

Анальгетическое действие производного гексаазаизовюрцитана на моделях соматической боли, вызванной активацией TRPA1- и TRPV1-ионных каналов

Крылова С.Г.¹, Лопатина К.А.¹, Зуева Е.П.¹, Сафонова Е.А.¹, Поветьева Т.Н.¹,
Нестерова Ю.В.¹, Афанасьева О.Г.¹, Кульпин П.В.¹, Суслов Н.И.¹, Кулагина Д.А.²,
Сысолятин С.В.², Жданов В.В.¹

¹ Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины (НИИФиРМ) им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

² Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН)
Россия, 659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1

РЕЗЮМЕ

Цель. Оценка анальгетического действия тиовюрцина в условиях активации TRPA1- и TRPV1-ионных каналов на моделях соматогенной ноцицепции.

Материалы и методы. Объектом исследования является соединение 4-(3,4-дибромтиофенкарбонил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло [5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}]додекан (тиовюрцин). Исследование анальгетической активности тиовюрцина проводили в условиях хомогенной модели активации TRPA1-каналов (формалиновый тест) и в селективном (капсаициновом тесте) с агонистом TRPV1-каналов – капсаицином. Соединение вводили однократно *per os* в диапазоне доз 50–200 мг/кг (водно-твиновый растворитель) за 1 ч до экспериментальных воздействий. В качестве референс-препаратов использовали диклофенак натрия превентивно однократно *per os* в дозе 10 мг/кг на 1%-м растворе крахмальной слизи в объеме 0,2 мл/мышь, кеторолак – в дозе 6 мг/кг в аналогичном растворителе, объеме и пути введения.

Результаты. Установлено, что тиовюрцин при превентивном однократном *per os* введении в дозах 100 и 200 мг/кг эффективно блокирует ноцицептивные реакции, обусловленные активацией TRPA1- и TRPV1-ионных каналов. При этом анальгетическая активность тиовюрцина оказалась сравнимой и (или) превосходящей действие кеторолака и диклофенака в зависимости от модельной ситуации. Кроме того, выявлено, что тиовюрцин (200 мг/кг *per os*) соответствует диклофенаку натрия (10 мг/кг *per os*) и превосходит кеторолак (6 мг/кг *per os*) по выраженности противовоспалительного действия в формалиновом тесте.

Заключение. Бифазность поведенческих реакций в прогностическом «Формалиновом тесте» не позволяет однозначно сделать вывод о направленности механизма действия тиовюрцина, что подтверждает гипотезу о полимодальности. Данные, полученные на двух моделях соматогенной ноцицепции, не исключают того, что модуляция активности рецепторов TRPA1- и TRPV1-ионных каналов является одним из механизмов его анальгетического действия. По сочетанию выявленных ключевых для анальгетика характеристик тиовюрцин является уникальным веществом с высоким терапевтическим и инновационным потенциалом.

Ключевые слова: гексаазаизовюрцитан, тиовюрцин, анальгетическая активность, соматогенная ноцицепция, TRP-ионные каналы, кеторолак, диклофенак, капсаицин, формалиновый тест, противовоспалительная активность.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

✉ Крылова Светлана Геннадьевна, e-mail: krylova5935@gmail.com.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках реализации государственного контракта № 14.N08.11.0179.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено биоэтическим комитетом НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга (протокол JACUC № 96092015 от 16.09.2015).

Для цитирования: Крылова С.Г., Лопатина К.А., Зуева Е.П., Сафонова Е.А., Поветьева Т.Н., Нестерова Ю.В., Афанасьева О.Г., Кульпин П.В., Суслов Н.И., Кулагина Д.А., Сысолятин С.В., Жданов В.В. Анальгетическое действие производного гексаазазиворцитана на моделях соматической боли, вызванной активацией TRPA1- и TRPV1-ионных каналов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 110–118. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-110-118>.

Analgesic action of hexaazaisowurtzitan derivative in somatic pain models caused by TRPA1 and TRPV1 Ion channels activation

Krylova S.G.¹, Lopatina K.A.¹, Zueva E.P.¹, Safonova E.A.¹, Povet'eva T.N.¹, Nesterova Yu.V.¹, Afanas'eva O.G.¹, Kul'pin P.V.¹, Suslov N.I.¹, Kulagina D.A.², Sysolyatin S.V.², Zhdanov V.V.¹

¹Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (GRIP&RM), Tomsk National Research Medical Center (TNRMC), Russian Academy of Sciences
3, Lenin Av., Tomsk, 634028, Russian Federation

²Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
1, Socialist Str., Biysk, 659322, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the analgesic action of thiwurtzine in somatogenic nociception models by activation of TRPA1 and TRPV1 ion channels.

