

## DEMONSTRAREA ACTIVITĂȚII ANTINOCICEPTIVE A UNOR ANTIDEPRESANTE FOLOSIND MODELE DE NOCICEPTIE ACUTĂ LA ȘOARECI

### DEMONSTRATION OF ANTINOCICEPTIVE ACTION OF SOME ANTIDEPRESSANTS USING MODELS OF ACUTE NOCICEPTION IN MICE

Daniela Carmen Ababei<sup>1</sup>, Raluca Stefanescu<sup>2</sup>, Veronica Bild<sup>1,3</sup>, Delia Bulea<sup>1</sup>, Monica Neamtu<sup>1</sup>, Oana Dana Arcan<sup>1</sup>, Alexandru Vasincu<sup>1</sup>, Gabriela Dumitrita Stanciu<sup>3</sup>, IR Popescu<sup>4</sup>, S. Beschea Chiriac<sup>5</sup>

<sup>1</sup>.Pharmacodynamics and Clinical Pharmacy, UMP "Gr. T. Popa" Iasi

<sup>2</sup>University "Al. Ioan. Cuza" Iasi

<sup>3</sup>CEMEX – UMF "Gr. T. Popa" Iasi

<sup>4</sup>.Physiology UMF "Gr. T. Popa" Iasi

<sup>5</sup>.Clinical Toxicology University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iasi

**Cuvinte cheie:** *antidepresive, antinocicepție, Zymosan A*

**Key words:** *antidepressant, antinociceptive, Zymosan A*

#### Rezumat

Relația dintre durere și depresie a devenit în ultimii ani o temă de actualitate pentru specialiștii în domeniu. Pentru realizarea unei terapii raționale a durerii s-a căutat a se demonstra potențialul antinociceptiv a unor substanțe medicamentoase care nu fac parte din grupa analgezicelor clasice. În studiul de față s-a demonstrat acțiunea antinociceptivă a nortriptilinei, doxepinei și clomipraminei (antidepresive triciclice) având la bază capacitatea acestor substanțe de a influența unii mediatori implicați în procesele algice (noradrenalina (NA), serotonina (5-HT)). Potența antinociceptivă scade în ordinea: nortriptilina, clomipramină, doxepină, pentru modelul de durere inflamatorie. Pentru modelul cu stimul termic potența scade astfel: clomipramină, nortriptilină, doxepină. Demonstrarea acțiunii antinociceptive sugerează că aceste substanțe modula durerea și ar putea fi adjuvante în tratamentul acesteia.

#### Abstract

During the last few years, the relationship between pain and depression has become a frequent topic for the specialists in the field. In order to achieve a rational pain therapy, it was sought to demonstrate the antinociceptive potential of some drugs that do not belong to the classical analgesic group. In the present study, we demonstrated the antinociceptive action of nortriptyline, doxepin and clomipramine (tricyclic antidepressants), based on the ability of these agents to influence some mediators involved in pain processes (noradrenaline (NA), serotonin (5-HT)). The antinociceptive potency decreases, for the inflammatory pain model, in the following order: nortriptyline, clomipramine, doxepine. For the thermal stimulus model, potency decreases as follows: clomipramine, nortriptyline, doxepine. The demonstration of these antinociceptive actions suggests that these substances modulate pain and may be used as adjuncts in its therapy.

## 1. Introducere

În ultimii ani, rolul antidepresivelor în staturile algice a fost în mod constant demonstrată.

De asemenea, în stările clinice, s-au încercat să se stabilească legături între durere și depresie.

Întrebările care au fost adesea abordate de către grupurile de lucru identificate în literatura de specialitate a fost:

*„Este durerea o cauza a depresiei sau depresia este o cauza a durerii?”.*

Astfel, în literatura de specialitate a fost demonstrată eficacitatea antidepresivelor în durerea neuropatică, durerea cronică sau alte situații hiperalgice [1].

Modelele pentru nocicepție cronică sunt bazate frecvent pe sistemul serotoninergic sau dopaminergic [2].

