УДК 615.453:543.544.5
DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2016.v0.i2.6672

Л. В. Брунь[1], В. І. Маколінець[2]
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ[1], ХАРКІВ
ІНСТИТУТ ПАТОЛОГІЇ ХРЕБТА ТА СУГЛОБІВ ІМЕНІ ПРОФ. М. І. СИТЕНКА[2], ХАРКІВ

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО ІНФРАЧЕРВОНОГО ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА КОНЦЕНТРАЦІЮ ДИКЛОФЕНАКУ НАТРІЮ У ПЛАЗМІ КРОВІ ЩУРІВ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Метою даного дослідження було встановити вплив низькоінтенсивного інфрачервоного лазерного випромінювання (НІЛВ) на концентрацію диклофенаку натрію в експерименті на щурах методом високоефективної рідинної хроматографії.

Для проведення експерименту було використано 15 щурів-самців масою 250–300 г. Тварин поділили на 3 групи. Щурам 1-ї групи вводили per os диклофенак натрію в дозі $ЕД_{50}$ (8 мг/кг маси тіла тварин). Тварини 2-ї групи отримували per os диклофенак натрію (8 мг/кг) та через 15 хв піддавались впливу НІЛВ. Щури 3-ї групи зазнавали впливу НІЛВ, а через 15 хв їм вводили per os диклофенак натрію в дозі 8 мг/кг. Тварин виводили з досліду через 60 хв після введення препарату. Для екстрагування диклофенаку натрію із зразків плазми крові щурів був використаний метод твердофазової екстракції, який ми модифікували з урахуванням мікроконцентрації діючої речовини.

У результаті проведеного дослідження встановлено, що режим лікування тварин у такій послідовності, як вплив НІЛВ та через 15 хв введення per os диклофенаку натрію, є найбільш ефективним. Отримані результати свідчать про те, що сумісне використання НІЛВ та диклофенаку натрію посилює дію препарату. Це дозволить знизити дозу, впливати на надходження та тривалість дії в організмі, а також зменшити частоту приймання препарату.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **остеоартроз, нестероїдні протизапальні препарати, диклофенак натрію, глюкозамін, низькоінтенсивне інфрачервоне лазерне випромінювання, високоефективна рідинна хроматографія.**

ВСТУП. Всесвітня організація охорони здоров'я проголосила перше десятиліття XXI ст. Декадою кісток і суглобів. Остеоартроз є лідером за поширеністю серед захворювань кістково-м'язової системи (КМС). Від нього страждає не менше 20 % населення земної кулі. Тому лікування остеоартрозу залишається одним із найбільш складних завдань медицини, клінічної медицини та фармації [9].

Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) займають одне з центральних місць у терапії захворювань КМС. Найбільш широко використовують у сучасній медицині та фармації диклофенак натрію (ДNa), який залишається еталонним препаратом групи НПЗП [5, 6, 9].

Увагу дослідників привертає використання як методу лікування низькоінтенсивного інфрачервоного лазерного випромінювання (НІЛВ), що володіє знеболювальним, протизапальним, анальгетичним, регенерувальним, десенсибілізувальним, імунокорегувальним, гіпохолестеринемічним, бактерицидним та бактеріостатичним ефектами, а також покращує місцевий кровообіг [3, 7].

Таким чином, можливість комбінованого використання НІЛВ та НПЗП для лікування КМС з метою впливу на різні ланцюги патогенезу є актуальним і обґрунтованим завданням та дозволить покращити результати лікування хворих.

Метою роботи було дослідити вплив НІЛВ на концентрацію ДNa в плазмі крові щурів методом високоефективної рідинної хроматографії.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Диклофенак натрію – натрію 2-[(2,6 – дихлорфеніл) аміно]

© Л. В. Брунь, В. І. Маколінець, 2016.

феніл] ацетат – володіє виразною протизапальною, анальгетичною, а також помірно виразною жарознижувальною активністю [3, 4]. Для проведення дослідження використовували субстанцію ДNa виробництва Борщагівського хіміко-фармацевтичного заводу (БХФЗ) (серія № 20040609). Як робочий стандартний зразок (РСЗ) застосовували субстанцію ДNa виробництва фірми "Amoli Organics Ltd" (серія № 20061013).

