

УДК 612.159:615.3

**ВЛИЯНИЕ 1-ГИДРОКСИ-1,1-ЭТИЛИДЕНДИФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ,
БИС(2-ПИРИДИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛИЛ-3)ПРОПАНА И ИХ АДДУКТА НА
БОЛЕВУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ САМЦОВ КРЫС (ЧАСТЬ 1)**

*Черетаев И. В., Раваева М. Ю., Джелдубаева Э. Р., Чуюн Е. Н., Шульгин В. Ф.,
Шейхмамбетов Н., Палаевская М. В.*

*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: cheretaev86@yandex.ru*

В статье представлены результаты оценки влияния 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты, бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропана и их аддукта в дозах 5, 50, 100 и 200 мг/кг на болевую чувствительность самцов крыс. Эксперименты проведены на 150 лабораторных крысах-самцах линии Вистар в тест-моделях острой термической («tail-flick», «hot plate») и механической боли (тест Рэндалла-Селитто). Показано, что 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновая кислота обладает выраженным противоболевым эффектом при термическом воздействии в дозах 5 и 200 мг/кг, а при механическом болевом воздействии – в дозе 50 мг/кг; бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропан – в тесте «tail-flick» в дозе 200 мг/кг, в тесте Рэндалла-Селитто – в дозе 50 мг/кг; их аддукт оказывает анальгетический эффект в моделях термической боли в дозах 50, 100 и 200 мг/кг, а при механическом болевом раздражении – в дозах 5, 50, 100 и 200 мг/кг.

Ключевые слова: 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновая кислота, бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропан, аддукт, болевая чувствительность, анальгетический эффект, перцептуальный компонент боли, механическая боль, спинальный и супраспинальный механизмы регуляции боли.

ВВЕДЕНИЕ

Более 90 % заболеваний сопровождается болью, и около 20 % населения планеты страдает симптомами, связанными с хронической болью [1]. По некоторым данным травмы, при которых происходит использование анальгетиков, занимали второе место среди всех впервые в жизни зарегистрированных заболеваний в Крыму [2]. Потому поиск новых анальгетиков актуален как для Республики Крым, так и для Российской Федерации в целом.

В настоящее время существует множество биологически активных веществ, обладающих высоким потенциалом с точки зрения возможных эффектов на нервную систему и, в частности, противоболевой активности. К одним из таких соединений относятся бисфосфонаты и 1,2,4-триазолы.

Самым известным представителем химических веществ группы бисфосфонатов на сегодняшний день является 1-гидроксиэтилиден-1,1-дифосфоновая кислота. Известно, что данное соединение применяется в медицинской практике в составе препаратов ксидифон и этидронат как основная действующая субстанция [3–14]. Эти

препараты применяются против остеопороза, при опухолевых поражениях костей, медикаментозного сопровождения других костных и онкологических заболеваний. Данное соединение является родоначальником практически всех других веществ из группы бисфосфонатов, которые обладают антирезорбционной активностью и существенно влияют на обмен кальция в костной ткани и снижают энергетический обмен в клетке за счёт того, что данная кислота встраивается в молекулы аденозинтрифосфата (АТФ) и преобразует её в негидролизуемые соединения. Неспособность таких соединений к гидролизу тормозит АТФ-зависимые клеточные процессы, вызывая, таким образом, апоптоз остеокластов в костной ткани [15, 16]. Как известно [17–22], кальций и АТФ являются основными вторичными мессенджерами в клетке, поэтому влияние на сигнальные каскады с участием кальция и АТФ теоретически способно существенно повлиять на функционирование нервных клеток и синапсов, и, следовательно, на болевую чувствительность.

Другими биологически активными агентами, перспективными с точки зрения воздействия на различные физиологические системы организма, являются 1,2,4-триазолы [23, 24]. Они интересны тем, что являются подходящей основой, матрицей, для сборки комплексных соединений с различными лигандами, обладающими определёнными полезными свойствами [23–26]. Ряд производных 1,2,4-триазола применяется в практической медицинской деятельности как средство для лечения грибковых и вирусных инфекций, некоторых психических расстройств, рака молочной железы, заболеваний сердечно-сосудистой системы [23–28]. У некоторых перспективных производных 1,2,4-триазола известны антибактериальные, анестезирующие, противовоспалительные и антипирогенные эффекты, способность снижать артериальное давление и риск развития токсических поражений и заболеваний печени, антиоксидантная и противосвёртывающая активность в отношении системы крови [23–26].

Данные о биологических свойствах совместных гетеролигандных комплексов дифосфоновых кислот и производных 1,2,4-триазолов в литературе не обнаружены, хотя огромный потенциал синтетических возможностей модифицирования молекулы 1,2,4-триазолов открывает большие перспективы для синтеза и исследования биологической активности новых его производных с бисфосфонатами для получения эффективных и безопасных лекарственных препаратов нового поколения. Одним из таких производных является аддукт бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропана и 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты.

Цель работы – оценить влияние 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты, бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропана и их аддукта на болевую чувствительность самцов крыс в диапазоне доз от 5 до 200 мг/кг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Предварительно в тесте «открытое поле» [29, 30] было отобрано 150 лабораторных крыс-самцов линии Вистар («ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово») одинакового возраста массой 180-200 г со средним уровнем двигательной активности и низким уровнем эмоциональности. Для этого использовали специализированную рабочую станцию размером 45 x 45 см с

прозрачными полипропиленовыми стенками высотой 20 см, представляющую собой актиметр (IR Actimeter, Pan Lab Harvard Apparatus», Испания) с двумя инфракрасными рамками, выполняющих роль датчиков движений. Для управления рабочей станцией и сбора данных использовали программное обеспечение Actitrack 2.0 (Pan Lab Harvard Apparatus», Испания).

Животных, участвующих в эксперименте, содержали в стандартных условиях вивария при температуре 18–22 °С на подстиле «Рехофикс МК 2000» (на основе початков кукурузы) с естественным 12-часовым свето-темновым циклом, свободным доступом к воде (ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур») и полноценному гранулированному корму ГОСТ Р-50258-92. Исследование проведено в соответствии с ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. Экспериментальная часть работы выполнена в центре коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» кафедры физиологии человека и животных и биофизики Таврической академии (структурное подразделение ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского»).

