

# АНАЛЬГЕЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА АТИПИЧНОГО НПВС N-АЦЕТИЛ-L-ПРОЛИНА

Волчек А.В., Дубовик Б.В.

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Беларусь

Среди известных лекарственных средств наибольшей анальгетической эффективностью обладают наркотические анальгетики, действующие при болевом синдроме различной интенсивности и происхождения [6]. Однако, их применение сопровождается опасными побочными эффектами, включая лекарственную зависимость, угнетение дыхательного центра, тошноту и рвоту, повышение тонуса гладких мышц желудочно-кишечного тракта и мочевых путей [13]. Нежелательные эффекты опиоидов неотделимы от болеутоляющего действия и являются неотъемлемой частью фармакологического спектра этих соединений, их выраженность зависит от дозы анальгетика [11].

Для лечения легкого и умеренного болевого синдрома широко применяют ненаркотические анальгетики, относящиеся к нестероидным противовоспалительным средствам (НПВС) ингибиторам циклооксигеназы (ЦОГ). НПВС являются препаратами выбора при зубной боли, остеоартрозе, легких и средне-тяжелых травмах опорно-двигательного аппарата в спортивной медицине [9]. Они не влияют на дыхательный центр, не вызывают эйфории и лекарственной зависимости, но по анальгетической эффективности значительно уступают наркотическим анальгетикам [6, 9, 10]. Все представители класса НПВС – ингибиторов ЦОГ обладают сходными побочными эффектами, включая изъязвления слизистой желудка и нарушение функции почек [12].

В связи с тем, что применяемые в практике болеутоляющие средства обладают рядом неустраняемых недостатков и не удовлетворяют требованиям эффективности и безопасности, поиск новых эффективных и малотоксичных анальгетиков является актуальной задачей современной фармакологии.

В настоящем исследовании представлены результаты изучения анальгетических свойств N-ацетил-L-пролина (Гроцепрол®, Беларусь) –противовоспалительного лекарственного средства с нетипичным для НПВС – ингибиторов ЦОГ спектром фармакологической активности, включающим противовоспалительные [4], болеутоляющие свойства [1], при отсутствии гастротоксичности [3] и жаропонижающего действия [2]. В качестве препарата сравнения использовали прототип НПВС - ацетилсалициловую кислоту. В другой серии экспериментов оценивали результат фармакодинамического взаимодействия мелоксикама и N-ацетил-L-пролина.

**Материалы и методы.** Исследование проведено 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 300 нелинейных белых мышах-самцах массой 22-30 г. Субстанция N-ацетил-L-пролина для исследований представлена Институтом физико-органической химии НАН Беларуси, ацетилсалициловая кислота и мелоксикам приобретены в фирме Sigma Aldrich. Препараты суспензировали на 1% крахмальном геле и

вводили интрагастрально в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела. Контрольные животные получали эквивалентный объем растворителя.

Для оценки болеутоляющих свойств использовали следующие экспериментальные модели – тест тепловой иммерсии хвоста и реакцию висцеральной боли в тесте корчей, индуцированной внутрибрюшинным введением ирританта. Тест тепловой иммерсии хвоста основан на спинальном флексорном рефлексе в ответ на погружение хвоста в горячую воду, при этом происходит активация полимодальных ноцицепторов и их афферентных волокон С- и А $\beta$ -типа, а также высокопороговых механорецепторов [5]. Тест отличается стабильностью, информативностью, хорошей воспроизводимостью и является щадящей по отношению к животному моделью, позволяя оценить изменения болевой чувствительности на пороговом уровне [8]. Хвост мышей погружали до половины длины в воду температуры 48 $^{\circ}$ С, поддерживаемой с точностью 0,1 $^{\circ}$ С. Болевую чувствительность оценивали по латентному периоду реакции отдергивания хвоста, критерием анальгетического действия считали ее удлинение в опытных группах в сравнении с эффектом плацебо. Тест перитовисцеральной боли заключается в изменении чувствительности ноцицепторов С-волокон брюшины в присутствии альгогена [5]. Уксуснокислые корчи вызывали введением 0,6% раствора уксусной кислоты внутрибрюшинно в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела животного. Каолиновые корчи инициировали введением 3% суспензии каолина в объеме 0,2 мл/10 г массы. Учитывали суммарное количество корчей - непроизвольного спазма абдоминальной мускулатуры, прогибания спины и вытягивания задних конечностей, наблюдаемых в течение 20 минут после введения альгогена.

