

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE



*„Evaluarea potențialului antihiperalgic al unor
asocieri fixe de substanțe active”*

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. SIMONA NEGREȘ

Student-doctorand:

CIPRIAN PUȘCAȘU

BUCUREȘTI

2023

Cuprinsul tezei de doctorat

Introducere	10
I. Partea generală	14
1. Aspecte fiziopatologice generale ale durerii neuropate.....	14
1.1. Definiția durerii neuropate.....	14
1.2. Durerea neuropată: clasificare, cauze.....	14
1.3. Prevalența durerii neuropate.....	15
1.4. Simptomele durerii neuropate.....	16
1.5. Diagnosticul durerii neuropate.....	17
1.5.1. Percepții senzoriale anormale-indiciu în diagnosticul durerii neuropate.....	17
1.5.2. Instrumente de screening.....	18
1.6. Mecanismele implicate în apariția durerii neuropate.....	19
1.6.1. Sensibilizarea periferică.....	19
1.6.1.1. Sensibilizarea și activitatea ectopică la nivelul nociceptorilor aferenți primari.....	19
1.6.1.2. Afectarea canalelor ionice.....	20
1.6.2. Sensibilizarea centrală.....	21
1.6.2.1. Sensibilizare la nivelul măduvei spinării.....	21
1.6.2.2. Sistemul glutamatergic spinal – fenomenul „wind-up”.....	21
1.6.2.3. Citokinele proinflamatorii și activarea celulelor gliale.....	22
1.6.2.4. Modificări fenotipice.....	23
1.6.2.5. Dezinhibiția la nivelul măduvei spinării.....	23
1.6.2.6. Mecanisme la nivel suprasinal.....	24
1.7. Diferite tipuri de neuropatie.....	25
1.7.1. Neuropatia asociată infecției cu HIV.....	25
1.7.2. Nevralgia postherpetică.....	25
1.7.3. Nevralgia de trigemen.....	26
1.7.4. Durerea neuropată indusă de chimioterapice.....	27
1.7.5. Durerea neuropată din sindromul membrului fantomă.....	28
1.7.6. Neuropatia diabetică.....	29
1.7.6.1. Definiție, incidență, clasificare.....	29
1.7.6.2. Caracteristicile clinice ale polineuropatiei diabetice nedureeroase.....	29
1.7.6.3. Caracteristicile clinice ale polineuropatiei diabetice dureroase.....	31
1.7.6.4. Factori de risc.....	32
1.7.6.5. Fiziopatologia neuropatiei diabetice.....	32

1.7.6.5.1. Hiperglicemia și hiperlipidemia	32
1.7.6.5.2. Modificări la nivel microvascular.....	33
1.7.6.5.3. Tulburări ale căilor de semnalizare a insulinei	33
2. Abordarea terapeutică în durerea neuropată.....	35
II. Contribuții personale	39
3. Ipoteză de lucru și obiective generale.....	39
4. Investigarea potențialului antihiperalgic pentru diferite doze	42
de sildenafil și metformin în neuropatia diabetică indusă de aloxan la șoarece	42
4.1. Introducere.....	42
4.2. Materiale și metode	43
4.2.1. Animale de experiență.....	43
4.2.2 Substanțe.....	43
4.2.3. Determinarea dozei de aloxan pentru inducerea diabetului.....	43
4.2.4. Evaluarea potențialului antihiperalgic al sildenafilului și metforminului	44
4.2.5. Hipersensibilitatea la rece.....	44
4.2.5.1 Testul acetonei.....	44
4.2.5.2 Testul retragerii cozii.....	45
4.2.6. Hipersensibilitatea la cald.....	46
4.2.6.1 Testul Hot-plate	46
4.2.7. Teste de sânge.....	47
4.2.7.1. Concentrația de glucoză din sânge	47
4.2.7.2. Nivelurile fructozaminei și hemoleucograma.....	47
4.2.8. Determinarea DE50	47
4.2.9. Analiză statistică.....	48
4.3. Rezultate	48
4.3.1. Determinarea dozei de aloxan pentru inducerea diabetului.....	48
4.3.1.1. Determinarea concentrației de glucoză din sânge	51
4.3.1.2. Hipersensibilitatea la rece.....	53
4.3.1.3. Hipersensibilitatea la cald.....	53
4.3.2. Evaluarea potențialului antihiperalgic al sildenafilului și metforminului	54
4.3.2.1. Hipersensibilitatea la cald.....	54
4.3.2.2. Hipersensibilitatea la rece.....	55
4.3.2.3. Teste de sânge.....	57
4.3.2.3.1. Concentrația de glucoză din sânge	57

4.3.2.3.2. Nivelurile fructozaminei și hemoleucograma.....	59
4.3.3. Determinarea DE50	62
4.4. Discuții.....	63
4.5. Concluzii.....	70
5. Influența asocierii sildenafil-metformin asupra hiperalgeziei și markerilor biochimici în neuropatia diabetică la șoarece	71
5.1. Introducere.....	71
5.2. Materiale și metode	72
5.2.1. Animale de experiență.....	72
5.2.2 Substanțe.....	73
5.2.3. Inducerea diabetului zaharat.....	73
5.2.4 Concentrația de glucoză din sânge	74
5.2.5. Teste pentru evaluarea efectului antihiperlagic	74
5.2.5.1. Hipersensibilitatea la cald.....	74
5.2.5.2. Hipersensibilitatea la rece.....	74
5.2.6. Analiza biochimică a omogenatelor din creier și ficat	75
5.2.6.1. Evaluarea TNF- α și IL-6.....	75
5.2.6.2. Evaluarea activității NOS	76
5.2.6.3. Conținutul de proteine	76
5.2.7. Analiză statistică.....	76
5.3. Rezultate	77
5.3.1 Concentrația de glucoză din sânge	77
5.3.2 Teste pentru evaluarea efectului antihiperlagic	78
5.3.2.1. Hipersensibilitatea la cald.....	78
5.3.2.2. Hipersensibilitatea la rece.....	79
5.3.3 Analiza biochimică a omogenatelor din creier și ficat	82
5.3.3.1. Evaluarea TNF- α și IL-6	82
5.3.3.2. Evaluarea activității NOS	83
5.4. Discuții.....	86
5.5. Concluzii.....	92
6. Evaluarea sinergismului asocierii dintre sildenafil și metformin într-un model animal de neuropatie diabetică indusă de aloxan	94
6.1. Introducere.....	94
6.2. Materiale și metode	94
6.2.1. Teste pentru evaluarea efectului antihiperlagic	94

6.2.2. Evaluarea sinergismului dintre sildenafil și metformin.....	95
6.2.3. Preprocesarea datelor.....	95
6.2.4. Implementarea propriu-zisă a algoritmului de evaluare a sinergismului	96
6.3. Rezultate	98
6.4. Discuții.....	101
6.5. Concluzii.....	104
7. Predicția DE50 pentru asocierea sildenafil-metformin într-un model animal de neuropatie diabetică indusă de aloxan la șobolan.....	105
7.1. Introducere.....	105
7.2. Materiale și metode	105
7.2.1. Substanțe.....	105
7.2.2. Animalele de experiență	106
7.2.3. Inducerea diabetului zaharat.....	106
7.2.4. Concentrația glucozei în sânge	107
7.2.5. Teste pentru evaluarea efectului antihiperalgic	107
7.2.5.1. Hipersensibilitatea la cald.....	107
7.2.5.2. Hipersensibilitatea la rece.....	107
7.2.5.3. Hipersensibilitatea tactilă	108
7.2.6. Analiza biochimică a omogenatelor din creier și ficat	109
7.2.6.1. Evaluarea TNF- α și IL-6.....	109
7.2.6.2. Evaluarea activității NOS	109
7.2.6.3. Evaluarea tiolilor totali	109
7.2.6.4. Conținutul de proteine	109
7.2.7. Analiză statistică.....	110
7.3. Rezultate	110
7.3.1 Concentrația glucozei în sânge	110
7.3.2. Teste pentru evaluarea efectului antihiperalgic	112
7.3.2.1. Hipersensibilitatea la cald.....	112
7.3.2.2. Hipersensibilitatea la rece.....	113
7.3.2.3. Hipersensibilitatea tactilă	115
7.3.3. Evaluarea TNF- α și IL-6	117
7.3.4. Evaluarea activității NOS	119
7.3.4. Evaluarea tiolilor totali	119
7.4. Discuții.....	122
7.5. Concluzii.....	128

