва няколко

пъти по-висока ефективност при това патологично състояние. Установен е добър терапевтичен ефект на бенфотиамин при алкохолна полиневропатия (Woelk et al, 1998) и диабетна невропатия (Winkler et al, 1999) при клинични проучвания. Наред с клиничните данни, експерименталните проучвания също показват, че бенфотиаминът има противоболков ефект при модели на невропатна болка. Sanchez-Ramirez и сътр. (2006) установяват антиноцицептивен ефект при плъхове с модел на диабетна невропатия, използвайки формалинов тест. Същите автори установяват и антиалодиничен ефект на бенфотиаминът при модел на невропатна болка при плъхове. Съществуват експериментални данни (Сурчева и съавт, 2006), че бенфотиаминът усилва аналгетичното действие на НСПВС при едновременното им приложение при модел на невропатна болка с лигиране на н. ишиадикус. По този начин комбинацията намалява нежеланите лекарствени реакции на тази основна група аналгетици. Мао J. (1999) установява, че бенфотиаминът забавя развитието на толерантност към аналгетичния ефект на морфина, както и че потиска абстинентните прояви след продължителното прилагане на опиоида.

2.2. Алфа (α) – липоева киселина

Алфа-липоевата киселина (ALA) е 6,8-дитио-октанова киселина, известна още като тиоктова киселина (фиг. 2). Изолирана е през 1950 г. от говежди черен дроб и покъсно нейната химична структура е потвърдена чрез синтез.



Фигура 2. Структурна формула на алфа (α) – липоева киселина

2.2.1. Фармакокинетика.

Човек синтезира ALA в черния дроб и други тъкани с висока метаболитна активност като сърце и бъбреци. Поради наличието на асиметричен въглероден атом, тя е оптично активно съединение с два възможни оптични изомера: R-LA и S-LA. Естествената алфа-липоева киселина е в R конфигурация и е дясновъртяща. За

терапевтични цели алфа-липоевата киселина обикновено се прилага под формата на рацемична смес. Абсолютната бионаличност на 200 мг липоева киселина като воден разтвор е 38% за R формата и 28% за S формата. Въпреки това, няма разлика в плазмените концентрации на двата изомера на липоевата киселина при интравенозно приложение. Нейният амид е коензим на дихидролипоат ацетилтрансферазната субединица на митохондриалния комплекс, катализиращ окислителното декарбоксилиране на пируват, α -кетоглутарат и α -кетокиселини, образувани при трансаминирането на левцин, изолевцин и валин. Тези реакции определят и механизма на действие на алфа-липоевата киселина-пренасяне на α -кетонна група върху коензим А. Алфа-липоевата киселина е и основен елемент в митохондриалния комплекс на четири протеина, участващи в синтеза и разграждането на глицина.

Предполага се, че алфа-липоевата киселина се синтезира в човешкия и животинския организъм в митохондриите, където подобно в бактериалните и растителни клетки, октановата киселина и цистеина са нейни директни прекурсори (Patel MS, Vettakkorumakankav NN, 1995). Човек може да синтезира ALA де ново от мастни киселини и цистеин, но само в много малки количества и следователно е зависим от екзогенния внос. Приемът на храна намалява бионаличността на ALA, поради това се препоръчва да се приема 30 мин преди или 2 часа след хранене. Плазменият полуживот на алфа-липоевата киселина е 30 мин до 1 час. Метаболизира се в черния дроб чрез митохондриално β -окисление. След орално приложение на алфа-липоева киселина на плъхове, LD₅₀ е 2000 мг/кг телесно тегло, което показва много ниска токсичност. Алфа-липоева киселина е с ниско молекулно тегло, усвоява се бързо от храната и преминава през кръвно-мозъчната бариера. Алфа-липоевата киселина се редуцира в клетката до дихидролипоева киселина, която преминава в извънклетъчното пространство и по този начин се осъществява вътреклетъчна и извънклетъчна протекция.

2.2.2. Фармакодинамика

Биологичните ефекти на ALA са предимно свързани с нейните антиоксидантни свойства, но също така проявява антимуtagenен и противоканцероген ефект (Novotny L et al, 2008). Алфа-липоевата киселина повлиява различни клетъчни процеси, вкл. директно изчистване на кислородни радикали, рециклиране на други антиоксиданти, ускоряване синтеза на глутатион и модулиране активността на транскрипционни фактори, особено на ядрения фактор (NF) – карра В, който участва в увреждащите

ефекти при състояние на оксидативен стрес (Packer L, 1998). Въпреки че, основния механизъм на действие на ALA вероятно се дължи на способността и да увеличава глутатиона, тя повишава синтезата на NO в култивирани ендотелни клетки и подобрява ендотелната NO-зависима вазомоторна функция при различни условия чрез повишаване нивото на глутатиона в ендотела. Също така ALA намалява плазмените нива на IL-6 и plasminogen activator inhibitor-1, което предполага и други механизми на действие освен антиоксидантен (Sola S et al, 2005). Алфа-липоевата киселина регулира експресията на редокс чувствителни проинфламаторни протеини, вкл. TNF и iNO синтетаза.

Комплексът липоева киселина/дихидролипоева киселина участва в инсулиновата секреция. Установено е, че ALA подобрява усвояването на глюкоза в инсулин-резистентните и инсулин-чувствителните мускулни тъкани (Ghibu S et al, 2009). Повишавайки утилизацията на глюкоза и подобрявайки гликемичния контрол, алфа-липоевата киселина играе ключова роля в процесите на детоксикация в черния дроб. Vitar и сътрудници (2010) установяват, че прилагането на 50 мг/кг ALA на плъхове за 30 дни предотвратява диабет-медираната митохондриална и ендотелна дисфункция чрез PI3K/Akt-зависимия сигнален път.

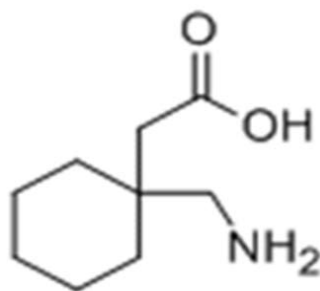
През последното десетилетие се засилва интереса към фармакологичните свойства на алфа-липоевата киселина и много публикации потвърждават благоприятния и ефект при заболявания като захарен диабет, атеросклероза, невродегенеративни заболявания, синдром на придобита имунна недостатъчност (СПИН). Няколко експериментални изследвания доказват, че алфа-липоевата киселина проявява фармакологични ефекти, които предотвратяват нервна дегенерация при ин витро модели на диабет, болест на Паркинсон и болест на Алцхаймер (Abdul NM et al, 2007). Интересът на изследователите се дължи на уникалната редуцираща мощ на алфа-липоевата киселина. Поради ниския редокspotенциал на липоевата/дихидролипоевата система, редуцираната липоева киселина участва както в реакции, неутрализиращи свободните кислородни радикали, така и в намаляване на кислородните форми на други антиоксиданти. Алфа-липоевата киселина, за разлика от другите антиоксиданти е добре разтворима както във вода, така и в мазнини, което е уникална нейна характеристика. Поради тази причина я наричат антоксидант на антиоксидантите.

Според ортомолекулярната концепция, изказана от Linus Pauling, най-важната цел на медицината би трябвало бъде подпомагане на клетъчния метаболизъм с природни

съединения, които приложени в подходяща доза и време ще запазят или възстановят нормалните функции на организма (Pauling L, 1968). В съответствие с тази идея, в бъдеще липоевата киселина ще бъде ключов елемент във всички лекарствени форми в количества, свързани с повлияване на оксидативния стрес в етиопатогенезата на дадено заболяване.

2.3. Габапентин

Габапентинът [1-(aminomethyl) cyclohexane acetic acid] е антиепилептичен медикамент, представляващ структурен аналог на гама-аминомаслената киселина (ГАМК). Габапентинът за първи път е въведен във Великобритания през 1993 година и в последствие в над 100 страни за лечение на епилепсия и невропатна болка. В САЩ габапентинът е въведен за допълнително лечение на парциални гърчове и постхерпетична невралгия. Той е водоразтворима бяла субстанция с кристален строеж и съдържа циклохексанов пръстен в структурата си (Bockbrader HN et al, 2010).



Фигура 3. Структурна формула на габапентин

2.3.1. Фармакокинетика

Единствения възможен път на въвеждане на габапентина е пероралния. Резорбира се в тънките черва чрез проста и улеснена дифузия. Транспортира се чрез неидентифициран рецептор, който е част от насищаем транспортен механизъм, отговорен за транспорта и на L-амино киселините. Тъй като този преносител-зависим транспорт е насищаем, бионаличността на габапентина е обратно пропорционална на дозата. При доза 300 мг дневно, бионаличността е около 60% и при доза 1600 мг 3 пъти дневно – тя намалява до около 35 %. Максимална плазмена концентрация (C_{max}) 2,7 – 2,99 mg/l се постига след 3 – 3,2 часа при еднократна доза от 300 мг. Като резултат от доза-зависимата насищаема абсорбция на габапентина, Стах се увеличава в по-малка степен при доза три пъти по-голяма – 900 мг. Обемът на разпределение на габапентина е 0,6 – 0,8 л/кг. Концентрацията на габапентина в цереброспиналната течност

представлява 20% от плазмената концентрация, докато концентрацията в мозъчната тъкан е 80% от плазменото ниво. Установено е, че при плъхове панкреатичната и реналната тъканни концентрации са съответно осем и четири пъти по-високи в сравнение със серумните концентрации. При хора не се наблюдава натрупване на габапентина в панкреатичната тъкан. При физиологично рН габапентинът е в йонизирано състояние и концентрацията му в мастната тъкан е ниска. Габапентинът не се свързва с плазмените протеини, не се метаболизира в организма и се излъчва непроменен с урината. Габапентинът има елиминационна кинетика от първи порядък и при бъбречна недостатъчност елиминирането му се намалява като линейна функция, която корелира с креатининовия клирънс. Времето на полуживот на габапентина е между 4,8 и 8,7 часа. Габапентинът се отстранява при хемодиализа и при пациенти с бъбречна недостатъчност поддържащата доза габапентин трябва да се прилага след хемодиализата. За разлика от другите антиепилептични медикаменти, габапентина не повлиява микрозомалните ензимни системи в черния дроб, отговорни за лекарствения метаболизъм.

2.3.2. Фармакодинамика

Терапевтичните показания за приложението на габапентин са две: 1) като допълнителна терапия за лечение на парциална епилепсия с или без вторична генерализация, при възрастни и деца над 6 години и 2) за лечение на периферна невропатна болка при болезнена диабетна невропатия и постхерпетична невралгия при възрастни.

Предполага се, че механизмът на действие на габапентина е свързан с взаимодействие с транспортера на L-амино киселини, който е отговорен не само за абсорбцията на лекарството в тънките черва, но и е експресиран в кръвно-мозъчната бариера и в нервната система. Острото прилагане на габапентин води до промяна в цитозолната и екстрацелуларната концентрации на няколко аминокиселини, вкл. L-левцин, L-валин и L-фенилаланин в кортикалните астроцити и синаптозоми при плъх, като тези ефекти са фармакологично значими (Su TZ et al, 1995).

Габапентинът не повлиява директно ГАМК-ергичната медиация и не блокира обратното връщане и метаболизма на ГАМК. Редица проучвания посочват, че габапентинът не повлиява ГАМК-А рецепторите (Ben-Menachem E, 2004). Други автори установяват, че неговите ефекти, макар и частично се дължат на активирането на пресинаптичните ГАМК-В рецептори.

Габапентинът намалява калий зависимия калциев инфлукс през волтаж-зависимите калциеви канали в клетъчни линии от хипофиза на мишки, които конститутивно експресират ГАМК-В рецептори, съдържащи gb1-a-gb2 димерни субединици. Тези ефекти се възпроизвеждат от баклофен и се обръщат при ко-апликация със селективен ГАМК-В рецепторен антагонист. Съществуват данни за габапентин-медирана активация на ГАМК-В хетерорецепторите, но не и на авторецепторите в срезове от мозъчна кора на плъх (Parker DAS et al, 2004).

Други автори, при експериментални проучвания установяват, че ГАМК-В рецепторите не участват в реализирането на фармакологичните ефекти на габапентина (Jensen AA et al, 2002). Тези данни увеличават възможността габапентина селективно да намалява освобождаването на възбудни невромедиатори при относително запазване на инхибиторната невромедиация чрез селективно активиране на субтип ГАМК-В рецепторите.

Габапентинът може да повиши NMDA-предизвиканите потенциали в ГАМК позитивни неврони в задните рога на гръбначния мозък на плъх, в присъствие на протеинкиназа С, вероятно чрез повишаване чувствителността на NMDA рецепторния комплекс към глицин (Gu Y and Huang L-YM, 2002). Няколко проучвания показват намалено освобождаване на глутамат в мозъчни срезове на плъх в присъствие на габапентин (Maneuf YP et al, 2004), въпреки че това е малко вероятно да се дължи на пряко въздействие върху глутаматергичната медиация. Описани са и други ефекти на габапентина, но се счита, че те не играят съществена фармакодинамична роля. Такива са леко понижението в освобождаването на моноаминни невромедиатори-допамин, норадrenalин, серотонин и блокиране на Na канали след продължително приложение.

Чрез радиолиганд свързващ анализ се установява, че [³H] габапентина се свързва с голям афинитет към единична популация от свързващи места, изолирани от хомогенизирани мозъчни мембрани от различни видове бозайници. Мощно и стереоселективно изместване на [³H] габапентина се постига с някои аналози на ГАМК и най-вече със S изомера на 3-изобутил ГАМК. Авторадиолигандни проучвания са показали, че тези свързващи места са хетерогенно изразени в мозъка, като най-вероятно са локализирани предимно в невроните, отколкото в гlijата (Maneuf, Y. P. et al, 2006).

Установено е, че [³H] габапентин свързващия протеин представлява $\alpha 2\delta$ субединицата на волтаж зависимите калциеви канали. Тя се състои от четири гена: $\alpha 2\delta$ -1, $\alpha 2\delta$ -2, $\alpha 2\delta$ -3 и $\alpha 2\delta$ -4. Всяка субединица е експресирана в тъканите по специфичен начин. Доказано е, че само $\alpha 2\delta$ -1 и $\alpha 2\delta$ -2 субединиците са свързващо място за

габапентина. Анализ на генната структура на $\alpha 2\delta$ -2 показва наличие на аргинин в 217 позиция. Още едно доказателство за това, че действието на габапентина се медира от $\alpha 2\delta$ протеина е, че аналгетичната му активност корелира с афинитета.

Други предположения касаят биохимични събития в ЦНС, които могат да обяснят антиепилептичния ефект. Такива са увеличена екстрацелуларната концентрация на ГАМК в някои региони на мозъка, дължаща се на повишена активност на ензима декарбоксилаза на глутаминовата киселина, който образува ГАМК и понижена активност на ГАМК декарбоксилазата, която разгражда ГАМК. Проучвания с магнитно резонансна спектроскопия показват глобално увеличаване на ГАМК в мозъка след приложение на габапентин, въпреки че няма доказателства, че габапентинът увеличава интраневроналната ГАМК концентрация, свързва ГАМК-А или ГАМК-В рецептори или осъществява някаква ГАМК-миметична активност.

2.3.3. Габапентин и невропатна болка

Механизмът на действие на габапентина при лечение на невропатна болка е ненапълно обяснен. По-ранни проучвания показват, че габапентина има само централен антиалодиничен ефект, но по-късно е установено, че той инхибира ектопичната невронална активност от увредени периферни нерви. Вероятните механизми на противоболковия ефект при невропатна болка включват ЦНС ефекти и периферни ефекти.

ЦНС ефекти (на ниво гръбначен и главен мозък) се модулират чрез: а) усилен инхибиторна активност на ГАМК-ергичните пътища (и отгук намалена възбудна активност); б) NMDA-рецепторен антагонизъм; в) блокиране на Са канали. Периферните ефекти се осъществяват чрез: инхибиция на периферни нерви.

Най-много доказателства има NMDA-рецепторния антагонизъм и блокирането на Са канали. Field и сътрудници (1997) опровергават теорията, че антихипералгезичната му активност се осъществява чрез опиоидни рецептори. Те установяват, че морфиновия толеранс не повлиява ефекта на габапентина, а налоксона не редуцира антихипералгезичния му ефект.

Проучванията, касаещи периферния механизъм на действие на габапентина са противоречиви. Интратекалното му приложение инхибира топлинната и механична хипералгезия без да повлиява симпатиковата невромедиация и острата ноцицепция. Това предполага спинален механизъм на действие. Patel и сътрудници (2000) установяват пресинаптично действие на габапентина в гръбначния мозък на плъх.

Габапентинът блокира тоничната фаза на ноцицепцията, индуцирана от формалин и карагенин и осъществява мощен инхибиторен ефект при модели на невропатна болка с механична хипералгезия и механична/термална алодиния.

Въпреки че габапентинът не свързва ГАМК-А и ГАМК-В рецепторите, е описана повишена синтеза и намалено разграждане на ГАМК. Но потенцирането на ГАМК-ергичната медиация изглежда не е отговорно за антиалодиничния му ефект, защото ГАМК рецепторните антагонисти не намаляват този ефект.

Проучванията показват инхибирането на антихипералгезичния ефект на габапентин от D-serine, агонист за NMDA-рецептора на глицин-свързващото място. В крайна сметка проучванията не са установили директно свързване на габапентина към NMDA-рецептора.

Алфа/делта ($\alpha\delta$) субединицата на волтаж зависимите калциеви канали е свързващо място за габапентина и S-изомера на прегабалина. Тъй като само габапентина и S-изомера на прегабалина имат антихипералгезичен ефект, се предполага, че този ефект се осъществява чрез свързване с това място на волтаж зависимите калциеви канали. Fink et al (2000) установяват, че в неокортекса на плъх, габапентина концентрационно зависимо инхибира невроналния калциев инфлукс чрез инхибиране на P/Q тип калциеви канали. Намаления калциев инфлукс редуцира освобождаването на възбудни аминокиселини (в това число глутамат), което води до намалена AMPA рецепторна активация и освобождаване на NA в мозъка. Тези проучвания подкрепят хипотезата, че инхибирането на калциевите канали осъществява аналгетичния ефект на габапентина при хронична невропатна болка. Установено е, че габапентина намалява K^+ -индуцираното освобождаване на глутамат в срезове от неокортекс и хипокампа на плъхове (Dooley DJ et al, 2000).

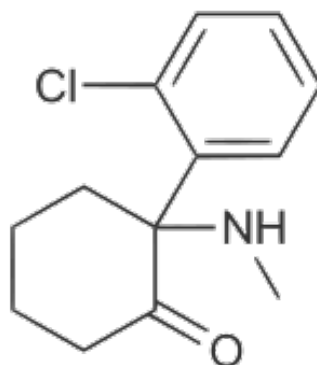
Габапентинът е с доказана ефикасност при лечението на невропатна болка и се използва за тази индикация при пациенти над 18 години. Резултатите от експериментални и клинични проучвания потвърждават употребата на габапентин при невропатна болка и други хронични болкови синдроми. Трицикличните антидепресанти, опиоидните аналгетици и други антиконвулсанти се използват за лечение на хронична болка, но тяхното приложение е свързано с доста нежелани лекарствени реакции. Габапентинът е подходяща терапевтична възможност поради относително нисък риск от лекарствени взаимодействия и сериозни нежелани лекарствени реакции, ако неговата ефективност бъде установена при невропатна болка и други видове хронична болка.

Няколко проучвания върху плъхове показват ефикасността на габапентина при алодиния и хипералгезия. Интраперитонеалното въвеждане на габапентин на плъхове намалява механичната хипералгезия, предизвикана от термално увреждане (Jones DL, Sorkin LS, 1998). Partridge et al (1998) демонстрират ефикасността на габапентин при лечение на вторична хипералгезия, индуцирана от субстанция Р. Габапентинът е ефективен при абнормални възприятни процеси при плъхове с диабет при използване на формалинов тест. Това потвърждава неговата ефективност при лечение на диабетна невропатия при хора (Cesena RM, Calcutt NA, 1999). Yoon & Yaksh (1999) установяват, че при формалинов тест на плъхове, габапентина и ибупрофена, приложени самостоятелно, ефективно повлияват хипералгезията. При едновременно приложение на двете вещества се наблюдава адитивно взаимодействие.

Габапентинът превъзхожда морфина и амитриптилина по отношение на статичната и динамичната компонента на алодинията при плъхове след орално и интратекално приложение. При локално приложение габапентинът не е по-ефективен от морфина и амитриптилина (Field MJ et al, 1999). Chen и съавтори (2000) установяват, че интратекалното въвеждане на габапентин на плъхове, дозозависимо повишава болковия праг към ноцицептивни стимули.

2.4. Кетамин

Кетаминът (dl2-(o-chlorophenyl)-2-(methylamino) cyclohexanone hydrochloride) е интравенозен анестетик, който е структурен аналог на фенциклидина. Той е открит от д-р Calvin Stevens (Wayne State University) през 1961 г. Известни са два оптически изомера на кетамина: S(+) кетамин и R(-) кетамин. Аналгетичния и анестетичния потенциал на S(+) кетамина е три до четири пъти по-силен в сравнение с R(-) кетамина.



Фигура 4. Структурна формула на кетамин

2.4.1. Фармакокинетика

Кетаминът е липидоразтворим и може да се прилага лесно чрез различни пътища на въвеждане-интравенозно, интрамускулно, подкожно, перорално, ректално, назално, трансдермално, епидурално или интратекално (Azevedo et al, 2000). Поради високата си липофилност, първоначално се разпределя в по-добре кръвоснабдените тъкани и след това се преразпределя в тъканите с по-слаба перфузия. Кетаминът се метаболизира в черния дроб от чернодробните микрозомални ензими, като образува няколко метаболита, някои от които притежават фармакологична активност. Излъчва се под формата на метаболити с урината (90%) и с фекалиите (5%), както и в непроменен вид (4%). При интравенозно въвеждане анестезията продължава 5 до 10 минути, а при интрамускулно – 12 до 25 минути.

2.4.2. Фармакодинамика

Кетаминът блокира неконкурентно NMDA глутаматните рецептори, като се свързва с фенциклидиновото място в самия канал (Harrison & Simmonds, 1985). Той проявява ефект и върху опиоидната, холинергичната и допаминергичната медиация (White & Ryan, 1996). Влиянието върху глутаматната медиация определя неговия аналгетичен, дисоциативен и невропротективен ефект, а с действието си върху опиоидните рецептори, кетаминът води до дисфорични реакции. Симпатомиметичното действие е медирано от повлияването на централната и периферната моноаминергична медиация. Блокирането на централната и периферната холинергична медиация допринася за анестетичното и халюциногенното му действие (Adams HA, 1998). Kapur & Seeman (2001) установяват, че кетаминът антагонизира ефектите на допамина върху D2 рецепторите. Кетаминът, приложен в анестетични дози, има невропротективен ефект при различни животински модели на мозъчно увреждане. Този ефект се дължи на блокирането на NMDA рецепторите и намаляване на инфлукса на Ca^{2+} йони през рецепторния канал (Himmelseher and Durieux, 2005). Кетаминът, в субанестетични дози (30 мг/кг) се използва в експериментални модели за предизвикване на шизофрения-подобни симптоми, което е в съответствие с глутаматергичната хипотеза за патогенезата на тази болест (Becker A et al, 2003).

Основният механизъм на действие на кетамина е блокирането на NMDA глутаматните рецептори. Въпреки силния хипнотичен и аналгетичен ефект, той не води до кардиоваскуларна и респираторна депресия (Corssen and Domino, 1996). За разлика от другите анестетици, кетаминът води до бронходилатация, което се използва широко

в педиатричната и общата хирургия (Hill et al, 1999). В клиниките, кетаминът и по-специално неговия изомер S(+) кетамина, се използва за премедикация и седация, както и за въвеждане и поддържане на обща анестезия. Кетаминът широко се използва в анестезиологията като стандартен анестетик при деца и възрастни в дози по-високи от 2 мг/кг (Green et al, 1998). Кетаминът е подходящ анестетик при травматичен шок, септичен шок, при пациенти с белодробни заболявания, както и при хиповолемия (Sinner & Graf, 2008). В субанестетични дози, кетаминът проявява аналгетичен ефект и се препоръчва за постоперативна анестезия и седация. При лечение на хронична болка, той е ефективен както приложен самостоятелно, така и комбиниран с други аналгетици. В последните години много експериментални данни показват, че кетаминът проявява антидепресивен и анксиолитичен ефект (Zarate et al, 2006; Garcia et al, 2008; Maeng et al, 2008).

2.4.3. Кетамин и невропатна болка

Установено е, че NMDA рецепторите заемат важно място в развитието на хипералгезията и в патогенезата на хроничните болкови синдроми. Действието на възбудните аминокиселини, като глутамат, върху NMDA рецепторите води до невронална хиперчувствителност, която е в основата на първичната и вторична хипералгезия и алодинията при хронични болкови състояния. Стимулирането на NMDA рецепторите със селективни агонисти предизвиква болково поведение, което се потиска при въвеждането на антагонисти (Du J et al, 2003). Други автори установяват, че интратекалното инжектиране на N-methyl-D-aspartat индуцира болкова симптоматика (Mjellem-Joly N et al, 1991).

Кетаминът антагонизира NMDA рецепторите в задния рог на гръбначния мозък и в аферентните неврони, които инервират периферните тъкани и осъществяват синаптични връзки със задния рог. Установено е, че кетаминът намалява централната сенситизация, провежда низходяща инхибиция на моноаминергичната медиация, както и блокира Na⁺ канали и μ -опиоидните рецептори в периферните неврони. Поради блокирането на централната сенситизация той проявява дългодействащ аналгетичен ефект (Christoph T et al, 2006). При едновременно прилагане с опиоидни аналгетици, кетаминът подпомага достигането на адекватна алгезия при по-ниско дозиране на опиоидите, тъй като забавя развитието на толеранс към тях (Zeng J et al, 2006). Nadeson et al (2002) установяват, че интратекалното въвеждане на кетамин индуцира антиноцицептивен и антиинфламаторен ефект. В допълнение, Vulutcu и съавтори (2002)

потвърждават аналгетичното действие на кетамин при формалинов и абдоминален констрикторен тест, но не и при тестовете „гореща плоча“ и „tail-flick“. Съществуват и клинични данни, че системното приложение на кетамин намалява пост-оперативната и туморната болка при пациенти (Kollender et al, 2008). Психомиметичните странични ефекти (включващи зрителни и слухови халюцинации, дисоциация и кошмари), наблюдавани при употребата на кетамин ограничават неговата системна употреба при лечение на невропатна болка (Hocking G et Cousins MJ, 2003).

3. Методи за изследване на болка и възпаление

В началото на 20-ти век, Sherrington (1910) въвежда понятието nociception (от латинското nocere, „увреждам“). Според Dennis и Melzack (1983), болката/ноцицепцията има поне три функции: 1) да предупреди индивида за наличието на реално тъканно увреждане; 2) индивида да осъзнае, че стимулите имат потенциал да причинят такава увреда; 3) да предупреди една социална група за опасност, ако съществува риск за всеки един от членовете.

Zimmermann (1986) тълкува определението за болка на Международната асоциация за изучаване на болката (IASP), така че да е приложимо за животните: „отблъскващ сетивен опит, причинен от реално или потенциално нараняване, което предизвиква прогресивни моторни и вегетативни реакции, което резултира в обучително поведение на избягване и може да промени определено видово поведение, вкл. и социално.

3.1. Методи за изследване на остра болка и възпаление

При експерименталните изследвания на механизмите на остра болка се използват различни видове стимули: електрични, топлинни, механични и химични. Всички ноцицептивни стимули могат да се характеризират от различни параметри, които са класифицирани в три категории: физическа природа на стимула, мястото на приложение, както и памет за мястото на стимулиране.

Тъй като прилагането на стимула не трябва да предизвиква увреждане, често се дефинира ограничение за това колко дълго животното трябва да бъде изложено на стимула („cut off time“). Това ограничение е абсолютно необходимо, когато интензитетът на стимула се увеличава, като компромис трябва да се намери между динамиката на ефекта, който се изследва (най-дългото възможно време) и предотвратяване на увреждане на тъканите (най-краткото възможно време). Това

предполага, че възможното време трябва да бъде три пъти времето за реакция на контролните животни. Освен това, многократното прилагане на стимула до определеното ограничение може да очувстви периферните рецептори и/или да предизвика централна сензитизация (например, чрез натрупване на медиатори на ниво гръбначен стълб).

В идеалния случай, поведенческият болков модел при животни трябва да притежава следните характеристики (Le Bars et al, 2001):

1. Специфичност. а) стимулът трябва да бъде ноцицептивен („input specificity“). Въпреки че това е общо усещане и не винаги е лесно да се потвърди, че това е постигнато (например появата на флексionen рефлекс не винаги означава, че стимулът е ноцицептивен и регистрираният рефлекс е израз на болка). б) трябва да бъде възможно в поведенческия модел да се разграничават отговорите към ноцицептивни стимули от отговорите към не-ноцицептивните стимули. С други думи, количествения отговор трябва да е изключително или преимуществено предизвикан от ноцицептивни стимули.

2. Чувствителност. а) трябва да бъде възможно количествено да се определи отговора и да се съпостави тази променлива с интензитета на стимула в рамките на разумен диапазон (от болковия праг до прага на болкова толерантност). Количественият отговор трябва да бъде подходящ за даден вид стимул и монотонно свързан с неговия интензитет. б) моделът трябва да бъде чувствителен към манипулации и особено фармакологични такива, които биха намалили ноцицептивното поведение по специфичен начин. Чувствителният тест трябва да бъде в състояние да покаже ефекти за различните класове антиноцицептивни агенти при дози сравними с тези, използвани като аналгетици при хора.

3. Достоверност: моделът трябва да позволява разграничаването на неспецифични промени в поведението от тези, предизвикани от самия ноцицептивен стимул. Реакцията, която се наблюдава не трябва да бъде дискредитирана от едновременни реакции, свързани с други функции и по-специално ако те се дължат на фармакологичен агент. Достоверността на теста, т.е. степента, в която изпитването действително е мярка за това, което претендира да се измери, е несъмнено един от най-трудните проблеми за разрешаване.

4. Надежност: трябва да се получи постоянност на резултатите, когато животните се тестват отново, но с един и същи тест или равностойна форма на теста. В този контекст, многократното прилагане на стимула не трябва да предизвиква увреждане.

5. Възпроизводимост: резултатите, получени с теста трябва да бъдат възпроизводими не само в рамките на една и съща лаборатория, но и също така между различни лаборатории. Тъй като никой от тестовете за чувствителност към болка не отговаря на всички критерии, изборът на тест трябва да бъде компромис.

Тестовете, използвани при животински модели могат да се класифицират на базата на една от физическите характеристики на стимулите: тестове, основани на използването на краткотрайни стимули (от порядъка на секунди) и тестове, при които се използват дълготрайни стимули (от порядъка на минути). Първите се отнасят до болки от кожен произход с физически стимули (термични, механични, електрически), приложени върху малки площи, често с нарастващ интензитет. Вторите са свързани с болки от кожен или висцерален произход, при които химически дразнителни се прилагат подкожно или интраперитонеално. В допълнение може да се добави към последната категория и тестове, въз основа на раздуване на кухи органи (висцерална механична стимулация), които по продължителност на стимулацията заемат междинно място.

3.1.1. Тестове, базирани на краткотрайни стимули (фазична болка)

Тези тестове са най-често използваните. Характеризират се най-общо със следното: 1) включват кратък период на стимулация; 2) имат по-често соматични отколкото висцерални места на стимулация; 3) измерват прагове и резултатите, до които водят не дават информация по отношение на отговорите към директни ноцицептивни стимули; 4) обикновено включва измерване на времето за отговор към стимул с нарастващ интензитет с изричното предположение, че това време на реакция е свързано с прага; 5) стимулират се минимални повърхности, с две изключения: гореща плоча и електрическа мрежа, където са стимулирани четирите лапи и опашката на животното едновременно; 6) могат да бъдат класифицирани в зависимост от природата на стимула, а именно топлинни, механични или електрически.

3.1.1.1. Тестове на базата на използване на топлинни стимули

При тях винаги се стимулира кожата, а не висцерални или мускулно-скелетни тъкани. Важно е да се отбележи, че лъчистата топлина стимулира също така и терморепторите и следователно прилагането на топлинен стимул ще доведе до определена последователност на активиране, а именно: най-напред терморептори, след това терморептори и ноцицептори, по-късно само ноцицептори и накрая (евентуално) ноцицептори и т. нар. „парадоксални студови“ рецептори. На практика

животното бързо се отдръпва от стимула и се реализира само началото на тази последователност.

Източникът на болкова стимулация може да бъде на разстояние (напр. лъчиста топлина от лампа) или в пряк контакт с кожата. Лъчистата топлина представлява сравнително селективен стимул за ноцицепторите и има предимство пред другите видове топлинна стимулация, с това че не произвежда тактилни стимули.

3.1.1.1. Тест „отдръпване на опашката“ (tail-flick test).

Има два варианта на този тест – прилагане на лъчиста топлина върху малка повърхност на опашката или потапяне на опашката във вода с определена температура.

Tail-Flick test с използване на лъчиста топлина. Прилагането на топлинно излъчване върху опашката на животното провокира отдръпване на опашката с кратко енергично движение. Това е времето за реакция, наричано латентност. Това се постига чрез стартиране на таймер в момента на прилагането на източника на топлина. Чрез реостат се контролира интензитета на тока. Времето до отеглянето на опашката обикновено е между 2 и 10 секунди. Фотоелемент спира таймера и изключва лампата в момента на отдръпване на опашката. Удължаването на времето за реакция е израз на аналгетично действие. Препоръчително е експозицията на лъчиста топлина да не надхвърля 10 до 20 секунди, поради опасност от изгаряне на кожата. Предимствата на този метод са простотата и малката вариабилност във времето на реакция при отделните видове експериментални животни. Времето за реакция варира в зависимост от интензивността на източника на лъчиста топлина: когато той е по-мощен, температурния наклон е по-стръмен и следователно реакционното време е по-кратко (Carstens and Wilson, 1993). По същия начин времето за реакция варира в зависимост от стимулираната площ: когато площта се увеличава, времето за реакция намалява. Рефлексът tail-flick не винаги може да бъде чисто гръбначен и включва висши нервни структури. Например може да бъде медиран от гръбначномозъчен-булбарно-гръбначномозъчен кръг (King et al, 1997).

Тест Tail-Flick с използване на потапяне на опашката. Този тест е разновидност на гореописания, с тази разлика, че площта на стимулация е много по-голяма. Потапянето на опашката на животното в гореща вода предизвиква рязко движение на опашката, а понякога и плъзгащи движения на цялото тяло. Това е реакционното време, което се наблюдава. Този тест е доста по-различен от предишния доколкото потапянето на опашката в гореща течност повишава нейната температурата много по-бързо в

сравнение с прилагането на лъчиста топлина. Основното предимство е възможността за прилагане на различни температури. По този начин, по-ниските температури може да се използват за търсене на ефектите на слаби аналгетици.

3.1.1.2. Тест с отдръпване на лапата

Този тест има предимство, че не включва видим орган на терморегулацията, т. е. опашката. С цел изучаване хипералгезията в резултат на възпаление, Hargreaves et al (1988) допълват модела на Randall и Selitto (1957), като прилагат лъчиста топлина върху лапата, която вече е била възпалена от подкожно инжектиране на карагенин. Perkins и съавт. (1993) използват ултравиолетови лъчи за предизвикване на възпаление. Едно от предимствата на тези тестове е, че се прилага топлина до повърхността на ходилото на свободно движещи се животни. Недостатък е, че позицията на крака става основен фактор и активността на флексорите варира в зависимост от позицията на животното.

Yeomans и Proudfit (1996) провеждайки теста за отдръпване на задна лапа при анестизирани плъхове, стигат до следното заключение: когато температурата се повишава стръмно ($6.5^{\circ}\text{C}/\text{сек}$), времето за отдръпване на лапата е кратко и температурата на повърхността на кожата достига високо ниво, което предполага активиране на тип А δ влакната; когато температурата се повишава бавно ($1^{\circ}\text{C}/\text{сек}$) времето за реакция е по-дълго и температурата на кожата се повишава по-малко, без да достига високи нива, което се дължи на активиране само на тип С влакна.

3.1.1.3. Тест „гореща плоча“

При този тест плъхът или мишката се поставят в отворен цилиндър, на дъното на който има метална плоча, която се нагрива. Плочата се нагрива до постоянна температура и се измерва реакционното време за облизване на задна лапа или скачане. И двете поведенчески реакции се считат за супраспинални интегрирани отговори.