Materials and methods. The object of the study is the compound 4-(3,4-dibromothiophenecarbonyl)-2,6,8,12-tetraacetyl-2,4,6,8,10,12-hexaazatetracyclo [5.5.0^{03,11}.0^{5,9}]dodecane (thiwurtzine). The analgesic activity of thiwurtzine was studied under the conditions of a chemogenic activation model of TRPA1 channels (by the formalin test), and by a selective test with an agonist of TRPV1 channels (the capsaicin test). The compound was administered once *per os* in a dose range of 50–200 mg/kg (water-tween solvent) an hour before the experimental manipulations. The reference drugs were diclofenac sodium in a preventive single *per os* dose of 10 mg/kg in 1% starch gel in a volume of 0.2 ml/mouse, and ketorolac in a dose of 6 mg/kg in the same solvent, volume and route of administration.

Results. Thiwurtzine, when administered in *per os* doses of 100 and 200 mg/kg, was found to effectively block nociceptive reactions caused by activation of TRPA1 and TRPV1 ion channels. At the same time, the analgesic activity of thiwurtzine turned out to be comparable and/(or) superior to the ketorolac and diclofenac action, depending on the model situation. In addition, it was found that thiwurtzine (200 mg/kg *per os*) corresponds to diclofenac sodium (10 mg/kg *per os*) and is superior to ketorolac (6 mg/kg *per os*) in terms of anti-inflammatory severity in the formalin test.

Conclusion. The biphasicity of behavioral reactions in the prognostic formalin test do not allow for an unambiguous conclusion about the direction of the action mechanism of thiwurtzine, which confirms the polymodality hypothesis. The data obtained in the two models of somatogenic nociception do not exclude the fact that the modulation of the TRPA1 and TRPV1 activity is one of the mechanisms of the thiwurtzine analgesic action. By the key analgesic characteristics found herein, thiwurtzine proves to be a unique compound with a high therapeutic and innovation potential.

Conclusion. The biphasicity of behavioral reactions in the prognostic formalin test do not allow for an unambiguous conclusion about the direction of the action mechanism of thiwurtzine, which confirms the polymodality hypothesis. The data obtained in the two models of somatogenic nociception do not exclude the fact that the modulation of the TRPA1 and TRPV1 activity is one of the mechanisms of the thiwurtzine analgesic action. By the key analgesic characteristics found herein, thiwurtzine proves to be a unique compound with a high therapeutic and innovation potential.

Key words: hexaazaisowurtzitane, thiowurtzine, analgesic activity, somatogenic nociception, TRP ion channels, formalin test, capsaicin, ketorolac, diclofenac, anti-inflammatory activity

Conflict of interest. Authors declare no obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. This study was carried out under the State Contract No. 14.N08.11.0179.

Conformity with the principles of ethics. Study was approved by the Bioethics Committee of the GRIP&RM, TNRMC (JACUC protocol No. 96092015 of 16.09.2015).

For citation: Krylova S.G., Lopatina K.A., Zueva E.P., Safonova E.A., Povet'eva T.N., Nesterova Yu.V., Afanas'eva O.G., Kul'pin P.V., Suslov N.I., Kulagina D.A., Sysolyatin S.V., Zhdanov V.V. Analgesic action of hexaazaisowurtzitane derivative in somatic pain models caused by TRPA1 and TRPV1 ion channels activation. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 110–118. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-110-118>.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одним из новых направлений фармацевтики является синтез молекул-кандидатов с целью разработки на их основе ненаркотических анальгетиков для купирования сильной и средней боли [1]. В стационарных и амбулаторных условиях для терапии боли различной этиологии у пациентов используются, главным образом, три типа анальгетиков: на основе опиатов и каннабиоидов с разной анальгетической активностью, нестероидных противовоспалительных веществ, а также их комбинации в схемах мультимодальной терапии [1–3]. Для купирования сильной и средней боли альтернативой опиатам могут служить ненаркотические анальгетики, действующие на центральную и периферическую системы передачи нервного импульса у человека и обладающие целым рядом преимуществ. Однако число возможных молекул-кандидатов в ненаркотические анальгетики крайне ограничено. Одним из современных подходов для получения инновационных молекул является разработка методов направленного конструирования и синтеза оригинальных соединений.

В результате межотраслевого взаимодействия ИПХЭТ СО РАН и НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ была получена первая в мире молекула в новом классе веществ 4-(3,4-дибромтиофенкарбонил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло [5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}]додекан (тиовюрцин) для медицинского применения (патент РФ № 2565766 от 23.09.2015). Инновационное соединение создано технологией направленного синтеза по результатам прогнозирования с помощью программного пакета PASS и является первым в классе гексаазаизовюрцитанов. Начиная с 1980-х гг., многочисленные исследования, связанные с синтезом этого класса соединений, носили преимущественно оборонный характер. Лишь в последние годы гексаазаизовюрцитан нача-

ли применять в качестве фармакофора для разработки оригинальных фармацевтических субстанций [4].

