

Evaluarea potențialului antinociceptiv a valproatului de sodiu la șoarece

Evaluation of the antinociceptive potential of sodium valproate 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: acid valproic, efect antinociceptiv, edem inflamator, răspuns constrictiv abdominal

Key words: valproic acid, antinociceptive effect, inflammatory edema, abdominal constrictive response

Rezumat

Cercetările din ultimii ani în domeniul algeziologiei au demonstrat existența mai multor tipuri de durere cu mediație complexă ceea ce a atras utilizarea unor compuși din alte clase decât analgezicele clasice pentru tratamentul durerii. Scopul acestei lucrări este de a demonstra acțiunea antinociceptivă a valproatului de sodiu. În prezenta lucrare se utilizează trei modele de nocicepție care utilizează stimul chimic, termic și presiune și un model de inflamație acută indusă prin carrageenan. S-a lucrat pe șoareci albi masculi, Swiss cu greutate cuprinse între 20-30 g. Administrarea valproatului s-a efectuat pe cale orală prin administrarea unor secvențe de doze în progresie geometrică. În urma analizei statistice s-au obținut valori DE₅₀ ale valproatului de sodiu pentru fiecare model de nocicepție după cum urmează: DE₅₀ = 21.773 ± 6.786 mg/kg pentru modelul de nocicepție cu Zymosan A, DE₅₀ = 11.807 ± 4.035 mg/kg, pentru testul Hot plate, DE₅₀ = 19.247 ± 2.207 mg/kg pentru testul Randall-Sellitto. Acțiunea valproatului se explică prin inhibarea citokinelor proinflamatoare de tip TNF-alfa, IL1, beta, IL6 și a mediatorilor de tip PGE2. Experimentele s-au efectuat în accord cu legislația în vigoare în ceea ce privește lucrul cu animalele de laborator.

Abstract

Recent research in the field of algesiology demonstrated the existence of several types of pain, with complex mediation cascades. This fact prompted the use of compounds from other drug families than classical analgesics for the treatment of pain. The purpose of this paper is to demonstrate the antinociceptive action of sodium valproate in mice. This investigation relies on three nociception models that use chemical, thermal, mechanical (pressure) stimuli, and a model of acute inflammation induced by carrageenan. The investigations were made using male white Swiss mice, weighing 20-30 grams. Valproate administration has been made orally, using geometric progression dose sequences. According to the statistical analysis, we obtained values of ED₅₀ for sodium valproate for each nociception model as follows: ED₅₀ = 21.773 ± 6.786 mg/kg for the nociception model with Zymosan A, ED₅₀ = 11.807 ± 4.035 mg/kg, for the hot plate test, ED₅₀ = 19.247 ± 2.207 mg/kg for the Randall-Sellitto test. The action of the valproate is explained by the inhibition of pro-inflammatory cytokines like TNF-α, IL1β, IL6 and prostaglandin mediators like PGE2. The experiments were made according to the European and Romanian legislation that concerns working with lab animals.

Introducere

În ultimii ani durerea a fost privită nu doar ca simptom ci ca o boală în sine. Cercetările în domeniul algeziologiei s-au extins și au adus în discuție existența mai

multor tipuri de durere cu mediație complexă.

Având în vedere neuromediatorii implicați, cercetătorii au căutat noi posibilități terapeutice în tratamentul durerii.

Medicamente din alte clase decât analgezicele opioide și nonopioide sau

antiinflamatoare nesteroidiene (AINS) și-au dovedit acțiunea analgezică singure (antidepresive triciclice, anticonvulsivante) sau în asociere cu alte substanțe.

O serie de anticonvulsivante cum ar fi carbamazepina sau acidul valproic sunt utile în nevralgia de trigemen sau durerea neuropată [14].

În lucrarea de față se tentează demonstrarea acțiunii antinociceptive a valproatului de sodiu, la șoarece, printr-o serie de modele de nocicepție care implică diferite mediații.

1. Material si Metoda

Studiul s-a realizat de șoareci masculi Swiss (Sursa Institutul Cantacuzino București) cu greutatea 20-30 g. Animalele au fost plasate în cuști de plexiglas, prevăzute cu adăpător.

