

АНАЛЬГЕЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА КОМБИНАЦИИ АТИПИЧНОГО НПВС N-АЦЕТИЛ
L-ПРОЛИНА И МЕЛОКСИКАМА

Волчек А. В., Дубовик Б. В.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. В работе изучены анальгезирующие свойства комбинации мелоксикама и атипичного нестероидного противовоспалительного средства (НПВС) N-ацетил-L-пролина при внутрижелудочном введении в тестах тепловой иммерсии хвоста и перитонвисцеральной боли у мышей. Показан аддитивный характер взаимодействия соединений, характерный для агентов с различными фармакодинамическими механизмами действия. Установлено, что комбинаторное сочетание N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в массовом соотношении 40/1 и 20/1 демонстрирует сильный синергизм, позволяя снижать дозы компонентов в 4–20 раз. Результаты исследования являются экспериментальным обоснованием приемлемости практического использования синергичной комбинации ненаркотических анальгетиков N-ацетил-L-пролина и мелоксикама.

Ключевые слова: ацетилпролин, Гроцепрол, мелоксикам, НПВС, анальгезия, боль.

Введение. Создание эффективных и безопасных анальгетических средств на основе синергичных комбинаций, несомненно, является актуальной задачей фармакологии. Определенный интерес представляет потенциальная возможность полезного фармакодинамического взаимодействия нестероидных противовоспалительных средств ингибиторов циклооксигеназы (далее — ЦОГ) и анальгетиков с иным механизмом действия.

В настоящей работе представлены результаты исследования анальгетических свойств комбинации N-ацетил-L-пролина и малотоксичного НПВС длительного действия мелоксикама. N-ацетил-L-пролин (Гроцепрол[®], Республика Беларусь) — противовоспалительное и болеутоляющее лекарственное средство, обладающее сопоставимой с ненаркотическими анальгетиками эффективностью. По нашим данным, спектр фармакологической активности N-ацетил-L-пролина необычен для НПВС — ингибиторов ЦОГ и включает противовоспалительные [1], болеутоляющие свойства [2] при отсутствии гастротоксичности [3] и жаропонижающего действия [4]. В рандомизированном контролируемом двойном слепом исследовании в рамках второй фазы клинических испытаний N-ацетил-L-пролин показал сравнимую с диклофенаком натрия эффективность у пациентов с деформирующим остеоартрозом (гонартроз, коксартроз) 2-й стадии (результаты не опубликованы). Гроцепрол[®] применяется в клинической практике для лечения слабого и умеренного болевого синдрома различного происхождения, а также в качестве вспомогательного болеутоляющего и противовоспалительного средства при артритах (рег. № 10/12/1830).

Материалы и методы. Исследование проведено в условиях экспериментальной лаборатории НИЧ БГМУ в соответствии с нормами биомедицинской этики и правилами гуманного обращения с животными с соблюдением требований Европейской конвенции 86/609 ЕЕС, регламентирующей изучение боли на живых организмах. Эксперименты выполнены на 160 нелинейных белых мышцах-самцах массой 22–30 г. Животные содержались в виварии при естественном световом дне и тепловом комфорте, свободном доступе к воде и корму. Контрольную и подопытные группы формировали из здоровых мышей методом рандомизации по массе тела в качестве ведущего признака.

Субстанция N-ацетил-L-пролина для исследований представлена Институтом физико-органической химии НАН Беларуси, мелоксикам приобретен в фирме Sigma Aldrich, производства Fluka, Швейцария. Препараты вводили интрагастрально жестким зондом в виде суспензий в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела животных. В качестве суспензионной среды использовали 1 % крахмальный гель, приготавливаемый непосредственно перед использованием. Контрольные животные получали эквивалентный объем растворителя.

Для оценки болеутоляющих свойств использовали две экспериментальные модели — тест тепловой иммерсии хвоста и реакцию перитонвисцеральной боли в тесте корчей, индуцированной внутрибрюшинным введением ирританта.

