

УДК 612.159:615.3

DOI 10.37279/2413-1725-2020-6-3-262-274

**ОЦЕНКА АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ АДДУКТА 1-ГИДРОКСИ-1,1-ЭТИЛИДЕНДИФОСФОНОВОЙ
КИСЛОТЫ И БИС(2-ПИРИДИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛИЛ-3)ПРОПАНА ПРИ
КУРСОВОМ ВВЕДЕНИИ У САМЦОВ КРЫС**

Черетаев И. В., Раваева М. Ю., Чуян Е. Н., Шульгин В. Ф.

*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 анальгетической и противовоспалительной активности аддукта 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты и бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропана при 3-недельном курсовом введении у самцов крыс. Эксперименты проведены на 70 лабораторных крысах-самцах линии Вистар в тест-моделях острой термической («tail-flick», «hot plate») и механической боли (тест Рэндалла-Селитто), а также воспаления (формалиновый тест). В диапазоне доз от 5 до 100 мг/кг данное соединение в основном демонстрирует эффективность анальгетика при однократном введении, только при механической боли исследуемый аддукт проявляет обезболивающий эффект при курсовом введении в дозе 5 мг/кг. В «формалиновом тесте» обнаружен противовоспалительный и экссудативный эффект исследуемого аддукта в дозе 5 мг/кг.

Ключевые слова: аддукт 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты и бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропана, курсовое введение, анальгетический эффект, противовоспалительная активность, перцептуальный компонент боли, механическая боль, спинальный и супраспинальный механизмы регуляции боли.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что в среднем каждые девять из десяти заболеваний организма человека сопровождаются болью, а пятая часть людей на земном шаре испытывает симптомы хронических болевых синдромов, поэтому поиск новых анальгетиков актуален для практической медицины [1]. Что касается непосредственно Республики Крым, то травмы, сопровождающиеся применением различных анальгетиков при медицинском лечении, занимали по статистике в данном регионе в 2018 г. второе место в структуре всех впервые в жизни зарегистрированных заболеваний [2]. Поэтому поиск новых анальгетиков актуален как для мировой медицины, так и для решения ряда практических задач медицинского кластера Республики Крым, связанных с алгическими явлениями.

Существует множество химических соединений, перспективных в отношении наличия у них анальгетической активности. К таким веществам относят соединения, синтезированные на основе бисфосфонатов и 1,2,4-триазола. У некоторых

перспективных производных 1,2,4-триазола известны анестезирующие, противовоспалительные и антипирогенные эффекты [3-5]. Ранее были показаны противоболевые эффекты аддукта 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты (ГДК) и бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропана (БТП) и их аддукта (ГДК+БТП), аддукта 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты и бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)бутана (ГДК+БТБ) при однократном введении самцам и самкам крыс в диапазоне доз от 5 до 200 мг/кг [6-10]. Однако непосредственные данные об анальгетических и противовоспалительных эффектах ГДК+БТП при курсовом введении у животных отсутствуют.

Цель работы – оценить у самцов крыс анальгетическую и противовоспалительную активность ГДК+БТП при 21-дневном курсовом введении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Предварительно в тесте «открытое поле» [11, 12] было отобрано 70 лабораторных крыс-самцов линии Вистар («ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово») одинакового возраста массой 180–200 г со средними параметрами двигательной активности и низким уровнем эмоциональности. Установка данного теста – актиметр (IR Actimeter, Pan Lab Harvard Apparatus, Испания) – состоит из рабочей станции размером 45 х 45 см с прозрачными полипропиленовыми стенками высотой 20 см с двумя инфракрасными рамками-датчиками движений. Для управления актиметром и сбора экспериментальных данных использовали программное обеспечение Actitrack 2.0 (Pan Lab Harvard Apparatus, Испания).

Животные были разделены на 7 групп по 10 особей. На 40 самцах тестировали анальгетическую активность ГДК+БТП, а на 30 других – противовоспалительную активность. Все исследования проводили в соответствии с ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и принципами, изложенными в Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. Экспериментальная часть работы выполнена на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» и кафедры физиологии человека и животных и биофизики Таврической академии (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского». Самцов крыс, 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.

