

УДК 615.322:582.675.1:615.212.7

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА АКОНИТА КУЗНЕЦОВА

С.Г. Крылова¹, П.С. Зориков², Е.П. Зуева^{1,3}, Т.Г. Разина¹, Е.Н. Амосова¹, О.Ю. Рыбалкина^{1,3}

¹ НИИ фармакологии имени Е.Д. Гольдберга СО РАМН (634028, г. Томск, пр-т Ленина, 3), ² Горнотаежная станция им. В.Л. Комарова ДВО РАН (692533, Приморский край, Уссурийский район, с. Горнотаежное, ул. Солнечная, 26), ³ Национальный исследовательский Томский государственный университет (634050, г. Томск, пр-т Ленина, 36)

Ключевые слова: *Aconitum Kuznezoffi Reichenb.*, экстракт, «горячая пластина», укусыные корчи.

EXPERIMENTAL STUDY OF THE ANALGESIC ACTIVITY OF ACONITUM KUZNEZOFFI REICHENB

S.G. Krylova¹, P.S. Zorikov², E.P. Zueva^{1,3}, T.G. Razina¹, E.N. Amosova¹, O.Yu. Rybalkina^{1,2}

¹E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology, Siberian Branch of RAMS (3 Lenin Ave. 634028 Tomsk, Russian Federation), ²V.L. Komarov Gornotaezhnaya station, Far Eastern Branch of RAS (26 Solnechnaya St. Gornotaezhnoe village, Ussuriysky district, Primorsky Region 692533 Russian Federation), ³National Research Tomsk State University (36 Lenin Ave. Tomsk 634050 Russian Federation)

Background. One of the urgent problems of modern pharmacology is the development of high-efficiency low-dose analgesics. Promising direction is the development of drugs based on the diterpene alkaloids produced by Ranunculaceae family plants.

Methods. For the experimental study of the analgesic activity of a standardized alkaloid-containing aconite extract (*Aconitum Kuznezoffi Reichenb.* – Ranunculaceae Juss.) the researchers used screening models of thermic (Hot plate) and chemical (Abdominal constriction test) impact of pain.

Results. In the test “hot plate” there was revealed a pronounced analgesic effect of the *Aconitum Kuznezoffi Reichenb.* in intragastric course use. On the model of chemical pain stimulation in the peritoneum the phyto-drug showed analgesic activity comparable with the effect of indometacin.

Conclusions. Aconite extract showed a mixed type of receptor response on the models with different profile of pain stimulation that allows to include it into a group of promising highly active analgesics with a complex mechanism of action.

Keywords: *Aconitum Kuznezoffi Reichenb.*, extract, hot plate, acetic cramps.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 2, p. 38–40.

Одной из актуальных задач современной фармакологии является разработка высокоэффективных низкодозовых анальгетиков для купирования болевого синдрома различного генеза [2, 5]. В последние годы особый интерес в этом аспекте вызывают данные о фармакологической активности алкалоидсодержащих растений. Перспективным направлением является исследование и разработка лекарственных средств на основе diterпеновых алкалоидов, продуцируемых растениями семейства лютиковые (Ranunculaceae) [3, 4]. Входящие в эту группу алкалоиды, благодаря способности взаимодействовать с рецепторной системой восприятия боли и своей полипотентной активности, стали базисными веществами в современной таргетной фармакологии и используются в хирургической

и неврологической клиниках («Мелликтин», «Кондельфин»). В кардиофитофармакологии проводятся исследования антиангинальных, антиаритмических, кардиотонических свойств биологически активных веществ аконитов [4]. Среди дальневосточных борцов наименее изученным в химическом отношении является аконит Кузнецова (*Aconitum Kuznezoffi Reichenb.* – Ranunculaceae Juss.). В русской народной, китайской и тибетской медицине трава, корнеклубни, плоды и листья этого вида аконита применяют при бронхиальной астме, скарлатине, анемии, инфекционных и желудочно-кишечных заболеваниях как противовоспалительное, болеутоляющее, спазмолитическое, мочегонное средство [3, 4]. Согласно данным литературы, все части аконита Кузнецова содержат алкалоиды, главный из которых – аконитин. В корнеклубнях выявлено до 0,3%, в листьях – 0,1% алкалоидов аконитина и псевдоаконитина. При нагревании с водой образуется менее ядовитый алкалоид О-бензоилаконин, а при кипячении – малоядовитый аконин. Надземная часть и корнеклубни также содержат 3-дезоксааконитин, неолин, зонгорин, бейвутин, наргарин, хигенамин, пендулин, мезаконитин, гипаконитин, 3-О-ацетилаконитин, буллатин А и буллатин С. В надземной части растения обнаружены лепенин и денудатин, в корнях найдены флавоноиды [4].