Експериментальне дослідження проведено на базі експериментально-біологічної клініки Державної установи "Інститут патології хребта та суглобів імені проф. М. І. Ситенка НАМН України". Тварини, яких використовували в експерименті, – нелінійні білі щури популяції експериментально-біологічної клініки ДУ "ІПХС імені проф. М. І. Ситенка НАМН України".

Для проведення експерименту було відібрано 15 щурів-самців масою 250–300 г, яких утримували згідно із санітарними нормами на стандартному раціоні [4]. Роботу з тваринами проводили відповідно до Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 EU при експериментах на тваринах.

НІЛВ проводили за допомогою лазерного терапевтичного апарата "Мустанг" в умовах режиму: довжина хвилі – 0,89 мкм, імпульсна потужність – 7–8 Вт, імпульсна частота – 3000 Гц, тривалість сеансу – 3 хв 42 с, доза опромінення – 0,3 Дж (розрахована фахівцями ННЦ "Інститут метрології"). Апарат застосовували контактно по задній поверхні колінного суглоба щура, звільненого від шерсті.

Час використання НІЛВ було встановлено при дослідженні фармакокінетики ДNa в плазмі крові щурів методом високоефективної рідинної хроматографії на попередніх етапах експерименту. Першу концентрацію ДNa визначено через 15 хв після введення препарату [2].

Тварин було поділено на 3 групи по 5 щурів у кожній. Щурам 1-ї групи вводили per os ДNa в дозі $ЕД_{50}$ (8 мг/кг маси тіла тварин) [4]. Тварини 2-ї групи отримували per os ДNa в дозі 8 мг/кг та через 15 хв піддавались впливу НІЛВ. Щури 3-ї групи зазнавали впливу НІЛВ, а через 15 хв їм вводили per os ДNa в дозі 8 мг/кг. Тварин виводили з досліду через 60 хв після введення препарату.

Кров відбирали в кількості 7–10 мл у маркувальні пробірки, які були гепаровані. Зразки крові центрифугували (3000 об./хв, 15 хв), отримували плазму крові. Проміжок між забором проби крові та її обробкою не перевищував 5 хв.

До аналізу плазми проби зберігали при температурі – 80 °С.

Для екстрагування ДNa із зразків плазми крові щурів був використаний метод твердофазової екстракції [12]. Метод ми модифікували з урахуванням мікроконцентрації діючої речовини на попередніх етапах комплексного дослідження [1].

Кількісне визначення ДNa у плазмі крові щурів проводили найбільш високочутливим методом високоефективної рідинної хроматографії [10–12]. Цей метод було використано для встановлення концентрацій ДNa на всіх етапах дослідження.

Статистичну обробку одержаних експериментальних даних проводили за допомогою програми STATISTICA (StatSoft Inc., США). Вірогідність отриманих результатів оцінювали на рівні значущості не менше 95 % ($p \leq 0,05$) [8].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Визначення кількісного вмісту ДNa виробництва БХФЗ у плазмі крові щурів проводили відносно РСЗ ДNa виробництва фірми "Amoli Organics Ltd".

Типові хроматограми випробовуваних розчинів та розчинів порівняння представлено на рисунках 1–3.

Встановлено, що концентрація ДNa в плазмі крові щурів 1-ї групи, яким вводили per os ДNa (8 мг/кг), складала від 1,62 до 3,90 мкг/мл.

Концентрація ДNa в плазмі крові тварин 2-ї групи, яким вводили per os ДNa (8 мг/кг) та через 15 хв піддавали впливу НІЛВ, становила від 1,77 до 3,18 мкг/мл.

Концентрація ДNa в плазмі крові щурів 3-ї групи, які зазнавали впливу НІЛВ, а через 15 хв їм вводили per os ДNa (8 мг/кг), складала від 2,59 до 4,06 мкг/мл.

Таким чином, визначено концентрацію ДNa у зразках плазми крові щурів при різних схемах лікування. У результаті проведеного дослідження встановлено, що концентрація ДNa в плазмі крові щурів 3-ї групи більша, ніж у 1-й та 2-й.