В исследованиях анальгетической активности ГДК+БТП самцы одной группы являлись контрольными и получали каждый день утром в 10.00 течение 21 суток внутривенно инъекции по 0,2 мл физиологического раствора и находились в стандартных условиях вивария (ГОСТ Р-53434-2009), остальные группы получали в это же время в течение 21 суток по 0,2 мл внутривенных инъекций ГДК+БТП в

дозах 5, 50 и 100 мг/кг. Данные дозы выбраны потому, что в них в различных тестах в соответствии с ранее полученными данными [6, 8, 9] ГДК+БТП при однократном введении проявлял наиболее выраженную анальгетическую активность. Аналогичным образом формировали группы животных и при тестировании противовоспалительного эффекта ГДК+БТП, только без инъекций дозы 100 мг/кг. ГДК+БТП синтезирован на кафедре общей и неорганической химии факультета биологии и химии Таврической академии (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского». Химическая чистота ГДК+БТП составляла не менее 98 %.

Анальгетическую активность ГДК+БТП оценивали по параметрам болевой чувствительности животных в фоне и через 1 час после внутривентральных инъекций на 1-е, 6-е, 10-е, 14-е и 21-е сутки эксперимента в моделях острого болевого стресса «tail-flick», Рэндалла-Селитто и «hot plate». 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 «отдёргивание хвоста» (установка LE7106 Tail-flick Meter, Pan Lab Harvard Apparatus, Испания) регистрировали латентный период отведения хвоста (ЛПРОХ), который определяли по времени (с) отдёргивания хвоста [10, 13–17]. На хвост каждой крысы, сидящей в фиксаторе, осуществляли 3 предъявления термального раздражителя с последующим расчетом среднего значения ЛПРОХ в секундах у каждого животного [6–10, 16]. Данный тест основан на спинальном флексорном рефлекс, возникающем в ответ на локальное воздействие на хвост высокой температуры и позволяет судить об анальгетическом эффекте вещества преимущественно с участием перцептуального компонента ноцицепции и спинального механизма регуляции болевой чувствительности [6–10, 13–17].

В тесте Рэндалла-Селитто (анальгезиметр BIO-RP-R Rodent pincher, Bioseb, Франция) прибор отображает приложенную силу (в г), при которой животное реагирует на постепенно нарастающее механическое сдавливание хвоста – болевой порог (БП) механической болевой чувствительности [16–18]. Осуществляли по 3 механических сжатия щипцами хвоста каждой крысы, сидящей в фиксаторе, с последующим расчетом среднего значения БП в граммах у каждого животного [6–10, 16].

В тесте «горячая пластина» (экспериментальная установка Cold and hot plate CNP, Bioseb) регистрировали латентный период болевой реакции (ЛПБР) животного, который определялся величиной времени (с) проявления реакции отведения и облизывания конечностей и (или) вокализации, подпрыгивания от нагретой поверхности. Измерения данного показателя проводили после помещения животного на горячую металлическую поверхность температурой + 55 °С. Тест позволяет судить о болевой чувствительности животных с участием супраспинальных механизмов [6–10, 16, 17, 19, 20].

Противовоспалительную активность ГДК+БТП оценивали в тесте формалиновый отёк лапы у крыс [4, 9]. Острую воспалительную реакцию воспроизводили путем субплантарного введения 0,1 мл 2 % раствора формалина в виде водного раствора в левую заднюю лапу крысе, а затем измеряли величину отека конечности с помощью метода водной плетизмометрии (установка Digital

Water Plethysmometer LE7500, Panlab, Испания) [9] на 10-е и 21-е сутки курсового введения БТП+ГДК в дозах от 5 и 50 мг/кг.

Данные представлены в виде среднего арифметического и его ошибки, их статистический анализ выполнен в программных пакетах StatSoft/STATISTICA 8 и 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 [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В тесте «tail-flick», как показано в табл. 1, обнаружен анальгетический эффект ГДК+БТП в дозе 5 и 100 мг/кг на 1-е сутки курсового введения и в дозе 50 мг/кг – на 1-е и 21-е сутки. Это выражалось в достоверном возрастании ЛПРОХ относительно контрольной группы в дозе 5 мг/кг на 1-е сутки введения на 32.7 % ($p \leq 0.05$), в дозе 50 мг/кг на 1-е и 21-е сутки введения – на 40 % ($p \leq 0.01$) и 67.1 % ($p \leq 0.001$) и в дозе 100 мг/кг на 1-е сутки введения – на 80.0 % ($p \leq 0.01$) соответственно. Анальгетический эффект после курсового введения ГДК+БТП проявился также на 21-е сутки, вероятно, потому, что к этому времени включение естественных адаптационных резервов и ресурсов организма приводило к возвращению порогов болевой чувствительности к исходному уровню, о чём свидетельствует отсутствие достоверных различий ЛПРОХ в контроле на 1-е и 21-е сутки, а также в экспериментальных группах на 1-е и 21-е сутки. В дозе 5 мг/кг на 10-е сутки введения, наоборот, был обнаружен аллогенный эффект ГДК+БТП (ЛПРОХ достоверно уменьшался относительно контроля на 24.1 % ($p \leq 0.01$)). Поскольку в остальных случаях курсового введения на протяжении 21-х суток противоболевая активность ГДК+БТП не была обнаружена (кроме 21-х суток курсового введения вещества в дозе 50 мг/кг), применение данного аддукта в качестве анальгетика, принимающего участие в спинальном механизме регуляции болевой чувствительности, целесообразно в дозах 5, 50 и 100 мг/кг только при однократном введении.

