

Interacțiunea de tip sinergic dintre paracetamol (acetaminofen) și carbamazepină la șoarece

Synergistic interaction between acetaminophen and carbamazepine in mice

Lidia Cristina Chițac¹, S. Beșchea^{2*}, Monica Neamțu¹, Delia Bulea¹, Veronica Bild¹

¹Department of Pharmacodynamics and Clinical Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy, „Grigore T. Popa” Iași

²Department of Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, USAMV Iași

* Corresponding author

Cuvinte cheie: carbamazepină, synergism, cytokine, acetaminophen

Key words: carbamazepine, synergism, cytokine, acetaminophen

Rezumat

Studiul de față își propune investigarea tipului de interacțiune farmacodinamică și demonstrarea acțiunii antinociceptive a unei combinații binare în proporție fixă între un analgezic non-opioid (Acetaminofen) și un anticonvulsivant (carbamazepină) ca o modalitate rațională de tratament al durerii. Toate procedeele experimentale utilizate în realizarea acestui studiu au fost în strânsă concordanță cu reglementările bioetice internaționale referitoare la experiențele realizate pe animale de laborator. Pentru cuantificarea interacțiunii s-a utilizat metoda dreptei aditive compuse, care permite evaluarea cantitativă a interacțiunilor de tip farmacodinamic din combinațiile binare în proporție fixă. Interacțiunea între aceste substanțe este de tip sinergic (potențare), dovedită prin deplasarea la stânga a dreptei de regresie a asocierii față de dreapta aditivă compusă. Parametrii statistici ai analizei de regresie pun în evidență synergismul dintre cele două substanțe ($Z_{mix} = 39.276 \pm 7.54 \text{ mg/kg}$ ($Z_{mix} < Z_{add}$), indice de interacțiune $\gamma = 0,387$, $p < 0.05$, $t_c = 3.753$, $t_t = 3.511$, $F_c = 10.825$, $F_t = 4.260$). Synergismul dintre cele două substanțe se explică prin mecanismele de acțiune specifice fiecărei substanțe.

Abstract

This study aims to demonstrate the type of pharmacodynamic interaction and the demonstration of an antinociceptive action of fixed-ratio binary combinations between a non-opioid analgesic (acetaminophen) and an anticonvulsant (carbamazepine) as a rational way to treat pain. All experimental procedures used in this study were closely in line with international bioethical regulations on experiments conducted on laboratory animals. For quantifying the interaction, we used the method of the additive composite curve, which allows the quantitative assessment of the pharmacodynamic interactions of binary combinations in fixed proportion. The interaction between these substances is the synergistic (potentiation), as evidenced by the left shift of the regression curve of the combination compared to the composite additive curve. The statistical parameters of regression analysis reveal the synergism between the two substances ($Z_{mix} = 39.276 \pm 7.54 \text{ mg / kg}$ ($Z_{mix} < Z_{add}$) the interaction index $\gamma = 0.387$, $p < 0.05$, $t_c = 3.753$, $t_t = 3.511$, $F_c = 10.825$, $F_t = 4.260$). The synergism between the two substances is explained by the specific action mechanisms of each substance.

Introducere

Terapia analgezică modernă este dominată la ora actuală de cele două clase principale de medicamente analgezice și anume: analgezice opioide și analgezice neopioide (analgezice antipiretice și antiinflamatoare nesteroidiene AINS). În privința substanțelor analgezice-AINS, s-au

dezvoltat o multitudine de noi variante sintetice îmbunătățite, la fel ca și o serie de căi de administrare optimizate, dar inovațiile conceptuale nu au fost pe deplin satisfăcătoare. Aceasta se datorează, probabil, unui avans relativ lent al înțelegerii patogenezei durerii inflamatorii.

Pe de altă parte, un principiu formulat în cadrul farmacologiei asocierilor de

analgice, ca o modalitate rațională de ameliorare a tratamentului durerii, este acela că, asociind substanțe medicamentoase cu mecanisme de acțiune diferite, se poate obține o acoperire multimodală a unui spectru mai larg de tipuri de durere, creând, în acest mod, posibilitatea potențială ca interacțiunea care apare să fie mai mare decât aditivă, adică sinergică [14].

În studiile noastre a fost luat în considerație rolul citokinelor proinflamatoare în stările de durere patologică [22].

În această lucrare se tentează luarea în discuție a perspectivelor unor asocieri (combinații) între medicamente care să influențeze durerea din procesele inflamatorii.

