



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.13.3.020>



Богдан В.Г.¹✉, Доронькина А.С.², Жаворонок И.П.², Лепешко С.Г.², Маньковская С.В.², Янцевич А.В.³

¹ Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь

² Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

³ Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Антиноцицептивная эффективность использования комбинированной плазмидной конструкции VEGF165-ANG-1 у животных с экспериментальной ишемией задних конечностей

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Богдан В.Г. – концепция и дизайн исследования, участие в проведении исследования, анализе материалов и результатов, корректировка содержания статьи; Доронькина А.С., Жаворонок И.П., Лепешко С.Г., Маньковская С.В., Янцевич А.В. – участие в проведении исследования, сборе, анализе материалов и результатов, подготовке статьи.

Финансирование: работа выполнялась в рамках задания отдельного проекта фундаментальных и прикладных научных исследований «Изучение безопасности и ангиогенной активности генно-инженерных плазмидных конструкций в условиях моделирования ишемии нижних конечностей в экспериментах in vivo».

Этическое заявление: работа выполнялась в соответствии с этическими нормами, одобрена комитетом по биоэтике Института физиологии Национальной академии наук Беларуси (протокол № 1 от 24 января 2024 г.).

Подана: 22.07.2024

Принята: 03.09.2024

Контакты: bogdan-5@mail.ru

Резюме

Цель. Оценить антиноцицептивные эффекты применения отечественной комбинированной генно-инженерной плазмидной конструкции pIDNA_VEGF165/Ang-1 в условиях моделированной хронической ишемии конечности у экспериментальных животных.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования были проведены на 56 белых половозрелых крысах Wistar обоего пола (28 самок, 28 самцов) возрастом 8 месяцев. Моделирование хронической недостаточности артериального кровоснабжения конечности у лабораторного животного выполняли по разработанному способу. Животные первой группы не получали специального лекарственного лечения. Во второй группе в ишемизированную мышцу бедра осуществляли введение физиологического раствора. В третьей группе в пораженную мышцу однократно внутримышечно вводили раствор pIDNA_VEGF165/Ang-1 в дозе 100 мкг. У всех животных до операции, а также на 7-е, 14-е, 21-е, 28-е, 35-е, 42-е, 56-е и 70-е сутки после оперативного вмешательства оценивали показатели порога ноцицептивной реакции, изменения паттернов походки.

Результаты. Применение разработанной комбинированной плазмидной конструкции с генами фактора роста эндотелия сосудов (VEGF165) и ангиопоэтина-1 (ANG-1) в условиях моделированной хронической ишемии конечности у экспериментальных животных вне зависимости от пола сопровождается выраженным антиноцицептивным эффектом. При однократном локальном введении в ишемизированную

мышцу бедра раствора плазмидной ДНК pDNA_VEGF165/Ang-1 в дозе 100 мкг достоверное повышение значений показателей порога ноцицептивной реакции, площади и интенсивности отпечатка оперированной конечности животного отмечается на 14-е сутки после лечения, с восстановлением ее функционального состояния к 28-м суткам.

Заключение. Положительная динамика регресса симптомов хронической ишемии оперированной конечности после использования генно-инженерной векторной конструкции VEGF165/ANG-1 в эксперименте указывает на высокий потенциал разработки в качестве прототипа первого отечественного комбинированного генотерапевтического средства.

Ключевые слова: хроническая недостаточность артериального кровоснабжения конечности, эксперимент, крысы, ишемия, комбинированная плазмидная конструкция, ноцицептивная реакция

Bogdan V.¹✉, Doronkina A.², Zhavoronok I.², Lepeshko S.², Mankovskaya S.², Yantsevich A.³

¹ National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

² Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

³ Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Antinociceptive Effectiveness of Use of the Combined VEGF165-ANG-1 Plasmid Construction in Animals with Experimental Hind Limb Ischemia

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Bogdan V. – the concept and design of the study, participation in the research, analysis of materials and results, correction of the content of the article; Doronkina A., Zhavoronok I., Lepeshko S., Mankovskaya S., Yantsevich A. – participation in the research, collection, analysis of materials and results, preparation of the article.