В тесте Рэндалла-Селитто, служащем для определения порогов механической болевой чувствительности, как видно из табл. 2, обнаружен анальгетический эффект ГДК+БТП в дозе 5 мг/кг на 6-е, 14-е и 21-е сутки курсового введения, так как БП достоверно увеличивался относительно контроля на 55.3 ($p \leq 0.001$), 72.5 ($p \leq 0.001$) и 49.6 % ($p \leq 0.01$) соответственно. В дозе 50 мг/кг подобный эффект был обнаружен на 1-е и 10-е сутки введения (БП достоверно увеличивался относительно контроля на 25.2 % ($p \leq 0.01$) и 21.3 % ($p \leq 0.001$) соответственно), а в дозе 100 мг/кг – только на 1-е сутки на 80 % ($p \leq 0.01$).

Таким образом, результаты теста Рэндалла-Селитто свидетельствуют об эффективности однократного применения ГДК+БТП в качестве анальгетика при механической боли в дозах 50 и 100 мг/кг и при курсовом введении – только в дозе 5 мг/кг.

Таблица 1
Латентный период реакции отведения хвоста (ЛПРОХ) крыс при действии
ГДК+БТП в тесте «tail-flick» в диапазоне доз от 5 до 100 мг/кг

| Сутки введения ГДК+БТП | Доза, мг/кг (количество животных в группе) | ЛПРОХ, с ($M \pm m$) и % от контроля |
|------------------------|--|--|
| 1-е | контроль (n=10) | 3,64±0,11 100 % |
| | 5 (n=10) | 4,82±0,33 * 132,7 % |
| | 50 (n=10) | 5,09±0,87 ** 140,0 % |
| | 100 (n=10) | 6,55±1,08 ** 180,0 % |
| 6-е | контроль (n=10) | 6,07±0,23 100 % |
| | 5 (n=10) | 7,27±0,76 119,8 % |
| | 50 (n=10) | 6,89±0,52 113,6 % |
| | 100 (n=10) | 6,32±0,41 104,1 % |
| 10-е | контроль (n=10) | 6,06±0,29 100 % |
| | 5 (n=10) | 4,60±0,29 * 75,9 % |
| | 50 (n=10) | 5,89±0,49 97,2 % |
| | 100 (n=10) | 6,18±0,54 102,0 % |
| 14-е | контроль (n=10) | 6,25±0,33 102,0 % |
| | 5 (n=10) | 5,94±0,30 95,0 % |
| | 50 (n=10) | 6,02±0,53 96,3 % |
| | 100 (n=10) | 5,90±0,68 94,4 % |
| 21-е | контроль (n=10) | 3,13±0,18 100 % |
| | 5 (n=10) | 3,16±0,17 101 % |
| | 50 (n=10) | 5,23±0,08 *** 167,1 % |
| | 100 (n=10) | 3,52±0,28 112,5 % |

Примечание: *, **, *** – достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой при $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ и $p \leq 0.001$ соответственно.