В эксперименте с каждым веществом принимали участие 50 самцов крыс (всего 150 особей) массой 180–200 г. Животные каждой экспериментальной серии были разделены на 5 групп по 10 особей. Поскольку в эксперименте изучали эффекты 3 веществ (1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты, бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропана и их аддукта), всего было проведено 3 экспериментальных серии по 50 животных в каждой с однократным внутрибрюшинным введением вещества. В каждой серии эксперимента животные одной группы являлись контрольными и получали внутрибрюшинно инъекции по 0,2 мл физиологического раствора и находились в стандартных условиях вивария. Остальные экспериментальные группы получали по 0,2 мл внутрибрюшинных инъекций тестируемого вещества в дозах 5, 50, 100 и 200 мг/кг соответственно. Тестирование параметров болевой чувствительности крыс проводили через 1 час после инъекций в моделях острого болевого стресса «tail-flick», Рэндалла-Селитто («щипцы») и «hot plate» (в соответствии с данными [28, 31] по фармакокинетике бисфосфонатов и 1,2,4-триазолов). Перед проведением тестов «tail-flick» и Рэндалла-Селитто после инъекций животных помещали в специальные фиксаторы для крыс (AE1001-R0, НПК «Открытая Наука», Россия).

В тесте «tail-flick» оценивали перцептуальный компонент боли, основным показателем данного теста служил латентный период реакции отведения хвоста (ЛПРОХ) в ответ на свето-термальное раздражение, который определяли по значению времени (с) проявления реакции отдергивания хвоста. Измерения проводили на приборе LE7106 Tail-flick Meter (Pan Lab Panlab Harvard Apparatus, Испания). На хвост каждой крысы, сидящей в фиксаторе, осуществляли 3 предъявления свето-термального раздражителя с последующим расчетом среднего значения ЛПРОХ в секундах у каждого животного. Данный тест основан на

спинальном флексорном рефлексе, возникающем в ответ на локальное воздействие на хвост высокой температуры, и позволяет судить о болевой чувствительности животных преимущественно на спинальном уровне [32–35].

В тесте Рэндалла-Селитто (экспериментальная установка BIO-RP-R Rodent pincher – analgesia meter, Bioseb, Франция) прибор отображает приложенную силу в граммах – болевой порог (БП) механической болевой чувствительности, при котором происходит ответная реакция животного на постепенно увеличивающееся по силе сдавливание хвоста щипцами [35, 36]. Осуществляли по 3 механических сжатия щипцами хвоста каждой крысы, сидящей в фиксаторе, с последующим расчетом среднего значения БП в граммах у каждого животного.

В тесте «hot plate» (экспериментальная установка Cold and hot plate CNP, Bioseb, Франция) регистрировали ЛПБР животного, который определяли по значению времени (с) проявления реакции отдергивания и лизания конечностей и (или) вокализации. Тест позволяет судить о болевой чувствительности животных на супраспинальном уровне [35, 37–39].

Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона (25 и 75 %), их статистический анализ и графическое представление выполнены в программном пакете Graph Pad Prism 7.0. Достоверность различий между группами определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным тестом Тьюки и непараметрическим критерием множественных сравнений Данна согласно официальным методическим рекомендациям по статистической обработке результатов доклинических исследований лекарственных средств, приведенным в специализированной литературе [35].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты (ГДК) на болевую чувствительность самцов крыс.

Результаты проведенного анализа влияния ГДК на ЛПРОХ крыс в тесте «tail-flick» представлены на рис. 1, А. В данном тесте, являющимся термической моделью острой боли [35], был выявлен анальгетический эффект ГДК в дозе 5 мг/кг, проявлявшийся в достоверном увеличении ЛПРОХ на 36,9 % ($p \leq 0.01$, $n=10$), что свидетельствует об участии перцептуального компонента и спинального механизма в регуляции болевой чувствительности под влиянием указанной дозы ГДК. При этом в диапазоне доз от 5 до 200 мг/кг была обнаружена обратно пропорциональная зависимость эффекта ГДК на ЛПРОХ от дозы с максимумом в дозе 5 мг/кг.

В тесте Рэндалла-Селитто (рис. 1, Б), служащем для определения порогов механической болевой чувствительности [35, 36], выявлен анальгетический эффект ГДК только в дозе 50 мг/кг, проявлявшийся в достоверном увеличении БП в ответ на механическое сжатие хвоста щипцами на 26,2 % ($p \leq 0.001$, $n=10$). Остальные дозы в диапазоне от 5 до 200 мг/кг оказались не эффективны в данном тесте.

В тесте «hot plate» (рис. 1, В) у самцов крыс выявлен анальгетический эффект ГДК только в дозе 200 мг/кг, выразившийся в увеличении ЛПБР относительно контроля на 24,1 % ($p \leq 0.01$; $n=10$), что свидетельствует согласно [35, 37–39] об участии супраспинальных механизмов в регуляции болевой чувствительности

тестируемой кислотой. При этом у самцов в диапазоне доз от 5 до 200 мг/кг установлена U-образная зависимость эффекта ГДК от дозы с максимумом в дозе 200 мг/кг.