Funding: the work was carried out within the framework of the task of a separate project of fundamental and applied scientific research "Studying the safety and angiogenic activity of genetically engineered plasmid structures in conditions of modeling lower limb ischemia in in vivo experiments".

Ethics statement: the work was carried out in accordance with ethical standards, approved by the Bioethics Committee of the Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Protocol No. 1 dated January 24, 2024).

Submitted: 22.07.2024

Accepted: 03.09.2024

Contacts: bogdan-5@mail.ru

Abstract

Purpose. To evaluate the antinociceptive effects of the use of the domestic combined genetically engineered plasmid construct pDNA_VEGF165/Ang-1 in conditions of simulated chronic limb ischemia in experimental animals.

Materials and methods. Experimental studies were conducted on 56 white mature Wistar rats of both sexes (28 females, 28 males) aged 8 months. Modeling of chronic insufficiency of arterial blood supply to a limb in a laboratory animal was performed according to the developed method. Animals of the first group did not receive any special drug treatment.



In the second group, saline solution was injected into the ischemic thigh muscle. In the third group, the pDNA_VEGF165/Ang-1 solution was injected intramuscularly into the affected muscle at a dose of 100 µg. In all animals before surgery, as well as on days 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56 and 70 after surgery, the nociceptive reaction threshold and changes in gait patterns were assessed.

Results. The use of the developed combined plasmid construct with the genes for vascular endothelial growth factor (VEGF165) and angiopoietin 1 (ANG-1) under conditions of simulated chronic limb ischemia in experimental animals, regardless of gender, is accompanied by a pronounced antinociceptive effect. With a single local injection of a solution of plasmid DNA pDNA_VEGF165/Ang-1 into the ischemic thigh muscle at a dose of 100 µg, a significant increase in the values of the threshold of the nociceptive reaction, the area and intensity of the imprint of the operated limb of the animal is noted on the 14th day after treatment, with the restoration of its functional state by 28 days.

Conclusion. The positive dynamics of regression of symptoms of chronic ischemia of the operated limb after using the genetically engineered vector construct VEGF165/ANG-1 in the experiment indicates a high potential for development as a prototype of the first domestic combined gene therapy agent.

Keywords: chronic insufficiency of arterial blood supply to the limb, experiment, rats, ischemia, combined plasmid construct, nociceptive reaction

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одним из методов лечения хронической ишемии нижних конечностей (ХИНК) является терапевтический ангиогенез, основанный на стимуляции роста новых сосудов в ишемизированных мышцах путем введения ангиогенных факторов роста, их генов или стволовых/прогениторных клеток [1–3].

При этом именно генная терапия считается наиболее перспективной стратегией лечения. На сегодняшний день в мире ведутся активные разработки в направлении создания генотерапевтических (ГТ) лекарственных средств. Первым в мире зарегистрированным в 2011 году невирусным ГТ-препаратом для лечения ХИНК является российский неоваскулген, который представляет собой высокоочищенную сверхскрученную форму плазмидной ДНК, кодирующей ген фактора роста эндотелия сосудов человека (VEGF165). Показание к использованию препарата: комплексная терапия для реваскуляризации при ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза (IIa–III степени по А.В. Покровскому – Фонтейну). В 2019 году в Японии был разрешен к применению для лечения критической ишемии нижних конечностей ГТ-препарат collatogene, который содержит плазмиду, кодирующую фактор роста гепатоцитов HGF [3, 4].

В нашей стране учеными Национальной академии наук Беларуси впервые создана отечественная генно-инженерная векторная конструкция pCDNATM3.1(–) VEGF165. Доказана ее способность индуцировать значимое повышение экспрессии гена VEGF165 в мезенхимальных мультипотентных стромальных клетках и эндотелиоцитах человека и увеличивать выработку клетками белка VEGF165. Впервые в эксперименте *in vivo* установлен положительный сочетанный (ангиогенный

и антиноцицептивный) эффект применения разработанной плазмидной ДНК конструкции в условиях моделированной ишемии мышц конечности [5, 6].