Субстанции вводили за 30-40 минут до проведения тестов в следующих дозах: N-ацетил-L-пролин 100, 200, 400, 800 мг/кг; ацетилсалициловую кислоту 100, 200, 400 мг/кг; мелоксикам 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5, 7.5, 12.5, 20 мг/кг. Исследованы 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 их анальгетической активности.

Анальгетическую эффективность оценивали по способности препаратов уменьшать количество корчей по сравнению с контрольной группой, и рассчитывали по формуле:

$$AЭ = (Cк - Cо) / Cк \times 100\% \quad (1),$$

где: AЭ – анальгетическая эффективность в %, Cк – среднее количество корчей в контрольной группе, Cо – среднее количество корчей в опытной группе.

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

Анализ фармакодинамического взаимодействия препаратов выполнен по методике T.Chou [7] с использованием вычислительных возможностей компьютерной программы Microsoft Excel. Методом регрессионного анализа определяли эффективные дозы (ED<sub>16</sub>-ED<sub>84</sub>) индивидуальных субстанций и их комбина-

торного сочетания. Уравнение регрессии считали качественным при ошибке аппроксимации данных менее 15%.

Индекс снижения дозы (DRI) каждого компонента комбинации рассчитывали по формуле:

$$DRI = D_x / D \quad (2),$$

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:

$$CI = (1/DRI_1) + (1/DRI_2) \quad (3),$$

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 [7]:  $CI < 0,1$  – 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.** На модели термоболевого раздражения у мышей установлено, что N-ацетил-L-пролин обладает существенным, сравнимым с ацетилсалициловой кислотой, анальгетическим эффектом (таблица 1).

Таблица 1

Влияние N-ацетил-L-пролина и ацетилсалициловой кислоты на латентный период термоболевого реакции у мышей (в секундах)

Вещества	Дозы, мг/кг					
	Стат. показатель	Плацебо	100	200	400	800
Эксперимент 1						
N-ацетил-L-пролин	M	7,00	8,80	18,40*	20,40*	16,60*
	SD	3,54	3,90	5,32	12,01	6,66
Ацетилсалициловая кислота	M	-	8,80	19,00*	15,50*	-
	SD	-	3,11	6,20	4,64	-
Эксперимент 2						
N-ацетил-L-пролин	M	4,40	4,00	5,00	12,20*	11,80*
	SD	1,14	1,00	2,35	3,83	2,17
Ацетилсалициловая кислота	M	-	5,00	7,60	9,20*	-
	SD	-	1,00	2,30	2,17	-

\*Достоверное различие с плацебо ( $P < 0.05$  по критерию Даннета);

N-ацетил-L-пролин в дозах 100-200 мг/кг снижает чувствительность к болевому раздражению у мышей, пик анальгезии (2-3-кратное повышение

болевого порога) достигается при 400 мг/кг. Эффект носит насыщающий характер и при дальнейшем повышении дозы вещества существенно не возрастает. Аналогичная насыщающая зависимость доза-эффект характерна и для ацетилсалициловой кислоты (таблица 2). N-ацетил-L-пролин на модели термоболевого раздражения равноэффективен ацетилсалициловой кислоте по критерию ED<sub>50</sub> и оказывает равный ей максимальный анальгетический эффект, проявляющийся 2-3-кратным увеличением порога болевой чувствительности.