В проведенных ранее исследованиях выявлена выраженная анальгетическая активность инновационного соединения в условиях термического ноцицептивного теста «Горячая пластина» и модели острой висцеральной и соматически глубокой боли «Укусные корчи», сравнимая и (или) превышающая действие диклофенака натрия, кеторолака и трамадола. Отсутствие влияния тиовюрцина на продукцию основных медиаторов воспаления (гистамина, серотонина, простагландина) и ульцерогенной активности в диапазоне доз 25–200 мг/кг позволило заключить об отсутствии его ЦОГ-зависимого действия [5]. При этом доказано его выраженное противовоспалительное действие на модели арахидонового воспаления, умеренное – на моделях брадикининового и каррагенинового воспаления [6]. Соединение можно отнести к 3-му классу опасности (летальная доза (ЛД₅₀) находится в пределах 150–5 000 мг/кг), ГОСТ 12.1.007-76. При максимально возможном объеме однократного введения тиовюрцина ЛД₅₀ (или гибели животных) достигнуто не было. Тиовюрцин не вызывал респираторную депрессию, изменений в рефлекторной деятельности желудочно-кишечного тракта. При исследовании механизма действия тиовюрцина выявлена налоксон-чувствительная анальгезия, доказано отсутствие тропности к периферическим опиоидным рецепторам с использованием налоксона метиодита [5].

Таким образом, совокупность представленных данных свидетельствует о полимодальности механизма действия соединения, что обуславливает проведение дальнейших исследований в этом аспекте.

Цель исследования – оценка анальгетического действия тиовюрцина в условиях активации TRPA1- и TRPV1-ионных каналов на моделях соматогенной ноцицепции (формалиновый и капсаициновый тесты).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 50 аутбредных половозрелых самцах мышей сток CD1, 48 самцах мышей линии СВА (возраст 7–8 нед), первой категории, конвенциональных. Животные получены из отдела экспериментального биомоделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ (сертификат здоровья животных имеется). Содержание животных и дизайн экспериментов одобрены биоэтическим комитетом НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (протокол JACUS № 96092015 от 16.09.2015), соответствовали Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, и Приказу Министерства здравоохранения РФ (№ 199н от 1.08.2016).

Дизайн экспериментов, объем выборки, схема ведения экспериментов, выбор статистического анализа определены оптимальным образом для данного вида исследования и позволяют получить достоверные данные для интерпретации результатов без увеличения количества животных. Перед началом эксперимента каждому животному внутри группы присваивали индивидуальный номер, помечаемый с помощью меток фукорцином. Распределение на группы осуществляли рандомизированно, используя в качестве критерия массу тела, так, чтобы индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения в пределах одной группы более чем на $\pm 10\%$. По окончании экспериментов эвтаназия мышей производилась методом краниоцервикальной дислокации.

Исследуемая инновационная молекула представляет собой полиазотистое полициклическое соединение каркасного строения – 4-(3,4-дибромтиофенкарбонил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло[5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}]додекан. Соединение получено впервые ацилированием промышленно доступного 2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло[5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}] додекана (гексаазазовюрцитана) хлорангидридом 3,4-дибромтиофенкарбоновой кислоты. Характеристика тиовюрцина (бесцветный кристаллический продукт с содержанием основного вещества 99,0% и единичной примеси не более 0,2% (метод высокоэффективной жидкостной хроматографии), температурой плавления 328–330 °С) полностью подтверждена физико-химическими методами исследования: ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$, спектр ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д.), спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.).

Проведенные ранее исследования анальгетической активности тиовюрцина позволили определить терапевтическую дозу анальгетика 100 мг/кг *per os*

[5, 6]. Тиовюрцин вводили превентивно однократно внутрь через зонд в диапазоне доз 50–200 мг/кг (водно-твиновый растворитель) за 1 ч до экспериментальных манипуляций. В качестве препаратов сравнения использовали диклофенак натрия (Немофарм, Россия) превентивно однократно внутрь через зонд в дозе 10 мг/кг в виде суспензии на 1%-м растворе крахмальной слизи в объеме 0,2 мл/мышь, кеторолак (Dr. Reddy's Laboratories Ltd., Индия) – в дозе 6 мг/кг в аналогичном растворителе, объеме и пути введения. Предлагаемые дозы референс-препаратов соответствовали средней терапевтической дозе для человека. Животные группы негативного контроля получали эквивалентные количества растворителя – водно-твиновой смеси в аналогичном режиме.

Формалиновый тест. Формалиновый тест, являющийся хемогенной моделью острой болевой реакции, имитирует болевые реакции различного генеза (соматические травмы, ожоги, порезы, химические повреждения, операционные кожные разрезы) [7]. Одним из механизмов ноцигенного действия формалина является активация TRPA1-каналов, реагирующих в норме на холод и стимулирующих развитие термической и механической гипералгезии [8].