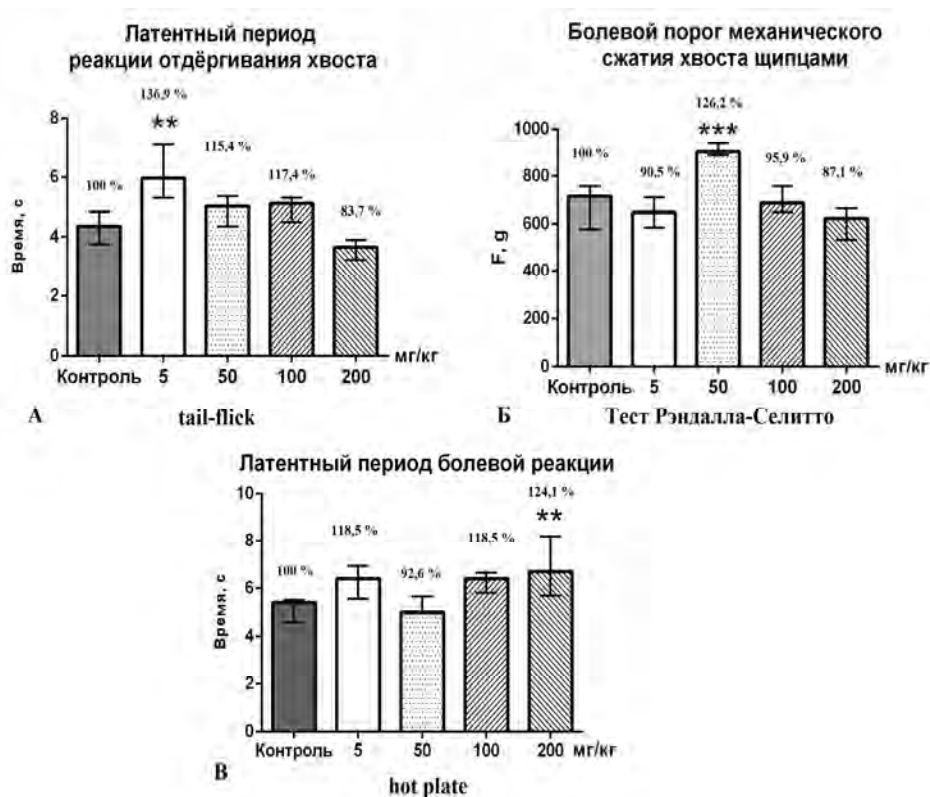


Рис. 1. Влияние 1-гидрокси-1,1-этилендифосфоновой кислоты на пороги болевой чувствительности крыс-самцов в тестах «tail-flick», Рэндалла-Селитто и «hot plate».

Примечание: А – латентный период отведения хвоста в тесте «tail-flick», Б – латентный период болевой реакции крыс в тесте Рэндалла-Селитто, В – болевой порог крыс в тесте «hot plate»; * – $p \leq 0.05$; ** – $p \leq 0.01$; *** – $p \leq 0.001$ – достоверность отличий показателя по сравнению с контролем (принят за 100 %).

Таким образом, по данным различных моделей острой боли ГДК проявляет анальгезирующее действие. При термическом воздействии выраженным противоболевым эффектом ГДК обладает в дозах 5 и 200 мг/кг, а при механическом болевом воздействии – в дозе 50 мг/кг.

Влияние бис(2-пиридил-1,2,4-триазалил-3)пропана (БТП) на болевую чувствительность самцов и самок крыс.

Результаты оценки влияния бис(2-пиридил-1,2,4-триазалил-3)пропана (БТП) на ЛПРОХ крыс в тесте «tail-flick» представлены на рис. 2, А. В данном тесте выявлен

анальгетический эффект БТП в дозе 200 мг/кг, выразившийся в достоверном увеличении ЛПРОХ на 30,1 % ($p \leq 0.05$; $n=10$). Выраженная эффективность в данном тесте свидетельствует об участии перцептуального компонента боли и спинального механизма регуляции болевой чувствительности под влиянием тестируемой дозы БТП.

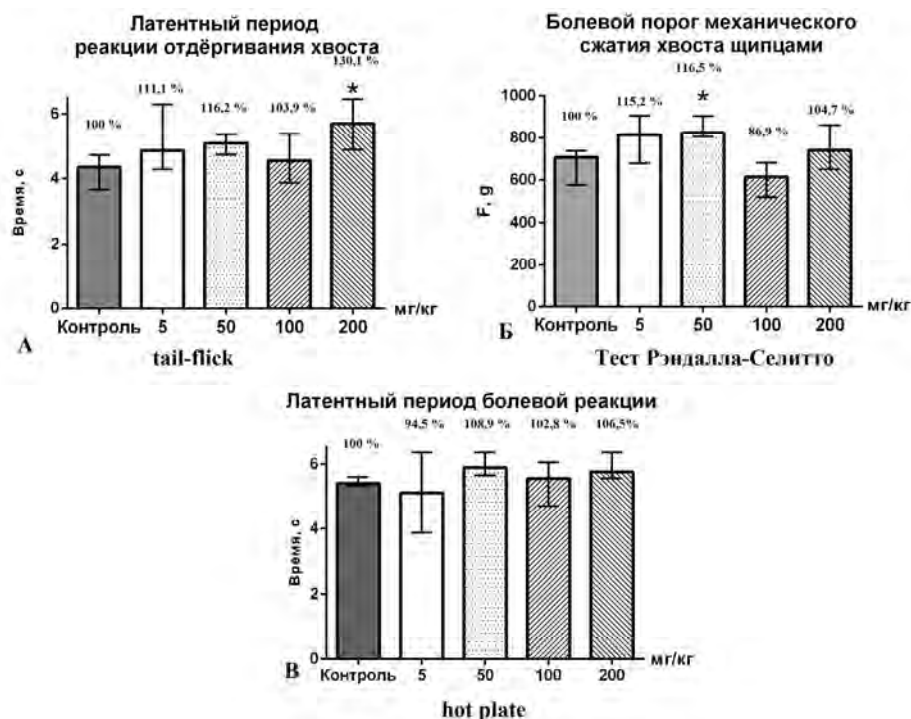


Рис. 2. Влияние бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропана на пороги болевой чувствительности крыс-самцов в тестах «tail-flick», Рэндалла-Селитто и «hot plate».

Примечание: А – латентный период отведения хвоста в тесте «tail-flick», Б – латентный период болевой реакции крыс в тесте Рэндалла-Селитто, В – болевой порог крыс в тесте «hot plate»; * – $p \leq 0.05$ – достоверность отличий показателя по сравнению с контролем (принят за 100 %).

В тесте Рэндалла-Селитто (рис. 2, Б) выявлен анальгетический эффект БТП в дозе 50 мг/кг. Эффект проявлялся в достоверном увеличении БП на 16,5 % ($p \leq 0.05$; $n=10$) в ответ на механическое сжатие хвоста щипцами. При этом зависимость «доза-эффект» носила куполообразный характер (рис. 2, Б), выраженность эффекта проявлялась в дозе 50 мг/кг.

В тесте «hot plate» у самцов не было обнаружено достоверных эффектов БТП на ЛПБР относительно контроля (рис. 2, В). Это свидетельствует об отсутствии участия супраспинальных механизмов в регуляции болевой чувствительности самцов под влиянием указанного вещества.

Таким образом, по данным всех проведённых тестов анальгетическое действие БТП проявлялось в дозах 50 и 200 мг/кг.

Влияние аддукта 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты и бис(2-пиридил-1,2,4-триазилил-3)пропана (ГДК+БТП) на болевую чувствительность самцов крыс.