К новой стратегии развития генной терапии, обеспечивающей аддитивный терапевтический эффект при ХИНК, в настоящее время можно отнести моделирование ГТ-препаратов с несколькими генами как в составе одной комбинированной генно-инженерной конструкции, так и в виде совместного применения нескольких отдельных плазмид, представляющих собой кольцевые ДНК, в качестве векторных платформ для доставки проангиогенных генов. В случае терапевтического ангиогенеза примером может служить применение смеси плазмид, кодирующих VEGF165 и HGF, а также использование плазмид, несущих гены HGF и ангиопоэтина-1 (Ang-1) [4].

В доступной нам литературе не было найдено информации о разработке комбинированной генно-инженерной векторной конструкции с генами VEGF165 и ANG-1 и результатах оценки ее эффективности в экспериментальной модели хронической ишемии конечности.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить антиноцицептивные эффекты применения отечественной комбинированной генно-инженерной плазмидной конструкции pDNA_VEGF165/Ang-1 в условиях моделированной хронической ишемии конечности у экспериментальных животных.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования были проведены на 56 белых половозрелых крысах Wistar обоего пола (28 самок, 28 самцов) возрастом 8 месяцев, содержащихся в условиях вивария Института физиологии НАН Беларуси при температуре $22,0 \pm 1,0$ °C и 12/12 ч. цикле ночь/день со свободным доступом к воде и пище. Протокол исследования одобрен комитетом по биоэтике (протокол № 1 от 24.01.2024).

Комбинированная генотерапевтическая конструкция – плазида с экспрессионной кассетой человеческого фактора роста эндотелия сосудов (VEGF165) и ангиопоэтина-1 (ANG-1) – впервые разработана и синтезирована в ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси». Субстанция передана в ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» в виде стерильного раствора для инъекций.

Моделирование хронической недостаточности артериального кровоснабжения (ишемии) задней конечности у крыс выполняли по разработанному нами способу (заявка на патент № а20230305 от 01.12.2023) [7].

На 28-е сутки после моделирования патологии всех животных методом рандомизации распределили на три группы с одинаковым количеством самцов и самок. Критериями приемлемости рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболеваний и гомогенность групп по массе тела ($\pm 10\%$). Животные первой группы ($n=12$; группа «Ишемия») не получали специального лекарственного лечения. Во второй группе на 28-е сутки в ишемизированную мышцу бедра осуществляли однократное введение апиогенного физиологического раствора в объеме 200 мкл ($n=12$; группа «Ишемия + АФР»). В третьей группе в этот же временной срок в пораженную мышцу однократно внутримышечно вводили раствор pDNA_VEGF165/Ang-1 в дозе 100 мкг ($n=32$; группа «Ишемия + VEGF165/ANG-1»). Общий период наблюдения составил 70 суток.



Исследование функций ишемизированных задних конечностей у экспериментальных животных во всех группах выполняли путем измерения порога ноцицептивной реакции, паттернов походки (площади и интенсивности отпечатков конечности) до операции, а также на 7-е, 14-е, 21-е, 28-е, 35-е, 42-е, 56-е и 70-е сутки после оперативного вмешательства.

Оценку порога ноцицептивной реакции (ПНР) у экспериментальных животных проводили с помощью теста Рэндалла – Селитто [8]. Процедуру осуществляли поочередно на обеих задних конечностях для каждой особи с применением аппарата PanLab (Испания).

Изменения паттернов походки изучали, используя аппаратно-программный комплекс CatWalk XT версии 10.6 (Noldus, Голландия). Каждое животное тестировали до получения трех адекватных пробежек (вариация <75%, время пробежки <5 с). Площадь отпечатка оценивали в квадратных сантиметрах (см²), а интенсивность отпечатка – в абсолютных единицах измерения (абс. ед.).