Животных распределяли на пять групп: 1-я, контроль, – без лечения; 2-я, кеторолак, – 6 мг/кг; 3-я, диклофенак, – 10 мг/кг; 4-я, тиовюрцин, – 100 мг/кг; 5-я, тиовюрцин, – 200 мг/кг. Тестируемый объект и препараты сравнения вводили за 1 ч до начала опыта. Гипералгезию моделировали подкожным введением 20 мкл 2%-го водного раствора формалина интраплантарно в подушечку правой задней лапки по истечении 1 ч. Интенсивность болевой ответа в первую и во вторую фазы теста регистрировали ежесекундно по количеству и продолжительности поведенческих паттернов («флинчей») болевых реакций (облизываний, потряхиваний) инъецированной лапы в течение 60 мин. Время паттернов суммировалось для каждого животного. Анальгетическую активность соединений оценивали отдельно для I (первые 10 мин после введения формалина) и II (с 10-ю по 60-ю мин после введения формалина) фаз ноцицептивного ответа по уменьшению числа болевых реакций относительно таковых негативного контроля.

Капсаициновый тест. Исследование анальгетической активности новой молекулы в селективном тесте с агонистом TRPV1-каналов является необходимым этапом в изучении специфической фармакологической активности. Этот тест позволяет оценить влияние вещества на чувствительность TRPV1-каналов, находящихся, главным образом, в ноцицептивных нейронах периферической и центральной нервной системы [9].

Животных распределяли на пять групп: 1-я (контроль) – без лечения; 2-я (кеторолак) – 6 мг/кг; 3-я (тиовюрцин) – 50 мг/кг; 4-я (тиовюрцин) – 100 мг/кг; 5-я (тиовюрцин) – 200 мг/кг. За 1 ч до начала опыта вводили тестируемый объект и референс-препарат. Через 1 ч инъецировали 10 мкл раствора капсаицина (3 мкг/10 мкл 10%-го этанола, растворенного в 0,9%-м NaCl) интраплантарно в подушечку левой задней лапы. После введения лапу протирали этанолом для предотвращения кожного раздражения капсаицином. Фиксировали время (латентный период), которое пройдет до начала реакции (мышь начинала сильно трясти лапой и облизывать ее). Далее регистрировали каждую секунду количество паттернов облизывания и суммарное время облизывания лапы в течение 15 мин для каждой мыши. Основными критериями эффективности является суммарное время облизывания и продолжительность болевой реакции.

Оценка противовоспалительного эффекта. По окончании двух серий экспериментов животные были подвергнуты эвтаназии, после чего обе задние лапки (воспаленная и здоровая) выделены по выступу кости ниже сочленения мало- и большеберцовой кости и выше пяточного сустава, определена их масса на лабораторных электронных весах. Противовоспалительный эффект, оцениваемый по изменению массы отека, был выражен в процентах к контролю и посчитан по соответствующим формулам [10].

Статистическая обработка полученных результатов проведена методами вариационной статистики с использованием программного обеспечения Statistica 6.0. Для всех данных подсчитаны среднее значение (\bar{X}) и стандартная ошибка среднего ($M \pm m$), которые вместе со значением n (количество вариант в группе) представлены в табл. 1, 2. Различия сравниваемых величин считали достоверным в случае вероятности их тождества меньше 5% ($p < 0,05$). Используя выборочные коэффициенты асимметрии и эксцесса, оценивали степень приближения закона распределения исследуемого признака к нормальному. При отклонениях распределений признака от нормального вида для независимых выборок использовали непараметрический критерий U -критерий Вилкоксона – Манна – Уитни. Для выявления достоверности различий качественных показателей использовали критерий углового преобразования Фишера [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Современная экспериментальная система, включающая в себя ноцицептивные тесты с использованием электрических, тепловых, механических и химических раздражителей, модуляцией боли на

различных уровнях организации чувствительности, позволяет получить спектр антиноцицептивных характеристик новых веществ и, в определенной мере, прогнозировать характер их обезболивающего действия у человека [9, 11, 12].

Подкожное введение формалина в дорзальную поверхность задней лапки вызывало характерную бифазную поведенческую ноцицептивную реакцию (рис.), о чем свидетельствует сумма болевых реакций у контрольных животных в I фазе ноцицептивного ответа ($30,8 \pm 1,6$) «флинчей»; во II фазе – ($13,2 \pm 2,6$).