В тесте «tail-flick» (рис. 3, А) ГДК+БТП в дозе 100 мг/кг вызывал наибольшее увеличение ЛПБР относительно контроля (на 59,3 %, $p \leq 0.01$, $n=10$). В дозах 50 и 200 мг/кг ГДК+БТП достоверно повышал относительно контроля ЛПБР на 22 ($p \leq 0.01$, $n=10$) и 19,8 % ($p \leq 0.01$, $n=10$) соответственно. Результаты теста свидетельствует об анальгетическом эффекте данных доз ГДК+БТП и об участии в данном эффекте перцептуального компонента боли и спинального механизма регуляции болевой чувствительности.

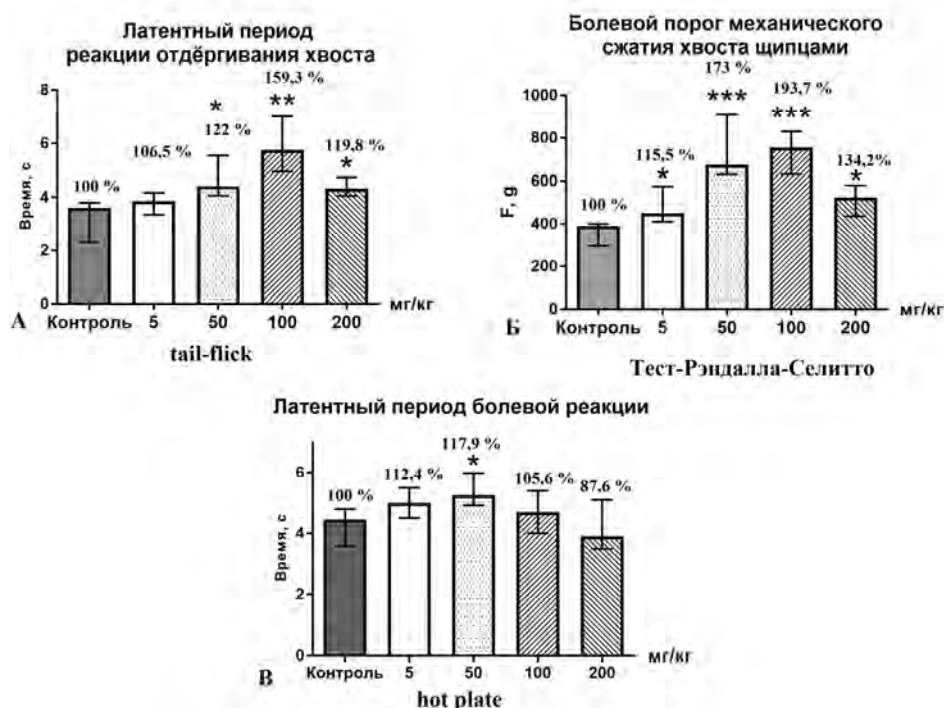


Рис. 3. Влияние аддукта 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты и бис(2-пиридил-1,2,4-триазилил-3)пропана на пороги болевой чувствительности крыс-самцов в тестах «tail-flick», Рэндалла-Селитто и «hot plate».

Примечание: А – латентный период отведения хвоста в тесте «tail-flick», Б – латентный период болевой реакции крыс в тесте Рэндалла-Селитто, В – болевой порог крыс в тесте «hot plate»; * – $p \leq 0.05$; ** – $p \leq 0.01$; *** – $p \leq 0.001$ – достоверность отличий показателя по сравнению с контролем.

В тесте Рэндалла-Селитто (рис. 3, Б) наиболее выраженное повышение БП относительно значений контрольной группы (на 93,7 %, $p \leq 0.001$, $n=10$) было зарегистрировано при действии ГДК+БТП в дозе 100 мг/кг, а в дозе 50 мг/кг он повышался на 73 % ($p \leq 0.001$, $n=10$) соответственно. В дозах 5 и 200 мг/кг ГДК+БТП

вызывал повышение ЛПБР на 15,5 ($p \leq 0.05$, $n=10$) и 34,2 % ($p \leq 0.05$, $n=10$) соответственно. Таким образом, в тесте, отражающем механическую болевую чувствительность, показан анальгетический эффект ГДК+БТП в широком диапазоне доз – 5, 50, 100 и 200 мг/кг.

В тесте «hot plate» установлено, что достоверное повышение ЛПБР относительно значений контроля, а, следовательно, и анальгетический эффект ГДК+БТП, отмечены при воздействии дозы 50 мг/кг (на 17,9 %, $p \leq 0,05$), как показано на рис. 3, В. Это свидетельствует об участии супраспинального механизма регуляции болевой чувствительности в противоболевом эффекте ГДК+БТП в дозе 50 мг/кг. В остальных дозах (5, 100, 200 мг/кг) данное соединение не проявляло выраженную противоболевую активность, о чём свидетельствуют недостоверные изменения ЛПБР относительно контроля под воздействием указанных доз ГДК+БТП.

Таким образом, ГДК+БТП оказывает анальгетический эффект в моделях термической боли в дозах 50, 100 и 200 мг/кг, а при механическом болевом раздражении – 5, 50, 100 и 200 мг/кг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлено, что 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновая кислота, бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропан и их аддукт в различных дозах в диапазоне от 5 до 200 мг/кг существенно изменяют болевую чувствительность крыс-самцов, повышая её пороги, и оказывает анальгетический эффект с участием различных механизмов регуляции боли:

1. 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновая кислота в дозе 5 мг/кг проявляет анальгетический эффект с участием перцептуального компонента и спинального механизма боли, повышая латентный период отведения хвоста на 36,9 % ($p \leq 0.05$) в тесте «tail-flick». Также данная кислота проявляет анальгетический эффект в дозе 50 мг/кг, повышая болевой порог относительно контроля в тесте Рэндалла-Селитто, отражающем механическую болевую чувствительность, на 26,2 % ($p \leq 0.001$). В тесте «hot plate» 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновая кислота в дозе 200 мг/кг проявляет анальгетический эффект с участием супраспинального механизма регуляции боли, повышая относительно контроля латентный период болевой реакции на 24,1 % ($p \leq 0.01$).
2. Бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропан обладает анальгетическим эффектом в дозе 200 мг/кг с участием перцептуального компонента и спинального механизма боли, увеличивая латентный период отведения хвоста на 30,1 % ($p \leq 0.05$) в тесте «tail-flick». Также данное соединение проявляет анальгетический эффект в дозе 50 мг/кг, повышая болевой порог относительно контроля в тесте Рэндалла-Селитто, отражающем механическую болевую чувствительность, на 16,5 % ($p \leq 0.05$). В тесте «hot plate» у самцов не было обнаружено достоверных эффектов бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропана, что говорит об отсутствии участия супраспинальных механизмов в регуляции боли данным веществом.