Concluzii și contribuții personale	129
Bibliografie	133
Anexe	151

Abrevieri și simboluri

AAN	Academia Americană de Neurologie
Acetil~CoA	Acetil~Coenzima A
ADN	Acid dezoxiribonucleic
AGE	Produși avansați de glicație
AMPc	Adenozin monofosfat ciclic
AMPK	Proteinkinaza activată de adenozin monofosfat
Ang 1	Angiopietina 1
ARN	Acid ribonucleic
ARNm	Acid ribonucleic mesager
ATC	Antidepresive triciclice
ATP	Adenozin trifosfat
COX-2	Ciclooxigenază-2
DE₅₀	Doza eficace 50
DE	Disfuncție erectilă
DN4	Chestionarul <i>Douleur Neuropathique 4</i>
DPN	Neuropatia diabetică periferică
EFNS	Federația Europeană a Societăților de Neurologie
G	Gabapentin
GABA	Acid gamma-aminobutiric
GBN	Gabapentin
Glucozamină-6-P	Glucozamină-6-fosfat
GMPc	Guanosin monofosfat ciclic
GSH	Glutation intracelular redus
Hb	Hemoglobină
HbA1c	Hemoglobină glicozilată
Hct	Hematocrit
HDL	Lipoproteine de înaltă densitate
HIV	Virusul imunodeficienței umane

i.p.	intraperitoneal
IASP	Asociația Internațională pentru Studiul Durerii
IGF	Factorul de creștere asemănător insulinei
IHS	Societatea Internațională a Cefaleei
IL-1β	Interleukina 1 β
IL-6	Interleukina 6
iNOS	Nitric oxid sintetaza inductibilă
ISRN	Inhibitoare neselective ale recaptării noradrenalinei și serotoninei
LANSS	Scala <i>Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs</i>
LDL	Lipoproteine de joasă densitate
M	Metformin
MD	Lot martor diabetic
MPV	Volumul mediu al trombocitelor
mTORC1	Ținta complexului de rapamicină 1
NEFA	Acizi grași neesterificați (liberi)
NF-κB	Factor nuclear kappa al celulelor B
NGF	Factorul de creștere a nervilor
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO	Oxid nitric
NOS	Nitric oxid sintetaza
NPIC	Neuropatia periferică indusă de chimioterapie
OD	Densitate optică
OMS	Organizația Mondială a Sănătății
ORL 1	Receptorul 1 de lipoproteină oxidată cu densitate joasă
PDE 5	Fosfodiesteraza 5
PG	Prostaglandine
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2α	Prostaglandina F2 α
PGI2	Prostaglandina I2
PPARγ	Receptorul gamma activat de proliferator de peroxizomi
RAGE	Receptorul specific al produșilor finali de glicajie avansată

RBC	Eritrocite
ROS	Specii reactive de oxigen
S	Sildenafil
S.E.M.	Eroarea standard a mediei
S-LANSS	Auto-raportare a pacientului a scalei <i>Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs</i>
SNC	Sistem nervos central
TLR4	Receptorul Toll-like 4
TNF-α	Factorul de necroză tumorală α
TRPV1	Receptorul de potențial temporar vanilloid 1
TTX	Tetrodotoxina
UDP-GlcNAc	Uridin difosfat N-acetilglucozamină
VEGF	Factorul de creștere endotelial vascular
WBC	Leucocite

Introducere

Potrivit OMS, diabetul zaharat este „o boală metabolică cronică, caracterizată prin creșterea nivelului de glucoză în sânge, care conduce în timp, la afecțiuni grave ale nervilor, rinichilor, inimii, vaselor de sânge și ochilor”. Neuropatia este una dintre complicațiile pe termen lung atât ale diabetului de tip 1, cât și ale diabetului de tip 2 și se caracterizează prin durere, pierderi senzoriale, care afectează calitatea vieții și duc chiar la amputarea membrelor. La nivel mondial, Federația Internațională a Diabetului estimează că 537 de milioane de oameni suferă de diabet, iar dintre aceștia, cel puțin 50% dezvoltă neuropatia diabetică în timp.

În prezent, neuropatia diabetică se dovedește a fi dificil de tratat eficient și produce degradări semnificative ale calității vieții, împreună cu o povară economică substanțială. Pentru tratamentul acestei complicații sunt disponibile puține strategii terapeutice, care cu succes limitat în atenuarea durerii. Conform Ghidurilor Federației Europene a Societăților de Neurologie (EFNS) și Academiei Americane de Neurologie (AAN), terapia neuropatiei diabetice include ca tratament de primă linie antidepressivele triciclice (amitriptilina), gabapentinoidele (gabapentin și pregabalin) și inhibitoarele neselective ale recaptării adrenalinei și noradrenalinei (duloxetina și venlafaxina). Ca terapie de linie a doua poate fi utilizat tramadolul, iar dacă se preferă tratament topic se utilizează capsaicina. Opioidelor forte (morfină și oxycodona) sunt recomandate ca agenți de linie a 3-a datorită potențialului crescut de abuz.

Marea varietatea de mecanisme fiziopatologice implicate în dezvoltarea și progresia neuropatiei diabetice face dificilă proiectarea de strategii terapeutice eficiente. Prin urmare, în nevoia de a descoperi noi substanțe active cu eficacitate îmbunătățită și mai puține reacții adverse în această teză de doctorat, ne-am propus să investigăm efectele a două medicamente utilizate deja pentru tratamentul hiperglicemiei sau pentru complicațiile induse de aceasta pe termen lung. Astfel, ipoteza de cercetare a pornit de la următoarele considerente:

- sildenafilul, un inhibitor al PDE-5, utilizat pentru tratamentul disfuncției erectile în diabetul zaharat, poate avea efect benefic în neuropatia diabetică, deoarece îmbunătățește funcția neurovasculară prin creșterea semnificativă a numărului de vase de sânge funcționale și a fluxului sanguin regional în nervul sciatic (această ipoteză este

susținută și de datele din literatură care au semnalat faptul că pacienții diabetici cu disfuncție erectilă tratați cu sildenafil au prezentat simptome reduse ale neuropatiei);

- metforminul este un agent antihyperglicemiant recomandat ca primă linie de ghidurile în vigoare (Asociația Americană de Diabet (2021) și Asociația Europeană pentru Studiul Diabetului (2021) care ameliorează durerea prin activarea proteinkinazei activate de către adenozin monofosfat (AMPK), considerată țintă pentru tratamentul durerii.

Obiectivele generale ale cercetării au fost următoarele:

- Validarea metodei de inducere a neuropatiei diabetice prin administrarea de aloxan la șoarece, concomitent cu monitorizarea valorilor glicemiei și a parametrilor sanguini;
- Determinarea potențialului antihyperalgic în diferite teste farmacologice experimentale pentru compușii selectați pentru evaluare în modelul de neuropatie diabetică la șoarece. S-a determinat activitatea celor două substanțe active administrate individual, dar în asociere, utilizând diferite doze. În paralel s-a urmărit și determinarea din sânge a fructozaminei și a parametrilor hematologici, alături de markerii biochimici obținuți pe omogenate din creier și ficat;
- Pentru sildenafil și metformin au fost determinate dozele eficiente 50% (DE₅₀) pentru tratamentul neuropatiei diabetice la șoarece;
- Evaluarea sinergismului de acțiune dintre sildenafil și metformin asupra neuropatiei diabetice la șoarece și șobolan.

I. Partea generală

1. Aspecte fiziopatologice generale ale durerii neuropate

Asociația Internațională pentru Studiul Durerii (IASP) definește durerea neuropată ca fiind o „durere cauzată de o leziune sau o boală a sistemului nervos” [1]. Durerea neuropată este caracterizată ca fiind constantă sau intermitentă, spontană sau provocată și este descrisă ca arsură, înțepătură, furnicătură, mâncărime, junghi. Poate fi însoțită de alodinie (aparitia senzației de durere la un stimul non dureros) sau hiperalgezie (exagerarea senzației de durere) [2]. Durerea neuropată se clasifică în centrală sau periferică în funcție de localizare.

Diagnosticul durerii neuropate poate fi o adevărată provocare, având în vedere asocierea sa cu alte afecțiuni și absența unui metode standard de diagnostic. Așadar, deloc surprinzător,

poate fi dificil de tratat eficient, fiind asociată cu deteriorări semnificative ale calității vieții și o povară economică substanțială [2].

Conform celor mai recente studii, prevalența durerii neuropate variază astfel:

- a) Europa-7,7% ;
- b) Australia-7% ;
- c) Statele Unite ale Americii-5% [2].

De obicei, simptomele senzoriale negative și pozitive coexistă în durerea neuropată. Simptomele negative includ atenuarea diferitelor calități somatosenzoriale, cum ar fi hipoestezia tactilă sau anestezia, hipoestezia termică, hipoalgezia și pierderea senzației vibratorii. Aceste simptome produc disconfort, dar nu sunt dureroase. Pe lângă simptomele negative, pot apărea simptome pozitive spontane, cum ar fi parestezia și disestezia, durerea paroxistică și durerea superficială continuă. Alte simptome pozitive includ hiperalgezia și alodinia, fiind provocate de diverși stimuli [3].

Diabetul și complicațiile sale reprezintă provocări majore, în creștere pentru sistemele de sănătate din întreaga lume. Potrivit Federației Internaționale de Diabet, 425 de milioane de persoane din întreaga lume cu vârsta ≥ 20 de ani au avut diabet în 2017, iar acest număr este de așteptat să crească la 629 de milioane până în 2045 [3].

Neuropatia diabetică reprezintă o problemă comună și, până de curând, în mare măsură neglijată, care afectează aproximativ 50% dintre pacienții cu diabet la un moment dat [4-7]. Neuropatia diabetică poate fi definită ca „prezența simptomelor și/sau semnelor datorate disfuncției nervilor periferici la persoanele cu diabet zaharat după excluderea altor cauze” [7]. O problemă majoră a neuropatiei diabetice este că, odată ce s-a dezvoltat și au apărut complicațiile, este dificil de tratat, iar pacienții se confruntă cu un risc crescut de amputații și cu o mortalitate crescută [8-11].