Статистическую обработку полученных результатов исследования выполняли с помощью программ Statistica 10. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала (Me [Q25%; Q75%]). Анализ статистической значимости количественных признаков проводили с помощью непараметрических тестов: Уилкоксона – для зависимых и Манна – Уитни – для независимых выборок в парных сравнениях.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение порога ноцицептивной реакции

Моделирование ишемии задней конечности у крыс приводило к развитию механической гипералгезии на 7-е сутки после операции, что выражалось в снижении значений ПНР ипсилатеральной конечности на 26,5% ($p=0,0277$) у самок и на 28,2% ($p=0,0277$) у самцов по сравнению со значениями фона. К 28-м суткам отмечали окончание формирования модели ишемии задней конечности, в это время фиксировали снижение вышеупомянутого показателя у самок на 32,2% ($p=0,0277$) и у самцов на 34,7% ($p=0,0277$) относительно исходных значений. Дальнейший мониторинг показал незначительное повышение значений ПНР и уменьшение выраженности клинической картины для групп крыс «Ишемия» и «Ишемия + АФР» (рис. 1А, В).

У крыс обоего пола на 35-е сутки после операции / 7-е сутки после инъекции раствора плазмидной ДНК pDNA_VEGF165/Ang-1 в дозе 100 мкг/жив статистически значимых различий ПНР относительно значений на 28-е сутки после операции получено не было (рис. 1А, В).

На 42-е сутки после операции / 14-е сутки после инъекции раствора плазмидной ДНК pDNA_VEGF165/Ang-1 зарегистрировано статистически значимое увеличение значений ПНР ипсилатеральной конечности на 23,4% ($p=0,0431$) у самок и на 23,7% ($p=0,0431$) у самцов относительно 28-х суток, на 20,1% ($p=0,0043$) и 13,2% ($p=0,0172$) соответственно относительно группы «Ишемия» и на 29,6% ($p=0,0087$) и 28,3% ($p=0,0087$) относительно группы «Ишемия + АФР».

К 70-м суткам исследования отмечали статистически значимое увеличение ПНР на 34,0% ($p=0,0431$) у самок и на 40,2% ($p=0,0277$) у самцов относительно значений на 28-е сутки, однако восстановление до исходных значений не происходило, зафиксированы значения ниже данных до операции на 9,1% ($p=0,0277$) и 8,5% ($p=0,0277$) соответственно (рис. 1А, В).

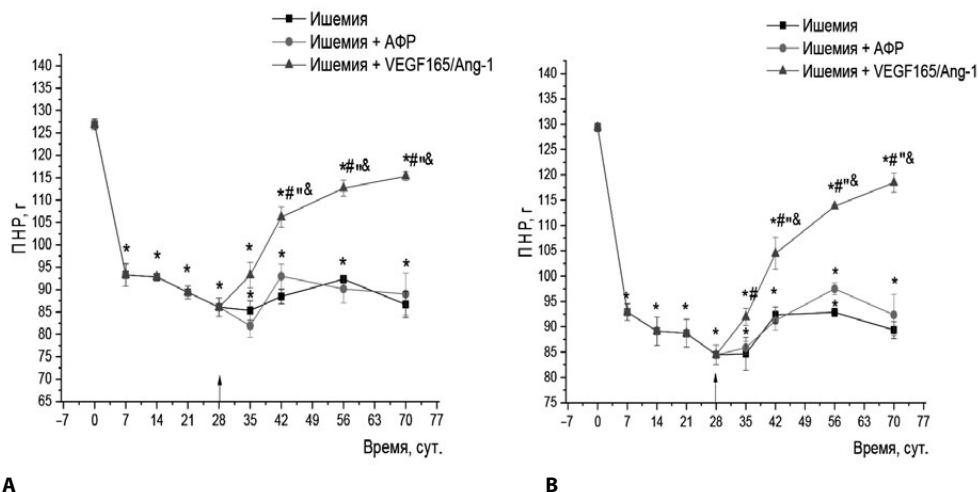


Рис. 1. Изменение порога ноцицептивной реакции (ПНР) оперированной конечности крыс (самки, А; самцы, В) на механический стимул, Me [25%; 75%]

Примечания: * $p < 0,05$ по сравнению со значениями до операции; * $p < 0,05$ по сравнению со значениями на 28-е сутки; " $p < 0,05$ по сравнению с группой «Ишемия»; & $p < 0,05$ по сравнению с группой «Ишемия + АФР».