Таблица 2

Болевой порог (БП) механической болевой чувствительности крыс при действии ГДК+БТП в тесте Рэндалла-Селитто в диапазоне доз от 5 до 100 мг/кг

| Сутки введения ГДК+БТП | Доза, мг/кг (количество животных в группе) | БП, г ($M \pm m$) и % от контроля |
|------------------------|--|-------------------------------------|
| 1-е | контроль (n=10) | 1012,0 \pm 61,9 100 % |
| | 5 (n=10) | 932,9 \pm 47,5 * 92,2 % |
| | 50 (n=10) | 1267,0 \pm 73,6 ** 125,2 % |
| | 100 (n=10) | 1585,0 \pm 139,0 ** 156,6 % |
| 6-е | контроль (n=10) | 789,3 \pm 31,5 100 % |
| | 5 (n=10) | 1226 \pm 93,4 *** 155,3 % |
| | 50 (n=10) | 988,3 \pm 66,2 125,2 % |
| | 100 (n=10) | 854 \pm 102,4 108,2 % |
| 10-е | контроль (n=10) | 751,1 \pm 27,6 100 % |
| | 5 (n=10) | 835,90 \pm 28,54 ** 155,3 % |
| | 50 (n=10) | 911,40 \pm 22,95 *** 121,3 % |
| | 100 (n=10) | 801,7 \pm 64,0 106,7 % |
| 14-е | контроль (n=10) | 524,8 \pm 35,0 100 % |
| | 5 (n=10) | 905 \pm 60,5 *** 172,5 % |
| | 50 (n=10) | 572,3 \pm 39,9 109,5 % |
| | 100 (n=10) | 551,0 \pm 49,2 105 % |
| 21-е | контроль (n=10) | 650,3 \pm 58,3 100 % |
| | 5 (n=10) | 972,5 \pm 100,5 ** 149,6 % |
| | 50 (n=10) | 569,0 \pm 31,2 87,5 % |
| | 100 (n=10) | 544 \pm 120 83,7 % |

Примечание: то же, что и в табл. 1.

В тесте «hot plate», как показано в табл. 3, обнаружен анальгетический эффект ГДК+БТП в дозе 5 мг/кг на 1-е и 21-е сутки курсового введения и аллогенный – на 10-е сутки введения. Это выражалось в достоверном возрастании ЛПБР на 32.1 % ($p \leq 0.01$, 1-е сутки введения) и 31.3 % ($p \leq 0.01$, 21-е сутки введения) и уменьшении – на 16.7 % ($p \leq 0.01$, 10-е сутки введения) соответственно. В дозе 50 мг/кг ГДК+БТП проявлял анальгетический эффект на 1-е и 14-е сутки введения, поскольку ЛПБР возрастал на 89.9 ($p \leq 0.001$) и 21.06 % ($p \leq 0.05$) соответственно.

Таблица 3

Латентный период болевой реакции крыс (ЛПБР) при действии при действии ГДК+БТП в тесте «hot plate» в диапазоне доз от 5 до 100 мг/кг

| Сутки введения ГДК+БТП | Доза, мг/кг (количество животных в группе) | ЛПБР отведения хвоста, с ($M \pm m$) и % от контроля |
|------------------------|--|--|
| 1-е | контроль (n=10) | 3,63±0,11 100 % |
| | 5 (n=10) | 4,80±0,17 ** 132,1 % |
| | 50 (n=10) | 6,90±0,66 *** 189,9 % |
| 6-е | контроль (n=10) | 5,46±0,34 100 % |
| | 5 (n=10) | 5,81±0,34 106,5 % |
| | 50 (n=10) | 6,30±0,39 115,4 % |
| 10-е | контроль (n=10) | 8,19±0,14 100 % |
| | 5 (n=10) | 6,82±0,42 ** 83,3 % |
| | 50 (n=10) | 7,40±0,26 90,4 % |
| 14-е | контроль (n=10) | 5,92±0,32 100 % |
| | 5 (n=10) | 6,53±0,34 110,3 % |
| | 50 (n=10) | 7,17±0,32 * 121,1 % |
| 21-е | контроль (n=10) | 5,85±0,42 100 % |
| | 5 (n=10) | 7,68±0,32 ** 131,3 % |
| | 50 (n=10) | 6,64±0,39 113,5 % |

Примечание: то же, что и в табл. 1.

Результаты теста «hot plate» свидетельствуют о целесообразности только однократного применения ГДК+БТП в качестве анальгетика в дозах 5 и 50 мг/кг, так как при курсовом введении эти эффекты были непостоянны и нестабильны. Поскольку в тесте «hot plate» и на предыдущем этапе исследований при однократном введении ГДК+БТП в дозе 100 мг/кг, и в данной работе при курсовом введении противовоспалительная активность не была обнаружена, данные в табл. 3 по этой дозе не представлены.