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°C ± 2°C), și un ciclu de lumină / întuneric, 12ore / 12 ore (07.00 AM / 07.00 PM).

Animalele au primit *ad libitum* apă și hrană standard (Biobaza Baneasa).

Testările au fost efectuate în începând cu orele 10.00 AM iar cu 3 ore înainte de testari 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 [18].

În aceste studii pentru demonstrarea acțiunii antinociceptive s-a utilizat:

- valproatul de sodiu (Sigma),
- Zymosan A (Sigma),
- Carrageenan lambda (Sigma),
- CMC-Na (Sigma), si
- ser fiziologic (Zentiva).

Cercetările nociceptive au avut la bază stimul chimic, termic, mecanic după cum urmează: **Testul răspunsului constrictiv abdominal** (metoda lui Siegmund și col. 1957, tehnica lui Koster și col. 1959) indus prin Zymosan A, constă în administrarea intraperitoneală a unei suspensii de Zymosan A în doză de 40mgkg⁻¹.

Se înregistrează numărul de răspunsuri constrictive abdominale timp de 12 minute după administrarea agentului iritant [13].

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

$$\% \text{ (antinocicepție) inhibiție} = (\text{nr. non-responderi} / \text{nr total de animale}) \times 100 \text{ [11].}$$

Testul Hot plate (metoda lui Woolfe și Mac Donald (1944) modificată de Eddy și Laborit (1953), are la bază aplicarea stimulului termic (52.5°C), timp de 30 secunde (*cut off*) pe fata plantară a șoarecelui [4].

Se utilizează aparatul Hot plate 7280 Ugo Basile prevăzut cu sistem de menținere a temperaturii constante și măsurării timpului de expunere la stimulul termic. Interpretarea datelor a fost de tip gradat [11].

S-a apreciat efectul antinociceptiv prin formula:

$$\% \text{ (antinocicepție) inhibiție} = (T_x - T_0) / (T_m + T_0) \times 100$$

Unde: T₀ – latența răspunsului măsurată înainte de administrarea substanței de studiat, T_x – latența la diferite intervale de timp consecutive administrării substanței, T_m – timpul maxim permis (*cut-off time*).

Testul Randall - Selitto permite evaluarea durerii în condiții inflamatorii și constă în aplicarea unui stimul mecanic pe laba inflamată a animalului (*cut-off* 250g) edemul obținându-se prin injectarea subcutanată în regiunea plantară a unei suspensii saline 3% de carrageenan lambda la șoarece [4].

Se utilizează analgezimetrul Ugo Bazile 37215. Interpretarea datelor a fost de tip

gradat. Efectul antinociceptiv s-a apreciat prin formula:

$$\% \text{ (antinocicepție) inhibiție} = \frac{(g_x + g_0)}{(g_x - g_0)} \times 100$$

Unde: g_0 – latența răspunsului măsurată înainte de administrarea substanței de studiat, g_x – latența la diferite intervale de timp consecutive administrării substanței, g_m – greutatea maximă permisă (cut-off).

Evaluarea edemului inflamator a labei la șoarece se realizează prin măsurarea volumului labei inflamate obținut prin administrarea subcutanată în regiunea plantară unei suspensii saline de 3% carrageenan lambda la șoarece [5, 13]. Se utilizează pletismometrul 7200 Ugo Basile.

Gradul de inhibiție a edemului inflamator s-a calculat după formula:

$$\% \text{ inhibiție} = \frac{(M-T)}{M} \times 100$$

Unde: M- valoarea gradului de inhibiție a lotului martor, T- valoarea gradului de inhibiție a lotului tratat

Analiza statistică a datelor.

Pentru a studia relațiile între doză și efect, protocolul de lucru impune trasarea

dreptelor de regresie și analiza lor pentru ambele tipuri de efecte iar pentru măsurarea relației dintre cele două variabile (doza-efect) se utilizează coeficientul de corelație Perason „R”.

Pentru evaluarea potențialului antinociceptiv, de va calcula valoarea dozei eficace 50 (DE50) din efectul maxim posibil măsurat.

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).

