



Možnosti potenciácie účinku neopioidných analgetík

PharmDr. Martin Janovský

Ústav farmakologie

3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova

Dizertačná práca

Školiteľ:

Prof. MUDr. Miloslav Kršiak, DrSc.

Praha, 2011

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som sa rád poďakoval môjmu školiteľovi, prof. MUDr. Miloslavovi Kršiakovi, DrSc., za inšpiratívne vedenie a cenné rady, ktoré mi behom postgraduálneho štúdia poskytoval, ako aj za trpezlivosť, ktorú so mnou mal v niektorých jeho fázach.

Ďalej šikovným a obetavým laborantkám z Ústavu farmakológie – Evke Šulcovej, Blanke Meirychovej, Markéte Dvořákovéj a Katke Gröholovej za ich neoceniteľnú pomoc pri experimentálnej práci.

Rád by som spomenul aj svojho bývalého spolupracovníka, MUDr. Tomáša Doležala, Ph.D., ktorý ma v začiatkoch zasväcoval do tajov vedeckého bádania.

Poďakovanie ďalej patrí prof. Rolandovi J. Tallaridovi, Ph.D., z Temple University vo Philadelphii za pomoc pri štatistických kalkuláciách a Ing. Bohdanovi Němcovi zo spoločnosti Cepha, s.r.o., za analýzu vzoriek; kolegom z lekárne Pharmaland na Zličíne za ústretovosť, ktorej sa mi od nich pri vedeckej práci dostávalo a Katke Figovej, ktorá to so mnou celé absolvovala vrátane neľahkých začiatkov v Prahe.

Na záver ďakujem svojej priateľke Miške a rodičom za bezmedznú podporu, ktorej sa mi od nich v mojej práci neustále dostáva.

Práca bola podporená výskumným zámerom MSM0021620816.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracoval samostatn a že som riadne uviedol a citoval všetky použité pramene a literatúru. Súčasne prehlasujem, že práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronickej verzie mojej práce v databázi systému medziuniverzitného projektu Theses.cz za účelom sústavnej kontroly podobnosti kvalifikačných prác.

V Prahe, 26.05.2011

Martin Janovský

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. LITERÁRNY PREHĽAD O SÚČASNOM STAVE PROBLEMATIKY	10
2.1. Patofyziológia bolesti	10
2.1.1. Primárne aferentné podnety	10
2.1.2. Spracovanie nociceptívnych podnetov v mieche	11
2.1.2.1. Funkčná organizácia sivej hmoty miechy	11
2.1.2.2. Vrátková teória bolesti	12
2.1.3. Prenos bolestivého impulzu do supraspinálnych centier	13
2.1.3.1. Funkčná organizácia ascendentných dráh	13
2.1.3.2. Talamus	14
2.1.4. Descendentná modulácia spinálnych nociceptívnych neurónov	15
2.1.4.1. Descendentná inhibícia	15
2.1.4.2. Descendentná facilitácia	16
2.2. Farmakológia bolesti	17
2.2.1. Excitačná neurotransmisia	17
2.2.1.1. Excitačné aminokyseliny	17
2.2.1.2. Excitačné neuropeptidy	18
2.2.1.3. Ostatné mediátory excitačnej neurotransmisie	18
2.2.1.4. Descendentná facilitácia a neuromediátory	19
2.2.2. Inhibičná neurotransmisia	20
2.2.2.1. Inhibičné aminokyseliny	20
2.2.2.2. Opioidný systém	21
2.2.2.3. Descendentná inhibícia a neuromediátory	22
2.2.3. Kaskáda dejov aktivovaná tkanivovým poškodením	23
2.3. Súčasná možnosť farmakoterapie bolesti	26
2.3.1. Neopoidné analgetiká	26
2.3.2. Opioidné analgetiká	27
2.3.3. Postup pri farmakoterapii bežných akútnych bolestí	29
2.4. Použitie neopoidných analgetík v kombináciách	31
2.4.1. Interakcie paracetamolu s NSA	31
2.4.2. Interakcie paracetamolu s opioidmi	32
2.4.3. Interakcie paracetamolu s látkami z iných farmakologických skupín	33
2.4.3.1. Interakcia paracetamolu s guajfenezínom	33
2.4.3.2. Interakcia paracetamolu s kofeínom	33
2.4.3.3. Interakcia paracetamolu s rilmenidínom	34
2.4.4. Interakcie NSA s opioidmi	34
2.4.5. Interakcie NSA s látkami z iných farmakologických skupín	37
2.4.5.1. Interakcie NSA s kanabinoidmi	37
2.4.5.2. Interakcie NSA s cholinomimetikami	37
2.4.5.3. Interakcie NSA s látkami ovplyvňujúcimi adrenergný systém	38
2.4.5.4. Interakcie NSA s gabapentínom	39
2.4.5.5. Interakcie NSA s aminoguanidínom	39
2.4.6. Interakcie neopoidných analgetík s psychofarmakami	39

2.4.7. Interakcie neopioidných analgetík s spazmolytikami	40
2.4.8. Nežiadúce účinky v dôsledku interakcií neopioidných analgetík.....	41
2.5. Formulácie neopioidných analgetík s farmaceutickými pomocnými látkami	43
3. CIEĽ PRÁCE	45
4. METODIKY PRÁCE	47
4.1. Animálne modely bolesti.....	47
4.1.1. Model akútnej viscerálnej bolesti – test peritoneálneho dráždenia (<i>writhing</i> test).....	47
4.1.2. Model akútnej tepelnej bolesti (<i>plantar</i> test).....	48
4.2. Meranie sérových koncentrácií farmák	49
4.3. Laboratórne zvieratá	50
4.4. Použité farmaká a chemikálie	51
4.4.1. Celekoxib.....	51
4.4.2. Etorikoxib	52
4.4.3. Paracetamol	53
4.4.4. Ibuprofén	54
4.4.5. Kodeín	54
4.4.6. Meloxikam.....	55
4.4.7. Beta-cyklodextrín.....	56
4.4.8. Ostatné chemikálie.....	56
4.5. Štatistické metódy	57
4.5.1. Teoretický základ izobolografickej analýzy.....	57
4.5.2. Postup použitý pri analýze výsledkov interakcií	60
4.5.2.1. Lineárna regresná analýza	60
4.5.2.2. Izobolografická analýza.....	61
4.5.2.3. Test štatistickej významnosti	63
4.5.2.4. Interakčný index γ	64
4.5.3. Ostatné štatistické metódy.....	64
5. VÝSLEDKY	66
5.1. Interakcie neopioidných analgetík s kodeínom	66
5.1.1. Interakcia etorikoxibu s kodeínom.....	66
5.1.2. Interakcia celekoxibu s kodeínom	70
5.1.3. Interakcia ibuprofenu s kodeínom	73
5.1.4. Interakcia paracetamolu s kodeínom.....	76
5.1.6. Interakčný index γ	79
5.2. Analgetická účinnosť a sérové koncentrácie beta-cyklodextrín-meloxikamu	80
5.2.1. Test akútnej tepelnej bolesti	80
5.2.2. Test peritoneálneho dráždenia	84
5.2.3. Sérové koncentrácie meloxikamu a beta-cyklodextrín-meloxikamu.....	86

6. DISKUSIA	88
6.1. Interakcie etorikoxibu a celekoxibu s kodeínom a porovnanie s interakciami kodeínu s paracetamolom a ibuprofénom	88
6.2. Analgetická účinnosť a sérové koncentrácie beta-cyklodextrín-meloxikamu	92
7. ZÁVERY A ZHODNOTENIE CIEĽOV PRÁCE.....	94
8. SÚHRN.....	96
8. ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ AUTORA.....	97
9. ZOZNAM REFERENCIÍ.....	98

ZOZNAM SKRATIEK A SYMBOLOV

- % MPE – parameter „*maximal possible effect*“
- 5-HT – sérotonín (5-hydroxytryptamín)
- ACE – angiotenzín konvertujúci enzým
- AMPA – kyselina α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-izoxazolypropiónová
- ANOVA – analýza rozptylu
- APPROVe – epidemiologická štúdia *Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx*
- Asp – aspartát
- ATP – adenzíntrifosfát
- BCD – beta-cyklodextrín
- Ca²⁺ – vápenatý kation
- CB-1,2 – kanabinoïdné receptory
- CCK – cholecystokinín
- cGMP – cyklický guanozínmonofosfát
- CGRP – *calcitonin gene-related peptide*
- CNS – centrálna nervová sústava
- COX – cyklooxygenáza
- CYP450 – cytochróm P450
- DRC – krivka vzťahu dávky a účinku (angl. *dose-response curve*)
- DRP – potenciál zadných koreňov miechy (angl. *dorsal root potential*)
- EAA – excitačné aminokyseliny
- ED₅₀ – stredná efektívna dávka
- GABA – kyselina γ -aminobutánová
- GIT – gastrointestinálny trakt
- Glu – glutamát
- HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
- IASP – Medzinárodná asociácia pre výskum bolesti
- IC₅₀ – stredná inhibičná koncentrácia
- i.p. – intraperitoneálna aplikácia
- K⁺ – draselný kation
- KA – kainát
- LD₅₀ – stredná letálna dávka
- NK – neurokinín

NMDA – N-metyl-D-aspartát
N-NOC – nenociceptívne neuróny
NNT – parameter „*number needed to treat*“
NO – oxid dusnatý
NRM – *nucleus raphe magnus*
NSA – nesteroidné antireumatiká
ORL1 – orfanový receptor
PAG – periakveduktálna šed' (angl. *periaqueductal grey*)
PGD₂ – prostaglandín D₂
PGE₂ – prostaglandín E₂
PGF_{2α} – prostaglandín F_{2α}
PGG₂ – prostaglandín G₂
PGH₂ – prostaglandín H₂
PGI₂ – prostaglandín I₂
p.o. – perorálna aplikácia
PWL – parameter „*paw withdrawal latency*“
RVM – rostrálna ventromediálna predĺžená miecha (*medulla*)
SE – stredná chyba (angl. *standard error*)
s.c. – subkutánná aplikácia
SPI – parameter „*sum of the pain intensity*“
SSRI – selektívne inhibítory spätného vychytávania sérotonínu
TxA₂ – tromboxán A₂
VÚFB – Výzkumný ústav pro farmácii a biochemii
WDR – multireceptorové neuróny (angl. *wide-dynamic range*)

1. ÚVOD

Neopioidné analgetiká tvoria širokú skupinu farmakologicky účinných látok a patria medzi najpoužívanejšie liečivé látky na svete. Sú široko dostupné a často používané vo forme voľnopredajných liekov, ako aj liekov, ktorých výdaj je viazaný na lekársky predpis. Používajú sa na zmiernenie rôznych typov bolesti, najčastejšie ako pomocná liečba reumatických a muskuloskeletálnych ochorení a pooperačných stavov.

Mechanizmus účinku väčšiny neopioidných analgetík pri tlení nociceptívnej bolesti je založený na inhibícii enzýmu cyklooxygenázy (COX). COX sa v organizme vyskytuje v dvoch izoformách, COX-1 a COX-2, a je limitujúcim faktorom pre syntézu prostaglandínov, ktoré zvyšujú senzitivitu receptorov pre bolesť. Neopioidné analgetiká patria medzi najúčinnšie látky, ktoré sú vo farmakoterapii k dispozícii pre tlenie nociceptívnej bolesti, od ich selektivity voči dvom izoformám COX závisí najmä spektrum ich nežiadúcich účinkov.

Použitie neopioidných analgetík v kombináciách medzi sebou, alebo s látkami z iných farmakoterapeutických skupín má za cieľ zlepšiť ich analgetickú účinnosť pri použití nižších dávok, s čím súvisí menší výskyt nežiadúcich účinkov. Samostatnú kategóriu predstavujú formulácie neopioidných analgetík s farmaceutickými pomocnými látkami, ktoré sú často používané pri formulácii liečivých prípravkov s cieľom zrýchliť nástup účinku a zlepšiť biologickú dostupnosť liečivej látky z prípravku.

Predkladaná práca má za cieľ posúdiť mieru synergie vybraných kombinácií neopioidných analgetík s využitím preklinických modelov bolesti a štatistickej metódy izobolografickej analýzy; ako aj porovnať rýchlosť nástupu a intenzitu analgetického účinku čistého neopioidného analgetika s prípravkom modifikovaným farmaceutickou pomocnou látkou.

2. LITERÁRNY PREHĽAD O SÚČASNOM STAVE PROBLEMATIKY

2.1. Patofyziológia bolesti

Podľa definície IASP (z angl. *International Association for the Study of Pain*, Medzinárodná asociácia pre výskum bolesti) z roku 1986, je bolesť nepríjemný zmyslový alebo emocionálny zážitok spojený s akútnym, alebo potenciálnym poškodením tkaniva, alebo opísaný výrazmi pre takéto poškodenie.

Bolesť vzniká dráždením senzorických zakončení primárnych aferentných neurónov, nociceptorov. Noxický podnet vyvolávajúci bolesť môže byť mechanický, chemický, alebo tepelný. Vtedy hovoríme o nociceptívnej bolesti, pričom samotný pojem „nocicepcia“ označuje súbor dejov, ktoré nastanú ako neurofyziologická odpoveď na noxický podnet, zatiaľ čo vnímanie samotnej bolesti je závislé na spracovaní aferentných podnetov v CNS a je silne individuálne (Millan 1999). Ak sa jedná o vyvolanie bolesti v zdravom tkanive, hovoríme o fyziologickej nociceptívnej bolesti, ktorá slúži ako výstraha organizmu pred poškodením niektorej jeho časti. Pri zápalovom procese dochádza následkom poškodenia tkaniva k periférnej a s ňou spojenej centrálnnej senzitivácii, čiže k zníženiu prahu bolesti a zosilneniu odpovede na nociceptorové podráždenie. Podnety z nociceptorov sa aferentnými dráhami privádzajú do zadných miechových rohov, kde sa integrujú a predávajú do supraspinálnych centier. Zároveň prebieha descendentná modulácia spinálnych nociceptívnych neurónov.

2.1.1. Primárne aferentné podnety

Problematika klasifikácie primárnych aferentných receptorov na základe štruktúry a funkcie bola spracovaná v niekoľkých rozsiahlych prehľadových prácach, ktoré vychádzajú z neuroanatomických štúdií (Willis and Coggeshall 1991; Meyer, Campbell et al. 1994; Millan 1999; Almeida, Roizenblatt et al. 2004).

Proces vzniku bolesti začína aktiváciou nociceptorov, ktoré sa vyskytujú vo veľkom množstve povrchových aj vnútorných tkanív, vrátane artérií a viscerálnych orgánov (Almeida, Roizenblatt et al. 2004). Nociceptory nadväzujú na voľné nervové zakončenia primárnych aferentných neurónov, ktoré vedú podnety do vyšších centier. Primárne aferentné neuróny rozdeľujeme na základe štruktúry, priemeru a vodivosti na niekoľko základných typov. Slabo

myelinizované A-delta vlákna s priemerom 2 – 6 μm a rýchlosťou vzruchu 12 – 30 m/s vedú krátkotrvajúce impulzy s vyššou intenzitou a týmto spôsobom zabezpečujú akútnu fázu bolesti a spustenie obrannej reakcie. Rozoznávame dva typy A-delta vlákien, 1. typ tvorí vysokoprahové mechanoreceptory, 2. typ termoreceptory pre vysoké, alebo veľmi nízke teploty. Ďalším typom A vlákien sú myelinizované vlákna A-beta ($>10 \mu\text{m}$; 30 – 100 m/s). Za normálnych podmienok nevedú bolestivé stimuly, ale majú dôležitú úlohu v mechanizmoch segmentálneho útľmu. Nemyelinizované C vlákna (0,4 – 1,2 μm ; 0,5 – 2 m/s) vedú vzruchy pomalšie, sekundárne k podnetom prenášaným A-delta vláknami. tie sa potom prejavujú ako tupá bolesť. Predstavujú termosenzitívne receptory pre teplo alebo chlad, mechanoreceptory s nízkym prahom a špecifické receptory pre niektoré algogénne látky ako substancia P, histamín, acetylcholín, serotonín, prostaglandíny apod. Ako tzv. “tiché receptory” (“*silent receptors*”) býva označovaný špeciálny typ C vlákien, ktoré sa aktivujú len v prítomnosti zápalovej reakcie. Táto klasifikácia najvýraznejšie zohľadňuje rozdelenie nociceptorov v koži, napríklad v svaloch A-delta a C vlákna vedú bolestivé vzruchy bez výraznej diferenciacie.

2.1.2. Spracovanie nociceptívnych podnetov v mieche

2.1.2.1. Funkčná organizácia sivej hmoty miechy

Sivá hmota miechy je podľa cytoarchitektonického princípu rozdelená na niekoľko zón (*laminae I – X*). Bolestivé impulzy sú primárnymi aferentnými vláknami vedené zadnými miechovými koreňmi do zadných miechových rohov. V koreňoch miechy sa nachádzajú gangliá s telami senzorických neurónov, prostredníctvom ktorých sa impulzy dostávajú do miechových zón I – VI v sivej hmote. Zóna I je okrajová, pod ňou sa nachádza zóna II (*substantia gelatinosa*), zóny III a IV (*nucleus proprius*) a hĺbkové zóny V a VI. Ďalšie zóny tvoria prechodnú sivú hmotu (VII), predné miechové rohy (VIII, IX) a zóna X obklopuje miechový kanál (Rexed 1952; Besson and Chaouch 1987).

Dve povrchové zóny (I a II₀, vonkajšia časť vrstvy II), spoločne s vrstvami V, VI a X sa prednostne podieľajú na spracúvaní a ďalšej transmisii nociceptívnej informácie z periférie. Nemyelinizované C vlákna privádzajú bolestivé impulzy z kože hlavne do vrstvy II₀ a s menšou intenzitou do vrstvy I. Na druhej strane tento typ vlákien privádza impulzy z vnútorných orgánov, svalov a kĺbov v najväčšej miere do zón I, IV/VI a tiež X. Slabo myelinizované vysokoprahové A-delta vlákna privádzajú nociceptívne impulzy z kože

prednostne do zóny I a v menšej miere do zóny II₀ (Swett and Woolf 1985; Molander and Grant 1986).

V sivej hmote miechy rozoznávame tri základné typy neurónov podľa charakteru ich odpovedí na nociceptívne impulzy (Dubner and Bennett 1983; Mense 1993; Schaible and Grubb 1993; Cervero 1995). V zónach I a II₀ sa nachádzajú tzv. „tiché“ alebo NS (*nociceptive-specific*) neuróny, ktoré sú aktivované nociceptívnymi impulzmi z aferentných vlákien C a A-delta s vysokou intenzitou. Prednostne v zóne V, ale aj v niektorých iných, sa nachádzajú tzv. multireceptorové neuróny WDR (*wide-dynamic range*) (Ness and Gebhart 1990; Gebhart 1995). V týchto receptoroch sa zbíha široké spektrum podnetov z kože, svalov a vnútorných orgánov. WDR neuróny sú zároveň považované za kľúčové pre kódovanie intenzity impulzu, tiché neuróny majú kvôli prijímaniu impulzov s vysokou intenzitou túto schopnosť obmedzenú (Dubner, Kenshalo, Jr. et al. 1989). Tretím typom neurónov sú neuróny nenociceptívne (N-NOC), nachádzajúce sa hlavne v zónach II, III a IV. Toto delenie len zjednodušene ukazuje úlohy jednotlivých typov neurónov v zadných miechových rohoch pri prijímaní a ďalšom spracúvaní nociceptívnych impulzov, tieto mechanizmy sú však v skutočnosti komplexnejšie (Morgan 1998).

2.1.2.2. Vrátková teória bolesti

Vrátková teória ovplyvnila významným spôsobom celkový pohľad na neurofyziologické mechanizmy bolesti (Keller and Vyklícký 2006). Formulovali ju Melzack a Wall (Melzack and Wall 1965), na základe experimentálnej práce publikovanej o rok skôr (Mendell and Wall 1964). Autori tejto práce použili experimentálny model, pri ktorom mačkám v éterovej anestézii podviazali krčnú tepnu, preťali miechu v sekcii C1 a zabránili prívodu krvi bazilárnou tepnou. Následne zvieratám paralyzovaným pomocou galamín-trijodidu vypreparovali zadné korene miechy v oblasti *intumescencia lumbalis* a nervové vlákna v podkolennej jamke. Prenos vzruchov myelinizovanými A vláknami zablokovali pomocou anódového bloku, čím dosiahli selektívne dráždenie nemyelinizovaných C vlákien. Pomocou tohto dráždenia došlo k hyperpolarizácii zakončení týchto vlákien a presynaptickej facilitácii. Podľa vrátkovej teórie je toto umožnené úbytkom presynaptickej inhibície spôsobovanej neurónmi v *substantia gelatinosa*. Ďalším výsledkom tejto práce bolo potvrdenie existencie už predtým pozorovaného ustáleného potenciálu zadných koreňov miechy (DRP) (Barron and Matthews 1938).

V nasledujúcich rokoch sa viacero autorov pokúsilo tento experiment zopakovať, a to s použitím podobného anódového bloku, ako použili Mendell s Wallom (Franz and Iggo 1968), alebo s využitím alternatívnych techník selektívneho dráždenia. Vyklický so spolupracovníkmi použili vo svojej práci radiačné teplo, ktoré vyvoláva impulznú aktivitu vo vláknoch typu C (Vyklicky, Rudomin et al. 1969), ani v jednom prípade však nebola pozorovaná hyperpolarizácia primárnych aferentných vlákien. Aj keď sa vrátková teória bolesti nakoniec ukázala ako nepravdivá, významnou mierou prispela k rozvoju neurofyziológie a k postupnému odkrývaniu mechanizmov, ktoré sa zúčastňujú na vnímaní a modifikácii bolestivých podnetov v CNS.

2.1.3. Prenos bolestivého impulzu do supraspinálnych centier

2.1.3.1. Funkčná organizácia ascendentných dráh

Prenos nociceptívnych impulzov projekčnými miechovými neurónmi do vyšších oddielov CNS je veľmi komplexný proces a táto problematika bola spracovaná v niekoľkých rozsiahlych prehľadových prácach (Willis and Westlund 1997). Vzostupné dráhy rozdeľujeme neuroanatomicky do dvoch základných skupín, na monosynaptické a polysynaptické. Monosynaptické dráhy vedú impulzy priamo do supraspinálnych centier. U cicavcov je najrozšírenejšia spinotalamická dráha, ktorej projekčné neuróny sa koncentrujú hlavne v zóne I a v menšej miere sú rozptýnené aj v hlbších úsekoch miechy. Pomocou nej sa bolestivý impulz privádza cez talamus do oblastí mozgovej kôry. Prostredníctvom imunoreakčných metód sa zistilo, že projekčné neuróny v zóne I exprimujú u potkanov NK-1 receptor, na ktorom pôsobí substancia P (Ding, Takada et al. 1995). Spojenie zóny I s talamom bolo u primátov potvrdené v roku 1975 (Trevino and Carstens 1975) a dnes je považovaná za najdôležitejšiu. Inervujú ju rôzne typy aferentných vlákien z kože, svalov, kĺbov aj viscerálnych orgánov. Spinomezencefalická dráha sa vyskytuje u všetkých stavovcov. Má menej výraznú somatickú organizáciu, ako spinotalamická dráha a najdôležitejšie cieľové štruktúry sú *nucleus parabrachialis* a periakveduktálna šed' (PAG). Pri protismernej aktivácii spino-parabrachiálnych neurónov v zóne I u potkanov sa zistilo, že väčšina z nich je nociceptívne špecifická a ich odpoveď reflektuje intenzitu mechanických a tepelných podnetov (Bester, Chapman et al. 2000). Ukázalo sa, že neuróny v parabrachiálnom jadre sa zúčastňujú aj na reflexnom zvýšení krvného tlaku v reakcii na bolestivý podnet (Allen and Pronych 1997). Spinoretikulárna dráha zabezpečuje spojenie s retikulárnou formáciou

mozgového kmeňa. Projekcia z predĺženej miechy do retikulárnej formácie je popísaná už pomerne dlho (Abols and Basbaum 1981), len nedávno však bolo anatomicky popísané spojenie spinálnych neurónov s viacerými skupinami neurónov v retikulárnej formácii, a to serotoninergných (5-HT), ale aj tých, ktoré serotonín neobsahujú (Braz, Enquist et al. 2009). Descendentné projekcie týchto neurónov potom významne prispievajú k spätnej inhibícii, ale aj facilitácii nociceptívneho impulzu v zadných miechových rohoch. Ďalej boli popísané projekcie monosynaptickými dráhami priamo do hypotalamu, talamu a amygdaly. Spojenie do hypotalamu a amygdaly prebieha spinomezencefalickou dráhou cez parabrachiálne jadro, spojenie do talamu je sprostredkované samostatnou telencefalickou dráhou.

Polysynaptické dráhy preberajú na rozdiel od monosynaptických podnety od sekundárnych nociceptívnych neurónov. Patria sem spinocervikálna dráha a postsynaptická dráha zadného miechového povrazca, tzv. lemniskálny systém. Tá prebieha cez *nucleus gracilis* a *nucleus cuneatus*, ktoré sa pravdepodobne zúčastňujú na mediácii mechanickej alodýnie (Berkley and Hubscher 1995). Monosynaptické dráhy majú na spinálnej úrovni prevažne kontralaterálny priebeh, zatiaľ čo polysynaptické dráhy prebiehajú ipsilaterálne. Spojenie zo sekundárneho neurónu do mozgu však už prebieha kontralaterálne.

2.1.3.2. Talamus

Talamus je už dlho považovaný za kľúčovú štruktúru, ktorá preberá, integruje a ďalej odovzdáva nociceptívnu informáciu. Táto jeho úloha je však v skutočnosti komplexnejšia. Ako bolo uvedené vyššie, okrem najdôležitejšej spinotalamickej dráhy preberá informácie priamo alebo nepriamo aj od iných ascendentných dráh. Z talamu prebiehajú projekcie ako do kôrových centier, tak aj do limbického systému, takže okrem informácie o type, lokalizácii, intenzite a trvaní bolestivého podnetu sa spolupodieľa aj na emocionálnej reakcii na bolesť. Existujú rôzne pohľady na funkčné usporiadanie talamu s ohľadom na prenos bolestivého podnetu. Diskusia na túto tému je zložitá kvôli nejednotnej terminológii a značným medzidruhovým rozdielom, napriek tomu sa však uznáva rozdelenie talamických jadier na niekoľko hlavných skupín (Millan 1999). U primátov sa ustálilo používanie pojmu „primárne senzorické jadro talamu“, ktoré sa delí na niekoľko častí. V týchto jednotlivých oddieloch sú zakončené vetvy spinotalamickej dráhy a bolo preukázané ich napojenie na neuróny talamokortikálnej dráhy vedúcej do primárnej somatosenzorickej kôry (Shi and Apkarian 1995). Pomocou zobrazovacích štúdií boli identifikované aj ďalšie oblasti mozgovej kôry s projekciou do talamu, ktoré sa rozličnou mierou podieľajú na senzorickej a emocionálnej

zložke bolesti. Tieto rozdiely môžu súvisieť s rozdielnou konektivitou týchto oblastí do oblastí limbického systému (Millan 1999). Pri porovnaní bolestivých a nebolestivých stimulov u dospelých pacientov sa ukázalo, že bolestivé stimuly v oveľa väčšej miere aktivujú insulárnu kôrovú oblasť, ktorá má rozsiahle projekcie do somatosenzorických, ako aj limbických oblastí. Takéto spojenia zabezpečujú integráciu bolestivého stimulu s emocionálnym prežitkom a pamäťovou stopou, ktorá chráni pred nebezpečenstvom bolestivého stimulu (Coghill, Talbot et al. 1994).

2.1.4. Descendentná modulácia spinálnych nociceptívnych neurónov

2.1.4.1. Descendentná inhibícia

Descendentné dráhy začínajúce v mozgovom kmeni majú dôležitú úlohu pri modulácii aktivity spinálnych nociceptívnych neurónov. Podieľajú sa na tom hlavne serotoninerčné a noradrenergické mechanizmy, v menšej miere aj dopaminergné. Najdôležitejšou štruktúrou tejto polysynaptickej modulácie je periakveduktálna šed'. Objavenie tohoto endogénneho systému regulujúceho bolesť sa pripisuje pozorovaniu, že lézia ventrolaterálnej časti PAG výrazne oslabuje vnímanie bolesti (Melzack, STOTLER et al. 1958). Následne bolo zdokumentované, že elektrická stimulácia PAG u potkanov spôsobuje analgéziu a tým bola naznačená možná úloha PAG pri descendentnej inhibícii bolesti (Reynolds 1969). Mechanizmy, ktoré umožňujú analgéziu pomocou stimulácie PAG, sú komplexnej povahy. Descendentné dráhy regulujú výdaj neurotransmiterov z primárnych aferentných vlákien (Travagli and Williams 1996), na druhej strane ovplyvňujú aj aktivitu projekčných neurónov, a to priamo, alebo nepriamo prostredníctvom excitačných, respektíve inhibičných interneurónov (Millan 1999). V roku 1973 bolo zistené, a neskôr mnohými štúdiami potvrdené, že stimulácia PAG znižuje reakciu neurónov v miechových rohoch na intraarteriálnu injekciu bradykinínu (Liebeskind, Guilbaud et al. 1973). Neskôr sa ukázalo, že stimulácia PAG znižuje aj odpovede spinotalamických projekčných neurónov na stimuláciu primárnych aferentných C a A-delta vlákien (Zhang, Owens et al. 1991). Pomocou anatomických štúdií sa zistilo, že descendentné inhibičné dráhy z periakveduktálnej šedi prebiehajú cez regióny v rostrálnej ventromediálnej predĺženej mieche (RVM), konkrétne *nucleus raphe magnus* (NRM) a *nucleus gigantocellularis*, a z nich cez *funiculus lateralis* k spinálnym nociceptívnym neurónom (Basbaum and Fields 1979). Pri štúdiách na potkanoch sa ukázalo, že neuróny v RVM spadajú do troch skupín, tzv. „*off-cells*“, „*on-cells*“ a

„*neutral cells*“. Pri *tail-flick* teste bola pozorovaná zvýšená aktivita *on-cells* neurónov a znížená aktivita *off-cells* neurónov, zatiaľ čo aktivita *neutral cells* neurónov ostala nezmenená (Fields, Heinricher et al. 1991). Z uvedeného vyplynulo, že *off-cells* neuróny majú pravdepodobne tonický inhibičný vplyv na spinálne nociceptívne neuróny, zatiaľ čo *on-cells* neuróny facilitujú ich odpoveď na nociceptívnu stimuláciu. Následne je možné sa domnievať, že na aktivitu týchto neurónov má priamy vplyv projekcia z PAG.

2.1.4.2. Descendentná facilitácia

Už bola spomenutá funkcia *on-cells* neurónov a ich facilitačný vplyv na aktivitu nociceptívnych neurónov v miechových rohoch. Okrem toho rozoznávame niekoľko ďalších prípadov, kedy dochádza k facilitácii spinálnej nociceptívnej neurotransmisie za prispenia supraspinálnych centier. Ukázalo sa, že za určitých podmienok môže dochádzať v oblasti RVM k descendentnej inhibícii aj facilitácii, a tieto projekcie sú vedené do spinálnej oblasti odlišnými povrazcami miechy (Zhuo and Gebhart 1997). K aktivácii miechových neurónov môže dôjsť aj stimuláciou niektorých kôrových oblastí (Yeziarski, Gerhart et al. 1983).

2.2. Farmakológia bolesti

Na prenose a modulácii bolestivého signálu na všetkých úrovniach sa podieľa celý rad receptorov a neurotransmiterov. Ako excitačné neurotransmitery sa uplatňujú hlavne excitačné aminokyseliny a neuropeptidy pôsobiace cez príslušné typy receptorov. Inhibičná neurotransmisia prebieha prostredníctvom inhibičných aminokyselín a systému endogénnych opioidov. Významnú úlohu v modulácii bolesti zohrávajú aj adrenergné a cholinergné receptory, sérotoninergný systém a veľká pozornosť je v súčasnosti venovaná systému endogénnych kanabinoïdov.

2.2.1. Excitačná neurotransmisia

Na úrovni aferentných dráh aj v CNS sa pri prenose nociceptívneho signálu uvoľňujú hlavne excitačné aminokyseliny (EAA) a neuropeptidy. Väčšinou sú kolokalizované a navzájom sa ovplyvňujú. Z excitačných aminokyselín je najdôležitejší glutamát (Glu) a aspartát (Asp), z neuropeptidov substancia P a *calcitonin gene-related peptide* (CGRP).

2.2.1.1. Excitačné aminokyseliny

Excitačné aminokyseliny pôsobia prostredníctvom metabotropných glutamátových receptorov (mGluR), alebo ionotropných receptorov. mGluR receptory delíme podľa štruktúry a funkcie do troch skupín (I – III). Do skupiny I patria subtypy mGluR1 a mGluR5, do skupiny II subtypy mGluR2 a mGluR3 a do skupiny III subtypy mGluR6, mGluR7 a mGluR8 (Hayashi, Sekiyama et al. 1994; Conn and Pin 1997). Pri nocicepcii majú najväčší význam metabotropné glutamátové receptory skupiny I. Z farmakologického hľadiska ide o receptory asociované s G-proteínom. Sú široko zastúpené na všetkých úrovniach súvisiacich s prenosom bolesti, od periférnych aferentných vlákien až po talamus, ich úloha pri akútnej nocicepcii však zostáva stále otázná.

Ionotropné glutamátové receptory delíme podľa syntetických agonistov na tri základné typy, AMPA (kyselina α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-izoxazolypropiónová), kainátové (KA) a NMDA (N-metyl-D-aspartát). Farmakologicky ide o iónové kanály riadené ligandom. AMPA/KA receptory pri intenzívnej stimulácii aferentných sensorických vlákien sprostredkujú rýchlu postsynaptickú aktiváciu v miechových rohoch (Martin, Blackstone et al. 1992). Na druhej strane NMDA receptory predstavujú typ s pomalou aktiváciou.

Periférne podanie NMDA spôsobuje aktiváciu primárnych aferentných neurónov (Ault and Hildebrand 1993). Pri aplikácii priamo do miechy dochádza k zvýšeniu intenzity neurálnych odpovedí na neškodné aj noxické mechanické stimuly a zároveň intratekálne podanie NMDA-antagonistov tieto odpovede potláča (Sher and Mitchell 1990; Neugebauer, Lucke et al. 1993; Cumberbatch, Herrero et al. 1994).

2.2.1.2. Excitačné neuropeptidy

Z látok typu neuropeptidov zohrávajú pri nocicepcii najvýznamnejšiu úlohu substancia P, neurokinín A a CGRP. Substancia P a neurokinín A, spoločne nazývané aj pronociceptívne tachykiníny, pôsobia na neurokinínových receptoroch NK-1 a NK-2, ktoré stimulujú aktivitu fosfolipázy C. Intratekálne podanie substancie P u myši a potkanov podmieňuje bolestivé správanie, resp. zosilňuje spinálne nociceptívne reflexy (Hylden and Wilcox 1981; Yashpal and Henry 1983). Na druhej strane sú tieto príznaky potlačené podaním antagonistov tachykinínových receptorov a substancia P-protilátky (Lembeck, Folkers et al. 1981). Periférna noxická stimulácia spôsobuje uvoľňovanie aj ďalších neuropeptidov v miechových rohoch. Z neurokinínov bola pri neurokiníne A popísaná podobná excitácia spinálnych nociceptívnych neurónov, ako pri substancii P. Uvoľňovanie neurokinínu A a jeho excitačný účinok prebieha ešte vo väčšej miere, ako substancia P a pretrváva dlhší čas (Yanagisawa and Otsuka 1990; Duggan, Hope et al. 1990). Ďalší pronociceptívny peptid, CGRP, existuje v dvoch izoformách (α a β). Pôsobí prostredníctvom najmenej dvoch typov receptorov, CGRP₁ a CGRP₂, asociovaných s adenylátcyklázou (Brain and Cambridge 1996). Excitačné neuropeptidy vo svojom pôsobení kooperujú navzájom aj s EAA, pričom sú syntetizované vo viacerých štruktúrach a pôsobia na rôznych typoch receptorov. Okrem spomenutých najdôležitejších zástupcov pôsobia pronociceptívne ešte napríklad neuropeptid Y a galanín.

