

Противовоспалительное и анальгетическое действие ингибитора индуцируемой синтазы оксида азота в эксперименте

В.С. Мотов^{1, 2}, В.В. Быков^{1, 2}, А.В. Быкова², А.И. Венгеровский¹

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия

²ООО «Инновационные фармакологические разработки», Томск, Россия

АННОТАЦИЯ

В в е д е н и е . Оксид азота играет ключевую роль в развитии воспаления. В связи с этим перспективно создание лекарственного средства, снижающего продукцию оксида азота в очаге воспаления.

Ц е л ь . Изучить в эксперименте противовоспалительное и анальгетическое действие ингибитора индуцируемой синтазы оксида азота производного амингуанидина (шифр – LIS-M).

М а т е р и а л ы и м е т о д ы . Соединение LIS-M в 1% водном растворе поливинилпирролидона вводили внутримышечно в дозах 5, 10 и 20 мг/кг 150 крысам-самцам линии Sprague Dawley и 50 мышам-самцам линии CD-1 с экспериментальными моделями воспаления и боли. Животные группы сравнения получали диклофенак в дозе 10 мг/кг, животные группы контроля – 1% водный раствор поливинилпирролидона в эквивалентном объеме. Оценивали влияние соединения LIS-M на течение экспериментальной патологии и его анальгетическое потенциальное ulcerогенное действие.

Р е з у л ь т а т ы . У крыс-самцов линии Sprague Dawley соединение LIS-M уменьшает острое экссудативное воспаление, вызванное инъекцией под плантарный апоневроз каррагинена, гистамина или серотонина, тормозит пролиферацию грануляционной ткани и экссудацию вокруг имплантированного под кожу ватного тампона, не оказывает ulcerогенного действия. У мышей-самцов линии CD-1 ослабляет болевую реакцию и увеличивает время до ее наступления.

З а к л ю ч е н и е . Соединение LIS-M в диапазоне доз 5–20 мг/кг оказывает выраженное антиэкссудативное, антипролиферативное и анальгетическое действие, не уступая действию диклофенака в дозе 10 мг/кг, и не оказывает ulcerогенного действия.

Ключевые слова: производное амингуанидина, индуцируемая форма синтазы оксида азота, воспаление, боль, ulcerогенное действие.

Образец цитирования: Мотов В.С., Быков В.В., Быкова А.В., Венгеровский А.И. Противовоспалительное и анальгетическое действие ингибитора индуцируемой синтазы оксида азота в эксперименте // Journal of Siberian Medical Sciences. 2022;6(1):106–115. doi: 10.31549/2542-1174-2022-6-1-106-115

Anti-inflammatory and analgesic activity of an inducible NO synthase inhibitor in an experiment

V.S. Motov^{1, 2}, V.V. Bykov^{1, 2}, A.V. Bykova², A.I. Vengerovskii¹

¹Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

²Innovative Pharmacological Research, LLC, Tomsk, Russia

ABSTRACT

I n t r o d u c t i o n . Nitric oxide plays a key role in the development of inflammation. In this regard, it is promising to create a drug that reduces the production of nitric oxide in the focus of inflammation.

Поступила в редакцию 01.09.2021
Прошла рецензирование 12.10.2021
Принята к публикации 01.11.2021

Автор, ответственный за переписку
Мотов Валерий Сергеевич: ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.
E-mail: preclin13_dep@iphar.ru

Received 01.09.2021
Revised 12.10.2021
Accepted 01.11.2021

Corresponding author
Valeriy S. Motov: Siberian State Medical University, 2, Moskovsky Trakt, Tomsk, 634050, Russia.
E-mail: preclin13_dep@iphar.ru

A i m . To study experimentally the anti-inflammatory and analgesic effects of an inducible nitric oxide synthase inhibitor of an aminoguanidine derivative (LIS-M).

M a t e r i a l s a n d m e t h o d s . The compound LIS-M in 1% aqueous solution of polyvinylpyrrolidone was administered intramuscularly at doses of 5, 10 and 20 mg/kg to 150 male Sprague Dawley rats and 50 male CD-1 mice with experimental models of inflammation and pain. The animals of the comparison group received diclofenac at a dose of 10 mg/kg, the animals of the control group received 1% aqueous solution of polyvinylpyrrolidone in an equivalent volume. The effect of the LIS-M compound on the course of experimental pathology and its analgesic potential ulcerogenic effect were evaluated.

R e s u l t s . In male Sprague Dawley rats, the LIS-M compound reduces acute exudative inflammation caused by injection of carrageenan, histamine or serotonin in plantar aponeurosis, inhibits the proliferation of granulation tissue and exudation around a cotton swab implanted under the skin, does not have an ulcerogenic effect. In male CD-1 mice, it weakens the pain reaction and increases the time before it occurs.

C o n c l u s i o n . The LIS-M compound at doses ranging from 5 to 20 mg/kg has a pronounced antiexudative, antiproliferative and analgesic effect, not inferior to the action of diclofenac at a dose of 10 mg/kg, and does not have an ulcerogenic effect.

Keywords: aminoguanidine derivative, inducible nitric oxide synthase, inflammation, pain, ulcerogenic action.