Rezultate si discutii

Prin administrarea pe cale orală, de doze succesive cuprinse între 5.00 - 40.00 mg/kg⁻¹, în progresie geometrică, a unei suspensii de valproat de sodiu in CMC-Na 0,1% s-a obținut pentru testul răspunsului constrictiv abdominal un efect maxim posibil antinociceptiv de 80.00%. (Tabelul 1).

Tabelul 1

Evaluarea potențialului antinociceptiv al valproatului de sodiu

Model de nocicepție	Valproat de sodiu mg/kg p.o	EMP (%)	Parametri statistici
Testul răspunsului constrictiv abdominal	40.00	80.00	ED50 = 21.773 +/- 6.786 Eqn: $Y = 1.943 + 2.285 \cdot X$, R: 0.921 True Confidence Limits (11,338,115.64) log(1.055,2,063)
	20.00	50.32	
	10.00	33.33	
	5.00	0.00	
Testul Hot plate	20.0	81.32	ED50 = 11.807 +/- 4.035 Eqn: $Y = -29.880 + 74.504 \cdot X$, R: 0.887 True Confidence Limits (11.685,2.169) log(1.068,0.336) ANOVA d.f.(1,2) F(calc): 17.379, F(tab): 18.51
	10.00	26.32	
	5.00	16.00	
	2.50	10.13	
Testul Randall Sellitto	40.00	65.4	ED50 = 19.247 +/- 2.207 Eqn: $Y = -30.126 + 62.386 \cdot X$ R: 0.982 True Confidence Limits (12.044, 42.916) log(1.081,1.633) ANOVA d.f.(1,2) F(calc): 52.776, F(tab): 18.51
	20.00	56.4	
	10.00	34.8	
	5.00	10.23	
Edemul inflamator al labei	40.00	48.95	ED50 = 45.753 +/- 6.964 Eqn: $Y = -4.579 + 32.870 \cdot X$, R: 0.989 True Confidence Limits (20.097,10.854) log(1.303,1.036) F(calc): 43.285, F(tab): 161.4
	20.00	36.45	
	10.00	29.16	

Datele obținute în tabelul 1 au permis trasarea dreptei de regresie pentru determinarea valorii DE 50 a valproatului de

sodiu pentru modelele de nocicepție studiate (Figurile 1 - 4). Din analiza dreptei de regresie (Fig 1) și tabelul 1 se observă că s-

a putut pune în evidență efectul antinociceptiv al valproatului de sodiu ($DE_{50} = 21.773 \pm 6.786$) în modelul de nociceptie cu Zymosan A.

Testul răspunsului constrictiv abdominal permite aprecierea analgeziei centrale și periferice.

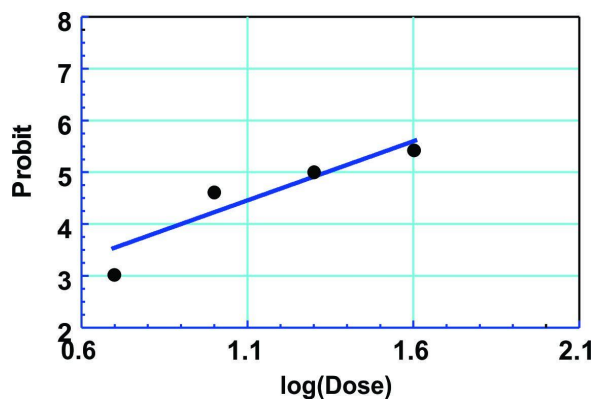


Fig. 1 Dreapta de regresie pentru stabilirea DE_{50} a valproatului de sodiu pentru testul răspunsului constrictiv abdominal

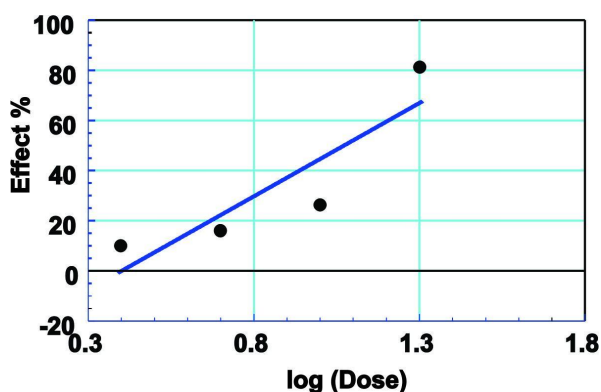


Fig. 2 Dreapta de regresie pentru stabilirea DE_{50} a valproatului de sodiu pentru testul Hot plate

