Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт фармакологии
имени В.В. Закусова»

На правах рукописи

МАТЮШКИН АЛЕКСАНДР ИВАНОВИЧ

Изучение противовоспалительной и противоболевой активности гимантана в лекарственной форме для наружного применения

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель -
кандидат фармацевтических наук,
Иванова Елена Анатольевна

Москва 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 10
1.1 Некоторые болезни костно-мышечной системы: остеоартроз. Распространённость, этиология и патогенез остеоартроза 10
1.2 Фармакотерапия остеоартроза 15
1.2.1 Симптоматические лекарственные средства быстрого действия 16
1.2.2 Симптоматические лекарственные средства медленного действия 19
1.3 Разрабатываемые подходы к фармакотерапии остеоартроза 24
1.3.1 Медикаментозные средства терапии остеоартроза, находящиеся на стадии разработки 24
1.3.2 Всасывание, проникновение в ткани и побочные эффекты НПВП в лекарственных формах для наружного применения 29
1.4 Обоснование цели, задач и используемых моделей исследования 35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 39
2.1. Животные 39
2.2. Препараты и вещества, используемые в экспериментах 39
2.3. Дизайн эксперимента 41
2.4. Методы исследования 42
2.4.1. Формалиновый тест 42
2.4.2. Модель каррагенанового отека 43
2.4.3. Количественное определение продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, у крыс с каррагенановым отёком лапы 44
2.4.4. Модель отека, вызванного конканавалином А 44
2.4.5. Модель адъювантного артрита 45
2.4.5.1. Оценка влияния препаратов на вызванный полным адъювантом Фрейнда воспалительный процесс у крыс при их ежедневном применении в течение 14 дней, начиная за сутки до индукции воспаления 45
2.4.5.1.1. Регистрация отёчности левой задней конечности 46
2.4.5.1.2. Регистрация массы тела животных 46
2.4.5.1.3. Регистрация массовых коэффициентов тимуса и селезенки 46
2.4.5.2. Оценка влияния препаратов на вызванный полным адъювантом Фрейнда воспалительный процесс у крыс при их ежедневном применении в течение 14 дней, начиная с 14 суток после индукции воспаления 46
2.4.5.2.1. Регистрация отёчности задних конечностей 46
2.4.5.2.2. Регистрация температуры кожи задних конечностей 47

2.4.5.2.3. Регистрация массы тела животных 47
2.4.5.2.4. Регистрация моторного дефицита 47
2.4.5.2.5. Оценка гипералгезии, вызванной введением полного адъюванта Фрейнда 48
2.4.5.2.6. Регистрация гематологических показателей 48
2.4.6. Модель термической гипералгезии при остром экссудативном воспалении 49
2.4.7. Модель послеоперационной боли 49
2.5. Статистическая обработка результатов 51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 52
3.1 Выбор оптимальной по составу гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения 52
3.1.1 Выбор концентрации гимантана в гелевой лекарственной форме для наружного применения на основании результатов оценки противоболевой и противовоспалительной активности гелей-прототипов в формалиновом тесте у крыс 52
3.1.2 Выбор наиболее эффективной 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения среди 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения, различающихся составом вспомогательных веществ 56
3.1.3 Оценка влияния активатора всасывания диметилсульфоксида на выраженность противоболевой и противовоспалительной активности 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения в формалиновом тесте у крыс 61
3.2 Оценка противовоспалительной активности 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на моделях острого и хронического воспаления у грызунов 66
3.2.1 Влияние 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на отёчность лап и уровень продуктов свободно-радикального окисления липидов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, в гомогенате мягких тканей лап крыс с каррагенановым отёком 67
3.2.2 Влияние 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на отёк стопы мышей, вызванный конканавалином А 69
3.2.3 Влияние 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на вызванный полным адъювантом Фрейнда воспалительный процесс у крыс 71
3.2.3.1 Влияние 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на вызванный полным адъювантом Фрейнда воспалительный процесс у крыс при ежедневном применении в течение 14 дней, начиная за сутки до индукции воспаления 71
3.2.3.2 Влияние 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на вызванный полным адъювантом Фрейнда воспалительный процесс у крыс при ежедневном применении в течение 14 дней, начиная с 14 дня после индукции воспаления 76

3.3 Оценка анальгетической активности 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на моделях термической гипералгезии при остром экссудативном воспалении и послеоперационной гипералгезии у крыс 88
3.3.1 Оценка анальгетической активности 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на модели термической гипералгезии при остром экссудативном воспалении у крыс 88
3.3.2 Оценка анальгетической активности 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на модели послеоперационной гипералгезии у крыс 90
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 97
ВЫВОДЫ 108
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 111
ЛИТЕРАТУРА 112

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Распространенность болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани неуклонно растёт: в РФ с 2006 по 2017 годы она увеличилась на 35% [3, 40]. Ведущее место среди болезней костно-мышечной системы занимает остеоартроз (называемый также остеоартритом, ОА), его распространенность за указанный временной период возросла на 24,3% [3, 40]. ОА является одной из основных причин стойкой потери трудоспособности; рост заболеваемости ОА связан с увеличением продолжительности жизни населения и распространённостью обусловленных образом жизни факторов риска, основным из которых является ожирение [336]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) более 40% людей пожилого возраста страдают ОА, и около 80% пациентов с ОА имеют ограничения подвижности разной степени [98].

Фармакотерапия ОА симптоматическая, препаратами первой линии являются ацетаминофен (парацетамол) и нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) [263]. Высокий риск развития серьезных побочных эффектов (желудочно-кишечные осложнения, нарушение агрегации тромбоцитов, функции почек, печени и др.) при системном применении этих препаратов определяет актуальность поиска других подходов к фармакотерапии ОА [23]. Одним из них является использование противовоспалительных и противоболевых средств в лекарственных формах для наружного применения, которое сопровождается снижением риска развития побочных эффектов по сравнению с препаратами системного действия вследствие значительного уменьшения концентрации действующих веществ в крови. Включение в комплексную терапию ОА и других болезней костно-мышечной системы местных противовоспалительных и противоболевых препаратов позволяет снизить дозы и кратность приема лекарственных средств системного действия, что обеспечивает большую безопасность и комплаентность фармакотерапии [63, 129].

Степень разработанности проблемы. НПВП в лекарственных формах для наружного применения впервые были включены в клинические рекомендации по лечению болезней костно-мышечной системы в 2000-е гг: разрешение FDA, США, получено в 2007 г.; рекомендация NICE, Великобритания, вышла в 2008 г. [129]. Накожное нанесение НПВП в лекарственных формах для наружного применения обеспечивает создание эффективных концентраций действующих веществ в тканях-мишенях, за счёт чего развиваются их фармакологические эффекты [170].

Хорошая проницаемость через клеточные мембраны в ткани характерна для соединений, имеющих в своей структуре фрагменты обладающих высокой липофильностью каркасных углеводородов, в частности, адамантана [170]. К производным аминоадамантана относятся соединения с анальгетическим, нейропротекторным и противопаркинсоническим действием [81, 216, 341]. Производное 2-аминоадамантана - гимантан (N-(2-адамантил)-гексаметиленимина

гидрохлорид) – разработанное в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» противопаркинсоническое средство [5, 43]. У гимантана была обнаружена выраженная противоболевая и противовоспалительная активность при отсутствии ульцерогенного побочного эффекта [4]. Фармакодинамические и физико-химические свойства гимантана позволяют рассматривать его перспективным соединением для создания на его основе противовоспалительного и противоболевого средства в лекарственной форме для наружного применения.

Цель исследования – экспериментальная оценка противовоспалительного и противоболевого действия гимантана в лекарственной форме – гель для наружного применения.

Задачи исследования:

1. Изучить обезболивающее и противовоспалительное действие гелей-прототипов (содержат только действующее вещество – гимантан и гелеобразователь – гидроксипропилметилцеллюлозу, ГПМЦ) для создания гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения с целью выбора оптимальной концентрации действующего вещества.
2. Оценить обезболивающее и противовоспалительное действие 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения, различающихся составом вспомогательных веществ, в формалиновом тесте и на модели каррагенанового отёка лапы у крыс и выбрать наиболее эффективную 5% гелевую лекарственную форму гимантана для наружного применения.
3. Изучить антиэкссудативное и антиоксидантное действие выбранной 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения в сравнении с 1% гелем диклофенака, диклофенаком и гимантаном при внутрибрюшинном введении на модели каррагенанового отёка лапы у крыс.
4. Изучить противовоспалительное действие выбранной 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения в сравнении с 1% гелем диклофенака, диклофенаком и гимантаном при внутрибрюшинном введении на модели вызванного конканавалином А отека лапы у мышей.
5. Изучить противовоспалительную активность выбранной 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения в сравнении с 1% гелем диклофенака, диклофенаком и гимантаном при внутрибрюшинном введении на модели адъювантного артрита, вызванного инъекцией полного адъюванта Фрейнда (ПАФ) в заднюю лапу крыс, при ежедневном применении препаратов в течение 14 дней, начиная за сутки до индукции воспаления.
6. Изучить противовоспалительную активность выбранной 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения в сравнении с 1% гелем диклофенака, диклофенаком и гимантаном при внутрибрюшинном введении на модели адъювантного артрита, вызванного

инъекцией ПАФ в заднюю лапу крыс, при ежедневном применении препаратов в течение 14 дней, начиная с 14 дня после индукции воспаления.

7. Изучить анальгетическую активность выбранной 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения в сравнении с 1% гелем диклофенака, диклофенаком и гимантаном при внутрибрюшинном введении на моделях термической гипералгезии при остром экссудативном воспалении и послеоперационной гипералгезии у крыс.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное изучение противовоспалительного и противоболевого действия адамантансодержащего соединения гимантана в гелевой лекарственной форме для наружного применения. Среди изученных гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения отобрана наиболее эффективная 5% гелевая лекарственная форма, содержащая в качестве вспомогательных веществ диметилсульфоксид (ДМСО), ГПМЦ, нипагин, нипазол, воду очищенную.

На моделях воспаления и боли доказано, что спектр действия отобранной лекарственной формы для наружного применения при накожном нанесении в области повреждений тканей шире, чем при внутрибрюшинном введении гимантана в субстанции в дозах 10-20 мг/кг и диклофенака в дозах 5-10 мг/кг, а также диклофенака в виде 1% гелевой лекарственной формы для наружного применения. На модели формалиновой боли установлено, что 5% гель гимантана при однократном применении проявляет анальгетическую активность в острую фазу, обусловленную воздействием формалина на первичные афференты боли, а гимантан и диклофенак при внутрибрюшинном введении в изученных дозах и 1% гель диклофенака таким эффектом не обладают. На модели каррагенанового отёка показано, что 5% гель гимантана снижает повышенный уровень продуктов свободно-радикального окисления (СРО) липидов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), в мягких тканях лап крыс значимо эффективнее, чем гимантан при внутрибрюшинном введении и диклофенак при внутрибрюшинном введении и в виде 1% гелевой лекарственной формы для наружного применения.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в ходе исследования данные о противовоспалительной и противоболевой эффективности гимантана в гелевой лекарственной форме для наружного применения свидетельствуют о перспективе создания препаратов в лекарственных формах для наружного применения на основе соединений, являющихся производными адамантана и обладающих противовоспалительным и противоболевым действием.

Выявленная противовоспалительная и противоболевая активность гимантана в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения обосновывает целесообразность дальнейшего доклинического изучения этой лекарственной формы гимантана в качестве

потенциального лекарственного средства для терапии воспалительных заболеваний опорно-двигательного аппарата. На гелевую лекарственную форму гимантана для наружного применения получен патент РФ №2663452.

Методология и методы исследования. Исследование выполнено в три этапа. На первом из них осуществлялся выбор наиболее эффективной гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения в формалиновом тесте и на модели каррагенанового отёка у крыс. На следующих двух этапах изучалась противовоспалительная и противоболевая активность отобранной гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения в сравнении с эталонным НПВП диклофенаком в гелевой лекарственной форме для наружного применения, гимантаном и диклофенаком при внутрибрюшинном введении.

В исследовании использовались методы оценки противовоспалительной и противоболевой активности веществ в соответствии с рекомендациями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Часть.1. М.: Гриф и К, 2012) и применяемые за рубежом методы [92].

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Лекарственная форма для наружного применения – 5% гель гимантана, содержащая в качестве вспомогательных веществ ДМСО, ГПМЦ, нипагин, нипазол, воду очищенную, обладает наибольшей анальгетической и противовоспалительной активностью в формалиновом тесте и на модели каррагенанового отека у крыс по сравнению с гелевыми лекарственными формами с другим количеством действующего вещества и составом вспомогательных веществ.

2. На модели каррагенанового отёка у крыс гимантан в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения при однократном применении проявляет антиэкссудативный эффект и снижает повышенный уровень продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, в гомогенатах мягких тканей лап животных с каррагенановым отёком.

3. Гимантан в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения при курсовом десятидневном наружном применении проявляет противовоспалительную активность на модели отёка стопы у мышей, вызванного конканавалином А.

4. На модели адъювантного артрита у крыс гимантан в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения уменьшает отёчность задних конечностей при 14-ти дневном курсовом применении с началом как за сутки до введения адъюванта, так и на 14 день после индукции воспаления. У крыс с вторичной иммунологической реакцией гимантан в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения также снижает выраженность воспалительной гипералгезии, уровень сегментоядерных нейтрофилов и нормализует координацию движений. При обеих схемах применения 5% геля гимантана побочных эффектов не зафиксировано.

5. Гимантан в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения при однократном применении оказывает анальгетическое действие в тесте термической гипералгезии у крыс с каррагенановым отёком лапы, при ежедневном курсовом (дважды в сутки) применении на модели послеоперационной гипералгезии у крыс снижает механическую гипералгезию.

Степень достоверности. Работа выполнена с использованием соответствующих поставленным задачам адекватных методов исследования; при проведении экспериментов был получен достаточный объём данных; статистическая обработка полученных данных проводилась согласно общепринятым методам математической статистики.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были представлены на программе «УМНИК» в рамках молодежного научно-инновационного конкурса «Московский молодежный старт» (Москва, 2017); V Съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (Ярославль, 2018); Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина, «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2018); программе «УМНИК – РАН» (Москва, 2018); Международной научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине и биологии» (Сочи, 2019); 55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019) (Хельсинки, Финляндия, 2019).

Личный вклад автора. Автором самостоятельно выполнен поиск и анализ источников литературы, проведены эксперименты, обработка и интерпретация данных, при активном участии автора сформулированы положения, выносимые на защиту, и выводы, подготовлены публикации по результатам диссертационного исследования.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, включая 6 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из них 4 статьи в журналах, входящих в международные базы данных Scopus и Web of Science; 1 патент РФ; 1 статья и 5 тезисов в материалах научных конференций и съездов.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 147 страницах компьютерного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, главы обсуждения результатов исследования и выводов. Содержит 33 таблицы и 11 рисунков. Список литературы включает 51 отечественный и 306 зарубежных источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Некоторые болезни костно-мышечной системы: остеоартроз. Распространённость, этиология и патогенез остеоартроза

Распространённость и этиология остеоартроза

Распространённость болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани неуклонно растёт: в РФ с 2006 по 2017 годы она увеличилась на 35% [3, 40]; ведущее место среди болезней костно-мышечной системы занимает остеоартроз (называемый также остеоартритом, ОА). ОА – это дегенеративное заболевание суставов, характеризующееся разрушением хряща, образованием костных отростков на краю сустава (остеофиты), склерозом субхондральной кости, изменениями в капсуле сустава и воспалением синовиальной оболочки [306]. Это медленно прогрессирующее заболевание, которое сопровождается хронической болью и ограничением подвижности человека, что приводит к замене сустава [266]. ОА обычно манифестирует в возрасте старше 50 лет [234] и чаще всего поражает суставы коленей, рук, бёдер и позвоночника, являясь основной причиной нарушения подвижности у пожилых людей [345]. Во всем мире распространенность ОА составляет 10% среди мужчин и 20% среди женщин [121]. По данным ВОЗ, более 40% лиц пожилого возраста страдают ОА, и около 80% пациентов с ОА имеют ограничения подвижности разной степени [98].

По происхождению ОА классифицируют на первичный (идиопатический) и вторичный. Этиология первичного ОА неизвестна [227, 353]; этиология вторичного ОА обусловлена дегенеративными явлениями, возникающими в результате острой или хронической травмы суставов, при ожирении, мышечной дисфункции, воспалительных артропатиях, отложении кальция в суставах, подагре, а также сосудистых заболеваниях и диабете [335].

К факторам риска возникновения и прогрессирования ОА относятся ожирение, метаболические заболевания, возраст, пол, этническая принадлежность, генетические факторы, питание, плотность костной ткани и функциональное состояние мышц [234]. При наличии врождённых и изменяемых [215] факторов риска, связанных с развитием ОА, может увеличиваться восприимчивость суставов к травмам, перегрузкам, прямым повреждениям тканей или может быть нарушен процесс восстановления поврежденной ткани суставов. Схематически факторы риска возникновения ОА и их влияние на прогрессирование заболевания обобщены на рисунке 1. При этом для разных суставов они могут различаться [83]. Например, частота встречаемости ОА тазобедренного сустава имеет прямую корреляцию с весом, генетическими факторами, полом, перенесёнными травмами, профессиональными факторами и возрастом, в то

время как частота встречаемости ОА коленного сустава коррелирует с весом, образом жизни и физической активностью [126].

Ожирение является одним из самых значительных факторов риска развития ОА [160]. Данные Фремингемского исследования, опубликованные в 1997 г, свидетельствуют о наличии прямой корреляции между индексом массы тела (ИМТ) и риском развития ОА коленного сустава [146]. В проведённом в Финляндии исследовании установлено, что риск развития ОА коленного сустава у людей с ИМТ, равным или превышающим 30, в 7 раз выше по сравнению с пациентами, чей ИМТ ниже 25 [327].

У пациентов с ОА часто наблюдается метаболический синдром, что предполагает вероятность общего патогенеза, включающего метаболические нарушения и системное воспаление. Так, в проведённом в США исследовании показано, что среди пациентов с ОА среднего возраста 43,8 года риск метаболического синдрома повышен в 5,26 раза [183, 289].

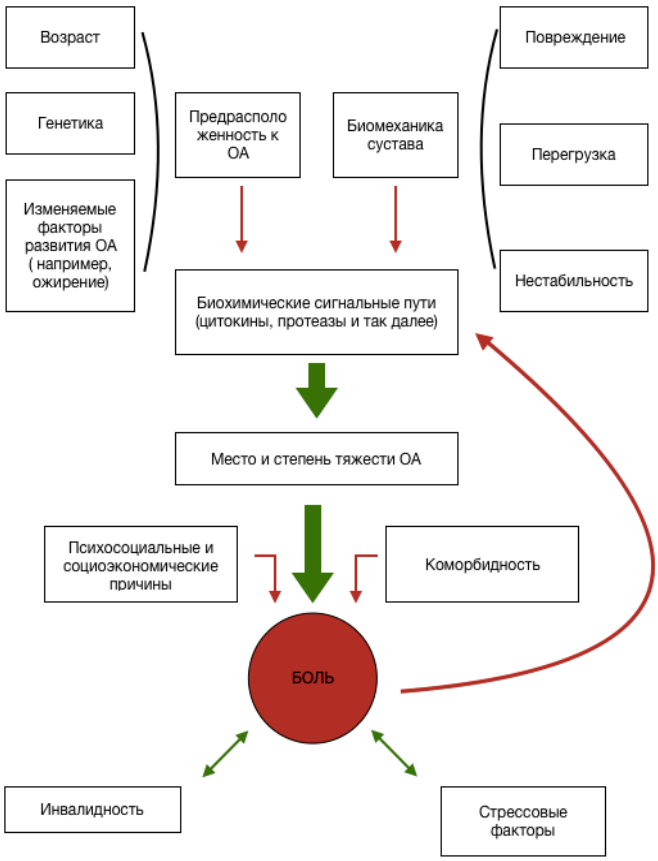

Рисунок 1. *Факторы риска возникновения и прогрессирования остеоартроза и обусловленной его наличием суставной боли; схема из* [135] *с авторскими изменениями. ОА – остеоартроз.*

Распространенность ОА значительно увеличивается с возрастом [69, 125]. Взаимосвязь между возрастом и риском возникновения ОА, вероятно, является многофакторной. К этим факторам относятся повреждение и истончение хряща, ослабление мышц и снижение проприоцепции. Кроме того, основные клеточные процессы, которые поддерживают гомеостаз тканей, с возрастом замедляются, что приводит к неадекватной реакции на нагрузку или травму сустава и, как следствие, к разрушению ткани сустава [234].

Частота возникновения ОА коленного, тазобедренного и кистевого суставов у женщин выше, чем у мужчин, и у женщин она резко возрастает во время менопаузы [318]. Женщины более подвержены ОА коленных суставов и суставов кистей, в то время как у мужчин чаще развивается ОА шейного отдела позвоночника [64]. На основании этих данных была предложена гипотеза о влиянии гормональных факторов на развитие ОА, однако она не находит однозначного подтверждения в результатах клинических и эпидемиологических исследований [111, 213, 317].

Распространенность ОА варьирует среди этнических групп. Так, среди китайцев ОА кистевого сустава встречается гораздо реже (44,5% у мужчин и 47% у женщин, n = 2509, Китай) по сравнению с представителями европеоидной расы (75,2% у мужчин и 85% у женщин, n = 1628, США) [355]. При этом по данным Пекинского (n = 1781) и Фрамингемского (n = 1420) исследований у китаянок чаще встречается ОА коленного сустава по сравнению с европеоидными женщинами того же возраста – 42,8% против 34,4% [354]. Распространенность ОА тазобедренного сустава у негроидных и европеоидных американок не различается (23% и 22%, соответственно), у негроидных мужчин она составляет 21% против 17% у европеоидных граждан США [265].

Патогенез остеоартроза

Несмотря на большое количество проведённых исследований, патогенез ОА в значительной степени остаётся неясным [345]. Предполагается, что ОА начинается с протеолиза хрящевой матрицы. Изменения в матриксе хряща приводят к его фибрилляции и эрозии, что влечёт за собой выброс протеогликанов и фрагментов коллагена в синовиальную жидкость. Этот процесс запускает воспалительный ответ в синовиальной оболочке, что вызывает дальнейшую деградацию хряща [321].

В синовиальном воспалении задействованы активированные синовиальные Т-клетки, В-клетки и инфильтрующие синовиальную оболочку макрофаги (Рисунок 2). Продукты разрушения хряща, которые выделяются в синовиальную жидкость, фагоцитируются синовиальными клетками, усиливая синовиальное воспаление. В свою очередь, активированные синовиальные клетки в воспаленной синовиальной оболочке вырабатывают провоспалительные медиаторы [89], что приводит к избыточному образованию разрушающих хрящ

протеолитических ферментов и, следовательно, обеспечивает петлю положительной обратной связи в развитии патологического процесса. Противодействуя воспалительному процессу, синовиальная оболочка продуцирует противовоспалительные медиаторы и костный морфогенетический белок (BMP), который способствует образованию новых костных отростков – остеофитов [307].

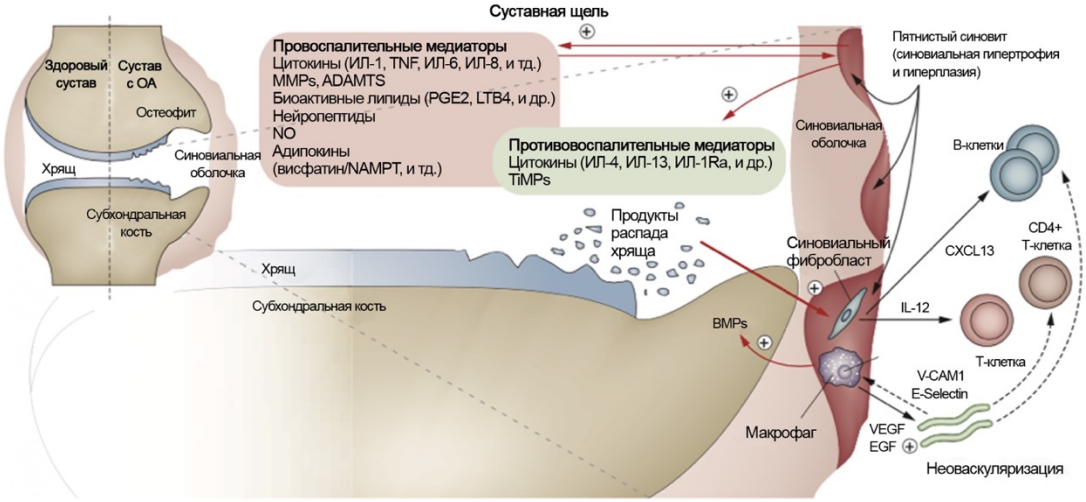

Рисунок 2. *Синовиальное воспаление* [307]. *Примечания: ADAMTS – дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина; BMP – костный морфогенетический белок; CCL2 – CC-хемокиновый лиганд 2; CXCL13, CXC – хемокиновый лиганд 13; EGF – эндотелиальный фактор роста; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; ИЛ – интерлейкин; ИЛ-1Ra – антагонист рецептора ИЛ-1; LIF – фактор, ингибирующий лейкоз; LTB4 – лейкотриен B4; MMP – матриксная металлопротеиназа; NAMPT – никотинамидфосфорибозилтрансфераза (также называемая висфатином); NO – оксид азота; NGF – фактор роста нервов; OA – остеоартроз; PGE2 – простагландин E2; TiMP – тканевой ингибитор металлопротеиназы; TNF – фактор некроза опухоли; vCAM-1 – молекула адгезии сосудистых клеток 1; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.*

По мере прогрессирования субхондрального склероза хрящ становится всё менее способным распределять большие нагрузки и уменьшать трение в суставной щели, что в итоге приводит к прямому контакту костей друг с другом [70] и образованию остеофитов [70]. Истощение хряща, субхондральный склероз, формирование остеофитов, ремоделирование костной ткани в суставе имеют решающее значение для рентгенологической диагностики ОА. Согласно классификации Келлгрена и Лоуренса [204], рентгенологические изменения при ОА подразделяют на 4 стадии:

- 0 стадия: отсутствие рентгенологических признаков;
- I стадия (сомнительный ОА) – сомнительные рентгенологические признаки;
- II стадия (мягкий ОА) – единичные остеофиты, небольшое сужение суставной щели;
- III стадия (умеренный ОА) – умеренное сужение суставной щели, множественные остеофиты, возможная деформация костей;
- IV стадия (тяжелый ОА) – грубые остеофиты, суставная щель почти не прослеживается, тяжелый остеосклероз, деформация костей.

При распространении патологического процесса с хрящевой ткани, в которой иннервация отсутствует, на иннервируемые субхондральную кость, надкостницу, синовиальную оболочку, суставную капсулу, связки и околосуставные мышцы (Рисунок 3), к клиническим симптомам пациентов с ОА присоединяется боль [209], включающая как боль в суставах в покое, так и боль при движении.

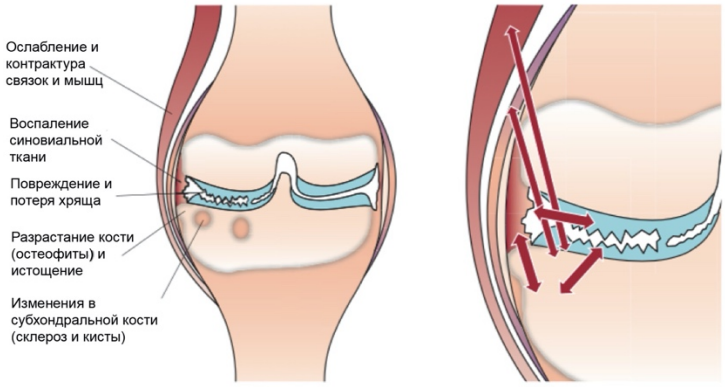

Рисунок 3. *Ткани, задействованные в патогенезе остеоартроза* [83]. *Справа показано двунаправленное влияние патологических изменений в хрящевой, костной ткани, синовиальной оболочке, связках и мышцах.*

Исследования ОА коленного сустава выявили корреляцию между болью, синовитом и патологическими изменениями субхондральной кости [120, 145, 252]. В норме ткани суставов практически нечувствительны к действию болевых раздражителей, и поэтому периферическая болевая сенсибилизация, опосредованная влиянием факторов роста нервов или цитокинов, является признаком патологии суставов [73, 120, 143, 208]. В дополнение к периферической болевой сенсибилизации, при ОА может происходить сенсибилизация на уровне спинного мозга или коры головного мозга [257]. Наконец, переживание боли будет также определяться психологическими, социальными и другими факторами [135] (Рисунок 4).

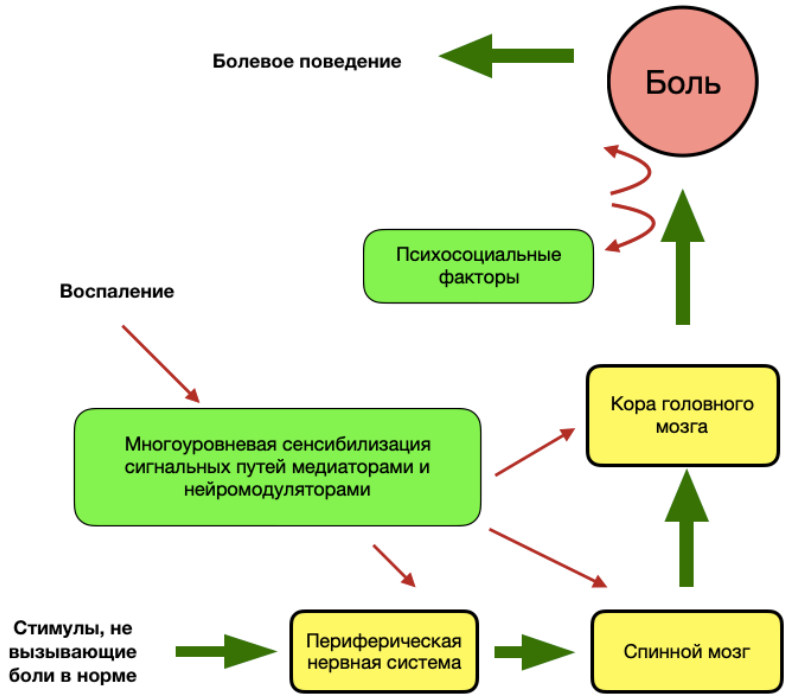

Рисунок 4. *Патогенез боли при остеоартрозе* [135].

Таким образом, боль при ОА может быть обусловлена локальной и центральной сенсибилизацией, в результате чего воздействие раздражителей, в норме боли не вызывающих, становится болезненным. Кроме того, повреждению суставов может способствовать нейрогенное воспаление [208].

1.2 Фармакотерапия остеоартроза

Целями терапии ОА являются уменьшение боли, улучшение функционального состояния суставов, предотвращение развития их деформации, дальнейшего разрушения суставного хряща, предупреждение и ликвидация инвалидизации больных и улучшение их качества жизни [49, 350]. Специфика терапии ОА обусловлена тяжестью симптомов и продолжительностью заболевания [321].

В соответствии с рекомендациями Международного общества исследований ОА (OARSI, Osteoarthritis Research Society International) [350], Американской академии хирургов-ортопедов (AAOS, American Academy of Orthopedic Surgeons) [195] и действующими федеральными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению ОА Общероссийской общественной организации «Ассоциация ревматологов России» [49] терапия ОА должна быть комплексной и включать нефармакологические методы, медикаментозное и хирургическое лечение [195, 313, 350]. К нефармакологическим методам терапии относятся физические упражнения, контроль

массы тела, физиотерапия, использование ортопедических приспособлений. Медикаментозная терапия ОА включает симптоматические лекарственные средства быстрого и медленного действия. Хирургическое вмешательство рассматривается для пациентов с тяжелым ОА, не реагирующих на консервативную терапию. Эффективность методов артроскопических ирригации и санации кратковременна, и они не приносят пользы в долгосрочной перспективе [130]. Полная замена суставов является клинически и экономически эффективным вмешательством для пациентов с прогрессирующим ОА, однако имеет ряд функциональных ограничений и характеризуется высокой частотой осложнений [159].

1.2.1 Симптоматические лекарственные средства быстрого действия

Ацетаминофен (парацетамол)

Ацетаминофен (парацетамол) является безрецептурным анальгетическим средством, рекомендованным для лечения пациентов с ОА без признаков воспаления при слабых или умеренных болях в суставах [49]. Ацетаминофен ингибирует циклооксигеназу (ЦОГ)-3, изоформу ЦОГ, локализованную преимущественно в коре головного мозга, уменьшая боль и лихорадку [104]. Кроме того, препарат оказывает слабое ингибирующее влияние на ЦОГ-1 и ЦОГ-2 [158]. Результаты 5 рандомизированных контролируемых исследований (РКИ), сравнивающих эффективность ацетаминофена с плацебо у пациентов с ОА, показали, что ацетаминофен превосходит плацебо по выраженности анальгетического действия ($p<0,05$), имея сходный профиль безопасности [328].

Согласно рекомендациям Американского колледжа ревматологии (American College of Rheumatology, ACR) и OARSI, максимальная терапевтическая доза ацетаминофена при начальном лечении ОА коленного или тазобедренного сустава составляет 4000 мг в день [180, 195, 349, 350]. Прием ацетаминофена сверх рекомендуемой дозы может привести к нарушению функции печени и почек. Таким образом, хотя ацетаминофен считается относительно безопасным анальгетическим средством, следует избегать его длительного применения, чтобы снизить риск возникновения побочных эффектов [352].

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП)

НПВП часто назначают для купирования болей пациентам с ОА, которые не отвечают на терапию ацетаминофеном [328]. Препараты этой фармакотерапевтической группы оказывают противовоспалительное, обезболивающее и жаропонижающее действие за счёт ингибирования ЦОГ-1 и ЦОГ-2 [248]. Для лечения ОА применяют как селективные, так и неселективные ингибиторы ЦОГ. Среди неселективных ингибиторов ЦОГ в клинической практике наиболее

широко используются диклофенак, ибупрофен и кетопрофен, среди селективных ингибиторов ЦОГ-2 – целекоксиб, рофекоксиб и эторикоксиб [319].

По результатам метаанализа 8 РКИ сообщается, что у пациентов с ОА различной локализации, принимавших НПВП перорально, болевые симптомы менее выражены, чем в группе пациентов, которым назначали ацетаминофен [79, 328]. Тем не менее, высокий риск НПВП-ассоциированных побочных эффектов значительно ограничивает их широкое и долгосрочное использование [276]. Частота возникновения побочных эффектов на фоне приёма НПВП достигает практически 30% [286], из них желудочно-кишечные осложнения являются наиболее распространенными нежелательными явлениями [154, 224]. Также применением НПВП могут быть обусловлены неблагоприятные сердечно-сосудистые события, гематологические осложнения и нарушения функции печени и почек [23, 76].

Для уменьшения боли при ОА коленных суставов и суставов кистей, не купирующейся ацетаминофеном, или при нежелании пациентов с ОА принимать НПВП перорально рекомендовано назначение НПВП в лекарственных формах для наружного применения [49]. После их применения действующие вещества в терапевтических концентрациях могут быть обнаружены в синовиальной жидкости, мышцах и фасциях, оказывая фармакологическое действие как на внутрисуставные, так и на внесуставные мишени терапии ОА [136, 231, 296]. По литературным данным, при наружном нанесении местных лекарственных форм НПВП их биодоступность и максимальная концентрация в плазме крови не превышает соответственно 5% и 15% от значений фармакокинетических параметров, которые достигаются после перорального приема препаратов [178].

Результаты ряда клинических исследований эффективности курсовой терапии ОА (главным образом, ОА коленного сустава) НПВП в форме гелей, кремов и мазей длительностью до четырёх недель показали их преимущества по сравнению с плацебо. Однако проведены только единичные сравнительные клинические исследования действия НПВП при наружном и пероральном применении. Так, данные трёхмесячного клинического исследования терапии ОА диклофенаком в лекарственной форме для наружного применения с диметилсульфоксидом (ДМСО) в своём составе свидетельствуют о сравнимой эффективности этой лекарственной формы с эффективностью диклофенака при пероральном приёме [264]. Результаты двойного слепого РКИ сравнительной эффективности ежедневного перорального приёма ибупрофена в дозе 1200 мг (таблетки по 400 мг 3 раза в день) и нанесения 3 г 0,5% геля пироксикама (1 г геля наносили 3 раза в день) на протяжении четырёх недель при ОА коленного сустава свидетельствуют о сопоставимой эффективности препаратов [134].

Данные клинических исследований продемонстрировали снижение частоты возникновения побочных эффектов при назначении НПВП в лекарственных формах для

наружного применения по сравнению с назначением НПВП перорально; наиболее частыми нежелательными явлениями на фоне НПВП в лекарственных формах для наружного применения являются кожные реакции в месте нанесения [263]. Вследствие этого их часто назначают при ОА, и страдающие ОА пациенты используют местное лечение НПВП в дополнение к ежедневному пероральному приёму препаратов [263].

Опиоиды

Для терапии рефрактерной боли у пациентов с ОА, когда препараты первой линии (ацетаминофен или НПВП) неэффективны или противопоказаны, рекомендовано назначение трамадола [49, 350] – синтетического опиоида со смешанным механизмом действия: препарат является агонистом опиатных рецепторов и ингибирует обратный нейрональный захват норадреналина и серотонина [82].

Метаанализ эффективности и безопасности слабых (трамадол, кодеин и пропоксифен) и сильных (оксикодон, окситрекс, оксиморфон, фентанил и морфина сульфат) опиоидов при ОА показал, что эти анальгетические препараты значительно уменьшают интенсивность боли по сравнению с плацебо, незначительно влияя на физическую активность пациентов [71]. Однако побочные эффекты опиоидов, такие как тошнота, рвота, констипация, сонливость, головокружение, усталость, головная боль, высокий риск развития лекарственной зависимости и смерти от передозировки ограничивает их применение [82, 152, 276, 337]. Результаты упомянутого выше метаанализа 18 РКИ [71] свидетельствуют о том, что 25% (818/3244) пациентов, получавших анальгетическую терапию опиоидами, отказались от их приёма из-за побочных явлений, что значительно превышает показатель группы плацебо – 7% (116/1612).

Внутрисуставные глюкокортикостероиды (ГКС)

Внутрисуставные (в/с) инъекции ГКС рекомендованы пациентам с ОА, страдающим болью умеренной или сильной выраженности и не реагирующим на лечение первой линии [350]. FDA одобрены следующие инъекционные ГКС: метилпреднизолона ацетат, триамцинолона ацетат, бетаметазона ацетат и бетаметазона натрия фосфат, триамцинолона гексацетонид и дексаметазон [72]. Данные Кокрановского систематического обзора 27 клинических исследований с участием 1767 пациентов свидетельствуют о том, что в/с инъекции ГКС при ОА коленного сустава уменьшают выраженность боли и улучшают функцию сустава по сравнению с в/с инъекциями плацебо [200]. Быстро развивающийся выраженный противовоспалительный и иммуносупрессивный эффект при в/с введении ГКС обусловлен влиянием препаратов на регулирующие транскрипцию глюкокортикоидные ядерные рецепторы, вследствие чего снижается экспрессия провоспалительных белков и концентрация провоспалительных

цитокинов [72, 96, 164]. Побочные эффекты при в/с инъекциях ГКС, как правило, включают боль и гиперемию в области инъекции, септический артрит и редкие случаи синдрома Тахона [187, 292].

Ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина (ИОЗСН)

ИОЗСН в основном используются для терапии депрессии и других психических расстройств [205] и условно рекомендованы пациентам с ОА, неадекватно отвечающим на анальгезию ацетаминофеном и НПВП. Центральная сенсибилизация обусловлена в том числе нарушением серотонинергической и норадренергической нейротрансмиссии, и повышение активности этих медиаторных систем на фоне ИОЗСН приводит к активации нисходящей антиноцицептивной системы [340]. ИОЗСН дулоксетин одобрен FDA для купирования хронической скелетно-мышечной боли, включая боль при ОА. Результаты двух двойных слепых РКИ продемонстрировали эффективность дулоксетина в отношении снижения выраженности боли и улучшения физической функции при ОА коленного сустава [105, 106]. Наиболее распространенными побочными эффектами препарата являются расстройства желудочно-кишечного тракта, сексуальная дисфункция, усталость и сонливость [205].

1.2.2 Симптоматические лекарственные средства медленного действия

Глюкозамина и хондроитина сульфат

Глюкозамин является основным компонентом гликозаминогликанов в хрящевой матрице. Установлено, что глюкозамин индуцирует продукцию хондроцитами человека протеогликанов, ингибирует катаболические ферменты и снижает образование ИЛ-1β в синовиальной жидкости [225, 229]. Хондроитина сульфат, основной компонент внеклеточного матрикса в суставном хряще [168], играет важную роль в регуляции осмотического давления и гомеостаза коллагеновой сети [75]. Глюкозамина сульфат и хондроитина сульфат широко используются в терапии ОА последние 20 лет [352]. Результаты метаанализа шести РКИ, два из которых оценивали эффективность лечения ОА коленного сустава глюкозамина сульфатом и четыре – хондроитина сульфатом, продемонстрировали замедление радиологического прогрессирования заболевания на фоне постоянного приёма хондропротекторов более двух или трёх лет, эффект ежедневного назначения этих препаратов в течение первого года терапии был не значимым [229].

Диацереин

Диацереин включён в клинические рекомендации по диагностике и лечению ОА Общероссийской общественной организацией «Ассоциация ревматологов России» [42], Европейской лигой против ревматизма (EULAR) [199] и OARSI [251, 351]. Диацереин,

производное антрахинона, – пролекарство, метаболизирующееся в желудочно-кишечном тракте диацетилированием до активного метаболита реина [281]. Диацереин/реин является ингибитором ИЛ-1β, снижает чувствительность рецепторов к ИЛ-1 на поверхности хондроцитов при ОА (Рисунок 5) [241]. На фоне препарата наблюдается уменьшение содержания ИЛ-1β в синовиальной жидкости пациентов с ОА коленного сустава [281]. Кроме того, диацереин ингибирует индуцированную ИЛ-1β активацию стимулирующего экспрессию провоспалительных цитокинов фактора транскрипции NF-κB [78, 258].

Помимо противовоспалительных свойств диацереин обладает антикатаболическим [243, 258] и анаболическим [144, 243, 301, 305] действием. В экспериментах на животных установлено, что диацереин значительно снижает выраженность морфологических изменений у беспородных собак с моделью ОА, индуцированного рассечением передней крестообразной связки левого колена [315]; улучшает состояние хряща у незрелых собак породы бигль с экспериментальной моделью хондролиза тазобедренного сустава [211]; замедляет прогрессирование ОА у крыс после менискэктомии [293].

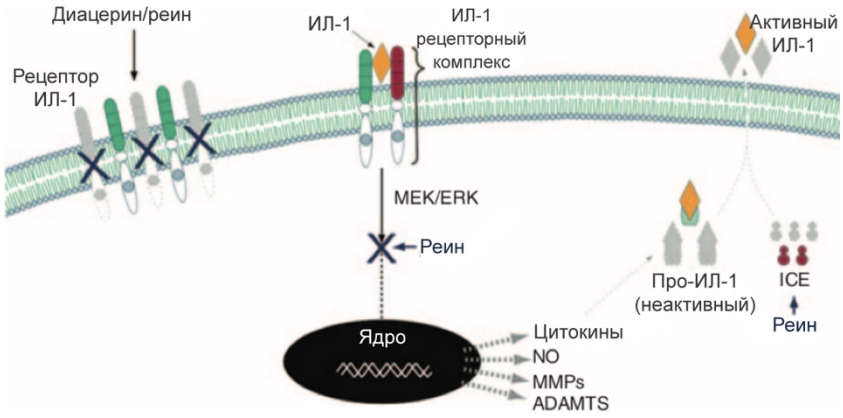

Рисунок 5. *Влияние диацереина/реина на систему ИЛ-1* [242]. *Примечания: MEK/ERK – внутриклеточный каскад, где MEK – митоген-активируемая протеинкиназа (MAP киназа), ERK – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; NO – оксид азота; MMP – металлопротеазы; ADAMTS – домен дезинтегрина и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина, ICE – ИЛ-1-конвертирующий фермент; серый цвет свидетельствует об уменьшении продукции компонентов системы ИЛ-1*

По данным OARSI 2006 г., анальгетический эффект диацереина у пациентов с ОА коленного и тазобедренного суставов сопоставим с анальгетическим эффектом НПВП [351]. Опубликованный в 2016 г. обзор результатов клинических исследований эффективности терапии диацереином ОА коленного и тазобедренного суставов и их метаанализов свидетельствует о том, что хотя терапевтическое действие НПВП по сравнению с диацереином развивается быстрее,

эффективность месячного курса лечения и НПВП, и диацереином в отношении купирования боли и нормализации функции суставов сравнима. При этом эффект терапии диацереином, в отличие от НПВП, сохраняется несколько месяцев после окончания лечения [281]. Результаты отечественного исследования показали, что диацереин оказывает противовоспалительное и анальгетическое действие у пациентов с ОА коленного сустава и сопутствующим синовитом [46]. Однако при доказанной эффективности препарата при ОА коленного и тазобедренного суставов имеется ограниченное количество данных о его терапевтическом действии при ОА других суставов [281]. Нежелательными эффектами диацереина являются желудочно-кишечные расстройства (в основном мягкий стул и диарея), лёгкие кожные реакции и гепатобилиарные расстройства [281].

Пиаскледин

Пиаскледин – препарат неомыляемых соединений масел авокадо и соевых бобов (НСАС). Его биологическую активность обуславливают содержащиеся в нём быстро проникающие в клетки стероиды: фитостеролы, β-ситостерин, кампестерол и стигмастерол [232]. Препарат обладает хондропротекторными, анаболическими и антикатаболическими свойствами, ингибируя разрушение хряща и способствуя его восстановлению, стимулируя синтез коллагена и аггрекана, снижая концентрацию ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, фактора некроза опухоли (ФНО) и простагландина Е2 (ПГЕ2) [174, 175, 221, 249]. Кроме того, НСАС ингибируют активность коллагеназы и стромелизина 1 [207, 250]; индуцированную ИЛ-1 экспрессию ERK-киназы, но не p38-киназы или JNK-киназы в культуре хондроцитов [151] и повышают уровень тканевых ингибиторов металлопротеиназ в культуре фибробластов человека [217]; препарат увеличивает концентрацию трансформирующего фактора роста (TGF)-β1 и TGF-β2 в жидкости коленного сустава собак без экспериментальной патологии. На модели остеоинтеграции титанового имплантата в большеберцовой кости у крыс НСАС повышают уровень маркеров роста костей – BMP-2 и TGF-β1 [273].

Эффективность и безопасность НСАС оценена в двойных слепых многоцентровых РКИ у пациентов с ОА коленного и тазобедренного суставов. В двух трёхмесячных исследованиях установлено, что согласно данным, полученным с помощью опросника WOMAC (Western Ontario and McMAster Universities Osteorthritis Index), терапия НСАС 300 мг/день улучшает функциональную активность, уменьшает ригидность и выраженность боли, что способствует снижению дозы применяемых пациентами с ОА анальгетических средств [68, 87]. В шестимесячном РКИ у пациентов с феморотибиальным гонартрозом эффективность НСАС в дозе 300 мг 1 раз в день сопоставима с эффективностью хондроитина сульфата при его назначении в дозе 400 мг 3 раза в день [282].

Препараты гиалуроновой кислоты

Гиалуроновая кислота (ГК) является линейным гликозаминогликановым компонентом внеклеточного матрикса хряща, синовиальной жидкости и кожи. ГК смазывает поверхности синовиальных суставов, способствуя их амортизации и оказывая непосредственное влияние на функцию синовиальных клеток. Установлено, что ГК замедляет индуцированный анти-Fas-антителами апоптоз хондроцитов, выделенных из коленного хряща пациентов с ОА, связываясь с рецепторами CD44 и ICAM-1, таким образом регулируя процессы деградации хрящевого матрикса [233]. При ОА концентрация ГК в синовиальной жидкости суставов снижается [74]. Поскольку эластичность и вязкость синовиальной жидкости прямо пропорциональны содержанию и целостности цепей ГК, внутрисуставная инъекция ГК является рациональным подходом к лечению ОА [62].