2.2.1.3. Ostatné mediátory excitačnej neurotransmisie

V súčasnej dobe sa prisudzuje čoraz väčšia úloha pri prenose nociceptívnej informácie molekule oxidu dusnatého (NO). Aktivita neuronálnej NO-syntázy v miechových rohoch sa zvyšuje zvýšením hladiny Ca²⁺ pri tkanivovom poškodení. NO sa podieľa na senzitivácii samotných miechových nociceptívnych neurónov pomocou tvorby cyklického guanozínmonofosfátu (cGMP) (Clementi and Meldolesi 1997).

Prozápalovo pôsobiace prostaglandíny vznikajú kaskádou dejov evokovanou excitačnými mediátormi pri tkanivovom poškodení, ich úloha pri samotnej nocicepcii však zostáva stále nejasná. Hlavnú úlohu tu zohráva PGE₂, ktorý pôsobí na štyroch typoch receptorov (EP₁₋₄). Bola popísaná úloha EP₃ receptoru pri mechanickej nocicepcii v mozgu (Oka, Hori et al. 1997).

Ďalšia molekula so širokým spektrom biologickej aktivity, adenzíntrifosfát (ATP), sa spolupodieľa na vzniku nocicepcie väzbou na ionotropné P2X receptory. Zistilo sa, že v mieche sa ATP vo funkcii neuromediátora uvoľňuje v zakončeniach aferentných nervov a priamo vyvoláva nociceptívne správanie u potkanov (White, Downie et al. 1985; Bland-Ward and Humphrey 2000).

Významnú úlohu pri vzniku tepelnej zápalovej bolesti zohráva aktivácia vaniloidného TRPV1 receptoru. Tento receptor predstavuje nešpecifický polymodálny integrátor nocicepcie, keď je okrem vysokej teploty aktivovaný aj nízkym pH (protóny), kapsaicínom a endovaniloidmi, a veľkým množstvom zápalových mediátorov (Ma and Quirion 2007). V súčasnej dobe sa nachádza v klinickom skúšaní antagonista TRPV1 receptoru, od ktorého sa očakáva analgetické pôsobenie pri dentálnej bolesti a migréne. Postupne boli objavené ďalšie podtypy tohto receptoru, u ktorých sa ukázalo, že nie sú miestom účinku kapsaicínu, ani iných vaniloidov. Tieto receptory sa nachádzajú okrem CNS aj v iných tkanivách a toto je pravdepodobne príčinou, že v niektorých modeloch chronickej bolesti vykazujú TRPV1-deficientné myši viac znakov bolestivého správania, ako nezmenené kontroly. Ukazuje sa, že úloha TRPV receptorov v mechanizmoch vzniku bolesti môže byť komplexnejšia, než sa predpokladalo, a stále nie je úplne známa (Szallasi, Cruz et al. 2006).

2.2.1.4. Descendentná facilitácia a neuromediátory

Pri descendentnej facilitácii je pravdepodobná účasť neurotransmitterov, nachádzajúcich sa v spinálnych neurónoch. Naznačuje to štúdia, podľa ktorej sú v rafeálnych neurónoch lokalizované sérotonín a substancia P spoločne s aspartátom a glutamátom, a tieto neuróny majú spinálnu projekciu (Nicholas, Pieribone et al. 1992). Ďalšia štúdia ukazuje, že na sekundárnej hyperalgézií spôsobenej horčičným olejom u potkanov participuje neurotenzín v RVM a spinálny cholecystokinín (CCK) prostredníctvom CCK_B receptorov (Urban, Jiang et al. 1996). Ešte predtým sa zistilo, že systémová aplikácia morfínu pri *tail-flick* teste významne zvyšuje aktivitu *off-cells* neurónov a znižuje aktivitu *on-cells* neurónov v RVM. Tento účinok je reverzibilný a je možné ho zvrátiť opioidným antagonistom naloxonom. Z uvedeného

vyplýva významná úloha non-5-HT neurónov v RVM pri opioidnej analgézi (Barbaro, Heinricher et al. 1986). V serotoninernej neurotransmisii boli popísané opačné účinky na jednotlivých podtypoch receptorov na projekčných spinálnych neurónoch. 5-HT_{1A} receptory spôsobujú hyperpolarizáciu otvorením K⁺-kanálov, zatiaľ čo 5-HT₂ a 5-HT₃ receptory spôsobujú naopak depolarizáciu. Aj v prípade, že sú ko-lokalizované na jednom neuróne, má ich aktivácia opačný účinok, 5-HT_{1A} receptory spôsobujú inhibíciu nocicepcie a 5-HT₂/5-HT₃ receptory naopak facilitáciu (Boess and Martin 1994).

2.2.2. Inhibičná neurotransmisia

Z inhibičných neuromediátorov podieľajúcich sa na percepcii bolesti na periférii a v CNS majú veľký význam inhibičné aminokyseliny kyselina γ -aminobutánová (GABA) a glycín a opioidný systém. Zčasti sa na inhibícii bolestivej neurotransmisie podieľajú aj adrenergne a serotoninergne receptory a receptory pre adenozin.

2.2.2.1. Inhibičné aminokyseliny

GABA je všeobecne pokladaná za najdôležitejší inhibičný neuromediátor v CNS, kde je zodpovedná za asi 40 % inhibičnej transmisie (Malcangio and Bowery 1996). GABA rozvíja svoju biologickú aktivitu prostredníctvom viacerých typov receptorov (GABA_A, GABA_B a GABA_C). Ligandom riadený iónový kanál GABA_A pozostáva zo štyroch podjednotiek s väzbovými miestami pre viacero skupín liečiv, nepriamo dôležitých aj z hľadiska liečby bolesti (benzodiazepíny, barbituráty, neurosteroidy). GABA_B receptor sa viaže na GTP a inhibičný účinok GABA je u neho mimikovaný baklofénom. Zo supraspinálnych centier zohrávajú GABA-ergné neuróny významnú úlohu v modulácii bolesti v talame a v talamo-kortikálnych projekciách (Castro-Alamancos 1997). Menej preskúmaná je zatiaľ úloha GABA v mieche. GABA_A aj GABA_B receptory sú lokalizované presynapticky na primárnych aferentných vláknach. GABA_A receptory sa nachádzajú aj ďalej v interneurónoch predných aj zadných miechových rohov, zatiaľ čo GABA_B receptory sa nachádzajú v zakončeníach primárnych aferentných vlákien ako autoreceptory. Antinociceptívny účinok agonistov GABA_A aj GABA_B receptorov bol popísaný na viacerých animálnych modeloch. V CNS účinok GABA_A agonistov spočíva v ovplyvňovaní receptorov prevažne na supraspinálnej úrovni, kým GABA_B agonisti pôsobia v rovnakej miere na oboch úrovniach (spinálnej aj

supraspinálnej) (Sawynok 1987). V humánnej farmakoterapii sa agonisti GABA receptorov používajú ako adjuvantná terapia bolesti (benzodiazepíny, baklofen).

Väčšina spinálnych inhibičných neurónov obsahuje GABA-u ko-lokalizovanú na presynaptických zakončeníach spoločne s glycínom (Popratiloff, Valtschanoff et al. 1996). Glycín pôsobí prostredníctvom vlastných inhibičných, strychnín-senzitívnych receptorov, ktoré patria do skupiny iónových kanálov podobných nikotínovým receptorom pre acetylcholín. Pri vzniku zápalovej bolesti u potkanov sú tieto glycínové receptory selektívne blokované prostaglandínom E₂ (PGE₂) mechanizmom proteínkinázy A, zatiaľ čo prostaglandín F_{2α} (PGF_{2α}), prostaglandín D₂ (PGD₂) a prostaglandín I₂ (PGI₂, prostacyklín) sa ukázali ako neúčinné. Rovnako neovplyvnená ostala aj neurotransmisia na GABA_A, AMPA a NMDA receptoroch. Táto práca priniesla ďalšie zistenia ohľadom úlohy prostaglandínov pri nocicepcii ako neuromediátorov (Ahmadi, Lippross et al. 2002). Zmeny v koncentráciách glycínu v PAG pri periférnej zápalovej reakcii boli u potkanov pri plnom vedomí zisťované pomocou mikrodialýzy. Pri formalínovom teste došlo k zníženiu koncentrácie glycínu v perfuzáte v skorej a neskorej fáze, ale nie pri analgézi. Perfúzia naloxonom nezmenila pokles hladiny glycínu po formalínovej injekcii ani jeho bazálnu hladinu. Táto štúdia napovedá, že endogénne opioidy pravdepodobne neovplyvňujú aktivitu glycinergných neurónov v PAG a glycín sa teda v tomto regióne neuvolňuje súbežne s GABA, pretože tento mediátor s opioidmi na tejto úrovni interaguje (Maione, Marabese et al. 2000).

2.2.2.2. Opioidný systém

Na prelome 70-tych a 80-tych rokov minulého storočia boli identifikované tri základné prekurzory endogénnych opioidov, proopiomelanokortín, prodynorfín a proenkefalín (Nakanishi, Inoue et al. 1979; Kakidani, Furutani et al. 1982; Noda, Furutani et al. 1982). Proenkefalín je prekurzorom endogénnych opioidov [Met⁵]- a [Leu⁵]-enkefalínu, prodynorfín je zdrojom dynorfínu A, dynorfínu B, a α- a β-neodynorfínu, a proopiomelanokortín je zdrojom α- a β-endorfínu. Popri tom sú všetky tri prekurzory zdrojom viacerých peptidov s dlhším reťazcom, vrátane neopiodných. Neskôr bola objavená nová skupina opioidných peptidov, zahŕňajúca látky endomorfín-1 a endomorfín-2. Tieto peptidy sa od ostatných endogénnych opioidov líšia štruktúrou a výraznou selektivitou k opioidnému receptoru typu μ. Tri základné typy opioidných receptorov (δ, μ a κ) patria do skupiny transmembránových receptorov asociovaných s G-proteínom a majú veľa spoločných štrukturálnych znakov. Každý typ opioidných receptorov má vlastnú skupinu prednostných endogénnych ligandov.

Za endogénne ligandy pre μ -receptor sú považované endomorfiny, enkefalíny sa prednostne viažu na δ -receptor a afinita β -endorfinu je podobná k μ - aj δ -receptoru. Na κ -receptor sa viažu dynorfiny. Aj keď jednotlivé skupiny endogénnych opioidov sa prednostne viažu na jednotlivé subtypy opioidných receptorov a sú potom pokladané za ich endogénne ligandy, všetky vykazujú afinitu aj k ostatným subtypom.

Okrem troch dobre známych subtypov opioidných receptorov bol pred niekoľkými rokmi objavený ďalší typ, orfanový receptor asociovaný s G-proteínom (ORL1). Tento receptor vykazuje približne 70 % štrukturálnu homológiu s opioidnými receptormi a jeho endogénnym ligandom je nociceptín FQ/orfanín, štrukturálne podobný dynorfinu A (Reinscheid, Nothacker et al. 1995; Meunier 1997). Na ORL1 receptor sa neviažu antagonisti opioidných receptorov.

Expresia opioidných receptorov aj ich ligandov prebieha vo veľkom rozsahu vo všetkých častiach CNS súvisiacich s bolesťou, kde spôsobujú inhibíciu synaptickej transmisie.

2.2.2.3. Descendentná inhibícia a neuromediátory

Podobne ako je tomu pri descendentnej facilitácii, aj farmakologické aspekty descendentnej inhibície sú komplikovanejšie, ako sa zdá z hypotézy jednoduchého spojenia medzi PAG, RVM a projekčnými spinálnymi neurónmi. Yaksh a Rudy už v roku 1978 ukázali, že po injekcii morfinu do PAG nastáva dlhotrvajúca analgézia, ktorú je možné odstrániť naloxonom (Yaksh and Rudy 1978). O rok neskôr bolo navyše ukázané, že takáto injekcia morfinu do PAG spôsobuje rovnako naloxon-reverzibilnú aktiváciu neurónov v NRM (Behbehani and Fields 1979). Opioidný systém teda zohráva významnú úlohu pri descendentnej inhibícii spinálnych projekčných neurónov po osi PAG-NRM.

Opioidy v PAG významnou mierou interagujú aj s GABA-ergnými a glutaminergnými neurónmi. GABA-ergné neuróny sa v PAG vyskytujú hlavne v podobe interneurónov, ktoré sú tonicky aktívne. Po injekcii nekompetitívneho GABA_A antagonistu pikrotoxínu aj kompetitívneho GABA_A antagonistu bikukulínu do PAG dôjde k analgézi u potkanov pri *tail-flick* teste, pričom bola pozorovaná zvýšená aktivita *off-cell* neurónov, respektíve znížená aktivita *on-cell* neurónov v RVM. Po injekcii selektívneho GABA_A agonistu muscimolu došlo k zrušeniu týchto účinkov, rovnako ako účinku morfinu podaného tiež priamo do PAG (Moreau and Fields 1986). Z uvedenej štúdie vyplýva, že opioidný systém v PAG interaguje s GABA-ergnými neurónmi a ich inhibíciou dôjde k odblokovaniu modulačného účinku PAG na spinálne nociceptívne neuróny. Podobne zohrávajú excitačnú úlohu v PAG neuróny

exprimujúce synapsy pre EAA, glutamát a aspartát. V PAG sa nachádzajú všetky tri typy glutaminergných receptorov. Niekoľkokrát bolo preukázané, že injekcia glutamátu do PAG má za následok analgéziu, rovnako ako ovplyvnenie neurónov v RVM (Behbehani and Fields 1979).

V PAG bola zistená prítomnosť enzýmov, ktoré sa zúčastňujú na syntéze katecholamínov a v *in vitro* štúdií adrenalín predlžuje aktivitu väčšiny neurónov z PAG. Tieto neuróny pochádzajú hlavne z ventrolaterálnej časti a ich ovplyvnenie adrenalínom prebieha presynapticky aj postsynapticky, pretože tieto účinky sú rušené α_1 aj α_2 antagonistami (Pearson, Goldstein et al. 1979; Kopp, Denoroy et al. 1979; Jiang, Chandler et al. 1992).

Ventrolaterálna aj ventromediálna časť PAG obsahuje telá serotoninergných neurónov (Clements, Beitz et al. 1985), ale ich úloha pri modulácii bolesti pravdepodobne súvisí s ovplyvnením pocitu strachu a úzkosti serotonínom.

2.2.3. Kaskáda dejov aktivovaná tkanivovým poškodením

Pri pretrvávajúcom aferentnom podnete, napríklad pri tkanivovom poškodení následkom poranenia excitačné neurotransmitery prostredníctvom excitačných receptorov (NMDA a NK-1) iniciujú spustenie kaskády vedúcej k syntéze NO, produktov cyklooxygenáz a zvýšeniu aktivity miechových kináz (Yaksh, Hua et al. 1999). Aktivácia NMDA receptoru vedie k zvýšeniu intracelulárnej hladiny Ca^{2+} a zvýšeniu aktivity fosfolipázy A_2 (Dumuis, Sebben et al. 1988). Cyklooxygenázy katalyzujú syntézu prostaglandínov z kyseliny arachidónovej, ktorá sa tvorí v bunkách z fosfolipidov prostredníctvom fosfolipázy A_2 . Cyklooxygenáza je bifunkčný enzým, pomocou bis-oxygenázovej aktivity katalyzuje tvorbu prvého peroxidového medziproduktu z kyseliny arachidónovej prostaglandínu G_2 (PGG_2) a pomocou peroxidázovej aktivity z neho vytvára druhý peroxidový medziprodukt prostaglandín H_2 (PGH_2). Ten je následne zdrojom celého spektra prostanoidov. Biologické účinky jednotlivých prostanoidov sú zhrnuté v Tab.1, ktorá bola spracovaná podľa prehľadovej práce Mardiniho a Fitzgeralda (Mardini and Fitzgerald 2001). Z nej je vidieť, že biologické účinky jednotlivých prostanoidov sú veľmi pestré.

Prostaglandíny sa tvoria z viacerých neurálnych aj non-neurálnych zdrojov a existuje aj viacero foriem cyklooxygenáz. Konštitutívna forma COX-1 sa nachádza vo väčšine tkanív, predovšetkým však v trombocytoch, bunkách žalúdočnej sliznice a obličkách, kde má organoprotektívne vlastnosti. Na druhej strane aktivita COX-2 je vo veľkej miere indukovaná

prozápalovými mediátormi (IL-1, IL-2, TNF- α , bakteriálny lipopolysacharid) a katalyzuje tvorbu hlavne tej časti prostaglandínov, ktoré sú v spojitosti so zápalom a bolesťou.

Aj keď sú v súčasnosti známe dva gény pre COX-1 a COX-2, pomocou zostrihov (*splicing*) a posttranslačných úprav vznikajú ich rôzne varianty. Známa je COX-3 ako varianta COX-1 a predpokladá sa existencia varianty COX-2b (Kršiak, Doležal et al. 2006). Ďalej existujú indície, že v niektorých prípadoch, napríklad v preklinckom modeli osteoartrózy, dochádza k zvýšenej expresii spinálnej mRNA pre COX-2, ale v neskoršej fáze aj pre COX-1. Podobné zvýšenie nastalo aj u oboch proteínov (Procházková, Zanvit et al. 2009). Z toho vyplýva, že dnešný pohľad na problematiku izoform cyklooxygenáz a ich biologickú funkciu predstavuje pravdepodobne len zjednodušenie skutočného stavu.

Pri hyperalgézií zohrávajú z väčšieho množstva prostanoidov generovaných *in vivo* najdôležitejšiu úlohu PGE₂ a PGI₂. Mechanizmus ich pôsobenia pri nocicepcii spočíva pravdepodobne v tom, že cez excitačné EP receptory pôsobia v miechových rohoch a zároveň spätne ovplyvňujú uvoľňovanie glutamátu a substancie P (Millan 1999).

Oveľa menej je známa funkcia produktov lipoxygenázovej vetvy mechanizmu kyseliny arachidónovej. Leukotrién B₄ sa akumuluje v zapálených tkanivách a predpokladá sa, že ovplyvňuje aktivitu polymorfonukleárných leukocytov. Okrem toho pravdepodobne zatiaľ neznámym mechanizmom interaguje s nociceptívnymi zakončeniami C-vlákien (Aman, Schuligoi et al. 1996).

Tab.1. Prednostné miesta výskytu a hlavné biologické účinky prostanoidov

PROSTANOID	PREDNOSTNÉ MIESTO VÝSKYTU	HLAVNÉ BIOLOGICKE ÚČINKY
tromboxán A₂ (TxA₂)	trombocyty, monocyty	agregácia trombocytov, broncho- a vazokonstrikcia, proliferačný účinok
prostaglandín I₂ (PGI₂, prostacyklín)	vaskulárny endotel a subendotel	inhibícia agregácie a adhézie trombocytov, broncho- a vazodilatácia, uvoľňovanie cholesterolu z arteriálnych buniek, zvýšenie priepustnosti arteriálnych stien
prostaglandín D₂ (PGD₂)	mastocyty, PGD-syntáza bola objavená aj v mozgu	bronchospazmus a alergická astma, inhibícia agregácie trombocytov, spánok
prostaglandín E₂ (PGE₂)	dreň obličiek, žalúdočná sliznica, trombocyty, mikrovaskulárny endotel	inhibícia reabsorpcie Na ⁺ , broncho- a vazodilatácia, kontrakcia uteru, funkcia lymfocytov, presynaptická adrenergná modulácia
prostaglandín F_{2α} (PGF_{2α})	mozog, uterus	kontrakcia bronchov a uteru, uterálna vazokonstrikcia, pôrod

2.3. Súčasné možnosti farmakoterapie bolesti

2.3.1. Neopioidné analgetiká

Je to pomerne široká skupina látok, ktoré majú analgetické, antipyretické a protizápalové účinky a patria medzi najrozšírenejšie a najúčinnnejšie látky používané vo farmakoterapii nociceptívnej bolesti. Ich mechanizmus účinku je založený na inhibícii cyklooxygenázy, ktorá je limitujúcim prvkom v syntéze prostaglandínov. Rozdelenie podľa účinku a miery selektivity voči COX-1 a COX-2 je uvedené v Tab.2, spracovanej podľa kapitol v monografii Bolest od Rokytu, Kršiaka, Kozáka a kolektívu autorov (Kršiak, Doležal et al. 2006; Kršiak, Lejčko et al. 2006).

Analgetické účinky neselektívnych a COX-2 preferenčných, respektíve selektívnych analgetík sú porovnateľné, líšia sa však incidenciou nežiadúcich účinkov. Najčastejšie nežiadúce účinky neselektívnych NSA sú gastrointestinálne, menej časté prejavy zvýšenej krvácanosti (hlavne pri aspiríne) a alergické reakcie s možným rozvojom bronchiálnej astmy. Riziko krvácania sa zvyšuje pri súčasnom užívaní antikoagulancií a antidepresív zo skupiny SSRI (selektívne inhibítory spätného vychytávania sérotonínu). Podľa rozsiahlych klinických štúdií a metaanalýz spracovaných v prehľadovej práci Lanasa (Lanas 2010), dochádza u pacientov užívajúcich neselektívne NSA k štvornásobne vyššiemu riziku komplikácii v hornom gastrointestinálnom trakte (GIT) v porovnaní s pacientmi, ktorí NSA neužívajú, a dokonca k päťnásobnému nárastu rizika vzniku peptického vredu. Za rizikové faktory sú považované vek nad 60 rokov, liečba vysokými dávkami, alebo dlhodobá liečba NSA, peptický vred v anamnéze, súčasná liečba antikoagulanciami, alebo glukokortikoidmi a infekcia mikroorganizmom *Helicobacter pylori*. Na druhej strane, liečba COX-2 preferenčnými, alebo COX-2 selektívnymi NSA prináša výrazne znížený výskyt gastrointestinálnych nežiadúcich reakcií, u COX-2 selektívnych NSA je miera rizika dokonca na úrovni placebo.

V súčasnosti je široko diskutovaná otázka kardiovaskulárneho rizika spojeného s liečbou COX-2 selektívnymi NSA. Na základe rozsiahlej epidemiologickej štúdie APPROVe (z angl. *Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx*), ktorá bola pôvodne zameraná na možný vplyv rofekoxibu na recidívu benígnych polypov v hrubom čreve, bolo zistené, že užívanie rofekoxibu je spojené so signifikantným nárastom infarktu myokardu a tromboembolických príhod v porovnaní s placebom (Baron, Sandler et al. 2008). Na základe týchto údajov bol rofekoxib v roku 2004 stiahnutý z trhu.

Okrem NSA patria do skupiny neopioidných analgetík aj paracetamol a pyrazolóny (metamizol a propyfenazón). Od NSA sa líšia tým, že nemajú protizápalové účinky a sú veľmi slabými inhibítormi periférnej COX. Ich analgetická účinnosť sa vysvetľuje inhibíciou COX v CNS. Podľa viacerých indícií má centrálna zložka mechanizmu účinku paracetamolu súvis s ovplyvnením descendentných serotonergných dráh (Graham and Scott 2005; Pickering, Esteve et al. 2008).

2.3.2. Opioidné analgetiká

Opioidné analgetiká v rôznej miere stimulujú aktivitu opioidných receptorov a tým spôsobujú analgéziu. Pôsobia na tri základné typy opioidných receptorov – μ , κ a δ , ktoré majú vlastné endogénne ligandy, pričom analgézia prebieha hlavne aktiváciou spinálnych a supraspinálnych μ receptorov. Opioidné receptory patria medzi receptory asociované s G-proteínom, ich aktiváciou je utlmená funkcia adenylátcyklázy a v konečnom dôsledku znižujú výstup K^+ a vstup Ca^{2+} cez presynaptickú membránu a tlmia tak prenos vzruchu cez synapsu. Ich účinok je teda vo všeobecnosti tlmivý. Miesta účinku opioidných analgetík sú hlavne v zadných miechových rohoch a pri kontrole descendentných inhibičných dráh PAG-RVM. Opioidné receptory sa však vyskytujú aj na zakončeníach periférnych aferentných C vlákien.

Opioidy podľa účinku rozdeľujeme na silné a slabé. Medzi silné opioidy patria látky s plným agonistickým účinkom na opioidné receptory ako morfín, metadon alebo fentanyl. Slabší agonisti opioidných receptorov sú kodeín alebo tramadol, ktoré patria medzi analgetiká často používané aj v terapii bežných bolestí. Rozdelenie na silné a slabé opioidy je uvedené v Tab.2, spracovanej podľa kapitol v monografii Bolest (Kršiak, Doležal et al. 2006; Kršiak, Lejčko et al. 2006).

Medzi látky so zmiešaným agonisticko-antagonistickým účinkom patria pentazocín, nalbufín a buprenorfin a ako antagonistu opioidných receptorov sa používa naloxon. Rozdelenie podľa agonistického pôsobenia na receptory je uvedené v Tab.3, spracovanej podľa kapitoly v učebnici Pharmacology, 5th Edition (Rang, Dale et al. 2003).

Opioidné analgetiká spôsobujú v terapeutických dávkach dávkovo závislú analgéziu, vo vyšších dávkach dochádza k rozvoju nežiadúcich účinkov typu sedácie alebo eufórie, útlmu dýchacieho centra, obštipácie a zvracania. Nežiadúce účinky môžu byť zosilnené súčasným podávaním iných látok s tlmivým účinkom na CNS, napríklad alkoholom alebo benzodiazepínmi.

Tab.2. Rozdelenie analgetík (spracované podľa Rokyta, Kršiak, Kozák a kol.: Bolest', 2006)

Neopioidné analgetiká		
Analgetiká-antipyretiká	paracetamol, metamizol, propyfenazón	
Nesteroidné antiflogistiká	neselektívne	kyselina acetylsalicylová (aspirín), ibuprofén, diklofenak, kyselina tiaprofénová, ketoprofén, naproxén, piroxikam, oxaprozín, indometacín, dexketoprofén
	COX-2 preferenčné	meloxicam, nimesulid
	COX-2 selektívne	celecoxib, etorikoxib
Opioidné analgetiká		
Silné opioidy	morfín, petidín, fentanyl, piritramid, buprenorfín, oxykodón, hydromorfón, metadón, ramifentanil, sufentanil	
Slabé opioidy	kodeín, tramadol, dihydrokodeín, propoxyfén, pentazocín, butorfanol, nalbufrín	

Tab.3. Rozdelenie opioidov podľa stimulácie alebo blokády opioidných receptorov (podľa Rang *et al.*: Pharmacology, 5th Edition, 2003)

			μ (mí)	δ (delta)	κ (kappa)
Agonisti	Silné opioidy	morfín, oxykodón, hydromorfón, fentanyl, sufentanil, piritramid, metadón, petidín	+++	+	+
	Slabé opioidy	kodeín, tramadol	+	0/+	0/+
Zmiešaní agonisti-antagonisti	Silné opioidy	buprenorfín	P (+++)	0/+	--
	Slabé opioidy	pentazocín, butorfanol, nalbufrín	-	+	P(++)
Antagonisti	naloxon, naltrexon		---	-	--

+ agonista, P(+) parciálny agonista, - antagonista, 0 bez efektu

2.3.3. Postup pri farmakoterapii bežných akútnych bolestí

Výber farmakoterapie bežnej akútnej bolesti sa riadi niekoľkými zásadami. Vychádza sa z údajov od pacienta o intenzite a charaktere bolesti a z jeho klinického stavu. Pri výbere analgetika sa všeobecne uplatňuje postup vychádzajúci z trojstupňovej klasifikácie intenzity bolesti WHO (Svetová zdravotnícka organizácia, Tab.4). Ďalším vodítkom je Oxfordská liga analgetík, zostavená na základe výsledkov metaanalýz veľkého počtu klinických štúdií zameraných na stavy spojené s akútnou bolesťou z hľadiska medicíny založenej na dôkazoch (Tab.5). S výnimkou intenzívnych krátkodobých bolestí má prednosť neinvazívne podávanie analgetík, je nutné dostatočne monitorovať účinnosť liečby a nežiadúce účinky. U bežných krátkodobých bolestí je vhodné užívať analgetiká len v prípade potreby.

Tab.4. Algoritmus farmakoterapie akútnej bolesti podľa rebríčka WHO (spracované podľa Rokyta, Kršiak, Kozák a kol.: Bolesť, 2006)

1. stupeň – mierna až stredná bolesť	
<i>NSA nie sú kontraindikované</i>	<i>NSA sú kontraindikované</i>
<ul style="list-style-type: none"> • ibuprofén 200 mg • diklofenak 25 mg • kys. acetylsalicylová 650 – 1000 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • paracetamol 650 – 1000 mg • tramadol 50 – 100 mg
2. stupeň – stredná až silná bolesť	
<i>NSA nie sú kontraindikované</i>	<i>NSA sú kontraindikované</i>
<ul style="list-style-type: none"> • ibuprofén 400 – 800 mg • diklofenak 50 – 100 mg • iné klasické NSA • nimesulid 100 mg • vhodná analgetická kombinácia • metamizol 500 – 1000 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • paracetamol 650 mg + tramadol 75 mg • paracetamol 650 – 1000 mg + kodeín 60 mg • iná vhodná analgetická kombinácia • metamizol 500 – 1000 mg
3. stupeň – veľmi silná bolesť	
<ul style="list-style-type: none"> • silný opioid (prípadne + paracetamol alebo NSA) – injekčne: morfin, piritramid, petidín – perorálne: morfin, oxycodon 	

Tab.5. Oxfordská liga analgetík (publikovaná v bulletine Moore, Edwards, Barden a McQuay: Bandolier`s Little Book of Pain, Oxford University Press, 2003), upravené podľa Rokyta, Kršiak, Kozák a kol.: Bolest', 2006)

Skupina	NNT	
1	< 2,9	nesteroidné antiflogistiká – ibuprofén 200 alebo 400 mg, diklofenak 25 alebo 50 mg ai., koxiby paracetamol + opioidy vysoké dávky – paracetamol 1000 mg + kodeín 60 mg, paracetamol 650 mg + tramadol 75 mg metamizol 500 mg
	2,9	morfín 10 mg i.m., petidín 100 mg i.m.
2	3 – 4	paracetamol alebo kys. acetylsalicylová vysoké dávky (1000 mg) paracetamol + kodeín stredné dávky – paracetamol 600 – 650 mg + kodeín 60 mg
3	4,1 – 6	paracetamol alebo kys. acetylsalicylová stredné dávky (500 – 650 mg) paracetamol + kodeín nízke dávky – paracetamol 300 mg + kodeín 30 mg tramadol 100 mg

Oxfordská liga analgetík bola zostavená na základe metaanalýz početných klinických skúšaní analgetík podľa účinku ich perorálnych dávok pri akútnej alebo pooperačnej bolesti. Hodnota NNT (z angl. „*Number Needed to Treat*“) udáva, koľko pacientov (nereagujúcich na placebo) musíme liečiť, aby sme aspoň u jedného z nich dosiahli aspoň 50 % úľavu od bolesti. Čím je hodnota NNT nižšia, tým je väčšia pravdepodobnosť, že liečivo bude tlmieť bolesť.

2.4. Použitie neopioidných analgetík v kombináciách

Neopioidné analgetiká sa kombinujú s látkami z rôznych farmakologických skupín za účelom zvýšenia analgetického účinku a zníženia potrebnej dávky, s čím súvisí zníženie výskytu nežiadúcich účinkov. Zvláštnu kategóriu tvoria kombinácie analgetík s farmaceutickými pomocnými látkami, ktoré sami nemajú žiadny farmakologický účinok. Prípravky, ktoré obsahujú jednu, alebo viac látok zo skupiny NSA v kombinácii napríklad s paracetamolom a s látkami potencujúcimi ich analgetický účinok, napríklad kofeínom, tvoria dnes skupinu významných liekov na liečbu rôznych typov bolesti, v preklinickom aj klinickom výskume je však spektrum používaných a skúšaných kombinácií oveľa širšie.

2.4.1. Interakcie paracetamolu s NSA

Potenciálne synergne interakcie medzi paracetamolom a viacerými látkami zo skupiny NSA boli hodnotené v rozsiahlejšej preklinickej štúdiu pomocou izobolografickej analýzy. Po vyhodnotení analgetickej účinnosti použitých kombinácií v teste peritoneálneho dráždenia (*writhing test*) u myši bola zistená potenciácia analgetického účinku medzi paracetamolom a použitými NSA: diklofenakom, ibuprofénom, naproxenom, ketoprofénom, meloxicamom, nimesulidom a parecoxibom. Okrem toho bola zistená aj synergna interakcia medzi paracetamolom a metamizolom (Miranda, Puig et al. 2006).

Zvláštna pozornosť bola venovaná interakciám paracetamolu s ketoprofénom. V štúdiu skúmajúcej analgetickú účinnosť týchto látok v teste peritoneálneho dráždenia u myši bola preukázaná ich signifikantná synergia pri perorálnom podaní. Na druhej strane sa nezistilo žiadne vzájomné ovplyvnenie plazmatických hladín medzi týmito liečivami (Qiu, Liu et al. 2007).

Ketoprofén je zmesou opticky aktívnych izomérov, pričom farmakologicky účinná je jeho pravotočivá forma dexketoprofén. Jeho interakcie s paracetamolom boli skúmané v preklinickej štúdiu, v ktorej bol jako tretia látka použitý základný zástupca opioidných analgetík morfin. V tejto štúdiu boli použité tri testy akútnej bolesti, test peritoeálneho dráždenia, test švihnutia chvostom (*tail-flick test*) a formalínový test. Pri teste švihnutia chvostom sa zistila synergna interakcia medzi morfinom a paracetamolom, dexketoprofén bol silne synergický s obidvoma použitými látkami vo všetkých troch testoch, pričom jeho analgetický účinok bol vo všeobecnosti silnejší, ako u racemickej formy (Miranda, Puig et al. 2007).

2.4.2. Interakcie paracetamolu s opioidmi

V náväznosti na vyššie uvedenú štúdiu autori publikovali ďalšiu prácu, v ktorej sledovali interakcie medzi zložkami multimodálnej analgézie v teste peritoneálneho dráždenia u myší. V experimentoch podávali intraperitonálne kombinácie látok, z ktorých sa jako najúčinnější prejavila trojkombinácia morfinu, paracetamolu a ketoprofenu. Zároveň bol hodnotený vplyv látok z iných farmakologických skupín. Podanie antagonistu opioidných receptorov naltrexonu a 5-HT₃-antagonistu tropisetronu uvedenú synergiu zoslabilo, zatiaľ čo podanie α_1 -blokátora prazosínu ju signifikantne zosilnilo. Podanie anticholinergika atropínu nemalo na uvedenú synergiu žiadny účinok (Miranda, Prieto et al. 2008).