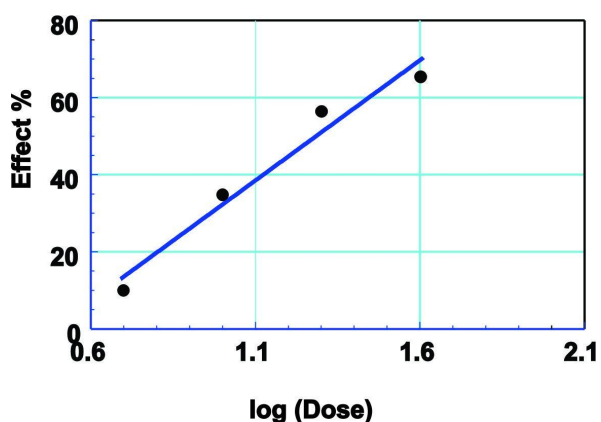


Fig. 3 Dreapta de regresie pentru stabilirea DE_{50} a valproatului de sodiu pentru testul Randall Selitto

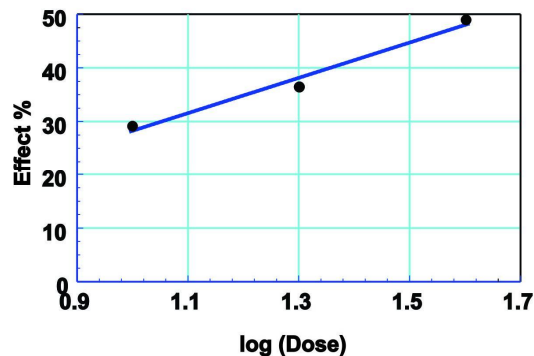


Fig. 4 Dreapta de regresie pentru stabilirea DE_{50} a valproatului de sodiu pentru evaluarea gradului de inhibiție a edemului inflamator.

Unii 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) [7].

Spre deosebire de răspunsul constrictiv abdominal produs prin administrarea intraperitoneală de acid acetic, administrarea de zymosan nu produce necroză celulară, în consecință poate fi mult mai relevant pentru patogeniza durerii inflamatoare [7, 14].

În ultimul timp s-a pus în evidență că agenții inflamatori nu stimulează direct eliberarea de mediatori primari hipemociceptivi, ci că eliberarea lor este precedată de o cascadă de citokine [8].

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 (Ribiero cit Cunha, 2005) [1].

Mecanismul de acțiune al acidului valproic constă în inhibarea GABA-transaminazei, enzimă responsabilă de degradarea GABA și creșterea activității acid glutamic decarboxilazei, acționând indirect pe GABA [16].

Literatura de specialitate aduce în evidență și alte mecanisme de acțiune posibile care ar putea contribui la efectul antinociceptiv (atenuarea mediației excitatorii prin NMDA, blocarea canalelor de Na, Calciu

voltaj dependente (tip L, C, D, N, F, T) și canalelor de potasiu voltaj dependente) [3, 9, 15].

Alte studii demonstrează că acidul valproic reduce numărul de leucocite, și eliberarea de mieloperoxidaza în exudatul peritoneal în modelul de peritonită cu carrageenan care produce un răspuns inflamator cu infiltrat de neutrofile implică exudare de plasmă migrare celulară și eliberare de mediatori de tipul NO, PGE2, IL-1 beta, IL-6, TNF-alfa [10, 16].

Din analiza dreptei de regresie (Fig 3) și tabelul 1 se observă că s-a putut pune în evidență efectul antinociceptiv al valproatului de sodiu ($DE50 = 19.247 \pm 2.207$) pentru modelul de nocicepție inflamatorie indus prin carrageenan. Studii recente demonstrează efectul antinociceptiv și antiinflamator al valproatului de sodiu asupra edemului labei indus prin carrageenan [16].