Исследования эффективности в/с инъекций ГК в коленный сустав пациентов с ОА начаты с 1970-х годов [74]; для достижения терапевтического эффекта требуется курсовая терапия в/с инъекций препаратов ГК [285]. Многочисленные клинические исследования показали, что в/с инъекции препаратов ГК хорошо переносятся и обеспечивают статистически значимое уменьшение боли при ОА коленного и плечевого суставов [58, 65, 85, 132, 157, 218, 259, 270, 287, 285, 312].

На сегодняшний день препараты ГК получают биотехнологически: ГК синтезируется стрептококками; полученная таким образом ГК высокой степени очистки, риск её загрязнения веществами животного происхождения минимален, и, соответственно, её аллергенность низкая. Кроме того, ГК стабилизируют, подвергая тщательному контролируемому поперечному сшиванию, в результате чего образуется вязкий гель с повышенной плотностью ГК без изменения полианионного характера полисахаридной цепи [55]. Стабилизированную ГК, полученную биотехнологическим путем (non-animal stabilized hyaluronic acid, NASHA), используют для терапии ОА коленного и тазобедренного сустава с 2001 года [254]. Применение этой формы ГК, за счет увеличенного периода полувыведения из сустава, позволяет уменьшить количество в/с инъекций для достижения долгосрочного эффекта при лечении ОА [62].

Стронция ранелат

Биологическая роль стронция – усиление пролиферации преостеобластов, дифференцировки остеобластов, участие в синтезе коллагена I типа и минерализации костного матрикса, а также ингибирование дифференцировки и активации остеокластов [90, 94]. Соль стронция с ранелевой кислотой в качестве лекарственного препарата выбрана из 26 соединений стронция вследствие физико-химических, фармакокинетических характеристик и хорошей

переносимости пациентами и используется в клинической практике для лечения остеопороза у женщин и мужчин [291].

In vitro показано, что стронция ранелат усиливает образование хрящевого матрикса изолированными хондроцитами посредством стимулирования анаболизма в хрящевой ткани [173]. На модели ОА у собак, индуцированного рассечением передней крестообразной связки колена, стронция ранелат уменьшает выраженность повреждения хряща, вызывает утолщение субхондральной кости, ингибируя экспрессию матриксных металлопротеиназ, ИЛ-1β и биомаркёра деградации коллагена II типа хрящевой ткани (CTX-II) [284]. Клинические испытания показали, что стронция ранелат значительно увеличивает массу и прочность кости за счет изменения свойств костного матрикса и минеральной плотности кости пациентов [219, 240, 325]. Результаты двойного слепого плацебо-контролируемого исследования эффективности терапии ОА коленного сустава стронция ранелатом свидетельствуют о способности препарата снижать деградацию хрящевой ткани и выраженность симптомов ОА [117]. Согласно федеральным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению ОА стронция ранелат показан для уменьшения боли и замедления прогрессирования ОА крупных суставов [49].

Препараты витамина D

Витамин D влияет на усвоение кальция в хрящевой ткани и метаболизм кости, поэтому его дефицит может вносить вклад в прогрессирование ОА [222, 238]. Метаанализ четырёх РКИ с участием 1136 пациентов, посвящённый оценке результатов терапии ОА коленного сустава витамином D в суточной дозе от 800 до 60000 МЕ с использованием опросника WOMAC, свидетельствует о значимом повышении функциональной активности, снижении показателя боли, но не показателя скованности WOMAC и об отсутствии влияния витамина D на деградацию большеберцовой кости [153]. Клиническое исследование с участием 175 пациентов с ОА коленного сустава с пониженным содержанием витамина D в сыворотке крови (<30 нг/мл) показало, что еженедельный приём 40000 МЕ витамина D2 на протяжении шести месяцев уменьшает выраженность боли, улучшает качество жизни и физическую работоспособность больных [238].

Антиоксиданты

У пациентов с ОА коленного сустава II-III стадий в сыворотке крови повышена концентрация маркёров свободно-радикального окисления липидов и снижен уровень эндогенных антиоксидантов [61]; шестьдесят процентов пациентов с ОА имеют высокий уровень окисленных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в сыворотке крови [109]. Исследования на хондроцитах, выделенных из суставного хряща коров, показали, что окисленные ЛПНП,

связываясь с рецепторами LOX-1, за счёт интенсификации оксидативного стресса вызывают гипертрофию [210] и преждевременное старение суставного хряща [357]. Поэтому применение антиоксидантов для снижения выраженности оксидативного стресса при ОА патогенетически обосновано. Согласно отдельным клиническим исследованиям обладающие антиоксидантным действием биологически активные добавки, содержащие экстракты куркумы и босвеллии, способны уменьшать боль и улучшать функциональную активность сустава при ОА коленного сустава [161].

1.3 Разрабатываемые подходы к фармакотерапии остеоартроза

Недостаточная эффективность медикаментозной терапии ОА и нежелательные побочные эффекты лекарственных средств, в первую очередь симптоматических препаратов быстрого действия, обуславливают актуальность поиска новых подходов к фармакотерапии ОА. Поиск новых подходов к фармакотерапии ОА идёт по нескольким направлениям, включающим создание новых лекарственных препаратов, действующих на разные звенья патогенеза ОА, и разработку лекарственных форм применяемых в терапии ОА препаратов, обеспечивающих их доставку в патологический очаг в оптимальных концентрациях при снижении системных концентраций, что ведёт к уменьшению частоты и выраженности побочных эффектов.

К потенциальным медикаментозным средствам терапии ОА, находящимся на разных этапах разработки, относятся препараты факторов роста и пептидов, участвующих в процессах регенерации кости и хряща, моноклональное антитело к фактору роста нервов β (Nerve growth factor β, NGF-β), антагонисты рецептора ИЛ-1 и рецепторов, связанных с ретиноевой кислотой альфа (RORα рецепторы), а также ингибирующие активность трансформирующего ростового фактора β1 (Transforming growth factor β1, TGF-β1) средства.

К лекарственным формам препаратов, применение которых сопровождается сниженным риском возникновения побочных эффектов по сравнению с лекарственными формами системного действия, относятся наружные лекарственные формы. Использование противовоспалительных и противоболевых препаратов в лекарственных формах для наружного применения в комплексной терапии ОА позволит снизить дозу и/или частоту приёма лекарственных средств системного действия, что будет способствовать улучшению общего состояния пациентов.

1.3.1 Медикаментозные средства терапии остеоартроза, находящиеся на стадии разработки

Антитело к фактору роста нервов-β

В синовиальной жидкости пациентов с ОА повышен уровень фактора роста нервов-β (Nerve growth factor-β, NGF-β) [59], который сенсибилизирует сенсорные нейроны, усиливая выраженность боли [269, 344]. Препарат танезумаб, представляющий собой гуманизированное моноклональное антитело к NGF-β, является совместной разработкой фармацевтических компаний Pfizer и Eli Lilly для терапии хронической боли у пациентов с ОА. По результатам РКИ с участием 450 пациентов с ОА коленного сустава, опубликованным в 2010 г., танезумаб значительно уменьшает боль в колене при улучшении общего состояния пациентов по сравнению с плацебо. Однако терапия танезумабом сопровождается повышенной частотой нежелательных побочных эффектов по сравнению с плацебо (68% против 55%, соответственно); среди них наиболее частые – головная боль, инфекции верхних дыхательных путей и парестезии [223]. В июне 2017 г. FDA присвоило танезумабу статус препарата для получения одобрения в ускоренные сроки [352], и на сегодняшний день закончена III фаза двойного слепого плацебо-контролируемого многоцентрового РКИ анальгетической эффективности и безопасности танезумаба при подкожном введении пациентам с ОА коленного и тазобедренного суставов [138]. Её результаты свидетельствуют о значимом анальгетическом эффекте препарата и об улучшении на его фоне функции суставов у пациентов с ОА коленного и тазобедренного суставов и неадекватной реакцией на стандартную обезболивающую терапию. Однако количество пациентов с ОА, которым в ходе проводимого РКИ понадобилась замена сустава, в группах, получавших препарат, превосходило их число в группе, получавшей плацебо, что требует дальнейшего анализа клинической значимости этих данных [304].

Фактор роста фибробластов 18

Фактор роста фибробластов 18 (Fibroblast growth factor 18, FGF-18) участвует в хондрогенезе и процессах восстановления хряща, при в/с введении увеличивает объём хряща как у пациентов с ОА коленного сустава, так и на моделях экспериментального ОА у животных. В культуре хондроцитов рекомбинантный человеческий FGF-18 сприфермин™ стимулирует их пролиферацию, увеличивает экспрессию хондроцитарного маркёра Sox9 и способствует образованию хондроцитами внеклеточного матрикса [155]. Результаты двойного слепого плацебо-контролируемого РКИ безопасности и эффективности в/с инъекций сприфермина™ при ОА коленного сустава с участием 180 пациентов, опубликованные в 2014 г., свидетельствуют о дозозависимом эффекте препарата в отношении предотвращения потери хряща и сужения ширины суставного пространства; при этом серьезные нежелательные явления на его фоне не наблюдались [236]. На сегодняшний день закончено пятилетнее плацебо-контролируемое РКИ FORWARD с участием 549 пациентов: в/с введение сприфермина™ в дозе 100 мкг, но не 30 мкг,

каждые 6 или 12 месяцев значимо увеличивало толщину хряща через два года терапии ОА коленного сустава. Однако значимых различий результатов оценки состояния пациентов по опроснику WOMAC между группами, получавшими сприфермин в обеих дозах и плацебо, зарегистрировано не было [181].

Пептид TPX-100, полученный из матричного внеклеточного фосфогликопротеина

Матричный внеклеточный фосфогликопротеин (Matrix extracellular phosphoglycoprotein, MEPE) экспрессируется на остеобластах, остеоцитах и одонтобластах; его экспрессия повышена при нарушениях фосфатного и костно-минерального обмена [298]. 23-аминокислотный пептид TPX-100, полученный из MEPE, усиливает пролиферацию хряща на моделях экспериментального повреждения суставов у коз и крыс. Результаты РКИ терапии билатерального пателлофеморального ОА в/с еженедельными инъекциями TPX-100 на протяжении 4 недель с участием 93 пациентов свидетельствуют о его хорошей переносимости и безопасности; эффективность препарата при еженедельном в/с введении в дозе 200 мг (4 недели) проявлялась регистрируемыми в течение 12 месяцев улучшением функциональной активности суставов и снижением выраженности боли, что сопровождалось сокращением потребности пациентов в НПВП [253]. На данный момент завершена II фаза РКИ (двойное слепое плацебо-контролируемое РКИ) безопасности и эффективности в/с инъекций TPX-100 на 120 пациентах со слабым или умеренным пателлофеморальным ОА, однако её результаты ещё не являются общедоступными [52].

Низкомолекулярная фракция сывороточного альбумина человека

Низкомолекулярная фракция 5% сывороточного альбумина человека (НМФ-АЧ) стимулирует хондрогенную дифференцировку, усиливая синтез коллагена 2α1, и проявляет противовоспалительные свойства, частично обусловленные присутствием в препарате дикетопиперазина [80], снижающего продукцию ИФ-γ и ФНО-α Т-лимфоцитами [310]. Результаты многоцентрового двойного слепого РКИ с участием 329 пациентов с умеренным и тяжёлым ОА коленного сустава продемонстрировали, что НМФ-АЧ является безопасным препаратом, уменьшающим выраженность боли на протяжении 12 недель после в/с инъекции [79]. Анализ 3 плацебо-контролируемых РКИ с участием 417 пациентов с тяжелым ОА коленного сустава показал, что однократная в/с инъекция НМФ-АЧ улучшает показатели боли и физической функции по опроснику WOMAC, при этом серьёзных побочных эффектов, обусловленных введением препарата, не зафиксировано [114].

Антагонисты рецептора интерлейкина-1

В культуре хондроцитов ИЛ-1β индуцирует деградацию матрикса хряща за счёт

увеличения продукции коллагеназы и нарушения баланса коллагеназа/тканевые ингибиторы металлопротеиназ [311]; дозозависимо ингибирует экспрессию необходимого для хондрогенеза хондроцитарного маркёра Sox9 [261]. В/с введение в коленный сустав как синовиальных клеток, трансдуцированных с геном антагониста рецептора ИЛ-1 [283], так и рекомбинантного антагониста рецептора ИЛ-1 [100] эффективно при экспериментальном ОА у собак.

Терапевтическое действие антагонистов рецептора ИЛ-1 у пациентов с ОА коленного сустава оценивалось двумя независимыми РКИ, ни в одном из которых не зарегистрировано значимого клинического эффекта препаратов: в одном из них пациенты с ОА получали однократную в/с инъекцию анакинры, рекомбинантного антагониста рецептора ИЛ-1, и её эффект оценивался в течение 12 недель после инъекции [107]; в другом РКИ AMG108, моноклональное антитело подкласса иммуноглобулина G2 к рецептору ИЛ-1, вводили подкожно, один раз в 4 недели на протяжении 12 недель, эффект терапии оценивали в течение 12 недель после последней инъекции препарата [113].

Костный морфогенетический белок-7

Костный морфогенетический белок-7 (Bone morphogenic protein-7, BMP-7), член суперсемейства TGF-β, играет ключевую роль в эмбриогенезе, гомеостазе и регенерации костей и хрящей [101] и одобрен FDA в качестве средства для лечения несращения костей [277]. BMP-7 регулирует экспрессию некоторых факторов роста, включая инсулиноподобный фактор роста-1 (Insulin-like growth factor 1, IGF-1) и TGF-β/BMPs; в суставном хряще оказывает анаболическое действие, усиливая синтез компонентов внеклеточного матрикса коллагена II типа и аггрекана, без индукции гипертрофии хондроцитов [110]. На экспериментальных моделях повреждения суставного хряща у собак, кроликов и овец рекомбинантный BMP-7 проявляет хондропротекторный эффект [116, 194, 307] .

Результаты многоцентрового плацебо-контролируемого РКИ безопасности и переносимости BMP-7 пациентами с ОА коленного сустава показали, что при однократных в/с инъекциях BMP-7 в дозах 0,03 мг, 0,1 мг, 0,3 мг и 1 мг не выявлено его дозолимитированного токсического действия, что обусловило перспективу проведения дальнейших РКИ эффективности BMP-7 при ОА [186]. На данный момент завершена II фаза двойного слепого РКИ безопасности и эффективности BMP-7 на 51 пациенте с ОА коленного сустава, однако её результаты не являются общедоступными [137].

Паратиреоидный гормон / Паратгормон-родственный протеин

Паратиреоидный гормон (ПТГ) увеличивает образование костной массы за счёт снижения апоптоза остеобластов [197]. Терипаратид, рекомбинантный препарат человеческого ПТГ (11-34), одобренный FDA для лечения остеопороза, при ежедневном подкожном введении мышам с моделью ОА снижает дегенерацию хряща в том случае, когда курс инъекций начинается сразу после моделирования экспериментального ОА путём повреждения мениска/связок коленного сустава, или проявляет регенерирующий эффект в случае, когда его введение животным начинают через 8 недель после хирургической манипуляции [300]. На мышах с нокаутом гена, кодирующего паратгормон-родственный протеин (ПТГрП), установлено, что ПТГрП ингибирует дифференцировку хондроцитов в гипертрофический фенотип [338]. Таким образом, результаты доклинических исследований эффективности препаратов ПТГ и ПТГрП свидетельствуют о перспективе их изучения в качестве средств для замедления дегенерации хряща и стимуляции регенеративных процессов в его внеклеточном матриксе при ОА.

Ингибирование активности трансформирующего ростового фактора β

При изменённой механической нагрузке на сустав как у мышей с моделью экспериментального ОА, так и у пациентов с ОА в субхондральной кости повышается экспрессия трансформирующего ростового фактора β1 (Transforming growth factor-β1, TGF-β1). В высоких концентрациях TGF-β1 стимулирует образование кластеров нестин-позитивных мезенхимальных стволовых клеток, что приводит к нарушению формирования кости, сопровождающемуся усиленным ангиогенезом [356]. У людей с болезнью Камурати-Энгельманна (Camurati–Engelmann disease, CED) имеется точечная активирующая мутация в гене TGFB1, что приводит к активации TGF-β1 при его секреции [320]; и эти пациенты склонны к развитию ОА [86, 342]. У мышей с мутацией CED TGF-β1 активируется при секреции остеобластическими клетками, костная масса неравномерно распределена и нарушено формирования хряща; ингибирование активности TGF-β в субхондральной кости ослабляет выраженность дегенеративных процессов в суставном хряще при экспериментальном ОА и может рассматриваться одним из потенциальных подходов к созданию новых лекарственных средств для терапии ОА [356].

Антагонисты рецепторов, связанных с ретиноевой кислотой альфа (RORα рецепторов), и средства, нормализующие уровень холестерина

В последние годы большое внимание уделяется роли метаболических нарушений в патогенезе ОА и, в частности, изменениям метаболизма холестерина [108]. Под воздействием гидроксилаз из холестерина образуются циркулирующие в крови и регулирующие разнообразные биологические процессы оксистеролы [274]. При ОА в хондроцитах увеличен

уровень холестерина вследствие его усиленного захвата клетками, активации холестерол-25-гидроксилазы и 25-гидроксихолестерол-7α-гидроксилазы (CYP7B1) и повышенной продукции метаболитов оксистерола; у мышей с моделью ОА диета с высоким содержанием холестерина, сопровождающаяся увеличением его концентрации в сыворотке крови, приводит к усугублению экспериментальной патологии. Установлено, что изменения метаболизма холестерина, индуцирующие развитие ОА, опосредуются участием в патологическом процессе рецепторов, связанных с ретиноевой кислотой альфа (RORα рецепторов), что подтверждается снижением выраженности деградации хряща на фоне в/с инъекции антагониста RORα рецепторов SR3335 у мышей с моделями ОА [108]. Поэтому антагонисты RORα рецепторов и средства, нормализующие уровень холестерина, могут быть интересны для исследования в качестве новых потенциальных средств терапии ОА.

1.3.2 Всасывание, проникновение в ткани и побочные эффекты НПВП в лекарственных формах для наружного применения

НПВП являются препаратами выбора при терапии скелетно-мышечной боли, в частности при ОА, однако на фоне приёма НПВП системного действия часто возникают нежелательные побочные явления. Противовоспалительные и противоболевые препараты в лекарственных формах для наружного применения наносятся на поверхность кожи в непосредственной близости от зоны поражения, чем достигается создание эффективных концентраций действующих веществ в тканях-мишенях при их гораздо меньших концентрациях в крови по сравнению со значениями, регистрируемыми на фоне НПВП системного действия. Этим применение препаратов в лекарственных формах для наружного применения отличается от использования трансдермальных терапевтических систем доставки лекарственных средств, обеспечивающих их поступление через кожу в системный кровоток. Использование НПВП в лекарственных формах для наружного применения за счёт уменьшения концентраций действующих веществ в крови по сравнению с приёмом НПВП системного действия сопровождается снижением как риска побочных эффектов, так и метаболизма препаратов в печени [170, 177].

Всасывание НПВП в лекарственных формах для наружного применения

Для того чтобы достичь патологического очага при скелетно-мышечной боли, действующие вещества препаратов в лекарственных формах для наружного применения должны преодолеть все слои кожи: эпидермис, дерму и подкожную жировую клетчатку [334]. Роговой слой эпидермиса в значительной степени гидрофобен, и через него легче переносятся лекарственные вещества в неионизированной форме [170]; оптимальная молекулярная масса соединений для прохождения через кожу составляет менее 500 Да [93]. НПВП в основном

липофильны, молекулярная масса большинства НПВП от 200 до 400 Да, они представляют собой слабые кислоты со значениями рКа от 3 до 4,6 [322], поэтому при физиологическом pH кожи мало ионизированы и хорошо проникают через неё [57, 322].

Поступление действующих веществ в системный кровоток при применении лекарственных форм для наружного применения НПВП описано в ряде работ. Исследование, сравнивающее поступление в системный кровоток диклофенака после нанесения здоровым добровольцам 1% геля диклофенака в количестве, соответствующем 60 мг действующего вещества, на 100 $см^2$ кожи 3 раза в день на протяжении 4 дней с последующей окклюзией пластиковой фольгой в течение 4 часов для усиления трансдермального всасывания и после однократного нанесения 1% геля диклофенака в количестве, соответствующем 300 мг действующего вещества, на 100 $см^2$ кожи без последующей окклюзии пластиковой фольгой, показало, что максимальная концентрация (Cmax) диклофенака ± стандартное отклонение (СО) в плазме крови составляет 8,54±1,49 нг/мл после многократного использования 1% геля и 1,45±0,48 нг/мл после однократного нанесения лекарственной формы для наружного применения [127]. После нанесения 1% геля диклофенака здоровым добровольцам в области одного коленного сустава по 4 г на нанесение/4 раза в день, при совокупном количестве диклофенака в нанесённой лекарственной форме за день 160 мг, Cmax± СО в плазме крови составляет 15±7,3 нг/мл. При нанесении 1% геля диклофенака в области двух коленных и двух локтевых суставов количество геля на одно нанесение увеличивается до 12 г (содержащих при 4-х разовом нанесении, соответственно, 480 мг диклофенака), что соответствует Cmax±СО, равным 53,8±32 нг/мл [271]. После однократного применения пластыря (10х14см), содержащего 1,3% диклофенака эполамина, Cmax действующего вещества находится в диапазоне концентраций 0,7-6 нг/мл при регистрации фармакокинетических параметров через 10-20 часов после его нанесения; через пять дней ежедневного применения этого пластыря (2 раза в день) концентрация диклофенака в плазме крови составляет 1,3-8,8 нг/мл [60]. При этом значение Cmax±СО после перорального приёма диклофенака в дозе 50 мг/3 раза в день, рекомендуемой при терапии ОА, равно 2270±778 нг/мл [170], а Cmax±СО при однократном пероральном приёме диклофенака натрия в дозе 50 мг соответствует 1504,5±225,9 нг/мл (в группе девушек среднего возраста 19,4 года) – 1625,1±153,0 нг/мл (в группе женщин среднего возраста 68,1 года) [343].

Фармакокинетическое исследование применения содержащей кетопрофен системы доставки Transfersome при её накожном нанесении пациентам с ОА коленного сустава по 4,8 г лекарственной формы, содержащей 110 мг кетопрофена, 2 раза в день показало, что концентрация действующего вещества в плазме крови спустя 2 недели применения этой лекарственной формы для наружного применения составляет 81,2 (4,6–677) нг/мл, спустя 6

недель – 76,7 (4,6–598,8) нг/мл [297], что составляет 0,1–17% от концентрации кетопрофена в плазме крови после его перорального приема в дозе 50 мг 4 раза в день [170].

При сравнительной оценке концентраций кетопрофена в плазме крови, синовиальной жидкости и тканях сустава после его использования в виде пластыря, наносимого на 24 часа и содержащего 30 мг действующего вещества, и перорального приёма капсулы с 50 мг препарата пациентами, подвергшимися артроскопии, установлено, что применение лекарственной формы для наружного применения обеспечивает достижение более низких концентраций кетопрофена в плазме крови, синовиальной оболочке и синовиальной жидкости по сравнению с его пероральным приёмом в виде капсулы. Медианы этих концентраций соответственно составляют 18,7 нг/мл, 56,7 нг/г и 12,8 нг/мл для кетопрофена в виде пластыря против 2595,3 нг/мл, 363,9 нг/г и 353,8 нг/мл для пероральной лекарственной формы. При этом концентрации действующего вещества в хряще и мениске при использовании пластыря кетопрофена превышают концентрации, достигнутые после перорального приёма капсулы препарата, и равны 568,9 нг/г и 349,3 нг/г на фоне лекарственной формы для наружного применения против 83,5 нг/г и 85,7 нг/г на фоне пероральной лекарственной формы, соответственно [296].

При сопоставлении фармакокинетических параметров после перорального приёма 800 мг ибупрофена (2 таблетки по 400 мг) здоровыми добровольцами и нанесения 16 г 5% геля ибупрофена на кожу бедра площадью 17х19 см установлено, что после применения препарата в лекарственной форме для наружного применения Cmax в плазме крови в 300 раз ниже, чем после его перорального приёма. При этом на фоне перорального приёма ибупрофена его концентрации в мышцах и подкожно-жировой клетчатке составляют 120,8 нг/мл и 95,6 нг/мл, соответственно; применение препарата в виде 5% геля сопровождается достижением в мышцах концентрации ибупрофена, равной 100,7 нг/мл, при значительно более высокой концентрации в подкожно-жировой клетчатке – 1374 нг/мл [324].

Таким образом, результаты описанных выше фармакокинетических исследований свидетельствуют о том, что после применения НПВП в лекарственных формах для наружного применения в плазме крови регистрируются гораздо более низкие концентрации действующих веществ, чем после перорального приёма препаратов, при этом в отдельных исследованиях показано, что на фоне местных НПВП содержание действующих веществ в суставном хряще и подкожно-жировой клетчатке превышает концентрации действующих веществ после перорального приема.

Влияние состава НПВП в лекарственных формах для наружного применения на проникновение действующих веществ в ткани

Проникновение в ткани НПВП в лекарственных формах для наружного применения зависит от технологии изготовления лекарственных форм, в частности от выбора основы, использования усилителей всасывания и носителей действующих веществ. Кроме того, фармакокинетические параметры НПВП в лекарственных формах для наружного применения могут различаться при включении в них действующего вещества в виде разных солей. Так, значения Cmax и площади под кривой «концентрация-время» (AUC) после курсового нанесения здоровым добровольцам на протяжении 4 дней каждые 12 часов по 2 трансдермальных пластыря «Олфен» с содержанием 140 мг диклофенака натрия в одном пластыре в два раза выше, чем после курсового нанесения пластырей с содержанием 180 мг диклофенака эполамина (что эквивалентно 140 мг диклофенака натрия) по такой же схеме [162].

При сравнении фармакокинетических параметров двух гелей диклофенака установлено, что на фоне лекарственной формы для наружного применения, при приготовлении которой раствор диклофенака вводят в водно-спиртовую гелевую основу, Cmax и AUC возрастают соответственно на 106% и 53,8% по сравнению с показателями Cmax и AUC для геля диклофенака, при создании которого действующее вещество эмульгируют в липидной фазе [308].

В исследовании влияния усилителей всасывания ДМСО (1%, 5% и 10%), Твина 20 (1%, 2% и 5%), олеиновой кислоты (0,4%, 1% и 5%) и ментола (1%, 2,5% и 5%) на проницаемость мелоксикама в виде 0,3% геля через целлюлозные мембраны и трупную кожу установлено, что добавление в лекарственную форму ментола вызывает прямо пропорциональное его количеству усиление проницаемости препарата, в то время как ДМСО, Твин 20 во всех тестируемых концентрациях не усиливают её. Добавление в гель мелоксикама олеиновой кислоты в концентрациях 1% и 5% увеличивает его проницаемость через трупную кожу; однако повышение концентрации олеиновой кислоты с 1% до 5% приводит к снижению проницаемости препарата через целлюлозную мембрану [193].

В эксперименте in vitro показано, что добавление ДМСО в качестве усилителя всасывания в 1,5% лосьон диклофенака приводит к увеличению абсорбции препарата при его многократном, но не однократном применении [177].

Результаты исследования влияния наноносителей – наносфер, нанокапсул или наноэмульсий – на проникновение в кожу нимесулида в виде гелевой лекарственной формы для наружного применения свидетельствуют о том, что все изучаемые наноносители увеличивают проницаемость препарата через слои кожи; при этом она максимальна для содержащего наноэмульсию геля нимесулида, при применении которого действующее вещество непосредственно проникает в дерму и не определяется количественно в других слоях кожи, что регистрируется на фоне исследуемых гелей нимесулида, содержащих наносферы и нанокапсулы [66].

Кетопрофен в лекарственной форме для наружного применения, созданной с использованием ультрадеформируемых носителей, с содержанием 2,3% действующего вещества эффективнее проникает в мышцы по сравнению кетопрофеном в форме 2,5% геля, не содержащего носителей, и кетопрофена в таблетках по 50 мг [102].

Исследование, оценивающее профиль высвобождения индометацина из включённых в гидрогели липосомальных везикул, состоящих из дипальмитоил-L-альфа-фосфатидилхолина и холестерина (9:1), в коже и противовоспалительный эффект этой лекарственной формы НПВП, показало, что у добровольцев с индуцированной ультрафиолетом эритемой она оказывает выраженное и более длительное противовоспалительное действие по сравнению с гелем индометацина, не содержащим липосомальных везикул. Эффективность исследуемой лекарственной формы препарата прямо пропорциональна количеству высвобождаемого в коже действующего вещества; продолжительность его действия, вероятно, обусловлена взаимодействием липосомальных везикул с липидами рогового слоя кожи, приводящим к образованию депо НПВП в роговом слое, которое обеспечивает его длительное высвобождение в более глубокие слои кожи [290].

Профиль эффективности/безопасности НПВП в лекарственных формах для наружного применения

Метаанализ результатов 86 клинических исследований и неопубликованных отчётов с участием 10160 пациентов, систематизирующий данные об эффективности и безопасности НПВП в лекарственных формах для наружного применения с 1966 по 1998 годы, показал, что использование местных НПВП эффективно с целью облегчения как острой, так и хронической боли, при этом частота возникновения местных и системных побочных эффектов, а также случаев отмены НПВП в лекарственных формах для наружного применения не отличается от плацебо [260].

Результаты нескольких двойных слепых клинических исследований эффективности и безопасности НПВП в лекарственных формах для наружного применения и при пероральном приёме при ОА свидетельствуют об их сопоставимой эффективности при сниженной частоте обусловленных системным действием препаратов побочных явлений на фоне препаратов в лекарственных формах для наружного применения. В частности, при ОА суставов кистей показана сравнимая выраженность терапевтического действия ибупрофена при ежедневном приёме в дозе 1200 мг (таблетки по 400 мг 3 раза в день) и 1% геля диклофенака при ежедневном четырёхкратном накожном нанесении полоски геля длиной 10 см. Однако 21 пациент досрочно прекратил участие в этом РКИ: число отказавшихся от терапии было больше в группе, перорально принимавшей ибупрофен, – 16 человек (10%), чем в группе, наружно

использовавшей 1% гель диклофенака, – 5 пациентов (3%). Большинство побочных эффектов, ставших причиной отказа от терапии, – нежелательные желудочно-кишечные явления: они зарегистрированы у 8 пациентов на фоне ибупрофена и у 1 пациента на фоне 1% геля диклофенака [347]. При ОА коленного сустава эффективность курса терапии диклофенаком в дозе 50 мг дважды в день, ежедневно, и 1% гелем элтенака при трёхкратном накожном нанесении по 3 г, содержащих 30 мг действующего вещества, ежедневно, сопоставима; но на фоне приёма диклофенака зарегистрировано в 3 раза больше нежелательных желудочно-кишечных явлений, чем в группе пациентов, которым был назначен 1% гель элтенака [302]. При ОА коленного сустава также зафиксирована сопоставимая эффективность 2% раствора диклофенака натрия для наружного применения (по 50 капель на одно нанесение) и диклофенака в капсулах по 50 мг (1 капсула на приём) при ежедневном использовании препаратов трижды в день; однако на фоне перорального приёма диклофенака частота нежелательных желудочно-кишечных явлений, включающих диспепсию, боль в животе, диарею и тошноту, и нарушений функции печени была значительно выше, чем в группе пациентов, которым назначали препарат в наружной лекарственной форме [329].

Частота системных побочных эффектов при применении НПВП в лекарственных формах для наружного применения, как правило, не отличается от частоты системных побочных эффектов, наблюдаемых на фоне плацебо [246, 260]; в ретроспективном популяционном исследовании, оценивающем риск кровотечений из верхних отделов желудочно-кишечного тракта и их перфораций, не выявлено значимого влияния НПВП в лекарственных формах для наружного применения на частоту госпитализаций пациентов по этому поводу [142].

Нежелательные явления при применении НПВП в лекарственных формах для наружного применения характеризуются в основном кожными проявлениями в месте нанесения препаратов – сыпью и зудом, – и возникают обычно у 10-15% пациентов [178]. На частоту неблагоприятных кожных реакций могут негативно влиять вспомогательные вещества в лекарственной форме для наружного применения. Так, если при использовании 1% геля диклофенака, не содержащего в своём составе ДМСО в качестве усилителя всасывания, частота кожных проявлений в месте нанесения составляет 7% против 2% при применении соответствующего геля-плацебо [271]; то на фоне 1,5% раствора диклофенака натрия для наружного применения, содержащего в составе ДМСО, частота регистрации сухости кожи соответствует 36%; парестезий – 14%, сыпи – 13% и зуда – 11%. При применении раствора-носителя с ДМСО, облегчающим прохождение лекарственных веществ через клеточные мембраны, не содержащего диклофенака натрия, отмечена повышенная частота сухости кожи (14%), парестезий (22%), сыпи (8%) и зуда (8%) по сравнению с раствором-плацебо практически без ДМСО, при использовании которого сухость кожи регистрировалась в 1%, парестезий – в 6%, сыпь – в 4% и зуд – в 4% случаев. При

прекращении терапии 1,5% раствором диклофенака натрия для наружного применения и использования раствора-носителя и раствора-плацебо все кожные проявления исчезали [91].

1.4 Обоснование цели, задач и используемых моделей исследования

В качестве потенциальных средств для купирования костно-мышечной боли и снижения выраженности воспаления, в частности при ОА, могут рассматриваться блокаторы NMDA-рецепторов. Известно, что соединения, блокирующие NMDA-рецепторы, наряду с нейропротекторной проявляют анальгетическую активность [279]. Активация глутаматных рецепторов NMDA подтипа необходима для долгосрочной потенциации ноцицептивных нейронов [189, 190, 235] и играет важную роль в сенситизации при воспалительных состояниях [226]. В последние десятилетия выявлено участие глутаматных рецепторов NMDA подтипа в развитии воспалительных и иммунных процессов. NMDA-рецепторы экспрессируются на нейтрофилах; при активации последних NMDA-рецепторы за счёт ауто- и паракринной регуляции стимулируют респираторный взрыв нейтрофилов, в результате которого образуется большое количество активных форм кислорода [115, 230, 239]. Функционально активные NMDA-рецепторы, расположенные на лимфоцитах, участвуют в регуляции уровня внутриклеточного кальция [237] и активных форм кислорода [88, 330] и модулируют скорость синтеза ИФ-γ [245]. Предполагается, что экспрессия NMDA-рецепторов в иммунных клетках контролируется центральной нервной системой [244]. Соединения, блокирующие NMDA-рецепторы, действуя на описанные выше звенья воспалительных и иммунных процессов, снижают их выраженность [128]. Так, блокатор NMDA-рецепторов MN-08 уменьшает уровень цитокинов ФНО-α и ИЛ-1β, ЦОГ-2, индуцибельной NO-синтазы и активных форм кислорода в стимулированной липополисахаридом культуре клеток RAW 264.7, ингибирует апоптоз в стимулированной липополисахаридом культуре клеток A549 и ослабляет выраженность патологических изменений в лёгких на модели индуцированного липополисахаридом острого повреждения лёгких у мышей линии BALB/C [196].

К блокаторам NMDA-рецепторов относятся производные аминоадамантана [81, 216], проявляющие нейропротекторные и анальгетические свойства. Обезболивающий эффект блокатора NMDA-рецепторов амантадина (адамантан-1-амина), применяемого для лечения нейродегенеративных заболеваний [341], продемонстрирован у пациентов с диабетической периферической нейропатией [67], у онкологических больных с нейропатической болью после хирургических вмешательств [288] и у пациентов с хронической болью в спине [212].

Гимантан (N-(2-адамантил)-гексаметиленимина гидрохлорид), разработанный в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, – низкоафинный неконкурентный канальный блокатор

глутаматных рецепторов NMDA-подтипа [140], обладающий при системном введении грызунам выраженным противопаркинсоническим, нейропротекторным, противовоспалительным и анальгетическим действием [4, 5, 28, 43]. Экспериментально установлено, что гимантан при однократном внутрибрюшинном введении проявляет противовоспалительный эффект на следующих моделях острого экссудативного воспаления: каррагенанового отёка лапы у крыс [38], уксусного перитонита у мышей [16] и отёка лапы у мышей, вызванного конканавалином А [45]. Гимантан при однократном внутрибрюшинном введении в дозе 20 мг/кг оказывает такой же противовоспалительный эффект, как и диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг (внутрибрюшинно), но в отличие от большинства НПВП гимантан не обладает ульцерогенным действием [4]. Гимантан при однократном внутрибрюшинном введении в дозах 10 мг/кг, 20 мг/кг и 40 мг/кг снижает повышенный уровень ИЛ-6 в сыворотке крови мышей с конканавалин А-индуцированным воспалением; при ежедневном внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг уменьшает повышенный уровень моноцитарного хемотаксического протеина-1 в сыворотке крови крыс с индуцированным интранигральным введением липополисахарида воспалением и нормализует повышенный уровень ИЛ-1α в сыворотке крови крыс с индуцированным 6-гидроксидофамином гемипаркинсонизмом [45]. Кроме того, гимантан обладает антиоксидантным действием [5, 15, 35].

Гимантан проявляет анальгетическую активность на экспериментальных моделях висцеральной и соматической боли у грызунов. В методике оценки висцеральной боли – тесте уксусных корчей – у мышей гимантан снижает выраженность боли при однократном внутрибрюшинном введении в дозах 10 мг/кг, 20 мг/кг и 40 мг/кг [4] и при однократном пероральном введении в дозе 20 мг/кг [191]. В методике оценки соматической боли, вызванной альгогенами, – формалиновом тесте у крыс – гимантан при однократном внутрибрюшинном введении в дозе 20 мг/кг подавляет выраженность тонической фазы боли [191]. Зарегистрированный в этих тестах анальгетический эффект гимантана в дозе 20 мг/кг сопоставим с анальгетическим эффектом диклофенака натрия в дозе 10 мг/кг [191].

В отличие от традиционных НПВП и ненаркотических анальгетиков, по механизму действия являющихся ингибиторами ЦОГ, гимантан эффективен при следующих видах соматической боли:

- термической соматической боли – гимантан в дозе 20 мг/кг как при внутрибрюшинном, так и при пероральном способах введения снижает выраженность боли в тесте отдёргивания хвоста от теплового излучения (tail-flick) у мышей [191]; гимантан в дозах 10 мг/кг и 20 мг/кг (внутрибрюшинно) дозозависимо увеличивает порог болевой чувствительности у мышей в тесте горячей пластины [4];

- соматической боли у крыс, вызванной переменным электрическим током, – гимантан при ежедневном пероральном введении в течение 14 дней (один раз в сутки) в дозах 10 мг/кг и 20 мг/кг повышает порог болевой чувствительности животных в ответ на раздражение лап переменным электрическим током при плавно увеличивающемся напряжении [4].

Экспериментально показано, что гимантан пролонгирует обезболивающее действие морфина в тесте горячей пластины у мышей и снижает выраженность симптомов синдрома отмены морфина у крыс [27]; при длительном введении (22 дня) в дозах 10, 20 и 40 мг/кг и через 48 часов после его отмены не вызывает изменений психомоторной активности и в дозах 1-10 мг/кг не обладает аддиктивным потенциалом [5].

Высокая липофильность жесткого углеводородного каркаса адамантильного фрагмента определяет возможность производных адамантана – в частности, гимантана – непосредственно взаимодействовать с содержащими липидный бислой клеточными мембранами и легко проникать через них [1, 36], что обеспечивает технологические преимущества при создании лекарственных форм для наружного применения на их основе.

Таким образом, блокатор NMDA-рецепторов гимантан обладает комплексом фармакодинамических и физико-химических свойств, позволяющих считать его одним из перспективных действующих веществ для создания противовоспалительного и противоболевого препарата в лекарственной форме для наружного применения.

Диссертационное исследование посвящено оценке противовоспалительного и анальгетического действия гимантана в лекарственной форме для наружного применения в опытах на грызунах. Выбор экспериментальных моделей для реализации цели исследования ограничен способом применения изучаемого препарата – накожным нанесением. В качестве основной модели боли использовали формалиновый тест у крыс, позволяющий оценить влияние соединений на две разные фазы ноцицептивного поведения. Первая – острая фаза – наступает сразу после подкожной инъекции разбавленного формалина в лапу животных, продолжительностью около 5 минут, вторая – тоническая – фаза начинается примерно через 20 минут после инъекции алгогена [326]. Первую фазу связывают с активацией первичных афферентных сенсорных нейронов, вторую фазу – с сочетанным влиянием афферентного входа и центральной сенсибилизацией в спинном мозге. Формалин возбуждает экспрессирующие TRPA1 катионные каналы сенсорные нейроны, вызывая приток кальция в клетки; блокада TRPA1 катионных каналов приводит к ослаблению характерных поведенческих реакций в ответ на интраплантарную инъекцию формалина. Подобное снижение выраженности ноцицептивных реакций наблюдается у TRPA1-дефицитных мышей [256]. Кроме того, после инъекции раствора формалина в коже повышается концентрация возбуждающих аминокислот аспартата и глутамата: пик повышения уровня аспартата приходится на первые минуты, глутамата – на 40-

45 минуты после введения формалина [275]. Большинство анальгетических средств снижают выраженность ноцицептивного поведения животных только во вторую фазу формалиновой боли [256]. После подкожной инъекции раствора формалина в месте введения развивается отёк, по уменьшению которого на фоне соединений судят о наличии у них антиэкссудативных свойств.

Антиэкссудативное действие гимантана в лекарственной форме для наружного применения изучали на модели каррагенанового отёка у крыс, патогенез которого включает участие метаболитов каскада арахидоновой кислоты [84, 272], гистамина и брадикинина тучных клеток [95, 133, 214], нейрокининов [112], цитокинов [188], оксида азота [299], фактора роста нервов [255]. Антиэкссудативные свойства препарата также оценивали на модели отёка лапы у мышей, вызванного введением лектина конканавалина А, за счёт воздействия на рецепторы мембран тучных клеток и базофильных лейкоцитов высвобождающего медиаторы воспаления (гистамин, серотонин, лейкотриены и др.) [26, 39].

В качестве модели, позволяющей изучить влияние гимантана в лекарственной форме для наружного применения на хронический воспалительный процесс, использовали модель адъювантного артрита у крыс, индуцированного введением полного адъюванта Фрейнда (ПАФ) в заднюю лапу, на которой возможно установить влияние веществ на развитие неиммунного и иммунного воспаления [24, 25, 50, 51]. Показано, что ПАФ, как и формалин и каррагенан, вызывает увеличение количества глутаматных рецепторов на аксонах афферентных нейронов [99]. Модель послеоперационной боли у крыс, вызванной разрезом кожи, фасций и короткого сгибателя пальцев (flexor digitorum brevis) задней лапы, удобна для регистрации влияния препаратов в лекарственных формах для наружного применения на термическую и механическую гипералгезию [92] и поэтому выбрана для изучения анальгетического действия гимантана в лекарственной форме для наружного применения при его курсовом применении.

Таким образом, оценка противовоспалительного и противоболевого действия гимантана в лекарственной форме для наружного применения на перечисленных выше моделях патологических состояний позволит сделать комплексное заключение об эффективности изучаемого препарата.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Животные

Исследования выполнены на самцах белых аутбредных крыс (n=478) (масса крыс в острых опытах составляла 240-270 г, начальная масса крыс в экспериментах по оценке влияния 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на вызванный полным адъюватом Фрейнда (ПАФ) воспалительный процесс и на выраженность послеоперационной гипералгезии составляла, соответственно, 260-300 г и 290-315 г), самцах крыс линии Вистар (n=53, масса крыс 270-300 г) и самцах аутбредных мышей с начальной массой 23-29 г (n=57) в опыте по оценке влияния препаратов на отёк стопы мышей, вызванный конканавалином А (Кон А).

Животных получали из питомника лабораторных животных филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (Московская область) и содержали в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2014 г. N 51. Все эксперименты проводили во временном интервале с 9.00 до 16.00. Организацию и проведение работы осуществляли в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами: Приказом Минздрава РФ №199н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

2.2. Препараты и вещества, используемые в экспериментах

1. Препараты исследования:

- Оригинальное соединение с противовоспалительной активностью гимантан – N-(2-адамантил)-гексаметиленимина гидрохлорид (Патент РФ №2559777, синтезирован под руководством вед.науч.сотр., канд.хим.н. Авдюниной Н.И. и предоставлен для исследований химико-технологической лабораторией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова») – применялся в дозах 10 мг/кг и 20 мг/кг внутрибрюшинно (растворитель – 0,9% р-р хлорида натрия)

- Гелевые формы гимантана, гели-прототипы гимантана и гели-плацебо, созданные под руководством проф., д.фарм.н. Алексеева К.В. в лаборатории готовых лекарственных форм ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»:

1% гель-прототип гимантана (Состав: гимантан – 0,5 г, гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) – 1,00 г, вода очищенная до 50,00 г),

5% гель-прототип гимантана (Состав: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, вода очищенная до 50,00 г),

5 % гель гимантана серий 070916/100317 (Состав: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, вода очищенная до 50,00 г),

5 % гель гимантана серии 080916 (Состав: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, ДМСО – 4,00 г, вода очищенная до 50,00 г),

5 % гель гимантана серии 090916 (Состав: гимантан – 2,5 г, полоксамер Р407 – 8,50 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, вода очищенная до 50,00 г),

5 % гель гимантана серий 130317/150118/190219 (Состав: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, ДМСО – 5,00 г, вода очищенная до 50,00 г),

гель-плацебо серии 141017 (Состав: ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, ДМСО – 5,00 г, вода очищенная до 50,00 г),

гель-плацебо серии 110317 (Состав: ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, вода очищенная до 50,00 г)

2. Препараты сравнения:

- Противовоспалительный препарат диклофенак натрия (Hemofarm, Сербия) – раствор для инъекций 25 мг/мл, применялся в дозах 5 мг/кг и 10 мг/кг внутрибрюшинно

- Противовоспалительный препарат диклофенак (Hemofarm, Сербия) – 1% гель, наносился наружно на задние лапы животных

3. Вещества для моделирования патологических состояний:

- Каррагенан (Sigma-Aldrich, США) применялся в виде 1% раствора, вводился в объеме 0,1 мл субплантарно в заднюю лапу крыс

- Конканавалин А (Кон А) (Sigma-Aldrich, США) вводился в концентрации 5 мг/мл в заднюю конечность мышей в объёме 20 мкл

- Полный адъювант Фрейнда (ПАФ) – взвесь БЦЖ в вазелиновом масле (Sigma-Aldrich, США) – вводился в объеме 0,1 мл субплантарно в заднюю лапу крыс

- Формалин («БиоВитрум», Россия) применялся в виде 2% раствора, вводился в объеме 0,1 мл субплантарно в заднюю лапу крыс

2.3. Дизайн эксперимента

Экспериментальная работа была выполнена согласно дизайну исследования, состоящему из трех этапов (Рисунок 6).