V klinickej oblasti je dnes často používaná kombinácia paracetamolu so slabým opioidom kodeínom. 28 klinických štúdií zaoberajúcich sa účinnosťou tejto kombinácie pri akútnej pooperačnej bolesti (25 oproti placebo a 13 oproti paracetamolu) a publikovaných do roku 2002 bolo hodnotených pomocou metaanalýzy, ktorá vyšla napríklad v bulletine Moore, Edwards, Barden a McQuay: Bandolier's Little Book of Pain (Oxford University Press, 2003) a je dostupná aj v elektronickej forme. Podľa tejto metaanalýzy dosahuje pri strednej až silnej bolesti kombinácia 600 – 650 mg paracetamolu a 60 mg kodeínu v porovnaní s placebom hodnotu 4,2 NNT, pričom dochádza k minimálne 50 % úľave od bolesti počas 4 – 6 hodín. Rovnako kombinácia 1000 mg paracetamolu a 60 mg kodeínu dosahuje dokonca až 2,2 NNT. Zatiaľ čo pri kombinácii 600 – 650 mg/60 mg uvádzalo aspoň 50 % úľavu od bolesti 42 % pacientov, pri kombinácii 1000 mg/60 mg to bolo 57 %. Ukázalo sa, že v porovnaní s paracetamolom samotným spôsobuje pridanie 60 mg kodeínu signifikantne zvýšený analgetický efekt. K nárastu dochádza u 13 až 22 % z celkového počtu pacientov. U pacientov liečených kombináciou 600 – 650 mg paracetamolu s 60 mg kodeínu sa objavili signifikantne početnejšie vedľajšie príznaky ospalosti a závratu v porovnaní s placebom, u žiadneho z nich však nedosiahli závažnosť vedúcu k prerušeniu, alebo ukončeniu liečby.

Ďalšia metaanalýza, ktorá je k dispozícii v rovnakom zdroji, ako vyššie uvedená (Bandolier's Little Book of Pain, Oxford University Press, 2003), je zameraná na analgetickú účinnosť kombinácie paracetamolu s ďalším zástupcom skupiny slabých opioidov, tramadolom. Podľa tejto metaanalýzy je kombinácia paracetamolu s tramadolom (650 mg/75 mg pri akútnej bolesti po stomatologickom zákroku a 975 mg/112,5 mg pri akútnej bolesti po chirurgickom zákroku) výrazne účinnější ko placebo s hodnotami NNT medzi 2 – 3. Tento účinok pretrváva niekoľko hodín, po ôsmich hodinách je stále rovnaký, ako po šiestich.

Pacienti liečení z dôvodu dentálnej bolesti uvádzali vyšší výskyt nežiadúcich účinkov typu závratu, nauzey a zvracania, v porovnaní s placebom.

V novšej štúdií bola ako test bolesti u 17 zdravých dobrovoľníkov použitá hyperalgézia spôsobená mechanickými podnetmi po predchádzajúcej transkutánnej elektrickej stimulácii. Obidve skúmané látky boli podávané vo forme intravenózne infúzie samostatne aj v kombinácii. Podanie tramadolu aj paracetamolu viedlo k porovnateľnému potlačeniu bolesti, zatiaľ čo paracetamol mal výraznejší efekt na hyperalgéziu. Podanie týchto látok v kombinácii viedlo k supra-aditívnemu analgetickému účinku a zároveň bola pozorovaná vyššia účinnosť na hyperalgéziu v porovnaní s paracetamolom samotným (Filitz, Ihmsen et al. 2008).

2.4.3. Interakcie paracetamolu s látkami z iných farmakologických skupín

2.4.3.1. Interakcia paracetamolu s guaifenezínom

Kombinácia paracetamolu s guaifenezínom je základom niektorých voľnopredajných liekov proti bolesti už dlhý čas. Schopnosť guaifenezínu, ktorý sa samostatne používa ako expektorans a myorelaxans, ovplyvniť analgetický účinok paracetamolu, bola overená v preklinickej štúdií. V teste peritoneálneho dráždenia sa ukázalo, že guaifenezín podávaný perorálne v subefektívnej dávke (200 mg/kg) znižuje hodnotu ED₅₀ paracetamolu z 233,7 mg/kg (samostatné podanie paracetamolu) na 82,2 mg/kg (paracetamol v kombinácii s guaifenezínom). Keďže u guaifenezínu bol popísaný okrem myorelaxačného aj určitý sedatívny efekt, autori štúdie skúmali aj jeho vplyv na pohybovú aktivitu myší. Za týmto účelom použili dva behaviorálne modely, test rotujúcej tyčky (*rota-rod test*) a aktivitnú klietku. Ani jeden z týchto modelov neukázal pri použití potencujúcej dávky guaifenezínu výrazné ovplyvnenie pohybovej aktivity u myší. Z výsledkov štúdie vyplýva, že guaifenezín skutočne zlepšuje analgetický účinok paracetamolu (Dolezal and Krsiak 2002b).

2.4.3.2. Interakcia paracetamolu s kofeínom

Podobne ako kombinácia paracetamolu s guaifenezínom, aj kombinácia paracetamolu s kofeínom je základom niektorých voľnopredajných liekov proti bolesti. To, že kofeín potencuje analgetický účinok paracetamolu, bolo preukázané v klinickej štúdií, v ktorej autori skúmali rozdiely medzi analgetickým efektom paracetamolu samotného a kombinácie

paracetamolu s kofeínom. Štúdie sa zúčastnilo 173 pacientov trpiacich dentálnou bolesťou po extrakcii zubu a 1345 pacientiek s popôrodnými bolesťami. Pacientmi uvádzané zmeny v pociťovaní bolesti po podaní analgetík boli hodnotené pomocou jednotiek vyjadrujúcich percentuálne zmeny v intenzite bolesti % SPI (*sum of the pain intensity*). Zo štúdie vyplynulo, že kombinácia 500 mg dávky paracetamolu s 65 mg kofeínu mala väčší analgetický efekt ako podanie 500 mg paracetamolu samotného vo všetkých hodnotených skupinách pacientov. Rovnako rýchlosť nástupu účinku bola u kombinácie paracetamolu s kofeínom vyššia, ako tomu bolo u paracetamolu samotného (Laska, Sunshine et al. 1983).

Účinnosť kofeínu ako adjuvantného ko-analgetika bola rovnako v 80-tych rokoch hodnotená pomocou metaanalýzy, ktorá zahŕňala klinické štúdie na viac ako 10000 pacientoch v časovom rozmedzí 20-tich rokov. Výsledky metaanalýzy ukázali, že na dosiahnutie rovnakého analgetického účinku je potrebná o 40 % vyššia dávka analgetika samotného, ako analgetika kombinovaného s kofeínom (Laska, Sunshine et al. 1984).

2.4.3.3. Interakcia paracetamolu s rilmenidínom

Možná potenciácia analgetického účinku paracetamolu imidazolínovým α_2 -agonistom rilmenidínom, ktorý sa v súčasnosti používa ako antihypertenzívum, bola zisťovaná v preklinickej štúdií. Použitý bol preklinický test peritoneálneho dráždenia u myší, zatiaľ čo možné lokomočné nežiadúce účinky boli overované pomocou testu rotujúcej tyčky. Pomocou izobolografickej analýzy sa ukázalo, že interakcia paracetamolu s rilmenidínom v analgézií je silne synergná, a že takáto kombinácia nijako neovplyvňovala lokomočné vlastnosti zvierat v analgetických, ani v supra-analgetických dávkach (Soukupova, Dolezal et al. 2009b).

2.4.4. Interakcie NSA s opioidmi

V preklinickej štúdií boli porovnávané vlastnosti skupiny neopioidných analgetík a ich interakcie s morfínom pri intraperitoneálnej aplikácii v teste peritoneálneho dráždenia u myší. Autori použili diklofenak, ketoprofén, piroxikam, meloxikam, paracetamol a metamizol. Pri podávaní kombinácií jednotlivých neopioidných analgetík s morfínom a následnom vyhodnotení pomocou izobolografickej analýzy boli preukázané supra-aditívne interakcie. Následne boli s využitím selektívnych antagonistov opioidných receptorov hľadané možné mechanizmy, ktoré môžu na jednotlivých synergných interakciách participovať. Pri použití selektívneho antagonistu μ -receptorov naltrexonu bolo pozorované zníženie supra-aditivity na

hodnoty aditívne, pričom u kombinácií morfinu s paracetamolom a morfinu s metamizolom došlo k zníženiu až na hodnoty subaditívne. Pri použití selektívneho antagonistu δ -receptorov naltrindolu došlo k zníženiu aktivity kombinácií morfinu s diklofenakom, paracetamolom a metamizolom, pričom aktivita kombinácií morfinu s ketoprofénom, meloxicamom a piroxikamom ostala nezmenená. U ovplyvnených kombinácií boli interakcie pozmenené zo supra-aditívnych na aditívne. Vplyv κ -receptorov na vznik synergných interakcií morfinu s použitou skupinou neopioidných analgetík bol hodnotený pomocou nor-binaltorfiminu. Táto látka neovplyvnila aktivitu žiadnej použitej kombinácie (Miranda, Silva et al. 2004).

V štúdiách uvedených vyššie nebol braný zreteľ na selektivitu použitých neopioidných analgetík voči jednotlivým formám cyklooxygenáz. Sú však k dispozícii aj práce, ktoré sa tejto problematike a jej prípadnému vplyvu na synergiu s opioidmi venujú. S použitím testu peritoneálneho dráždeina boli hodnotené interakcie zástupcov skupiny neselektívnych neopioidných analgetík s morfinom. Za týmto účelom bol použitý naproxen, metamizol, piroxikam, diklofenak a ketoprofen. S použitím izobolografickej analýzy sa ukázalo, že kombinácie všetkých uvedených látok s morfinom boli synergné (Miranda, Prieto et al. 2005).

V ďalšej štúdií bol na rovnakom modeli bolesti, ako v predchádzajúcej práci hodnotený vznik synergných interakcií medzi morfinom a látkami zo skupiny COX-2-preferenčných NSA. Použitý bol nimesulid, meloxicam a parecoxib. Pomocou metódy izobolografickej analýzy boli zistené synergné interakcie u všetkých použitých kombinácií, pričom najvyššia synergia bola zistená u parecoxibu, nasledovanému meloxicamom a nimesulidom. Všetky látky v tejto štúdii boli podávané intratekálne (Pinarđi, Prieto et al. 2005).

Ďalšou látkou zo skupiny COX-2 preferenčných neopioidných analgetík, ktorej bola venovaná pozornosť pri sledovaní interakcií s morfinom, je rofekoxib. V tejto štúdii bol použitý model artritídy u potkana. Po použití niekoľkých dávok látok samotných a následne ich kombinácií autori určili kombináciu dávok, ktorá vykazovala najvyššiu a oproti kontrolám významnú analgetickú účinnosť. Okrem uvedenej kombinácie rofekoxibu s morfinom bol zistený výrazne nižší výskyt gastrointestinálnych nežiadúcich účinkov, ako tomu bolo v kontrolnej štúdii s použitím indometacínu (Deciga-Campos, Lopez et al. 2003).

Okrem prác skúmajúcim interakcie neopioidných analgetík s morfinom bola veľká pozornosť venovaná aj kombináciám týchto látok so zástupcami skupiny slabých opioidov. Pri použití kombinácie neselektívneho inhibítora COX naproxenu s tramadolom došlo k očakávanému analgetickému účinku pri teste peritoneálneho dráždenia u myší, ktorý sa však nedostavil, ak bola v kombinácii s tramadolom použitá látka s COX-2-preferenčným mechanizmom účinku, rofecoxib. Rovnako aj pri použití izobolografickej analýzy sa ukázalo,

že interakcia medzi naproxenom a tramadolom je supra-aditívna, zatiaľ čo takáto interakcia pri použití rofecoxibu pozorovaná nebola (Satyanarayana, Jain et al. 2004a).

V štúdiu, ktorá bola venovaná potenciácii analgetického účinku kombinácie ketorolaku s tramadolom, dostávali samice potkanov niekoľko perorálnych dávok týchto látok podávaných samostatne, alebo v kombináciách v modeli artritckej bolesti. Pri použití rôznych kombinácií tramadolu a ketorolaku boli zistené aditívne antinociceptívne účinky u 14 kombinácií, u troch kombinácií bol zistený maximálny antinociceptívny efekt a u jednej kombinácie bola pozorovaná tzv. vysoká potenciácia účinku ($p < 0,001$). Zároveň bol pri použití tejto dávky zistený nižší výskyt gastrointestinálnych nežiadúcich účinkov v porovnaní s kontrolnou skupinou, u ktorej bol na vyvolanie gastrointestinálnej reakcie použitý indometacín (Lopez-Munoz, Diaz-Reval et al. 2004).

Podobná štúdia mala za cieľ vyhodnotenie analgetickej účinnosti kombinácie tramadolu s COX-2-preferenčným neopioidným analgetikom etorikoxibom. Autori tejto štúdie použili model mechanickej hyperalgie u potkanov a na overenie synergetickej interakcie metódu izobolografickej analýzy. S jej využitím bol preukázaný vznik supra-aditívnej interakcie medzi týmito dvomi látkami, z nich každá aj pri podaní samostatne vzkázala dlhotrvajúci účinok v použítom modeli bolesti. V účinnej kombinácii následne bolo možné použiť nižšie dávky oboch látok (Singh, Patil et al. 2006).

Ďalšou látkou zo skupiny slabých opioidov, ktorá je využívaná v klinickej praxi na liečbu bolesti, je kodeín. Na štúdium interakcií medzi kodeínom a neopioidnými analgetikami s nešpecifickým mechanizmom účinku boli použité indometacín a diklofenak. V preklinickej štúdiu skúmajúcej interakcie medzi kodeínom a indometacínom na modeli formalínového testu bolesti u potkanov boli jednotlivé látky aplikované perorálne najprv samostatne a potom v kombinácii, ktorá vykazovala dávkovo-závislý analgetický účinok. Napriek tomu ale izobolografická analýza nepreukázala synergnú, len aditívnu interakciu. Naproti tomu pri použití diklofenaku v rovnakom modeli bolesti boli zistené synergné interakcie na rôznych použitých úrovniach, pri lokálnom, spinálnom aj systémovom podaní (Jimenez-Andrade, Ortiz et al. 2003; Arredondo-Garza, Lozano-Cuenca et al. 2007).

Formalínový test bolesti u potkanov bol použitý aj preklinickej štúdiu, skúmajúcej interakcie medzi látkou s COX-2 selektívnym mechanizmom účinku, lumirakoxibom a kodeínom. V tejto práci autori použili aj ďalšieho zástupcu slabých opioidov, nalbufín. Pri lokálnej aplikácii všetkých troch látok samostatne, ako aj kombinácií lumiracoxibu s obidvoma opioidmi bola zistená dávkovo závislá analgetická účinnosť a následne po

vyhodnotení izobolografickou analýzou bola u oboch kombinácií preukázaná supra-aditívna interakcia (Ortiz and Castaneda-Hernandez 2008).

2.4.5. Interakcie NSA s látkami z iných farmakologických skupín

2.4.5.1. Interakcie NSA s kanabinoidmi

Kanabinoidy sú látky, ktoré sú stále považované za potenciálny zdroj nových liečiv a preto sú za týmto účelom intenzívne skúmané. Štúdie skúmajúce interakcie neopioidných analgetík sa tejto problematike takisto nevyhli. U endogénneho kanabinoidu anandamidu existuje analgetická aktivita, ktorá bola využitá v preklinickej štúdii zameranej na interakcie tejto látky s ibuprofénom za účelom zníženia jeho dávky potrebnej na navodenie analgetického efektu. Použitý bol formalínový test u potkanov a na vyhodnotenie dát izobolografická analýza. Kombinácia anandamidu s ibuprofénom sa ukázala ako synergická a pomocou špecifických antagonistov CB-1 a CB-2 receptorov sa ukázalo, mechanizmus interakcie prebieha pravdepodobne prostredníctvom oboch týchto receptorov (Guindon, LoVerme et al. 2006).

V ďalšej štúdii bola zistená synergická interakcia medzi kanabinoidným agonistom a neopioidným analgetikom ketorolakom v teste peritoneálneho dráždenia u myši (Ulugol, Ozyigit et al. 2006).

2.4.5.2. Interakcie NSA s cholinomimetikami

Inou skupinou látok, o ktorej sa uvažuje v súvislosti s ovplyvnením aktivity neopioidných analgetík, sú cholinomimetiká. V štúdii zameranej na kombináciu priameho cholinomimetika karbacholu s viacerými neopioidnými analgetikami v teste peritoneálneho dráždenia u myši bola zistená supra-aditívna potenciácia analgetického účinku pri intraperitoneálnom podaní, avšak po intratekálnej aplikácii boli interakcie len aditívne (Miranda, Sierralta et al. 2002a).

V ďalšej štúdii boli po použití inhibítora acetylcholinesterázy neostigminu dosiahnuté podobné výsledky (Miranda, Sierralta et al. 2002b).

2.4.5.3. Interakcie NSA s látkami ovplyvňujúcimi adrenergny systém

Rozdiel medzi silou interakcie po intraperitoneálnej a intratekálnej aplikácii bol pozorovaný aj v štúdiu zaoberajúcej sa interakciami neopioidných analgetík s α_2 -agonistom klonidínom. Použitých bolo niekoľko NSA s nešpecifickým aj COX-2 preferenčným mechanizmom účinku, paracetamol a metamizol, ako model bolesti test peritoneálneho dráždenia. Kombinácie týchto látok s klonidínom sa po intraperitoneálnej aplikácii ukázali znovu ako synergné a po intratekálnej aplikácii ako aditívne (Miranda and Pinardi 2004).

Možná adrenergná modulácia antinociceptívneho účinku NSA bola študovaná s použitím diklofenaku a ketoprofenu. Pri simultánnom podaní diklofenaku s adrenergnými látkami fenylefrínom, klonidínom, dezipramínom, prazosínom a johimbínom v teste peritoneálneho dráždenia u myší sa zistilo, že po systémovej aplikácii dochádza k supra-aditívnej interakcii s agonistami α -receptorov fenylefrínom a klonidínom (Miranda, Sierralta et al. 2001).

V ďalšej štúdiu sa ako supra-aditívne ukázali kombinácie ketoprofenu s fenylefrínom a klonidínom po intraperitoneálnej aplikácii, pričom po intratekálnom podaní k takejto interakcii nedošlo. Ako supra-aditívna sa ukázala aj interakcia medzi ketoprofenom a inhibítorom spätného vychytávania noradrenalinu desipramínom, rovnako len po systémovej aplikácii (Pinardi, Sierralta et al. 2001).

V izobolografickej štúdiu sa autori zamerali na testovanie možnej potenciácie analgetického účinku ibuprofenu imidazolínovým α_2 -agonistom rilmenidínom, ktorý sa používa jako antihypertenzívum. Použili na to preklinický test peritoneálneho dráždenia a na overenie možných lokomočných nežiadúcich účinkov takejto kombinácie test rotujúcej tyčky. Izobolografická analýza ukázala, že interakcia medzi týmito dvoma látkami pri analgézii je významne synergná bez ovplyvnenia motorických vlastností laboratórnych zvierat, ale stále nie je jasné, či má rilmenidín nejakú analgetickú aktivitu aj u ľudí (Soukupova, Dolezal et al. 2009a).

S adrenergnou moduláciou antinociceptívneho účinku neopioidných analgetík čiastočne súvisí aj práca zaoberajúca sa interakciám ibuprofenu s antidepressívom duloxetínom, ktorý je inhibítorom spätného vychytávania noradrenalinu a serotonínu v niekoľkých preklinických modeloch bolesti. V modeloch abdominálnej zápalovej bolesti a karagenínom-indukovanej termálnej hyperalgie sa interakcia ibuprofenu s duloxetínom ukázala ako supra-aditívna, zatiaľ čo v modeli mechanickej allodýnie len ako aditívna. Všetky látky boli podávané systémove perorálnou cestou (Jones, Peters et al. 2007).

2.4.5.4. Interakcie NSA s gabapentínom

Ďalšia látka, ktorá sa nepoužíva primárne na potlačenie bolesti, ale má analgetickú aktivitu, je gabapentín. Vo formalínovom teste bolesti u potkanov bol gabapentín testovaný v kombinácii s ibuprofénom. Obidve látky boli najprv aplikované samostatne, pričom vo fáze 1 formalínového testu bol ich analgetický účinok limitovaný, zatiaľ čo vo fáze 2 bol ich efekt výraznejší a dávkovo závislý. Izobolografická analýza ukázala aditívnu interakciu medzi týmito dvoma látkami vo fáze 2. Zároveň sa zistilo, že kombinácia gabapentínu s ibuprofénom nemala vplyv na strednú hodnotu arteriálneho krvného tlaku a srdcový rytmus pokusných zvierat, zatiaľ čo pri samostatnom podaní obidve látky vo fázach 1 a 2 tieto hodnoty v rozličnej miere ovplyvňovali (Yoon and Yaksh 1999).

V podobnej štúdií bola preukázaná synergia medzi gabapentínom a diklofenakom vo formalínovom teste u potkanov po lokálnej aplikácii (Picazo, Castaneda-Hernandez et al. 2006).

Okrem gabapentínu sa používajú pri liečbe bolesti aj ďalšie antikonvulzíva, napríklad karbamazepín, valproát, lamotrigín at., ich hlavnými indikáciami sú neuropatická bolesť a bolesti hlavy rôzneho pôvodu.

2.4.5.5. Interakcie NSA s aminoguanidínom

Znovu formalínový test, ale tentoraz u myší, bol použitý v štúdií, ktorá sa zaoberala interakciou medzi COX-2-preferenčným neopioidným analgetikom meloxicamom a selektívneho inhibítora indukibilnej formy NO-syntázy aminoguanidínom. Vyššie dávky obidvoch látok viedli k potlačeniu bolestivého správania u myší v neskorej fáze formalínového testu. Podávanie látok v kombináciách, v ktorých bola dávka jednej, alebo druhej látky podprahová, viedlo rovnako k potlačeniu bolestivého správania, pričom izobolografická analýza ukázala, že interakcia medzi použitými liečivami je synergická (Dudhgaonkar, Tandan et al. 2008).

2.4.6. Interakcie neopioidných analgetík s psychofarmakami

Ako adjuvantné liečivá vo farmakoterapii bolesti sa často používajú látky zo skupiny antidepressív, ktoré majú dnes výrazné uplatnenie hlavne pri liečbe neuropatickej bolesti, ale aj

migrény, fantómovej bolesti apod. Najviac sa uplatňujú tricyklické antidepresíva (imipramín, dezipramín, amitriptylín, atď.), ďalej napríklad mirtazapín, venlafaxín a bupropión.

Za účelom sedácie počas terapeutického výkonu sa často v kombinácii s analgetikami používajú benzodiazepíny. Ako príklad je možné uviesť klinickú štúdiu, v ktorej boli dvom skupinám pacientov, u ktorých bola vykonávaná extrakorporálna litotripsia, podávané kombinácie ketorolaku (60 mg), resp. 100 µg fentanylu s 2,5 mg midazolamu intravenóznou cestou. Ukázalo sa, že obidve kombinácie mali dostatočný analgetický účinok, pričom v skupine pacientov dostávajúcich kombináciu fentanylu s midazolamom bol väčší výskyt nežiadúcich účinkov typu závratu alebo nauzey (Yang, Cherng et al. 2002).

V štúdiu, ktorá skúmala možnú potenciáciu analgetického účinku ibuprofenu anxiolytikom alprazolamom (benzodiazepín, ktorý sa viaže na GABA_A receptor) v niekoľkých preklinických modeloch bolesti, bola potenciácia zistená len pri teste peritoneálneho dráždenia. V modeli akútnej tepelnej bolesti (*plantar* test) a rotujúcej tyčky (*tail-flick* test) boli výsledky negatívne. Z toho je možné usudzovať, že potenciácia analgetického účinku ibuprofenu s alprazolamom prebieha len v obmedzenej miere (Dolezal and Krsiak 2002a).

2.4.7. Interakcie neopioidných analgetík s spazmolytikami

Kombinácie neopioidných analgetík s centrálnymi účinnými spasmolytikami sú takisto základom viacerých liekov často používaných v klinickej praxi, či už voľne predajných, alebo viazaných na lekárske predpis.

Často používaná je kombinácia paracetamolu so spazmolyticky účinným anticholinergikom N-butylyskopolamínom. Jej účinnosť pri kolikovitých abdominálnych bolestiach bola overená napríklad v klinickej štúdiu zahrňujúcej 1637 pacientov. Autori štúdie použili u jednotlivých skupín pacientov samostatné dávky N-butylyskopolamínu (10 mg) a paracetamolu (500 mg), ich fixnú kombináciu, alebo placebo. Ukázalo sa, že v skupinách liečených paracetamolom, N-butylyskopolamínom, alebo ich fixnou kombináciou došlo k štatisticky významnému poklesu intenzity a frekvencie bolesti v porovnaní s placebom, pričom všetky tri druhy liečby boli dobre tolerované. Na druhej strane však štúdia nepreukázala významne zvýšený účinok fixnej kombinácie paracetamolu s N-butylyskopolamínom oproti obidvom látkam podávaným samostatne (Mueller-Lissner, Tytgat et al. 2006).

Ďalšou častou indikáciou tejto kombinácie je menštruačná bolesť. V klinickej štúdii sa ukázalo, že u 125 pacientiek trpiacich menštruačnou bolesťou je kombinácia 500 mg paracetamolu a 10 mg N-butylskopolamínu signifikantne účinná oproti placebo, pričom nedošlo k žiadnym zmenám v menštruačnom krvácaní, ani k incidencii iných nežiadúcich účinkov (Los Santos, Zmijanovich et al. 2001).

U nás je rozšírená aj kombinácia ďalšieho analgetika-antipyretika metamizolu s dvomi spazmolyticky účinnými syntetickými anticholinergikami, pitofenónom a fempiverínom. Jej účinok bol preukázaný napríklad v klinických štúdiách, ktorých sa zúčastnili pacientky trpiace bolesťami po gynekologickom chirurgickom zákroku a pacienti s renálnymi, biliárnymi a uretrálnymi kolikami (Bloch, Smythe et al. 1985; Chaudhary and Gupta 1999).

2.4.8. Nežiadúce účinky v dôsledku interakcií neopioidných analgetík

Nežiadúce účinky, ktoré vznikajú ako dôsledok interakcií neopioidných analgetík s inými liečivami sú všeobecne známe a vyplývajú z ich mechanizmu účinku. Klinický význam má interakcia hlavne neselektívnych NSA s kumarínovým antikoagulans warfarínom. Pri súčasnom podávaní týchto látok (zvlášť, ak sa jedná o vysoké dávky NSA) dochádza k predĺženiu protrombínového času a k zvýšenému riziku krvácania. Predpisovanie warfarínu spoločne s liekmi, u ktorých môže potenciálne dôjsť k nežiadúcej interakcii bolo hodnotené v klinickej štúdii, ktorá pracovala s údajmi zozbieraných z 321 zariadení primárnej zdravotníckej starostlivosti v Škótsku v rokoch 2005 – 2006. Z celkového počtu 17861 pacientov užívajúcich warfarín, ktorí sa na tejto štúdii zúčastnili, bol u 68 % predpísaný okrem warfarínu ešte aspoň jeden liek, potenciálne spôsobujúci interakciu. Spomedzi krátkodobo predpísaných liekov boli látky zo skupiny NSA druhou najčastejšie predpisovanou skupinou (za makrolidovými antibiotikami), pričom u dlhodobo predpisovaných liekov boli NSA spoločne s antitrombotikami najčastejšou skupinou. Na druhej strane v oboch prípadoch bolo predpisovanie liekov potenciálne spôsobujúcich interakcie signifikantne nižšie, ako u pacientov, ktorí warfarín neužívali (Snaith, Pugh et al. 2008).

Kvôli uvedeným skutočnostiam sú pacientom užívajúcim warfarín často predpisované alebo v lekárňach odporúčané ako prostriedky proti zvýšenej teplote a bolesti lieky s obsahom paracetamolu. Napriek relatívnej bezpečnosti paracetamolu bolo v období 1966 – 1999 publikovaných niekoľko klinických alebo prípadových štúdií popisujúcich potenciáciu účinku

warfarínu paracetamolom. Mechanizmus tejto interakcie zatiaľ nie je známy. Výsledky týchto štúdií sú uvedené v prehľadovej práci Sheka a kol., 1999 (Shek, Chan et al. 1999).

Pri súčasnom podávaní látok zo skupiny NSA s aspirínom (v antiagregačnej dávke) sa znižuje jeho antiagregačný efekt. Následkom toho sa u pacientov užívajúcich aspirín v kombinácii s nesteroidným antiflogistikom objavuje väčší výskyt vaskulárnych príhod. Mechanizmus tejto interakcie potvrdzuje klinická štúdia, v ktorej boli skúmané antiagregačné účinky 6 bežne používaných NSA a ich vplyv na účinok aspirínu *ex vivo*. Štúdia ukázala, že antikoagulačný účinok aspirínu sa znížil po súčasnej administrácii ibuprofenu, indometacínu, naproxenu a kyseliny tiaprofénovej, zatiaľ čo pri kombinácii so sulindakom a celekoxibom ostal nezmenený. Z toho vyplýva, že tieto látky sú u pacientov, ktorí potrebujú kombináciu aspirínu s iným NSA najvhodnejšie (Shek, Chan et al. 1999; Gladding, Webster et al. 2008).

Z ďalších klinicky významných nežiadúcich interakcií neopioidných analgetík je možné spomenúť zvyšovanie toxicity metotrexátu a baklofenu, zatiaľ čo k zníženiu terapeutického účinku dochádza napríklad u probenecidu. Riziko gastrointestinálneho krvácania sa zvyšuje pri súčasnom podávaní NSA a antidepresív zo skupiny SSRI.

Problematikou používania nesteroidných antiflogistík u pacientov so zvýšeným gastroduodenálnym rizikom (vredy, perforácie, krvácanie) na Slovensku sa zaoberala ročná štúdia na vzorke 326 pacientov. Z nich u 194 sa rozvinula niektorá z foriem gastroduodenálneho poškodenia v dôsledku používania liečiv zo skupiny NSA, pričom u 49 % z nich sa tieto nežiadúce účinky rozvinuly v súvislosti s použitím aspirínu, u 38 % s iným NSA a v 13 % po ich kombinácii (Rybar, Hlista et al. 2006).

Uvedené komplikácie vznikajúce ako následok interakcií neopioidných analgetík s inými liečivami sa vo veľkej miere vyskytujú u starších pacientov, ktorých zdravotný stav vyžaduje často dlhodobú niekoľkonásobnú farmakoterapiu.

2.5. Formulácie neopioidných analgetík s farmaceutickými pomocnými látkami

Z pomocných látok dnes používaných pri formulácii liekových foriem predstavujú cyklodextríny jeden z účinných systémov umožňujúcich ovplyvnenie absorpcie a distribúcie neopioidných analgetík po perorálnom podaní. Práca využívajúca sprektroskopické metódy a metódy molekulového modelovania charakterizovala komplexáciu neopioidných analgetík zo skupiny oxikamov s beta-cyklodextrínom, ktorý je zo skupiny cyklodextrínov najpoužívanejší. Pri nekovalentnej interakcii medzi beta-cyklodextrínom s piroxikamom, tenoxikamom a meloxikamom autori zmerali väzobné konštanty všetkých troch látok (najvyššia u piroxikamu). Interakcia prebieha v pomere 1:1 a nedochádza pri nej k vzniku žiadneho iného typu väzby okrem nekovalentnej, ani k deformácii molekúl (Banerjee, Chakraborty et al. 2004).

Neopioidné analgetiká zo skupiny oxikamov sú doteraz najpoužívanejšími látkami vo výskume ovplyvnenia analgetickej účinnosti farmák pomocou kombinácií s farmaceutickými pomocnými látkami. Farmakodynamické a farmakokinetické vlastnosti beta-cyklodextrín-piroxikamu spoločne s terapeutickým potenciálom tejto kombinovanej formy v liečbe reumatických ochorení a bolestivých stavov sú zhrnuté v prehľadovej práci Leeho a Balfoura (Lee and Balfour 1994). V komparatívnej klinickej štúdii na vzorke 48 pacientov bolo preukázané niekoľkonásobné zrýchlenie absorpcie beta-cyklodextrín-piroxikamu oproti piroxikamu čistému, čo sa prejavilo jeho rýchlejšim nástupom analgetického účinku s rozdielom jednej hodiny (Wang, Miller et al. 2000). V ďalšej klinickej štúdií bola na vzorke 31 pacientov hodnotená účinnosť a gastrointestinálna tolerabilita komplexu piroxikamu s beta-cyklodextrínom pri chronickej bolesti chrbta. Po 40-dňovej perorálnej liečbe bol účinok beta-cyklodextrín-piroxikamu hodnotený ako lepší u 90,3 % pacientov, pričom podľa hodnotenia lekárov bol lepší u 87,1 % pacientov. Rovnako z hľadiska nežiadúcich účinkov bola liečba komplexnou formou piroxikamu hodnotená pacientmi aj lekármi ako lepšie znášaná. Nežiadúce účinky spojené s liečbou beta-cyklodextrín-piroxikamom sa objavili u 9,7 % pacientov, pričom u žiadneho z nich nemali vážny charakter (Pijak, Turcani et al. 2002). Použitie neopioidných analgetík lokálne v prípravkoch určených k aplikácii na kožu tvorí významnú zložku liečby rôznych bolestivých stavov. Zistilo sa, že komplexácia piroxikamu s beta-cyklodextrínom zvyšuje podiel difuzibilnej formy účinnej látky v hydroxypropylmetylcelulózovom géli a následne zlepšuje jej prienik do kože a podkožných tkanív (Jug, Becirevic-Lacan et al. 2005).

Ďalšia látka zo skupiny oxikamov, ktorej interakcie s farmaceutickými pomocnými látkami sa doteraz skúmali vo väčšej miere, aj keď nie tak intenzívne, ako u piroxikamu, je meloxicam. Meloxicam má na rozdiel od piroxikamu COX-2-preferenčný mechanizmus účinku a s ním spojené priaznivejšie spektrum vedľajších účinkov liečby. Pri skúmaní fyzikálno-chemických charakteristík binárnych komplexov meloxicamu s α -, β - a γ -cyklodextrínom sa zistilo, že tieto komplexy majú vyššiu solubilitu v porovnaní s meloxicamom čistým. Autori použili metódy analýzy fázovej rozpustnosti, hmotnostnej spektrometrie a nukleárnej magnetickej rezonancie (Naidu, Chowdary et al. 2004). Pri použití meloxicamu asociovaného s beta-cyklodextrínom sa rozpustnosť tabliet vo vode zvyšuje o 30 % a zároveň sa u takto modifikovaného meloxicamu zlepšujú aj farmakokinetické parametre charakterizujúce distribúciu látky v organizme u zdravých dobrovoľníkov. Použité tablety boli pripravené metódami priameho lisovania, alebo vlhkej granulácie, pričom použitie beta-cyklodextrínu neovplyvnilo ich mechanickú odolnosť (Ghorab, Abdel-Salam et al. 2004). Analgetické a protizápalové vlastnosti meloxicamu, spolu s jeho nežiadúcim ulcerogénnym potenciálom, boli skúmané po asociácii s polyetylén glykolom 6000. Táto formulácia zvýšila rozpustnosť meloxicamu vo vode a mala priaznivý efekt u všetkých troch sledovaných parametrov (Vijaya Kumar and Mishra 2006).

