

Зарубина И.В., Федорова О.В., Шабанов П.Д.

Анализ эффектов тропалгина при воспалительной боли у крыс с различным болевым порогом

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, 6

У крыс Вистар определяли индивидуальную болевую чувствительность в тесте отдергивания хвоста (*tail-flick*) при воздействии на него фокусированного теплового луча. Животные с латентным периодом отдергивания хвоста менее 5 с считались высокочувствительными к боли (ВЧ), более 10 с — низкочувствительными (НЧ) к боли. У них изучали эффекты нового неопиоидного анальгетика тропалгина, вводимого внутривнутрибрюшинно в дозе 2 мг/кг (ЕД₅₀). Тропалгин проявлял выраженное анальгетическое действие при асептическом воспалении (формалиновый тест), сопоставимое с эффектами метамизола натрия (50 мг/кг) и диклофенака натрия (7 мг/кг). Тропалгин не менял индивидуальной болевой чувствительности у ВЧ и НЧ крыс без воспаления. При моделировании асептического воспаления тропалгин (2 мг/кг) уменьшало выраженность болевого поведения у крыс в обе фазы воспалительной реакции. В группе ВЧ к боли крыс суммарное время болевой поведенческой реакции снижалось на 53% в фазу острой боли и на 58% в фазу тонической боли. У НЧ к боли крыс время вылизывания воспаленной лапы уменьшалось в первую фазу на 42%, во вторую фазу на 66%. Предполагается, что в основе анальгетического эффекта тропалгина лежит его способность высвободить эндогенный аденозин в пуринергических нейронах, ранее продемонстрированная для подобных соединений тропина.

Ключевые слова: болевая чувствительность, острая воспалительная боль, анальгетики, тропалгин, метамизол натрия, диклофенак натрия

Zarubina I.V., Fedorova O.V., Shabanov P.D.

Analysis of tropalgin effects in an inflammation pain model in rats with different pain threshold

Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg 194044, Acad. Lebedev street, 6, i.v.zarubina@inbox.ru

Individual pain sensitivity of male Wistar rats was determined in a tail-flick model after action of focused thermal ray (flick) on tail. Rats with latency less than 5 sec were qualified as high sensitive (HS) to pain, more than 10 sec as low sensitive (LS) to pain. Effects of a new nonopioid analgetic tropalgin 2 mg/kg (ED₅₀) i.p. was studied in both groups of rats. Tropalgin was effective as an analgetic in aseptic inflammation model (formaldehyde test). The analgetic effects of tropalgin were same as after administration of methamizol sodium (50 mg/kg) or diclofenac sodium (7 mg/kg). Tropalgin did not change individual pain sensitivity in both HS and LS rats without inflammation. In HS to pain rats, the common time of pain behavioral reactions was decreased by 53% in an acute phase of pain and by 58% in a tonic phase of pain in inflammation pain model. In LS to pain rats, the time of leaking of inflamed paw was decreased by 42% in the first phase and by 66% in the second phase. We suggest that analgetic effect of tropalgin is connected with adenosine release in purinergic neurons that has been demonstrated earlier for drugs of tropin structure.

Key words: pain sensitivity, acute inflammation pain, analgetics, tropalgin, methamizol sodium, diclofenac sodium

Боль относится к значимым медико-социальным проблемам, поскольку существенно изменяет поведение человека. Острая и хроническая боль приводит к различным функциональным нарушениям основных систем организма (кровообращения, дыхательной, пищеварительной и др.), нарушает процессы регуляции разных видов чувствительности и формирует особый

тип болевого поведения [1]. Хорошо известно, что реакции человека и животных на любые экстремальные воздействия не одинаковы, и в популяции обнаруживаются устойчивые и чувствительные особи к действию стрессорных факторов. При этом устойчивость определяется факторами индивидуальной восприимчивости к экстремальным факторам среды [2, 3]. Порог болевого ощущения также формируется на основе генетически детерминированного взаимодействия ноцицептивной и антиноцицептивной систем организма и является эволюционно выработанной жизненно важной

