

Ю. А. Бойко¹, М. В. Нестеркина^{2, 3*}, А. А. Шандра¹, И. А. Кравченко^{2, 3**}

АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ ВАНИЛИНА

¹ Одесский национальный медицинский университет, Украина, 65000, Одесса.

² Одесский национальный политехнический университет, Украина, 65044, Одесса.

³ Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, Украина, 65082, Одесса.
e-mail: * mashaneutron@gmail.com, ** kravchenko.pharm@gmail.com

Анальгетическая активность производных 4-гидрокси-3-метоксибензальдегида (ванилина) с различными фармакоформными группами изучена *in vivo* на моделях химически-индуцированной боли, вызванной субплантарным введением агонистов TRP ионных каналов — капсаицина и аллилизотиоцианата. Противовоспалительное действие производных ванилина продемонстрировано на модели каррагинан-индуцированной отека. Исследована анальгетическая и противовоспалительная активность ванилина и его производных, которая связана с влиянием указанных веществ на TRPA1 и TRPV1 рецепторы.

Ключевые слова: производные ванилина; TRPA1 и TRPV1 рецепторы; анальгетическая активность; противовоспалительное действие.

TRP-каналы (transient receptor potential channels) впервые были обнаружены в 1969 г. На примере мутантного штамма *Drosophila melanogaster* было показана роль TRP-каналов в формировании электрического ответа на световое воздействие в зрительном анализаторе [1]. Несмотря на более чем 40-летнюю историю, интенсивное изучение TRP-каналов началось с 90-х годов прошлого столетия, после клонирования и секвенирования гена TRPL-канала дрозофилы [2]. В последнее время изучению TRP-каналов уделяют пристальное внимание в связи с их несомненной ролью в организации механизмов чувствительности к различным физическим и химическим стимулам [3, 4]. С точки зрения практической медицины, интерес вызывает участие TRP-каналов в генерации болевых импульсов в ноцицептивных нервных волокнах [4]. В настоящее время вещества, оказывающие влияние на рецепторы, связанные с TRPV-каналами (ванилоидное семейство TRP-каналов), рассматривают как принципиально новый и перспективный класс анальгетиков [5].

Классическим агонистом TRPV-1 рецепторов является капсаицин [6]. К важным особенностям механизма действия данного соединения относится как способность вызывать интенсивное болевое ощущение при первичной активации капсаицин-чувствительных нервных волокон, так и последующая анальгезия, связанная с десенситизацией TRPV-1 рецепторов при длительном воздействии на них капсаицина [7]. В связи с указанной противоболевой активностью, капсаицин нашел применение в качестве анальгетического средства при хронической боли [8, 9]. Перспективность и эффективность использования капсаицина в клинике болевых синдромов закономерно привлекает внимание исследователей и к веществам, имеющим сходную с ним структуру. Это могут быть как соединения растительного происхождения, так и вновь синтезированные вещества [10]. С фармако-химической точки зрения в молекулу капсаицина и подобных ему

соединений можно выделить 3 функциональные части (рис. 1) [9].

А-сегмент соответствует замещенному бензольному кольцу. Данный сегмент является самой стабильной частью капсаициноидов и капсиноидов, в большинстве случаев его модификация приводит к полной утрате биологической активности. В-сегмент также слабо вариабелен и представлен амидной либо сложноэфирной связью. Капсаициноиды, в которых отсутствует данный сегмент, обладают меньшим аффинитетом к TRPV-1 рецепторам [10]. С-сегмент — алифатическая, насыщенная либо содержащая двойную связь цепочка — является вариабельным фрагментом. С фармакологической точки зрения наиболее важной частью молекулы является ванилоидный сегмент, отвечающий за аффинитет к TRPV-1 рецепторам, алифатический “хвост” при этом выполняет модулирующие функции.

Как было указано, модификация ванилоидной части оказывает крайне существенное влияние на биологическую активность полученных производных. В некоторых случаях удавалось добиться замены агонистических свойств на антагонистические по отношению к TRPV-1 рецепторам введением галогенных радикалов в бензольное кольцо [11].