Таблица 2

Среднеэффективные дозы N-ацетил-L-пролина и ацетилсалициловой кислоты (ED<sub>50</sub>), рассчитанные по критерию удвоения порога термоболевого чувствительности у мышей

Вещества	ED <sub>50</sub> , мг/кг	Доверительный интервал	
N-ацетил-L-пролин	215	200	230
Ацетилсалициловая кислота	205	190	220

На моделях болевого раздражения брюшины ирритантами показано, что N-ацетил-L-пролин обладает существенным, сравнимым с ацетилсалициловой кислотой, анальгетическим эффектом (таблица 3). В дозах 400 и 800 мг/кг N-ацетил-L-пролин статистически достоверно (p<0,05 по критерию Дункана) уменьшал количество «корчей», вызываемых альгогенами. Расчетная ED<sub>50</sub> N-ацетил-L-пролина на модели уксуснокислых корчей составила 370 мг/кг (для ацетилсалициловой кислоты – 180 мг/кг), каолиновых «корчей» – около 200 мг/кг (ацетилсалициловая кислота – более 400 мг/кг).

Таблица 3

Влияние N-ацетил-L-пролина и ацетилсалициловой кислоты на болевую реакцию корчей у мышей. Анальгетическая эффективность (АЭ), количество корчей.

Препарат	Доза, мг/кг	АЭ, %	Корчи
			М ± SD
Ирритант – 0,6% р-р уксусной кислоты, n=6			
Плацебо	-	-	37,4 ± 3,4
Ацетилсалициловая кислота	100	27	27,4 ± 4,4
	200	43	21,4 ± 8,5
	400	80*	7,6 ± 4,3*
N-ацетил-L-пролин	100	24	28,4 ± 3,0
	200	18	30,8 ± 3,9
	400	57*	16,0 ± 4,5*
	800	96*	1,4 ± 1,4*
Ирритант – 3% суспензия каолина, n=8			
Плацебо	-	-	7,6 ± 0,9
Ацетилсалициловая кислота	200	38	4,8 ± 1,1
	400	31	5,3 ± 1,3
N-ацетил-L-пролин	100	3	7,4 ± 2,3
	200	62*	2,9 ± 0,7*
	400	66*	2,6 ± 1,0*

Примечание: \* - p<0,05 в сравнении с плацебо.

При изучении влияния мелоксикама, N-ацетил-L-пролина и их комбинации на порог термоболевого чувствительности у мышей в тесте тепловой им-

мерсии хвоста установлено, что 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 ( $5,2 \pm 0,4$  с и  $6,1 \pm 1,1$  с). Регрессионный анализ показал дозозависимый характер изменения порога болевой чувствительности у мышей, получавших N-ацетил-L-пролин, при приемлемом уровне ошибки аппроксимации данных (менее 15%, см. рисунок 1).

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).

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 контролем повышали латентный период термоболовой реакции у мышей в 1,8 и 2,1 раза соответственно ( $7,9 \pm 1,3$  с 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 анальгетического эффекта доз N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в составе комбинаторного сочетания в соотношении 40/1, полученные путем аппроксимации данных, представлены на рисунке 1.

