

## Новые модели изучения воспалительной активности

И.А. Дьяченко<sup>1,2</sup>, В.А. Паликов<sup>1,2</sup>, Ю.А. Паликова<sup>1,2</sup>, Я.А. Андреев<sup>3</sup>,  
А.Н. Мурашёв<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> – Филиал ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Пуцино

<sup>2</sup> – Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пуцино

<sup>3</sup> – ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва

Контактная информация: Дьяченко Игорь Александрович, [dyachenko@bibch.ru](mailto:dyachenko@bibch.ru)

В исследовании представлен поведенческий тест на химическое воздействие для определения анальгетической активности и оценки воспалительного процесса. Тест отвечает современным требованиям к исследованию фармакологически активных веществ, проявляющих анальгетическую активность, и гуманному обращению с экспериментальными животными.

**Ключевые слова:** модель *in vivo*, поведенческий тест, воспалительный процесс, анальгетическая и противовоспалительная активность.

### Введение

Проведение всестороннего изучения активности потенциального лекарственного вещества (ЛВ) в экспериментах на животных является основной частью доклинических испытаний фармакологического исследования. На сегодняшний день исследование новых ЛВ, обладающих противовоспалительной активностью, занимает около 15% от общего числа исследований в мире [7]. Независимо от причин возникновения, многие острые и хронические заболевания сопровождаются болью и воспалением, резко снижающими качество жизни человека, его социальную адаптацию, вызывая постоянные страдания.

Воспаление – это комплексный местный и общий патологический процесс, возникающий в ответ на повреждение (*alteratio*) клеточных структур организма или действие патогенного

раздражителя и проявляющийся в реакциях (*exudatio* и др.), направленных на устранение продуктов повреждения, а если возможно, то и агентов (раздражителей), а также приводящий к максимальному для данных условий восстановлению (*proliferatio* и др.) в зоне повреждения. Именно воспалительный процесс является одной из основных причин обращения людей за врачебной помощью. Более 60% заболеваний ассоциированы с воспалением. Около 5% человечества страдает от хронического воспаления. Ежедневно свыше 12 млн человек в мире принимают какой-либо противовоспалительный препарат. Однако их прием является одной из самых типичных причин нежелательных реакций на фармакотерапию. По официальным оценкам, в США использование ненаркотических анальгетиков и нестероидных противовоспалительных пре-

паратов ежегодно приводит более чем к 70 тыс. госпитализаций и 7 тыс. смертельных случаев [1].

Еще в конце XIX столетия И.И. Мечников считал, что воспаление – это приспособительная и выработанная в ходе эволюции реакция организма. Одним из важнейших ее проявлений служит фагоцитоз микрофагами и макрофагами патогенных агентов и обеспечение таким образом выздоровления организма. Но репаративная функция воспаления была для И.И. Мечникова сокрыта. Подчеркивая защитный характер воспаления, он в то же время полагал, что целительная сила природы, которую и представляет собой воспалительная реакция, не есть еще приспособление, достигшее совершенства. По мнению И.И. Мечникова, доказательством этого являются частые болезни, сопровождающиеся воспалением, и случаи смерти от них [2].

Внешние признаки воспаления определил уже древнеримский писатель Авл Корнелий Цельс:

- 1) «*rubor*» (краснота, покраснение, эритема);
- 2) «*tumor*» (опухоль, в данном случае – припухлость, т.е. отёк);
- 3) «*calor*» (жар, гипертермия – повышение местной температуры);
- 4) «*dolor*» (боль).

Дополнил Клавдий Гален (130-200 гг. н.э.), добавив «*functio laesa*» (нарушение функции).