От аналгетиците само опиоидите влияят върху времето за облизване на лапата. Реакционното време за скачане се увеличава в еднаква степен от по-малко мощните аналгетици като ацетилсалицилова киселина или парацетамол, особено когато температурата на плочата е 50°C или по-малко.

Поведението е относително стереотипно при мишки и по-сложно при плъхове, които душат, ближат предни и задни лапи, изправят се, започват и спират да се мият. Освен това, този тест е много чувствителен на обучение, което води до скъсяване на времето за реакция, изразено чрез скачане и изчезване на реакцията, изразена чрез

близане на лапата. Така по време на първоначалното тестиране, животното може да оближе лапите си и след това да скочи, но при следващи тестирания ще скочи почти веднага с много по-кратко време на реакция.

Трябва да се отбележи, че този тест се състои в стимулиране на четирите крайника и дори опашката на животното едновременно. Такива хетеротопни стимули, включващи големи площи от тялото несъмнено задействат дифузни инхибиторни контроли, които вероятно променят наблюдаваните отговори.

3.1.1.4. Тестове с използване на студени стимули

Студът като дразнител се използва много рядко за изследване на остра болка. От друга страна този тест се използва по-често при животински модели на невропатия. Техниките са подобни на тези, които използват топлина като стимул: потапяне на опашката или крайник (Briggs et al., 1998) или поставяне на животното върху студена повърхност (Jasmin et al., 1998).

3.1.2. Тестове на базата на използване на механични стимули

Най-често използваните места за прилагане на болкови механични стимули са задната лапа и опашката на гризачи. Тестовите, използващи постоянен натиск са отпаднали за сметка на тези, използващи постепенно увеличаване на натиска.

В хода на този тест натиск с нарастващ интензитет се прилага върху малка площ на задната лапа или по-често върху опашката. На практика лапата или опашката е поставена между равна повърхност и притискащ конус, монтиран на върха на система от зъбни колела с курсор, който се премества по дължината на мерителен лъч. Тези устройства позволяват прилагането на измерим нарастващ натиск и прекъсване на теста, когато се достигне прага. Измереният параметър е натиска в грамове, водещ до появата на определено поведение. Когато натиска се увеличава, може да се наблюдава последователно рефлекс на отдръпване на лапата; по-сложно движение, при което животното се опитва да си освободи крайника; след това борба и накрая вокализация.

Ако първата от тези реакции е несъмнено гръбначен рефлекс, то последните две включват супраспинални структури. Този тест с механично стимулиране има някои недостатъци: 1) понякога е трудно да се измери интензивността на натиска с точност; 2) повторното прилагане на механичния стимул може да доведе до намаляване или увеличаване чувствителността на стимулираната част от тялото, като в последния случай това носи риск от промяна в тъканите от възпалителни реакции, които биха

могли да поставят под въпрос валидността на повторните тестове; 3) необходимостта от прилагането на относително голям натиск, което обяснява слабата чувствителност на метода и относително малкия брой вещества, които показват активност при този тест; 4) от значение е и нивото на вариабилност на отговорите.

С цел подобряване чувствителността на теста, Randall и Selitto (1957) предлагат да се сравняват праговете, наблюдавани при здрава и възпалена лапа. Възпалението се индуцира предварително с подкожна инжекция в стимулираната област с вещества като кротеново масло, бирени дрожди или карагенин, като последния се използва най-често и до днес. Въпреки че беше установено, че чувствителността на метода се подобрява, неговата специфичност се нарушава, защото двата фармакологични ефекта могат да бъдат ясно разграничени. Поради това е доста трудно да се установи аналгетична или дори „antalgic“ активност. Въпреки това сравнението на отговорите, предизвикани от здрава и възпалена лапа на едно и също животно позволява този проблем да се преодолее: нестероидните противовъзпалителни средства (НСПВС) са неактивни при здрава лапа и увеличават прага на вокализация, когато е приложен натиск върху възпалена лапа. Чрез намаляване на степента, с която се увеличава натиска върху лапата и удължаване на времето за прилагане на стимула, могат да бъдат разграничени аналгетични субстанции с близка активност (Chipkin et al., 1983).

3.1.3. Тестове, основани на използване на електрически стимули

3.1.3.1. Използване на дълготрайни електрически стимули

Електрическо стимулиране на опашката. Електрически стимули с постепенно нарастващи интензитети могат да бъдат прилагани под формата на тренировки (с продължителност няколко стотни от милисекундата) чрез подкожни електроди в опашката на плъх или мишка. Приложението на тези стимули води до рефлексно движение на опашката, вокализация по време на стимулация и след това продължаване на вокализацията след периода на стимулиране („vocalization afterdischarge“). Тези отговори са организирани в йерархична последователност и зависят от различните нива на интеграция на ноцицептивния сигнал в ЦНС: гръбначен мозък, мозъчен ствол и таламус/риненцефалон. Последният модулира афективните и мотивационни аспекти на болковото поведение.

Електрическо стимулиране на лапата (и опашката). При тези тестове под формата на тренировки се прилагат електрически стимули с увеличаване на

интензитета по пода на клетката, в която животното свободно се движи. Измерени са праговете за различни поведения: потрепване на животните, пискане или опит за бягство, подскок. Вокалният отговор може да се записва, измерва и анализира обективно. Както и при теста гореща плоча, едновременното стимулиране на четирите крака и опашката на животното е несъмнено източник на неорганизиран инхибиторни контроли, които е вероятно да променят отговора, който се следи.

3.1.3.2. Използване на единични удари или много кратки тренировки с електрически стимули

Стимулиране на опашката. Този тест се различава от гореописаните по това, че: 1) електрическите стимули, приложени към опашката са единични и с кратка продължителност (10 или 20 милисекунди), което позволява латенцията да бъде измерена и 2) наблюдаваните поведения са различни, макар и свързани. Когато интензитетът на стимулация се увеличава се наблюдават последователно следните отговори: потрепвания, избягване, вокализация и хапане на електродите. Тези отговори отново са йерархично организирани, като последния е най-координиран и зависят от различните нива на интеграция на ноцицептивния сигнал в ЦНС.

Стимулиране на зъбна пулпа. Недостатък при използване на електрическа стимулация при изучаване на болката е неселективното стимулиране, което възбужда различни видове първични аферентни нервни влакна. Това се преодолява чрез селективно стимулиране на малки нервни влакна с триъгълни или трапецовидни (Fang and Mortimer, 1991) електрически импулси (за разлика от конвенционалните правоъгълни вълни). Недостатък на тези техники е, че не се блокират малките неболкови (напр. терморелепторни) нерви и трудно се прилагат на свободно движещи се животни. Много изследователи са опитвали да намерят тъкан, в която всички аферентни нервни влакна са ноцицептивни. Най-често за тази цел се използва зъбната пулпа, защото: 1) аферентните нерви в зъбната пулпа могат да се активират само от болкови стимули, подобно при хората; 2) активирането на тези нерви при хора никога не предизвиква усещане, различно от болка; 3) всички тези нерви имат малък диаметър и бавна скорост на проводимост, подобно на тези, които са свързани с ноцицепцията на други места в тялото.

Независимо от техните ограничения, моделите използващи стимулиране на зъбната пулпа се прилагат при изследване активността на опиоидните аналгетици. Те са по-селективни от теста с перитонеално дразнене и може да се прилага при

неопиоидните аналгетици, когато теста „гореща плоча“ не е показателен. Тези модели не са много чувствителни при изследване аналгетичната активност на НСПВС, които показват ефект само при високи (понякога близки до токсични) дози.

Стимулиране на крайници. Електромиографски записи на ноцицептивни рефлексии от крайници са били използвани за експериментални изследвания на чувствителността към болка, но те са по-рядко използвани отколкото поведенческите тестове. Тези тестове позволяват количествено определяне на отговорите, независимо дали има движение на крайника, както и оценяване на отговорите при надпрагови стимули. При хора електрофизиологичните методи за изучаване на спиналния и супраспиналния контрол върху моторната активност при нормални и патологични условия, също регистрират ноцицептивни флексорни рефлексии. Willer (1977) разработва двоен електрофизиологичен и неврофармакологичен подход за изучаване на ноцицептивния флексорен рефлекс на долен крайник и предлага този рефлекс да се използва като обективен показател за изучаване на болката. Достоверността на флексорните рефлексии като мярка за чувствителността към болка при животни е по-малка отколкото при хора, тъй като прилагането на остър стимул причинява едновременно болка и рефлекс на отдръпване. Тези два отговора могат да бъдат разграничени когато животното се анестезира, поради чувствителността на мозъка към общия анестетик и участието на възходящи пътища, използващи различни невронални кръгове на спинално ниво.

3.1.4. Тестове, базирани на дългодействащи стимули (тонична болка)

При тези тестове се използва дразнещ, химичен болков агент като ноцицептивен стимул. Характерно при тях е, че не е необходимо определянето на ноцицептивен праг, а се използва количествен подход за наблюдаване на поведението след прилагането на стимула. Тези тестове се използват като модел за тонична, но не и хронична болка, тъй като тяхната продължителност е от порядъка на няколко десетки минути. При тези тестове дразнещият агент се инжектира интрадермално или интраперитонеално. Използват се тестове и с интракапсуларно въвеждане на уратни кристали или карагенин, но те са свързани с модели на хронична възпалителна болка. Към тестовите с дълготрайни стимули се отнасят и тези, свързани със стимулиране на кух орган. Последните могат да бъдат разделени в две категории, в зависимост от вида на стимула: 1) тестове, свързани с въвеждане на болково вещество; 2) тестове, свързани с раздуване на кух орган.

3.1.4.1. Тестове с интрадермално въвеждане на веществото

Най-често прилаганото вещество за интрадермално инжектиране е формалин („формалинов тест“), като се използва 37% разтвор на формалдехид. По-рядко се използват хипертоничен физиологичен разтвор, етилен диамино тетра-оцетна киселина и капсаицин.

В гръбната повърхност на предната лапа на плъх се инжектира 0,5% до 15% разтвор на формалин и се предизвиква болезнено поведение, което може да бъде оценено по скала с четири нива: 0 – нормална поза, 1 – инжектираната лапа остава на пода, но не поддържа животното, 2 – с ясно повдигната инжектирана лапа и 3 – облизване на инжектираната лапа (Dubuisson and Dennis, 1977). Резултатите са изразени или за единица време или като интервал от време. Друг параметър, който може да бъде измерен е броят на облизвания на лапата за единица време, сумарното време, прекарано в близане на лапата. Тези специфични поведения, в резултат на инжектиране на формалин могат да бъдат регистрирани автоматично от камера, свързана с компютър. По този начин, ефектите на фармакологичното вещество като двигателна активност могат да бъдат идентифицирани и разделени от антиноцицептивните ефекти.

При плъхове и мишки, интраплантарното инжектиране на формалин произвежда двуфазна поведенческа реакция, която се състои от първоначална фаза с продължителност около 3 минути след инжектирането и след латентен период се наблюдава втора фаза между 20-та и 30-та минута. Наблюдаваните резултати през първа фаза се дължат на директно дразнене на ноцицепторите, докато втората фаза включва период на чувствителност, през който се развива възпалителна реакция. Промените, наблюдавани през втората фаза се дължат на централна сенситизация на невроните в задния рог, както и на периферна сензитизация на болковите рецептори от предизвиканата от формалина локална възпалителна реакция (Taylor et al., 1997).

Опиоидните аналгетици проявяват антиноцицептивен ефект и през двете фази на формалиновия тест, докато НСПВС потискат само втората фаза, особена ако формалина се инжектира във високи концентрации (Yashpal and Coderre, 1998).

3.1.4.2. Тестове с интраперитонеално инжектиране на дразнещи агенти („the Writhing Test“)

Интраперитонеалното приложение на вещества, които дразнят серозните мембрани провокира стереотипно поведение при мишки и плъхове, което се характеризира с коремни свивания, усукване на абдоминалните мускули, намаляване на

двигателната активност и моторна некоординираност. Измерват се коремните спазми за единица време. Тези поведенчески реакции са израз на болка от химичното дразнене на перитонеума. Като дразнещи химични агенти се използват ацетилхолин, разредена солна или оцетна киселина, брадикинин, адреналин, калиев хлорид, триптамин и окситоцин. Предимството на този метод е, че позволява да се регистрират ефекти и от слаби аналгетици. От друга страна при него липсва специфичност и може да се използва не само при аналгетици, но и при други вещества, които нямат аналгетично действие като адренергични блокери, антихистамини, мускулни релаксанти, MAO-инхибитори и невротропици. По този начин един положителен резултат с този тест не означава непременно, че веществото е аналгетик. Но тъй като всички аналгетици инхибират коремните спазми, този тест е подходящ за отсяване на молекули, чийто фармакодинамични свойства са неизвестни.

Интраперитонеалното инжектиране на дразнещи вещества също е било използвано при nonbehavioral модели на ноцицепция, т. е. модели, в които животното е анестезирано. Така например, промени в средното артериално кръвно налягане и вътрестомашното налягане са били използвани като маркери за ноцицептивни реакции при интраперитонеално въвеждане на брадикинин на анестезирани плъхове (Griesbacher et al., 1998).

3.1.5. Тестове със стимулиране на кухи органи

При тези тестове дразнещият агент се инжектира директно в кух орган и по този начин теста може да се разглежда като модел на висцерална болка. Прилагането на формалин в дебелото черво на плъх предизвиква двуфазна реакция на болково поведение, включваща начална фаза на разтягане и свиване на цялото тяло и втора фаза, през която е наблюдава коремно близане и хапане. По подобен начин са разработени модели за болка в пикочния мехур след интравезикално въвеждане на капсаицин или капсаицин-подобни вещества. Ness и Gebhart (1988) предизвикват колоректално раздуване чрез надуваем балон при плъхове и наблюдават избягващо поведение и рефлексии от коремните мускули, които могат да бъдат регистрирани електромиографски. Също така се наблюдават и вегетативни реакции като повишаване на кръвното налягане и тахикардия, макар че те могат да бъдат обърнати или отслабени от някои анестетици. При тези тестове се използва и дразнене на дебелото черво от прилагането на оцетна киселина. Други модели на ноцицепция, включващи стомашно-чревния тракт на плъхове използват раздуване на стомаха или дванадесетопръстника.

Модели на висцерална болка използват и стимулация на части от пикочо-половата система при животни в съзнание (Giamberardino et al, 1995).

3.2. Модели за изследване на хронична болка

Хроничната болка се предизвиква от увреждане на тъканите, но продължава и след оздравяването на лезията, която я причинява. Поради тази причина тя не се дължи на активиране на ноцицепторите, няма протективен ефект и понижава качеството на живот на пациентите. Причините за хронифициране на болката са същите, както и причините за възникване на невропатната болка, защото хроничната болка обикновено е невропатна (с изкл. на възпалителната) (Jaggi et al, 2009).

Животинските модели са основни за установяване механизмите на хроничната болка и намирането на ефективна терапия. Тези модели са така разработени, че да симулират условията на клинична болка с различна етиология.

Оценката на невропатната болка при хора е сложна, защото повечето от стимулите за предизвикване на невропатна болка водят до необратими увреждания. Идеалните модели на хронична болка трябва да доведат до възпроизводими сензорни дефицити като алодиния, хипералгезия и продължителни спонтанни болки.

3.2.1. Модели на периферна невропатна болка

3.2.1.1. Модел на аксотомия

Това е най-старият модел на невропатна болка при животни и включва пълно срязване на седалищния нерв на ниво средата на бедрото над бифуркацията на нерва (Wall PD, 1979). Моделът предизвиква *anesthesia dolorosa*, т.е. болка в област с отсъствие на каквато и да е сетивност. Поради етични съображения, моделът не се използва, а и пълната лезия на нерва е рядко явление при пациенти и се наблюдава само при ампутация като фантомна болка.

3.2.1.2. Модел на хронична констриктивна травма

Този модел е разработен от Bennet and Xie (1988) като модел на периферна мононевропатия при плъхове и е един от най-често използваните животински модели на невропатна болка. Под анестезия се отпрепарира седалищния нерв и проксимално от трифуркацията на нерва се правят три свободни лигатури, като се внимава да не се прекъсне ендоневралната циркулация. Наблюдавани са поведенчески признаци като спонтанна болка, щадене и прекомерно близане на крайника, накуцване на

ипсилатералната задна лапа. Поведенческите промени като механична и термична хипералгезия, химическа хиперреактивност и студена алодиния се развиват в рамките на седмица след операцията. Електрофизиологични изследвания показват, че частичното увреждане на нерва води до повишаване чувствителността на А и С-влакната, които играят роля в иницирането и поддържането на поведението на болка (Gabaу E, 2004). Моделът на хронично констриктивно увреждане на нерв възпроизвежда едностранна периферна мононевропатия и наблюдаваните симптоми съответстват на комплексен регионален болков синдром при пациенти. Този модел се използва широко за изследване на спонтанна болка и абнормална чувствителност.

3.2.1.3. Модел на частично лигиране на седалищния нерв

Моделът е разработен от Seltzer съавт. (1990) и е един от най-често използваните модели на периферна невропатия. Левият седалищен нерв се отпрепарира и се лигира $\frac{1}{2}$ до $\frac{1}{3}$ от диаметъра на нерва. Наблюдават се поведенчески признаци на спонтанна болка като щадене и близане на лапата от страна на увредата. Една седмица след операцията се отчитат поведенчески промени като студена алодиния и механична хипералгезия. Поради бързото начало и дългата продължителност на предизвиканите алодиния и хипералгезия, този модел е подходящ за изследване на каузалгични болкови синдроми при пациенти.

3.2.1.4. Модел на лигиране на гръбначно мозъчен нерв

Kim и Chung (1992) разработват модел на периферна мононевропатия чрез лигиране на гръбначно мозъчни нерви. След като се отпрепарира, L5 и L6 се лигират дистално от коренчетата на гръбначния ганглий. Поведенческите промени като механична и студена алодиния, термична хипералгезия и спонтанна болка се развиват 24 до 48 часа след операцията и персистират в продължение на 10 – 16 седмици. Предимство при този модел е наличието едновременно на увредени и интактни спинални сегменти. Недостатък е, че изисква по-обширни хирургични процедури.

Labuda и Little (2005) разработват модел с лигиране само на L5 гръбначно мозъчен нерв, който е лесно възпроизводим модел с минимално нараняване на околните тъкани.

3.2.1.5. Модел на щадящо увреждане на периферен нерв

Това е сравнително нов модел на невропатна болка, описан от Decosterd и Woolf (2000). При плъхове под анестезия се отпрепарира левия седалищен нерв с трите му клона: н. суралис, н. перонеус и н. тибалис. Лигират се двата клона, а третият остава неувреден. Механична и термична хипералгезия и алодиния се развиват до 4 дни след операцията и се наблюдават до 6 месеца след увреждането. Предимство на този модел е, че дава възможност да се сравни разликата в механичната и термичната чувствителност на ненаранените кожни участъци с обезнервените области. Това е важно, защото позволява едновременно изследване на промените в двата увредени първични сетивни неврони и в съседните интактни сензорни неврони и установяване на относителният им принос за патофизиологията на болката.

3.2.1.6. Модел на периферна невропатия чрез крионевролизис на седалищния нерв

Този модел на периферна невропатия е интересен, защото увреждането на периферния нерв се постига не с лигиране или прекъсване, а чрез замразяване. За тази цел седалищния нерв се отпрепарира от околните тъкани и замразява проксимално от трифуркацията с помощта на азотен оксид. Поведенческите симптоми, наблюдавани при този модел са механична алодиния и автотомия, без термична хипералгезия. Увреждането, предизвикано от крионевролизиса е обратимо и дава възможност за проучване на ефекта на преходна нервна увреда.

3.2.1.7. Модел на периферна невропатия чрез възпаление на седалищния нерв

Известно е, че половината от невропатиите при пациентите се причиняват от възпаление или инфекция, вместо от травма. В допълнение на това, възпалителни реакции се наблюдават дори и при травматични увреждания на нерва. Ето защо този модел на възпаление е модел на избор за увреждане на периферен нерв за много изследователи. Използват се различни възпалителни агенти (zimosan, carrageenan, Freund's adjuvant), които се въвеждат чрез катетър, имплантиран около седалищния нерв. Механична алодиния се наблюдава 2 – 3 дни след операцията. При този модел на възпаление на периферен нерв се наблюдава огледална болка в места, контралатерални на увредата. Такава огледална болка се наблюдава при хронични бокови състояния като рефлексна симпатикова дистрофия, каузалгия, атипична лицева болка, идиопатична орофациална артромиалгия и др. Моделът на възпалителна невропатия на седалищния нерв дава възможност за изучаване на тази огледална невропатна болка. Слабото ниво

на активиране на имунната система създава едностранно механична алодиния в ипсилатералния възпален седалищен нерв, докато по-силното активиране на имунната система води до двустранна алодиния.

3.2.1.8. Модел на фотохимично-индуцирано увреждане на седалищния нерв

Този модел включва лазерно облъчване на седалищния нерв след интравенозно прилагане на фоточувствително багрило. Алуминиево фолио се поставя под нерва за изолиране на околните тъкани и за отразяване на светлината. Увреждането на нерва е резултат на фотохимична реакция, водеща до тромбоза и оклузия на малките съдове, кръвоснабдяващи нерва. Наблюдаваните поведенчески промени са механична, топлинна и студена алодиния и спонтанна болка.

3.2.1.9. Лазер-индуцирано увреждане на седалищния нерв

Едно потенциално ограничение на предишния модел е наличието на фоточувствително багрило. Проучвания, използващи лазерно облъчване показват, че CO₂ може самостоятелно да предизвика дегенерация на нерва в различна степен (Chiang NY, 2005). На втория постоперативен ден животните развиват характерни прояви на невропатна болка, вкл. термична хипералгезия и механична алодиния.

3.2.2. Модели на централна невропатна болка

Разработени са редица модели на централна невропатна болка въз основа на увреждане на гръбначния мозък. В резултат възниква болка, алодиния и хипералгезия.

3.2.2.1. Екситотоксично увреждане на гръбначния мозък

При този модел интратекалното въвеждане на AMPA рецепторен агонист (quisqualic acid) предизвиква увреждане чрез повишаване нивото на възбуждащите аминокиселини. Наблюдаваните патологични промени при този модел са сходни с клиничните симптоми, наблюдавани при сирингомиелия. Този модел на екситотоксичност е ефективен модел за изучаване на централния механизъм и невроналния субстрат, отговорен за началото и прогресирането на сетивните промени при състояния, свързани с увреждане на гръбначния мозък.

3.2.2.2. Модел на фотохимично увреждане на гръбначния мозък

Този модел е подобен на модела с фотохимично увреждане на периферен нерв. Инжектирането в опашната вена на фоточувствително багрило, последвано от

въздействие върху прешлени с аргон йонен лазер води до тромбоза на локални кръвоносни съдове и развитие на механична и студена алодиния и хипералгезия.

3.2.1.3. Модели на лекарство-индуцирана невропатия

Модели на невропатия, предизвикана от противотуморни средства

Винкристин-индуцирана невропатия

Клиничното приложение на противотуморното средство винкристи се свързва с развитието на невротоксичност на периферните нерви и сензорно-моторна невропатия. Многократното интравенозно инжектиране на винкристин в различни дози (20, 75, 100 или 200 мкг/кг) бързо води до развитие на болезнена невропатия. Тъй като при високата доза винкристи се наблюдава значителна смъртност, Authier и съавт. (2003) модифицират този модел с прилагане на 10 последователни инжектирания на ниски дози винкристин за намаляване на общата токсичност. Въвеждането на винкристин води до развитието на значителна механична и студена алодиния, без ефект върху термичната чувствителност.

Цисплатина-индуцирана невропатия

Цисплатината предизвиква периферна сензорна невропатия със засягане на миелинизираните нервни влакна с по-голям диаметър. Недостатък на този модел е развитието на нефротоксичност преди да се развие невротоксичност. Поради това е трудно да се установи дали невропатията се дължи на бъбречна недостатъчност или е следствие от директното действие на цисплатина. Кумулативни дози цисплатина (15 мг/кг) са свързани с развитието на термична хипералгезия, механична и студена алодиния.

Анти-HIV лекарства-индуцирана невропатия

Установено е, че високоактивната антиретровирусна терапия, включваща нуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза предизвиква болезнени невропатии и абнормна невронна хипервъзбудимост. Разработени са модели с различен дозов режим и различен път на въвеждане на лекарствата (Bhango SK, 2007). Ноцицептивните тестове показват максимално развитие на механична хипералгезия 5 дни след прилагане на анти-HIV лекарствата. Този модел на невропатна болка може да бъде полезен за проучване и откриване на нови терапевтични цели за лечение на HIV-индуцирана невропатна болка.

3.2.1.4. Модели на болест-предизвикана невропатия

Модел на диабетна невропатия

Периферната диабетна невропатия е най-честото усложнение на диабета и водеща причина за ампутация на долните крайници. Клиничните симптоми на невропатията включват повишен праг на вибрационно и топлинно усещане, които прогресират до загуба на чувствителност, както и до развитието на необичайни усещания като парестезии, алодиния и хипералгезия. Най-често използваните модели на диабетна невропатия са чрез прилагане на панкреасни бета клетъчни токсини стрептозотозин (Courteix C, 1993) и алоксан (Lee J, 1990). Недостатък при тези модели е, че животните развиват метаболитни разстройства като хипергликемия, кетоацидоза, промени в липидния метаболизъм. Някои от тези симптоми могат да усложнят интерпретирането на резултатите от ноцицептивните тестове.

3.5.2. Модели на болка при карцином

Няколко вида животински модели на ракова болка са разработени, вкл. болка при рак на костите и рак на кожата.

3.5.2.1. Модел на болка при злокачествен тумор на костите

Болка при рак на костите е една от най-често срещаните ракови болки, които могат да се дължат на първичен рак на костите или метастатичен при рак на яйчниците, простатата и белия дроб. Най-често използвания модел е рак на бедрената кост при мишки. В бедрената кост на мишки се инокулират остеолитични фибросаркомни клетки, които предизвикват болезнен остеосарком. Пет дни след инжектирането настъпва рак-индуцирана костна деструкция, която води до спонтанна и предизвикана болка (Sasamura, 2002).

3.5.2.2. Модел на болка при кожен карцином

При този модел меланомни клетки се инжектират подкожно в плантарната област на задната лапа на мишки. Наблюдава се изразена хипералгезия в първите 7 – 10 дни (ранна фаза) и след 14-ия ден след заразяването (късна фаза).

3.5.2.3. Модел на варицела зостер-индуцирана невропатия

Варицела зостер вирусът е силно невротропен, причинява варицела като първична инфекция, а по-късно се транспортира ретроградно по аксоните до сензорните ганглии на периферната нервна система. При отслабване на клетъчния имунитет настъпва

реактивиране на вируса с развитие на остра херпес зостер инфекция, характеризираща се с трайна невропатна болка с различна степен на сензорен дефицит.

Описани са няколко животински модела на латентна инфекция с вируса на херпес зостер (Dalziel RG, 2004; Hasnie FS, 2007). Плъховете се инфектират чрез подкожно въвеждане на вирусни клетки. Промените в поведенческите реакции включват механична алодиния и хипералгезия на третия ден след инфектирането.

3.3. Други модели на невропатия

Модел на етанол-индуцирана невропатия

Установено е, че хроничната употреба на етанол предизвиква болезнена невропатия, характеризираща се с дистална аксонална дегенерация. Най-често използвания животински модел на алкохол-индуцирана невропатия е чрез прилагане на 6,5% етанол дневно в продължение на 12 седмици (Narita M, 2007). Наблюдава се механична хипералгезия, която се задържа дори и след отнемането на етанола.

ОБОБЩЕНИЕ

Както проличава от направения литературен обзор, способността да се изпитва болка има протективна роля: тя ни предупреждава за предстояща или действителна тъканна увреда и предизвиква координиран рефлекс и поведенчески реакции, които да минимализират уврежданията.

Невропатната болка е тежък здравословен проблем, който се наблюдава при около 1% от населението за който липсва все още ефективна терапия. Основното състояние при невропатната болка е трайна (продължителна) свръхвъзбудимост на ноцицептивните сензорни нервни влакна. Установяването на механизмите на тази абнормална невронална свръхчувствителност е от изключително значение за разбиране и лечение на невропатната болка.

Традиционните противоболкови средства, като опиоидни аналгетици, аналгетици-антипиретици и НСПВС слабо повлияват симптомите на невропатната болка. Експериментални и клинични проучвания доказват ефикасността на лекарства от групите на антидепресантите (амитриптилин, нортриптилин, имипрамин) и антиконвулсантите (карбамазепин, габапентин, прегабалин) при лечение на невропатна болка. Участието на глутаматните рецептори в патогенезата на хронични болкови състояния дава основание за използването на неконкурентни антагонисти на тези рецептори, като кетамин, амантадин декстрометорфан при различни невропатни болкови състояния. Отдавна е известно, че В витамините се използват като аналгетични средства при лечение на болкови състояния, свързани с техния дефицит. През последните години е установен терапевтичният потенциал на витамини от В групата, и по-специално витамин В1, В6, и комбинацията между тях при увреждане на периферните нерви, като диабетна и алкохолна невропатия. Увреждането на периферните нерви води до оксидативен стрес с образуване на реактивни кислородни радикали и намаляване на оксидативната защита. Алфа липоевата киселина е мощен антиоксидант и невропротективно средство, използвано при остро и хронично увреждане на нервната тъкан.

Тези средства, чийто основен фармакологичен ефект не е болкоуспокояващия са не напълно проучени по отношение на различни модели и методи на остра и хронична болка. Изследването на аналгетичното и противовъзпалителното им действие ще допринесе за тяхното клинично приложение като допълнителни средства при лечение на остра и хронична болка.

ЦЕЛ

Целта на настоящето проучване е да се сравни противоболковото и противовъзпалително действие на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин, приложени в различни дози еднократно и многократно при интактни плъхове и такива с модел на невропатна болка, както и повлияване на TNF- α и IL-6 при LPS индуцирано възпаление.

ЗАДАЧИ

За постигането на тази цел си поставихме следните задачи:

1. Да се изследва противоболковия ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин, приложени в различни дози при модел на болка, причинена от топлинен стимул при еднократно и многократно приложение.
2. Да се изследва противоболковия ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин, приложени в различни дози при модел на болка, причинена от механичен стимул при еднократно и многократно приложение.
3. Да се изследва противоболковия ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин, приложени в различни дози при модел на болка, причинена от химичен болков стимул при еднократно и многократно приложение.
4. Да се изследва противовъзпалителния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин, приложени в различни дози еднократно и многократно при модел на възпаление с карагенин.
5. Да се изследват ефектите на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин, приложени в ефективна доза многократно при модел на невропатна болка:
 - а) при тест с топлинен болков стимул.
 - б) при тест с механичен болков стимул.
6. Да се изследва влиянието на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при многократно приложение върху нивата на проинфламаторните цитокини TNF- α и IL-6 при липополизахарид-индуцирано възпаление.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Всички експерименти са проведени съгласно Изискванията и Правилата за работа с лабораторни животни. За проучването е получено Разрешително за използване на животни в опити № 73/03.12.2012 година от Българска агенция по безопасност на храните към Министерство на земеделието и храните и от Комисия по научна етика към Медицински университет – Пловдив – Протокол № 4/25.06.2015 г.

Използвани бяха мъжки плъхове порода Вистар с тегло 170 – 220 грама (n = 496). Животните бяха отглеждани при стандартни лабораторни условия: 12:12 часа тъмно-светъл цикъл, 45% относителна влажност на въздуха, температура $23 \pm 1^\circ\text{C}$ и свободен достъп до храна и вода.

I. Експериментални групи

1. Изследване на доза-ефект зависимостта на аналгетичното действие на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при еднократно третиране.

При експериментите за изследване на аналгетично действие на веществата при еднократно въвеждане използвахме контролна група (n = 8), третирана с физиологичен разтвор в доза 1 мл/кг интраперитонеално и позитивна контрола (n = 8), третирана с метамизол в доза 150 мг/кг интраперитонеално.

1.1. За изследване на доза-ефект зависимостта на аналгетичното действие на **бенфотиамин** при еднократно третиране бяха използвани 24 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 3 групи по 8 животни както следва:

I група – третирани с бенфотиамин в доза 20 мг/кг перорално

II група – третирани с бенфотиамин в доза 40 мг/кг перорално

III група – третирани с бенфотиамин в доза 80 мг/кг перорално

1.2. За изследване на доза-ефект зависимостта на аналгетичното действие на **алфа-липоевата киселина** бяха използвани 24 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 3 групи по 8 животни както следва:

I група – третирани с алфа-липоева киселина в доза 30 мг/кг интраперитонеално

II група – третирани с алфа-липоева киселина в доза 60 мг/кг интраперитонеално

III група – третирани с алфа-липоева киселина в доза 90 мг/кг интраперитонеално

1.3. За изследване на доза-ефект зависимостта на аналгетичното действие на **габапентин** бяха използвани 24 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 3 групи по 8 животни както следва:

I група – третиран с габапентин в доза 30 мг/кг интраперитонеално

II група – третиран с габапентин в доза 60 мг/кг интраперитонеално

III група – третиран с габапентин в доза 100 мг/кг интраперитонеално

1.4. За изследване на доза-ефект зависимостта на аналгетичното действие на **кетамин** бяха използвани 24 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 3 групи по 8 животни както следва:

I група – третиран с кетамин в доза 30 мг/кг интраперитонеално

II група – третиран с кетамин в доза 40 мг/кг интраперитонеално

III група – третиран с кетамин в доза 50 мг/кг интраперитонеално

2. Изследване на доза-ефект зависимостта на противовъзпалителното действие на **бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при еднократно третиране.**

При експериментите с еднократно въвеждане на веществата за изследване на противовъзпалителното им действие, използвахме контролна група (n = 8), третирана с физиологичен разтвор и позитивна контрола (n = 8), третирана с диклофенак в доза 25 мг/кг интраперитонеално.

2.1. За изследване на доза-ефект зависимостта на противовъзпалителното действие на **бенфотиамин** бяха използвани 24 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 3 групи по 8 животни както следва:

I група – третиран с бенфотиамин в доза 20 мг/кг перорално

II група – третиран с бенфотиамин в доза 40 мг/кг перорално

III група – третиран с бенфотиамин в доза 80 мг/кг перорално

2.2. За изследване на доза-ефект зависимостта на противовъзпалителното действие на **алфа-липоевата киселина** при еднократно въвеждане бяха използвани 24 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 3 групи по 8 животни както следва:

I група – третиран с алфа-липоева киселина в доза 30 мг/кг интраперитонеално

II група – третиран с алфа-липоева киселина в доза 60 мг/кг интраперитонеално

III група – третираны с алфа-липоева киселина в доза 90 мг/кг интраперитонеално

2.3. За изследване на доза-ефект зависимостта на противовъзпалителното действие на **габапентин** бяха използвани 24 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 3 групи по 8 животни както следва:

I група – третираны с габапентин в доза 30 мг/кг интраперитонеално

II група – третираны с габапентин в доза 60 мг/кг интраперитонеално

III група – третираны с габапентин в доза 100 мг/кг интраперитонеално

2.4. За изследване на доза-ефект зависимостта на противовъзпалителното действие на **кетамин** бяха използвани 24 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 3 групи по 8 животни както следва:

I група – третираны с кетамин в доза 30 мг/кг интраперитонеално

II група – третираны с кетамин в доза 40 мг/кг интраперитонеално

III група – третираны с кетамин в доза 50 мг/кг интраперитонеално

3. Изследване на доза-ефект зависимостта на аналгетичното действие на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при 14-дневно многократно третиране.

При експериментите с многократно въвеждане на веществата за изследване на аналгетичното им действие, използвахме контролна група (n = 8), третирана с физиологичен разтвор и позитивна контрола (n = 8), третирана с метамизол в доза 150 мг/кг интраперитонеално.

