

УДК [615.276:615.453.42]:57.084.1

О.С. ПОПОВ, С.К. ШЕБЕКО, к. фарм.н., доцент, С.Б. ПОПОВ, д. мед.н., професор,
І.А. ЗУПАНЕЦЬ, д. мед.н., професор
/Національний фармацевтичний університет/

Вивчення впливу комбінованого препарату на основі диклофенаку та кверцетину на експериментально індуковану больову реакцію у щурів

Резюме

У статті представлені результати дослідження анальгезивної дії препарату Диклокор у порівнянні з диклофенаком натрію (ДН) за умов експериментально індукованої больової реакції на фоні розвитку запальної гіпералгезії у щурів. У ході експерименту визначали такі показники як поріг больової чутливості (ПБЧ), анальгезивна активність (АА) і середня ефективна доза (ЕД₅₀) за анальгезивною активністю, після чого з урахуванням коефіцієнтів видової чутливості було розраховано середню терапевтичну дозу (СТД) Диклоктору для застосування в клінічній практиці у якості анальгезивного засобу. Результати дослідження свідчать про те, що Диклокор у дозі 10,4 мг/кг, яка відповідає 4 мг/кг за ДН, має ту ж саму анальгезивну активність, що і ДН у дозі 5 мг/кг, що вказує на синергетичну дію ДН і кверцетину – активних компонентів препарату Диклокор.

ЕД₅₀ Диклоктору за анальгезивною активністю склала 12,01±1,87 мг/кг, що відповідає 4,62±0,72 мг/кг за ДН (проти 5 мг/кг для ДН). Для пацієнта з масою 70 кг добова СТД Диклоктору повинна складати 200 мг, що відповідає 77 мг/добу за ДН (проти 125 мг/добу для ДН). Вищезазначені результати надають Диклоктору перспективності в якості анальгезивного засобу.

Ключові слова: Диклокор, диклофенак натрію, кверцетин, поріг больової чутливості, щури

Анальгезивний ефект диклофенаку натрію (ДН) добре відомий і широко використовується для лікування таких станів як ревматичні захворювання, посттравматичне та постопераційне запалення, головний біль, мігрень тощо. Проте зворотним боком використання цього надзвичайно ефективного препарату є його побічні дії, насамперед підвищення ризику гастропатій та інфаркту міокарда [11]. Тому актуальною науковою задачею є пошук таких комбінацій ДН з іншими сполуками, що дозволять знизити його дозування при збереженні терапевтичної ефективності. Одним із таких композиційних лікарських засобів є Диклокор.

Матеріали та методи дослідження

Усі дослідження проводили відповідно до директиви Ради ЄС 2010/63/EU про дотримання законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей. План представлено дослідження затверджено Комітетом з біоетики Національного фармацевтичного університету.

Об'єктом дослідження є оригінальний препарат Диклокор – капсули для перорального застосування (270 мг капсульної маси) виробництва ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ» (Україна). Склад однієї капсули:

- кверцетин – 40 мг
- диклофенак натрію – 25 мг.

Оскільки однією з діючих речовин Диклоктору є диклофенак натрію, у якості препарату порівняння використовували Вольтарен (Novartis Pharma, Швейцарія) у середній ефективній дозі за анальгезивною активністю – 5 мг/кг [4]. Оскільки, згідно з даними літера-

тури, ефективні дози ДН за анальгезивною дією при пероральному застосуванні у щурів знаходяться в інтервалі 5–7 мг/кг [4, 8], у дослідженні запропоновано наступне використання доз Диклоктору – 2, 4 та 8 мг/кг за ДН або 5,2, 10,4 та 20,8 мг/кг за сумою діючих речовин. Це дозволило визначити ЕД₅₀ препарату за анальгезивною дією та провести порівняльний аналіз його активності.

Оскільки Диклокор випускається у вигляді капсул для перорального застосування, його вводили щурам внутрішньошлунково у вигляді суспензій, виготовлених при додаванні стабілізаторів, за допомогою шлункового зонда.

Дослідження анальгезивних властивостей препарату Диклокор за умов розвитку експериментально індукованої больової реакції на фоні розвитку запальної гіпералгезії [6, 12] проводили на 50 білих нелінійних щурах обох статей масою 150–180 г, яких було поділено на 5 дослідних груп по 10 тварин: 1 група – контрольна патологія; 2 група – тварини, які отримували Диклокор у дозі 5,2 мг/кг; 3 група – тварини, які отримували Диклокор у дозі 10,4 мг/кг; 4 група – тварини, які отримували Диклокор у дозі 20,8 мг/кг; 5 група – тварини, які отримували ДН у дозі 5 мг/кг.