Тест тепловой иммерсии хвоста основан на спинальном флексорном рефлекс в ответ на погружение хвоста в горячую воду, при этом происходит активация полимодальных ноцицепторов и их афферентных волокон С- и Ад-типа, а также высокопороговых механорецепторов. Тест отличается стабильностью, информативностью и хорошей воспроизводимостью показателей, является щадящей по отношению к животному моделью исследования анальгезии, позволяя оценить изменения болевой чувствительности практически на пороговом уровне [5]. Для этого мышью помещали в узкий контейнер, ограничивающий движения животных. Хвост, вытянутый наружу, погружали до половины длины в горячую воду температуры 48 °С, поддерживаемой с точностью 0,1 °С. Болевую чувствительность оценивали по латентному периоду реакции

отдергивания хвоста в секундах. Критерием аналгетического действия считали удлинение латентного периода реакции в опытных группах в сравнении с эффектом плацебо.

Тест перитовисцеральной боли уксуснокислых корчей основан на изменении чувствительности С-полимодалных ноцицепторов серозной оболочки брюшины в присутствии альгогена. Болевую реакцию корчей вызывали внутрибрюшинным введением 0,6 % водного раствора уксусной кислоты объемом 0,1 мл на 10 г массы тела животного. Учитывали суммарное количество корчей — непроизвольного сокращения абдоминальной мускулатуры, прогибания спины и вытягивания задних конечностей, наблюдаемых в течение 20 мин после введения альгогена. Анальгетический эффект оценивали по способности препаратов уменьшать количество корчей в сравнении с эффектом плацебо.

Субстанции вводили за 30–40 мин до проведения тестов в дозах, находящихся в диапазоне эффективных аналгетических для мышей — N-ацетил-L-пролин 100, 200, 400, 800 мг/кг, мелоксикам 0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5; 7,5; 12,5; 20 мг/кг. Исследованы комбинаторные сочетания мелоксикам/N-ацетил-L-пролин в соотношениях: $1/20$ — 2,5 + 50 мг/кг, 5 + 100 мг/кг и $1/40$ — 2,5 + 100 мг/кг, 5 + 200 мг/кг, что приблизительно соответствует соотношению аналгетической активности соединений.

Полученные данные обрабатывали с использованием параметрических и непараметрических критериев вариативной статистики. Различия между группами признавали достоверными при $p < 0,05$.

Анализ фармакодинамического взаимодействия субстанций выполнен по методике T. Chou [6] посредством специально разработанного интерактивного алгоритма с использованием вычислительных возможностей компьютерной программы MS Excel. Методом регрессионного анализа определяли эффективные дозы (ED_{16} - ED_{84}) индивидуальных субстанций и их комбинаторного сочетания. Уравнение регрессии считали качественным при ошибке аппроксимации данных менее 15 %.

Индекс снижения дозы (далее — DRI) каждого компонента комбинации считали по формуле:

$$DRI = D_x / D(1), \quad (1)$$

где D_x — доза препарата, оказывающая эффект определенной силы при индивидуальном применении;
 D — доза препарата в комбинации, оказывающая аналогичный эффект.

Значение DRI показывает, во сколько раз можно снизить дозу каждого компонента в синергичной комбинации для достижения эффекта, сопоставимого с индивидуальным действием компонента.

Результат взаимодействия мелоксикама и N-ацетил-L-пролина оценивали по значению комбинаторного индекса (CI), который рассчитывали по формуле:

$$CI = (1/DRI_1) + (1/DRI_2), \quad (2)$$

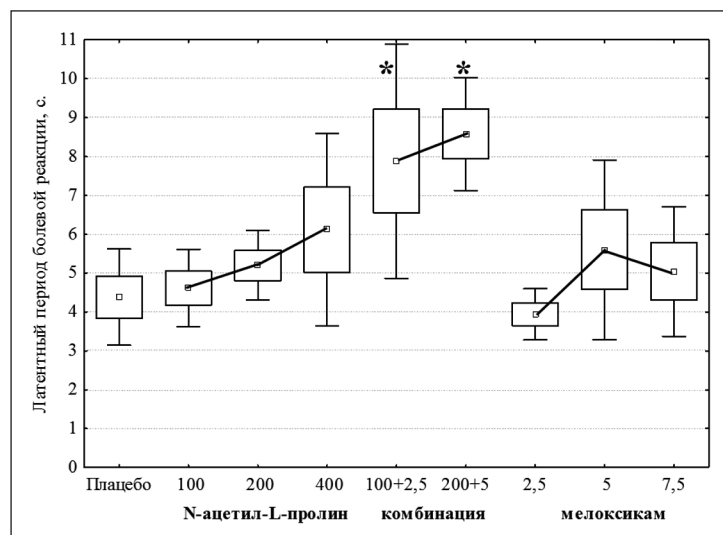
где DRI_1 и DRI_2 — индексы снижения дозы мелоксикама и N-ацетил-L-пролина соответственно при комбинированном применении.