Ținând cont de faptul că antidepresivele pot influența neuromediatorii, noradrenalină (NA), 5-OH triptamină (5-HT) sau dopamina (DA) prin inhibarea re-captării, blocarea receptorilor sau a agoniștilor presinaptici, acțiunea analgezică dintre acești compuși putând fi explicată prin mecanismele de acțiune, caracteristice fiecărei substanțe [3].

În prezentul studiu, ne propunem evaluarea potențialului antinociceptiv al mai multor antidepresive, folosind modele de nocicepția acută pe șoareci.

## 2. Material și Metodă

Cercetările din prezentul studiu s-au realizat pe șoareci Swiss masculi cu greutatea 18-22 g.

Animalele au fost cazate în cuști de plexiglas prevăzute cu adăpători, menținute în condiții de temperatură  $21.00 \pm 2.00$  °C și umiditate controlată cu un ciclu de lumină întuneric: 7.00 AM / 7.00 PM și ai primit hrană și apă *ad libitum*.

Toate procedeele experimentale au fost efectuate în acord reglementările IASP (Internațional Association for the Study of Pain) și legislația în vigoare (4).

S-au utilizat următoarele substanțe: Doxepin (Sigma), Nortriptilină (Sigma), Clomipramină (Sigma), Carboximetilceluloză Sodică (CMCNa).

Substanțele de cercetat se administrează pe cale orală suspendate în CMC-Na, secvențe de doze în progresie geometrică.

Agentul nociceptiv Zymosan A se administrează sub forma de suspensie salină pe cale i.p.

- Modelele de nocicepție utilizate au fost: testul răspunsului constrictiv abdominal indus prin Zymosan (interpretat cuantal) și
- testul plăcii încălzite (model de nocicepție termică) (interpretat gradat).

*Testul răspunsului constrictiv abdominal* indus prin Zymosan A este un model de nocicepție chimică cu specificitate pe durerea inflamatorie și folosește *metoda lui Siegmund, tehnica lui Koster* (5, 6).

Testul constă în administrarea intraperitoneală a unei suspensii de Zymosan A, 40 mg/kg/corp și înregistrarea unui răspuns caracteristic numit răspuns constrictiv abdominal timp de 12 minute de la momentul administrării agentului chimic.

Interpretarea efectului este de tip cuantal caracterizată de prezența sau absența răspunsului.

*Testul plăcii încălzite* presupune utilizarea unui aparat specializat denumit *Hot Plate UGO Basile modelul 7280* și constă în plasarea animalului de experiență pe suprafața încălzită la  $52,5 \pm 0,20$  °C timp de 30 secunde.

Se notează răspunsul caracteristic: lingerea/scuturarea labelor posterioare, săritura. Interpretarea efectului este de tip gradat calculându-se efectul maxim posibil (EMP%) obținut.

Pentru determinarea eficacității substanțelor studiate se va calcula valoarea DE50 a fiecărei substanțe pentru fiecare model de nocicepție.

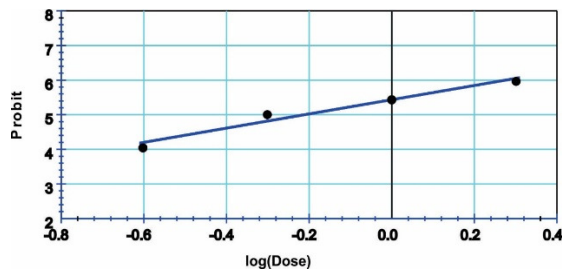
## 3. Rezultate și Discuții

Prin administrarea unor secvențe de doze de nortriptilină 0.250-2.00 mg/kg pe cale orală (*Tabelul 1 fig 1,2*) s-au obținut următoarele rezultate:

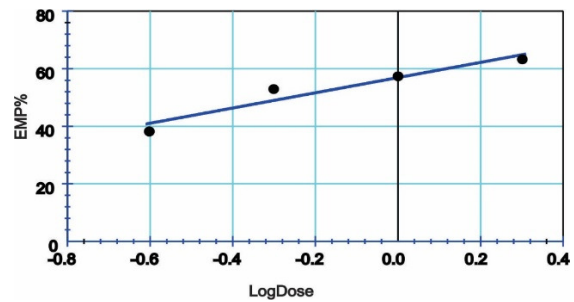
**Tabelul 1**

Activitatea comparativă a unor secvențe de doze de nortriptilină 0.250-2.00 mg/kg pe cale orală

