

## Interacțiunea de tip sinergic dintre trimetazidină și ketoprofen la șoarece

### Synergistic interaction between trimetazidine and ketoprofen in mice

Daniela Carmen Ababei<sup>1</sup>, S. Beșchea<sup>2\*</sup>, Monica Neamțu<sup>3</sup>, A. Vasincu<sup>3</sup>, Oana Arcan<sup>3</sup>,  
Veronica Bild<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, University of Medicine and Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy „Grigore. T. Popa” Iași

<sup>2</sup>Department of Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, USAMV Iași

<sup>3</sup>Department of Pharmacodynamics and Clinical Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy, „Grigore. T. Popa” Iași

**Corespondență:** [sorin.beschea@yahoo.com](mailto:sorin.beschea@yahoo.com)

**Cuvinte cheie:** *efect antinociceptiv, ketoprofen, răspuns constrictiv abdominal, trimetazidina*

**Key words:** *antinociceptive effect, ketoprofen, abdominal constrictive response, trimetazidine*

#### Rezumat

Studiile recente au pus în evidență acțiunea antinociceptivă, antiinflamatoare și efecte de protecție gastrică a trimetazidinei (TMD) pe diferite modele, în condiții experimentale la șobolan. Studiul de față își propune demonstrarea acțiunii antinociceptive a trimetazidinei la șoarece, evaluată în condiții de durere inflamatorie și determinarea tipului de interacțiune farmacodinamică între trimetazidină și ketoprofen (KETO), antiinflamator nesteroidian utilizat în durerea postoperatorie sau alte situații care implică durere și inflamație. În această lucrare se utilizează ca model experimental de nocicepție, testul răspunsului constrictiv abdominal indus cu Zymosan la șoarece iar pentru studiul interacțiunii se utilizează ca metodă de evaluare cantitativă, metoda combinațiilor binare în proporție fixă. Datele experimentale au permis demonstrarea valorii DE<sub>50</sub> a ketoprofenului (DE<sub>50</sub> = 0,606 ± 0,108 mg/kg) și demonstrarea sinergismului pentru substanțele asociate. (Z<sub>add</sub> = 1,818 ± 0,326mg/kg, Z<sub>mix</sub> = 0,458 ± 0,101 mg/kg, γ = 0,251, T<sub>c</sub> = 4,928, T<sub>t</sub> = 3,84, P < 0,05). Rezultatele obținute demonstrează că se pot utiliza în asociere, doze mai mici din fiecare substanță pentru același nivel de activitate (50%) comparativ cu dozele administrate pentru substanțele ca atare ceea ce ar putea contribui și la o reducere a numărului de reacții adverse. Pe de altă parte, demonstrarea sinergismului poate contribui la elucidarea mecanismelor de acțiune în unele cazuri. Experimentele din prezentul studiu s-au efectuat în acord cu legislația în vigoare în ceea ce privește lucrul cu animalele de laborator.

#### Abstract

Recent studies have demonstrated the antinociceptive, anti-inflammatory, and gastric protective effects of trimetazidine (TMD) on various models in rats. The present study proposes to demonstrate the antinociceptive action in mice, evaluated in conditions of inflammatory pain, together with the determination of the type of pharmacodynamic interaction between trimetazidine and ketoprofen (KETO). In this study we used as experimental model of nociception the abdominal constrictive response (writhing test), induced with Zymosan A in mice, and for the study of the interaction we used as quantitative evaluation method the method of binary combinations in fixed proportions. The experimental results allowed the demonstration of the ED<sub>50</sub> for ketoprofen (DE<sub>50</sub> = 0,606 ± 0,108 mg/kg) and the demonstration of the synergism for the associated substances. (Z<sub>add</sub> = 1.818 ± 0.326mg/kg, Z<sub>mix</sub> = 0.458 ± 0,101 mg/kg, γ = 0.251, T<sub>c</sub> = 4.92, T<sub>t</sub> = 3.84, P < 0,05). The results demonstrate that for the same level of activity (50%), smaller doses of each substance can be used, compared to the doses of the substances administered alone, which might contribute to a reduction in the number or severity of adverse effects. on the other side, the demonstration of the synergism might contribute to the clarification of the action mechanisms. The experiments presented below were made in agreement with the rules and regulations concerning the work with lab animals.