Значения CI трактовали в соответствии со следующей шкалой [6]: $CI < 0,1$ — очень сильный синергизм; $CI = 0,1–0,3$ — сильный синергизм; $CI = 0,3–0,7$ — синергизм; $CI = 0,7–0,85$ — умеренный синергизм; $CI = 0,85–0,90$ — слабый синергизм; $CI = 0,90–1,0$ — аддитивный эффект.

Результаты представляли графически в виде рассчитанной путем регрессионного анализа зависимости доза-эффект индивидуальных субстанций и их комбинации; распределений CI — эффект и DRI — эффект.

Результаты и их обсуждение. Действие мелоксикама, N-ацетил-L-пролина и их комбинации на порог термоболовой чувствительности у мышей в тесте тепловой иммерсии хвоста представлено на рисунке 1.

Латентный период термоболовой реакции в ответ на погружение хвоста в горячую воду у животных контрольной группы составил $4,4 \pm 0,5$ с. N-ацетил-L-пролин в дозе 100 мг/кг не влиял на болевую чувствительность ($4,6 \pm 0,4$ с), а в дозах 200 и 400 мг/кг повышал порог болевой реакции, увеличивая латентный период отдергивания хвоста в 1,2 и 1,4 раза соответственно ($5,2 \pm 0,4$ и $6,1 \pm 1,1$ с). Регрессионный анализ показал дозозависимый характер изменения порога болевой чувствительности у мышей, получавших N-ацетил-L-пролин (рисунок 2), при приемлемом уровне ошибки аппроксимации данных (менее 15 %). Мелоксикам при индивидуальном применении в дозе 2,5 мг/кг не влиял на регистрируемый параметр ($3,9 \pm 0,3$ с), в дозах 5 и 7,5 мг/кг повышал латентный период реакции на боль в 1,3 и 1,2 раза соответственно ($5,6 \pm 1$ с и $5,0 \pm 0,7$ с).



Среднее, стандартная ошибка, 95 % ДИ; n = 10.

* — $p < 0,05$ по критерию Ньюмена–Кейлса в сравнении с эффектами плацебо, N-ацетил-L-пролина (100; 200 мг/кг) и мелоксикама (2,5; 5 и 7,5 мг/кг), назначаемых индивидуально

Рисунок 1. — Влияние N-ацетил-L-пролина, мелоксикама и их комбинаций на латентный период болевой реакции в тесте тепловой иммерсии хвоста у мышей

Комбинации N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в массовом соотношении 40/1: 100 мг/кг N-ацетил-L-пролина + 2,5 мг/кг мелоксикама и 200 мг/кг N-ацетил-L-пролина + 5 мг/кг мелоксикама статистически достоверно в сравнении с группой контроля повышали латентный период болевой реакции мышей при погружении хвоста в горячую воду в 1,8 и 2,1 раза соответственно ($7,9 \pm 1,3$ и $8,6 \pm 0,6$ с). Результат действия комбинаций значительно превышал индивидуальные эффекты компонентов в аналогичных дозах ($p < 0,05$ по критерию Ньюмена–Кейлса). Кривые регрессии аналгетического эффекта доз N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в составе комбинаторного сочетания в соотношении 40:1, полученные путем аппроксимации данных, представлены на рисунке 2.