3. Аддукт 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты и бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропана оказывает анальгетический эффект в дозах 50, 100 и 200 мг/кг с участием перцептуального компонента и спинального механизма боли, повышая латентный период отведения хвоста на 22 ($p \leq 0.05$), 59,3 ($p \leq 0.01$) и 19,8 % ($p \leq 0.05$) соответственно в тесте «tail-flick». Также данное вещество проявляет анальгетический эффект в дозах 5, 50, 100 и 200 мг/кг, повышая болевой порог относительно контроля в тесте Рэндалла-Селитто, отражающем механическую болевую чувствительность, на 15,5 ($p \leq 0.05$), 73 ($p \leq 0.001$), 93,7 ($p \leq 0.001$) и 34,2 % ($p \leq 0.05$) соответственно. В тесте «hot plate» аддукт 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты и бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропана в дозе 50 мг/кг проявляет анальгетический эффект с участием супраспинального механизма регуляции боли, повышая относительно контроля латентный период болевой реакции на 17,9 % ($p \leq 0.05$).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 18-13-00024 «Координационные соединения дифосфонатов металлов со спейсеризованными 1,2,4-триазолами как основа новых гибридных материалов и лекарственных препаратов» на экспериментальном оборудовании центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» кафедры физиологии человека и животных и биофизики Таврической академии (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского».

Список литературы

1. Бондаренко Д. А. In vivo модели для изучения анальгетической активности / Д. А. Бондаренко, И. А. Дьяченко, Д. И. Скобцов [и др.] // Биомедицина. – 2011. – № 2. – С. 84–94.
2. Официальный сайт территориального органа Федеральной службы государственной статистики по Республике Крым <http://crimea.gks.ru> (дата обращения 26.05.2019).
3. Silverman S. L. Rachitic syndrome after disodium etidronate therapy in an adolescent / S. L. Silverman, E. A. Hurvitz, V. S. Nelson, A. Chiodo // I. Arch. Phys. Med. Rehabil. – 1994. – Vol. 75, No 1. – P. 118–120.
4. Reszka A. A. Mechanism of Action of Bisphosphonates / A. A. Reszka, G. A. Rodan // Curr. Osteoporos. Rep. – 2003. – Vol. 3, No 2. – P. 45–52.
5. Дедов И. И. Роль и место бисфосфонатов в профилактике и лечении остеопороза 10-летний опыт применения алендроната (фосамакса) / И. И. Дедов, Л. Я. Рожинская, Ж. Е. Белая // Остеопороз и остеопатии. – 2005. – № 1. – С. 20–30.
6. Russell R. Determinants of structure-function relationships among bisphosphonates / R. Russell // Bone. – 2007. – Vol. 40, No 5. – P. 21–25.
7. Высоцкая И. В. Рекомендации по применению бисфосфонатов при лечении больных раком молочной железы и изучение состояния костной ткани у больных: по материалам Американского общества клинической онкологии (ASCO). Часть I. Рекомендации по применению бисфосфонатов в лечении рака молочной железы / И. В. Высоцкая // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2008. – № 2. – С. 14–22.
8. Высоцкая И. В. Рекомендации по применению бисфосфонатов при лечении больных раком молочной железы и изучение состояния костной ткани у больных: по материалам Американского общества клинической онкологии (ASCO). Часть II. Бисфосфонаты в адьювантном лечении рака молочной железы / И. В. Высоцкая // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2008. – № 3. – С. 36–40.

9. Петриев В. М. Остеотропные радиофармпрепараты на основе фосфоновых кислот для лечения костных метастазов человека (обзор) / В. М. Петриев, Е. Л. Афанасьева, В. Г. Скворцов // Хим.-фарм. журн. – 2008. – Т. 42, № 5. – С. 1–10.
10. Drake M. T. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice / M. T. Drake, B. L. Clarke, S. Khosla // Mayo. Clin. Proc. – 2008. – Vol. 83, No 9. – P. 1032–1045.
11. Дроздов В. Эффективность и безопасность лечения остеопении и остеопороза бифосфонатами / В. Дроздов, Ю. Эмбутниекс // Врач. – 2010. – № 5. – С. 67–71.
12. Ковальчук П. А. Бифосфонаты и их роль в лечении опухолевых поражений костей (обзор литературы) / П. А. Ковальчук, А. Г. Дедков, С. И. Бойчук, И. Б. Волков // Клиническая онкология. – 2012. – № 7 (3). – С. 1–4.
13. Cattalini J. P. Bisphosphonate-Based Strategies for Bone / J. P. Cattalini, M. Pharm, A. R. Boccaccini // Tissue engineering: Part B. – 2012. – Vol. 18, No 5. – P. 324–326.
14. Мостовой С. О. Коррекция с помощью хелатообразующих веществ остеосклеротических изменений в нижнечелюстной кости крыс, вызванных приёмом бифосфонатов / С. О. Мостовой, В. Ф. Шульгин, В. М. Пешков // Цитология. – 2018. – Т. 60, № 6. – С. 476–481.
15. The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis / J. Frith, J. Monkkonen, S. Auriola [et al.]. // Arthritis Rheum. – 2001. – Vol. 44, No 9. – P. 2201–2210.
16. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite / P. P. Lehenkari, M. Kellinsalmi, J. P. Näpänkangas [et al.]. // Mol. Pharm. – 2002. – Vol. 61, No 5. – P. 1255–1262.
17. Berridge M. G. Neuronal calcium signaling / M. G. Berridge // Neuron. – 1998. – Vol. 21, No 1. – P. 13–18.
18. Berridge, M. G. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease / M. G. Berridge // Physiol. Rev. – 2016. – Vol. 96, No 4. – P. 1261–1296.
19. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission / G. Burnstock // Physiol. Rev. – 2007. – Vol. 87, No 2. – P. 659–797.
20. АТФ-зависимые и кальциевые механизмы влияния салицилатов на электрические потенциалы нейронов моллюска *Helix albescens* / И. В. Черетаев, И. И. Кореньюк, Д. Р. Хусайнов [и др.]. // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2015. – Т. 101, № 3. – С. 326–336.
21. Беспрозванный И. Б. Система кальциевой сигнализации при нейродегенерации / И. Б. Беспрозванный // Acta Naturae. – 2010. – Т. 2, № 1. – С. 80–88.
22. ATP-Dependent and Calcium Mechanisms of the Effects of Salicylates on Electrical Potentials in Neurons in the Mollusk *Helix Albescens* / I. V. Cheretaev, I. I. Korenyuk, D. R. Khusainov [et al.]. // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2016. – Vol. 46, No. 6. – P. 644–651.
23. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some [1,2,4]-Triazole Derivatives / B. S. Patil, G. Krishnamurthy, N. D. Shashikumar [et al.]. // Journal of Chemistry. – 2013. – Article ID 462594. – 7 p.
24. Synthesis, analgesic and anti-inflammatory activities of new methyl-imidazolyl-1,3,4-oxadiazoles and 1,2,4-triazoles / A. Almasirad, Z. Mousavi, M. Tajik // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2014. – Vol. 22. – P. 22–29.
25. Novel thiazolo[3,2-b]-1,2,4-triazoles derived from naproxen with analgesic/anti-inflammatory properties: Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies / D. Sarigol, A. Uzgoren-Baran, B. C. Tel [et al.]. // Bioorg. Med. Chem. – 2015. – Vol. 23. – P. 2518–2528.
26. 1,2,4-Triazole Scaffolds: Recent Advances and Pharmacological Applications / A. Thakur, P. S. Gupta, P. K. Shukla // Int. J. Curr. Res. Aca. Rev. – 2016. – Vol. 4 (2). – P. 277–296.
27. Каплан Г. И. Триазолы и их пестицидная активность / Г. И. Каплан, С. С. Кукаленко // Современные проблемы химии и химической промышленности. – 1983. – Т. 140, № 2. – С. 1–36.
28. Studies on the anticonvulsant activity of 4-alkyl-1,2,4-triazole-3-thiones and their effect on GABAergic system / T. Plech, B. Kaprona, J. J. Łuszczki [et al.]. // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2014. – Vol. 86. – P. 690–699.
29. Hall C. S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity / C. S. Hall // J. Comp. Physiol. Psychol. – 1936. – Vol. 22. – P. 345–352.
30. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. Хьюстон. – М.: Высшая школа, 1991. – 399 с.