При такому режимі лікування тварин, як введення per os ДNa (8 мг/кг) та через 15 хв вплив НІЛВ (2-га група), концентрація препарату щодо групи щурів, яким вводили per os ДNa (1-ша група), практично не відрізнялась. Це свідчить про ефективність даного режиму лікування на рівні показників лікування ДNa.

При такому режимі лікування тварин, як вплив НІЛВ та через 15 хв введення per os ДNa (3-тя група), концентрація препарату щодо групи щурів, яким вводили per os ДNa (1-ша група), відрізнялась в 1,7 раза, а стосовно режиму лікування при введенні per os ДNa та через 15 хв НІЛВ (2-га група) – в 1,8 раза. Це свідчить про високу ефективність даного режиму лікування.

Встановлено, що режим лікування тварин у такій послідовності, як вплив НІЛВ та через 15 хв введення per os ДNa, є найбільш ефективним.

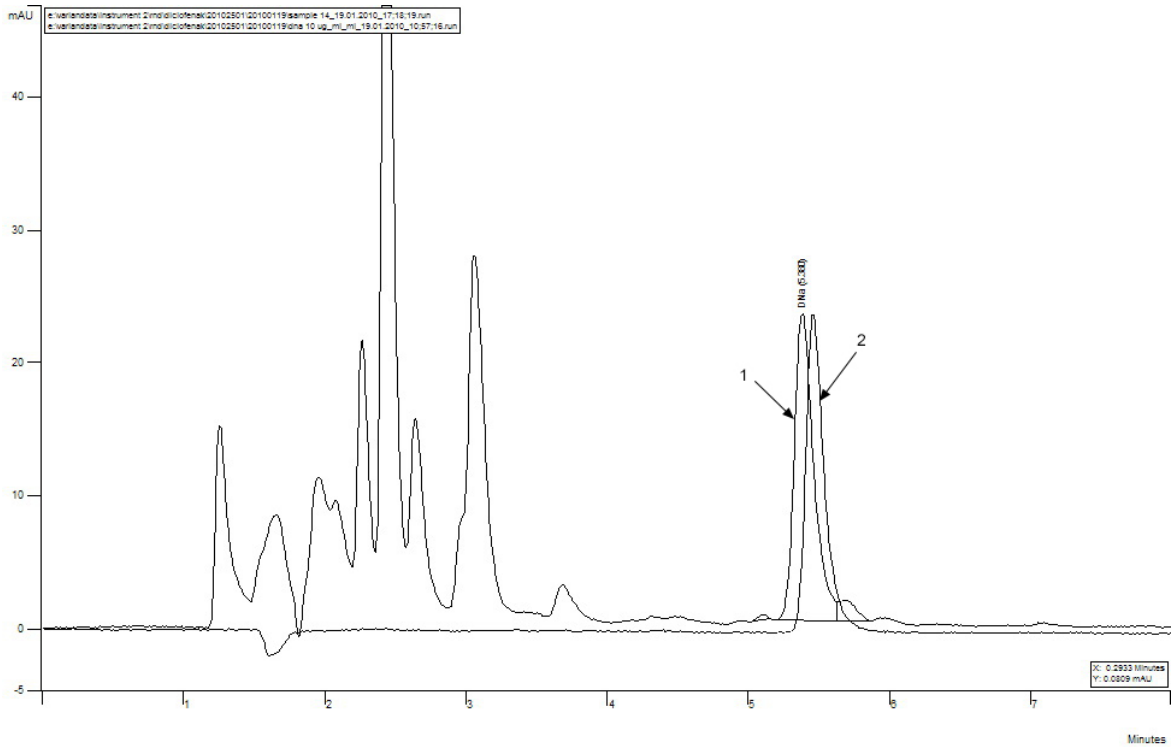

Рис. 1. Хроматограми розчину порівняння та випробовуваного розчину з плазми крові щурів, які отримували per os ДNa: 1 – хроматограма розчину порівняння; 2 – хроматограма випробовуваного розчину з плазми крові щурів, які отримували per os ДNa.