1. Material si metoda

În cercetările din prezenta lucrare s-au utilizat șoareci masculi Swiss (Sursa Institutul Cantacuzino București) cu greutatea 20-25 g. Condițiile de habitat s-au realizat în incinta laboratorului de Farmacodinamie experimentală din cadrul disciplinei de Farmacodinamie și Farmacie clinică, UMF „Grigore T. Popa” Iași, într-o cameră cu temperatură și umiditate controlată ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), și un ciclu de lumină/întuneric, 12ore/12 ore (07.00AM / 07.00PM).

Animalele au fost cazate în cuști de plexiglas, prevăzute cu adăpător grupate câte 8-10 animale-cușcă. Acestea au primit apă și hrană standard (sursa Biobaza Baneasa). Testările au fost efectuate începând cu orele 10.00 AM. Cu 3 ore înainte de testări s-a sistat accesul la hrană și apă. Toate procedeele experimentale utilizate în realizarea acestui studiu au fost în strânsă concordanță cu normele specifice aprobate în UMF „Grigore T. Popa” și reglementările bioetice internaționale referitoare la experiențele realizate pe animale de laborator [23].

În acest studiu s-au utilizat următoarele substanțe:

- acetaminofen (Sigma),
- carbamazepină (Sigma),
- Zymosan A (Sigma),
- CMC-Na (Sigma),
- ser fiziologic (Zentiva).

Carbamazepina și acetaminofenul au fost administrate singure și în asociere pe cale orală în secvențe de doze în progresie geometrică. S-a utilizat un model de nocicepție cu stimul chimic cu specificitate pentru durerea inflamatoare. În acest studiu testul răspunsului constrictiv abdominal (metoda lui Siegmund și col. 1957, tehnica lui Koster și col. 1959) constă în administrarea intraperitoneală a unei suspensii de Zymosan A în doză de 40mg / Kgc. la șoarece [20]. Se înregistrează numărul de răspunsuri constrictive abdominale timp de 12 minute după administrarea agentului iritant [21].

Interpretarea datelor a fost de tip cantal caracterizată de prezența sau absența răspunsului calculându-se efectul maxim posibil:

$$\% \text{ (antinocicepție) inhibiție} = \frac{\text{nr. non-responderi}}{\text{nr total de animale}} \times 100 \text{ [19].}$$

Pentru cuantificarea interacțiunii s-a utilizat metoda dreptei aditive compuse care permite evaluarea cantitativă a interacțiunilor de tip farmacodinamic din combinațiile binare în proporție fixă [18, 19].

Metoda are la bază analiza dreptelor de regresie, dreapta de regrese a asocierii față de dreapta aditivă compusă pentru nivelul de activitate de 50%. Indexul de interacțiune indică tăria sinergismului. În analiza statistică pentru toate testele de semnificație statistică, s-a considerat că pentru valori $P < 0,05$ există o diferență semnificativă statistic între grupele comparate (ANOVA Test, *t* - test).

2. Rezultate si Discutii

S-au administrat pe cale orală doze succesive de paracetamol în progresie geometrică cuprinse între: $50.00-600.00 \text{ mgkg}^{-1}$.

Prin administrarea acestora s-a obținut un efect maxim posibil de 100% pentru doza de 600 mg/kg. Datele au permis determinarea valorii DE50 a paracetamolului. (Tabelul 1)

S-au administrat pe cale orală doze succesive de carbamazepină în progresie geometrică cuprinse între 7.5-60.00 mg/kg. Prin administrarea acestora s-a obținut un efect maxim posibil de 80% pentru doza de 60.00 mg/kg. Datele au permis determinarea valorii DE50 a carbamazepinei (Tabelul 1).

Tabel 1

Valoarea DE 50 a medicamentelor luate în studiu administrate singure

| Valoare | Acetaminophen (Paracetamol) | Carbamazepină (CBZ) |
|---|----------------------------------|--------------------------------|
| DE50 (SEM) ¹ mgkg ⁻¹ / p.o | 162.48 (26.24) | 41.14 (12.20) |
| | Y = -2.367 + 3.33*X R = 0.948 | Y = 0.59 + 2.72*X R = 0.976 |

¹SEM, Eroarea standard a mediei

Datele obținute în tabelul 1 au permis trasarea dreptei de regresie pentru dreapta aditivă compusă pentru stabilirea valorii Zadd. (Fig. 1).