3.1. За изследване на доза-ефект зависимостта на аналгетичното действие на **бенфотиамин** при многократно третиране бяха използвани 24 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 3 групи по 8 животни както следва:

I група – третираны с бенфотиамин в доза 20 мг/кг перорално

II група – третираны с бенфотиамин в доза 40 мг/кг перорално

III група – третираны с бенфотиамин в доза 80 мг/кг перорално

3.2. За изследване на доза-ефект зависимостта на аналгетичното действие на **алфа-липоевата киселина** при многократно третиране бяха използвани 24 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 3 групи по 8 животни както следва:

I група – третираны с алфа-липоева киселина в доза 30 мг/кг интраперитонеално

- II група – третираны с алфа-липоева киселина в доза 60 мг/кг интраперитонеално
- III група – третираны с алфа-липоева киселина в доза 90 мг/кг интраперитонеално

3.3. За изследване на доза-ефект зависимостта на аналгетичното действие на **габапентин** при многократно третиране бяха използвани 24 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 3 групи по 8 животни както следва:

- I група – третираны с габапентин в доза 30 мг/кг интраперитонеално
- II група – третираны с габапентин в доза 60 мг/кг интраперитонеално
- III група – третираны с габапентин в доза 100 мг/кг интраперитонеално

3.4. За изследване на доза-ефект зависимостта на аналгетичното действие на **кетамин** при многократно третиране бяха използвани 24 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 3 групи по 8 животни както следва:

- I група – третираны с кетамин в доза 30 мг/кг интраперитонеално
- II група – третираны с кетамин в доза 40 мг/кг интраперитонеално
- III група – третираны с кетамин в доза 50 мг/кг интраперитонеално

4. Изследване на доза-ефект зависимостта на противовъзпалителното действие на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при 14-дневно многократно третиране.

При експериментите с многократно въвеждане на веществата за изследване на противовъзпалителното им действие, използвахме контролна група (n = 8), третирана с физиологичен разтвор в доза 1 мл/кг интраперитонеално и позитивна контрола (n = 8), третирана с диклофенак в доза 25 мг/кг интраперитонеално.

4.1. За изследване на доза-ефект зависимостта на противовъзпалителното действие на **бенфотиамин** при многократно третиране бяха използвани 24 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 3 групи по 8 животни както следва:

- I група – третираны с бенфотиамин в доза 20 мг/кг перорално
- II група – третираны с бенфотиамин в доза 40 мг/кг перорално
- III група – третираны с бенфотиамин в доза 80 мг/кг перорално

4.2. За изследване на доза-ефект зависимостта на противовъзпалителното действие на **алфа-липоевата киселина** при многократно третиране бяха използвани 24 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 3 групи по 8 животни както следва:

I група – третирани с алфа-липоева киселина в доза 30 мг/кг интраперитонеално

II група – третирани с алфа-липоева киселина в доза 60 мг/кг интраперитонеално

III група – третирани с алфа-липоева киселина в доза 90 мг/кг интраперитонеално

4.3. За изследване на доза-ефект зависимостта на противовъзпалителното действие на **габапентин** при многократно третиране бяха използвани 24 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 3 групи по 8 животни както следва:

I група – третирани с габапентин в доза 30 мг/кг интраперитонеално

II група – третирани с габапентин в доза 60 мг/кг интраперитонеално

III група – третирани с габапентин в доза 100 мг/кг интраперитонеално

4.4. За изследване на доза-ефект зависимостта на противовъзпалителното действие на **кетамин** при многократно третиране бяха използвани 24 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 3 групи по 8 животни както следва:

I група – третирани с кетамин в доза 30 мг/кг интраперитонеално

II група – третирани с кетамин в доза 40 мг/кг интраперитонеално

III група – третирани с кетамин в доза 50 мг/кг интраперитонеално

5. За изследване аналгетичния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при модел на невропатна болка бяха използвани 48 мъжки бели плъха порода Вистар, разделени чрез случаен подбор в 6 групи по 8 животни както следва:

I група (sham контрола) – оперирана, без лигиране на n. ischiadicus

II група (контрола) – лигиране на n. ischiadicus и третирани с физиологичен разтвор интраперитонеално

III група – лигиране на n. ischiadicus и третирани с бенфотиамин в доза 20 мг/кг интраперитонеално

IV група – лигиране на n. ischiadicus и третирани с алфа-липоева киселина в доза 60 мг/кг интраперитонеално

V група – лигиране на n. ischiadicus и третирани с габапентин в доза 60 мг/кг интраперитонеално

VI група – лигиране на n. ischiadicus и третирани с кетамин в доза 50 мг/кг интраперитонеално

6. За изследване влиянието на многократно приложените бенфотиамин, алфалипоева киселина, габапентин и кетамин върху серумните нива на провъзпалителните цитокини TNF α и IL-6 бяха използвани 52 мъжки бели плъха порода Вистар.

II. Методи

1. Ноцицептивни тестове

1.1. Тест „гореща плоча”

Използвахме апарата HOT/COLD PLATE (Ugo Basile, Italy) с гореща повърхност с температура $55 \pm 5^\circ\text{C}$. Животните се поставят върху нея, ограничени от плексигласов цилиндър. Отчита се латентното време, определено като периода между момента на поставяне на животното върху горещата плоча до момента, в който оближе една от задните си лапи, направи опит за изскачане от цилиндъра или реагира с вокализация. За да се избегне увреждане на тъканите, максималният престой върху плочата (cut-off time) е 30 секунди. Латентното време беше отчитано за всяко животно непосредствено след третирането, както и на първия, втория и третия час след третирането. Критерият за аналгетична активност е удължаване на нормалното реакционно време при опитните животни в сравнение с контролата, третирана с физиологичен разтвор. Третираната с метамизол контролна група се използва като еталон за оценка на аналгетичното действие.

1.2. Тест с механичен натиск на лапата (аналгезиметър)

Тестът е описан от Randall & Selitto (1957). Използва се апарат – аналгезиметър (Ugo Basile, Italy). Прилага се механичен болков стимул. Ноцицептивният праг се измерва като се прилага натиск върху една от задните лапи на плъха. Силата на натиска е калибрирана в 10 гр/см при максимална сила 250 грама. Отчита се в условни единици (сантиметри) силата на натиска, при която животното отдръпва тестираната лапа. Максималният възможен натиск е при 25 см. Тестирането се провежда за всяко животно непосредствено след третирането, както и на първия, втория и третия час след третирането.

1.3. Формалинов тест

В една от задните лапи на плъха се инжектира интраплантарно по 0,1 мл 2% воден разтвор на формалин. Отчита се в секунди времето на близане на лапата за първите 10 минути и между 20 – 30 минута. Формалинът се въвежда веднага след третирането със съответния медикамент. Критерий за аналгетично действие е намаляването на времето за облизване на лапата при опитните животни в сравнение с контролата с физиологичен разтвор. Третираната с метамизол група се използва като еталон за оценка на аналгетичното действие.

2. Метод за изследване на противовъзпалително действие чрез предизвикване на оток на задната лапка на плъх с въвеждането на карагенин.

Използва се апарат плетизмометър (Ugo Basile). Преди третирането се измерва обема на задната дясна лапа на животните от всички групи. След това в задната дясна лапа на всички животни се инжектира 0,1 мл от 1% разтвор на карагенин в 0,9% натриев хлорид за предизвикване на карагенинов оток. Непосредствено след инжектирането на карагенин, животните от контролната група се инжектират интраперитонеално с 0,1 мл 0,9% разтвор натриев хлорид; втората група се инжектират с диклофенак в доза 25 мг/кг интраперитонеално, а на животните от другите опитни групи се въвеждат интраперитонеално изследваните вещества. В апарат плетизмометър (Ugo Basile) се отчита обемът изместена течност от задната дясна лапка на плъха на втория, третия и четвъртия час след третирането с карагенин. Изчислява се разликата в мл между обема на третираната с карагенин задна дясна лапа на втория, третия и четвъртия час (V_t) и обема на задна дясна лапа на всяко опитно животно преди третирането (V_0). Прилага се формула за изчисляване на процента на инхибиране на възпалението:

$$V_t = V_t - V_0 / V_0 \cdot 100$$

3. Модел на невропатна болка

Модел на невропатна болка се създава чрез лигиране на нервус ишиадикус (Bennett and Xie, 1998). Животните се анестезират чрез интраперитонеално въвеждане на пентобарбитал натрий в доза 50 мг/кг, което осигурява анестезия с продължителност 20 – 40 минути. Животните заспиват бързо и се фиксират по корем върху дъска. С електрическа бръсначка се обръсва левия крак в горната една трета и мястото се дезинфекцира със спирт. Прави се разрез на кожата около 2 см. Подкожието

внимателно се отпрепарира с тъпа ножица и леко се срязва. Левият седалищен нерв се открива в дълбочина между мускул бицепс феморис. Леко се отпрепарира нерва от околните тъкани и се правят две лигатури (всяка с по два възела) през 2 мм. Първата лигатура е по-хлабава, докато втората е по-стегната, но само притиска нерва, без да го прекъсва. След увреждането на нерва, подкожието и кожата се зашиват с хирургични шевове. Раната се дезинфекцира със сулфатиазол прах. При sham контролата се извършва идентична дисекция на левия крак без да се лигира седалищния нерв.

Седем дни след лигирането на седалищния нерв се извършват експериментите за аналгетично действие на изследваните вещества.

4. Липополизахарид-индуцирано възпаление

Метод: Ензимно-свързан имуносорбентен тест *ELISA*

Принцип на метод: Всички процедури по *ELISA* теста са извършени при стриктно спазване на инструкциите за работа с китове на производителя.

За количествено изследване на цитокина TNF- α серумите от плъхове, вътрешните контроли и стандартите на теста след разреждане се накапваха в обем 100 μ l за всяка ямка върху плаката. След инкубация и измиване се поставяше конюгат в обем 50 μ l Biotinylated anti rat TNF- α към всички ямки (второ антивидово анти тяло) за образуване на комплекс с цитокина. Следваше второ промиване за отстраняване на несвързания конюгат. Прибавян беше ензим в обем 100 μ l Streptavidin – HRP към всички ямки и съответния му хромогенен субстрат в обем 100 μ l TMB Substrate Solution за настъпване на цветна реакция, маркираща наличие на цитокина. Абсорбцията, която е пропорционална на цитокиновата концентрация, се измерваше колориметрично на *ELISA* рийдър *TECAN* при дължина на вълната 450 nm. Чрез построяване на стандартни криви се определяше концентрацията на всеки от цитокините в pg/ml.

За количествено изследване на цитокина IL-6 серумите от плъхове и вътрешните контроли се накапваха след разреждане в обем 50 μ l за всяка ямка върху плаката. Стандартите се накапваха след съответното разреждане в обем 100 μ l за всяка ямка върху плаката. След инкубация и измиване се поставяше конюгат в обем 50 μ l Biotin-Conjugate анти-плъши IL-6 моноклонално анти тяло към всички ямки (второ антивидово анти тяло) за образуване на комплекс с цитокина. Следваше второ промиване за отстраняване на несвързания конюгат. Прибавян беше ензим в обем 100 μ l Streptavidin – HRP към всички ямки и съответния му хромогенен субстрат в обем 100 μ l TMB Substrate Solution за настъпване на цветна реакция, маркираща наличие на

цитокина. Абсорбцията, която е пропорционална на цитокиновата концентрация, се измерваше колориметрично на ELISA рийдър TECAN при дължина на вълната 450nm. Чрез построяване на стандартни криви се определяше концентрацията на всеки от цитокините в pg/ml.

Използва се липополизахарид (LPS) на E.coli щам B:055 на Sigma Aldrich (cat.L2880-25MG). Инжектира се интраперитонеално еднократно в доза 250 µg/kg на плъховете от контролната група и експерименталните групи с многократно третиране. Четири часа след инжектирането на LPS беше събрана кръв за имунологични изследвания след хиперемия на латералните кръвоносни съдове на опашката на животните. За целта животното се фиксира и опашката се потапя в съд с топла вода с температура около 40°C за 3–4 минути. Кръвта беше събрана в моновети и центрофугирана при 3000 оборота/минута в продължение на 10 минути непосредствено след събиране на пробите. Полученият серум беше съхраняван при -80°C в нискотемпературен фризер (SANYO) в Катедрата по микробиология и имунология при МУ – Пловдив в продължение на един месец до измерване концентрацията на цитокините.

5. *In vitro* изследване на про-инфламаторни цитокини с метод ELISA

Метод: Ензимно-свързан имуносорбентен тест *ELISA*

Принцип на метод: Всички процедури по ELISA теста са извършени при стриктно спазване на инструкциите за работа с китове на производителя. Про-инфламаторните цитокини TNF-α и IL-6 бяха изследвани в серум от плъхове с LPS-индуцирано възпаление. Бяха използвани готови търговски китове за плъши серум за TNF-α и IL-6 съответно: Rat TNF-α ELISA KIT Diaclone (Cat.No: 865.000.096; годност 2016-09; няма референтни граници); Rat IL-6 ELISA KIT Diaclone (Cat.No: 670.010.096; годност 2016-08; няма референтни граници).

TNFα – аналитична чувствителност – минимална откриваемост 15 pg/ml

IL-6 – аналитична чувствителност – минимална откриваемост 19 pg/ml

За количествено изследване на цитокина TNF-α серумите от плъхове, вътрешните контроли и стандартите на теста след разреждане се накапваха в обем 100 µl за всяка ямка върху плаката. След инкубация и измиване се поставяше конюгат в обем 50 µl Biotinylated anti rat TNF-α към всички ямки (второ антивидово анти тяло) за образуване на комплекс с цитокина. Следваше второ промиване за отстраняване на несвързания конюгат. Прибавян беше ензим в обем 100 µl Streptavidin – HRP към всички ямки и

съответния му хромогенен субстрат в обем 100 μ l TMB Substrate Solution за настъпване на цветна реакция, маркираща наличие на цитокина. Абсорбцията, която е пропорционална на цитокиновата концентрация, се измерваше спектрофотометрично на ELISA рийдър TECAN при дължина на вълната 450 nm. Чрез построяване на стандартни криви се определяше концентрацията на всеки от цитокините в pg/ml.

За количествено изследване на цитокина IL-6 серумите от плъхове и вътрешните контроли се накапваха след разреждане в обем 50 μ l за всяка ямка върху плаката. Стандартите се накапваха след съответното разреждане в обем 100 μ l за всяка ямка върху плаката. След инкубация и измиване се поставяше конюгат в обем 50 μ l Biotin-Conjugate анти-плъши IL-6 моноклонално антитяло към всички ямки (второ антивидово антитяло) за образуване на комплекс с цитокина. Следваше второ промиване за отстраняване на несвързания конюгат. Прибавян беше ензим в обем 100 μ l Streptavidin – HRP към всички ямки и съответния му хромогенен субстрат в обем 100 μ l TMB Substrate Solution за настъпване на цветна реакция, маркираща наличие на цитокина. Абсорбцията, която е пропорционална на цитокиновата концентрация, се измерваше колориметрично на ELISA рийдър TECAN при дължина на вълната 450 nm. Чрез построяване на стандартни криви се определяше концентрацията на всеки от цитокините в pg/ml.

Таблица 1. Стандарти за построяване на стандартна крива за определяне на TNF- α

Стандарт	TNF- α Концентрация (pg/ml)	Оптична плътност OD (450nm) Референтна	Оптична плътност OD (450nm) Получена	Коефициен на вариабилност CV (%)
1	1000	1,821	1,834	6,8
2	500	1,018	0,991	4,7
3	250	0,618	0,481	6,1
4	125	0,327	0,241	1,9
5	31,25	0,205	0,155	1,4
6	15,6	0,130	0,114	1,6
Blank	0	0,057	0	

Таблица 2. Стандарти за построяване на стандартна крива за определяне на IL-6

Стандарт	IL6 Концентрация (pg/ml)	Оптична плътност OD (450nm) Референтна	Оптична плътност OD (450nm) Получена	Коефициен на вариабилност CV (%)
1	2000	1,839	1,702	1,8
2	1000	0,91	1,006	2,1
3	500	0,457	0,389	0,6
4	250	0,247	0,178	2,1
5	125	0,139	0,144	0,5
6	62,5	0,083	0,090	0,9
Blank	0	0,038	0	

6. Използвани лекарствени продукти и химически вещества

6.1. Лекарствени продукти.

Benfotiamin (Benfogamma, Wörwag pharma)

Alpha-lipoic acid (Thiogamma, Wörwag pharma)

Gabapentin (Gabagamma, Wörwag pharma)

Ketamine (Calipsol, Gedeon Richter)

Diclofenac (Diklak, Hexal AG)

Metamizol (Metamizole Sodium, Sopharma)

6.2. Химични съединения

Formalin (Sigma)

Carrageenan (Fluka)

Pentobarbital natrii (Sigma)

Lipopolysaccharide (Sigma)

III. Статистически анализ на получените резултати

Получените данни от ноцицептивните и противовъзпалителните тестове бяха обработени статистически с програма SPSS 17.0. За всеки показател при всяка група бяха определени средната аритметична стойност (MEAN) и стандартната ѝ грешка (\pm SEM). Сравняването на резултатите за всеки показател спрямо съответната контролна група беше извършено с помощта на Independent Sample T test при степен на достоверност $P < 0,05$. За определяне на разпределението беше използван теста на Kolmogorov-Smirnov. При разпределение, различно от нормално, използвахме тест Mann-Whitney.

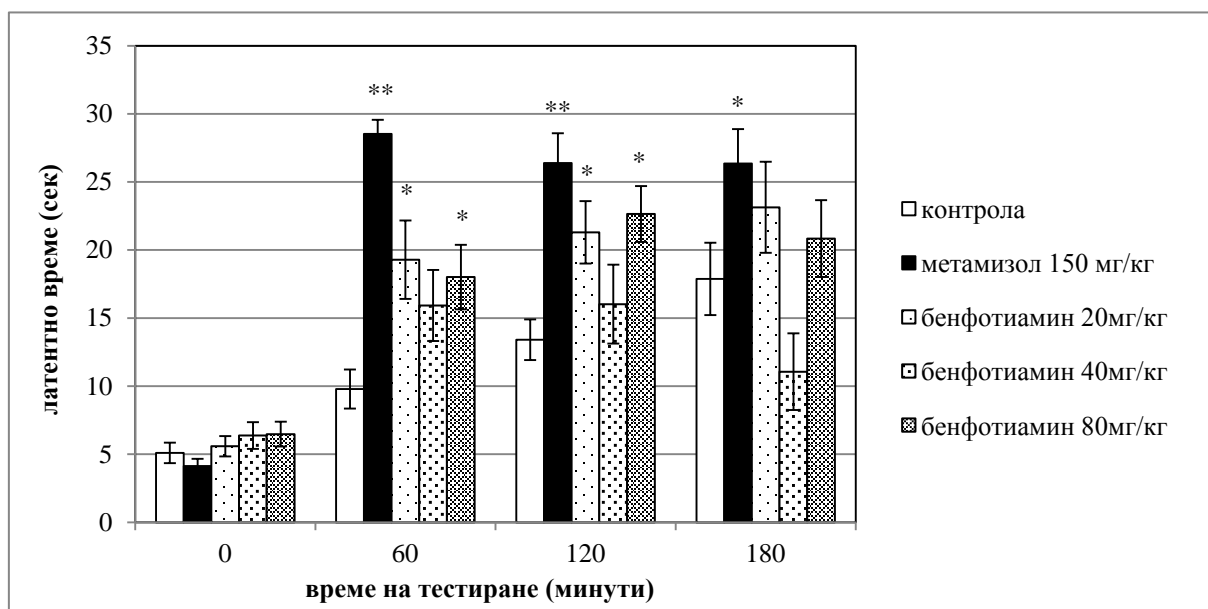
РЕЗУЛТАТИ

1. Влияние на дозата върху аналгетичния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при теста „гореща плоча“ (hot-plate test) при еднократно третиране.

При теста „гореща плоча“ средното латентно време при контролната група е 5 сек на нулевата минута и 10 сек, 13 сек и 18 сек съответно на 60-та, 120-та и 180-та минута. Метамизолът, използван като еталонен аналгетик повиши статистически значимо времето за престой върху горещата плоча при съпоставяне с контролата на 60-та ($p < 0,01$), 120-та ($p < 0,01$) и 180-та минута ($p < 0,05$).

1.1. Ефект на бенфотиамин при тест с топлинен болков стимул

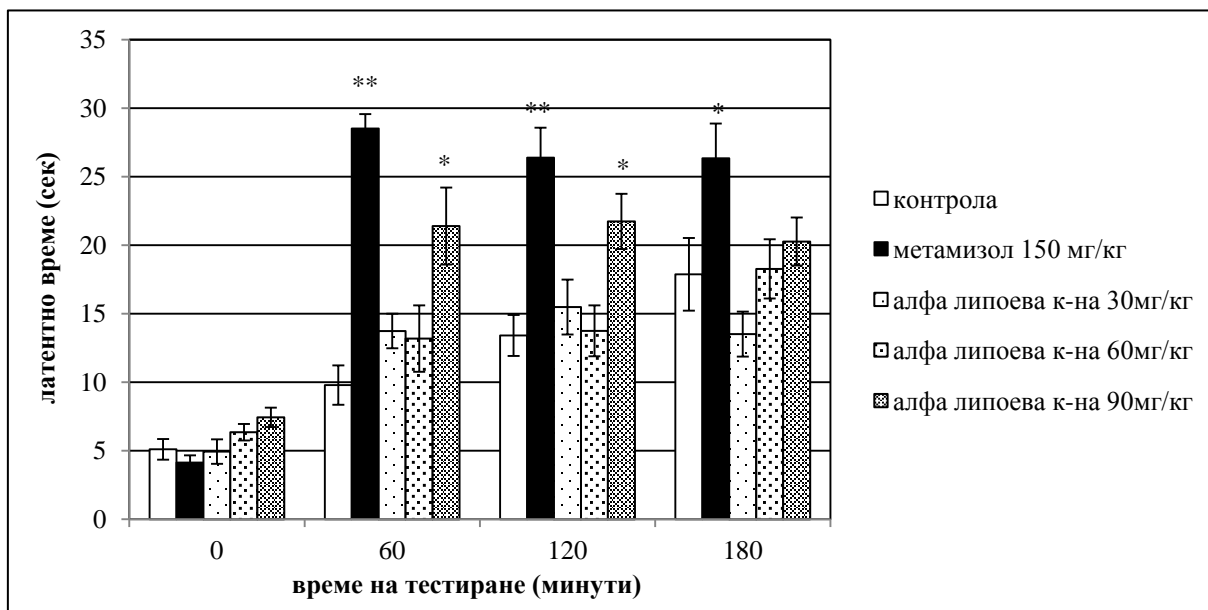
Животните, третирани с бенфотиамин в доза 20 мг/кг достоверно повишиха латентното време на 60-та и 120-та минута – съответно 19 сек и 21 сек при сравнение с контролата на съответната минута ($p < 0,05$). Групата, третирана с бенфотиамин в доза 40 мг/кг не показва статистически значима разлика в този показател в сравнение с контролната група. На 60-та и 120-та минута, животните третирани с бенфотиамин в доза 80 мг/кг повишиха статистически достоверно латентното време при сравнение с контролата ($p < 0,05$) (фиг. 5).



Фигура 5. Ефект на бенфотиамин в дози 20, 40 и 80 мг/кг при тест „гореща плоча“ и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение с контролата на същата минута; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

1.2. Ефект на алфа-липоева киселина при тест с топлинен болков стимул

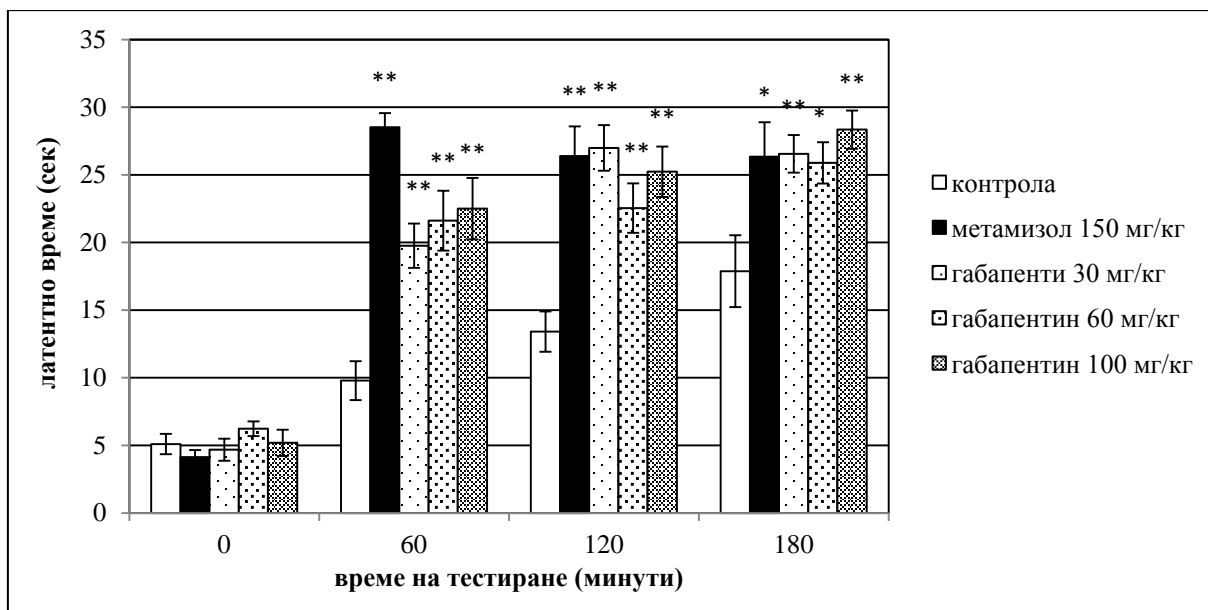
Групите третираны с алфа-липоева киселина в дози 30 и 60 мг/кг не промениха статистически значимо проследявания показател при сравнение с контролата. Животните, третираны с алфа-липоева киселина в доза 90 мг/кг повишиха стойността на латентното време на 60-та и 120-та минута при съпоставяне с контролата ($p < 0,05$) (фиг. 6).



Фигура 6. Ефект на алфа-липоева киселина в дози 30, 60 и 90 мг/кг при тест „гореща плоча“ и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение с контролата на същата минута; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

1.3. Ефект на габапентин при тест с топлинен болков стимул

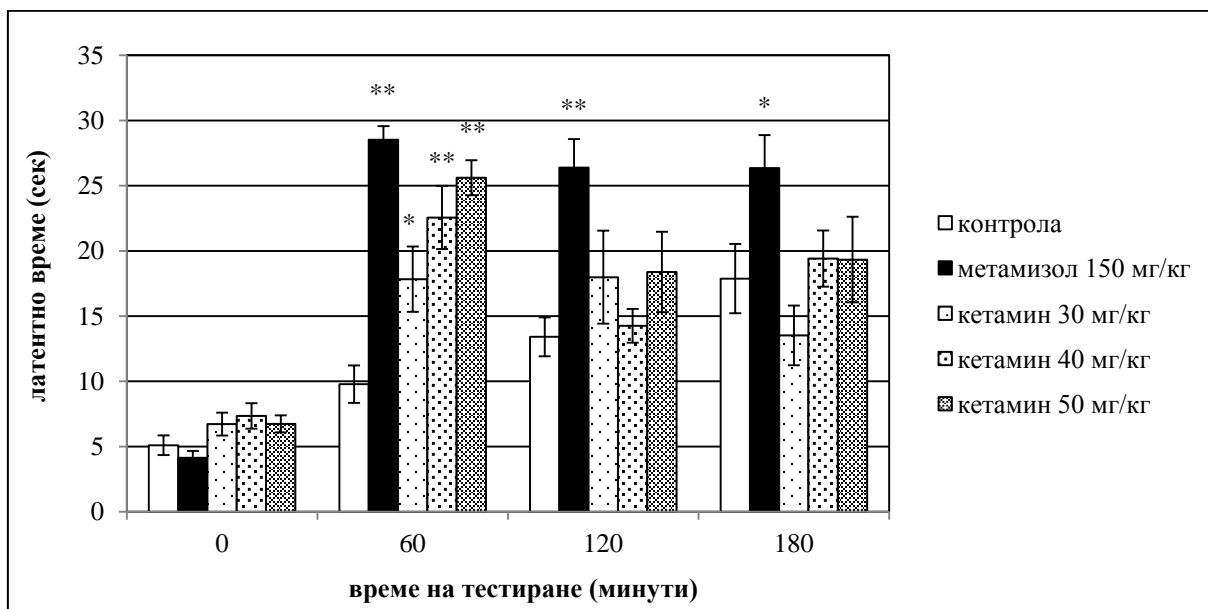
При теста „гореща плоча“ групите, третираны с трите изпитвани дози габапентин показаха статистическо значимо увеличение на латентното време на 60-та ($p < 0,01$), 120-та ($p < 0,01$) и 180-та минута ($p < 0,05$ и $p < 0,01$) при сравнение със съответната контролна група (фиг. 7).



Фигура 7. Ефект на габапентин в дози 30, 60 и 100 мг/кг при тест „гореща плоча“ и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение с контролата на същата минута; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

1.4. Ефект на кетамин при тест с топлинен болков стимул

При тестванията в апарата „гореща плоча“, групите, третирани с трите дози кетамин повишиха статистически значимо латенцията само на 60-тата минута ($p < 0,05$ и $p < 0,01$) в сравнение със съответната контролна група (фиг. 8).



Фигура 8. Ефект на кетамин в дози 30, 40 и 50 мг/кг при тест „гореща плоча“ и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение с контролата на същата минута; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

2. Влияние на дозата върху аналгетичния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при при тест с механичен болков стимул (аналгезиметър тест) при еднократно третиране.

При теста с механичен натиск върху лапата контролната група показва средна стойност на натиска, необходим за отдръпване на лапата, изразен в грам/сантиметър между 12 и 14. Групата третирана с метамизол значимо увеличи силата на натиска при съпоставяне със съответната контрола на 60-та ($p < 0,05$), 120-та ($p < 0,01$) и 180-та минута ($p < 0,01$).

2.1. Влияние на дозата върху аналгетичния ефект на бенфотиамин при аналгезиметър тест.

При теста с механичен натиск на лапата, групите, третирани с трите дози бенфотиамин не показаха статистически значимо увеличение на силата на натиска спрямо контролната група (табл. 3).

Таблица 3. Сила на натиска върху лапата на плъх (гр/см) при еднократно третиране с бенфотиамин в дози 20, 40 и 80 мг/кг. Представени са средните стойности за групата \pm SEM. * $p < 0,05$ при сравнение с контролата на същата минута; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

Група/Минути	0	60	120	180
контрола	12,78 \pm 0,66	10,5 \pm 1,46	10,4 \pm 0,9	13,5 \pm 0,93
метамизол 150 мг/кг	12,875 \pm 0,57	17,125 \pm 2,61*	20,625 \pm 1,89**	23 \pm 1,86**
бенфотиамин 20 мг/кг	14,31 \pm 0,81	13,75 \pm 1,69	13,19 \pm 1,68	16,56 \pm 1,32
бенфотиамин 40 мг/кг	13,19 \pm 0,82	11,88 \pm 1,92	11,94 \pm 1,48	16,25 \pm 1,22
бенфотиамин 80 мг/кг	13,19 \pm 0,91	12,88 \pm 2,91	11,19 \pm 2,39	16,81 \pm 1,74

2.2. Влияние на дозата върху аналгетичния ефект на алфа-липоева киселина при аналгезиметър тест.

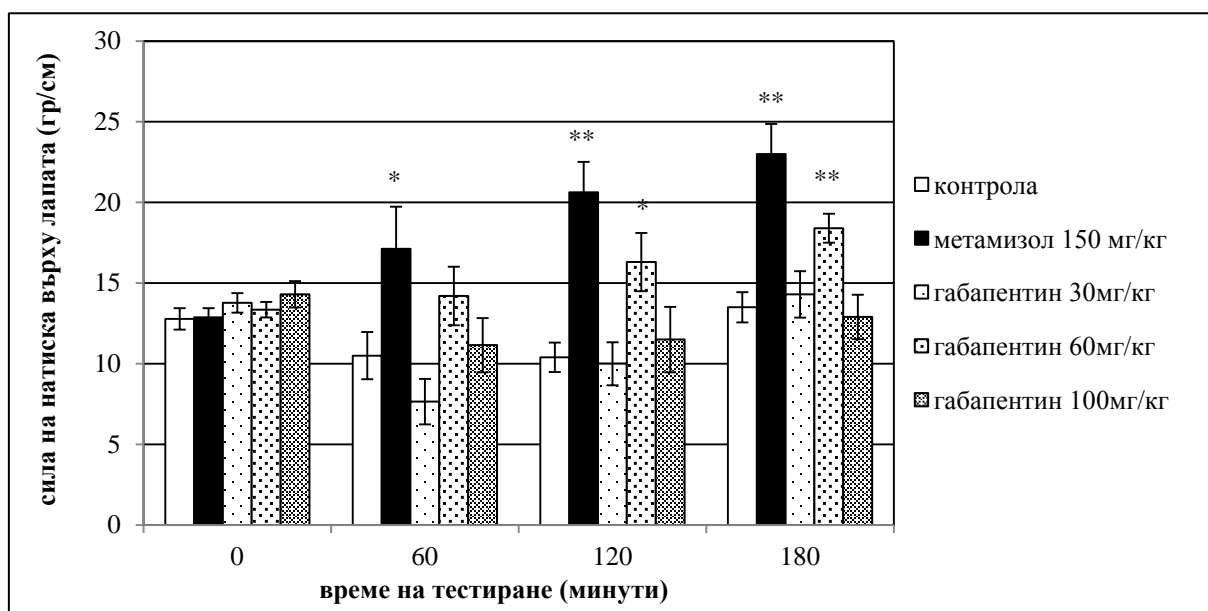
При аналгезиметър теста не се установи статистически значимо увеличение на латентното време между групите, третирани с алфа-липоева киселина в трите изследвани дози и контролната група и при четирите интервала на измерване (табл.4).

Таблица 4. Сила на натиска върху лапата на плъх (гр/см) при еднократно третиране с алфа-липоева киселина в дози 30, 60 и 90 мг/кг. Представени са средните стойности за групата \pm SEM. * $p < 0,05$ при сравнение с контролата на същата минута; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

Групи/минути	0	60	120	180
контрола	12,78 \pm 0,66	10,5 \pm 1,46	10,4 \pm 0,9	13,5 \pm 0,93
метамизол 150 мг/кг	12,875 \pm 0,57	17,125 \pm 2,61*	20,625 \pm 1,89**	23 \pm 1,86**
алфа-липоева к-на 30/мг/кг	14,12 \pm 0,58	11,13 \pm 1,53	5,31 \pm 1,51	7,44 \pm 1,44
алфа-липоева к-на 60/мг/кг	13,63 \pm 0,89	9,63 \pm 0,96	7,44 \pm 1,31	11 \pm 2,37
алфа-липоева к-на 90/мг/кг	14 \pm 0,82	10,88 \pm 1,17	7,38 \pm 1,19	6,06 \pm 1,39

2.3. Влияние на дозата върху аналгетичния ефект на габапентин при аналгезиметър тест

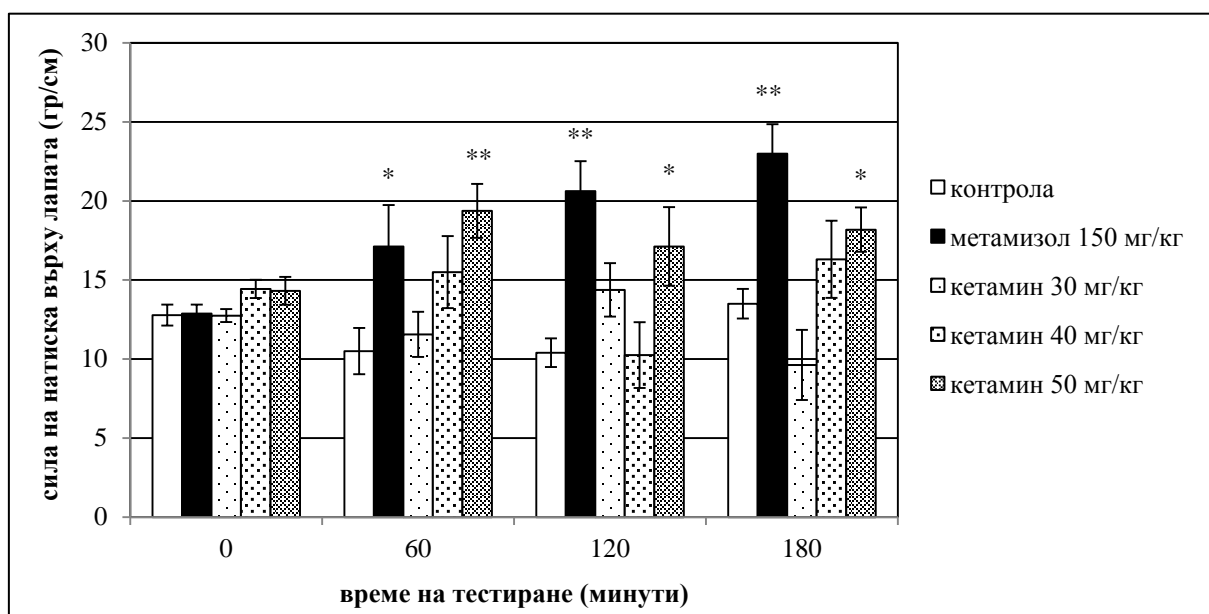
Животните, третирани с габапентин в дози 30 мг/кг и 100 мг/кг не показаха статистически значимо увеличение на силата на натиска, необходим за отдръпването на тестираната лапа при сравнение с контролната група и при четирите тествания. Групата, получила габапентин в доза 60 мг/кг повиши значимо стойността на изследвания показател на 120-та ($p < 0,05$) и 180-та минута ($p < 0,01$) в сравнение с контролата (фиг. 9).