Citation example: Motov V.S., Bykov V.V., Bykova A.V., Vengerovskii A.I. Anti-inflammatory and analgesic activity of an inducible NO synthase inhibitor in an experiment. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2022;6(1):106–115. doi: 10.31549/2542-1174-2022-6-1-106-115

ВВЕДЕНИЕ

Оксид азота (NO) участвует во многих физиологических и патологических процессах. Он образуется в эндотелии сосудов в реакциях, катализируемых конституциональным и индуцируемым изоферментами синтазы NO [1]. Конституциональный NO расширяет сосуды, улучшает кровоснабжение органов, тормозит агрегацию тромбоцитов, оказывает противоатеросклеротическое и гастропротективное действие, участвует в синаптической передаче [2]. В очаге воспаления NO синтезируется в большом количестве под влиянием индуцируемого кальцийнезависимого изофермента синтазы NO (iNOS). Его активаторами служат интерферон γ , интерлейкин-6, фактор некроза опухоли α , липополисахариды бактерий [3]. NO активирует синтез провоспалительных цитокинов, оказывает цитотоксическое действие, усиливает экссудацию и пролиферацию соединительной ткани [4].

Для лечения воспалительных заболеваний перспективно создание нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), способного уменьшать активность iNOS без влияния на ее конституциональную форму. Предполагается, что такое средство может подавлять воспалительную реакцию без нежелательного влияния на сердечно-сосудистую систему и ulcerogenicного действия. Как известно, большинство современных НПВС не лишены этих опасных побочных эффектов [5]. В ООО «Инновационные фармакологические разработки» (Россия, Томск) синтезировано соединение LIS-M – производное

INTRODUCTION

Nitric oxide (NO) is involved in many physiological and pathological processes. It is formed in the vascular endothelium in reactions catalyzed by constitutive and inducible NO synthase isoforms [1]. Constitutive NO dilates blood vessels, improves blood supply to organs, inhibits platelet aggregation, has anti-atherosclerotic and gastroprotective effects, participates in synaptic transmission [2]. In the focus of inflammation, large amount of NO is synthesized under the influence of calcium-independent inducible NO synthase (iNOS) isoform. Its activators are interferon γ , interleukin-6, tumor necrosis factor- α , lipopolysaccharides of bacteria [3]. NO activates the synthesis of pro-inflammatory cytokines, has a cytotoxic effect, enhances exudation and proliferation of connective tissue [4].

For the treatment of inflammatory diseases, the creation of a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), capable of reducing the activity of iNOS without affecting its constitutional form, is promising. It is assumed that such a remedy can suppress the inflammatory reaction without adverse effects on the cardiovascular system and ulcerogenic action. As it is known, most modern NSAIDs are not free from these dangerous side effects [5]. A compound LIS-M, a derivative of the selective iNOS inhibitor aminoguanidine, was synthesized in Innovative Pharmacological Research, LLC (Tomsk, Russia). The selective action of LIS-M on iNOS is provided by the radical of nitrophenyl aminoindole [6]. In previous experiments, the iNOS concentration was measured by the enzyme immunoassay (Cloud-Clone Corp. Kit, USA)

селективного ингибитора iNOS аминугуанидина. Селективное действие LIS-M на iNOS обеспечивает радикал нитрофениламиноиндола [6]. В ранее проведенных экспериментах иммуноферментным методом (набор Cloud-Clone Corp., США) измеряли концентрацию iNOS и радиометрическим методом (набор Cayman Chemical Company, США) – активность конституциональных форм фермента. Соединение LIS-M ингибировало только iNOS [7].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить в эксперименте влияние ингибитора iNOS производного аминугуанидина на воспаление и боль.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Производное аминугуанидина LIS-M представляет собой ({[3-(4-нитрофениламино)индол-2-ил]метилена}амино)гуанидина метансульфонат (рис. 1). Средняя летальная доза LD₅₀ LIS-M при внутримышечном введении составляет для крыс-самцов 382.6 мг/кг, для мышей-самцов – 200 мг/кг.

Эксперименты проводили в испытательном центре ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар») на 150 крысах-самцах линии Sprague Dawley массой тела 230–250 г и 50 мышях-самцах линии CD-1 массой тела 25–27 г. Животных получали из отделения свободных от патогенной микрофлоры лабораторных животных ООО «Ифар», содержали в стандартных пластиковых клетках по 6 крыс и 10 мышей при температуре 18–26 °С, относительной влажности воздуха 45–65 %, воздухообмене 10–11 объемов/ч и регулируемом световом режиме (12:12 ч). Исследование одобрено этическими комитетами Сибирского государственного медицинского университета (протокол № 5591 от 23.10.2017) и ООО «Ифар» (протокол № 31/2020 от 04.02.2020), проведено в соответствии с положениями Европейской конвенции

and the activity of the constitutional forms of the enzyme was measured by the radiometric method (Cayman Chemical Company Kit, USA). The LIS-M compound inhibited only iNOS [7].

AIM OF THE RESEARCH

To study the effect of an iNOS inhibitor of an aminoguanidine derivative on inflammation and pain experimentally.

MATERIALS AND METHODS

The aminoguanidine derivative LIS-M is ({[3-(4-nitrophenyl amino)indole-2-yl]methylene} amino)guanidine methanesulfonate (Fig. 1). The average lethal dose (LD₅₀) of LIS-M with intramuscular administration is 382.6 mg/kg for male rats, 200 mg/kg for male mice.

The experiments were carried out in the testing center of Innovative Pharmacology Research, LLC (IPhar, LLC) on 150 male Sprague Dawley rats weighing 230–250 g and 50 male CD-1 mice weighing 25–27 g. The animals were obtained from the Department of specific pathogen free (SPF) laboratory animals of IPhar, LLC, kept in standard plastic cages (6 rats and 10 mice per cage) at a temperature of 18–26 °C, relative humidity of 45–65%, air exchange of 10–11 volumes/h and adjustable light mode (12:12 h). The study was approved by the ethical committees of the Siberian State Medical University (Protocol No. 5591 of 23.10.2017) and IPhar, LLC (Protocol No. 31/2020 of 04.02.2020), conducted in accordance with the provisions of the European Convention for the Protection of Laboratory Animals (Strasbourg, 1986) and in compliance with the principles and the Rules of Good Laboratory Practice (GOST 33044-2014, Order of the Ministry of Health of Russia dated 01.04.2016 No. 199n).