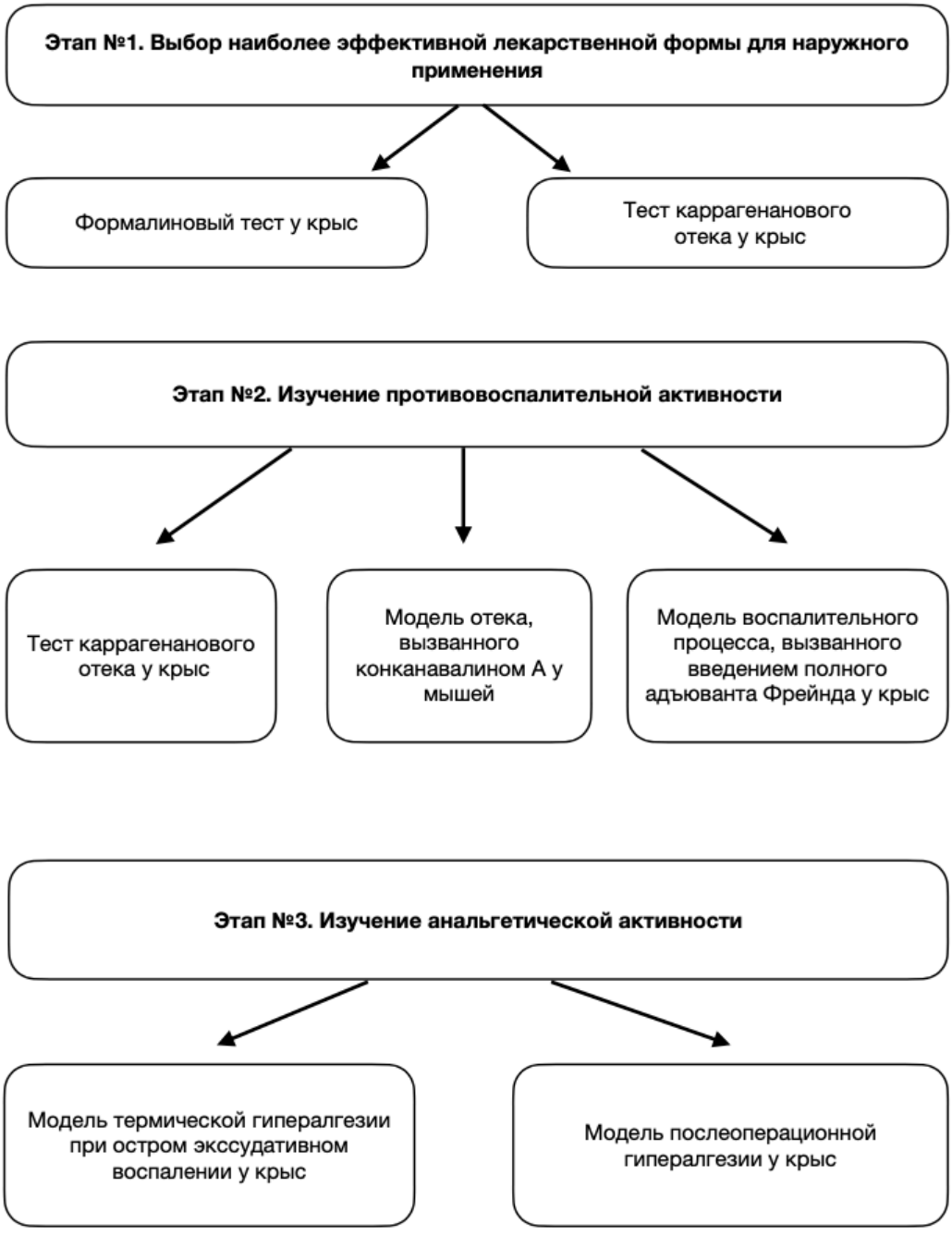

Рисунок 6. Дизайн исследования

Задачей первого этапа работы был выбор концентрации гимантана и вспомогательных компонентов его гелевой лекарственной формы для наружного применения на основании результатов экспериментального исследования противоболевой и противовоспалительной активности различающихся своим составом гелевых лекарственных форм гимантана для

наружного применения на крысах в формалиновом тесте, позволяющем оценить влияние соединений как на болевую, так и на воспалительную реакцию животных, и в тесте каррагенанового отёка.

На втором этапе углубленно изучали противовоспалительную активность выбранной на первом этапе работы лекарственной формы гимантана в сравнении с гимантаном и диклофенаком при внутрибрюшинном введении и 1% гелем диклофенака при наружном применении на моделях острой экссудативной воспалительной реакции – в тестах каррагенанового отёка у крыс и вызванного Кон А отёка у мышей – и адъюватного артрита, вызванного инъекцией ПАФ, у крыс.

На третьем этапе углубленно изучали анальгетические свойства выбранной на первом этапе работы лекарственной формы гимантана на моделях термической гипералгезии при остром экссудативном воспалении и послеоперационной гипералгезии у крыс в сравнении с 1% гелевой лекарственной формой диклофенака для наружного применения, гимантаном в дозе 20 мг/кг и диклофенаком в дозе 10 мг/кг при внутрибрюшинном введении.

На фармацевтическом рынке диклофенак в гелевой лекарственной форме для наружного применения представлен в двух концентрациях: 1% и 5% [44]. По данным опубликованных научных работ в экспериментальных фармакологических исследованиях, выполненных на грызунах, не встретилось использования диклофенака в виде 5% геля. В большинстве публикаций описано применение 1% геля диклофенака [131, 163, 182, 220, 262, 303], поэтому в проводимом исследовании в качестве препарата сравнения был взят диклофенак в лекарственной форме для наружного применения – 1% гель.

Дозы гимантана и диклофенака при однократном внутрибрюшинном введении грызунам составляли, соответственно, 20 мг/кг и 10 мг/кг, так как ранее было установлено, что в этих дозах они проявляют схожий противовоспалительный [4] и противоболевой [191] эффекты. Так как гимантан в большинстве проводимых ранее экспериментов на грызунах, в частности при оценке его влияния на нейровоспаление у крыс [4], при курсовом системном введении вводили в дозах 10 мг/кг и менее [4, 14, 21, 22, 28, 37], то при курсовом внутрибрюшинном введении в экспериментах диссертационного исследования препарат использовали в дозе 10 мг/кг. Дозу диклофенака при курсовом введении пропорционально снижали в два раза.

2.4. Методы исследования

2.4.1. Формалиновый тест

Эксперимент проводили на самцах белых аутбредных крыс и самцах крыс линии Вистар. В левую заднюю лапу животных субплантарно вводили 100 мкл 2% раствора формалина [10]. Гелевые лекарственные формы препаратов наносили на левую заднюю лапу крыс за 1 час до

индукции формалиновой боли. Контрольным животным наносили гель-плацебо, не содержащий в своем составе гимантана. Фиксировали изменение поведения животных, по времени соответствующее двум фазам боли – острой и тонической, которые регистрировали соответственно на протяжении первых 5 минут и с 20 по 60 минуты после введения раствора формалина. Каждые 5 минут в течение обеих фаз боли в баллах регистрировали 4 типа поведенческих реакций: 0 - отсутствие реакции; 1 - лапа остается на горизонтальной поверхности, но животное на нее не опирается; 2 - лапа поднята; 3 - лапа облизывается, грызется или встряхивается. Подсчитывали сумму баллов в острую и тоническую фазы боли. Критерием анальгетического эффекта считали уменьшение болевых реакций в группах крыс, получавших препараты, относительно контрольной группы.

На фоне субплантарного введения раствора формалина у животных развивается отек лапы, выраженность которого максимальна через 4-5 часов после инъекции, поэтому степень отечности лап крыс оценивали через 4 часа после индукции воспаления в экспериментах на самцах белых аутбредных крыс и через 5 часов – в опытах на самцах крыс линии Вистар. Отек лапы определяли по разнице диаметра лапы (миллиметры), измеренного штангенциркулем, через 4-5 часов после индукции воспаления относительно диаметра лапы до индукции воспаления. Противовоспалительный эффект оценивали по уменьшению отека лапы у крыс на фоне изучаемых лекарственных форм препаратов относительно показателя контрольной группы [50].

2.4.2. Модель каррагенанового отека

Каррагенановый отек у самцов белых аутбредных крыс моделировали субплантарным введением в левую заднюю лапу животных 0,1 мл 1% раствора каррагенана (сульфатированного полисахарида из ирландского морского мха) [50] и регистрировали по увеличению диаметра стоп в плюсневой области через 1, 2, 3 и 4 часа после индукции воспаления относительно диаметра до его индукции с помощью инженерного штангенциркуля. Противовоспалительный эффект оценивали по уменьшению отека лапы у крыс на фоне лекарственных препаратов относительно соответствующих показателей контрольной группы. Гелевые лекарственные формы гимантана и диклофенака наносили на левую заднюю лапу, препараты системного действия вводили внутрибрюшинно крысам за 1 час до индукции каррагенанового отека. Контрольной группой были животные с экспериментальной патологией, не получавшие препаратов.

2.4.3. Количественное определение продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, у крыс с каррагенановым отёком лапы[1]

При воспалении интенсифицируется перекисное окисление липидов (ПОЛ), и его уровень может рассматриваться как показатель выраженности воспалительного процесса [9, 41]. Одним из продуктов ПОЛ является реагирущий с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) малоновый диальдегид, концентрация которого в тканях при воспалении повышается вследствие как оксидантного стресса, так и усиления метаболизма арахидоновой кислоты [139, 247].

Для определения концентрации продуктов ПОЛ, реагирущих с ТБК, к 50 мкл 5% гомогената мягких тканей задних лап крыс или сыворотки крови добавляли 40 мкл 0,485 М соли Мора и инкубировали при 37°С в течение 30 минут. Затем к образцам добавляли 1000 мкл 0,9% раствора ТБК (Serva, Германия) в 50% уксусной кислоте и инкубировали при 80°С в течение 60 минут. После охлаждения измеряли оптическую плотность образцов на спектрофотометре DU-50 (Beckman-Coulter, США) в полумикрокювете при 532 нм. Расчет количества реагирующих с ТБК продуктов проводили на основании значения коэффициента молярной экстинкции $1{,}56 \bullet 105 М^{-1} см^{-1}$. Все измерения проводили в двух параллелях [8].

2.4.4. Модель отека, вызванного конканавалином А

Оценку влияния 5% гелевой лекарственной формы гимантана на вызванное Кон А воспаление проводили в сравнении с 1% гелем диклофенака, диклофенаком натрия и гимантаном на самцах белых аутбредных мышей. Препараты наносили наружно или вводили внутрибрюшинно (диклофенак натрия в дозе 5 мг/кг, гимантан в дозе 10 мг/кг) ежедневно один раз в сутки в течение 10 дней. Животным контрольной группы внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. На 10 день курсового использования препаратов их применяли за 1 час до субплантарного введения (в подушечку задней стопы) раствора Кон А в дозе 100 мкг/20 г массы тела (20 мкл раствора в концентрации 5 мг/мл), в контралатеральную конечность мышам вводили тот же объем изотонического раствора натрия хлорида [26]. Через 1 час после введения Кон А мышей подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации, определяли массу задних лап и подсчитывали индекс реакции воспаления (Ир) по формуле:

$$И_р=(Р_{оп}-Р_к)*100\%/Р_к,$$

где $Р_{оп}$ – масса стопы задней лапы, в подушечку которой вводили Кон А, $Р_к$ – масса стопы задней лапы, в подушечку которой вводили изотонический раствор натрия хлорида.

---

[1] Эксперимент проводился совместно с гл.н.с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», д.б.н., профессором Золотовым Н.Н.

2.4.5. Модель адъювантного артрита

Адъювантный артрит моделировали субплантарным введением 0,1 мл ПАФ в левую заднюю лапу белых аутбредных крыс [50]. Исследование влияния гимантана в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения в сравнении с гимантаном при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг и диклофенаком при внутрибрюшинном введении в дозе 5 мг/кг и при нанесении на заднюю конечность в виде 1% геля на вызванный ПАФ хронический воспалительный процесс у крыс проводили в два этапа. На первом этапе оценивали действие препаратов при их ежедневном применении в течение 14 дней, начиная за сутки до инъекции ПАФ. На втором этапе изучали влияние препаратов при их ежедневном применении в течение 14 дней, начиная с 14 дня после введения ПАФ. Временные схемы применения препаратов на этих этапах исследования выбраны в соответствии с действующими «Методическими рекомендациями по доклиническому изучению нестероидных противовоспалительных лекарственных средств» для данной модификации модели адъювантного артрита [50].

2.4.5.1. Оценка влияния препаратов на вызванный полным адъювантом Фрейнда воспалительный процесс у крыс при их ежедневном применении в течение 14 дней, начиная за сутки до индукции воспаления

На данном этапе оценивали влияние препаратов на отёчность задней конечности, в которую вводили ПАФ, массу тела, массовые коэффициенты органов иммунной системы тимуса и селезёнки и гибель животных (Рисунок 7).

Рисунок 7. Схема эксперимента по оценке влияния препаратов на вызванный полным адъювантом Фрейнда воспалительный процесс у крыс при их ежедневном применении в течение 14 дней, начиная за сутки до индукции воспаления

2.4.5.1.1. Регистрация отёчности левой задней конечности

С помощью инженерного штангенциркуля регистрировали диаметр левых задних конечностей крыс в плюсневой области (Рисунок 8а) и в области скакательного сустава (Рисунок 8б) до введения ПАФ и на 3, 6, 9 и 12 сутки после его введения. Выраженность отёчности левых задних лап оценивали по увеличению диаметра стопы в плюсневой области и диаметра скакательного сустава животных на 3, 6, 9 и 12 сутки после введения ПАФ по сравнению с фоновыми значениями (до введения ПАФ).

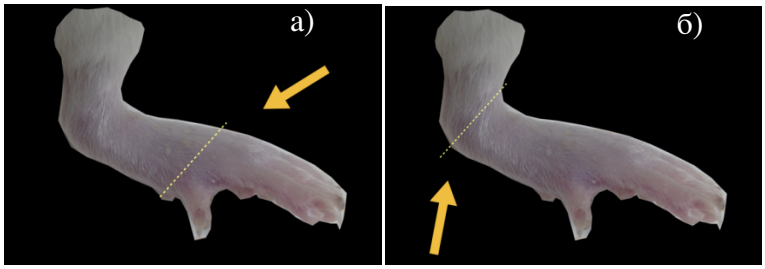

Рисунок 8. Измерение диаметра задней лапы крысы: а) – в плюсневой области; б) – в области скакательного сустава

2.4.5.1.2. Регистрация массы тела животных

Регистрацию массы тела крыс проводили с помощью электронных весов до введения ПАФ и на 3, 6, 9, 12 и 14 сутки после его введения. Выраженность изменения массы тела животных оценивали по сравнению с фоновыми значениями (до введения ПАФ).

2.4.5.1.3. Регистрация массовых коэффициентов тимуса и селезенки

На 14 сутки после индукции воспаления животных подвергали эвтаназии методом декапитации и выделяли органы иммунной системы – тимус и селезенку. Рассчитывали их массовые коэффициенты по формуле: масса органа (мг) / масса крысы (г).

2.4.5.2. Оценка влияния препаратов на вызванный полным адъювантом Фрейнда воспалительный процесс у крыс при их ежедневном применении в течение 14 дней, начиная с 14 суток после индукции воспаления

На втором этапе изучали влияние препаратов на выраженность воспалительного процесса у крыс с вторичной иммунологической реакцией на инъекцию ПАФ, проявлявшейся отёком правой задней конечности, с регистрацией отёчности левой (в которую вводили ПАФ) и правой задних конечностей, температуры кожи, болевой чувствительности задних конечностей, функции суставов задних конечностей в тесте «Вращающийся стержень», массы тела, гематологических показателей и гибели животных (Рисунок 9).

2.4.5.2.1. Регистрация отёчности задних конечностей

С помощью инженерного штангенциркуля регистрировали диаметр левых и правых задних конечностей крыс в области плюсны и скакательного сустава до введения ПАФ и на 7, 14,

21 и 28 сутки после его введения. Выраженность отёчности задних лап оценивали по увеличению диаметра стопы в плюсневой области и диаметра скакательного сустава животных на 7, 14, 21 и 28 сутки после введения ПАФ по сравнению с фоновыми значениями (до введения ПАФ).

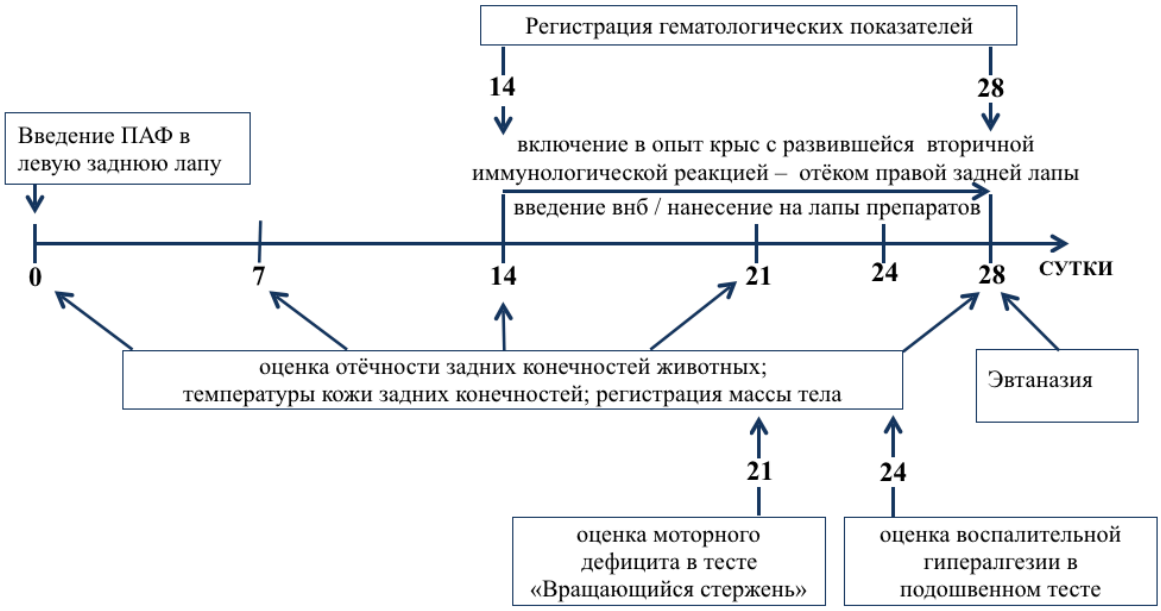

Рисунок 9. Схема эксперимента по оценке влияния препаратов на вызванный полным адъювантом Фрейнда воспалительный процесс у крыс при их ежедневном применении в течение 14 дней, начиная с 14 суток после индукции воспаления

2.4.5.2.2. Регистрация температуры кожи задних конечностей

В день введения ПАФ (до его введения) и на 14, 21 и 28 сутки после его введения регистрировали температуру кожи задних конечностей крыс и рассчитывали её изменение относительно исходных значений (до введения ПАФ). Температуру кожи измеряли инфракрасным электронным термометром (модель DT-633, A&D medical, Япония).

2.4.5.2.3. Регистрация массы тела животных

Регистрацию массы тела крыс проводили с помощью электронных весов до введения ПАФ и на 7, 14, 21 и 28 сутки после его введения. Выраженность изменения массы тела животных оценивали по сравнению с фоновыми значениями (до введения ПАФ).

2.4.5.2.4. Регистрация моторного дефицита

О нарушении функции суставов крыс с моделью воспаления судили, оценивая координацию движений животных в тесте «Вращающийся стержень». Установка «Вращающийся стержень» (Rota Rod, Ugo Basile, Италия) представляет собой барабан 3 см в диаметре, разделенный 6 дисками (25 см в диаметре) на 5 одинаковых частей. Барабан может вращаться в разных скоростных режимах, задаваемых в зависимости от задач исследования и

тяжести состояния животных. Перед тестированием животных адаптировали к условиям методики, осуществляя по 3 последовательных посадки на барабан установки со скоростью 5 об./мин. Тестирование моторного навыка осуществляли при режиме вращения барабана со скоростью от 10 до 30 об./мин (ускорение составляло 1 об. за 10 с), регистрируя латентное время падения крыс в секундах и скорость вращения барабана установки в момент их падения.

2.4.5.2.5. Оценка гипералгезии, вызванной введением полного адъюванта Фрейнда

На 24 сутки после введения ПАФ у крыс оценивали выраженность термической гипералгезии в подошвенном тесте на установке Plantar Test (Hargreave's Method, Ugo Basile, Италия). Животных помещали по отдельности в пластиковые камеры (20×10×14 см) на стеклянной платформе аппарата и в течение 15 минут адаптировали к условиям уставновки. Интенсивность ИК-излучения была равной 66, что соответствовало повышению температуры воздействия от 40 до 50°С в течение 10 секунд. Излучение фокусировали на середине подошвенной поверхности задних лап животных, максимально допустимое время воздействия составляло 20 секунд. Регистрировали латентный период (ЛП) отдёргивания задних лап в ответ на подачу сфокусированного луча инфракрасного света в секундах. Выраженность термической гиперчувствительности у крыс с вызванным введением ПАФ воспалительным процессом оценивали по снижению ЛП отдергивания задних лап животных в ответ на подачу сфокусированного луча инфракрасного света по сравнению с соответствующими показателями группы крыс без экспериментальной патологии.

2.4.5.2.6. Регистрация гематологических показателей[2]

Вызванное ПАФ хроническое иммунное воспаление рассматривают в качестве модели ревматоидного артрита [24, 51]. У пациентов с этим заболеванием часто наблюдаются нарушения гемопоэза, которые могут быть как следствием самого заболевания, так и его лекарственной терапии [6]. В экспериментальных работах у крыс в ответ на субплантарную инъекцию ПАФ также зафиксированы изменения гематологических показателей. Так, в опубликованных индийской группой исследователей [77] материалах на 46 сутки после индукции воспаления зарегистрированы нормохромная анемия, тромбоцитоз и лейкоцитоз. Отечественными фармакологами на 45 сутки после введения ПАФ у крыс также выявлены нормохомная анемия и лейкоцитоз при увеличенном СОЭ, на 105 сутки – пониженное содержание гемоглобина, тромбоцитоз, лейкоцитоз с изменением лейкоцитарной формулы: наблюдались относительные палочкоядерная и сегментоядерная нейтрофилия, эозинофилия при лимфо- и моноцитопении [11].

[2] Эксперимент проводился совместно со ст.н.с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» Алексеевой С.В. и инженером 1-й категории лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» Качаловым К.С.

Гематологические показатели у крыс оценивали на более ранних сроках формирования иммунологического ответа на инъекцию ПАФ – на 14 (до применения препаратов) и 28 сутки после его введения. У животных брали кровь, ампутировав кончик хвоста, удаляя из пробы первые капли для предотвращения загрязнения и возможной ошибки при измерении. На гематологическом анализаторе «Abacus Junior VET» (Diatron, Австрия) регистрировали следующие гематологические показатели: абсолютное содержание лейкоцитов; абсолютное содержание лимфоцитов; абсолютное содержание смеси моноцитов, базофилов и эозинофилов; абсолютное содержание гранулоцитов; относительное (%) содержание лимфоцитов; содержание средних клеток на долю лейкоцитов; относительное (%) содержание гранулоцитов; абсолютное содержание эритроцитов; концентрацию гемоглобина в периферической крови; гематокрит; средний объем эритроцита; среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците в абсолютных единицах; среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците; ширину распределения эритроцитов; абсолютное содержание тромбоцитов; тромбокрит; средний объем тромбоцитов; ширину распределения тромбоцитов.

Также в образцах крови, взятых у животных на 14 и 28 сутки после инъекции ПАФ, определяли лейкоцитарную формулу с помощью компьютезированной микроскопической системы «МЕКОС-Ц1».

2.4.6. Модель термической гипералгезии при остром экссудативном воспалении

Выраженность термической гипералгезии оценивали у аутбредных крыс с острым экссудативным воспалением, вызванным субплантаным введением 0,1 мл 1% раствора каррагенана в левую заднюю лапу [10]. Гимантан и диклофенак в гелевых лекарственных формах для наружного применения наносили на поверхность левой задней лапы или вводили внутрибрюшинно спустя 2 часа после введения альгогена. Болевую чувствительность животных в ответ на термическое раздражение регистрировали спустя 3 часа после введения раствора каррагенана в подошвенном тесте на установке Plantar Test (Hargreave’s Method, Ugo Basile, Италия), как описано в пункте 2.4.5.2.5.

2.4.7. Модель послеоперационной боли

Наркотизированных этаминал-натрием (45 мг/кг, внутрибрюшинно) крыс помещали в положение лежа на животе на хирургические столики, подошвенную поверхность левой задней лапы обрабатывали асептически. На подошвенной поверхности левой задней лапы делали продольный разрез кожи, начинающийся на расстоянии 0,5 см от большеберцовой кости и распространяющийся на 1 см дистально. После этого выделяли короткий сгибатель пальцев (flexor digitorum brevis) (Рисунок 10) и разрезали его в продольном направлении, мышечные связки при этом оставались неповрежденными [92]. Кровотечение, в случае появления, останавливали легким сдавливанием лапы выше разреза в проксимальном направлении. После

надреза мышцы ее возвращали в исходное положение и разрез кожи зашивали горизонтальным матрацным швом (нить – 5-0 polyglactin 910, Ethicon, Somerville, NJ). Место разреза обрабатывали стрептоцидом и раствором бриллиантового зеленого.

Рисунок 10. Проведение хирургической манипуляции

Изучаемые препараты наносили на прооперированную лапу животных и вводили внутрибрюшинно дважды в сутки (в 9.00 и 16.00), начиная со дня операции (0 сутки эксперимента). Животным в группах, получавших комбинированную экспериментальную терапию препаратами как внутрибрюшинно, так и наружно, в утренний сеанс их наносили наружно, в вечерний – вводили внутрибрюшинно. Анальгетическую активность препаратов оценивали по снижению гиперчувствительности прооперированной лапы к механическому и термическому раздражителям, регистрируя чувствительность задних лап за сутки до операции (фоновые значения, -1 сутки опыта), на 1, 2, 3 и 4 сутки после операции. В эти же дни осуществляли регистрацию чувствительности правых задних лап крыс к механическому и термическому раздражению и фиксировали массу тела крыс.

Оценка чувствительности задних лап крыс к механическим раздражителям с помощью волосков фон Фрея. Крыс помещали по отдельности в пластиковые камеры (20×10×14 см) на возвышенной решетчатой платформе с перфорациями размером 1 см^2 и в течение 15 минут адаптировали в условиях покоя. Нить фон Фрея (Aesthesio® Ugo Basile, Италия) с калиброванной силой на сгибание, равной 10 г, предъявляли перпендикулярно в разных местах подошвенной поверхности задних лап животных, исключая области пальцев и скакательного сустава, 10 раз (длительность воздействия составляла 1 секунду). Регистрировали количество отдёргиваний задних лап в ответ на их стимуляцию. Выраженность механической гиперчувствительности прооперированных животных оценивали по увеличению частоты отдергивания левых задних лап в ответ на их стимуляцию по сравнению с фоновым показателем.

Оценка чувствительности задних лап крыс к тепловым раздражителям в подошвенном тесте проводилась, как описано в пункте 2.4.5.2.5. Выраженность термической гиперчувствительности прооперированных животных оценивали по снижению ЛП отдергивания

прооперированных левых задних лап в ответ на подачу сфокусированного луча инфракрасного света по сравнению с фоновым показателем.

2.5. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью языка программирования R версии 3.5.1 [103]. Нормальность распределения данных проверяли критерием Шапиро-Уилка с последующей оценкой межгруппового равенства дисперсий критерием Бартлетта. При статистической обработке экспериментальных данных использовали параметрические и непараметрические методы анализа: дисперсионный анализ (ANOVA), критерий Даннета, критерий Ньюмена-Кейлса, критерий Манна-Уитни, парный критерий Вилкоксона. Результаты в таблицах представлены в зависимости от использования параметрических или непараметрических методов анализа: в случае применения параметрической статистики – как среднее ± ошибка среднего (стандартное отклонение); в случае анализа непараметрическими методами – как медиана, 1 и 3 квартили. Различия между группами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гелевая лекарственная форма для наружного применения является одной из лекарственных форм противоболевых и противовоспалительных препаратов, перспективных для использования в комплексной терапии болезней костно-мышечной системы, так как её физико-химические свойства позволяют обеспечить быстрое проникновение и равномерное распределение действующих веществ в тканях. Работа по созданию гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения проводилась в несколько этапов. Первый этап работы включал блок экспериментов, задачей которого являлся выбор концентрации действующего вещества и вспомогательных компонентов на основании результатов оценки противоболевой и противовоспалительной активности гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения в тестах на грызунах. На втором и третьем этапах работы проводили углубленное фармакологическое исследование противовоспалительной и противоболевой активности гимантана в наиболее перспективной гелевой лекарственной форме для наружного применения.

3.1 Выбор оптимальной по составу гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения

Выбор концентрации гимантана и вспомогательных компонентов его гелевой лекарственной формы для наружного применения осуществляли на основании результатов экспериментального исследования противоболевой и противовоспалительной активности отличающихся своим составом гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения на крысах в формалиновом тесте, позволяющем оценить влияние соединений как на болевую, так и на воспалительную реакцию, вызванную субплантарной инъекцией раствора формалина в заднюю лапу животных, и в тесте каррагенанового отёка.

3.1.1 Выбор концентрации гимантана в гелевой лекарственной форме для наружного применения на основании результатов оценки противоболевой и противовоспалительной активности гелей-прототипов в формалиновом тесте у крыс

На первой стадии экспериментальной работы оценивали анальгетическую и противовоспалительную активность двух гелевых форм-прототипов с минимальным количеством наполнителей (ГПМЦ в качестве гелеобразующего полимера и вода очищенная в качестве консерванта), различающихся между собой концентрацией гимантана: геля-прототипа, содержащего 1% гимантана, и геля-прототипа, содержащего 5% гимантана. Анальгетическую и противовоспалительную эффективность 1% и 5% гелей-прототипов гимантана оценивали в сравнении с 1% гелем диклофенака в формалиновом тесте у самцов белых аутбредных крыс массой 240-270 г.

В момент введения альгогена (0 минута) свидетельствующее о боли поведение крыс во всех опытных группах соответствовало максимальным 3 баллам. На 5 минуте острой, вызванной воздействием формалина на первичные афференты, фазы боли болевая реакция снижалась во всех группах, но значимых различий между ними не наблюдалось. При подсчёте медианы суммарного балла острой фазы боли зарегистрировано её достоверное уменьшение для группы животных, получавших 5% гель-прототип гимантана, относительно контрольной группы, которым на лапу наносили не содержащий гимантан гель-плацебо. 1% гель-прототип гимантана и 1% гель диклофенака не оказывали значимого влияния на суммарный балл острой фазы формалиновой боли (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние 1% и 5% гелей-прототипов гимантана в сравнении с 1% гелем диклофенака при нанесении на заднюю лапу на выраженность болевой реакции в острую фазу формалиновой боли у крыс, баллы

Группа, количество животных в группе	Время после введения раствора формалина		Суммарный балл острой фазы
	0 минута	5 минута	
Контроль, гель-плацебо, n=9	3,0 (3,0; 3,0)	1,0 (1,0; 2,0)	5,0 (4,0; 5,0)
Диклофенак, 1% гель, n=9	3,0 (3,0; 3,0)	1,0 (1,0; 2,0)	4,0 (4,0; 5,0)
Гимантан, 1% гель-прототип, n=11	3,0 (3,0; 3,0)	2,0 (1,0; 2,0)	5,0 (4,0; 5,0)
Гимантан, 5% гель-прототип, n=12	3,0 (2,5; 3,0)	1,0 (0,0; 2,0)	3,5 (3,0; 4,0)*
Примечание: * - $p<0,05$ по сравнению с группой «Контроль, гель-плацебо», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе			

Тоническая, обусловленная развитием воспаления, фаза формалиновой боли в контрольной группе (крысы, которым на лапу наносили гель-плацебо) характеризовалась 2 баллами в каждой отдельной временной точке на протяжении всей длительности регистрации этой фазы (с 20 по 60 минуту после введения раствора формалина) при суммарном показателе, равном 18 баллам (таблица 2).

5% гель-прототип гимантана значимо снижал суммарный балл тонической фазы боли на 27,8%, при этом уменьшение выраженности поведенческих реакций в ответ на введение альгогена для отдельных временных интервалов было значимо только в отношении 35 минуты после введения раствора формалина (таблица 2). 1% гель-прототип гимантана, хотя и замедлял развитие второй фазы формалиновой боли за счёт снижения выраженности поведенческих реакций в ответ на введение альгогена на 20 минуте эксперимента ($p<0,05$), не оказывал

Таблица 2 – Влияние 1% и 5% гелей-прототипов гимантана в сравнении с 1% гелем диклофенака при нанесении на заднюю лапу на выраженность болевой реакции в тоническую фазу формалиновой боли, баллы

Группа, количество животных в группе	Время после введения раствора формалина, минуты									Суммарный балл
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	
Контроль, гель-плацебо, n=9	2,0 (2,0;2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	2,0 (2,0; 3,0)	2,0 (2,0; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	2,0 (1,0; 2,0)	18,0 (17,0; 19,0)
Диклофенак, 1% гель, n=9	1,0* (1,0;2,0)	2,0 (1,0; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	1,0* (1,0; 2,0)	2,0 (1,0; 2,0)	2,0 (1,0; 2,0)	2,0 (1,0; 2,0	1,0 (0,0; 2,0)	1,0 (0,0; 2,0)	14,0* (9,0; 15,0)
Гимантан, 1% гель-прототип, n=11	1,0* (1,0;2,0)	2,0 (2,0; 3,0)	2,0 (1,0; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	2,0 (2,0; 3,0)	2,0 (1,0; 2,0	1,0 (1,0; 2,0)	2,0 (1,0; 2,0)	17,0 (14,0; 18,0)
Гимантан, 5% гель-прототип, n=12	2,0 (0,5;2,0)	1,5 (1,0; 2,0)	2,0 (1,5; 2,0)	1,5* (1,0; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	2,0 (1,5; 2,0	1,5 (1,0; 2,0	1,0 (1,0; 1,5)	2,0 (0,0; 2,0)	13,0* (12,0; 14,5)
Примечание: * - p<0,05 по сравнению с группой «Контроль, гель-плацебо», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе										

значимого влияния на суммарный балл тонической боли (таблица 2). Препарат сравнения 1% гель диклофенака, как и 1% гель-прототип гимантана, значимо замедлял наступление второй фазы формалиновой боли, уменьшая показатель болевой чувствительности, зарегистрированный на 20 минуте опыта. Кроме того, препарат сравнения значимо снижал выраженность болевой реакции крыс на 35 минуте после введения альгогена. Суммарный балл тонической фазы формалиновой боли на фоне 1% геля диклофенака уменьшался на 22,2% ($p<0,05$, таблица 2).

Субплантарное введение раствора формалина приводило к развитию отёка задней лапы крыс, выраженность которого через 4 часа после инъекции соответствовала увеличению диаметра лапы в области плюсны на 1,2 мм в контрольной группе животных. 5 % гель-прототип гимантана, как и препарат сравнения 1 % гель диклофенака, снижал экссудативную реакцию у крыс на 33,3 % ($p<0,05$). 1 % гель-прототип гимантана значимого действия на отёчность поврежденной лапы не оказывал (таблица 3).

Таблица 3 - Влияние 1% и 5% гелей-прототипов гимантана в сравнении с 1% гелем диклофенака при нанесении на заднюю лапу на выраженность вызванного субплантарной инъекцией раствора формалина отёка у крыс

Группа, количество животных в группе	Увеличение диаметра лапы, мм.
Контроль, гель-плацебо, n=11	1,2 (0,8; 2,2)
Диклофенак, 1% гель, n=12	0,8 (0,6; 1,1)*
Гимантан, 1% гель-прототип, n=15	1,0 (0,7; 1,3)
Гимантан, 5% гель-прототип, n=15	0,8 (0,6; 0,9)*
Примечание: * - $p<0,05$ по сравнению с группой «Контроль, гель-плацебо», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе	

Таким образом, на модели двухфазной формалиновой боли у крыс установлено, что 5% гель-прототип гимантана оказывает противоболевое действие как в отношении острой, так и в отношении тонической фаз боли. По выраженности анальгетического действия в отношении тонической фазы боли 5% гель-прототип гимантана не уступает препарату сравнения 1% гелю диклофенака, выгодно отличаясь от него способностью уменьшать боль острой фазы, и превосходит 1% гелевую форму-прототип гимантана. Кроме того, 5% гель-прототип гимантана так же, как и 1% гель диклофенака, снижает воспалительную реакцию, развившуюся в ответ на субплантарную инъекцию раствора формалина. Поэтому 5% концентрация гимантана была выбрана для создания гелевых лекарственных форм для наружного применения на его основе.

3.1.2 Выбор наиболее эффективной 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения среди 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения, различающихся составом вспомогательных веществ

На этой стадии работы сравнивали противоболевую и противовоспалительную эффективность трёх 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения: серии 070916, содержащей на 50,0 г лекарственной формы: гимантана – 2,50 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагина – 0,075 г, нипазола – 0,025 г, воды очищенной до 50,00 г; серии 080916, содержащей на 50,0 г лекарственной формы: гимантана – 2,50 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагина – 0,075 г, нипазола – 0,025 г, ДМСО – 4,00 г, воды очищенной до 50,00 г; серии 090916, содержащей на 50,0 г лекарственной формы: гимантана – 2,50 г, полоксамера Р407 – 8,50 г, нипагина – 0,075 г, нипазола – 0,025 г, воды очищенной до 50,00 г. Их противоболевое действие регистрировали в тесте формалиновой боли, противовоспалительное действие оценивали по способности снижать выраженность формалинового и каррагенанового отёков у самцов белых аутбредных крыс массой 240-270 г.

Оценка противоболевой и противовоспалительной активности 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения серий 070916, 080916 и 090916 в формалиновом тесте у крыс

Как и на стадии экспериментальной работы, описанной в разделе 3.1.1, в момент введения раствора формалина (0 минута) во всех группах свидетельствующее о боли поведение животных характеризовалось максимальными 3 баллами, снижавшимися к 5 минуте острой фазы боли. Хотя значимых различий между группами на 5 минуте после введения альгогена не наблюдалось, минимальное значение медианы болевой реакции было зарегистрировано в группе крыс, которым на заднюю лапу наносили 5% гель гимантана серии 080916. Благодаря этому суммарный балл болевых реакций в острую фазу формалиновой боли в группе животных, получавших 5% гель гимантана серии 080916, был значимо на 15,8% ниже суммарного балла болевых реакций в контрольной группе, что свидетельствует о том, что 5% гель гимантана этой серии оказывает противоболевое действие в отношении острой фазы формалиновой боли (таблица 4). 5% гели гимантана серий 070916 и 090916 на суммарный балл болевых реакций в острую фазу формалиновой боли не влияли (таблица 4).

Свидетельствующее о боли поведение животных контрольной группы в тоническую фазу формалиновой боли характеризовалось 2 (20, 30-60 минуты опыта) и 3 (25 минута опыта) баллами, медиана суммарного балла болевой реакции тонической фазы формалиновой боли в контрольной группе составила 20 баллов (таблица 5).

Таблица 4 – Влияние 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения серий 070916, 080916 и 090916 при нанесении на заднюю лапу на выраженность болевой реакции в острую фазу формалиновой боли у крыс, баллы

Группа, количество животных в группе	Время после введения раствора формалина		Суммарный балл острой фазы
	0 минута	5 минута	
Контроль, гель-плацебо, n=10	3,0 (3,0; 3,0)	2,0 (1,0; 2,0)	4,8 (4,0; 5,0)
Гимантан, 5% гель, серия 070916#, n=11	3,0 (3,0; 3,0)	2,0 (2,0; 2,0)	5,0 (4,0; 5,0)
Гимантан, 5% гель, серия 080916#, n=11	3,0 (2,0; 3,0)	1,0 (1,0; 2,0)	4,0 (3,0; 4,0)*
Гимантан, 5% гель, серия 090916#, n=8	3,0 (3,0; 3,0)	2,0 (0,8; 2,5)	5,0 (3,8; 5,5)

Примечания:
* - p<0,05 по сравнению с группой «Контроль, гель-плацебо», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе;
# - составы гелей гиманатана:
- серия 070916: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, вода очищенная до 50,00 г;
- серия 080916: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, ДМСО – 4,00 г, вода очищенная до 50,00 г;
- серия 090916: гимантан – 2,5 г, полоксамер Р407 – 8,50 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, вода очищенная до 50,00 г

5% гели гимантана серий 080916 и 090916 значимо снижали медиану суммарного балла болевой реакции тонической фазы формалиновой боли соответственно на 25% и 30% по сравнению с контрольной группой. При этом гель гимантана серии 080916 значимо уменьшал выраженность свидетельствующего о боли поведения животных ещё и на 45 минуте, а гель гимантана серии 090916 – на 50 минуте после введения раствора формалина (таблица 5). 5% гель гимантана серии 070916 снижал медиану суммарного балла болевой реакции тонической фазы формалиновой боли на 20%, однако это снижение не достигало уровня p<0,05 (таблица 5).

На фоне субплантарного введения раствора формалина у животных развился отёк задней лапы. Его выраженность в контрольной группе крыс, которым на заднюю лапу наносили гель-плацебо, в этом эксперименте соответствовала 1,85 мм. 5% гелевые лекарственные формы гимантана серий 070916 и 080916 значимо снижали экссудативную реакцию, вызванную введением раствора формалина, соответственно на 53,0% и 44,3% по сравнению с контрольной группой (таблица 6). Уменьшение выраженности воспалительной реакции у крыс на фоне 5% геля гимантана серии 090916 (30,6%, p=0,112) не достигало уровня статистической значимости p<0,05.

Таблица 5 – Влияние 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения серий 070916, 080916 и 090916 при нанесении на заднюю лапу на выраженность болевой реакции в тоническую фазу формалиновой боли у крыс, баллы

Группа, количество животных в группе	Время после введения раствора формалина, минуты									Суммарный балл
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	
Контроль, гель-плацебо, n=10	2,0 (2,0; 2,0)	3,0 (2,0; 3,0)	2,0 (1,0; 2,0)	2,0 (1,0; 3,0)	2,0 (2,0; 3,0)	2,0 (2,0; 3,0)	2,0 (1,0; 2,0)	2,0 (1,0; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	20,0 (17,0; 21,0)
Гимантан, 5% гель, серия 070916#, n=11	2,0 (1,0; 2,0)	2,0 (2,0; 3,0)	2,0 (1,0; 3,0)	2,0 (1,0; 2,0)	2,0 (2,0; 3,0)	2,0 (2,0; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	1,3 (1,0; 2,0)	2,0 (1,0; 2,0)	16,0 (15,5; 18,0)
Гимантан, 5% гель, серия 080916#, n=11	2,0 (1,0; 3,0)	2,0 (1,5; 3,0)	2,0 (1,0; 3,0)	2,0 (1,0; 2,0)	2,0 (1,0; 2,0)	1,0* (1,0; 2,0)	2,0 (1,0; 2,0)	1,0 (1,0; 2,0)	1,0 (1,0; 2,0)	15,0* (14,0; 17,0)
Гимантан, 5% гель, серия 090916#, n=8	2,0 (1,0; 3,0)	2,0 (1,0; 2,0)	1,0 (1,0; 2,0)	1,0 (1,0; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	2,0 (1,0; 2,0)	1,0* (1,0; 1,0)	1,5 (1,0; 2,0)	1,5 (1,0; 2,0)	14,0* (12,0; 17,0)

Примечания:
* - p<0,05 по сравнению с группой «Контроль, гель-плацебо», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе;
# - составы гелей гиманатана:
- серия 070916: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, вода очищенная до 50,00 г;
- серия 080916: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, ДМСО – 4,00 г, вода очищенная до 50,00 г;
- серия 090916: гимантан – 2,5 г, полоксамер Р407 – 8,50 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, вода очищенная до 50,00 г

Таблица 6 – Влияние 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения серий 070916, 080916 и 090916 при нанесении на заднюю лапу на выраженность вызванного субплантарной инъекцией раствора формалина отёка у крыс.

Группа, количество животных в группе	Увеличение диаметра лапы, мм.
Контроль, гель-плацебо, n=10	1,85 (1,18; 2,55)
Гимантан, 5% гель, серия 070916#, n=11	0,79 (0,5; 1,24)*
Гимантан, 5% гель, серия 080916#, n=11	0,75 (0,55; 1,4)*
Гимантан, 5% гель, серия 090916#, n=8	1,29 (1,09; 1,55)
Примечания: * - p<0,05 по сравнению с группой «Контроль, гель-плацебо», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе; # - составы гелей гиманатана: - серия 070916: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, вода очищенная до 50,00 г; - серия 080916: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, ДМСО – 4,00 г, вода очищенная до 50,00 г; - серия 090916: гимантан – 2,5 г, полоксамер Р407 – 8,50 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, вода очищенная до 50,00 г	

Таким образом, результаты исследования противоболевого и противовоспалительного действия 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения серий 070916, 080916 и 090916 в формалиновом тесте у крыс свидетельствуют о том, что только 5% гель гимантана серии 080916 обладает способностью снижать боль как в острую, так и в тоническую фазу формалиновой боли, и 5% гели гимантана серий 070916 и 080916 значимо снижают отёк лапы у крыс, вызванный субплантарной инъекцией раствора формалина. Поэтому дальнейший выбор 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения проводили между гелями гимантана серий 080916 и 070916, различающимися между собой наличием активатора всасывания – ДМСО.

Оценка противовоспалительной активности 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения серий 070916 и 080916 в сравнении с 1% гелем диклофенака в тесте каррагенанового отёка лапы у крыс

Субплантарное введение в заднюю лапу самцов белых аутбредных крыс массой 240-270 г 1% раствора каррагенана вызывало развитие острой экссудативной реакции, выраженность которой была максимальна через 2 часа после введения флогогена. 5% гелевая лекарственная форма гимантана для наружного применения серии 080916 значимо снижала выраженность отёчности лап животных через 2 и 4 часа после введения раствора каррагенана: через 2 часа после индукции воспаления отёчность лап крыс была на 29,2% меньше, чем в контрольной группе; через

4 часа выраженность воспалительной реакции снижалась на 50% по сравнению с контрольной группой. Через 1 и 3 часа после введения раствора каррагенана степень отёчности лап животных, которым на заднюю лапу наносили 5% гель гимантана серии 080916, по сравнению с контрольной группой уменьшалась соответственно на 29,4% и 10,5%, однако это уменьшение не достигало уровня статистической значимости $p<0,05$ ($p\leq0,1$) (таблица 7).

5% гелевая лекарственная форма гимантана для наружного применения серии 070916 снижала выраженность воспалительной реакции только через 4 часа после введения раствора каррагенана, значимо уменьшая отёчность лап крыс на 18,2% по сравнению с контрольной группой животных (таблица 7).

Препарат сравнения 1% гель диклофенака значимо снижал выраженность отёка лап крыс через 2 часа после введения раствора каррагенана на 33,3%, через 3 часа – на 31,6% и через 4 часа – на 40,9% по сравнению с контрольной группой (таблица 7). Значимых различий между противовоспалительным эффектом 1% геля диклофенака и 5% геля гимантана серии 080916 в тесте каррагенанового отёка у крыс не выявлено ($p>0,05$, критерий Манна-Уитни).

Таблица 7 – Влияние 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения серий 070916 и 080916 в сравнении с 1% гелем диклофенака при нанесении на заднюю лапу на выраженность каррагенанового отёка у крыс.

Группа, количество животных в группе	Увеличение диаметра поврежденной лапы, мм, на фоне введения каррагенана через:			
	1 час	2 часа	3 часа	4 часа
Контроль, гель-плацебо, n=8	1,7 (1,2; 2,0)	2,4 (1,9; 3,0)	1,9 (1,6; 2,5)	2,2 (1,8; 2,3)
Диклофенак, 1% гель, n=10	1,4 (1,2; 1,8)	1,6 (1,2; 1,9)*	1,3 (1,0; 1,4)*	1,3 (1,2; 1,8)*
Гимантан, 5% гель, серия 070916#, n=11	2,0 (1,5; 2,5)	2,4 (2,0; 2,7)	2,0 (1,90; 2,4)	1,8 (1,3; 1,9)*
Гимантан, 5% гель, серия 080916#, n=11	1,2 (0,9; 1,3)	1,7 (1,5; 2,0)*	1,7 (1,1; 1,9)	1,1 (1,0; 1,5)*

Примечания:
* - $p<0,05$ по сравнению с группой «Контроль, гель-плацебо», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе;
# - составы гелей гиманатана:
- серия 070916: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, вода очищенная до 50,00 г;
- серия 080916: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, ДМСО – 4,00 г, вода очищенная до 50,00 г

Таким образом, на основании результатов проведённого исследования противоболевой и противовоспалительной активности 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения серий 070916, 080916 и 090916 в формалиновом тесте и тесте каррагенанового отёка

у крыс наиболее эффективной является 5% гелевая лекарственная форма гимантана для наружного применения серии 080916, содержащая в своём составе ДМСО в качестве активатора всасывания.