Фигура 9. Ефект на габапентин в дози 30, 60 и 100 мг/кг при аналгезиметър тест и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение с контролата на съответната минута; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

2.4. Влияние на дозата върху аналгетичния ефект на кетамин при аналгезиметър тест

При теста с механичен стимул, групите, получили кетамин в дози 30 мг/кг и 40 мг/кг не показаха достоверно увеличение на проследявания показател при сравнение с контролата и при четирите тествания. Групата, третирана с кетамин в доза 50 мг/кг показва сигнификантно увеличение на проследявания показател на 60-та ($p < 0,01$), 120-та и 180-та минута в сравнение с контролната група ($p < 0,05$) (фиг. 10).



Фигура 10. Ефект на кетамин в дози 30, 40 и 50 мг/кг при аналгезиметър тест и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение с контролата на съответната минута; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

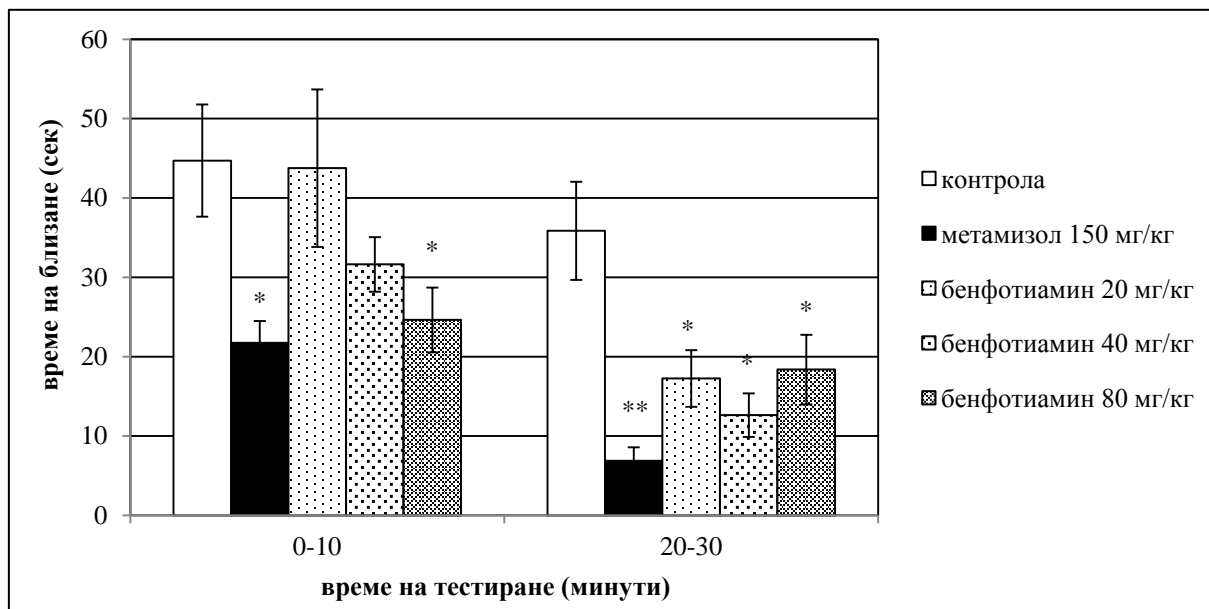
3. Влияние на дозата върху аналгетичния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при тест с химичен болков стимул при еднократно третиране.

При теста с формалин средното време за близане на лапата при контролната група е 44 секунди през първите 10 минути (ранна фаза) и 36 секунди през вторите 10 минути (късна фаза). Метамизолът, като еталонен аналгетик намали статистически достоверно броя на близанията и в ранната ($p < 0,05$), и в късната фаза ($p < 0,01$) при сравнение с контролата.

3.1. Ефект на бенфотиамин при формалинов тест

Групите, третиращи с бенфотиамин в дози 20 и 40 мг/кг намалиха статистически достоверно времето за близане на лапата само през късната фаза в сравнение с

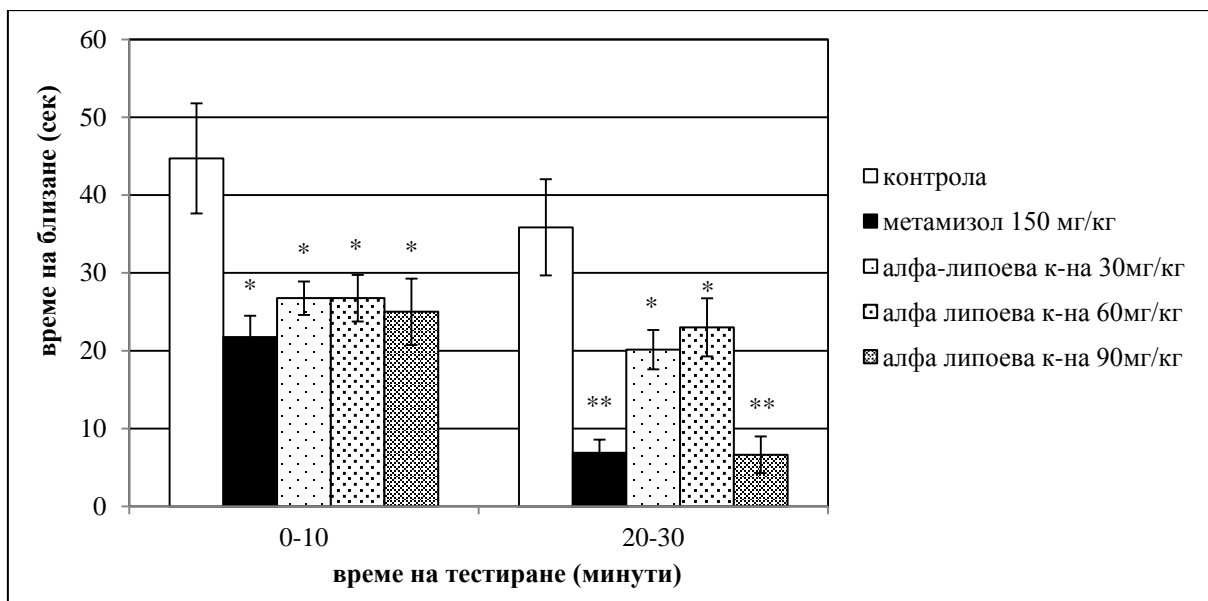
контролата ($p < 0,05$). При групата, третирана с бенфотиамин в доза 80 мг/кг понижението на проследявания показател е статистически значимо както в ранната, така и в късната фаза при сравнение с контролата ($p < 0,05$) (фиг. 11).



Фигура 11. Ефект на бенфотиамин в дози 20, 40 и 80 мг/кг при формалинов тест и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

3.2. Ефект на алфа-липоева киселина при формалинов тест

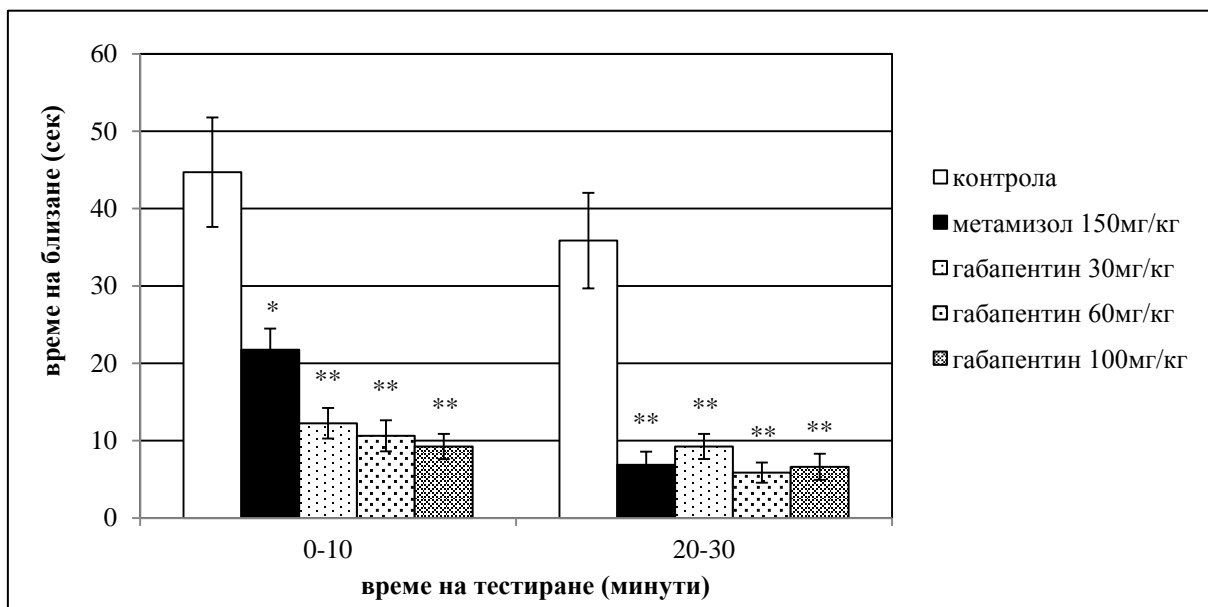
При формалиновия тест групите, третиращи с алфа-липоева киселина в трите изследвани дози намалиха статистически достоверно времето на близане на лапата в ранната ($p < 0,05$) и в късната фаза ($p < 0,05$ и $p < 0,01$) на теста при сравнение с контролната група (фиг. 12).



Фигура 12. Ефект на алфа-липоева киселина в дози 30, 60 и 90 мг/кг при формалинов тест и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

3.3. Ефект на габапентин при формалинов тест

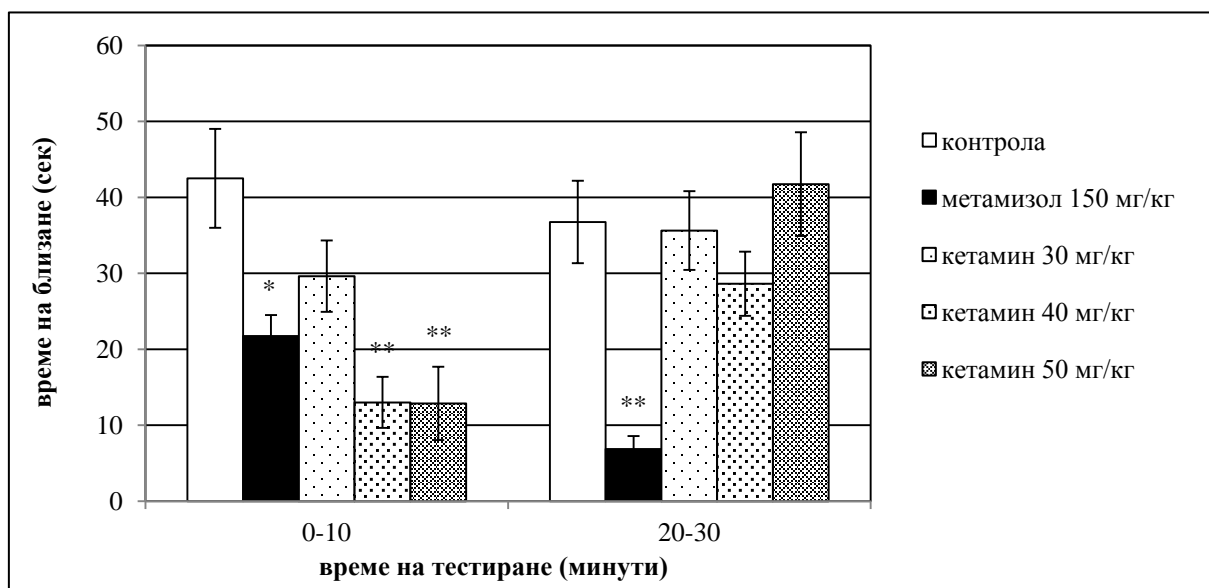
При теста с химичен болков стимул, групите, третирани с трите дози габапентин намалиха достоверно времето за близане на лапата и в двете фази при сравнение с контролата ($p < 0,01$) (фиг. 13).



Фигура 13. Ефект на габапентин в дози 30, 60 и 100 мг/кг при формалинов тест и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола. ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

3.4. Ефект на кетамин при формалинов тест

При формалиновия тест животните, получили кетамин в доза 30 мг/кг не показаха статистически значимо намаление на времето за близане на лапата и в двете фази на теста при сравнение с контролата. При групите, третирани с кетамин в дози 40 мг/кг и 50 мг/кг понижението на проследявания показател е статистически достоверно само в ранната фаза ($p < 0,01$) (фиг. 14).



Фигура 14. Ефект на кетамин в дози 30, 40 и 50 мг/кг при формалинов тест и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

4. Влияние на дозата върху противовъзпалителния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при карагенинов модел на възпаление при еднократно третиране

Контролната група показва среден обем на възпалената лапа на 120-та минута – 34, на 180-та минута – 51 и на 240-та минута – 59. Диклофенакът като еталон за противовъзпалително действие показва статистически значимо намаление на отока на лапата, предизвикан с карагенин и при трите тествания в сравнение с контролата ($p < 0,05$; $p < 0,01$).

4.1. Ефект на бенфотиамин при модел на възпаление, предизвикан с карагенин.

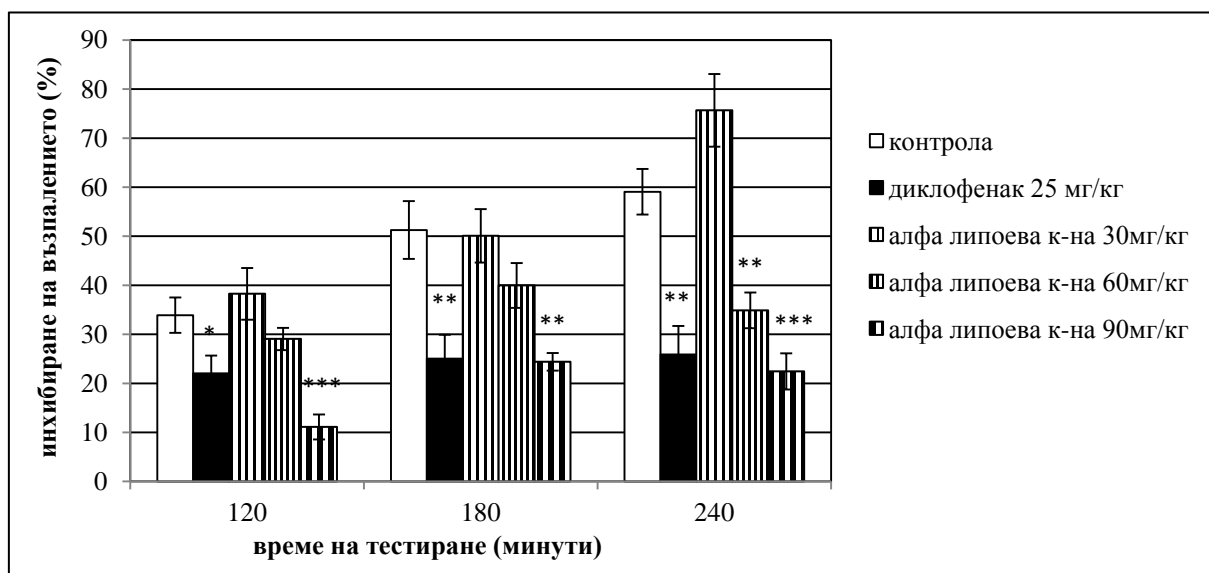
Групите, третирани с трите дози бенфотиамин не показаха статистически достоверно намаление на обема на отока на лапата при трите тествания спрямо групата, третирана с физиологичен разтвор (табл. 5).

Таблица 5. Инхибиране на възпалението (%) при еднократно третиране с бенфотиамин в дози 20, 40 и 80 мг/кг при карагенинов модел на възпаление. Представени са средните стойности за групата \pm SEM. * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

Група/минути	120	180	240
контрола	33,90 \pm 3,60	51,26 \pm 5,89	59,07 \pm 4,64
диклофенак 25 мг/кг	22,60 \pm 3,84*	25,04 \pm 4,87**	25,90 \pm 5,81**
бенфотиамин 20 мг/кг	101,76 \pm 7,79	132,58 \pm 6,58	143,20 \pm 7,93
бенфотиамин 40 мг/кг	61,09 \pm 7,09	83,10 \pm 6,06	89,58 \pm 8,87
бенфотиамин 80 мг/кг	71,85 \pm 4,53	94,33 \pm 14,88	94,61 \pm 9,21

4.2. Ефект на алфа-липоева киселина върху модел на възпаление, предизвикан с карагенин

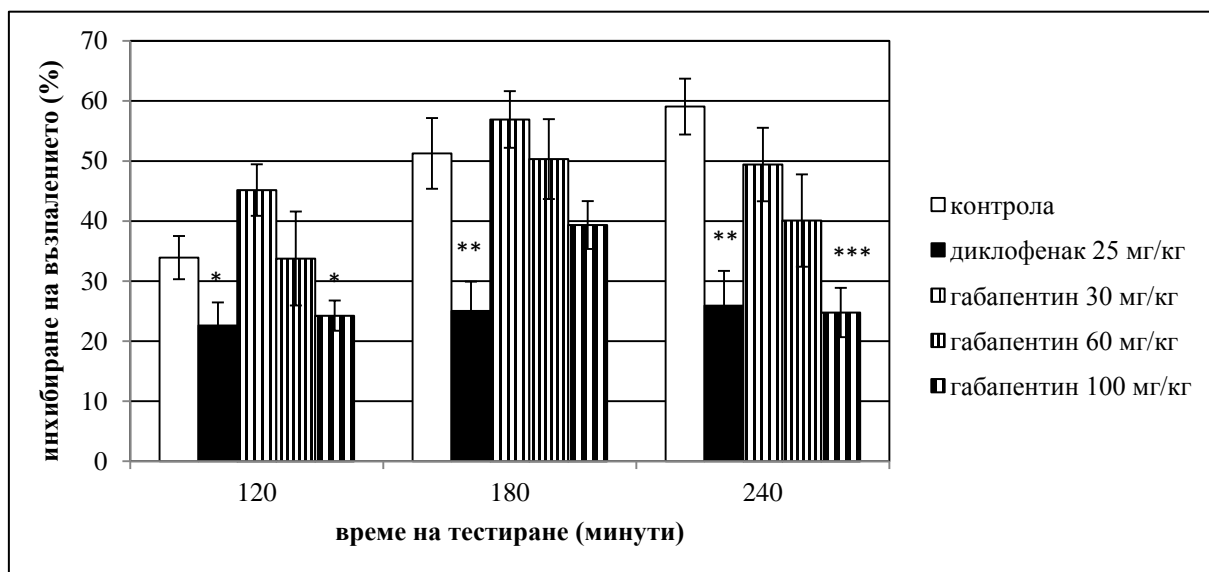
Плъховете получили алфа-липоева киселина в най-ниска доза (30 мг/кг) не показаха статистически значимо намаление на отока на лапата при карагениновия модел на възпаление в сравнение с контролната група. Групата, третирана с алфа-липоева киселина в доза 60 мг/кг намали достоверно ($p < 0,01$) отока на лапата на 240-тата минута в сравнение с контролата. Групата, третирана с най-високата доза алфа-липоева киселина (90 мг/кг) статистически значимо намали карагениновия оток и при трите тествания при съпоставяне с контролата ($p < 0,001$ и $p < 0,01$) (фиг. 15).



Фигура 15. Ефект на алфа-липоева киселина в дози 30, 60 и 90 мг/кг при карагенинов модел на възпаление и еднократно третиране; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ при сравнение със съответната контрола.

4.3. Ефект на габапентин върху модел на възпаление, предизвикан с карагенин

Групите, третирани с габапентин в дози 30 мг/кг и 60 мг/кг не показаха достоверно намаление на отока на лапата в сравнение с контролата и при трите интервала на измерване. Животните, получили най-високата доза (100 мг/кг) габапентин намалиха статистически значимо отока на лапата в сравнение с контролата на 120-та и 240-та минута ($p < 0,05$; $p < 0,001$) (фиг. 16).



Фигура 16. Ефект на габапентин в дози 30, 60 и 100 мг/кг при еднократно третиране при карагенинов модел на възпаление; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ при сравнение със съответната контрола.

4.4. Ефект на кетамин върху модел на възпаление, предизвикан с карагенин

При карагениновия модел на възпаление групите, третирани с кетамин в дози 30, 40 и 50 мг/кг не показаха достоверно намаление на отока на лапата и при трите тествания в сравнение с контролата (табл. 6).

Таблица 6. Инхибиране на възпалението (%) при еднократно третиране с кетамин в дози 30, 40 и 50 мг/кг при карагенинов модел на възпаление. Представени са средните стойности за групата \pm SEM. * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

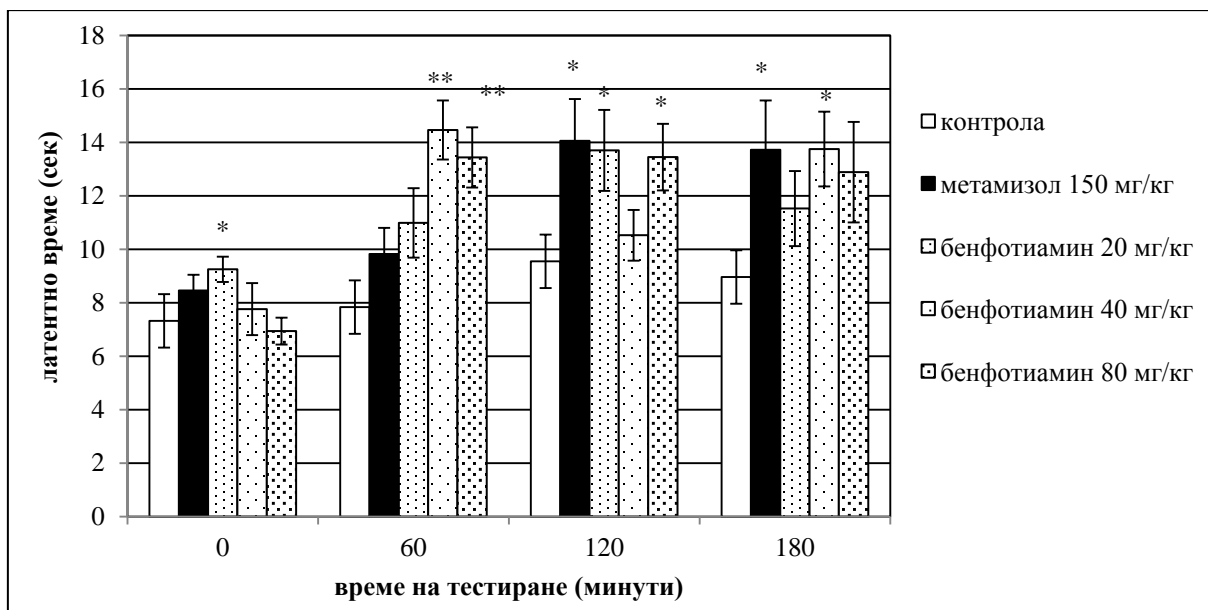
Група/минути	120	180	240
контрола	33,90 \pm 3,59	51,26 \pm 5,89	59,07 \pm 4,64
диклофенак 25 мг/кг	22,60 \pm 3,84*	25,04 \pm 4,87**	25,90 \pm 5,81**
кетамин 30 мг/кг	54,51 \pm 5,13	55,07 \pm 4,65	71,65 \pm 4,46
кетамин 40 мг/кг	47,71 \pm 4,02	50,35 \pm 4,76	56,81 \pm 5,63
кетамин 50 мг/кг	35,71 \pm 4,81	43,06 \pm 4,52	58,69 \pm 5,21

5. Влияние на дозата върху аналгетичния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при теста „гореща плоча“ (hot-plate test) при многократно 14-дневно третиране.

При многократно третиране в апарата „гореща плоча“ контролната група показва средно латентно време на 0-вата минута – 7 сек, на 60-та – 8 сек, на 120-та – 10 сек и на 180-та минута – 9 секунди. Групата, третирана с метамизол в доза 150 мг/кг повиши стойността на латенцията в сравнение с контролата, като достоверна разлика се установи само на 120-та и 180-та минута ($p < 0,05$).

5.1. Ефект на бенфотиамин при тест с топлинен болков стимул

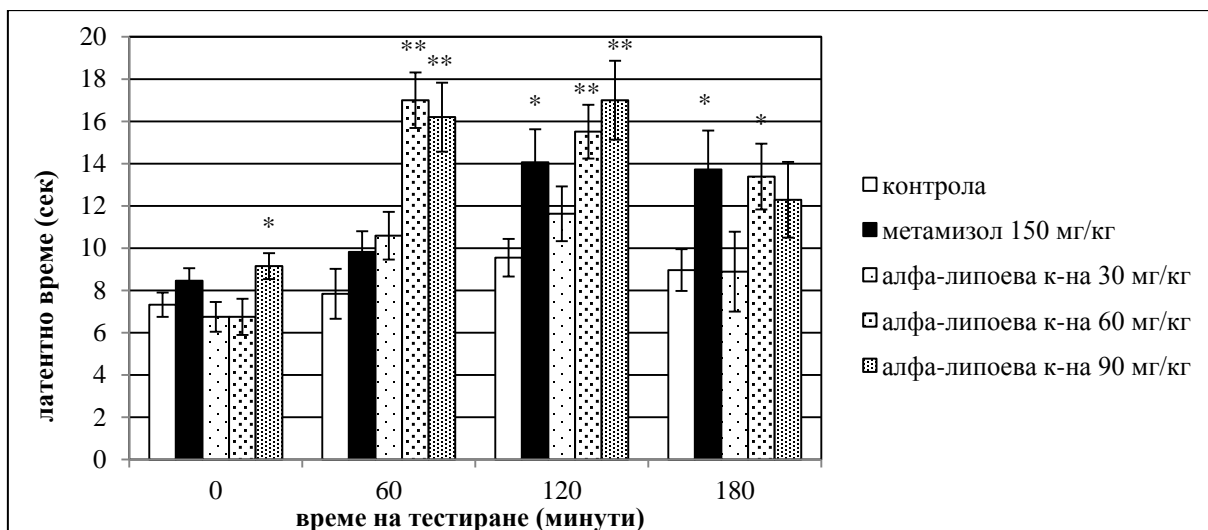
При четиринадесетдневното третиране групата, получила бенфотиамин в доза 20 мг/кг статистически значимо повиши латенцията на 0-вата и 120-тата минута ($p < 0,05$) в сравнение с контролната група. Групата, третирана с бенфотиамин в доза 40 мг/кг достоверно повиши проследявания показател на 60-та ($p < 0,01$) и 180-та минута ($p < 0,05$) в сравнение с контролата. При групата, третирана с 80 мг/кг бенфотиамин повишението на проследявания показател е статистически достоверно само на 60-та ($p < 0,01$) и 120-та ($p < 0,05$) минута в сравнение с контролата (фиг. 17).



Фигура 17. Ефект на бенфотиамин в дози 20, 40 и 80 мг/кг при тест „гореща плоча“ и многократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение с контролата на същата минута; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

5.2. Ефект на алфа-липовеа киселина при тест с топлинен болков стимул

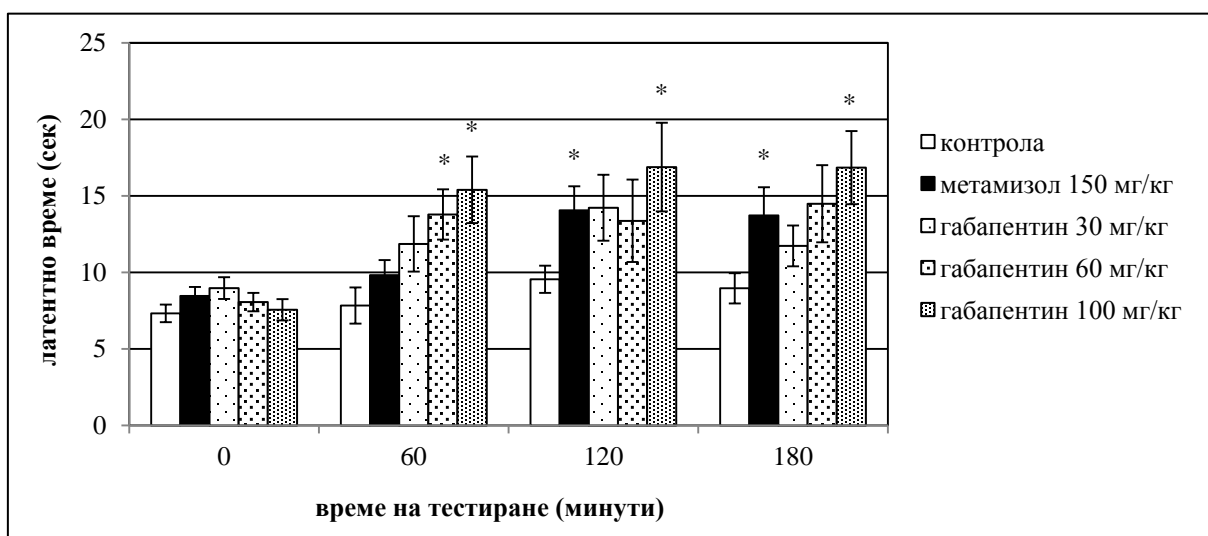
При теста „гореща плоча“ в условия на многократно третиране групата, получила алфа-липовеа киселина в доза 30 мг/кг не показва достоверно увеличение на латентното време и при четирите измервани интервала от време в сравнение с контролата. При групата, третирана с алфа-липовеа киселина в доза 60 мг/кг наблюдавахме статистически значимо увеличение на проследявания показател на 60-та ($p < 0,01$), 120-та ($p < 0,01$) и 180-та ($p < 0,05$) минута при сравнение с контролата. Третираните с 90 мг/кг алфа липовеа киселина животни повишиха стойността на проследявания показател на 0-ва ($p < 0,05$), 60-та ($p < 0,01$) и 120-та ($p < 0,01$) минута в сравнение с контролата (фиг. 18).



Фигура 18. Ефект на алфа-липоева киселина в дози 30, 60 и 90 мг/кг при тест „гореща плоча“ и многократно третиране; * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

5.3. Ефект на габапентин при тест с топлинен болков стимул

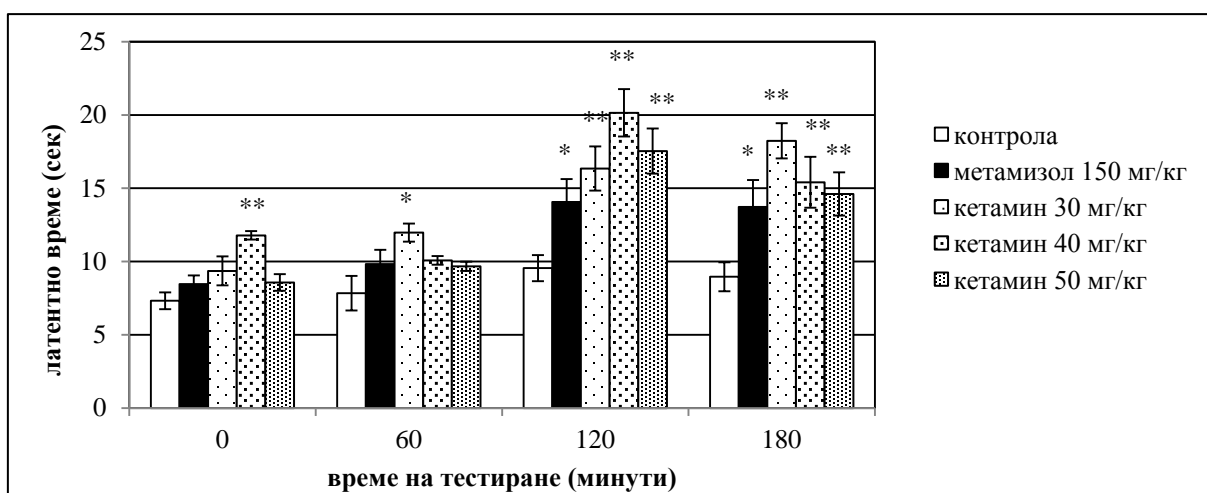
Животните, третирани многократно с габапентин в доза 30 мг/кг не показаха достоверно повишение на латентното време и при четирите тествания в сравнение с контролната група. Групата, третирана с габапентин в доза 60 мг/кг повиши достоверно латенцията само на 60-тата минута ($p < 0,05$) в сравнение с контролата. При групата, третирана с най-високата доза габапентин (100 мг/кг) повишението на проследявания показател е статистически достоверно на 60-та, 120-та и 180-та минута ($p < 0,05$) в сравнение с контролата (фиг. 19).



Фигура 19. Ефект на габапентин в дози 30, 60 и 100 мг/кг при тест „гореща плоча“ и многократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение с контролата на същата минута.

5.4. Ефект на кетамин при тест с топлинен болков стимул

При теста „гореща плоча“ животните, многократно третиран с кетамин в доза 30 мг/кг повишиха достоверно латентното време на 60-та ($p < 0,05$), 120-та ($p < 0,01$) и 180-та минута ($p < 0,01$) в сравнение с контролата. Групата, третирана с кетамин в доза 40 мг/кг повиши статистически значимо латентното време на 0-ва, 120-та и 180-та минута ($p < 0,01$) в сравнение с контролата. При групата, третирана многократно с кетамин в доза 50 мг/кг достоверно увеличение на проследявания показател се установи на 120-та и 180-та минута ($p < 0,01$) в сравнение с контролната група (фиг. 20).



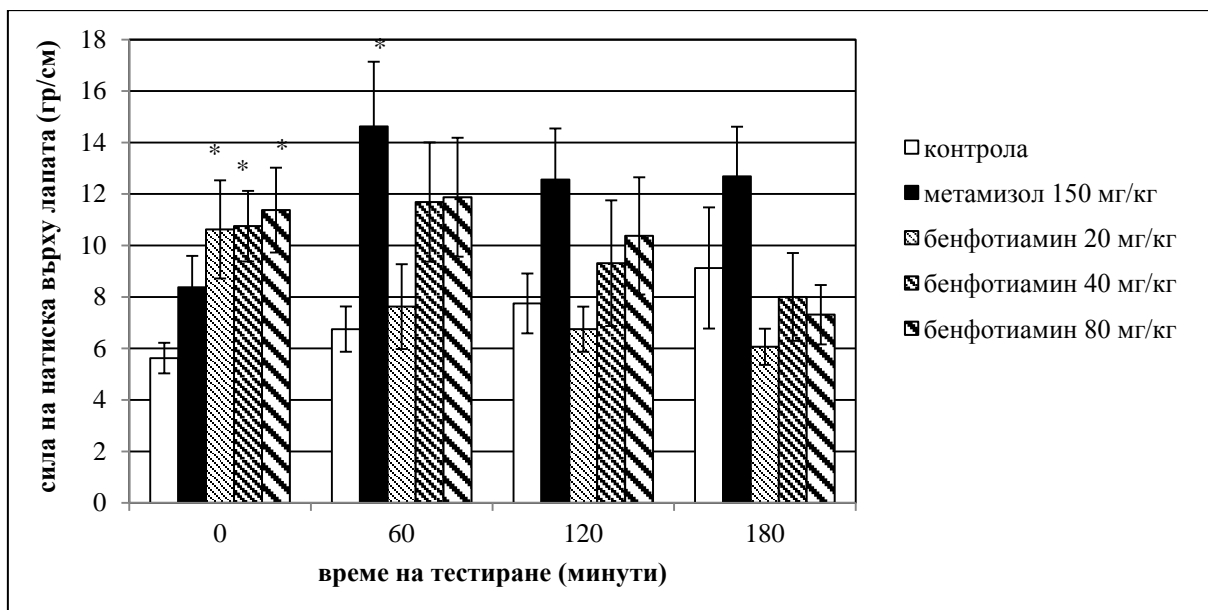
Фигура 20. Ефект на кетамин в дози 30, 40 и 50 мг/кг при тест „гореща плоча“ и многократно третиране; * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

6. Влияние на дозата върху аналгетичния ефект на бенфотиамин, алфа-липовеа киселина, габапентин и кетамин при тест с механичен болков стимул (аналгезиметър тест) при многократно 14-дневно третиране.