3. CIEĽ PRÁCE

Cieľom dizertácie bolo zistiť či by bolo možné zvýšiť analgetickú účinnosť novších neopioidných analgetík selektívne alebo preferenčne tlmiacich COX-2, a to koxibov alebo meloxicamu (ktoré sú šetrnejšie voči GIT v porovnaní so staršími nesteroidnými antireumatikami-antiflogistikami), kombináciami s ďalšími látkami.

V podstate išlo o dva hlavné ciele:

1/ Zistiť, či kombinácie opioidu (kodeínu) s koxibmi (etorikoxibom alebo celekoxibom) budú mať vyššiu analgetickú účinnosť podobne, ako je to už známe u kombinácií opioidov s inými neopioidnými analgetikami, hlavne s paracetamolom alebo ibuprofénom.

Išlo o testovanie hypotézy, predpokladu, že opioid kodeín zvýši analgetickú účinnosť koxibov podobne, ako ju zvyšuje u starších neopioidných analgetík (to bolo možné predpokladať na základe kombinácie dvoch rôznych mechanizmov analgetického pôsobenia – inhibície COX-2 koxibmi a aktivácie opioidných receptorov kodeínom).

Vedľajším, doplnujúcim cieľom tu bolo overiť prítomnosť synergie a zistiť mieru synergie u kombinácie kodeínu s paracetamolom alebo ibuprofénom izobolografickou metódou. Existujú síce solídne klinické dôkazy vyššej analgetickej účinnosti kombinácií kodeínu s paracetamolom alebo ibuprofénom, ale napodiv ešte nikdy u nich nebola overovaná prítomnosť synergie izobolografickou analýzou. Tá navyše môže ukázať i mieru synergie.

Tieto otázky, hypotézy, sme riešili testovaním analgetickej účinnosti niekoľkých dávok uvedených farmák a ich kombinácií podaných vždy per os v modeli akútnej viscerálnej bolesti (peritoneálneho dráždenia – „*writhing*“ testu) u myší. Výsledky sme hodnotili izobolografickou analýzou.

2/ Zistiť, či komplex meloxicamu s beta-cyklodextrínom bude mať vyššiu analgetickú účinnosť a lepšiu biologickú dostupnosť podobne, ako je to už známe u komplexu piroxikamu s beta-cyklodextrínom.

Išlo o testovanie hypotézy, predpokladu, že beta-cyklodextrín zvýši analgetickú účinnosť a biologickú dostupnosť meloxicamu podobne, ako ju zvyšuje u staršieho gastrointestinálne rizikovejšieho piroxikamu (to bolo možné predpokladať na základe zistenia, že beta-cyklodextrín zvyšuje rozpustnosť meloxicamu vo vode).

Túto úlohu sme riešili testovaním analgetickej účinnosti niekoľkých dávok beta-cyklodextrín-meloxicamu alebo samotného meloxicamu per os v modeli termickej akútnej bolesti – *plantar* testu, v modeli akútnej viscerálnej bolesti – test peritoneálneho dráždenia (*writhing* test), a meraním zmien koncentrácie meloxicamu v krevnom sére u potkanov.

4. METODIKY PRÁCE

4.1. Animálne modely bolesti

V predkladanej práci sme použili dve rozdielne metódy merania akútnej bolesti u myši a potkanov, model akútnej viscerálnej bolesti – test peritoneálneho dráždenia (*writhing* test) a model akútnej tepelnej bolesti (*plantar* test).

4.1.1. Model akútnej viscerálnej bolesti – test peritoneálneho dráždenia (*writhing* test)

Algeziometrický test bolesti, v literatúre často označovaný ako *writhing* test (z angl. *writh*e = krútiť sa, zvíjať sa), je založený na chemickom peritoneálnom dráždení a používa sa väčšinou u myši. Jeho základom je injekčné podanie silne zriedenej dráždivej látky do peritoneálnej dutiny myši, následkom čoho pozorujeme charakteristické prejavy spojené so zvíjaním, respektíve preťahovaním zadnej časti trupu a zadných končatín. Sledovaním početnosti týchto charakteristických prejavov v časových úsekoch je možné vyhodnotiť analgetickú účinnosť podanej látky. Tento model bol vytvorený na základe práce Colliera a spol. z roku 1968, ktorá popisuje testovanie rôznych intraperitoneálne (i.p.) podaných substancií za účelom nájdenia vhodného modelu, ktorý by bol použiteľný ako preklinická simulácia viscerálnej bolesti a zároveň by nevystavoval laboratórne zvieratá väčšej bolesti, než je nevyhnutné, nespôsoboval zvýšenú permeabilitu cievnych stien a neposkytoval falošné pozitívne odozvy. Analgetiká boli podané vždy 20 minút pred i.p. injekciou dráždivej látky a sledovanie odpovedí začalo 2 minúty po nej. Kyselina octová zriedená destilovanou vodou a podaná v dávke 50 mg/kg i.p. poskytla prvé odpovede v čase 2 minúty od aplikácie, počet v ďalších časových úsekoch narastal a v čase 10 a 30 minút od aplikácie poskytla signifikantne viac odpovedí, ako tomu bolo u myši, ktoré dostali vehikulum i.p. Bola testovaná na vzorke 75 myši. Pri podaní apsirínu 20 minút pred i.p. injekciou bradykinínu, alebo fyziologického roztoku bol pozorovaný výrazný rozdiel v analgetickej účinnosti oproti kontrolám (Collier, Dinneen et al. 1968). Na základe tejto štúdie bol navrhnutý dizajn algeziometrického testu, ktorý sa s malými obmenami úspešne používa dodnes. Napriek tomu sa nejedná o ideálny model, pretože kvôli dráždeniu všetkých tkanív peritonea nemimikuje úplne verne kolikovitú bolesť. Je to spôsobené neprirodzenou povahou bolestivého stimulu. Naopak jeho výhodou je, že je experimentálne pomerne nenáročný a nekladie vysoké

požiadavky na technickú vybavenosť laboratória. Neskôr bola stanovená hodnota strednej letálnej dávky (LD_{50}) u myši na koncentráciu 3,16 % kyseliny octovej (Singh, Junnarkar et al. 1983).

V našej práci sme podávali testované látky myšiam perorálne (p.o.) 30 minút pred začiatkom algeziometrického testu. Kontrolná skupina dostala fyziologický roztok. Algeziometrický test začal bezprostredne po podaní dráždivej látky, ktorou bola 0,6 % kyselina octová (0,1 ml/10 g). Počet bolestivých prejavov bol hodnotený u zvierat umiestnených v malých plastových nádobách s priehľadnými stenami a dostatočným množstvom podstielky. Zvieratá boli v nádobách umiestnené po troch kusoch a počet prejavov bol počítaný skúsenými pozorovateľmi, ktorí nemali informácie, či sa jedná o myši ovplyvnené analgetikom, alebo kontrolnú skupinu. Tie boli vždy hodnotené naraz. Pre každú meranú dávku bola použitá skupina šiestich myší, pre meranie kombinácie dvoch látok skupina deviatich myší. Analgetická účinnosť bola hodnotená ako percentuálna časť maximálneho možného účinku % MPE (z angl. *maximal possible effect*), ktorá sa počíta z nasledujúceho vzťahu, kde $N_{control}$ znamená počet prejavov u kontrolných zvierat a $N_{treated}$ počet prejavov u zvierat s medikáciou:

$$\%MPE = \frac{N_{control} - N_{treated}}{N_{control}} \times 100$$

4.1.2. Model akútnej tepelnej bolesti (*plantar test*)

Model akútnej tepelnej bolesti, ktorý sa používa väčšinou u laboratórnych potkanov, býva v literatúre často označovaný ako *plantar test* (z angl. *plantar* = plantárny, chodidlový). Jeho princípom je termálne dráždenie plantárnej plochy končatiny potkana umiestneného v plastovej nádobke s tepelne vodivou podlahou. Pod ňou sa nachádza pohyblivý zdroj tepla, ktorý slúži na tepelné dráždenie zvieraťa, ktoré je pri experimente pri plnom vedomí a má obmedzenú možnosť pohybu. V zariadení je zabezpečené automatické zastavenie ohrievania pri detegovanom pohybe dráždenej končatiny. Pokiaľ k pohybu, napríklad následkom analgézie nedôjde, zdroj tepla sa zastaví ešte predtým, než by mohlo dôjsť k poškodeniu tkaniva. Tento test sa používa na meranie bolestivej odpovede po predom navodenej hyperalgézie. Jeho dizajn vychádza z práce publikovanej v roku 1988 Hargreavesom a kolegami, v ktorej opísali metódu experimentálne navodenej hyperalgézie pomocou

subkutánnej (s.c.) injekcie karagenínu do plantárnej oblasti u potkana. Toto vyústilo do signifikantne nižších latencií odtiahnutia tlapky od tepelného impulzu (PWL, z angl. *paw withdrawal latency*), než tomu bolo u kontrolných zvierat, čo zodpovedá zníženému prahu bolesti. Podaním analgetík je možné prah bolesti v tomto teste naopak zvýšiť a tak merať ich účinnosť. V práci bolo opísané aj zariadenie, ktoré automaticky reaguje na behaviorálnu odpoveď (Hargreaves, Dubner et al. 1988). Skúsený pozorovateľ dokáže rozlíšiť náhodný pohyb a bolestivú reakciu zvieratá, pozorovanie je ale čiastočne limitované prítomnosťou opuchu končatiny, ktorou sa zvieratá opiera o podložku.

V experimente sme použili prístroj značky Ugo Basile[®], ktorý umožňuje meranie PWL s presnosťou na 0,1 sekundy. Ako prvé boli podané p.o. dávky analgetík, alebo fyziologického roztoku (u kontrol), po 60 minútach bola aplikovaná s.c. dávka 0,1 ml 1 % roztoku karagenínu do chodidlovej oblasti zadnej končatiny, na navodenie opuchu a hyperalgie. Zvieratá boli vložené do plastových nádobiek 10 minút pred začatím samotného experimentu, aby došlo k adaptácii na vonkajšie podmienky. Pohyblivý zdroj tepla sa automaticky zastavil po 20 sekundách bez behaviorálnej odpovede. Bolestivá odpoveď bola meraná vždy trikrát, a to v hodinových intervaloch od jednej do piatich hodín po začatí experimentu, následne sa použila priemerná hodnota z troch meraní. Bazálne hodnoty PWL boli zmerané 30 minút pred podaním akejkoľvek medikácie.

4.2. Meranie sérových koncentrácií farmák

Opakovaný odber krvi u laboratórných hlodavcov je nevyhnutný pre viacero typov farmakologických štúdií. Napriek tomu však k tejto problematike neexistuje jednotný prístup. V literatúre je možné nájsť viacero spôsobov, ktorými je možné ho uskutočniť a každý z nich má určité výhody a nevýhody. V experimentálnej práci sme zvolili metódu odberu krvi u potkanov pomocou heparinizovanej sklenenej kapiláry z retro-orbitálneho plexu v krátkodobej halotanovej anestézii, pretože umožňuje opakovaný odber v krátkodobých intervaloch bez viditeľných behaviorálnych zmien. Farmaká boli aplikované perorálne a u každého zvieratá boli realizované len dva odbery, v intervaloch 30 a 60 minút od aplikácie. Vzorky boli kompletované do skúmaviek obsahujúcich sodnú soľ kyseliny etyléndiamintetraoctovej a následne z nich boli centrifugáciou oddelené supernatanty, ktoré boli následne zmrazené v hlbokomraziacom boxe a odoslané na HPLC analýzu do spoločnosti Cepha, s.r.o.

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia je metóda, ktorá umožňuje separovať, identifikovať a kvantitatívne stanoviť jednotlivé zložky analyzovanej zmesi. Deje sa to pomocou prietoku mobilnej fázy pod vysokým tlakom cez kolónu, v ktorej sa nachádza stacionárna fáza, pričom jednotlivé zložky analyzovanej zmesi majú k týmto dvom fázam rozdielnu afinitu. Základným kvantitatívnym výstupom HPLC analýzy je výška chromatografického píku. Citlivosť metódy závisí od typu použitého detektora. Vzorky boli analyzované metódou vnútorného štandardu s UV detekciou (vlnová dĺžka 360 nm), s detekčným limitom 4,04 ng/ml a limitom kvantifikácie 25 ng/ml. Pri analýze neboli zistené žiadne interferencie s endogénnymi zložkami krvného séra, ani inými prísadami.

4.3. Laboratórne zvieratá

Vo všetkých experimentoch boli použité samce laboratórneho potkana kmeňa Wistar s hmotnosťami od 215 do 230 g a samce laboratórnej myši kmeňa NMRI (od 28 do 30 g). Všetky pochádzali z chovnej stanice VÚFB Konárovice (Výzkumný ústav pro farmáciu a biochemii). Zvieratá boli chované v štandardných laboratórnych podmienkach podľa správnej laboratórnej praxe v miestnosti s kontrolovanou teplotou ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) s dvanásťhodinovým cyklom striedania svetla a tmy. Kŕmené boli štandardným krmivom pre hlodavce značky Pelet, St1 od výrobcu Velaz, s.r.o. s neobmedzeným prísunom vody, a to aj počas trvania experimentu.

Do každého experimentu bol zaradený len nevyhnutný počet zvierat, pričom každé zviera sa zúčastnilo pokusu len nevyhnutne dlhý čas a vždy len jedenkrát. Okamžite po prebehnutí experimentu bolo každé zviera bezbolestne usmrtené. Všetky procedúry, ktoré boli na zvieratách prevádzané boli v súlade s medzinárodne platnými predpismi (Zimmermann 1983), a s požiadavkami Komisie pre ochranu laboratórnych zvierat 3. Lekárskej fakulty Karlovej Univerzity. Každý experiment prebehol v súlade s vopred schváleným projektom pokusov.

4.4. Použité farmaká a chemikálie

4.4.1. Celekoxib

Celekoxib, chemicky 4-[5-(4-metylfenyl)-3-(trifluorometyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzénsulfónamid, patrí do skupiny COX-2 preferenčných nesteroidných antireumatík. Do klinickej praxe bol uvedený ako prvý zo skupiny koxibov v roku 1998. Čiastočná selektivita voči COX-2 bola dosiahnutá výmenou karboxylovej skupiny NSA za sulfónamidovú skupinu, pomocou ktorej sa viaže na katalytické miesto COX-2, ale zároveň ostala zachovaná aj slabá afinita voči COX-1 (Kurumbail, Stevens et al. 1996). Pomer stredných inhibičných koncentrácií IC_{50} (COX-1)/ IC_{50} (COX-2), ktorý vyjadruje mieru selektivity voči jednotlivým izoformám COX, je u celekoxibu 7,6. Ukazuje to vyššiu selektivitu voči COX-2 v porovnaní s neselektívnymi NSA, ale približne 4,5 krát nižšiu v porovnaní s rofecoxibom a približne 14 krát nižšiu v porovnaní s etorikoxibom. Hodnoty IC_{50} pre COX-1 boli získané meraním koncentrácií metabolitu TxA_2 počas zrážania ľudskej krvi (Patrono, Ciabattoni et al. 1980), a hodnoty IC_{50} pre COX-2 pomocou merania koncentrácií PGE_2 indukovaných bakteriálnym lipopolysacharidom v heparizovaných vzorkách plazmy, v ktorých bola predtým aktivita COX-1 utlmená aspirínom (Patrignani, Panara et al. 1994). Tieto metódy viac zodpovedajú fyziologickým podmienkam, ako tomu bolo v dovtedy používaných *in vitro* metódach.

Po p.o. podaní dosahuje maximálnych hladín v plazme za 2 až 4 hodiny a silne sa viaže na bielkoviny krvnej plazmy. Metabolizuje sa pomocou cytochrómu P450 (CYP) 2C9 a vylučuje sa močom prevažne vo forme metabolitov. Polčas eliminácie má približne 11 hodín.

Celekoxib je slabým inhibítorom CYP2D6, preto je potrebná zvýšená opatrnosť pri súčasnom podávaní liekov, ktoré sa týmto systémom metabolizujú. Môže zvyšovať nefrotoxicitu cyklosporínu a takrolimu.

Hlavnou indikáciou pre klinické použitie je symptomatická liečba osteoartrózy, reumatoidnej artritídy a ankylozujúcej spondylitídy po vyhodnotení pomeru rizika a prínosu pre pacienta. Je možné ho použiť aj na liečbu akútnych bolestí.

U pacientov užívajúcich celekoxib po dobu šiestich mesiacov bol zistený nižší výskyt gastrointestinálnych komplikácií v porovnaní s pacientmi, ktorí užívali ibuprofén, alebo diklofenak. Vyšší výskyt bol zaznamenaný len u pacientov, ktorí užívali súčasne nízke dávky aspirínu (Silverstein, Faich et al. 2000). Veľkosť kardiovaskulárneho rizika pri užívaní celekoxibu nie je úplne jasná, ale bezpochyby nižšia, ako tomu je u rofecoxibu a valdekokibu. Napovedá to 12-týždňová klinická štúdia, podľa ktorej bola incidencia kardiovaskulárnych

príhod u pacientov užívajúcich celekoxib porovnateľná s pacientmi užívajúcich diklofenak a naproxen. Po *post hoc* analýze tejto štúdie boli výsledky mierne upravené, ale k signifikantnému nárastu nedošlo (Singh, Fort et al. 2006).

V experimentálnej práci sme v teste peritoneálneho dráždenia u myši použili dávky celekoxibu 2, 4, 8 a 12 mg/kg p.o., v suspenzii v 0,9 % fyziologickom roztoku s prídavkom Tweenu 80 (Sigma-Aldrich, s.r.o.). Ako zdroj celekoxibu boli použité kapsuly Celebrex[®] cps. (Pfizer, s.r.o.).

4.4.2. Etorikoxib

Etorikoxib, chemicky 5-chloro-2-(6-metylpyridín-3-yl)-3-(4-metylsulfonylfenyl)-pyridín, patrí medzi COX-2 selektívne NSA s približne 14 krát vyššou selektivitou k COX-2 v porovnaní s celekoxibom. Po p.o. podaní sa dobre absorbuje, absolútna biologická dostupnosť je približne 100 %. Má vysokú väzbu na bielkoviny krvnej plazmy a vylučuje sa prevažne v moči vo forme neaktívnych metabolitov. Môže zvyšovať plazmatické hladiny digoxínu a perorálnych antikoagulancií, nedoporučuje sa súčasné užívanie s aspirínom vo vyššej dávke, ako je potrebná pre kardiovaskulárnu profylaxiu. U pacientov užívajúcich ACE inhibítory môže dôjsť pri súčasnom užívaní etorikoxibu k dočasnému zhoršeniu renálnych funkcií, rovnako je potrebná opatnosť pri súčasnom užívaní cyklosporínu a takrolimu. Nebol popísaný vplyv na CYP450, ale je inhibítorom ľudskej sulfotransferázy.

Indikáciami pre klinické použitie sú chronické zápalové ochorenia osteoartróza, reumatoidná artritída a ankylozujúca spondylitída, a akútne príznaky dnaveho zápalu spojené s bolesťou. Musí byť vždy individuálne zvážený pomer prínosu a rizika pre pacienta.

Gastrointestinálna tolerabilita etorikoxibu bola veľmi dobre preukázaná v rozsiahlych klinických štúdiách, pri krátkodobom aj dlhodobom podávaní sa zistila výrazne nižšia incidencia ako pocitov diskomfortu spojených s nauzeou a bolesťami žalúdka, tak aj ulcerácií a gastrointestinálneho krvácania u pacientov užívajúcich etorikoxib, v porovnaní s pacientmi užívajúcich naproxen (Leung, Malmstrom et al. 2002; Reginster, Fischer et al. 2004). Výsledky štúdií zameraných na kardiovaskulárne riziko pri liečbe etorikoxibom nie sú úplne konzistentné. Doterajšie klinické štúdie nepreukázali jednoznačnú spojitosť užívania etorikoxibu s vyšším výskytom kardiovaskulárnych príhod, preto prebehol rozsiahly medzinárodný program zahŕňajúci viac ako 34000 pacientov s osteoartrózou a reumatoidnou artritídou dlhodobo užívajúcich etorikoxib v dávkach 60 alebo 90 mg denne a diklofenak

v dávke 150 mg denne. Výsledkom bolo, že po 18 mesiacoch sa počet pacientov s tromboembolickou príhodou v oboch skupinách signifikantne nelíšil (320 v skupine etorikoxibu a 323 v skupine diklofenaku). Rovnako bol potvrdený nižší výskyt nekomplikovaných gastrointestinálnych reakcií v skupine etorikoxibu v porovnaní s diklofenakom, aj keď výskyt komplikovaných reakcií bol v oboch skupinách porovnateľný (Cannon, Curtis et al. 2006). Táto štúdia napovedá, že etorikoxib má pravdepodobne priaznivejší profil kardiovaskulárneho rizika, ako bolo zistené v minulosti u rofekoxibu.

V experimentálnej práci boli v teste peritoneálneho dráždenia u myši použité dávky etorikoxibu 0,5; 2, 3 a 4 mg/kg p.o., v suspenzii v 0,9 % fyziologickom roztoku s prídavkom Tweenu 80 (Sigma-Aldrich, s.r.o.). Ako zdroj etorikoxibu boli použité poťahované tablety Arcoxia[®] tbl. (Merck & Co., s.r.o.).

4.4.3. Paracetamol

Paracetamol, chemicky N-acetyl-p-aminofenol, patrí do skupiny neopioidných analgetík-antipyretík, ktoré na rozdiel od NSA nemajú protizápalový účinok. Je veľmi slabým inhibítorom periférnej COX a jeho účinok sa vysvetľuje väčšinou inhibíciou COX v CNS. Mechanizmus účinku je nejasný a je predmetom intenzívneho výskumu. Uvažuje sa o interferencii so serotonínovými neurónmi v descendných modulačných dráhach v CNS (Pickering, Esteve et al. 2008), okrem toho sa zistilo, že aktívny metabolit paracetamolu, AM404, interaguje so systémom endogénnych kanabinooidov (Hasanein 2009).

Paracetamol sa rýchlo a takmer úplne vstrebáva z GIT a maximálnych plazmatických hladín dosahuje za 30 až 60 minút. Metabolizuje sa v pečeni, biologický polčas má 1 až 3 hodiny a vylučuje sa prevažne obličkami vo forme konjugátov. Pri saturácii pečenných enzýmov metabolizujúcich paracetamol môže dochádzať k vzniku toxických metabolitov.

Indikáciami pre klinické použitie paracetamolu sú akútne stavy spojené so zvýšenou telesnou teplotou a mierne až stredne silné bolesti rôzneho pôvodu.

Opatrnosť je potrebná pri hepatálnej a renálnej insuficiencii, pri krátkodobom podávaní v terapeutických dávkach nevykazuje klinicky závažné nežiaduce účinky ani liekové interakcie.

V experimentálnej práci sme použili v teste peritoneálneho dráždenia u myší dávky 150, 200, 250 a 300 mg/kg paracetamolu (Sigma-Aldrich, s.r.o.) pripraveného v perorálnej suspenzii s 0,9 % fyziologickým roztokom s prídavkom Tweenu 80 (Sigma-Aldrich, s.r.o.).

4.4.4. Ibuprofén

Ibuprofén, chemicky kyselina 2-[4-(2-metylpropyl)fenyl]propionová, patrí do skupiny neselektívnych NSA. Mechanizmom účinku je neselektívna inhibícia cyklooxygenáz, z ktorej vyplýva analgetické a protizápalové pôsobenie, jako aj rozvoj nežiadúcich účinkov typických pre túto skupinu farmák. Ibuprofén má nižšie riziko závažných gastrointestinálnych nežiadúcich reakcií v porovnaní napríklad s piroxikamom, indometacínom, alebo diklofenakom (Menniti-Ippolito, Maggini et al. 1998).

Po perorálnom podaní sa ibuprofén rýchlo a dobre vstrebáva, vrcholu plazmatických koncentrácií dosahuje po 45 minútach pri podaní nalačno a po 1 až 3 hodinách po podaní s jedlom. Vzhľadom na gastrointestinálne riziko sa doporučuje podávať s jedlom. Metabolizuje sa v pečeni s biologickým polčasom asi 2 hodiny a vylučuje sa renálne vo forme metabolitov.

Ako analgetikum-antipyretikum je indikovaný pri akútnych stavoch spojených so zvýšenou telesnou teplotou a bolesťami rôznej etiológie. Jako protizápalové liečivo sa indikuje pri zápalových a degeneratívnych ochoreniach kĺbov, jako aj pri mimokĺbovom reumatizme. Opatrnosť je potrebná u pacientov s niektorými formami ochorení spojivového tkaniva, bronchiálnou astmou, hepatálnou a renálnou insuficienciou a gastrointestinálnym rizikom v anamnéze. Nedoporučuje sa podávať súčasne s inými NSA, ani s perorálnymi antikoagulanciami.

V experimentálnej práci v teste peritoneálneho dráždenia u myší sme ibuprofén (Sigma-Aldrich, s.r.o.) podali v perorálnej suspenzii s 0,9 % fyziologickým roztokom a prídavkom Tweenu 80 (Sigma-Aldrich, s.r.o.) v dávkach 30, 50, 70 a 90 mg/kg.

4.4.5. Kodeín

Kodeín, chemicky (5 α ,6 α)-7,8-didehydro-4,5-epoxy-3-metoxo-17-metylmorfínan-6-ol; patrí do skupiny slabých opioidov. Pôsobí ako agonista na μ

opioidných receptoroch, ale tento agonistický účinok je slabší, v porovnaní napríklad s morfínom, oxykodónom, alebo fentanylom.

Po perorálnom podaní sa dobre vstrebáva a v pečeni sa metabolizuje na morfín, ktorý pôsobí jako vlastná účinná látka a spoločne s ďalšími metabolitmi sa vylučuje renálne. Kodeín teda patrí do skupiny farmák, ktoré označujeme jako *prodrugs*, teda až v priebehu metabolizmu sa menia na vlastnú účinnú látku. Táto konverzia prebieha pomocou CYP2D6, ktorého slabým inhibítorom je celecoxib. Medzi týmito dvoma látkami je teda možná farmakokinetická lieková interakcia, u ktorej ale zatiaľ nebola popísaná klinická signifikancia (Hersh and Moore 2004).

Kodeín zvyšuje analgetický účinok analgetík-antipyretík, súčasné užívanie s inými látkami s tlmivým účinkom na CNS môže potencovať tlmivý účinok kodeínu. Používa sa ako analgetikum, hlavne v kombináciách, a ako antitusikum.

V experimentálnej práci v teste peritoneálneho dráždenia u myší sme kodeín (Sigma-Aldrich, s.r.o.) aplikovali v perorálnej suspenzii v 0,9 % fyziologickom roztoku s prídavkom Tweenu 80 (Sigma-Aldrich, s.r.o.) v dávkach 10, 15, 20 a 30 mg/kg.

4.4.6. Meloxikam

Meloxikam, chemicky 4-hydroxy,2-metyl-N(5-metyl,1,3-tiazol-2yl)-2H-1,2-benzotiazín-3-carboxamid-1,1-dioxid, patrí do skupiny COX-2 preferenčných NSA. Znamená to, že prednostne inhibuje COX-2, ale nie s takou mierou selektivity, ako koxiby a vo vyšších dávkach inhibuje na rozdiel od koxibov vo väčšej miere aj COX-1. Miera selektivity u meloxikamu, zisťovaná pomocou vyjadrená pomocou testu v ľudskej krvi a vyjadrená pomerom $IC_{50}(\text{COX-1})/IC_{50}(\text{COX-2})$ je približne 2,0; čo je asi 4 krát menej, ako u celecoxibu (Riendeau, Percival et al. 2001).

Vďaka tomuto mechanizmu účinku bola u meloxikamu v klinických štúdiách popísaná lepšia gastrointestinálna tolerabilita v porovnaní s diklofenakom, ibuprofénom, piroxikamom a indometacínom (Degner, Sigmund et al. 2000). Menej jasný je možný vplyv meloxikamu na krvnú zrážanlivosť, preto sa jeho súčasné podávanie s inými NSA, ani perorálnymi antikoagulanciami nedoporučuje. Rovnako aj u pacientov s bronchiálnou astmou a gastrointestinálnym poškodením v anamnéze sa doporučuje opatrnosť.

Meloxicam je nerozpustný vo vode a po perorálnom podaní dosahuje maximálnych koncentrácií v plazme po 5 až 6 hodinách. Je silno viazaný na plazmatické bielkoviny a vylučuje sa vo forme metabolitov s biologickým polčasom asi 20 hodín.

Používa sa v krátkodobej symptomatickej liečbe exacerbácií osteoartrózy alebo pri dlhodobej liečbe reumatoidnej artritídy.

V experimentálnej práci sme použili meloxicam (Zentiva, a.s.) v teste akútnej tepelnej bolesti u potkanov v perorálnej suspenzii 0,9 % fyziologického roztoku s prídavkom arabskej gummy (Sigma-Aldrich, s.r.o.) v dávkach 3 a 10 mg/kg. V teste peritoneálneho dráždenia u myši bol meloxicam použitý rovnako v perorálnej suspenzii s prídavkom arabskej gummy v dávkach 1, 7 a 15 mg/kg. Pri stanovení sérových koncentrácií bol meloxicam podaný potkanom v perorálnej suspenzii s prídavkom arabskej gummy v dávke 10 mg/kg.

4.4.7. Beta-cyklodextrín

Beta-cyklodextrín je cyklický oligosacharid s hydrofóbnou centrálnou dutinou a hydrofilným obalom, ktorý umožňuje pomocou nekovalentnej väzby v centrálnej dutine vytvárať komplexy s látkami, ktoré sú samostatne nerozpustné vo vode a zvyšovať tak ich rozpustnosť. Je možné to použiť napríklad na zrýchlenie vstrebávania z gastrointestinálneho traktu a teda aj zrýchlenie nástupu účinku.

Beta-cyklodextrín-meloxicam (BCD-meloxicam; komplex v pomere 1:1, Zentiva, a.s.) bol v experimentálnej práci použitý v rovnakých experimentoch a dávkach, ako meloxicam nemodifikovaný.

4.4.8. Ostatné chemikálie

Kontrolné skupiny zvierat dostávali v interakčných experimentoch 0,9 % fyziologický roztok s prídavkom Tweenu 80 a v experimentoch s modifikovaným meloxicamom 0,9 % fyziologický roztok s prídavkom arabskej gummy. Arabská guma je prírodný produkt s obsahom polysacharidov a glykoproteínov, zatiaľ čo Tween 80 (synonymum Polysorbát 80) je syntetický produkt založený na polyetoxysorbitanmonooleáte. Obidva produkty boli použité na stabilizáciu perorálnych suspenzií.

Pri algeziometrických testoch bol u myši použitý ako dráždivá látka 0,6 % zriedený roztok kyseliny octovej v dávke 10 mg/kg i.p. a u potkanov 1 % roztok karagenínu vpravený v objeme 0,1 % s.c. do plantárnej oblasti zadnej končatiny.

Pri odberoch krvi na stanovenie sérových koncentrácií meloxicamu sme používali krátkodobú anestéziu pomocou inhalačného anestetika halotanu. Skúmavky obsahovali sodnú soľ kyseliny etyléndiamíntetraoctovej na zabránenie zrážaniu krvi.

4.5. Štatistické metódy

Pri podaní dvoch rozdielnych farmák človeku alebo zvierat'u môže medzi nimi dochádzať k rôznym interakciám. Ich účinky sa sčítajú, to znamená, že nastáva aditivita a výsledný účinok kombinácie takýchto dvoch látok sa rovná, zjednodušene povedané, súčtu ich jednotlivých účinkov. Ďalšia možnosť nastáva, ak je výsledný účinok kombinácie dvoch farmák vyšší, ako sa dá predpokladať z ich jednotlivých účinkov. Vtedy hovoríme o synergiej alebo supra-aditívnej interakcii a je možné predpokladať, že k nej dochádza na úrovni ich mechanizmov účinku a teda účinky dvoch látok sa navzájom potencujú. Tretia možnosť je, že výsledkom podania dvoch látok v kombinácii je účinok, ktorý nezodpovedá očakávaniam založeným na účinnosti obidvoch látok podaných samostatne. Účinky obidvoch látok si navzájom odporujú a hovoríme o sub-aditívnej interakcii.

4.5.1. Teoretický základ izobolografickej analýzy

Vo farmakoterapii je veľmi užitočná možnosť posúdiť silu a povahu takýchto interakcií, čo umožňuje podávať jednotlivé látky v nižších dávkach a očakávať pritom vyšší účinok vďaka interakcii medzi nimi. Vďaka tomu je možné napríklad zmierniť ich prípadné nežiaduce účinky. Pri takýchto kalkuláciách uvažujeme pre každú látku pojem „potencia“. Tento pojem znamená, že na dosiahnutie rovnakého farmakologického účinku potrebujeme u jednej látky vyššiu dávku (menej potentná), zatiaľ čo u druhej látky stačí nižšia dávka (viac potentná). Podiel týchto dávok potom definujeme pojmom „relatívna potencia“.

Najjednoduchší prípad nastáva, keď má kombinácia dvoch látok konštantnú relatívnu potenciu v celom rozsahu účinnosti, t.j. závislosť účinku na dávke je lineárna. V tomto prípade platia jednoduché zákonitosti:

$$a + Pb = A$$

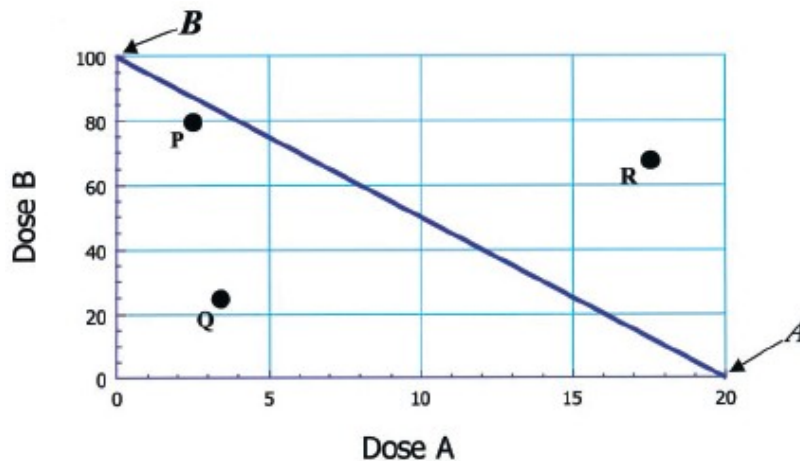
$$\frac{a}{R} + b = B$$

$$\frac{a}{A} + \frac{b}{B} = 1$$

(A = dávka látky A; B = dávka látky B; R = relatívna potencia; a = dávka látky A použitá v kombinácii; b = dávka látky B použitá v kombinácii)

Z uvedených rovníc je potom možné vypočítať páry dávok, pomocou ktorých dostaneme požadovanú potenciu zmesi. Takáto analýza bola použitá už v roku 1942 (Finney 1942), ale vo väčšine prípadov použiteľná nie je.

V prípade, že relatívna potencia zmesi dvoch látok je variabilná, ako tomu je vo väčšine prípadov, hore uvedené vzťahy prestávajú postačovať a je potrebné uvažovať o ekvipotentných pároch dávok, tzv. „izoboloch“. Pomocou sústavy izobolov, z ktorých každý je definovaný karteziánskymi koordinátami, je možné vytvoriť špeciálny typ grafu, tzv. „izobologram“ (Obr.1).