Цель исследования – анализ анальгетической активности суммарного алкалоидсодержащего экстракта аконита Кузнецова с использованием стандартных тестов на термическое и химическое болевое воздействие.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на 41 аутбредном самце мышей CD1 (возраст – 7–8 недель), 28 аутбредных самцах крысах CD (возраст – 7–8 недель), конвенциональных, первой категории, полученных из питомника НИИ фармакологии имени Е.Д. Гольдберга СО РАМН (сертификат здоровья лабораторных животных Научного центра биомедицинских технологий № 24–03). Дизайн экспериментов одобрен комитетом по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных и службой обеспечения качества института НИИ фармакологии СО РАМН. Экспериментальное исследование проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986), приказом МЗ РФ № 708 Н от 28 августа 2010 г., ГОСТ

Крылова Светлана Геннадьевна – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории онкофармакологии НИИ фармакологии имени Е.Д. Гольдберга СО РАМН; e-mail: krylova5935@gmail.com

Р 53434–2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [5, 6].

Исходный экстракт получен исчерпывающей экстракцией измельченных корней *Aconitum Kuznezoffi* Reichenb. (*Ranunculaceae* Juss.) 40 % этанолом. Стандартизацию экстракта проводили по содержанию алкалоидов на цифровом спектрофотометре UV2051PC (Shimadzu, Япония) в диапазоне 230–380 нм. Спектры обрабатывали с помощью разработанной авторами компьютерной программы, зарегистрированной в Государственном реестре программ для ЭВМ (регистрационное свидетельство № 2009614442). Содержание сухих экстрактивных веществ в экстракте составило 8,6 %. На хроматограмме выявлено пять основных аконитинов.

Дозы суммы алкалоидов аконита Кузнецова ($1/5 \text{ ЛД}_{50} = 2,6 \text{ мл/кг}$, $1/10 \text{ ЛД}_{50} = 1,3 \text{ мл/кг}$ для мышей) для внутрижелудочного введения были рассчитаны как терапевтические в предварительных исследованиях для других видов фармакологической активности изучаемого вещества [4]. Дозы для крыс – 1,3 и 0,65 мл/кг – были определены с применением коэффициента пересчета для животных [5]. В качестве препарата сравнения при проведении теста «уксусные корчи» использовали индометацин (Sigma, Германия) в дозе 10 мг/кг в виде суспензии на 1 % растворе крахмальной слизи в объеме 0,2 мл/мышь. Все вещества вводили однократно ежедневно в течение трех суток, последнее введение осуществляли за час до тестирования болевой чувствительности. Животные контрольной группы получали эквивалентные количества растворителя (вода) в аналогичном режиме.

Базисным методом для измерения порога болевой чувствительности и потенциального анальгезирующего эффекта фармакологических препаратов в ответ на термическое раздражение является тест «горячая пластина» (Hot plate) [5, 8]. Через час после последнего введения препаратов выполняли исследование с помощью прибора Hotplate Analgesia Meter (Columbus Instruments, США). Крыс помещали на пластину, нагретую до $54,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, после чего фиксировали латентное время болевой реакции. К конечным точкам эксперимента относились: облизывание подушечек передних и задних лап, подпрыгивание. Анальгетическую активность агентов в тестах на термическую боль представляли в виде среднего латентного времени в группе и процента угнетения болевой реакции (УБР), который рассчитывали по формуле: где Т – время болевой реакции.

$$\text{УБР} = \frac{(T_{\text{контроль}} - T_{\text{опыт}})}{T_{\text{контроль}}} \times 100 \%,$$

Тест «уксусные корчи» (Abdominal constriction test) направлен на исследование острой висце-

ральной и соматически глубокой боли. Специфическую болевую реакцию – «корчи» (характерные движения животных, включающие сокращения брюшных мышц, чередующиеся с их расслаблением, вытягиванием задних конечностей и прогибанием спины) – вызывали внутрибрюшинным введением 0,75 % раствора уксусной кислоты мышам в дозе 0,1 мл/10 г массы тела [5]. Анальгезирующий эффект оценивали по способности лекарственного средства (в течение 20 мин. после инъекции) уменьшать количество «корчей» по сравнению с контрольной группой животных (критерий эффективности – снижение болевой реакции не менее чем на 50 %) и латентному времени наступления болевой реакции. Эвтаназию животных по окончании экспериментов осуществляли ингаляцией CO_2 (крысы) и краниоцервикальной дислокацией (мыши).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни [1].