При теста с механичен натиск върху лапата в условията на многократно третиране контролната група показва средна стойност на натиска, изразен в грам/сантиметър между 5 и 9 гр/см. Групата, третирана с метамизол показва увеличение на показателя, като сигнификантна разлика се установи само на 60-тата минута ($p < 0,05$) в сравнение с контролата.

6.1. Ефект на бенфотиамин при аналгезиметър тест.

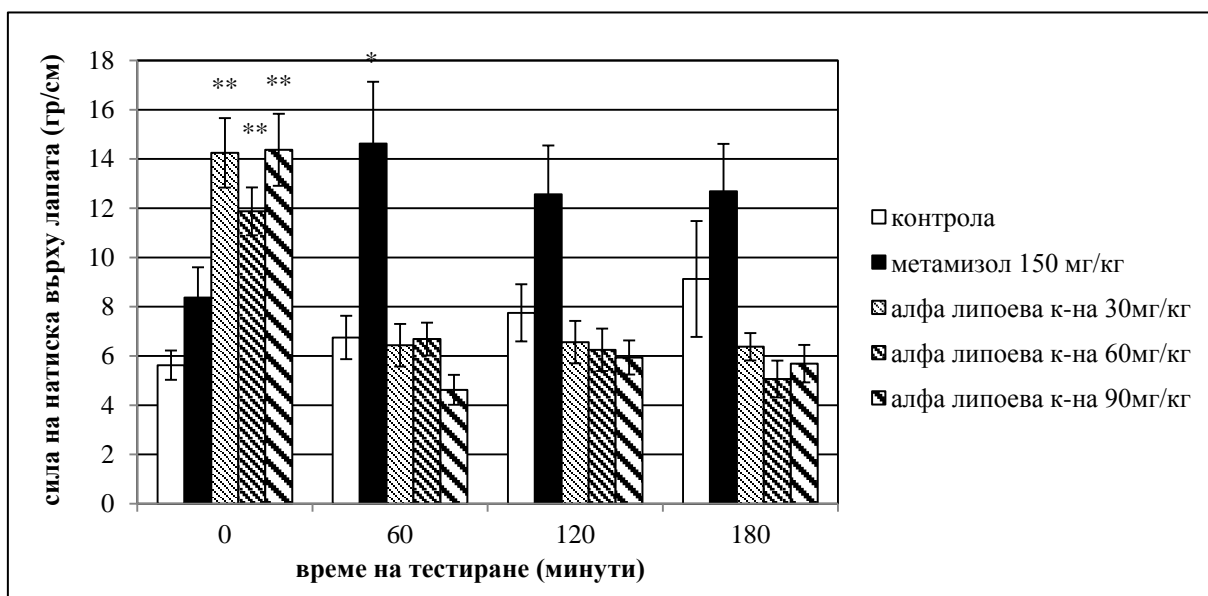
Групите, третираны многократно с бенфотиамин в трите изследвани дози показаха статистически значимо увеличение на латентното време само на 0-ва минута ($p < 0,05$) в сравнение с контролата (фиг. 21).



Фигура 21. Ефект на бенфотиамин в дози 20, 40 и 80 мг/кг при аналгезиметър тест и многократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола.

6.2. Ефект на алфа-липоева киселина при аналгезиметър тест

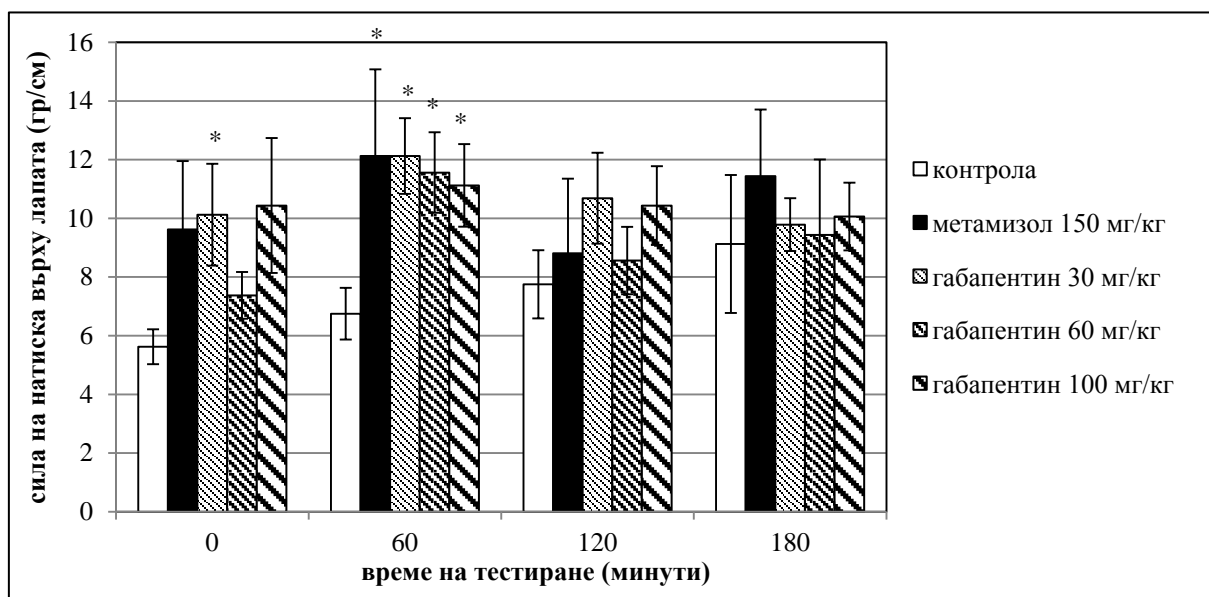
При четиринадесетдневното третиране с алфа-липоева киселина, трите експериментални групи показаха увеличение на натиска, необходим за отдръпване на лапата само на 0-ва минута ($p < 0,001$) в сравнение с контролата (фиг. 22).



Фигура 22. Ефект на алфа-липоева киселина в дози 30, 60 и 90 мг/кг при аналгезиметър тест и многократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола и ** $p < 0,001$ при сравнение със съответната контрола.

6.3. Ефект на габапентин при аналгезиметър тест

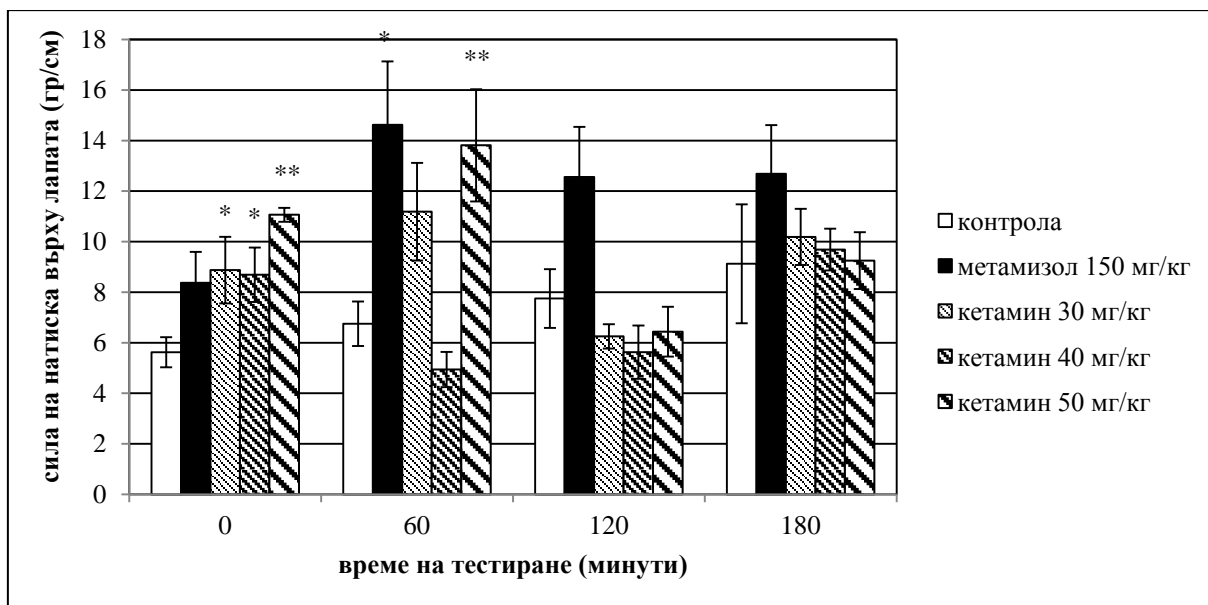
Групата, третирана многократно с габапентин в доза 30 мг/кг увеличи сигнификантно латенцията на 0-ва и 60-та минута ($p < 0,05$) в сравнение с контролата. Животните, третирани с другите две дози (60 и 100 мг/кг) габапентин повишиха достоверно проследявания показател само на 60-та минута ($p < 0,05$) в сравнение с контролата (фиг. 23).



Фигура 23. Ефект на габапентин в дози 30, 60 и 100 мг/кг при аналгезиметър тест и многократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола.

6.4. Ефект на кетамин при аналгезиметър тест

При теста с механичен натиск върху лапата, групите третирани многократно с двете по-ниски изследвани дози кетамин (30 и 40 мг/кг) повишиха достоверно силата на натиска само на 0-ва минута ($p < 0,05$) в сравнение с контролата. Групата, получила кетамин в доза 50 мг/кг статистически значимо увеличи показателя на 0-ва и 60-та минута ($p < 0,01$) в сравнение с контролата (фиг. 24).



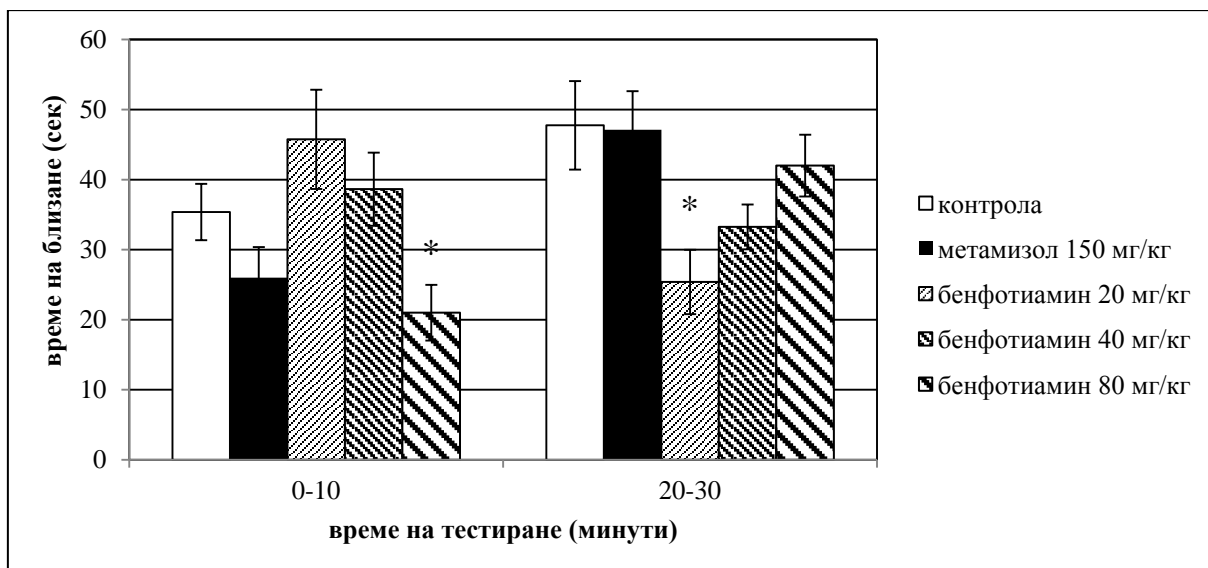
Фигура 24. Ефект на кетамин в дози 30, 40 и 50 мг/кг при аналгезиметър тест и многократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола и ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

7. Влияние на дозата върху аналгетичния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при тест с химичен болков стимул при многократно 14-дневно третиране.

При формалиновия тест в условията на многократно третиране средното време на близане на лапата при контролната група е 35 секунди през ранната фаза и 48 секунди през късната фаза. Групата, третирана с метамизол не намали достоверно проследявания показател и през двете фази на теста в сравнение с контролната група.

7.1. Ефект на бенфотиамин при формалинов тест

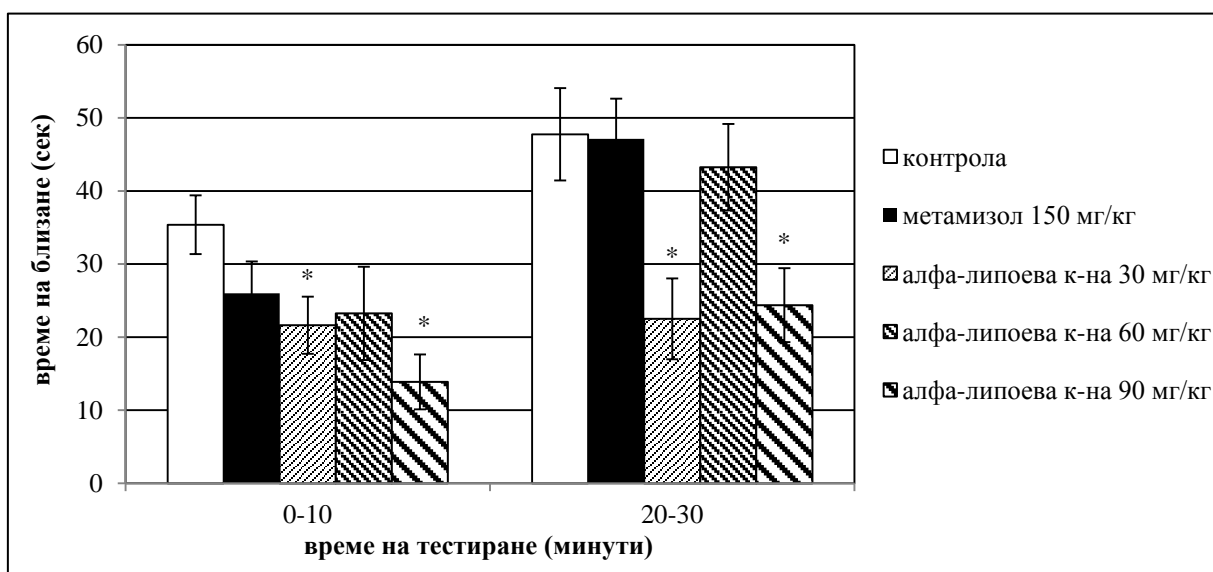
Групата, третирана с бенфотиамин в доза 20 мг/кг намали достоверно времето за близане на лапата само през късната фаза на теста ($p < 0,05$) в сравнение с контролата. Статистически незначим ефект се наблюдава при групата, третирана с бенфотиамин в доза 40 мг/кг в сравнение с контролата. Животните, получили бенфотиамин в доза 80 мг/кг понижиха достоверно проследявания показател само в ранната фаза ($p < 0,05$) при сравнение с контролата (фиг. 25).



Фигура 25. Ефект на бенфотиамин в дози 20, 40 и 80 мг/кг при формалинов тест и многократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола.

7.2. Ефект на алфа-липоева киселина при формалинов тест

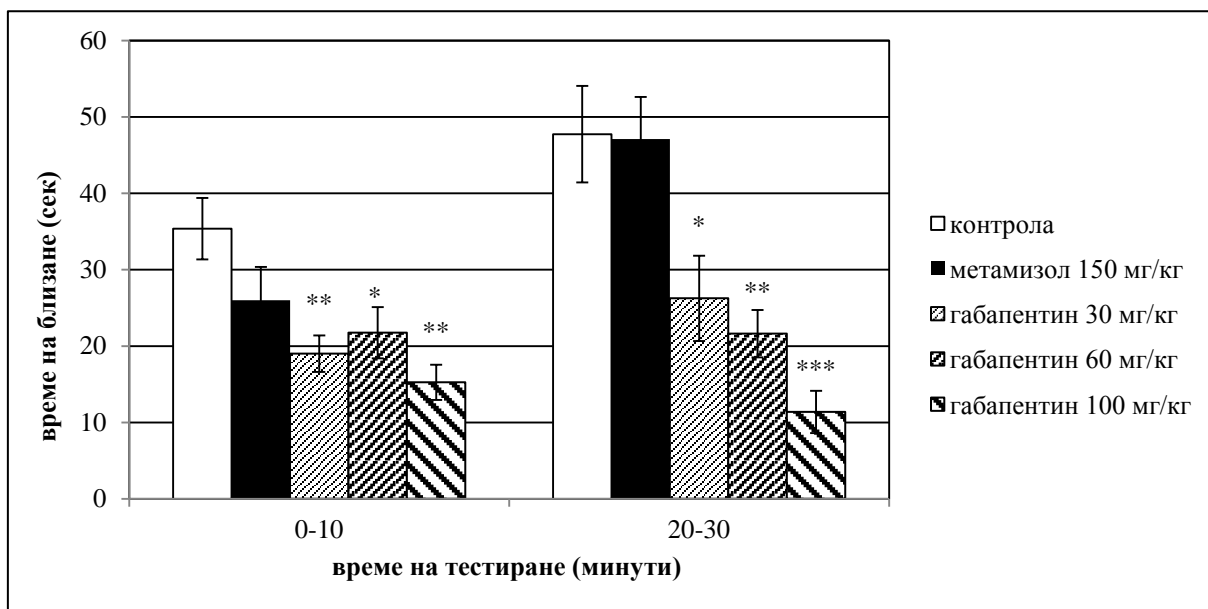
При теста с химичен болков стимул групите, третирани с алфа-липоева киселина в дози 30 и 90 мг/кг намалиха статистически значимо времето за близане на лапата и в двете фази на теста ($p < 0,05$) в сравнение с контролата. Групата, третирана със средната доза алфа-липоева киселина (60 мг/кг) не показва статистически достоверно намаление на проследявания показател и през двете фази на теста в сравнение с контролата (фиг. 26).



Фигура 26. Ефект на алфа-липоева киселина в дози 30, 60 и 90 мг/кг при формалинов тест и многократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола.

7.3. Ефект на габапентин при формалинов тест

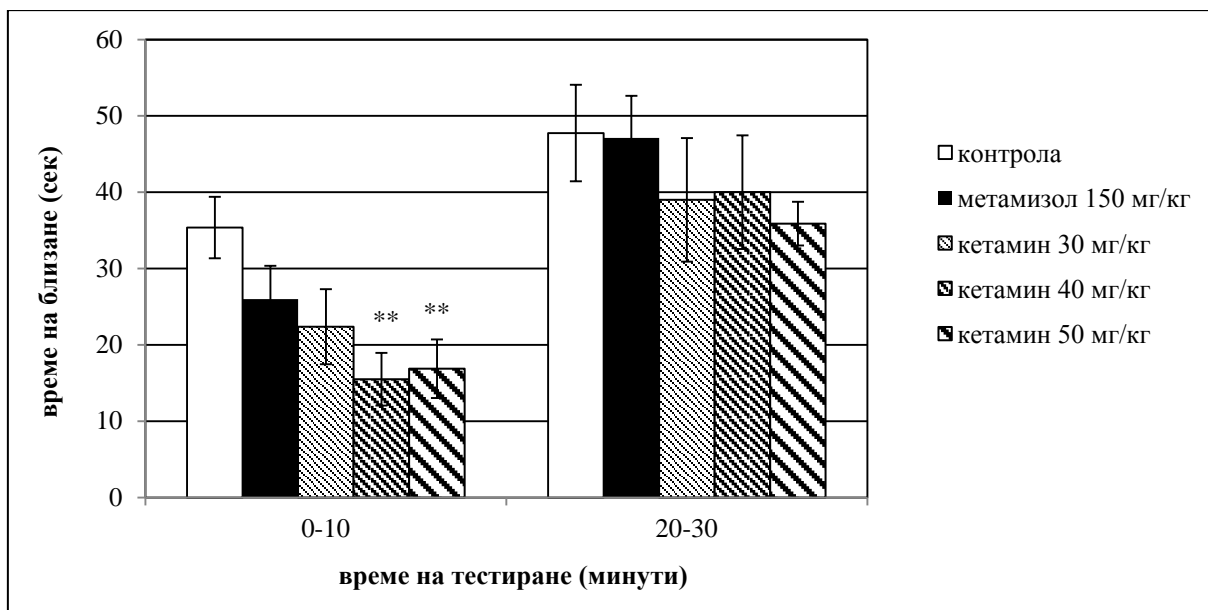
При формалиновия тест при многократно третиране на животните с трите изследвани дози габапентин (30, 60 и 100 мг/кг) се установи статистически значимо намаление на времето за близане на лапата както през ранната, така и през късната фаза на теста ($p < 0,05$; $p < 0,01$ и $p < 0,001$) в сравнение с контролата (фиг. 27).



Фигура 27. Ефект на габапентин в дози 30, 60 и 100 мг/кг при формалинов тест и многократно третиране; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ при сравнение със съответната контрола.

7.4. Ефект на кетамин при формалинов тест

При групата, третирана многократно с кетамин в доза 30 мг/кг не се установи статистически достоверно понижение на времето за близане на лапата и през двете фази на формалиновия тест в сравнение с контролата. Животните, третирани с двете по-високи дози кетамин (40 и 50 мг/кг) намалиха достоверно проследявания показател само през ранната фаза на теста ($p < 0,01$) в сравнение с контролата (фиг. 28).



Фигура 28. Ефект на кетамин в дози 30, 40 и 50 мг/кг при формалинов тест и многократно третиране; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

8. Влияние на дозата върху противовъзпалителния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при карагенинов модел на възпаление при 14-дневно многократно третиране

При карагениновия модел на възпаление контролната група показва среден обем на възпалената лапа между 36 и 42. Групата, третирана с противовъзпалителното средство диклофенак в доза 25 мг/кг достоверно намали отока на лапата и при трите тествания ($p < 0,05$) в сравнение с контролата.

8.1. Ефект на бенфотиамин при модел на възпаление, предизвикан с карагенин

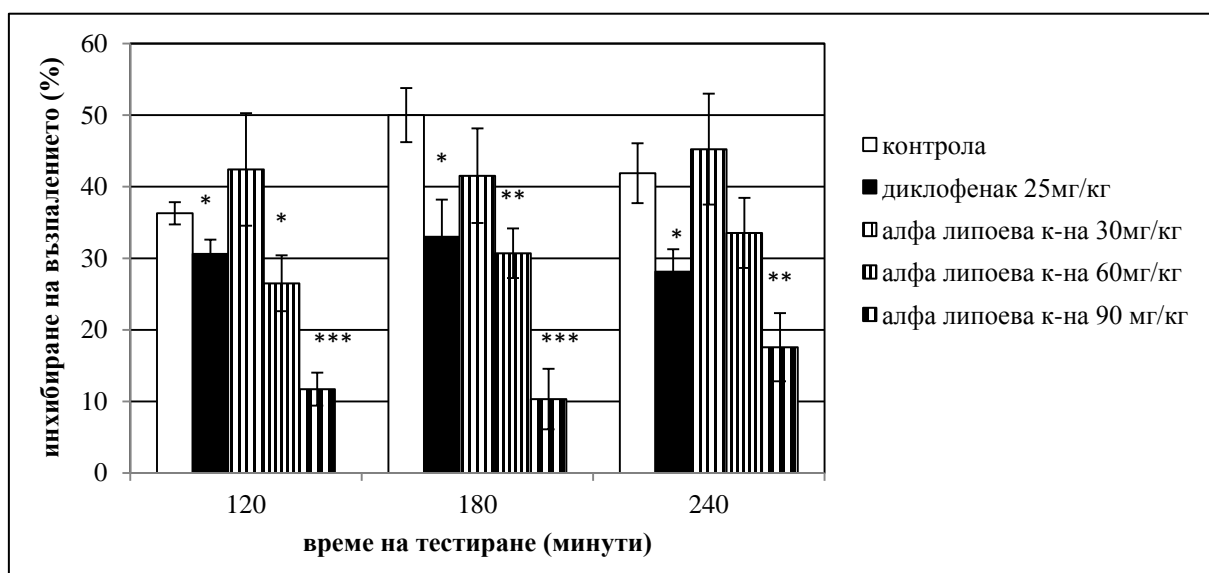
Групите, третирани многократно и с трите изследвани дози бенфотиамин (20, 40 и 80 мг/кг) не намалиха статистически значимо карагениновия оток на лапата в сравнение с контролата и при трите тествания (таблица 7).

Таблица 7. Инхибиране на възпалението (%) при многократно третиране с бенфотиамин в дози 20, 40 и 80 мг/кг при карагенинов модел на възпаление. Представени са средните стойности за групата \pm SEM. * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола.

Група/минути	120	180	240
контрола	36,29 \pm 1,56	50 \pm 3,77	41,89 \pm 4,19
диклофенак 25 мг/кг	30,62 \pm 1,99*	33,01 \pm 5,19*	28,12 \pm 3,13*
бенфотиамин 20 мг/кг	45,44 \pm 5,59	61,12 \pm 6,46	102,09 \pm 11,33
бенфотиамин 40 мг/кг	41,9 \pm 6,24	64,44 \pm 8,64	96,22 \pm 13,42
бенфотиамин 80 мг/кг	42,67 \pm 3,60	70,63 \pm 4,63	113,71 \pm 9,69

8.2. Ефект на алфа-липоева киселина при модел на възпаление, предизвикан с карагенин

При карагениновия модел на възпаление групата, третирана с алфа-липоева киселина в доза 30 мг/кг не намали достоверно отока на лапата и при трите тествания в сравнение с контролата. При групата, третирана с алфа-липоева киселина в доза 60 мг/кг се наблюдава статистически достоверно намаление на карагениновия оток на 120-та ($p < 0,05$) и 180-та минута ($p < 0,01$) в сравнение с контролата. Групата, получила най-висока доза алфа-липоева киселина (90 мг/кг) статистически значимо намали отока на лапата и при трите тествания ($p < 0,01$ и $p < 0,001$) в сравнение с групата, третирана с физиологичен разтвор (фиг. 29).



Фигура 29. Ефект на алфа-липоева киселина в дози 30, 60 и 90 мг/кг при карагенинов модел на възпаление и многократно третиране; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ при сравнение със съответната контрола.

8.3. Ефект на габапентин при модел на възпаление, предизвикан с карагенин

Групите с многократно приложение на габапентин в трите изследвани дози (30, 60 и 100 мг/кг) не показаха статистически значимо намаление на отока на лапата при карагениновия модел на възпаление в сравнение с контролата (таблица 8).

Таблица 8. Инхибиране на възпалението (%) при многократно третиране с габапентин в дози 30, 60 и 100 мг/кг при карагенинов модел на възпаление. Представени са средните стойности за групата \pm SEM. * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола.

Група/минути	120	180	240
контрола	36,29 \pm 1,56	50,01 \pm 3,77	41,89 \pm 4,19
диклофенак 25 мг/кг	30,62 \pm 1,99*	33,01 \pm 5,19*	28,12 \pm 3,13*
габапентин 30 мг/кг	32,30 \pm 6,34	48,01 \pm 7,99	42,50 \pm 7,16
габапентин 60 мг/кг	31,78 \pm 2,91	48,75 \pm 4,79	40,86 \pm 3,71
габапентин 100 мг/кг	28,48 \pm 6,01	39,45 \pm 6,59	37,16 \pm 5,94

8.4. Ефект на кетамин при модел на възпаление, предизвикан с карагенин

При карагениновия модел на възпаление групите многократно третирани с кетамин в дози 30, 40 и 50 мг/кг не показаха достоверно намаление на отока на лапата и при трите тествания в сравнение с контролната група (таблица 9).

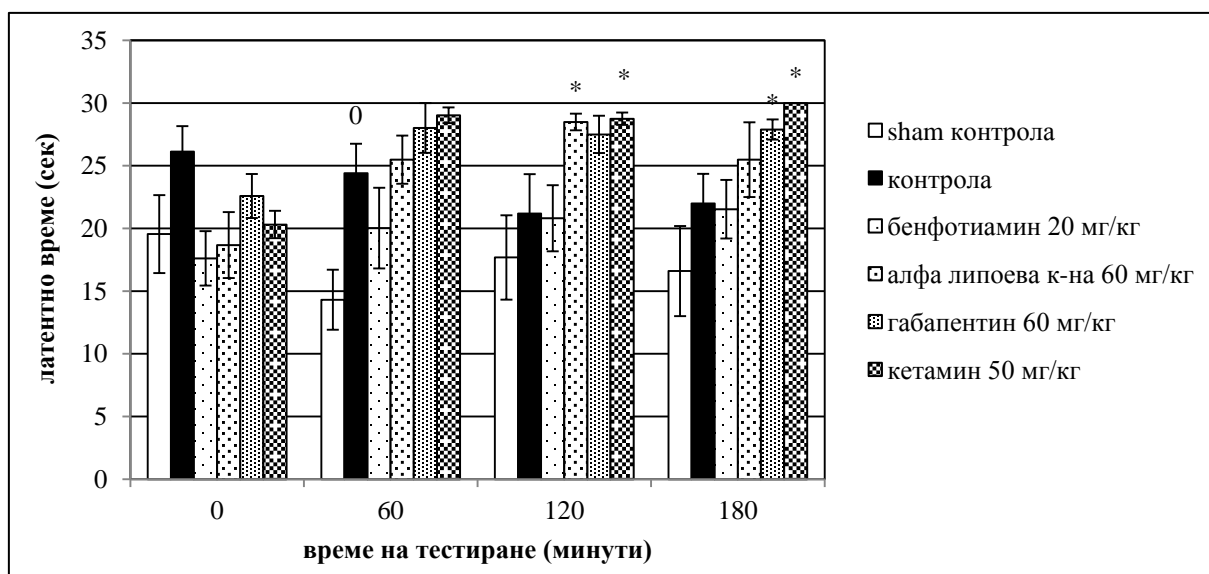
Таблица 9. Инхибиране на възпалението (%) при многократно третиране с кетамин в дози 30, 40 и 50 мг/кг при карагенинов модел на възпаление. Представени са средните стойности за групата \pm SEM. * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола.

Група/минути	120	180	240
контрола	36,29 \pm 1,56	50,01 \pm 3,77	41,89 \pm 4,19
диклофенак 25 мг/кг	30,62 \pm 1,99*	33,01 \pm 5,19*	28,12 \pm 3,13*
кетамин 30 мг/кг	32,25 \pm 4,23	42,41 \pm 4,38	44,33 \pm 5,07
кетамин 40 мг/кг	30,06 \pm 4,23	41,84 \pm 2,31	38,25 \pm 4,62
кетамин 50 мг/кг	36,83 \pm 5,65	41,33 \pm 7,28	49,61 \pm 6,98

9. Сравняване на аналгетичния ефект на бенфотиамин, α -липоева киселина, габапентин и кетамин при модел на невропатна болка при тест с топлинен болков стимул.

При теста „гореща плоча“ средното латентно време при sham контролата е между 14 и 20 секунди при четирите тествания. Контролната група с модел на невропатна болка увеличи достоверно латентното време само на 60-та минута ($p < 0,01$) в сравнение с sham контролата. Няма статистически значима разлика в проследявания

показател при групата, третирана с бенфотиамин в доза 20 мг/кг в сравнение с контролата. Групата, третирана с алфа-липоева киселина в доза 60 мг/кг достоверно повиши латентното време само на 120-та минута ($p < 0,05$) в сравнение с контролата. Групата, получила габапентин в доза 60 мг/кг достоверно увеличи латентното време само на 180-та минута ($p < 0,05$) в сравнение с контролата. Животните, третирани с кетамин в доза 50 мг/кг статистически значимо повишиха латентното време при съпоставяне с контролата на 120-та и 180-та минута ($p < 0,05$) в сравнение с контролната група (фиг. 30).

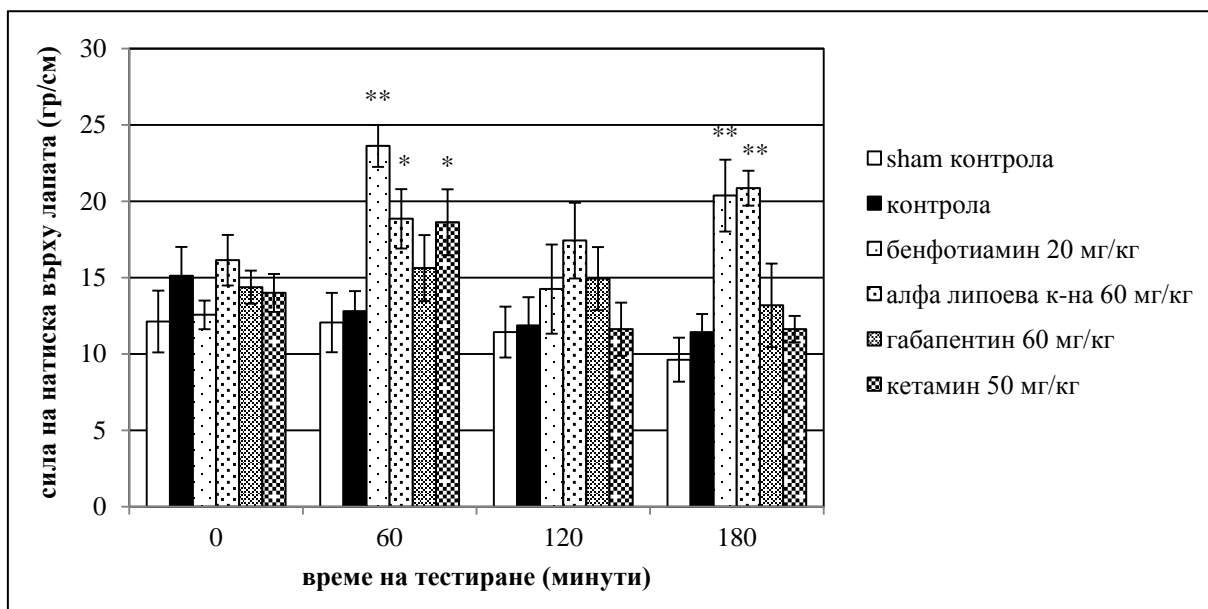


Фигура 30. Ефект на бенфотиамин, алфа-липоева к-на, габапентин и кетамин при тест „гореща плоча“ и модел на невропатна болка. ⁰ $p < 0,01$ в сравнение със sham контролата; * $p < 0,05$ в сравнение с контролата.

10. Сравняване на аналгетичния ефект на бенфотиамин, α -липоева киселина, габапентин и кетамин при модел на невропатна болка при тест с механичен болков стимул.

При теста с механичен натиск на лапата, силата на натиска, при която животното отдръпва тестираната лапа, представена в грам/сантиметър при sham контролата е 12 за 0-ва и 60-та минута, 11 и 9 съответно на 120-та и 180-та минута. Групата, третирана с физиологичен разтвор не показва статистически значимо увеличение на проследявания показател при четирите тествания в сравнение с sham контролата. Животните, получили бенфотиамин в доза 20 мг/кг показаха достоверно увеличение на натиска в грам/сантиметър на 60-та и 180-та минута в сравнение с контролата ($p < 0,01$). Животните, третирани с α -липоева киселина в доза 60 мг/кг статистически значимо повишиха стойността на натиска, необходим за отдръпване на лапата, при съпоставяне

с контролата на 60-та ($p < 0,05$) и 180-та минута ($p < 0,01$). Не се установи значима разлика в изследвания показател между групата, третирана с габапентин и контролната група. Групата, третирана с кетамин в доза 50 мг/кг повиши стойността на проследявания показател само на 60-тата минута в сравнение с контролата ($p < 0,05$) (фиг. 31).



Фигура 31. Ефект на бенфотиамин, алфа-липоева к-на, габапентин и кетамин при аналгезиметър тест и модел на невропатна болка. * $p < 0,05$ в сравнение с контролата; ** $p < 0,01$ в сравнение с контролата.