В качестве родительской молекулы нами был выбран ванилин, обладающий значительным потенциалом для создания на его основе веществ с положительной биологической активностью [12] и имеющий сродство к TRP рецепторам. Для модулирования фармакологической активности использовали производные ванилина, имеющие различия в В-сегменте. Учитывая положительное влияние данных соединений на структуру биологических мембран, целесообразным является изучение данных производных в условиях трансдермального введения; в дальнейшем исследовали их анальгетическую и противовоспалительную активность.

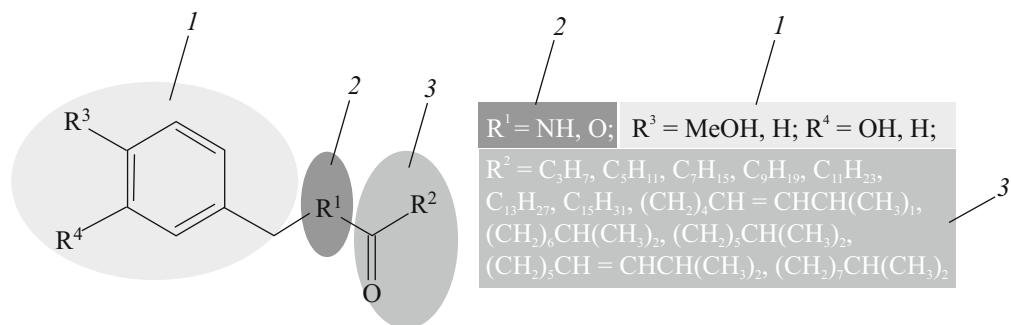


Рис. 1. Химическая структура молекулы капсаицина: 1 – слабо варьируемый А-сегмент; 2 – В-сегмент, соответствующий амидной либо сложноэфирной связи; 3 – структурно наиболее варьируемый С-сегмент.

Экспериментальная часть

В настоящей работе изучение анальгетической и противовоспалительной активности осуществляли в условиях трансдермального введения следующих производных ванилина: оксима ванилина, ванилинового спирта и ванилиновой кислоты. Указанные производные синтезировали, исходя из ванилина (98 %, ТСИ, Belgium), в соответствии с известными методами [13].

Мягкую основу для мазей изготавливали смешением полиэтиленгликоля-1500, полиэтиленоксида-400 и 1,2-пропиленгликоля в соотношении 4:2:3. Полученную смесь нагревали с перемешиванием до момента полного растворения полиэтиленоксида-1500, после чего добавляли одно из активных веществ (ванилин, оксим ванилина, ванилиновый спирт, ванилиновая кислота). Конечная концентрация активного вещества в мази составляла 2 % по массе.

Для исследования были использованы животные, выращенные и содержавшиеся в виварии Одесского национального медицинского университета. Для экспериментальной работы случайным образом отобрали 60 мышей и 30 крыс: крысы — самцы массой 180–220 г, линии Вистар; мыши — самцы массой 16–20 г линии СВА. Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Все исследования с использованием животных проводили согласно биоэтических норм “European Convention for the Protection of Vertebrate

Animals Used for Experimental and Other Specific Purposes” (Strasbourg, 1986).

Исследования анальгетической активности проводили на мышах, которые были разделены на 6 групп по 10 особей в каждой группе. У мышей 4 опытных групп за 10 мин до начала теста правые задние конечности обрабатывали одной из 4 мазей. На конечность наносили ~ 10 мг мази, которая легко втиралась в кожные покровы стопы. Пятая группа животных выступала в качестве контрольной (наносили только мазевую основу). Шестой группе животных на задние конечности наносили мазь, содержащую препарат сравнения анестезин. Каждую группу, включая контрольную, делили поровну на 2 подгруппы (по 5 особей в подгруппе). Животных первых подгрупп использовали в “капсаициновом тесте”, животных вторых подгрупп — в “аллилизотионатовом тесте”.

Противовоспалительную активность изучали на крысах, которых также разделили на 6 групп по 5 особей в группе. Животных первой группы лечили мазью с ванилином, второй — мазью с оксимом ванилина, третьей — мазью с ванилиновым спиртом, четвертой — мазью с ванилиновой кислотой. Животных пятой группы использовали в качестве контроля (наносили только мазевую основу). Шестой группе животных на конечность наносили мазь, содержащую препарат сравнения ибупрофен.