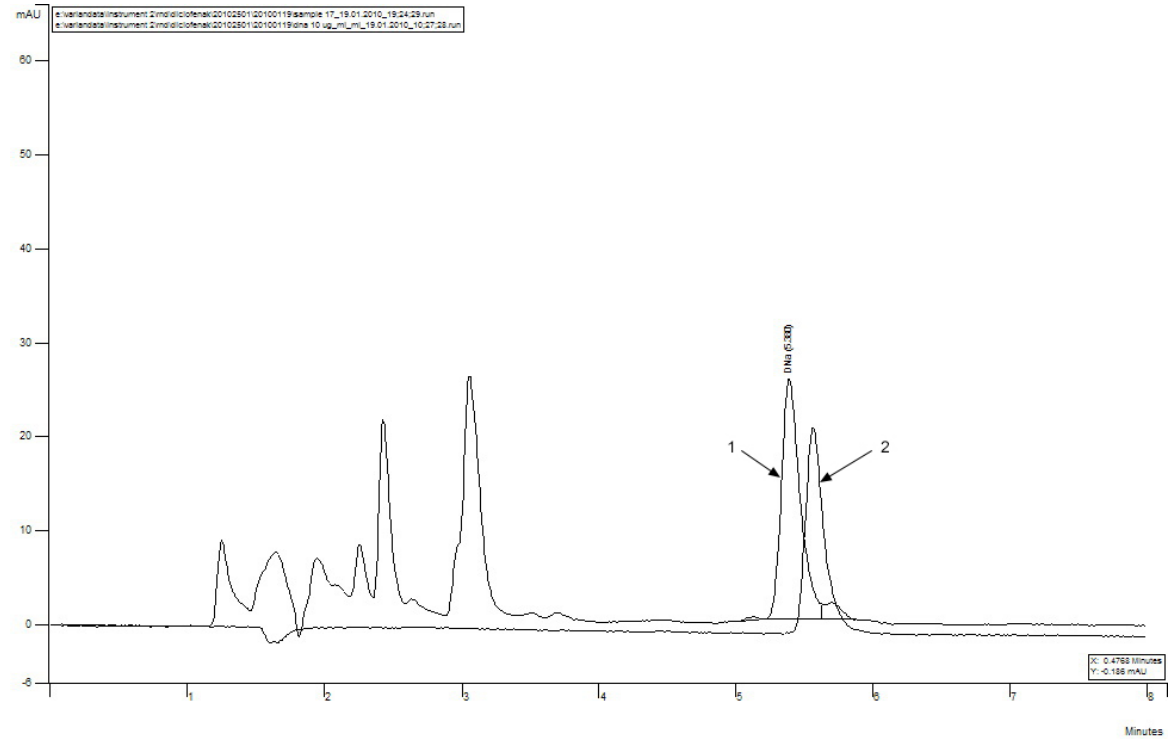

Рис. 2. Хроматограми розчину порівняння та випробовуваного розчину з плазми крові щурів, які отримували per os ДNa та через 15 хв піддавались впливу НІЛВ: 1 – хроматограма розчину порівняння; 2 – хроматограма випробовуваного розчину з плазми крові щурів, які отримували per os ДNa та через 15 хв піддавалась впливу НІЛВ.

Отримані результати свідчать про те, що сумісне використання НІЛВ та диклофенаку натрію посилює дію препарату. Це дозволить знизити дозу, впливати на надходження та тривалість дії в організмі, а також зменшити частоту приймання препарату.