11. Ефекти на бенфотиамин, α -липоева киселина, габапентин и кетамин при многократно третиране върху серумното ниво на IL-6 при липополизахарид-индуциран модел на възпаление.

При липополизахарид-индуциран модел на системно възпаление, еднократното интраперитонеално въвеждане на LPS в доза 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ доведе до статистически значимо повишение на серумното ниво на IL-6 при моделната група в сравнение с контролата ($p < 0,05$).

Групите, третирана и с трите дози бенфотиамин не показаха статистически значима разлика в серумните нива на IL-6 при сравнение с моделната група при LPS-индуциран модел на възпаление (таблица 10).

Таблица 10. Серумни нива на IL-6 (pg/ml) при възпаление, предизвикано с липополизахарид при 14-дневно третиране с бенфотиамин. Представени са средните стойности за групата \pm SEM. ⁰p < 0,05 при сравнение с контролата.

Група	Mean \pm SEM
контрола	73 \pm 1,78
контрола + LPS 250 мкг/кг (моделна група)	112,75 \pm 5,44 ⁰
бенфотиамин 20 мг/кг + LPS	155 \pm 65,05
бенфотиамин 40 мг/кг + LPS	137 \pm 35,15
бенфотиамин 80 мг/кг + LPS	112,25 \pm 11,12

При липополизахарид-индуцирания модел на възпаление само групата, третирана с α -липоева киселина в доза 30 мг/кг показва статистически значимо повишение на серумните нива на IL-6 в сравнение с контролата (табл. 11).

Таблица 11. Серумни нива на IL-6 (pg/ml) при възпаление, предизвикано с липополизахарид при 14-дневно третиране с алфа-липоева киселина. Представени са средните стойности за групата \pm SEM. ⁰p < 0,05 при сравнение с контролата; *p < 0,05 при сравнение с моделната група.

Група	Mean \pm SEM
контрола	73 \pm 1,78
контрола + LPS 250 мкг/кг (моделна група)	112,75 \pm 5,44 ⁰
АЛА 30 мг/кг+LPS	243,75 \pm 9,57*
АЛА 60 мг/кг+LPS	154,75 \pm 24,09
АЛА 90 мг/кг+LPS	129 \pm 21,16

При LPS-индуциран модел на възпаление, животните, третирани многократно с габапентин не показаха сигнификантна промяна в серумните нива на изследвания цитокин в сравнение с моделната група (табл. 12).

Таблица 12. Серумни нива на IL-6 (pg/ml) при възпаление, предизвикано с липополизахарид при 14-дневно третиране с габапентин. Представени са средните стойности за групата \pm SEM. ⁰p < 0,05 при сравнение с контролата.

Група	Mean \pm SEM
контрола	73 \pm 1,78
контрола + LPS 250 мкг/кг (моделна група)	112,75 \pm 5,44 ⁰
габапентин 30 мг/кг + LPS	203,75 \pm 32,34
габапентин 60 мг/кг + LPS	163,5 \pm 44,52
габапентин 100 мг/кг + LPS	142,25 \pm 28,61

Групите, третирани с трите дози кетамин не показаха достоверни разлики в серумното ниво на IL-6 при съпоставяне с моделната група при липополизахарид-индуцирано възпаление (табл. 13).

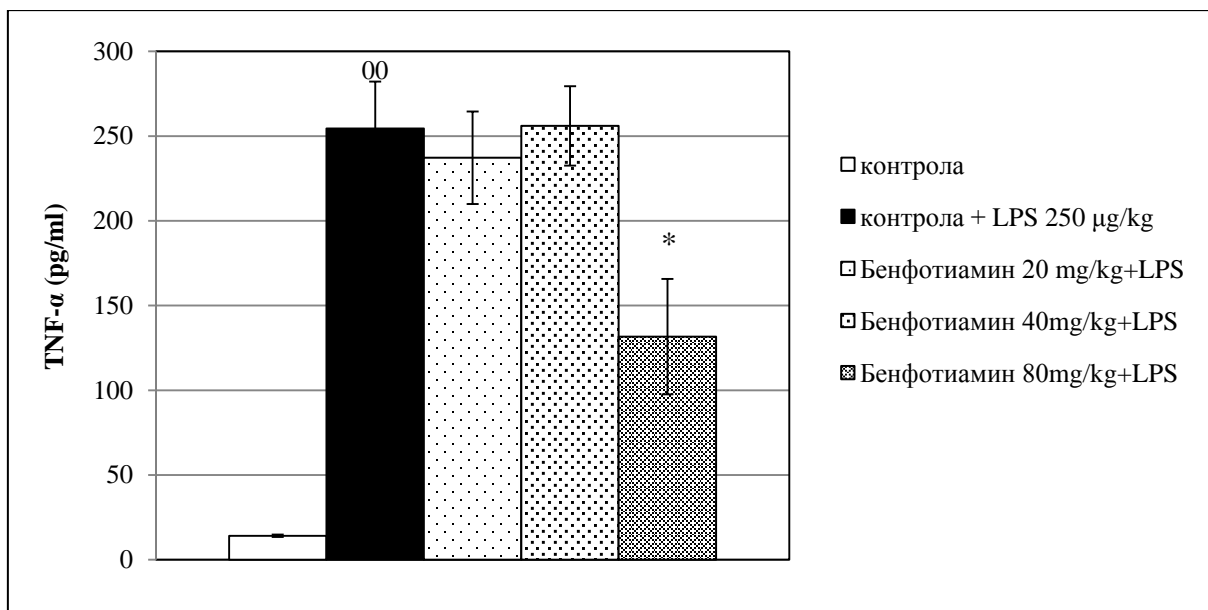
Таблица 13. Серумни нива на IL-6 (pg/ml) при възпаление, предизвикано с липополизахарид при 14-дневно третиране с кетамин. Представени са средните стойности за групата \pm SEM. ⁰ $p < 0,05$ при сравнение с контролата.

Група	Mean \pm SEM
контрола	73 \pm 1,78
контрола + LPS 250 мкг/кг (моделна група)	112,75 \pm 5,44 ⁰
кетамин 30 мг/кг + LPS	147 \pm 44,38
кетамин 40 мг/кг + LPS	104 \pm 17,26
кетамин 50 мг/кг + LPS	127,25 \pm 6,6

12. Ефекти на бенфотиамин, α -липоева киселина, габапентин и кетамин при 14-дневно многократно третиране върху серумното ниво на TNF- α при липополизахарид-индуциран модел на възпаление.

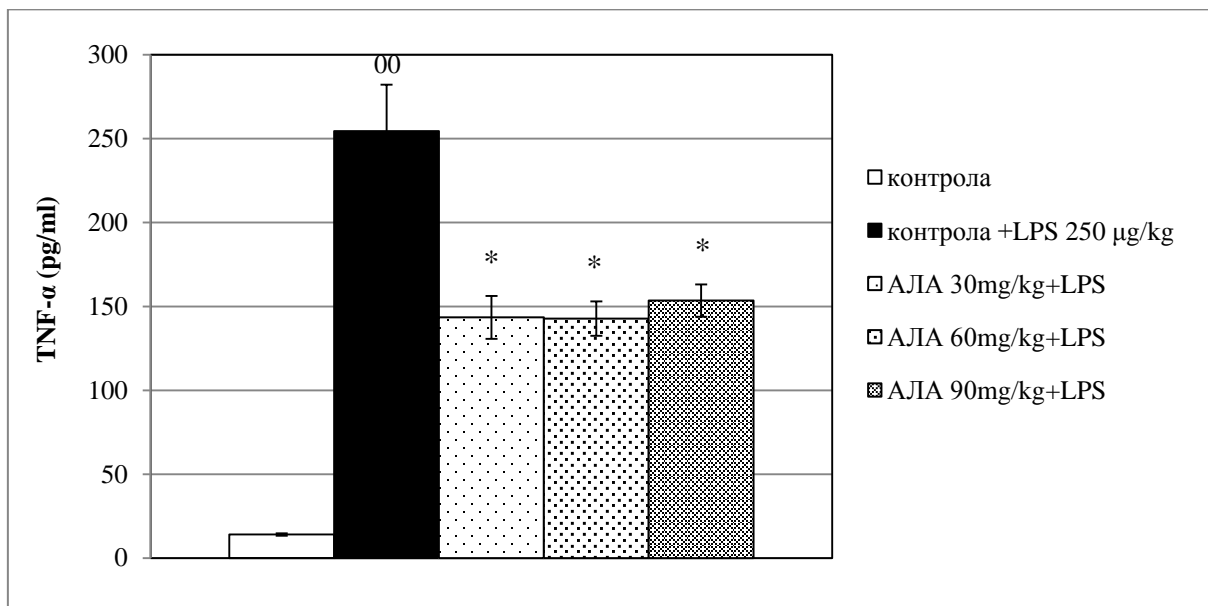
Животните, третирани с физиологичен разтвор и липополизахарид еднократно в доза 250 μ g/kg сигнификантно увеличиха серумното ниво на TNF- α в сравнение с контролната група ($p < 0,01$).

При липополизахарид-индуциран модел на възпаление групата, третирана с бенфотиамин в доза 80 мг/кг достоверно намали серумното ниво на TNF- α в сравнение с моделната група. При третираните с другите две дози бенфотиамин животни, не се установи статистически значима разлика в серумните нива на TNF- α в сравнение с моделната група (фиг. 32).



Фигура 32. Серумно ниво на TNF- α при 14-дневно многократно третиране с бенфотиамин. $^{00}p < 0,01$ при сравнение с контролата; $*p < 0,05$ при сравнение с контролата + LPS.

Животните, третирани и с трите дози алфа-липоева киселина статистически значимо понижиха стойностите на TNF- α в сравнение с моделната група (фиг. 33).



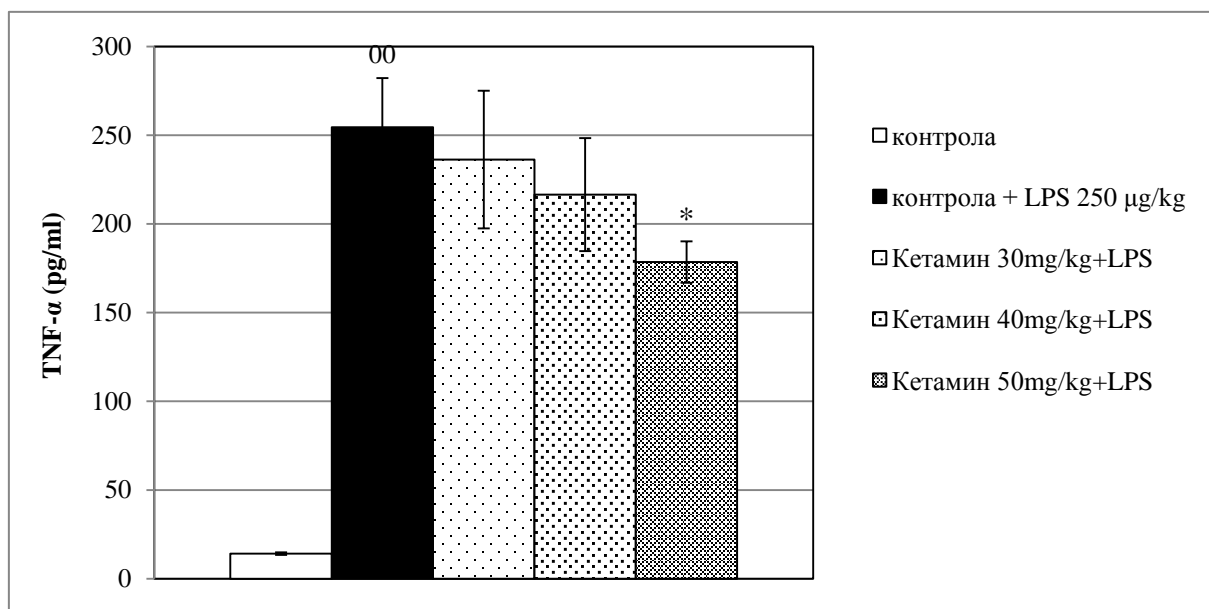
Фигура 33. Серумно ниво на TNF- α при 14-дневно многократно третиране с алфа-липоева киселина. $^{00}p < 0,01$ при сравнение с контролата; $*p < 0,05$ при сравнение с контролата + LPS.

Групите, третирани многократно с габапентин несигнификантно намалиха нивото на изследвания проинфламаторен цитокин в сравнение с моделната група (таблица 14).

Таблица 14. Серумни нива на TNF- α (pg/ml) при възпаление, предизвикано с липополизахарид при 14-дневно третиране с габапентин. Представени са средните стойности за групата \pm SEM. ⁰⁰p < 0,01 при сравнение с контролата.

Група	Mean \pm SEM
контрола	14,125 \pm 0,72
контрола + LPS 250 мкг/кг (моделна група)	254,5 \pm 27,68 ⁰⁰
габапентин 30 мг/кг + LPS	236,5 \pm 46,49
габапентин 60 мг/кг + LPS	203,5 \pm 24,33
габапентин 100 мг/кг + LPS	164,25 \pm 31,76

При LPS модел на възпаление, животните, третирани с кетамин понижиха доза-зависимо изследвания цитокин, като сигнификантно намаление се наблюдава само при най-високата доза в сравнение с моделната група (фиг. 34).



Фигура 34. Серумно ниво на TNF- α при 14-дневно третиране с кетамин. ⁰⁰p < 0,01 при сравнение с контролата; *p < 0,05 при сравнение с контролата + LPS.

ОБСЪЖДАНЕ

Проведените експерименти в настоящата работа са в две направления – проучване за аналгетичен и противовъзпалителен ефект на изследваните вещества при еднократно и хронично третиране. Изследването за аналгетично действие е проведено в две посоки – от една страна разгледахме влиянието на изследваните вещества върху интактни плъхове, а от друга – влиянието им върху модел на невропатна болка.

Аналгетичният ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин е изследван при три ноцицептивни теста с използване на топлинен, механичен и химичен болков стимул. За проучване на противовъзпалителния им ефект е използван модел на остро ексудативно възпаление с интраплантарно въвеждане на карагенин.

Като модел на невропатна болка използвахме експериментален модел с лигиране на седалищния нерв.

За проучване влиянието на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин върху серумните нива на проинфламаторните цитокини, определихме нивата на TNF- α и IL-6 в серума на плъхове с липополизахарид-индуцирано възпаление.

При сравняване на резултатите на изследваните вещества при еднократно и 14-дневно прилагане, както и при модела на хронична невропатна болка (Таблица 15), се открояват следните закономерности в техните аналгетични и противовъзпалителни ефекти:

1. Бенфотиамин

1.1. Аналгетичен и противовъзпалителен ефекти

Бенфотиамин приложен еднократно показва средна продължителност на аналгетичния ефект при теста гореща плоча, докато при 14-дневно прилагане този ефект е с голяма продължителност. Това налага извода, че бенфотиамин е по-добре да се прилага многократно в случаите на термична болка с цел постигане на по-добър обезболяващ ефект. Получените от нас данни подкрепят тези на Moallem и съавтори (2008), които установяват, че тиаминът проявява изразен аналгетичен ефект при ноцицептивен тест с използване на топлинен стимул – „гореща плоча“. Тези автори наблюдават този ефект в по-високи дози тиамин – 50, 100 и 125 мг/кг. Като се има предвид, че бенфотиамин е липорастворим аналог на тиамин, не е очудващо, че проявява ефект в по-ниски дози. Константинов и съавтори (2011) установяват, че бенфотиаминът в доза 10 мг/кг потенцира аналгетичния ефект на морфина при теста

„гореща плоча“. Същите автори установяват, че бенфотиаминът забавя развитието на толерантност към аналгетичния ефект на морфина. Вероятно този ефект на бенфотиамина се дължи на факта, че той се отличава с по-висока бионаличност от тиамин, активира ензима транскетолаза, в резултат на което намалява тъканното ниво на продуктите от пентозофосфатния път. Други автори (Wu и Ren, 2006) установяват, че бенфотиаминът в доза 100 мг/кг подобрява симптомите на диабетна невропатия и ретинопатия при стрептозотоцин-индуциран диабет на мишки.

При теста с механичен натиск бенфотиамин няма ефект при еднократно прилагане, докато при многократно проявява ранен и кратък аналгетичен ефект. Следователно бенфотиамин може да покаже аналгетичен ефект при механично предизвикана болка ефективно след многократно прилагане.

При формалиновия тест бенфотиамин приложен еднократно повлиява ранната фаза на болкова реакция във високи дози, докато късната фаза на болкова реакция се повлиява от всички приложени от нас дози. Многократното 14-дневно прилагане на бенфотиамин показва по-различен ефект – високата доза повлиява ранната фаза на болкова реакция, докато ниската доза, вероятно поради кумулиране на ефекта проявява такъв върху късната фаза на болкова реакция. Налага се обобщението, че еднократното прилагане на бенфотиамин във високи дози повлиява ранната фаза, а в по-ниски приложен многократно и късната фаза на болковата реакция. Следователно бенфотиамин е надеждно средство за потискане на болки от химичен характер. Ноцицептивният отговор при теста с формалин е двуфазен. Наблюдава се начален остър период с продължителност около 10 минути – фаза 1 и регистрираните поведенчески промени се дължат на остро активирани от формалина първични аферентни нервни терминали. Тези промени се медиатират от активиране на TrpA1 каналите (McNamara CR, 2007). Втората фаза на формалиновия тест отразява централната сенситизация на невроните в задния рог и периферна сенситизация на ноцицепторите от предизвиканата от формалина локална възпалителна реакция (Herrero, 2000). Получените от нас резултати показват, че бенфотиаминът в по-ниски дози блокира само ноцицептивните стимули, предавани чрез ноцицепторите и първичните аферентни неврони. Високата доза бенфотиамин повлиява както периферните, така и спиналните ноцицептивни механизми. Установено е, че пероралното приложение на бенфотиамин сигнификантно повишава нивата на тиамин, тиаминмонофосфат и тиамин дифосфат в плазма, черен дроб, но не и в мозъчната тъкан. Това е в съгласие с известния фармакологичен профил на бенфотиамина, а

именно благоприятен ефект при увреждане на периферните нерви и липса на специфичен ефект върху централната нервна система.

Редица експериментални и клинични проучвания потвърждават терапевтичния потенциал на бенфотиамина при диабетна микроангиопатия и невропатия, както и при алкохолна полиневропатия (Stracke, H, 2008; Hammes, 2003; Schupp, 2008; Schmid, 2008). Получените от нас резултати подкрепят тези на Sanchez-Ramirez GM et al (2006) за антиноцицептивен ефект на бенфотиамина при формалинов тест на интактни плъхове и при експериментален модел на захарен диабет, индуциран със стрептозоцин. Тези автори наблюдават ефектите през втората фаза на формалиновия тест при доза 300 мг/кг приложена перорално. Редица проучвания установяват антиноцицептивен ефект на тиамина при констрикторен тест с оцетна киселина и формалинов тест на мишки (Abacioglu et al, 2000; Franca et al, 2001). Други подчертават ролята на цитокините и азотния оксид и в ноцицептивния отговор, предизвикан от формалин (Chichorro JG, 2004). Поради това, че бенфотиаминът е аналог на тиамина с подобрени фармакокинетични показатели, нашите резултати потвърждават антиноцицептивния ефект на бенфотиамина при този тип болков модел и подчертават перспективата за клинично приложение.

Противовъзпалителното действие на бенфотиамин не се доказва в нашите експерименти. Както карагенин-индуцирания оток не се променя независимо от еднократно или 14-дневно третиране с бенфотиамин, така и липополизахарид-индуцираното възпаление не промени нивата на интерлевкин 6.

При карагениновия модел на възпаление, бенфотиаминът в използваните от нас дози не показва достоверен антиинфламаторен ефект както при еднократно така и при многократно приложение. Следователно бенфотиамина в по-слаба степен повлиява развитието на този тип възпаление. Възпалителният отговор, предизвикан от карагенин, индуцира освобождаването на редица цитокини и хемокини, като IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 и азотен оксид (Tanaka et al., 2004). Shoeb и Ramana (2011) установяват, че бенфотиаминът намалява липополизахарид-индуцираната експресия на инфламаторни цитокини и хемокини в макрофагите. Същите автори посочват, че бенфотиаминът потиска липополизахарид-индуцираното освобождаване на свободни кислородни радикали и макрофагеалната смърт *ин витро*. Според тях антиинфламаторната активност на бенфотиаминът се дължи на потискане на фосфолипаза A2 и последващо инхибиране освобождаването на метаболити на арахидоновата киселина – PGE2, TXB,

ЛТВ4. Yadav и съавт. (2009) установяват, че бенфотиаминът проявява антиоксидативна и противовъзпалителна активност при ендотоксин-индуциран увеит на плъхове.

1.2. Аналгетичен ефект на бенфотиамин при модел на невропатна болка

При модел на невропатна болка бенфотиаминът в използваната от нас доза не показва достоверен антиноцицептивен ефект при теста с топлинен болков стимул. Wang и съавт. (2005) изследват ефекта на тиамин при два модела на невропатна болка-притискане на дорзалния спинален ганглий и налагане на лигатура на n. ishiadicus. Те наблюдават подобряващ ефект на тиамин, въведен интраперитонеално в дози 5 – 100 мг/кг при термална хипералгезия. Същите автори не установяват значим антиноцицептивен ефект на тиамин при механичен болков стимул. В нашето изследване бенфотиамин показва ранен и продължителен антиноцицептивен ефект при механичния болков стимул, което вероятно се дължи на различните пътища на въвеждане на веществата.

При теста с механичен болков стимул поведенческите отговори се медиират предимно от спиналните центрове. При модел на алодиния чрез лигиране на гръбначно-мозъчни нерви на ниво L5 и L6 при плъхове бенфотиаминът проявява аналгетичен ефект при тест с механичен натиск на лапата (Sanchez-Ramirez G et al, 2006). Същите автори установяват антиноцицептивен ефект на бенфотиамин и при експериментален модел на захарен диабет, индуциран със стрептозотоцин. При интратекално приложение на инхибитори на протеин киназа C е наблюдаван антиноцицептивен ефект при плъхове с лигатура на гръбначно-мозъчен нерв (Yajima et al, 2003) или при формалинов тест (Souza et al, 2002). В заключение считаме, че възможно обяснение на антиноцицептивния, антихипералгезичния и антиалодиничния ефекти на бенфотиамин е блокирането на диацилглицерол-протеин киназа C пътя.

Редица клинични проучвания демонстрират, че бенфотиаминът намалява алкохолната невропатна болка (Woelk et al, 1998; Ang et al, 2008). Съществуват и много клинични данни за ролята на бенфотиамин в предотвратяване прогресията на усложненията при захарен диабет чрез увеличаване активността на транскетолазата, което води до инхибиране образуването на крайните продукти на гликирането (AGEs) (Babaei-Jadidi R et al, 2003; Stirban A et al, 2006). Тези продукти от обмяната на глюкозата са отговорни за появата и прогресията на редица съдови болести (Basta, 2004), диабетна невропатия (Wada, 2005), диабетна нефропатия (Sebekova, 2003) и диабетна ретинопатия (Fosmark, 2006). Потискайки образуването на AGEs в

периферната нервна тъкан, бенфотиаминът подобрява нервната проводимост при експериментална диабетна невропатия (Stracke H et al, 2001). Данни от експериментални проучвания сочат, че бенфотиаминът подобрява васкуларната ендотелна дисфункция при плъхове (Verma S et al, 2009).

1.3. Ефекти на многократното прилагане на бенфотиамин върху серумната концентрация на проинфламаторни цитокини при LPS индуциран модел на възпаление.

При модел на липополизахарид-индуцирано възпаление, животните многократно третирани с бенфотиамин в най-висока доза показаха статистически значимо понижение в серумното ниво на TNF- α . При същия модел на възпаление, бенфотиаминът в трите изследвани дози не промени статистически значимо серумното ниво на IL-6.

Добре известна е ролята на тиамин (Вит В1) в невромедиацията и функцията на невроните в ЦНС. Затова и нервната система е най-чувствителна на тиаминов дефицит, свързан с увреждане на окислителния метаболизъм, нарушена кръвно-мозъчна бариера, астроцитна дисфункция, амилоидно отлагане и възпаление (Pascal L, 2014). Установено е, че бенфотиаминът инхибира трите основни метаболитни пътя в патогенезата на хипергликемично-индуцираното съдово увреждане, както и активирането на проинфламаторния транскрипционен фактор NF- κ B (Hammes HP, 2003). Umech Yadav и съавт. (2010) установяват, че бенфотиаминът предотвратява LPS индуцираните сигнални пътища, водещи до апоптична клетъчна смърт на миши макрофаги. Известно е, че LPS при свързване с неговия рецептор, TLR-4, инициира реакции на фосфорилиране и дефосфорилиране на различни кинази, което в крайна сметка води до активиране на транскрипционните фактори NF- κ B и AP-1 (Kim et al, 2006). Активирането на NF- κ B води до транскрипцията на различни възпалителни маркери, вкл. COX-2 и iNOS (Srivastava et al, 2009). Други автори (Bozic I et al, 2015) изследват и доказват противовъзпалителния ефект на бенфотиамин при LPS стимулирани миши BV-2 микроглиални клетки. Те установяват, че бенфотиаминът намалява продукцията на проинфламаторни медиатори като iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6 и повишава нивото на противовъзпалителния IL-10 при ин витро опити с микроглиални клетъчни култури, стимулирани с LPS. Нашите експерименти с 14-дневно прилагане на бенфотиамин доказаха намаляването на продукцията на TNF- α под влияние на бенфотиамин, но не повлиява продукцията на IL-6. Вероятно това се дължи на сравнително краткото

прилагане на бенфотиамин. Други автори (Shoeb and Ramana, 2012) показват, че бенфотиаминът инхибира освобождаването на метаболити на арахидоновата киселина чрез потискане на фосфолипаза А2 и предпазва от LPS-индуцирано образуване на липидни хидропероксиди в макрофагите.

Тези резултати показват, че бенфотиаминът може да бъде ново противовъзпалително средство, което да подобри ендотоксин-индуцираното възпаление чрез инхибиране двата пътя в метаболизма на арахидоновата киселина. Тъй като е доказано, че витамин В1 е безопасен при употреба, неговият аналог бенфотиамин може да се използва като нов терапевтичен подход за лечение на хронични възпалителни състояния, вкл. невродегенеративни болести като болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон и мултиплена склероза.

2. Алфа-липоева киселина (АЛА)

2.1. Аналгетичен и противовъзпалителен ефекти

Настоящото изследване алфа-липоевата киселина при еднократно приложение показва значим антиноцицептивен ефект само в най-високата доза при теста с топлинен болков стимул, който е със средна продължителност. Този ефект се регистрира и при 14-дневното ѝ прилагане, като ефекта е с голяма продължителност (Таблица 15). Интересно е, че АЛА прояви ранен и кратък аналгетичен ефект при механичен болков стимул. Следователно прилагането ѝ при болки предизвикани от термично дразнене ще с по-голям успех, отколкото при механично-предизвикани болки. Най-добри ефекти този препарат показва върху ранната и късна фази на формалиново дразнене, като потисна и 2-те фази.

Експериментални изследвания показаха, че АЛА е ефективен аналгетик при различни животински модели (Lee et al, 2009), но молекулният механизъм на този ефект не е достатъчно добре проучен. Предполага се, че АЛА модулира специфични йонни канали, за да упражни аналгетичен ефект. Тези йонни канали регулират невроналната възбудимост на неврони, участващи в болковите пътища. Предполага се, че Т-тип калциеви канали в ноцицептори на дорзалните спинални ганглии функционират като усилващи сигналите при остри болкови реакции. Авторите предполагат, че АЛА може да упражнява аналгетичен ефект като модулатор на тези Т-тип калциеви канали. Вероятно това е и механизъмът на наблюдавания аналгетичен ефект и в нашите експерименти.

Клинични проучвания установяват невропротективен ефект на АЛА при редица невродегенеративни заболявания като диабет и диабетна невропатия, както и при остро или хронично увреждане на мозъка или нервната тъкан (Packer L, 1997). Други автори (Toklu H. et al, 2009) също установяват, че прилагането на АЛА след травматично мозъчно увреждане намалява отделянето на проинфламаторни цитокини, които играят важна роля в оксидативната мозъчна увреда.

Алфа-липоевата киселина показва достоверен продължителен антиинфламаторен ефект при карагениновия модел на възпаление. Установихме този ефект при двете високи дози при еднократно и при многократно третиране. Наблюдава се тенденция към доза-ефект зависимост в противовъзпалителния ефект на АЛА. Получените от нас резултати потвърждават тези на други автори за противовъзпалителна активност на АЛА при експериментални условия на индуциран с карагенин оток (Odabasoglu F et al, 2011). За разлика от опитите на посочените автори, ние установихме противовъзпалителна активност при използване на по-ниски дози алфа-липоева киселина.

За изследване ефектите на антиоксидантната защита при остри възпалителни процеси в тъканите, се измерва нивото на редица антиоксидантни параметри – каталаза, супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза, глутатион редуктаза. В експериментални условия е установено, че противовъзпалителните качества на АЛА се дължат на позитивния ѝ ефект върху антиоксидантната система (van den Berg R et al, 2001; Cho YS et al, 2004). Моделът на карагенин(CAR)-индуцираното възпаление на лапата е широко използван за определяне на острата фаза на възпаление. Хистамин, 5-хидрокси триптамин и брадикинин са медиаторите, открити в ранната фаза на CAR-индуцираното възпаление, докато простагландините се установяват в късната фаза на възпалителната реакция. Приложението на карагенин активира макрофагите и полиморфонуклеарните левкоцити, които продуцират свободни кислородни радикали и освобождават проинфламаторни медиатори като TNF- α и IL-6. Нашите резултати подкрепят косвено тази хипотеза, тъй като АЛА показва добре изразен ефект върху този модел както при еднократно, така и при многократно прилагане.

2.2. Аналгетичен ефект на АЛА при модел на невропатна болка

На плъхове с модел на невропатна болка и тест „гореща плоча“ АЛА показва късен и продължителен антиноцицептивен ефект при изследваната от нас доза. При теста с

механичен натиск на лапата се установи добре изразен ранно настъпващ и продължителен антиноцицептивен ефект на АЛА при всички интервали на измерване.

Травматичното увреждане на n. ischiadicus при плъхове е често използван модел за изучаване увреждането на периферните нерви. Различни експериментални модели на периферна нервна увреда установяват участието на ноцицептивните С-фибри в механичната и топлинна хипералгезия при невропатна болка. Vogelaar et al (2004) наблюдават след увреда на n. ischiadicus намаляване на механичната и топлинна чувствителност в увредената зона.

Този модел води до оксидативен стрес с образуване на реактивни кислородни радикали и намаляване на антиоксидантната защита. Алфа-липоевата киселина е мощен липофилен антиоксидант ин виво и ин витро и играе основна роля като кофактор в много митохондриални реакции. Експериментални проучвания сочат, че при увреждане на гръбначния мозък се наблюдава липидно перокисление, което по автокаталитичен механизъм води оксидативна деструкция на клетъчните мембрани (Adibhatla RM et al, 2008). Глутатионът и други антиоксиданти играят основна роля в спиране разпространението на свободно-радикаловите реакции, които са резултат на липидната пероксидация. Повишеното ниво на глутатиона в тъканите е важен защитен механизъм срещу свръхпродукцията на свободни кислородни радикали. Toklu и съавт. (2010) установяват при плъхове с модел на гръбначно-мозъчна увреда намаляване нивото на глутатиона, а интраперитонеалното приложение на АЛА в доза 50 мг/кг увеличава нивото на глутатиона и намалява образуването на реактивни свободни радикали, измерено чрез хемилуминисцентна техника. Експериментални данни показват, че АЛА осъществява невропротективен ефект при плъхове с модели на язва, исхемия/реперфузия, мозъчна травма и субархноидален кръвоизлив (Sehirli O et al, 2008; Dulundu E et al, 2007). Други автори (Zhang et al, 2007) установяват, че АЛА осъществява антиинфламаторен ефект чрез инхибиране на TNF- α и липополизахарид-индуцирана ендотелна активация ин витро и липополизахарид-индуцирано остро възпаление ин виво. В заключение, в нашите експерименти АЛА показва значим антиинфламаторен ефект при модел на хронична невропатна болка, вероятно повлиявайки механизмите на оксидативен стрес и липидна пероксидация.

2.3. Ефекти на многократното прилагане на АЛА върху серумната концентрация на проинфламаторни цитокини при липополизахарид (LPS) индуциран модел на възпаление.

В настоящето проучване при многократно приложение на АЛА върху плъхове, установихме значимо намаление на серумното ниво на TNF- α при LPS-индуцирано възпаление. При същия модел на възпаление не наблюдавахме статистически значимо намаление в нивото на другия проинфламаторен цитокин – IL-6, а в най-ниската използвана от нас доза – дори нарастване на концентрацията на IL-6.

Основна характеристика на патофизиологията на остро възпаление, предизвикано от бактериален ендотоксин LPS е продукцията на множество провъзпалителни медиатори като клетъчни адхезионни молекули, цитокини и хемокини от съдовите ендотелни клетки и моноцити/ макрофаги. Регулирането на експресията на тези медиатори е свързано с оксидативния стрес чрез специфични окислително – редукционни сигнални пътища, вкл. и транскрипция на факторите NF- κ B AP-1 (Liu et al, 2006). Интрацелуларните антиоксиданти могат да повлияят клетъчната редокс система и по този начин да намалят отговора на ендотелните клетки към оксидативен стрес и инфламаторни цитокини (Moura et al, 2015).

Системното прилагане на LPS води до остро освобождаване на реактивни кислородни радикали (ROS), както и до увеличаване плазмените нива на TNF- α и NO. Тези резултати потвърждават признатите прооксидантни свойства на LPS (Victor VM, 2003).

Благоприятните ефекти на АЛА върху нивата на TNF- α в нашите резултати може да се дължат на способността ѝ да модулира антиоксидант/прооксидантния метаболизъм. ALA, поради дитиоловата си природа, може да улавя редица ROS, сред които хидроксилен радикал, супероксид анион и алкилов радикал. Все повече доказателства сочат, че ALA/DHLA свързват редица метални йони и по този начин намаляват метал-катализираните свободно-радикалови реакции (Shay et al, 2009). Установено е, че АЛА инхибира LPS- индуцираната експресия на клетъчни адхезионни молекули в различни видове клетки и животински модели (Skibska B, 2006). Известно е, че NF- κ B играе важна роля в LPS- индуцираната транскрипция на инфламаторни гени, които участват във възпалението при ендотоксемия и септичен шок (Liu et Malik, 2006). Антиоксидантните и противовъзпалителни свойства на АЛА са установени и при LPS-индуцирана ендотоксемия при плъхове чрез намаляване на плазмените нива на глутамат пируват трансминазата, лактат дехидрогеназата, тумор-некротизиращ

фактор- α (Shen et al, 2015). Cadirci и съавт. (2010) установяват намаление в серумното ниво на проинфламаторните цитокини TNF- α и IL-6 при експериментален модел на остро белодробно увреждане.

Клинични проучвания установяват, че повишената активност на NF- κ B корелира с клиничната тежест и смъртност при пациенти с остро възпаление и сепсис (Arnalich F et al, 2000). Zhang WJ и съавт. (2007) установяват, че АЛА потиска NF- κ B активиране и NF- κ B-зависимата регулация на TNF- α и MCP-1 както в човешки моноцитни THP-1 клетки, така и в различни тъкани от мишки с модел на LPS-индуцирано възпаление.

Както вече отбелязахме, установено е, че LPS предизвиква оксидативен стрес чрез увеличено производство на проинфламаторни цитокини и реактивни свободни радикали (Zhao L, 2008). Приложението на LPS предизвиква възпалителен отговор, който води до освобождаването на голям брой ендогенни възпалителни медиатори, вкл. интерлевкини (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-1), хемокини, адхезионни молекули, реактивен кислородни видове (ROS) и реактивни азотни видове (RNS) (Yoshino S, 2000). Неконтролираното и прекомерно образуване на проинфламаторни медиатори води до развитието на оксидативен стрес и септичен шок (Riedemann NC, 2003). Всички защитни ефекти на АЛА се дължат на нейната дитиолова група. Наличието на тази група дава възможност на ALA и DHALA да свързват различни ROS (синглетен кислород, хидроксилни радикали), както и да рециклират други клетъчни оксиданти, вкл. витамин С и Е, глутатион, коензим Q. При модел на липополизахарид-индуцирано миокардно увреждане е установено, че ALA намалява оксидативния стрес, инхибира липидното перокисление в сърцето и увеличава нивото на глутатион редокс системата в сърцето (A. Gogasa, 2009).