Для корреспонденции: Зарубина Ирина Викторовна, д.биол.н., проф., ст. науч. сотр. каф. фармакологии ВМА им. С.М. Кирова МО РФ, e-mail: i.v.zarubina@inbox.ru

константой, не одинаковой у разных индивидуумов [4, 5]. Ранее нами показано, что крысы с низкой чувствительностью к боли обладают большей устойчивостью к тяжелой травме и иммобилизационному стрессу, чем высокочувствительные к боли животные [6]. Это подтверждает важное значение индивидуальной болевой чувствительности при выборе эффективной и безопасной терапии болевых синдромов. Патогенез боли, вызванной воспалением или повреждением тканей, обусловлен непосредственным раздражением или сенсibilизацией ноцицептивных нервных окончаний медиаторами воспаления. На периферические и соматические компоненты боли такие, как воспаление, отек вследствие раздражения болевых рецепторов прямо действуют нестероидные противовоспалительные средства (НПВП), механизм действия большинства которых связан с угнетением активности циклооксигеназы в спинном мозге и на периферии, а также торможением избыточной продукции медиаторов воспаления [7]. Длительное применение этой группы препаратов приводит к развитию таких нежелательных явлений, как гастропатия, кардиоваскулярные нарушения, гепато-ренальные дисфункции и др. Поэтому поиск эффективных анальгетиков нового поколения с неопиоидным механизмом действия остается актуальной медицинской проблемой.

Цель исследования — изучение анальгетического действия нового производного тропина — тропалгина при острой асептической воспалительной реакции у животных с различной болевой чувствительностью.

Методика

Опыты выполнены на половозрелых крысах-самцах Вистар массой 160—180 г, полученных из питомника Рапполово РАМН (Ленинградская область). Животных содержали в виварии в стандартных условиях освещения и питания при свободном доступе к воде и пище. Исследования осуществляли в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 2003 г. №267), требованиями Международной ассоциации по изучению боли и Директивы Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС). Работа одобрена локальным комитетом по этике при Военно-медицинской академии им. С.М.Кирова.

Индивидуальную болевую чувствительность определяли в тесте отдергивания хвоста (tail-flick) при воздействии на него фокусированного теплового луча [8]. Латентный период отдергивания хвоста регистрировали с помощью оптоэлектронного анальгезиметра ТФ-003 (Россия). Мощность лампы осветителя составляла 50 Вт, сила тока 3 мА, точность регистрации — 0,1 с. Животные с болевым порогом менее 5 с

(временем задержки отдергивания хвоста) считались высокочувствительными к боли (ВЧ), более 10 с — низкочувствительными (НЧ) к боли.

Животным внутрибрюшинно вводили тропалгин в дозе 2 мг/кг (синтезирован в отделе нейрофармакологии им. С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург). Через 20 мин моделировали острое асептическое воспаление. В качестве хемотропной модели неспецифической асептической воспалительной реакции использовали «формалиновый тест», являющийся международно признанной процедурой для скрининга средств с потенциальной анальгетической активностью [9]. Для формирования боли крысам интраплантарно (в подушечку задней лапы) вводили 20 мкл 4% водного раствора формалина. Интенсивность болевой реакции оценивали в течение 60 мин по продолжительности суммарного времени вылизывания инъецированной лапы и общему числу спонтанных вздрагиваний.

Коэффициент анальгезии рассчитывали по известной формуле [10]:

$$A = (P_k - P_o) / P_k * 100\%, \text{ где}$$

P_k — количество регистрируемых поведенческих реакций в контроле;

P_o — количество регистрируемых поведенческих реакций в опытной группе;

A — коэффициент анальгезии.

Препаратами сравнения служили нестероидные противовоспалительные средства — метамизол натрия (анальгин, АО «Софарма», София, Болгария) в дозе 50 мг/кг и диклофенак натрия (Хемофарм, Сербия) в дозе 7 мг/кг, вводимые внутрибрюшинно. Контрольные животные получали эквивалентный объем физиологического раствора.