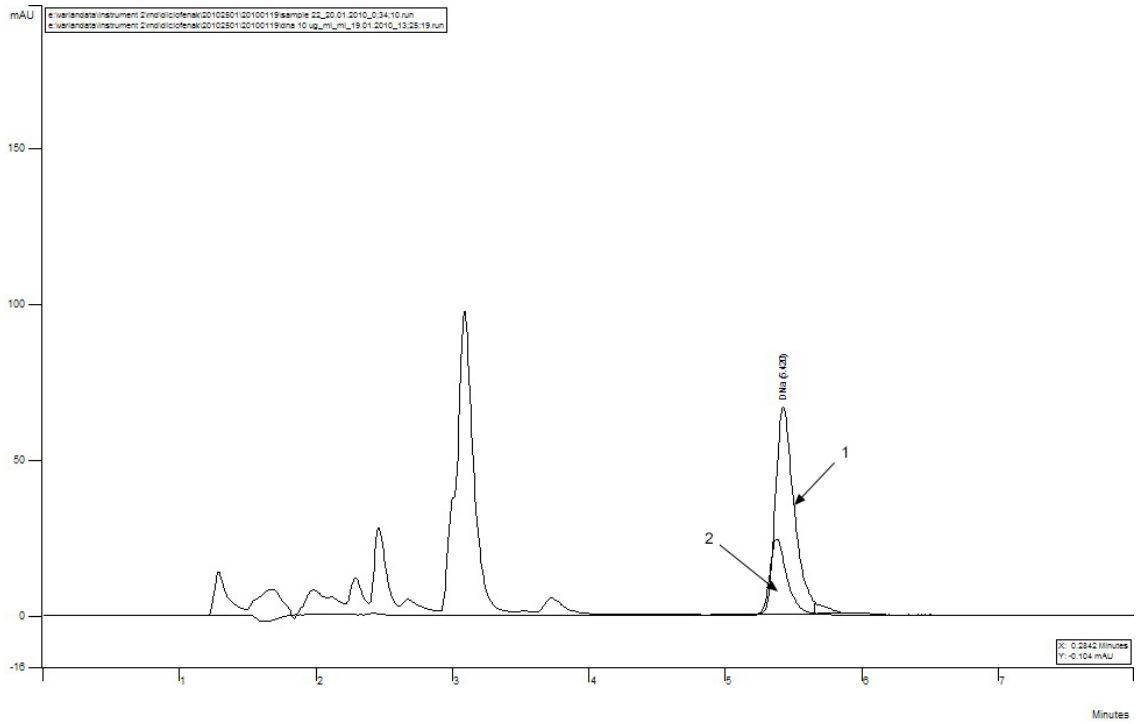

Рис. 3. Хроматограми розчину порівняння та випробовуваного розчину з плазми крові щурів, які зазнавали впливу НІЛВ та через 15 хв отримували per os ДNa: 1 – хроматограма розчину порівняння; 2 – хроматограма випробовуваного розчину з плазми крові щурів, які зазнавали впливу НІЛВ та через 15 хв отримували per os ДNa.

ВИСНОВОК. У результаті проведеного дослідження встановлено вплив НІЛВ на концентрацію ДNa в плазмі крові щурів методом високоефективної рідинної хроматографії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Брунь Л. В. Розробка методики кількісного визначення диклофенаку натрію в плазмі крові щурів методом високоефективної рідинної хроматографії з урахуванням особливостей аналізу мікроконцентрації діючої речовини / Л. В. Брунь, С. М. Губарь // Укр. біофармац. журн. – 2016. – № 3 (44). – С. 54–59.

2. Брунь Л. В. Дослідження фармакокінетики диклофенаку натрію у плазмі крові щурів методом високоефективної рідинної хроматографії / Л. В. Брунь, В. І. Маколінець, С. М. Губарь // Укр. біофармац. журн. – 2016. – № 4 (45). – С. 50–55.

3. Буйлин В. А. Низкоинтенсивная лазерная терапия заболеваний суставов / В. А. Буйлин. – М. : ТОО “Фирма Техника”, 1996. – 25 с.

4. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. О. В. Сефанова. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.

5. Клиническая фармакология и фармакотерапия : монография / [С. В. Налетов, Т. Д. Бахтеева, В. Н. Казаков и др.] ; под ред. С. В. Налетова. – Севастополь : Вебер, 2005. – 672 с.

6. Компендиум 2015 – лекарственные препараты / под ред. В. Н. Коваленко, А. П. Викторова. – К. : Морион, 2015. – 2320 с.

7. Лазеры в клинической медицине : руководство для врачей / под ред. С. Д. Плетнева. – М. : Медицина, 1996. – 432 с.

8. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2000. – 320 с.

9. Остеоартроз: консервативная терапия : монография / [Н. А. Корж, А. Н. Хвисюк, Н. В. Дедух и др.] ; под ред. Н. А. Коржа, Н. В. Дедух, И. А. Зупанца. – Харьков : Золотые страницы, 2007. – 424 с.

10. Brunner L. A. An automated method for the determination of diclofenac sodium in human plasma / L. A. Brunner, R. S. Luders // J. Chromatogr. Sci. – 1991. – **29**, № 7. – P. 287–291.