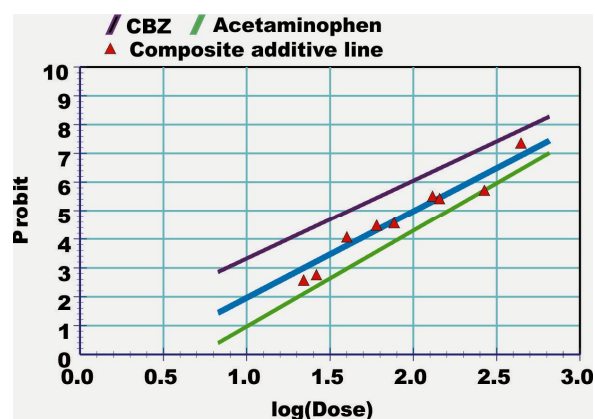


Fig. 1 Analiza dreptei aditive compuse a asocierii CBZ-Paracetamol

Din analiza dreptei de regresie (Fig. 1) și tabelul 1 se observă că s-a putut pune în evidență efectul antinociceptiv al carbamazepinei (DE50 = 41.14 ± 12.20 mgkg⁻¹) și a paracetamolului (162.48 ± 26.24 mgkg⁻¹) pe modelul de nocicepție studiat. După determinarea acestor valori s-a demonstrat o valoare Zadd = 101.59 ± 14.54 mgkg⁻¹ și proporțiile celor două substanțe (Tabelul 2). După administrarea combinației în proporție fixă, serii succesive de doze în progresie geometrică, am constatat următoarele:

Zmix = 39.276 ± 7.54 mg/kg (Zmix < Zadd), indice de interacțiune $\gamma = 0,387$, $p < 0.05$ (Tabelul 2). Interacțiunea între aceste substanțe este de tip sinergic (potențare). Aceasta este dovedită prin deplasarea la stânga a dreptei de regresie a asocierii față de dreapta aditivă compusă (Fig. 2).

Parametrii statistici ai analizei de regresie pun în evidență sinergismul dintre cele două substanțe ($t_c = 3.753$, $T_t = 3.511$, $F_c = 10.825$, $F_t = 4.260$).

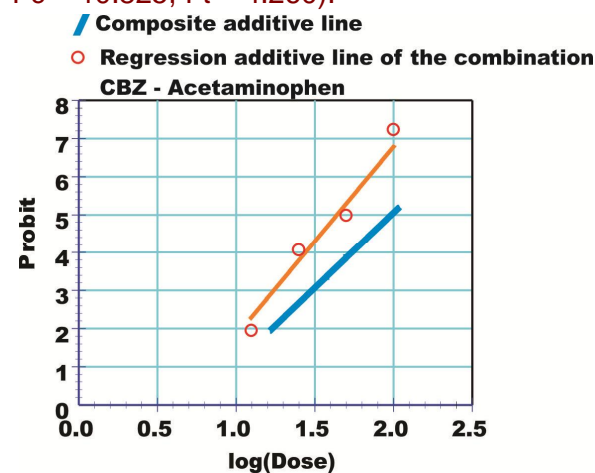


Fig. 2 Dreapta de regresie a asocierii paracetamol-CBZ față de dreapta aditivă compusă.

Table 2

Valoarea DE50 a medicamentelor luate în studiu administrate în asociere

| Substanța | Doza totală mg/kg/p.o | Efect maxim posibil (EMP) % | ED50 (SEM) | |
|---|--------------------------|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|
| | | | Zadd (SEM) | Zmix (SEM) |
| Acetaminophen / CBZ (0.798/0.202) | 12.20 | 16.66 | 101.59 (14.54) | 39.276 (7.54) ¹ |
| | 25.40 | 33.33 | Y = 3.02 + 0.57*X | Y = -3.17 + 4.97*X |
| | 50.80 | 66.66 | R = 0.959 | R = 0.953 |
| | 101.59 | 100.00 | | Interaction index=0.387 |

¹Combinație sinergică

Testul răspunsului constrictiv abdominal permite aprecierea analgeziei centrale și periferice. Testul poate utiliza o serie de agenți iritanți cum ar fi acetilcolină bromid, acid acetic, Zymosan A. Prin utilizarea agentului iritant Zymosan A modelul capătă o specificitate pentru patogeniza durerii inflamatoare [12, 21].

O serie de autori au arătat că prin administrarea intraperitoneală de Zymosan A, la șoarece, apare un răspuns inflamator, caracterizat prin răspuns constrictiv abdominal, extravazare de plasmă, infiltrare leucocitară și biosinteză de eicosanoide Doherty cit Pettipher, 1997 [12].

În ultimul timp s-a pus în evidență că agenții inflamatori nu stimulează direct eliberarea de mediatori primari hipernociceptivi, ci că eliberarea lor este precedată de o cascadă de citokine [5, 15]. S-a pus în evidență că, la șoarece, răspunsul constrictiv abdominal la zymosan și acid acetic este mediat prin TNF-alfa, IL1-beta și IL8, care acționează concomitent și sinergic [15].