Таким образом, результаты углублённого биоскрининга анальгетических эффектов ГДК+БТП при курсовом внутрибрюшинном введении позволяют заключить, что искомый аддукт в основном демонстрирует эффективность в качестве анальгетика при однократном введении и только при механической боли данное вещество эффективно при курсовом введении в дозе 5 мг/кг.

В «формалиновом тесте», как продемонстрировано в табл. 4, наблюдался провоспалительный и экссудативный эффект ГДК+БТП в дозе 5 мг/кг, так как в данной дозе ГДК+БТП на 21-е сутки введения увеличивал формалиновый отёк лапы крыс на 70.9 % ($p \leq 0.01$).

Таблица 4

Величина формалинового отёка лапы у крыс в «формалиновом тесте» при действии БТП+ГДК в дозах 5 и 50 мг/кг

| Сутки введения ГДК+БТП | Доза, мг/кг (количество животных в группе) | Объём отёка, мл, ($M \pm m$) и % от контроля |
|------------------------|--|--|
| 1-е | контроль (n=10) | 0,30±0,11 100 % |
| | 5 (n=10) | 0,21±0,06 70,0 % |
| | 50 (n=10) | 0,18±0,07 60,0 % |
| 10-е | контроль (n=10) | 0,51±0,05 100 % |
| | 5 (n=10) | 0,59±0,16 115,7 % |
| | 50 (n=10) | 0,54±0,12 105,9 % |
| 21-е | контроль (n=10) | 0,55±0,06 100 % |
| | 5 (n=10) | 0,94±0,05 ** 170,9 % |
| | 50 (n=10) | 0,40±0,04 72,7 % |

Примечание: ** – достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой при $p \leq 0.01$ соответственно.

Следовательно, противовоспалительного эффекта у исследуемых доз ГДК+БТП (5 и 50 мг/кг) на 1-е, 10-е и 21-е сутки курсового введения не было обнаружено. Наоборот, длительное курсовое введение ГДК+БТП в дозе 5 мг/кг в течение 21 суток и более не рекомендуется, так как оно оказывает провоспалительный и экссудативный эффект.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При курсовом введении крысам-самцам ГДК+БТП в течение 21 суток в диапазоне доз от 5 до 100 мг/кг обнаружено, что данное соединение в основном демонстрирует эффективность анальгетика при однократном введении, только при механической боли данное вещество проявляет обезболивающий эффект при курсовом введении в дозе 5 мг/кг:

1. Тест «tail-flick» показал, что применение ГДК+БТП в качестве анальгетика, принимающего участие в спинальном механизме регуляции болевой чувствительности, целесообразно в дозах 5, 50 и 100 мг/кг только при однократном введении: ЛПРОХ возрастал относительно контроля в дозе 5 мг/кг на 1-е сутки введения ГДК+БТП на 32.7 % ($p \leq 0.05$), в дозе 50 мг/кг на 1-е и 21-е сутки введения ГДК+БТП – на 40 % ($p \leq 0.01$) и 67.1 % ($p \leq 0.001$) и в дозе 100 мг/кг на 1-е сутки введения ГДК+БТП – на 80.0 % ($p \leq 0.01$) соответственно. В дозе 5 мг/кг на 10-е сутки введения, наоборот, был обнаружен аллогенный эффект ГДК+БТП (ЛПРОХ достоверно уменьшался относительно контроля на 24.1 % ($p \leq 0.01$)).
2. В тесте Рэндалла-Селитто показана эффективность однократного применения ГДК+БТП в качестве анальгетика при механической боли в дозах 50 и 100 мг/кг (БП достоверно увеличивался относительно контроля на 25.2 % ($p \leq 0.01$) и 80 % ($p \leq 0.01$), а при курсовом введении – только в дозе 5 мг/кг (БП увеличивался относительно контроля на 55.3 % ($p \leq 0.001$), 72.5 % ($p \leq 0.001$) и 49.6 % ($p \leq 0.01$) на 6-е, 14-е и 21-е сутки курсового введения соответственно).
3. В тесте «hot plate» показана целесообразность только однократного применения ГДК+БТП в качестве анальгетика в дозах 5 и 50 мг/кг, так как при курсовом введении эти эффекты были непостоянны и нестабильны.
4. В «формалиновом тесте» обнаружен провоспалительный и экссудативный эффект ГДК+БТП в дозе 5 мг/кг, поскольку ГДК+БТП на 21-е сутки введения увеличивал формалиновый отёк лапы крыс на 70.9 % ($p \leq 0.01$).

Исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» и кафедры физиологии человека и животных и биофизики Таврической академии (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 18-13-00024 «Координационные соединения дифосфонатов металлов со спейсированными 1,2,4-триазолами как основа новых гибридных материалов и лекарственных препаратов».

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. 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. doi: 10.1186/2008-2231-22-22
4. 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. doi: 10.1016/j.bmc.2015.03.049
5. 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. doi: 10.20546/ijcrar.2016.402.031
6. 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) / И. В. Черетаев, М. Ю. Раваева, Э. Р. Джелдубаева [и др.]. // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология, химия. – 2019. – Т. 5 (71), № 2. – С. 162–175.
7. Влияние 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты и бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропана на болевую чувствительность самок крыс / Черетаев И. В., Чуян Е. Н., Раваева М. Ю. [и др.]. // Международный научно-исследовательский журнал. – 2019. – № 7 (85), Ч. 1. – С. 92–97. doi: 10.23670/IRJ.2019.85.7.018
8. Сравнительный анализ противоболевой активности 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты, бис(2-пиридил-1,2,4-триазолил-3)пропана и их аддукта у самцов крыс (часть 2) / Черетаев И. В., Раваева М. Ю., Джелдубаева Э. Р. [и др.]. // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология, химия. – 2019. – Т. 5 (71), № 3. – С. 199–206.
9. Bioscreening of the spacerized complex BIS (2-Pyridyl)-3-(1,2,4-Triazolyl) propane and 11-Hydroxy-1,1-Ethylidenediphosphonic acid / E. Chuyan, M. Ravaeva, I. Cheretaev [et al.]. // Advances in Biological Sciences Research. – 2019. – Vol. 7. – P. 82–86. doi: 10.2991/isils-19.2019.19
10. Cheretaev I. V. Etidronic acid adduct and bis (2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3) butane: properties and effect on pain sensitivity / I. V. Cheretaev, M. Yu. Ravaeva, E. N. Chuyan // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. – 2020. – Vol. 889. – Article 012029. doi: 10.1088/1757-899X/889/1/012029
11. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. Хьюстон. – М.: Высшая школа, 1991. – 399 с.
12. Вдовина Н. В. Исследование особенностей поведения здоровых крыс разного возраста и крыс-опухоленосителей в «открытом поле» / Н. В. Вдовина, Е. С. Клинцева, Т. Г. Щербатюк // Современные технологии в медицине. – 2010. – № 2. – С. 12–16.
13. 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. doi: 10.1159/000178812
14. 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. doi: 10.1007/s00359-009-0482-z
15. 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. doi: 10.1111/j.1472-8206.2012.01034.x
16. 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.
17. Minina E. N. Peculiarities of psychophysiological reaction of experimental rats during the course application of “energy” drink / E. N. Minina, I. V. Cheretaev, N. Hait // Procedia Computer Science. – 2020. – Vol. 169. – P. 715–719. doi: 10.1016/j.procs.2020.02.173

18. Randall L. O. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue / L. O. Randall, J. J. Sellitto // Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. – 1957. – Vol. 111 (4). – P. 409–419.
19. Рогожин Е. А. Характеристика белково-пептидного экстракта семян мари белой (*Chenopodium album* L.): изучение компонентного состава, антимикробных и анальгетических свойств / Е. А. Рогожин, О. В. Кисиль, И. В. Черетаев, С. К. Завриев // Антибиотики и химиотерапия. – 2017. – Т. 62, № 9–10. – С. 3–8.
20. 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.

**EVALUATION OF ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF
1-HYDROXY-1,1-ETHYLIDENDIPHOSPHONIC ACID ADDUCT AND
BIS (2-PYRIDYL-1,2,4-TRIAZOLYL-3)PROPANE DURING COURSE
ADMINISTRATION IN MALE RATS**

Cheretaev I. V., Ravaeva M. Yu., Chuyan E. N., Shulgin V. F.

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

The article presents the results of evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of the adduct of 1-hydroxy-1,1-ethylidendiphosphonic acid and bis(2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3)propane (HEA+BPP) in male rats with a 21-day course administration.

The aim of the study was to evaluate analgesic and anti-inflammatory activity in male rats with 21-day course administration of HEA+BPP course administration with 21-day course administration.

The animals were divided into 7 groups of 10 individuals. Analgesic activity of HEA+BPP was tested on 40 males, and anti-inflammatory activity was tested on 30 others.