В нашите експерименти вероятно недостатъчно продължителното прилагане на АЛА – само 14 дни не позволи значимо повлияване на нивата на IL-6.

3. Габапентин

3.1. Аналгетичен и противовъзпалителен ефекти

При ноцицептивния тест „гореща плоча“, габапентинът и в трите използвани дози при еднократно приложение показва статистически значим противоболков ефект. Този ефект е с голяма продължителност, понеже се регистрира на всички интервали на измерване (Таблица 15). При многократно 14-дневно третиране антиноцицептивния ефект на габапентина се регистрира само при двете по-високи дози, но също с голяма

продължителност. Получените от нас данни подкрепят тези на Kilic и съавтори (2012), които установяват, че габапентинът проявява изразена аналгетична активност при ноцицептивните тестове – „гореща плоча“, „tail clip“, „tail flick“ при доза 30 мг/кг.

При модела на механична ноцицепция само двете по-високи дози габапентин показаха аналгетичен ефект при еднократно въвеждане. При 14-дневно прилагане този ефект се регистрира и при трите използвани дози.

При тези ноцицептивни тестове поведенческите отговори се медиират от супраспинални центрове (Kilic et al, 2012). Те установяват, че комбинираното приложение на габапентин и ципрохептадин в доза 2 µg/kg като периферен 5-HT₂ антагонист засилва централния противоболков ефект на габапентина, което предполага участие на супраспинални серотонинергични механизми в осъществяването на аналгетичното действие на габапентина. В литературата съществуват данни за участието на 5-HT рецептори в противоболковия ефект на габапентина при плъхове (Bardin et al, 2000). Други (Dixit et al, 2002) установяват, че интратекалното въвеждане на серотонин осъществява антиноцицептивен ефект, медиран от 5-HT₂ и 5-HT₃ рецептори.

При други експериментални проучвания с използване на болкови модели се установява, че габапентинът намалява хипералгезията (Bertrand Set al, 2001). При ноцицептивния констрикторен тест с оцетна киселина е установено, че габапентинът проявява аналгетичен ефект, което предполага и участието на периферни механизми в противоболковия ефект на габапентина (Kilic F et al, 2012). Експериментални проучвания доказват, че в периферния аналгетичен ефект на габапентина участват волтаж зависимите Ca канали субтип $\alpha_2\delta$ и намалено освобождаване на невротрансмитери като глутамат, норадреналин, ГАМК, субстанция Р и калцитонин ген свързания пептид (Fehrenbacher JC, 2003; Field MJ, 2006; Maneuf YP, 2006). Нашите резултати не изключват тези хипотези в механизма на действие на габапентина като аналгетик.

При формалиновия тест наблюдавахме изразен антиноцицептивен ефект на габапентин и в трите приложени дози, както при еднократно, така и при многократно приложение. Този ефект се регистрира и върху двете фази на формалиновия тест – ранна и късна (Таблица 15). Shimoyama N и съавт. (1997) също установяват антиноцицептивен ефект на габапентина при формалинов тест, при интратекално въвеждане на габапентин в дози от 6 до 200 микрограма на плъх. Тъй като втората фаза на формалиновия тест се дължи на сенсибилизация на невроните в задните рога на

гръбначния мозък, получените резултати показват участието на спиналните антиноцицептивни механизми в аналгетичния ефект на габапентина. Очувствяването на заднороговите неврони в гръбначния мозък включва активиране на NMDA и NK-1 рецепторите с последващ инфлукс на Ca^{2+} йони вътреклетъчно и активиране на вторични невромедиаторни системи. Установено, че габапентинът намалява Ca^{2+} инфлукс в пресинаптичните нервни терминали и инхибира освобождаването на възбудни аминокиселини (Fink K et al, 2000). Предполага се, че механизмът на аналгетичното действие на габапентина се реализира чрез блокиране на $\alpha 2\delta$ субединицата на волтаж зависимите калциеви канали (Field MJ, 2000). В нашите експерименти установихме антиноцицептивен ефект на габапентина, дължащ се вероятно на блокиране на ноцицептивните стимули, предавани чрез болковите рецептори и първичните аферентни неврони.

3.2. Аналгетичен ефект на габапентин при модел на невропатна болка

При теста „гореща плоча“ габапентинът показва късно настъпващ, но продължителен антиноцицептивен ефект в изследваната доза. Този ефект се регистрира на 2-ри и 3-ти час след въвеждането. Подобни на нашите са резултатите на Samara C и съавт. (2013), които регистрират аналгетичен ефект на габапентина при плъхове със същия модел на невропатна болка при тест с топлинен болков стимул. Други автори (Arcos M, 2013) не установяват аналгетичен ефект на габапентина при модел на термична ноцицепция при плъхове с увреда на n. ischiadicus.

При теста на Randall & Selitto с механичен натиск на лапата в нашите експерименти габапентинът не показва статистически значим противоболков ефект. За разлика от нас, Arcos M и съавт. (2013) установяват аналгетичен ефект на габапентина при „аналгезиметър тест“ на плъхове с модел на лигиран n. ischiadicus. Разликата вероятно се дължи на различните доза и път на въвеждане на габапентина. Друго възможно обяснение на получените резултати е повлияване на различни аферентни неврони, участващи в трансмисията на механичните и термични стимули, съответно миелинизирани (A- β и A- δ) и немиелинизирани C неврони, които се увреждат при хроничната констрикция на n. ischiadicus. Хистопатологичните промени при хронично увреждане на n. ischiadicus показват масивна дегенерация на миелинизираните неврони, дистално от мястото на лигиране (Gabay E, 2004). Gustafsson H и съавт. (2003) установяват, че габапентина намалява механичната алодиния при мишки с модел на невропатия чрез фотохимична индуцирана исхемия на n. ischiadicus.

Данните от предклинични проучвания показват, че невропатната болка при плъхове с гръбначно мозъчна увреда се дължи на сенсибилизация на заднороговите гръбначно мозъчни неврони (Hains BC et al, 2003). В литературата съществуват данни, които посочват, че при периферно нервно увреждане се наблюдава нарушена регулация на $\alpha 2\delta$ -1 протеина на волтаж зависимите Са канали в дорзалните рога на гръбначния мозък, което се свързва с развитието на тактилна алодиния (Li CY, 2004). Доказателства за патофизиологичната роля на $\alpha 2\delta$ -1 протеина в развитието на болката са експериментите с трансгенни миши линии с повишена експресия на $\alpha 2\delta$ -1 протеина в сензорни и заднокоренчеви неврони, при които се наблюдава хиперчувствителност към механични и термични стимули в сравнение с контролните животни (Li CY, 2004). Експериментални и клинични проучвания установяват, че габапентина е ефективен медикамент за лечение на невропатна болка при увреда на гръбначния мозък, като антиноцицептивния му ефект се дължи на блокиране на Са канали чрез свързване с Са, $\alpha 2\delta$ -1 протеина (Hulsebosch CE, 2000; Siddall PJ, 2006). Аналгетичният ефект на габапентина се установява и при редица контролирани клинични проучвания на пациенти с диабетна и постхерпетична невропатия (Morello et al, 1999; Rice and Maton, 2002).

В заключение нашите данни потвърждават ноцицептивния и антиалодиничния ефект на габапентин, както и потискане на хипералгезията, изразени при остра и хронична невропатна болка. Предполагаме, че вероятният механизъм е чрез блокиране на Са²⁺ канали на спинално ниво.

3.3. Ефекти на многократното прилагане на габапентин върху серумната концентрация на проинфламаторни цитокини при LPS индуциран модел на възпаление.

В настоящето изследване след 14-дневно третиране на животните с габапентин не установихме значима промяна в серумните нива на TNF- α и IL-6 спрямо контролната група при LPS-индуцирано възпаление. Lee BS и съавт. (2013) установяват, че интратекалното приложение на габапентин съществено намалява нивата на проинфламаторните цитокини TNF- α , IL-1 β и IL-6, увеличени в резултат на гръбначно-мозъчно увреждане при плъхове. Същите автори установяват и повишена експресия на IL-10 след интратекално въвеждане на габапентин при същия модел на невропатна болка. Тези резултати подкрепят идеята, че увеличената експресия на IL-10 може да бъде механизъм, чрез който интратекално приложения габапентин инхибира

производството на провъзпалителни цитокини. Известно е, че при невропатна болка експресията на проинфламаторните цитокини TNF- α , IL-1 β и IL-6 е повишена в резултат на освобождаването им от активирани гръбначно-мозъчни глиални клетки (Ma W et al, 2012; Chen YW et al, 2012). Нашите резултати не позволяват категорично заключение за вероятното потискане на продукцията на проинфламаторни цитокини TNF- α и IL-6 от габапентин.

4. Кетамин

4.1. Аналгетичен и противовъзпалителен ефекти

При теста „гореща плоча“ и при еднократно, и многократно приложение кетаминът показва значим антиноцицептивен ефект и в трите изследвани дози. Този ефект е краткотраен при еднократно прилагане на кетамин, докато е по-силен и продължителен при 14-дневно прилагане (Таблица 15). Получените от нас резултати подкрепят тези на Swartjes M и съавт. (2011), които установяват, че кетаминът проявява изразена аналгетична активност при друг ноцицептивен тест с използване на топлинен стимул – инфрачервени лъчи. Посочените автори установяват този ефект при дози по-ниски от нашите – 7,5 мг/кг и 10 мг/кг, приложени еднократно. Romero TR и съавт. (2013) също потвърждават аналгетичния ефект на локално приложен кетамин при модел на хипералгезия, предизвикан от интраплантарно инжектиран простагландин E2.

При теста с механичен болков стимул установихме продължителен антиноцицептивен ефект при еднократно прилагане, докато при 14-дневно прилагане ефекта е ранно настъпващ и кратък (Таблица 15). Този на пръв поглед противоречив резултат касаещ продължителността на ефекта му се нуждае от по-нататъшно изясняване в бъдещи експерименти. Не може да бъде изключена сенситизация на съответните механични болкови рецептори от кетамин при продължително прилагане.

При формалиновия тест, кетаминът в двете по-високи дози показва значим антиноцицептивен ефект само по отношение на ранната фаза на теста (Таблица 15). Този ефект се наблюдава при еднократно и при 14-дневно приложение на кетамин. За разлика от нас, Vulutcu и съавт (2002) установяват съществен антиноцицептивен ефект при еднократно системно интратекално прилагане на кетамин само през късната фаза на формалиновия тест. Вероятно тази разлика се дължи на различния начин на прилагане на кетамин. Аналгетичният ефект на кетамин е установен при постоперативна болка при редица клинични и експериментални проучвания (Wang N, 2015; Koizuka S, 2005). Установено е, че кетаминът намалява нуждите от опиоиден

аналгетик при опиоид-толерантни пациенти с хронична болка, както и при пациенти с остра постоперативна болка (Schug et Goddard, 2014). Мета анализ на клинични проучвания показва ползата от допълнителното прилагане на кетамин за контролиране на ракова болка при деца и възрастни пациенти (Bredlau AL, 2013). Нашите резултати позволяват заключението, че кетаминът може да е надежден аналгетик при болки, предизвикани с химични агенти веднага след настъпване на увредата, а не на по-късен етап от развитие на болковата реакция.

В настоящето изследване кетаминът при еднократно и многократно приложение не показва статистически значим противовъзпалителен ефект при карагениновия модел на възпаление. Редица експериментални изследвания установяват силен антиинфламаторен ефект на кетамин при различни модели на системно възпаление: ендотоксемия, сепсис и исхемия (Zhang Z, 2014). Липсата на ефект в нашите резултати не отхвърлят възможния противовъзпалителен ефект на кетамин. Бъдещи експерименти в тази насока могат категорично да докажат или отхвърлят този ефект на кетамин при карагенинов модел на възпаление.

4.2. Аналгетичен ефект на кетамин при модел на невропатна болка

Плъховете с модел на невропатна болка при теста „гореща плоча“ показаха антиноцицептивния ефект на кетамин в изследваната от нас доза (Таблица 15). Този ефект се регистрира по-късно, но е продължителен. В литературата съществуват множество данни за участието на NMDA рецепторите в патогенезата на болката при увреждане на периферните тъкани или нерви (Chizh and Eide, 2002; Chizh and Headley, 2005). NMDA рецептори се откриват в периферните миелинизирани и немиелинизирани соматични нервни влакна, в гръбначния и главния мозък.

Един от механизмите в развитието на невропатната болка е невроналната свръхвъзбудимост и централната сенситизация на невроните в задния рог на гръбначния мозък. В резултат на това отговорът към сензорни дразнения е улеснен и подпрагови стимули генерират болка (алодиния), което води до отговори с усилена амплитуда и продължителност (хипералгезия). Активирането на NMDA рецепторите от селективни агонисти води до развитие на спинална сенситизация и индуцира болково поведение, което се потиска при въвеждане на кетамин (Du J et al, 2003). Въпреки, че NMDA антагонисти са показали ефикасност при експериментални модели, както и при пациенти с хронична болка, клиничната им употреба за лечение на невропатна болка е ограничено поради страничните им ефекти като седация, халюцинации, атаксия. При

други клинични проучвания е наблюдаван по-дълготраен ефект при пациенти с невропатична болка лекувани с NMDA антагонисти (Rabben et al., 1999; Correll et al., 2004).

Burton et al., (1999) установяват, че кетаминът води до продължително забавяне развитието на алодиния, свързана с увреждане на гръбначния нерв при плъхове. Други автори установяват, че въвеждането на краткодействащият NMDA антагонист кетамин намалява развитието на толерантност към опиати, състояние, свързано с развитието на NMDA рецепторна хипералгезия (Danysz et al., 2005). При експериментални модели, интратекалното или системно приложение на кетамин намалява хипералгезията и възпалителната болка, предизвикани от периферно нервно увреждане (Qian J et al, 1996; Klimscha W et al., 1998). Други автори установяват, че при интратекално въвеждане кетаминът не проявява антиноцицептивен ефект при остра термична болка при плъхове (Kawamata T et al, 2000). Антиноцицептивен ефект на кетамин е установен и при остра болка, наблюдавана при друг тест с термичен болков стимул – „tail-flick“ (Nasstrom J et al, 1992).

При ноцицептивния тест с механичен натиск на лапата, кетаминът показва ранен и кратък аналгетичен ефект (Таблица 15). Koizuka S. и съавт. (2005) установяват, че кетаминът намалява свръхчувствителността на невроните в ранния стадий при модел на постоперативна болка при плъхове. Същите автори установяват, че предтретирането с α_2 -рецепторен или серотонинов рецепторен антагонист понижава ефекта на кетамин при този модел. Тези резултати предполагат, че активирането на моноаминергичните низходящи инхибиторни пътища заемат важно място в механизма на аналгетичния ефект на кетамин при този болков модел. Ние не можем да отхвърлим тази хипотеза.

Съществуват нови експериментални данни за ролята на спиналните астроцити, най-голямата популация от клетки в гръбначния мозък, в ноцицепцията и антиноцицепцията на спинално ниво (Scholz et Woolf, 2007). Mei X. и съавт (2009) установяват, че при модел на невропатна болка чрез лигиране на гръбначномозъчен нерв, интратекалното въвеждане на кетамин намалява механичната алодиния. Тези автори установяват, че интратекалното въвеждане на кетамин намалява астроцитната активация в задноголовите неврони в лумбалния отдел на гръбначния мозък, измерена чрез имунохистохимичен метод. Тези резултати им позволяват да заключат, че инхибирането на астроцитната активация чрез блокиране на NMDA рецепторите върху мембраната на астроцитите е вероятно нов механизъм в аналгетичния ефект на кетамин на спинално ниво.

4.3. Ефекти на многократното прилагане на кетамин върху серумната концентрация на проинфламаторни цитокини при LPS индуциран модел на възпаление.

При модел на LPS-индуцирано възпаление установихме доза-зависимо намаление в серумните нива на TNF- α при животните многократно третирани с кетамин, като статистическа значимост се наблюдава само при най-високата доза. При същия модел на възпаление не установихме сигнификантни промени в стойностите на IL-6 при хронично третираните с кетамин животни. Нашите резултати са в съответствие с литературните данни.

TNF- α and IL-6 са основни възпалителни цитокини, продуцирани от макрофагите и участват в регулирането на имунния отговор, острата фаза на възпалението и хемопоезата (Wu, 2008). Ward JL et al (2011) при проучвания върху плъхове установяват, че кетаминът в субанестетични дози намалява серумните нива на IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α и IFN- γ при LPS-индуцирано възпаление. Същите автори съобщават, че при друг модел на възпаление – травматично мозъчно увреждане, кетаминът не оказва влияние върху увеличените мозъчни концентрации на провъзпалителните цитокини. При експериментален модел на сепсис у гризачи, Yu et al (2007) съобщават, че кетамин, приложен интравенозно намалява повишената серумна концентрация на TNF- α , но не оказва влияние върху серумното ниво на IL-6.

При експериментално проучване Wu GJ et al (2008) установяват, че кетамин инхибира продукцията на TNF- α и IL-6 в LPS активирани макрофаги. В подкрепа на противовъзпалителния ефект на кетамин са и данните от същите автори, че кетаминът намалява синтезата на TNF- α , IL-6 и IL-1 β информационна ДНК (mRNA) от LPS активирани макрофаги. Интравенозното въвеждане на липополизахарид се използва и като експериментален модел на остро белодробно увреждане, което води до увеличена продукция на възпалителни цитокини. Gokcinar et al (2013) установяват, че при този експериментален модел интравенозното въвеждане на кетамин намалява концентрацията на TNF- α както в плазмата така и в белодробната тъкан. Антиинфламаторен ефект на кетаминът е наблюдаван и при редица клинични проучвания, които установяват намаление в серумното ниво на TNF- α и IL-6 (Roussabrov E, 2008; Lu HW, 2010).

В заключение, нашите данни подкрепят съобщаваните в литературата данни за кетамин, че предизвиква намаляване концентрацията на TNF- α , но не повлиява концентрацията на IL-6 при липополизахарид предизвиканото възпаление.

Таблица 15. Сравняване ефектите на изследваните вещества при еднократно и 14-дневно прилагане, както и върху модел на хронична невропатна болка по различни тестове на аналгетично и противовъзпалително действие.

Вещество Тест	Еднократно прилагане				14-дневно прилагане				Хронична невропатна болка			
	Бенфотиа- мин	Алфа липоева к-на	Габапентин	Кетамин	Бенфотиа- мин	Алфа липо- ева к-на	Габапентин	Кетамин	Бенфотиа- мин	Алфа липоева к-на	Габапентин	Кетамин
Гореща плоча	Средна продължи- телност на аналгезията	Средна продължи- телност на аналгезията	Голяма продължи- телност на аналгезията	Кратко трайна аналгезия	Голяма продължи- телност на аналгезията	Голяма продължи- телност на аналгезията	Голяма продължи- телност на аналгезията	Голяма продължи- телност на аналгезията	Няма ефект	Късен и продължи- телен ефект	Късен и продължи- телен ефект	Късен и продължи- телен ефект
Аналгези- метър	Без ефект	Без ефект	Късен анал- гетичен ефект	Продължи- телен анал- гетичен ефект	Ранен и кратък аналгетичен ефект	Ранен и кратък аналгетичен ефект	Ранен и кратък аналгетичен ефект	Ранен и кратък аналгетичен ефект	Ранен и продължи- телен ефект	Ранен и продължи- телен ефект	Без ефект	Ранен и кратък ефект
Формали- нов тест	Повлияване на ранната и късната болкови реакции	Повлияване на ранната и късната болкови реакции	Повлияване на ранната и късната болкови реакции	Повлияване на ранната болкова реакция	Високата доза повлия ранната, а ниската доза – къс- ната болко- ва реакция	Повлияване на ранната и късната болкови реакции	Повлияване на ранната и късната болкови реакции	Повлияване на ранната болкова реакция	-	-	-	-
Плетизмо- метър	Без ефект	Продължи- телен про- тивовъзпа- лителен ефект	Потискане на начална- та и късната фаза на възпаление	Без ефект	Без ефект	Продължи- телен про- тивовъзпа- лителен ефект	Без ефект	Без ефект	-	-	-	-

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Болката е най-ранният симптом, който кара пациента да потърси лекарска помощ. Въпреки това, тя остава все още недостатъчно проучена и лечението ѝ, особено на хроничната болка е трудно. В последните години все повече се обръща внимание на комбинираното лечение на болката със средства, чийто основен механизъм на действие не е аналгетичния.

Установените от нас експериментални данни можем да обобщим в няколко направления: 1/ изследване на аналгетично и противовъзпалително действие на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при еднократно и многократно приложение, 2/ изследване на техните ефекти върху модел на хронична невропатна болка и 3/ изследване промените в серумните нива на два провъзпалителни цитокина при LPS-индуциран модел на възпаление и многократно прилагане на изследваните вещества.

При сравняване на резултатите на изследваните средства при еднократно и 14-дневно прилагане, както и при модела на хронична невропатна болка (Таблица 15), се открояват следните закономерности в техните аналгетични и противовъзпалителни ефекти:

Бенфотиамин приложен еднократно показва средна продължителност на аналгетичния ефект при теста гореща плоча, докато при 14-дневно прилагане този ефект е с голяма продължителност. Това налага извода, че бенфотиамин е по-добре да се прилага многократно в случаите на термична болка с цел постигане на по-добър обезболяващ ефект. При теста с механичен натиск бенфотиамин няма ефект при еднократно прилагане, докато при многократно проявява ранен и кратък аналгетичен ефект. Следователно бенфотиамин може да покаже аналгетичен ефект при механично предизвикана болка след многократно прилагане. При формалиновия тест бенфотиамин приложен еднократно повлиява ранната фаза на болкова реакция във високи дози, докато късната фаза на болкова реакция се повлиява от всички приложени от нас дози. Многократното 14-дневно прилагане на бенфотиамин показва по-различен ефект – високата доза повлиява ранната фаза на болкова реакция, докато ниската доза, вероятно поради кумулиране на ефекта проявява такъв върху късната фаза на болкова реакция. Налага се обобщението, че еднократното прилагане на бенфотиамин във високи дози повлиява ранната фаза, а в по-ниски приложен многократно и късната фаза на болковата реакция. Следователно бенфотиамин е надеждно средство за потискане на болки от химичен характер.

При модела на хронична болка бенфотиамин не показва аналгетичен ефект при теста гореща плоча, докато при аналгезиметър теста регистрирахме ранен и продължителен обезболяващ ефект. Следователно можем да заключим, че бенфотиаминът е по-подходящ за потискане на болки, в резултат от механичен натиск.

Противовъзпалителното действие на бенфотиамин не се доказва в нашите експерименти. Както карагенин-индуцирания оток не се променя независимо от еднократно или 14-дневно третиране с бенфотиамин, така и липополизахарид-индуцираното възпаление не промени нивата на интерлевкин 6. Установеното от нас понижение в нивото на TNF- α само от най-високата доза бенфотиамин не подкрепи тезата за наличие на значим антиинфламаторен ефект.

Алфа-липоевата киселина при еднократно приложение показва средна продължителност на аналгетичния ефект, докато при многократно 14-дневно прилагане този ефект е с голяма продължителност. Следователно алфа-липоевата киселина може да се прилага многократно с цел постигане на по-добър обезболяващ ефект при случаи на термична болка. При теста с механичен стимул алфа-липоевата киселина не показва ефект при еднократно прилагане, докато при многократно прояви ранен и кратък аналгетичен ефект. Това ни дава основание да препоръчаме многократно прилагане на алфа-липоева киселина при болка предизвикана от механичен стимул. При формалиновия тест алфа-липоевата киселина повлия ранната и късната фаза на болковата реакция, както при еднократно, така и при многократно приложение. Това налага извода, че алфа-липоевата киселина е ефикасно средство за повлияване на болки от химичен характер.

При модела на невропатна болка алфа-липоевата киселина показва продължителен аналгетичен ефект и при двата ноцицептивни модела, което налага извода, че тя е подходящ медикамент в комбинираната терапия на хроничната болка.

При карагениновия модел на възпаление алфа-липоевата киселина показва продължителен противовъзпалителен ефект при еднократно и многократно приложение. При LPS-индуцираното възпаление алфа-липоевата киселина понижи серумните нива на TNF- α , а най-ниската доза увеличи нивото на IL-6. Това налага обобщението, че алфа-липоевата киселина може да бъде ефективно средство в комбинираната терапия на възпалителни процеси.

Габапентинът приложен еднократно и многократно показва голяма продължителност на аналгетичния ефект при теста гореща плоча. При теста с механичен натиск габапентинът приложен еднократно прояви късен аналгетичен ефект,

докато при 14-дневно прилагане обезболяващия ефект беше ранен и кратък. При формалинов тест габапентинът приложен еднократно и многократно повлия и ранната, и късната фаза на болковата реакция. Тези данни ни позволяват да заключим, че габапентинът може да бъде ефикасно средство при лечение на различни по характер остри болкови синдроми.

При модела на хронична болка габапентинът показва късен и продължителен аналгетичен ефект само при теста гореща плоча. Тези данни потвърждават обезболяващият ефект на габапентин при невропатна болка, особено предизвикана от топлинен стимул.

При карагенин-индуцирания модел на възпаление габапентин приложен еднократно потисна началната и късната фаза на възпалителния отговор, докато при многократно приложение не показва противовъзпалителен ефект. При LPS-индуцирания модел на възпаление габапентинът не промени нивата на IL-6 и TNF- α . Установените резултати от изследване на противовъзпалителното действие на габапентина ни дава основание да препоръчаме еднократното прилагане на габапентин при използването му като противовъзпалително средство поради по-изразен антиинфламаторен ефект.

Кетамин приложен еднократно показва кратка продължителност на аналгетичния ефект при теста гореща плоча, докато при 14-дневно приложение този ефект е с голяма продължителност. При теста с механичен натиск кетаминът при еднократно прилагане проявява продължителен аналгетичен ефект, докато при многократно приложение този ефект е кратък. Следователно кетаминът проявява по-добър обезболяващ ефект при случаите на термична болка, ако се прилага многократно, а при механично предизвикана болка е по-добре еднократното му приложение. При формалиновия тест кетаминът повлиява само ранната фаза на болковата реакция както при еднократно, така и при многократно приложение. Това ни дава основание да заключим, че кетаминът е надеждно средство за потискане на болки от химичен произход.

При модел на хронична болка кетаминът прояви късен и продължителен обезболяващ ефект при теста гореща плоча и ранен и продължителен – при теста с механичен натиск. Следователно кетаминът е надеждно адювантно средство при лечение на хронична невропатна болка.

При нашите експерименти не се доказа противовъзпалително действие на кетамин при карагениновия модел на възпаление при еднократно и многократно му прилагане. При модела на LPS-индуцирано възпаление кетаминът промени нивата само на TNF- α .

ИЗВОДИ

1. Бенфотиаминът при еднократно прилагане проявява аналгетична активност при тестовете с топлинен и химичен болков стимул, а при многократно третиране аналгетична активност се установи при трите ноцицептивни теста. При карагениновия модел на възпаление не се установи противовъзпалителен ефект.
2. Алфа-липоевата киселина при еднократно прилагане прояви аналгетичен ефект при тестовете с топлинен и химичен болков стимул, а при многократно прилагане тя показва аналгетична активност при трите ноцицептивни теста. При карагениновия модел на възпаление тя прояви значим противовъзпалителен ефект както при еднократно, така и при многократно приложение.
3. Габапентинът при еднократно и многократно прилагане показва аналгетичен ефект при всички използвани тестове. При карагенин-индуцирания модел на възпаление противовъзпалителен ефект се установи само при еднократното му приложение.
4. Кетаминът показва изразен антиноцицептивен ефект при еднократно прилагане и механично предизвикана болка и при многократно прилагане и термична болка. Не прояви противовъзпалителен ефект при карагенинов модел на възпаление.
5. При модел на невропатна болка габапентинът, алфа-липоевата киселина и кетаминът проявяват аналгетична активност, докато бенфотиаминът не показва аналгетична активност при теста с топлинен болков стимул.
6. При модел на невропатна болка бенфотиаминът, алфа-липоевата киселина и кетаминът проявяват аналгетична активност, докато габапентинът не показва аналгетична активност при теста с механичен болков стимул.
7. При липополизахарид-индуцирания модел на възпаление бенфотиаминът и габапентинът не проявиха значим ефект върху нивата на TNF- α , докато алфа-липоевата киселина и кетаминът понижиха нивата на TNF- α . Не се установи понижение на нивата на IL-6 при всички изследвани вещества, приложени многократно.

ПРИНОСИ

1. С предимно научен характер

1.1. Установена е аналгетичната активност на изследваните вещества при еднократно и многократно прилагане при модели на болка с термичен, механичен и химичен стимул.

1.2. Установена е противовъзпалителната активност на изследваните вещества при еднократно и многократно прилагане при модел на карагенин-индуцирано възпаление. За първи път е установена противовъзпалителна активност на габапентин при модел на остро ексудативно възпаление.

1.3. Установена е аналгетичната активност на изследваните вещества приложени многократно върху модел на хронична невропатна болка.

1.4. Изследвани са промените в нивата на на TNF- α и IL-6 при многократно прилагане на изследваните вещества при модел на LPS-предизвикано възпаление.

2. Спредимно приложен характер

2.1. Бенфотиамин е надеждно средство за потискане на остра и хронична невропатна болка, както еднократно, така и многократно приложен, но е лишен от противовъзпалителен ефект.

2.2. Алфа-липоевата киселина е с изразен аналгетичен ефект спрямо остра и хронична невропатна болка (еднократно и многократно приложена) и показва продължителен противовъзпалителен ефект.

2.3. Габапентин е ефикасно средство за лечение на болки от различен характер, приложен еднократно или многократно. Като противовъзпалително средство габапентин проявява ефект при еднократно прилагане и може да се приложи в клиничната практика за овладяване на остри възпалителни болкови прояви.

2.4. Кетамин (еднократно или многократно приложен) може да се използва за потискане на различни остри болкови реакции, на хронична невропатна болка, но не проявява противовъзпалителен ефект.

2.5. Използваните модели и схеми на проучване на фармакологични средства имат приложен характер за обучение на специализанти по фармакология.

ЛИТЕРАТУРА

1. Миланов И (2009) Болка в неврологичната практика. Монография. София, издателство „Медицина и физкултура“.
2. Константинов С, Цветкова В, Краевски П, Момеков Г, Цанова Ц, Караиванова М, Казаков Л, Власковска М (2011) Бенфотиамин : възможности за включване при антинеопластична терапия и лечение на болката. Лекарска практика 3 : 32-36.
3. Abacioglu N, Demir S, Cakici I et al (2000) Role of guanylyl cyclase activation via thiamine in suppressing chemically-induced writhing in mouse. *Arzneim Forsch* 50: 554-558.
4. Abbas ZG, Swai AB (1997) Evaluation of the efficacy of thiamine and pyridoxine in the treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy. *East Afr Med J* 74:803-808.
5. Abdul HM, Butterfield DA (2007) Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-Lcarnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Free Radic Boil Med* 42: 371-384.
6. Adams HA, (1998) Mechanisms of action of ketamine. *Anaesthesiol Reanim* 23(3): 60-63.
7. Adibhalta RM, Hatcher JF (2008) Phospholipase A2 reactive oxygen species and lipid peroxidation in CNS pathologies. *BMB Rep* 41: 560-567.
8. Arnalich F, Garcia-Palomero E, López J, Jiménez M, Madero R, Renart J, Vázquez JJ, Montiel C (2000) Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect Immun* 68: 1942-1945.
9. Ang CD, Alviar MJ, Dans AL et al (2008) Vitamin B for treating peripheral neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev* 16.
10. Arcos M, Palanca JM, Montes F, Barrios C (2013) Antioxidants and gabapentin prevent heat hypersensitivity in a neuropathic pain model. *Journal of Investigative Surgery* 26: 109-117.
11. Attal N, Cruccu G, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS et al (2006) EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *European Journal of Neurology* 13: 1153-1169.
12. Authier N, Gillet JP, Fialip J, Eschalier A, Coudore (2003) A new animal model of vincristine-induced nociceptive peripheral neuropathy. *Neurotoxicology* 24: 797-805.
13. Azevedo VM, Lauretti GR, Pereira NL, Reis MP (2000) Transdermal ketamine as an adjuvant for postoperative analgesia after abdominal gynaecological surgery using lidocaine epidural blockade. *Anesth Analg* 91: 1479-82.
14. Babaei- Jadidi R, Karachalias N, Ahmed N et al (2003) Prevevntion of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. *Diabetes* 52: 2110-2120.

15. Baker H, Frank O (1976) Absorption, utilization and clinical effectiveness of allithiamines compared to water-soluble thiamines. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 22 (Suppl): 63-68.
16. Bardin L, Lavarenne J, Eschalier A (2000) Serotonin receptor subtype involve in the spinal antinociceptive effects of 5-HT in rats. *Pain* 86: 11-18.
17. Barrera P, van der Maas A, van Ede AE, Kiemeney BA, Laan RF et al (2002) Drug survival, efficacy and toxicity of monotherapy with a fully human antitumor necrosis factor-alpha antibody compared with methotrexate in long-standing rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 41: 430-439.
18. Basta G, Schmidt AM, De Caterina R (2004) Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* 63: 582-592.
19. Becker A, Peters B, Schroeder H et al (2003) Ketamine-induced change in rat behavior: a possible animal model of schizophrenia. *Neuro-Psych&Biolog Psych* 27:687-700.
20. Ben-Menachem E (2004) Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice. *Epilepsia* 45: 13-18.
21. Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33: 87-107.
22. Bernstein AL, Loitz CS (1998) Clinical and electrophysiological study of the treatment of painful diabetic neuropathies with pyridoxine. *Curr Top Nutr Dis* 19: 411-423.
23. Bertrand S, Ng GY, Purisai MG et al (2001) The anticonvulsant, antihyperalgesic agent gabapentin is an agonist at brain gamma-aminobutyric acid type B receptors negatively coupled to voltage-dependent calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 15-24.
24. Bettendorff L, Weewers L, Wins P, Schoffeniels E (1990) Injection of sulbutiamine induces an increase in thiamine triphosphate in rat tissues. *Biochem Pharmacol* 40:2557-2560.
25. Beutler B and Cerami A (1986) Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature*. 320: 584-588.
26. Bhangoo SK, Ren D, Miller RJ. et al (2007) CXCR4 chemokine receptor signaling mediates pain hypersensitivity in association with antiretroviral toxic neuropathy. *Brain Behav. Immun.* 21: 581-591.
27. Bitar MS, Ayed AK, Abdel-Halim SM, Isenovic ER, Al-Mulla F (2010). Inflammation and apoptosis in aortic tissues of aged type II diabetes: amelioration with α -lipoic acid through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. *Life Sci* 86: 844-853.
28. Bitsch R (1989) Lipidlösliche Thiaminderivate. *Dtsch Apotheker Z* 129: 65-68.
29. Bitsch, R, Wolf, M, Moller J, Heuzeroth L, Gruneklee, D (1991) Bioavailability assessment of the lipophilic benfotiamine as compared to a water-soluble thiamin derivative. *Ann. Nutr. Metab* 35: 292-296.