Nivelurile HbA1c și durata diabetului zaharat, alături de alți factori metabolici, precum hipertensiunea arterială și rezistența la insulină, sunt predictorii ai neuropatiei diabetice. De asemenea, numeroase studii au evidențiat prezența obezității la pacienții cu neuropatie, dar și hipertrigliceridemia și nivelurile scăzute de lipoproteine de înaltă densitate (HDL), în special la pacienții cu diabet zaharat de tip 2. Pe lângă acești factori, fumatul, alcoolul și vârsta înaintată contribuie la progresia neuropatiei diabetice [12-14].

Pentru o viziune mai bună asupra apariției și progresiei neuropatiei diabetice, este esențială descrierea procesului prin care este produsă energie de către sistemul nervos periferic prin utilizarea substraturilor. În diabet, sistemul de transport al acizilor grași cu catenă lungă în celulele Schwann devine saturat și moleculele de acetil-CoA (acetil coenzima A) sunt transformate în acilcarnitină, care este toxică atât pentru celulele Schwann, cât și pentru neuronii din ganglionul rădăcinii dorsale, contribuind la dezvoltarea neuropatiei diabetice împreună cu afectarea nervilor [15]. Nivelurile crescute de glucoză conduc la metabolizarea glucozei prin una sau mai multe căi de metabolizare, cum ar fi calea poliolor și calea hexozaminei, ceea ce duce la creșterea ROS și, respectiv, a inflamației, în mare parte din cauza disfuncțiilor mitocondriale [16], care contribuie la afectarea continuă a sistemului nervos.

Deși multe studii sugerează că nu apar modificări ale fluxului sanguin asociate neuropatiei diabetice, la nivelul nervilor periferici apare o circulație sanguină deficitară care poate contribui la progresia neuropatiei diabetice. Circulația slabă de la nivel microvascular conduce la leziuni suplimentare ale nervilor periferici, asociate cu disfuncții ale acestora. Diabetul cauzează ischemia fibrelor nervoase ceea ce determină creșterea densității capilarelor endoneuriale [17].

2. Abordarea terapeutică în durerea neuropată

Managementul durerii neuropate se concentrează pe tratarea simptomelor și numai în anumite stări patologice cauzele etiologice pot fi tratate, ameliorând astfel durerea [18].

Tratamentul farmacologic al durerii neuropate cuprinde:

I. Agenți de primă linie:

1. *Antidepresivele triciclice*, în special **amitriptilina** (acționează prin inhibarea noradrenalinei și serotoninei, dar prezintă și efecte asupra canalelor ionice, receptorilor adrenergici, histaminergici și colinergici; efectele secundare includ somnolență, amețeli, gură uscată, hipotensiune arterială ortostatică și prelungirea intervalului QT; sunt contraindicate la pacienții cu glaucom, hipertrofie de prostată și cu unele tulburări de conducere cardiacă) [18-20].
2. *Inhibitorii neselectivi ai recaptării serotoninei și noradrenalinei*, în special **duloxetina** și **venlafaxina** (acționează prin inhibarea neselectivă a recaptării

serotoninei și noradrenalinei; printre reacțiile adverse se numără greață, dureri abdominale și constipație, hipertensiune arterială (la doze mari pentru venlafaxină); se utilizează cu precauție la pacienții cu tulburări cardiace și afecțiuni hepatice (în cazul duloxetinei) [18-20].

3. *Gabapentinoidele: pregabalin, gabapentin* (efectul lor analgezic este datorat în principal scăderii sensibilizării la nivel central prin legarea de subunitatea $\alpha 2-\delta$ a canalelor Ca^{2+} voltaj-dependente; efectele secundare includ sedare, amețeli, edem periferic, creștere în greutate, vedere încețoșată, oboseală) [18-20].

II. Agenți de a doua linie:

1. *Tratament topic: lidocaina* (acționează prin scăderea descărcării ectopice spontane prin blocarea canalelor de sodiu; efectele secundare sunt locale, în special iritații la nivelul pielii) și *capsaicina* (acționează prin activarea receptorului TRPV1, conducând la desensibilizarea și defuncționalizarea TRPV1 în fibrele nervoase epidermice; reacțiile adverse se întâlnesc la nivel local-roșeață, mâncărime) [18-20].
2. *Opioide: tramadol și tapentadol* (inhibă transmiterea nociceptivă prin intermediul receptorii opioizi μ pres- și postsinaptici; tramadolul prezintă un mecanism mixt de acțiune: agonist opioid μ și inhibarea recaptării serotoninei și a noradrenalinei pe căile monoaminergice inhibitoare; se recomandă ca agenți de a doua linie din cauza riscului crescut de abuz deși mai scăzut comparativ cu opioidele puternice) și au risc de confuzie și somnolență în special la vârstnici; se utilizează cu precauție în asociere cu antidepresivele) [18-20].

III. Agenți de a treia linie

1. *Opioide forte: oxycodona și morfina* (acționează ca agoniști ai receptorilor opioizi μ ; prezintă risc crescut de farmacodependență) [18-20].

Toxina botulinică de tip A (o neurotoxină puternică utilizată în mod obișnuit pentru tratamentul hiperactivității musculare focale, efect datorat inhibării exocitozei sinaptice și a transmisiei neuronale; tratamentul este în general considerat sigur, deși există dovezi limitate din studii pe termen lung) [18-20].

II. Contribuții personale

3. Ipoteză de lucru și obiective generale

Neuropatia este una dintre complicațiile frecvente ale diabetului zaharat care apare din cauza afectării sistemului nervos periferic. Neuropatia care apare în diabet se numește neuropatie diabetică și afectează aproximativ 50% dintre pacienții cu diabet .

Și disfuncția erectilă (DE) are etiologie neurologică [21] și microvasculară [22] și este strâns legată de patologii cardiovasculare și de factorii de risc ai acesteia, în special diabetul zaharat [23-24].

Nu există un tratament unic pentru a preveni sau a inversa modificările neuropatice sau pentru a oferi ameliorarea totală a durerii. De aceea, considerăm că există o nevoie tot mai mare de studii care să evalueze cele mai eficiente medicamente sau combinații pentru gestionarea DNP pentru a maximiza ameliorarea durerii și pentru a îmbunătăți calitatea vieții.

Având în vedere aceste considerente, ne-am propus investigarea efectelor sildenafilului și metforminului, administrate ca monoterapie sau în asociere pentru tratamentul durerii neuropate periferice la animale rozătoare diabetice plecând de la următoarele observații:

- ✓ Nivelul PDE-5 crește în caz de hiperglicemie, iar administrarea unui inhibitor PDE-5, de tip sildenafil, poate ameliora circulația sanguină la nivelul nervului sciatic prin creșterea expresia GMPc;
- ✓ Metforminul, pe lângă acțiunea sa antihiperglicemiantă prin care îmbunătățește statusul glicemic și poate preveni instalarea neuropatiei prin două mecanisme: activează AMPK (considerată țintă pentru tratamentul durerii) și inhibă mTORC1.

În prezenta lucrare ne-am propus evaluarea potențialului antihiperalgic a diferitelor doze de sildenafil și metformin, dar și a asocierii sildenafil-metformin în diferite teste experimentale farmacologice și influența acestor medicamente asupra analizelor de sânge (hemoleucograma, fructozamina) și a diferiților markeri biochimici (citokine proinflamatorii, nitriți, tioli) din omogenate din creier și ficat.

4. Investigarea potențialului antihiperalgic pentru diferite doze de sildenafil și metformin în neuropatia diabetică indusă de aloxan la șoarece

În nevoia de a descoperi noi substanțe active cu eficacitate îmbunătățită și mai puține reacții adverse, cercetări recente au arătat că tratamentul neuropatiei periferice diabetice cu sildenafil, inhibitor al PDE 5 (fosfodiesteraza-5), îmbunătățește circulația la nivelul nervului sciatic și funcția neurologică în modelele animale experimentale [25-26]. De asemenea, efectul antihiperalgic al metforminului a fost studiat pe modele animale în mai multe cercetări și s-a demonstrat că, pe lângă efectele sale antihiperalgice, ameliorează durerea prin inhibarea mTORC și activarea (AMPK) [27-29]. Diferențe și varietatea de mecanisme prin care acționează sildenafilul și metforminul îi încadrează în categoria candidaților pentru descoperirea de noi strategii terapeutice. Reutilizarea acestor două medicamente pentru gestionarea bolii ar putea oferi opțiuni terapeutice cu eficacitate superioară, deoarece tratează atât complicațiile metabolice cât și complicațiile diabetului zaharat [30].

Materiale și metode

Procedurile experimentale au fost efectuate în conformitate cu normele de bioetică propuse de Legea 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice și Directivei 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010, privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice. Protocolul experimental a fost aprobat de Comisia de Bioetică a Facultății de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila, București, România.

Au fost selectate 110 animale diabetice, împărțite în 11 loturi experimentale (n=10) care au primit tratament zilnic, timp de 14 zile prin gavaj oral, astfel: apă distilată pentru lotul non-diabetic (ND); apă distilată pentru lotul diabetic (D); gabapentin 50 mg·kg⁻¹ (lotul G50); gabapentin 100 mg·kg⁻¹ (lotul G100); gabapentin 150 mg·kg⁻¹ (lotul G150); metformin 150 mg·kg⁻¹ (lotul M150); metformin 250 mg·kg⁻¹ (lotul M250); metformin 500 mg·kg⁻¹ (lotul M500); sildenafil 1.5 mg kg⁻¹ (lotul S1.5), sildenafil 2.5 mg·kg⁻¹ (lotul S2.5); sildenafil 3 mg·kg⁻¹ (lotul S3).