Rats and mice were intramuscularly injected with the compound LIS-M at doses of 5, 10 and 20 mg/kg in 1% aqueous solution of polyvinylpyrrolidone or

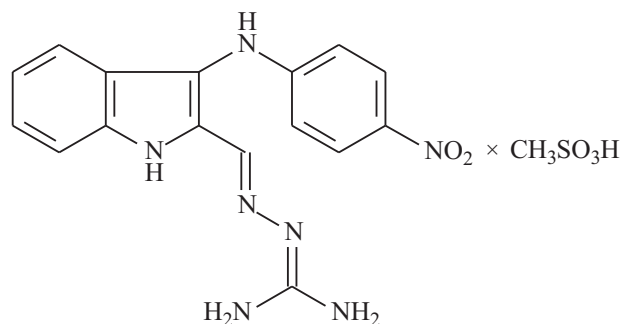


Рис. 1. Структурная формула LIS-M
Fig. 1. LIS-M structural formula

по защите лабораторных животных (Страсбург, 1986) и с соблюдением принципов и правил надлежащей лабораторной практики (ГОСТ 33044-2014, приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199н).

Крысам и мышам внутримышечно вводили в 1% водном растворе поливинилпирролидона соединение LIS-M в дозах 5, 10 и 20 мг/кг или препарат сравнения диклофенак (Sandoz, Германия) в дозе 10 мг/кг [8]. Контрольные животные получали 1% водный раствор поливинилпирролидона в эквивалентном объеме.

Для оценки влияния веществ на разные виды острого экссудативного воспаления через 0.5 ч после однократной внутримышечной инъекции соединения LIS-M или диклофенака под плантарный апоневроз задней конечности крыс вводили каррагинин (20 мг/мл), гистамин (20 мг/мл) или серотонин (0.1 мг/мл) в водных растворах (все Sigma-Aldrich, США). В другую конечность вводили изотонический раствор натрия хлорида в том же объеме. Величину отека оценивали при помощи плетизмометра (Ugo Basile, Италия) как разницу между объемами задних конечностей через 4 ч после введения каррагинина или через 0.5 ч после введения гистамина и серотонина [9, 10].

Для моделирования хронического пролиферативного воспаления крысам под легким наркозом севофлураном в асептических условиях имплантировали под кожу спины два стерильных ватных тампона массой 10 мг каждый. В течение 7 сут 1 раз в сутки внутримышечно вводили соединение LIS-M в дозах 5, 10, 20 мг/кг или диклофенак в дозе 10 мг/кг. На 8-е сутки после операции животных выводили из эксперимента в камере, постепенно заполняемой углекислым газом, извлекали тампоны с образовавшейся вокруг них грануляционной тканью, взвешивали, высушивали в термостате до постоянной массы и повторно взвешивали. Пролиферативную реакцию оценивали по разнице между массой высушенной гранулемы и исходной массой тампона, экссудативную – по разнице между массой сырой и высушенной гранулем [10].

Анальгетический эффект оценивали у мышей по влиянию на сокращения брюшных мышц («корчи»), вызванные внутрибрюшинной инъекцией 0.75% раствора уксусной кислоты в объеме 0.1 мл/10 г массы тела животного. За 8 ч до инъекции раздражителя вводили однократно внутримышечно вещество LIS-M или диклофенак. В течение последующих 15 мин для каждого

the comparison drug diclofenac (Sandoz, Germany) at a dose of 10 mg/kg [8]. Control animals received 1% aqueous solution of polyvinylpyrrolidone in an equivalent volume.

To assess the effect of substances on various types of acute exudative inflammation, 0.5 h after a single intramuscular injection of the compound LIS-M or diclofenac, carrageenan (20 mg/ml), histamine (20 mg/ml) or serotonin (0.1 mg/ml) in aqueous solution (all Sigma-Aldrich, USA) were administered under plantar aponeurosis of the hind limb of rats. Normal saline was injected into the other limb in the same volume. The volume of edema was assessed using a plethysmometer (Ugo Basile, Italy) as the difference between the volumes of the hind limbs 4 h after the administration of carrageenan or 0.5 h after the injection of histamine and serotonin [9, 10].

To simulate chronic proliferative inflammation, two sterile cotton swabs each weighing 10 mg were aseptically implanted under the skin of the back of rats under light anesthesia with sevoflurane. For 7 days, the LIS-M compound was administered intramuscularly once a day at doses of 5, 10, 20 mg/kg or diclofenac at a dose of 10 mg/kg. On the 8th day after the operation, the animals were sacrificed in a chamber gradually filled with carbon dioxide; swabs with granulation tissue were removed, weighed, dried in a thermostat to a constant mass and re-weighed. The proliferative reaction was evaluated by the difference between the mass of the dried granuloma and the initial mass of the swab, the exudative reaction was evaluated by the difference between the mass of the raw and dried granulomas [10].

The analgesic effect was evaluated in mice by the effect on abdominal muscle contractions (writhing test) caused by intraperitoneal injection of 0.75% acetic acid solution in a volume of 0.1 ml/10 g of animal body weight. LIS-M or diclofenac was administered once intramuscularly 8 h before the injection of the irritant. During the next 15 min, the number of cramps was counted for each animal and the time before the first cramp was recorded [10].

To study the potential ulcerogenic effect, the compound LIS-M (5, 10, 20 mg/kg) or diclofenac (10 mg/kg) was administered intramuscularly to rats 4 times with an interval of 24 h. Three hours after the last administration, the animals were sacrificed in an atmosphere of carbon dioxide. The gastric mucosa was examined using a stereoscopic microscope (Observation Devices, LLC, Russia) at magnification $\times 10$, the degree of mucosal lesion was assessed on a four-point scale [10].