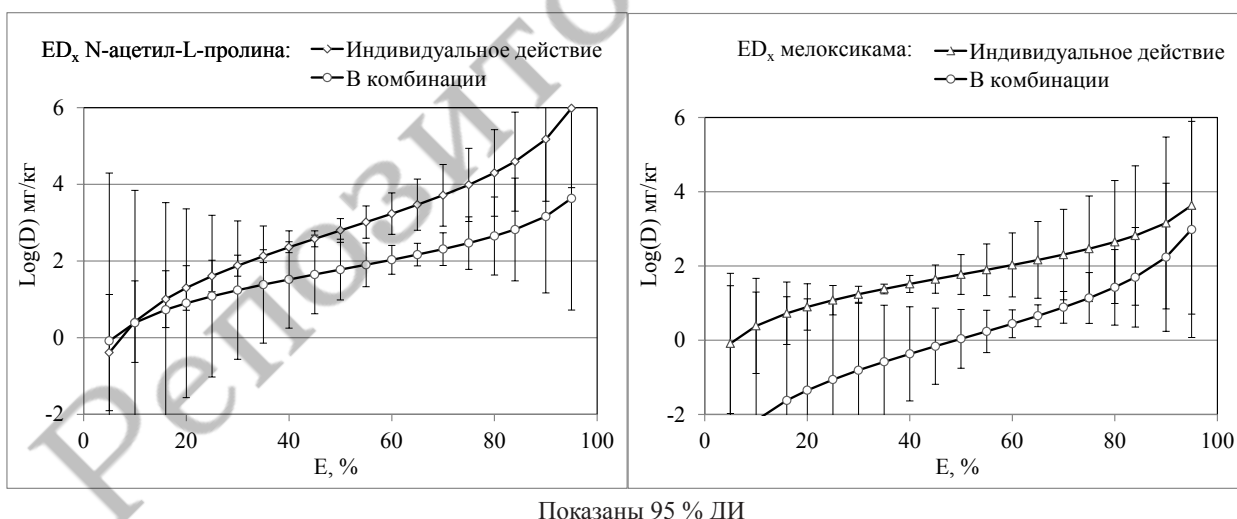
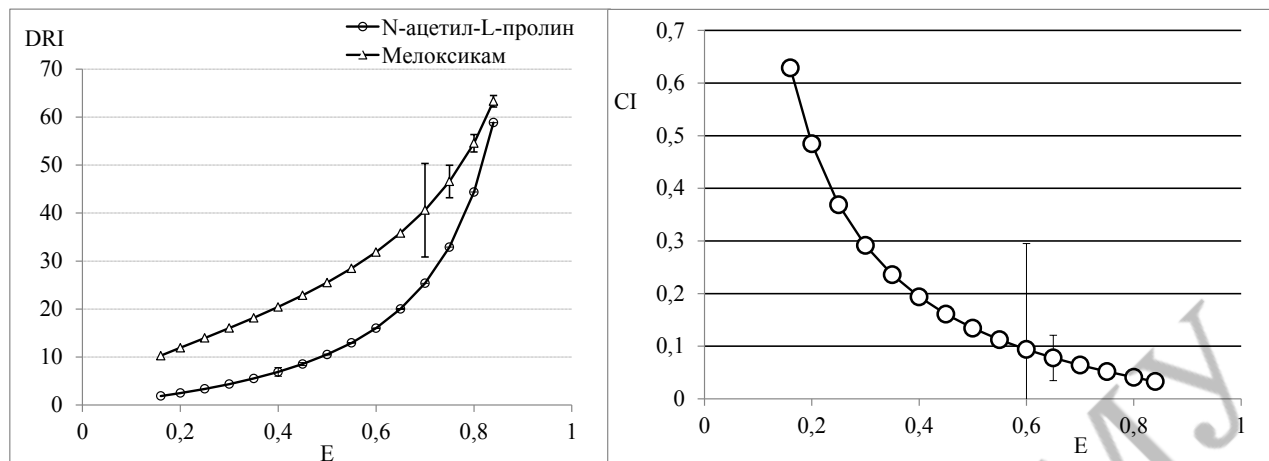