31. Князькова И. И. Клиническая фармакология бисфосфонатов / И. И. Князькова // Ліки України. – 2014. – № 5–6. – С. 84–89.
32. Determination of Adrenergic and Imidazoline Receptor Involvement in Augmentation of Morphine and Oxycodone Analgesia by Clonidine and BMS182874 / Gulati A., Bhalla S., Matwyshyn G. [et al]. // Pharmacology. – 2011. – Vol. 83. – P. 45–58.
33. Smith E. S. Nociceptors: a phylogenetic view / E. S. Smith, G. R. Lewin // J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol. – 2009. – Vol. 195 (12). – P. 1089–1106.
34. Xu F. The neurotoxicity of intrathecal lidocaine is enhanced in postpartum compared to virgin rats / F. Xu, B. Zhang, T. Li // Fundam Clin Pharmacol. – 2013. – Vol. 27, № 4. – P. 427–433.
35. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А. Н. Миронов, Н. Д. Бунатян, А. Н. Васильев [и др.]. – Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
36. Randall L. O. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue / L. O. Randall, J. J. Selitto // Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. – 1957. – Vol. 111 (4). – P. 409–419.
37. Woolfe G. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol) / G. Woolfe, A. D. Macdonald // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1944. – Vol. 80, № 3. – P. 300–307.
38. Влияние L-аргинина на электрокожную и температурную болевую чувствительность у крыс / Л. А. Северьянова, И. И. Бобынцева, Н. А. Кирьянова [и др.]. // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2005. – № 2. – С. 44–49.
39. Корреляции болевой чувствительности и гуморального иммунного ответа у мышей при термораздражении / А. М. Василенко, О. Г. Яновский, О. В. Коптелов // Бюлл. exper.-мед. – 1995. – №4. – С. 405–408.

EFFECT OF 1-HYDROXY-1,1-ETHYLIDENDIPHOSPHONE ACID, BIS(2-PYRIDYL-1,2,4-TRIAZOLYL-3)PROPANE AND THEIR ADDUCT ON THE PAIN SENSITIVITY OF RATS (PART 1)

***Cheretaev I. V., Ravaeva M. Yu., Dzheldubaeva E. R., Chuyan E. N., Shulgin V. F.,
Sheichmambetov N., Palaevskaya M. V.***

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia
E-mail: cheretaev86@yandex.ru*

The article presents the results of the study of assessing the effects of 1-hydroxy-1,1-ethylidenediphosphonic acid, bis(2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3)propane and their adduct in doses of 5, 50, 100 and 200 mg/kg on pain sensitivity of male rats.

The aim of the work is to evaluate the effect of 1-hydroxy-1,1-ethylidenediphosphonic acid, bis(2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3)propane and their adduct on the pain sensitivity of male rats in the dose range from 5 to 200 mg/kg.

The studies were performed on 150 white laboratory rats-males of the Wistar line ("FSUE Nursery of laboratory animals "Rappolovo") weighing 180–200 g (5 groups of 10 animals each) kept in standard vivarium conditions at a temperature of 18–22 °C in the understyle "Rehofix MK 2000" (based on corn cobs) with a natural 12-hour light-dark cycle, free access to water and (GOST 33215-2014 "Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for equipping premises and organizing procedures") and complete granulated feed in accordance with GOST R-50258-92. Previously, in the open field test, animals were selected with an average level of motor activity and a low level of emotionality (for this purpose, an infrared actimeter and the software of Actitrack 2.0

from Pan Lab Harvard Apparatus, Spain) were used.

In the experiment with each substance, 50 male rats took part (150 animals in total). Animals of each experimental series were divided into 5 groups of 10 animals. Since the effects of 3 substances (1-hydroxy-1,1-ethylidenediphosphonic acid, bis(2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3)propane and their adduct) were studied in the experiment, a total of 3 experimental series with a single intraperitoneal the introduction of the substance. In each series of the experiment, animals of one group were control and received intraperitoneally injections of 0.2 ml of saline and were in standard vivarium conditions, the remaining experimental groups received 0.2 ml of intraperitoneal injections of the test substance in doses of 5, 50, 100 and 200 mg / kg respectively. Testing the parameters of pain sensitivity in rats was carried out 1 hour after injection in models of acute painful stress "tail-flick", Randall-Selitto ("forceps") and "hot plate". Before the "tail-flick" and Randall-Selitto tests, after injections, the animals were placed in special fixers for rats (NPK Open Science, Russia).