A fost evaluat potențialul antihiperalgic a diferitelor doze de sildenafil și metformin în testul stimulului cald (Hot-plate), dar și în testul stimulului rece (retracția cozii din apă răcită la 10°C) după inducerea diabetului cu ajutorul aloxanului. La sfârșitul experimentului, au fost recoltate probe de sânge pentru evaluarea fructoazamiei și hemoleucogramei. De asemenea, au fost calculate dozele eficiente 50 (DE₅₀) pentru sildenafil și metformin în testele hipersensibilității la cald și la rece.

Analiza statistică a datelor experimentale și ilustrarea lor grafică au fost efectuate folosind pachetul software GraphPad Prism v.5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, SUA). Tipul de distribuție a datelor a fost determinat cu ajutorul testului D'Agostino-Pearson. Rezultatele experimentale au fost analizate folosind următoarele teste statistice: testul de analiză unidirecțională a varianței (ANOVA) urmat de testul post-hoc Dunnett pentru date parametrice și testul Kruskal-Wallis urmat de testul post-hoc Dunn pentru date nonparametrice.

Rezultate și discuții

În acest experiment, am observat o creștere semnificativă a sensibilității la durere în lotul martor diabetic atât în testul Hot-plate, cât și în testul de retragere a cozii, în comparație cu martorul non-diabetic. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu datele din literatură care indică faptul că stresul oxidativ indus de hiperglicemie este un mecanism important care duce atât la dezvoltarea, cât și la progresia hiperalgiei și alodiniei la rozătoare [30-31].

În testul Hot-plate, sildenafilul a produs un efect antihiperalgic la toate animalele diabetice tratate cu diferite doze. Acest efect a fost semnificativ statistic pentru dozele de 2.5 mg·kg⁻¹ și 3 mg·kg⁻¹, începând cu a 7-a zi de tratament (Figura 4.1.A). Aceleași efecte antihiperalgice au fost obținute pentru sildenafil în testul de retracție a cozii din apă rece pentru aceleași doze, cu creșteri semnificative ale latenței reacției la durere pentru doze de 2.5 mg·kg⁻¹ și 3 mg·kg⁻¹ în a 14-a zi a experimentului (Figura 4.1.B).

Prezenta cercetare a arătat că la loturile diabetice tratate cu metformin, sensibilitatea dureroasă la un stimul rece (apă răcită la 10°C) a scăzut în timpul evaluării în zilele 7 și 14 ale experimentului. Metformin în doze de 150 mg·kg⁻¹ și de 500 mg·kg⁻¹ au arătat o creștere semnificativă a latenței reacției dureroase în comparație lotul martor diabetic după 14 zile de tratament (Figura 4.1.B).

În evaluarea sensibilității la durere în testul Hot-plate, a fost observat efectul antihiperalgic al metforminului pentru toate dozele. Metforminul administrat în doza de 150 mg·kg⁻¹ a demonstrat o scădere semnificativă a sensibilității la durere în comparație cu martorul diabetic după 7 zile de tratament, în timp ce toate dozele de metformin au înregistrat o creștere semnificativă a latenței reacției la durere în comparație cu lotul martor diabetic după 14 zile de tratament (Figura 4.1.A).

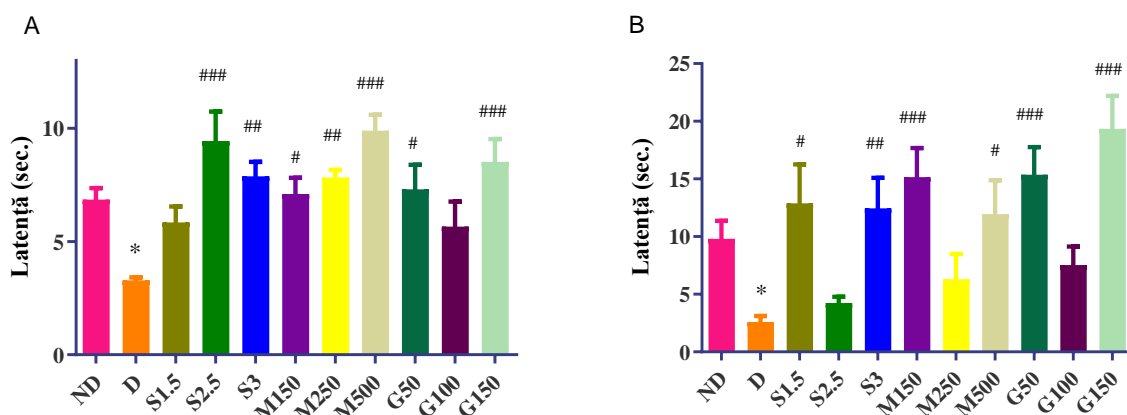


Figura 4.1. (A) Latența reacției dureroase în testul Hot-plate după 14 zile (B) Latența reacției dureroase în testul de retracție a cozii după 14 zile. Valorile sunt exprimate ca medie ± S.E.M.

Testele de sânge au evidențiat o creștere a valorilor leucocitelor în toate grupurile cu diabet zaharat în comparație cu martorul non-diabetic. Valori semnificativ mai scăzute au fost observate la loturile tratate cu metformin 250 mg·kg⁻¹ și 500 mg·kg⁻¹ față de martorul diabetic. De asemenea, am remarcat o scădere a valorilor eritrocitelor, hemoglobinei și hematocritului în toate loturile diabetice în comparație cu martorul non-diabetic, deși în rândul loturilor tratate cu metformin 250 mg·kg⁻¹ și 500 mg·kg⁻¹ scăderea nu a fost semnificativă statistic. În corelație cu alte studii preclinice și clinice [32-33], valorile volumului mediu al trombocitelor semnificativ crescute au fost raportate în studiul nostru pentru toate loturile diabetice în comparație cu șoarecii non-diabetici. În plus, lotul tratat cu metformin în doză de 250 mg·kg⁻¹ a arătat valori ale volumului mediu al trombocitelor semnificativ scăzute.

După evaluarea eficacității medicamentelor administrate în hipersensibilitatea la cald indusă de diabet, am obținut valorile pentru DE₅₀ de 2.07 mg·kg⁻¹ pentru sildenafil, 348.92

mg·kg⁻¹ pentru metformin și 70.39 mg·kg⁻¹ pentru gabapentin. Valorile DE₅₀ calculate pentru efectele antihiperalgic în hipersensibilitatea la rece au fost de 2.06 mg·kg⁻¹ pentru sildenafil, 205.90 mg·kg⁻¹ pentru metformin și 104.31 mg·kg⁻¹ pentru gabapentin.

5. Influența asocierii sildenafil-metformin asupra hiperalgiei și markerilor biochimici în neuropatia diabetică la șoarece

Cercetările experimentale pe modele animale au demonstrat efectul antihiperalgic al sildenafilului, care îmbunătățește funcția neurovasculară prin creșterea semnificativă a numărului de vase de sânge funcționale și a fluxului sanguin regional în nervul sciatic [26]. Pe de altă parte, metformin, agent antihiperglucemiant, a prevenit instalarea neuropatiei periferice prin activarea AMPK [34]. Byrne și colab. au demonstrat că metforminul a redus hiperalgiea la șobolanii tratați cu fructoză, ceea ce sugerează că efectul său antihiperalgic nu este total dependent de acțiunea sa hipoglicemiantă [35]. În plus, Deftu și colab. au subliniat că metforminul activează AMPK, care, în consecință, modulează activitatea ubiquitin ligazei E3 NEDD4-2 și expresia canalelor de sodiu dependente de tensiune (NaVs) [36].

Este bine cunoscut faptul că TNF- α este implicată în fiziopatologia durerii cronice [37]. De asemenea, și în cazul pacienților diabetici apare inflamația la nivelul țesuturilor nervoase și mai multe studii au arătat o creștere a citokinelor proinflamatorii la nivel sanguin [34-35]. Alături de TNF- α , și producția de IL-6 suferă o creștere la pacienții diabetici cu neuropatie [38].

iNOS este o enzimă proinflamatoare care generează radicali liberi intracelulari și crește producția de NO [39]. În consecință, NO contribuie la progresia durerii neuropatice afectând în mod direct axonii periferici lezați și acționează ca o moleculă de semnalizare la nivelul cornului dorsal medular [40].

Materiale și metode

Normele de bioetică pentru cercetarea animalelor de experiență în scop științific propuse de Legea 43/2014 privind protecția animalelor de experiență și Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European privind protecția animalelor utilizate în experimente au fost respectate. Protocolul experimental a fost aprobat de Comisia de Bioetică a Facultății de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila, București, România.