3.1.3 Оценка влияния активатора всасывания диметилсульфоксида на выраженность противоболевой и противовоспалительной активности 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения в формалиновом тесте у крыс

Ввиду удобства технологического процесса сотрудниками отдела готовых лекарственных форм ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» для дальнейших исследований была изготовлена 5% гелевая лекарственная форма гимантана для наружного применения серии 130317 с увеличенным содержанием ДМСО по сравнению с гелевой формой гимантана серии 080916. 5% гелевая лекарственная форма гимантана для наружного применения серии 130317 содержит на 50,0 г лекарственной формы: гимантана – 2,50 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагина – 0,075 г, нипазола – 0,025 г, ДМСО – 5,00 г, воды очищенной до 50,00 г. Известно, что ДМСО проявляет противовоспалительную активность и в неразведенном виде используется в качестве лекарственного препарата «Димексид» [44], в связи с чем задачей следующей стадии экспериментального исследования явилась оценка выраженности противоболевого и противовоспалительного действия ДМСО в 5% гелевой лекарственной форме гимантана для наружного применения. Для реализации этой задачи сравнивалось противоболевое и противовоспалительное действие 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения серии 130317 и серии 100317, соответствующей составу 5% геля гимантана серии 070916, и гелей плацебо серий 141017 и 110317, отличающихся, соответственно, от 5% гелей гимантана серий 130317 и 100317 отсутствием действующего вещества. 5% гелевая лекарственная форма гимантана для наружного применения серии 100317 содержит на 50,0 г лекарственной формы: гимантана – 2,50 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагина – 0,075 г, нипазола – 0,025 г, воды очищенной до 50,00 г.

Противоболевое и противовоспалительное действие 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения серий 130317 и 100317 и соответствующих им гелей-плацебо оценивалось в формалиновом тесте у крыс линии Вистар массой 270-300 г с включением в опыт контрольной группы животных, которым на заднюю лапу не наносили ни 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения, ни соответствующих им гелей-плацебо, и группы крыс, которым на заднюю лапу наносили препарат сравнения 1% гель диклофенака.

В ответ на субплантарное введение раствора формалина в заднюю лапу у крыс развивалась острая фаза боли, которая характеризовалась в группе контрольных животных максимальными 3

баллами в момент введения альгогена, снижаясь к 5 минуте наблюдения до 2 баллов. Суммарный балл острой фазы формалиновой боли для контрольной группы составил 5 баллов. Из изучаемых гелевых лекарственных форм для наружного применения только 5% гель гимантана серии 130317 на уровне тенденции ($p<0,1$) на 20% снижал выраженность острой фазы формалиновой боли по сравнению с контрольной группой (таблица 8).

Таблица 8 – Влияние 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения серий 130317 и 100317 и соответствующих им гелей-плацебо серий 141017 и 110317 в сравнении с 1% гелем диклофенака при нанесении на заднюю лапу на выраженность болевой реакции в острую фазу формалиновой боли у крыс, баллы

Группа, количество животных в группе	Время после введения раствора формалина		Суммарный балл острой фазы
	0 мин	5 мин	
Контроль, n=10	3,0 (2,3; 3,0)	2,0 (1,3; 3,0)	5,0 (4,0; 5,0)
Гель-плацебо, серия 110317#, n=9	3,0 (2,1; 3,0)	3,0 (2,0; 3,0)	5,0 (4,1; 6,0)
Гель гимантана, серия 100317#, n=10	3,0 (1,3; 3,0)	2,0 (1,3; 2,0)	5,0 (3,6; 5,0)
Гель-плацебо серия 141017#, n=8	3,0 (1,8; 3,0)	2,0 (2,0; 3,0)	5,0 (4,3; 5,0)
Гель гимантана, серия 130317#, n=8	2,5 (1,9; 3,0)	1,8 (1,0; 2,3)	4,0 (3,9; 5,0)@
1% гель диклофенака, n=8	3,0 (3,0; 3,0)	2,0 (2,0; 2,0)	5,0 (5,0; 5,0)

Примечания:
@ - $p\leq0,1$ по сравнению по сравнению с контролем, критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе;
# - составы гелей гиманатана и гелей-плацебо:
- гель гимантана серии 100317: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, вода очищенная до 50,00 г;
- гель гимантана серии 130317: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, ДМСО – 5,00 г, вода очищенная до 50,00 г;
- гель-плацебо серии 110317: ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, вода очищенная до 50,00 г;
- гель-плацебо серии 141017: ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, ДМСО – 5,00 г, вода очищенная до 50,00 г

Тоническая фаза формалиновой боли в контрольной группе характеризовалась суммарным показателем, равным 19,8 балла (таблица 9). Оба изучаемые геля-плацебо не оказывали значимого влияния на выраженность тонической фазы формалиновой боли; на их фоне отмечено незначительное снижение суммарного балла тонической фазы боли по сравнению с контрольными животными (таблица 9).

В группе крыс, которым на задние лапы наносили 5% гелевую наружную лекарственную форму гимантана серии 130317, суммарный балл тонической фазы боли значимо снижался на 11,6% по сравнению с контрольными животными и на уровне тенденции ($p \leq 0,1$) на 5,4% – по сравнению с соответствующей группой плацебо серии 141017 (таблица 9). В группе животных, получавших 5% гель гимантана серии 100317, суммарный балл тонической фазы боли также уменьшался: на 12,6% по сравнению с группой контрольных животных ($p < 0,05$) и на 6,5% по сравнению с гелем-плацебо серии 110317 ($p < 0,05$) (таблица 9). Гель гимантана серии 100317 значимо снижал выраженность свидетельствующих о боли поведенческих реакций для отдельных временных интервалов на 30 и 55 минутах после введения раствора формалина по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы (таблица 9). Гель гимантана серии 130317 также уменьшал выраженность свидетельствующих о боли поведенческих реакций на 30 и 55 минутах наблюдения по сравнению с контрольной группой, однако уменьшение регистрируемых показателей не достигало уровня статистической значимости и носило характер тенденции ($p \leq 0,1$). Суммарный балл тонической фазы формалиновой боли на фоне препарата сравнения 1% геля диклофенака значимо уменьшался на 12,6% по сравнению с контрольной группой (таблица 9).

Субплантарное введение раствора формалина в заднюю лапу крыс приводило к развитию её отёка, выраженность которого через 5 часов после инъекции соответствовала увеличению диаметра лапы контрольных животных на 1,5 мм (таблица 10). 5% гель гимантана серии 130317 уменьшал выраженность воспаления на 33,3% по сравнению с контрольной группой ($p = 0,058$). Его противовоспалительный эффект не отличался от эффекта 1% геля диклофенака ($p = 0,639$, критерий Манна-Уитни), также снижавшего отёчность на 33,3% по сравнению с контрольной группой (таблица 10). На фоне 5% геля гимантана серии 100317 не было зарегистрировано значимого уменьшения воспалительной реакции животных. Гели-плацебо серий 141017 и 110317 не оказывали влияния на отёчность лап крыс (таблица 10).

Таблица 9 – Влияние 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения серий 130317 и 100317 и соответствующих им гелей-плацебо серий 141017 и 110317 в сравнении с 1% гелем диклофенака при нанесении на заднюю лапу на выраженность болевой реакции в тоническую фазу формалиновой боли у крыс, баллы

Группа, количество животных в группе	Время после введения раствора формалина, мин									Суммарный балл
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	
Контроль, n=10	2,5 (2,0; 3,0)	3,0 (2,0; 3,0)	3,0 (2,0; 3,0)	2,5 (2,0; 3,0)	2,0 (2,0; 3,0)	2,0 (2,0; 2,8)	2,0 (2,0; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	19,8 (18,0; 22,3)
Гель-плацебо, серия 110317#, n=9	2,0 (2,0; 3,0)	2,0 (2,0; 3,0)	3,0 (2,3; 3,0)	3,0 (2,3; 3,0)	2,0 (2,0; 3,0)	2,0 (2,0; 3,0)	2,0 (2,0; 2,0)	1,5 (1,0; 2,0)	2,0 (1,3; 2,0)	18,5 (18,0; 22,0)
Гель гимантана, серия 100317#, n=10	2,0 (1,5; 2,8)	2,5 (2,0; 3,0)	2,0* (2,0; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	2,0 (1,3; 2,0)	2,0 (2,0; 2,8)	2,0 (1,0; 2,0)	1,0* (1,0; 2,0)	1,0 (1,0; 2,0)	17,3*& (15,3; 19,5)
Гель-плацебо, серия 141017#, n=8	3,0 (2,5; 3,0)	2,0 (2,0; 3,0)	2,0 (2,0; 3,0)	3,0 (2,5; 3,0)	2,0 (2,0; 2,0)	2,0 (1,5; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0)	1,5 (1,0; 2,0)	18,5 (18,0; 21,5)
Гель гимантана, серия 130317#, n=8	2,5 (1,8; 3,0)	2,0 (1,0; 3,0)	2,0@ (1,9; 2,3)	2,0 (1,8; 3,0)	2,0 (1,8; 2,0)	2,0 (1,0; 2,3)	1,5 (1,0; 2,0)	2,0@ (1,0; 2,0)	2,0 (1,0; 2,0)	17,5*$ (14,9; 19,3)
1% гель диклофенака, n=8	2,0 (1,8; 3,0)	2,0@ (2,0; 2,3)	2,3 (2,0; 3,0)	2,0@ (1,8; 2,0)	2,0@ (1,0; 2,0)	2,0 (1,0; 2,0)	2,0 (1,0; 2,0)	2,0 (1,8; 2,0)	1,0 (1,0; 2,0)	17,3* (15,3; 19,5)

Примечания:
* - p<0,05 по сравнению с контролем, критерий Манна-Уитни; @ - p≤0,1 по сравнению с контролем, критерий Манна-Уитни; & - p≤0,05 по сравнению с гелем-плацебо 110317, критерий Манна-Уитни; $ - p≤0,1 по сравнению с гелем-плацебо серии 141017, критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе;
# - составы гелей гиманатана и гелей-плацебо:
- гель гимантана серии 100317: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, вода очищенная до 50,00 г;
- гель гимантана серии 130317: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, ДМСО – 5,00 г, вода очищенная до 50,00 г;
- гель-плацебо серии 110317: ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, вода очищенная до 50,00 г;
- гель-плацебо серии 141017: ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, ДМСО – 5,00 г, вода очищенная до 50,00 г

Таблица 10 – Влияние 5% гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения серий 130317 и 100317 и соответствующих им гелей-плацебо серий 141017 и 110317 в сравнении с 1% гелем диклофенака при нанесении на заднюю лапу на выраженность формалинового отёка у крыс

Группа, количество животных в группе	Увеличение диаметра лапы, мм
Контроль, n=10	1,5 (1,3; 1,6)
Гель-плацебо, серия 110317#, n=9	1,3 (1,2; 2,0)
Гель гимантана, серия 100317#, n=10	1,2 (0,9; 1,3)
Гель-плацебо, серия 141017#, n=8	1,5 (1,4; 1,5)
Гель гимантана, серия 130317#, n=8	1,0 (0,6; 1,4) @
1% гель диклофенака, n=8	1,0 (0,9; 1,0) *

Примечания:
* - p≤0,05 по сравнению с контролем, критерий Манна-Уитни; @ - p=0,058 по сравнению с контролем, критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе;
# - составы гелей гиманатана и гелей-плацебо:
- гель гимантана серии 100317: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, вода очищенная до 50,00 г;
- гель гимантана серии 130317: гимантан – 2,5 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, ДМСО – 5,00 г, вода очищенная до 50,00 г;
- гель-плацебо серии 110317: ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, вода очищенная до 50,00 г;
- гель-плацебо серии 141017: ГПМЦ – 1,00 г, нипагин – 0,075 г, нипазол – 0,025 г, ДМСО – 5,00 г, вода очищенная до 50,00 г

Таким образом, в формалиновом тесте у крыс линии Вистар установлено, что 5% гелевые лекарственные формы гимантана для наружного применения серий 130317 и 100317 оказывают противоболевое действие в отношении тонической фазы формалиновой боли, не уступая противоболевому эффекту 1% геля диклофенака, однако только 5% гель гимантана серии 130317, содержащий в качестве активатора всасывания ДМСО, способен снижать выраженность острой фазы формалиновой боли. 5% гель гимантана серии 130317 проявляет противовоспалительную активность, по выраженности сопоставимую с противовоспалительным эффектом 1% геля диклофенака, а 5% гель гимантана серии 100317 в этом эксперименте не обнаружил значимого влияния на вызванную раствором формалина отёчность лап крыс. Гели-плацебо серий 141017 и 110317, соответствующие 5% гелям гимантана серий 130317 и 100317, в формалиновом тесте у крыс линии Вистар анальгетического и противовоспалительного действия не оказывают. Следовательно, количества ДМСО, добавляемого в 5% гелевую лекарственную форму гимантана для наружного применения, недостаточно для проявления его собственных фармакологических эффектов, однако оно обуславливает усиление противоболевой и противовоспалительной

активности действующего вещества гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения серии 130317 по сравнению с серией 100317, не содержащей ДМСО в своём составе.

Таким образом, в результате проведённых на первом этапе работы и описанных выше экспериментов по оценке противоболевого и противовоспалительного действия гелевых лекарственных форм гимантана для наружного применения в качестве наиболее перспективной для дальнейших исследований выбрана 5% гелевая лекарственная форма гимантана для наружного применения, содержащая на 50,0 г лекарственной формы: гимантана – 2,50 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагина – 0,075 г, нипазола – 0,025 г, ДМСО – 5,00 г, воды очищенной до 50,00 г (серии 130317, 150118, 190219).

Полученные результаты опубликованы в работах с соавторами:
[13, 17, 19, 30, 32, 33]

3.2 Оценка противовоспалительной активности 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на моделях острого и хронического воспаления у грызунов

Второй этап экспериментального исследования посвящён оценке противовоспалительной активности выбранной на первом этапе работы 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения (содержит на 50,0 г лекарственной формы: гимантана – 2,50 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагина – 0,075 г, нипазола – 0,025 г, ДМСО – 5,00 г, воды очищенной до 50,00 г) в сравнении с гимантаном и диклофенаком при внутрибрюшинном введении и 1% гелем диклофенака при наружном применении на моделях острой экссудативной воспалительной реакции – в тестах каррагенанового отёка у крыс и вызванного конканавалином А (Кон А) отёка у мышей – и адъювантного артрита, вызванного инъекцией полного адъюванта Фрейнда (ПАФ), у крыс. В экспериментальное исследование включены группы гимантана при внутрибрюшинном введении для того, чтобы сопоставить выраженность действия гимантана в гелевой лекарственной форме для наружного примененния с эффектом изучаемого препарата при системном введении. Ввиду этого, препарат сравнения диклофенак также использовался в опытах в виде гелевой лекарственной формы для наружного применения и при введении внутрибрюшинно.

3.2.1 Влияние 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на отёчность лап и уровень продуктов свободно-радикального окисления липидов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, в гомогенате мягких тканей лап крыс с каррагенановым отёком

В тесте каррагенанового отёка у самцов белых аутбредных крыс массой 270-320 г оценивали влияние 5% гелевой лекарственной формы гимантана серии 150118 в сравнении с 1% гелевой лекарственной формой диклофенака при однократном наружном нанесении на заднюю лапу животных, в которую вводили раствор каррагенана, гимантаном в дозе 20 мг/кг и диклофенаком в дозе 10 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении на выраженность экссудативного воспаления и уровень продуктов свободно-радикального окисления (СРО) липидов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), в гомогенате мягких тканей лап крыс с каррагенановым отёком.

У крыс с каррагенановым отёком левой задней лапы, не получавших препараты, её отёчность нарастала в течение 3 часов после введения флогогена, достигая увеличения диаметра стопы, равного 1,9 мм, и незначительно снижалась на 4 часу опыта (таблица 11). На фоне изучаемого 5% геля гимантана зарегистрировано значимое уменьшение отёчности лап животных через 2, 3 и 4 часа после введения раствора каррагенана, составившее соответственно 29%, 52% и 29% относительно группы «Каррагенановый отёк». Эффект 5% геля гимантана значимо не отличался ($p>0,05$, критерий Манна-Уитни) от эффекта 1% геля диклофенака, снижавшего отёк лап крыс через 2, 3 и 4 часа после введения флогогена соответственно на 36%, 53% и 41% по сравнению с группой «Каррагенановый отёк» (таблица 11). Антиэкссудативное действие гимантана в дозе 20 мг/кг и диклофенака в дозе 10 мг/кг при внутрибрюшинном введении было менее выраженным: гимантан значимо уменьшал отёчность лап крыс на 26% через 3 часа после введения флогогена; его эффект был сопоставим с эффектом диклофенака, который также значимо подавлял экссудацию только через 3 часа после введения раствора каррагенана на 31% (таблица 11).

О выраженном воспалительном процессе в мягких тканях лап крыс с каррагенановым отёком свидетельствует увеличенная в 4,4 раза концентрация продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, в группе «Каррагенановый отёк» по сравнению с группой интактных крыс, зарегистрированная через 5 часов после индукции воспаления. 5% гель гимантана на 62% ($p<0,05$) уменьшал уровень продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, в гомогенате мягких тканей лап крыс по сравнению с группой животных с экспериментальной патологией, не получавшей терапии, превосходя 1% гель диклофенака ($p<0,05$), который значимо снижал концентрацию продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, на 17%. Гимантан при внутрибрюшинном введении в дозе 20 мг/кг так же, как и 1% гель диклофенака, уменьшал

уровень продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, на 17% ($p<0,05$) по сравнению с группой «Каррагенановый отёк», а диклофенак при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг на уровень изучаемых продуктов СРО липидов в гомогенате мягких тканей лап крыс влияния не оказывал (таблица 11).

Таблица 11. Влияние гимантана и диклофенака при нанесении на заднюю лапу в виде гелевых лекарственных форм и при внутрибрюшинном введении на отёк лапы и концентрацию продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, в гомогенате мягких тканей лап крыс с каррагенановым отёком

Группа, количество животных в группе	Изменение диаметра стопы левой задней конечности крысы (мм) относительно фона после введения каррагенана через:				Концентрация продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, мкмоль/л
	1 час	2 часа	3 часа	4 часа	
Интактные животные, n=11	0,0 (-0,2; 0,1)*	0,0 (0,0;0,1)*	0,0 (-0,1; 0,0)*	0,1 (0,0; 0,1)*	0,03 (0,02; 0,05)*
Каррагенановый отёк, n=11	0,9 (0,5;1,1)	1,4 (1,15; 1,7)	1,9 (1,7; 2,4)	1,7 (1,2; 2,2)	0,13 (0,13; 0,14)#
Каррагенан + Гимантан 20 мг/кг, n=9	0,8 (0,3; 1,0)	1,3 (1,1; 1,6)	1,4 (1,2; 1,5)*	1,3 (1,2; 1,8)	0,11 (0,09; 0,13)*#
Каррагенан + Гимантан 5%гель, n=9	0,6 (0,2; 1,0)	1,0 (0,6; 1,4)*	0,9 (0,9; 1,2)*	1,2 (0,6; 1,4)*	0,05 (0,02; 0,08)*
Каррагенан + Диклофенак 10 мг/кг, n=9	0,9 (0,4; 1,2)	1,2 (1,1; 1,7)	1,3 (1,2; 1,8)*	1,2 (1,1; 1,4)	0,14 (0,11; 0,15)#
Каррагенан + Диклофенак 1%гель, n=9	0,9 (0,2; 1,0)	0,9 (0,5; 1,0)*	0,9 (0,3;1,35)*	1,0 (0,7; 1,4)*	0,11 (0,08; 0,14)*#
Примечание: * - $p<0,05$ по сравнению с группой «Каррагенановый отёк», критерий Манна-Уитни; # - $p<0,05$ по сравнению с группой «Гимантан, 5% гель», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе					

Дополнительно было изучено влияние гимантана и диклофенака в гелевых лекарственных формах для наружного применения на концентрацию продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, в сыворотке крови крыс с каррагенановым отёком лапы через 5 часов после индукции воспаления. Установлено, что в сыворотке крови крыс с каррагенановым отёком уровень продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, был повышен на 23,1% по сравнению с группой животных без патологии. Ни 5% гель гимантана, ни 1% гель диклофенака не влиял на концентрацию продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, в сыворотке крови крыс с каррагенановым отёком лапы (таблица 12). Отсутствие системного антиоксидантного действия препаратов в гелевых лекарственных формах для наружного применения при однократном накожном нанесении свидетельствует о низкой биодоступности препаратов. Так, для 1% геля диклофенака согласно инструкции она составляет 6% [44].

Таблица 12 – Влияние гимантана и диклофенака в гелевых лекарственных формах при однократном наружном нанесении на заднюю конечность крыс с каррагенановым отёком на концентрацию продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, в сыворотке крови (мкмоль/л)

Группа, количество животных в группе	Концентрация продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, в сыворотке крови крыс с каррагенановым отёком лапы
Интактные животные, n=11	0,13 (0,12; 0,13)*
Каррагенановый отёк, n=11	0,16 (0,14; 0,18)
Каррагенан + Гимантан 5% гель, n=9	0,16 (0,14; 0,18)
Каррагенан + Диклофенак 1% гель, n=9	0,15 (0,15; 0,16)
Примечание: * - $p<0,05$ по сравнению с группой «Каррагенановый отёк», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе	

Таким образом, гимантан в 5% гелевой лекарственной форме при однократном наружном нанесении на заднюю конечность животных проявляет сопоставимый с 1% гелем диклофенака антиэкссудативный эффект на модели каррагенанового отёка у крыс и по выраженности противовоспалительного действия не уступает гимантану в дозе 20 мг/кг и диклофенаку в дозе 10 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении. 5% гель гимантана снижает повышенный уровень продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, в гомогенатах мягких тканей лап крыс с каррагенановым отёком, превосходя по этой способности 1% гель диклофенака и гимантан при внутрибрюшинном введении, тогда как диклофенак при внутрибрюшинном введении не уменьшает концентрацию продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, в гомогенатах мягких тканей лап крыс с каррагенановым отёком. При этом 5% гель гимантана не влияет на их концентрацию в сыворотке крови животных с моделью экссудативного воспаления.

3.2.2 Влияние 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на отёк стопы мышей, вызванный конканавалином А

На модели отёка стопы у мышей, вызванного Кон А, оценивали влияние 5% гелевой лекарственной формы гимантана серии 150118 в сравнении с 1% гелем диклофенака, диклофенаком и гимантаном при внутрибрюшинном введении при применении препаратов в течение 10 дней.

Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что и гимантан, и диклофенак при обоих путях введения значимо снижали степень отёчности лап мышей. Наиболее выраженное противовоспалительное действие проявляли гимантан и диклофенак в гелевых лекарственных формах для наружного применения, значимо уменьшавшие индекс реакции на Кон А соответственно на 48,4% и 47,2% по сравнению с контрольной группой (таблица 13). Гимантан в дозе 10 мг/кг и диклофенак в дозе 5 мг/кг при внутрибрюшинном введении в течение 10 дней снижали индекс реакции на Кон А соответственно на 29,5% и 22,6% (таблица 13).

Таблица 13 – Влияние гимантана и диклофенака при наружном нанесении гелевых лекарственных форм на заднюю конечность и внутрибрюшинном введении в течение 10 дней на отёк стопы у мышей, вызванный конканавалином А

Группа, количество животных в группе	Индекс реакции, %
Контроль, физ. р-р внутрибрюшинно (10 дней) + Кон А, n=13	34,83±1,83 (6,59)
Гимантан внутрибрюшинно, 10 мг/кг (10 дней) + Кон А, n=12	24,56±2,05 (7,09)*
Гимантан, 5% гель (10 дней) + Кон А, n=11	18,39±2,49 (8,26)*
Диклофенак внутрибрюшинно, 5 мг/кг (10 дней) + Кон А, n=13	26,96±3,24 (11,67)*
Диклофенак, 1% гель (10 дней) + Кон А, n=8	17,99±2,11 (5,96)*
Примечание: * - $p<0,05$ по сравнению с контрольной группой, критерий Ньюмена-Кейлса; данные представлены в виде среднего ± ошибка среднего (Стандартное отклонение), n – количество животных в группе; # - Индекс реакции рассчитывали по формуле: $И_р=(Р_{оп}-Р_к)*100\%/Р_к$, где $Р_{оп}$ – масса стопы задней лапы, в подушечку которой вводили Кон А, $Р_к$ – масса стопы задней лапы, в подушечку которой вводили изотонический раствор натрия хлорида	

Таким образом, результаты эксперимента по оценке влияния 5% гелевой лекарственной формы гимантана серии 150118 в сравнении с 1% гелем диклофенака, диклофенаком и гимантаном при внутрибрюшинном введении на модели отёка стопы у мышей, вызванного Кон А, свидетельствуют о том, что 5% гель гимантана серии 150118 проявляет выраженное противовоспалительное действие и по антиэкссудативной эффективности не уступает как 1% гелю диклофенака, так и диклофенаку в дозе 5 мг/кг и гимантану в дозе 10 мг/кг при ежедневном десятидневном применении.

3.2.3 Влияние 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на вызванный полным адъювантом Фрейнда воспалительный процесс у крыс

Исследование влияния гимантана в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения в сравнении с гимантаном при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг и диклофенаком при внутрибрюшинном введении в дозе 5 мг/кг и при нанесении на заднюю конечность белых аутбредных крыс в виде 1% геля на вызванный ПАФ хронический воспалительный процесс у крыс проводили в два этапа. На первом этапе оценивали эффект препаратов при их ежедневном применении в течение 14 дней, начиная за сутки до инъекции ПАФ, с регистрацией отёчности конечности, в которую вводили ПАФ, массы тела животных, массовых коэффициентов органов иммунной системы тимуса и селезёнки и гибели животных. На втором этапе изучали влияние препаратов при их ежедневном применении в течение 14 дней, начиная с 14 дня после введения ПАФ, на выраженность воспалительного процесса у крыс с вторичной иммунологической реакцией на инъекцию ПАФ с регистрацией отёчности левой (в которую вводили ПАФ) и правой задних конечностей, температуры кожи, болевой чувствительности задних конечностей, функции суставов задних конечностей в тесте «Вращающийся стержень» и гематологических показателей животных.

3.2.3.1 Влияние 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на вызванный полным адъювантом Фрейнда воспалительный процесс у крыс при ежедневном применении в течение 14 дней, начиная за сутки до индукции воспаления

У крыс с экспериментальным воспалением, не получавших препаратов (группа активного контроля), наблюдалась отёчность левой задней конечности, в которую вводили ПАФ, на протяжении всего периода регистрации (12 суток после инъекции ПАФ). Максимальная выраженность отёка левой стопы была зафиксирована на 3 сутки после введения ПАФ и соответствовала увеличению её диаметра в плюсневой области на 2,0 мм относительно фоновых значений (до введения ПАФ). При регистрации диаметра левой задней стопы в плюсневой области у животных группы активного контроля на 6, 9 и 12 сутки после введения ПАФ зафиксировано постепенное снижение выраженности отёчного синдрома: разница диаметра стоп с фоновыми значениями составляла 1,2 мм на 6, 1,15 мм на 9 и 1,1 мм на 12 сутки. Во все дни измерения диаметра стопы крыс в плюсневой области разница изменения диаметра стопы животных группы активного контроля относительно фоновых показателей была значимой по сравнению с группой крыс без экспериментальной патологии (группа пассивного контроля) (таблица 14).

После субплантарной инъекции ПАФ отёк левой задней конечности крыс распространялся на скакательный сустав. Его отёчность у животных группы активного контроля нарастала в течение 6 суток после введения ПАФ. Увеличение медианы диаметра скакательного сустава на 6

сутки после индукции воспаления в группе активного контроля составляло 2,8 мм относительно фонового значения, после чего отёк спадал. Его минимальная выраженность наблюдалась на 12 день после введения ПАФ и соответствовала увеличению диаметра скакательного сустава на 1,8 мм по сравнению с показателем до моделирования экспериментальной патологии (таблица 15).

5% гель гимантана серии 130317 значимо уменьшал медиану увеличения диаметра стопы крыс в плюсневой области на 50,0% и 20,8%, соответственно, на 3 и 6 сутки после введения ПАФ по сравнению с показателями группы активного контроля (таблица 15). Гимантан в лекарственной форме для наружного применения значительно снижал отёк скакательного сустава крыс, уменьшая медиану увеличения диаметра скакательного сустава по сравнению с соответствующими значениями в группе активного контроля во все дни его регистрации на 50,0%-71,4% ($p<0,05$) (таблица 15).

Противовоспалительный эффект гимантана в лекарственной форме для наружного применения не уступал эффекту препарата при его внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг. Гимантан при внутрибрюшинном введении крысам в дозе 10 мг/кг значимо снижал медиану изменения диаметра стопы животных в плюсневой области на 6 сутки после введения ПАФ на 12,5% и медиану изменения диаметра скакательного сустава на 50,0% и 62,5% соответственно на 3 и 6 сутки после введения ПАФ по сравнению с показателями группы активного контроля (таблицы 14, 15).

Таблица 14. Изменение диаметра стопы левой задней конечности крыс с вызванным полным адъювантом Фрейнда воспалительным процессом

Группа, количество животных в группе на начало опыта	Изменение диаметра стопы левой задней конечности крыс в плюсневой области (мм) относительно фоновых значений после введения полного адъюванта Фрейнда на:			
	3 сутки	6 сутки	9 сутки	12 сутки
Пассивный контроль, n=8	0,00 (0,00; 0,10)	0,00 (-0,05; 0,25)	0,00 (-0,10; 0,15)	0,05 (-0,05; 0,20)
Активный контроль, n=10	2,00* (1,40; 2,00)	1,20* (1,20; 1,30)	1,15* (1,00; 1,40)	1,00* (0,75; 1,50)
Гимантан 10 мг/кг, n=11	1,20* (1,00; 2,00)	1,05*# (0,90; 1,20)	1,10* (0,90; 1,30)	1,10* (0,90; 1,20)
Гимантан 5% гель, n=11	1,00*# (0,50; 1,70)	0,95*# (0,50; 1,10)	1,00* (0,50; 1,30)	0,60* (0,50; 1,50)
Диклофенак 5 мг/кг, n=11	1,20*# (1,00; 1,60)	1,10* (1,00; 1,60)	1,10* (0,60; 1,50)	1,10* (0,70; 1,20)
Диклофенак 1% гель, n=11	1,80* (1,40; 2,05)	1,00* (0,50; 1,70)	1,50* (1,00; 2,20)	2,00* (1,00; 2,50)
Примечание: * - $p<0,05$ по сравнению с группой «Пассивный контроль», критерий Манна-Уитни, # - $p<0,05$ по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей, n – количество животных в группе				

Таблица 15. Изменение диаметра левого скакательного сустава крыс с вызванным полным адъювантом Фрейнда воспалительным процессом

Группа, количество животных в группе на начало опыта	Изменение диаметра левого скакательного сустава крыс (мм) относительно фоновых значений после введения полного адъюванта Фрейнда на:			
	3 сутки	6 сутки	9 сутки	12 сутки
Пассивный контроль, n=8	0,05 (-0,05; 0,10)	0,15 (0,10; 0,25)	0,20 (0,00; 0,35)	0,25 (0,05; 0,40)
Активный контроль, n=10	2,20* (2,00; 2,50)	2,80* (1,50; 3,00)	2,10* (1,50; 3,20)	1,80* (1,50; 2,40)
Гимантан 10 мг/кг, n=11	1,10*# (0,50; 2,00)	1,05*# (0,50; 2,50)	1,35* (1,00; 1,50)	1,25* (1,00; 1,50)
Гимантан 5% гель, n=11	1,00*# (0,50; 1,50)	1,05*# (0,40; 1,40)	0,60*# (0,40; 0,80)	0,90* (0,10; 1,50)
Диклофенак 5 мг/кг, n=11	1,50*# (1,00; 2,00)	1,90* (0,70; 3,00)	1,00*# (0,90; 1,90)	1,10* (0,60; 2,00)
Диклофенак 1% гель, n=11	1,20* (0,75; 2,30)	1,90* (1,00; 2,50)	1,75* (0,50; 2,25)*	2,00* (0,70; 2,50)
Примечание: * - p<0,05 по сравнению с группой «Пассивный контроль», критерий Манна-Уитни, # - p<0,05 по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей, n – количество животных в группе				

Препарат сравнения диклофенак при внутрибрюшинном введении в дозе 5 мг/кг выраженно подавлял отёчный синдром у крыс с воспалительным процессом, вызванным субплантарным введением ПАФ, значимо снижая медиану увеличения диаметра стопы крыс в плюсневой области на 3 сутки после введения ПАФ на 40% и медиану изменения диаметра скакательного сустава на 31,8% и на 52,4% соответственно на 3 и 9 сутки после введения ПАФ по сравнению с показателями группы активного контроля (таблицы 14, 15). Однако уменьшение отёчности повреждённой задней конечности крыс на фоне 1% геля диклофенака по сравнению с соответствующими показателями группы активного контроля не достигало уровня статистической значимости ни в один из дней регистрации (таблицы 14, 15). Кроме того, в группе животных, которым наружно наносили 1% гель диклофенака, наблюдалась смертность: в течение двух недель опыта на фоне 1% геля диклофенака погибло 4 из 11 крыс в группе. Смертности крыс в других группах не наблюдалось.

У крыс с воспалительным процессом зарегистрирован сниженный прирост массы тела на протяжении всего эксперимента. Так, если за первые 3 дня опыта по сравнению с фоновыми значениями (до введения ПАФ) масса тела животных без патологии в среднем увеличилась на 12,0 г, то в группе крыс активного контроля масса тела животных снизилась на 7,0 г. Прирост массы тела в группе крыс с воспалением в последующие дни регистрации на 6, 9, 12 и 14 сутки был соответственно значимо ниже показателей группы животных пассивного контроля на 57,1%, 37,1%, 34,8% и 17,9% (таблица 16).

Влияние изучаемых препаратов на прирост массы тела крыс с воспалительным процессом наиболее ярко проявлялось на 3 сутки после введения ПАФ. Так, на фоне гимантана при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг и диклофенака при внутрибрюшинном введении в дозе 5 мг/кг был зарегистрирован прирост массы тела крыс, равный, соответственно, 2,5 г и 3,0 г, что значимо отличалось от значения изменения массы тела животных в группе активного контроля. Гелевые наружные лекарственные формы препаратов были не так эффективны. У крыс, которым в течение 3 дней на лапу наносили 1% гель диклофенака, масса тела относительно значения до введения ПАФ не изменилась, что также значимо отличалось от показателя группы активного контроля. На фоне 5% геля гимантана была зарегистрирована отрицательная динамика прироста массы тела: масса тела животных снизилась на 4,0 г относительно значения до введения ПАФ (таблица 16).

Начиная с 6 суток после введения ПАФ, прирост массы тела крыс на фоне гимантана при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг незначительно отличался от показателя прироста массы тела животных, которым наносили наружную гелевую лекарственную форму препарата. Среди групп крыс с воспалительным процессом на 14 сутки после введения ПАФ прирост массы тела был максимальным у животных, получавших гимантан обоими способами введения: показатели изменения массы тела крыс в этих группах статистически не отличались от соответствующего показателя группы животных пассивного контроля (таблица 16).

Таблица 16. Изменение массы тела крыс с вызванным полным адъювантом Фрейнда воспалительным процессом

Группа, количество животных в группе на начало опыта	Изменение массы тела крыс (г) относительно фоновых значений после введения полного адъюванта Фрейнда на:				
	3 сутки	6 сутки	9 сутки	12 сутки	14 сутки
Пассивный контроль, n=8	12,0 (8,0; 14,0)	31,5 (27,5; 34,0)	44,5 (39,0; 51,0)	56,0 (52,5; 71,0)	65,2 (56,0; 80,1)
Активный контроль, n=10	-7,0* (-10,0; -5,0)	13,5* (10,0; 19,0)	28,0* (20,0; 32,0)	36,5* (32,0; 42,0)	53,5* (43,0; 57,0)
Гимантан 10 мг/кг, n=11	2,5*# (0,0; 5,0)	21,0*# (19,0; 23,0)	34,0* (30,0; 40,0)	42,0* (34,0; 49,0)	58,2 (49,4; 67,7)
Гимантан 5% гель, n=11	-4,0* (-9,0; -1,0)	21,0* (19,0; 23,0)	24,0 (20,0; 34,0)	45,0* (25,0; 57,0)	52,0 (30,0; 72,0)
Диклофенак 5 мг/кг, n=11	0,0*# (-1,5; 2,0)	13,0* (8,0; 20,0)	29,0* (13,0; 34,0)	43,0* (20,0; 48,0)	43,4* (12,9; 54,9)
Диклофенак 1% гель, n=11	3,0*# (-1,0; 5,0)	9,0* (-7,0; 18,0)	17,5* (-27,0; 24,5)	32,0* (16,0; 45,0)	43,0* (23,0; 60,0)
Примечание: * - $p<0,05$ по сравнению с группой «Пассивный контроль», критерий Манна-Уитни, # - $p<0,05$ по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей, n – количество животных в группе					

Прирост массы тела крыс на фоне препарата сравнения диклофенака как при его внутрибрюшинном введении в дозе 5 мг/кг, так и при наружном нанесении гелевой лекарственной формы был менее выражен. Скорее всего, это связано с побочными эффектами препарата. Наименьший прирост массы тела животных с воспалительным процессом на 6 и 9 сутки после введения ПАФ был зарегистрирован у крыс, которым на заднюю конечность наносили 1% гель диклофенака (таблица 16). Это обусловлено токсическим действием данной лекарственной формы: гибель 3 крыс в этой группе была отмечена именно в период с 6 по 9 сутки после введения ПАФ.

На 14 сутки после введения ПАФ у крыс с воспалительным процессом зафиксированы значимые изменения массовых коэффициентов органов иммунной системы тимуса и селезёнки по сравнению с показателями группы крыс пассивного контроля. Так, в группе животных активного контроля на 26,3% снизился массовый коэффициент тимуса, а массовый коэффициент селезёнки увеличился на 15,5% (Таблица 17). Изучаемые препараты при обоих способах введения не предотвращали развития инволюции тимуса и гипертрофии селезёнки у крыс с экспериментальной патологией. Максимально выраженные изменения массовых коэффициентов исследуемых органов иммунной системы были отмечены на фоне препарата сравнения диклофенака: инволюция тимуса у крыс, которым внутрибрюшинно вводили препарат в дозе 5 мг/кг, соответствовала 35,1% по сравнению с массовым коэффициентом тимуса в группе пассивного контроля; гипертрофия селезёнки в группе животных, которым на заднюю конечность наносили 1% гель диклофенака, соответствовала увеличению её массового коэффициента на 71,8% по сравнению с группой крыс без патологии (Таблица 17).

Таблица 17. Массовые коэффициенты органов иммунной системы крыс с вызванным полным адъювантом Фрейнда воспалительным процессом на 14 сутки опыта

Группа, количество животных в группе	Массовые коэффициенты (масса органа (мг) / масса крысы (г)):	
	Тимус - Среднее ± Ошибка среднего (Стандартное отклонение)	Селезёнка - Медиана (Q1; Q3)
Пассивный контроль, n=8	1,14 ± 0,06 (0,16)	2,84 (2,53; 3,34)
Активный контроль, n=10	0,84 ± 0,03* (0,11)	3,28* (3,11; 4,27)
Гимантан 10 мг/кг, n=11	0,84 ± 0,03* (0,09)	3,59* (3,34; 4,10)
Гимантан 5% гель, n=11	0,84 ± 0,04* (0,13)	3,77* (2,98; 4,42)
Диклофенак 5 мг/кг, n=11	0,74 ± 0,02* (0,07)	4,01* (3,48; 5,73)
Диклофенак 1% гель, n=6	0,84 ± 0,04* (0,10)	4,88* (3,54; 5,93)
Примечание: * - $p<0,05$ по сравнению с группой «Пассивный контроль», критерий Даннета (при нормальном распределении) / критерий Манна-Уитни (при отсутствии нормального распределения); n – количество животных в группе		

Таким образом, результаты проведённого эксперимента показали, что в течение 2 недель после введения ПАФ в левую заднюю конечность крыс развивается воспалительный процесс,

проявляющийся отёчностью повреждённой лапы, сниженным приростом массы тела, инволюцией тимуса и гипертрофией селезёнки. Гимантан в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения снижает отёчность левой задней лапы крыс, не уступая по эффективности гимантану в дозе 10 мг/кг и диклофенаку в дозе 5 мг/кг при внутрибрюшинном введении, действуя более выраженно, чем 1% гель диклофенака, но не предупреждает отрицательного прироста массы тела крыс, характерного для формирующегося под влиянием ПАФ воспалительного процесса на 3 сутки после его инъекции, что наблюдается на фоне гимантана и диклофенака при внутрибрюшинном введении. Однако с 6 по 14 сутки после введения ПАФ прирост массы тела крыс на фоне 5% геля гимантана практически не отличается от прироста массы тела животных, которым гимантан вводили внутрибрюшинно. Гимантан и диклофенак как при наружном, так и при внутрибрюшинном способах введения не устраняют симптомы развития патологии иммунной системы – инволюцию тимуса и гипертрофию селезёнки – у крыс с вызванным ПАФ воспалительным процессом.

3.2.3.2 Влияние 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на вызванный полным адъювантом Фрейнда воспалительный процесс у крыс при ежедневном применении в течение 14 дней, начиная с 14 дня после индукции воспаления

На 14 сутки после введения ПАФ в левую заднюю лапу 100 белым аутбредным крысам вторичная иммунологическая реакция, проявляющаяся повреждением правой задней конечности, развилась у 45 животных. Их распределили на 5 групп: группа активного контроля, крысы которой не получали экспериментальной терапии; 2 группы животных, которым, начиная с 14 суток после введения ПАФ, на задние лапы ежедневно наносили препараты в лекарственных формах для наружного применения – 5% гель гимантана серии 150118 или 1% гель диклофенака; 2 группы животных, которым, начиная с 14 суток после введения ПАФ, ежедневно внутрибрюшинно вводили гимантан в дозе 10 мг/кг или диклофенак в дозе 5 мг/кг. На 14 сутки эксперимента (до введения/нанесения препаратов) отёчность правых задних конечностей животных в этих группах статистически не различалась, проявляясь увеличением диаметра правой задней конечности в плюсневой области на 1,0-1,4 мм и увеличением диаметра правого скакательного сустава на 1,1-1,4 мм по сравнению с соответствующими показателями животных без экспериментальной патологии – крысами группы пассивного контроля (таблицы 18, 19).

Спустя 7 суток экспериментальной терапии, на 21 сутки после введения ПАФ в левую заднюю лапу крыс, 5% гель гимантана значимо снижал отёчность правой задней лапы крыс: по сравнению с группой активного контроля угнетение отёка лапы в плюсневой области составляло 37,5%; в области скакательного сустава – 44,4% (таблицы 18, 19). Эффективность 5% геля гимантана значимо не отличалась от эффективности 1% геля диклофенака, снижавшего

отёчность правой задней лапы крыс только в области скакательного сустава на 55,6% (p<0,05), и диклофенака в дозе 5 мг/кг (внутрибрюшинно), также уменьшавшего только отёк скакательного сустава на 33,3% (p<0,05) по сравнению с группой активного контроля. Гимантан при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг значимого влияния на снижение отёчности правой задней конечности крыс на 21 сутки после введения ПАФ не оказывал (таблицы 18, 19).

К 28 суткам после индукции воспаления отёчность правых задних конечностей снижалась во всех группах. В группе активного контроля значимые отличия по сравнению с группой пассивного контроля зарегистрированы только по параметру «изменение диаметра скакательного сустава», увеличенному у животных с экспериментальной патологией на 0,4 мм (таблицы 18, 19). На фоне ежедневной двухнедельной терапии изучаемыми препаратами значимое снижение отёчности правых задних лап по сравнению с группой активного контроля зарегистрировано только по параметру «изменение диаметра скакательного сустава» в группах крыс, которым наружно на задние лапы наносили 5% гель гимантана (параметр соответствовал 0,1 мм) или внутрибрюшинно вводили диклофенак в дозе 5 мг/кг (параметр соответствовал -0,1 мм) (таблицы 18, 19).

Таблица 18 – Изменение диаметра стопы правой задней конечности крыс с вызванным полным адъювантом Фрейнда воспалительным процессом

Группа, количество животных в группе на начало экспериментальной терапии	Изменение диаметра стопы правой задней конечности в плюсневой области (мм) относительно фоновых значений после введения полного адъюванта Фрейнда на:		
	14 сутки – до использования препаратов	21 сутки	28 сутки
Пассивный контроль, n=15	0,1 (-0,2; 0,5)	0,0 (-0,3; 0,2)	0,0 (-0,2; 0,4)
Активный контроль, n=11	1,1 (0,9; 1,3)*	0,8 (0,6; 0,9)*	0,4 (0,2; 0,7)
Гимантан 10 мг/кг, n=8	1,1 (1,0; 1,33)*	0,7 (0,5; 1,1)*	0,5 (0,3; 0,6)*
Гимантан 5% гель, n=8	1,5 (1,2; 1,5)*	0,5 (0,3; 0,5)*#	0,3 (0,2; 0,6)
Диклофенак 5 мг/кг, n=8	1,2 (1,0; 1,2)*	0,7 (0,3; 1,1)*	0,0 (-0,1; 0,5)
Диклофенак 1% гель, n=10	1,1 (1,0; 1,3)*	0,3 (0,2; 0,5)*	0,2 (-0,1; 0,3)
Примечание: * - p<0,05 по сравнению с группой «Пассивный контроль», критерий Манна-Уитни, # - p<0,05 по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей			

Таблица 19 – Изменение диаметра скакательного сустава правой задней конечности крыс с вызванным полным адъювантом Фрейнда воспалительным процессом

Группа, количество животных в группе на начало экспериментальной терапии	Изменение диаметра скакательного сустава правой задней конечности (мм) относительно фоновых значений после введения полного адъюванта Фрейнда на:		
	14 сутки – до использования препаратов	21 сутки	28 сутки
Пассивный контроль, n=15	0,0 (-0,2; 0,1)	0,0 (-0,1; 0,1)	0,0 (-0,2; 0,2)
Активный контроль, n=11	1,1 (1,0; 1,4)*	0,9 (0,6; 1,1)*	0,4 (0,4; 0,6)*
Гимантан 10 мг/кг, n=8	1,4 (1,3; 1,5)*	0,5 (0,4; 0,6)*	0,3 (0,1; 0,5)
Гимантан 5% гель, n=8	1,3 (1,1; 1,4)*	0,5 (0,3; 0,6)*#	0,1 (-0,2; 0,2)#
Диклофенак 5 мг/кг, n=8	1,3 (1,2; 1,5)*	0,6 (0,2; 0,7)*#	-0,1 (-0,4; 0,2)#
Диклофенак 1% гель, n=10	1,2 (1,1; 1,5)*	0,4 (0,1; 0,7)*#	0,15 (0,0; 0,3)
Примечание: * - $p<0,05$ по сравнению с группой «Пассивный контроль», критерий Манна-Уитни, # - $p<0,05$ по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей			

На 14 сутки после индукции воспаления у животных с вторичной иммунологической реакцией сохранялась первичная воспалительная реакция – отёчность левой задней лапы, в которую вводили ПАФ, – что проявлялось значимым увеличением диаметра стопы в плюсневой области на 2,4-3,3 мм и значимым увеличением диаметра скакательного сустава на 1,2-2,0 мм по сравнению с группой животных пассивного контроля. В группе активного контроля к 21 и 28 суткам после введения ПАФ отёк левой задней лапы постепенно спадал, однако значимые различия по сравнению с животными без экспериментального воспаления в эти дни регистрации сохранялись по обоим регистрируемым параметрам: «изменение диаметра левой стопы» и «изменение диаметра левого скакательного сустава» (таблицы 20, 21). На фоне курсовой терапии изучаемыми препаратами значимое снижение отёчности левой задней лапы по сравнению с группой активного контроля зафиксировано на 21 сутки после введения ПАФ в группах крыс, которым наружно на лапы наносили гелевые лекарственные формы: 5% гель гимантана, полностью устранивший отёк левого скакательного сустава, и 1% гель диклофенака, уменьшивший его диаметр на 44,4%. На 28 день после введения ПАФ значимых различий между этими группами и группой активного контроля зафиксировано не было вследствие снижения отёчности левого скакательного сустава у крыс группы активного контроля до значения медианы, равного 0,4 мм (таблицы 20, 21).