## 1. Introducere

Studiul de față își propune demonstrarea tipului de interacțiune farmacodinamică dintre o substanță cu acțiune antianginoasă (Trimetazidina) și un antiinflamator nesteroidian (Ketoprofen) la șoarece.

Ketoprofenul este un antiinflamator nesteroidian utilizat frecvent în afecțiunile inflamatorii, mecanismul de acțiune bazându-se predominant pe capacitatea de inhibiție a ciclooxygenazei, în consecință reducerea sintezei metaboliților acidului arahidonic. În chirurgia experimentală și în practica medicală chirurgicală, ketoprofenul este frecvent utilizat postoperator.

În ultimii ani o serie de studii au pus în evidență acțiunea analgezică a unor compuși a căror acțiune principală ar fi cea antianginoasă, anticonvulsivantă etc.

Astfel, o serie de compuși care blochează canalele de calciu sau sodiu și-au dovedit acțiunea analgezică în diferite tipuri de durere.

Trimetazidina, de exemplu și-a demonstrat atât acțiunea antinociceptivă cât și acțiunea antiinflamatoare pe diferite modele experimentale la șobolan (Abdel-Salam & El-Batran, 2005).

Având în vedere astfel de date ne-am propus demonstrarea acțiunii antinociceptive în condiții inflamatorii a trimetazidinei și ketoprofenului precum și analiza combinației celor două substanțe. În farmacologia experimentală este recunoscut din ce în ce mai mult faptul că studiul cantitativ al combinațiilor medicamentoase, în special detectarea adevăratului sinergism (potențare) poate fi un pas util în elucidarea mecanismului de acțiune (Raffa, Stone et al., 2000).

## 2. Material și metodă

### *Animale de laborator*

Cercetările din prezentul studiu s-au realizat de șoareci masculi Swiss (Institutul Cantacuzino București) cu greutatea 18 - 22 g.

Animalele au fost plasate în cuști de plexiglas, tip mini-Duna, prevăzute cu adăpător. Pentru acomodare s-au plasat câte 10-15 animale/cușcă urmărindu-se timp de 15 zile comportamentul acestora. Condițiile de

habitat s-au realizat în laboratorul de Farmacodinamie experimentală (disciplina de Farmacodinamie și Farmacie clinică), UMF „Grigore T. Popa” Iași, într-o incintă cu temperatură și umiditate controlată ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), și un ciclu de lumină/întuneric, 12 ore/12 ore (07,00 AM / 07,00 PM).

Animalele au primit apă și hrană standard (sursa Biobaza Băneasa), *ad libitum*.

Testările au fost efectuate pe loturi de câte 6 animale începând cu orele 10.00 AM iar 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 (Zimmermann, 1986).

### *Substanțe utilizate*

Pentru realizarea testărilor s-au utilizat: Ketoprofen (Sigma), Zymosan A (Sigma), Trimetazidină (Sigma), CMC-Na (Sigma) și ser fiziologic (Zentiva).

*Testul răspunsului constrictiv abdominal* (metoda lui Siegmund și col. 1957, tehnica lui Koster și col. 1959) indus prin Zymosan A, constă în administrarea pe cale intraperitoneală 40 mg/kg, a unei suspensii de Zymosan A.

Inregistrarea numărului de răspunsuri constrictive abdominale s-a efectuat timp de 12 minute după administrarea agentului iritant (Turner & Hebborn, 1965).

### *Interpretarea datelor*

A fost de tip cantal caracterizată de prezența sau absența răspunsului calculându-se efectul maxim posibil: % (antinocicepție)

**Inhibiție = (nr. non-responderi / nr. total de animale) x 100**

### *Analiza statistică a datelor.*

Pentru analiza relațiilor doză-efect, protocolul de lucru impune trasarea dreptelor de regresie și analiza acestora iar pentru măsurarea relației dintre cele două variabile (doza-efect) se utilizează coeficientul de corelație Person „R”.

Pentru evaluarea potențialului antinociceptiv, se va calcula valoarea dozei

eficace 50 ( $DE_{50}$ ) din efectul maxim posibil măsurat.

Pentru **cuantificarea interacțiunii** s-a utilizat metoda dreptei aditive compuse, metodă ce permite evaluarea cantitativă a interacțiunilor de tip farmacodinamic din combinațiile binare în proporție fixă (Tallarida, 2001; Tallarida, 2002).

Metoda se bazează pe analiza dreptelor de regresie (dreapta de regresie a asocierii față de dreapta aditivă compusă) pentru nivelul de activitate de 50%.