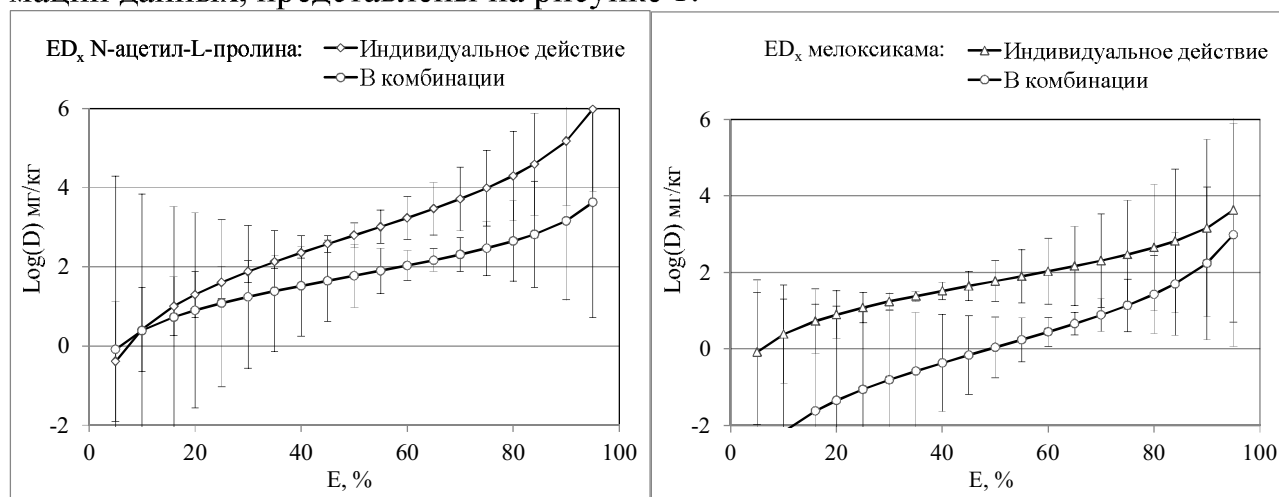


Рисунок 1.

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.

Показаны 95% доверительные интервалы.

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  $ED_{50}$  препарата в комбинации в 25,5 раз меньше, чем при индивидуальном применении. Среднеэффективная анальгетическая доза N-ацетил-L-пролина в комбинаторном сочетании с мелоксика-

мом может быть снижена примерно в 10 раз по сравнению с индивидуальным действием препарата. В диапазоне эффективных доз ED<sub>16</sub>-ED<sub>84</sub> DRI N-ацетил-L-пролина повышался от 1,88 до 58,8. Во всем диапазоне кривых доза-эффект, комбинация демонстрирует однонаправленный характер взаимодействия. Показатель комбинаторного индекса (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 [7], может быть охарактеризовано как выраженный синергизм. Среднеэффективные дозы комбинации проявляют сильный синергизм (CI составляет 0,13).

Изучение действия мелоксикама, N-ацетил-L-пролина и их комбинации на порог болевой чувствительности в тесте перитовисцеральной боли «уксуснокислые корчи» показало, что в контрольной группе мышей после внутрибрюшинного введения 0,6% раствора уксусной кислоты в объеме 0,1 мл / 10 г на протяжении 20 минут зарегистрировано в среднем 34,4±3,1 корчей. 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. Эффект препарата зависел от дозы, по уравнению регрессии (рисунок 2), составленному с точностью аппроксимации более 99,99%, ED<sub>50</sub> N-ацетил-L-пролина составляет 257 мг/кг. Индивидуальное действие мелоксикама на порог болевой чувствительности у мышей также зависело от дозы: 5 мг/кг – 31,0±0,8; 7,5 мг/кг – 17,2±4,8; 12,5 мг/кг – 10,2±1,5 и 20 мг/кг – 7,6±2,2 корчей. Расчетный параметр ED<sub>50</sub> составил 9,0 мг/кг.