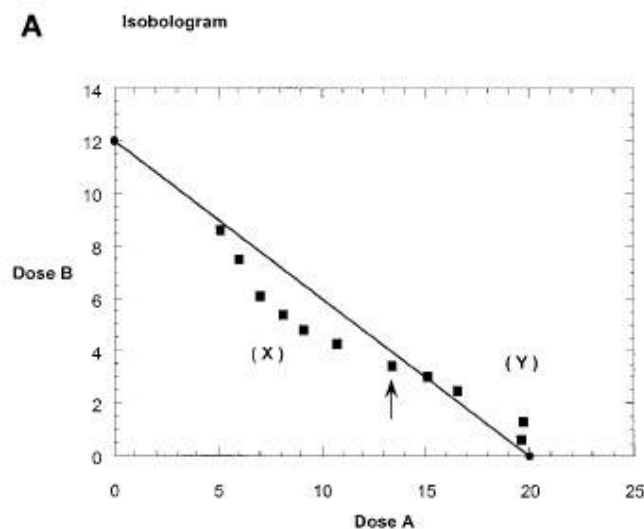


Obr.1. A = dávka látky A, pri ktorej je dosiahnutý zvolený efekt; B = dávka látky B, pri ktorej je dosiahnutý zvolený efekt; Q = kombinácia so supra-aditívnym efektom; R = kombinácia so sub-aditívnym efektom; P = kombinácia s aditívnym efektom. Obrázok je prebratý z prehľadovej práce od Tallaridu (Tallarida 2001).

Na tomto grafe je vidieť, že ak nemáme k dispozícii látku s konštantnou relatívnou potenciou, zvolíme si jednu hladinu účinnosti (napríklad 50 %). Pre zvolenú hladinu účinnosti dostaneme na osi x dávku látky A, pri ktorej dosahuje tento efekt, ak je podaná samostatne a na osi y dávku látky B, pri ktorej táto látka dosahuje rovnaký efekt, ak je podaná samostatne. Pri zvolenej hladine účinnosti 50 % označujeme tieto dávky ako efektívne dávky (ED_{50}), pri

ktorých je dosiahnutých 50 % maximálneho účinku. Úsečku, ktorá spája tieto dva body označujeme ako líniu aditivity, a je to súčet všetkých párov dávok, ktoré dávajú rovnaký účinok, ako dávka *A* a dávka *B*. V prípade, že je zvoleného efektu dosiahnuté pri použití nižších dávok, ako vyplýva z izobologramu, na grafe sa to prejaví ako bod ležiaci pod líniou aditivity (bod Q). Vtedy hovoríme o supra-aditívnej interakcii. V prípade, že je tohto efektu dosiahnuté dávkami vyššími, ako sú predpokladané, daný bod sa objaví nad líniou aditivity a hovoríme o sub-aditívnej interakcii (bod R). Ak je daného efektu dosiahnuté približne rovnakými dávkami, ako sú predpokladané a bod sa objaví v blízkosti línie aditivity, alebo priamo na nej, k interakcii nedochádza a hovoríme o aditivite (Tallarida 2001).

Tento na prvý pohľad jednoduchý koncept pracuje s hodnotami, ktoré získavame z kriviek závislosti medzi dávkou a účinkom. Tieto hodnoty však majú neodmysliteľnú variabilitu, ktorú spôsobuje ako prítomnosť živých zvierat v experimentoch, tak skutočnosť, že pri dávkach *a* a *b* sa jedná prakticky len o odhady. Línia aditivity je potom aproximáciou získanou napríklad metódou najmenších štvorcov (Tallarida 2000d). Toto je dobre viditeľné na Obr.2.



Obr.2. Skutočné hodnoty párov dávok (X, Y), ktoré po aproximácii na priamku dávajú líniu aditivity. Obrázok je prebratý z prehľadovej práce od Tallaridu (Tallarida 2001).

Okrem toho existujú ďalšie, zložitejšie prípady, napríklad kombinácia plného a parciálneho agonistu, keď izobologramy nie sú lineárne (Tallarida 2006).

Z uvedeného je zrejmé, že aj keď je základná myšlienka izobolografickej analýzy na pohľad jednoduchá a graficky znázornené výsledky majú vysokú výpovednú hodnotu, sama analýza vyžaduje pomerne veľké množstvo matematických a štatistických kalkulácií.

4.5.2. Postup použitý pri analýze výsledkov interakcií

4.5.2.1. Lineárna regresná analýza

Pre každú jednotlivú látku podanú samostatne bola najprv zostrojená hyperbolická krivka vzťahu dávky a účinku (DRC, z angl. *dose-response curve*). Ako kvantifikácia účinku bol použitý parameter % MPE. Táto krivka, po prevedení do logaritmickej sústavy, získa sigmoidný priebeh a strednú časť tejto krivky je možné aproximovať na priamku, ktorá je následne odhadom skutočných hodnôt. Z tejto priamky je možné graficky odvodiť približnú hodnotu ED₅₀ pre zvolenú hladinu 50 % maximálneho účinku.

Hodnotu ED₅₀ je možné získať aj presne pomocou nasledujúcich kalkulácií. Pre rovnicu priamky

$$y = a + bx$$

(a = odhad priesečníku priamky s osou x ; b = odhad sklonu priamky; x, y = hodnoty dávok a im zodpovedajúcich účinkov v počte N , táto hodnota sa označuje aj ako počet stupňov voľnosti)

vypočítame zodpovedajúce hodnoty a a b zo vzťahov:

$$b = \frac{\sum x_i y_i - N \bar{x} \bar{y}}{\sum x_i^2 - N \bar{x}^2}$$

$$a = \bar{y} - b \bar{x}$$

Po dosadení 50 do rovnice priamky získame hodnotu logED₅₀ a jej odlogaritmovaním hodnotu ED₅₀.

Keďže regresná priamka je odhad vytvorený pomocou metódy najmenších štvorcov, v štatistickej kalkulácii je potrebné vypočítať reziduálny súčet štvorcov Q . Vydelením reziduálneho súčtu štvorcov počtom stupňov voľnosti mínus dva ($N - 2$) dostaneme reziduálny rozptyl s^2 .

$$Q = \sum_{i=1}^N (y_i - a - bx_i)^2$$

$$s^2 = \frac{Q}{N - 2}$$

Pomocou reziduálneho rozptylu s^2 následne vypočítame rozptyl hodnoty $\log ED_{50}$ $V(\log ED_{50})$:

$$V(\log ED_{50}) = \frac{s^2}{b^2} \left[\frac{1}{N} + \frac{(\log ED_{50} - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \right]$$

Druhá odmocnina hodnoty $V(\log ED_{50})$ je stredná chyba SE (angl. *standard error*) hodnoty $\log ED_{50}$. Vynásobením hodnoty SE koeficientom t zo Studentovho t-rozdelenia dostaneme interval spoľahlivosti pre hodnotu $\log ED_{50}$. Hodnotu t z tabuľky Studentovho rozdelenia vyberieme pomocou zvolenej hladiny významnosti, napríklad 95 % a počtu stupňov voľnosti $N - 2$.

Postup bol spracovaný na základe kapitoly v knihe *Drugs Synergism and Dose-Effect Data Analysis* od Tallaridu (Tallarida 2000b).

4.5.2.2. Izobolografická analýza

Po získaní hodnôt ED_{50} látok A a B tak, ako bolo uvedené v predchádzajúcej kapitole, pokračujeme prípravou fixných kombinácií tak, že každú hodnotu ED_{50} štyrikrát vydáme dvomi. Z delenia na polovicu vyplýva parameter „frakcia f “, v tomto prípade $f = 0,5$; ktorý následne použijeme vo výpočtoch.

Teoretickú hodnotu $ED_{50\text{ADD}}$ pre kombináciu látky A s látkou B stanovíme pomocou nasledujúceho výpočtu:

$$ED_{50\text{ADD}} = fA + (1 - f)B$$

($A = ED_{50\text{A}}$; $B = ED_{50\text{B}}$)

Od tejto dávky očakávame, že bude mať rovnaký účinok, ako látky A a B podané samostatne v dávkach ED_{50} .

Keďže hodnoty $ED_{50\text{A}}$ a $ED_{50\text{B}}$, získané pomocou lineárnej regresie nie sú presné, je potrebné vypočítať rozptyl V a strednú chybu SE pre $ED_{50\text{ADD}}$. Najprv vypočítame z hodnoty $SE(\log ED_{50})$ z predchádzajúceho odstavca o lineárnej regresii hodnotu $SE(ED_{50})$ pre látku A a B podľa nasledujúceho vzťahu:

$$SE(ED_{50}) = 2,30 \times ED_{50} \times SE(\log ED_{50})$$

Umocnením na druhú získame z hodnôt $SE(ED_{50})$ pre látku A aj látku B hodnoty $V(ED_{50})$ pre látku A aj látku B, a následne vypočítame rozptyl V pre $ED_{50\text{ ADD}}$:

$$V(ED_{50\text{ ADD}}) = f^2V(ED_{50\text{ A}}) + (1 - f)^2V(ED_{50\text{ B}})$$

Druhou odmocninou hodnoty $V(ED_{50\text{ ADD}})$ získame hodnotu $SE(ED_{50\text{ ADD}})$.

Následne experimentálne otestujeme pripravené štyri fixné kombinácie, ako sú uvedené v nasledujúcej tabuľke (Tab.6).

Tab.6. Diely látok A a B, pomocou ktorých pripravíme dávky zmesi potrebné pre stanovenie $ED_{50\text{ EXP}}$.

diel látky A	diel látky B	kombinácia
$ED_{50\text{ A}}/2$	$ED_{50\text{ B}}/2$	$ED_{50\text{ A}}/2 + ED_{50\text{ B}}/2$
$ED_{50\text{ A}}/4$	$ED_{50\text{ B}}/4$	$ED_{50\text{ A}}/4 + ED_{50\text{ B}}/4$
$ED_{50\text{ A}}/8$	$ED_{50\text{ B}}/8$	$ED_{50\text{ A}}/8 + ED_{50\text{ B}}/8$
$ED_{50\text{ A}}/16$	$ED_{50\text{ B}}/16$	$ED_{50\text{ A}}/16 + ED_{50\text{ B}}/16$

Takýmto postupom ostávajú zachované proporcie obidvoch látok v zmesi vo všetkých dávkach:

$$p_A = \frac{fA}{ED_{50\text{ ADE}}} \quad p_B = \frac{(1-f)B}{ED_{50\text{ ADE}}}$$

Následne podľa postupu uvedeného v predchádzajúcom odstavci pomocou lineárnej regresie vypočítame hodnotu $ED_{50\text{ EXP}}$ spoločne s hodnotou SE .

V prípade, že platí: $ED_{50\text{ EXP}} < ED_{50\text{ ADD}}$; hovoríme o supra-aditivite
 $ED_{50\text{ EXP}} > ED_{50\text{ ADD}}$; hovoríme o sub-aditivite

Aby sme mohli hovoriť o supra-, alebo sub-aditivite, experimentálne stanovená hodnota $ED_{50\text{ EXP}}$ sa musí od teoreticky očakávanej hodnoty $ED_{50\text{ ADD}}$ signifikantne odlišovať.

Postup bol spracovaný na základe kapitoly v knihe *Drugs Synergism and Dose-Effect Data Analysis* od Tallaridu (Tallarida 2000a).

4.5.2.3. Test štatistickej významnosti

Test štatistickej významnosti, pomocou ktorého vyhodnotíme odlišnosť hodnôt $ED_{50\text{ ADD}}$ a $ED_{50\text{ EXP}}$ vychádza z dvojvýberového Studentovho t -testu, ktorý slúži na porovnanie dvoch výberových priemerov. Základným princípom tohto testu je, že z dvoch výberových priemerov (pre každý máme k dispozícii smerodajnú odchýlku s_A , resp. s_B) vypočítame združený odhad rozptylu s^2 a združený odhad smerodajnej odchýlky s :

$$s^2 = \frac{(N_1 - 1)s_1^2 + (N_2 - 1)s_2^2}{N_1 + N_2 - 2}$$

Pomocou združeného odhadu smerodajnej odchýlky s vypočítame koeficient t :

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

Následne vyberieme z tabuľky Studentovho t -rozdelenia hodnotu T pre zvolenú hladinu významnosti a daný počet stupňov voľnosti $N_1 + N_2 - 2$ a ak vypočítaná hodnota t spadá mimo intervalu tabuľkových hodnôt ($-T$; $+T$), nulovú hypotézu zamietneme.

Pri izobolografickej analýze nepochádzajú výberové priemery a hodnoty smerodajných odchýlok zo vstupných dát, ale sú odvodené z regresných kriviek. Z tohto dôvodu vypočítame koeficient t vzťahom upraveným pre potreby dosadzovaných hodnôt, kde SE_{ADD} znamená strednú chybu $ED_{50\text{ ADD}}$ a SE_{EXP} strednú chybu $ED_{50\text{ EXP}}$:

$$t = \frac{\log ED_{50\text{ ADD}} - \log ED_{50\text{ EXP}}}{\sqrt{(SE_{ADD})^2 + (SE_{EXP})^2}}$$

Hodnotu t neporovnávame následne s tabuľkovou hodnotou T , ako pri štandardnom t -teste, ale T hodnotu vypočítame z tabuľkových hodnôt pre $ED_{50\text{ ADD}}$ (T_{ADD}) a $ED_{50\text{ EXP}}$ (T_{EXP}):

$$T = \frac{T_{ADD}(SE_{ADD})^2 + T_{EXP}(SE_{EXP})^2}{(SE_{ADD})^2 + (SE_{EXP})^2}$$

Ak platí, že $t > T$; hodnoty $ED_{50\text{ ADD}}$ a $ED_{50\text{ EXP}}$ sa od seba signifikantne líšia pre danú hladinu významnosti a v prípade, že platí: $ED_{50\text{ EXP}} < ED_{50\text{ ADD}}$, hovoríme o supra-aditívnej interakcii. Štatistická významnosť bola prezentovaná pre hodnotu pravdepodobnosti $p < 0,05$.

Postup bol spracovaný na základe kapitoly v knihe Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis od Tallaridu (Tallarida 2000c), a podľa kapitoly v knihe Základy štatistiky pro biomedicínské obory od Zvárovej (Zvárová 2002).

4.5.2.4. Interakčný index γ

Hodnota interakčného indexu γ kvantitatívne charakterizuje silu supra-aditívnej interakcie medzi dvoma látkami. Vypočíta sa ako podiel experimentálnej hodnoty $ED_{50\text{ EXP}}$ a teoretickej hodnoty $ED_{50\text{ ADD}}$:

$$\gamma = \frac{ED_{50\text{ EXP}}}{ED_{50\text{ ADD}}}$$

Čím je hodnota interakčného indexu nižšia, tým je vyššia synergia medzi dvoma látkami (Tallarida 2002).

4.5.3. Ostatné štatistické metódy

Pri prezentácii výsledkov experimentov s beta-cyklodextrín-meloxicamom bola na zistenie štatistickej významnosti v testoch bolesti použitá jednocestná analýza rozptylu (ANOVA test) a pri porovnaní nárastu sérových koncentrácií v plazme dvojvýberový Studentov t -test. Výsledky s hodnotou pravdepodobnosti $p < 0,05$ boli prezentované ako štatisticky významné.

Deskriptívna analýza priemerných hodnôt, jednocestný ANOVA test a dvojvýberový Studentov t -test boli realizované v programe SigmaStat, verzia 3.1 (SPSS, Inc.); lineárna

regresná analýza a izobolografická analýza boli realizované v programe PharmToolsPro, verzia 1.1.2 (The McCary Group, Inc.).

Izobologramy boli realizované v programe PharmToolsPro, verzia 1.1.2; ostatné grafické znázornenia v programe SigmaPlot, verzia 8.0 (SPSS, Inc.).

5. VÝSLEDKY

5.1. Interakcie neopioidných analgetík s kodeínom

5.1.1. Interakcia etorikoxibu s kodeínom

Ako prvé boli získané hodnoty ED₅₀ etorikoxibu a kodeínu. Obidve farmaká poskytli v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myší dávkovo závislú analgetickú účinnosť. Použité boli 4 dávky etorikoxibu a 4 dávky kodeínu, ktoré poskytli hodnoty % MPE, ako sú uvedené v Tab.7 a Tab.8.

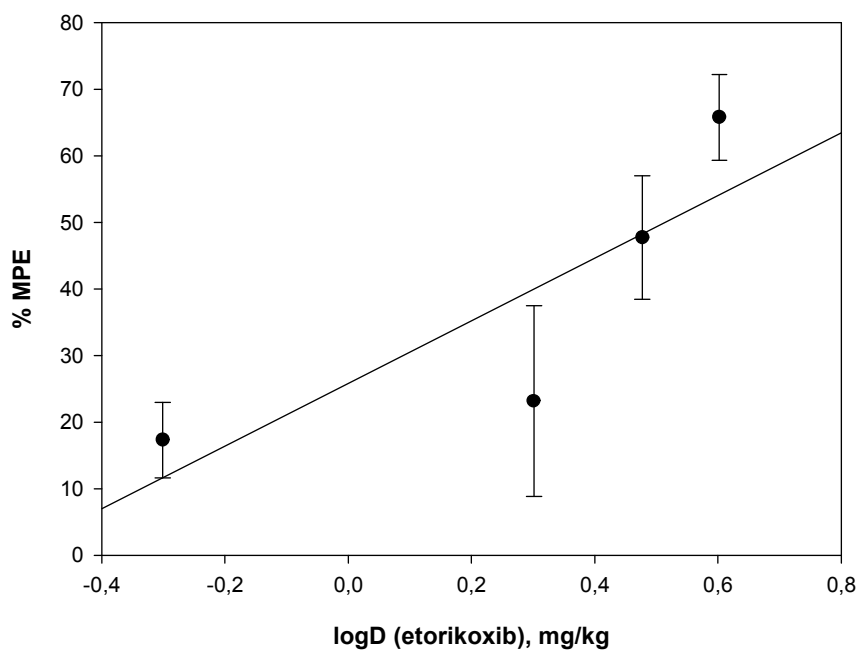
Tab.7. Dávky a analgetická účinnosť etorikoxibu v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myší

dávka (D), mg/kg	logD	% MPE
0,5	- 0,301	17,31
2	0,301	23,13
3	0,477	47,72
4	0,602	65,75

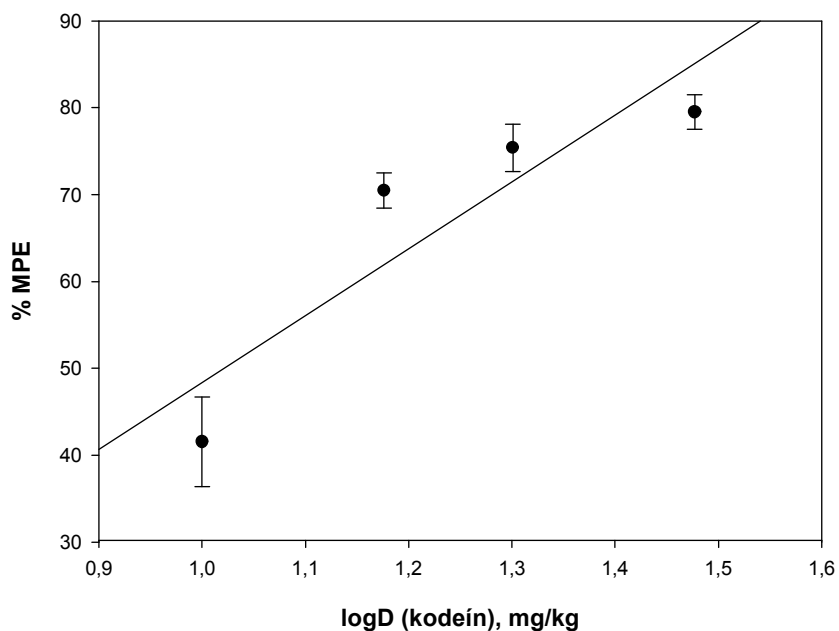
Tab.8. Dávky a analgetická účinnosť kodeínu v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myší

dávka (D), mg/kg	logD	% MPE
10	1,000	41,53
15	1,176	70,49
20	1,301	75,40
30	1,477	79,50

Z kriviek závislosti dávky a účinku boli metódou najmenších štvorcov pomocou lineárnej regresnej analýzy získané regresné priamky (Obr.3 a Obr.4) a vypočítané hodnoty ED₅₀: **3,27 ± 1,47 mg/kg** pre etorikoxib a **10,5 ± 2,29 mg/kg** pre kodeín.



Obr.3. Regresná priamka získaná metódou najmenších štvorcov ukazuje dávkovo závislú účinnosť etorikoxibu v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myši.



Obr.4. Regresná priamka získaná metódou najmenších štvorcov ukazuje dávkovo závislú účinnosť kodeínu v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myši.

Následne boli pripravené 4 dávky zmesi etorikoxibu s kodeínom tak, ako je uvedené v Tab.9.

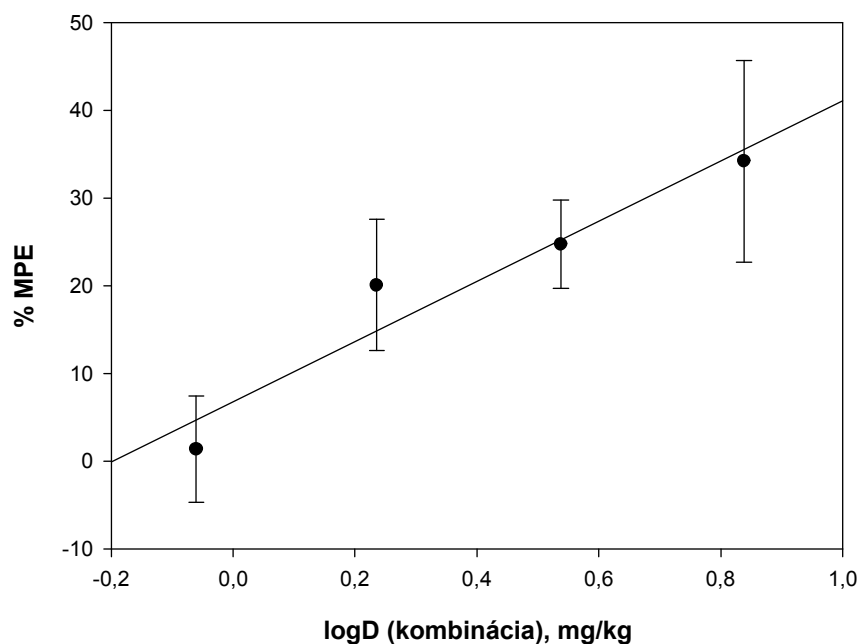
Tab.9. Dávky kombinácie etorikoxibu s kodeínom pripravené z dielov ED_{50} obidvoch farmák.

diel etorikoxibu, mg/kg	diel kodeínu, mg/kg	kombinácia, mg/kg
$ED_{50}/2 = 1,64$	$ED_{50}/2 = 5,25$	6,89
$ED_{50}/4 = 0,82$	$ED_{50}/4 = 2,63$	3,45
$ED_{50}/8 = 0,41$	$ED_{50}/8 = 1,31$	1,72
$ED_{50}/16 = 0,20$	$ED_{50}/16 = 0,66$	0,86

Získané 4 dávky zmesi etorikoxibu s paracetamolom boli použité v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myší a znovu vykázali dávkovo závislý účinok s hodnotami % MPE, ako sú uvedené v Tab.10. Pomocou lineárnej regresnej analýzy bola vytýčená regresná priamka (Obr.5) a stanovená experimentálna hodnota ED_{50} zmesi: **$ED_{50 \text{ EXP}} = 18,13 \pm 7,5$ mg/kg.**

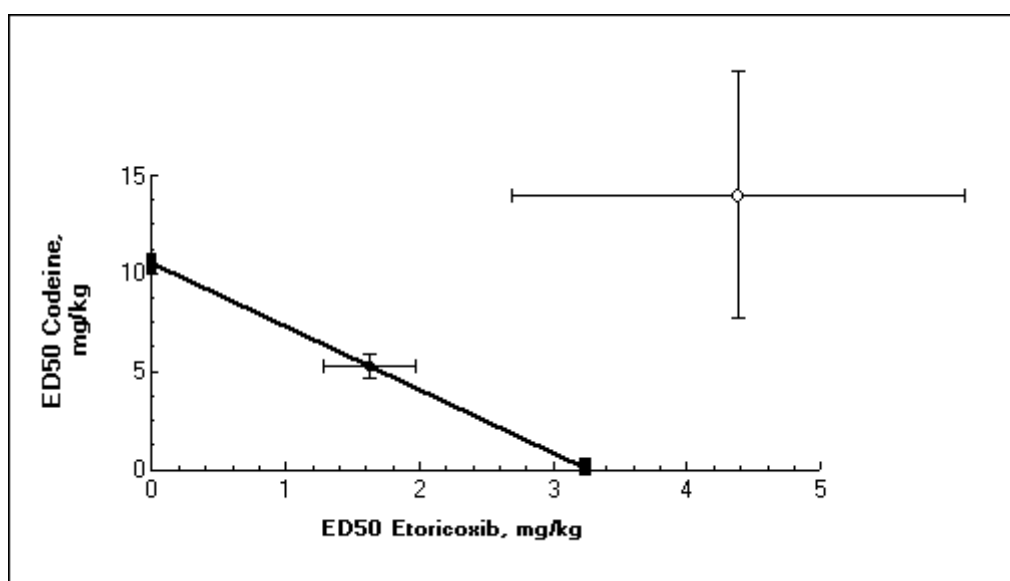
Tab.10. Dávky a analgetická účinnosť zmesi etorikoxibu s kodeínom v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myší.

dávka (D), mg/kg	logD	% MPE
0,86	- 0,066	1,40
1,72	0,236	20,09
3,45	0,538	24,74
6,89	0,838	34,18



Obr.5. Regresná priamka závislosti dávky a účinku pri experimentálnom stanovení ED_{50} zmesi etorikoxibu s kodeínom pomocou lineárnej regresnej analýzy.

Pomocou izobolografickej analýzy bola stanovená teoretická hodnota ED_{50} zmesi etorikoxibu s kodeínom: $ED_{50\text{ ADD}} = 6,72 \pm 1,11 \text{ mg/kg}$, a pomocou stanovených hodnôt bol vytvorený izobologram (Obr.6). V ňom leží teoretická hodnota $ED_{50\text{ ADD}}$ na línii aditivity, zatiaľ čo experimentálna hodnota $ED_{50\text{ EXP}}$ leží nad touto líniou. Porovnanie obidvoch hodnôt ukazuje, že interakcia medzi etorikoxibom a kodeínom je sub-aditívna ($t = 2,227$; $T = 4,047$; $p < 0,05$).



Obr.6. Izobologram sub-aditívnej interakcie medzi etorikoxibom a kodeínom. Línia aditivity spája hodnoty ED_{50} jednotlivých farmák, na nej leží teoretická hodnota $ED_{50\text{ ADD}}$ ich zmesi (plný krúžok) s príslušnými chybovými úsečkami. Nad líniou aditivity leží bod znázorňujúci experimentálnu hodnotu $ED_{50\text{ EXP}}$ zmesi (prázdny krúžok) s chybovými úsečkami.

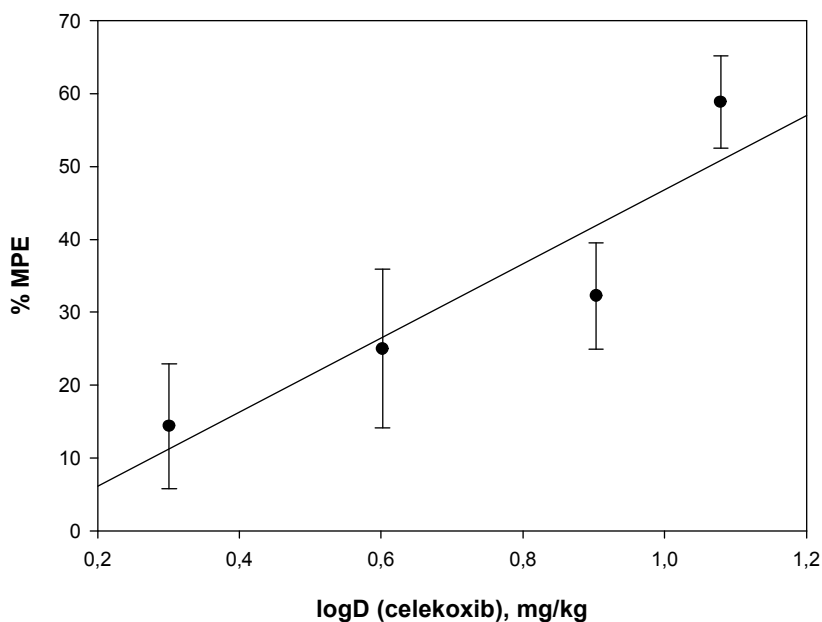
5.1.2. Interakcia celekoxibu s kodeínom

Pomocou lineárnej regresnej analýzy bola stanovená hodnota ED_{50} celekoxibu. V algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myší boli pre celekoxib použité 4 dávky tak, ako je uvedené v Tab.11. Pri podaní samostatne vykázal celekoxib dávkovo závislú účinnosť. Dávky a experimentálne stanovenie ED_{50} kodeínu sú uvedené v kapitole 5.1.1.

Tab.11. Dávky a analgetická účinnosť celekoxibu v algeziometrickom teste peritoneálnej bolesti u myší.

dávka (D), mg/kg	logD	% MPE
2	0,301	14,38
4	0,602	25,00
8	0,903	32,24
12	1,079	58,83

Z krivky závislosti dávky a účinku bola metódou najmenších štvorcov pomocou lineárnej regresnej analýzy získaná regresná priamka (Obr.7) a vypočítaná hodnota ED_{50} celekoxibu: **11,58 ± 3,68 mg/kg**.



Obr.7. Regresná priamka získaná metódou najmenších štvorcov popisuje dávkovo závislú analgetickú účinnosť celekoxibu v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myši.

S využitím získaných hodnôt ED_{50} celekoxibu a kodeínu boli pripravené dávky na experimentálne stanovenie $ED_{50 \text{ EXP}}$ zmesi podľa nasledujúcej Tab.12.

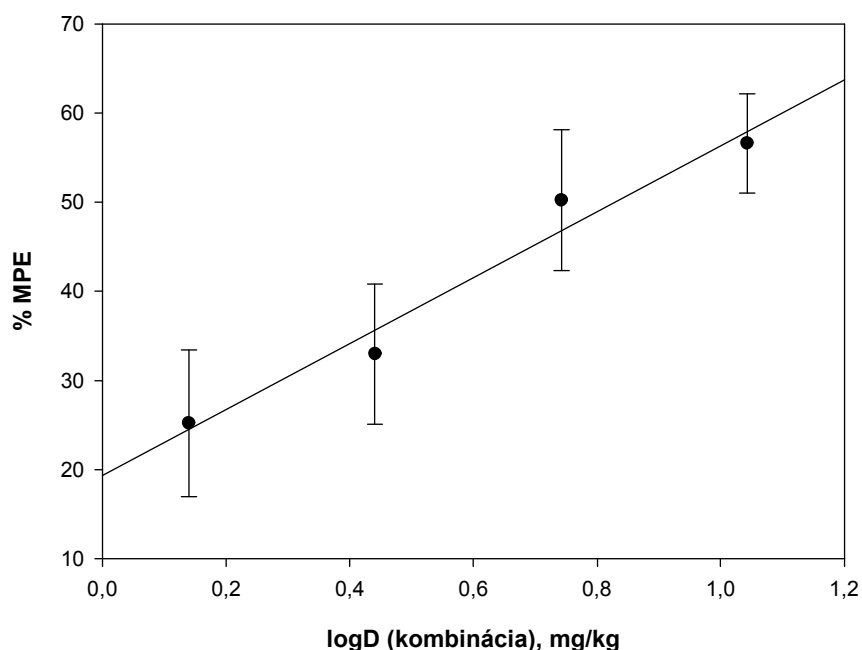
Tab.12. Dávky pre experimentálne stanovenie $ED_{50 \text{ EXP}}$ zmesi celekoxibu s kodeínom boli získané z jednotlivých dielov ED_{50} obidvoch látok.

diel celekoxibu, mg/kg	diel kodeínu, mg/kg	kombinácia, mg/kg
$ED_{50}/2 = 5,79$	$ED_{50}/2 = 5,25$	11,04
$ED_{50}/4 = 2,90$	$ED_{50}/4 = 2,63$	5,53
$ED_{50}/8 = 1,45$	$ED_{50}/8 = 1,31$	2,76
$ED_{50}/16 = 0,72$	$ED_{50}/16 = 0,66$	1,38

Pri experimentálnom testovaní zmesi celekoxibu s kodeínom bol v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myši získaný dávkovo závislý analgetický účinok (Tab.13), a pomocou lineárnej regresnej analýzy vytýčená regresná priamka (Obr.8), a stanovená experimentálna hodnota ED_{50} zmesi: $ED_{50 \text{ EXP}} = 6,74 \pm 0,83 \text{ mg/kg}$.

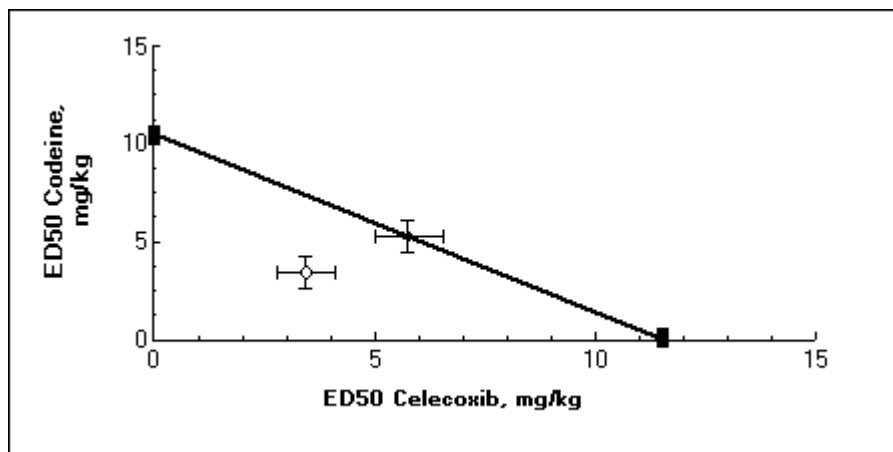
Tab.13. Hodnoty % MPE získané pri testovaní analgetickej účinnosti kombinácie celekoxibu s kodeínom.

dávka (D), mg/kg	logD	% MPE
1,38	0,140	25,20
2,76	0,441	32,96
5,53	0,742	50,21
11,04	1,043	56,60



Obr.8. Regresná priamka znázorňujúca dávkovo závislú analgetickú účinnosť kombinácie celekoxibu s kodeínom v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myší.

Metódou izobolografickej analýzy bola stanovená teoretická hodnota ED_{50} pre zmes celekoxibu s kodeínom: $ED_{50\text{ ADD}} = 10,87 \pm 1,12 \text{ mg/kg}$, a zo stanovených hodnôt bol vytvorený izobologram (Obr.9). V ňom leží teoretická hodnota na línii aditivity a experimentálna hodnota pod touto línii. Pomocou modifikovaného t -testu však nebola preukázaná štatistická významnosť rozdielu medzi týmito dvoma hodnotami ($t = 2,975$; $T = 3,543$; $p < 0,05$), čo ukazuje, že interakcia medzi celekoxibom a kodeínom je aditívna.