Недавнее открытие и описание семейства рецепторов TRPV-1 и TRPA-1 предоставило ряд новых потенциально терапевтических мишеней для лечения хронической боли. Последние отчеты показали, что каналы TRPA-1 могут играть важную роль в возникновении боли воспалительного генеза,

спровоцированной введением CFA и формалина [4, 6]. Принципиальное значение, с точки зрения понимания воспалительной боли и механизма действия анальгезирующих и противовоспалительных препаратов, играет разработка новых биомоделей. Аллилизотиоционат (АИТС) является агонистом TRPA-1-канала, тем самым способствуя развитию острой и воспалительной боли [3, 5]. Способность воздействовать на TRPA-1-каналы дает возможность моделировать острую и воспалительную боль, и на основе этой биомодели изучать активность новых препаратов.

**Целью** данной работы явилась разработка биомодели, которая в дальнейшем помогла бы исследовать терапевтический потенциал фармакологического TRPA-1 антагонизма для лечения воспалительных и нейропатической болей.

### **Материалы и методы**

Исследование проводилось на мышцах CD-1 в возрасте 8-10 недель. Животные были получены из НПП «Питомник лабораторных животных» Филиала ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН и имели статус СПФ, подтверждаемый сертификатом производителя.

Лаборатория биологических испытаний Филиала ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН имеет свидетельства об аккредитации Словацкой национальной службы аккредитации (SNAS), Росаккредитации, Международной организации AAALAC по гуманному обращению с лабораторными животными, что свидетельствует о высоком качестве выполняемой работы.

Все процедуры по рутинному уходу за животными выполнялись в соответствии со стандартными операционными процедурами лаборатории. Животные содержались в комнате барьерного типа, в контролируемых условиях окружающей среды (20-24°C и 28-63% относительная влажность). Температура и влажность постоянно контролировались с помощью системы мониторинга EVL. В комнате содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения и, по крайней мере, 10-кратная смена объема воздуха комнаты в час.

Мышам субплантарно в заднюю лапу вводился АИТС в различных концентрациях согласно групповой принадлежности (табл.). Контрольной группе вводился физиологический раствор. После чего в течение 5 мин фиксировалось количество облизываний задней лапы и время её поджатия.

Также измерялся диаметр подушечки задней лапы до момента введения вещества и через 2, 4, 6 и 24 ч после введения с помощью электронного штангенциркуля.

Для всех полученных данных была применена описательная статистика: подсчитаны среднее значение (Mean) и стандартная ошибка среднего (SEM). Экспериментальные данные статистически обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента для независимых рядов, расчёты результатов проводились

в пакете компьютерных программ «MS Excel 2010». Изменения исследуемых показателей считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Полученные данные в результате подсчета количества облизываний задней лапы показывают прямую зависимость «доза-эффект». Так, при введении АИТС в концентрации 0,05% количество облизываний составляет, в среднем, 3 раза, а при 1% концентрации количество облизываний составило, в среднем, 20 раз (рис. 1). Следует заметить, что животные из группы с физиологическим раствором не облизывали лапу, в которую вводили вещество. Различия между группами статистически достоверны.

В данном тесте к значимым результатам можно отнести время поджатия задней лапы в течение 5-ти мин с момента введения вещества. Обнаружена четкая зависимость между концентрацией АИТС и временем поджатия лапы (рис. 2). Такие концентрации АИТС, как 0,5% и 1%, имеют ярко выраженный и хорошо прослеживаемый эффект, что позволит оценить анальгетическую активность новых фармакологически активных веществ. Все группы имеют достоверные отличия между собой и относительно контрольной группы.