În acest studiu, am utilizat 100 de șoareci diabetici și 20 de șoareci non-diabetici împărțiți în 6 loturi egale (n=20) care au primit tratamente zilnic, timp de 14 zile *per os*, după cum urmează: lotul martor non-diabetic (ND) – apă distilată $0,1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$; lotul martor diabetic (D) - apă distilată $0,1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$; lotul GBN - gabapentin $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; Lotul S1.5+M150 - sildenafil $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + metformin $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; Lotul S2.5+M250 – sildenafil $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + metformin $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; Lotul S3+M500 - sildenafil $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + metformin $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Am evaluat initial, la 7 și la 14 zile glicemia, hipersensibilitatea la cald și hipersensibilitatea la rece, iar la sfârșitul experimentului am determinat TNF- α , IL-6 și concentrația de nitriți pe omogenate din creier și ficat.

Analiza statistică a datelor experimentale și ilustrarea lor grafică au fost efectuate folosind pachetul software GraphPad Prism v.5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, SUA). Tipul de distribuție a datelor a fost determinat cu ajutorul testului D'Agostino-Pearson. Rezultatele experimentale au fost analizate folosind următoarele teste statistice: testul de analiză unidirecțională a varianței (ANOVA) urmat de testul post-hoc Dunnet pentru date parametrice și testul Kruskal-Wallis urmat de testul post-hoc Dunn pentru date nonparametrice

Rezultate și discuții

Una dintre complicațiile comune ale diabetului zaharat este disfuncția erectilă. Meta-analiza efectuată de Kouidrat și colab. a arătat că incidența disfuncției erectile la pacienții diabetici a fost de 52,5% și prevalența sa a fost de aproximativ 3,5 ori mai mare decât la pacienții non-diabetici [41]. Eficacitatea, siguranța și îmbunătățirea calității vieții pacienților cu diabet zaharat de tip 2 și disfuncție erectilă care își administrează sildenafil sunt bine stabilite [42-43].

Importanța metforminului în tratamentul diabetului de tip 2 este bine stabilită de Asociația Americană de Diabet și Asociația Europeană pentru Studiul Diabetului [44], fiind recomandat ca terapie farmacologică de primă linie. Având în vedere că aceste două medicamente, sildenafilul și metforminul, sunt prescrise frecvent pentru a menține controlul glicemic și pentru a corecta disfuncția erectilă la pacienții cu diabet de tip 2, ne-am propus să investigăm dacă combinația celor două substanțe poate corecta neuropatia diabetică, o complicație frecventă a acestei boli.

În testul stimulului cald, toate cele 3 asocieri sildenafil-metformin au arătat o scădere semnificativă a sensibilității la durere în comparație cu lotul martor diabetic, atât după 7, cât și

după 14 zile de tratament . În a 7-a zi a experimentului, combinația S3+M500 a demonstrat un efect antihiperalgic mai intens, în timp ce după 14 zile de tratament, lotul S2.5+M250 a arătat o creștere mai mare a latenței reacției la durere (Figura 5.1.A). În testul stimulului rece, efectul antihiperalgic al celor 3 asocieri sildenafil-metformin observat în testul Hot-plate este susținut, lotul S3+M500 înregistrând cel mai mare timp de retracție a cozii în comparație cu martorul diabetic după 14 zile de tratament (Figura 5.2.A).

Cercetarea noastră a evidențiat că nivelurile de TNF- α sunt crescute semnificativ pentru martorul diabetic și asocierile S2.5+M250 și S3+M500 atât în țesuturile cerebrale, cât și cele hepatice. Pe de altă parte, au fost demonstrate creșteri mai mici pentru loturile GBN și S1.5+M150 în comparație cu martorul non-diabetic. Cercetarea de față evidențiază că citotoxicitatea aloxanului la rozătoare este mediată și de creșterea concentrației de citokine proinflamatorii la nivelul creierului și țesutului hepatic, fenomen care nu este inversat prin administrarea de sildenafil și metformin.

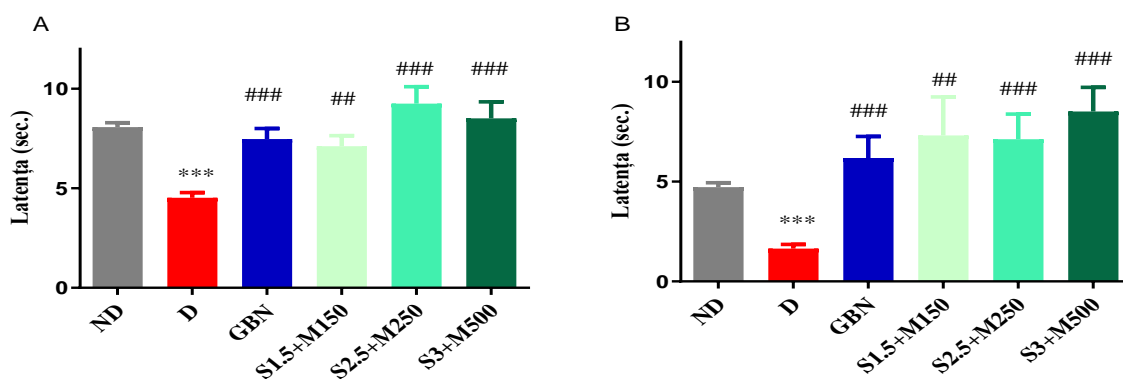


Figura 5.1. (A) Latența reacției la durere în testul Hot-plate după 14 zile (B) Latența reacției la durere în testul de retracție a cozii după 14 zile.

Valorile sunt exprimate ca medie \pm S.E.M

În ceea ce privește nivelul IL-6 loturile tratate cu gabapentin și combinația S2.5+M250 au înregistrat scăderi semnificative în țesuturile cerebrale comparativ cu martorul diabetic. În comparație, în țesuturile hepatice, loturile diabetice tratate cu gabapentin și asocierile S1.5+M150 și S2.5+M250 au înregistrat scăderi nesemnificative ale nivelului de IL-6 comparativ cu martorul diabetic după 14 zile de tratament.

După 14 zile de tratament, concentrația de nitriți a fost semnificativ scăzută pentru combinațiile S2.5+M250 și S3+M500 în țesuturile cerebrale în comparație cu martorul diabetic, în timp ce toate loturile diabetice care au primit tratament cu gabapentin și cele 3 asocieri sildenafil-metformin au demonstrat reduceri semnificative ale nivelurilor de nitriți în țesuturile hepatice în comparație cu martorul diabetic, ceea ce sugerează o activitate a NOS mai scăzută.

6. Evaluarea sinergismului asocierii dintre sildenafil și metformin într-un model animal de neuropatie diabetică indusă de aloxan

În ultimii ani, abordarea terapeutică a unei patologii cu un singur medicament s-a orientat încet spre terapia combinată care utilizează o asociere dintre mai multe substanțe active. Această schimbare s-a produs în urma observațiilor care au evidențiat eficacitatea limitată a monoterapiei în bolile cronice, apariția rezistenței la tratament, dar și a numeroase efecte adverse severe [45]. Cele mai recente rezultate au demonstrat că terapia combinată ar putea vindeca eficient bolile cronice cu etiologie și fiziopatologie complexe, cum ar fi diabetul, cancerul sau SIDA [46-49].

Scopul acestei cercetări a fost de a evalua sinergismul dintre metformin și sildenafil într-un model animal de neuropatie diabetică indusă de aloxan pe baza rezultatelor obținute în urma administrării individuale a celor 2 substanțe (Capitolul 4) și a asocierii dintre cele 2 (Capitolul 5) în testele hipersensibilității la cald și la rece.

Materiale și metode

Analiza experimentală a fost urmată de evaluarea sinergismului dintre sildenafil și metformin asupra durerii neuropate. Sinergismul a fost evaluat în mod cumulativ pentru cele 3 combinații dintre cele 2 medicamente, pentru ambele tipuri de teste pe bază de stimuli termici (hipersensibilitatea la căldură și alodinia la rece) și pentru 7, respectiv 14 zile de la administrarea substanțelor, algoritmul fiind astfel implementat în total de 4 ori. Evaluarea sinergismului a fost implementată în cadrul limbajului de programare Python, versiunea 3.9.2, prin intermediul librăriei synergy [50].

Rezultate și discuții

Tabelul 6.1. prezintă rezultatele obținute în privința evaluării sinergismului dintre sildenafil și metformin prin intermediul algoritmului MuSyC.

Tabel 6.1. Rezultatele obținute în privința evaluării sinergismului dintre sildenafil și metformin

Indicator	Caz1/ Interpretare	Caz2/ Interpretare	Caz3/ Interpretare	Caz4/ Interpretare
Beta (β)	0.07 Sinergism	4.44 Sinergism	-0.01 Antagonism	-0.25 Antagonism
Alfa-12 (α_{12})	0.57 Antagonism	Nedefinit	1.16 Sinergism	0.33 Antagonism
Alfa-21 (α_{21})	0.64 Antagonism	Nedefinit	1.07 Sinergism	0.86 Antagonism
Gama-12 (γ_{12})	0.63 Antagonism	Nedefinit	Nedefinit	5.39 Sinergism
Gama-21 (γ_{21})	1.67 Sinergism	Nedefinit	10.2 Sinergism	0 Antagonism

În ultimii ani, s-a constatat o tendință de a recurge la combinații medicamentoase pentru a trata boli cronice cu fiziopatologie complexă. Fiind o patologie cronică, neuropatia diabetică este dificil de tratat, afectând calitatea vieții pacienților. Astfel, este de interes descoperirea unor noi terapii cu eficacitate îmbunătățită. În acest sens, au fost identificate în literatura de specialitate câteva studii preclinice care au evaluat efectul diferitelor combinații medicamentoase în ameliorarea diferitelor tipuri de durere din neuropatia diabetică.