У представленому дослідженні інтенсивність больової реакції визначали за методом Рендалла – Селітто (L.O. Randall, J.J. Selitto, 1957) [9]. У зв'язку з цим у ході дослідження використовували анальгезиметр Ugo Basile 37215 («Ugo Basile», Італія), який дозволяє оцінити вплив досліджуваних об'єктів на механізми розвитку больової реакції та дуже точно визначити поріг больової чутливості шляхом зміни механічного впливу на кінцівку тварини [7, 10].

На початку експерименту всіх щурів піддавали процедурі визначення вихідних показників ПБЧ за допомогою анальгезиметра

Ugo Basile 37215, стимулюючи больову реакцію на правій задній лапі [7, 10]. Після цього не менш як через 30 хвилин у всіх тварин проводили відтворення запальної гіпералгезії на правій задній лапі шляхом субплантарного введення 0,1 мл 1% розчину λ -карагеніну («Sigma», США) [1, 6]. Через 1 годину після цього проводили одноразове внутрішньошлункове введення досліджуваних препаратів у відповідних дозах у вигляді суспензій, які попередньо виготовляли у необхідній кількості фізіологічного розчину із стабілізатором ТВІН-80. Тварини контрольної групи в еквівалентній кількості отримували фізіологічний розчин.

Оскільки час досягнення максимальної концентрації в сироватці крові пацієнтів для препаратів, що містять диклофенак натрію, складає приблизно 2 год [2], що відповідає максимальному ступеню вираженості анальгезивної дії при клінічному застосуванні, оцінку рівня АА дослідного засобу проводили через 2 години після його введення, тобто через 3 години після відтворення гіпералгезії.

Отже, через 3 години після відтворення патології у всіх тварин проводили визначення ПБЧ [6, 9] із застосуванням анальгезиметра Ugo Basile 37215. Далі визначали АА за здатністю досліджуваних засобів знижувати ступінь гіпералгезії у тварин [6]. Таким чином, АА розраховували за рівнем збільшення ПБЧ тварин порівняно з контрольними значеннями і виражали у відсотках:

$$AA = \frac{\Delta ПБЧ_k - \Delta ПБЧ_d}{\Delta ПБЧ_k} \times 100\%$$

де АА – анальгезивна активність (%);

$\Delta ПБЧ_d$ – відсоткова різниця у рівнях больової чутливості в групі дослідних тварин до та після відтворення запальної гіпералгезії;

$\Delta ПБЧ_k$ – відсоткова різниця у рівнях больової чутливості в групі контрольних тварин до та після відтворення запальної гіпералгезії.

Далі на підставі залежності анальгезивної активності препарату від використаної дози методом пробіт-аналізу розраховували його ED_{50} [3, 5].

На завершення з урахуванням коефіцієнтів видової чутливості [1] було розраховано СТА Диклокоору для застосування в клінічній практиці у якості анальгезивного засобу.

Статистичну обробку результатів проводили методами варіаційної статистики з використанням t -критерію Стьюдента і непараметричних методів аналізу (Mann-Whitney U Test) за допомогою комп'ютерних програм STATISTICA 7.0, StatPlus 2009 та MS Excel 2007 і представляли у вигляді порівняльних таблиць із результатами різних груп.

Результати та їх обговорення

Результати дослідження анальгезивних властивостей препаратів наведено у таблиці 1.

Таблиця 1. Вплив диклокоору і диклофенаку натрію на інтенсивність індукованої больової реакції у щурів (n=50)

| Об'єкт дослідження | Доза, мг/кг | ПБЧ, ум. од. | | $\Delta ПБЧ, \%$ | АА, % |
|----------------------|-------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|
| | | Вихідні дані | Через 3 години | | |
| Контрольна патологія | – | 225,5 \pm 17,4 | 89,0 \pm 9,9 | 60,5 \pm 2,8 | – |
| Диклокор | 5,2 | 254,5 \pm 14,2 | 143,0 \pm 10,8 | 44,3 \pm 1,2*/** | 26,8 \pm 2,0** |
| | 10,4 | 215,5 \pm 24,5 | 142,0 \pm 14,6 | 33,4 \pm 1,2* | 44,7 \pm 1,9 |
| | 20,8 | 195,5 \pm 15,2 | 165,0 \pm 9,6 | 14,2 \pm 2,3*/** | 76,6 \pm 3,9** |
| ДН | 5,0 | 197,0 \pm 27,0 | 132,5 \pm 15,7 | 31,5 \pm 1,6* | 47,9 \pm 2,7 |

Примітки: 1. * – відмінності вірогідні відносно тварин групи контрольної патології ($p \leq 0,05$);

2. ** – відмінності вірогідні відносно тварин, які отримували референс-препарат ДН ($p \leq 0,05$).