Для статистической обработки полученных количественных данных применяли пакеты программ SPSS Sigma Stat 3.0 и Minitab 14. В качестве статистических критериев использовали традиционные показатели описательной статистики. Для сравнения контрольной и экспериментальных групп использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, а также критерии попарных сравнений групп Стьюдента—Ньюмена—Кейлса и Данна. Из непараметрических критериев использовали критерий Краскела—Уоллиса для сравнения групп. Для оценки соответствия распределений случайных величин гауссовым применяли критерий нормальности Колмогорова—Смирнова.

Результаты и обсуждение

Болевая реакция при остром воспалении у животных, развивающаяся в ответ на интраплантарное введение водного раствора формалина, состоит из 2 фаз:

1-я фаза характеризует острую боль, длится в течение 5 мин и связана в основном с прямой активацией тонких немиелиновых С-волокон, передающих импульсацию от болевых рецепторов, 2-я фаза относится к тонической боли и продолжается в течение 1 ч и более. Во 2-ю фазу развивается воспалительный процесс в периферических тканях и изменяются функции нейронов задних рогов серого вещества спинного мозга, где расположены нейроны болевых восходящих путей. В течение этих фаз у животных наблюдается характерное болевое поведение: полизывание поврежденной лапы и вздрагивания тела или воспаленной конечности. Первые реакции относятся к супрасегментарным механизмам интегративной болевой реакции — дискриминативным, эмоциональным и моторным. Болевые вздрагивания служат признаком интенсивности спинальных ноцицептивных рефлексов [9].

В контрольной группе животных в 1-ю фазу острой болевой реакции были выражены оба признака болевого поведения. Однако у ВЧ к боли крыс количество общих болевых поведенческих реакций было больше, чем в группе НЧ животных. Суммарное время вылизывания инъецированной лапы у ВЧ животных превышало таковое у НЧ крыс на 63%, во 2-ю фазу, позволяющую оценить тоническую боль — на 33% (табл. 1).

Во 2-ю фазу воспалительной реакции у животных увеличивалось количество болевых вздрагиваний тела и (или) поврежденной конечности, что также было более выражено в группе ВЧ к боли крыс.

Различия в поведенческих реакциях у животных с различной чувствительностью к боли зависят от вовлечения механизмов реализации стресс-лимитирующих (опиоидных) систем организма. Они представлены главным образом скоплением энкефалинергиче-

ских нейронов в области серого околоспинального вещества головного мозга и имеют восходящие и нисходящие (в спинной мозг) проекции [11]. Активация нисходящих энкефалинергических нейронов меняет афферентные потоки болевой чувствительности и, следовательно, повышает пороги боли. Этот феномен, по-видимому, лежит в основе индивидуально сниженной болевой чувствительности. Термо-, хемо-, волюмен-, тактильные рецепторы кожи и внутренних органов в ответ на болевой раздражитель запускают ноцицептивные системы мозга, обеспечивая проведение болевого импульса и формирование реакции на боль. Также они активируют важнейшие системные реакции организма по поддержанию гомеостаза в новых условиях, в том числе системы кровообращения, состава крови, дыхания, метаболизма. Эти системы формируют быструю адаптацию к экстремальным ситуациям, в том числе моделируемое в наших исследованиях острое асептическое воспаление. Очевидно, нейрхимическое звено, связывающее эти два явления, вовлекает сходные афферентные триггеры — активацию ноцицепторов при реализации боли и активацию гомеостатических реакций через разные рецепторы, включая ноцицепторы.

У ВЧ животных, получавших метамизол натрия, выраженность болевой реакции в 1-ю фазу воспаления снижалась на 37%, у НЧ крыс — на 28%. Во 2-ю фазу воспаления суммарное время болевой поведенческой реакции снижалось у ВЧ крыс на 19%, у НЧ крыс — на 20%. На фоне действия диклофенака натрия у ВЧ животных болевые реакции в 1-ю фазу воспаления уменьшались на 23%, у НЧ к боли крыс — на 12%. Во 2-ю фазу воспалительной реакции выраженность болевых реакций снижалась у ВЧ крыс на 47%, у НЧ крыс — на 67% (табл. 1).