В условиях формалинового теста, который моделирует клиническую ситуацию как острой (фаза I), так и тонической боли (фаза II), выявлена анальгетическая активность тиовюрцина в обеих фазах [8]. В I фазе теста тиовюрцин при превентивном однократном внутривенном через зонд введении в дозах 100 и 200 мг/кг статистически достоверно уменьшал число начальных болевых реакций в виде поднятия конечности относительно соответствующих показателей контроля, при этом отмечалось отсутствие активности референс-препаратов диклофенака и кеторолака. Первая фаза формалинового теста характеризует острую боль, возникающую в ответ на инъекцию химического раздражителя, и связана, в основном, с прямой активацией тонких немиелиновых C-волокон, большинство из которых передает импульсацию от болевых рецепторов, в данном случае TRPA1-каналов [7–9]. На этом этапе наблюдения тиовюрцин умеренно ограничивал проявления острой боли, обусловленной активацией TRPA1-каналов ноцигенным действием формалина (рис.).

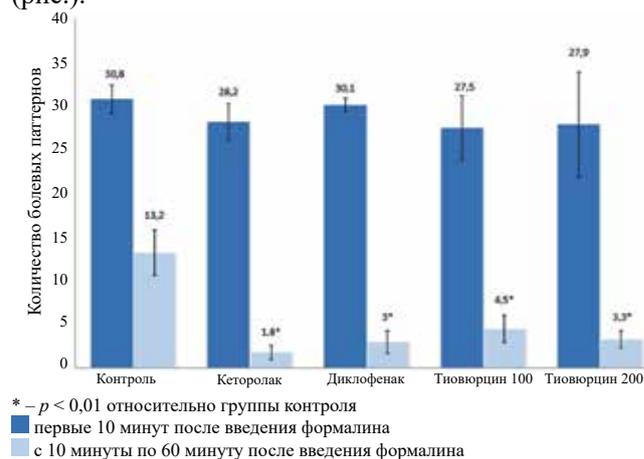


Рисунок. Болевая реакция у мышей в интервале 40–50 мин после введения формалина

Во II фазе формалинового воспаления тиовюрцин в дозах 100 и 200 мг/кг уменьшал количество типичной для данного теста поведенческой реакции облизывания лап в 3,4 ($p < 0,05$) и 3,2 раза ($p < 0,05$)

соответственно относительно данных контрольной группы (см. рис.). При анализе количества паттернов встряхивания лап выявлена сходная анальгетическая активность тестируемого вещества и референс-препаратов. Установлено отсутствие этой реакции у животных, получавших тиовюрцин в дозе 200 мг/кг, а применение соединения в дозе 100 мг/кг приводило к снижению числа встряхиваний в 5,3 раза относительно показателя негативного контроля, что свидетельствует о выраженном сдерживающем компоненте развития болевой реакции. Значения суммы болевой реакции тиовюрцина в дозах 100 мг/кг ($4,5 \pm 1,6$; $p < 0,01$) и 200 мг/кг ($3,3 \pm 1,0$; $p < 0,01$) оказались аналогичными показателям препаратов сравнения кеторолака ($1,8 \pm 0,8$; $p < 0,01$) и диклофенака ($3,0 \pm 1,3$; $p < 0,01$) по степени выраженности формалиновой гипералгезии.

При исследовании противовоспалительного действия тиовюрцина во II фазе ноцицептивного ответа выявлен его статистически значимый эффект в дозе 100 мг/кг. По снижению уровня воспалительного прироста конечности тиовюрцин в дозе 200 мг/кг (26%) соответствовал диклофенаку натрия (32%) и превосходил кеторолак (14%) (табл. 1).

Таблица 1

Показатели противовоспалительного действия тиовюрцина в условиях теста «Формалиновое воспаление» у аутобредных самцов мышей линии CD1		
Группа наблюдения, доза препарата	Прирост конечности, $M \pm m$, %	Угнетение воспаления конечности, %
Контроль, водно-глицериновый раствор ($n = 10$)	$48,0 \pm 2,5$	–
Кеторолак, 6 мг/кг ($n = 10$)	$41,2 \pm 4,8^*$	14
Диклофенак, 10 мг/кг ($n = 10$)	$32,8 \pm 1,5^*$	32
Тиовюрцин, 100 мг/кг ($n = 10$)	$41,2 \pm 2,2^*$	14
Тиовюрцин, 200 мг/кг ($n = 10$)	$35,4 \pm 3,2^*$	26

Примечание. Количество животных – n (здесь и в табл. 2).

* $p_U < 0,05$.

На втором этапе эксперимента применение тиовюрцина приводило к снижению интенсивности то-

нической боли за счет уменьшения воспалительного процесса (см. табл. 1) в периферических тканях и возможному изменению функции нейронов задних рогов спинного мозга, где лежат нейроны болевых восходящих путей. Формалиновый тест имеет достаточно высокую прогностическую значимость при исследовании механизма действия новых потенциальных анальгетиков, поскольку известно, что опиоидные анальгетики блокируют обе фазы ноцицепции, нестероидные противовоспалительные средства подавляют только вторую фазу, а местные анестетики – только первую [7, 8, 10].