Капсаициновый и аллилизотионатовый (АИТЦ) тест на анальгетическую активность. Тес-

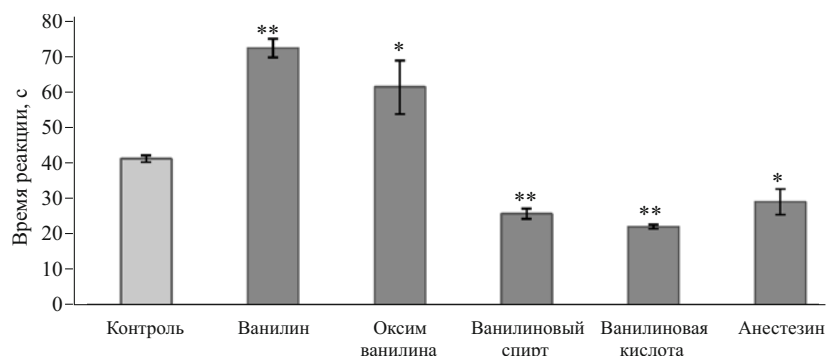


Рис. 2. Анальгетическая активность ванилина и его производных (капсаициновый тест): * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, по сравнению с контрольной группой животных.

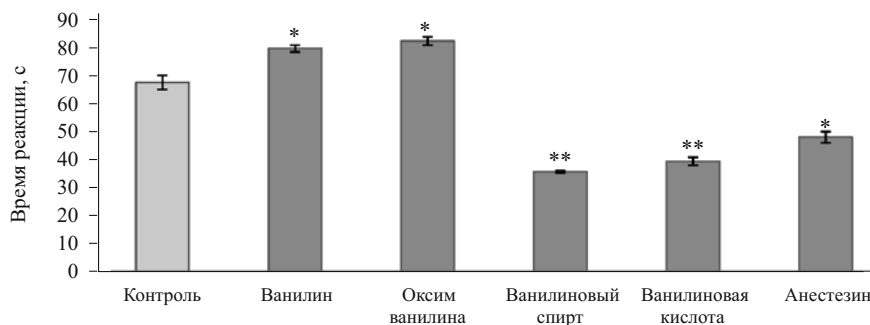


Рис. 3. Анальгетическая активность ванилина и его производных (аллилизотиоцианатовый тест); * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, по сравнению с контрольной группой животных.

ты по изучению анальгетического действия проводили в соответствии с описанными методиками [14].

Каррагинан-индуцированный воспалительный отек. Воспаление у экспериментальных животных индуцировали субплантарным введением каррагинана согласно методике [15]. Лечение животных с каррагинан-индуцированным отеком начинали непосредственно после введения флоггена и через 2 ч после введения. Затем нанесение мази осуществляли 1 раз в сутки ежедневно. Мазь наносили в количестве 50 мг на область воспаления, после чего проводили легкое втирание в течение нескольких минут.

Распределение полученных в ходе исследований данных проверяли на нормальность при помощи теста Шапиро — Уилка. Поскольку все полученные данные в экспериментальных выборках имели нормальное распределение, однофакторный дисперсионный анализ проводили с использованием t -критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони. Различия между значениями, для которых $p < 0,05$, считались статистически значимыми.

Результаты и их обсуждение

Изучение анальгетического и противовоспалительного действия проводили для мягких лекарственных форм, содержащих 2 % активного ингредиента (вани-

лина или его производного). Дальнейшее повышение содержания активного компонента в мази не приводило к усилению фармакологического эффекта. При использовании референс-препаратов в мазевую основу вводили эквимолярное количество анестезина/ибупрофена, что, учитывая близость молекулярных масс производных ванилина и соединений-сравнения, составило также 2 %. Введение капсаицина и аллилизотиоцианата приводит к выраженной ноцицептивной реакции. Время облизывания места введения ирританта является показателем интенсивности болевой ответа. В случае предварительной обработки конечностей мышей мазями с ванилином либо его производными наблюдалось как удлинение периода облизывания, так и его укорочение (рис. 2, 3). Использование ванилина и оксима ванилина увеличивало период облизывания в 1,75 и 1,5 раз в “капсаициновом” тесте и в 1,18 и 1,21 раз в “аллилизотиоцианатовом” тесте, соответственно. Ванилиновый спирт и ванилиновая кислота уменьшали время облизывания в 1,64 и 1,86 раза в “капсаициновом” тесте и в 1,89 и 1,74 раза в “аллилизотиоцианатовом” тесте, соответственно.