**Indexul de interacțiune** ( $y$ ) 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).

## Rezultate și discuții

Substanțele de studiat s-au administrat pe cale orală, doze succesive în progresie geometrică.

Pentru ketoprofen s-au administrat pe cale orală doze succesive cuprinse între 0,31-5,00 mg/kg.

Prin administrarea secvenței de doze de mai sus s-a obținut un efect maxim posibil de 100% începând cu doza de 1,25 mg/kg.

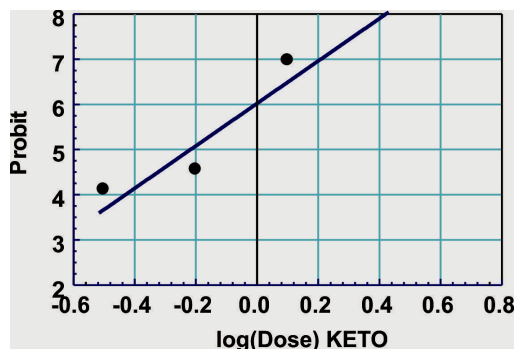
Datele obținute au permis determinarea valorii  $DE_{50}$  a ketoprofenului (Tabelul 1, figura 1). Pentru trimetazidină s-au administrat pe cale orală în progresie geometrică doze succesive cuprinse între 1,9 - 30,00 mg/kg.

Pentru secvența de doze luate în studiu nu s-a demonstrat acțiunea antinociceptivă, în condițiile administrării pe cale orală, testarea în condițiile durerii inflamatorii efectuându-se la 60 de minute după administrarea trimetazidinei. (Tabelul 1).

**Tabelul 1**  
Determinarea valorii  $DE_{50}$  ketoprofenului.

Parametru	Ketoprofen (KETO)	Trimetazidină (TMD)
$DE_{50}$	0,606 (0,100)	-
(SEM) <sup>1</sup>	$Y = 6,022 + 4,701 \cdot X$	-
mg/kg/p.o	$R = 0,904$ TLC: 0,363 - 0,959	-

<sup>1</sup>SEM, Eroarea standard a mediei



**Fig. 1.** Analiza dreptei de regresie a ketoprofenului

Metodologia de lucru pentru studiul combinațiilor în proporție fixă prevede un protocol pentru asocierile în care numai unul dintre compuși și-a prezentat acțiunea urmărită în condițiile experimentale date.

Astfel se utilizează perechi de doze în diferite rapoarte urmărindu-se EMP% pentru fiecare raport (Tabelul 2, figura 2).

Din tabelul 2 se observă că pentru raportul KETO/TMD 1:2 s-a obținut un EMP de 66,33% ceea ce permite stabilirea valorii Zadd.

Demonstrarea acestei valori este necesară pentru stabilirea perechilor de doze în proporție fixă, în evaluarea tipului de interacțiune farmacodinamică între cele două substanțe. În urma administrării perechilor de doze în proporția KETO/TMD - 0,333 /0,667 s-a obținut un efect antinociceptiv la combinației de 55,50%. Interacțiunea între ketoprofen și trimetazidină s-a dovedit a fi de tip sinergic.

Sinergismul este dovedit prin aspectul dreptelor de regresie, deplasarea la stânga a dreptei de regresie a asocierii față de dreapta aditivă compusă (figura 2).

Parametrii statistici ai analizei de regresie au pus pun în evidență sinergismul dintre cele două substanțe ( $F_c = 14,08$ ,  $F_t = 5,79$   $T_c = 4,92$ ,  $T_t = 3,84$ ,  $P < 0,05$ ).

Prin utilizarea testului răspunsului constrictiv abdominal se poate evalua analgezia centrală și periferică. Administrarea suspensiei iritante de Zymosan A conferă modelului o specificitate pentru patogeneza durerii inflamatoare (Pettipher, Hibbs et al., 1997) (Vale, Marques et al., 2003).

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, Hibbs et al., 1997).

De asemenea s-a pus în evidență și activarea căii alternative a complementului, generarea și eliberarea de PAF, radicali liberi ai oxigenului și enzimelor lizozomale (Rao, Currie et al., 1994).