животного подсчитывали число «корчей» и регистрировали время до наступления первой «корчи» [10].

Для исследования потенциального ulcerогенного действия соединение LIS-M (5, 10, 20 мг/кг) или диклофенак (10 мг/кг) вводили крысам внутримышечно 4 раза с интервалом 24 ч. Через 3 ч после последнего введения животных выводили из эксперимента в атмосфере углекислого газа. Слизистую оболочку желудка исследовали с помощью стереоскопического микроскопа (ООО «Наблюдательные приборы», Россия) при увеличении $\times 10$, степень поражения слизистой оболочки оценивали по четырехбалльной шкале [10].

Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро – Уилка. Установлено нормальное распределение данных, поэтому достоверность различий ($p < 0.05$) между группами определяли с помощью t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Каррагенин, гистамин и серотонин вызывали отек конечности крыс. После инъекции каррагенина объем воспаленной конечности возрастал на 88 %, под влиянием гистамина – на 41 %, серотонина – на 84 % (табл. 1). Производное аминоксидина LIS-M в дозах 5, 10 и 20 мг/кг после однократной внутримышечной инъекции статисти-

The normality of the data distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test. The normal distribution of data was established, so significance of the difference ($p < 0.05$) between the groups was determined using Student's t test.

RESULTS AND DISCUSSION

Carrageenan, histamine and serotonin caused edema of the rats' limbs. After injection of carrageenan, the volume of the inflamed limb increased by 88%, after histamine injection – by 41%, after serotonin injection – by 84% (Table 1). The derivative of aminoguanidine LIS-M at doses of 5, 10 and 20 mg/kg after a single intramuscular injection statistically significantly decreased the edema of the rats' limb: in the experiment with carrageenan by 30, 58 and 67% respectively, with administration of histamine – by 44, 52 and 71%, serotonin – by 23, 25 and 29 %. Diclofenac at a dose of 10 mg/kg reduced the exudative reaction by 62%. When carrageenan and histamine were administered, the LIS-M compound showed the greatest antiexudative effect at a dose of 20 mg/kg, when carrageenan was injected, it was 15% more pronounced than that of diclofenac at a dose of 10 mg/kg ($p < 0.05$); in experiments with histamine and serotonin administration, the effects of these substances were comparable. The severity of serotonin-induced edema was significantly greater than with the action of other inflammatory agents, and the anti-inflammatory effect of LIS-M and diclof-

Таблица 1. Противовоспалительное действие производного аминоксидина LIS-M в дозах 5, 10 и 20 мг/кг и диклофенака в дозе 10 мг/кг на моделях острого экссудативного воспаления

Table 1. Anti-inflammatory effect of the aminoguanidine derivative LIS-M at doses of 5, 10 and 20 mg/kg and diclofenac at a dose of 10 mg/kg on models of acute exudative inflammation

Условия эксперимента Experimental conditions	Каррагенин / Carrageenan		Гистамин / Histamine		Серотонин / Serotonin	
	величина отека, мл edema volume, ml	%	величина отека, мл edema volume, ml	%	величина отека, мл edema volume, ml	%
1% водный раствор поливинилпирролидона (контроль) 1% polyvinylpyrrolidone aqueous solution (control)	0.54 $\pm$ 0.08	100	0.37 $\pm$ 0.01	100	0.90 $\pm$ 0.04	100
LIS-M, 5 мг/кг (mg/kg)	0.38 $\pm$ 0.06 ¹	70	0.21 $\pm$ 0.03 ¹	56	0.70 $\pm$ 0.07 ¹	77
LIS-M, 10 мг/кг (mg/kg)	0.23 $\pm$ 0.03 ^{1,2}	42	0.18 $\pm$ 0.03 ¹	48	0.68 $\pm$ 0.05 ¹	75
LIS-M, 20 мг/кг (mg/kg)	0.18 $\pm$ 0.02 ^{1,2,3,4}	33	0.10 $\pm$ 0.03 ^{1,2,3}	29	0.64 $\pm$ 0.07 ¹	71
Диклофенак, 10 мг/кг Diclofenac, 10 mg/kg	0.26 $\pm$ 0.03 ^{1,2}	48	0.12 $\pm$ 0.03 ^{1,2,3}	32	0.67 $\pm$ 0.07 ¹	74

Примечание. Значимые отличия показателей: ¹ – по сравнению с показателем контрольной группы ($p < 0.05$), ² – по сравнению с показателем при введении LIS-M в дозе 5 мг/кг ($p < 0.05$), ³ – по сравнению с показателем при введении LIS-M в дозе 10 мг/кг ($p < 0.05$), ⁴ – по сравнению с показателем при введении диклофенака в дозе 10 мг/кг ($p < 0.05$).

Note. Significant differences in values: ¹ – compared with the indicator of the control group ($p < 0.05$), ² – compared with the indicator for LIS-M administration at a dose of 5 mg/kg ($p < 0.05$), ³ – compared with the indicator for LIS-M administration at a dose of 10 mg/kg ($p < 0.05$), ⁴ – compared with the indicator for diclofenac administration at a dose of 10 mg/kg ($p < 0.05$).