Рисунок 2. — Кривые регрессии доза-анальгетический эффект при индивидуальном действии N-ацетил-L-пролина и мелоксикама и в составе комбинаторного сочетания в соотношении 40:1 в тесте тепловой иммерсии хвоста у мышей

Анализ результатов взаимодействия N-ацетил-L-пролина и мелоксикама по T.Chou показал, что в диапазоне ED_{16} - ED_{84} индекс снижения дозы (DRI) мелоксикама составил 10-63 (рисунок 3), а его ED_{50} в комбинации в 25,5 раза меньше, чем при индивидуальном применении. Среднеэффективная аналгетическая доза N-ацетил-L-пролина в комбинаторном сочетании с мелоксикамом может быть снижена примерно

в 10 раз по сравнению с индивидуальным действием препарата. В диапазоне эффективных доз ED₁₆-ED₈₄ DRI N-ацетил-L-пролина повышался от 1,88 до 58,8.



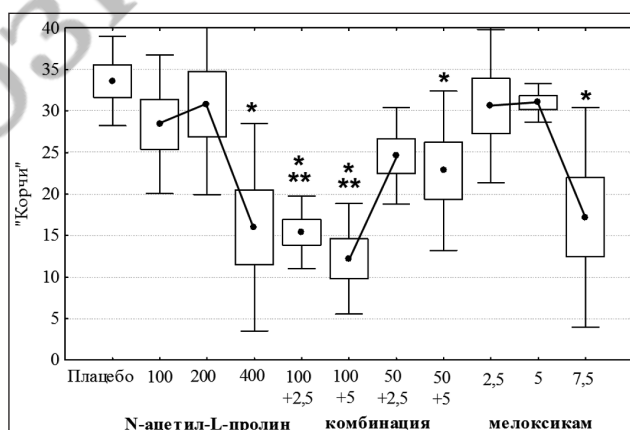
DRI показывает, во сколько раз может быть снижена доза каждого компонента в синергичной комбинации для достижения эффекта, сопоставимого с индивидуальным действием препаратов. Обозначены 95 % ДИ

Рисунок 3. — Индекс снижения анальгетической дозы (DRI) и комбинаторный индекс (CI) N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в комбинации 40/1 в тесте тепловой иммерсии хвоста у мышей

Во всем диапазоне регрессионных кривых доза-эффект комбинация демонстрирует однонаправленный характер взаимодействия. Показатель CI сочетания N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в соотношении 40/1 находится в диапазоне 0,63–0,03, что в соответствии с принципами комбинаторной фармакологии [6], может быть охарактеризовано как выраженный синергизм. Среднеэффективные дозы комбинации проявляют сильный синергизм (CI составляет 0,13).

Индивидуальное и комбинированное действие субстанций в тесте перитовисцеральной боли «уксуснокислые корчи» показано на рисунке 4. В исследовании изучен большой диапазон доз препаратов: N-ацетил-L-пролин — 100; 200; 400 и 800 мг/кг; мелоксикам — 0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5; 7,5; 12,5 и 20 мг/кг; с целью облегчения визуального восприятия графической информации, на рисунке 4 не представлены эффекты некоторых доз соединений. Путем аппроксимации данных составляли кривые регрессии доза-эффект N-ацетил-L-пролина и мелоксикама при индивидуальном действии и в составе комбинации (рисунок 5).

В контрольной группе мышей после внутрибрюшинного введения 0,6 % водного раствора уксусной кислоты в объеме 0,1 мл/10 г на протяжении 20 мин зарегистрировано в среднем 34,4±3,1 корчи. N-ацетил-L-пролин в дозах 100; 200; 400 и 800 мг/кг повышал порог болевой чувствительности животных, снижая количество корчей до 28,4±3,0; 30,8±3,9; 16,0±4,5; 1,4±1,4 соответственно.