Таблица 1

Эффекты тропалгина при асептическом воспалении ($M \pm m$, $n = 10$)

Группы животных		Общая болевая реакция, с	1-я фаза воспаления		2-я фаза воспаления	
			Суммарное время облизывания лап, с	Количество вздрагиваний	Суммарное время облизывания лап, с	Количество вздрагиваний
Контроль	ВЧ	532,3	130,3 ± 4,6	50 ± 4,1	402 ± 17	127 ± 2,5
	НЧ	382,9 [#]	79,7 ± 6,2 [#]	38 ± 3,7 [#]	303,2 ± 14,5 [#]	87 ± 2,8 [#]
Тропалгин, 2 мг/кг	ВЧ	296,5	61,7 ± 4,1*	32 ± 2,3*	234,8 ± 26,6*	55 ± 1,9*
	НЧ	134,94 [#]	33,2 ± 3,0**	22 ± 1,2**	101,7 ± 9,9**	28 ± 1,8**
Метамизол натрия, 50 мг/кг	ВЧ	407,7	82,3 ± 1,4**	47 ± 2,3	324,8 ± 10**	93 ± 4,4*
	НЧ	299,5 [#]	58,5 ± 1,6**	30 ± 3,4 [#]	242,8 ± 4,4**	71 ± 3,9**
Диклофенак, 7 мг/кг	ВЧ	313,3	100,2 ± 1,4**	45 ± 2,3	212,7 ± 3,4**	86 ± 2,7*
	НЧ	169,0 [#]	70,5 ± 2,5**	27 ± 1,6**	98,3 ± 1,8**	68 ± 3,0**

Примечание. * — значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с контролем; # — между группами животных с различной чувствительностью к боли.

Введение животным с разной чувствительностью к боли (но без воспаления), тропалгина в минимальной эффективной дозе 2 мг/кг, вызывающей аналгезию у 50% животных ($E_{D_{50}}$), перед повторением теста отдергивания хвоста не изменяло характера их индивидуальной болевой чувствительности, она сохранялась на уровне исходной (ВЧ или НЧ), то есть препарат не проявляет антиболевого действия при отступлении включения ноцицептивной системы. При моделировании асептического воспаления введение тропалгина в дозе 2 мг/кг уменьшало выраженность болевого поведения у крыс в обеих фазах воспалительной реакции. В группе ВЧ к боли крыс суммарное время болевой поведенческой реакции снижалось на 53% в фазу острой боли и на 58% в фазу тонической боли. У НЧ к боли крыс время вылизывания воспаленной лапы уменьшалось в 1-ю фазу на 42%, во 2-ю фазу на 66%. На фоне действия тропалгина количество вздрагиваний в 1-ю фазу воспалительной реакции уменьшалось в группе ВЧ животных на 36%, у НЧ крыс на 57%. Более выраженное уменьшение интенсивности этого паттерна болевого поведения наблюдалось во 2-ю фазу воспалительной реакции. Количество спонтанных вздрагиваний уменьшалось у ВЧ крыс на 57%, у НЧ крыс на 68%. Следовательно, тропалгин проявляет аналгетическое действие при асептическом воспалении. Рассчитанный коэффициент аналгезии тропалгина на модели хемогенной асептической воспалительной реакции при острой боли у ВЧ крыс составлял 53%, у НЧ крыс — 58%. При тонической боли коэффициент аналгезии тропалгина равнялся 42% в группе ВЧ крыс и 66% у НЧ животных (табл. 2).