Testul RCA			Testul plăcii încălzite		
Doza mg/kg	EMP %	Valoare DE50 mg/kg	Doza mg/kg	EMP %	Valoare DE50 mg/kg
2.00	83.33	0.615±0.193	2.00	63.240	0.547 ± 0.091
1.00	66.66	Y=5.43+2.05*X	1.00	57.340	Y = 56.91 + 26.41*X
0.5	50.00	X	0.5	52.920	R:0.961
0.25	14.66	R:980	0.25	38.22	TLC (0.041, 1300)



**Figura 1.** Dreapta de regresie a nortriptilinei prin testul RCA



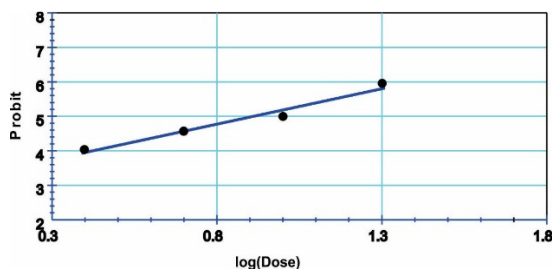
**Figura 2.** Dreapta de regresie a nortriptilinei prin testul plăcii încălzite

Prin administrarea unor secvențe de doze de doxepină 2.50-20.00 mg/kg și respectiv 5.00-20.00 mg/kg pe cale orală (Tabelul 2, fig. 3,4) s-au obținut următoarele rezultate:

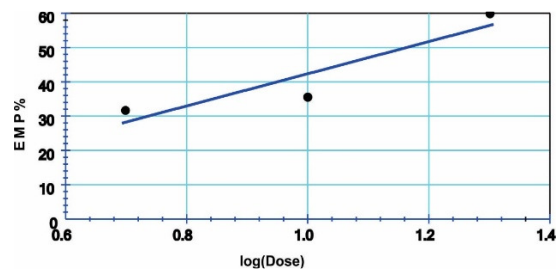
**Tabelul 2**

Activitatea comparativă a unor secvențe de doze de doxepină 2.50-20.00 mg/kg și respectiv 5.00-20.00 mg/kg pe cale orală

Testul RCA			Testul plăcii încălzite		
Doza mg/kg	EMP %	Valoare DE50 mg/kg	Doza mg/kg	EMP %	Valoare DE50 mg/kg
20.00	83.33	8.13 ± 2.56 Y= 3.13+2.05*X R:980	20.00	59.88	14.55 ± 4.131
10.00	50.00		10.00	35.53	Y = -4.55 + 46.90*X
5.00	33.33		5.00	31.64	R: 0.923
2.50	16.66				TLC (17.468, 5.569)



**Figura 3.** Dreapta de regresie a doxepinei prin testul RCA



**Figura 4.** Dreapta de regresie a doxepinei prin testul plăcii încălzite

Prin administrarea unor secvențe de doze de clomipramină 0.187-3.00 mg/kg și respectiv 0.187- 0.750 mg/kg pe cale orală (Tabelul 3, fig. 5, 6) s-au obținut următoarele rezultate:

Tabelul 3

Activitatea comparativă a unor secvențe de doze de clomipramină 0.187-3.00 mg/kg și respectiv 0.187- 0.750 mg/kg pe cale orală

Testul RCA			Testul plăcii încălzite		
Doza mg/kg	EMP%	Valoare DE50 mg/kg	Doza mg/kg	EMP%	Valoare DE50 mg/kg
3.00	66.66	1.51 ± 0.79 Y = 4.77 + 1.27 * X R: 976	0.750	64.03	0.486 ± 0.085 Y = 68.25 + 59.09 * X R: 963 TLC (0.658 0.204)
1.50	50.00		0.375	37.59	
0.75	33.33		0.87	28.37	
0.375	16.66				
0.187	16.66				