Referitor la eficacitatea măsurată prin intermediul indicatorului beta a asocierii sildenafil-metformin, testul hipersensibilității la rece a arătat o interacțiune sinergică între sildenafil și metformin, cu un efect mai pronunțat la 14 zile de la administrarea tratamentului. Cu privire la interpretarea clinică a valorilor calculate ale indicatorului alfa, pentru Cazul 3 (interacțiune sinergică), sildenafil și metformin și-au crescut reciproc potența în cazul hipersensibilității la cald. Acest fapt se poate traduce printr-o doză necesară mai mică de

sildenafil în prezența metforminului, precum și printr-o doză necesară mai mică de metformin în prezența sildenafilului atunci când scopul este reducerea hipersensibilității dureroase la cald.

7. Predicția DE₅₀ pentru asocierea sildenafil-metformin într-un model animal de neuropatie diabetică indusă de aloxan la șobolan

Pentru a maximiza beneficiile urmărite și a reduce riscul de evenimente adverse, individualizarea dozei de medicament se dovedește de cele mai multe a fi o provocare. DE₅₀ reprezintă doza la care apare răspunsul dorit pentru 50% din populație și se calculează prin trasarea unei drepte corespunzătoare efectului de 50% pe curba doză-răspuns. Folosirea dozei care produce aproximativ 50% din efectul maxim posibil al medicamentului s-a arătat a fi suficientă pentru a obține efectul urmărit. Este necesar de punctat faptul că odată cu creșterea dozei, crește și riscul de reacții adverse [51]. În acest studiu am hotărât să evaluăm eficacitatea DE₅₀ a combinației sildenafil-metformin calculată anterior în Capitolul 5 într-un model animal de neuropatie diabetică.

Materiale și metode

Procedurile experimentale privind animalele de experiență au fost efectuate conform Legii 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice și Directivei 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010, privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice. Protocolul experimental a fost aprobat de Comisia de Bioetică a Facultății de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila, București, România.

Pentru acest experiment am selectat 70 de șobolani diabetici și 10 șobolani non-diabetici împărțiți în 8 loturi egale (n=10) care au primit tratament zilnic, timp de 15 zile, per os, după cum urmează: lotul martor non-diabetic (ND) – apă distilată 1 mL·kg⁻¹; lot martor diabetic (D)- apă distilată 1 mL·kg⁻¹ ; lotul G30-gabapentin 30 mg·kg⁻¹; lotul G90-gabapentin 90 mg·kg⁻¹; lotul G150-gabapentin 150 mg·kg⁻¹; lotul S2+M100-sildenafil 2 mg·kg⁻¹ + metformină 100 mg·kg⁻¹; lotul S2,5+M300 – sildenafil 2,5 mg·kg⁻¹ + metformin 300 mg·kg⁻¹; lotul S3+M500-sildenafil 3 mg·kg⁻¹ + metformin 500 mg·kg⁻¹.

Am determinat glicemia, hipersensibilitatea termică la cald și la rece, dar și hipersensibilitatea tactilă pe durata a 15 zile de tratament. De asemenea, am evaluat nivelul TNF- α , IL-6, activitatea NOS și concentrația de tioli din omogenate de creier și ficat de șobolan.

Datele experimentale obținute au fost analizate statistic folosind pachetul software GraphPad Prism v.5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, SUA). Testul D'Agostino-Pearson a fost aplicat pentru a determina tipul de distribuție a datelor. Pentru datele parametrice, a fost utilizat testul ANOVA (*Analysis of Variance*) unifactorial (pentru date parametrice), urmat de testul post-hoc Duunett și testul Kruskal-Wallis (pentru date nonparametrice), urmat de testul post-hoc Dunn.

Rezultate și discuții

Atunci când vorbim despre tratamentele cronice, utilizarea celei mai mici doze eficiente este de preferat [51]. Studiile realizate de producători pentru determinarea DE₅₀ oferă, în unele cazuri, o estimare a DE₅₀ și un interval al DE₅₀ în rândul populației, însă aceste informații oferite par să aibă, în unele situații, o influență minoră asupra prescrierii medicamentelor. Specialiștii din domeniu fie nu conștientizează importanța DE₅₀, fie o ignoră complet. În același timp sunt ignorate și implicațiile practice ale variațiilor individuale ale DE₅₀ în funcție de caracteristicile farmacocinetice și farmacodinamice, dar și de dimensiunile corporale [52].

Rezultatele cercetării noastre au demonstrat o scădere marcantă a sensibilității termice pentru lotul tratat cu asocierea dintre DE₅₀ a sildenafilului și DE₅₀ a metforminului (lotul S2.5+M300) după 14 zile de tratament în testul Hot-plate (Figura 7.1.A). Astfel, această asociere a înregistrat un efect de scădere a hipersensibilității la cald indusă de neuropatia diabetică comparabil cu cel al asocierii dintre sildenafil și metformin care a utilizat doze superioare DE₅₀.

De asemenea, creșterea timpul de reacție la durere a fost remarcată și în testul Cold-plate. Loturile S2.5+M300 și S3+M500 au demonstrat scăderi semnificative ale sensibilității dureroase după administrarea tratamentului timp de 15 zile față de lotul martor diabetic (Figura 7.1.B).

Efectul antihiperlagic a fost remarcat și în testul hipersensibilității tactile atât pentru asocierea sildenafil 2.5 mg·kg⁻¹ + metformin 250 mg·kg⁻¹, cât și pentru asocierea sildenafil 3 mg·kg⁻¹ + metformin 500 mg·kg⁻¹ după 14 zile de tratament (Figura 7.1.C).

De asemenea, studiul nostru a relevat scăderea producției de TNF- α în urma tratamentului cu asocierile sildenafilil 2.5 mg·kg⁻¹-metformin 250 mg·kg⁻¹ și sildenafilil 3 mg·kg⁻¹ - metformin 500 mg·kg⁻¹ la nivel hepatic și asocierea sildenafilil 3 mg·kg⁻¹- metformin 500 mg·kg⁻¹ în țesuturile cerebrale. În plus, loturile S2.5+M250 și S3+M500 au redus marcant nivelul IL-6 comparativ cu lotul martor diabetic atât în țesutul cerebral, cât și cel hepatic. Mai mult, la nivel cerebral, ambele asocieri sildenafilil-metformin au înregistrat efecte superioare loturilor tratate cu gabapentin. Concentrației de nitriți a scăzut în urma celor 15 zile de tratament cu toate cele 3 asocieri sildenafilil-metformin atât în țesuturile cerebrale, cât și cele hepatice, iar concentrația de tioli totali raportați la proteine a crescut pentru toate loturile tratate cu asocierile sildenafilil-metformin atât în țesuturile cerebrale, cât și cele hepatice.

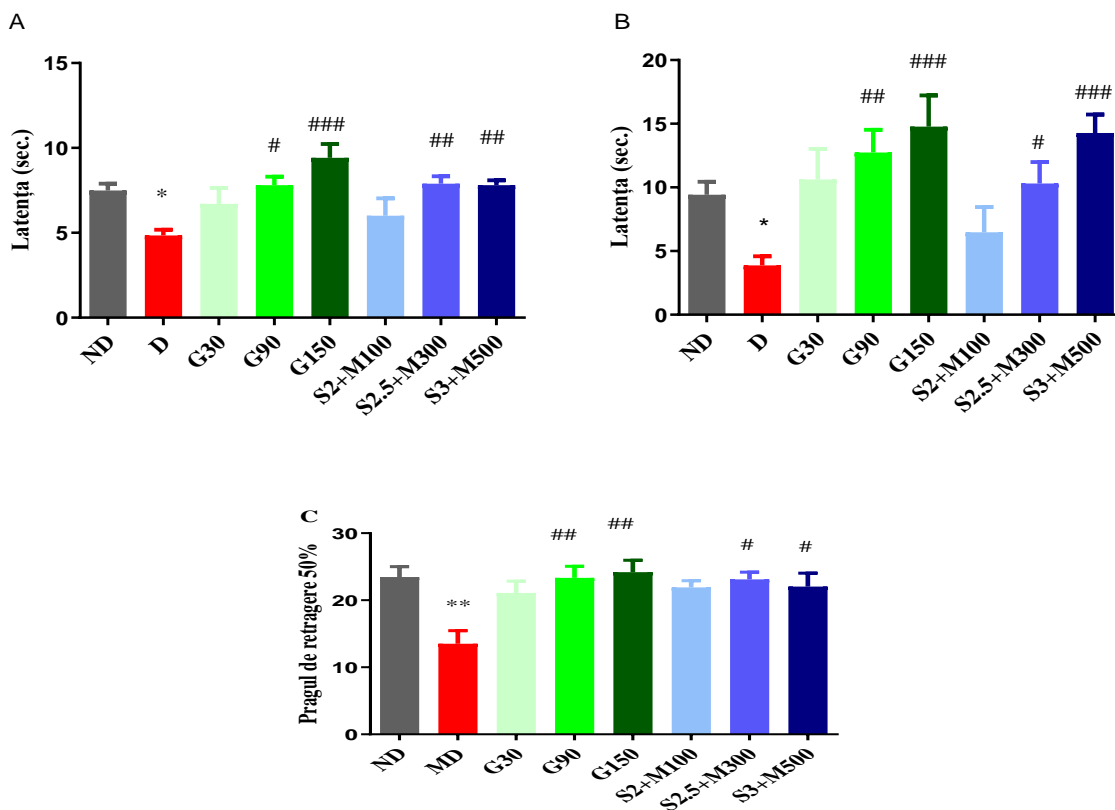


Figura 7.1. (A) Latența reacției dureroase în testul Hot-plate după 14 zile (B) Latența reacției dureroase în testul Cold-plate după 15 zile (C) Pragul de retragere 50% după 14 zile

Valorile sunt exprimate ca medie \pm S.E.M.