Противовоспалительную активность ванилина и его производных оценивали по способности уменьшать каррагинан-индуцированный отек. Динамика изменений объема отека в месте введения каррагинана у

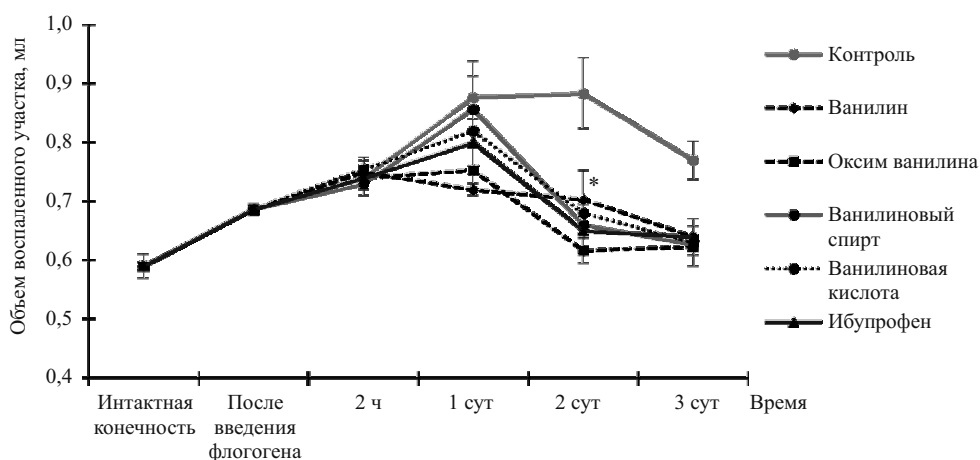


Рис. 4. Противовоспалительная активность ванилина и его производных на каррагинан-индуцируемом отеке у крыс (объем конечности); * $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой животных. Указанное значение достоверности является верным для всех исследованных групп животных.

животных контрольной и опытных групп представлены на рис. 4. В течение первых суток после введения флогогена не отмечено достоверной разницы в величине отека у животных контрольной и опытных групп. Объем воспаленного участка у групп, получавших экспериментальное лечение на второй и третий день лечения, был в 1,44 и 1,24 раза меньше, чем у животных контрольной группы ($\min p = 0,04$) на второй и третий день, соответственно. Достоверных различий в терапевтической эффективности использованных мазей зафиксировано не было.

Инъекция капсаицина в мягкие ткани стопы приводит к возникновению болевой реакции, связанной с активацией TRPV-1 мембранных каналов нервных волокон С-типа. Для исследованных соединений наблюдалось неоднородное воздействие на индуцированную капсаицином болевую реакцию. Ванилин и оксим ванилина потенцировал действие капсаицина, приводя к увеличению периода облизывания, что свидетельствует об усилении болевой реакции. В то же время ванилиновый спирт и ванилиновая кислота уменьшали период облизывания. Согласно современным представлениям о строении TRPV-1 канала, известно, что, когда данный канал находится в закрытом состоянии, в участке связывания капсаицина расположена небольшая липидная молекула [16]. Для оказания биологического эффекта капсаицину необходимо вытеснить данную молекулу из участка связывания. В случае предварительной обработки конечности мазью, содержащей ванилин либо его производные, предполагаем, что последние вытесняют липидную молекулу из мембранного кармана и занимают ее место. В этом случае инъецированный в ткани капсаицин должен вытеснить из участка связывания с рецептором ванилин либо его производное. Из предложенного механизма следует, что аффинитет TRPV-1 к ванилину и оксиму ванилина ниже, чем к природной “липидной пробке” и, наоборот, выше, в случае ванилинового спирта и ванилиновой кислоты. Указанные факторы изменяют кинетику связывания капсаицина с TRPV-1 и, в конечном итоге, влияют на выраженность болевой реакции.

Объяснением предполагаемых отличий в аффинитете исследованных соединений к ванилоидному сайту связывания, с нашей точки зрения, является энергия водородных связей, образующихся между переменным фрагментом соответствующих веществ (В-сегмент) и гидрофильными группами аминокислотных остатков. Показано, что для удержания капсаицина в мембранном кармане критическое значение имеют 2 группы водородных связей. Первая группа образуется между метокси- и гидроксид-радикалами бензольного кольца и соответствующими полярными фрагментами аминокислотных остатков, вторая группа связей возникает в районе амидной группировки [17]. Модификация В-сегмента ванилина приводит к усилению либо ослаблению водородных связей между данным фрагментом и аминокислотными полярными группировками, что отражается на процессе вытеснения капсаицином изученных веществ из мембранного кармана.