Fig. 1. Changes in the threshold of nociceptive response (NPR) of the operated limb of rats (female, A; male, B) to a mechanical stimulus, Me [25%; 75%]

Notes: * $p < 0.05$ compared to the values before surgery; * $p < 0.05$ compared to the values on day 28; " $p < 0.05$ compared to the "Ischemia" group; & $p < 0.05$ compared to the "Ischemia + PSS" group.

Изменение паттернов походки. Площадь отпечатка

На 7-е сутки после операции регистрировали снижение значений площади отпечатка на 61,5% ($p = 0,0464$) у самок и на 56,5% ($p = 0,0277$) у самцов относительно фоновых значений (рис. 2А, В). В свою очередь, на 28-е сутки было отмечено повышение уровня гипералгезии, которая выражалась в снижении данного показателя на 67,2% ($p = 0,0277$) у самок и на 73,8% ($p = 0,0431$) у самцов.

У крыс на 35-е сутки после операции / 7-е сутки после введения раствора плазмидной ДНК pDNA_VEGF165/Ang-1 в дозе 100 мг/жив статистически значимых различий относительно 28-х суток после операции получено не было, что согласуется с данными ПНР.

На 42-е сутки после операции / 14-е сутки после введения раствора плазмидной ДНК pDNA_VEGF165/Ang-1 у крыс-самцов регистрировали достоверное увеличение площади отпечатка травмированной конечности на 50,0% ($p = 0,0431$) относительно данных на 28-е сутки (рис. 2В). В это же время у самок с ишемией ипсилатеральной конечности наблюдали повышение вышеупомянутого показателя травмированной конечности на 76,9% ($p = 0,0173$) относительно группы «Ишемия» и на 130,0% ($p = 0,0180$) в сравнении со значениями на 28-е сутки (рис. 2А).

На 56-е сутки эксперимента / 28-е сутки после введения раствора плазмидной ДНК pDNA_VEGF165/Ang-1 регистрировали увеличение значений площади отпечатка

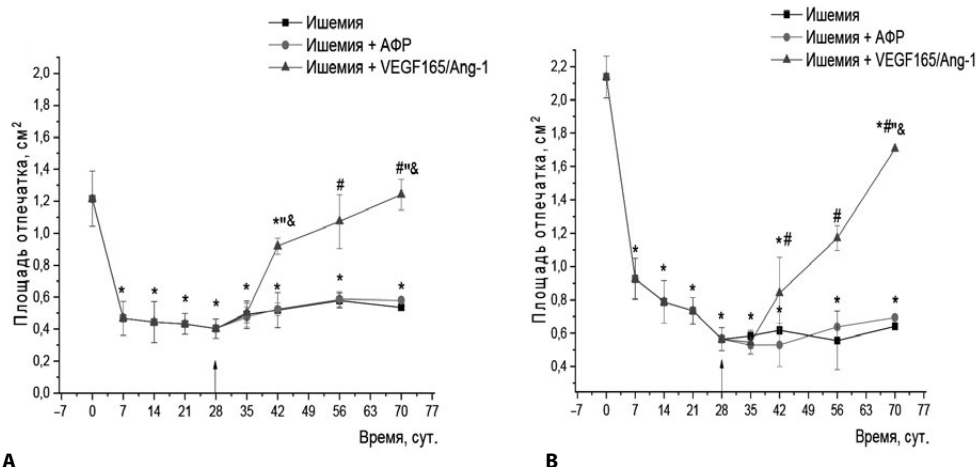


Рис. 2. Изменение площади отпечатка оперированной конечности крыс (самки, А; самцы, В), Ме [25%; 75%]

Примечания: * $p < 0,05$ по сравнению со значениями до операции; * $p < 0,05$ по сравнению со значениями на 28-е сутки; " $p < 0,05$ по сравнению с группой «Ишемия»; § $p < 0,05$ по сравнению с группой «Ишемия + АФР».

Fig. 2. Change in the footprint of the operated limb of rats (female, A; male, B), Me [25%; 75%]

Notes: * $p < 0.05$ compared to the values before surgery; * $p < 0.05$ compared to the values on day 28; " $p < 0.05$ compared to the "Ischemia" group; § $p < 0.05$ compared to the "Ischemia + PSS" group.