Таблица 20 – Изменение диаметра стопы левой задней конечности крыс с вызванным полным адъювантом Фрейнда воспалительным процессом

Группа, количество животных в группе на начало экспериментальной терапии	Изменение диаметра стопы левой задней конечности в плюсневой области (мм) относительно фоновых значений после введения полного адъюванта Фрейнда на:		
	14 сутки – до использования препаратов	21 сутки	28 сутки
Пассивный контроль, n=15	0,1 (-0,1; 0,4)	0,0 (-0,2; 0,3)	0,0 (-0,2; 0,4)
Активный контроль, n=11	2,5 (2,5; 3,2)*	2,0 (2,0; 2,8)*	1,9 (1,0; 2,0)*
Гимантан 10 мг/кг, n=8	2,9 (2,3; 3,0)*	1,5 (1,3; 2,1)	1,5 (1,2; 2,1)
Гимантан 5% гель, n=8	3,3 (2,7; 3,8)*	2,0 (1,3; 2,1)	1,5 (1,2; 2,0)
Диклофенак 5 мг/кг, n=8	2,7 (2,4; 3,5)*	2,5 (2,1; 3,1)	1,5 (1,2; 2,2)
Диклофенак 1% гель, n=10	3,3 (2,3; 4,2)*	2,0 (1,6; 2,8)	1,8 (1,6; 2,3)
Примечание: * - p<0,05 по сравнению с группой «Пассивный контроль», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей			

Таблица 21 – Изменение диаметра скакательного сустава левой задней конечности крыс с вызванным полным адъювантом Фрейнда воспалительным процессом

Группа, количество животных в группе на начало экспериментальной терапии	Изменение диаметра скакательного сустава левой задней конечности (мм) относительно фоновых значений после введения полного адъюванта Фрейнда на:		
	14 сутки – до использования препаратов	21 сутки	28 сутки
Пассивный контроль, n=15	-0,2 (-0,4; 0,0)	0,0 (-0,5; 0,3)	0,0 (-0,2; 0,2)
Активный контроль, n=11	1,3 (1,1; 1,6)*	0,9 (0,8; 1,1)*	0,4 (0,2; 0,7)*
Гимантан 10 мг/кг, n=8	1,8 (1,0; 2,0)*	0,9 (0,5; 1,1)*	0,4 (0,0; 0,6)
Гимантан 5% гель, n=8	1,0 (0,8; 1,5)*	0,0 (-0,0; 0,4)#	0,1 (-0,5; 0,5)
Диклофенак 5 мг/кг, n=8	1,2 (0,8; 1,4)*	0,7 (0,0; 1,5)	0,5 (0,0; 0,7)
Диклофенак 1% гель, n=10	1,2 (1,0; 1,5)*	0,5 (-0,2; 0,5)#	0,2(0,0; 0,5)
Примечание: * - p<0,05 по сравнению с группой «Пассивный контроль», критерий Манна-Уитни, # - p<0,05 по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей			

Развитие воспалительного процесса у крыс сопровождалось сниженным приростом массы тела животных по сравнению с группой пассивного контроля на протяжении всего опыта. Так, на 14 сутки после введения ПАФ у животных с экспериментальной патологией прирост массы тела был на 28,3-37,3% ниже, чем в группе крыс пассивного контроля (таблица 22). На 21 и 28 сутки после введения ПАФ прирост массы тела крыс группы активного контроля был соответственно на 32,4% и 31,0% ниже, чем у животных без экспериментальной патологии (p<0,05). Изучаемые препараты при обоих способах введения не оказывали влияния на массу тела крыс с воспалительным процессом (таблица 22).

Таблица 22 – Изменение массы тела крыс с вызванным полным адъювантом Фрейнда воспалительным процессом

Группа, количество животных в группе на начало экспериментальной терапии	Изменение массы тела крыс (г) относительно фоновых значений после введения полного адъюванта Фрейнда на:		
	14 сутки – до использования препаратов	21 сутки	28 сутки
Пассивный контроль, n=15	53 (41; 61)	71 (60; 86)	87 (74; 103)
Активный контроль, n=11	32 (26; 39)*	48 (45; 55)*	60 (53; 67)*
Гимантан 10 мг/кг, n=8	31 (19; 37)*	41 (37; 47)*	59 (47; 71)*
Гимантан 5% гель, n=8	37 (25; 43)*	39 (19; 54)*	67 (58; 80)*
Диклофенак 5 мг/кг, n=8	38 (32; 41)*	44 (39; 47)*	67 (62; 71)
Диклофенак 1% гель, n=10	33 (26; 52)	47 (39; 57)*	69 (37; 86)
Примечание: * - p<0,05 по сравнению с группой «Пассивный контроль», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей			

На 7 сутки после введения ПАФ у крыс зарегистрированы эритема и повышение температуры кожи задних конечностей [29], однако на 14, 21 и 28 сутки после введения ПАФ температура кожи как правой, так и левой задней конечности животных не отличалась от температуры кожи задних конечностей крыс без экспериментальной патологии (таблицы 23, 24). Однако для группы животных, которым с 14 по 28 сутки после введения ПАФ наружно на задние лапы наносили 1% гель диклофенака, на 14 сутки (до введения препаратов) было зафиксировано достоверное повышение температуры кожи левой задней лапы по сравнению с группой животных активного контроля. Ежедневная экспериментальная терапия крыс с адъювантным артритом изучаемыми препаратами при обоих способах введения не влияла на температуру кожи задних лап животных (таблица 24).

Таблица 23 – Температура кожи правых задних конечностей крыс с вызванным полным адъювантом Фрейнда воспалительным процессом

Группа, количество животных в группе на начало экспериментальной терапии	Температура кожи правых задних конечностей крыс (°С) после введения полного адъюванта Фрейнда на:		
	14 сутки – до использования препаратов	21 сутки	28 сутки
Пассивный контроль, n=15	32,0 (30,4; 33,1)	29,3 (28,3; 30,0)	28,7 (27,6; 30,3)
Активный контроль, n=11	31,4 (28,6; 32,3)	30,4 (28,0; 31,6)	28,4 (27,6; 29,9)
Гимантан 10 мг/кг, n=8	30,7 (30,2; 31,3)	28,7 (27,1; 31,2)	28,6 (28,1; 29,1)
Гимантан 5% гель, n=8	31,7 (30,0; 33,3)	29,0 (27,2; 29,9)	29,4 (27,4; 30,3)
Диклофенак 5 мг/кг, n=8	30,5 (30,1; 31,0)	31,6 (29,4; 32,5)	28,2 (27,4; 28,6)
Диклофенак 1% гель, n=10	31,1 (30,9; 32,0)	29,6 (26,8; 31,0)	29,8 (28,7; 31,5)
Примечание: данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей			

Таблица 24 – Температура кожи левых задних конечностей крыс с вызванным полным адъювантом Фрейнда воспалительным процессом

Группа, количество животных в группе на начало экспериментальной терапии	Температура кожи левых задних конечностей крыс (°С) после введения полного адъюванта Фрейнда на:		
	14 сутки – до использования препаратов	21 сутки	28 сутки
Пассивный контроль, n=15	32 (30,7; 33,0)	29,2 (28,2; 30,0)	29,3 (28,3; 30,0)
Активный контроль, n=11	30,8 (29,7; 32,2)	31,1 (29,0; 31,8)	30,4 (28,0; 31,6)
Гимантан 10 мг/кг, n=8	31,3 (31,2; 32,9)	29,9 (28,7; 31,2)	28,7 (27,1; 31,2)
Гимантан 5% гель, n=8	31,1 (30,9; 32,0)	29,6 (27,7; 32,2)	29,0 (27,2; 29,9)
Диклофенак 5 мг/кг, n=8	31,1 (30,1; 32,0)	32,1 (29,8; 31,2)	31,6 (29,4; 32,5)
Диклофенак 1% гель, n=10	32,4 (31,4; 33,2)#	30,4 (27,3; 31,5)	29,6 (26,8; 31,0)
Примечание: # - $p<0,05$ по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей			

У животных с воспалительным процессом на 21 сутки после введения ПАФ в тесте «Вращающийся стержень» зарегистрировано снижение координации движений, проявлявшееся уменьшением латентного периода (ЛП) падения с барабана установки на 31,4%. Изучаемые препараты в гелевых лекарственных формах для наружного применения значимо увеличивали ЛП падения крыс с установки по сравнению с группой активного контроля: 5% гель гимантана – на 74,3%, 1% гель диклофенака – на 60,0%. Гимантан при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг также улучшал координацию движений животных в тесте «Вращающийся стержень»: ЛП падения крыс с барабана установки на его фоне увеличивался на 60,0% ($p<0,05$). Диклофенак при курсовом внутрибрюшинном введении в дозе 5 мг/кг значимого влияния на поведение крыс с воспалительным процессом в тесте «Вращающийся стержень» не оказывал (таблица 25).

Таблица 25 Координация движений крыс с вызванным полным адъювантом Фрейнда воспалительным процессом на 21 сутки после его введения в тесте «Вращающийся стержень» при режиме скорости вращения барабана 10 до 30 об/мин

Группа, количество животных в группе	Латентный период падения крыс, сек.	Скорость вращения барабана, обороты в минуту
Пассивный контроль, n= 15	51 (36; 82)	15 (13; 21)
Активный контроль, n = 11	35 (32; 44)*	13 (11 ;15)
Гимантан 10 мг/кг, n = 8	56 (46; 68)#	16 (15; 18)
Гимантан 5% гель, n = 8	61 (52; 81)#	21 (18; 22)#
Диклофенак 5 мг/кг, n = 8	52 (42; 71)	16 (14; 19)
Диклофенак 1% гель, n = 6	56 (52; 75)#	16 (16; 20)#
Примечание: * - $p<0,05$ по сравнению с группой «Пассивный контроль», критерий Манна-Уитни, # - $p<0,05$ по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе		

Воспалительный процесс у животных привёл к развитию гипералгезии, которую регистрировали в подошвенном тесте на 24 сутки после введения ПАФ. У крыс группы активного контроля ЛП отдёргивания задних лап в ответ на подачу сфокусированного луча инфракрасного света на их подошвенную поверхность по сравнению с группой пассивного контроля снизился для левой лапы на 32,6% ($p<0,05$), правой лапы – на 24,8% ($p<0,05$). Изучаемые препараты при обоих способах применения значимо повышали порог болевой чувствительности животных с воспалением. Его повышение для левой задней лапы на фоне гимантана в гелевой лекарственной форме для наружного применения составляло 23,0%, на фоне гимантана при внутрибрюшинном введении – 55,2%; для правой задней лапы повышение ЛП соответственно было равно 34,0% и 27,8%. Препарат сравнения диклофенак увеличивал порог болевой чувствительности левой задней лапы крыс при использовании его гелевой формы на 106,7%, при внутрибрюшинном введении – на 41,4%. ЛП отдёргивания правой задней лапы на фоне диклофенака в гелевой лекарственной форме повышался на 41,2%, при его внутрибрюшинном введении – на 14,4% (таблица 26).

Таблица 26 – Порог болевой чувствительности крыс с вызванным полным адъювантом Фрейнда воспалительным процессом в подошвенном тесте на 24 сутки после индукции воспаления

Группа, количество животных в группе	Латентный период отдёргивания	
	левой задней лапы, сек.	правой задней лапы, сек.
Пассивный контроль, n= 15	12,9 (11,8; 14,6)	12,9 (12,3; 14,9)
Активный контроль, n = 11	8,7 (6,4; 9,9)*	9,7 (5,0; 12,1)*
Гимантан 10 мг/кг, n = 8	13,5 (10,5; 14,4)#	13 (11,2; 15,9)#
Гимантан 5% гель, n = 8	10,7 (9,9; 12,0)#	12,4 (11,6; 13,7)#
Диклофенак 5 мг/кг, n = 8	12,3 (9,3; 14,6)#	11,1 (9,7; 12,6)*#
Диклофенак 1% гель, n = 6	18,3 (17,7; 18,6)*#	13,7 (9,0; 19,3)#
Примечание: * - $p<0,05$ по сравнению с группой «Пассивный контроль», критерий Манна-Уитни, # - $p<0,05$ по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей, n – количество животных в группе		

У крыс с иммунным воспалением на 14 сутки после введения ПАФ зарегистрированы изменения некоторых гематологических показателей. По сравнению с группой пассивного контроля во всех группах животных с экспериментальной патологией (до применения препаратов) значимо увеличилось содержание тромбоцитов на 12,4-28,2% и возрос тромбокрит на 9,1-31,8% (таблица 27). Кроме того, в двух группах крыс с иммунным воспалением было значимо повышено содержание гранулоцитов: в группе активного контроля – на 57,8%, в группе «Гимантан 5% гель» – на 135,6%. В группе активного контроля также было увеличено содержание лейкоцитов – на 58,4% ($p<0,05$). При определении лейкоцитарной формулы образцов крови, взятых на 14 сутки после введения ПАФ, установлено, что в группах крыс с воспалением, получавших с 14 дня экспериментальную терапию, в этот день регистрации (до использования препаратов) зафиксировано значимое повышение сегментоядерных нейтрофилов (%) до 32,0-44,0% (на 33,3-

83,3%) по сравнению показателем группы пассивного контроля, равным 24,0%. В группе активного контроля увеличение содержания сегментоядерных нейтрофилов (%) было не столь выраженным и по сравнению с животными без экспериментальной патологии составляло 18,8% ($p>0,05$). Во всех группах животных с воспалением наблюдалось компенсаторное снижение содержания лимфоцитов (%) по сравнению с группой пассивного контроля. Для групп крыс, которым с 14 дня начинали наносить гелевые лекарственные формы или внутрибрюшинно вводить диклофенак, оно было значимым и составляло 9,7-29,9%. Для группы активного контроля и животных, которым с 14 дня внутрибрюшинно начинали вводить гимантан, оно было равно, соответственно 9,0% и 12,5% ($p>0,05$, таблица 27).

На 28 сутки после введения ПАФ во всех группах крыс с экспериментальной патологией наблюдалась нормализация лейкоцитарной формулы. Снижение содержания сегментоядерных нейтрофилов (%) по сравнению со значением на 14 сутки после введения ПАФ зарегистрировано во всех группах животных, однако выраженность этого снижения различалась. Через две недели курсовой экспериментальной терапии крыс препаратами при обоих способах введения значимое уменьшение содержания сегментоядерных нейтрофилов (%) по сравнению с показателем, зарегистрированным до использования препаратов на 14 сутки после введения ПАФ, было зафиксировано только в группах животных, которые получали гимантан внутрибрюшинно или в виде 5% геля. По сравнению с показателем на 14 сутки после введения ПАФ гимантан при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг снижал содержание сегментоядерных нейтрофилов (%) на 40,6%, в 5% гелевой лекарственной форме – на 43,2% (таблица 27). В этих группах крыс зарегистрировано компенсаторное повышение содержания лимфоцитов (%) относительно соответствующих показателей на 14 сутки после введения ПАФ: на фоне гимантана при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг – на 20,6%, на фоне гимантана в виде 5% гелевой формы – на 40,6%. На фоне диклофенака при обоих способах применения значимого изменения содержания лимфоцитов (%) по сравнению с показателями на 14 сутки после введения ПАФ (до использования препаратов) не наблюдалось. Снижение содержания сегментоядерных нейтрофилов (%) и компенсаторное повышение содержания лимфоцитов (%) относительно показателей на 14 сутки эксперимента было зафиксировано на 28 сутки после введения ПАФ и в группе активного контроля, однако эти изменения были менее выраженными, чем в группах животных, получавших гимантан, и составляли соотсветственно 28,1% и 12,2% (таблица 27).

У крыс, которые получали курсовую терапию диклофенаком при обоих способах введения, на 28 сутки после введения ПАФ были отмечены значимые отличия некоторых гематологических параметров по сравнению с группой активного контроля. Ежедневное двухнедельное внутрибрюшинное введение диклофенака в дозе 5 мг/кг приводило к значимому снижению содержания эритроцитов, концентрации гемоглобина и гематокрита соответственно на 17,2%,

13,0% и 17,4%. При этом содержание тромбоцитов и тромбокрит, как и на 14 день регистрации, в этой группе оставались повышенными: по сравнению с группой активного контроля это повышение составляло соответственно 50,8% и 52,4% ($p<0,05$). Кроме того, на фоне курсового внутрибрюшинного введения диклофенака в дозе 5 мг/кг отмечено увеличенное по сравнению с группой пассивного контроля содержание гранулоцитов – на 57,4% ($p<0,05$). На фоне 1% геля диклофенака по сравнению с группой активного контроля на 7,6% уменьшался гематокрит ($p<0,05$, таблица 27).

На фоне двухнедельной экспериментальной терапии изучаемыми препаратами в группе крыс с вторичной иммунологической реакцией на инъекцию ПАФ в левую заднюю лапу, которым наружно на задние конечности наносили 1% гель диклофенака, зарегистрирована гибель 4 из 10 животных. В остальных группах крыс с индуцированной ПАФ моделью воспаления смертности на протяжении 28 дней опыта не наблюдалось.

Таким образом, на модели адъювантного артрита у аутбредных крыс, вызванного введением ПАФ в левую заднюю лапу, у животных с развившимся вторичным воспалением – отёком правой задней лапы – 5% гель гимантана серии 150118 при ежедневном четырнадцатидневном нанесении на задние лапы крыс, начиная с 14 дня после введения ПАФ, снижает их отёчность, по эффективности не уступая 1% гелю диклофенака. 5% гель гимантана уменьшает выраженность обусловленной развитием воспалительного процесса гипералгезии в подошвенном тесте у крыс на 24 сутки после введения ПАФ: его эффект сопоставим с эффектом гимантана в дозе 10 мг/кг и диклофенака в дозе 5 мг/кг при внутрибрюшинном введении, но несколько уступает эффекту 1% геля диклофенака. 5% гель гимантана, так же как и 1% гель диклофенака и гимантан при внутрибрюшинном введении, нормализует нарушенную при адъювантном артрите координацию движений у крыс на 21 сутки после введения ПАФ.

У крыс с моделью адъювантного артрита на 14 сутки после введения ПАФ изменения большинства гематологических показателей не выходили за пределы референсных значений, за исключением показателей лейкоцитарной формулы, в которых зафиксировано повышение содержания сегментоядерных нейтрофилов. В группах животных с экспериментальной патологией, которым, начиная с 14 дня опыта, ежедневно на задние лапы наносили 5% гель гимантана или вводили гимантан в дозе 10 мг/кг внутрибрюшинно, на 28 день после введения ПАФ показатель сегментоядерных нейтрофилов снижался по сравнению со значениями, зарегистрированными на 14 день. Курсовая терапия диклофенаком при обоих способах введения к значимому снижению сегментоядерных нейтрофилов не приводила. Кроме того, в опыте зарегистрировано токсическое действие препарата сравнения, которое на фоне применения гелевой лекарственной формы проявлялось гибелью крыс, введения препарата внутрибрюшинно

– изменением ряда гематологических показателей. При курсовой терапии гимантаном при обоих способах введения токсических эффектов зафиксировано не было.

Таким образом, результаты второго этапа экспериментального исследования свидетельствуют об эффективности 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения (содержит на 50,0 г лекарственной формы: гимантана – 2,50 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагина – 0,075 г, нипазола – 0,025 г, ДМСО – 5,00 г, воды очищенной до 50,00 г) на моделях острого экссудативного воспаления у крыс и мышей и на модели адъювантного артрита, вызванного инъекцией ПАФ, у крыс.

Полученные результаты опубликованы в работах с соавторами:

[18, 29, 31, 34, 192]

Таблица 27 – Гематологические показатели крыс с вызванным полным адъювантом Фрейнда воспалительным процессом

Показатели	Группы, количество животных в группах на начало экспериментальной терапии					
	Пассивный контроль, n=15	Активный контроль, n=11	Гимантан 10 мг/кг, n=8	Гимантан 5% гель, n=8	Диклофенак 5 мг/кг, n=8	Диклофенак 1% гель, n=10
Фоновые показатели – на 14 сутки после введения полного адъюванта Фрейнда						
Эритроциты	7,95 (7,66; 8,66)	8,67 (8,25; 9,10)	8,43 (8,28; 8,63)	8,27 (8,04; 8,65)	7,61 (7,39: 8,12)	8,17 (7,99; 8,72)
Гемоглобин	134,0 (123,0; 140,1)	137,5 (134,8; 139,8)	135,1 (135,0; 139,5)	138,0 (137,0; 146,50)	129,0 (118,5; 135,5)	141,0 (130,0; 146,0)
Гематокрит	43,04 (41,70; 47,09)	44,31 (43,88; 46,63)	45,02 (44,26; 47,16)	43,69 (42,85; 46,05)	41,26 (38,98; 43,55)	43,24 (41,99; 46,42)
Гранулоциты	3,65 (3,22; 4,56)	5,76 (5,06; 6,57)*	5,87 (3,30; 8,10)	8,60 (5,57; 9,93)*	5,43 (4,33; 6,14)	5,70 (4,73; 6,17)
Тромбоциты	428,00 (389,50; 464,00)	481,00 (457,80; 552,80)*	529,00 (480,00; 606,00)*	548,50 (511,50; 587,00)*	525,00 (472,00; 552,00)*	511,00 (440,80; 525,20)*
Тромбокрит	0,22 (0,20; 0,25)	0,24 (0,24; 0,28)*	0,26 (0,25; 0,30)*	0,29 (0,26; 0,30)*	0,26 (0,25; 0,28)*	0,26 (0,23; 0,29)#
Лейкоциты	12,32 (0,65; 16,41)	19,52 (15,87; 21,37) *	16,5 (15,02; 20,45)	17,32 (14,62; 19,46)	14,6 (11,54; 16,27)	15,43 (14,45; 16,42)
Палочкоядерные нейтрофилы (%)	1,0 (0,5; 2,0)	1,0 (0,0; 1,0)	1,0 (0,0; 1,0)	1,0 (1,0; 1,8)	1,0 (0,5; 1,0)	1,0 (0,5; 1,0)
Сегментоядерные нейтрофилы (%)	24,0 (23,0; 29,0)	28,5 (23,5; 32,8)	32,0 (29,0; 34,5)*	44,0 (36,0; 49,0)*	32,0 (29,0; 35,5)*	34,0 (30,0; 40,5)*
Эозинофилы (%)	1,0 (0,0; 1,0)	0,5 (0,0; 2,0)	1,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 1,5)	1,0 (0,0; 1,5)	1,0 (0,0; 1,5)
Базофилы (%)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
Моноциты (%)	2,0 (2,0; 4,0)	4,0 (3,0; 4,0)	3,0 (2,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,8)	3,0 (2,5; 3,0)	3,0 (2,5; 3,0)
Лимфоциты (%)	72,0 (67,0; 72,5)	65,5 (63,0; 72,5)	63,0 (60,0; 68,0)	50,5 (46,0; 58,0)*	65,0 (60,0; 67,0)*	63,0 (56,5; 64,0)*
Показатели в группах на 28 сутки после введения полного адъюванта Фрейнда – через 14 дней ежедневного использования препаратов:						
Эритроциты	9,09 (8,23; 9,35)	9,44 (8,77; 9,98)	8,72 (8,50; 9,10)	8,94 (8,20; 9,39)	7,82 (7,39; 8,40)#	8,70 (8,60; 8,80)
Гемоглобин	137,00 (133,00; 141,50)	138,00 (134,00; 143,50)	135,00 (130,00; 137,00)	136,50 (126,80; 141,80)	120,00 (115,80; 126,50)*#	133,00 (127,50; 138,50)

Примечания: * - p<0,05 по сравнению с группой «Пассивный контроль», критерий Манна-Уитни, # - p<0,05 по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Манна-Уитни, @ - p<0,05 по сравнению с соответствующим показателем, зарегистрированным на 14 сутки после введения полного адъюванта Фрейнда, критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе

Таблица 27 – Гематологические показатели крыс с вызванным полным адъювантом Фрейнда воспалительным процессом (продолжение)

Показатели	Группы, количество животных в группах на начало экспериментальной терапии					
	Пассивный контроль, n=15	Активный контроль, n=11	Гимантан 10 мг/кг, n=8	Гимантан 5% гель, n=8	Диклофенак 5 мг/кг, n=8	Диклофенак 1% гель, n=10
Показатели в группах на 28 сутки после введения полного адъюванта Фрейнда – через 14 дней ежедневного использования препаратов:						
Гематокрит	45,53 (40,89; 47,45)	47,38 (46,29; 49,63)	45,44 (43,34; 45,76)	45,17 (40,30; 47,40)	39,12 (38,45; 41,40)*#	43,78 (43,05; 44,62)#
Гранулоциты	4,34 (3,85; 5,20)	4,14 (3,71; 5,55)	4,68 (4,55; 5,28)	4,76 (3,80; 5,37)	6,83 (6,04; 8,30)*	4,53 (3,96; 6,93)
Тромбоциты	434,00 (399,00; 451,00)	412,00 (387,50; 441,20)	424,00 (382,50; 471,50)	438,50 (382,50; 474,20)	621,50 (494,20; 724,00)*#	495,00 (440,20; 548,80)
Тромбокрит	0,23 (0,20; 0,24)	0,21 (0,20; 0,22)	0,22 (0,20; 0,24)	0,21 (0,19; 0,24)	0,32 (0,25; 0,36)*#	0,26 (0,23; 0,28)
Лейкоциты	16,91 (14,28; 18,96)	17,27 (16,47; 20,29)	19,31 (14,24; 21,38)	13,95 (12,99; 15,9)	19,9 (16,86; 21,51)	16,75 (15,73; 18,67)
Палочкоядерные нейтрофилы (%)	1,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 1,0)	1,0 (1,0; 1,0)	0,5 (0,0; 1,8)	1,0 (1,0; 1,8)#	0,5 (0,0; 1,3)
Сегментоядерные нейтрофилы (%)	19,0 (16,5; 26,0)@	20,5 (17,3; 23,3)@	19,0 (19,0; 21,0)*@	25,0 (21,3; 27,3)#*@	29,0 (23,5; 34,5)*	26,5 (19,8; 36,0)#*
Эозинофилы (%)	0,0 (0,0; 1,0)	0,5 (0,0; 1,5)	1,0 (0,0; 1,0)	0,5 (0,0; 1,0)	1,0 (0,0; 1,5)	0,0 (0,0; 0,5)
Базофилы (%)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
Моноциты (%)	4,0 (3,0; 4,5)	4,0 (2,8; 6,0)	3,0 (3,0; 3,0)	2,0 (2,0; 3,5)	3,0 (2,3; 3,0)	4,0 (3,8; 5,0)
Лимфоциты (%)	74,0 (71,0; 77,5)	73,5 (69,8; 78,0)@	76,0 (74,0; 77,0)@	71,0 (69,5; 74,8)@	66,0 (58,5; 68,8)#*	69,5 (58,0; 76,3)

Примечания: * - $p<0,05$ по сравнению с группой «Пассивный контроль», критерий Манна-Уитни, # - $p<0,05$ по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Манна-Уитни, @ - $p<0,05$ по сравнению с соответствующим показателем, зарегистрированным на 14 сутки после введения полного адъюванта Фрейнда, критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе

3.3 Оценка анальгетической активности 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на моделях термической гипералгезии при остром экссудативном воспалении и послеоперационной гипералгезии у крыс

Третий этап экспериментального исследования посвящён оценке анальгетической активности выбранной на первом этапе работы 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения (содержит на 50,0 г лекарственной формы: гимантана – 2,50 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагина – 0,075 г, нипазола – 0,025 г, ДМСО – 5,00 г, воды очищенной до 50,00 г) в сравнении с гимантаном и диклофенаком при внутрибрюшинном введении и гелем диклофенака при наружном применении на моделях термической гипералгезии при остром экссудативном воспалении и послеоперационной гипералгезии у крыс.

3.3.1 Оценка анальгетической активности 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на модели термической гипералгезии при остром экссудативном воспалении у крыс

В качестве модели воспаления, обуславливающего развитие термической гипералгезии у животных, использовалась методика каррагенанового отёка левой задней лапы у крыс, вызванного субплантарным введением 0,1 мл 1% раствора каррагенана.

Влияние 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения серии 190219 в сравнении 1% гелевой лекарственной формой диклофенака для наружного применения, гимантаном в дозе 20 мг/кг и диклофенаком в дозе 10 мг/кг при внутрибрюшинном введении на выраженность термической гипералгезии у крыс с каррагенановым отёком оценивали в подошвенном тесте при однократном нанесении препаратов в гелевых лекарственных формах на заднюю лапу животных, в которую вводили раствор каррагенана, или их внутрибрюшинном введении через 2 часа после индукции воспаления.

Острое экссудативное воспаление – каррагенановый отёк лапы – снижало порог болевой чувствительности крыс через 3 часа после его индукции, что проявлялось уменьшением латентного периода (ЛП) отдёргивания левой задней лапы в ответ на подачу сфокусированного луча инфракрасного света в 2,5 раза в группе животных с каррагенановым отёком, не получавших экспериментальной терапии (группа активного контроля), по сравнению с группой животных без экспериментальной патологии (группа пассивного контроля). 5% гелевая лекарственная форма гимантана при однократном нанесении на воспалённую заднюю лапу значимо снижала выраженность термической гипералгезии у крыс в 1,9 раза по сравнению с группой активного контроля. По эффективности 5% гель гимантана был сопоставим с 1% гелем диклофенака,

повышавшим ЛП отдёргивания повреждённой конечности в 2,2 раза по сравнению с группой активного контроля (таблица 28).

Выраженность анальгетического действия гимантана и диклофенака в гелевых лекарственных формах для наружного применения значимо не отличалась от выраженности анальгетического действия диклофенака в дозе 10 мг/кг при внутрибрюшинном введении, увеличивавшего ЛП отдёргивания левой задней лапы крыс в ответ на подачу сфокусированного луча инфракрасного света в 2,6 раза по сравнению с группой активного контроля (таблица 28). Гимантан при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг через 2 часа после индукции воспаления не оказывал значимого влияния на порог болевой чувствительности животных с каррагенановым отёком лапы, повышая медиану ЛП отдёргивания левой задней лапы только до 6,2 секунды относительно медианы, равной 4,5 секундам, в группе крыс активного контроля (таблица 28).

Таблица 28 – Выраженность термической гипералгезии у крыс с каррагенановым отёком левой задней лапы в подошвенном тесте

Группа, количество животных в группе	Латентный период отдёргивания левой лапы, сек.
Пассивный контроль, n=10	11,2 (9,8; 12,8)
Активный контроль, n=10	4,5 (3,7; 6,5)*
Гимантан 20 мг/кг, n=10	6,2 (5,7; 7,2)*
Гимантан 5% гель, n=10	8,5 (6,8; 11,6)#
Диклофенак 10 мг/кг, n=10	11,7 (9,7; 12,8)#
Диклофенак 1% гель, n=10	9,9 (8,6; 12,0)#
Примечание: * - p<0,05 по сравнению с группой «Пассивный контроль», критерий Манна-Уитни, # - p<0,05 по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе	

Таким образом, на модели термической гипералгезии у крыс с каррагенановым отёком левой задней лапы установлено, что анальгетический эффект 5% гелевой лекарственной формы гимантана при однократном нанесении на воспалённую заднюю лапу животных через 2 часа после индукции воспаления значимо не отличается от анальгетического эффекта диклофенака в 1% гелевой лекарственной форме для наружного применения и при его однократном внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг; гимантан при однократном внутрибрюшинном введении в дозе 20 мг/кг через 2 часа после индукции воспаления значимого действия на выраженность термической гипералгезии у крыс с каррагенановым отёком не оказывал.

3.3.2 Оценка анальгетической активности 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения на модели послеоперационной гипералгезии у крыс

Выраженность механической и термической послеоперационной гипералгезии регистрировали у крыс с моделью послеоперационной боли слабой выраженности, которая развивалась после хирургической манипуляции, заключавшейся в последовательных продольных разрезах кожи стопы и короткого сгибателя пальцев (flexor digitorum brevis) левой задней лапы наркотизированных животных с наложением горизонтальных матрацных швов на её завершающем этапе.

Влияние 5% гелевой лекарственной формы гимантана серии 190219 в сравнении с 1% гелевой лекарственной формой диклофенака при наружном нанесении на задние лапы животных, гимантаном в дозе 10 мг/кг и диклофенаком в дозе 5 мг/кг при внутрибрюшинном введении на выраженность механической и термической послеоперационной гипералгезии у крыс оценивали в динамике в течение 4 дней после операции относительно фоновых показателей чувствительности крыс к механическим (в тесте оценки чувствительности с помощью нитей фон Фрея) и термическим (в подошвенном тесте) раздражителям. Изучаемые препараты наносили животным наружно в виде гелевых лекарственных форм или вводили внутрибрюшинно дважды в сутки, начиная со дня операции. Кроме того, в эксперимент дополнительно были включены две группы крыс, получавших комбинированную экспериментальную терапию препаратами в гелевых лекарственных формах для наружного применения (1 применение препаратов в сутки) и при их внутрибрюшинном введении (2 применение препаратов в сутки).

Фоновые показатели чувствительности крыс к механическим и термическим раздражителям, зарегистрированные за день до операции, статистически не различались между групами животных как для левой, так и правой задней лапы (таблицы 29, 30, 31, 32).

Начиная с 1 суток после хирургической манипуляции, у животных, не получавших экспериментальной терапии (группа активного контроля), наблюдалась механическая и термическая гипералгезия повреждённой левой задней лапы (таблицы 29, 31). Так, в тесте механической гипералгезии число отдёргиваний левой задней лапы в ответ на раздражение её подошвенной поверхности нитью фон Фрея силой на сгибание, равной 10 г, на 1 сутки после операции повысилось со значения медианы, за день до операции равного 0, до значения 7,5. На последующие 2, 3 и 4 сутки после хирургической манипуляции болевая чувствительность левой задней лапы крыс в ответ на механическое раздражение не снижалась относительно 1 суток и характеризовалась значениями медианы числа её отдёргиваний, соответственно равными 8,5, 8,0 и 8,0 (таблица 29).

Изучаемый препарат гимантан как при двукратном ежедневном применении в виде 5% гелевой лекарственной формы для наружного применения, так и при двукратном ежедневном

внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг или при комбинированной схеме экспериментальной терапии в виде гелевой лекарственной формы для наружного применения и при внутрибрюшинном введении значимо снижал выраженность механической послеоперационной гипералгезии животных во все дни её регистрации по сравнению с соответствующими показателями группы активного контроля. Наиболее низкие значения медианы числа отдёргиваний левой задней лапы в ответ на раздражение нитью фон Фрея были зарегистрированы на фоне ежедневного двукратного нанесения на повреждённую заднюю конечность 5% геля гимантана: они не превышали значения медианы, равного 1,0 (таблица 29).

Среди используемых схем экспериментальной терапии диклофенаком наиболее эффективной была так же, как и при применении гимантана, схема двукратного ежедневного нанесения диклофенака в виде 1% геля: значения медиан числа отдёргиваний левой задней лапы в ответ на раздражение нитью фон Фрея на её фоне соответствовали 1,0-2,0 во все дни регистрации чувствительности крыс к механическому раздражению. Влияние гимантана в виде 5% геля при ежедневном двукратном нанесении на повреждённую левую заднюю лапу животных на число её отдёргиваний в ответ на раздражение нитью фон Фрея во все дни регистрации значимо не отличалось от влияния диклофенака в виде 1% геля при ежедневном двукратном нанесении на повреждённую левую заднюю лапу. Эффективность гимантана при ежедневном двукратном внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг значимо превосходила анальгетический эффект диклофенака в дозе 5 мг/кг при его ежедневном двукратном внутрибрюшинном введении в тесте оценки механической гипералгезии у крыс на 2, 3 и 4 дни после операции ($p<0,05$, критерий Манна-Уитни, таблица 29). Выраженность анальгетического действия комбинированной экспериментальной терапии гимантаном достоверно превышала выраженность анальгетического действия комбинированной экспериментальной терапии диклофенаком на 1 сутки после хирургической манипуляции ($p<0,05$, критерий Манна-Уитни, таблица 29).

Таблица 29 – Выраженность механической гипералгезии в условиях модели послеоперационной боли у крыс

Группа	Фоновое число отдёргиваний	Число отдёргиваний левой задней лапы в ответ на раздражение нитью фон Фрея силой на сгибание, равной 10 г; сутки после операции:			
		1 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки
Активный контроль, n=8	0,0 (0,0; 1,0)	7,5 (7,0; 8,3)#	8,5 (7,0; 9,3)#	8,0 (7,0; 9,0)#	8,0 (7,0; 8,0)#
Гимантан 10 мг/кг, n=9	0,0 (0,0; 1,0)	2,0 (0,0; 3,0)*	3,0 (1,0; 3,0)*	0,0 (0,0; 3,0)*	1,0 (0,0; 2,0)*
Гимантан 5% гель, n=9	0,0 (0,0; 1,0)	1,0 (0,0; 1,0)*	0,0 (0,0; 0,0)*	1,0 (0,0; 2,0)*	1,0 (1,0; 2,0)*
Гимантан 10 мг/кг + Гимантан 5% гель, n=9	0,0 (0,0; 0,0)	2,0 (1,0; 4,0)*#	1,0 (0,0; 4,0)*#	3,0 (2,0; 4,0)*#	2,0 (2,0; 3,0)*#
Диклофенак 5 мг/кг, n=8	1,0 (0,0; 2,0)	5,0 (4,0; 6,0)*#	7,5 (5,5; 8,5)#	6,0 (4,8; 6,3)*#	4,5 (3,0; 7,3)#
Диклофенак 1% гель, n=9	2,0 (1,0; 2,0)	1,0 (1,0; 2,0)*	1,0 (0,0; 2,0)*#	2,0 (1,0; 4,0)*	2,0 (2,0; 3,0)*
Диклофенак 5 мг/кг + Диклофенак 1% гель, n=8	0,0 (0,0; 0,0)	5,5 (4,3; 6,3)*#	3,0 (2,0; 5,5)*#	3,5 (2,3; 4,0)*#	3 (2,3; 4,0)*#
Примечание: * - p<0,05 по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Манна-Уитни, # - p<0,05 по сравнению с соответствующим фоновым показателем в группе, парный критерий Вилкоксона; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе					

Чувствительность в ответ на механическое раздражение правой задней лапы крыс с моделью послеоперационной боли, не получавших экспериментальной терапии (группа активного контроля), значимо не изменялась относительно фонового показателя во все дни её регистрации после операции: медианы значений числа отдёргиваний правой задней лапы в ответ на раздражение нитью фон Фрея в эти дни соответствовали 0,5-1,5. Показатели чувствительности неповреждённой правой задней лапы животных с моделью послеоперационной боли к механическому раздражению на фоне изучаемых препаратов не отличались от соответствующих фоновых значений ни в одной из групп крыс, получавших экспериментальную терапию (таблица 30).

Таблица 30 – Чувствительность правой задней лапы крыс с моделью послеоперационной боли к механическому раздражению

Группа	Фоновое число отдёргиваний	Число отдёргиваний правой задней лапы в ответ на раздражение нитью фон Фрея силой на сгибание, равной 10 г; сутки после операции:			
		1 день	2 день	3 день	4 день
Активный контроль, n=8	0,0 (0,0; 0,0)	0,5 (0,0; 2,3)	1,0 (0,0; 1,0)	0,5 (0,0; 1,3)	1,5 (0,5; 2,0)
Гимантан 10 мг/кг, n=9	1,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
Гимантан 5% гель, n=9	0,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)*	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
Гимантан 10 мг/кг + Гимантан 5% гель, n=9	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
Диклофенак 5 мг/кг, n=8	1,0 (0,0; 1,0)	1,0 (0,0; 1,0)	0,5 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,3)
Диклофенак 1% гель, n=9	1,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
Диклофенак 5 мг/кг + Диклофенак 1% гель, n=8	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,5)	0,0 (0,0; 0,0)
Примечание: * - $p<0,05$ по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе					

Термическая гипералгезия в группе крыс с моделью послеоперационной боли, не получавших экспериментальной терапии (группа активного контроля), проявлялась снижением медианы латентного периода (ЛП) отдёргивания левой задней лапы в ответ на подачу сфокусированного луча инфракрасного света на её подошвенную поверхность в 2,1 раза (до 4,6 секунды) на 1 сутки после операции по сравнению с зарегистрированным фоновым значением за сутки до хирургической манипуляции (9,8 секунды). В последующие 2, 3 и 4 сутки после операции в группе активного контроля ЛП отдёргивания левой задней лапы постепенно повышался соответственно до значения медиан, равных 5,9, 6,5 и 7,3 секундам, при этом значимая разница с фоновым значением сохранялась на 2 и 3 сутки после операции (таблица 31). Ни гимантан, ни диклофенак в гелевых лекарственных формах для наружного применения при ежедневном двукратном нанесении на задние лапы крыс и при ежедневном двукратном внутрибрюшинном введении значимого влияния на выраженность термической гипералгезии по сравнению с группой активного контроля не оказывали ни в один из дней регистрации (таблица 31). Значимое снижение выраженности термической гипералгезии левой задней лапы крыс с моделью послеоперационной боли по сравнению с группой активного контроля зафиксировано на фоне комбинированной экспериментальной терапии диклофенаком на 1 и 2 сутки после

операции, соответственно составлявшее 69,6% и 44,1%, и комбинированной экспериментальной терапии гимантаном на 2 сутки после операции, равное 46,6% (таблица 31).

Таблица 31 – Выраженность термической гипералгезии в условиях модели послеоперационной боли у крыс

Группа	Фоновый латентный период, сек.	Латентный период отдёргивания левой задней лапы, сек.; сутки после операции:			
		1 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки
Активный контроль, n=8	9,8 (8,4; 11,5)	4,6 (3,8; 6,8)#	5,9 (5,2; 6,6)#	6,5 (5,4; 8,0)#	7,3 (6,3; 8,7)
Гимантан 10 мг/кг, n=9	9,2 (8,7; 10,3)	5,1 (4,7; 8,4)#	7,1 (5,7; 8,2)	6,1 (5,7; 7,3)#	6,7 (5,5; 7,4)#
Гимантан 5% гель, n=9	9,0 (8,7; 9,9)	5,8 (5,4; 7,1)#	7,2 (5,6; 8,3)#	7,2 (7,1; 7,7)#	6,6 (5,2; 7,7)#
Гимантан 10 мг/кг + Гимантан 5% гель, n=9	9,3 (8,9; 10,7)	7,2 (6,7; 7,7)#	8,7 (7,3; 8,9)#*	8,5 (7,4; 10,2)	7,5 (5,1; 8,4)
Диклофенак 5 мг/кг, n=8	10,1 (8,3; 11,6)	5,3 (4,0; 6,6)#	6,3 (5,9; 6,8)#	7,9 (6,8; 9,7)	8,4 (7,0; 9,1)
Диклофенак 1% гель, n=9	9,2 (8,7; 12,1)	7,2 (5,9; 7,8)#	7,6 (5,2; 7,8)#	6,9 (6,3; 7,7)#	7,4 (6,7; 7,9)#
Диклофенак 5 мг/кг + Диклофенак 1% гель, n=8	10,6 (9,7; 12,5)	7,8 (6,1; 8,9)*#	8,5 (7,5; 10,6)*	7,8 (7,4; 8,6)#	10,0 (7,4; 12,4)
Примечание: * - p<0,05 по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Манна-Уитни, # - p<0,05 по сравнению с соответствующим фоновым показателем в группе, парный критерий Вилкоксона; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе					

Чувствительность в ответ на термическое раздражение правой задней лапы крыс с моделью послеоперационной боли, не получавших экспериментальной терапии (группа активного контроля), значимо не изменялась относительно фонового показателя во все дни её регистрации после операции в подошвенном тесте: медианы ЛП отдёргиваний правой задней лапы в ответ на подачу сфокусированного луча инфракрасного света соответствовали 8,9-11,7 секундам. Изучаемые препараты при всех схемах экспериментальной терапии не оказывали влияния на чувствительность неповреждённой правой задней лапы крыс с моделью послеоперационной боли к термическому раздражению (таблица 32).

Таблица 32 – Чувствительность правой задней лапы крыс с моделью послеоперационной боли к термическому раздражению

Группа	Фоновый латентный период, сек.	Латентный период отдёргивания правой задней лапы, сек.; сутки после операции:			
		1 день	2 день	3 день	4 день
Активный контроль, n=8	9,7 (7,8; 11,6)	11,1 (9,4; 12,8)	10,5 (9,1; 11,8)	8,9 (6,7; 10,1)	11,7 (10,9; 12,5)
Гимантан 10 мг/кг, n=9	9,3 (8,9; 10,2)	10,2 (8,9; 11,6)	8,8 (8,1; 15,8)	9,9 (9,2; 10,6)	9,1 (8,8; 9,4)
Гимантан 5% гель, n=9	9,5 (8,3; 10,2)	10,5 (9,2; 13,0)	9,3 (8,8; 11,9)	9,3 (8,1; 12,1)	8,9 (7,4; 10,8)
Гимантан 10 мг/кг + Гимантан 5% гель, n=9	9,5 (8,9; 10,2)	8,4 (7,8; 11,4)	8,9 (8,5; 10,7)	9,1 (7,9; 11,6)	7,7 (7,5; 9,1)
Диклофенак 5 мг/кг, n=8	9,8 (9,1; 11,1)	10,1 (9,2; 11,3)	10,1 (9,4; 11,4)	10,0 (9,2; 12,3)	10,2 (8,7; 11,3)
Диклофенак 1% гель, n=9	10,4 (9,2; 12,5)	11,4 (10,2; 12,1)	9,9 (8,7; 10,5)	8,6 (8,2; 10,9)	8,2 (7,7; 8,9)
Диклофенак 5 мг/кг + Диклофенак 1% гель, n=8	10,5 (9,1; 13,8)	11,6 (10,9; 12,2)	10,6 (8,3; 11,0)	11,5 (10,8; 12,1)	12,3 (10,3; 16,5)
Примечание: данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе					

Масса крыс с моделью послеоперационной боли во все дни регистрации после хирургической манипуляции значимо не отличалась от фоновых показателей массы, зафиксированных за сутки до операции, во всех экспериментальных группах (таблица 33), что подтверждает наличие у животных послеоперационной боли слабой выраженности, при которой не снижается потребление ими пищи и воды.

Таким образом, гелевая лекарственная форма гимантана для наружного применения серии 190219 у крыс с моделью послеоперационной боли снижает выраженность механической послеоперационной гипералгезии, не уступая по эффективности диклофенаку в 1% гелевой лекарственной форме для наружного применения, а также гимантану в дозе 10 мг/кг и диклофенаку в дозе 5 мг/кг при ежедневном двукратном внутрибрюшинном введении и комбинированной экспериментальной терапии препаратами при использовании их в виде гелевых лекарственных форм для наружного применения и при внутрибрюшинном введении. На выраженность термической гипералгезии у крыс с моделью послеоперационной боли ни гимантан, ни диклофенак в лекарственных формах для наружного применения при двукратном ежедневном применении значимого влияния не оказывают.