стически достоверно ослабляло отек конечности крыс: в эксперименте с каррагенином соответственно на 30, 58 и 67 %, при введении гистамина – на 44, 52 и 71 %, серотонина – на 23, 25 и 29 %. Диклофенак в дозе 10 мг/кг уменьшал экссудативную реакцию на 62 %. При введении каррагенина и гистамина соединение LIS-M проявляло наибольший антиэкссудативный эффект в дозе 20 мг/кг, при инъекции каррагенина он был на 15 % более выражен, чем действие диклофенака в дозе 10 мг/кг ($p < 0.05$), в экспериментах с введением гистамина и серотонина эффекты этих веществ были сопоставимы. Выраженность отека, вызванного серотонином, была значительно больше, чем при действии других воспалительных агентов, а противовоспалительный эффект LIS-M и диклофенака оказался слабее. Эффекты LIS-M в тесте с серотонином не зависели от дозы, что обусловлено меньшей ролью NO при данной модели воспаления.

Имплантация ватных тампонов под кожу крысам сопровождалась образованием вокруг них неспецифической неиммунной гранулемы. Производное аминогуанидина LIS-M в дозе 5 мг/кг не влияло на пролиферацию грануляционной ткани и экссудацию, в дозе 10 мг/кг достоверно уменьшало экссудацию, в дозе 20 мг/кг ослабляло экссудацию и пролиферацию не слабее диклофенака в дозе 10 мг/кг ($p < 0.05$) (табл. 2).

Уксусная кислота в 0.75% водном растворе при внутрибрюшинном введении вызвала у мышей висцеральную боль в виде сокращений брюшных мышц («корчи») [11]. Соединение LIS-M в дозах 5, 10 и 20 мг/кг уменьшало количе-

enac was weaker. The effects of LIS-M in the serotonin test were dose-independent, due to the lesser role of NO in this model of inflammation.

Implantation of cotton swabs under the skin of rats was accompanied by the formation of a non-specific non-immune granuloma around them. The aminoguanidine derivative LIS-M at a dose of 5 mg/kg did not affect granulation tissue proliferation and exudation, at a dose of 10 mg/kg significantly reduced exudation, at a dose of 20 mg/kg reduced exudation and proliferation not less than diclofenac at a dose of 10 mg/kg ($p < 0.05$) (Table 2).

Intraperitoneal injection of 0.75% aqueous solution of acetic acid caused visceral pain in mice in the form of abdominal muscle contractions (writhing) [11]. The LIS-M compound at doses of 5, 10 and 20 mg/kg reduced the number of cramps by 44, 50 and 81% respectively, when administered at a dose of 20 mg/kg, the time before the onset of the first cramp was extended by 98%, when administered at doses of 5 and 10 mg/kg, it did not change. Diclofenac at a dose of 10 mg/kg reduced the number of writhes by 63% and delayed the onset of the first one by 89%. The average effective dose (ED_{50}) of LIS-M in this test was 7 mg/kg (Table 3).

The LIS-M compound, when administered four times intramuscularly to rats at doses of 5, 10 and 20 mg/kg, did not exert an ulcerogenic action (0 points). Diclofenac at a dose of 10 mg/kg caused multiple lesions – pinpoint ulcers, erosions, multiple hemorrhages (2.5 ± 0.5 points).

NO is involved in the development of inflammation caused by carrageenan, histamine and serotonin. Carrageenan binds to toll-like receptors and,

Таблица 2. Противовоспалительное действие производного аминогуанидина LIS-M в дозах 5, 10 и 20 мг/кг и диклофенака в дозе 10 мг/кг на модели хронического пролиферативного воспаления

Table 2. Anti-inflammatory effect of the aminoguanidine derivative LIS-M at doses of 5, 10 and 20 mg/kg and diclofenac at a dose of 10 mg/kg on a model of chronic proliferative inflammation

Условия эксперимента Experimental conditions	Масса экссудата, мг Mass of exudate, mg	Масса грануляционной ткани, мг Granulation tissue mass, mg
1% водный раствор поливинилпирролидона (контроль) 1% polyvinylpyrrolidone aqueous solution (control)	83 ± 8	19.1 ± 1.5
LIS-M, 5 мг/кг (mg/kg)	82 ± 4	18.8 ± 1.4
LIS-M, 10 мг/кг (mg/kg)	75 ± 5 ^{1,2}	18.0 ± 1.8
LIS-M, 20 мг/кг (mg/kg)	68 ± 4 ^{1,2}	14.0 ± 1.1 ^{1,2,3}
Диклофенак, 10 мг/кг Diclofenac, 10 mg/kg	60 ± 4 ^{1,2,3}	13.8 ± 1.5 ^{1,2,3}

П р и м е ч а н и е . Значимые отличия показателей: ¹ – по сравнению с показателем контрольной группы ($p < 0.05$), ² – по сравнению с показателем при введении LIS-M в дозе 5 мг/кг ($p < 0.05$), ³ – по сравнению с показателем при введении LIS-M в дозе 10 мг/кг ($p < 0.05$).

N o t e . Significant differences in values: ¹ – compared with the indicator of the control group ($p < 0.05$), ² – with the indicator for LIS-M administration at a dose of 5 mg/kg ($p < 0.05$), ³ – with the indicator for LIS-M administration at a dose of 10 mg/kg ($p < 0.05$).

ство «корчей» на 44, 50 и 81 % соответственно, при введении в дозе 20 мг/кг время до наступления первой «корчи» удлинялось на 98 %, при введении в дозах 5 и 10 мг/кг – не изменялось. Диклофенак в дозе 10 мг/кг уменьшал количество «корчей» на 63 % и отодвигал наступление первой «корчи» на 89 %. Средняя эффективная доза ($ЭД_{50}$) LIS-M в этом тесте составляла 7 мг/кг (табл. 3).

Соединение LIS-M при четырехкратном внутримышечном введении крысам в дозах 5, 10 и 20 мг/кг не оказывало ulcerогенного действия (0 баллов). Диклофенак в дозе 10 мг/кг вызывал множественные повреждения – точечные язвы, эрозии, множественные кровоизлияния (2.5 ± 0.5 балла).