11. Kamath B. V. High-perfomance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac in human plasma and urine / B. V. Kamath, K. Shivram, A. C. Shah // J. Chromatogr. – 1993. – **12**, № 3. – P. 324–329.

12. United States Pharmacopea / Official Monographs. – 1995. – P. 546.

Л. В. Брунь[1], В. И. Маколинец[2]
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ[1], ХАРЬКОВ
ИНСТИТУТ ПАТОЛОГИИ ПОЗВОНОЧНИКА И СУСТАВОВ ИМЕНИ ПРОФ. М. И. СИТЕНКА[2], ХАРЬКОВ

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ИНФРАКРАСНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ДИКЛОФЕНАКА НАТРИЯ В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Резюме

Целью данного исследования было установить влияние низкоинтенсивного инфракрасного лазерного излучения (НИЛИ) на концентрацию диклофенака натрия в эксперименте на крысах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для проведения эксперимента было использовано 15 крыс-самцов массой 250–300 г. Животных разделили на 3 группы. Крысам 1-й группы вводили per os диклофенак натрия в дозе $ЕД_{50}$ (8 мг/кг массы тела животных). Животные 2-й группы получали per os диклофенак натрия (8 мг/кг) и через 15 мин подвергались влиянию НИЛИ. Крысы 3-й группы подвергались влиянию НИЛИ, а через 15 мин им вводили per os диклофенак натрия в дозе 8 мг/кг. Животных выводили из эксперимента через 60 мин после введения препарата. Для экстрагирования диклофенака натрия из образцов плазмы крови крыс был использован метод твердофазовой экстракции, который мы модифицировали с учетом микроконцентрации действующего вещества.

В результате проведенного исследования установлено, что режим лечения животных в такой последовательности, как влияние НИЛИ и через 15 мин введение per os диклофенака натрия, является наиболее эффективным. Полученные результаты свидетельствуют о том, что совместное использование НИЛИ и диклофенака натрия усиливает действие препарата. Это позволит снизить дозу, влиять на поступление и продолжительность действия в организме, а также уменьшить частоту приема препарата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **остеоартроз, нестероидные противовоспалительные препараты, диклофенак натрия, глюкозамин, низкоинтенсивное инфракрасное лазерное излучение, высокоэффективная жидкостная хроматография.**

L.V. Brun[1], V. I. Makolinets[2]
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY[1], KHARKIV
PROF. M. SYTENKO INSTITUTE OF SPINE AND JOINT PATHOLOGY[2], KHARKIV

STUDY OF THE INFLUENCE OF LOW-INTENSITY INFRARED LASER RADIATION ON CONCENTRATION OF DICLOFENAC SODIUM IN RATS' PLASMA BY THE METHOD OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Summary

The aim of this study is to determine the influence of low-intensity infrared laser radiation (LIIRLR) on concentration of diclofenac sodium in the experiment on rats by the method of high-performance liquid chromatography.

For study conduct, a total of 15 male rats with body weight of 250–300 g were used. Experimental animals were subdivided into 3 groups. Animals of group 1 received diclofenac sodium per os at the dose of ED_{50} (8 mg/kg of animal body weight). Animals of group 2 received diclofenac sodium per os (8 mg/kg) and in 15 min were exposed to LIIRLR. Animals of group 3 were exposed to LIIRLR and in 15 min received diclofenac sodium per os at the dose of 8 mg/kg. Animals were sacrificed in 60 min after drug administration. For extraction of diclofenac sodium from rat plasma samples, we used a method of solid-phase extraction, which had been modified due to micro-concentrations of the active substance.

In the result of the studies conducted, it has been determined that therapy regimen with the following sequence is the most efficient in the animals studied: exposure of LIIRLR and administration per os of diclofenac sodium in 15 min. The results obtained indicate to the fact that concomitant use of LIIRLR potentiates diclofenac sodium. It will allow to decrease the dose, influence on its entry and duration of its action in the organism, as well as to decrease the frequency of drug administration.

KEY WORDS: **osteoarthrosis, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, diclofenac sodium, glucosamine, low-intensity infrared laser radiation, high-performance liquid chromatography.**

Отримано 19.04.16

Адреса для листування: *Л. В. Брунь, Національний фармацевтичний університет, вул. Блюхера, 4, Харків, 61146, Україна.*