Nu s-a putut determina o valoare DE50 pentru inhibiția edemului inflamator pentru secvența de doze luată în studiu (Tabelul 1).

Valoarea $DE50 = 11.807 \pm 4.035$ mg/kgc⁻¹ (Tabelul 1, Fig. 2) obținută pentru testul Hot plate se poate explica prin intervenția acidului valproic asupra canalelor de sodiu din neuronii ganglionului rădăcinii posterioare (GRP) a nervului spinal, incluzând inhibiția indirectă a canalelor de sodiu lente și a canalelor de rectificare depolarizantă a membranei [12], precum și a curenților de calciu [2].

Astfel se poate presupune o inhibiție spino-corticală directă, datorată efectului inhibitor asupra descărcărilor de înaltă frecvență de potențiale de acțiune care sunt implicate direct în percepția durerii [6]. Până la ora actuală rezultatele obținute de noi sunt primele care prezintă un astfel de efect al acidului valproic pe un model de durere termică acută de tipul Hot plate.

Concluzii

Având în vedere mediația comună pentru cele două modele de nocicepție

edemul inflamator al labei indus prin carrageenan și răspunsul constrictiv abdominal indus prin Zymsan A, valorile DE50 apropiate și parametri statistici rezultați sugerăm că inhibiția nocicepției în durerea inflamatorie produsă de valproatul de sodiu ar putea fi explicată prin inhibarea citokinelor proinflamatoare de tip TNFalfa, IL1 beta, IL6 și a mediatorilor de tip PGE2.

De asemenea am demonstrat un efect antinociceptiv direct al valproatului de sodiu pe modelul de nocicepție termică acută.

Bibliografie

1. **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 USA*, 102(5), 1755-1760.
2. **De Sarro G, Ascoti C, di Paola ED, Vidal MJ, De Sarro A** (1992). Effects of antiepileptic drugs, calcium channel blockers and other compounds on seizures induced by activation of voltage-dependent L calcium channel in DBA/2 mice. *Gen Pharmacol*, 23(6), 1205-1216.
3. **Diederich K, Koch M** (2005). Role of the pedunculopontine tegmental nucleus in sensorimotor gating and reward-related behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, 179(2), 402-408.
4. **Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW** (2001). Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*, 53(4), 597-652.
5. **Levy L** (1969). Carrageenan paw edema in the mouse. *Life Sci*, 8(11), 601-606.
6. **McLean MJ, Macdonald RL** (1986). Sodium valproate, but not ethosuximide, produces use- and voltage-dependent limitation of high frequency repetitive firing of action potentials of mouse central neurons in cell culture. *J Pharmacol Exp Ther*, 237(3), 1001-1011.
7. **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.
8. **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.
9. **Rosenberg G** (2007). The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees? *Cell Mol Life Sci*, 64(16), 2090-2103.
10. **Salvemini D, Wang ZQ, Bourdon DM, Stern MK, Currie MG, Manning PT** (1996). Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. *Eur J Pharmacol*, 303(3), 217-220.
11. **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.
12. **Tian LM, Alkadhi KA** (1994). Valproic acid inhibits the depolarizing rectification in neurons of rat amygdala. *Neuropharmacology*, 33(10), 1131-1138.
13. **Turner RA, Hebborn P** (1965). *Screening methods in pharmacology*. Academic Press, New York, USA.
14. **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.
15. **Willmore LJ** (2003). Divalproex and epilepsy. *Psychopharmacol Bull*, 37 Suppl. 2, 43-53.
16. **Ximenes JC, de Oliveira Goncalves D, Siqueira RM, Neves KR, Santos Cerqueira G, Correia AO, Felix FH, Leal LK, de Castro Brito GA, da Graca Naffah-Mazzacorati M, Viana GS** (2013). Valproic acid: an anticonvulsant drug with potent antinociceptive and anti-inflammatory properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 386(7), 575-587.
17. **Zakrzewska JM, Linskey ME** (2014). Trigeminal neuralgia. *BMJ*, 348, g474.
18. **Zimmermann M** (1986). Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol Scand Suppl*, 554, 221-233.