Аллилизотиоцианатная болевая модель основана на связывании аллилизотиоцианата с TRPA-1 (анкириновое семейство TRP) и открытием TRPA-1 каналов [18]. TRPA-1 каналы, как и TRPV-1 каналы, являются неспецифическими катионными каналами, которые способны активироваться различными химическими и физическими стимулами [19, 20]. Возникающий при их активации болевой ответ опосредован как возбуждением ноцицептивных нервных волокон, так и последующим выделением нейропептидов [21]. Как и в случае TRPV-1 рецепторов, предварительная обработка конечности мазью с ванилином либо с его производными приводила к модуляции болевой реакции, вызванного активацией TRPA-1 рецепторов. Интересным является однонаправленность влияния ванилина и его производных на изменения болевой реакции для обеих моделей.

Изучение противовоспалительной активности проводили на модели каррагинанового отека. Введение в ткани каррагинана индуцирует множество вне- и внутриклеточных биохимических каскадов, а также межклеточных взаимодействий, включающих выделение гистамина и серотонина [22], брадикинина [23], активацию ЦОГ и синтез эйкозаноидов [24], реакцию со стороны сосудистого эндотелия [25]. Несмотря на разнообразие процессов, которые активируются в случае каррагинан-индуцированного отека, считаем, что использованные нами терапевтические соединения действуют на следующие узловые точки воспалительного каскада — отсроченная десенситизация TRPA-1 и TRPV-1, снижение продукции нейрогенных пептидов, уменьшение активности тучных клеток и тканевых макрофагов.

Использование ванилина и его производных в качестве противовоспалительных соединений не оказало существенного влияния на динамику развития каррагинанового отека в первые часы после введения. Наблюдаемые различия в размерах воспалительного отека у животных опытных и контрольной групп спустя 1 сут после индуцирования воспаления и после двукратного лечения были недостоверны ($p = 0,27$). Из полученных данных можно заключить, что исследованные вещества не оказывают выраженного влияния на первую фазу каррагинанового отека, зависящую от биогенных аминов, брадикинина и интерлейкинов. Уменьшение отека у животных опытных групп, по сравнению с контрольными, которое наблюдалось на 2 сут лечения, на наш взгляд, имеет многофакторную природу. Развивающаяся десенситизация TRP (ванилоидных и анкириновых) чувствительных нервных волокон приводит к уменьшению выделения субстанции P и кальцитонин ген-родственного пептида. Данные вещества стимулируют гипералгезию и увеличивают сосудистую проницаемость, кроме того субстанция P выступает в качестве активатора нейтрофилов, базофилов и тучных клеток, выделяемые ими при дегрануляции моноамины также способствуют росту порозности капилляров [20]. Таким образом, уменьшение выделения указанных нейропептидов приводит

к снижению отечности и болевого синдрома, что наблюдалось нами в условиях эксперимента на вторые сутки лечения.