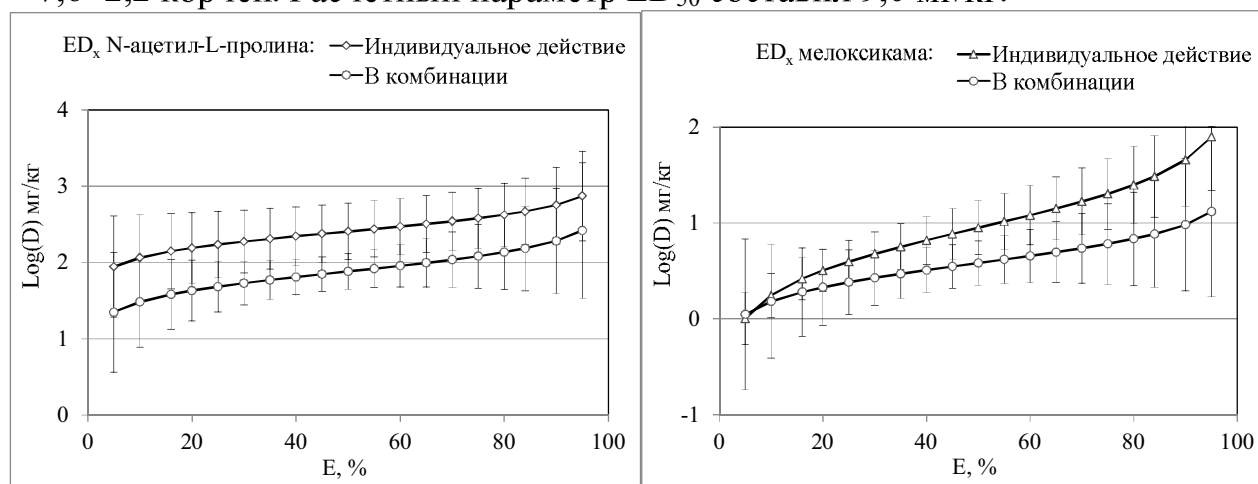


Рисунок 2.

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.

Показаны 95% доверительные интервалы.

Комбинации N-ацетил-L-пролина и мелоксикама 100+2,5 и 100+5 (15,4±1,6 и 12,2±2,4 корчей 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±2,1 и 22,8±3,5 корчей).

Математическое моделирование по T.Chou результатов совместного действия N-ацетил-L-пролина и мелоксикама показало, что доза N-ацетил-L-пролина в составе комбинаторного сочетания может быть снижена в 3-4 раза относительно дозы, вызывающей аналогичное индивидуальное действие (рисунок 3). В диапазоне ED<sub>16</sub>-ED<sub>84</sub> параметр DRI для мелоксикама составил 1,4-4,0, а ED<sub>50</sub> 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 составляет 0,73).

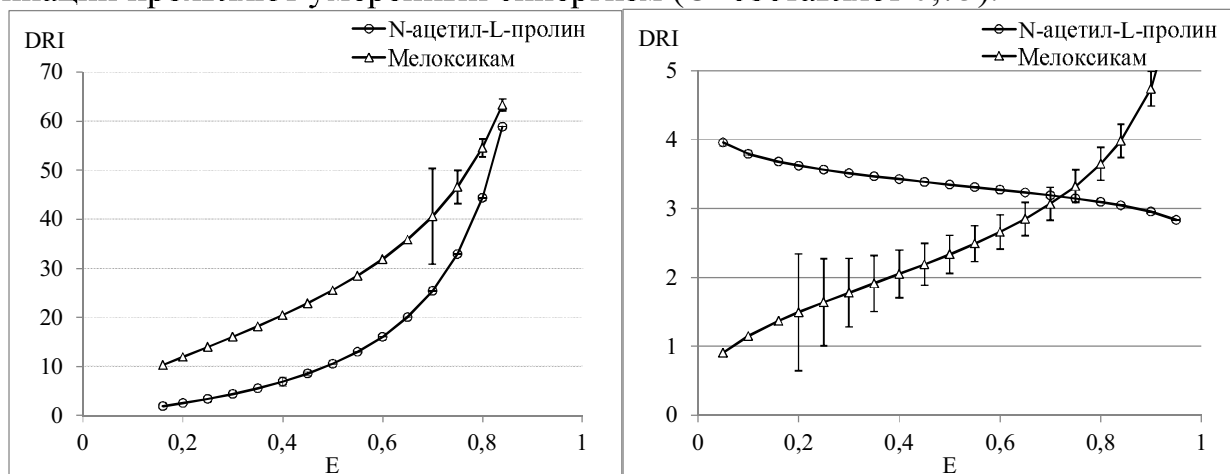


Рисунок 3.