Значения коэффициента аналгезии тропалгина при асептическом воспалении у ВЧ и НЧ к боли крыс

в 1-ю и 2-ю фазы воспалительной реакции были сопоставимы с коэффициентами аналгезии диклофенака натрия и превышали значения коэффициента при введении метамизола натрия. Это предполагает возможность наличия у тропалгина как аналгетического, так и противовоспалительного действия.

Способность метамизола натрия и диклофенака натрия ингибировать активность циклооксигеназы 2-го типа (воспалительной) обеспечивает классическую триаду в их эффектах: аналгетическое, противовоспалительное и жаропонижающее действие [7]. Механизм действия тропалгина до конца не изучен. Известно, что производные тропина способны блокировать Н-холинорецепторы и оказывать аденозинолиберующее действие [12]. Возможно активация эндогенных антиболевых систем, в частности, аденозина, лежит в основе аналгетического действия тропалгина.

Таким образом, тропалгин проявляет выраженное аналгетическое действие при асептической воспалительной реакции у животных с различной болевой чувствительностью. Для достижения оптимального аналгетического действия фармакологических средств необходимо учитывать особенности индивидуальной болевой чувствительности. Персонализированный подход в клинической практике позволит повысить эффективность обезболивания конкретных групп больных.

Выводы

1. Введение тропалгина интактным животным, разделенным по их индивидуальной чувствительности к боли, не изменяет их исходный уровень болевого порога в тесте отдергивания хвоста.

Таблица 2

Коэффициент аналгезии препаратов при асептическом воспалении

Препарат	Фазы воспаления	Группы животных	Коэффициент аналгезии
Метамизол натрия, 50 мг/кг	1	ВЧ	37
		НЧ	28
	2	ВЧ	19
		НЧ	20
Диклофенак, 7 мг/кг	1	ВЧ	23
		НЧ	12
	2	ВЧ	47
		НЧ	67
Тропалгин, 2 мг/кг	1	ВЧ	53
		НЧ	58
	2	ВЧ	42
		НЧ	66

2. При боли, вызванной асептическим воспалением, тропалгин проявляет анальгетическое действие, сопоставимое по величине с эффектами метамизола натрия и диклофенака натрия, но он более активен, поскольку действует в меньшей дозе (ED_{50} 2 мг/кг).

3. Вероятным механизмом анальгетического действия тропалгина при остром асептическом воспалении является способность высвобождать эндогенный аденозин в пуринергических нейронах.

Список литературы

1. Kemler M.A. Spinal cord stimulation in patients with chronic reflex sympathetic dystrophy. *New Engl. J. Med.* 2000; Vol. 142: 370-80.
2. Ростовцева Е.В., Бондарева Э.А., Агапов И.И. Молекулярно-генетические аспекты индивидуальных различий в болевомощении и терморегуляции. *Физиология человека.* 2009; 35(1): 130-40.
3. Kim H., Neubert J.K., San Miguel A. et al. Genetic influence on variability in human acute experimental pain sensitivity associated with gender, ethnicity and psychological temperament. *Pain.* 2004; 109(3): 488-90.
4. Пшенникова М.Г., Смирнова В.С., Грифова В.Н., Шимкович М.В. и др. Устойчивость к развитию невропатического болевого синдрома у крыс линии Август и популяции Вистар, обладающих разной врожденной устойчивостью к стрессовому воздействию. *Боль.* 2008; 2:13-6.
5. Turk D.C., Dworkin R.H., Allen R.R. et al. Core outcome domains for chronic pain clinical trials: IMMPACT recommendations. *Pain.* 2003; 106(3):337-45.
6. Зарубина И.В., Шабанов П.Д. Значение болевой чувствительности для устойчивости к иммобилизационному стрессу. *Патофизиология и экспериментальная терапия.* 2012; 1: 44-8.
7. Давыдов А.Т., Тюкавин А.И., Резванцев М.В., Конончук В.В., Шабанов П.Д. Фантомная боль, роль и место различных методов лечения фантомно-болевого синдрома. *Обзоры по клин. фармакологии и лек. терапии.* 2014;12(1): 35-58.
8. Kawakita K., Funakoshi M. A quantitative study on the tail flick test in the rat. *Physiol. Behav.* 1987; 39(2): 235-40.
9. Janicki P.K., Parris W. Animal models for pain research. *Current Pain and Headache Reports.* 1997; Vol. 1: 197-204.
10. Кузьмин А.В., Звартау Э.Э. *Сравнительная оценка анальгетического потенциала и наркологической безопасности центральных анальгетиков в опытах на мышах. Эксперим. и клин. фармакол. болеутоляющих средств.* Под ред. Ю.Д.Игнатова. СПб., 1998.
11. Волчков В.А., Игнатов Ю.Д., Страшнов В.И. *Болевые синдромы в анестезиологии и реаниматологии.* М. Медпресс-информ. 2006.