Tabelul 2

Valorile EMP% pentru fiecare raport

Raport	Raport perechi doze	Doza totala mg/kg/p.o	(EMP) %	ED50 (SEM) <sup>1</sup>		Parametri statistici
				Zadd (SEM)	Zmix (SEM)	
KETO / TMD	1/3	-	33,33	-	-	F <sub>C</sub> = 14,08 F <sub>t</sub> = 5,79 T <sub>C</sub> = 4,92 T <sub>t</sub> = 3,84 P < 0,05
	1/2	-	66,33			
	1/1	-	50,00			
	1/0,5	-	16,66			
	1/0,25	-	0,00			
KETO / TMD (0,333/0,667)	-	0,113	16,66	1,818 (0,326) Y = 6,02 + 4,70*X R = 0,959	0,458 (0,101) <sup>1</sup> Y = 6,19 + 3,52*X R = 0,991 γ = 0,251	
	-	0,225	33,33			
	-	0,45	66,66			
	-	0,90	100,00			

<sup>1</sup>SEM, Eroarea standard a mediei

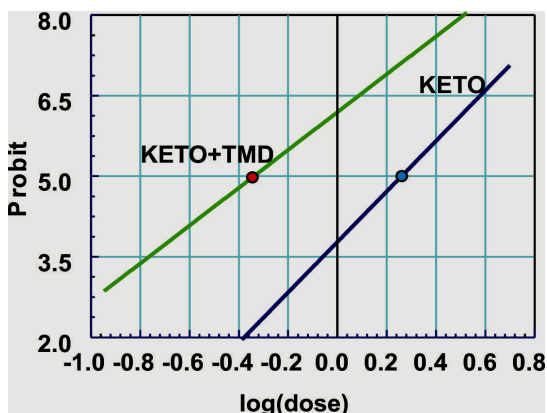


Figura 2. Analiza dreptei aditive compuse a asocierii KETO - TMD

Studii recente arată că agenții inflamatori nu stimulează direct eliberarea de mediatori primari hipernociceptivi, ci că eliberarea lor este precedată de o cascadă de citokine (Cunha, Poole et al., 1999) (Ribeiro, Vale et al., 2000).

La șoarece, răspunsul constrictiv abdominal prin Zyosan este mediat prin TNF-alfa, IL1-beta și IL8, care acționează concomitent și sinergic (Ribeiro cit (Cunha, Verri et al., 2005).

Ketoprofenul este un antiinflamator nesteroidian, utilizat sub formă de racemic în acest studiu. Spre deosebire de alte AINS, KETO are la bază un mecanism periferic de acțiune și unul central dar care nu pot fi pe

deplin identificate (Pinarci, Sierralta et al., 2001).

Mecanismele de acțiune se bazează pe inhibiția ciclooxygenazei și nitric-oxid-sintazei.

Recent s-a demonstrat la nivel central interacțiunea KETO cu sistemul serotoninergic ceea ar putea explica eficacitatea înaltă comparativ cu alte AINS (Diaz-Reval, Ventura-Martinez et al., 2004).

Implicațiile la nivel spinal par a fi explicate prin intervenția asupra receptorului 5HT3, în timp ce la nivel supraspinal prin intervenția asupra receptorilor 5-HT1, 5-HT-2, 5-HT7 (Diaz-Reval, Ventura-Martínez et al., 2002).

Alte studii arată că inhibă lipoxigenaza, leucotrienele, stabilizează membranele lizozomale, prezintă acțiune antibradikininică și este un scavenger de radicali hidroxil (Qiu, Liu et al., 2007).

Trimetazidina este un blocant neselectiv al canalelor de calciu, agent antiischemic care intervine în stresul oxidativ (Cristea, 2005).

La șoarece TMD reduce stresul oxidativ indus prin Lipopolizaharid E.

TMD blochează β-oxidarea prin inhibarea 2-AcetilCoA tiolazei, reduce acumularea de calciu și producerea de superoxizi.

De asemenea administrarea de trimetazidină pe modele de ischemie cardiacă a demonstrat o tendință de scădere a nivelurilor de IL6, C3, C5 IL8, TNFα și leucotriene, care

sunt responsabile atât pentru leziunile oxidative omniprezente în cazul inflamației acute și a leziunilor de reperfuzie, cât și pentru activarea mecanismelor percepției dureroase din inflamație (Martins, Siqueira Filho et al., 2012).

### Concluzii

Sinergismul dintre cele două substanțe poate fi explicat prin mecanismul complex al ketoprofenului la care se adaugă efectul antioxidant al TMD precum și reducerea influxului de calciu în neuroni datorată inhibării curenților prin receptorii AMPA / kainat ceea ce previne depolarizarea neuronală și activarea neuronilor aferenți primari, reducând astfel percepția dureroasă (Jain, Bharal et al., 2010).