на 167,5% ($p=0,0431$) у самок и на 108,9% ($p=0,0431$) у самцов относительно 28-х суток (рис. 2А, В).

При анализе исследуемых показателей на 70-е сутки после операции регистрировали увеличение площади отпечатка ипсилатеральной конечности у самок на 210,0% ($p=0,0277$) и у самцов на 205,4% ($p=0,0431$) относительно значений на 28-е сутки, на 129,6% ($p=0,0043$) и 167,2% ($p=0,0433$) соответственно в сравнении с группой «Ишемия», на 113,8% ($p=0,0022$) и 147,8% ($p=0,0022$) соответственно в сравнении с группой «Ишемия + АФР». Отметим, что у самок после проведенного лечения площадь отпечатка травмированной конечности вернулась к исходным данным на 28-е сутки после введения генно-инженерной конструкции (рис. 2А).

Интенсивность отпечатка

На 7-е сутки после моделирования ишемии задней конечности регистрировали статистически значимое снижение интенсивности отпечатка ипсилатеральной конечности на 25,4% ($p=0,0277$) у самок и на 20,0% ($p=0,0277$) для самцов (рис. 3А, В).

При анализе исследуемых показателей на 28-е сутки отмечали снижение интенсивности ипсилатеральной конечности на 37,3% ($p=0,0464$) у самок и на 29,8% ($p=0,0431$) у самцов относительно полученных данных до моделирования патологии (рис. 3А, В).

На 35-е сутки после операции / 7-е сутки после введения раствора плазмидной ДНК pDNA_VEGF165/Ang-1 у крыс с ишемией правой задней конечности достоверных различий относительно 28-х суток после операции получено не было.

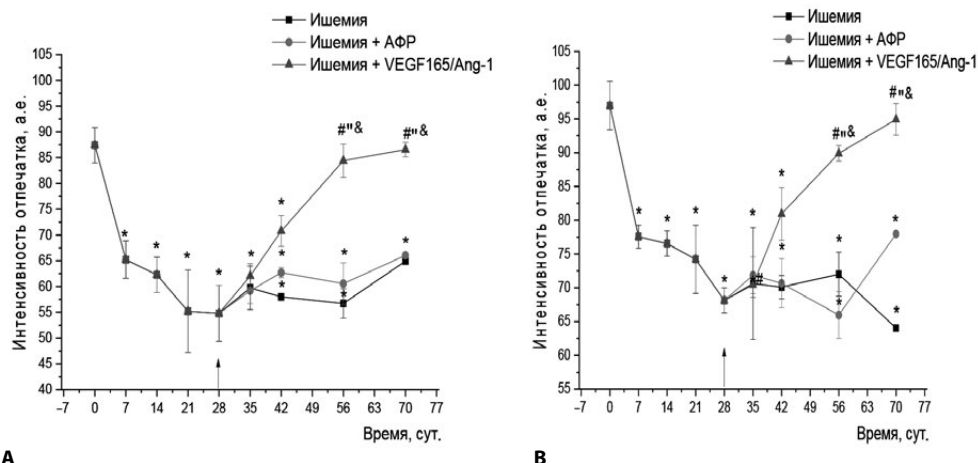


Рис. 3. Изменение интенсивности отпечатка оперированной конечности крыс (самки, А; самцы, В), Ме [25%; 75%]

Примечания: * $p < 0,05$ по сравнению со значениями до операции; # $p < 0,05$ по сравнению со значениями на 28-е сутки; & $p < 0,05$ по сравнению с группой «Ишемия»; * $p < 0,05$ по сравнению с группой «Ишемия + АФР».

Fig. 3. Change in the intensity of the imprint of the operated limb of rats (female, A; male, B), Me [25%; 75%]

Notes: * $p < 0.05$ compared to the values before surgery; # $p < 0.05$ compared to the values on the 28th day; & $p < 0.05$ compared to the "Ischemia" group; * $p < 0.05$ compared to the "Ischemia + PSS" group.