Concluzii și contribuții personale

Pornind de la observațiile din studiile anterioare, am evaluat într-un prim experiment potențialul antihiperalgic al sildenafilului și metforminului administrate în 3 doze diferite într-un model animal de neuropatie diabetică.

Pentru a induce neuropatia diabetică, am administrat 2 doze diferite de aloxan - 130 mg·kg⁻¹ și 150 mg·kg⁻¹ la șoarece.

În testul Hot-plate, toate dozele de metformin (150 mg·kg⁻¹, 250 mg·kg⁻¹, 500 mg·kg⁻¹), sildenafilul 2,5 mg·kg⁻¹ și sildenafilul 3 mg·kg⁻¹ au arătat o creștere semnificativă a latenței reacției la durere după 14 zile de tratament. În testul de retracție a cozii din apă la temperatură de 10°C, metforminul administrat în doze de 150 mg·kg⁻¹ și 500 mg·kg⁻¹ și sildenafilul de 1,5 mg·kg⁻¹ și 3 mg·kg⁻¹ au demonstrat creșteri semnificative ale latenței reacției dureroase după 14 zile de tratament.

În plus, hemoleucograma a arătat valori crescute pentru leucocite și volumul mediu al trombocitelor și valori scăzute pentru eritrocite, hemoglobină și hematocrit loturile diabetice. Datorită controlului glicemic mai bun, metforminul administrat în dozele de 250 mg·kg⁻¹ și 500 mg·kg⁻¹ a dus la scăderea semnificativă a valorilor leucocitelor și la scăderi nesemnificative statistic ale valorilor eritrocitelor, hemoglobinei și hematocritului.

În continuarea cercetării noastre, am analizat efectul antihiperalgic al asocierilor dintre dozele de sildenafil și dozele de metformin administrate anterior individual într-un model animal de neuropatie diabetică la șoarece.

O creștere a latențelor reacției la durere a fost observată în testul retracției cozii și în testul Hot-plate. În plus, toate cele 3 asocieri de sildenafil-metformin au prezentat efecte similare sau superioare gabapentinului în reducerea sensibilității la durere.

Mai mult decât atât, asocierea dintre sildenafilul 2,5 mg·kg⁻¹ și metformin 250 mg·kg⁻¹ a demonstrat capacitatea de a reduce producția de interleukină-6 în țesuturile cerebrale și hepatice.

De asemenea, loturile tratate cu sildenafilul 2,5 mg·kg⁻¹ + metformin 250 mg·kg⁻¹ și sildenafilul 3 mg·kg⁻¹ + metformin 500 mg·kg⁻¹ au prevenit creșterea activității nitric oxid sintetazei cerebrale, în timp ce toate cele 3 asocieri sildenafil-metformin au prezentat valori semnificativ reduse ale nitriților în țesuturile hepatice.

Pe baza rezultatelor obținute în Capitolele 4 și 5 în testele hipersensibilității la cald și la rece în urma administrării substanțelor de testat în monoterapie și în asociere am evaluat, sinergismul asocierii prin intermediul algoritmului MuSyC.

Rezultatele cercetării au arătat o interacțiune sinergică între sildenafilul și metformin în testul hipersensibilității la rece. În testul hipersensibilității la cald, sildenafilul și metforminul și-au crescut reciproc potența.

Într-un ultim experiment din cadrul tezei de doctorat, am evaluat capacitatea asocierii dintre DE_{50} a sildenafilului și metforminului, calculate pe baza datelor obținute în primul experiment pentru reducerea durerii într-un model de neuropatie diabetică indusă cu aloxan la șobolan.

Astfel, asocierea sildenafil 2,5 mg·kg⁻¹ + metformin 250 mg·kg⁻¹, administrate pe o durată de 15 zile, a crescut timpii de reacție la durere în testele Hot-plate și Cold-plate, dar și pragul de retragere (50%) al labei posterioare în testul von-Frey.

De asemenea, administrarea acestei asocieri a demonstrat acțiunea antiinflamatoare prin scăderea nivelului factorului de necroză tumorală TNF- α în țesutul hepatic și a interleukinei-6 la nivel cerebral și hepatic. Mai mult, asocierea sildenafil 2,5 mg·kg⁻¹ + metformin 250 mg·kg⁻¹ a prevenit creșterea activității nitric oxid sintetazei și a arătat protecție împotriva depleției de glutatation.

Noutatea cercetării este dată de ipoteza utilizării a două substanțe active care pot fi prescrise frecvent în terapia pacientului diabetic pentru tratamentul dereglării metabolismului glucidic (metformin) și pentru complicațiile vasculare induse de hiperglicemie (sildenafil, inhibitor PDE5). Nu există studii publicate în literatura de specialitate, care să investigheze eficacitatea sildenafilului în neuropatia diabetică, sau a asocierilor dintre metformin și sildenafil.

Contribuțiile personale din cadrul acestei cercetări pot fi considerate următoarele:

- ✓ Inducerea și validarea metodei de neuropatie diabetică la șoarece prin administrarea de aloxan. Corelarea datelor privind modificările produse de tulburările metabolice date de nivelul crescut al glicemiei și fructozaminei și creșterea sensibilității dureroase termice în modelul de diabet aloxanic (**Capitolul 4**);
- ✓ Investigarea efectului metforminului și sildenafilului administrate în monoterapie asupra sensibilității dureroase la șoarecele diabetic, în corelație cu concentrația

fructozaminei și valorile hemoleucogramei (leucocite, eritrocite, hemoglobină, hematocrit, volumul mediu al trombocitelor) (**Capitolul 4**).

- ✓ Determinarea dozelor eficiente 50% pentru sildenafil și metformin în testul hipersensibilității la cald și la rece în modelul animal descris anterior (**Capitolul 4**);
- ✓ Demonstrarea efectului antihiperalgic a unor asocieri în doze fixe de sildenafil și metformin în diabetul aloxanic la șoarece, corelat cu influențarea nivelului de citokine proinflamatorii (TNF- α și IL-6) și a activității nitric oxid sintetazei din omogenate de creier și ficat. Aceste determinări sunt primele în literatură, întrucât asocierea sildenafil – metformin nu a mai fost studiată (**Capitolul 5**);
- ✓ Evaluarea sinergismului asocierii dintre sildenafil și metformin pe baza rezultatelor experimentale obținute prin determinarea parametrilor sensibilității dureroase la șoarecele diabetic, utilizând algoritmul MuSyC (calcularea a trei tipuri de indicatori de sinergism: eficacitate, potență și cooperativitate) (**Capitolul 6**);
- ✓ Evaluarea potențialului antihiperalgic al asocierii dintre sildenafil și metformin, administrate în doze eficiente 50% (anterior calculate) la șobolani cu neuropatie diabetică indusă de aloxan (**Capitolul 7**).
- ✓ Demonstrarea reducerii eliberării citokinelor proinflamatorii IL6 și TNF α în țesutul cerebral și periferic în urma administrării asocierilor de sildenafil și metformin la șobolanul diabetic, alături de scăderea activității nitric oxid sintetazei și creșterii protecției împotriva depleției de glutathion (**Capitolul 7**).

Bibliografie selectivă

1. Pain - International Association for the Study of Pain (IASP). <https://www.iasp-pain.org/publications/pain/> (accessed Sep. 06, 2022).
2. Rusbridge C, Jeffery ND. Pathophysiology and treatment of neuropathic pain associated with syringomyelia. *Vet J*, 175(2):164–172, 2008.
3. IDF Diabetes Atlas. <https://idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas.html> (accessed Mar. 07, 2023).
4. Davies M, Brophy S, Williams R, Taylor A. The Prevalence, Severity, and Impact of Painful Diabetic Peripheral Neuropathy in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 29(7):1518–1522, 2006.
5. Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *Lancet Neurol*, 11(6):521–534, 2012.
6. Peltier A, Goutman SA, Callaghan BC. Painful diabetic neuropathy. *BMJ*, 348, 2014.