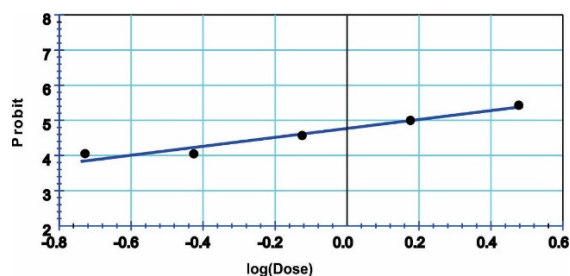


Figura 5. Dreapta de regresie a clomipraminei prin testul RCA

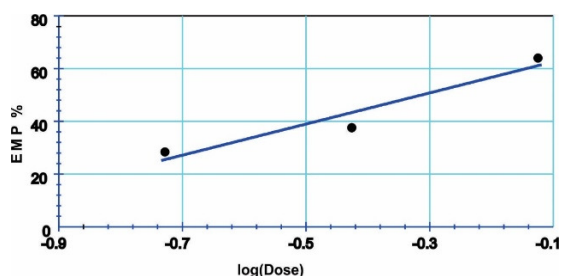


Figura 6. Dreapta de regresie a clomipraminei prin testul plăcii încălzite

Pentru toate substanțele luate în studiu s-a putut demonstra valoarea DE50 pentru modelele de nocicepție utilizate.

Doxepina, nortriptilina, clomipramina fac parte din grupa antidepressivă triciclică inhibitoare neselectivă ale recaptării noradrenalinei și 5HT.

Analizând valorile DE50 obținute pentru modelul de nocicepție cu stimul chimic constatăm că potența antinociceptivă descrește în ordinea nortriptilină, clomipramină, doxepină.

Pentru testul de nocicepție cu stimul termic potența descrește în ordinea: *clomipramină*, *nortriptilină*, *doxepină* (clomipramina și nortriptilina sunt comparabile ca potență) (Tabelele 1, 2, 3)

Potența pentru inhibiția recaptării neurotransmițătorilor monoaminici este variabilă: nortriptilina are o potență maximă

pentru recaptarea noradrenalinei de 4.35 comparativ cu 18.5 pentru serotonină și 1140 pentru dopamină ceea ce oferă o selectivitate de 4.25 în favoarea noradrenalinei.

La fel doxepina prezintă o potență de 29.4 pentru NA, 66,7 pentru 5-HT și 12200 pentru DA ceea ce îi conferă o selectivitate minimă de 2.27 în favoarea NA; în sfârșit clomipramina, ca agent cu selectivitate pentru 5-HT are o potență de 37 pentru NA, 0.28 pentru 5-HT de 2200 pentru DA ceea ce conferă o selectivitate de 132 pentru 5-HT (7).

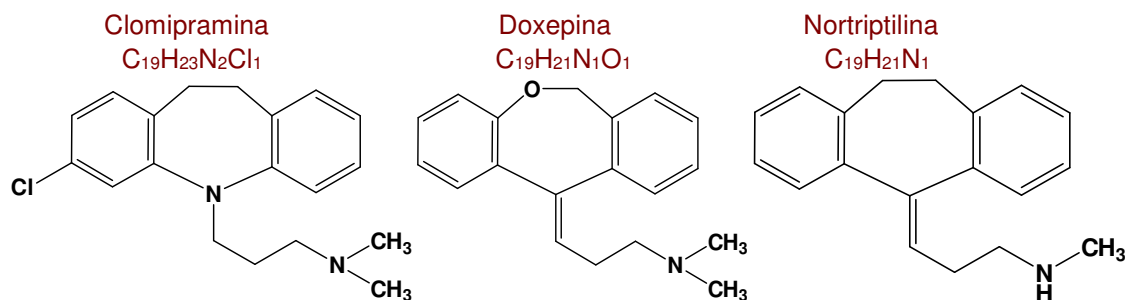
O ipoteză care ar putea explica acțiunea antinociceptivă a celor trei substanțe ar putea fi inhibiția recaptării în diverse grade a NA și a 5HT la nivelul căilor inhibitorii noradrenergice și serotoninergice de control ale durerii cu direcție mezencefalo-spinală.