Paracetamolul are efecte analgezice și antipiretice similare cu AINS.

Totuși, spre deosebire de acestea, paracetamolul administrat în doze terapeutice are activitate antiinflamatorie și antiplachetară foarte mică sau inexistentă și nici nu manifestă profilul efectelor secundare de tip AINS, precum leziuni ale tractului gastro-intestinal, bronhoconstricția indusă de acid acetic salicilic.

De aceea paracetamolul a înlocuit pe scară largă acidul acetilsalicilic și alți salicilați în tratamentul durerilor ușoare spre moderate, care nu sunt asociate cu procese inflamatorii, precum cefaleea, durerile dentare și dismenoreea [2].

Deși a fost sintetizat în urmă cu mulți ani și utilizat intens în tratamentul durerii, mecanismul său de acțiune rămâne încă necunoscut. Mecanismul cel mai probabil rămâne cel de inhibiție a ciclooxigenazei. Unele cercetări au testat eventuala

interferență între paracetamol și NOs (nitric-oxid-sintaza) atât constitutivă cât și inductibilă [2], alte cercetări sprijină ipoteza unei componente activatorii a căilor opioide descendente spinale [13].

Alte studii prezintă acțiunea sa asupra TRPA1 spinal, care sunt considerați printre declanșatorii cei mai importanți ai durerii la nivel spinal. Metaboliții acetaminofenului activează TRPA1 nativ și reduc curenții voltaj-dependenți de calciu și sodiu din neuronii aferenți primari, astfel inducând un efect analgezic [1].

Un alt mecanism analgezic al acetaminofenului este realizat prin inhibarea captării de anandamidă și alți endocanabinoizi din spatiul extracelular. Aceste date par a sugera că și modularea sistemului endocanabinoizilor ar putea să fie un mecanism suplimentar care să medieze efectele antinociceptive sinergice ale combinațiilor acetaminofenului [10].

Carbamazepina este un medicament cu acțiune anticonvulsivantă, util în diferite forme de epilepsie, dar care în ultima vreme este util în clinică în anumite tipuri de durere, cum ar fi nevralgia de trigemen [16].

Medicamentul își explică acțiunea prin blocarea canalelor de Na. Se cunosc mai multe subtipuri notate cu Na_v 1.1 până la 1.9. Na_v1.7, 1.8 și 1.9 sunt exprimați numai la nivelul neuronilor senzoriali periferici și se consideră că sunt implicați atât în inițierea durerii acute cât și în menținerea hiperalgeziei inflamatorii postelzionale. Canalele Na_v 1.4, 1.6, 1.7, sunt sensibile la tetrodotoxină (TTX), în vreme ce Na_v 1.5, 1.8, 1.9, sunt rezistenți la aceasta [7-9].

Subtipul Na_v 1.7 este exprimat în mod semnificativ în neuronii din ganglionul rădăcinii posterioare (GRP) în neuronii simpatici și mienterici, în vreme ce Na_v 1.8 sunt este exprimat preferențial în GRP și în ganglionul Gasser.

Este bine documentată implicația sa în durerea inflamatorie și în durerea indusă de stimul rece [4]. Este cunoscut faptul că

subtipul $Na_v1.7$ este sensibil la carbamazepina și de asemenea că mutațiile sale produc o serie de sindroame dureroase ereditare [11].

$Na_v1.9$ este exprimat în neuronii senzoriali și în sistemul nervos enteric, mai ales în neuroni de dimensiuni mici cu proprietăți nociceptive.

În lumina acestor cunoștințe $Nav1.7$, 18 , și 19 ar putea fi ținte importante pentru analgezice [7].

Concluzii

Sinergismul obținut în cercetările din prezenta lucrare se poate explica prin mecanismele de acțiune specifice fiecărei substanțe.

De obicei efecte sinergice se obțin când se combină două medicamente ce prezintă cel puțin un mecanism de acțiune diferit.

În cazul carbamazepinei și acetaminofenului, există mai multe mecanisme în lucru, care ar putea concura pentru obținerea unui astfel de efect evident:

- Carbamazepina blochează canalele ionice implicate în generarea și transportul senzațiilor nociceptive la nivelul nervului spinal și al măduvei spinării ;
- Acetaminofenul ar putea inhiba generarea locală de mediatori inflamatori prin presupusa sa inhibiție a COX;
- Poate inhiba generarea de potențiale de Na/Ca la nivelul neuronilor nociceptivi senzoriali primari prin activarea TRPV; poate modula căile spinale endocanabinoide, astfel reducând transmisia durerii la nivel spinal.