Obr.9. Izobologram aditívnej interakcie medzi celecoxibom a kodeínom. Hodnoty ED_{50} jednotlivých farmák spája línia aditivity, na nej leží bod znázorňujúci teoretickú hodnotu ED_{50_ADD} (plný krúžok) s príslušnými chybovými úsečkami. Pod líniou aditivity leží bod znázorňujúci experimentálnu hodnotu ED_{50_EXP} s chybovými úsečkami (prázdny krúžok).

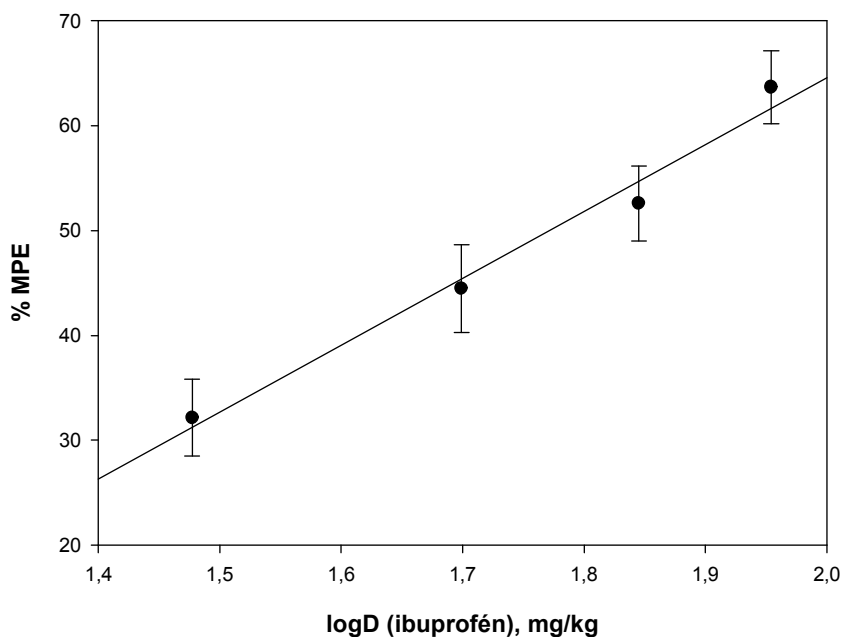
5.1.3. Interakcia ibuprofenu s kodeínom

Pomocou algeziometrického testu peritoneálneho dráždenia u myší bola ako prvá stanovená hodnota ED_{50} ibuprofenu. S využitím 4 dávok bol získaný dávkovo závislý analgetický účinok ibuprofenu s hodnotami % MPE, ako sú uvedené v Tab.14. Dávky, hodnoty % MPE a stanovenie ED_{50} pre kodeín sú uvedené v kapitole 5.1.1.

Tab.14. Dávky ibuprofenu použité na stanovenie hodnoty ED_{50} a im zodpovedajúce hodnoty % MPE.

dávka (D), mg/kg	logD	% MPE
30	1,477	32,56
50	1,699	44,27
70	1,845	52,97
90	1,954	63,68

Z krivky závislosti dávky a účinku ibuprofenu podaného samostatne bola pomocou metódy najmenších štvorcov získaná lineárnou regresnou analýzou regresná priamka (Obr.10) a stanovená hodnota ED_{50} ibuprofenu: **$58,13 \pm 5,32$ mg/kg.**



Obr.10. Regresná priamka znázorňujúca dávkovo závislý analgetický účinok ibuprofenu v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myši.

Pomocou získaných hodnôt ED_{50} ibuprofenu a kodeínu pri samostatnom podaní boli pripravené 4 dávky ich zmesi potrebné na experimentálne stanovenie hodnoty $ED_{50\text{ EXP}}$ zmesi, ako je uvedené v Tab.15.

Tab.15. Diely ibuprofenu a kodeínu potrebné k príprave 4 dávok zmesi pre experimentálne stanovenie $ED_{50\text{ EXP}}$ kombinácie.

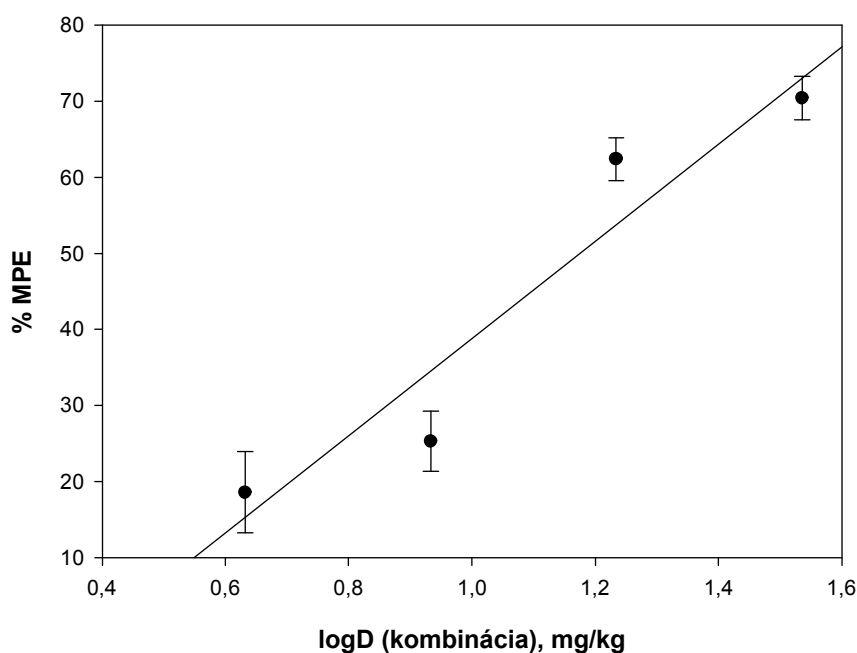
diel ibuprofenu, mg/kg	diel kodeínu, mg/kg	kombinácia, mg/kg
$ED_{50}/2 = 29,07$	$ED_{50}/2 = 5,25$	34,32
$ED_{50}/4 = 14,53$	$ED_{50}/4 = 2,63$	17,16
$ED_{50}/8 = 7,27$	$ED_{50}/8 = 1,31$	8,58
$ED_{50}/16 = 3,63$	$ED_{50}/16 = 0,66$	4,29

V algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myši bola pri testovaní kombinácie ibuprofenu s kodeínom získaná dávkovo závislá účinnosť s hodnotami % MPE, ako sú uvedené v Tab.16. Následne bola metódou najmenších štvorcov pomocou lineárnej regresnej

analýzy získaná regresná priamka tejto závislosti (Obr.11), a stanovená hodnota ED₅₀ kombinácie: **ED_{50 EXP} = 14,95 ± 2,62 mg/kg**.

Tab.16. Analgetická účinnosť 4 dávok kombinácie ibuprofenu s kodeínom v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myši.

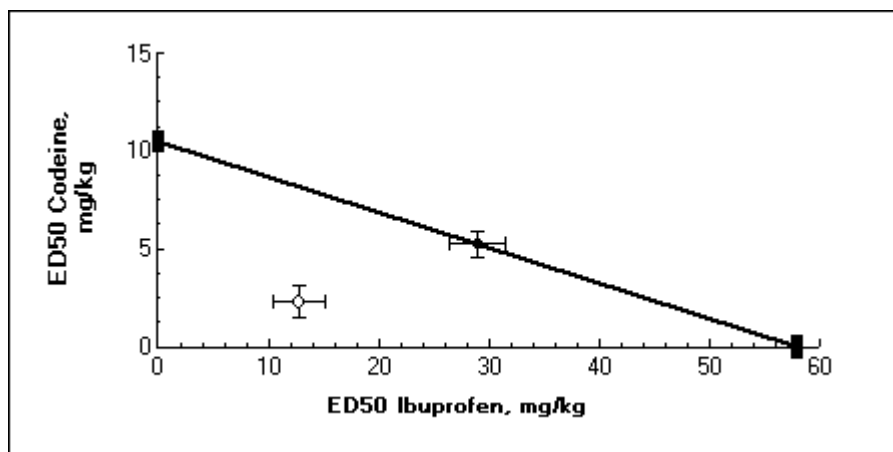
dávka (D), mg/kg	logD	% MPE
4,29	0,632	18,607
8,58	0,933	25,278
17,16	1,234	62,372
34,32	1,536	70,378



Obr.11. Regresná priamka dávkovej závislosti analgetického účinku kombinácie ibuprofenu s kodeínom v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myši.

Metódou izobolografickej analýzy bola následne získaná teoretická hodnota ED₅₀ pre kombináciu ibuprofenu s kodeínom: **ED_{50 ADD} = 34,60 ± 2,92 mg/kg**. Pomocou hodnôt ED_{50 EXP} a ED_{50 ADD} bol zostrojený izobologram (Obr.12), v ktorom leží hodnota ED_{50 ADD} na línii aditivity a hodnota ED_{50 EXP} pod touto líniov. Rozdiel medzi týmito dvoma hodnotami je

štatisticky významný ($t = 4,395$; $T = 4,069$; $p < 0,05$), čo ukazuje na supra-aditívnu interakciu medzi ibuprofénom a kodeínom.



Obr.12. Izobologram interakcie medzi ibuprofénom a kodeínom. Línia aditivity spája hodnoty ED_{50} oboch látok podaných samostatne a teoretická hodnota ED_{50_ADD} pre kombináciu leží na tejto linii. Je znázornená plným krúžkom s príslušnými chybovými úsečkami. Experimentálna hodnota ED_{50_EXP} pre kombináciu leží pod líniou aditivity, je znázornená prázdny krúžkom s chybovými úsečkami.

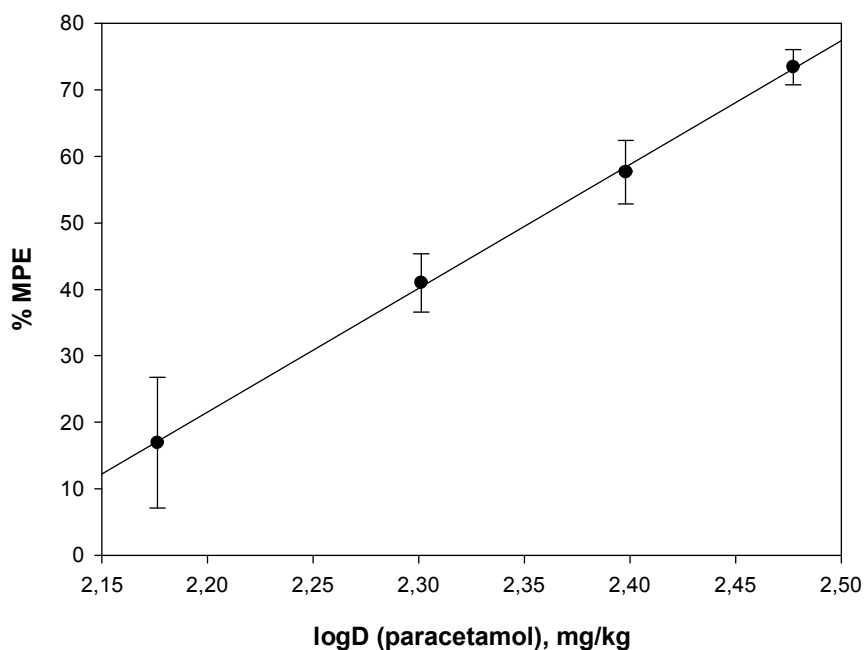
5.1.4. Interakcia paracetamolu s kodeínom

Ako prvá bola stanovená hodnota ED_{50} pre paracetamol. Boli na to použité 4 dávky, ktoré v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myší poskytli hodnoty % MPE uvedené v Tab.17. Dávky kodeínu, im zodpovedajúci účinok a stanovenie hodnoty ED_{50} kodeínu sú uvedené v kapitole 5.1.1.

Tab.17. Dávky paracetamolu a získané hodnoty % MPE pri experimentálnom stanovení ED_{50} paracetamolu.

dávka (D), mg/kg	logD	% MPE
150	2,176	16,93
200	2,301	40,98
250	2,398	57,65
300	2,477	73,40

Analgetický účinok paracetamolu podaného samostatne bol dávkovo závislý. Z krivky závislosti dávky a účinku bola metódou najmenších štvorcov pomocou lineárnej regresnej analýzy skonštruovaná regresná priamka (Obr.13), a vypočítaná hodnota ED₅₀ pre paracetamol: **225,36 ± 1,02 mg/kg**.



Obr.13. Regresná priamka dávkovej závislosti analgetického účinku paracetamolu v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myši.

Zo získaných hodnôt ED₅₀ paracetamolu a kodeínu podaných samostatne boli pripravené 4 dávky zmesi na experimentálne stanovenie hodnoty ED₅₀ EXP kombinácie paracetamolu s kodeínom podľa Tab.18.

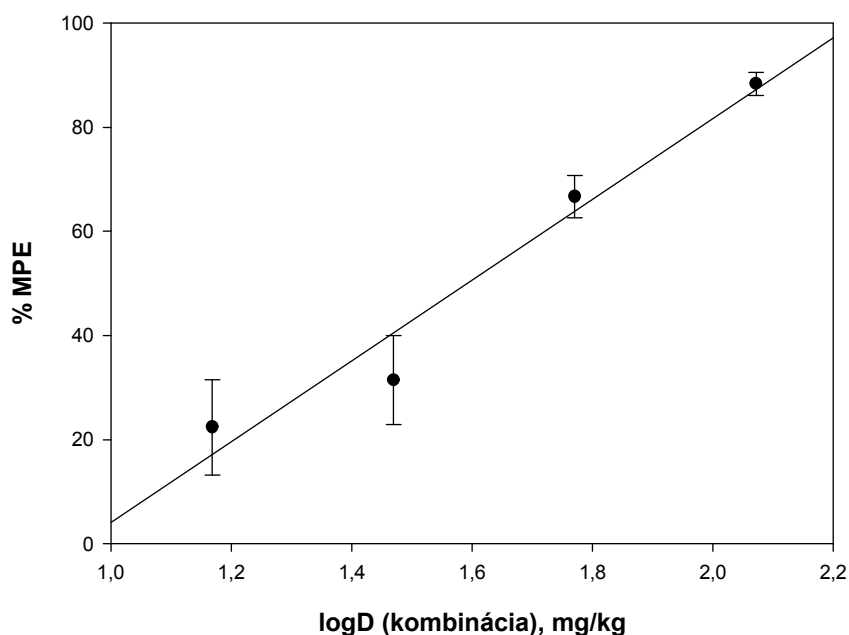
Tab.18. Postup pri príprave dávok zmesi paracetamolu s kodeínom na experimentálne stanovenie hodnoty ED₅₀ EXP kombinácie.

diel paracetamolu, mg/kg	diel kodeínu, mg/kg	kombinácia, mg/kg
ED ₅₀ /2 = 112,68	ED ₅₀ /2 = 5,25	117,93
ED ₅₀ /4 = 56,34	ED ₅₀ /4 = 2,63	58,97
ED ₅₀ /8 = 28,17	ED ₅₀ /8 = 1,31	29,48
ED ₅₀ /16 = 14,09	ED ₅₀ /16 = 0,66	14,75

Pri experimentálnom testovaní 4 dávok kombinácie paracetamolu s kodeínom bola získaná dávkovo závislá analgetická účinnosť s hodnotami % MPE uvedenými v Tab.19. Pomocou lineárnej regresnej analýzy bola metódou najmenších štvorcov získaná regresná priamka (Obr.14), tejto dávkovej závislosti a následne vypočítaná experimentálna hodnota ED_{50} pre kombináciu paracetamolu s kodeínom: $ED_{50 \text{ EXP}} = 38,42 \pm 4,40 \text{ mg/kg}$.

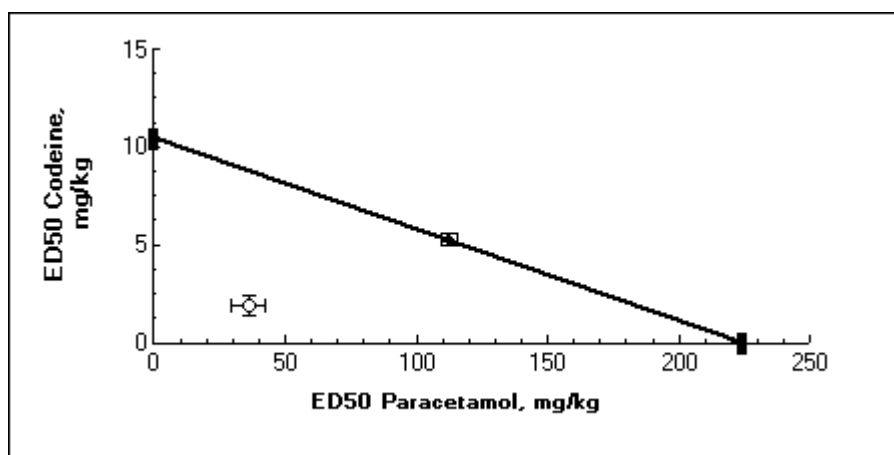
Tab.19. Analgetická účinnosť kombinácie paracetamolu s kodeínom v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myší pri stanovení hodnoty $ED_{50 \text{ EXP}}$.

dávka (D), mg/kg	logD	% MPE
14,75	1,169	22,34
29,48	1,470	31,42
58,97	1,771	66,64
117,93	2,072	88,34



Obr.14. Regresná priamka znázorňujúca dávkovú závislosť získanú pri testovaní kombinácie paracetamolu s kodeínom v algeziometrickom teste peritoneálneho dráždenia u myší.

Metódou izobolografickej analýzy bola teoretická hodnota ED_{50} pre kombináciu paracetamolu s kodeínom stanovená nasledovne: $ED_{50\text{ ADD}} = 117,34 \pm 1,26 \text{ mg/kg}$. Pomocou obidvoch získaných hodnôt, teoretickej a experimentálnej, bol zostrojený izobologram (Obr.15). V ňom leží bod znázorňujúci teoretickú hodnotu $ED_{50\text{ ADD}}$ na línii aditivity, zatiaľ čo bod znázorňujúci experimentálnu hodnotu $ED_{50\text{ EXP}}$ leží pod touto líniov. Rozdiel medzi obidvoma hodnotami je štatisticky významný ($t = 8,404$; $T = 3,889$; $p < 0,05$), z čoho vyplýva, že interakcia medzi paracetamolom a kodeínom je supra-aditívna.



Obr.15. Izobologram interakcie paracetamolu s kodeínom. Lína aditivity spája hodnoty ED_{50} jednotlivých farmák podaných samostatne, na nej leží bod znázorňujúci teoretickú hodnotu pre kombináciu $ED_{50\text{ ADD}}$ s chybovými úsečkami (plný krúžok). Pod líniov aditivity leží bod znázorňujúci experimentálne stanovenú hodnotu pre kombináciu $ED_{50\text{ EXP}}$ s chybovými úsečkami (prázdny krúžok).

5.1.6. Interakčný index γ

Po získaní hodnôt $ED_{50\text{ ADD}}$ a $ED_{50\text{ EXP}}$ pre každú z použitých kombinácií bol pre jednotlivé kombinácie vypočítaný interakčný index γ , ktorý umožňuje kvantitatívne charakterizovať mieru synergie. Hodnoty sú uvedené v Tab.20.

Tab.20. Hodnoty $ED_{50\text{ ADD}}$ a $ED_{50\text{ EXP}}$ pre jednotlivé kombinácie neopioidných analgetík s kodeínom a im zodpovedajúce interakčné indexy γ .

kombinácia	$ED_{50\text{ ADD}}$ (mg/kg)	$ED_{50\text{ EXP}}$ (mg/kg)	index γ
ETO + KOD	$6,72 \pm 1,11$	$18,13 \pm 7,50$	2,70
CEL + KOD	$10,87 \pm 1,12$	$6,74 \pm 0,83$	0,62
IBU + KOD	$34,60 \pm 2,92$	$14,95 \pm 2,62$	0,43
PAR + KOD	$117,34 \pm 1,26$	$38,42 \pm 4,40$	0,33

S využitím interakčného indexu γ bola miera synergie medzi etorikoxibom, celekoxibom, ibuprofénom, paracetamolom a kodeínom vyhodnotená nasledovne:

$$\gamma = 2.7_{\text{COD+ETO}} > \gamma = 0.62_{\text{COD+CEL}} > \gamma = 0.43_{\text{COD+IBU}} > \gamma = 0.33_{\text{COD+PAR}}$$

Z toho vyplýva, že najsilnejšia synergia je medzi paracetamolom a kodeínom, nasledovaná kombináciou ibuprofenu s kodeínom. Kombinácie celekoxibu a etorikoxibu s kodeínom už synergne neboli.

5.2. Analgetická účinnosť a sérové koncentrácie beta-cyklodextrín-meloxicamu

5.2.1. Test akútnej tepelnej bolesti

Meloxicam aj beta-cyklodextrín-meloxicam boli aplikované v dávkach 3 a 10 mg/kg v teste akútnej tepelnej bolesti u potkanov indukovanej karagenínom. V prezentácii výsledkov sú na vyjadrenie analgetického účinku použité časy, o ktoré sa líšia hodnoty PWL pokusných skupín (kontrola, meloxicam, BCD-meloxicam), od bazálnych hodnôt PWL nameraných 30 minút pred podaním medikácie.

U kontrolnej skupiny (0,9 % fyziologický roztok p.o.) boli v časoch 3 až 5 hodín od aplikácie karagenínu namerané výrazne nižšie hodnoty PWL v porovnaní s bazálnymi hodnotami.

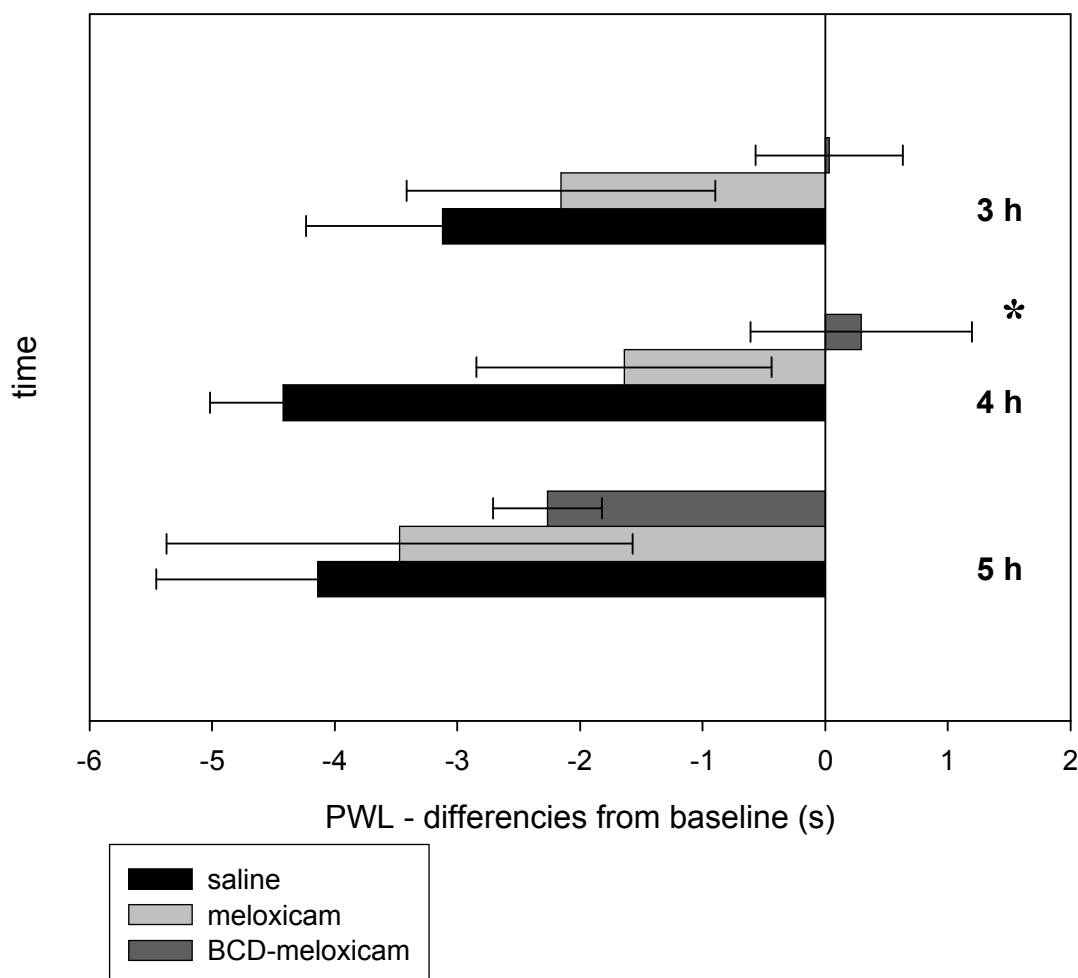
Naproti tomu, pri dávkach 3 mg/kg p.o. bol pozorovaný u BCD-meloxicamu trend zvýšenej analgetickej účinnosti oproti kontrolnej skupine od 3. hodiny po podaní karagenínu, ktorý vo 4. hodine trvania experimentu dosiahol štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$).

V dávke 3 mg/kg bol pozorovaný rovnako zvýšený trend analgetickej účinnosti oproti kontrolám aj u nemodifikovaného meloxicamu, štatisticky významný však nebol. V 5. hodine trvania experimentu bolo pozorované zníženie analgetickej účinnosti u oboch použitých medikácií. Hodnoty PWL získané v experimente sú uvedené v Tab.21 a graf znázorňujúci rozdiely oproti bazálnym hodnotám na Obr.16.

Tab.21. Hodnoty PWL získané pri testovaní meloxicamu 3 mg/kg a BCD-meloxicamu 3 mg/kg v algeziometrickom teste akútnej tepelnej bolesti u potkanov navodenej karagenínom (C = kontroly, M = meloxicam, BCDM = beta-cyklodextrín-meloxicam).

	bazálne hodnoty PWL _B (s)	3. hod		4. hod		5. hod	
		PWL ₃ (s)	rozdiel PWL ₃ – PWL _B (s)	PWL ₄ (s)	rozdiel PWL ₄ – PWL _B (s)	PWL ₅ (s)	rozdiel PWL ₅ – PWL _B (s)
C	12,67	9,60	– 3,07	8,25	– 4,42	8,53	– 4,14
M (3 mg/kg)	11,77	9,61	– 2,16	10,13	– 1,64	8,29	– 3,48
BCDM (3 mg/kg)	11,24	11,27	+ 0,03	11,53	+ 0,29	8,97	– 2,27

Plantar test 3 mg/kg



Obr.16. Rozdiely v hodnotách PWL u testovaných skupín v časoch 3 až 5 hodín trvania experimentu oproti bazálnym hodnotám (0) v sekundách. Pri bolesti sa hodnoty PWL skracujú a rozdiely sú tak posunuté do záporných hodnôt. Pri analgézií je posun do záporných hodnôt menší, alebo sa dostáva do kladných hodnôt. Vo 4. hodine bola dosiahnutá štatistická významnosť rozdielu medzi skupinou BCD-meloxicamu a kontrolami ($p < 0,05$).

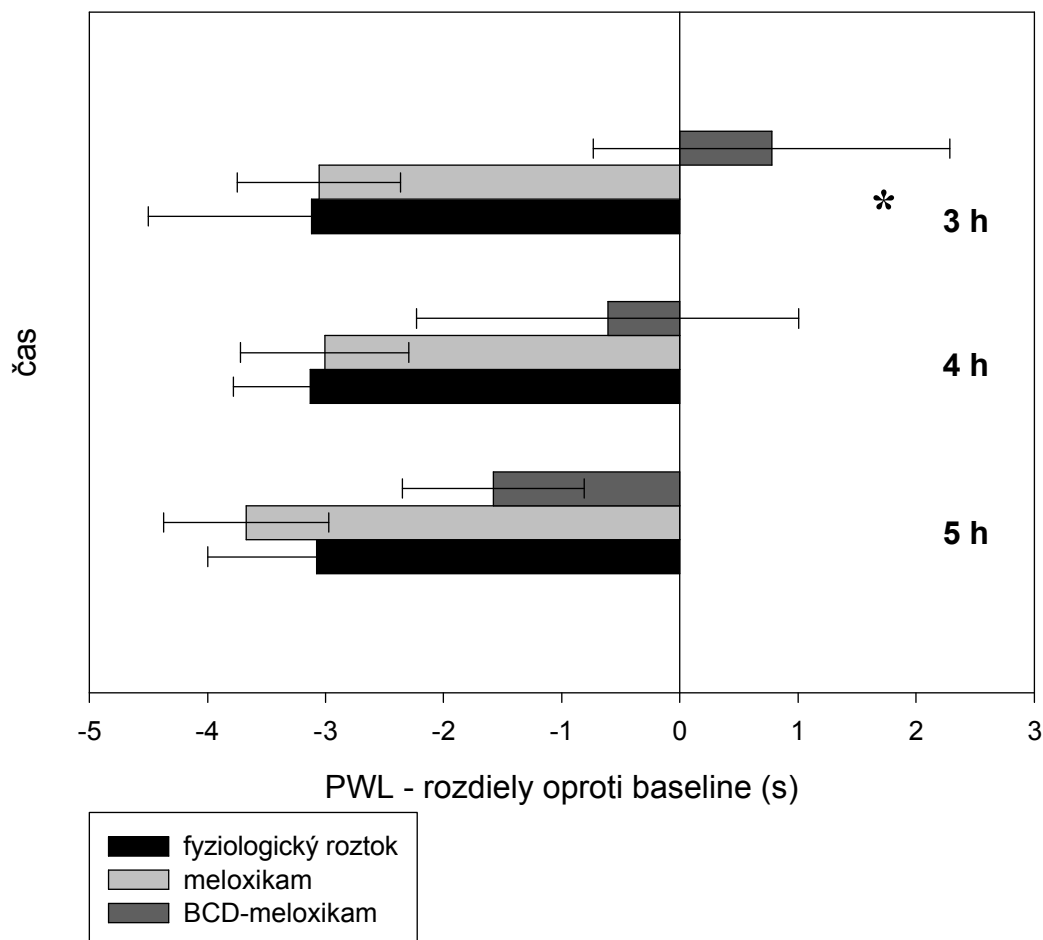
Pri použití dávok 10 mg/kg sa významná odlišnosť BCD-meloxicamu a kontrolnej skupiny ($p < 0,05$), objavila už v 3. hodine po s.c. aplikácii karagenínu. Vo 4. a 5. hodine sa tento účinok následne znižoval. Nemodifikovaný meloxicam nedosiahol ani pri tejto dávke analgetickú účinnosť, ktorá by bola štatisticky významná oproti kontrolám. Namerané hodnoty PWL oboch testovaných látok a kontrolnej skupiny sú uvedené v Tab.22 a graf,

ktorý znázorňuje odklony jednotlivých skupín od bazálnych hodnôt v 3., 4. a 5. hodine po s.c. aplikácii karagenínu je na Obr.17.

Tab.22. Hodnoty PWL získané pri testovaní meloxicamu 10 mg/kg a BCD-meloxicamu mg/kg v algeziometrickom teste akútnej tepelnej bolesti u potkanov navodenej karagenínom (C = kontroly, M = meloxicam, BCDM = beta-cyklodextrín-meloxicam).

	bazálne hodnoty PWL _B (s)	3. hod		4. hod		5. hod	
		PWL ₃ (s)	rozdiel PWL ₃ – PWL _B (s)	PWL ₄ (s)	rozdiel PWL ₄ – PWL _B (s)	PWL ₅ (s)	rozdiel PWL ₅ – PWL _B (s)
C	10,22	7,09	– 3,13	7,09	– 3,13	7,14	– 3,08
M (10 mg/kg)	11,57	8,52	– 3,05	8,57	– 3,00	7,90	– 3,67
BCDM (10 mg/kg)	10,31	11,17	+ 0,86	9,69	– 0,62	8,73	– 1,57

Plantar test 10 mg/kg



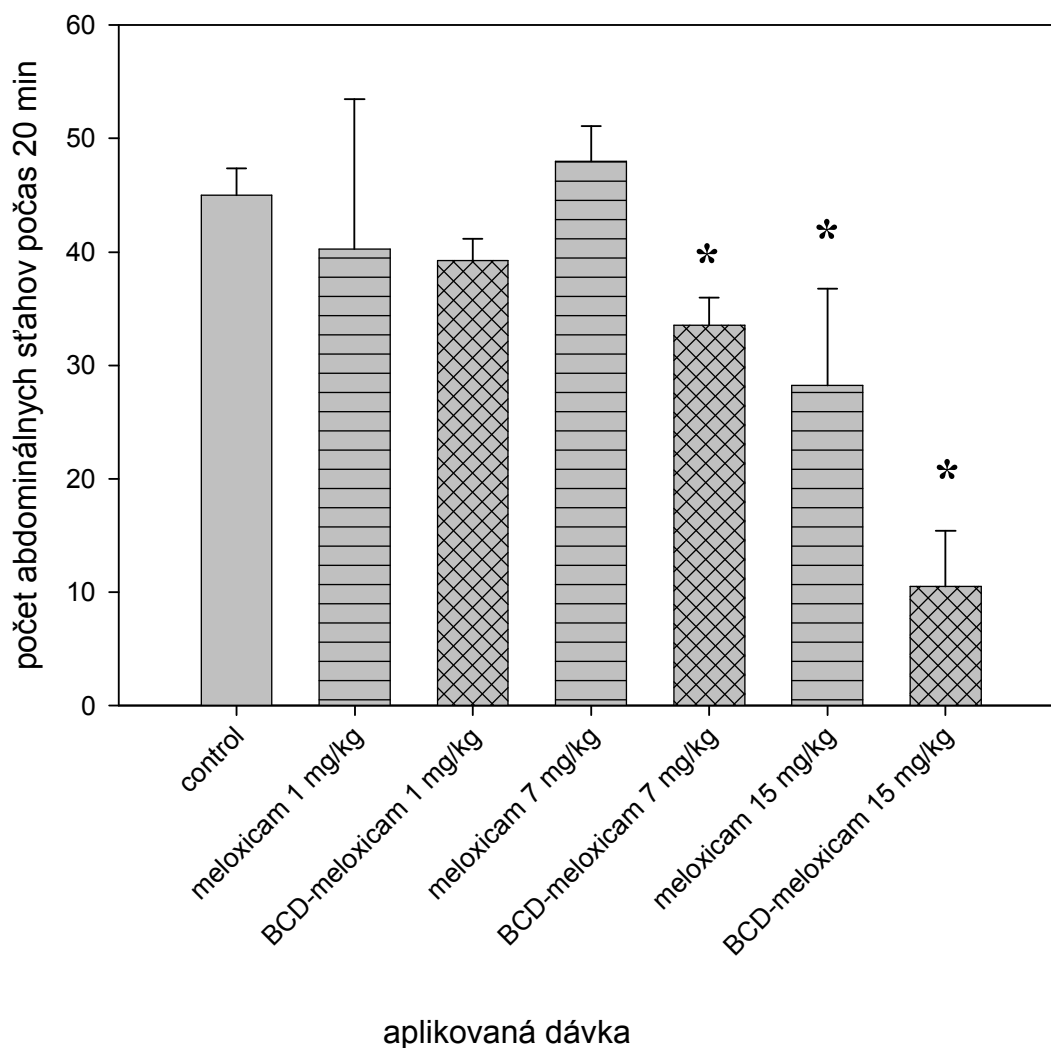
Obr.17. Rozdiely v hodnotách PWL u testovaných skupín v časoch 3 až 5 hodín trvania experimentu oproti bazálnym hodnotám (0) v sekundách. Pri bolesti sa hodnoty PWL skracujú a rozdiely sú tak posunuté do záporných hodnôt. Pri analgézii je posun do záporných hodnôt menší, alebo sa dostáva do kladných hodnôt. V 3. hodine bola dosiahnutá štatistická významnosť rozdielu medzi skupinou BCD-meloxicamu a kontrolami ($p < 0,05$).