Fenomenul a fost observat de Jones și colab 2004 folosind duloxetine (8) un inhibitor neselectiv al recaptării noradrenergice și serotoninergice.

Având în vedere șansele de apariție a unor metaboliți care ar putea avea influență asupra rezultatelor obținute un demers util ar putea fi investigarea concentrației plasmatice a substanțelor printr-o metodă de înaltă acuratețe precum și identificarea și măsurarea potențialilor metaboliți ai substanțelor studiate.

Având în vedere faptul că literatura de specialitate prezintă astfel de terminări pe sângele uman și de șobolan cu limite de detecție de ordinul ng, următoarea etapă o reprezintă identificarea și cuantificarea acestor substanțe la șoarece.

Formulele moleculare și formulele de structură plană ale clomipraminei, doxepinei și nortriptilinei sunt prezentate mai jos:



Grupările amino- terțiare ale clomipraminei și doxepinei precum și gruparea amino-secundară a nortriptilinei pot fi protonate în mediu acid. Prin urmare, aceste molecule pot fi analizate în modul de ionizare pozitiv într-un spectrometru de masă echipat cu o sursă de ionizare blândă precum MALDI sau ESI.

Ionii moleculari formați [clomipramină + H]<sup>+</sup>, [doxepină + H]<sup>+</sup> și [nortriptilină + H]<sup>+</sup> vor fi observați la valori ale m/z de 315,163, 280,170 și respectiv 264,175.

Hideki Nozawa și colaboratorii săi au publicat în anul 2015 un studiu în care au arătat analiza unor medicamente antidepresive triciclice și a unor metaboliti ai acestora folosind aparatul MALDI-QTOF pe probe de sânge uman utilizând plasma (9).

Yuan Shen și colaboratorii săi au publicat în anul 2010 un studiu pentru determinarea amitriptilinei și nortriptilinei din plasma de șobolan.

Curbele de calibrare au fost liniare pe domeniul de concentrații 10-1000 ng/mL pentru nortriptilină.

Limita de cuantificare a fost 10 ng/mL (10).

Studiul de față a demonstrat acțiune antinociceptivă pe ambele modele de nocicepție, pentru toate substanțele luate în studiu.

Astfel, putem trage concluzia că inhibitoarele de recaptare a NA și 5-HT ar putea avea și o eficacitate clinică în modularea durerii singure sau ca adjuvante la terapia analgezică clasică.

## Bibliografie

1. **Mika J., et al.**, Neuronal and immunological basis of action of antidepressants in chronic pain - clinical and experimental studies. *Pharmacol Rep*, 2013. **65**(6): p. 1611-21.
2. **Fishbain DA, et al.**, Evidence-based data from animal and human experimental studies on pain relief with antidepressants: a structured review. *Pain Med*, 2000. **1**(4): p. 310-6.
3. **Zychowska M, et al.**, The influence of microglia activation on the efficacy of amitriptyline, doxepin, milnacipran, venlafaxine and fluoxetine in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, 2015. **749**: p. 115-23
4. **Zimmermann M.** Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol Scand*, 1986. **128** (Suppl. 554): p. 221-33.
5. **Turner RA, Hebborn P.** Screening methods in pharmacology. 1965, New York,; Academic Press
6. **Le Bars D, Gozariu M, Cadden SV.** Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*, 2001. **53**(4): p. 597-652.
7. **Goodman, L.S., et al.**, Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 2001, New York: McGraw-Hill.
8. **Jones CK, Peters SC, Shannon HE** Efficacy of duloxetine, a potent and balanced serotonergic and noradrenergic reuptake inhibitor, in inflammatory and acute pain models in rodents. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **312**(2): p. 726-32.
9. **Nozawa H et al.**, MALDI-TOF mass spectrometric determination of eight benzodiazepines with two of their metabolites in blood. *Leg Med (Tokyo)*, 2015. **17**(3): p. 150-6.
10. **Shen Y, et al.**, Validated LC-MS (ESI) assay for the simultaneous determination of amitriptyline and its metabolite nortriptyline in rat plasma: application to a pharmacokinetic comparison. *J Pharm Biomed Anal*, 2010. **53**(3): p. 735-9.