7. Pop-Busui R, Boulton AJM, Feldman EL, *et al.* Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 40(1):136–154, 2017.
8. Boulton AJM. Diabetic neuropathy and foot complications. *Handb Clin Neurol*, 126:97–107, 2014.
9. Bowling FL, Rashid ST, Boulton AJM. Preventing and treating foot complications associated with diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 11(10):606–616, 2015.
10. Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SEM, *et al.* Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N Engl J Med*, 352(4):341–350, 2005.
11. Tesfaye S, Vileikyte L, Rayman G, *et al.* Painful diabetic peripheral neuropathy: consensus recommendations on diagnosis, assessment and management. *Diabetes Metab Res Rev*, 27(7):629–638, 2011.
12. Dunnigan SK, Ebadi H, Breiner A, *et al.* Conduction Slowing in Diabetic Sensorimotor Polyneuropathy. *Diabetes Care*, 36(11):3684, 2013.
13. Gummy LF, Bampton ETW, Tolkovsky AM. Hyperglycaemia inhibits Schwann cell proliferation and migration and restricts regeneration of axons and Schwann cells from adult murine DRG. *Mol Cell Neurosci*, 37(2):298–311, 2008.
14. Mizisin AP, Shelton GD, Wagner S, Rusbridge C, Powell HC. Myelin splitting, Schwann cell injury and demyelination in feline diabetic neuropathy. *Acta Neuropathol*, 95(2):171–174, 1998.
15. Dyck PJ, Overland CJ, Low PA, *et al.* Signs and symptoms versus nerve conduction studies to diagnose diabetic sensorimotor polyneuropathy: CI vs. NPhys trial. *Muscle Nerve*, 42(2):157–164, 2010.
16. Feldman EL, Nave KA, Jensen TS, Bennett DLH. New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. *Neuron*, 93(6):1296–1313, 2017.
17. Nowicki M, Kosacka J, Serke H, Blüher M, Spanel-Borowski K. Altered sciatic nerve fiber morphology and endoneural microvessels in mouse models relevant for obesity, peripheral diabetic polyneuropathy, and the metabolic syndrome. *J Neurosci Res*, 90(1):122–131, 2012.
18. Cavalli E, Mammana S, Nicoletti F, Bramanti P, Mazzon E. The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 33, 2019.
19. Pușcașu C, Zănfirescu A, Negreș S. Recent Progress in Gels for Neuropathic Pain. *Gels*, 9(5):417, 2023.
20. Attal N. Pharmacological treatments of neuropathic pain: The latest recommendations. *Rev Neurol (Paris)*, 175(1–2):46–50, 2019.
21. Nehra A, Moreland RB. Neurologic erectile dysfunction. *Urol Clin North Am*, 28(2):289–308, 2001.
22. Gerber RE, Vita JA, Ganz P, *et al.* Association of Peripheral Microvascular Dysfunction and Erectile Dysfunction. *J Urol*, 193(2):612–617, 2015.
23. Thompson IM. Erectile Dysfunction and Subsequent Cardiovascular Disease. *JAMA*, 294(23):2996, 2005.
24. Selvin E, Burnett AL, Platz EA. Prevalence and Risk Factors for Erectile Dysfunction in the US. *Am J Med*, 120(2):151–157, 2007.
25. Corbin JD, Francis SH. Cyclic GMP Phosphodiesterase-5: Target of Sildenafil. *J Biol Chem*, 274(20):13729–13732, 1999.
26. Wang L, Chopp M, Szalad A, *et al.* Sildenafil ameliorates long term peripheral neuropathy in type II diabetic mice. *PLoS One*, 10(2), 2015.
27. Melemedjian OK, Mejia GL, Lepow TS, Zoph OK, Price TJ. Bidirectional regulation of P

body formation mediated by eIF4F complex formation in sensory neurons. *Neurosci Lett*, 563:169–174, 2014.

28. Mao-Ying QL, Kavelaars A, Krukowski K, *et al.* The Anti-Diabetic Drug Metformin Protects against Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in a Mouse Model. *PLoS One*, 9(6):e100701, 2014.

29. Shiers S, Pradhan G, Mwirigi J, *et al.* Neuropathic Pain Creates an Enduring Prefrontal Cortex Dysfunction Corrected by the Type II Diabetic Drug Metformin But Not by Gabapentin. *J Neurosci*, 38(33):7337–7350, 2018.

30. Pușcașu C, Mihai P, Zbârcea CE, *et al.* Investigation of antihyperalgesic effects of different doses of sildenafil and metformin in alloxan-induced diabetic neuropathy in mice. *Farmacía* 2, 71:3, 2023.

31. Yu L-N, Yang X-S, Hua Z, Xie W. [Serum levels of pro-inflammatory cytokines in diabetic patients with peripheral neuropathic pain and the correlation among them]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 89(7):469–471, 2009.

32. Brown AS, Hong Y, De Belder A, *et al.* Megakaryocyte ploidy and platelet changes in human diabetes and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(4):802–807.

33. Eriksson U, Ewald U, Tuvemo T. Increased platelet volume in manifest diabetic rats. *Ups J Med Sci*, 88(1):17–23, 1983.

34. J. Price T, Das V, Dussor G. Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase (AMPK) Activators For the Prevention, Treatment and Potential Reversal of Pathological Pain. *Curr Drug Targets*, 17(8):908–920, 2016.

35. Byrne FM, Cheetham S, Vickers S, Chapman V. Characterisation of Pain Responses in the High Fat Diet/Streptozotocin Model of Diabetes and the Analgesic Effects of Antidiabetic Treatments. *J Diabetes Res*, 2015:1–13, 2015.

36. Deftu A-F, Chu Sin Chung P, Laedermann CJ, *et al.* The Antidiabetic Drug Metformin Regulates Voltage-Gated Sodium Channel Na_v 1.7 via the Ubiquitin-Ligase NEDD4-2. *Eneuro*, 9(2):ENEURO.0409-21.2022, 2022.

37. Zhang H, Zhang H, Dougherty PM. Dynamic effects of TNF- α on synaptic transmission in mice over time following sciatic nerve chronic constriction injury. *J Neurophysiol*, 110(7):1663–1671, 2013.

38. Hills CE, Brunskill NJ. Cellular and physiological effects of C-peptide. *Clin Sci*, 116(7):565–574, 2009.

39. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem*, 30(1):11–26, 2015.

40. Levy D, Zochodne DW. NO Pain: Potential Roles of Nitric Oxide in Neuropathic Pain. *Pain Pract*, 4(1):11–18, 2004.

41. Kouidrat Y, Pizzol D, Cosco T, *et al.* High prevalence of erectile dysfunction in diabetes: a systematic review and meta-analysis of 145 studies. *Diabet Med*, 34(9):1185–1192, 2017.

42. Escobar-Jiménez F. Eficacia y seguridad del sildenafil en varones con diabetes mellitus tipo 2 y disfunción eréctil. *Med Clin (Barc)*, 119(4):121–124, 2002.

43. Shah P, Trivedi N. A meta-analysis on efficacy and tolerability of sildenafil for erectile dysfunction in patients with diabetes mellitus. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*, 39(1):1, 2018.

44. Buse JB, Wexler DJ, Tsapas A, *et al.* 2019 Update to: Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*, 43(2):487–493, 2020.

45. Zhou X, Seto SW, Chang D, *et al.* Synergistic Effects of Chinese Herbal Medicine: A

- Comprehensive Review of Methodology and Current Research. *Front Pharmacol*, 7, 2016.
46. Devita VT, Young RC, Canellos GP. Combination versus single agent chemotherapy: A review of the basis for selection of drug treatment of cancer. *Cancer*, 35(1):98–110, 1975.
47. Chesney MA, Morin M, Sherr L. Adherence to HIV combination therapy. *Soc Sci Med*, 50(11):1599–1605, 2000.
48. Jukema JW, van der Hoorn JW. Amlodipine and atorvastatin in atherosclerosis: a review of the potential of combination therapy. *Expert Opin Pharmacother*, 5(2):459–468, 2004.
49. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*, 17(11):1410–1422, 2011.
50. Wooten DJ, Albert R. synergy: a Python library for calculating, analyzing and visualizing drug combination synergy. Wren J, ed. *Bioinformatics*, 37(10):1473–1474, 2021.
51. Dimmitt S, Stampfer H, Martin JH. When less is more - efficacy with less toxicity at the ED50. *Br J Clin Pharmacol*, 83(7):1365–1368, 2017.
52. Cross J, Lee H, Westelinck A, Nelson J, Grudzinskas C, Peck C. Postmarketing drug dosage changes of 499 FDA-approved new molecular entities, 1980-1999. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 11(6):439–446, 2002.

Lucrări științifice publicate în reviste de specialitate

1. **Pușcașu, C**; Zanfirescu, A; Negreș, S. Recent progress in gels for neuropathic pain. *Gels*, 9(5):417, 2023. <https://doi.org/10.3390/gels9050417>. FI = 4,432; Q1 (Capitolul 1, pag. 16, 35, 36).
2. **Pușcașu, C**; Mihai, DP; Zbârcea, CE; Zanfirescu, A; Chiriță, C; Ghiță, CIV; Negreș, S. Investigation of antyhiperalgic effects of different doses of sildenafil and metformin in alloxan-induced diabetic neuropathy in mice. *Farmacia*, 3:71, 2023
<https://doi.org/10.31925/farmacia.2023.3.19>. FI = 1,62; Q2 (Capitolul 4, pag. 42-70).
3. **Pușcașu C**, Ungurianu A, Șeremet OC, Andrei C, Mihai DP, Negreș S. The Influence of Sildenafil–Metformin Combination on Hyperalgesia and Biochemical Markers in Diabetic Neuropathy in Mice. *Medicina*, 59(8):1375, 2023.
<https://doi.org/10.3390/medicina59081375>. FI= 2,948; Q3 (Capitolul 5, pag. 71-93).