1-hydroxy-1,1-ethylidenediphosphonic acid at a dose of 5 mg/kg exhibits an analgesic effect with the participation of the perceptual component of pain and its spinal mechanism, increasing the latent period of tail retraction by 36.9% ($p \leq 0.05$) in the "tail-flick test". This acid also exhibits an analgesic effect at a dose of 50 mg/kg, increasing the pain threshold relative to the control in the Randall-Selitto test, which reflects mechanical pain sensitivity, by 26.2 % ($p \leq 0.001$). In the "hot plate" test, 1-hydroxy-1,1-ethylidenediphosphonic acid at a dose of 200 mg/kg exhibits an analgesic effect with the participation of the supraspinal mechanism of pain regulation, increasing the latent pain response period by 24.1 % ($p \leq 0.01$) relative to the control.

Bis(2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3)propane has an analgesic effect at a dose of 200 mg/kg with the participation of the perceptual component of pain and its spinal mechanism, increasing the latent period of tail ablation by 30.1 % ($p \leq 0.05$) in the "tail-flick" test. This compound also exhibits an analgesic effect at a dose of 50 mg/kg, increasing the pain threshold relative to the control in the Randall-Selitto test, which reflects mechanical pain sensitivity, by 16.5 % ($p \leq 0.05$). In the "hot plate" test in males, no significant effects of bis(2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3)propane were found, which indicates the absence of the participation of supraspinal mechanisms in the regulation of pain by this substance.

The adduct of 1-hydroxy-1,1-ethylidenediphosphonic acid and bis(2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3) propane has an analgesic effect in doses of 50, 100 and 200 mg/kg with the participation of the perceptual component of pain and its spinal mechanism, increasing the latent period of tail abduction by 22 ($p \leq 0.05$), 59.3 ($p \leq 0.01$) and 19.8 % ($p \leq 0.05$), respectively, in the "tail-flick" test. Also, this substance shows an analgesic effect in doses of 5, 50, 100 and 200 mg/kg, increasing the pain threshold relative to the control in the Randall-Selitto test, reflecting mechanical pain sensitivity, by 15.5 ($p \leq 0.05$), 73 ($p \leq 0.001$), 93.7 ($p \leq 0.001$) and 34.2 % ($p \leq 0.05$), respectively. In the "hot plate" test, the adduct of 1-hydroxy-1,1-ethylidenediphosphonic acid and bis(2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3)propane at a dose of 50 mg/kg exhibits an analgesic effect with the participation of the supraspinal pain regulation mechanism increasing the latent period of the pain response by 17.9 % relative to the control ($p \leq 0.05$).

Thus, it has been found that 1-hydroxy-1,1-ethylidene diphosphonic acid, bis(2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3) propane and their adduct in various doses in the range from 5 to 200 mg/kg are substantially alter the pain sensitivity of male rats, increasing its thresholds, and has an analgesic effect with the participation of various pain regulation mechanisms.

Keywords: 1-hydroxy-1,1-ethylidenediphosphonic acid, bis(2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3)propane, adduct, pain sensitivity, analgesic effect, perceptual pain component, mechanical pain, spinal and supraspinal pain regulation.

References

1. Bondarenko D. A., D'jachenko I. A., Skobcov D. I., Murashev A. N., In vivo modeli dlja izuchenija anal'geticheskoj aktivnosti, *Biomedicina*, **2**, **84**. (2011).
2. Oficial'nyj sajt territorial'nogo organa Federal'noj sluzhby gosudarstvennoj statistiki po Respublike Krym <http://crimea.gks.ru> (data obrashhenija 26.05.2019)
3. Silverman S. L., Hurvitz E. A., Nelson V. S., Chiodo A., Rachitic syndrome after disodium etidronate therapy in an adolescent, *I. Arch. Phys. Med. Rehabil.*, **75**, **1**. (1994).
4. Reszka A. A., Rodan G. A. Mechanism of Action of Bisphosphonates, *Curr. Osteoporos. Rep.*, **3**, **2**, 45 (2003).
5. Dedov I. I., Rozhinskaya L. Ya., Belaya Zh. E., Rol' i mesto bisfosfonatov v profilaktike i lechenii osteoporoza 10-letnij opyt primeneniya alendronata (fosamaksa), *Osteoporoz i osteopatii*, **1**, 20 (2005).
6. Russell R., Determinants of structure-function relationships among bisphosphonates, *Bone*, **40**, **5**, 21 (2007).
7. Vysockaya I. V., Rekomendacii po primeniyu bisfosfonatov pri lechenii bol'nyh rakom molochnoj zhelezy i izuchenie sostoyaniya kostnoj tkani u bol'nyh: po materialam Amerikanskogo obshchestva klinicheskoy onkologii (ASCO). Chast' I. Rekomendacii po primeniyu bisfosfonatov v lechenii raka molochnoj zhelezy, *Opuholi zhenskoy reproduktivnoj sistemy*, **2**, 14 (2008).
8. Vysockaya I. V., Rekomendacii po primeniyu bisfosfonatov pri lechenii bol'nyh rakom molochnoj zhelezy i izuchenie sostoyaniya kostnoj tkani u bol'nyh: po materialam Amerikanskogo obshchestva klinicheskoy onkologii (ASCO). Chast' II. Bisfosfonaty v ad'yuvantnom lechenii raka molochnoj zhelezy, *Opuholi zhenskoy reproduktivnoj sistemy*, **3**, 36 (2008).
9. Petriev V. M., Afanas'eva E. L., Skvorcov V. G., Osteotropnye radiofarmpreparaty na osnove fosfonovyh kislot dlya lecheniya kostnyh metastazov cheloveka (obzor), *Him.-farm. zhurn.*, **42**, **5**, 1 (2008).
10. Drake, M. T. Clarke B. L., Khosla S., Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice, *Mayo. Clin. Proc.*, **83**, **9**, 1032 (2008).
11. Drozdov V., Ehmbutnieks YU., Effektivnost' i bezopasnost' lecheniya osteopenii i osteoporoza bifosfonatami, *Vrach*, **5**, 67 (2010).
12. Koval'chuk P.A., Dedkov A. G., Bojchuk S. I., Volkov I. B., Bifosfonaty i ih rol' v lechenii opuholevyh porazhenij kostej (obzor literatury), *Klinicheskaya onkologiya*, **7**, **3**, 1 (2012).
13. Cattalini J. P., Pharm M., Boccaccini A. R., Bisphosphonate-Based Strategies for Bone, *Tissue engineering: Part B*, **18**, **5**, 324 (2012).
14. Mostovoj S. O., Shul'gin V. F., Peshkov V. M., Korrekciya s pomoshch'yu helatoobrazuyushchih veshchestv osteoskleroticheskikh izmenenij v nizhnechelyustnoj kosti krys, vyzvannyh priyomom bisfosfonatov, *Citologiya*, **60**, **6**, 476 (2018).
15. Frith J., Monkkonen J., Auriola S., Mönkkönen H., Rogers M., The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis, *Arthritis Rheum.*, **44**, **9**, 2201 (2001).
16. Lehenkari P. P., Kellinsalmi M., Näpänkangas J. P., Ylitalo K. V., Mönkkönen J., Rogers M. J., Azhayev A., Väänänen H. K., Hassinen I. E., Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite, *Mol. Pharm.*, **61**, **5**, 1255 (2002).