Бифазность поведенческих реакций мышей в группах применения тиовюрцина не позволяет однозначно сделать вывод о направленности механизма действия тиовюрцина. Если в I фазе выявлен умеренный антиноцицептивный эффект анальгетика на фоне отсутствия активности референс-препаратов группы нестероидных противовоспалительных средств, то во II фазе преимущественно эффективно блокировал болевой ответ животных. При этом интенсивность болевой реакции во вторую фазу, судя по уменьшению продолжительности паттернов вылизывания в группе тиовюрцина, оказалась сопоставимой с выраженностью антиноцицептивной активности кеторолака и диклофенака. Кроме того, выявленная ранее налоксон-чувствительная анальгезия тиовюрцина не исключает возможности вовлечения опиоидэргической системы в реализации его антиноцицептивной активности в двух фазах эксперимента [5]. Совокупность полученных результатов определяет необходимость дальнейшего исследования на других моделях ноцицепции.

Интраплаттарное введение раствора капсаицина вызывало выраженную поведенческую ноцицептивную реакцию в виде облизывания и встряхивания лапки у животных контрольной группы. При этом все параметры развития болевой реакции и поведенческих паттернов соответствуют данным литературы и свидетельствуют о воспроизведении модельной ситуации (табл. 2).

Таблица 2

Показатели антиноцицептивной активности тиовюрцина при превентивном однократном внутривнутреннем введении в условиях капсаицинового теста у самцов мышей линии CBA, $M \pm m$					
Группа животных, доза препарата	Латентное время болевой реакции, с	Количество		Суммарное время облизываний, с	Продолжительность болевой реакции, с
		облизываний	встряхиваний		
Контроль, вода очищенная ($n = 8$)	$8,8 \pm 1,8$	$9,4 \pm 1,6$	$5,6 \pm 1,3$	$86,6 \pm 20,6$	$820,0 \pm 31,1$
Кеторолак, 6 мг/кг ($n = 10$)	$25,1 \pm 7,1^*$	$5,0 \pm 0,9^*$	$1,6 \pm 0,5^*$	$38,4 \pm 13,0$	$347,6 \pm 79,6^*$
Тиовюрцин, 50 мг/кг ($n = 10$)	$62,8 \pm 21,6^*$	$8,7 \pm 2,0$	$2,6 \pm 1,0$	$82,0 \pm 35,1$	$579,4 \pm 57,9^*$
Тиовюрцин, 100 мг/кг ($n = 9$)	$18,7 \pm 5,0^*$	$6,3 \pm 0,9$	$1,4 \pm 0,4^{**}$	$30,4 \pm 10,2^{**}$	$421,4 \pm 75,0^*$
Тиовюрцин, 200 мг/кг ($n = 10$)	$61,2 \pm 20,1^{**}$	$5,2 \pm 1,2^*$	$1,6 \pm 0,7^*$	$20,6 \pm 5,0^{**}$	$326,6 \pm 86,4^*$

* $p_U < 0,05$; ** $p_U < 0,01$ относительно группы негативного контроля.

Как и следовало ожидать, применение кеторолака вызывало значительное снижение выраженности болевой реакции у самцов мышей линии СВА: увеличение в 2,9 раза ($p < 0,05$) латентного периода развития болевой реакции, снижение количества облизываний в 1,9 раза ($p < 0,05$), числа встряхиваний лапы – в 3,5 раза ($p < 0,05$) относительно аналогичных данных контрольной группы (см. табл. 2). Следует отметить снижение продолжительности болевой реакции в 2,4 раза ($p < 0,01$). Вышеприведенные результаты соответствуют данным литературы о выраженности обезболивающего эффекта кеторолака.

Анализ результатов группы применения тиовюрцина позволяет сделать заключение о его выраженном дозозависимом анальгетическом эффекте. При этом не выявлено статистически значимых различий с данными группы применения кеторолака. Так, при введении соединения в дозе 50 мг/кг фиксировалось увеличение латентного времени болевой реакции в 7,1 раза ($p < 0,05$) относительно показателя группы контроля, в 1,7 раза – относительно показателя группы кеторолака. По совокупности полученных результатов продолжительность болевой реакции снизилась в 1,4 раза ($p < 0,05$) относительно аналогичного показателя негативного контроля.

Выраженная анальгетическая активность тиовюрцина в дозе 100 мг/кг проявлялась в статистически достоверном увеличении периода наступления болевой реакции, уменьшении количества встряхиваний лапы в 4,0 раза ($p < 0,01$), суммарного времени облизывания в 2,8 раза ($p < 0,01$) и продолжительности болевой реакции в 1,9 раза ($p < 0,01$) относительно соответствующих показателей контрольной группы.