Дані, наведені у таблиці 1, свідчать, що у тварин контрольної групи під впливом механічного подразнення кінцівки на фоні розвитку запальної гіпералгезії виникає виражена больова реакція. Про це свідчить зниження показника ПБЧ, порівняно з вихідними даними, на 60,5%.

На відміну від цього, під впливом досліджуваних засобів у всіх дозах, що вивчалися, спостерігається вірогідно менше зниження ПБЧ, порівняно з контрольною групою, що свідчить про наявність анальгезивних властивостей у даних засобів.

Найменший відсоток зниження ПБЧ у даному дослідженні, а отже, й найвищі показники АА, спостерігали під впливом диклокоору в дозі 20,8 мг/кг за сумою діючих речовин. При застосуванні даного засобу в менших дозах показники АА були вірогідно нижчими. У дозі 5,2 мг/кг диклокор знижував ПБЧ у щурів з гіпералгезією на 44,3%, в дозі 10,4 мг/кг – на 33,4%, в дозі 20,8 мг/кг – лише на 14,2%, порівняно з вихідними даними. Отримані результати дозволили у ході подальших розрахунків отримати наступні показники АА для диклокоору: при застосуванні в дозі 5,2 мг/кг – 26,8%, в дозі 10,4 мг/кг – 44,7% та в дозі 20,8 мг/кг – 76,6%. Усе описане вище свідчить про виражену анальгезивну активність диклокоору, що має виражений дозозалежний характер.

При застосуванні ДН в дозі 5,0 мг/кг, що, згідно з літературними даними, відповідає ED_{50} за анальгезивною активністю [4], спостерігали зниження показників ПБЧ у тварин, порівняно з вихідними значеннями, на 31,5%, що обумовило наявність АА, яка дорівнювала 47,9%. Даний показник відповідає рівню активності диклокоору в дозі 10,4 мг/кг (4,0 мг/кг за ДН), є достовірно більшим, ніж при застосуванні диклокоору в дозі 5,2 мг/кг, та поступається диклокоору в дозі 20,8 мг/кг.

Порівнюючи анальгезивні показники диклокоору та ДН слід зазначити, що Диклокор має анальгезивну дію, еквівалентну ДН в дозі, на 20% меншій за вмістом ДН. Це свідчить про те, що поєднання кверцетину та ДН у вказаній лікарській формі при дотриманні певної технології виробництва посилює анальгезивні властивості останнього.

На наступному етапі дослідження було розраховано середні ефективні дози для препаратів Диклокор та ДН за анальгезивною дією на підставі залежності активності препаратів від використаної дози методом пробіт-аналізу [5] (табл. 2). За допомогою табличних даних відсотки активності в кожній групі були переведені у пробіти (y), далі були визначені їх вагові коефіцієнти (B) та місця доз (x) з проведенням подальших необхідних розрахунків.

Для подальших розрахунків, у результаті яких було визначено показники ED_{16} , ED_{50} та ED_{84} , використовували рівняння, які відображають залежність між дозами та пробітами:

$$y = A_0 + A_1 x.$$

Таблиця 2. Значення доз і рівня активності для визначення ЕД₅₀ препарату Диклокору шурів за анальгезивною дією методом пробіт-аналізу

| Доза, мг/кг | Активність, % | Місце доз, x | Пробіт, y | Ваговий коефіцієнт, B | xB | x ² B | YB | xyB |
|-------------|---------------|--------------|-----------|-----------------------|------|------------------|-------|--------|
| 5,2 | 26,8 | 1 | 4,42 | 4,3 | 4,3 | 4,3 | 19,01 | 19,01 |
| 10,4 | 44,7 | 2 | 4,87 | 4,9 | 9,8 | 19,6 | 23,86 | 47,73 |
| 20,8 | 76,6 | 4 | 5,74 | 4,1 | 16,4 | 65,6 | 23,53 | 94,14 |
| Сума | | | | 13,3 | 30,5 | 89,5 | 66,40 | 160,87 |

Таблиця 3. Результати розрахунків для визначення ЕД₅₀ препарату Диклокор за анальгезивною активністю методом пробіт-аналізу

| A ₁ | A ₀ | Рівняння залежності пробіт-доза | Місце дози ЕД ₅₀ | Місце дози ЕД ₁₆ | Місце дози ЕД ₈₄ | ЕД ₅₀ | s |
|----------------|----------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------|-------|
| 0,44 | 3,99 | y = 0,44x + 3,99 | 2,31 | 0,03 | 4,59 | 12,01 | 1,87 |
| | | | | | | 4,62* | 0,72* |

Примітка. * – за диклофенаком натрію.