В развитии воспаления, вызванного каррагенином, гистамином и серотонином, участвует NO. Каррагенин связывается с толл-подобными рецепторами и при участии цитозольных киназ и ядерного фактора κB активирует iNOS с усилением синтеза NO [12]. Гистамин как агонист H_1 -рецепторов активирует фосфолипазу C, продукцию диацилглицерола и инозитол-3-фосфата. Вторичные мессенджеры активируют протеинкиназу C_β и ядерный фактор κB , что становится стимулом к индукции iNOS и синтезу NO [13]. Серотонин при участии 5-HT₂-рецепторов повышает активность индукторов iNOS – фосфолипазы A и митоген-активируемых протеинкиназ [14]. Ингибирование iNOS с помощью LIS-M уменьшает синтез NO, что снижает экссудацию в очаге воспаления.

Оксид азота также оказывает влияние на процесс образования гранулемы вокруг инертного инородного тела. Преимущественно антиэкску-

with the participation of cytosolic kinases and nuclear factor- κB , activates iNOS, increasing synthesis of NO [12]. Histamine as an H_1 receptors agonist activates phospholipase C, the production of diacylglycerol and inositol-3-phosphate. Secondary messengers activate protein kinase C_β and nuclear factor- κB , which becomes a stimulus for the iNOS induction and NO synthesis [13]. Serotonin, with the participation of 5-HT₂ receptors, upregulates the iNOS inductors – phospholipase A and mitogen-activated protein kinases [14]. Inhibition of iNOS by LIS-M reduces the synthesis of NO, which decreases exudation in the focus of inflammation.

Nitric oxide also influences the formation of granuloma around an inert foreign body. The predominantly antiexudative effect of the aminoguanidine derivative LIS-M is due to the dose-dependent effect of NO on the processes of granulation tissue proliferation. In low concentrations, NO inhibits mitosis and enhances fibroblast apoptosis [15], in high concentrations, it enhances fibrosis, promoting the production of cytokines that control the synthesis of growth factors and colony-stimulating factors [16, 17].

The analgesic effect of the LIS-M compound is due to iNOS inhibition and suppression of NO production [11, 18]. NO sensitizes neurons conducting pain signals, enhances glutamatergic synaptic transmission and decreases the sensitivity of kappa-opioid receptors to endogenous opioid peptides [18].

Thus, the selective iNOS inhibitor, the aminoguanidine derivative LIS-M, has an antiexudative and antiproliferative effect without typical side effect of NSAIDs – ulcerogenicity.

Таблица 3. Анальгетическая активность производного аминогуанидина LIS-M в дозах 5, 10 и 20 мг/кг и диклофенака в дозе 10 мг/кг на модели гипералгезии, вызванной инъекцией уксусной кислоты
Table 3. Analgesic activity of the aminoguanidine derivative LIS-M at doses of 5, 10 and 20 mg/kg and diclofenac at a dose of 10 mg/kg on a model of acetic acid-induced hyperalgesia

Условия эксперимента Experimental conditions	Количество «корчей» Number of cramps	Время до наступления первой корчи, мин Time before the onset of the first cramp, min
1% водный раствор поливинилпирролидона 1% polyvinylpyrrolidone aqueous solution	16 ± 4	4.4 ± 1.3
LIS-M, 5 мг/кг (mg/kg)	9 ± 2^1	4.4 ± 1.2
LIS-M, 10 мг/кг (mg/kg)	8 ± 3^1	4.5 ± 1.6
LIS-M, 20 мг/кг (mg/kg)	$3 \pm 1^{1,2}$	8.7 ± 1.5^1
Диклофенак, 10 мг/кг Diclofenac, 10 mg/kg	6 ± 2^1	8.3 ± 1.4^1

П р и м е ч а н и е. Значимые отличия показателей: ¹ – по сравнению с показателем контрольной группы ($p < 0.05$), ² – по сравнению с показателем у животных, получавших диклофенак ($p < 0.05$).

N o t e. Significant differences in values: ¹ – compared with the indicator of the control group ($p < 0.05$), ² – with the indicator in animals treated with diclofenac administration ($p < 0.05$).

дательное действие производного аминокислотина LIS-M обусловлено дозозависимым влиянием NO на процессы пролиферации грануляционной ткани. В малой концентрации NO тормозит митозы и усиливает апоптоз фибробластов [15], в высокой концентрации усиливает фиброз, способствуя продукции цитокинов, контролируемых синтезом факторов роста и колониестимулирующих факторов [16, 17].

Анальгетическое влияние соединения LIS-M обусловлено ингибированием iNOS и торможением продукции NO [11, 18]. NO сенсибилизирует нейроны, проводящие болевой сигнал, усиливает глутаматергическую синаптическую передачу и ослабляет чувствительность опиоидных κ -рецепторов к эндогенным опиоидным пептидам [18].

Таким образом, селективный ингибитор iNOS, производное аминокислотина LIS-M, оказывает антиэкссудативное и антипролиферативное действие без типичного побочного эффекта НПВС – язвочероженного влияния.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы:

1. На модели острого экссудативного воспаления, вызванного инъекцией под плантарный апоневроз крыс каррагенина, гистамина и серотонина, производное аминокислотина LIS-M при однократном внутримышечном введении в дозах 5, 10 и 20 мг/кг проявляет выраженное антиэкссудативное действие. Противовоспалительное действие LIS-M в дозе 20 мг/кг сопоставимо с эффектом диклофенака в дозе 10 мг/кг.

2. На модели хронического пролиферативного воспаления соединение LIS-M при внутримышечном введении в дозах 5, 10 и 20 мг/кг проявляет значительное антиэкссудативное и менее выраженное антипролиферативное действие.