In studies of analgesic activity of HEA+BPP, males of one group were control and received intraperitoneal injections of 0.2 ml of saline solution every day at 10.00 for 21 days, the others groups received 0.2 ml of intraperitoneal injections of HEA+BPP at doses of 5, 50 and 100 mg/kg at the same time for 21 days. In analgesic studies, groups of animals were similarly formed, when testing the anti-inflammatory effect of HEA+BPP, only without injecting a dose of 100 mg/kg. HEA+BPP synthesized at the Department of General and inorganic chemistry of the faculty of biology and chemistry of the Tauride Academy (structural division) of the V. I. Vernadsky Crimean Federal University. The chemical purity of HEA+BPP was at least 98 %.

The analgesic activity of HEA+BPP was evaluated by the parameters of pain sensitivity of animals in the background and 1 hour after intraperitoneal injections on the 1st, 6th, 10th, 14th and 21st days of the experiment in the models of acute pain stress "tail-flick", Randall-Sellitto and "hot plate". Before the tail-flick and Randall-Sellitto tests were performed, the animals were placed in special rat retainers after injection.

The anti-inflammatory activity of HEA+BPP was evaluated in the formalin paw edema test in rats. Acute inflammatory response was reproduced by subplantar injection of 0.1 ml of 2 % formalin solution in the form of an aqueous solution into the left hind leg

of a rat, and then the value of limb edema was measured using the method of water plethysmometry on the 10th and 21st days of course administration of HEA+BPP in doses of 5 and 50 mg/kg.

The data are presented as mean and standard error mean, statistical analysis performed using the software packages StatSoft/STATISTICA 8 and Graph Pad Prism 7.0. The significance of differences between groups was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc test Tukey and non-parametric criterion of multiple comparisons of Dunn, according to official methodological recommendations on statistical treatment of the results of preclinical studies of medicines, given in the literature.

During course administration to male rats of HEA+BPP for 21 days in the dose range from 5 to 100 mg / kg, it was found that this compound mainly demonstrates effectiveness as an analgesic with a single injection, only for mechanical pain, this substance is effective with a course administration at a dose of 5 mg/kg:

The "tail-flick" test showed, that using of HEA+BPP as an analgesic involved in the spinal mechanism of pain sensitivity regulation is advisable in doses of 5, 50 and 100 mg/kg only with a single injection: latent period of the reaction discharge of the tail increased relative to control at a dose of 5 mg/kg on the 1st day of administration of HEA+BPP by 32.7 % ($p \leq 0.05$), at a dose of 50 mg/kg on the 1st and 21st days of administration – by 40 % ($p \leq 0.01$) and 67.1 % ($p \leq 0.001$) and at a dose of 100 mg/kg on the 1st day of administration – by 80.0 % ($p \leq 0.01$), respectively. At a dose of 5 mg/kg on the 10th day of administration, on the contrary, was discovered algogenic effect of HEA+BPP (latent period of the reaction discharge of the tail was significantly decreased relative to control by 24.1 % ($p \leq 0.01$)).

In the test of Randall-Selitto the efficiency of single use HEA+BPP as an analgesic in mechanical pain at doses of 50 and 100 mg/kg (pain threshold was significantly increased relative to control at 25.2 % ($p \leq 0.01$) and 80 % ($p \leq 0.01$), and in course administration only at a dose of 5 mg/kg (pain threshold was significantly increased relative to control at 55.3 % ($p \leq 0.001$), 72.5 % ($p \leq 0.001$) and 49.6 % ($p \leq 0.01$) on the 6th, 14th and 21st day of the course introduction).

The "hot plate" test shows the feasibility of only a single use of HEA+BPP as an analgesic in doses of 5 and 50 mg/kg, since these effects were unstable and unstable when administered on a course basis.

The "formalin test" revealed the inflammatory and exudative effect of HEA+BPP at a dose of 5 mg/kg, in which HEA+BPP on the 21st day of administration increased the formalin edema of the rat paw by 70.9 % ($p \leq 0.01$).