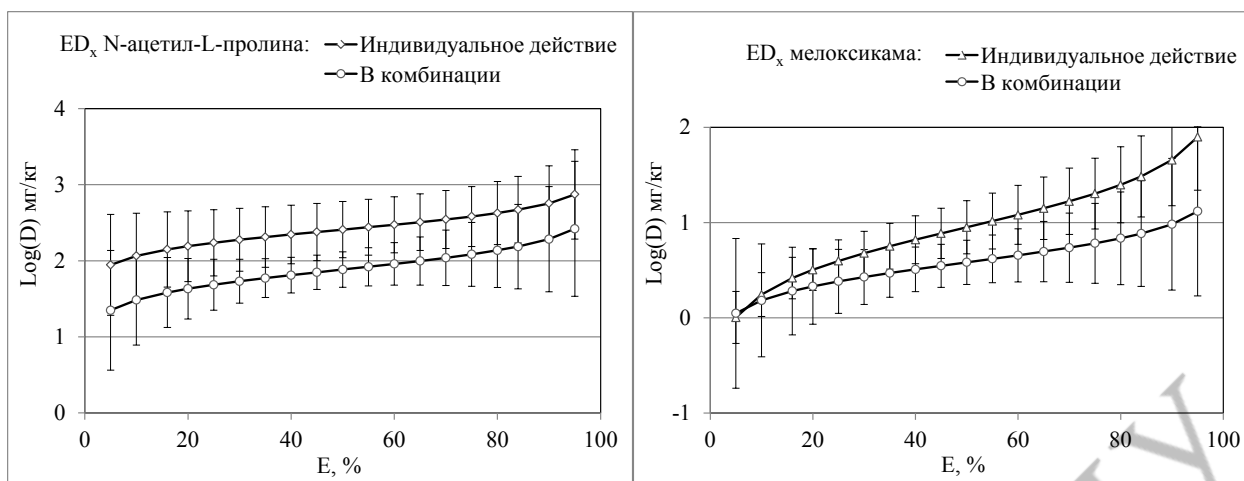


Среднее, стандартная ошибка, 95 % ДИ; n = 5.

* — $p < 0,05$ по критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с эффектом плацебо;

** — $< 0,05$ по критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с индивидуальными эффектами N-ацетил-L-пролина в дозах 100 и 200 мг/кг и мелоксикама в дозах 2,5; 5 мг/кг

Рисунок 4. — Влияние N-ацетил-L-пролина, мелоксикама и их комбинаторного сочетания на количество корчей, вызванных внутрибрюшинным введением раствора уксусной кислоты у мышей



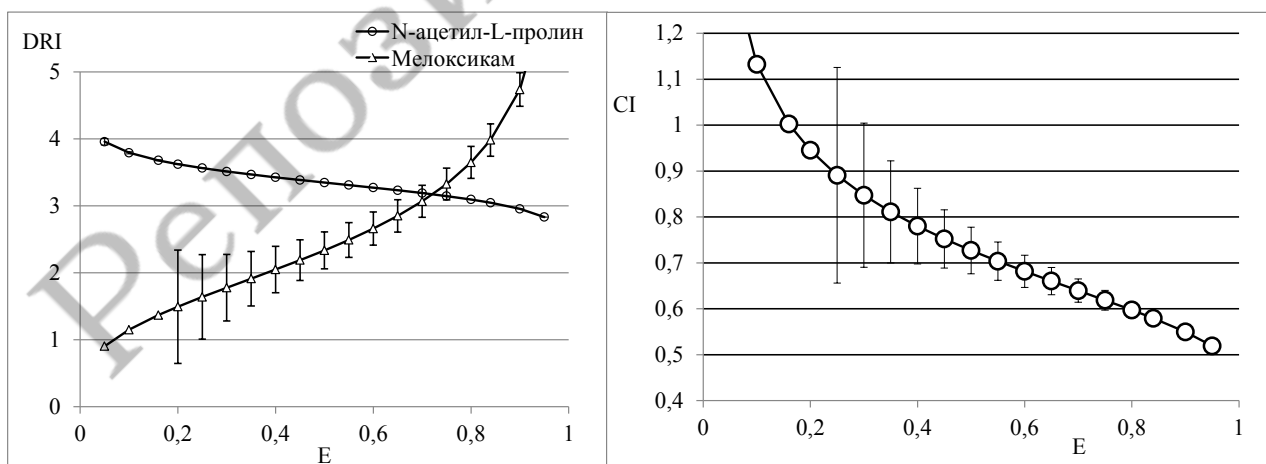
Показаны 95 % ДИ

Рисунок 5. — Кривые регрессии доза-анальгетический эффект при индивидуальном действии N-ацетил-L-пролина, мелоксикама и их комбинаторного сочетания в соотношении 20:1 в тесте уксуснокислых корчей у мышей