Коефіцієнти A₀ і A₁ розраховували за формулами:

$$A_0 = \frac{(\Sigma B) - (\Sigma xB)A_1}{\Sigma B}$$

$$\frac{\Sigma xB}{\Sigma B} \times [\Sigma yB - (\Sigma xB)A_1] + (\Sigma x^2B)A_1 = \Sigma xyB.$$

Далі були знайдені значення місць доз (x) для ЕД₁₆, ЕД₅₀ та ЕД₈₄, з урахуванням того, що значення пробітів (y) дорівнюють для ЕД₁₆ – 4, ЕД₅₀ – 5 та ЕД₈₄ – 6 [6].

Стандартну похибку s значення ЕД₅₀ було визначено за формулою:

$$s = \frac{E_{84} - E_{16}}{2\sqrt{n}}$$

де n – число спостережень;

E₈₄ – доза лікарського засобу, при якій спостерігається активність 84%;

E₁₆ – доза лікарського засобу, при якій спостерігається активність 16%.

Підсумкові результати розрахунків наведено в таблиці 3.

У результаті проведених розрахунків було визначено показник ЕД₅₀ досліджуваного препарату за анальгезивною активністю: ЕД₅₀ Диклокору склало 12 мг/кг, що відповідає 4,62 мг/кг за диклофенаком натрію. Отримані дані свідчать про підвищення активності ДН (з урахуванням того, що згідно з даними літератури його ЕД₅₀ за цим видом активності складає 5,0 мг/кг) [4] при застосуванні у вигляді капсул, що може пояснюватись не тільки сумациєю фармакологічних ефектів при сумісному застосуванні з кверцетином, а й фармацевтичними особливостями даної лікарської форми. Далі з урахуванням коефіцієнтів видової чутливості [1] було розраховано СТА Диклокору для застосування в клінічній практиці у якості анальгезивного засобу. Для лікування больового синдрому у людини Диклокор доцільно застосовувати у дозі 2,9 мг/кг (за сумою діючих речовин), а зважаючи на те, що середня маса пацієнта становить близько 70 кг, добова СТА дослідного засобу повинна складати 200 мг, що відповідає 77 мг/добу за ДН. Розрахована таким чином доза при перерахунку на ДН є дещо меншою, ніж СТА даного НПЗП, яка в середньому складає 125 мг/добу (100 – 150 мг/добу) [2].

Висновки

Результати експерименту доводять, що препарат Диклокор у капсулах можна розглядати як перспективний засіб для корек-

ції больового синдрому. Синергетична дія ДН і кверцетину посилює анальгезивні властивості ДН, що може дозволити знизити його дозування.

У подальших дослідженнях впливу препарату Диклокор на перебіг спонтанної больової реакції буде доцільно використовувати середню ефективну дозу препарату, що становить 12,0 мг/кг за сумою діючих речовин.

За результатами проведених клінічних досліджень Диклокору в якості засобу для лікування больового синдрому у хворих із запально-деструктивними захворюваннями суглобів визначена рекомендована до застосування добова доза – 2,9 мг/кг або 200 мг/добу за сумою діючих речовин, що складає 3 капсули препарату.