На 56-е сутки эксперимента / 28-е сутки после введения раствора исследуемой субстанции регистрировали увеличение значений интенсивности отпечатка на 54,0% ($p=0,0431$) у самок и на 32,0% ($p=0,0431$) у самцов относительно значений на 28-е сутки, а также в среднем на 48,8% ($p=0,0043$) и на 24,9% ($p=0,0043$) в сравнении со значениями контрольных групп животных (группы «Ишемия» и «Ишемия + АФР»; рис. 3А, В).

Важно констатировать, что процесс полного восстановления функции оперированной конечности (по критерию интенсивности отпечатка) как у самцов, так и у самок завершался (соответствовал показателям до операции) к исходу 28-х суток после введения комбинированной плазмидной конструкции pDNA_VEGF165/Ang-1.

К 70-м суткам после операции / на 42-е сутки после введения раствора плазмидной ДНК pDNA_VEGF165/Ang-1 отмечали статистически значимое увеличение значений вышеупомянутого показателя у самцов на 39,4% ($p=0,0431$), у самок на 57,9% ($p=0,0277$) относительно 28-х суток.

■ ВЫВОДЫ

1. Впервые установлено, что применение разработанной комбинированной плазмидной конструкции с генами фактора роста эндотелия сосудов (VEGF165) и ангиопоэтина-1 (ANG-1) в условиях моделированной хронической ишемии конечности у экспериментальных животных вне зависимости от пола сопровождается выраженным антиноцицептивным эффектом.



2. При однократном локальном введении в ишемизированную мышцу бедра раствора плазмидной ДНК pDNA_VEGF165/Ang-1 в дозе 100 мкг достоверное повышение значений показателей порога ноцицептивной реакции, площади и интенсивности отпечатка оперированной конечности животного отмечается на 14-е сутки после лечения.
3. Положительная динамика регресса симптомов хронической ишемии оперированной конечности с восстановлением ее функционального состояния к 28-м суткам после использования генно-инженерной векторной конструкции VEGF165/ANG-1 в эксперименте указывает на высокий потенциал разработки в качестве прототипа первого отечественного комбинированного генотерапевтического средства.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Liu Y., Musetti S., Huang L. Gene therapy with plasmid DNA. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. ed. D.J. Abraham., John Wiley & Sons, Inc. 2021:1–35.
2. Chervyakov Yu.V., Vlasenko O.N. Comparison of the effectiveness of gene therapy and standard conservative therapy for patients with chronic lower limb ischemia due to atherosclerosis. *Grekov's Bulletin of Surgery*. 2018;177(2):64–9. (in Russian)
3. Bogdan V.G., Lepeshko S.G. Stimulation of angiogenesis in the complex treatment of patients with chronic arterial insufficiency of the lower extremities. *Military medicine*. 2017;2:117–19. (in Russian)
4. Slobodkina E.A., Karagyaur M.N., Balabanyan V.Yu., Makarevich P.I. Gene therapy in regenerative medicine: latest achievements and actual directions of development. *Genes and Cells*. 2020;15(1):6–16. (in Russian)
5. Bogdan V.G., Doronkina A.S., Zhavoronok I.P., Fedorova E.V., Filippovich T.A., Lepeshko S.G., Mankovskaya S.V. Angiogenic and antinociceptive effects of the genotherapy construction pcDNA_VEGF165 in the conditions of chronic limb ischemia in an in vivo experiment. *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2024;68(2):138–47. (in Russian)
6. Bogdan V.G., Poleshko A.G., Misiukevich A.Yu., Smirnov A.A., Sukhaveyeva S.V., Yantsevich A.V. Biological potential of a genetic engineering construction encoding the gene for the human vascular endothelium growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*. 2024;21(2):95–103. (in Russian)
7. Bogdan V.G., Doronkina A.S., Zhavoronok I.P., Fedorova E.V., Filippovich T.A., Lepeshko S.G., Mankovskaya S.V. Pathogenetic model of chronic arterial insufficiency of blood supply to a limb in an experiment. *Surgery. Eastern Europe*. 2024;13(1):38–48. (in Russian)
8. Randall L.O., Selitto J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1957;111:409–19.