Таблица 33 – Масса крыс с моделью послеоперационной боли

Группа	Фоновое значение, г	Масса животных, г; сутки после операции:			
		1 день	2 день	3 день	4 день
Активный контроль, n=8	313 (306; 323)	307 (305; 326)	314 (309; 339)	314 (305; 338)	314 (306; 338)
Гимантан 10 мг/кг, n=9	308 (285; 318)	300 (278; 313)	307 (283; 316)	310 (286; 327)	315 (294; 335)
Гимантан 5% гель, n=9	289 (286; 301)	285 (282; 290)	290 (288; 298)	292 (291; 302)	298 (290; 310)
Гимантан 10 мг/кг + Гимантан 5% гель, n=9	311 (310; 337)	307 (299; 317)	311 (302; 319)	314 (296; 323)	308 (290; 317)
Диклофенак 5 мг/кг, n=8	292 (285; 303)*	280 (275; 296)	283 (279; 302)*	282 (274; 295)*	274 (268; 288)*
Диклофенак 1% гель, n=9	316 (313; 328)	316 (302; 320)	314 (306; 320)	320 (302; 324)	305 (299; 318)
Диклофенак 5 мг/кг + Диклофенак 1% гель, n=8	312 (290; 320)	325 (314; 327)	321 (296; 328)	317 (294; 321)	314 (298; 323)
Примечание: * - $p<0,05$ по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Манна-Уитни; данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; n – количество животных в группе					

Таким образом, результаты третьего этапа экспериментального исследования свидетельствуют о наличии у 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения (содержит на 50,0 г лекарственной формы: гимантана – 2,50 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагина – 0,075 г, нипазола – 0,025 г, ДМСО – 5,00 г, воды очищенной до 50,00 г) анальгетической активности, проявляющейся при её однократном нанесении на задние лапы крыс с моделью термической гипералгезии, вызванной острым экссудативным воспалением – каррагенановым отёком, – и при её ежедневном курсовом (дважды в сутки) наружном нанесении на задние лапы крыс с моделью послеоперационной боли в отношении механической гипералгезии.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одним из разрабатываемых направлений фармакотерапии боли и воспаления при заболеваниях костно-мышечной системы является создание препаратов в лекарственных формах для наружного применения, эффективность которых обеспечивается высокими концентрациями действующих веществ в патологическом очаге при их сниженных концентрациях в системном кровотоке по сравнению с пероральным приёмом препаратов. Адамантансодержащие соединения перспективны в качестве действующих веществ для создания новых противовоспалительных и противоболевых препаратов в лекарственных формах для наружного применения, так как высокая липофильность углеводородного каркаса адамантильного фрагмента определяет их способность легко проникать через клеточные мембраны и даже менять их физические свойства [1, 36]. К примеру, известно, что ремантадин при добавлении к мембранам из лецитина и холестерина в концентрации 30-40 мкг/мл вызывает повышение их эластичности [36, 179]. Производное 2-аминоадамантана гимантан (N-(2-адамантил)-гексаметиленимина гидрохлорид), оценка противоболевой и противовоспалительной активности которого в лекарственной форме для наружного применения является целью диссертационного исследования, проявляет мембранотропные свойства в эксперименте на мембранах эритроцитов [20, 35].

На первом этапе диссертационного исследования осуществляли выбор концентрации гимантана в гелевой лекарственной форме для наружного применения и вспомогательных веществ лекарственной формы препарата исследования на основании результатов оценки противоболевой и противовоспалительной активности лекарственных форм гимантана разных составов в формалиновом тесте у крыс. Механизм ноцигенного и провоспалительного действия формалина комплексный и включает активацию TRPA1 каналов, реагирующих в норме на холод и при стимуляции способствующих развитию воспаления [256], С-волокон [171]; повышение уровня внеклеточного глутамата и аспартата [314] и концентрации вещества Р в задних рогах спинного мозга [203]. В свою очередь, вещество Р, выделяющееся при стимуляции из периферических окончаний С-волокон, способно изменять возбудимость клеточных мембран за счёт взаимодействия со вторичными мессенджерами и протеинкиназами, фосфорилирующими мембраносвязанные белки [267]. При формалиновом отёке наблюдается миграция лейкоцитов, преимущественно нейтрофилов, в зону повреждения тканей [228, 295].

При сравнении противоболевой и противовоспалительной эффективности 1% и 5% гелей-прототипов гимантана в формалиновом тесте у крыс установлено, что 5% гель-прототип превосходит 1% гель-прототип, уменьшая воспаление и боль в тоническую фазу так же эффективно, как и известный нестероидный противовоспалительный препарат (НПВП) диклофенак [118] в виде 1% геля. Однако в отличие от 1% геля диклофенака, 5% гель-прототип

гимантана снижает ещё и болевую чувствительность животных в острую фазу формалиновой боли. При сравнении выраженности противоболевого и противовоспалительного действия 5% гелей гимантана, различающихся составом вспомогательных компонентов, в формалиновом тесте у крыс в качестве наиболее перспективной гелевой лекарственной формы для наружного применения выбрана 5% гелевая лекарственная форма гимантана с ДМСО в своём составе. ДМСО увеличивает проницаемость клеточных мембран для многих лекарственных веществ (стрептоцида, салициловой кислоты, бутадиона, гепарина, антибиотиков, нитроглицерина и др.), в частности, повышенное всасывание преднизолона из мазей, содержащих ДМСО, позволяет в 10 раз снизить его терапевтическую дозу [42, 176]; поэтому ДМСО широко применяется в фармацевтической технологии как активатор всасывания. ДМСО проявляет противовоспалительную активность и в неразведенном виде используется в качестве лекарственного препарата «Димексид» [44]. Выбранная наиболее перспективной для дальнейших исследований 5% гелевая лекарственная форма гимантана для наружного применения содержит на 50,0 г лекарственной формы: гимантана – 2,50 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагина – 0,075 г, нипазола – 0,025 г, ДМСО – 5,00 г, воды очищенной до 50,00 г. Гель-плацебо, отличающийся от указанной 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения отсутствием действующего вещества, не обладает противовоспалительным и противоболевым действием в формалиновом тесте у крыс, что согласуется с описанными в литературе данными, свидетельствующими о том, что содержания ДМСО менее 20% в лекарственных формах для наружного применения недостаточно для проявления его собственной противовоспалительной активности [12].

5% гель-прототип гимантана и 5% гель гимантана, содержащий ДМСО в своём составе, способны наряду с характерным для НПВП-ингибиторов ЦОГ обезболивающим действием в отношении тонической фазы формалиновой боли [185] снижать чувствительность крыс в острую её фазу, в отношении которой эффективны местные анестетики [53, 256]. Однако гимантан при внутрибрюшинном введении в дозе 20 мг/кг проявляет, как и диклофенак натрия при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг, анальгетический эффект в отношении тонической, но не острой фазы формалиновой боли у крыс [191]. Скорее всего, различие анальгетических свойств гимантана в 5% лекарственной форме для наружного применения и при внутрибрюшинном введении в дозе 20 мг/кг в формалиновом тесте у крыс обусловлено большей концентрацией действующего вещества в области инъекции при использовании препарата в виде 5% геля, за счёт чего ярче проявляются его мембранотропные свойства. Подтверждением этому служат экспериментальные данные о способности ремантадина и 2-адамантанамина оказывать дозозависимое местноанестезирующее действие [184]. Кроме того, известно, что глутамат играет важную роль в гомеостазе кожи, его секреция повышается при нарушении её целостности, и

блокаторы NMDA-рецепторов ускоряют процессы заживления кожи [150]. Поэтому вероятно, что различие в проявлении обезболивающего действия гимантана в виде 5% геля и при внутрибрюшинном введении обусловлено в том числе более сильным блокирующим влиянием препарата в лекарственной форме для наружного применения на NMDA-рецепторы кожи за счёт большей концентрации действующего вещества в тканях задней лапы крысы, в которую вводили раствор формалина, что требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

О выраженном местном действии гимантана в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения свидетельствует его антиэкссудативная эффективность на модели каррагенанового отёка лапы у крыс, сопоставимая с антиэкссудативной эффективностью 1% геля диклофенака и не уступающая эффективности гимантана в дозе 20 мг/кг и диклофенака в дозе 10 мг/кг при внутрибрюшинном введении. Каррагенановый отёк лапы у крыс является широко используемой моделью экссудативной воспалительной реакции, которая характеризуется двумя фазами течения патологического процесса. Ранняя фаза развивается в течение первого часа после введения флогогена и обусловлена выделением гистамина, серотонина, брадикинина и, в меньшей степени, простагландинов. Отставленная по времени фаза воспаления (спустя 1 час после введения раствора каррагенана) сопровождается нейтрофильной инфильтрацией и продолжающейся генерацией простагландинов [156]. Выделяемые нейтрофилами свободные радикалы, оксид азота NO, фактор некроза опухоли α и ИЛ-1β также вовлечены в процесс развития отставленной по времени фазы острого каррагенанового воспаления лапы крыс [165]. Результаты выполненного в ходе диссертационного исследования эксперимента свидетельствуют о том, что через 5 часов после индукции воспаления в мягких тканях лап крыс с каррагенановым отёком повышается уровень продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, одним из которых является малоновый диальдегид (МДА); его концентрация увеличивается при интенсификации окислительного стресса и метаболизма арахидоновой кислоты [172]. В проведённых ранее в лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» исследованиях установлено, что гимантан обладает антиоксидатными свойствами, снижая уровень МДА в системе аскорбат-зависимого ПОЛ в гомогенате печени интактных крыс [5]; при внутрибрюшинном введении животным уменьшая повышенный уровень продуктов ПОЛ в структурах головного мозга мышей C57BL/6 с 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин-индуцированным паркинсоническим синдромом и аутбредных крыс с 6-гидроксидофамин-индуцированным паркинсоническим синдромом [15] и в перитонеальном экссудате аутбредных мышей с гликогеновым перитонитом и аутбредных крыс с уксусным перитонитом [35]. Гимантан при однократном внутрибрюшинном введении в дозе 20 мг/кг, в отличие от диклофенака при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг, значимо на 17% снижает повышенный уровень продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, в гомогенате

мягких тканей лап крыс с каррагенановым отёком. По способности уменьшать повышенный уровень продуктов ПОЛ в мягких тканях лап крыс с каррагенановым отёком гимантан при внутрибрюшинном введении значительно уступает его 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения, на фоне которой при однократном нанесении на лапу крыс с каррагенановым отёком повышенный уровень продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, снижается на 62%. 1% гель диклофенака уменьшает концентрацию продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, в гомогенате мягких тканей лап крыс на 17% ($p<0,05$). Наблюдаемый в эксперименте местный антиоксидантный эффект гимантана и диклофенака в гелевых лекарственных формах для наружного применения не сопровождается изменением уровня продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, в сыворотке крови крыс с каррагенановым отёком лапы.

Известно, что диклофенак при системном введении способен снижать повышенный уровень малонового диальдегида в плазме крови крыс с адъювантным артритом [323] и каррагенановым отёком лапы [54]. Отсутствие влияния диклофенака в дозе 10 мг/кг на уровень продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, в гомогенате мягких тканей лап крыс, вероятно, обусловлено недостаточностью его дозы для развития антиоксидантного действия в зоне введения каррагенана. Это подтверждается тем, что гимантан в дозе 20 мг/кг, оказывающий более выраженное антиоксидантное действие при внутрибрюшинном введении мышам и крысам с экссудативным воспалением, чем диклофенак при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг [35], в гораздо меньшей степени снижает повышенный уровень изучаемых продуктов СРО липидов в гомогенате тканей лап крыс с каррагенановым отёком по сравнению с его лекарственной формой для наружного применения.

Ранняя фаза каррагенанового отёка по механизму развития подобна реакции воспаления на конканавалин А (Кон А), которую регистрируют через час после введения флогогена в заднюю лапу мышей и рассматривают в качестве модели псевдоаллергической реакции, вызванной высвобождением тучными клетками и базофилами медиаторов воспаления [26, 39]. В тесте реакции воспаления на Кон А у аутбредных мышей оценивали противовоспалительное действие гимантана в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения при курсовом десятидневном нанесении на задние лапы мышей, последнее из которых осуществлялось за 1 час до индукции воспаления. Установлено, что изучаемый препарат при данной схеме применения так же, как и при однократном использовании в методиках формалинового и каррагенанового отёков у крыс, снижает отёчность лап животных. Его эффективность не уступает эффективности курсового применения гимантана при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг и диклофенака при применении в дозе 5 мг/кг внутрибрюшинно или в виде 1% геля наружно.

В продолжение изучения противовоспалительного действия гимантана в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения проводили исследование его эффективности на модели адъювантного артрита, вызванного субплантарным введением полного адъюванта Фрейнда (ПАФ) в заднюю лапу аутбредных крыс. Эта модель разрабатывалась с середины прошлого столетия [268, 348] и является широко известной и используемой по сей день [25, 122, 280]. Введение ПАФ в заднюю лапу крыс приводит к первичному неиммунному воспалению этой лапы, после чего развивается вторичная иммунологическая реакция, характеризующаяся отёком контралатеральной задней лапы, и дальнейшая генерализация воспалительного процесса. Однако вторичная иммунологическая реакция с последующей генерализацией воспалительного процесса формируется не у всех крыс с адъювантным артритом. Так, в работе Шекуновой Е.В. и соавторов [51] описано развитие генерализации патологического процесса той или иной выраженности примерно у 41% животных с этой моделью: у 25% крыс она затрагивает суставы контралатеральной задней конечности, суставы передних конечностей и суставы хвоста; у 16% крыс она проявляется поражением суставов контралатеральной по отношению к стороне инъекции ПАФ задней лапы. Рядом исследователей субплантарная инъекция ПАФ в заднюю лапу крыс используется как модель артрита, при которой у животных регистрируют отёчность только той лапы, в которую вводят ПАФ [7, 47].

Изучение эффективности гимантана в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения на модели адъювантного артрита у аутбредных крыс проводили в два этапа, на первом из которых оценивали его влияние на выраженность первичной воспалительной реакции животных при ежедневном наружном применении, начиная за сутки до инъекции ПАФ; на втором этапе исследовали влияние 5% геля гимантана на выраженность патологического процесса у крыс с вторичной иммунологической воспалительной реакцией при ежедневном наружном применении, начиная через 14 суток после инъекции ПАФ в заднюю лапу животных. На обоих этапах исследования эффективность 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения оценивали в сравнении с 1% гелевой лекарственной формой диклофенака для наружного применения, а также диклофенаком в дозе 5 мг/кг и гимантаном в дозе 10 мг/кг при ежедневном внутрибрюшинном введении.

На первом этапе исследования установлено, что гимантан в виде 5% геля подавляет выраженность первичной воспалительной реакции у крыс в ответ на введение ПАФ, не уступая по эффективности гимантану в дозе 10 мг/кг и диклофенаку в дозе 5 мг/кг при внутрибрюшинном введении и 1% гелю диклофенака, но не оказывает влияния на сниженный прирост массы тела животных, характерный для развивающегося патологического процесса, что наблюдается при использовании гимантана и диклофенака при системном введении на 3 сутки после инъекции ПАФ. У крыс с воспалительным процессом на 14 сутки после введения ПАФ зарегистрирована

инволюция тимуса и гипертрофия селезёнки, что свидетельствует о развитии патологии иммунной системы и согласуется с результатами морфологического исследования, описанными для крыс с вызванным субплантарным введением ПАФ в заднюю лапу воспалительным процессом на 135 день опыта [48]. Гимантан и диклофенак как при наружном, так и при внутрибрюшинном способах введения не устраняли эти симптомы развития патологии иммунной системы. Выявленная на первом этапе исследования способность 5% геля гимантана снижать вызванную ПАФ первичную воспалительную реакцию у животных явилась основанием для проведения второго этапа исследования его эффективности на модели адъювантного артрита у аутбредных крыс с вторичной иммунологической воспалительной реакцией.

У животных с хроническим иммунным воспалением, при котором развивается повреждение суставов других конечностей помимо той, в которую вводят ПАФ, наряду с внешними признаками артрита (отёчность, эритема и деформация конечностей) наблюдаются характерные для ревматоидного артрита патоморфологические изменения в суставах, проявляющиеся, прежде всего, усиленной пролиферацией синовиоцитов, гиперплазией, отёчностью и утолщением синовиальной оболочки, образованием паннуса [24, 51]. Критическую роль в патогенезе ревматоидного артрита играют В-лимфоциты, Т-лимфоциты и макрофаги [346]. На лимфоцитах человека находятся ионотропные глутаматные рецепторы [237], и иммунные клетки выделяют глутамат, который модулирует их активность [56, 278]. Известно, что антагонисты NMDA-рецепторов (МК-801, мемантин, ифенпродил) оказывают иммуносупрессивное действие, снижая антиген-специфическую Т-клеточную пролиферацию, цитотоксичность и способность контролируемой хемокинами миграции Т-клеток [202].

Блокатор NMDA-рецепторов гимантан уменьшает отёчность задних конечностей крыс с вторичным иммунным воспалением, вызванным введением ПАФ в заднюю лапу, при применении в виде 5% гелевой лекарственной формы для наружного применения, по выраженности противоотёчного действия не уступая диклофенаку в виде 1% геля. Вследствие развивающегося хронического иммунного воспалительного процесса у крыс наблюдается сниженный прирост массы тела, гипералгезия задних конечностей, моторный дефицит и изменение ряда гематологических параметров. Гимантан и диклофенак при наружном применении в виде гелей и внутрибрюшинном введении снижают выраженность воспалительной гипералгезии у крыс, зарегистрированной как для правой, так и для левой задней лапы в подошвеном тесте, при этом наибольший эффект зафиксирован на фоне 1% геля диклофенака; препараты в гелевых лекарственных формах и гимантан при внутрибрюшинном введении устраняют моторный дефицит животных с экспериментальным воспалительным процессом в тесте «Вращающийся стержень».

На 14 сутки после инъекции ПАФ (до начала курсового применения препаратов) в крови крыс всех групп с вторичным иммунным воспалением наблюдалось увеличенное содержание тромбоцитов и повышенный тромбокрит. Известно, что при обострении заболевания у пациентов с ревматоидным артритом регистрируют увеличение уровня тромбоцитов [2], которое связывают со стимуляцией мегакариоцитопоэза ИЛ-6; ИЛ-11; фактором роста стволовых клеток; фактором, ингибирующим лейкемию; колониестимулирующим фактором гранулоцитов и тромбопоэтином [141, 201]. На 28 сутки после инъекции ПАФ содержание тромбоцитов и тромбокрит во всех группах крыс с адъювантным артритом, кроме группы животных, которым внутрибрюшинно вводили диклофенак в дозе 5 мг/кг, не отличались от показателей группы крыс без экспериментальной патологии. Кроме содержания тромбоцитов и тромбокрита, на 14 сутки после индукции воспаления у крыс с вызванным ПАФ воспалительным процессом было повышено процентное содержание сегментоядерных нейтрофилов при компенсаторном снижении лимфоцитов. На фоне гимантана при его ежедневном наружном применении в виде 5% геля или внутрибрюшинном введении, начиная с 14 дня опыта, на 28 сутки после индукции воспаления показатель сегментоядерных нейтрофилов снижался по сравнению с зарегистрированными на 14 день значениями; экспериментальная терапия диклофенаком при обоих способах введения к значимому уменьшению сегментоядерных нейтрофилов не приводила.

Как на первом, так и на втором этапе исследования эффективности гимантана в сравнении с диклофенаком при четырнадцатидневном ежедневном применении в виде гелевых лекарственных форм и при внутрибрюшинном введении на модели адъювантного артрита у крыс, вызванного инъекцией ПАФ, зафиксирована гибель животных в группах, которым наружно наносили 1% гель диклофенака: на первом этапе исследования погибло 4 из 11 крыс; на втором этапе – 4 из 10 крыс в группе. Учитывая, что при ежедневном внутрибрюшинном введении диклофенака в дозе 5 мг/кг на протяжении 2 недель гибели животных на обоих этапах исследования зарегистрировано не было, то гибель крыс, которым ежедневно наносили 1% гель диклофенака, обусловлена токсическим влиянием не действующего вещества, а препарата в лекарственной форме – 1% геля диклофенака фирмы Hemofarm (биодоступность диклофенака при местном применении этого 1% геля составляет 6% [44]).

На фоне двухнедельного внутрибрюшинного введения диклофенака крысам с вторичным иммунным воспалением на втором этапе исследования (с 14 по 28 сутки после введения ПАФ) в крови животных снижались содержание эритроцитов, концентрация гемоглобина и гематокрит, повышалось содержание гранулоцитов при сохранившихся с 14 дня эксперимента увеличенных значениях тромбоцитов и тромбокрита. В опубликованном анализе результатов шести двойных слепых РКИ эффективности, переносимости и безопасности комбинации протеолитических ферментов и биофлаваноидов в сравнении с диклофенаком при ОА коленного сустава показано,

что пероральная курсовая терапия диклофенаком приводит к снижению уровня гемаглобина и гематокрита у пациентов [333]. При экспериментальной двухнедельной терапии крыс с вторичным иммунным воспалением гимантаном при обоих способах введения подобного диклофенаку влияния на гематологические показатели не наблюдалось.

Изучение анальгетической активности 5% гелевой лекарственной формы гимантана для наружного применения в сравнении с гимантаном и диклофенаком при внутрибрюшинном введении и гелем диклофенака при наружном применении проводили на моделях термической гипералгезии при остром экссудативном воспалении и послеоперационной гипералгезии у крыс. Влияние препаратов на термическую гипералгезию оценивали в подошвенном тесте у животных с каррагенановым отёком лапы. Повышение в тканях в ответ на инъекцию раствора каррагенана уровня брадикинина стимулирует развитие цитокинового каскада (увеличение концентрации ФНО-α, цитокин-индуцированного нейтрофильного хемоаттрактанта (CINC)-1/CXCL1, ИЛ-1β), который, в свою очередь, обуславливает высвобождение простагландинов и симпатических аминов [123, 147], за счёт влияния на присутствующие в мембранах ноцицептивных нейронов рецепторы сенсибилизирующих первичные афферентные ноцицепторы [119, 148, 206]. Через 3 часа после введения 100 μг каррагенана в заднюю лапу крыс наблюдается пик аккумуляции нейтрофилов в тканях её подошвы, определяемый по активности миелопероксидазы [124]. В зоне воспаления нейтрофилы могут продуцировать или увеличивать содержание медиаторов воспаления, включающих свободные радикалы, протоны водорода, металлопротеазы и другие ферменты и способствующих выделению медиаторов, напрямую воздействующих на ноцицепторы; кроме того, известно, что нейтрофилы непосредственно обуславливают развитие механической гипералгезии у крыс с каррагенановым отёком лапы [316, 339].

Гимантан в виде 5% геля при нанесении на заднюю конечность крыс с каррагенановым отёком через 2 часа после инъекции раствора каррагенана повышает порог болевой чувствительности животных, регистрируемый через 3 часа после индукции воспаления, и его анальгетический эффект значимо не отличается от эффекта диклофенака при обоих способах введения. Однако внутрибрюшинное введение гимантана в дозе 20 мг/кг крысам с каррагенановым отёком не приводило к значимому снижению их болевой чувствительности в подошвенном тесте. По всей видимости, разница в проявлении анальгетических свойств гимантана при наружном применении в виде 5% геля и системном введении в тесте термической гипералгезии у крыс с каррагенановым отёком обусловлена, как и в тесте формалиновой боли у крыс, большей концентрацией действующего вещества в патологическом очаге при использовании препарата в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения.

Модель послеоперационной боли у крыс, вызванной разрезом кожи, фасций и короткого сгибателя пальцев (flexor digitorum brevis) задней лапы, воспроизводит острую боль при

хирургических разрезах [92]. Послеоперационная боль у пациентов возникает в состоянии покоя и обостряется при кашле, движении [92] и механической стимуляции [198, 294, 331, 332]. У крыс с используемой моделью послеоперационной боли на протяжении нескольких дней после хирургической манипуляции наблюдается механическая гипералгезия, что свидетельствует о подобии регистрируемых в экспериментальной работе проявлений клинической картине механической гипералгезии в послеоперационном периоде у людей [92, 331]. Развивающаяся после этой операции боль у крыс является болью слабой выраженности, так как у животных после операции отсутствует потеря массы тела по сравнению с более болезненными хирургическими манипуляциями, например, лапаротомией, после которой масса тела животных снижается [149, 309]. Острая боль после операции вызвана сенситизацией ноцицепторов при повреждении нервных волокон, в частности, чувствительных к тепловым и механическим раздражителям ноцицептивных С-волокон [92, 97], и высвобождением в месте разреза кожи обуславливающих развитие гипералгезии и аллодинии медиаторов воспаления [169].

Гимантан в виде 5% геля при двукратном ежедневном применении в тесте оценки чувствительности с помощью нитей фон Фрея значимо снижал выраженность механической послеоперационной гипералгезии, наблюдавшейся у крыс с моделью послеоперационной боли на протяжении 4 суток после операции, не уступая по эффективности диклофенаку в виде 1% геля, гимантану в дозе 10 мг/кг и диклофенаку в дозе 5 мг/кг при ежедневном двукратном внутрибрюшинном введении и комбинированной экспериментальной терапии препаратами при использовании их в виде лекарственных форм для наружного применения и при внутрибрюшинном введении. Однако повышение порога болевой чувствительности к термическому раздражителю на фоне изучаемых препаратов при их двукратном наружном применении в виде гелей или внутрибрюшинном введении не достигало величин, значимо отличавшихся от соответствующих показателей в группе животных с моделью послеоперационной боли, не получавших экспериментальной терапии; выраженность термической гипералгезии у крыс с моделью послеоперационной боли значимо уменьшалась при применении комбинированной экспериментальной терапии диклофенаком на 1 и 2 сутки после операции и гимантаном на 2 сутки после операции. Вероятнее всего, для проявления анальгетического эффекта гимантана и диклофенака при их курсовом использовании в виде гелей или введении внутрибрюшинно в тесте термической гипералгезии у крыс с моделью послеоперационной боли требуются большие дозы препаратов, что согласуется с результатами экспериментального исследования, согласно которому доз мелоксикама замедленного высвобождения при подкожном введении и геля капрофена при наружном применении, обеспечивающих анальгетическое действие в отношении механической послеоперационной гипералгезии у крыс, недостаточно для достижения анальгетического эффекта в отношении

термической послеоперационной гипералгезии [309]. Кроме того, известно, что блокаторы NMDA рецепторов более выраженно подавляют механическую гипералгезию, вызванную ПАФ у крыс, по сравнению с термической. Так, неконкурентный блокатор NMDA рецепторов МК-801 и конкурентыный блокатор NMDA рецепторов АР-5 при интратекальном введении животным оказывают дозозависимый анальгетический эффект в отношении механической гипералгезии, и только АР-5 способен снижать выраженность термической гипералгезии [167]; блокатор NMDA рецепторов [Ser^{1}]histogranin подавляет механическую, но не термическую гипералгезию у крыс [166].

Таким образом, результаты диссертационного исследования свидетельствуют о том, что производное 2-аминоадамантана гимантан в выбранной 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения (состав на 50,0 г лекарственной формы: гимантана – 2,50 г, ГПМЦ – 1,00 г, нипагина – 0,075 г, нипазола – 0,025 г, ДМСО – 5,00 г, воды очищенной до 50,00 г) проявляет противовоспалительную активность на моделях острой экссудативной реакции у крыс и мышей и адъювантного артрита у крыс и противоболевую активность на моделях термической гипералгезии при воспалении, формалиновой боли и механической гипералгезии, развившейся вследствие хирургической манипуляции, у крыс (Рисунок 11). Его эффективность по большинству регистрируемых параметров не уступает эффективности известного НПВП диклофенака в 1% гелевой лекарственной форме. Однако в отличие от него 5% гель гимантана при однократном применении проявляет анальгетическую активность в острую фазу формалиновой боли и в значительно большей степени снижает повышенный уровень продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, в мягких тканях лап крыс с каррагенановым отёком, а при двухнедельном ежедневном применении не вызывает гибели крыс с вызванным ПАФ адъювантным артритом. 5% гель гимантана при наружном применении, в отличие от гимантана при внутрибрюшинном введении, проявляет анальгетическую активность в отношении острой фазы формалиновой боли и термической гипералгезии у крыс с каррагенановым отёком и значительно более выраженно снижает повышенный уровень продуктов ПОЛ в мягких тканях лап крыс с каррагенановым отёком, что свидетельствует о способности гимантана в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения хорошо проникать в ткани, обеспечивая в них высокую концентрацию действующего вещества, что обуславливает эффективность гимантана в этой лекарственной форме.

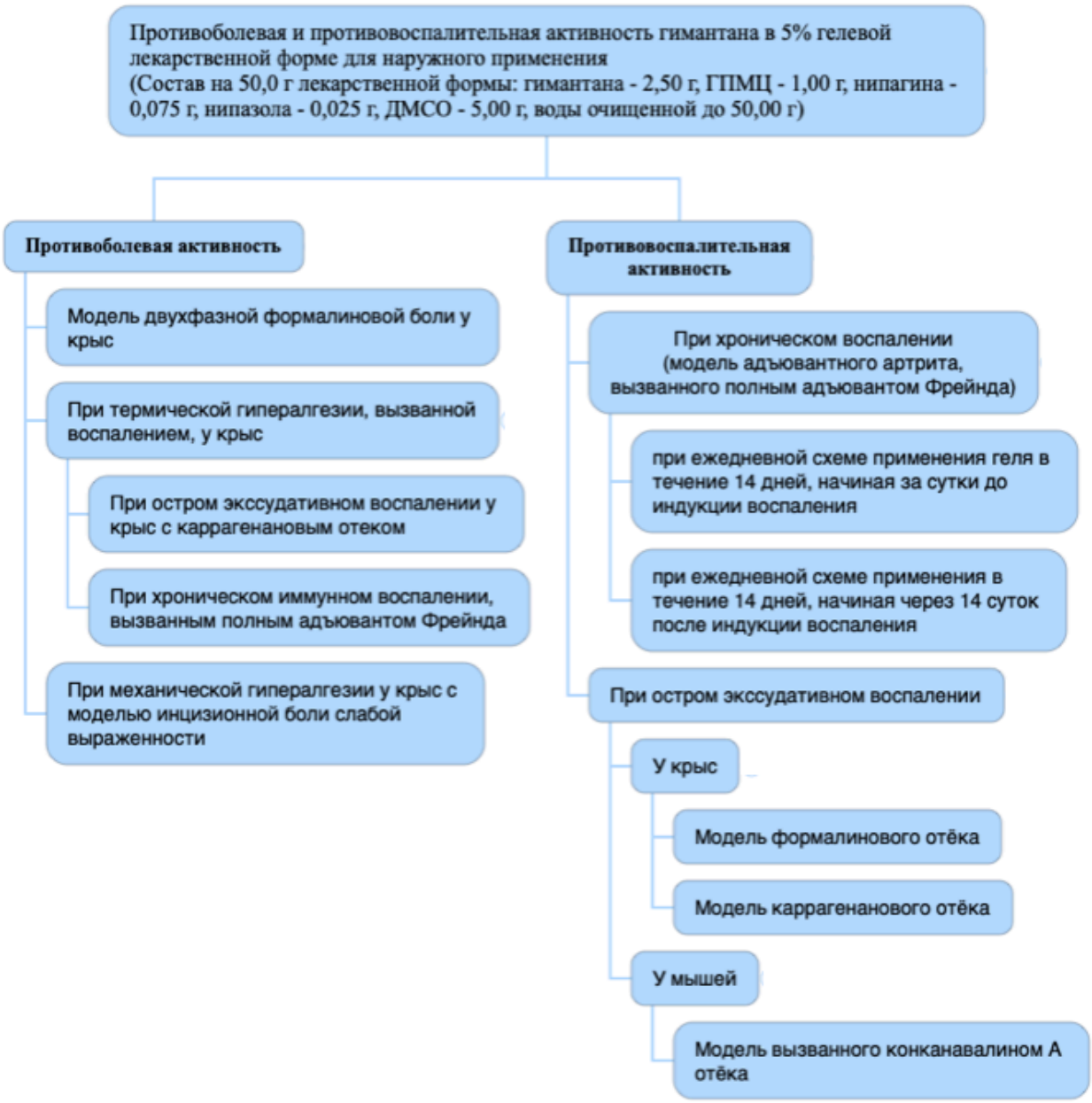

Рисунок 11. Экспериментальные модели на грызунах, на которых гимантан в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения проявляет противоболевую и противовоспалительную активность

ВЫВОДЫ

1. Гель-прототип гимантана 5% (содержит действующее вещество и гелеобразователь) при однократном наружном применении оказывает противоболевое действие в острой и тонической фазе формалиновой боли у крыс и снижает обусловленную инъекцией раствора формалина отёчность лап животных, превосходит по эффективности 1% гель-прототип гимантана и не уступает по противоболевому и противовоспалительному эффекту 1% гелю диклофенака.

2. Гелевая лекарственная форма гимантана для наружного применения 5%, содержащая в составе вспомогательных веществ диметилсульфоксид и гидроксипропилметилцеллюлозу, в формалиновом тесте и на модели каррагенанового отёка у крыс более эффективна, чем 5% гелевые лекарственные формы гимантана для наружного применения, содержащие в составе вспомогательных веществ гидроксипропилметилцеллюлозу или полоксамер Р407.

3. На модели каррагенанового отёка у крыс 5% гель гимантана при однократном нанесении проявляет антиэкссудативный эффект, сопоставимый с эффектом 1% геля диклофенака, гимантана (20 мг/кг) и диклофенака (10 мг/кг) при однократном внутрибрюшинном введении.

4. На модели каррагенанового отёка у крыс 5% гель гимантана при однократном нанесении снижает повышенный уровень продуктов свободно-радикального окисления липидов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, в гомогенате мягких тканей лап крыс, превосходит по антиоксидатным свойствам диклофенак (1% гель) и гимантан (20 мг/кг, внутрибрюшинно).

5. На модели отёка стопы у мышей, вызванного конканавалином А, 5% гель гимантана при ежедневном применении в течение 10 дней уменьшает воспалительную реакцию на 48,4%, не уступая по эффективности диклофенаку (1% гель; 5 мг/кг, внутрибрюшинно) и гимантану (10 мг/кг, внутрибрюшинно).

6. На модели адъювантного артрита у крыс 5% гель гимантана при ежедневном применении в течение 14 дней, начиная за сутки до индукции воспаления, снижает выраженность отёчного синдрома, не уступает по эффективности гимантану (10 мг/кг, внутрибрюшинно) и диклофенаку (1% гель; 5 мг/кг внутрибрюшинно).

7. У крыс с вторичным иммунным воспалением, вызванным инъекцией полного адъюванта Фрейнда, 5% гель гимантана при ежедневном курсовом применении, начиная с 14 дня после индукции воспаления, снижает отёчность, выраженность гипералгезии, нормализует координацию движений; снижает уровень сегментоядерных нейтрофилов, не оказывает побочных эффектов.

8. 5% гель гимантана при однократном применении оказывает анальгетическое действие в тесте термической гипералгезии у крыс с каррагенановым отёком лапы, сходное с эффектом диклофенака (1% геля и 10 мг/кг, внутрибрюшинно).

9. 5% гель гимантана при ежедневном курсовом (дважды в сутки) применении оказывает анальгетическое действие на модели послеоперационной боли у крыс в отношении механической гипералгезии, не уступает по эффективности 1% гелю диклофенака при наружном применении, гимантану (10 мг/кг, внутрибрюшинно) и диклофенаку (5 мг/кг, внутрибрюшинно) при ежедневном двукратном введении и комбинациям гимантана (10 мг/кг, внутрибрюшинно) и 5% геля гимантана; диклофенака (5 мг/кг, внутрибрюшинно) и 1% геля диклофенака.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные в ходе диссертационного исследования данные свидетельствуют о целесообразности расширенного доклинического изучения производного 2-аминоадамантана гимантана (N-(2-адамантил)-гексаметиленимина гидрохлорид) в 5% гелевой лекарственной форме для наружного применения в качестве потенциального противовоспалительного и противоболевого лекарственного препарата для наружного применения в комплексной терапии болезней костно-мышечной системы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ОА – остеоартрит, остеоартроз

в/с – внутрисуставный

ГК – гиалуроновая кислота

ГКС – глюкокортикостероиды

ДМСО – диметилсульфоксид

ИЛ – интерлейкин

ИМТ – индекс массы тела

ИОЗСН – ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина

Кон А – конканавалин А

ЛП – латентный период

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

МДА – малоновый диальдегид

НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты

НСАС – неомыляемые соединения масел авокадо и соевых бобов

ПАФ – полный адъювант Фрейнда

ПГЕ2 – простагландин Е2

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПТГ – Паратиреоидный гормон

РКИ – рандомизированное контроллируемое исследование

СРО – свободно-радикальное окисление

ТБК - 2-тиобарбитуровая кислота

ФНО (TNF) – фактор некроза опухолей (tumor necrosis factor)

ЦОГ – циклооксигеназа

AAOS – American Academy of Orthopedic Surgeons

ACR – American College of Rheumatology

BMP – (bone morphogenetic protein) костный морфогенетический белок

COMP – Human Cartilage Oligomeric Protein

NGF – (nerve growth factor) фактор роста нервов

OARSI – Osteoarthritis Research Society International

VEGF – (vascular endothelial growth factor) фактор роста эндотелия сосудов

WOMAC – Western Ontario and McMAster Universities Osteorthritis Index

ЛИТЕРАТУРА

1. Багрий, Е.И. Адамантаны: получение, свойства, применение [Текст] / Е.И. Багрий. – М.: Наука. – 1989. – 264 с.

2. Балабанова, Р.М. Ревматоидный артрит: новые подходы к старой проблеме [Электронный ресурс] / Р.М. Балабанова, Е.В. Шекшина. – Режим доступа: https://medi.ru/info/1912.

3. Вакуленко, О.Ю. Остеоартроз: современные подходы к лечению [Текст] / О.Ю. Вакуленко, Е.В. Жиляев // Ревматология. – 2016. – № 22. – С. 1494-1498.

4. Вальдман, Е.А. Средство для терапии боли и воспаления при нейродегенеративных заболеваниях [Текст] // Патент РФ 2 559 777 / Е.А. Вальдман, Е.А. Иванова, И.Г. Капица, Т.А. Воронина, С.В. Алексеева, А.В. Непоклонов. – 2015.

5. Вальдман, Е.А. Разработка фармакологического средства патогенетической терапии паркинсонизма на основе анализа механизмов действия производных аминоадамантана [Текст]: дисс. … д-ра мед. наук: 14.00.25 / Вальдман Елена Артуровна. – М., 2001.

6. Ватутин, Н.Т. Изменения крови при ревматоидном артрите [Текст] / Н.Т. Ватутин, Н.В. Калинкина, Н.В. Склянная, А.С. Николишина // Украинский медицинский журнал. – 2008. – Т. 32, № 2. – С. 58-64.

7. Веснина, Л.Э. Фуллерен С 60 обладает иммуномодулирующей активностью при адъювантном артрите у крыс [Текст] / Л.Э. Веснина, Т.В. Мамонтова, М.В. Микитюк, Н.А. Боброва, Л.А. Куценко, Г.А. Ярошенко, И.П. Кайдашев // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – Т. 75, № 8. – С. 15-20.

8. Владимиров, Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах [Текст] / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 252 с.

9. Вологдина, А.В. Состояние неферментного перекисного окисления липидов у больнх хроническими воспалительными заболеваниями [Текст] / А.В. Вологдина // Механизмы повреждения и регуляции восстановления процессов. – Новосибирск, 1988. – С. 3-4.

10. Воронина, Т.А. Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств [Текст] / Т.А. Воронина, Л.С. Гузеватых // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под общ. ред. А.Н. Миронова. Часть 1. – Москва: Гриф и К, 2012. – С. 197-218.

11. Гайнетдинова, А.Н. Оценка эффективности тиоктовой кислоты в комбинированной терапии ревматоидного артрита: клинико-экспериментальное исследование [Текст]: дисс. … канд. мед. наук: 14.03.06 /Гайнетдинова Алсу Нурисламовна. – Казань, 2018.

12. Гомжин, А.М. Гель димексида, обладающий противовоспалительным действием [Текст] / Патент РФ 2 408 366 //А.М. Гомжин, А.Н. Карпов, С.Н. Сакварелидзе. – 2011.

13. Иванова, Е.А. Фармацевтическая композиция в гелевой лекарственной форме для местного применения на основе N-(2-адамантил)-гексаметиленимина гидрохлорида [Текст] / Патент РФ 2 663 452 // Е.А. Иванова, Л.Н. Грушевская, К.В. Алексеев, Б.М. Пятин, Т.А. Воронина, А.Д. Дурнев, А.И. Матюшкин, Е.В. Блынская, Н.И. Авдюнина. – 2018.

14. Иванова, Е.А. Противопаркинсоническая активность гимантана на модели гемипаркинсонического синдрома у крыс [Текст] / Е.А. Иванова, И.Г. Капица, Е.А. Вальдман, Т.А. Воронина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, № 3. – С. 362-365.

15. Иванова, Е.А. Влияние гимантана на уровень продуктов перекисного окисления липидов в головном мозге при экспериментальном паркинсоническом синдроме [Текст] / Е.А. Иванова, И.Г. Капица, Н.Н. Золотов, Е.А. Вальдман, А.В. Непоклонов, К.Н. Колясникова, Т.А. Воронина // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2016. – № 3. – С. 9-12.

16. Иванова, Е.А. Противовоспалительная активность гимантана на моделях периферического воспаления и нейровоспаления, индуцированного липополисахаридом [Текст] / Е.А. Иванова, И.Г. Капица, А.В. Непоклонов, И.И. Кокшенев, Е.А. Вальдман, Т.А. Воронина // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т. 47, № 10. – С. 12-15.

17. Иванова, Е.А. Оценка анальгетической активности гелевых форм гимантана для местного применения в формалиновом тесте у крыс [Текст] / Е.А. Иванова, А.И. Матюшкин, Е.В. Блынская, Т.А. Воронина // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52, № 8. – С. 51-55.

18. Иванова, Е.А. Влияние гимантана в лекарственной форме для наружного применения на вызванный полным адъювантом Фрейнда воспалительный процесс у крыс [Текст] / Е.А. Иванова, А.И. Матюшкин, Т.А. Воронина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т. 82, № 4. – С. 23-27.

19. Иванова, Е.А. Оценка противовоспалительного действия 5% гелевых форм гимантана [Текст] / Е.А. Иванова, А.И. Матюшкин, Т.А. Воронина // Сборник научных работ, посвященный 35-летию фармацевтического факультета Ярославского государственного

медицинского Университета Актуальные вопросы разработки, изучения и обращения лекарственных средств. – Ярославль: Аверс Плюс, 2017. – С. 180-183.

20. Иванова, Е.А. Оценка противоболевой активности и мембранотропных свойств производных аминоадамантана амантадина и гимантана [Текст] / Е.А. Иванова, А.И. Матюшкин, И.Г. Капица, Н.Н. Золотов, Е.А. Вальдман, Т.А. Воронина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81, № S. – С. 97.

21. Капица, И.Г. О влиянии гимантана и амантадина на развитие леводопа-индуцированных дискинезий на модели паркинсонического синдрома у крыс [Текст] / И.Г. Капица, Е.А. Иванова, А.В. Непоклонов, И.И. Кокшенев, Т.А. Воронина, Е.А. Вальдман // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011. – Т. 74, № 7. – С. 9-12.

22. Капица, И.Г. Влияние гимантана на биоэлектрическую активность мозга мышей с МФТП - вызванным паркинсоническим синдромом [Текст] / И.Г. Капица, И.И. Кокшенев, Л.Н. Неробкова, Е.А. Вальдман, Т.А. Воронина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76, № 4. – С. 3-6.

23. Каратеев, А.Е. Рациональное использование нестероидных противовоспалительных препаратов. Клинические рекомендации [Текст] / А.Е. Каратеев, Е.Л. Насонов, В.Т. Ивашкин, А.И. Мартынов, Н.Н. Яхно, Г.П. Арутюнов, Л.И. Алексеева, Г.Р. Абузарова, М.А. Евсеев, М.Л. Кукушкин, С.С. Копенкин, А.М. Лила, Т.Л. Лапина, Д.С. Новикова, Т.В. Попкова, А.П. Ребров, К.В. Скоробогатых, Н.В. Чичасова // Научно-практическая ревматология. – 2018. – Т. 56. – С. 1-29.

24. Кашкин, В.А. Комплексная оценка степени развития патологии при моделировании адъювант-индуцированного артрита у крыс [Текст] / В.А. Кашкин, Е.В. Шекунова, А.А. Мужикян // Международный вестник ветеринарии. – 2015. – № 1. – С. 92-103.

25. Коваленко, Л.П. Противовоспалительные свойства ноопепта (дипептидного ноотропа ГВС-111) [Текст] / Л.П. Коваленко, М.Г. Мирамедова, С.В. Алексеева, Т.А. Гудашева, Р.У. Островская, С.Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – Т. 65, № 2. – С. 53-55.

26. Коваленко, Л.П. Методические рекомендации по изучению аллергизирующих свойств лекарственных средств [Текст] / Л.П. Коваленко, В.Н. Федосеева, А.Д. Дурнев, А.С. Иванова, Т.Б. Мастернак, А.Н. Миронов, Е.В. Арзамасцев, Т.А. Гуськова, И.Б. Жоголева, О.Л. Верстакова, Л.У. Радченко // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под общ. ред. А.Н. Миронова. Часть 1. – Москва: Гриф и К, 2012. – С. 51-63.

27. Колик, Л.Г. Влияние производных аминоадамантана на индуцированную морфином анальгезию у мышей [Текст] / Л.Г. Колик, А.В. Надорова, И.В. Чернякова, Е.А. Вальдман // Химико-фармацевтический журнал. – 2020. – Т. 54, № 4. – С. 15-19.

28. Крайнева, В.А. Средство для лечения нарушений мозгового кровообращения и травм головного мозга [Текст] / Патент РФ 2 554 502 // В.А. Крайнева, Е.А. Вальдман, С.О. Котельникова, Д.В. Масленников, Т.С. Ганьшина, А.В. Гнездилова, Р.С. Мирзоян, Т.А. Воронина, Е.А. Иванова, И.И. Кокшенев. – 2016.

29. Матюшкин, А.И. Сравнение выраженности воспаления у крыс с первичной реакцией и вторичной иммунологической реакцией на инъекцию полного адъюванта Фрейнда [Текст] / А.И. Матюшкин, Е.А. Иванова, С.В. Алексеева, К.С. Качалов, Т.А. Воронина // Биомедицина. – 2019. – Т. 15, № 2. – С. 75-87.

30. Матюшкин, А.И. Влияние диметилсульфоксида на выраженность противовоспалительного и анальгетического действия гелей гимантана [Текст] / А.И. Матюшкин, Е.А. Иванова, Т.А. Воронина, Е.В. Блынская, К.В. Алексеев, А.И. Марахова // Фармация. – 2019. – Т. 68, № 6. – С. 37-41.

31. Матюшкин, А.И. Противовоспалительные свойства гимантана на моделях каррагенанового отека и декстрансульфатного отека [Текст] / А.И. Матюшкин, Е.А. Иванова, Т.А. Воронина, Н.Н. Золотов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. – Т. 83, № 5. – С. 47-50.

32. Матюшкин, А.И. Исследование противоболевого и противовоспалительного действия гелей гимантана [Текст] / А.И. Матюшкин, Е.А. Иванова, Т.А. Воронина // Материалы Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина «Достижения современной фармакологической науки». – Рязань: ОТСиОП РязГМУ, 2018. – С. 118.

33. Матюшкин, А.И. Оценка противоболевой и противовоспалительной активности гимантана в наружной гелевой лекарственной форме [Текст] / А.И. Матюшкин, Е.А. Иванова, Т.А. Воронина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81, № S. – С. 156.

34. Матюшкин, А.И. Влияние гимантана при системном введении и местном применении в наружной лекарственной форме на уровень малонового диальдегида при остром экссудативном воспалении у крыс [Текст] / А.И. Матюшкин, Е.А. Иванова, Н.Н. Золотов, Т.А. Воронина // Материалы международной научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине и биологии». – Сочи, 2019. – С. 86-92.

35. Матюшкин, А.И. Мембранотропные и антиоксидантные свойства гимантана [Текст] / А.И. Матюшкин, Е.А. Иванова, Н.Н. Золотов, Т.А. Воронина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т. 82, № 4. – С. 28-31.

36. Морозов, И.С. Фармакология адамантанов [Текст] / И.С. Морозов, В.И. Петров, С.А. Сергеева. – Волгоград: Волгоград. мед. акад., 2001. – 320 с.

37. Непоклонов, А.В. Изучение эффектов гимантана на модели ранней («домоторной») стадии болезни Паркинсона у крыс [Текст] / А.В. Непоклонов, И.Г. Капица, Е.А. Иванова, Т.А. Воронина, Е.А. Вальдман // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – Т. 75, № 11. – С. 3-6.

38. Непоклонов, А.В. Изучение противовоспалительной активности нового противопаркинсонического препарата гимантан [Текст] / А.В. Непоклонов, А.В. Таллерова // Материалы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии». – Казань, 2012. – С. 139.