12. Сердюк С.Е., Гмиро В.Е. Периферически действующие медиаторы боли и анальгезии потерцируют центральное анальгезирующее действие фентанила и анальгина у крыс. *Рос. физиол. журнал им. И.М.Сеченова.* 2012; 98(3): 325-30.

Поступила 06.04.15

References

1. Kemler M.A. Spinal cord stimulation in patients with chronic reflex sympathetic dystrophy. *New Engl. J. Med.* 2000; Vol. 142:370-80.
2. Rostovtseva E.V., Bondareva E.A., Agapov I.I. Molecular and genetic aspects of individual difference in pain perception and thermoregulation. *Human Physiology.* 2009; 35(1): 130-40. (in Russian)
3. Kim H., Neubert J.K., San Miguel A. et al. Genetic influence on variability in human acute experimental pain sensitivity associated with gender, ethnicity and psychological temperament. *Pain.* 2004;109(3):488-90.
4. Pshennikova M.G., Smirnova V.S., Grifova V.N., Shimkovich M.V. et al. Resistance to neuropathic pain syndrome development in August rats and Wistar line possessing different innate resistance to stress exposure. *Pain.* 2008;(2):13-6. (in Russian)
5. Turk D.C., Dworkin R.H., Allen R.R. et al. Core outcome domains for chronic pain clinical trials: IMMPACT recommendations. *Pain.* 2003; 106(3): 337-45.
6. Zarubina I.V., Shabanov P.D. Significance of pain sensitivity for resistance to immobilization stress. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2012; 1: 44-8. (in Russian)
7. Davydov A.T., Tyukavin A.I., Rezvantsev M.V., Kononchuk V.V., Shabanov P.D. Phantom pain, role and place of different methods of treatment of phantom-pain syndrome. *Obz. Klin. Farmakol. i Lek. Terapii.* 2014;12(1): 35-58. (in Russian)
8. Kawakita K., Funakoshi M. A quantitative study on the tail flick test in the rat. *Physiol. Behav.* 1987; 39(2): 235-40.
9. Janicki P.K., Parris W. Animal models for pain research. *Current Pain and Headache Reports.* 1997; 1: 197-204.
10. Kuz'min A.V., Zvartau E.E. *Comparative assessment of analgetic potential and narcological safety of the central analgetics in the experiments on mice.* Ed. by Y.D. Ignatov. St. Petersburg, 1998. (in Russian)
11. Volchkov V.A., Ignatov Y.D., Strashnov V.I. *Pain syndromes in anesthesiology and reanimatology.* Moscow, Medpress-inform; 2006. (in Russian)
12. Serdyuk S.E., Gmiro V.E. Peripherally acting pain transmitters and analgesia potentiate central analgetic action of fentanyl and analgin in rats. *Sechenov Rus. Physiol J.* 2012; 98(3):325-30. (in Russian)

Received 06.04.15

Сведения об авторах:

Федорова Ольга Владимировна, соискатель каф. фармакологии ВМА им. С.М. Кирова МО РФ
Шабанов Петр Дмитриевич, д.м.н., проф., зав. каф. ВМА им. С.М. Кирова МО РФ, e-mail: pdshabanov@mail.ru