Список використаної літератури

1. Доклинические исследования лекарственных средств : методические рекомендации / под ред. А. В. Стефанова. – К. : Авиценна, 2002. – 528 с.
2. Інструкція для медичного застосування препарату «Вольтарен®» [Електронний ресурс]. – Наказ МОЗ України № 107 від 19.02.2009. – Режим доступу : <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=24079>.
3. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М. : Высш. шк., 1990. – 352 с.
4. Лекарственная терапия воспалительного процесса: экспериментальная и клиническая фармакология противовоспалительных препаратов / Я. А. Сигидин, Г. Я. Шварц, А. П. Арзамасцев, С. С. Либман. – М. : Медицина, 1988. – 240 с.
5. Прозоровский В. Б. Практическое пособие по ускоренному определению средних эффективных доз и концентрации биологически активных веществ / В. Б. Прозоровский. – СПб., 1992. – 42 с.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М. : ГрифиК, 2012. – 944 с.
7. Gunda S. Evaluation of two 2,5-disubstituted-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazoles for anti-inflammatory and analgesic activities / S. Gunda, I. Chaitanya, G. Kutty // Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci. – 2012. – Vol. 3 (1). – P. 930–944.
8. Hasani A. S. Preemptive analgesic effect of diclofenac: experimental study in rats / A. S. Hasani, M. Soljakova, M. H. Jakupi // M. E. J. Anesth. – 2011. – Vol. 21 (3). – P. 355–360.
9. Randall L. O. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue / L. O. Randall, J. J. Selitto // Arch. Int. Pharmacodyn. – 1957. – Vol. 111, № 4. – P. 409–419.
10. Analgesic and anti-inflammatory properties of *Oxyanthus unilocularis* / N. B. Nkeh-Chungag, P. C. Mxolisi Bekwa, J. E. Ndebia [et al.] // J. Med. Plants Res. – 2010. – Vol. 4 (10). – P. 932–939.
11. McGettigan P. Cardiovascular Risk with Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Systematic Review of Population-Based Controlled Observational Studies / P. McGettigan, D. Henry // PLoS Medicine. – 2011. – № 8 (9). – P. e1001098
12. Vogel Ed. H.G. Drug discovery and evaluation: pharmacological assays / Vogel Ed. H.G. – 3rd edition. – Berlin : Springer-Verlag, 2008. – 2071 p.

Резюме

Изучение влияния комбинированного препарата на основе диклофенака и кверцетина на экспериментально индуцированную болевую реакцию у крыс

А.С. Попов, С.К. Шебеко, С.Б. Попов, И.А. Зупанец

Национальный фармацевтический университет

В статье приведены результаты исследования анальгезирующего действия препарата Диклокор в сравнении с диклофенаком натрия (ДН) при условии развития экспериментально индуцированной болевой реакции на фоне развития воспалительной гипералгезии у крыс. В ходе эксперимента определялись такие показатели, как порог болевой чувствительности (ПБЧ), анальгезирующая активность (АА) и средняя эффективная доза (ED_{50}) по анальгезирующей активности, после чего с учетом коэффициентов видовой чувствительности был произведен расчет средней терапевтической дозы (СТД) Диклокора для применения в клинической практике в качестве анальгезирующего средства. Результаты исследования свидетельствуют о том, что Диклокор в дозе 10,4 мг/кг, соответствующей 4 мг/кг по ДН, оказывает такую же анальгезирующую активность, что и ДН в дозе 5 мг/кг, что указывает на синергетическое действие ДН и кверцетина – активных компонентов препарата Диклокор.

ED_{50} Диклокора по анальгезирующей активности составила $12,01 \pm 1,87$ мг/кг, что соответствует $4,62 \pm 0,72$ мг/кг по ДН (против 5 мг/кг для ДН). Для пациента с массой 70 кг суточная СТД Диклокора должна составлять 200 мг, что соответствует 77 мг/сутки по ДН (против 125 мг/сутки для ДН). Приведенные результаты показывают перспективность Диклокора в качестве анальгезирующего средства.

Ключевые слова: Диклокор, диклофенак натрия, кверцетин, порог болевой чувствительности, крысы

Summary

Effect of a combined medication of diclofenac and quercetin on experimentally induced pain reaction in rats

A.S. Popov, S.K. Shebeko, S.B. Popov, I.A. Zupanets'

National Pharmaceutical University

The article presents the results of the research of Diclocor analgesic effects compared with diclofenac sodium (DS) under conditions of experimentally induced pain reaction in the setting of the development of inflammatory hyperalgesia in rats. During the experiment such factors as pain limit (PL), analgetical activity (AA) and the average effective dose (ED_{50}) for analgesic activity were determined. Then taking into account the ratios of species differences in sensitivity, the average therapeutic dose (ATD) of Diclocor was calculated for the use in clinical practice as an analgesic agent. Results of the study indicate that Diclocor at a dose of 10.4 mg / kg, which is equivalent to 4 mg / kg DS has the same analgesic activity, as DS at a dose of 5 mg / kg, indicating the synergistic effect of DS and quercetin – an active component of Diclocor.

ED_{50} of Diclocor for analgesic activity was $12,01 \pm 1,87$ mg / kg, corresponding to $4,62 \pm 0,72$ mg / kg for DS (compared to 5 mg / kg for DS). For a patient with a weight of 70 kg the daily intake of Diclocor ATD should be 200 mg, corresponding to 77 mg / day for DS (against 125 mg / day for DS). The above given results provide prospects to Diclocor as analgesic agent.

Keywords: Diclocor, diclofenac sodium, quercetin, pain limit, rats