Эффект N-ацетил-L-пролина зависел от дозы, по уравнению регрессии (рисунок 5) составленному с точностью аппроксимации более 99,99 %, ED_{50} составляет 257 мг/кг. Индивидуальное действие мелоксикама на порог болевой чувствительности у мышей также зависело от дозы: 5 мг/кг — $31,0 \pm 0,8$; 7,5 мг/кг — $17,2 \pm 4,8$; 12,5 мг/кг — $10,2 \pm 1,5$ и 20 мг/кг — $7,6 \pm 2,2$ корчей. Расчетный параметр ED_{50} составил 9,0 мг/кг.

Комбинации N-ацетил-L-пролина и мелоксикама 100+2,5 и 100+5 ($15,4 \pm 1,6$ и $12,2 \pm 2,4$ корчи соответственно) статистически значимо повышали порог болевой чувствительности у мышей по сравнению с эффектом плацебо и результатом действия аналогичных доз компонентов при индивидуальном применении. Сочетания 50 мг/кг N-ацетил-L-пролина с 2,5 и 5 мг/кг мелоксикама также проявили некоторое анальгетическое действие ($24,6 \pm 2,1$ и $22,8 \pm 3,5$ корчи).

Математическое моделирование результатов совместного действия N-ацетил-L-пролина и мелоксикама показало, что благодаря аддитивному характеру взаимодействия компонентов комбинации доза N-ацетил-L-пролина в составе комбинаторного сочетания в 3–4 раза ниже дозы, вызывающей аналогичное индивидуальное действие (рисунок 6). В диапазоне ED_{16} - ED_{84} параметр DRI для мелоксикама составил 1,4–4,0, а ED_{50} препарата в комбинации в 2,3 раза меньше, чем при индивидуальном применении. Величина CI сочетания N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в соотношении 20/1 была в диапазоне 0,94–0,58, что соответствует слабому и умеренному фармакологическому синергизму. Среднеэффективные дозы комбинации проявляют умеренный синергизм (CI — 0,73).



DRI показывает, во сколько раз может быть снижена доза каждого компонента в синергичной комбинации для достижения эффекта, сопоставимого с индивидуальным действием препаратов.

Обозначены 95 % ДИ

Рисунок 6. — Индекс снижения анальгетической дозы (DRI) и комбинаторный индекс (CI) N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в комбинации 20/1 в тесте уксуснокислых корчей у мышей

Таким образом, результаты изучения анальгетических свойств комбинации N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в сочетаниях 20/1 и 40/1 показали аддитивный характер взаимодействия компонентов - препараты демонстрировали умеренный и сильный фармакологический синергизм.

Результаты нашего исследования согласуются с данными, полученными в серии исследований Н. А. Бизунок [7]. Автором показано, что мелоксикам, салициловая кислота и ацетилсалициловая кислота в диапазоне эффективных анальгетических и противовоспалительных концентраций оказывали умеренное стимулирующее действие на респираторный взрыв макрофагов, индуцированный зимозаном *in vitro*. N-ацетил-L-пролин в этих же условиях ингибировал продукцию супероксида, расчетная EC₅₀ составила 10⁻³ М, E_{max} — 72,6±5,9 %. Комбинация N-ацетил-L-пролина с мелоксикамом и N-ацетил-L-пролина с ацетилсалициловой кислотой в массовых соотношениях 10/1 полностью устранял стимулирующее действие обоих ингибиторов ЦОГ.