17. Berridge M. G., Neuronal calcium signaling, *Neuron*, **21**, **1**, 13 (1998).
18. Berridge M. G., The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease, *Physiol. Rev.*, **96**, **4**, 1261 (2016).
19. Burnstock G., Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission, *Physiol. Rev.*, **87**, **2**, 659 (2007).
20. Cheretaev I. V., Korenyuk I. I., Husainov D. R., Katyushina O. V., Gamma T. V., Kolotilova O. I., ATF-zavisimye i kal'cievye mekhanizmy vliyaniya salicilatov na ehlektricheskie potentsialy nejronov molluska *Helix albescens*, *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*, **101**, **3**, 326 (2015).
21. Besprozvannyj I. B., Sistema kal'cievoj signalizacii pri nejrodegeneracii, *Acta Naturae*, **2**, **1**, 80 (2010).
22. Cheretaev I. V., Korenyuk I. I., Khusainov D. R., Gamma T. V., Kolotilova O. I., Nozdrachev A. D., ATP-Dependent and Calcium Mechanisms of the Effects of Salicylates on Electrical Potentials in Neurons in the Mollusk *Helix Albescens*, *Neuroscience and Behavioral Physiology*, **46**, **6**, 644 (2016).
23. B. S.Patil, G. Krishnamurthy, N. D. Shashikumar, M. R. Lokesh, H. S. Bhojya Naik, Synthesis and Antimicrobial Activity of Some [1,2,4]-Triazole Derivatives, *Journal of Chemistry*, **462594**, 7 (2013).
24. Almasirad A., Mousavi Z., Tajik M., Synthesis, analgesic and anti-inflammatory activities of new methylimidazolyl-1,3,4-oxadiazoles and 1,2,4-triazoles, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **22**, 22 (2014).
25. Sarigol D., Uzgoren-Baran A., Tel B. C., Somuncuoglu E. I., Kazkayasi I., Ozadali-Sari K., Unsal-Tan O., Okay G., Ertan M., Tozkoparan B., Novel thiazolo[3,2-b]-1,2,4-triazoles derived from naproxen with analgesic/anti-inflammatory properties: Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies, *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 2518 (2015).
26. Thakur A., Gupta P. S., Shukla P. K., 1,2,4-Triazole Scaffolds: Recent Advances and Pharmacological Applications, *Int. J. Curr. Res. Acad. Rev.*, **4** (2), 277 (2016).
27. Kaplan G. I., Kukalenko S. S., Triazoly i ih pesticidnaya aktivnost', *Sovremennye problemy himii i himicheskoy promyshlennosti*, **140**, **2**, 1 (1983).
28. Plech T., Kaprona B., Łuszczki J. J., Paneth A., Siwek A., Kołaczowski M., Zolnierek M., Nowak G., Studies on the anticonvulsant activity of 4-alkyl-1,2,4-triazole-3-thiones and their effect on GABAergic system, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **86**, 690 (2014).
29. Hall C. S., Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity, *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **22**, 345 (1936).
30. Buresh Ja., Bureshova O., H'juston D., *Metodiki i osnovnye jeksperimenty po izucheniju mozga i povedenija*, 399 p. (Moscow, Vysshaja shkola, 1991).
31. Knyazkova I. I. Clinical pharmacology of bisphosphonates, *Liki Ukrainy*, **5–6**, 84 (2014).
32. Gulati A., Bhalla S., Matwysyn G., Zhang Z., Andurkar S.V., Determination of Adrenergic and Imidazoline Receptor Involvement in Augmentation of Morphine and Oxycodone Analgesia by Clonidine and BMS182874, *Pharmacology*, **83**, 45 (2011).
33. Smith E. S., Lewin G. R., Nociceptors: a phylogenetic view, *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.*, **195** (12), 1089 (2009).
34. Xu F., Zhang B., Li T., The neurotoxicity of intrathecal lidocaine is enhanced in postpartum compared to virgin rats, *Pharmacology*, **27**, **4**, 427 (2013).
35. Mironov A. N., Bunatjan A. D., Vasil'ev A. N. i dr., *Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv*. Ch. 1. 944 s. (Moskva: Grif i K, 2012).
36. Randall L. O., Selitto J. J., A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **111** (4), 409 (1957).
37. Woolfe G., Macdonald A. D., The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **80**, **3**, 300 (1944).
38. Sever'yanova L. A., Bobynceva I. I., Kir'yanova N. A., Dolginceva M. E., Vliyanie L-arginina na elektrokozhnuyu i temperaturную bolevuyu chuvstvitel'nost' u krysa, *Kurskij nauchno-prakticheskij vestnik «Chelovek i ego zdorov'e»*, **2**, **44**, 2005.
39. Vasilenko A. M., Yanovskij O. G., Koptelev O. V., Korrelyacii bolevoj chuvstvitel'nosti i gumoral'nogo immunnogo otveta u myshej pri termorazdrozhenii, *Byull. eksper.-med.*, **4**, 405 (1995).