Таблица

Распределение животных по группам

Номер группы	Кол-во животных (n)	Вещество	Концентрация вещества	Объем введения (мл)
1	5	Физ. р-р.	0,9%	0,02
2	5	АИТС	0,05%	0,02
3	5	АИТС	0,1%	0,02
4	5	АИТС	0,5%	0,02
5	5	АИТС	1%	0,02

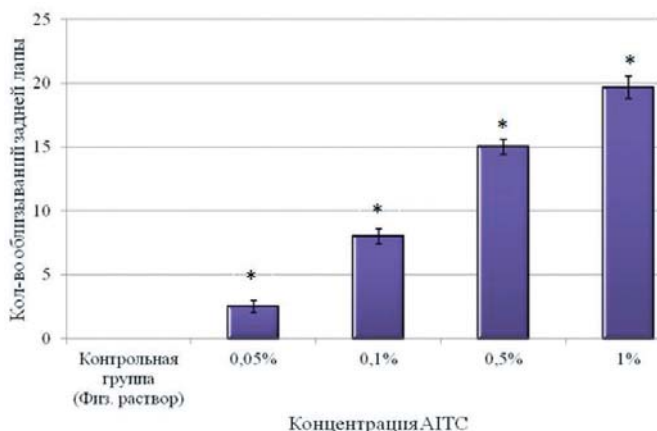


Рис. 1. Сравнение количества облизываний задней лапы мышей CD-1 в течение 5-ти мин после однократного субплантарного введения физиологического раствора и аллилизотиоционата (АИТС) в 4-х концентрациях: 0,05; 0,1; 0,5; 1%.

Примечание: \* –  $p < 0,05$  относительно предыдущей группы по t-критерию Стьюдента.

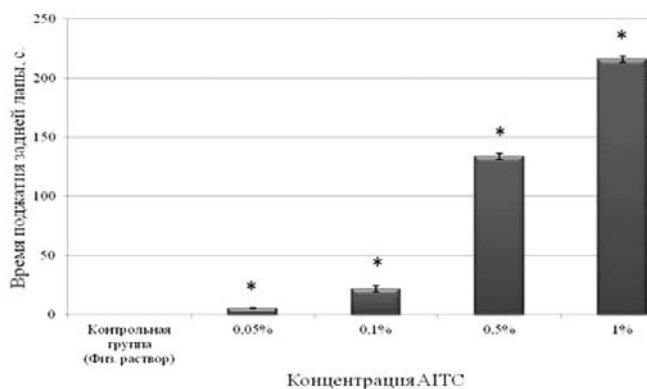


Рис. 2. Сравнение время поджатия задней лапы мышей CD-1 в течение 5-ти мин после однократного субплантарного введения физиологического раствора и аллилизотиоционата (АИТС) в 4-х концентрациях: 0,05; 0,1; 0,5; 1%.

Примечание: \* –  $p < 0,05$  относительно предыдущей группы по t-критерию Стьюдента.

Измерение диаметра подушечки задней лапы в различных временных точках показывает, что группы, которым вводили АИТС в концентрациях 0,5% и 1%, имеют наиболее выраженное проявление в виде отека лапы (рис. 3). Максимальный объем лапы достигается уже через 2 ч после введения. Между собой обе эти группы не имеют достоверных отличий ни в од-

ной из временных точек. Группы мышей, которым вводили АИТС в концентрациях 0,05% и 0,1%, достоверно отличаются от контрольной группы и от групп с 0,5% и 1% АИТС во временных точках 2, 4 и 6 ч. Между собой обе эти группы достоверно неотличимы. Объем лапы у всех групп через 24 ч достоверно не отличается и приближен к первоначальным значениям.

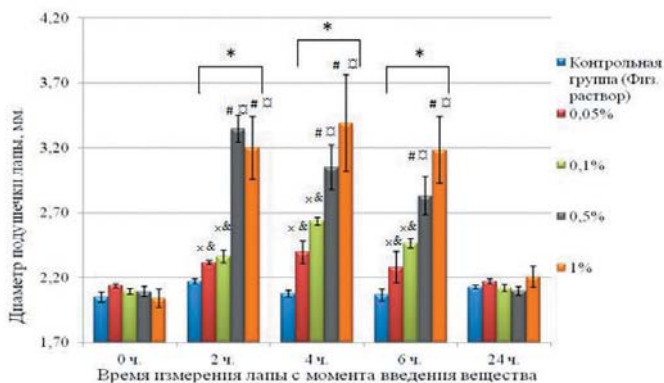


Рис. 3. Сравнение диаметра подушечки задней лапы мышей CD-1 в различные временные точки после однократного субплантарного введения физиологического раствора и аллилизотиационата (АИТС) в 4-х концентрациях: 0,05; 0,1; 0,5; 1%.