În orice caz acetaminofenul (paracetamolul) pare a rămâne un analgezic puternic și ar putea să se bucure de o nouă perioadă de glorie ca membru în diverse combinații medicamentoase cu proprietăți

analgezice mai puternice și utilizabile în mai multe tipuri de durere.

Bibliografie

1. **Andersson DA, Gentry C, Alenmyr L, Killander D, Lewis SE, Andersson A, Bucher B, Galzi JL, Sterner O, Bevan S, Hogestatt ED, Zygmunt PM** (2011). TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Nat Commun*, 2, 551.
2. **Bujalska M** (2004a). Effect of nitric oxide synthase inhibition on antinociceptive action of different doses of acetaminophen. *Pol J Pharmacol*, 56(5), 605-610.
3. **Bujalska M** (2004b). Effect of nonselective and selective opioid receptors antagonists on antinociceptive action of acetaminophen [part III]. *Pol J Pharmacol*, 56(5), 539-545.
4. **Cummins TR, Rush AM** (2007). Voltage-gated sodium channel blockers for the treatment of neuropathic pain. *Expert Rev Neurother*, 7(11), 1597-612.
5. **Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Veiga FH, Ferreira SH** (1999). Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. *Br J Pharmacol*, 126(1), 45-50.
6. **Cunha TM, Verri WA, Jr, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH** (2005). A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(5), 1755-1760.
7. **Dib-Hajj S, Black JA, Cummins TR, Waxman SG** (2002). $NaN/Nav1.9$: a sodium channel with unique properties. *Trends Neurosci*, 25(5), 253-259.
8. **Dib-Hajj SD, Binshtok AM, Cummins TR, Jarvis MF, Samad T, Zimmermann K** (2009a). Voltage-gated sodium channels in pain states: role in pathophysiology and targets for treatment. *Brain Res Rev*, 60(1), 65-83.
9. **Dib-Hajj SD, Black JA, Waxman SG** (2009b). Voltage-gated sodium channels: therapeutic targets for pain. *Pain Med*, 10(7), 1260-1269.
10. **Hama AT, Sagen J** (2010). Cannabinoid receptor-mediated antinociception with acetaminophen drug combinations in rats

- with neuropathic spinal cord injury pain. *Neuropharmacology*, 58(4-5), 758-766.
11. **Lee KP, Jun JY, Chang IY, Suh SH, So I, Kim KW** (2005). - TRPC4 is an essential component of the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in mouse visceral smooth muscle cells. *Mol Cells*, 20(3), 435-441.
 12. **Pettipher ER, Hibbs TA, Smith MA, Griffiths RJ** (1997). Analgesic activity of 2-amino-4-methylpyridine, a novel NO synthase inhibitor. *Inflamm Res*, 46 Suppl, 2, S135-136.
 13. **Raffa, R.B.** 2001. Pharmacology of oral combination analgesics: rational therapy for pain. *J Clin Pharm Ther*, 26(4), 257-264.
 14. **Raffa RB, Walker EA, Sterious SN** (2004). Opioid receptors and acetaminophen (paracetamol). *Eur J Pharmacol*, 503(1-3), 209-210.
 15. **Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ** (2000). Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol*, 387(1), 111-118.
 16. **Siniscalchi A, Gallelli L, Avenoso T, Squillace A, De Sarro G** (2011). Effects of carbamazepine / oxycodone coadministration in the treatment of trigeminal neuralgia. *Ann Pharmacother*, 45(6), e33.
 17. **Tallarida RJ** (2001). Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther*, 298(3), 865-872.
 18. **Tallarida RJ** (2002). The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain*, 98(1-2), 163-8.
 19. **Tallarida RJ, Cowan A, Raffa RB** (2003). - Antinociceptive synergy, additivity, and subadditivity with combinations of oral glucosamine plus nonopioid analgesics in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 307(2), 699-704.
 20. **Turner RA, Hebborn P** (1965). *Screening methods in pharmacology*. Academic Press, New York, USA.
 21. **Vale ML, Marques JB, Moreira CA, Rocha FA, Ferreira SH, Poole S, Cunha FQ, Ribeiro RA** (2003). Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(1), 102-108.
 22. **Watkins LR, Maier SF, Goehler LE** (1995). Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain*, 63(3), 289-302.
 23. **Zimmermann M** (1986). -Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol Scand*, 128(Suppl. 554), 221-33.