39. Никитин, В.М. Справочник методов иммунологии [Текст] / В.М. Никитин. – Кишинев: ШТИИНЦА, 1982. – 304 с.

40. Общая заболеваемость в РФ за 2017. Статистические данные МЗРФ [Текст]. – Москва: Министерство Здравоохранения Российской Федерации, 2017.

41. Пащенко, И.Г. Состояние системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты при заболеваниях органов дыхания [Текст] / И.Г. Пащенко, М.С. Камнев, Н.Н. Пащенко, Н.А. Цимбал, М.В. Марковцева, И.Г. Сударкина // Ульяновский Медико-Биологический Журнал. – 2011. – № 4. – С. 32-44.

42. Семкина, О.А. Вспомогательные вещества, используемые в технологии мягких лекарственных форм (мазей, гелей, линиментов, кремов) (обзор) [Текст] / О.А. Семкина, М.А. Джавахян, Т.А. Левчук, Л.И. Гагулашвили, В.Ф. Охотникова // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 39, № 9. – С. 45-48.

43. Середенин, С.Б. Инъекционная лекарственная форма для лечения болезни паркинсона, способ ее приготовления и применение [Текст] / Патент РФ 2 520 758 // С.Б. Середенин, Т.А. Воронина, Б.М. Пятин, И.Г. Капица, Е.А. Вальдман, Л.Н. Неробкова, Н.И. Авдюнина, К.В. Алексеев, Л.Н. Грушевская, Е.В. Блынская, М.С. Сергеева. – 2014.

44. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России. – 2020.

45. Таллерова, А.В. Влияние противопаркинсонического препарата гимантан на уровень цитокинов в эксперименте [Текст] / А.В. Таллерова, Е.А. Иванова, И.Г. Капица, Л.П. Коваленко, Е.А. Вальдман, Т.А. Воронина // Иммунология. – 2013. – Т. 34, № 5. – С. 254-257.

46. Удовика, М.И. Диацереин как препарат выбора в терапии остеоартроза коленных суставов с вторичным рецидивирующим синовитом [Текст] / М.И. Удовика // Научно-практическая ревматология. – 2015. – Т. 53, № 6. – С. 614-618.

47. Ульянина, Л.Р. Сравнительная оценка эффективности экспериментальной терапии адъювантного артрита у крыс новым аминокислотным комплексом лития и метотрексатом [Текст] / Л.Р. Ульянина, Л.Н. Залялютдинова, А.Н. Гайнетдинова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С. 469.

48. Ульянина, Л.Р. Сравнительная оценка биологической активности металлокомплексов метионина [Текст]: дисс. … канд. мед. наук: 14.03.16 /Ульянина Лейла Рамилевна. – Казань, 2017. – 131 с.

49. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению остеоартроза с дополнениями [Текст]. – Ассоциация ревматологов России, 2016. – 19 с.

50. Шварц, Г.Я. Методические рекомендации по изучению нестероидных противовоспалительных лекасртсвенных средств [Текст] / Г.Я. Шварц, Р.Д. Сюбаев // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под общ. ред. А.Н. Миронова. Часть первая. – Москва: Гриф и К, 2012. – С. 746-758.

51. Шекунова, Е.В. Сравнительный анализ двух экспериментальных моделей хронического артрита у крыс. [Текст] / Е.В. Шекунова, В.А. Кашкин, А.А. Мужикян, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. – Т. 79, № 10. – С. 22-28.

52. A study evaluating the safety and efficacy of intra-articular injections of TPX-100 in subjects with mild to moderate patello-femoral osteoarthritis involving both knees [Электронный ресурс]/ Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01925261.

53. Abbadie, C. Differential contribution of the two phases of the formalin test to the pattern of c-fos expression in the rat spinal cord: studies with remifentanil and lidocaine [Text] / C. Abbadie, B.K. Taylor, M.A. Peterson, A.I. Basbaum // Pain. – 1997. – Vol. 69, № 1-2. – P. 101-110.

54. Abbas, S.S. Possible potentiation by certain antioxidants of the anti-inflammatory effects of diclofenac in rats [Text] / S.S. Abbas, M.F. Schaalan, A.K. Bahgat, E.S. El-Denshary // The Scientific World Journal. – 2014. – Vol. 2014. – P. 731462.

55. Adams, M.E. An analysis of clinical studies of the use of crosslinked hyaluronan, hylan, in the treatment of osteoarthritis [Text] / M.E. Adams // The Journal of Rheumatology. Supplement. – 1993. – Vol. 39. – P. 16-18.

56. Affaticati, P. Sustained calcium signalling and caspase-3 activation involve NMDA receptors in thymocytes in contact with dendritic cells [Text] / P. Affaticati, O. Mignen, F. Jambou, M.-C. Potier, I. Klingel-Schmitt, J. Degrouard, S. Peineau, E. Gouadon, G.L. Collingridge, R. Liblau, T. Capiod, S. Cohen-Kaminsky // Cell Death and Differentiation. – 2011. – Vol. 18, № 1. – P. 99-108.

57. Ahuja, M. Topical ocular delivery of NSAIDs [Text] / M. Ahuja, A.S. Dhake, S.K. Sharma, D.K. Majumdar // The AAPS journal. – 2008. – Vol. 10, № 2. – P. 229-241.

58. Akermark, C. Non-animal stabilised hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis of the knee: a tolerability study [Text] / C. Akermark, P. Berg, A. Björkman, P. Malm // Clinical Drug Investigation. – 2002. – Vol. 22. – P. 157-166.

59. Aloe, L. Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis [Text] / L. Aloe, M.A. Tuveri, U. Carcassi, R. Levi-Montalcini // Arthritis and Rheumatism. – 1992. – Vol. 35, № 3. – P. 351-355.

60. Alpharma. Diclofenac Epolamine 1.3% Topical Patch (Flector Patch) Package Labeling [Text]. Piscataway, NJ. – Alpharma, 2007.

61. Altindag, O. Increased oxidative stress and its relation with collagen metabolism in knee osteoarthritis [Text] / O. Altindag, O. Erel, N. Aksoy, S. Selek, H. Celik, M. Karaoglanoglu // Rheumatology International. – 2007. – Vol. 27, № 4. – P. 339-344.

62. Altman, R.D. Efficacy and safety of a single intra-articular injection of non-animal stabilized hyaluronic acid (NASHA) in patients with osteoarthritis of the knee [Text] / R.D. Altman, C. Akermark, A.D. Beaulieu, T. Schnitzer, Durolane International Study Group // Osteoarthritis and Cartilage. – 2004. – Vol. 12, № 8. – P. 642-649.

63. Altman, R.D. Topical therapies for osteoarthritis [Text] / R.D. Altman, H.R. Barthel // Drugs. – 2011. – Vol. 71, № 10. – P. 1259-1279.

64. Altman, R.D. Early management of osteoarthritis [Text] / R.D. Altman // The American Journal of Managed Care. – 2010. – Vol. 16 Suppl Management. – P. S41-47.

65. Altman, R.D. Intraarticular sodium hyaluronate (Hyalgan) in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial. Hyalgan Study Group [Text] / R.D. Altman, R. Moskowitz // The Journal of Rheumatology. – 1998. – Vol. 25, № 11. – P. 2203-2212.

66. Alves, M.P. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers [Text] / M.P. Alves, A.L. Scarrone, M. Santos, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres // International Journal of Pharmaceutics. – 2007. – Vol. 341, № 1-2. – P. 215-220.

67. Amin, P. A pilot study of the beneficial effects of amantadine in the treatment of painful diabetic peripheral neuropathy [Text] / P. Amin, N.D.C. Sturrock // Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association. – 2003. – Vol. 20, № 2. – P. 114-118.

68. Appelboom, T. Symptoms modifying effect of avocado/soybean unsaponifiables (ASU) in knee osteoarthritis. A double blind, prospective, placebo-controlled study [Text] / T. Appelboom, J. Schuermans, G. Verbruggen, Y. Henrotin, J.Y. Reginster // Scandinavian Journal of Rheumatology. – 2001. – Vol. 30, № 4. – P. 242-247.

69. Arden, N.K. Defining incident radiographic hip osteoarthritis for epidemiologic studies in women [Text] / N.K. Arden, N.E. Lane, N. Parimi, K.M. Javaid, L.-Y. Lui, M.C. Hochberg, M. Nevitt // Arthritis and Rheumatism. – 2009. – Vol. 60, № 4. – P. 1052-1059.

70. Ashford, S. Osteoarthritis: A review [Text] / S. Ashford, J. Williard // The Nurse Practitioner. – 2014. – Vol. 39, № 5. – P. 1-8.

71. Avouac, J. Efficacy and safety of opioids for osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials [Text] / J. Avouac, L. Gossec, M. Dougados // Osteoarthritis and Cartilage. – 2007. – Vol. 15, № 8. – P. 957-965.

72. Ayhan, E. Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis [Text] / E. Ayhan, H. Kesmezacar, I. Akgun // World Journal of Orthopedics. – 2014. – Vol. 5, № 3. – P. 351-361.

73. Bajaj, P. Osteoarthritis and its association with muscle hyperalgesia: an experimental controlled study [Text] / P. Bajaj, P. Bajaj, T. Graven-Nielsen, L. Arendt-Nielsen // Pain. – 2001. – Vol. 93, № 2. – P. 107-114.

74. Balazs, E.A. Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis [Text] / E.A. Balazs, J.L. Denlinger // The Journal of Rheumatology. Supplement. – 1993. – Vol. 39. – P. 3-9.

75. Bali, J.P. Biochemical basis of the pharmacologic action of chondroitin sulfates on the osteoarticular system [Text] / J.P. Bali, H. Cousse, E. Neuzil // Seminars in Arthritis and Rheumatism. – 2001. – Vol. 31, № 1. – P. 58-68.

76. Bally, M. Risk of acute myocardial infarction with NSAIDs in real world use: bayesian meta-analysis of individual patient data [Text] / M. Bally, N. Dendukuri, B. Rich, L. Nadeau, A. Helin-Salmivaara, E. Garbe, J.M. Brophy // BMJ (Clinical research ed.). – 2017. – Vol. 357. – P. j1909.

77. Banji, D. Evaluation of the concomitant use of methotrexate and curcumin on Freund's complete adjuvant-induced arthritis and hematological indices in rats [Text] / D. Banji, J. Pinnapureddy, O.J.F. Banji, A.R. Kumar, K.N. Reddy // Indian Journal of Pharmacology. – 2011. – Vol. 43, № 5. – P. 546-550.

78. Barnes, P.J. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases [Text] / P.J. Barnes, M. Karin // The New England Journal of Medicine. – 1997. – Vol. 336, № 15. – P. 1066-1071.

79. Bar-Or, D. A randomized clinical trial to evaluate two doses of an intra-articular injection of LMWF-5A in adults with pain due to osteoarthritis of the knee [Text] / D. Bar-Or, K.M. Salottolo, H. Loose, M.J. Phillips, B. McGrath, N. Wei, J.L. Borders, J.E. Ervin, A. Kivitz, M. Hermann, T. Shlotzhauer, M. Churchill, D. Slappey, V. Clift // PloS One. – 2014. – Vol. 9, № 2. – P. e87910.

80. Bar-Or, D. Low molecular weight fraction of commercial human serum albumin induces morphologic and transcriptional changes of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [Text] / D. Bar-Or, G.W. Thomas, L.T. Rael, E.D. Gersch, P. Rubinstein, E. Brody // Stem Cells Translational Medicine. – 2015. – Vol. 4, № 8. – P. 945-955.

81. Battilocchio, C. Flow synthesis and biological studies of an analgesic adamantane derivative that inhibits P2X 7 -evoked glutamate release [Text] / C. Battilocchio, L. Guetzoyan, C. Cervetto, L. Mannelli, D. Frattaroli, I. Baxendale, G. Maura, A. Rossi, L. Sautebin, M. Biava, C. Ghelardini, M. Marcoli, S. Ley // ACS medicinal chemistry letters. – 2013. – Vol. 4. – P. 704-9.

82. Beaulieu, A.D. Once-daily, controlled-release tramadol and sustained-release diclofenac relieve chronic pain due to osteoarthritis: a randomized controlled trial [Text] / A.D. Beaulieu, P.M. Peloso, B. Haraoui, W. Bensen, G. Thomson, J. Wade, P. Quigley, J. Eisenhoffer, Z. Harsanyi, A.C. Darke // Pain Research & Management. – 2008. – Vol. 13, № 2. – P. 103-110.

83. Bijlsma, J.W.J. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice [Text] / J.W.J. Bijlsma, F. Berenbaum, F.P.J.G. Lafeber // Lancet. – 2011. – Vol. 377, № 9783. – P. 2115-2126.

84. Blackham, A. Effect of cyclo-oxygenase inhibitors in models of acute and chronic inflammation [Text] / A. Blackham, D.E. Hall, J. Mann, A.M. Woods // Agents and Actions. Supplements. – 1979. – № 4. – P. 193-201.

85. Blaine, T. Treatment of persistent shoulder pain with sodium hyaluronate: a randomized, controlled trial. A multicenter study [Text] / T. Blaine, R. Moskowitz, J. Udell, M. Skyhar, R. Levin, J. Friedlander, M. Daley, R. Altman // The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume. – 2008. – Vol. 90, № 5. – P. 970-979.

86. Blaney Davidson, E.N. TGF-beta and osteoarthritis [Text] / E.N. Blaney Davidson, P.M. van der Kraan, W.B. van den Berg // Osteoarthritis and Cartilage. – 2007. – Vol. 15, № 6. – P. 597-604.

87. Blotman, F. Efficacy and safety of avocado/soybean unsaponifiables in the treatment of symptomatic osteoarthritis of the knee and hip. A prospective, multicenter, three-month, randomized, double-blind, placebo-controlled trial [Text] / F. Blotman, E. Maheu, A. Wulwik, H. Caspard, A. Lopez // Revue Du Rhumatisme (English Ed.). – 1997. – Vol. 64, № 12. – P. 825-834.

88. Boldyrev, A.A. Rodent lymphocytes express functionally active glutamate receptors [Text] / A.A. Boldyrev, V.I. Kazey, T.A. Leinsoo, A.P. Mashkina, O.V. Tyulina, P. Johnson, J.O. Tuneva, S. Chittur, D.O. Carpenter // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2004. – Vol. 324, № 1. – P. 133-139.

89. Bondeson, J. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis [Text] / J. Bondeson, S.D. Wainwright, S. Lauder, N. Amos, C.E. Hughes // Arthritis Research & Therapy. – 2006. – Vol. 8, № 6. – P. R187.

90. Bonnelye, E. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro [Text] / E. Bonnelye, A. Chabadel, F. Saltel, P. Jurdic // Bone. – 2008. – Vol. 42, № 1. – P. 129-138.

91. Bookman, A.A.M. Effect of a topical diclofenac solution for relieving symptoms of primary osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial [Text] / A.A.M. Bookman, K.S.A. Williams, J.Z. Shainhouse // CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne. – 2004. – Vol. 171, № 4. – P. 333-338.

92. Brennan, T.J. Characterization of a rat model of incisional pain [Text] / T.J. Brennan, E.P. Vandermeulen, G.F. Gebhart // Pain. – 1996. – Vol. 64, № 3. – P. 493-501.

93. Brown, M.B. Dermal and transdermal drug delivery systems: current and future prospects [Text] / M.B. Brown, G.P. Martin, S.A. Jones, F.K. Akomeah // Drug Delivery. – 2006. – Vol. 13, № 3. – P. 175-187.

94. Buache, E. Effect of strontium-substituted biphasic calcium phosphate on inflammatory mediators production by human monocytes [Text] / E. Buache, F. Velard, E. Bauden, C. Guillaume, E.

Jallot, J.M. Nedelec, D. Laurent-Maquin, P. Laquerriere // Acta Biomaterialia. – 2012. – Vol. 8, № 8. – P. 3113-3119.

95. Buritova, J. The contribution of peripheral bradykinin B2 receptors to carrageenan-evoked oedema and spinal c-Fos expression in rats [Text] / J. Buritova, V. Chapman, P. Honoré, J.M. Besson // European Journal of Pharmacology. – 1997. – Vol. 320, № 1. – P. 73-80.

96. Caldwell, J.R. Intra-articular corticosteroids. Guide to selection and indications for use [Text] / J.R. Caldwell // Drugs. – 1996. – Vol. 52, № 4. – P. 507-514.

97. Campbell, J.N. Responses to heat of C-fiber nociceptors in monkey are altered by injury in the receptive field but not by adjacent injury [Text] / J.N. Campbell, A.A. Khan, R.A. Meyer, S.N. Raja // Pain. – 1988. – Vol. 32, № 3. – P. 327-332.

98. Cañizares, M. Association of regional racial/cultural context and socioeconomic status with arthritis in the population: a multilevel analysis [Text] / M. Cañizares, J.D. Power, A.V. Perruccio, E.M. Badley // Arthritis and Rheumatism. – 2008. – Vol. 59, № 3. – P. 399-407.

99. Carlton, S.M. Peripheral excitatory amino acids [Text] / S.M. Carlton // Current Opinion in Pharmacology. – 2001. – Vol. 1, № 1. – P. 52-56.

100. Caron, J.P. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression [Text] / J.P. Caron, J.C. Fernandes, J. Martel-Pelletier, G. Tardif, F. Mineau, C. Geng, J.P. Pelletier // Arthritis and Rheumatism. – 1996. – Vol. 39, № 9. – P. 1535-1544.

101. Carreira, A.C. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives [Text] / A.C. Carreira, F.H. Lojudice, E. Halcsik, R.D. Navarro, M.C. Sogayar, J.M. Granjeiro // Journal of Dental Research. – 2014. – Vol. 93, № 4. – P. 335-345.

102. Cevc, G. Preclinical characterisation of NSAIDs in ultradeformable carriers or conventional topical gels [Text] / G. Cevc, S. Mazgareanu, M. Rother // International Journal of Pharmaceutics. – 2008. – Vol. 360, № 1-2. – P. 29-39.

103. Chan, B.K.C. Data Analysis Using R Programming [Text] / B.K.C. Chan // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2018. – Vol. 1082. – P. 47-122.

104. Chandrasekharan, N.V. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression [Text] / N.V. Chandrasekharan, H. Dai, K.L.T. Roos, N.K. Evanson, J. Tomsik, T.S. Elton, D.L. Simmons // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2002. – Vol. 99, № 21. – P. 13926-13931.

105. Chappell, A.S. A double-blind, randomized, placebo-controlled study of the efficacy and safety of duloxetine for the treatment of chronic pain due to osteoarthritis of the knee [Text] / A.S. Chappell, D. Desaiah, H. Liu-Seifert, S. Zhang, V. Skljarevski, Y. Belenkov, J.P. Brown // Pain Practice: The Official Journal of World Institute of Pain. – 2011. – Vol. 11, № 1. – P. 33-41.

106. Chappell, A.S. Duloxetine, a centrally acting analgesic, in the treatment of patients with osteoarthritis knee pain: a 13-week, randomized, placebo-controlled trial [Text] / A.S. Chappell, M.J. Ossanna, H. Liu-Seifert, S. Iyengar, V. Skljarevski, L.C. Li, R.M. Bennett, H. Collins // Pain. – 2009. – Vol. 146, № 3. – P. 253-260.

107. Chevalier, X. Intraarticular injection of anakinra in osteoarthritis of the knee: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study [Text] / X. Chevalier, P. Goupille, A.D. Beaulieu, F.X. Burch, W.G. Bensen, T. Conrozier, D. Loeuille, A.J. Kivitz, D. Silver, B.E. Appleton // Arthritis and Rheumatism. – 2009. – Vol. 61, № 3. – P. 344-352.

108. Choi, W.-S. The CH25H-CYP7B1-RORα axis of cholesterol metabolism regulates osteoarthritis [Text] / W.-S. Choi, G. Lee, W.-H. Song, J.-T. Koh, J. Yang, J.-S. Kwak, H.-E. Kim, S.K. Kim, Y.-O. Son, H. Nam, I. Jin, Z.-Y. Park, J. Kim, I.Y. Park, J.-I. Hong, H.A. Kim, C.-H. Chun, J.-H. Ryu, J.-S. Chun // Nature. – 2019. – Vol. 566, № 7743. – P. 254-258.

109. Christiansen, B.A. Management of Osteoarthritis with Avocado/Soybean Unsaponifiables [Text] / B.A. Christiansen, S. Bhatti, R. Goudarzi, S. Emami // Cartilage. – 2015. – Vol. 6, № 1. – P. 30-44.

110. Chubinskaya, S. OP-1/BMP-7 in cartilage repair [Text] / S. Chubinskaya, M. Hurtig, D.C. Rueger // International Orthopaedics. – 2007. – Vol. 31, № 6. – P. 773-781.

111. Cirillo, D.J. Effect of hormone therapy on risk of hip and knee joint replacement in the Women's Health Initiative [Text] / D.J. Cirillo, R.B. Wallace, L. Wu, R.A. Yood // Arthritis and Rheumatism. – 2006. – Vol. 54, № 10. – P. 3194-3204.

112. Coderre, T.J. Central neural mediators of secondary hyperalgesia following heat injury in rats: neuropeptides and excitatory amino acids [Text] / T.J. Coderre, R. Melzack // Neuroscience Letters. – 1991. – Vol. 131, № 1. – P. 71-74.

113. Cohen, S.B. A randomized, double-blind study of AMG 108 (a fully human monoclonal antibody to IL-1R1) in patients with osteoarthritis of the knee [Text] / S.B. Cohen, S. Proudman, A.J. Kivitz, F.X. Burch, J.P. Donohue, D. Burstein, Y.-N. Sun, C. Banfield, M.S. Vincent, L. Ni, D.J. Zack // Arthritis Research & Therapy. – 2011. – Vol. 13, № 4. – P. R125.

114. Cole, B. LMWF-5A for the Treatment of Severe Osteoarthritis of the Knee: Integrated Analysis of Safety and Efficacy [Text] / B. Cole, B. McGrath, K. Salottolo, D. Bar-Or // Orthopedics. – 2018. – Vol. 41, № 1. – P. e77-e83.

115. Collard, C.D. Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function [Text] / C.D. Collard, K.A. Park, M.C. Montalto, S. Alapati, J.A. Buras, G.L. Stahl, S.P. Colgan // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Vol. 277, № 17. – P. 14801-14811.

116. Cook, S.D. Repair of articular cartilage defects with osteogenic protein-1 (BMP-7) in dogs [Text] / S.D. Cook, L.P. Patron, S.L. Salkeld, D.C. Rueger // The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume. – 2003. – Vol. 85-A Suppl 3. – P. 116-123.

117. Cooper, C. Efficacy and safety of oral strontium ranelate for the treatment of knee osteoarthritis: rationale and design of randomised, double-blind, placebo-controlled trial [Text] / C. Cooper, J.-Y. Reginster, R. Chapurlat, C. Christiansen, H. Genant, N. Bellamy, W. Bensen, F. Navarro, J. Badurski, E. Nasonov, X. Chevalier, P.N. Sambrook // Current Medical Research and Opinion. – 2012. – Vol. 28, № 2. – P. 231-239.

118. Costa, B.R. da. Effectiveness of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of pain in knee and hip osteoarthritis: a network meta-analysis [Text] / B.R. da Costa, S. Reichenbach, N. Keller, L. Nartey, S. Wandel, P. Jüni, S. Trelle // Lancet (London, England). – 2017. – Vol. 390, № 10090. – P. e21-e33.

119. Coutaux, A. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms [Text] / A. Coutaux, F. Adam, J.-C. Willer, D. Le Bars // Joint Bone Spine. – 2005. – Vol. 72, № 5. – P. 359-371.

120. Creamer, P. Pain mechanisms in osteoarthritis of the knee: effect of intraarticular anesthetic [Text] / P. Creamer, M. Hunt, P. Dieppe // The Journal of Rheumatology. – 1996. – Vol. 23. –№ 6. – P. 1031-1036.

121. Cross, M. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study [Text] / M. Cross, E. Smith, D. Hoy, S. Nolte, I. Ackerman, M. Fransen, L. Bridgett, S. Williams, F. Guillemin, C.L. Hill, L.L. Laslett, G. Jones, F. Cicuttini, R. Osborne, T. Vos, R. Buchbinder, A. Woolf, L. March // Annals of the Rheumatic Diseases. – 2014. – Vol. 73, № 7. – P. 1323-1330.

122. Cui, P. Antiarthritic effect of chitosan nanoparticle loaded with embelin against adjuvant-induced arthritis in Wistar rats [Text] / P. Cui, F. Qu, N. Sreeharsha, S. Sharma, A. Mishra, S.K. Gubbiyappa // IUBMB life. – 2020. – Vol. 72, № 5. – P. 1054-1064.

123. Cunha, F.Q. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. [Text] / F.Q. Cunha, S. Poole, B.B. Lorenzetti, S.H. Ferreira // British

Journal of Pharmacology. – 1992. – Vol. 107, № 3. – P. 660-664.

124. Cunha, T.M. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception [Text] / T.M. Cunha, W.A. Verri, I.R. Schivo, M.H. Napimoga, C.A. Parada, S. Poole, M.M. Teixeira, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha // Journal of Leukocyte Biology. – 2008. – Vol. 83, № 4. – P. 824-832.

125. Dagenais, S. Systematic review of the prevalence of radiographic primary hip osteoarthritis [Text] / S. Dagenais, S. Garbedian, E.K. Wai // Clinical Orthopaedics and Related Research. – 2009. – Vol. 467, № 3. – P. 623-637.

126. De Filippis, L. Epidemiology and risk factors in osteoarthritis: literature review data from «OASIS» study [Text] / L. De Filippis, S. Gulli, A. Caliri, C. Romano, F. Munaò, G. Trimarchi, D. La Torre, C. Fichera, A. Pappalardo, G. Triolo, M. Gallo, G. Valentini, G. Bagnato, Gruppo OASIS (Osteoarthritis South Italy Study) // Reumatismo. – 2004. – Vol. 56, № 3. – P. 169-184.

127. Dehghanyar, P. Topical skin penetration of diclofenac after single- and multiple-dose application [Text] / P. Dehghanyar, B.X. Mayer, K. Namiranian, H. Mascher, M. Müller, M. Brunner // International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics. – 2004. – Vol. 42, № 7. – P. 353-359.

128. Del Arroyo, A.G. NMDA receptor modulation of glutamate release in activated neutrophils [Text] / A.G. Del Arroyo, A. Hadjihambi, J. Sanchez, E. Turovsky, V. Kasymov, D. Cain, T.D. Nightingale, S. Lambden, S.G.N. Grant, A.V. Gourine, G.L. Ackland // EBioMedicine. – 2019. – Vol. 47. – P. 457-469.

129. Derry, S. Topical NSAIDs for chronic musculoskeletal pain in adults [Text] / S. Derry, P. Conaghan, J.A.P. Da Silva, P.J. Wiffen, R.A. Moore // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2016. – Vol. 2016, № 4.

130. Dervin, G.F. Effect of arthroscopic débridement for osteoarthritis of the knee on health-related quality of life [Text] / G.F. Dervin, I.G. Stiell, K. Rody, J. Grabowski // The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume. – 2003. – Vol. 85, № 1. – P. 10-19.

131. Dhande, P.P. Anti-inflammatory and analgesic activities of topical formulations of pterocarpus santalinus powder in rat model of chronic inflammation [Text] / P.P. Dhande, A.O. Gupta, S. Jain, J.S. Dawane // Journal of clinical and diagnostic research: JCDR. – 2017. – Vol. 11, № 7. – P. FF01-FF04.

132. Di Giacomo, G. Hyaluronic acid intra-articular injections in patients affected by moderate to severe glenohumeral osteoarthritis: a prospective randomized study [Text] / G. Di Giacomo, N. de Gasperis // Joints. – 2017. – Vol. 5, № 3. – P. 138-142.

133. Di Rosa, M. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenan [Text] / M. Di Rosa, L. Sorrentino // European Journal of Pharmacology. – 1968. – Vol. 4, № 3. – P. 340-342.

134. Dickson, D.J. A double-blind evaluation of topical piroxicam gel with oral ibuprofen in osteoarthritis of the knee [Text] / D.J. Dickson // Current Therapeutic Research-Clinical and Experimental. – 1991. – Vol. 49. – P. 199-207.

135. Dieppe, P.A. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis [Text] / P.A. Dieppe, L.S. Lohmander // Lancet (London, England). – 2005. – T. 365, № 9463. – P. 965-973.

136. Dominkus, M. Comparison of tissue and plasma levels of ibuprofen after oral and topical administration [Text] / M. Dominkus, M. Nicolakis, R. Kotz, F.E. Wilkinson, R.R. Kaiser, K. Chlud // Arzneimittel-Forschung. – 1996. – T. 46, № 12. – P. 1138-1143.

137. Double-blind, randomized, single dose escalation safety study of intraarticular bone morphogenic protein (38A BMP-7) in subjects with osteoarthritis (OA) of the knee / ClinicalTrials.gov [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01133613.

138. Efficacy and safety of a subcutaneous tanezumab titration dosing regimen in subjects with moderate to severe osteoarthritis of the hip or knee ClinicalTrials.gov [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02697773

139. Ekambaram, P. The thromboxane synthase and receptor signaling pathway in cancer: an emerging paradigm in cancer progression and metastasis [Text] / P. Ekambaram, W. Lambiv, R. Cazzolli, A.W. Ashton, K.V. Honn // Cancer Metastasis Reviews. – 2011. – Vol. 30, № 3-4. – P. 397-408.

140. Elshanskaya, M.V. Interaction of the new adamantane derivative A-7 - A potential antiparkinsonian drug - with NMDA receptor channels [Text] / M.V. Elshanskaya, A.I. Sobolevskii, E.A. Val'dman, B.I. Khodorov // Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya. – 2001. – Vol. 64, № 1. – P. 18-21.

141. Ertenli, I. Pathologic thrombopoiesis of rheumatoid arthritis [Text] / I. Ertenli, S. Kiraz, M.A. Oztürk, I. c Haznedaroğlu, I. Celik, M. Calgüneri // Rheumatology International. – 2003. – T. 23, № 2. – P. 49-60.

142. Evans, J.M. Topical non-steroidal anti-inflammatory drugs and admission to hospital for upper gastrointestinal bleeding and perforation: a record linkage case-control study [Text] / J.M. Evans, A.D. McMahon, M.M. McGilchrist, G. White, F.E. Murray, D.G. McDevitt, T.M. MacDonald // BMJ : British Medical Journal. – 1995. – Vol. 311, № 6996. – P. 22-26.

143. Farrell, M. Pain and hyperalgesia in osteoarthritis of the hands [Text] / M. Farrell, S. Gibson, J. McMeeken, R. Helme // The Journal of Rheumatology. – 2000. – Vol. 27, № 2. – P. 441-447.

144. Felisaz, N. Stimulating effect of diacerein on TGF-beta1 and beta2 expression in articular chondrocytes cultured with and without interleukin-1 [Text] / N. Felisaz, K. Boumediene, C. Ghayor, J.F. Herrouin, P. Bogdanowicz, P. Galerra, J.P. Pujol // Osteoarthritis and Cartilage. – 1999. – Vol. 7,

№ 3. – P. 255-264.

145. Felson, D.T. Bone marrow edema and its relation to progression of knee osteoarthritis [Text] / D.T. Felson, S. McLaughlin, J. Goggins, M.P. LaValley, M.E. Gale, S. Totterman, W. Li, C. Hill, D. Gale // Annals of Internal Medicine. – 2003. – T. 139, № 5 Pt 1. – P. 330-336.

146. Felson, D.T. Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Study [Text] / D.T. Felson, Y. Zhang, M.T. Hannan, A. Naimark, B. Weissman, P. Aliabadi, D. Levy // Arthritis and Rheumatism. – 1997. – T. 40, № 4. – P. 728-733.

147. Ferreira, S.H. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. [Text] / S.H. Ferreira, B.B. Lorenzetti, S. Poole // British Journal of Pharmacology. – 1993. – Vol. 110, № 3. – P. 1227-1231.

148. Ferreira, S.H. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2 [Text] / S.H. Ferreira, M. Nakamura, M.S. de Abreu Castro // Prostaglandins. – 1978. – Vol. 16, № 1. – P. 31-37.

149. Flecknell, P.A. Comparison of the effects of oral or subcutaneous carprofen or ketoprofen in rats undergoing laparotomy [Text] / P.A. Flecknell, H.E. Orr, J.V. Roughan, R. Stewart // The Veterinary Record. – 1999. – Vol. 144, № 3. – P. 65-67.

150. Fuziwara, S. NMDA-type glutamate receptor is associated with cutaneous barrier homeostasis [Text] / S. Fuziwara, K. Inoue, M. Denda // The Journal of Investigative Dermatology. – 2003. – Vol. 120, № 6. – P. 1023-1029.

151. Gabay, O. Stress-induced signaling pathways in hyalin chondrocytes: inhibition by Avocado-Soybean Unsaponifiables (ASU) [Text] / O. Gabay, M. Gosset, A. Levy, C. Salvat, C. Sanchez, A. Pigenet, A. Sautet, C. Jacques, F. Berenbaum // Osteoarthritis and Cartilage. – 2008. – T. 16, № 3. – P. 373-384.

152. Gana, T.J. Extended-release tramadol in the treatment of osteoarthritis: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial [Text] / T.J. Gana, M.L.G. Pascual, R.R.B. Fleming, J.R. Schein, C.C. Janagap, J. Xiang, G.J. Vorsanger, 023 Study Group // Current Medical Research and Opinion. – 2006. – Vol. 22, № 7. – P. 1391-1401.

153. Gao, X.-R. The effect of vitamin D supplementation on knee osteoarthritis: A meta-analysis of randomized controlled trials [Text] / X.-R. Gao, Y.-S. Chen, W. Deng // International Journal of Surgery (London, England). – 2017. – Vol. 46. – P. 14-20.

154. García, Rodríguez L.A. Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs [Text] / L.A. García Rodríguez, H. Jick // Lancet (London, England). – 1994. – T. 343,№ 8900. – P. 769-772.

155. Gigout, A. Sprifermin (rhFGF18) enables proliferation of chondrocytes producing a hyaline cartilage matrix [Text] / A. Gigout, H. Guehring, D. Froemel, A. Meurer, C. Ladel, D. Reker,

A.C. Bay-Jensen, M.A. Karsdal, S. Lindemann // Osteoarthritis and Cartilage. – 2017. – Vol. 25, № 11. – P. 1858-1867.

156. Gilligan, J.P. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P [Text] / J.P. Gilligan, S.J. Lovato, M.D. Erion, A.Y. Jeng // Inflammation. – 1994. – Vol. 18, № 3. – P. 285-292.

157. Goa, K.L. Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing [Text] / K.L. Goa, P. Benfield // Drugs. – 1994. – Vol. 47, № 3. – P. 536-566.

158. Graham, G.G. Mechanism of action of paracetamol [Text] / G.G. Graham, K.F. Scott // American Journal of Therapeutics. – 2005. – Vol. 12, № 1. – P. 46-55.

159. Grayson, C.W. Total joint arthroplasty for persons with osteoarthritis [Text] / C.W. Grayson, R.C. Decker // PM & R: the journal of injury, function, and rehabilitation. – 2012. – Vol. 4, № 5 Suppl. – P. S97-103.

160. Grotle, M. Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: an epidemiological study in the general population with 10 years follow-up [Text] / M. Grotle, K.B. Hagen, B. Natvig, F.A. Dahl, T.K. Kvien // BMC musculoskeletal disorders. – 2008. – Vol. 9. – P. 132.

161. Grover, A.K. Benefits of antioxidant supplements for knee osteoarthritis: rationale and reality [Text] / A.K. Grover, S.E. Samson // Nutrition Journal. – 2016. – Vol. 15. – P. 1.

162. Gschwend, M.H. Determination of the transdermal bioavailability of a newly developed diclofenac sodium patch in comparison with a reference preparation [Text] / M.H. Gschwend, W. Martin, P. Arnold, M.-O. Verdun, N. Cambon, A. Frentzel, W. Scheiwe // Arzneimittel-Forschung. – 2005. – Vol. 55, № 7. – P. 403-413.

163. Gupta, S.K. Comparison of analgesic and anti-inflammatory activity of meloxicam gel with diclofenac and piroxicam gels in animal models: pharmacokinetic parameters after topical application [Text] / S.K. Gupta, P. Bansal, R.K. Bhardwaj, J. Jaiswal, T. Velpandian // Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology. – 2002. – Vol. 15, № 2. – P. 105-111.

164. Habib, G.S. Systemic effects of intra-articular corticosteroids [Text] / G.S. Habib // Clinical Rheumatology. – 2009. – Vol. 28, № 7. – P. 749-756.

165. Halici, Z. Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: an experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema [Text] / Z. Halici, G.O. Dengiz, F. Odabasoglu, H. Suleyman, E. Cadirci, M. Halici // European Journal of Pharmacology. – 2007. – Vol. 566, № 1-3. – P. 215-221.

166. Hama, A. Selective antihyperalgesic effect of [Ser1] histogranin on complete Freund's adjuvant-induced hyperalgesia in rats [Text] / A. Hama, J. Sagen // Pain. – 2002. – Vol. 95, № 1-2. – P. 15-21.

167. Hama, A. Differential efficacy of intrathecal NMDA receptor antagonists on inflammatory mechanical and thermal hyperalgesia in rats [Text] / A. Hama, J. Woon Lee, J. Sagen // European Journal of Pharmacology. – 2003. – Vol. 459, № 1. – P. 49-58.

168. Hardingham, T. Chondroitin sulfate and joint disease [Text] / T. Hardingham // Osteoarthritis and Cartilage. – 1998. – Vol. 6 Suppl A. – P. 3-5.

169. Hargreaves, K.M. Pharmacology of peripheral neuropeptide and inflammatory mediator release [Text] / K.M. Hargreaves, J.Q. Swift, M.T. Roszkowski, W. Bowles, M.G. Garry, D.L. Jackson // Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology. – 1994. – Vol. 78, № 4. – P. 503-510.

170. Haroutiunian, S. Topical NSAID therapy for musculoskeletal pain [Text] / S. Haroutiunian, D.A. Drennan, A.G. Lipman // Pain Medicine (Malden, Mass.). – 2010. – Vol. 11, № 4. – P. 535-549.

171. Heapy, C.G. Afferent C-fiber and A-delta activity in models of inflammation [Text] / C.G. Heapy, A. Jamieson, N.J.V. Russel // Br J Pharmacol. – 1987. – Vol. 90. – P. 164.

172. Hecker, M. On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A2 biosynthesis [Text] / M. Hecker, V. Ullrich // The Journal of Biological Chemistry. – 1989. – Vol. 264, № 1. – P. 141-150.

173. Henrotin, Y. Strontium ranelate increases cartilage matrix formation [Text] / Y. Henrotin, A. Labasse, S.X. Zheng, P. Galais, Y. Tsouderos, J.M. Crielaard, J.Y. Reginster // Journal of Bone and Mineral Research. – 2001. – Vol. 16, № 2. – P. 299-308.

174. Henrotin, Y.E. Effects of three avocado/soybean unsaponifiable mixtures on metalloproteinases, cytokines and prostaglandin E2 production by human articular chondrocytes [Text] / Y.E. Henrotin, A.H. Labasse, J.M. Jaspar, D.D. De Groote, S.X. Zheng, G.B. Guillou, J.Y. Reginster // Clinical Rheumatology. – 1998. – Vol. 17, № 1. – P. 31-39.

175. Henrotin, Y.E. Avocado/soybean unsaponifiables increase aggrecan synthesis and reduce catabolic and proinflammatory mediator production by human osteoarthritic chondrocytes [Text] / Y.E. Henrotin, C. Sanchez, M.A. Deberg, N. Piccardi, G.B. Guillou, P. Msika, J.-Y.L. Reginster // The Journal of Rheumatology. – 2003. – Vol. 30, № 8. – P. 1825-1834.

176. Herschler, R.J. Enhancing tissue penetration of physiologically active agents with dmso [Text]. Patent N3551554 / R.J. Herschler. – 1970.

177. Hewitt, P.G. In vitro cutaneous disposition of a topical diclofenac lotion in human skin: effect of a multi-dose regimen [Text] / P.G. Hewitt, N. Poblete, R.C. Wester, H.I. Maibach, J.Z. Shainhouse // Pharmaceutical Research. – 1998. – Vol. 15, № 7. – P. 988-992.

178. Heyneman, C.A. Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases: a comparison [Text] / C.A. Heyneman, C. Lawless-Liday, G.C. Wall // Drugs. – 2000. – T. 60, № 3. – P. 555-574.

179. Hianik, T. Rimantadine effects on the elasticity of bilayer lipid membranes and on ion transport through gramicidin D channels [Text] / T. Hianik, G. Laputková, K. Poláková // General Physiology and Biophysics. – 1990. – Vol. 9, № 4. – P. 391-402.

180. Hochberg, M.C. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee [Text] / M.C. Hochberg, R.D. Altman, K.T. April, M. Benkhalti, G. Guyatt, J. McGowan, T. Towheed, V. Welch, G. Wells, P. Tugwell, American College of Rheumatology // Arthritis Care & Research. – 2012. – Vol. 64, № 4. – P. 465-474.

181. Hochberg, M.C. Effect of intra-articular sprifermin vs placebo on femorotibial joint cartilage thickness in patients with osteoarthritis: The FORWARD randomized clinical trial [Text] / M.C. Hochberg, A. Guermazi, H. Guehring, A. Aydemir, S. Wax, P. Fleuranceau-Morel, A. Reinstrup Bihlet, I. Byrjalsen, J. Ragnar Andersen, F. Eckstein // JAMA. – 2019. – Vol. 322, № 14. – P. 1360-1370.

182. Hua, S. Topical loperamide-encapsulated liposomal gel increases the severity of inflammation and accelerates disease progression in the adjuvant-induced model of experimental rheumatoid arthritis / S. Hua, P.H. Dias, D.-G. Pepperall, Y. Yang // Frontiers in Pharmacology. – 2017. – Vol. 8. – P. 503.

183. Huffman, K.M. Osteoarthritis and the metabolic syndrome: more evidence that the etiology of OA is different in men and women [Text] / K.M. Huffman, W.E. Kraus // Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society. – 2012. – Vol. 20, № 7. – P. 603-604.

184. Hung, C.-H. Rimantadine and 2-adamantanamine elicit local anesthesia to cutaneous nociceptive stimuli in a rat model [Text] / C.-H. Hung, C.-C. Chu, Y.-C. Chen, Y.-W. Chen, J.-J. Wang // Fundamental & Clinical Pharmacology. – 2014. – Vol. 28, № 2. – P. 199-204.

185. Hunskaar, S. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain [Text] / S. Hunskaar, K. Hole // Pain. – 1987. – Vol. 30, № 1. – P. 103-114.

186. Hunter, D.J. Phase 1 safety and tolerability study of BMP-7 in symptomatic knee osteoarthritis [Text] / D.J. Hunter, M.C. Pike, B.L. Jonas, E. Kissin, J. Krop, T. McAlindon // BMC Musculoskeletal Disorders. – 2010. – Vol. 11. – P. 232.

187. Hunter, J.A. A risk-benefit assessment of intra-articular corticosteroids in rheumatic disorders [Text] / J.A. Hunter, T.H. Blyth // Drug Safety. – 1999. – Vol. 21, № 5. – P. 353-365.

188. Ianaro, A. A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammation, down-regulates inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carrageenin-induced oedema in mice [Text] / A. Ianaro, C.A. O'Donnell, M. Di Rosa, F.Y. Liew // Immunology. – 1994. – Vol. 82, № 3. – P. 370-375.

189. Ikeda, H. Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia [Text] / H. Ikeda, B. Heinke, R. Ruscheweyh, J. Sandkühler // Science. – 2003. – Vol. 299, № 5610. – P. 1237-1240.

190. Ikeda, H. Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn [Text] / H. Ikeda, J. Stark, H. Fischer, M. Wagner, R. Drdla, T. Jäger, J. Sandkühler // Science – 2006. – Vol. 312, № 5780. – P. 1659-1662.

191. Ivanova, E. Comparison of the analgesic activity of antiparkinsonian aminoadamantane derivatives amantadine and hemantane [Text] / E. Ivanova, I. Kapitsa, E. Valdman, T. Voronina // Advances in Parkinson's Disease. – 2016. – Vol. 5. – P. 50-60.

192. Ivanova, E.A. Comparative evaluation of hemantane and diclofenac topical formulations on complete Freund's adjuvant-induced inflammation in rats [Text] / E.A. Ivanova, A.I. Matyushkin, T.A. Voronina, A.D. Durnev // TOXICOLOGY LETTERS. – 2019. – Vol. 314, № S1. – P. S178.

193. Jantharaprapap, R. Effects of penetration enhancers on in vitro permeability of meloxicam gels [Text] / R. Jantharaprapap, G. Stagni // International Journal of Pharmaceutics. – 2007. – Vol. 343, № 1-2. – P. 26-33.

194. Jelic, M. Regeneration of articular cartilage chondral defects by osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in sheep [Text] / M. Jelic, M. Pecina, M. Haspl, J. Kos, K. Taylor, D. Maticic, J. McCartney, S. Yin, D. Rueger, S. Vukicevic // Growth Factors (Chur, Switzerland). – 2001. – Vol. 19, № 2. – P. 101-113.

195. Jevsevar, D.S. Treatment of osteoarthritis of the knee: evidence-based guideline, 2nd edition [Text] / D.S. Jevsevar // The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. – 2013. – Vol. 21, № 9. – P. 571-576.

196. Jiang, J. The novel N-methyl-d-aspartate receptor antagonist MN-08 ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [Text] / J. Jiang, Q. Jian, M. Jing, Z. Zhang, G. Zhang, L. Shan, P. Yu, Y. Wang, L. Xu // International Immunopharmacology. – 2019. – Vol. 66. – P. 109-118.

197. Jilka, R.L. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone [Text] / R.L. Jilka, R.S. Weinstein, T. Bellido, P. Roberson, A.M. Parfitt, S.C. Manolagas // Journal of Clinical Investigation. – 1999. – Vol. 104, № 4. – P. 439-446.

198. Johansson, B. Preoperative local infiltration with ropivacaine for postoperative pain relief after cholecystectomy [Text] / B. Johansson, H. Glise, B. Hallerbäck, P. Dalman, A. Kristoffersson //

Anesthesia and Analgesia. – 1994. – Vol. 78, № 2. – P. 210-214.

199. Jordan, K.M. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT) [Text] / K.M. Jordan, N.K. Arden, M. Doherty, B. Bannwarth, J.W.J. Bijlsma, P. Dieppe, K. Gunther, H. Hauselmann, G. Herrero-Beaumont, P. Kaklamanis, S. Lohmander, B. Leeb, M. Lequesne, B. Mazieres, E. Martin-Mola, K. Pavelka, A. Pendleton, L. Punzi, U. Serni, B. Swoboda, G. Verbruggen, I. Zimmerman-Gorska, M. Dougados, Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials ESCISIT // Annals of the Rheumatic Diseases. – 2003. – Vol. 62, № 12. – P. 1145-1155

200. Jüni, P. Intra-articular corticosteroid for knee osteoarthritis [Text] / P. Jüni, R. Hari, A.W.S. Rutjes, R. Fischer, M.G. Silletta, S. Reichenbach, B.R. da Costa // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2015, №10. – P. CD005328.

201. Kacena, M.A. The role of megakaryocytes in skeletal homeostasis and rheumatoid arthritis [Text] / M.A. Kacena, M.C. Horowitz // Cur. Opin. Rheumatol. – 2006. – Vol. 18, № 4. – P. 405-410.

202. Kahlfuß, S. Immunosuppression by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists is mediated through inhibition of Kv1.3 and KCa3.1 channels in T cells [Text] / S. Kahlfuß, N. Simma, J. Mankiewicz, T. Bose, T. Lowinus, S. Klein-Hessling, R. Sprengel, B. Schraven, M. Heine, U. Bommhardt // Molecular and Cellular Biology. – 2014. – Vol. 34, № 5. – P. 820-831.

203. Kantner, R.M. Increase in substance P in the dorsal horn during a chemogenic nociceptive stimulus [Text] / R.M. Kantner, M.L. Kirby, B.D. Goldstein // Brain Research. – 1985. – Vol. 338, № 1. – P. 196-199.