Индексы снижения анальгетической дозы (DRI) N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в комбинации 40/1 в тесте тепловой иммерсии хвоста (слева) и в сочетании 20/1 в тесте уксуснокислых корчей (справа) у мышей.

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

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. В нашем исследовании препараты демонстрировали умеренный и сильный фармакологический синергизм. Полученные данные 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 препарата жаропонижающего и гастропатического эффектов [3, 2]. Это позволило предположить, что механизм противовоспалительного и анальгетического действия N-ацетил-L-пролина не связан с ингибированием ЦОГ [2]. Данное предположение хорошо согласуется с результатами фармакологического взаимодействия N-ацетил-L-пролина с ме-

локсикамом 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 препараты, 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.

### Выводы

N-ацетил-L-пролин в опытах на мышах при введении внутрь обладает выраженным анальгетическим действием в различных экспериментальных тестах, включая реакцию отдергивания хвоста при термоболевом раздражении, болевую реакцию «корчей», индуцированных внутрибрюшинным введением ирритантов (уксусной кислоты, каолина). По болеутоляющей эффективности на данных моделях N-ацетил-L-пролин сопоставим с ацетилсалициловой кислотой и может рассматриваться как потенциальное анальгетическое средство.

N-ацетил-L-пролин и мелоксикам в комбинаторных сочетаниях 20/1 и 40/1 на моделях тепловой иммерсии хвоста и перитовисцеральной боли у мышей обладает значительной анальгетической активностью. Эффект комбинации превышает индивидуальное действие аналогичных доз компонентов.

### Литература

1. Волчек, А.В. Анальгетические свойства N-ацетил-L-пролина / А.В. Волчек, Д.И. Романовский, Б.В. Дубовик // Рецепт (Recipe). – 2007. – №6 (56). – С. 33-38.
2. Волчек, А.В. Влияние атипичного НПВС N-ацетил L-пролина на пирогеналовую лихорадку / А.В. Волчек, Б.В. Дубовик // Рецепт (Recipe). – 2008. – №2 (58). – С. 49-54.
3. Волчек, А.В. Оценка ульцерогенного потенциала Оцепрола – НПВС из класса производных пролина / А.В. Волчек, Б.А. Волынец, Д.И. Романовский, З.И. Куваева, Б.В. Дубовик // 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. Противовоспалительные свойства N-ацетил-L-пролина / А.В. Волчек, М.Б. Бокова, Д.И. Романовский, Б.В. Дубовик // Рецепт (Recipe). – 2007. – №5 (55). – С. 25-34.
5. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
6. American Society for Pain Management Nursing position statement with clinical practice guidelines: authorized agent controlled analgesia / MF. Cooney [et al.] // Pain Manag Nurs. – 2013. – Vol. 14. – pp. 176-181.
7. Chou T-Ch. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacological reviews, 2006 vol. 58, pp. 621–681.



8. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacological reviews*, 2001 vol. 53, pp. 597–652.
9. Nonopioid analgesics / MA. Munir [et al.] // *Anesthesiology Clinics*. – 2007. – Vol. 25. – pp. 761-774.
10. Opioid use for chronic low back pain: A prospective, population-based study among injured workers in Washington state / G. Franklin [et al.] // *Clin J Pain*. – 2009. – Vol. 25. – pp. 743—751.
11. Pasero, C. *Pain Assessment and Pharmacologic Management* / C. Pasero, M. McCaffery. - St. Louis: Mosby Elsevier, 2011. - pp. 277-622.
12. Rainsford, K.D. *Aspirin and Related Drugs* / K.D. Rainsford. – London, 2004. – pp. 388-575.
13. Side effects of opioids during shortterm administration: effect of age, gender and race / MS. Cepeda [et al.] // *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. – 2003. – Vol. 74. – pp. 102-112.