3. На модели острой висцеральной боли анальгетическая активность соединения LIS-M

CONCLUSION

The research allows us to draw the following conclusions:

1. In the rat model of acute exudative inflammation caused by subplantar injection of carrageenan, histamine and serotonin, the aminoguanidine derivative LIS-M with a single intramuscular injection at doses of 5, 10 and 20 mg/kg showed a pronounced antiexudative effect. The anti-inflammatory effect of LIS-M at a dose of 20 mg/kg is comparable to the effect of diclofenac at a dose of 10 mg/kg.

2. In the model of chronic proliferative inflammation, the LIS-M compound, when administered intramuscularly at doses of 5, 10 and 20 mg/kg, exhibits a significant antiexudative and less pronounced antiproliferative effect.

3. In the model of acute visceral pain, the analgesic activity of the LIS-M compound when administered intramuscularly at doses of 5 and 10 mg/kg is up there with the diclofenac, and at a dose of 20 mg/kg exceeds the effect of the latter.

4. The LIS-M compound is free from an ulcerogenic effect when administered to rats fourfold intramuscularly at doses of 5, 10 and 20 mg/kg.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

при внутримышечном введении в дозах 5 и 10 мг/кг выражена не слабее по сравнению с диклофенаком, в дозе 20 мг/кг превосходит эффект диклофенака.

4. Соединение LIS-M не оказывает язвочероженного действия при четырехкратном внутримышечном введении крысам в дозах 5, 10 и 20 мг/кг.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lambden S. Bench to bedside review: therapeutic modulation of nitric oxide in sepsis – an update // *Intensive Care Med. Exp.* 2019;7(1):64. doi: 10.1186/s40635-019-0274-x.
2. Кузнецова В.Л., Соловьева А.Г. Оксид азота: свойства, биологическая роль, механизмы действия // *Совр. проблемы науки и образования.* 2015;4:4621.
3. Kopincová J., Puzserová A., Bernátová I. Biochemical aspects of nitric oxide synthase feedback regulation by nitric oxide // *Interdiscip. Toxicol.* 2011;4(2):63–68. doi: 10.2478/v10102-011-0012-z.

REFERENCES

1. Lambden S. Bench to bedside review: therapeutic modulation of nitric oxide in sepsis – an update. *Intensive Care Med. Exp.* 2019;7(1):64. doi: 10.1186/s40635-019-0274-x.
2. Kuznetsova V.L., Soloveva A.G. Nitric oxide: properties, biological role, mechanisms of action. *Modern Problems of Science and Education.* 2015;4:4621. (In Russ.)
3. Kopincová J., Puzserová A., Bernátová I. Biochemical aspects of nitric oxide synthase feedback regulation by nitric oxide. *Interdiscip. Toxicol.* 2011;4(2):63–68. doi: 10.2478/v10102-011-0012-z.