5.2.2. Test peritoneálneho dráždenia

V teste peritoneálneho dráždenia u myší bola analgetická účinnosť meloxicamu a BCD-meloxicamu posudzovaná na základe počtu abdominálnych sťahov spojených s charakteristickou extenziou zadných končatín po i.p. aplikácii zriedeného 0,6 % roztoku kyseliny octovej (0,1 ml/10 g). Nižší počet sťahov je prezentovaný ako vyšší analgetický účinok.

V dávke 1 mg/kg nedosiahla ani jedna z použitých medikácií analgetický účinok, ktorý by bol štatisticky odlišný od kontrolnej skupiny (0,9 % fyziologický roztok), aj keď sa ukázal určitý trend vyššieho účinku v skupine, ktorá dostávala BCD-meloxicam. V dávke 7 mg/kg dosiahol tento trend štatisticky významný rozdiel oproti kontrolám ($p < 0,05$), zatiaľ čo nemodifikovaný meloxicam tento rozdiel nedosiahol. V dávke 15 mg/kg sa rozdiel analgetickej účinnosti BCD-meloxicamu a kontrol ešte prehĺbil a štatisticky významnú analgetickú účinnosť dosiahol aj meloxicam nemodifikovaný ($p < 0,05$). Znovu bol však badateľný výrazne vyšší účinok u skupiny, ktorá dostávala BCD-meloxicam. Rozdiely v účinnosti meloxicamu a BCD-meloxicamu v dávkach 1, 7 a 15 mg/kg sú uvedené v grafe na Obr.18.

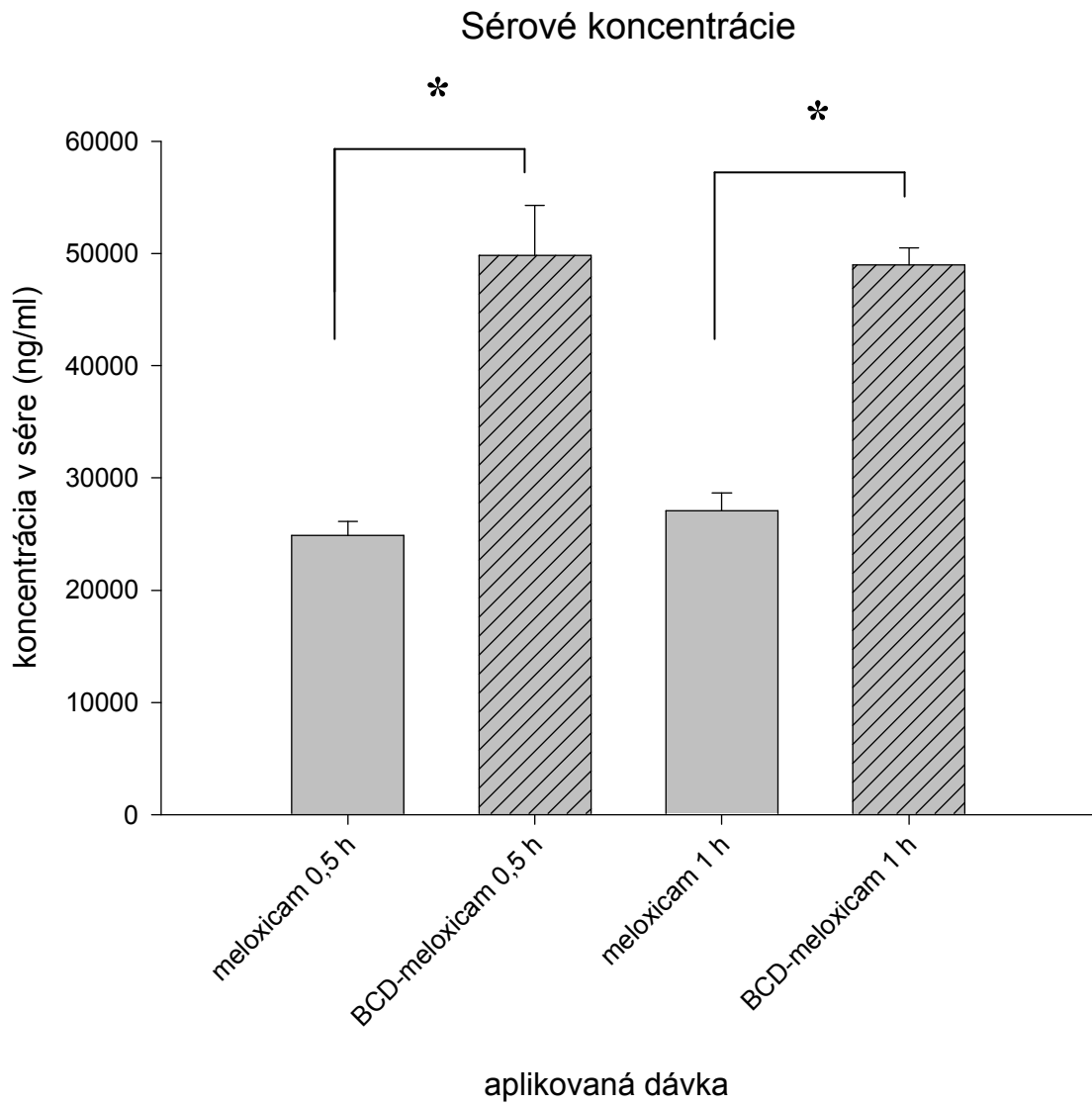
Writhing test



Obr.18. V grafe sú ukázané počty abdominálnych sťahov v teste peritoneálneho dráždenia u myší u kontrolnej skupiny a v skupinách, ktoré dostávali jednotlivé medikácie. Symbol * ukazuje štatistickú významnosť analgetického účinku oproti kontrolám.

5.2.3. Sérové koncentrácie meloxicamu a beta-cyklodextrín-meloxicamu

V štúdiu zameranej na sledovanie nárastu sérových koncentrácií meloxicamu po p.o. aplikácii v nemodifikovanej forme, alebo v komplexe s beta-cyklodextrínom. Obidve látky podané v dávke 10 mg/kg dvom skupinám potkanov ($n = 6$). Po 30 a 60 minútach od aplikácie bola obidvom skupinám odobratá krv pomocou heparinizovanej kapiláry z retro-orbitálneho plexu za účelom stanovenia sérových koncentrácií. Vo vzorkách odobratých 30 minút po aplikácii bola koncentrácia meloxicamu signifikantne ($p < 0,05$) vyššia u skupiny, ktorá dostala BCD-meloxicam, v porovnaní so skupinou, ktorá dostala meloxicam nemodifikovaný. Rovnako vyššie koncentrácie boli namerané u skupiny, ktorá dostala BCD-meloxicam v porovnaní s nemodifikovaným meloxicamom aj vo vzorkách odobratých 60 minút po aplikácii ($p < 0,05$). Nárast hladín meloxicamu po podaní v čistej, alebo modifikovanej forme, je prezentovaný v grafe na Obr.19.



Obr.19. Sérové koncentrácie meloxicamu po 30 a 60 minútach od p.o. aplikácie u skupín, ktoré dostali dávku meloxicamu čistého a dávku BCD-meloxicamu. Symbol * ukazuje na štatisticky významný rozdiel medzi obidvoma skupinami.

6. DISKUSIA

V predkladanej práci sú prezentované výsledky interakcií etorikoxibu a celekoxibu s kodeínom. Interakcia etorikoxibu bola vyhodnotená ako sub-aditívna, interakcia celekoxibu ako aditívna, zatiaľ čo interakcie paracetamolu a ibuprofenu boli supra-aditívne. Okrem toho bola prezentovaná zvýšená analgetická účinnosť meloxicamu v komplexe s beta-cyklodextrínom v porovnaní s čistým meloxicamom v dvoch rôznych modeloch bolesti, vrátane nárastu sérových koncentrácií meloxicamu po podaní v oboch formách.

6.1. Interakcie etorikoxibu a celekoxibu s kodeínom a porovnanie s interakciami kodeínu s paracetamolom a ibuprofénom

Koxiby sú využívané v klinickej praxi už približne desať rokov, ale ich prípadné interakcie s opioidmi boli doteraz hodnotené iba vo veľmi obmedzenej miere: preklinicky boli tieto kombinácie hodnotené iba s rofekoxibom, ktorý bol neskôr stiahnutý z trhu a iné údaje o klinickom skúšaní kombinácií koxibov s opioidmi sme nenašli, nie je nám známa ani existencia žiadneho prípravku fixnej kombinácie koxibov s opioidmi (na rozdiel od častých fixných kombinácií opioidov napr. s paracetamolom).

Vyššia analgetická účinnosť kombinácií paracetamolu s kodeínom bola síce potvrdená v mnohých rozsiahlych klinických štúdiách a meta-analýzach, avšak prítomnosť a miera ich synergie doteraz nebola overovaná rigoróznou izobolografickou analýzou.

V preklinickej štúdii bola s využitím modelu zápalovej bolesti pri experimentálne navodenej artróze u potkanov hodnotená analgetická účinnosť rôznych kombinácií rofekoxibu so slabým opioidom tramadolom pomocou izobolografickej analýzy. Z dvanástich hodnotených kombinácií bola u piatich (3,2 mg/kg tramadol + 7,8 mg/kg rofekoxib; 5,6 mg/kg tramadol + 10 alebo 17,8 mg/kg rofekoxib; 10 mg/kg tramadol + 10 alebo 17,8 mg/kg rofekoxib), pozorovaná sub-aditivita, zatiaľ čo u zostávajúcich siedmich kombinácií bola pozorovaná aditivita. Pri použití vyšších dávok (10 mg/kg tramadol + 17,8 mg/kg rofekoxib), bola zistená nižšia incidencia gastrointestinálneho rizika v porovnaní s p.o. podaným indometacínom, ale vyššia v porovnaní s tramadolom, alebo rofekoxibom, podanými samostatne (Garcia-Hernandez, Deciga-Campos et al. 2007).

Rovnako v preklinickej štúdii, ktorá porovnávala analgetický účinok kombinácie naproxenu s tramadolom a rofekoxibu s tramadolom v teste akútnej viscerálnej bolesti u myší pomocou izobolografickej analýzy, nebola pri použití kombinácie rofekoxibu s tramadolom zistená synergia. Naproti tomu, pri použití kombinácie naproxenu s tramadolom došlo v použitom modeli bolesti k supra-aditívnej interakcii (Satyanarayana, Jain et al. 2004b). Podobne tomu bolo v našej štúdii – u kombinácií selektívnych inhibítorov COX-2 s kodeínom došlo maximálne k aditivite, zatiaľ čo u kombinácií paracetamolu a ibuprofenu s kodeínom došlo k výraznej, resp. menej výraznej synergii.

V preklinickej štúdii, ktorá zisťovala možné interakcie medzi rofekoxibom a silným opioidom morfinom bol použitý model bolesti pri experimentálne navodenej artróze u potkanov a miera interakcií bola hodnotená pomocou izobolografickej analýzy. Z dvanástich použitých kombinácií morfinu s rofekoxibom bola u troch zistená supra-aditívna interakcia (morfin 10 mg/kg + rofekoxib 5,6; 10 alebo 31,6 mg/kg), zatiaľ čo u ostatných deviatich kombinácií bola zistená len aditivita. Maximálny analgetický účinok v tejto štúdii bol dosiahnutý použitím kombinácie 56,2 mg/kg morfinu a 31,6 mg/kg rofekoxibu. Táto kombinácia preukázala nižší výskyt gastrointestinálnych účinkov v porovnaní s indometacínom (Deciga-Campos, Lopez et al. 2003).

Podľa výsledkov, ktoré sú predložené v tejto práci, nebola pri preklinickom testovaní kombinácií celekoxibu ($\gamma = 0,62$; aditivita) a etorikoxibu ($\gamma = 2,7$; sub-aditivita) s kodeínom zistená synergia. Tieto výsledky sú v súlade s predchádzajúcimi zisteniami uvedenými vyššie, podľa ktorých vykazuje súčasné podávanie ďalšieho koxibu, rofekoxibu, spoločne s opioidmi väčšinou len aditivitu, maximálne v obmedzenej miere synergii. Ako porovnanie sú uvedené dáta získané z testovania rofekoxibu, nakoľko celekoxib a etorikoxib, ktoré sa v dnešnej dobe používajú v perorálnej forme v klinickej praxi, doteraz testované v súvislosti interakcií s opioidmi neboli. Rovnako nie sú k dispozícii štúdie, ktoré by hodnotili klinický účinok kombinácii koxibov s opioidmi.

Naproti tomu bola analgetická účinnosť kombinácií paracetamolu a ibuprofenu s opioidmi potvrdená v mnohých rozsiahlych klinických štúdiách a meta-analýzach.

Analgetický účinok kombinácie paracetamolu so slabým opioidom kodeínom bol študovaný pomocou meta-analýzy zahŕňajúcej výsledky klinických štúdií, ktoré porovnávali účinnosť tejto kombinácie s paracetamolom podaným samostatne a placebom pri akútnej pooperačnej bolesti. Ako meradlo účinku bol použitý parameter NNT, pričom malo dôjsť aspoň k 50 % redukcii intenzity bolesti. V placebom kontrolovaných štúdiách došlo

k signifikantnému analgetickému účinku kombinácie v porovnaní s placebom v dávkach 800 až 1000 mg paracetamolu + 60 mg kodeínu (NNT = 2,2); 600 až 650 mg paracetamolu + 60 mg kodeínu (NNT = 3,9); a 300 mg paracetamolu + 30 mg kodeínu (NNT = 6,9). Z toho je jasná dávková závislosť analgetického účinku kombinácie paracetamolu s kodeínom.

V klinických štúdiách, ktoré porovnávali analgetickú účinnosť paracetamolu podaného samostatne a podaného v rovnakej dávke s prídavkom kodeínu, bol zistený o 10 až 15 % silnejší účinok kombinácie s trvaním účinku dlhším o jednu hodinu. V placebom kontrolovaných štúdiách došlo k nárastu nežiadúcich účinkov v skupinách, ktoré boli liečené kombináciou paracetamolu s kodeínom oproti placebo, tieto účinky však boli len miernej až strednej intenzity; po prídavku kodeínu k paracetamolu nebol zaznamenaný vyšší výskyt nežiadúcich účinkov v porovnaní s paracetamolom samotným (Toms, Derry et al. 2009).

Podobne v meta-analýze, zahŕňajúcej výsledky 31 klinických štúdií s celkovým počtom 2515 pacientov, boli účinky kombinácie paracetamolu s kodeínom hodnotené v porovnaní s placebom, alebo paracetamolom podaným samostatne. Pri paracetamole v dávke 1000 mg podanom samostatne, bola nameraná hodnota NNT = 3,6; pri dávke 600/650 mg NNT = 5,0. Po pridaní kodeínu 60 mg k slabšej dávke paracetamolu bola získaná hodnota NNT = 3,1 v porovnaní s placebom. V štúdiách, ktoré porovnávali účinok kombinácie paracetamolu s kodeínom priamo s paracetamolom podaným samostatne, bolo zistených v každej stovke sledovaných pacientov 12 percentný nárast tých, u ktorých sa zmiernila bolesť najmenej o 50 % (Moore, Collins et al. 1997) .

V rozsiahlej meta-analýze, ktorá zahrňovala výsledky siedmich klinických štúdií s rovnakým dizajnom, bola posudzovaná analgetická účinnosť kombinácie slabého opioиду tramadolu s paracetamolom (75 mg tramadolu + 650 mg paracetamolu, alebo 112,5 mg tramadolu + 975 mg paracetamolu), a porovnávaná s účinnosťou jednotlivých komponentov podaných samostatne pri pooperačnej bolesti. Ako meradlo účinku u jedného pacienta bol použitý parameter NNT, ktorý udáva počet pacientov nereagujúcich na placebo, u ktorých je aspoň u jedného dosiahnutá najmenej 50 % úľava od bolesti po podaní liečiva. Kombinácia tramadolu s paracetamolom poskytla signifikantne nižšie hodnoty NNT, a teda vyššiu pravdepodobnosť zmiernenia bolesti, v porovnaní s obidvoma látkami podanými samostatne, pričom nedošlo k nárastu výskytu nežiadúcich účinkov typu závratov, ospalosti, nauzey, zvracania, ani bolesti hlavy. Navyše, analgetický účinok kombinácie paracetamolu s tramadolom bol pri dentálnych bolestiach porovnateľný s analgetickým účinkom ibuprofenu 400 mg, čo je zaujímavé z hľadiska zníženia gastrointestinálnej toxicity (Edwards, McQuay et al. 2002).

Ďalšia meta-analýza zahŕňala výsledky 20 klinických štúdií, ktoré sa zaoberali analgetickým účinkom, jeho trvaním a výskytom nežiadúcich účinkov pri administrácii silného opioidu oxykodónu samostatne, alebo v kombinácii s paracetamolom, pri pooperačnej bolesti. Ako kritérium účinku bol znovu použitý počet pacientov, u ktorých došlo k aspoň 50 % redukcii bolesti po dobu 4 až 6 hodín (NNT). Pri podaní oxykodónu samostatne v dávke 15 mg bola získaná hodnota, ktorá zodpovedala 50 % redukcii bolesti, NNT = 4,6; zatiaľ čo u pacientov, ktorí dostávali oxykodón 10 mg v kombinácii s paracetamolom 650 mg, bola získaná hodnota NNT = 2,7. Pri použití tejto kombinácie bolo zaznamenané trvanie analgetického účinku 10 hodín. Pri použití kombinácie oxykodónu s paracetamolom bol pozorovaný nárast nežiadúcich účinkov, ale tieto účinky boli charakterizované ako miernej a strednej intenzity a málokedy viedli k prerušeniu liečby. Výsledky ukazujú, že analgetická účinnosť oxykodónu pri pooperačnej bolesti sa zvyšuje pri podaní v kombinácii s paracetamolom, pričom kombinácia 10 mg oxykodónu a 650 mg paracetamolu má porovnateľný účinok s bežnými NSA s dlhším trvaním (Gaskell, Derry et al. 2009).

V randomizovanej, dvojito-slepej klinickej štúdií bol porovnávaný analgetický účinok a incidencia nežiadúcich účinkov ibuprofenu podaného samostatne v dávke 400 mg a kombinácie 400 mg ibuprofenu s 20 mg kodeínu u pacientov, ktorí absolvovali obojstrannú extrakciu stoličky. U pacientov, ktorí dostali kombinovanú dávku oboch liečiv bola zaznamenaná signifikantne zvýšená analgetická účinnosť o 30 % v porovnaní s ibuprofenom podaným samostatne, a zdvojnásobenie trvania účinku v hodinách. Pacienti hodnotili efekt kombinácie výrazne pozitívne, pričom nedošlo k signifikantnému nárastu výskytu nežiadúcich účinkov (McQuay, Carroll et al. 1989).

V experimentoch, ktorých výsledky sú predložené v tejto práci, bola v teste akútnej viscerálnej bolesti u myší pomocou izobolografickej analýzy preukázaná synergia analgetického účinku paracetamolu ($\gamma = 0,33$) a ibuprofenu ($\gamma = 0,43$) s kodeínom. Tieto zistenia sú podporené dátami uvedenými vyššie a prezentované výsledky sú tak v zhode s klinickým použitím testovaných kombinácií. Navyše doteraz nebola publikovaná žiadna iná práca, ktorá by rigorózne overovala zvýšenú analgetickú účinnosť kombinácie paracetamolu s kodeínom pomocou izobolografickej analýzy.

6.2. Analgetická účinnosť a sérové koncentrácie beta-cyklodextrín-meloxicamu

Podľa výsledkov uvedených v tejto práci dosahuje BCD-meloxicam vyššiu analgetickú účinnosť v porovnaní s nemodifikovaným meloxicamom v dvoch rôznych modeloch bolesti – v modeli tepelnej hyperalgézie pri experimentálne navodenom zápale u potkanov a v modeli akútnej viscerálnej bolesti u myši.

Doteraz bol v rozsiahlej miere posudzovaný analgetický účinok ďalšieho NSA zo skupiny oxikamov, piroxicamu, ktorý má na rozdiel od meloxicamu COX neselektívny mechanizmus účinku. Komplex piroxicamu s beta-cyklodextrínom bol pripravený za účelom zníženia gastrointestinálneho rizika, ktoré je u piroxicamu pomerne značné (Degner, Sigmund et al. 2000). Na preklinickej úrovni bol účinok BCD-piroxicamu u potkanov v troch rôznych modeloch zápalovej bolesti. Zistilo sa, že účinok BCD-piroxicamu na tvorbu granulomatózneho tkaniva, ako aj v modeli experimentálne navodenej artrózy je porovnateľný s účinkom nemodifikovaného piroxicamu. V modeli experimentálnej karagenínom navodenej pleuritídy bola preukázaná dokonca vyššia účinnosť BCD-piroxicamu na mobilizáciu leukocytov, v porovnaní s nemodifikovaným piroxicamom (Amado, Taniguchi et al. 1995). Rovnako na klinickej úrovni bol testovaný analgetický účinok BCD-piroxicamu u pacientov s osteoartrózou pri akútnych bolestiach. Počas päťdňovej liečby bola pozorovaná porovnateľná analgetická účinnosť BCD-piroxicamu a nemodifikovaného piroxicamu s tým, že v prvý deň liečby sa účinok BCD-piroxicamu dostavil skôr. Perorálne podaný BCD-piroxicam bol ďalej porovnávaný s intramuskulárne podaným diklofenakom a ketoprofénom. Efektivita v zmiernení bolesti a rýchlosť nástupu účinku sa u perorálnej formy BCD-piroxicamu ukázala porovnateľná s uvedenými dvoma zástupcami NSA podanými intramuskulárne. Rovnako v porovnaní s metamizolom dosiahol BCD-piroxicam rýchlejší a dlhšie trvajúci účinok pri akútnej bolesti. U pacientov s bolesťami chrbta bola účinnosť BCD-piroxicamu porovnávaná s etodolakom a znovu bol zistený rýchlejší a silnejší účinok BCD-piroxicamu (Reginster and Franchimont 1993).

Prezentované výsledky, podľa ktorých má BCD-meloxicam vyšší analgetický účinok ako nemodifikovaný meloxicam v preklinických modeloch bolesti, sú v súlade s vyššie uvedenými zisteniami o piroxicame. Navyše, pri meloxicame je možné očakávať lepšiu gastrointestinálnu znášanlivosť v porovnaní s piroxicamom, nakoľko má COX-2 preferenčný mechanizmus účinku. Podľa detailnej analýzy využívajúcej techniky spektroskopie a molekulového modelovania poskytuje neutrálna forma meloxicamu s beta-cyklodextrínom stabilný nekovalentný komplex v pomere 1:1 a nedochádza pri tom k deformácii molekuly.

Väzobná konštanta meloxicamu je $114 \pm 15 \text{ mol}^{-1}$ a je porovnateľná s inými látkami s oxikamovou funkčnou skupinou (piroxikam $134 \pm 21 \text{ mol}^{-1}$, tenoxicam $115 \pm 13 \text{ mol}^{-1}$) (Banerjee, Chakraborty et al. 2004). Pri skúšobnej príprave tabliet obsahujúcich meloxicam v komplexe s beta-cyklodextrínom bola zistená dostatočná mechanická odolnosť takýchto tabliet spojená s rýchlejšim uvoľňovaním účinnej látky o 30 %, a to u tabliet pripravených lisovaním, tak aj u tabliet pripravených vlhkou granuláciou. Zároveň bolo u skupiny zdravých dobrovoľníkov zistené zlepšenie farmakokinetických parametrov po perorálnej aplikácii meloxicamu v komplexnej forme, ako aj vyššia biologická dostupnosť (Ghorab, Abdel-Salam et al. 2004).

Týmto údajom zodpovedá rýchlejší nárast hladín meloxicamu v sére u potkanov, ktorým bol podaný v p.o. forme v komplexe s beta-cyklodextrínom, v porovnaní s nemodifikovaným meloxicamom, ako bolo doložené v prezentovaných výsledkoch.

Na základe uvedených výsledkov a ich porovnania s doteraz známymi dátami je možné predpokladať, že opioidy pravdepodobne nepotencujú analgetický účinok COX-2 selektívnych inhibítorov COX, na rozdiel od neselektívnych inhibítorov COX a paracetamolu. Z teoretického hľadiska by mohlo byť zaujímavé nájsť mechanizmus, ktorý spôsobuje túto odlišnosť a ďalej tak prispieť k doterajšiemu konceptu liečby bolesti.

Od komplexu meloxicamu s beta-cyklodextrínom je naopak možné očakávať zvýšený analgetický účinok v porovnaní s nemodifikovaným meloxicamom spoločne so znížením gastrointestinálnej toxicity v porovnaní s piroxikamom po perorálnom podaní. Zároveň je možné očakávať aj rýchlejší nástup účinku a zlepšenú biologickú dostupnosť meloxicamu podaného takýmto spôsobom.

7. ZÁVERY A ZHODNOTENIE CIEĽOV PRÁČE

Oba hlavné ciele dizertácie boli splnené:

Ad 1/ Izobolografickou analýzou v modeli akútnej viscerálnej bolesti (peritoneálneho dráždenia u myší) sme zistili, že kombináciami opioidu (kodeínu) s koxibmi (celekoxibom alebo etorikoxibom) nebolo možné zvýšiť ich analgetickú účinnosť na rozdiel od kombinovania kodeínu s paracetamolom alebo ibuprofénom. Analgetická účinnosť kombinácie kodeínu s celekoxibom bola aditívna, s etorikoxibom dokonca sub-aditívna, zatiaľčo kombinácie kodeínu s ibuprofénom alebo s paracetamolom vykazovali synergnú (supra-aditívnu) analgetickú účinnosť. Synergia bola vyššia u kombinácie kodeínu s paracetamolom, ako u kombinácie kodeínu s ibuprofénom. Hypotéza, že opioid kodeín zvýši analgetickú účinnosť koxibov podobne, ako ju zvyšuje u starších neopioidných analgetík, preto nebola potvrdená.

Toto zistenie je prekvapivé a má teoretický aj praktický význam. Z teoretického hľadiska otvára otázku, prečo nie je možné opioidným pôsobením zosilniť analgetický účinok selektívnych inhibítorov COX-2 na rozdiel od neselektívnych inhibítorov COX alebo paracetamolu. Riešenie tejto otázky by mohlo priniesť nové poznatky o mechanizme analgetického pôsobenia týchto farmák. Praktický význam tohto zistenia spočíva v tom, že opioidmi asi nebude možné zvyšovať analgetickú účinnosť koxibov. To je v súlade s klinickou skúsenosťou, pretože sme nenašli žiadnu publikáciu o vyššej analgetickej účinnosti kombinácie opioidov s koxibmi.

Pre potvrdenie všeobecnejšej platnosti týchto záverov a hodnotení by samozrejme boli nutné ďalšie experimenty s ďalšími opioidmi, koxibmi a na ďalších modeloch bolesti.

Ad 2/ Zistili sme, že komplex meloxicamu s beta-cyklohextrínom má vyššiu analgetickú účinnosť (v modeli tepelnej akútnej bolesti – *plantar* testu u potkanov a v modeli akútnej viscerálnej bolesti – peritoneálneho dráždenia u myší), a lepšiu biologickú dostupnosť (vyššie koncentrácie meloxicamu v krevnom sére u potkanov), ako samotný meloxicam. Bola tak potvrdená hypotéza, predpoklad, že beta-cyklohextrín zvýši analgetickú účinnosť a biologickú dostupnosť meloxicamu podobne, ako ju zvyšuje u staršieho gastrointestinálne rizikovejšieho piroxicamu.

Toto zistenie má predovšetkým praktický význam. Ukazuje, že komplexáciou meloxicamu s beta-cyklohextrínom by bolo možné zvýšiť a urýchliť analgetický účinok

meloxicamu, čo by bolo žiadúce nielen u akútnej bolesti, ale aj všeobecne, pretože meloxicam ako preferenčný inhibítor COX-2 má menšiu mieru gastrointerstinálneho rizika.

8. SÚHRN

Cieľom dizertácie bolo zistiť, či by bolo možné zvýšiť analgetickú účinnosť novších neopioidných analgetík selektívne alebo preferenčne tlmiacich COX-2, a to koxibov alebo meloxicamu (ktoré sú šetrnejšie voči GIT ako staršie nesteroidné antireumatiká-antiflogistiká), kombináciami s ďalšími látkami. Za týmto účelom bolo použitých niekoľko bežne využívaných postupov.

Na základe údajov dostupných v odbornej literatúre boli zvolení dvaja zástupcovia zo skupiny selektívnych inhibítorov cyklooxygenázy-2, celecoxib a etorikoxib, a boli skúmané ich potenciálne interakcie so zástupcom slabých opioidov kodeínom. Analgetický účinok látok samotných a ich kombinácií bol hodnotený pomocou preklinického modelu akútnej viscerálnej bolesti (peritoneálneho dráždenia – „*writhing*“ testu) na myšiach a vzájomné interakcie hodnotené pomocou štatistickej metódy izobolografickej analýzy. Následne boli rovnakými metódami vyhodnotené interakcie paracetamolu a ibuprofenu s kodeínom, teda kombinácie, ktoré sa bežne používajú v klinickej praxi. Zistená bola sub-aditívna interakcia medzi etorikoxibom a kodeínom, zatiaľ čo u kombinácie celecoxibu s kodeínom bola pozorovaná aditivita. Na druhej strane, interakcie paracetamolu aj ibuprofenu s kodeínom boli synergné.

V druhej časti práce bol kladený dôraz na možné zlepšenie farmakologických vlastností meloxicamu po uvedení do komplexu s farmaceutickou pomocnou látkou beta-cyklodextrínom. Beta-cyklodextrín-meloxicam mal v porovnaní s nemodifikovaným meloxicamom výraznejší analgetický účinok v preklinickom modeli tepelnej hyperalgie u potkanov, ako aj v modeli akútnej viscerálnej bolesti u myší. Následne bol pozorovaný aj vyšší nárast koncentrácie meloxicamu v sére u potkanov po perorálnom podaní v komplexnej forme, v porovnaní s nemodifikovanou formou.

Výsledky experimentálnej práce naznačujú, že pravdepodobne nie je možné očakávať potenciáciu analgetického účinku u kombinácií selektívnych inhibítorov cyklooxygenázy-2 s kodeínom, na rozdiel od klinicky bežne využívaných kombinácií kodeínu s neselektívnym inhibítorom cyklooxygenáz ibuprofenom a neopioidným analgetikom-antipyretikom paracetamolom. Na druhej strane sa ukázalo, že meloxicam viazaný v komplexe s beta-cyklodextrínom môže mať zlepšený analgetický účinok, rovnako ako rýchlejší nárast hladín v plazme po perorálnom podaní.

8. ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ AUTORA

Publikácie s impakt faktorom, ktoré sú podkladom dizertácie:

1. Janovský,M., Doležal,T., Procházková,M., Slíva,J., Kršiak,M., Influence on analgesic activity and serum levels after meloxicam complexation with beta-cyclodextrin in mice and rats, *Arzneimittelforschung*, 60 (2010) 320-323.
2. Janovský,M., Kršiak,M., Codeine did not increase analgesic efficacy of coxibs in contrast to that of paracetamol or ibuprofen: isobolographic analysis in mice, *Neuro Endocrinol.Lett.*, 2 (2011) v tlači.

Publikácie s impakt faktorom bez vzťahu k téme dizertácie:

3. Bubenikova-Valesova,V., Kacer,P., Syslova,K., Rambousek,L., Janovsky,M., Schutova,B., Hrubá,L., Slamberova,R., Prenatal metamphetamine exposure affects the mesolimbic dopaminergic system and behavior in adult offspring, *Int.J.Dev.Neurosci.*, 27 (2009) 525-530.

Publikácie bez impakt faktoru v tuzemských recenzovaných časopisoch:

4. Janovský,M., Mikrodialýza v experimentálnom výskume bolesti, *Bolest*, 3 (2005) 151-155.

Ostatné publikácie a oznámenia:

5. Janovsky M., Dolezal T., Kršiak M. (2006): Preclinical testing of beta-cyclodextrin-meloxicam in experimental pain models. *Europ. J. Pain* 10, Suppl. 1,S169.

9. ZOZNAM REFERENCIÍ

1. Abols,I.A. and Basbaum,A.I., Afferent connections of the rostral medulla of the cat: a neural substrate for midbrain-medullary interactions in the modulation of pain, *J.Comp Neurol.*, 201 (1981) 285-297.
2. Ahmadi,S., Lippross,S., Neuhuber,W.L., and Zeilhofer,H.U., PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons, *Nat.Neurosci.*, 5 (2002) 34-40.
3. Allen,G.V. and Pronych,S.P., Trigeminal autonomic pathways involved in nociception-induced reflex cardiovascular responses, *Brain Res.*, 754 (1997) 269-278.
4. Almeida,T.F., Roizenblatt,S., and Tufik,S., Afferent pain pathways: a neuroanatomical review, *Brain Res.*, 1000 (2004) 40-56.
5. Amado,C.A., Taniguchi,S.F., Sudo,L.S., Kimura,E., and Oga,S., Effect of piroxicam beta-cyclodextrin complex on experimental inflammation, *Gen.Pharmacol.*, 26 (1995) 809-813.
6. Amann,R., Schuligoi,R., Lanz,I., and Peskar,B.A., Effect of a 5-lipoxygenase inhibitor on nerve growth factor-induced thermal hyperalgesia in the rat, *Eur.J.Pharmacol.*, 306 (1996) 89-91.
7. Arredondo-Garza,T., Lozano-Cuenca,J., Jimenez-Andrade,M., and Castaneda-Hernandez,G., Additive, but not synergistic antinociceptive effect of codeine and indomethacin combinations in the formalin test in the rat, *Proc.West Pharmacol.Soc.*, 50 (2007) 78-81.
8. Ault,B. and Hildebrand,L.M., L-glutamate activates peripheral nociceptors, *Agents Actions*, 39 Spec No (1993) C142-C144.
9. Banerjee,R., Chakraborty,H., and Sarkar,M., Host-guest complexation of oxycam NSAIDs with beta-cyclodextrin, *Biopolymers*, 75 (2004) 355-365.

10. Barbaro,N.M., Heinricher,M.M., and Fields,H.L., Putative pain modulating neurons in the rostral ventral medulla: reflex-related activity predicts effects of morphine, *Brain Res.*, 366 (1986) 203-210.
11. Baron,J.A., Sandler,R.S., Bresalier,R.S., Lanas,A., Morton,D.G., Riddell,R., Iverson,E.R., and Demets,D.L., Cardiovascular events associated with rofecoxib: final analysis of the APPROVe trial, *Lancet*, 372 (2008) 1756-1764.
12. Barron,D.H. and Matthews,B.H., The interpretation of potential changes in the spinal cord, *J.Physiol*, 92 (1938) 276-321.
13. Basbaum,A.I. and Fields,H.L., The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: further studies on the anatomy of pain modulation, *J.Comp Neurol.*, 187 (1979) 513-531.
14. Behbehani,M.M. and Fields,H.L., Evidence that an excitatory connection between the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia, *Brain Res.*, 170 (1979) 85-93.
15. Berkley,K.J. and Hubscher,C.H., Are there separate central nervous system pathways for touch and pain?, *Nat.Med.*, 1 (1995) 766-773.
16. Besson,J.M. and Chaouch,A., Peripheral and spinal mechanisms of nociception, *Physiol Rev.*, 67 (1987) 67-186.
17. Bester,H., Chapman,V., Besson,J.M., and Bernard,J.F., Physiological properties of the lamina I spinoparabrachial neurons in the rat, *J.Neurophysiol.*, 83 (2000) 2239-2259.
18. Bland-Ward,P.A. and Humphrey,P.P., P2X receptors mediate ATP-induced primary nociceptive neurone activation, *J.Auton.Nerv.Syst.*, 81 (2000) 146-151.
19. Bloch,B., Smythe,E., and Weeks,R., Analgesics for pain relief after gynaecological surgery. A two-phase study, *S.Afr.Med.J.*, 67 (1985) 325-329.
20. Boess,F.G. and Martin,I.L., Molecular biology of 5-HT receptors, *Neuropharmacology*, 33 (1994) 275-317.