Таким образом, в ходе проведенных исследований была установлена анальгетическая и противовоспалительная активность ванилина и его производных, которая связана с влиянием указанных веществ на TRPA-1 и TRPV-1. Различия в оказываемых эффектах на болевой ответ в экспериментальных ноцицептивных моделях между изученными веществами, с нашей точки зрения, объясняются особенностями связывания ванилина и его производных с аффинными сайтами TRPA-1 и TRPV-1. Противовоспалительное действие опосредуется рядом механизмов, включающих в себя угнетение продукции тахикининов, снижение уровня активации макрофагов и тучных клеток, уменьшение продукции провоспалительных цитокинов, снижение активности ЦОГ и NO-синтазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. D. J. Cosens, A. Manning, *Nature*, **224**(5216), 285 – 287 (1969).
2. A. M. Phillips, A. Bull, L. E. Kelly, *Neuron*, **8**(4), 631 – 642 (1992).
3. D. E. Clapham, L. W. Runnels, C. Strubing, *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 387 – 396 (2001).
4. M. J. Caterina, D. Julius, *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**(1), 487 – 517 (2004).
5. J. Sousa-Valente, A. P. Andreou, L. Urban, I. Nagy, *Br. J. Pharmacol.*, **171**(10), 2508 – 2527 (2014).
6. M. L. Reyes-Escogido, E. G. Gonzalez-Mondragon, E. Vazquez-Tzompantzi, *Molecules*, **16**(2), 1253 – 1270 (2011).
7. O. M. E. Abdel-Salam, *Capsaicin as a therapeutic molecule*, Springer Science & Business Media, Basel (2014).
8. K. Shimoda, N. Kubota, M. Akagi, *ACES*, **2**(1), 45 – 49 (2011).
9. B. C. N. Prasad, R. Shrivastava, G. A. Ravishankar, *Evid-Based-Integrative-Med.*, **2**(3), 147 – 166 (2005).
10. A. Szallasi, P. M. Blumberg, *Pharmacol. Rev.*, **51**(2), 159 – 212 (1999).
11. G. Appendino, N. Daddario, A. Minassi, et al., *J. Med. Chem.*, **48**(14), 4663 – 4669 (2005).
12. L. S. Premkumar, *ACS Chem. Neurosci.*, **5**(11), 1117 – 1130 (2014).
13. Л. Титце, Т. Айхер, *Препаративная органическая химия*, Мир, Москва (1999).
14. М. Nesterkina, I. Kravchenko, *Pharmaceuticals*, **10**(2), 1 – 10 (2017).
15. I. A. Kravchenko, E. A. Alekseeva, A. I. Aleksandrova, A. A. Kobernik, *Pharm. Chem. J.*, **49**(3), 163 – 166 (2015).
16. F. Yang, J. Zheng, *Protein Cell*, **8**(3), 169 – 177 (2017).
17. F. Yang, X. Xiao, W. Cheng, et al., *Nat. Chem. Biol.*, **11**(7), 518 – 524 (2015).
18. S. E. Jordt, D. M. Bautista, H. H. Chuang, et al., *Nature*, **427**(6971), 260 – 265 (2004).
19. W. J. Laursen, E. O. Anderson, L. J. Hoffstaetter, et al., *Temperature*, **2**(2), 214 – 226 (2015).
20. C. R. McNamara, J. Mandel-Brehm, D. M. Bautista, et al., *PNAS*, **104**(33), 13525 – 13530 (2007).
21. Y. Kaneko, A. Szallasi, *Br. J. Pharmacol.*, **171**(10), 2474 – 2507 (2014).
22. H. A. Al-Haboubi, I. J. Zeitlin, *Eur. J. Pharmacol.*, **88**(2 – 3), 169 – 176 (1983).
23. M. Di Rosa, J. P. Giroud, D. A. Willoughby, *J. Pathol.*, **104**(1), 15 – 29 (1971).
24. J. L. Liang, J.-Z. Wu, Y.-H. Liu, Z.-B. Zhang, *Mediators Inflamm.*, 2017, 1 – 14 (2017).
25. M. Bucci, F. Roviezzo, I. Posadas, J. Yu, L. Parente, W. C. Sessa, G. Cirino, *PNAS*, **102**(3), 904 – 908 (2005).

Поступила 19.12.17

ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF VANILLIN DERIVATIVES

Y. A. Boiko¹, M. V. Nesterkina^{2,3,*}, A. A. Shandra¹, and I. A. Kravchenko^{2,3,**}

¹ Odessa National Medical University, 65000 Odessa, Ukraine

² Odessa National Polytechnic University, 65044 Odessa, Ukraine

³ Odessa I. I. Mechnikov National University, 65082 Odessa, Ukraine

e-mail: * mashaneutron@gmail.com; ** kravchenko.pharm@gmail.com

The analgesic activity of 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanillin) derivatives with various pharmacophore groups has been studied *in vivo* on models of chemically induced pain caused by subplantar injection of TRP ion channel agonists – capsaicin and allylisothiocyanate. The anti-inflammatory effect of vanillin derivatives has been demonstrated on a carrageenan-induced edema model. The analgesic and anti-inflammatory activity of vanillin and its derivatives was established and associated with the influence of these compounds on TRPA1 and TRPV1 receptors.

Keywords: vanillin derivatives; TRPA1 receptor; TRPV1 receptor; analgesic activity; anti-inflammatory effect.