В случае введения тиовюрцина в дозе 200 мг/кг все анализируемые показатели статистически достоверно отличались от аналогичных значений контрольной группы. Так, латентное время наступления болевой реакции повысилось в 7,0 раза ($p < 0,05$), количество облизываний и встряхиваний уменьшилось в 1,8 ($p < 0,05$) и 3,5 раза ($p < 0,05$) соответственно. При этом суммарное время облизываний снизилось в 4,2 раза ($p < 0,01$), а продолжительность болевой реакции – в 2,5 раза ($p < 0,05$) относительно соответствующих значений негативного контроля. Механизм развития болевой реакции связан с активацией ионных каналов на ноцицепторах в тканях при химическом и механическом повреждении. Такое повреждение успешно провоцируется введением капсаицина – прямого агониста TRPV1-каналов [9].

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что исследуемое соединение блокировало развитие боли при введении капсаицина мышам,

причем наблюдаемый эффект был дозозависимым, достигал максимума при назначении тиовюрцина в дозах 100 и 200 мг/кг и был сравним с анальгетическим эффектом кеторолака.

В настоящее время к фармакологически наиболее актуальным биомишеням нервной системы человека для анальгезии относят рецепторы из семейства белков TRP-ионных каналов, открытие которых явилось важным этапом в изучении природы болевых ощущений на молекулярном уровне [13–16]. Поиск модуляторов и антагонистов активности рецепторов TRP-ионных каналов и разработка на их основе высокоэффективных анальгетиков с минимальным количеством побочных эффектов являются одним из приоритетных направлений работы научно-исследовательских лабораторий во всем мире [13, 16]. Выявленные свойства тиовюрцина актуализируют дальнейшую разработку на его основе уникальных препаратов, предназначенных для терапии сильной и средней боли различного генеза. Выраженная антиноцицептивная активность соединения уже через 1 ч после введения свидетельствует о возможности использования препаратов на основе тиовюрцина для купирования болевой реакции в экстремальных ситуациях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что тиовюрцин при превентивном однократном *per os* введении в дозах 100 и 200 мг/кг эффективно блокирует ноцицептивные реакции, обусловленные активацией TRPA1- и TRPV1-ионных каналов. При этом анальгетическая активность тиовюрцина оказалась сравнимой (или) превосходящей действие кеторолака и диклофенака в зависимости от модельной ситуации. Кроме того, выявлено, что тиовюрцин (200 мг/кг *per os*) соответствует диклофенаку натрия (10 мг/кг *per os*) и превосходит кеторолак (6 мг/кг *per os*) по выраженности противовоспалительного действия в формалиновом тесте. Полученные результаты экспериментов дают возможность утверждать, что выраженное антиноцицептивное действие инновационного соединения в условиях моделей (капсаициновый тест и формалиновый тест) обусловлено взаимодействием с биомишенями TRPV1 и TRPA.