Keywords: 1-hydroxy-1,1-ethylidendiphosphonic acid adduct and bis (2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3)propane, course administration, analgesic effect, anti-inflammatory activity, perceptual component of pain, mechanical pain, spinal and supraspinal mechanisms of 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. Official'nyj sajt territorial'nogo organa Federal'noj sluzhby gosudarstvennoj statistiki po Respublike Krym <http://crimea.gks.ru> (data obrashhenija 26.05.2019).
3. Almasirad A., Mousavi Z., Tajik M., Synthesis, analgesic and anti-inflammatory activities of new methyl-imidazolyl-1,3,4-oxadiazoles and 1,2,4-triazoles, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **22**, 22 (2014). doi: 10.1186/2008-2231-22-22
4. 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). doi: 10.1016/j.bmc.2015.03.049
5. Thakur A., Gupta P. S., Shukla P. K., 1,2,4-Triazole Scaffolds: Recent Advances and Pharmacological Applications, *Int. J. Curr. Res. Aca. Rev.*, **4** (2), 277 (2016). doi:10.20546/ijcrar.2016.402.031
6. Cheretaev I. V., Ravaeva M. Yu., Dzheldubaeva E. R., Chuyan E. N., Shulgin V. F., Sheichmambetov N., Palaevskaya M. V., Effect of 1-hydroxy-1,1-ethylidenediphosphone acid, bis (2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3) propane and their adduct on the pain sensitivity of rats, *Uchenye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo. Biologiya, himiya.*, **5** (71), 2, 162 (2019).
7. Cheretaev I. V., Chuyan E. N., Ravaeva M. Yu., Shulgin V. F., Influence of 1-hydroxy-1,1-ethylidenediphosphone acid and bis (2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3) propane on pain sensitivity of rat females, *International Research Journal*, **7** (85), 92 (2019) doi: 10.23670/IRJ.2019.85.7.018
8. Cheretaev I. V., Ravaeva M. Yu., Dzheldubaeva E. R., Chuyan E. N., Shulgin V. F., Sheichmambetov N., Palaevskaya M. V., Comparative analysis of analgesic activity of 1-hydroxy-1,1-ethylidenediphosphone acid, bis(2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3)propane and their adduct in rats (part 2), *Uchenye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo. Biologiya, himiya.*, **5** (71), 3, 199 (2019).
9. Chuyan E., Ravaeva M., Cheretaev I., Kornilenko O., Furkovskaya A., Birukova E., Bioscreening of the spacerized complex BIS (2-Pyridyl)-3-(1,2,4-Triazolyl) propane and 11-Hydroxy-1,1-Ethylidenediphosphonic acid, *Advances in Biological Sciences Research*, **7**, 82 (2019). doi: 10.2991/aisls-19.2019.19
10. Cheretaev I. V., Ravaeva M. Yu., Chuyan E. N., Etidronic acid adduct and bis (2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3) butane: properties and effect on pain sensitivity, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, **889**, 012029 (2020). doi:10.1088/1757-899X/889/1/012029
11. Buresh Ja., Bureshova O., H'juston D., *Metodiki i osnovnye jeksperimenty po izucheniju mozga i povedenija*, 399 p. (Moscow, Vysshaja shkola, 1991).
12. Vdovina N. V., Klintsova E. S., Shcherbatyuk T. G., The study of the behavior of healthy rats of different ages and rat-tumor carriers in the "open field", *Sovremennye tekhnologii v medicine*, **2**, 12 (2010).
13. 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). doi: 10.1159/000178812
14. Smith E. S., Lewin G. R., Nociceptors: a phylogenetic view, *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.*, **195** (12), 1089 (2009). doi: 10.1007/s00359-009-0482-z
15. Xu F., Zhang B., Li T., The neurotoxicity of intrathecal lidocaine is enhanced in postpartum compared to virgin rats, *Pharmacology*, **27**, 4, 427 (2013). doi: 10.1111/j.1472-8206.2012.01034.x
16. 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).
17. Minina E. N., Cheretaev I. V., Hait N., Peculiarities of psychophysiological reaction of experimental rats during the course application of "energy" drink, *Procedia Computer Science*, **169**, 715 (2020). doi: 10.1016/j.procs.2020.02.173
18. Randall L. O., Selitto J. J., A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **111** (4), 409 (1957).
19. Rogozhin E. A., Kisil' O. V., Cheretaev I. V., Zavriev S. K., Characterization of Protein and Peptide Extract from Lamb's Quarters' (*Chenopodium album* L.) Seeds: Studying of Composition, Antimicrobial and Analgesic Properties, *Antibiotiki i Khimioterapiya*, **62**, 9-10, 3 (2017).
20. Woolfe G., Macdonald A. D., The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **80**, 3, 300 (1944).