Aceste rezultate ar putea sugera un potențial avantaj al administrării combinate a KETO cu TMD, efectele dorite putând fi obținute la doze semnificativ mai mici.

Având în vedere efectul antioxidant al TMD și interferențele acestui efect cu reducerea protecției gastrice de AINS, co-administrarea de TMD ar putea fi benefică și asupra acestui aspect, ceea ce justifică investigații ulterioare și în această direcție.

### Bibliografie

- Abdel-Salam, O.M. & El-Batran, S. (2005)** Pharmacological investigation of trimetazidine in models of inflammation, pain and gastric injury in rodents. *Pharmacology*, 75(3), 122-132.
- Cristea, A. (2005).** *Tratat de farmacologie.* Editura Medicala, Bucuresti.
- Cunha, F.Q., Poole, S., Lorenzetti, B.B., Veiga, F.H. & Ferreira, S.H. (1999).** Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. *Br J Pharmacol*, 126(1), 45-50.
- Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Silva, J.S., Poole, S., Cunha, F.Q. & Ferreira, S.H. (2005).** A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(5), 1755-1760.
- Diaz-Reval, M.I., Ventura-Martinez, R., Deciga-Campos, M., Terron, J.A., Cabre, F. & Lopez-Munoz, F.J. (2004).** Evidence for a

central mechanism of action of S-(+)-ketoprofen. *Eur J Pharmacol*, 483(2-3), 241-248.

- Díaz-Reval, M.I., Ventura-Martínez, R., Déciga-Campos, M., Terrón, J.A., Cabré, F. & López-Muñoz, F.J. (2002).** Involvement of serotonin mechanisms in the antinociceptive effect of S(+)-ketoprofen. *Drug Development Research*, 57(4), 187-192.
- Jain, S., Bharal, N., Mediratta, P.K. & Sharma, K.K. (2010).** Trimetazidine exerts protection against increasing current electroshock seizure test in mice. *Seizure*, 19(5), 300-302.
- Martins, G.F., Siqueira Filho, A.G., Santos, J.B., Assuncao, C.R., Vieira, F.B., Valencia, A., Carvalho, K.G. & Jessen, B. (2012).** Trimetazidine and inflammatory response in coronary artery bypass grafting. *Arq Bras Cardiol*, 99(2), 688-696.
- Pettipher, E.R., Hibbs, T.A., Smith, M.A. & Griffiths, R.J. (1997)** Analgesic activity of 2-amino-4-methylpyridine, a novel NO synthase inhibitor. *Inflamm Res*, 46 Suppl 2, S135-136.
- Pinardi, G., Sierralta, F. & Miranda, H.F. (2001)** Interaction between the antinociceptive effect of ketoprofen and adrenergic modulatory systems. *Inflammation*, 25(4), 233-239.
- Qiu, H.X., Liu, J., Kong, H., Liu, Y. & Mei, X.G. (2007).** Isobolographic analysis of the antinociceptive interactions between ketoprofen and paracetamol. *Eur J Pharmacol*, 557(2-3), 141-146.
- Raffa, R.B., Stone, D.J., Jr. & Tallarida, R.J. (2000).** Discovery of "self-synergistic" spinal/supraspinal antinociception produced by acetaminophen (paracetamol). *J Pharmacol Exp Ther*, 295(1), 291-294.
- Rao, T.S., Currie, J.L., Shaffer, A.F. & Isakson, P.C. (1994).** In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 269(3), 917-925.
- Ribeiro, R.A., Vale, M.L., Thomazzi, S.M., Paschoalato, A.B., Poole, S., Ferreira, S.H. & Cunha, F.Q. (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.

- Tallarida, R.J. (2001).** Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther*, 298(3), 865-872.
- Tallarida, R.J. (2002).** The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain*, 98(1-2), 163-168.
- Turner, R.A. & Hebborn, P. (1965).** Screening methods in pharmacology. Academic Press, New York,.
- Vale, M.L., Marques, J.B., Moreira, C.A., Rocha, F.A., Ferreira, S.H., Poole, S., Cunha, F.Q. & Ribeiro, R.A. (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.
- Zimmermann, M. (1986).** Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol Scand Suppl*, 554, 221-233.