Совокупность ранее полученных данных может свидетельствовать в пользу того, что модуляция активности рецепторов TRP-ионных каналов является одним из механизмов его анальгетического действия. По сочетанию выявленных ключевых для анальгетика характеристик тиовюрцин является уникальным веществом с высоким терапевтическим и инновационным потенциалом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соснов А.В., Садовников С.В., Семченко Ф.М., Руфанов К.А., Тохмахчи В.Н., Соснова А.А., Тюрин И.А. Сильнодействующие ненаркотические анальгетики как направление развития фармацевтики. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016; 14 (1): 196–206.
2. Михайлова А.С. Анальгетический арсенал клинициста. *Фарматека*. 2018; (S3): 50–56.
3. Sawich S.O., Deonarine U., Harding H.E., Dan D., Naraynsingh V. Cannabis and postoperative analgesia. handbook of cannabis and related pathologies. *Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment*. 2017; 450–458. DOI: 10.1016/B978-0-12-800756-3.00052-1.
4. Sysolyatin S.V., Kalashnikov A.I., Malykhin V.V. Reductive debenzelation of 2,4,6,8,10,12 – hexaazaisowurtzitan. *International Journal of Energetic Materials and Chemical Propulsion*. 2010; 9 (4): 365–375. DOI: 10.1615/IntJEnergeticMaterialsChemProp.
5. Krylova S.G., Povet'eva T.N., Zueva E.P., Suslov N.I., Amosova E.N., Razina T.G., Lopatina K.A., Rybalkina O.Yu., Nesterova Yu.V., Afanas'eva O.G., Kiseleva E.A., Sysolyatin S.V., Kulagina D.A., Zhdanov V.V. Analgesic activity of hexaazaisowurtzitan derivatives. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019; 166 (4): 461–465. DOI: 10.1007/s10517-019-04372-9.
6. Лопатина К.А., Крылова С.Г., Зуева Е.П., Сафонова Е.А., Разина Т.Г., Рыбалкина О.Ю., Поветьева Т.Н., Суслов Н.И., Кулагина Д.А., Минакова М.Ю., Сысолятин С.В. Изучение механизма действия нового анальгетика производного гексаазаизоворцитана: эффекты медиаторов воспаления. *Российский журнал боли*. 2018; 58 (4): 68–72. DOI: 10.25731/RASP.2018.04.031.
7. McNamara C.R., Mandel-Brehm J., Bautista D.M., Siemens J., Deranian K.L., Zhao M., Hayward N.J., Chong J.A., Julius D., Moran M.M., Fanger C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104 (33): 13525–13530. DOI: 10.1073/pnas.0705924104.
8. Tjølsen A., Berge O.G., Hunskaar S. Roslandet J.H., Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992; 51 (1). DOI: 10.1016/0304-3959(92)90003-T.
9. Бондаренко Д.А., Дьяченко И.А., Скобцов Д.И., Мурашев А.Н. *In vivo* модели для изучения анальгетической активности. *Биомедицина*. 2011; 2: 84–94.
10. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2013: 944.
11. Rice A.S., Cimino-Brown D., Eisenach J.C., Kontinen V.K., Lacroix-Fralish M.L., Machin I.; Preclinical Pain Consortium, Mogil J.S., Stöhr T. Animal models and the prediction of efficacy in clinical trials of analgesic drugs: a critical appraisal and call for uniform reporting standards. *Pain*. 2008; 139 (2): 243–247. DOI: 10.1016/j.pain.2008.08.017.
12. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 2012; 211: 39–50. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.041.
13. Lee L.Y., Hsu C.C., Lin Y.J., Lin R.L., Khosravi M. Interaction between TRPA1 and TRPV1: synergy on pulmonary sensory nerves. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2015; 35: 87–93. DOI: 10.1016/j.pupt.2015.08.003.
14. Gaudet R. TRP channels entering the structural era. *J. Physiol*. 2008; 586 (15): 3565–3575. DOI: 10.1113/jphysiol.2008.155812.
15. Full-Spectral multiplexing of bioluminescence resonance energy transfer in three TRPV channels. *Biophysical Journal*. 2017; 112 (1): 87–98. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.11.3197.
16. Weyer-Menkhoff I., Lötsch J. Human pharmacological approaches to TRP-ion-channel-based analgesic drug development. *Drug Discovery*. 2018; 23 (12): 2003–2012. DOI: 10.1016/j.drudis.2018.06.020.

Вклад авторов

Крылова С.Г. – разработка концепции и дизайна экспериментов, участие в опытах, проверка критически важного интеллектуального содержания. Лопатина К.А. – организация и осуществление экспериментов, статистический анализ, написание статьи. Зуева Е.П. – обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания. Сафонова Е.А. – участие в экспериментах. Поветьева Т.Н. – разработка концепции и дизайна экспериментов, участие в экспериментах. Суслов Н.И. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Нестерова Ю.В. – участие в экспериментах, статистический анализ. Афанасьева О.Г. – участие в экспериментах. Кульпин П.В. – участие в экспериментах. Сысолятин С.В. – организация синтеза объекта исследования. Кулагина Д.А. – синтез и предоставление объекта исследования. Жданов В.В. – анализ результатов компьютерного прогнозирования фармакологической активности, окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Крылова Светлана Геннадьевна, д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория онкофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0003-0249-1395.

Лопатина Ксения Александровна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория онкофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0003-4445-4859.

Зуева Елена Петровна, д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией онкофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-6480-6770.

Сафонова Елена Андреевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория онкофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-0685-4192.

Поветьева Татьяна Николаевна, д-р мед. наук, профессор, вед. науч. сотрудник, лаборатория фитотерапии и специального питания, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0001-8644-489X.

Нестерова Юлия Владимировна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория фитотерапии и специального питания, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-1382-926X.

Афанасьева Ольга Геннадьевна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, лаборатория фитотерапии и специального питания, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-7374-5586.

Кульпин Павел Валерьевич, мл. науч. сотрудник, лаборатория фитотерапии и специального питания, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск.

Сулов Николай Иннокентьевич, д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией фитотерапии и специального питания, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-7993-5639.

Кулагина Дарья Александровна, канд. хим. наук, мл. науч. сотрудник, лаборатория медицинской химии, ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск. ORCID 0000-0002-4673-5817.

Сысолятин Сергей Викторович, д-р хим. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией медицинской химии, директор ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск. ORCID 0000-0002-1405-171X.

Жданов Вадим Вадимович, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, директор НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-9516-0204.

(✉) **Крылова Светлана Геннадьевна**, krylova5935@gmail.com.

Поступила в редакцию 07.02.2020

Подписана в печать 29.09.2020