Полученные данные, с одной стороны, имеют ценность в качестве экспериментального обоснования приемлемости практического использования синергичной комбинации ненаркотических анальгетиков N-ацетил-L-пролина и мелоксикама. Другим важным результатом работы является анализ самого характера фармакологического взаимодействия атипичного НПВС N-ацетил-L-пролина и классического НПВС мелоксикама. «Нетипичность» N-ацетил-L-пролина как противовоспалительного средства заключается в уникальном спектре фармакологических свойств, в первую очередь, отсутствии у него жаропонижающего и гастропатического эффектов [3, 4]. Это позволило нам ранее высказать гипотезу о том, что механизм противовоспалительного и анальгетического действия N-ацетил-L-пролина не связан с ингибированием ЦОГ [4]. Данное предположение хорошо согласуется с результатами фармакологического взаимодействия N-ацетил-L-пролина с мелоксикамом на моделях болевой реакции. Подобный аддитивный характер сочетанного действия компонентов комбинации, проявляющийся фармакологическим синергизмом от умеренного до очень сильного, возможен только при одновременном выполнении ряда условий: когда агенты, в данном случае это N-ацетил-L-пролин и ингибитор ЦОГ-2 мелоксикам, имеют разные фармакодинамические мишени, не перекрывающийся соединением-конкурентом каскад амплификации сигнала и единый результат действия. В настоящем исследовании на примере фармакологического взаимодействия N-ацетил-L-пролина с мелоксикамом убедительно показана различная природа анальгетических эффектов субстанций.

Заключение. Комбинация N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в сочетаниях 20:1 и 40:1 на моделях тепловой иммерсии хвоста и перитовисцеральной боли у мышей обладает значительной анальгетической активностью. Эффект композиции превышает индивидуальное действие аналогичных доз компонентов, показан синергичный характер фармакологического взаимодействия атипичного НПВС N-ацетил-L-пролина и мелоксикама.

Литература

1. Противовоспалительные свойства N-ацетил-L-пролина / А. В. Волчек [и др.] // Рецепт. — 2007. — № 5. — С. 25–34.
2. Волчек, А. В. Анальгетические свойства N-ацетил-L-пролина / А. В. Волчек, Д. И. Романовский, Б. В. Дубовик // Рецепт. — 2007. — № 6. — С. 33–38.
3. Оценка ulcerогенного потенциала Оцедрола — НПВС из класса производных пролина / А. В. Волчек [и др.] // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы : Материалы междунар. конф. / Отв. ред. Е. Н. Смирнова. — Минск : БГУ, 2003. — С. 143–144.
4. Волчек, А. В. Влияние атипичного НПВС N-ацетил L-пролина на пирогеналовую лихорадку / А. В. Волчек, Б. В. Дубовик // Рецепт. — 2008. — № 2. — С. 49–54.
5. Le Bars, D. Animal models of nociception / D. Le Bars, M. Gozariu, S. W. Cadden // Pharmacol. Rev. — 2001. — Vol. 53, № 4. — P. 597–652.
6. Chou, T-Ch. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies / T-Ch. Chou // Pharmacol. Rev. — 2006. — Vol. 58, № 3. — P. 621–681.
7. Бизунок, Н. А. Фармакодинамические взаимодействия N-замещенных производных L-пролина и клеточных модуляторов разного типа действия на модели Fc-гамма-R-зависимого фагоцитоза / Н. А. Бизунок // Известия НАН Беларуси. — 2012. — № 2. — С. 53–62.

ANALGESIC PROPERTIES OF THE COMBINATION OF AN ATYPICAL NSAID N-ACETYL L-PROLINE AND MELOXICAM

Vauchok A. U., Dubovik B. V.

Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus

We investigated analgesic properties of the combination of meloxicam and atypical NSAIDs N-acetyl-L-proline (Groceprol®) for intragastric administration in the tail immersion test and visceral pain in mice. Shown

that the compounds interact additionally; this is typical of agents with different pharmacodynamic mechanisms of action. Established that a combination of N-acetyl-L-proline and meloxicam in a weight ratio of 40:1 and 20:1 demonstrate strong synergism, allowing to reduce the dose of the components in 4–20 times as compared with the effect of the drugs individually. The results of the study are experimental justification for the use of analgesics synergistic combination of N-acetyl-L-proline and meloxicam.

Keywords: N-acetyl-L-proline, acetyl proline, Groceprol, NSAID, meloxicam, analgesic, pain.

Поступила 18.07.2018