Результаты исследования. Анальгетическая активность индометацина реализовывалась за счет значительного увеличения латентного времени развития болевой реакции (в 1,9 раза) и снижения проявлений специфической болевой реакции – числа «корчей» (в 2,5 раза) по сравнению с контрольной группой. В результате введения экстракта аконита в дозе 1,3 мл/кг выявлен статистически значимый анальгетический эффект, который проявлялся как в снижении количества корчей (в 1,9 раза), так и в повышении латентного времени развития болевой реакции. Следует отметить, что выраженность специфической болевой реакции у мышей при использовании фитопрепарата в дозе 1,3 мл/кг оказалась сопоставимой с активностью индометацина. При увеличении дозы экстракта до 2,6 мл/кг отмечалось уменьшение числа корчей в 2,2 раза. В пользу выраженного обезболивающего действия исследуемого вещества в дозе 2,6 мл/кг свидетельствовало повышение латентного времени развития реакции на 20,6 %. Угнетение болевой активности в группах «экстракт» оказалось аналогичным при действии индометацина (табл. 1).

При проведении теста «горячая пластина», используемого для выявления активных соединений, подавляющих соматически поверхностную и острую

Таблица 1

Влияние экстракта аконита Кузнецова на болевую чувствительность мышей на модели химического болевого раздражения брюшины

| Группа | Доза | n | Кол-во «корчей» за 20 мин, абс. | Латентное время развития, с | УБР, % |
|-------------|-----------|----|---------------------------------|-----------------------------|--------|
| Контроль | – | 10 | 23,30±2,21 | 217,00±9,78 | – |
| Индометацин | 10 мг/кг | 12 | 9,42±1,96 ¹ | 418,75±58,32 ¹ | 59,6 |
| Экстракт | 1,3 мл/кг | 10 | 12,20±3,33 ¹ | 394,30±96,58 ¹ | 47,6 |
| Экстракт | 2,6 мл/кг | 9 | 10,78±2,49 ¹ | 261,89±17,17 ^{1,2} | 53,7 |

¹ Разница с группой «контроль» статистически значима.

² Разница с группой «индометацин» статистически значима.

Таблица 2

Анальгетическая активность экстракта аконита Кузнецова в тесте «горячая пластина» на крысах

| Группа | Доза, мл/кг | n | Латентное время развития, с | УБР, % |
|----------|-------------|----|-----------------------------|--------|
| Контроль | – | 9 | 8,73±1,23 | – |
| Экстракт | 0,65 | 9 | 27,39±4,99 ¹ | 213,7 |
| Экстракт | 1,30 | 10 | 12,92±1,57 ^{1,2} | 48,0 |

¹ Разница с группой «контроль» статистически значима.

² Разница с группой «экстракт, 0,65» статистически значима.

боль, продемонстрировано выраженное анальгетическое действие экстракта аконита Кузнецова. Латентное время облизывания передних и задних лап при введении экстракта в дозе 0,65 мл/кг превышало аналогичный показатель нелеченых животных в 3,1 раза. В случае увеличения дозы до 1,3 мл/кг отмечалось нарастание времени развития реакции в 1,5 раза по сравнению с показателем контрольной группы, но фиксировалось снижение эффекта (в 2,1 раза) относительно такового у крыс, получавших экстракт в дозе 0,65 мл/кг (табл. 2).

Обсуждение полученных данных. Модели химического и термического болевого раздражения различаются системой ноцицепции, путем проведения нервного импульса и его восприятия, что может быть использовано в качестве критерия для определения обезболивающего профиля и эффективности потенциального анальгетика [5, 8]. Известно, что методы, основанные на термических стимулах (горячая пластина), чувствительны для препаратов, являющихся по характеру взаимодействия с опиоидными рецепторами чистыми агонистами, но не пригодны для нестероидных противовоспалительных средств [7, 8]. При этом анальгетический эффект опиоидных агентов на конкретный вид болевого раздражения опосредуется возбуждением определенных типов опиоидных рецепторов. Для подавления термических болевых реакций необходимо вовлечение μ - и σ -рецепторов, а блокада реакции на химическое раздражение брюшины, хотя и может опосредоваться всеми подтипами опиоидных рецепторов, обусловлена преимущественно агонистами κ -рецепторов [7–10]. Высокая анальгетическая активность исследуемого вещества в двух тестах позволяет предположить активацию нескольких типов рецепторов. Направленность действия алкалоидсодержащего экстракта на снижение болевой реакции в тесте на висцеральную боль может указывать на его преимущественное взаимодействие с κ -рецепторами, поскольку доказано, что на этих моделях наиболее эффективными анальгетиками являются κ -агонисты. Выявленный обезболивающий эффект экстракта при проведении термического ноцицептивного теста «горячая пластина», скорее всего, обусловлен вовлечением μ - и σ -рецепторов.