21. Brain,S.D. and Cambridge,H., Calcitonin gene-related peptide: vasoactive effects and potential therapeutic role, *Gen.Pharmacol.*, 27 (1996) 607-611.
22. Braz,J.M., Enquist,L.W., and Basbaum,A.I., Inputs to serotonergic neurons revealed by conditional viral transneuronal tracing, *J.Comp Neurol.*, 514 (2009) 145-160.
23. Cannon,C.P., Curtis,S.P., Fitzgerald,G.A., Krum,H., Kaur,A., Bolognese,J.A., Reicin,A.S., Bombardier,C., Weinblatt,M.E., van der,H.D., Erdmann,E., and Laine,L., Cardiovascular outcomes with etoricoxib and diclofenac in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis in the Multinational Etoricoxib and Diclofenac Arthritis Long-term (MEDAL) programme: a randomised comparison, *Lancet*, 368 (2006) 1771-1781.
24. Castro-Alamancos,M.A., Short-term plasticity in thalamocortical pathways: cellular mechanisms and functional roles, *Rev.Neurosci.*, 8 (1997) 95-116.
25. Cervero,F., Visceral pain: mechanisms of peripheral and central sensitization, *Ann.Med.*, 27 (1995) 235-239.
26. Chaudhary,A. and Gupta,R.L., Double blind, randomised, parallel, prospective, comparative, clinical evaluation of a combination of antispasmodic analgesic Diclofenac + Pitofenone + Fempiverinium (Manyana vs Analgin + Pitofenone + Fempiverinium (Baralgan) in biliary, ureteric and intestinal colic, *J.Indian Med.Assoc.*, 97 (1999) 244-245.
27. Clementi,E. and Meldolesi,J., The cross-talk between nitric oxide and Ca²⁺: a story with a complex past and a promising future, *Trends Pharmacol.Sci.*, 18 (1997) 266-269.
28. Clements,J.R., Beitz,A.J., Fletcher,T.F., and Mullett,M.A., Immunocytochemical localization of serotonin in the rat periaqueductal gray: a quantitative light and electron microscopic study, *J.Comp Neurol.*, 236 (1985) 60-70.
29. Coghill,R.C., Talbot,J.D., Evans,A.C., Meyer,E., Gjedde,A., Bushnell,M.C., and Duncan,G.H., Distributed processing of pain and vibration by the human brain, *J.Neurosci.*, 14 (1994) 4095-4108.

30. Collier,H.O., Dinneen,L.C., Johnson,C.A., and Schneider,C., The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse, *Br.J.Pharmacol.Chemother.*, 32 (1968) 295-310.
31. Conn,P.J. and Pin,J.P., Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors, *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 37 (1997) 205-237.
32. Cumberbatch,M.J., Herrero,J.F., and Headley,P.M., Exposure of rat spinal neurones to NMDA, AMPA and kainate produces only short-term enhancements of responses to noxious and non-noxious stimuli, *Neurosci.Lett.*, 181 (1994) 98-102.
33. Deciga-Campos,M., Lopez,U.G., Reval,M.I., and Lopez-Munoz,F.J., Enhancement of antinociception by co-administration of an opioid drug (morphine) and a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor (rofecoxib) in rats, *Eur.J.Pharmacol.*, 460 (2003) 99-107.
34. Degner,F., Sigmund,R., and Zeidler,H., Efficacy and tolerability of meloxicam in an observational, controlled cohort study in patients with rheumatic disease, *Clin.Ther.*, 22 (2000) 400-410.
35. Ding,Y.Q., Takada,M., Shigemoto,R., and Mizumo,N., Spinoparabrachial tract neurons showing substance P receptor-like immunoreactivity in the lumbar spinal cord of the rat, *Brain Res.*, 674 (1995) 336-340.
36. Dolezal,T. and Krsiak,M., Augmentation of analgesic effect of ibuprofen by alprazolam in experimental model of pain, *Physiol Res.*, 51 (2002a) 179-184.
37. Dolezal,T. and Krsiak,M., Guaifenesin enhances the analgesic potency of paracetamol in mice, *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, 366 (2002b) 551-554.
38. Dubner,R. and Bennett,G.J., Spinal and trigeminal mechanisms of nociception, *Annu.Rev.Neurosci.*, 6 (1983) 381-418.
39. Dubner,R., Kenshalo,D.R., Jr., Maixner,W., Bushnell,M.C., and Oliveras,J.L., The correlation of monkey medullary dorsal horn neuronal activity and the perceived intensity of noxious heat stimuli, *J.Neurophysiol.*, 62 (1989) 450-457.

40. Dudhgaonkar,S.P., Tandan,S.K., Kumar,D., Arunadevi,R., and Prakash,V.R., Synergistic interaction between meloxicam and aminoguanidine in formalin-induced nociception in mice, *Eur.J.Pain*, 12 (2008) 321-328.
41. Duggan,A.W., Hope,P.J., Jarrott,B., Schaible,H.G., and Fleetwood-Walker,S.M., Release, spread and persistence of immunoreactive neurokinin A in the dorsal horn of the cat following noxious cutaneous stimulation. Studies with antibody microprobes, *Neuroscience*, 35 (1990) 195-202.
42. Dumuis,A., Sebben,M., Haynes,L., Pin,J.P., and Bockaert,J., NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons, *Nature*, 336 (1988) 68-70.
43. Edwards,J.E., McQuay,H.J., and Moore,R.A., Combination analgesic efficacy: individual patient data meta-analysis of single-dose oral tramadol plus acetaminophen in acute postoperative pain, *J.Pain Symptom.Manage.*, 23 (2002) 121-130.
44. Fields,H.L., Heinricher,M.M., and Mason,P., Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits, *Annu.Rev.Neurosci.*, 14 (1991) 219-245.
45. Filitz,J., Ihmsen,H., Gunther,W., Troster,A., Schwilden,H., Schuttler,J., and Koppert,W., Supra-additive effects of tramadol and acetaminophen in a human pain model, *Pain*, 136 (2008) 262-270.
46. Finney,D.J., The analysis of toxicity tests on mixtures of poisons, *Ann.Appl.Biol.*, (1942) 82-94.
47. Franz,D.N. and Iggo,A., Dorsal root potentials and ventral root reflexes evoked by nonmyelinated fibers, *Science*, 162 (1968) 1140-1142.
48. Garcia-Hernandez,L., Deciga-Campos,M., Guevara-Lopez,U., and Lopez-Munoz,F.J., Co-administration of rofecoxib and tramadol results in additive or sub-additive interaction during arthritic nociception in rat, *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 87 (2007) 331-340.

49. Gaskell,H., Derry,S., Moore,R.A., and McQuay,H.J., Single dose oral oxycodone and oxycodone plus paracetamol (acetaminophen) for acute postoperative pain in adults, *Cochrane.Database Syst.Rev.*, (2009) CD002763.
50. Gebhart,G.F., Visceral nociception: consequences, modulation and the future, *Eur.J.Anaesthesiol.Suppl*, 10 (1995) 24-27.
51. Ghorab,M.M., Abdel-Salam,H.M., El Sayad,M.A., and Mekhel,M.M., Tablet formulation containing meloxicam and beta-cyclodextrin: mechanical characterization and bioavailability evaluation, *AAPS.PharmSciTech.*, 5 (2004) e59.
52. Gladding,P.A., Webster,M.W., Farrell,H.B., Zeng,I.S., Park,R., and Ruijne,N., The antiplatelet effect of six non-steroidal anti-inflammatory drugs and their pharmacodynamic interaction with aspirin in healthy volunteers, *Am.J.Cardiol.*, 101 (2008) 1060-1063.
53. Graham,G.G. and Scott,K.F., Mechanism of action of paracetamol, *Am.J.Ther.*, 12 (2005) 46-55.
54. Guindon,J., LoVerme,J., De Lean,A., Piomelli,D., and Beaulieu,P., Synergistic antinociceptive effects of anandamide, an endocannabinoid, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peripheral tissue: a role for endogenous fatty-acid ethanolamides?, *Eur.J.Pharmacol.*, 550 (2006) 68-77.
55. Hargreaves,K., Dubner,R., Brown,F., Flores,C., and Joris,J., A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia, *Pain*, 32 (1988) 77-88.
56. Hasanein,P., The endocannabinoid transport inhibitor AM404 modulates nociception in cholestasis, *Neurosci.Lett.*, 462 (2009) 230-234.
57. Hayashi,Y., Sekiyama,N., Nakanishi,S., Jane,D.E., Sunter,D.C., Birse,E.F., Udvarhelyi,P.M., and Watkins,J.C., Analysis of agonist and antagonist activities of phenylglycine derivatives for different cloned metabotropic glutamate receptor subtypes, *J.Neurosci.*, 14 (1994) 3370-3377.

58. Hersh,E.V. and Moore,P.A., Drug interactions in dentistry: the importance of knowing your CYPs, *J.Am.Dent.Assoc.*, 135 (2004) 298-311.
59. Hylden,J.L. and Wilcox,G.L., Intrathecal substance P elicits a caudally-directed biting and scratching behavior in mice, *Brain Res.*, 217 (1981) 212-215.
60. Jiang,M., Chandler,S.D., Ennis,M., Shipley,M.T., and Behbehani,M.M., Actions of epinephrine on neurons in the rat midbrain periaqueductal gray maintained in vitro, *Brain Res.Bull.*, 29 (1992) 871-877.
61. Jimenez-Andrade,J.M., Ortiz,M.I., Perez-Urizar,J., Aguirre-Banuelos,P., Granados-Soto,V., and Castaneda-Hernandez,G., Synergistic effects between codeine and diclofenac after local, spinal and systemic administration, *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 76 (2003) 463-471.
62. Jones,C.K., Peters,S.C., and Shannon,H.E., Synergistic interactions between the dual serotonergic, noradrenergic reuptake inhibitor duloxetine and the non-steroidal anti-inflammatory drug ibuprofen in inflammatory pain in rodents, *Eur.J.Pain*, 11 (2007) 208-215.
63. Jug,M., Becirevic-Lacan,M., Kwokal,A., and Cetina-Cizmek,B., Influence of cyclodextrin complexation on piroxicam gel formulations, *Acta Pharm.*, 55 (2005) 223-236.
64. Kakidani,H., Furutani,Y., Takahashi,H., Noda,M., Morimoto,Y., Hirose,T., Asai,M., Inayama,S., Nakanishi,S., and Numa,S., Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor, *Nature*, 298 (1982) 245-249.
65. Keller,O., Vyklický,L., Význam vrátkové teorie bolesti v hledání nervových mechanismů bolesti. In: R.Rokyta, M.Kršiak, and J.Kozák (Eds.), *Bolest. Tigis,s.r.o.*, 2006, pp. 63-66.
66. Kopp,N., Denoroy,L., Renaud,B., Pujol,J.F., Tabib,A., and Tommasi,M., Distribution of adrenaline-synthesizing enzyme activity in the human brain, *J.Neurol.Sci.*, 41 (1979) 397-409.

67. Kršiak,M., Doležal,T., Lejčko,J., Neopioidní analgetika. In: R.Rokyta, M.Kršiak, and J.Kozák (Eds.), *Bolest. Tígis*, 2006, pp. 109-118.
68. Kršiak,M., Lejčko,J., Doležal,T., Opioidní analgetika. In: R.Rokyta, M.Kršiak, and J.Kozák (Eds.), *Bolest. Tígis*, 2006, pp. 121-134.
69. Kurumbail,R.G., Stevens,A.M., Gierse,J.K., McDonald,J.J., Stegeman,R.A., Pak,J.Y., Gildehaus,D., Miyashiro,J.M., Penning,T.D., Seibert,K., Isakson,P.C., and Stallings,W.C., Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents, *Nature*, 384 (1996) 644-648.
70. Lanas,A., A review of the gastrointestinal safety data--a gastroenterologist's perspective, *Rheumatology.(Oxford)*, 49 Suppl 2 (2010) ii3-10.
71. Laska,E.M., Sunshine,A., Mueller,F., Elvers,W.B., Siegel,C., and Rubin,A., Caffeine as an analgesic adjuvant, *JAMA*, 251 (1984) 1711-1718.
72. Laska,E.M., Sunshine,A., Zigelboim,I., Roure,C., Marrero,I., Wanderling,J., and Olson,N., Effect of caffeine on acetaminophen analgesia, *Clin.Pharmacol.Ther.*, 33 (1983) 498-509.
73. Lee,C.R. and Balfour,J.A., Piroxicam-beta-cyclodextrin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in rheumatic diseases and pain states, *Drugs*, 48 (1994) 907-929.
74. Lembeck,F., Folkers,K., and Donnerer,J., Analgesic effect of antagonists of substance P, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 103 (1981) 1318-1321.
75. Leung,A.T., Malmstrom,K., Gallacher,A.E., Sarembock,B., Poor,G., Beaulieu,A., Castro,R., Sanchez,M., Detora,L.M., and Ng,J., Efficacy and tolerability profile of etoricoxib in patients with osteoarthritis: A randomized, double-blind, placebo and active-comparator controlled 12-week efficacy trial, *Curr.Med.Res.Opin.*, 18 (2002) 49-58.
76. Liebeskind,J.C., Guilbaud,G., Besson,J.M., and Oliveras,J.L., Analgesia from electrical stimulation of the periaqueductal gray matter in the cat: behavioral

- observations and inhibitory effects on spinal cord interneurons, *Brain Res.*, 50 (1973) 441-446.
77. Lopez-Munoz,F.J., Diaz-Reval,M.I., Terron,J.A., and Deciga-Campos,M., Analysis of the analgesic interactions between ketorolac and tramadol during arthritic nociception in rat, *Eur.J.Pharmacol.*, 484 (2004) 157-165.
 78. Los Santos,A.R., Zmijanovich,R., Perez,M.S., Marti,M.L., and Di Girolamo,G., Antispasmodic/analgesic associations in primary dysmenorrhea double-blind crossover placebo-controlled clinical trial, *Int.J.Clin.Pharmacol.Res.*, 21 (2001) 21-29.
 79. Ma,W. and Quirion,R., Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain, *Expert.Opin.Ther.Targets.*, 11 (2007) 307-320.
 80. Maione,S., Marabese,I., Rossi,F., Berrino,L., Palazzo,E., and Trabace,L., Effects of persistent nociception on periaqueductal gray glycine release, *Neuroscience*, 97 (2000) 311-316.
 81. Malcangio,M. and Bowery,N.G., GABA and its receptors in the spinal cord, *Trends Pharmacol.Sci.*, 17 (1996) 457-462.
 82. Mardini,I.A. and Fitzgerald,G.A., Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a growing class of anti-inflammatory drugs, *Mol.Interv.*, 1 (2001) 30-38.
 83. Martin,L.J., Blackstone,C.D., Haganir,R.L., and Price,D.L., Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain, *Neuron*, 9 (1992) 259-270.
 84. McQuay,H.J., Carroll,D., Watts,P.G., Juniper,R.P., and Moore,R.A., Codeine 20 mg increases pain relief from ibuprofen 400 mg after third molar surgery. A repeat-dosing comparison of ibuprofen and an ibuprofen-codeine combination, *Pain*, 37 (1989) 7-13.
 85. Melzack,R., Stotler,W.A., and Livingston,W.K., Effects of discrete brainstem lesions in cats on perception of noxious stimulation, *J.Neurophysiol.*, 21 (1958) 353-367.
 86. Melzack,R. and Wall,P.D., Pain mechanisms: a new theory, *Science*, 150 (1965) 971-979.

87. Mendell,L.M. and Wall,P.D., Ppresynaptic hyperpolarization: a role for fine afferent fibres, *J.Physiol*, 172 (1964) 274-294.
88. Menniti-Ippolito,F., Maggini,M., Raschetti,R., Da Cas,R., Traversa,G., and Walker,A.M., Ketorolac use in outpatients and gastrointestinal hospitalization: a comparison with other non-steroidal anti-inflammatory drugs in Italy, *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, 54 (1998) 393-397.
89. Mense,S., Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain, *Pain*, 54 (1993) 241-289.
90. Meunier,J.C., Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor, *Eur.J.Pharmacol.*, 340 (1997) 1-15.
91. Meyer,R.A., Campbell,J.N., Raja,S.N., Peripheral neural mechanisms of nociception. *Textbook of Pain*. Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1994, pp. 13-44.
92. Millan,M.J., The induction of pain: an integrative review, *Prog.Neurobiol.*, 57 (1999) 1-164.
93. Miranda,H.F. and Pinardi,G., Isobolographic analysis of the antinociceptive interactions of clonidine with nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Pharmacol.Res.*, 50 (2004) 273-278.
94. Miranda,H.F., Prieto,J.C., and Pinardi,G., Spinal synergy between nonselective cyclooxygenase inhibitors and morphine antinociception in mice, *Brain Res.*, 1049 (2005) 165-170.
95. Miranda,H.F., Prieto,J.C., Puig,M.M., and Pinardi,G., Isobolographic analysis of multimodal analgesia in an animal model of visceral acute pain, *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 88 (2008) 481-486.
96. Miranda,H.F., Puig,M.M., Dursteler,C., Prieto,J.C., and Pinardi,G., Dexketoprofen-induced antinociception in animal models of acute pain: synergy with morphine and paracetamol, *Neuropharmacology*, 52 (2007) 291-296.

97. Miranda,H.F., Puig,M.M., Prieto,J.C., and Pinardi,G., Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain, *Pain*, 121 (2006) 22-28.
98. Miranda,H.F., Sierralta,F., and Pinardi,G., An isobolographic analysis of the adrenergic modulation of diclofenac antinociception, *Anesth.Analg.*, 93 (2001) 430-5, 4th.
99. Miranda,H.F., Sierralta,F., and Pinardi,G., Carbachol interactions with nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Can.J.Physiol Pharmacol.*, 80 (2002a) 1173-1179.
100. Miranda,H.F., Sierralta,F., and Pinardi,G., Neostigmine interactions with non steroidal anti-inflammatory drugs, *Br.J.Pharmacol.*, 135 (2002b) 1591-1597.
101. Miranda,H.F., Silva,E., and Pinardi,G., Synergy between the antinociceptive effects of morphine and NSAIDs, *Can.J.Physiol Pharmacol.*, 82 (2004) 331-338.
102. Molander,C. and Grant,G., Laminar distribution and somatotopic organization of primary afferent fibers from hindlimb nerves in the dorsal horn. A study by transganglionic transport of horseradish peroxidase in the rat, *Neuroscience*, 19 (1986) 297-312.
103. Moore,A., Collins,S., Carroll,D., and McQuay,H., Paracetamol with and without codeine in acute pain: a quantitative systematic review, *Pain*, 70 (1997) 193-201.
104. Moreau,J.L. and Fields,H.L., Evidence for GABA involvement in midbrain control of medullary neurons that modulate nociceptive transmission, *Brain Res.*, 397 (1986) 37-46.
105. Morgan,M.M., Direct comparison of heat-evoked activity of nociceptive neurons in the dorsal horn with the hindpaw withdrawal reflex in the rat, *J.Neurophysiol.*, 79 (1998) 174-180.
106. Mueller-Lissner,S., Tytgat,G.N., Paulo,L.G., Quigley,E.M., Bubeck,J., Peil,H., and Schaefer,E., Placebo- and paracetamol-controlled study on the efficacy and tolerability of hyoscine butylbromide in the treatment of patients with recurrent crampy abdominal pain, *Aliment.Pharmacol.Ther.*, 23 (2006) 1741-1748.

107. Naidu,N.B., Chowdary,K.P., Murthy,K.V., Satyanarayana,V., Hayman,A.R., and Becket,G., Physicochemical characterization and dissolution properties of meloxicam-cyclodextrin binary systems, *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 35 (2004) 75-86.
108. Nakanishi,S., Inoue,A., Kita,T., Nakamura,M., Chang,A.C., Cohen,S.N., and Numa,S., Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor, *Nature*, 278 (1979) 423-427.
109. Ness,T.J. and Gebhart,G.F., Visceral pain: a review of experimental studies, *Pain*, 41 (1990) 167-234.
110. Neugebauer,V., Lucke,T., and Schaible,H.G., Differential effects of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists on the responses of rat spinal neurons with joint input, *Neurosci.Lett.*, 155 (1993) 29-32.
111. Nicholas,A.P., Pieribone,V.A., Arvidsson,U., and Hokfelt,T., Serotonin-, substance P- and glutamate/aspartate-like immunoreactivities in medullo-spinal pathways of rat and primate, *Neuroscience*, 48 (1992) 545-559.
112. Noda,M., Furutani,Y., Takahashi,H., Toyosato,M., Hirose,T., Inayama,S., Nakanishi,S., and Numa,S., Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin, *Nature*, 295 (1982) 202-206.
113. Oka,T., Hori,T., Hosoi,M., Oka,K., Abe,M., and Kubo,C., Biphasic modulation in the trigeminal nociceptive neuronal responses by the intracerebroventricular prostaglandin E2 may be mediated through different EP receptors subtypes in rats, *Brain Res.*, 771 (1997) 278-284.
114. Ortiz,M.I. and Castaneda-Hernandez,G., Examination of the interaction between peripheral lumiracoxib and opioids on the 1% formalin test in rats, *Eur.J.Pain*, 12 (2008) 233-241.
115. Patrignani,P., Panara,M.R., Greco,A., Fusco,O., Natoli,C., Iacobelli,S., Cipollone,F., Ganci,A., Creminon,C., Maclouf,J., and ., Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases, *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 271 (1994) 1705-1712.

116. Patrono,C., Ciabattoni,G., Pinca,E., Pugliese,F., Castrucci,G., De Salvo,A., Satta,M.A., and Peskar,B.A., Low dose aspirin and inhibition of thromboxane B2 production in healthy subjects, *Thromb.Res.*, 17 (1980) 317-327.
117. Pearson,J., Goldstein,M., and Brandeis,L., Tyrosine hydroxylase immunohistochemistry in human brain, *Brain Res.*, 165 (1979) 333-337.
118. Picazo,A., Castaneda-Hernandez,G., and Ortiz,M.I., Examination of the interaction between peripheral diclofenac and gabapentin on the 5% formalin test in rats, *Life Sci.*, 79 (2006) 2283-2287.
119. Pickering,G., Esteve,V., Loriot,M.A., Eschalier,A., and Dubray,C., Acetaminophen reinforces descending inhibitory pain pathways, *Clin.Pharmacol.Ther.*, 84 (2008) 47-51.
120. Pijak,M.R., Turcani,P., Turcaniova,Z., Buran,I., Gogolak,I., Mihal,A., and Gazdik,F., Efficacy and tolerability of piroxicam-beta-cyclodextrin in the outpatient management of chronic back pain, *Bratisl.Lek.Listy*, 103 (2002) 467-472.
121. Pinardi,G., Prieto,J.C., and Miranda,H.F., Analgesic synergism between intrathecal morphine and cyclooxygenase-2 inhibitors in mice, *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 82 (2005) 120-124.
122. Pinardi,G., Sierralta,F., and Miranda,H.F., Interaction between the antinociceptive effect of ketoprofen and adrenergic modulatory systems, *Inflammation*, 25 (2001) 233-239.
123. Popratiloff,A., Valtchanoff,J.G., Rustioni,A., and Weinberg,R.J., Colocalization of GABA and glycine in the rat dorsal column nuclei, *Brain Res.*, 706 (1996) 308-312.
124. Procházková,M., ZANVIT,P., Doležal,T., Prokešová,L., and Kršiak,M., Increased gene expression and production of spinal cyclooxygenase 1 and 2 during experimental osteoarthritis pain, *Physiol Res.*, 58 (2009) 419-425.
125. Qiu,H.X., Liu,J., Kong,H., Liu,Y., and Mei,X.G., Isobolographic analysis of the antinociceptive interactions between ketoprofen and paracetamol, *Eur.J.Pharmacol.*, 557 (2007) 141-146.

126. Rang,H.P., Dale,M.M., Ritter,J.M., Moore,P.K., Analgesic Drugs. Pharmacology, 5th Edition. Churchill Livingstone, Edinburgh , 2003, pp. 572-584.
127. Reginster, J. Y., Fischer, C. L., and Beualieu, A. Etoricoxib demonstrates similar efficacy and improved gastrointestinal safety compared with naproxen in two 138-week randomized studies of osteoarthritis patients. 2004. Annual European Congress of Rheumatology, Berlin, Germany. 9-6-2004.Ref Type: Conference Proceeding
128. Reginster,J.Y. and Franchimont,P., Piroxicam-beta-cyclodextrin in the treatment of acute pain of rheumatic disease, Eur.J.Rheumatol.Inflamm., 12 (1993) 38-46.
129. Reinscheid,R.K., Nothacker,H.P., Bourson,A., Ardati,A., Henningsen,R.A., Bunzow,J.R., Grandy,D.K., Langen,H., Monsma,F.J., Jr., and Civelli,O., Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor, Science, 270 (1995) 792-794.
130. Rexed,B., The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat, J.Comp Neurol., 96 (1952) 414-495.
131. Reynolds,D.V., Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation, Science, 164 (1969) 444-445.
132. Riendeau,D., Percival,M.D., Brideau,C., Charleson,S., Dube,D., Ethier,D., Falgueyret,J.P., Friesen,R.W., Gordon,R., Greig,G., Guay,J., Mancini,J., Ouellet,M., Wong,E., Xu,L., Boyce,S., Visco,D., Girard,Y., Prasit,P., Zamboni,R., Rodger,I.W., Gresser,M., Ford-Hutchinson,A.W., Young,R.N., and Chan,C.C., Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2, J.Pharmacol.Exp.Ther., 296 (2001) 558-566.
133. Rybar,I., Hlista,M., Masaryk,P., Rovensky,J., Hyrdel,R., and Kriska,M., [Gastroduodenal complications associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs in Slovak Republic: results of one-year prospective study], Vnitr.Lek., 52 (2006) 673-676.
134. Satyanarayana,P.S., Jain,N.K., Singh,A., and Kulkarni,S.K., Isobolographic analysis of interaction between cyclooxygenase inhibitors and tramadol in acetic acid-induced writhing in mice, Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry, 28 (2004a) 641-649.

135. Satyanarayana,P.S., Jain,N.K., Singh,A., and Kulkarni,S.K., Isobolographic analysis of interaction between cyclooxygenase inhibitors and tramadol in acetic acid-induced writhing in mice, *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry*, 28 (2004b) 641-649.
136. Sawynok,J., GABAergic mechanisms of analgesia: an update, *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 26 (1987) 463-474.
137. Schaible,H.G. and Grubb,B.D., Afferent and spinal mechanisms of joint pain, *Pain*, 55 (1993) 5-54.
138. Shek,K.L., Chan,L.N., and Nutescu,E., Warfarin-acetaminophen drug interaction revisited, *Pharmacotherapy*, 19 (1999) 1153-1158.
139. Sher,G.D. and Mitchell,D., Intrathecal N-methyl-D-aspartate induces hyperexcitability in rat dorsal horn convergent neurones, *Neurosci.Lett.*, 119 (1990) 199-202.
140. Shi,T. and Apkarian,A.V., Morphology of thalamocortical neurons projecting to the primary somatosensory cortex and their relationship to spinothalamic terminals in the squirrel monkey, *J.Comp Neurol.*, 361 (1995) 1-24.
141. Silverstein,F.E., Faich,G., Goldstein,J.L., Simon,L.S., Pincus,T., Whelton,A., Makuch,R., Eisen,G., Agrawal,N.M., Stenson,W.F., Burr,A.M., Zhao,W.W., Kent,J.D., Lefkowitz,J.B., Verburg,K.M., and Geis,G.S., Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study, *JAMA*, 284 (2000) 1247-1255.
142. Singh,G., Fort,J.G., Goldstein,J.L., Levy,R.A., Hanrahan,P.S., Bello,A.E., Andrade-Ortega,L., Wallemark,C., Agrawal,N.M., Eisen,G.M., Stenson,W.F., and Triadafilopoulos,G., Celecoxib versus naproxen and diclofenac in osteoarthritis patients: SUCCESS-I Study, *Am.J.Med.*, 119 (2006) 255-266.
143. Singh,P.P., Junnarkar,A.Y., Rao,C.S., Varma,R.K., and Shridhar,D.R., Acetic acid and phenylquinone writhing test: a critical study in mice, *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.*, 5 (1983) 601-606.

144. Singh,V.P., Patil,C.S., and Kulkarni,S.K., Analysis of interaction between etoricoxib and tramadol against mechanical hyperalgesia of spinal cord injury in rats, *Life Sci.*, 78 (2006) 1168-1174.
145. Snaith,A., Pugh,L., Simpson,C.R., and McLay,J.S., The potential for interaction between warfarin and coprescribed medication: a retrospective study in primary care, *Am.J.Cardiovasc.Drugs*, 8 (2008) 207-212.
146. Soukupova,M., Dolezal,T., and Krsiak,M., Synergistic interaction between rilmenidine and ibuprofen in the writhing test in mice, *Neuro.Endocrinol.Lett.*, 30 (2009a) 215-220.
147. Soukupova,M., Dolezal,T., and Krsiak,M., The synergistic interaction between rilmenidine and paracetamol in the writhing test in mice, *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, 379 (2009b) 575-580.
148. Swett,J.E. and Woolf,C.J., The somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord, *J.Comp Neurol.*, 231 (1985) 66-77.
149. Szallasi,A., Cruz,F., and Geppetti,P., TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs?, *Trends Mol.Med.*, 12 (2006) 545-554.
150. Tallarida,R.J., Fixed-ratio design. *Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis*. Chapman & Hall/CRC, 2000a, pp. 58-60.
151. Tallarida,R.J., Linear regression. *Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis*. Chapman & Hall/CRC, 2000b, pp. 26-33.
152. Tallarida,R.J., Test of significance. *Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis*. Chapman & Hall/CRC, 2000c, pp. 60-64.
153. Tallarida,R.J., The need for statistics. *Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis*. Chapman & Hall/CRC, 2000d, pp. 10-13.
154. Tallarida,R.J., Drug synergism: its detection and applications, *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 298 (2001) 865-872.

155. Tallarida,R.J., The interaction index: a measure of drug synergism, *Pain*, 98 (2002) 163-168.
156. Tallarida,R.J., An overview of drug combination analysis with isobolograms, *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 319 (2006) 1-7.
157. Toms,L., Derry,S., Moore,R.A., and McQuay,H.J., Single dose oral paracetamol (acetaminophen) with codeine for postoperative pain in adults, *Cochrane.Database Syst.Rev.*, (2009) CD001547.
158. Travagli,R.A. and Williams,J.T., Endogenous monoamines inhibit glutamate transmission in the spinal trigeminal nucleus of the guinea-pig, *J.Physiol*, 491 (Pt 1) (1996) 177-185.
159. Trevino,D.L. and Carstens,E., Confirmation of the location of spinothalamic neurons in the cat and monkey by the retrograde transport of horseradish peroxidase, *Brain Res.*, 98 (1975) 177-182.
160. Ulugol,A., Ozyigit,F., Yesilyurt,O., and Dogrul,A., The additive antinociceptive interaction between WIN 55,212-2, a cannabinoid agonist, and ketorolac, *Anesth.Analg.*, 102 (2006) 443-447.
161. Urban,M.O., Jiang,M.C., and Gebhart,G.F., Participation of central descending nociceptive facilitatory systems in secondary hyperalgesia produced by mustard oil, *Brain Res.*, 737 (1996) 83-91.
162. Vijaya Kumar,S.G. and Mishra,D.N., Analgesic, antiinflammatory, and ulcerogenic studies of meloxicam solid dispersion prepared with polyethylene glycol 6000, *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.*, 28 (2006) 419-422.
163. Vyklicky,L., Rudomin,P., Zajac,F.E., III, and Burke,R.E., Primary afferent depolarization evoked by a painful stimulus, *Science*, 165 (1969) 184-186.
164. Wang,D., Miller,R., Zheng,J., and Hu,C., Comparative population pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis for piroxicam-beta-cyclodextrin and piroxicam, *J.Clin.Pharmacol.*, 40 (2000) 1257-1266.

165. White,T.D., Downie,J.W., and Leslie,R.A., Characteristics of K⁺- and veratridine-induced release of ATP from synaptosomes prepared from dorsal and ventral spinal cord, *Brain Res.*, 334 (1985) 372-374.
166. Willis,W.D. and Coggeshall,R.E., *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*, 2nd edn. p. 595 , Plenum Press, New York, 1991.
167. Willis,W.D. and Westlund,K.N., Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain, *J.Clin.Neurophysiol.*, 14 (1997) 2-31.
168. Yaksh,T.L., Hua,X.Y., Kalcheva,I., Nozaki-Taguchi,N., and Marsala,M., The spinal biology in humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96 (1999) 7680-7686.
169. Yaksh,T.L. and Rudy,T.A., Narcotic analgesics: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques, *Pain*, 4 (1978) 299-359.
170. Yanagisawa,M. and Otsuka,M., Pharmacological profile of a tachykinin antagonist, spantide, as examined on rat spinal motoneurons, *Br.J.Pharmacol.*, 100 (1990) 711-716.
171. Yang,C.P., Cherng,C.H., Wong,C.S., and Ho,S.T., Effects of intravenous ketorolac and fentanyl combined with midazolam on analgesia and side effects during extracorporeal shock wave lithotripsy, *Acta Anaesthesiol.Sin.*, 40 (2002) 9-12.
172. Yashpal,K. and Henry,J.L., Endorphins mediate overshoot of substance P-induced facilitation of a spinal nociceptive reflex, *Can.J.Physiol Pharmacol.*, 61 (1983) 303-307.
173. Yeziarski,R.P., Gerhart,K.D., Schrock,B.J., and Willis,W.D., A further examination of effects of cortical stimulation on primate spinothalamic tract cells, *J.Neurophysiol.*, 49 (1983) 424-441.
174. Yoon,M.H. and Yaksh,T.L., Evaluation of interaction between gabapentin and ibuprofen on the formalin test in rats, *Anesthesiology*, 91 (1999) 1006-1013.

175. Zhang,D.X., Owens,C.M., and Willis,W.D., Two forms of inhibition of spinothalamic tract neurons produced by stimulation of the periaqueductal gray and the cerebral cortex, *J.Neurophysiol.*, 65 (1991) 1567-1579.
176. Zhuo,M. and Gebhart,G.F., Biphasic modulation of spinal nociceptive transmission from the medullary raphe nuclei in the rat, *J.Neurophysiol.*, 78 (1997) 746-758.
177. Zimmermann,M., Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals, *Pain*, 16 (1983) 109-110.
178. Zvárová,J., Porovnání průměrů. Základy statistiky pro biomedicínské obory I. Karolinum, 2002, pp. 122-129.