30. Bockbrader HN, Weshe D, Miller R, Chapel S, Janiczek N, Burger P (2010) A comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pregabalin and gabapentin. *Clin Pharmacokinet* 49: 661-669.
31. Bozic I, Savic D, Laketa D, Bjelobaba I, Milenkovic I, Pekovic S, Nedeljkovic N, Lavrnja I (2015) Benfotiamine Attenuates Inflammatory Response in LPS Stimulated BV-2 Microglia. *PLoS ONE* 10(2): e0118372. doi:10.1371/journal.pone.0118372.
32. Bredlau AL, Thakur R, Korones DN et al (2013) Ketamine for pain in adults and children with cancer: a systematic review and synthesis of the literature. *Pain Med* 14: 1505-1517.
33. Briggs SL, Rech RH, Sawyer DC (1998) Kappa antinociceptive activity of supra doline in the cold-water tail-flick assay in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 60: 467-472.
34. Bulutcu F, Dogrul A, Guc MO (2002). The involvement of nitric oxide in the analgesic effects of ketamine. *Life Sci* 71: 841-853.
35. Burton AW, Lee DH, Saab C, Chung JM (1999) Preemptive intrathecal ketamine injection produces a long-lasting decrease in neuropathic pain behaviors in a rat model. *Reg. Anesth. Pain Med* 24: 208-213.
36. Butterworth RF, Kril JJ, Harper CG (1993) Thiamine-dependent enzyme changes in the brains of alcoholics: relationship to the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 1084-1088.
37. Cadirci E, Altunkaynak BZ, Halici Z, Odabasoglu F, Uyanik, MH, Gundogdu C, Suleyman H, Halici M, Albayrak M, Unal, B (2010) Alpha-lipoic acid as a potential target for the treatment of lung injury caused by cecal ligation and puncture-induced sepsis model in rats. *Shock* 33: 479-484.
38. Camara C, Ramos HF, da Silva AP, Araujo C et al (2013) Oral gabapentin treatment accentuates nerve and peripheral inflammatory responses following experimental nerve constriction in Wistar rats. *Neuroscience Letters* 93-98.
39. Caram-Salas NL, Reyes-Garcia G, Medina-Santillan R, Granados-Soto V (2006) Thiamine and Cyanocobalamin relieve neuropathic pain in rats: synergy with dexamethasone. *Pharmacology* 77: 53-62.
40. Carstens E and Wilson C (1993) Rat tail flick reflex: magnitude measurement of stimulus-response function, suppression by morphine and habituation. *J Neurophysiol* 70: 630-639.
41. Cesena RM, Calcutt NA (1999) Gabapentin prevents hyperalgesia during the formalin test in diabetic rats. *Neuroscience Letters* 262: 101-4.
42. Chen SR, Eisenach JC, McCaslin PP, Pan HL (2000) Synergistic effect between intrathecal non-NMDA antagonist and gabapentin on allodynia induced by spinal nerve ligation in rats. *Anesthesiology* 92: 500-6.

43. Chen YW, Li YT, Chen YC, Li ZY, Hung CH (2012) Exercise training attenuates neuropathic pain and cytokine expression after chronic constriction injury of rat sciatic nerve. *Anesth Analg* 114: 1330-1337.
44. Chiang HY, Chen CT, Chien HF, Hsieh ST (2005) Skin denervation, neuropathology, and neuropathic pain in a laser-induced focal neuropathy. *Neurobiol. Dis.* 18: 40–53.
45. Chichorro JG, Lorenzetti BB, Zampronio AR (2004) Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. *Br. J. Pharmacol.* 141: 1175-1184.
46. Chipkin RE, Latranyi MB, Iorio LC, Bamett A (1983) Determination of analgesic drug efficacies by modification of the Randall and Selitto rat yeast test. *J Pharmacol Methods* 10: 223-229.
47. Chizh BA, Eide PK, (2002) Therapeutic potential of ionotropic glutamate receptor antagonists and modulators. F. P. Graham Publishing, Johnson City 263-300.
48. Chizh BA and Headley PM (2005) NMDA antagonists and neuropathic pain-multiple drug targets and multiple uses. *Curr Pharm Des* 11: 2977-2994.
49. Cho YS, Lee J, Lee TH et al (2004) α -lipoic acid inhibits airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114: 429-435.
50. Chong MS, Bajwa ZH (2003) Diagnosis and treatment of neuropathic pain. *J Pain Symptom Manage* 25 (5), S4-S11.
51. Christoph T, Schiene K, Englberger W, Parsons CG, Chizh BA (2006). The antiallodynic effect of NMDA antagonists in neuropathic pain outlasts the duration of the in vivo NMDA antagonism. *Neuropharmacology* 51: 12-7.
52. Collins SL, Moore RA, McQuay DM, Wiffen P (2000) Antidepressants and anticonvulsants for diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia: a quantitative systematic review. *Journal of Pain and Symptom Management* 20: 449-58.
53. Courteix C, Eschalier A, Lavarenne J (1993) Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain* 53: 81–88.
54. Correll GE, Maleki J, Gracely EJ et al (2004) Subanesthetic ketamine infusion therapy: a retrospective analysis of a novel therapeutic approach to complex regional pain syndrome. *Pain Med* 5: 263-275.
55. Corssen G, Domino EF (1996) Dissociative anesthesia: further pharmacologic studies and first clinical experience with the phencyclidine derivative CI-581. *Anesth Analg* 45: 29-40.
56. Dalziel RG, Bingham S, Sutton D et al. (2004) Allodynia in rats infected with varicella zoster virus – a small animal model for post-herpetic neuralgia. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 46: 234–242.

57. Danysz W, Kozela E, Parsons CG et al (2005) Peripherally acting NMDA receptor/glycine B site receptor antagonists inhibit morphine tolerance. *Neuropharmacology* 48: 360-371.
58. Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87: 149–158.
59. Dennis S and Melzack R (1983) Perspective on phylogenetic evolution of pain expression. *Animal Pain* 151-160.
60. Dixit RK, Bhargava VK (2002) Neurotransmitter mechanisms in gabapentin antinociception. *Pharmacology* 65: 198-203.
61. Dooley DJ, Mieske CA, Borosky SA (2000) Inhibition of K (+)-evoked glutamate release from rat neocortical and hippocampal slices by gabapentin. *Neuroscience Letters* 280: 107-10.
62. Du J, Zhou S, Coggeshall RE, Catlon SM (2003). N-methyl-D-aspartate- induced excitation and sensitization of normal and inflamed nociceptors. *Neuroscience* 118(2): 547-562.
63. Dubuisson D and Dennis SG (1977) The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4:161–174.
64. Dulundu E, Ozel Y, Topaloglu U, et al (2007) Alpha-lipoic acid protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Pharmacology* 79(3):163-170.
65. Errante LD, Petroff OAC (2003). Acute effects of gabapentin and pregabalin on rat forebrain cellular GABA, glutamate, and glutamine concentrations. *Seizure* 12:300-306.
66. Fang ZP and Mortimer JT (1991) Selective activation of small motor axons by quasi-trapezoidal current pulses. *IEEE Trans Biomed Eng* 38:168–174.
67. Fehrenbacher JC, Taylor CP, Vasko MR (2003) Pregabalin and gabapentin reduce release of substance P and CGRP from rat spinal tissues only after inflammation or activation of protein kinase C. *Pain* 105: 133-144.
68. Feingold KR, Hardardottir I and Grunfeld C (1998) Beneficial effects of cytokine induced hyperlipidemia. *Z. Ernahrungswiss.* 37: 66–74.
69. Field MJ, Oles OJ, Lewis AS et al (1997). Gabapentin (Neurontin) and S-(+)-3-isobutyl GABA represent a novel class of selective antihyperalgesic agents. *British Journal of Pharmacology* 121:1513-1522.
70. Field MJ, McCleary S, Hughes J, Singh L (1999) Gabapentin and pregabalin, but not morphine and amitriptyline, block both static and dynamic components of mechanical allodynia induced by streptozocin in the rat. *Pain* 80: 391-8.

71. Field MJ, Hughes J, Singh L (2000) Further evidence for the role of the $\alpha_2\delta$ subunit of voltage dependent calcium channels in models of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 131: 282-286.
72. Field MJ, Cox PJ, Stott E, Melrose H, Offord J et al (2006) Identification of the $\alpha_2\delta-1$ subunit of voltage dependent calcium channels as a novel molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci* 17537-17542.
73. Fink K, Meder W, Dooley D, Gothert M (2000). Inhibition of neuronal Ca (2+) influx by gabapentin and subsequent reduction of neurotransmitter release from rat neocortical slices. *British Journal of Pharmacology* 130: 900-6.
74. Fisher K, Coderre TJ, Hagen NA (2000) Targeting the N-methyl-D-aspartate receptor for chronic pain management. Preclinical animal studies, recent clinical experience and future research directions. *J Pain Symptom Manage* 20: 358-373.
75. Fosmark DS, Torjesen PA, Kilhoovd BK et al (2006) Increased serum levels of the specific advanced glycation end product methylglyoxal-derived hydroimidazolone are associated with retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 55: 232-236.
76. Franca DS, Souza AL, Almeida KR et al (2001) B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. *Eur J Pharmacol* 421: 157-164.
77. Frank RAW, Leeper FJ, Luisi BF (2007) Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. *Cell Mol Life Sci* 64: 892-905.
78. Fujiwara M, (1954) Allithiamine: a newly found derivative of vitamin B₁. *J. Biochem. (Tokyo)* 2: 273-285.
79. Fu GQ, Carstens E, Stelzer B, Zimmermann M (1998) B vitamins suppress spinal dorsal horn nociceptive neurons in the cat. *Neurosci Lett* 95: 3192-3197.
80. Fujiwara M, (1976) Allithiamine and its properties. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 22 (Suppl): 57-62.
81. Gabay E, Tal M (2004) Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. *Pain* 110: 354-360.
82. Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Reus GZ et al (2008) Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32: 140-144.
83. Ghibu S, Richard C, Vergely C, Zeller M et al (2009) Antioxidant properties of an endogenous thiol: Alpha – lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 54: 391-398.
84. Giamberardino MA, Valente R, Debigontina P, and Vecchiet L (1995) Artificial ureteral calculosis in rats: behavioral characterization of visceral pain episodes and their relationship with referred lumbar muscle hyperalgesia. *Pain* 61:459–469.

85. Goraca A and Aslanowicz-Antkowiak K (2009) Prophylaxis with α -lipoic acid against lipopolysaccharide-induced brain injury in rats. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 57: 141-146.
86. Goraca A, Piechota A, Huk-Kolega (2009) Effect of alpha-lipoic acid on LPS-induced oxidative stress in the heart. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60: 61-68.
87. Greb A, Bitsch R (1998) Comparative bioavailability of various thiamine derivatives after oral administration. *Int J Clin Pharmacol Ther* 36: 216-221.
88. Green SM, Rothrock SG, Lynch EL, Ho M, Harris T, Hestdalen R et al (1998) Intramuscular ketamine for pediatric sedation in the emergency department: safety profile in 1,022 cases. *Ann Emerg Med* 31(6), 688-697.
89. Griesbacher T, Amann R, Sametz W, Diethart S, Juan H (1998) The nonpeptide B2 receptor antagonist FR173657: inhibition of effects of bradykinin related to its role in nociception. *Br J Pharmacol* 124:1328–1334.
90. Gu Y, Huang L-YM (2002). Gabapentin potentiates NMDA receptor mediated currents in rat GABAergic dorsal horn neurons. *Neurosci Lett* 324:177-180.
91. Gustafsson H, Flood K, Berge OG, Brodin E et al (2003) Gabapentin reverses mechanical allodynia induced by sciatic nerve ischemia and formalin-induced nociception in mice. *Experimental Neurology* 182: 427-434.
92. Hains BC, Willis WD, Hulsebosch CE (2003) Temporal plasticity of dorsal horn somatosensory neurons after acute and chronic spinal cord hemisection in rat. *Brain Res* 970: 238-241.
93. Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, Lin J, Bierhaus A, Nawroth P, Hannak D, et al (2003) Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med* 9: 294-299.
94. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32: 77-88.
95. Harrison NL, Simmonds MA (1985) Quantitative studies on some antagonists of N-methyl-D-aspartate in slices of rat cerebral cortex. *Br J Pharmacol* 84 (2), 381-391.
96. Harrison NL, Simmonds, MA (1985) Quantitative studies on some antagonists of N-methyl-D-aspartate in slices of rat cerebral cortex. *Br J Pharmacol* 84: 381-391.
97. Hartving P, Linder KL, Bjurling P et al (1995) Pyridoxine effect on synthesis rate of serotonin in the monkey brain measured with positron emission tomography. *J Neural Transm Gen Sect* 102: 91-97.
98. Hasnie FS, Breuer J, Parker S et al (2007) Further characterization of a rat model of varicella zoster virus-associated pain: relationship between mechanical hypersensitivity and anxiety-related behavior, and the influence of analgesic drugs. *Neuroscience* 144: 1495–1508.

99. Herrero JF, Laird JM, Lopez-Garcia JA (2000) Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol* 61:169–203.
100. Hill GE, Anderson JL, Whitten CW (1999) Ketamine inhibits agonist-induced cAMP accumulation increase in human airway smooth muscle cells. *Can J Anaesth* 46:1172-1177.
101. Himmelseher S, Durieux M. E (2005) Revising a dogma: ketamine for patients with neurological injury. *Anesth Analg* 101, 524-534.
102. Hocking G, Cousins M (2003) Ketamine in chronic pain management: an evidence-based review. *Anesth Analg* 97: 1730-1739.
103. Hulsebosch CE, Xu GY, Perez-Polo JR et al (2000) Rodent model of chronic central pain after spinal cord contusion injury and effects of gabapentin. *J Neurotrauma* 17: 1205-1217.
104. Jaggi SA, Jain V, Singh N (2009) Animal models of neuropathic pain. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 25, doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x.
105. Jansen B, Donath W (1926). The isolation of the anti beri beri vitamin. *Nutr Rev* 40:53-55.
106. Jasmin L, Kohan L, Franssen M, Janni G, Goff JR (1998) The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. *Pain* 75: 367-382.
107. Jensen AA, Mosbacher J, Elg S et al (2002) The anticonvulsant gabapentin (Neurontin) does not act through γ -aminobutyric acid-B receptors. *Mol Pharmacol* 61: 1377-1384.
108. Jones DL, Sorkin LS (1998) Systemic gabapentin and S (+)-3-isobutyl-gamma-aminobutyric acid block secondary hyperalgesia. *Brain Research* 810: 93-9.
109. Jourdan D, Ardid D, Bardin L, Bardin M, Neuzeret D, Lanphouthacoul L, and Eschalier A (1997) A new automated method of pain scoring in the formalin test in rats. *Pain* 71:265–270.
110. Kapur S, Seeman P (2001) Ketamine has equal affinity for NMDA receptors and the high-affinity state of the dopamine D2 receptor. *Biol. Psychiatry* 49, 954-957.
111. Kawamata T, Omote K, Sonoda H et al (2000) Analgesic mechanisms of ketamine in the presence and absence of peripheral inflammation. *Anesthesiology* 93: 520-528.
112. Kiefer RT, Rohr P, Ploppa A, Dieterich HJ et al (2008) Efficacy of ketamine in anesthetic dosage for the treatment of refractory complex regional pain syndrome: an open-label phase II study. *Pain Med* 9: 1173-1201.
113. Kilic FS, Sirmagul B, Yildirim E et al (2012) Antinociceptive effects of gabapentin& its mechanism of action in experimental animal studies. *Indian J Med Res* 135: 630-635.
114. Kim HJ, Lee HS, Chong YH, Kang JL (2006) p38 mitogen-activated protein kinase up-regulates LPS-induced NF-kappaB activation in the development of lung injury and RAW 264.7 macrophages. *Toxicology* 225: 36–47.

115. Kim SH, Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50: 355–363.
116. King TE, Joynes RL, Grau JW (1997) Tail flick test: The role of supraspinal systems and avoidance learning. *Behav Neurosci* 111: 754-767.
117. Klimscha W, Horvath G, Szikszay M et al (1998) Antinociceptive effect of the S(+)-enantiomer of ketamine on carrageenan hyperalgesia after intrathecal administration in rats. *Anesth Analg* 86: 561-565.
118. Koizuka S, Obata H, Sasaki M et al (2005) Systemic ketamine inhibits hypersensitivity after surgery via descending inhibitory pathways in rats. *Can J Anesth* 52: 498-505.
119. Kollender Y, Bickels J, Stocki D, Maruoani N, Chazan S, Nirkin A, Meller I, Weinbroum AA (2008) Subanaesthetic ketamine spares postoperative morphine and controls pain better than standard morphine does alone in orthopaedic-oncological patients. *Eur. J. Cancer* 44: 954-962.
120. Koltzenburg M, Torebjork HE, Wahren LK (1994) Nociceptor modulated central sensitization causes mechanical hyperalgesia in acute chemogenic and chronic neuropathic pain. *Brain* 117: 579-591.
121. LaBuda CJ, Little PJ (2005) Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat. *J. Neurosci. Methods* 144: 175–181.
122. Laird MA, Gidal BE (2000) Use of gabapentin in the treatment of neuropathic pain. *Annals of Pharmacotherapy* 34: 802-7.
123. Leach JP, Sills GJ, Butler E, Forrest G et al (1997) Neurochemical actions of gabapentin in mouse brain. *Epilepsy Res* 27: 175-180.
124. Lee BS, Jun IG, Kim SH, Park JY (2013) Intrathecal Gabapentin Increases Interleukin-10 Expression and Inhibits Pro-Inflammatory Cytokine in a Rat Model of Neuropathic Pain. *J Korean Med Sci* 28: 308-314.
125. Le Bars D, Gozariu M, Cadden WS (2001) Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53: 597-652.
126. Lee J, Cox D, Mook D, McCarty R (1990) Effect of hyperglycemia on pain threshold in alloxan-diabetic rats. *Pain* 40: 105–107.
127. Lee WY, Orestes P, Latham J, et al. (2009) Molecular mechanisms of lipoic acid modulation of T-type calcium channels in pain neuropathy. *J. Neurosci* 29(30): 9500-9509.
128. Li CY, Song YH, Higuera ES, Luo ZD (2004) Spinal dorsal horn calcium channel $\alpha 2\delta$ -1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J Neurosci* 24: 8494-8499.
129. Liu SF, Malik AB (2006) NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol* 290: 622–645.

130. Lonsdale D (2004) Thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide: a little known therapeutic agent. *Med Sci Monit* 10: 199-203.
131. Ma W, St-Jacques B, Duarte PC (2012) Targeting pain mediators induced by injured nerve-derived COX2 and PGE2 to treat neuropathic pain. *Expert Opin Ther Targets* 16: 527-540.
132. Machado-Vieira R, Salvadore G, Diazgranados N, Zarate CA (2009) Ketamine and the next generation of antidepressants with a rapid onset of action. *Pharmacol Ther* 123 (2): 143-150.
133. Macres S, Richeimer S, Duran P (2004) Adjuvant analgesics. Principles and practice of pain medicine 627-638.
134. Maeng S, Zarate CA, Du J, Schloesser RJ et al (2008) Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry* 4: 349-352.
135. Maneuf YP, Blake R, Andrews NA, McKnight AT (2004) Reduction by gabapentin of K⁺-evoked release of [³H]-glutamate from the caudal trigeminal nucleus of the streptozotocin-treated rat. *Brit J Pharmacol* 141: 574-579.
136. Maneuf YP, Luo ZD, Lee K (2006) $\alpha 2\delta$ and the mechanism of action of gabapentin in the treatment of pain. *Cell & Developmental Biology* 17: 565-570.
137. Mao J (1999). NMDA and opioid receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. *Brain Res. Rev* 30: 289-304.
138. Marcus R, Coulston AM (1996) Water-soluble vitamins: the vitamin B complex and ascorbic acid. *Googman& Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics* 1555-1572.
139. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM (2007) TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13525–13530.
140. Mei X, Wang W, Li Y, Zhang H et al (2009) Inhibiting astrocytic activation: a novel analgesic mechanism of ketamine at the spinal level. *J of Neuroch* 109: 1691-1700.
141. Mjellem-Joly N, Lund A, Berge OG, Hole K (1991). Potentiation of behavioural response in mice by spinal coadministration of substance P and excitatory amino acid agonists. *Neurosci Lett* 133(1): 121-4.
142. Moallem SA, Hosseinzadeh H, Farahi S (2008) A study of acute and chronic antinociceptive and anti-inflammatory effects of thiamine in mice. *Iran Biomed J* 12: 173-178.
143. Morello CM, Leckband SG, Stoner CP et al (1999) Randomized double-blind study comparing the efficacy of gabapentin with amitriptyline on diabetic peripheral neuropathy pain. *Arch. Intern. Med.* 159: 1931-1937.

144. Moura FA, de Andrade KQ, dos Santos CF, Goulart MOF (2015) Lipoic acid: its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 15 (6) 1-26.
145. Nadeson R, Tucker A, Bajunaki E, Goodchild CS (2002). Potentiation by ketamine of fentanyl antinociception. I. An experimental study in rats showing that ketamine administered by non-spinal routes targets spinal cord antinociceptive systems. *Br. J. Anaesth.* 88: 685-691.
146. Narita M, Miyoshi K, Narita M, Suzuki T (2007) Involvement of microglia in the ethanol-induced neuropathic pain-like state in the rat. *Neurosci. Lett.* 414: 21–25.
147. Nasstrom J, Karlsson U, Post C (1992) Antinociceptive actions of different classes of excitatory amino acid receptor antagonists in mice. *Eur J Pharmacol* 212: 21-29.
148. Navarro X, Vivo M, Valero-Cabre A (2007) Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog. Neurobiol.* 82: 163-201.
149. Ness TJ and Gebhart GF (1988) Colorectal distension as a noxious visceral stimulus. Physiologic and pharmacologic characterisation of pseudoaffective reflexes in the rat. *Brain Res* 450:153–169.
150. Neufeld EJ, Fleming JC, Tartaglini E, Steinkamp MP (2001) Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome: a disorder of high-affinity thiamine transport. *Blood Cells Mol Dis* 27:135-138.
151. Nixon PF, Price J, Norman-Hick M, Williams GM, Kerr RA (1990) The relationship between erythrocyte transketolase activity and the “TPP effect” in Wernicke's encephalopathy and other thiamine deficiency states. *Clin Chim Acta* 192: 89-98.
152. Novotny L, Rauko P, Cojocel C (2008) α -Lipoic acid – the potential for use in cancer therapy. *Neoplasma* 55: 81-86.
153. O'Callaghan JP and Holzman SG (1975) Quantification of the analgesic activity of narcotic antagonists by a modified hot plate procedure. *J Pharmacol Exp Ther* 192: 497-505.
154. Odabasoglu F, Halici Z, Aygun H et al (2011) lipoic acid has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: an experimental study in rats with carrageenan-induced acute and cotton pellet-induced chronic inflammations. *British Journal of Nutrition* 105: 31-43.
155. Pácal L, Kuricová K, Kaňková K (2014) Evidence for altered thiamine metabolism in diabetes: Is there a potential to oppose gluco- and lipotoxicity by rational supplementation? *World J Diabetes* 15; 5: 288–295.
156. Packer L, Tritschler HJ, Wessel K (1997) Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med* 22: 359-378.
157. Packer L (1998) α -Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF- κ B signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug Metab Rev* 30: 245-275.

158. Parker DAS, Ong J, Marino V, Kerr DIB (2004) Gabapentin activates presynaptic GABA-B heteroreceptors in rat cortical slices. *Eur J Pharmacol* 495:137-143.
159. Partridge BJ, Chaplan SR, Sakamoto E, Yaksh TL (1998). Characterization of the effects of gabapentin and 3-isobutyl-(γ -aminobutyric acid) on substance-P induced thermal hyperalgesia. *Anesthesiology* 88: 196-205.
160. Patel MK, Gonzales MI, Bramwell S et al (2000). Gabapentin inhibits excitatory synaptic transmission in the hyperalgesic spinal cord. *British Journal of Pharmacology* 130: 1731-4.
161. Patel MS, Vettakkorumakankav NN (1995) Lipoic acid-requiring proteins: recent advances. In: *Biothiols in Health and Disease*. Ed. Packer L, Cadenas E, Marcel Dekker Inc., New York, 373–388.
162. Pauling L (1968) Orthomolecular psychiatry. Varying the concentrations of substances normally present in the human body may control mental disease. *Science*, 1968, 160, 265–271.
163. Perkins MN, Campbell E, Dray A (1993) Antinociceptive activity of the bradykinin B1 and B2 receptor antagonists, des-Arg9, (Leu8) – BK and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. *Pain* 53: 191-197.
164. Qian J, Brown SD, Carlton SM (1996) Systemic ketamine attenuates nociceptive behaviors in rat model of peripheral neuropathy. *Brain Res* 715: 51-62.
165. Rabben T, Skjelbred P, Oye I (1999) Prolonged analgesic effect of ketamine, an NMDA receptor inhibitor, in patients with chronic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 1060-1066.
166. Randall LO and Selitto JJ (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 111: 409-419.
167. Reyes-Garsia G, Castillo-Henkel C, Medina-Santillan R et al (2002) Mechanisms of analgesic action of B vitamins in formalin-induced inflammatory pain. *Proc West. Pharmacol Soc.* 144-146.
168. Rice AS and Maton S (2002) Gabapentin in postherpetic neuralgia: a randomized, double blind, placebo controlled study. *Pain* 94: 215-224.
169. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA (2003) The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 112: 460-467.
170. Rindi G, Lafarenza U (2000) Thiamine intestinal transport and related issues: recent aspects. *PSEBM* 224:246-255.
171. Romero TR, Duarte ID (2013) Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by ketamine. *Vet Anaesth Analg* 40: 419-424.
172. Sanchez-Ramirez GM, Caram-Salas NL, Rocha-Gonzalez HI et al (2006) Benfotiamine relieves inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol* 48-53.

173. Sasamura T, Nakamura S, Iida Y et al. (2002) Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. *Eur. J. Pharmacol.* 441: 185–191.
174. Schmid U, Stopper H, Heidland A, Schupp N (2008) Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro. *Diabetes Metab Res Rev* 24: 371-377.
175. Schupp N, Dette EM, Schmid U (2008) Benfotiamine reduces genomic damage in peripheral lymphocytes of hemodialysis patients. *Naunym Schmiedebergs Arch Pharmacol* 378: 283-291.
176. Sebekova K, Faist V, Hofmann T, Schinzel R, Heidland A (2003) Effects of a diet rich in advanced glycation end products in the rat remnant kidney model. *Am J Kidney Dis* 41: 48-51.
177. Sehirli O, Sener E, Cetinel S, Yuksel M, Gedik N, Sener G (2008) Alpha-lipoic acid protects against renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 35(3):249-255.
178. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43: 205–218.
179. Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM (2009) Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 1790(10): 1149–1160.
180. Shen HH, Lam KK, Cheng PY, Kung CW, Chen SY, Lin PC, Chung MT, Lee YM (2015) Alpha lipoic acid prevents endotoxic shock and multiple organ dysfunction syndrome induced by endotoxemia in rats. *Shock* 43 (4): 405-411.
181. Sherrington CS (1910) Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex and reflex stepping and standing. *J Physiol (Lond)* 40: 28-121.
182. Shimoyama N, Shimoyama M, Davis AM et al (1997) Spinal gabapentin is antinociceptive in the rat formalin test. *Neuroscience Letters* 222: 65-67.
183. Shinozaki H, (1976) Cardiac action of thiamine derivatives in guinea pig atria, *J Nutr Sci Vitaminol* 22: 29-34.
184. Shoeb M, Ramana KV (2012) Anti-inflammatory effects of benfotiamine are mediated through the regulation of the arachidonic acid pathway in macrophages. *Free Radical Biology&Medicine* 52: 182-190.
185. Siddall PJ, Cousins MJ, Otte A et al (2006) Pregabalin in central neuropathic pain associated with spinal cord injury: a placebo- control trial. *Neurology* 67: 1792-1800.
186. Sinner B, Graf BM (2008) Ketamine. *Handb Exp Pharmacol* 182, 313-333.
187. Skibska B, Jozefowicz-Okonkwo G, Goraca A (2006) Protective effects of early administration of alpha-lipoic acid against lipopolysaccharideinduced plasma lipid peroxidation. *Pharmacol Rep* 58: 399-404.

188. Sola S, Mir MQ, Cheema FA et al (2005) Irbesartan and lipoic acid improve endothelial function and reduce markers of inflammation in the metabolic syndrome. *Circulation* 111: 343-348.
189. Song XJ, Wang ZB (2003) Activation of cGMP – PKG signaling pathway mediates thiamine-induced inhibition of thermal hyperalgesia in rats with primary sensory neuron injury. *FASEB J* 439:7.
190. Souza AL, Moreira FA, Almeida KR, Bertollo CM et al (2002) In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. *Br J Pharmacol* 135: 239-247.
191. Srivastava, SK, Ramana, KV (2009) Focus on molecules: nuclear factor-kappaB. *Exp Eye Res* 88: 2–3.
192. Stirban A, Negrean M, Statmann B et al (2006) Benfotiamine prevents macro- and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 29: 2064-2071.
193. Stracke H, Lindemann A, Federlin K (1996) A benfotiamine-vitamin B combination in treatment of diabetic polyneuropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104: 311-316.
194. Stracke H, Hammes HP, Werkmann D et al (2001) Efficacy of benfotiamine versus thiamin on function and glycation products of peripheral nerves in diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diab* 109: 330-336.
195. Stracke H, Gaus W, Achenbach U, Federlin K, Bretzel RG (2008) Benfotiamine in diabetic polyneuropathy (BENDIP): results of a randomized, double blind, placebo-controlled clinical study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116: 600-605.
196. Stringer JL, Lorenzo N (1999) The reduction in paired-pulse inhibition in the rat hippocampus by gabapentin is independent of GABA-B receptor activation. *Epilepsy Res* 33:169-176.
197. Su TZ, Lunney E, Campbell G, Oxender DL (1995) Transport of gabapentin, a γ -amino acid drug, by system L α -amino acid transporters: a comparative study in astrocytes, synaptosomes, and CHO cells. *J Neurochem* 64:2125-2131.
198. Suman-Chauhan N, Webdale N, Hill DR, Woodruff GN (1993). Characterization of [³H]-gabapentin binding to a novel site in rat brain: homogenate binding studies. *European Journal of Pharmacology* 244: 293-301.
199. Surcheva S, Tzvetkova V, Yanev N, Surchev N et al (2006) Benfotiamine modulates analgesic effect of Cox inhibitors. *Studies on neuropathic allodynia. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci* 59: 1203-1208.
200. Swartjes M, Morariu A, Niesters M, Aarts L, Dahan A (2011) Nonselective and NR2B-selective N-methyl-D- aspartic acid receptor antagonists produce antinociception and long-term relief of allodynia in acute and neuropathic pain. *Anesthesiology* 115: 165-174.

201. Tanaka T, Minami M, Nakagawa T, Satoh M (2004) Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain: possible involvement in the development of neuropathic pain. *Neurosci. Res* 48: 463-469.
202. Taylor BK, Peterson MA, and Basbaum AI (1997) Early nociceptive events influence the temporal profile, but not the magnitude, of the tonic response to subcutaneous formalin: effects with remifentanyl. *J Pharmacol Exp Ther* 280:876–883.
203. Taylor CP, Vartanian MG, Yuen P et al (1993). Potent and stereospecific anticonvulsant activity of 3-isobutyl GABA relates to in vitro binding at a novel site labeled by tritiated dabapentin. *Epilepsy Research* 14: 11-15.
204. Taylor CP (1995) Gabapentin: mechanisms of action. In *Antiepileptic drugs* 829-841.
205. Toklu HZ, Hakan T, Biber N et al (2009) The protective effect of alpha lipoic acid against traumatic brain injury in rats. *Free Radic Res* 43: 658-667.
206. Toklu HZ, Hakan T, Celik H et al (2010) Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid in experimental spinal cord injury in rats. *Jurnal of Spinal Cord Medicine* 33: 401-409.
207. Van den Berg R, Haenen GR et al (2001) Transcription factor NF-kB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr* 86: 121-127.
208. Van Reeth O (1999) Pharmacologic and therapeutic features of sulbutiamine. *Drugs Today* 35: 187-192.
209. Verma S, Reddy K, Balakumar P (2009) The defensive effect of benfotiamine in sodium arsenite-induced experimental vascular endothelial dysfunction. *Biol Trace Elem Res* 8567-7.
210. Victor VM, De La Fuente M (2003) Changes in the supraoxide production and other macrophage functions could be related with the mortality of mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Physiol Res*, 52: 101–110.
211. Vogelaar CF, Vrinten DH, Hoekman MF et al (2004) Sciatic nerve regeneration in mice and rats: recovery of sensory innervation is followed by a slowly retreating neuropathic pain-like syndrome. *Brain Res*.19: 67-72.
212. Volvert ML, Seyen S, Piette M, Edvard B, Gandolf M, Plumier JC, Bettendorff L (2008) Benfotiamine, a synthetic S-acyl thiamine derivative, has different mechanisms of action and a different pharmacological profile than lipid-soluble thiamine disulfide derivatives. *BMC Pharmacology* 8:10.
213. Vranken HJ (2009) Mechanisms and treatment of neuropathic pain. *Central Nerv System Agents in Med Chemistry* 9: 71-78.
214. Wada R, Yagihashi S (2005) Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. *Ann NY Acad Sci* 1043: 598-604.

215. Wada T, Takagi H, Minakami H, Hamanaka W, Okamoto K, Ito A, Sahashi Y (1961) A new thiamine derivative, S-benzoylthiamine O-monophosphate. *Science* 134: 195-196.
216. Wall P.D., Devor M., Inbal R. et al. (1979) Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 7: 103–113.
217. Wang N, Fu Y, Ma H, Wang J (2015) Clinical research regarding preemptive analgesic effect of preoperative ketamine after transurethral resection of prostate. *Middle East J Anaesthesiol* 23: 295-300.
218. Wang ZB, Gan Q, Rupert RL, Zeng YM, Song XJ (2005) Thiamine, pyridoxine, cyanocobalamin and their combination inhibit thermal, but not mechanical hyperalgesia in rats with primary sensory neuron injury. *Pain* 114: 266-277.
219. White JM, Ryan CF (1996) Pharmacological properties of ketamine. *Drug Alcohol Rev* 15:145-155.
220. Willer JC (1977) Comparative study of perceived pain and nociceptive flexion reflex in man. *Pain* 3:69–80.
221. Winkler G, Pal B, Nagybeganyi E et al (1999) Effectiveness of different benfotiamine dosage regimens in the treatment of painful diabetic neuropathy. *Arzneim Forsch* 49: 220-224.
222. Woelk H, Lehl S, Bitsch R, Kopcke W (1998) Benfotiamine in treatment of alcoholic polyneuropathy: an 8-week randomized controlled study *Alcohol* 33: 631-638.
223. Wu S, Ren J (2006) Benfotiamine alleviates diabetes-induced cerebral oxidative damage independent of advanced glycation end-product, tissue factor and TNF- α . *Neurosci Lett* 394:158-162.
224. Xiong Z-Q, Stringer JL (1997) Effects of felbamate, gabapentin and lamotrigine on seizure parameters and excitability in the rat hippocampus. *Epilepsy Res* 27:187-194.
225. Yadav UC, Kalariya NM, Srivastava SK, Ramana KV (2010) Protective role of benfotiamine, a fat-soluble vitamin B1 analogue, in lipopolysaccharide-induced cytotoxic signals in murine macrophages. *Free Radic Biol Med* 48:1423–1434.
226. Yadav UCS, Subramanyam S, Ramana KV (2009) Prevention of endotoxin-induced uveitis in rats by benfotiamine, a lipophilic analogue of vitamin B1. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50: 2276-2282.
227. Yajima Y, Narita M, Shimamura M, Kubota C et al (2003) Differential involvement of spinal protein kinase C and protein kinase A in neuropathic and inflammatory pain in mice. *Brain Res* 992: 288-293.
228. Yamamoto T (2008) Mechanisms of the development of neuropathic pain and its treatment. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi* 77: 215-218.
229. Yashpal K and Coderre TJ (1998) Influence of formalin concentration on the antinociceptive effects of anti-inflammatory drugs in the formalin test in rats: separate

mechanisms underlying the nociceptive effects of low- and high-concentration formalin. *Eur J Pain* 2:63–68.

230. Yeomans DC and Proudfit HK (1996) Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: electrophysiological evidence. *Pain* 68: 141-150.
231. Yoon MH, Yaksh TL (1999) Evaluation of interaction between gabapentin and ibuprofen on the formalin test in rats. *Anesthesiology* 91: 1006-13.
232. Yoshino S, Sasatomi E, Ohsawa M (2000) Bacterial lipopolysaccharide acts as an adjuvant to induce autoimmune arthritis in mice. *Immunology* 99: 607-614.
233. Zarate CA, Singh JB, Carlson PJ et al (2006) A randomized trial of an NMDA antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63:856-864.
234. Zeng J, Thomson LM, Aicher SA (2006) Primary afferent NMDA receptors increase dorsal horn excitation and mediate opiate tolerance in neonatal rats. *J Neurosci* 26: 12033-12042.
235. Zhang WJ, Wei H, Hagen T, Frei B (2007) Alpha-lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(10): 4077-4082.
236. Zhao L, Chen YH, Wang HJ et al (2008) Reactive oxygen species contribute to LPS-induced tetragenesis in mice. *Toxicol Sci* 103: 149-157.
237. Zimmermann M (1986) Behavioural investigations of pain in animals. *Pain in Farm Animals* 16-29.
238. Zimmermann M (1988) Possibilities for B-vitamins to modulate basic biological mechanisms involved in pain. *Gerbershagen HU* 1-8.