204. Kellgren, J.H. Radiological assessment of osteo-arthrosis [Text] / J.H. Kellgren, J.S. Lawrence // Annals of the Rheumatic Diseases. – 1957. – Vol. 16, № 4. – P. 494-502.

205. Kelly, K. Toward achieving optimal response: understanding and managing antidepressant side effects [Text] / K. Kelly, M. Posternak, J.E. Alpert // Dialogues in Clinical Neuroscience. – 2008. – Vol. 10, № 4. – P. 409-418.

206. Khasar, S.G. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors [Text] / S.G. Khasar, G. McCarter, J.D. Levine // Journal of Neurophysiology. – 1999. – Vol. 81, № 3. – P. 1104-1112.

207. Khayyal, M.T. The possible «chondroprotective» effect of the unsaponifiable constituents of avocado and soya in vivo [Text] / M.T. Khayyal, M.A. el-Ghazaly // Drugs Under Experimental and Clinical Research. – 1998. – Vol. 24, № 1. – P. 41-50.

208. Kidd, B.L. Inhibition of inflammation and hyperalgesia in NK-1 receptor knock-out mice [Text] / B.L. Kidd, J.J. Inglis, K. Vetsika, V.C. Hood, C. De Felipe, H. Bester, S.P. Hunt, S.C. Cruwys

// Neuroreport. – 2003. – T. 14, № 17. – P. 2189-2192.

209. Kidd, B.L. The role of inflammatory mediators on nociception and pain in arthritis [Text] / B.L. Kidd, A. Photiou, J.J. Inglis // Novartis Foundation Symposium. – 2004. – Vol. 260. – P.122-133; discussion 133-138, 277-279.

210. Kishimoto, H. Induction of hypertrophic chondrocyte-like phenotypes by oxidized LDL in cultured bovine articular chondrocytes through increase in oxidative stress [Text] / H. Kishimoto, M. Akagi, S. Zushi, T. Teramura, Y. Onodera, T. Sawamura, C. Hamanishi // Osteoarthritis and Cartilage. – 2010. – Vol. 18, № 10. – P.1284-1290.

211. Kitadai, H.K. Effect of oral diacerein (DAR) in an experimental hip chondrolysis model [Text] / H.K. Kitadai, H.K. Takahashi, A.H. Straus, J.F. Ibanez, R. Lucas, F.T. Kitadai, C. Milani // Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society. – 2006. – Vol. 24, № 6. – P. 1240-1248.

212. Kleinböhl, D. Amantadine sulfate reduces experimental sensitization and pain in chronic back pain patients [Text] / D. Kleinböhl, R. Görtelmeyer, H.-J. Bender, R. Hölzl // Anesthesia and Analgesia. – 2006. – Vol. 102, № 3. – P. 840-847.

213. Klerk, B.M. de. No clear association between female hormonal aspects and osteoarthritis of the hand, hip and knee: a systematic review [Text] / B.M. de Klerk, D. Schiphof, F.P.M.J. Groeneveld, B.W. Koes, G.J.V.M. van Osch, J.B.J. van Meurs, S.M.A. Bierma-Zeinstra // Rheumatology. – 2009. – Vol. 48, № 9. – P. 1160-1165.

214. Kocher, L. The effect of carrageenan-induced inflammation on the sensitivity of unmyelinated skin nociceptors in the rat [Text] / L. Kocher, F. Anton, P.W. Reeh, H.O. Handwerker // Pain. – 1987. – Vol. 29, № 3. – P. 363-373.

215. Kolber, M.J. Risk Factors for Hip Osteoarthritis: Insight for the Strength and Conditioning Professional [Text] / M.J. Kolber, W.J. Hanney, S.W. Cheatham, P.A. Salamh // Strength & Conditioning Journal. – 2017. – Vol. 39, № 3. – P. 35.

216. Kornhuber, J. Effects of the 1-amino-adamantanes at the MK-801-binding site of the NMDA-receptor-gated ion channel: a human postmortem brain study [Text] / J. Kornhuber, J. Bormann, M. Hübers, K. Rusche, P. Riederer // European Journal of Pharmacology. – 1991. – Vol. 206, № 4. – P. 297-300.

217. Kut-Lasserre, C. Effect of avocado and soybean unsaponifiables on gelatinase A (MMP-2), stromelysin 1 (MMP-3), and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP- 1 and TIMP-2) secretion by human fibroblasts in culture [Text] / C. Kut-Lasserre, C.C. Miller, A.L. Ejeil, B. Gogly, M. Dridi, N. Piccardi, B. Guillou, B. Pellat, G. Godeau // Journal of Periodontology. – 2001. – T. 72, № 12. – P. 1685-1694.

218. Kwon, Y.W. Sodium hyaluronate for the treatment of chronic shoulder pain associated with glenohumeral osteoarthritis: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial [Text] / Y.W. Kwon, G. Eisenberg, J.D. Zuckerman // Journal of Shoulder and Elbow Surgery. – 2013. – Vol. 22, № 5. – P. 584-594.

219. Kyllönen, L. Local drug delivery for enhancing fracture healing in osteoporotic bone [Text] / L. Kyllönen, M. D'Este, M. Alini, D. Eglin // Acta Biomaterialia. – 2015. – Vol. 11. – P. 412-434.

220. Kyuki, K. Anti-inflammatory effect of diclofenac-sodium ointment (cream) in topical application [Text] / K. Kyuki, T. Shibuya, K. Tsurumi, H. Fujimura // Japanese Journal of Pharmacology. – 1983. – Vol. 33, № 1. – P. 121-132.

221. Lamaud, E. Biochemical effects of unsaponifiable lipidic components of avocado and soya bean administered percutaneously on the connective tissue components of hairless rat skin [Text] / E. Lamaud, A.M. Robert, J. Wepierre // International Journal of Cosmetic Science. – 1979. – Vol. 1, № 4. – P. 213-219.

222. Lane, N.E. Serum vitamin D levels and incident changes of radiographic hip osteoarthritis: a longitudinal study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group [Text] / N.E. Lane, L.R. Gore, S.R. Cummings, M.C. Hochberg, J.C. Scott, E.N. Williams, M.C. Nevitt // Arthritis and Rheumatism. – 1999. – Vol. 42, № 5. – P. 854-860.

223. Lane, N.E. Tanezumab for the treatment of pain from osteoarthritis of the knee [Text] / N.E. Lane, T.J. Schnitzer, C.A. Birbara, M. Mokhtarani, D.L. Shelton, M.D. Smith, M.T. Brown // The New England Journal of Medicine. – 2010. – Vol. 363, № 16. – P. 1521-1531.

224. Langman, M.J. Risks of bleeding peptic ulcer associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs [Text] / M.J. Langman, J. Weil, P. Wainwright, D.H. Lawson, M.D. Rawlins, R.F. Logan, M. Murphy, M.P. Vessey, D.G. Colin-Jones // Lancet. – 1994. – Vol. 343, № 8905. – P. 1075-1078.

225. Largo, R. Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes [Text] / R. Largo, M.A. Alvarez-Soria, I. Díez-Ortego, E. Calvo, O. Sánchez-Pernaute, J. Egido, G. Herrero-Beaumont // Osteoarthritis and Cartilage. – 2003. – Vol. 11, № 4. – P. 290-298.

226. Latremoliere, A. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity [Text] / A. Latremoliere, C.J. Woolf // The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society. – 2009. – Vol. 10, № 9. – P. 895-926.

227. Lawrence, R.C. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II [Text] / R.C. Lawrence, D.T. Felson, C.G. Helmick, L.M. Arnold, H. Choi,

R.A. Deyo, S. Gabriel, R. Hirsch, M.C. Hochberg, G.G. Hunder, J.M. Jordan, J.N. Katz, H.M. Kremers, F. Wolfe, National Arthritis Data Workgroup // Arthritis and Rheumatism. – 2008. – Vol. 58, № 1. – P. 26-35.

228. Lee, I.O. Effects of different concentrations of formalin on paw edema and pain behaviors in rats [Text] / I.O. Lee, Y.S. Jeong // Journal of Korean Medical Science. – 2002. – Vol. 17, № 1. – P. 81-85.

229. Lee, Y.H. Effect of glucosamine or chondroitin sulfate on the osteoarthritis progression: a meta-analysis [Text] / Y.H. Lee, J.-H. Woo, S.J. Choi, J.D. Ji, G.G. Song // Rheumatology International. – 2010. – Vol. 30, № 3. – P. 357-363.

230. Li, J.-T. Subanesthetic isoflurane relieves zymosan-induced neutrophil inflammatory response by targeting NMDA glutamate receptor and Toll-like receptor 2 signaling [Text] / J.-T. Li, W.-Q. Wang, L. Wang, N.-N. Liu, Y.-L. Zhao, X.-S. Zhu, Q.-Q. Liu, C.-F. Gao, A.-G. Yang, L.-T. Jia // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7, № 22. – P. 31772-31789.

231. Lin, J. Efficacy of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of osteoarthritis: meta-analysis of randomised controlled trials [Text] / J. Lin, W. Zhang, A. Jones, M. Doherty // BMJ (Clinical research ed.). – 2004. – Vol. 329, № 7461. – P. 324.

232. Lippiello, L. Metabolic effects of avocado/soy unsaponifiables on articular chondrocytes [Text] / L. Lippiello, J.V. Nardo, R. Harlan, T. Chiou // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM. – 2008. – Vol. 5, № 2. – P. 191-197.

233. Lisignoli, G. Anti-Fas-induced apoptosis in chondrocytes reduced by hyaluronan: evidence for CD44 and CD54 (intercellular adhesion molecule 1) invovement [Text] / G. Lisignoli, F. Grassi, N. Zini, S. Toneguzzi, A. Piacentini, D. Guidolin, C. Bevilacqua, A. Facchini // Arthritis and Rheumatism. – 2001. – Vol. 44, № 8. – P. 1800-1807.

234. Litwic, A. Epidemiology and burden of osteoarthritis [Text] / A. Litwic, M.H. Edwards, E.M. Dennison, C. Cooper // British Medical Bulletin. – 2013. – Vol. 105. – P. 185-199.

235. Liu, X.G. Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal N-methyl-D-aspartic acid receptor blockage [Text] / X.G. Liu, J. Sandkühler // Neuroscience Letters. – 1995. – Vol. 191, № 1-2. – P. 43-46.

236. Lohmander, L.S. Intraarticular sprifermin (recombinant human fibroblast growth factor 18) in knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [Text] / L.S. Lohmander, S. Hellot, D. Dreher, E.F.W. Krantz, D.S. Kruger, A. Guermazi, F. Eckstein // Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.). – 2014. – Vol. 66, № 7. – P. 1820-1831.

237. Lombardi, G. Characterization of ionotropic glutamate receptors in human lymphocytes [Text] / G. Lombardi, C. Dianzani, G. Miglio, P.L. Canonico, R. Fantozzi // British Journal of Pharmacology. – 2001. – Vol. 133, № 6. – P. 936-944.

238. Manoy, P. Vitamin D supplementation improves quality of life and physical performance in osteoarthritis patients [Text] / P. Manoy, P. Yuktanandana, A. Tanavalee, W. Anomasiri, S. Ngarmukos, T. Tanpowpong, S. Honsawek // Nutrients. – 2017. – T. 9, № 8. – P. 799

239. Mantuano, E. Tissue-type plasminogen activator regulates macrophage activation and innate immunity [Text] / E. Mantuano, P. Azmoon, C. Brifault, M.A. Banki, A.S. Gilder, W.M. Campana, S.L. Gonias // Blood. – 2017. – Vol. 130, № 11. – P. 1364-1374.

240. Marie, P.J. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis [Text] / P.J. Marie, D. Felsenberg, M.L. Brandi // Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. – 2011. – Vol. 22, № 6. – P. 1659-1667.

241. Martel-Pelletier, J. In vitro effects of diacerhein and rhein on interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha systems in human osteoarthritic synovium and chondrocytes [Text] / J. Martel-Pelletier, F. Mineau, F.C. Jolicoeur, J.M. Cloutier, J.P. Pelletier // The Journal of Rheumatology. – 1998. – Vol. 25, № 4. – P. 753-762.

242. Martel-Pelletier, J. Effects of diacerein at the molecular level in the osteoarthritis disease process [Text] / J. Martel-Pelletier, J.-P. Pelletier // Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease. – 2010. – Vol. 2, № 2. – P. 95-104.

243. Martin, G. Rhein inhibits interleukin-1 beta-induced activation of MEK/ERK pathway and DNA binding of NF-kappa B and AP-1 in chondrocytes cultured in hypoxia: a potential mechanism for its disease-modifying effect in osteoarthritis [Text] / G. Martin, P. Bogdanowicz, F. Domagala, H. Ficheux, J.-P. Pujol // Inflammation. – 2003. – Vol. 27, № 4. – P. 233-246.

244. Mashkina, A.P. NMDA receptors are expressed in lymphocytes activated both in vitro and in vivo [Text] / A.P. Mashkina, D. Cizkova, I. Vanicky, A.A. Boldyrev // Cellular and Molecular Neurobiology. – 2010. – Vol. 30, № 6. – P. 901-907.

245. Mashkina, A.P. The excitotoxic effect of NMDA on human lymphocyte immune function [Text] / A.P. Mashkina, O.V. Tyulina, T.I. Solovyova, E.I. Kovalenko, L.M. Kanevski, P. Johnson, A.A. Boldyrev // Neurochemistry International. – 2007. – Vol. 51, № 6-7. – P. 356-360.

246. Mason, L. Topical NSAIDs for acute pain: a meta-analysis [Text] / L. Mason, R.A. Moore, J.E. Edwards, S. Derry, H.J. McQuay // BMC Family Practice. – 2004. – Vol. 5, № 1. – P. 10.

247. Massey, K.A. Lipidomics of polyunsaturated-fatty-acid-derived oxygenated metabolites [Text] / K.A. Massey, A. Nicolaou // Biochemical Society Transactions. – 2011. – Vol. 39, № 5. – P. 1240-1246.

248. Mastbergen, S.C. Differential direct effects of cyclo-oxygenase-1/2 inhibition on

proteoglycan turnover of human osteoarthritic cartilage: an in vitro study [Text] / S.C. Mastbergen, N.W.D. Jansen, J.W.J. Bijlsma, F.P.J.G. Lafeber // Arthritis Research & Therapy. – 2006. – Vol. 8, № 1. – P. R2.

249. Mauviel, A. Effects of unsaponifiable extracts of avocado/soy beans (PIAS) on the production of collagen by cultures of synoviocytes, articular chondrocytes and skin fibroblasts [Text] / A. Mauviel, M. Daireaux, D.J. Hartmann, P. Galera, G. Loyau, J.P. Pujol // Revue Du Rhumatisme Et Des Maladies Osteo-Articulaires. – 1989. – Vol. 56, № 2. – P. 207-211.

250. Mauviel, A. Effect of unsaponifiable extracts of avocado and soybean (Piasclédine) on the collagenolytic action of cultures of human rheumatoid synoviocytes and rabbit articular chondrocytes treated with interleukin-1 [Text] / A. Mauviel, G. Loyau, J.P. Pujol // Revue Du Rhumatisme Et Des Maladies Osteo-Articulaires. – 1991. – Vol. 58, № 4. – P. 241-245.

251. McAlindon, T.E. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis [Text] / T.E. McAlindon, R.R. Bannuru, M.C. Sullivan, N.K. Arden, F. Berenbaum, S.M. Bierma-Zeinstra, G.A. Hawker, Y. Henrotin, D.J. Hunter, H. Kawaguchi, K. Kwoh, S. Lohmander, F. Rannou, E.M. Roos, M. Underwood // Osteoarthritis and Cartilage. – 2014. – Vol. 22, № 3. – P. 363-388.

252. McCrae, F. Scintigraphic assessment of osteoarthritis of the knee joint [Text] / F. McCrae, J. Shouls, P. Dieppe, I. Watt // Annals of the Rheumatic Diseases. – 1992. – Vol. 51, № 8. – P. 938-942.

253. McGuire, D. TPX-100 leads to marked, sustained improvements in subjects with knee osteoarthritis: pre-clinical rationale and results of a controlled clinical trial [Text] / D. McGuire, N. Lane, N. Segal, S. Metyas, H. Barthel, M. Miller, D. Rosen, Y. Kumagai // Osteoarthritis and Cartilage. – 2018. – Vol. 26. – P. S243.

254. McKee, M.D. NASHA hyaluronic acid for the treatment of shoulder osteoarthritis: a prospective, single-arm clinical trial [Text] / M.D. McKee, R. Litchfield, J.A. Hall, T. Wester, J. Jones, A.J. Harrison // Medical Devices. – 2019. – Vol. 12. – P. 227-234.

255. McMahon, S.B. NGF as a mediator of inflammatory pain [Text] / S.B. McMahon // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. – 1996. – Vol. 351, № 1338. – P. 431-440.

256. McNamara, C.R. TRPA1 mediates formalin-induced pain [Text] / C.R. McNamara, J. Mandel-Brehm, D.M. Bautista, J. Siemens, K.L. Deranian, M. Zhao, N.J. Hayward, J.A. Chong, D. Julius, M.M. Moran, C.M. Fanger // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2007. – Vol. 104, № 33. – P. 13525-13530.

257. Melzack, R. Central neuroplasticity and pathological pain [Text] / R. Melzack, T.J. Coderre, J. Katz, A.L. Vaccarino // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2001. – Vol. 933.

– P. 157-174.

258. Mendes, A.F. Diacerhein and rhein prevent interleukin-1beta-induced nuclear factor-kappaB activation by inhibiting the degradation of inhibitor kappaB-alpha [Text] / A.F. Mendes, M.M. Caramona, A.P. de Carvalho, M.C. Lopes // Pharmacology & Toxicology. – 2002. – Vol. 91, № 1. – P. 22-28.

259. Merolla, G. Ultrasound-guided subacromial injections of sodium hyaluronate for the management of rotator cuff tendinopathy: a prospective comparative study with rehabilitation therapy [Text] / G. Merolla, P. Bianchi, G. Porcellini // Musculoskeletal Surgery. – 2013. – Vol. 97 Suppl 1. – P. 49-56.

260. Moore, R.A. Quantitative systematic review of topically applied non-steroidal anti-inflammatory drugs [Text] / R.A. Moore, M.R. Tramèr, D. Carroll, P.J. Wiffen, H.J. McQuay // BMJ (Clinical research ed.). – 1998. – Vol. 316, № 7128. – P. 333-338.

261. Murakami, S. Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha [Text] / S. Murakami, V. Lefebvre, B. de Crombrugghe // The Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Vol. 275, № 5. – P. 3687-3692.

262. Naseri, M. The study of anti-inflammatory activity of oil-based dill (Anethum graveolens L.) extract used topically in formalin-induced inflammation male rat paw [Text] / M. Naseri, F. Mojab, M. Khodadoost, M. Kamalinejad, A. Davati, R. Choopani, A. Hasheminejad, Z. Bararpoor, S. Shariatpanahi, M. Emtiazy // Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. – 2012. – Vol. 11, № 4. – P. 1169-1174.

263. National Clinical Guideline Centre (UK). Osteoarthritis: Care and Management in Adults [Text] / National Institute for Health and Clinical Excellence // London (UK). – 2014.

264. National Collaborating Centre for Chronic Conditions (UK). Osteoarthritis: National Clinical Guideline for Care and Management in Adults [Text] / Royal College of Physicians // London (UK). – 2008.

265. Nelson, A.E. Characterization of individual radiographic features of hip osteoarthritis in African American and White women and men: the Johnston County Osteoarthritis Project [Text] / A.E. Nelson, L. Braga, J.B. Renner, J. Atashili, J. Woodard, M.C. Hochberg, C.G. Helmick, J.M. Jordan // Arthritis Care & Research. – 2010. – Vol. 62, № 2. – P. 190-197.

266. Neogi, T. The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis [Text] / T. Neogi // Osteoarthritis and Cartilage. – 2013. – Vol. 21, № 9. – P. 1145-1153.

267. Nestler, E.J. Protein phosphorylation in the brain [Text] / E.J. Nestler, P. Greengard // Nature. – 1983. – Vol. 305, № 5935. – P. 583-588.

268. Newbould, B.B. Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobactreial adjuvant

[Text] / B.B. Newbould // British Journal of Pharmacology and Chemotherapy. – 1963. – Vol. 21. – P. 127-136.

269. Nicol, G.D. Unraveling the story of NGF-mediated sensitization of nociceptive sensory neurons: ON or OFF the Trks? [Text] / G.D. Nicol, M.R. Vasko // Molecular Interventions. – 2007. – Vol. 7, № 1. – P. 26-41.

270. Noël, E. Efficacy and safety of Hylan G-F 20 in shoulder osteoarthritis with an intact rotator cuff. Open-label prospective multicenter study [Text] / E. Noël, P. Hardy, F.-W. Hagena, E. Laprelle, F. Goebel, C. Faure, L. Favard, P. Gaudin, R. Christ, C. Baudot, J. Dietl, P. Goupille // Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme. – 2009. – Vol. 76, № 6. – P. 670-673.

271. Novartis. Diclofenac sodium topical gel (voltaren gel) package labeling [Text] / Parsippany, NJ. – 2009

272. Oh-ishi, S. Analysis of chemical mediators involved in acute inflammatory reaction with the rat pleurisy model [Text] / S. Oh-ishi // Nihon Yakurigaku Zasshi. Folia Pharmacologica Japonica. – 1997. – Vol. 110, № 2. – P. 59-68.

273. Oliveira, G.J.P.L. de. Effect of avocado/soybean unsaponifiables on osseointegration: a proof-of-principle preclinical in vivo study [Text] / G.J.P.L. de Oliveira, L.G.F. de Paula, R. Spin-Neto, A. Stavropoulos, L.C. Spolidório, E. Marcantonio, R.A.C. Marcantonio // The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants. – 2014. – Vol. 29, № 4. – P. 949-957.

274. Olkkonen, V.M. Oxysterols and their cellular effectors [Text] / V.M. Olkkonen, O. Béaslas, E. Nissilä // Biomolecules. – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 76-103.

275. Omote, K. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw [Text] / K. Omote, P. Kawamata, M. Kawamata, A. Namiki // Brain Research. – 1998. – Vol. 787, № 1. – P. 161-164.

276. O'Neil, C.K. Adverse effects of analgesics commonly used by older adults with osteoarthritis: focus on non-opioid and opioid analgesics [Text] / C.K. O'Neil, J.T. Hanlon, Z.A. Marcum // The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy. – 2012. – Vol. 10, № 6. – P. 331-342.

277. Ong, K.L. Off-label use of bone morphogenetic proteins in the United States using administrative data [Text] / K.L. Ong, M.L. Villarraga, E. Lau, L.Y. Carreon, S.M. Kurtz, S.D. Glassman // Spine. – 2010. – Vol. 35, № 19. – P. 1794-1800.

278. Pacheco, R. Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation [Text] / R. Pacheco, H. Oliva, J.M. Martinez-Navío, N. Climent, F. Ciruela, J.M. Gatell, T. Gallart, J. Mallol, C. Lluis, R. Franco // Journal of Immunology. – 2006. – Vol. 177, № 10. – P. 6695-6704.

279. Parsons, C.G. Glutamate in CNS disorders as a target for drug development: an update

[Text] / C.G. Parsons, W. Danysz, G. Quack // Drug News & Perspectives. – 1998. – Vol. 11, № 9. – P. 523-569.

280. Patel, H. Animal models of rheumatoid arthritis [Text] / H. Patel, B. Dawson, F. Humby, M. Blades, C. Pitzalis, M. Burnet, M. Seed // Fundamentals of Inflammation. – Cambridge: Cambridge University Press, 2010. – P. 385-412.

281. Pavelka, K. Diacerein: Benefits, Risks and Place in the Management of Osteoarthritis. An Opinion-Based Report from the ESCEO [Text] / K. Pavelka, O. Bruyère, C. Cooper, J.A. Kanis, B.F. Leeb, E. Maheu, J. Martel-Pelletier, J. Monfort, J.-P. Pelletier, R. Rizzoli, J.-Y. Reginster // Drugs & Aging. – 2016. – Vol. 33, № 2. – P. 75-85.

282. Pavelka, K. Efficacy and safety of piascledine 300 versus chondroitin sulfate in a 6 months treatment plus 2 months observation in patients with osteoarthritis of the knee [Text] / K. Pavelka, P. Coste, P. Géher, G. Krejci // Clinical Rheumatology. – 2010. – Vol. 29, № 6. – P. 659-670.

283. Pelletier, J.P. In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy [Text] / J.P. Pelletier, J.P. Caron, C. Evans, P.D. Robbins, H.I. Georgescu, D. Jovanovic, J.C. Fernandes, J. Martel-Pelletier // Arthritis and Rheumatism. – 1997. – Vol. 40, № 6. – P. 1012-1019.

284. Pelletier, J.-P. Strontium ranelate reduces the progression of experimental dog osteoarthritis by inhibiting the expression of key proteases in cartilage and of IL-1β in the synovium [Text] / J.-P. Pelletier, M. Kapoor, H. Fahmi, D. Lajeunesse, A. Blesius, J. Maillet, J. Martel-Pelletier // Annals of the Rheumatic Diseases. – 2013. – Vol. 72, № 2. – P. 250-257.

285. Peyron, J.G. Intraarticular hyaluronan injections in the treatment of osteoarthritis: state-of-the-art review [Text] / J.G. Peyron // The Journal of Rheumatology. Supplement. – 1993. – Vol. 39.– P. 10-15.

286. Pirmohamed, M. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients [Text] / M. Pirmohamed, S. James, S. Meakin, C. Green, A.K. Scott, T.J. Walley, K. Farrar, B.K. Park, A.M. Breckenridge // BMJ. – 2004. – Vol. 329, № 7456. – P. 15-19.

287. Porcellini, G. Intra-articular glenohumeral injections of HYADD®4-G for the treatment of painful shoulder osteoarthritis: a prospective multicenter, open-label trial [Text] / G. Porcellini, G. Merolla, N. Giordan, P. Paladini, A. Burini, E. Cesari, A. Castagna // Joints. – 2015. – Vol. 3, № 3. – P. 116-121.

288. Pud, D. The NMDA receptor antagonist amantadine reduces surgical neuropathic pain in cancer patients: a double blind, randomized, placebo controlled trial [Text] / D. Pud, E. Eisenberg, A. Spitzer, R. Adler, G. Fried, D. Yarnitsky // Pain. – 1998. – Vol. 75, № 2-3. – P. 349-354.

289. Puenpatom, R.A. Increased prevalence of metabolic syndrome in individuals with

osteoarthritis: an analysis of NHANES III data [Text] / R.A. Puenpatom, T.W. Victor // Postgraduate Medicine. – 2009. – Vol. 121, № 6. – P. 9-20.

290. Puglia, C. Evaluation of in-vivo topical anti-inflammatory activity of indometacin from liposomal vesicles [Text] / C. Puglia, D. Trombetta, V. Venuti, A. Saija, F. Bonina // The Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2004. – Vol. 56, № 10. – P. 1225-1232.

291. Reginster, J.-Y. Strontium ranelate: a new paradigm in the treatment of osteoporosis [Text] / J.-Y. Reginster, R. Deroisy, I. Jupsin // Drugs of Today. – 2003. – Vol. 39, № 2. – P. 89-101.

292. Rekik, S. Tachon syndrome: rare side effect of articular injections of corticosteroids. a report of two cases [Text] / S. Rekik, S. Boussaid, H.B. Abla, I. Cheour, M. Ben Amor, M. Elleuch // Drug Safety - Case Reports. – 2017. – Vol. 4, № 1. – P. 20.

293. Rezende, M.U. de. Diacerhein versus glucosamine in a rat model of osteoarthritis [Text] / M.U. de Rezende, H.M. de C. Gurgel, P.R. Vilaça Junior, R.K. Kuroba, A.S.S. Lopes, R.Z. Phillipi, A.J. Hernandez // Clinics. – 2006. – Vol. 61, № 5. – P. 461-466.

294. Richmond, C.E. Preoperative morphine pre-empts postoperative pain [Text] / C.E. Richmond, L.M. Bromley, C.J. Woolf // Lancet. – 1993. – Vol. 342, № 8863. – P. 73-75.

295. Robbins, S.L. Pathologic basis of disease [Text] / S.L. Robbins, R.S. Cotran, V. Kumar. – 5th. – Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. – P.1400

296. Rolf, C. Intra-articular absorption and distribution of ketoprofen after topical plaster application and oral intake in 100 patients undergoing knee arthroscopy [Text] / C. Rolf, B. Engström, C. Beauchard, L.D. Jacobs, A. Le Liboux // Rheumatology. – 1999. – Vol. 38, № 6. – P. 564-567.

297. Rother, M. Efficacy and safety of epicutaneous ketoprofen in Transfersome (IDEA-033) versus oral celecoxib and placebo in osteoarthritis of the knee: multicentre randomised controlled trial [Text] / M. Rother, B.J. Lavins, W. Kneer, K. Lehnhardt, E.J. Seidel, S. Mazgareanu // Annals of the Rheumatic Diseases. – 2007. – Vol. 66, № 9. – P. 1178-1183.

298. Rowe, P.S.N. MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and minhibin [Text] / P.S.N. Rowe, Y. Kumagai, G. Gutierrez, I.R. Garrett, R. Blacher, D. Rosen, J. Cundy, S. Navvab, D. Chen, M.K. Drezner, L.D. Quarles, G.R. Mundy // Bone. – 2004. – Vol. 34, № 2. – P. 303-319.

299. Salvemini, D. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation [Text] / D. Salvemini, Z.Q. Wang, P.S. Wyatt, D.M. Bourdon, M.H. Marino, P.T. Manning, M.G. Currie // British Journal of Pharmacology. – 1996. – Vol. 118, № 4. – P. 829-838.

300. Sampson, E.R. Teriparatide as a chondroregenerative therapy for injury-induced osteoarthritis [Text] / E.R. Sampson, M.J. Hilton, Y. Tian, D. Chen, E.M. Schwarz, R.A. Mooney, S.V. Bukata, R.J. O'Keefe, H. Awad, J.E. Puzas, R.N. Rosier, M.J. Zuscik // Science Translational Medicine. – 2011. – Vol. 3, № 101. – P. 101ra93.

301. Sanchez, C. Effects of rhein on human articular chondrocytes in alginate beads [Text] / C. Sanchez, M. Mathy-Hartert, M.A. Deberg, H. Ficheux, J.Y.L. Reginster, Y.E. Henrotin // Biochemical Pharmacology. – 2003. – Vol. 65, № 3. – P. 377-388.

302. Sandelin, J. Local NSAID gel (eltenac) in the treatment of osteoarthritis of the knee. A double blind study comparing eltenac with oral diclofenac and placebo gel [Text] / J. Sandelin, A. Harilainen, H. Crone, P. Hamberg, B. Forsskåhl, G. Tamelander // Scandinavian Journal of Rheumatology. – 1997. – Vol. 26, № 4. – P. 287-292.

303. Sanna, V. Effect of vehicle on diclofenac sodium permeation from new topical formulations: in vitro and in vivo studies [Text] / V. Sanna, A.P. Peana, M.D.L. Moretti // Current Drug Delivery. – 2009. – Vol. 6, № 1. – P. 93-100.

304. Schnitzer, T.J. Effect of tanezumab on joint pain, physical function, and patient global assessment of osteoarthritis among patients with osteoarthritis of the hip or knee: a randomized clinical trial [Text] / T.J. Schnitzer, R. Easton, S. Pang, D.J. Levinson, G. Pixton, L. Viktrup, I. Davignon, M.T. Brown, C.R. West, K.M. Verburg // JAMA. – 2019. – Vol. 322, № 1. – P. 37-48.

305. Schöngen, R.N. Effect of diacetylrhein on the phagocytosis of polymorphonuclear leucocytes and its influence on the biosynthesis of hyaluronate in synovial cells [Text] / R.N. Schöngen, B.M. Giannetti, E. van de Leur, R. Reinards, H. Greiling // Arzneimittel-Forschung. – 1988. – Vol. 38, № 5. – P. 744-748.

306. Sellam, J. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis [Text] / J. Sellam, F. Berenbaum // Nature Reviews. Rheumatology. – 2010. – Vol. 6, № 11. – P. 625-635.

307. Sellers, R.S. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage [Text] / R.S. Sellers, D. Peluso, E.A. Morris // The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume. – 1997. – Vol. 79, № 10. – P. 1452-1463.

308. Seth, B.L. Comparative pharmacokinetics and bioavailability study of percutaneous absorption of diclofenac from two topical formulations containing drug as a solution gel or as an emulsion gel [Text] / B.L. Seth // Arzneimittel-Forschung. – 1992. – Vol. 42, № 2. – P. 120-122.

309. Seymour, T.L. Postoperative analgesia due to sustained-release buprenorphine, sustained-release meloxicam, and carprofen gel in a model of incisional pain in rats (rattus norvegicus) / T.L. Seymour, S.C. Adams, S.A. Felt, K. Jampachaisri, D.C. Yeomans, C. Pacharinsak // Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS. – 2016. – Vol. 55, № 3. – P. 300-305.

310. Shimonkevitz, R. A diketopiperazine fragment of human serum albumin modulates T-lymphocyte cytokine production through rap1 [Text] / R. Shimonkevitz, G. Thomas, D.S. Slone, M.

Craun, C. Mains, D. Bar-Or // The Journal of Trauma. – 2008. – Vol. 64, № 1. – P. 35-41.

311. Shingu, M. The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells [Text] / M. Shingu, Y. Nagai, T. Isayama, T. Naono, M. Nobunaga, Y. Nagai // Clinical and Experimental Immunology. – 1993. – Vol. 94, № 1. – P. 145-149.

312. Silverstein, E. The use of intra-articular hylan G-F 20 in the treatment of symptomatic osteoarthritis of the shoulder: a preliminary study [Text] / E. Silverstein, R. Leger, K.P. Shea // The American Journal of Sports Medicine. – 2007. – Vol. 35, № 6. – P. 979-985.

313. Sinusas, K. Osteoarthritis: diagnosis and treatment [Text] / K. Sinusas // American Family Physician. – 2012. – Vol. 85, № 1. – P. 49-56.

314. Skilling, S.R. Extracellular amino acid concentrations in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridine and nociceptive stimulation [Text] / S.R. Skilling, D.H. Smullin, A.J. Beitz, A.A. Larson // Journal of Neurochemistry. – 1988. – Vol. 51, № 1. – P. 127-132.

315. Smith, G.N. Diacerhein treatment reduces the severity of osteoarthritis in the canine cruciate-deficiency model of osteoarthritis [Text] / G.N. Smith, S.L. Myers, K.D. Brandt, E.A. Mickler, M.E. Albrecht // Arthritis and Rheumatism. – 1999. – Vol. 42, № 3. – P. 545-554.

316. Sommer, C. A metalloprotease-inhibitor reduces pain associated behavior in mice with experimental neuropathy [Text] / C. Sommer, C. Schmidt, A. George, K.V. Toyka // Neuroscience Letters. – 1997. – Vol. 237, № 1. – P. 45-48.

317. Spector, T.D. Is hormone replacement therapy protective for hand and knee osteoarthritis in women?: The Chingford Study / T.D. Spector, D. Nandra, D.J. Hart, D.V. Doyle // Annals of the Rheumatic Diseases. – 1997. – Vol. 56, № 7. – P. 432-434.

318. Srikanth, V.K. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis [Text] / V.K. Srikanth, J.L. Fryer, G. Zhai, T.M. Winzenberg, D. Hosmer, G. Jones // Osteoarthritis and Cartilage. – 2005. – Vol. 13, № 9. – P. 769-781.

319. Stewart, M. Efficacy of commonly prescribed analgesics in the management of osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis [Text] / M. Stewart, J. Cibere, E.C. Sayre, J.A. Kopec // Rheumatology International. – 2018. – Vol. 38, № 11. – P. 1985-1997.

320. Tang, Y. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation [Text] / Y. Tang, X. Wu, W. Lei, L. Pang, C. Wan, Z. Shi, L. Zhao, T.R. Nagy, X. Peng, J. Hu, X. Feng, W. Van Hul, M. Wan, X. Cao // Nature Medicine. – 2009. – Vol. 15, № 7. – P. 757-765.

321. Taruc-Uy, R.L. Diagnosis and treatment of osteoarthritis [Text] / R.L. Taruc-Uy, S.A. Lynch // Primary Care. – 2013. – Vol. 40, № 4. – P. 821-836

322. Tashiro, Y. Effect of lipophilicity on in vivo iontophoretic delivery. I. NSAIDs [Text] /

Y. Tashiro, S. Shichibe, Y. Kato, E. Hayakawa, K. Itoh // Biological & Pharmaceutical Bulletin. – 2001. – Vol. 24, № 3. – P. 278-283.

323. Tastekin N. Protective effects of L-carnitine and alpha-lipoic acid in rats with adjuvant arthritis [Text] / N. Tastekin, N. Aydogdu, D. Dokmeci, U. Usta, M. Birtane, H. Erbas, M. Ture // Pharmacological Research. – 2007. – Vol. 56, № 4. – P. 303-310.

324. Tegeder, I. Application of microdialysis for the determination of muscle and subcutaneous tissue concentrations after oral and topical ibuprofen administration [Text] / I. Tegeder, U. Muth-Selbach, J. Lötsch, G. Rüsing, R. Oelkers, K. Brune, S. Meller, G.R. Kelm, F. Sörgel, G. Geisslinger // Clinical Pharmacology and Therapeutics. – 1999. – Vol. 65, № 4. – P. 357-368.

325. Tenti, S. What about strontium ranelate in osteoarthritis? Doubts and securities [Text] / S. Tenti, S. Cheleschi, G.M. Guidelli, M. Galeazzi, A. Fioravanti // Modern Rheumatology. – 2014. – Vol. 24, № 6. – P. 881-884.

326. Tjølsen, A. The formalin test: an evaluation of the method [Text] / A. Tjølsen, O.G. Berge, S. Hunskaar, J.H. Rosland, K. Hole // Pain. – 1992. – Vol. 51, № 1. – P. 5-17.

327. Toivanen, A.T. Obesity, physically demanding work and traumatic knee injury are major risk factors for knee osteoarthritis--a population-based study with a follow-up of 22 years [Text] / A.T. Toivanen, M. Heliövaara, O. Impivaara, J.P.A. Arokoski, P. Knekt, H. Lauren, H. Kröger // Rheumatology. – 2010. – Vol. 49, № 2. – P. 308-314.

328. Towheed, T.E. Acetaminophen for osteoarthritis [Text] / T.E. Towheed, L. Maxwell, M.G. Judd, M. Catton, M.C. Hochberg, G. Wells // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2006. – № 1. – P. CD004257.

329. Tugwell, P.S. Equivalence study of a topical diclofenac solution (pennsaid) compared with oral diclofenac in symptomatic treatment of osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial [Text] / P.S. Tugwell, G.A. Wells, J.Z. Shainhouse // The Journal of Rheumatology. – 2004. – Vol. 31, № 10. – P. 2002-2012.

330. Tuneva, E.O. Effect of NMDA on production of reactive oxygen species by human lymphocytes [Text] / E.O. Tuneva, O.N. Bychkova, A.A. Boldyrev // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2003. – Vol. 136, № 2. – P. 159-161.

331. Tverskoy, M. Postoperative pain after inguinal herniorrhaphy with different types of anesthesia [Text] / M. Tverskoy, C. Cozacov, M. Ayache, E.L. Bradley, I. Kissin // Anesthesia and Analgesia. – 1990. – Vol. 70, № 1. – P. 29-35.

332. Tverskoy, M. Preemptive effect of fentanyl and ketamine on postoperative pain and wound hyperalgesia [Text] / M. Tverskoy, Y. Oz, A. Isakson, J. Finger, E.L. Bradley, I. Kissin // Anesthesia and Analgesia. – 1994. – Vol. 78, № 2. – P. 205-209.

333. Ueberall, M.A. Efficacy, tolerability, and safety of an oral enzyme combination vs diclofenac in osteoarthritis of the knee: results of an individual patient-level pooled reanalysis of data from six randomized controlled trials [Text] / M.A. Ueberall, G.H. Mueller-Schwefe, R. Wigand, U. Essner // Journal of Pain Research. – 2016. – Vol. 9. – P. 941-961.

334. Vaile, J.H. Topical NSAIDs for musculoskeletal conditions. A review of the literature [Text] / J.H. Vaile, P. Davis // Drugs. – 1998. – Vol. 56, № 5. – P. 783-799.

335. Velasquez, M.T. Osteoarthritis: another component of metabolic syndrome? [Text] / M.T. Velasquez, J.D. Katz // Metabolic Syndrome and Related Disorders. – 2010. – Vol. 8, № 4. – P. 295-305.

336. Vina, E.R. Epidemiology of osteoarthritis: literature update [Text] / E.R. Vina, C.K. Kwoh // Current Opinion in Rheumatology. – 2018. – Vol. 30, № 2. – P. 160-167.

337. Volkow, N.D. Opioid abuse in chronic pain--misconceptions and mitigation strategies [Text] / N.D. Volkow, A.T. McLellan // The New England Journal of Medicine. – 2016. – Vol. 374, № 13. – P. 1253-1263.

338. Vortkamp, A. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein [Text] / A. Vortkamp, K. Lee, B. Lanske, G.V. Segre, H.M. Kronenberg, C.J. Tabin // Science. – 1996. – Vol. 273, № 5275. – P. 613-622.

339. Wang, Z.-Q. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain [Text] / Z.-Q. Wang, F. Porreca, S. Cuzzocrea, K. Galen, R. Lightfoot, E. Masini, C. Muscoli, V. Mollace, M. Ndengele, H. Ischiropoulos, D. Salvemini // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2004. – Vol. 309, № 3. – P. 869-878.

340. Wang, Z.Y. Efficacy and safety of duloxetine on osteoarthritis knee pain: a meta-analysis of randomized controlled trials [Text] / Z.Y. Wang, S.Y. Shi, S.J. Li, F. Chen, H. Chen, H.Z. Lin, J.M. Lin // Pain Medicine (Malden, Mass.). – 2015. – Vol. 16, № 7. – P. 1373-1385.

341. Wanka, L. The lipophilic bullet hits the targets: medicinal chemistry of adamantane derivatives [Text] / L. Wanka, K. Iqbal, P.R. Schreiner // Chemical Reviews. – 2013. – Vol. 113, № 5. – P. 3516-3604.

342. Whyte, M.P. Camurati-Engelmann disease: unique variant featuring a novel mutation in TGFβ1 encoding transforming growth factor beta 1 and a missense change in TNFSF11 encoding RANK ligand [Text] / M.P. Whyte, W.G. Totty, D.V. Novack, X. Zhang, D. Wenkert, S. Mumm // Journal of Bone and Mineral Research. – 2011. – Vol. 26, № 5. – P. 920-933.

343. Willis, J.V. Pharmacokinetic studies on diclofenac sodium in young and old volunteers [Text] / J.V. Willis, M.J. Kendall // Scandinavian Journal of Rheumatology. Supplement. – 1978. – № 22. – P. 36-41.

344. Woolf, C.J. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory

hypersensitivity [Text] / C.J. Woolf, B. Safieh-Garabedian, Q.P. Ma, P. Crilly, J. Winter // Neuroscience. – 1994. – Vol. 62, № 2. – P. 327-331.

345. Xia, B. Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms [Text] / B. Xia, Di Chen, J. Zhang, S. Hu, H. Jin, P. Tong // Calcified Tissue International. – 2014. – Vol. 95, № 6. – P. 495-505.

346. Yap, H.-Y. Pathogenic role of immune cells in rheumatoid arthritis: implications in clinical treatment and biomarker development [Text] / H.-Y. Yap, S.Z.-Y. Tee, M.M.-T. Wong, S.-K. Chow, S.-C. Peh, S.-Y. Teow // Cells. – 2018. – Vol. 7, № 10. – P. 161

347. Zacher, J. Topisches diclofenac emulgel versus orales ibuprofen in der therapie der aktivierten arthrose der fingergelenke (heberden- und/oder bouchard-arthrose) - doppelblinde, kontrollierte, randomisierte studie [Text] / J. Zacher, K. Burger, L. Färber, M. Gräve, H. Abberger, K. Bertsch // Aktuelle Rheumatologie - AKTUEL RHEUMATOL. – 2001. – Vol. 26. – P. 7-14.

348. Zahiri, H. Adjuvant experimental polyarthritis. [Text] / H. Zahiri, J. Gagnon, R. Ayotte, C.A. Laurin // Canadian Medical Association Journal. – 1969. – Vol. 101, № 5. – P. 269-278.

349. Zhang, W. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part I: critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence [Text] / W. Zhang, R.W. Moskowitz, G. Nuki, S. Abramson, R.D. Altman, N. Arden, S. Bierma-Zeinstra, K.D. Brandt, P. Croft, M. Doherty, M. Dougados, M. Hochberg, D.J. Hunter, K. Kwoh, L.S. Lohmander, P. Tugwell // Osteoarthritis and Cartilage. – 2007. – Vol. 15, № 9. – P. 981-1000.

350. Zhang, W. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines [Text] / W. Zhang, R.W. Moskowitz, G. Nuki, S. Abramson, R.D. Altman, N. Arden, S. Bierma-Zeinstra, K.D. Brandt, P. Croft, M. Doherty, M. Dougados, M. Hochberg, D.J. Hunter, K. Kwoh, L.S. Lohmander, P. Tugwell // Osteoarthritis and Cartilage. – 2008. – Vol. 16, № 2. – P. 137-162.

351. Zhang, W. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009 [Text] / W. Zhang, G. Nuki, R.W. Moskowitz, S. Abramson, R.D. Altman, N.K. Arden, S. Bierma-Zeinstra, K.D. Brandt, P. Croft, M. Doherty, M. Dougados, M. Hochberg, D.J. Hunter, K. Kwoh, L.S. Lohmander, P. Tugwell // Osteoarthritis and Cartilage. – 2010. – Vol. 18, № 4. – P. 476-499.

352. Zhang, W. Emerging trend in the pharmacotherapy of osteoarthritis [Text] / W. Zhang, W.B. Robertson, J. Zhao, W. Chen, J. Xu // Frontiers in Endocrinology. – 2019. – Vol. 10. – P. 431.

353. Zhang, Y. Epidemiology of osteoarthritis [Text] / Y. Zhang, J.M. Jordan // Clinics in Geriatric Medicine. – 2010. – Vol. 26, № 3. – P. 355-369.

354. Zhang, Y. Comparison of the prevalence of knee osteoarthritis between the elderly

Chinese population in Beijing and whites in the United States: The Beijing Osteoarthritis Study [Text] / Y. Zhang, L. Xu, M.C. Nevitt, P. Aliabadi, W. Yu, M. Qin, L.Y. Lui, D.T. Felson // Arthritis and Rheumatism. – 2001. – Vol. 44, № 9. – P. 2065-2071.

355. Zhang, Y. Lower prevalence of hand osteoarthritis among Chinese subjects in Beijing compared with white subjects in the United States: the Beijing Osteoarthritis Study [Text] / Y. Zhang, L. Xu, M.C. Nevitt, J. Niu, J.P. Goggins, P. Aliabadi, W. Yu, L.-Y. Lui, D.T. Felson // Arthritis and Rheumatism. – 2003. – Vol. 48, № 4. – P. 1034-1040.

356. Zhen, G. Inhibition of TGF-β signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis [Text] / G. Zhen, C. Wen, X. Jia, Y. Li, J.L. Crane, S.C. Mears, F.B. Askin, F.J. Frassica, W. Chang, J. Yao, J.A. Carrino, A. Cosgarea, D. Artemov, Q. Chen, Z. Zhao, X. Zhou, L. Riley, P. Sponseller, M. Wan, W.W. Lu, X. Cao // Nature Medicine. – 2013. – Vol. 19, № 6. – P. 704-712.

357. Zushi, S. Induction of bovine articular chondrocyte senescence with oxidized low-density lipoprotein through lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 [Text] / S. Zushi, M. Akagi, H. Kishimoto, T. Teramura, T. Sawamura, C. Hamanishi // Arthritis and Rheumatism. – 2009. – Vol. 60, № 10. – P. 3007-3016.