4. Lin C.Y., Wang W.H., Chen S.H. et al. Lipopolysaccharide-induced nitric oxide, prostaglandin E₂, and cytokine production of mouse and human macrophages are suppressed by pheophytin-b // *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(12):2637. doi: 10.3390/ijms18122637.
5. Венгеровский А.И. Фармакология: учебник. М.: ГЭОТАР-медиа, 2020. 848 с.
6. Fantacuzzi M., Maccallini C., Di Matteo M. et al. Screening of NOS activity and selectivity of newly synthesized acetamidines using RP-HPLC // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016;120(3):419–424. doi: 10.1016/j.jpba.2015.11.045.
7. Мотов В.С., Быкова А.В., Быков В.В., Хазанов В.А., Венгеровский А.И. Протективное действие производного аминогуанидина на модели язвенного колита у крыс // *Эксперимент. и клин. фармакология.* 2021;84(5):6–10. doi: 10.30906/0869-2092-2021-84-5-6-10.
8. Bone K., Mills S. Principles and Practice of Phytotherapy. Modern Herbal Medicine. 2nd ed. Elsevier Health Sciences, 2013. 1056 p.
9. Holsapple M.P., Schnur M., Yim G.K.W. Pharmacological modulation of edema mediated by prostaglandin, serotonin and histamine // *Agents and Actions.* 1980;10:368–373.
10. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2013. Ч. 1. 944 с.
11. Su Y.S., Sun W.H., Chen C.C. Molecular mechanism of inflammatory pain // *World J. Anesthesiol.* 2014;3(1):71–81. doi: 10.5313/wja.v3.i1.71.
12. Huang G.J., Pan C.H., Liu F.C. et al. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Antrodia salmonea* in the lipopolysaccharide-stimulated RAW246.7 macrophages and the λ -carrageenan-induced paw edema model // *Food Chem. Toxicol.* 2012;50(5):1485–1493. doi: 10.1016/j.fct.2012.01.041.
13. Tanimoto A., Wang K.Y., Murata Y. et al. Histamine upregulates the expression of inducible nitric oxide synthase in human intimal smooth muscle cells via histamine H₁ receptor and NF- κ B signaling pathway // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007;27(7):1556–1561. doi: 10.1161/ATVBAHA.106.139089.
14. Manivet P., Mouillet-Richard S., Callebort J. et al. PDZ-dependent activation of nitric-oxide synthases by the serotonin 2B receptor // *J. Biol. Chem.* 2000;275(13):9324–9331. doi: 10.1074/jbc.275.13.9324.
15. Napoli C., Paolisso G., Casamassimi A. et al. Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013;62(2):89–95. doi: 10.1016/j.jacc.2013.03.070.
16. Anavi S., Eisenberg-Bord M., Hahn-Obercyger M. et al. The role of iNOS in cholesterol-induced liver fibrosis // *Lab. Invest.* 2015;95(8):914–924. doi: 10.1038/labinvest.2015.67.
17. Vickers S.M., MacMillan-Crow L.A., Green M., Ellis C., Thompson J.A. Association of increased immunostaining for inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine with fibroblast growth factor transformation in pancreatic cancer // *Arch. Surg.* 1999;134(3):245–251. doi: 10.1001/archsurg.134.3.245.
18. Xue M., Han L., Qian W. et al. Nitric oxide stimulates acute pancreatitis pain via activating the NF- κ B signal-
4. Lin C.Y., Wang W.H., Chen S.H. et al. Lipopolysaccharide-induced nitric oxide, prostaglandin E₂, and cytokine production of mouse and human macrophages are suppressed by pheophytin-b. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(12):2637. doi: 10.3390/ijms18122637.
5. Vengerovskii A.I. (2020). *Pharmacology: Textbook*. Moscow: GEOTAR-Media. 848 p. (In Russ.)
6. Fantacuzzi M., Maccallini C., Di Matteo M. et al. Screening of NOS activity and selectivity of newly synthesized acetamidines using RP-HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016;120(3):419–424. doi: 10.1016/j.jpba.2015.11.045.
7. Motov V.S., Bykova A.V., Bykov V.V., Khazanov V.A., Vengerovskii A.I. Protective activity of aminoguanidine derivative on the model of ulcerative colitis in rats. *Experimental and Clinical Pharmacology.* 2021;84(5):6–10. doi: 10.30906/0869-2092-2021-84-5-6-10. (In Russ.)
8. Bone K., Mills S. Principles and Practice of Phytotherapy. *Modern Herbal Medicine*. 2nd ed. Elsevier Health Sciences, 2013. 1056 p.
9. Holsapple M.P., Schnur M., Yim G.K.W. Pharmacological modulation of edema mediated by prostaglandin, serotonin and histamine. *Agents and Actions.* 1980;10:368–373.
10. Mironov A.N. (eds.) (2013). *Guidance for Preclinical Studies of Drugs*. Moscow: Grif and K. 944 p. (In Russ.)
11. Su Y.S., Sun W.H., Chen C.C. Molecular mechanism of inflammatory pain. *World J. Anesthesiol.* 2014;3(1):71–81. doi: 10.5313/wja.v3.i1.71.
12. Huang G.J., Pan C.H., Liu F.C. et al. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Antrodia salmonea* in the lipopolysaccharide-stimulated RAW246.7 macrophages and the λ -carrageenan-induced paw edema model. *Food Chem. Toxicol.* 2012;50(5):1485–1493. doi: 10.1016/j.fct.2012.01.041.
13. Tanimoto A., Wang K.Y., Murata Y. et al. Histamine upregulates the expression of inducible nitric oxide synthase in human intimal smooth muscle cells via histamine H₁ receptor and NF- κ B signaling pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007;27(7):1556–1561. doi: 10.1161/ATVBAHA.106.139089.
14. Manivet P., Mouillet-Richard S., Callebort J. et al. PDZ-dependent activation of nitric-oxide synthases by the serotonin 2B receptor. *J. Biol. Chem.* 2000;275(13):9324–9331. doi: 10.1074/jbc.275.13.9324.
15. Napoli C., Paolisso G., Casamassimi A. et al. Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013;62(2):89–95. doi: 10.1016/j.jacc.2013.03.070.
16. Anavi S., Eisenberg-Bord M., Hahn-Obercyger M. et al. The role of iNOS in cholesterol-induced liver fibrosis. *Lab. Invest.* 2015;95(8):914–924. doi: 10.1038/labinvest.2015.67.
17. Vickers S.M., MacMillan-Crow L.A., Green M., Ellis C., Thompson J.A. Association of increased immunostaining for inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine with fibroblast growth factor transformation in pancreatic cancer. *Arch. Surg.* 1999;134(3):245–251. doi: 10.1001/archsurg.134.3.245.
18. Xue M., Han L., Qian W. et al. Nitric oxide stimulates acute pancreatitis pain via activating the NF- κ B signal-

ling pathway and inhibiting the kappa opioid receptor // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020;2020:9230958. doi: 10.1155/2020/9230958.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мотов Валерий Сергеевич – аспирант кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; научный сотрудник ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар»), Томск, Россия. ORCID: 0000-0002-0197-7521.

Быков Владимир Валерьевич – канд. мед. наук, ассистент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; начальник отдела фармакологических исследований ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар»), Томск, Россия. ORCID: 0000-0002-5145-2184.

Быкова Арина Владимировна – канд. биол. наук, научный сотрудник ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар»), Томск, Россия. ORCID: 0000-0002-8495-8560.

Венгеровский Александр Исаакович – д-р мед. наук, профессор, заслуженный работник высшей школы РФ, заведующий кафедрой фармакологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия. ORCID: 0000-0001-5094-3742.

ing pathway and inhibiting the kappa opioid receptor. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020;2020:9230958. doi: 10.1155/2020/9230958.

ABOUT THE AUTHORS

Valery S. Motov – Post-graduate, Department of Pharmacology, Siberian State Medical University; Researcher, Innovative Pharmacological Research, LLC, Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0002-0197-7521.

Vladimir V. Bykov – Cand. Sci. (Med.), Assistant, Department of Pharmacology, Siberian State Medical University; Head, Department of Pharmacological Research, Innovative Pharmacological Research, LLC, Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0002-5145-2184.

Arina V. Bykova – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Innovative Pharmacological Research, LLC, Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0002-8495-8560.

Aleksander I. Vengerovskii – Dr. Sci. (Med.), Professor, Honored Worker of Higher Education of the Russian Federation, Head, Department of Pharmacology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0001-5094-3742.