Примечания: \* –  $p < 0,05$  относительно контрольной группы для соответствующей временной точки по t-критерию Стьюдента;

# –  $p < 0,05$  относительно группы с концентрацией АИТС 0,05% для соответствующей временной точки по t-критерию Стьюдента;

□ –  $p < 0,05$  относительно группы с концентрацией АИТС 0,1% для соответствующей временной точки по t-критерию Стьюдента;

x –  $p < 0,05$  относительно группы с концентрацией АИТС 0,5% для соответствующей временной точки по t-критерию Стьюдента;

& –  $p < 0,05$  относительно группы с концентрацией АИТС 1% для соответствующей временной точки по t-критерию Стьюдента.

### Выводы

В работе представлены основные направления по изучению анальгетической и противовоспалительной активности новых фармакологических веществ. При проведении доклинических исследований препаратов с предполагаемым анальгезирующим эффектом следует использовать АИТС в концентрации 1% и фиксировать количество облизываний и время поджатия задней лапы. Оценку противовоспалительной активности препаратов рекомендуется проводить с использованием вещества АИТС в концентрации 0,5%, измеряя диаметр подушечки задней лапы. Данная концентрация имеет достаточно выраженный ответ в виде отека задней

лапы. Учитывая отсутствие достоверных отличий от более высокой концентрации 1%, использование 0,5% АИТС более предпочтительно с точки зрения гуманности.

Данный тест полностью отвечает требованиям к доклиническим испытаниям новых фармакологически активных анальгетических средств в соответствии с ГОСТ Р53434-2009 «Национальный стандарт РФ Принципы надлежащей лабораторной практики (Principles of good laboratory practice)», утвержденным 01.03.2010 г.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-24-00118).

### Список литературы

1. *Аляутдин Р.Н., Романов Б.К., Давыдова О.Н., Чубарев В.Н.* Методические рекомендации для обучаемых. Фармацевтический факультет ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова Росздрава. - М. 2006.
2. *Струков А.И., Серов В.В.* Патологическая Анатомия. 5-е издание. 2010. С. 169.
3. *Guimaraes M.Z.P., Jordt S.-E.* TRP Ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades. Chapter 11TRPA1: A sensory channel of many talents: CRC Press. 2007.
4. *Hatakeyama Y., Takahashi K., Tominaga M., Kimura H., Ohta T.* Polysulfide evokes acute pain through the activation of nociceptive TRPA1 in mouse sensory neurons // *Mol. Pain.* 2015 May 2; 11:24. Doi: 10.1186/s12990-015-0023-4.
5. *Lumpkin E.A., Caterina M.J.* Mechanisms of sensory transduction in the skin // *Nature.* 2007. V. 445. N. 7130. P. 858-865.
6. *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 // *PNAS.* 2007. V. 104. N. 33.
7. [Электронный ресурс] - Режим доступа: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/FDAVeterinarianNewsletter/ucm190729.html>, свободный. - Загл. с экрана. - Яз. рус., англ.

## New models of studying of inflammatory activity

I.A. Diyachenko, V.A. Palikov, Yu.A. Palikova, Ya.A. Andreyev, A.N. Murashev

The article describes the behavioral test that uses the chemical effect to determine the analgesic activity and evaluation of the inflammatory process. It meets contemporary requirements for a study of the pharmacologically active materials with analgesic activity, and to ethical treatment of experimental animals.

**Key words:** *in vivo* models, behavioral test, inflammatory process, analgesic and anti-inflammatory activity.