На модели химического болевого раздражения брюшины у мышей выявлен выраженный анальгетической

эффект экстракта аконита Кузнецова (2,6 и 1,3 мл/кг), сопоставимый с действием индометацина. Суммарный экстракт алкалоидов (0,65 и 1,3 мл/кг) в термическом ноцицептивном тесте «горячая пластина» показал высокую анальгетическую активность. Исходя из совокупности полученных данных, можно заключить, что экстракт аконита Кузнецова проявляет смешанный тип рецепторного реагирования на моделях с различным профилем болевого раздражения, что позволяет отнести его к группе перспективных высокоактивных анальгетиков с комплексным механизмом действия.

Литература.

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2002. Т.1. 540 с.; Т.2. 608 с.
3. Нестерова Ю.В., Поветьева Т.Н., Сулов Н.И. [и др.]. Противовоспалительная активность дитерпеновых алкалоидов аконита байкальского // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 156, № 11. С. 611–616.
4. Поветьева Т.Н., Нестерова Ю.Г., Гайдамович Н.Н., Пушкарский С.В. Акониты в традиционной и научной медицине // Байкальские чтения-4. СПб.: Медкнига; Элби-СПб., 2010. С. 205–209.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
6. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe, 1986. 51 p.
7. Gendron L., Pintar J.E., Chavkin C. Essential role of mu opioid receptor in the regulation of delta opioid receptor-mediated antihyperalgesia // J. Neurosci. 2007. Vol. 150. P. 807–817.
8. Lavich T.R., Cordeiro R.S., Silva P.M., Martins M.A. A novel hotplate test sensitive to hyperalgesic stimuli and nonopioid analgesics // Braz. J. Med. Biol. Res. 2005. Vol. 38, No. 3. P. 445–451.
9. Morinville A., Cahill C. M., Kieffer B. et al. Muopioid receptor knockout prevents changes in deltaopioid receptor trafficking induced by chronic inflammatory pain // Pain. 2004. Vol.109, No. 3. P. 266–273.
10. Morinville A., Cahill C. M., Esdaile M. J. [et al.]. Regulation of δ -opioid receptor trafficking via μ -opioid receptor stimulation: evidence from μ -opioid receptor knockout mice // J. Neurosci. 2003. Vol. 23, No.12. P. 4888–4898.

Поступила в редакцию 03.04.2014.

Экспериментальное исследование анальгетической активности экстракта аконита Кузнецова

С.Г. Крылова¹, П.С. Зориков², Е.П. Зуева^{1,3}, Т.Г. Разина¹, Е.Н. Амосова¹, О.Ю. Рыбалкина^{1,3}

¹ НИИ фармакологии имени Е.Д. Гольдберга СО РАМН (634028, г. Томск, пр-т Ленина, 3), ² Горнотаежная станция имени В.Л. Комарова ДВО РАН (692533, Приморский край, Уссурийский район, с. Горнотаежное, ул. Солнечная, 26), ³ Национальный исследовательский Томский государственный университет (634050, г. Томск, пр-т Ленина, 36)

Резюме. Представлены результаты исследования анальгетической активности суммарного экстракта аконита Кузнецова на моделях термического и химического воздействия. В тесте «горячая пластина» (Hot plate) выявлен выраженный обезболивающий эффект суммы алкалоидов при внутрижелудочном курсовом использовании. На модели химического раздражения брюшины (Abdominal constriction test) фитопрепарат показал анальгетическую активность, сопоставимую с действием индометацина. Экстракт аконита проявил смешанный тип рецепторного реагирования на моделях с различным профилем болевого раздражения.

Ключевые слова: *Aconitum Kuznezoffi* Reichenb., экстракт, «горячая пластина», укусыны корчи.