

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ФИТОПРЕПАРАТА ПРИ ЭЛЕКТРОФОРЕЗЕ В РЕАБИЛИТАЦИИ БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРОЗОМ

Д.В. Бабаскин

ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (г. Москва)

The release of biologically active substances from phytopreparation by electrophoresis in the rehabilitation of patients with osteoarthritis

D.V. Babaskin

SBEI HPO I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

РЕЗЮМЕ

Исследована кинетика высвобождения флавоноидов из фитопрепарата при электрофорезе в модельных опытах. Определены основные параметры процессов. Установлена зависимость скорости высвобождения флавоноидов от исходной их концентрации в рабочем растворе фитопрепарата. Изучено влияние вида электрического тока и диметилсульфоксида на высвобождение биологически активных веществ из фитопрепарата.

Ключевые слова: электрофорез, высвобождение через мембрану, флавоноид, остеоартроз.

RESUME

The kinetics of release of flavonoids from phytopreparation electrophoresis in model experiments is investigated. Key parameters of processes are defined. The dependence of speed release of flavonoids from the basic concentration in the working solution of the phytopreparation is established. Influence of a kind of an electric current and dimethyl sulfoxide on liberation of biologically active substances from a phytopreparation is studied.

Keywords: electrophoresis, release through the membrane, flavonoid, osteoarthritis.

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственный электрофорез является сложным электрофармакотерапевтическим методом лечения, при котором на организм больного действует как лекарственное вещество, так и электрический ток [1]. Данные факторы способны к интерференции, поэтому ответная реакция организма будет не простой суммой эффектов от воздействия лекарства и электрического тока, а более сложной и специфичной, с участием нервной и эндокринной систем. Для электрофореза могут использоваться только те лекарственные вещества, которые устойчивы к действию электрического тока и сохраняют при этом свою фармакологическую активность, высвобождаясь из лекарственной формы в терапевтически значимых количествах [2].

В последние годы все чаще для электрофореза используются лекарственные средства растительного происхождения [3]. Предлагаемый нами фитопрепарат для электрофореза представляет собой смесь сухих экстрактов корневищ с корнями сабельника болотного, травы люцерны посевной и шишек хме-

ля обыкновенного (2:2:1) [4]. Сухие экстракты стандартизированы, содержат комплексы биологически активных веществ (БАВ), благодаря которым реализуются анальгетический, противовоспалительный, иммуномодулирующий и другие эффекты, позволяющие использовать их комплексно в медицине при воспалительно-дегенеративных заболеваниях опорно-двигательного аппарата [5]. Основными БАВ фитопрепарата являются флавоноиды. При электрофорезе их высвобождение и проникновение в кожу подчиняется закону Фика, согласно которому поток диффундирующих частиц (I) через плоскость перпендикулярную направлению диффузии прямо пропорционален градиенту концентрации (dc/dx):

$$I = -D (dc/dx), \quad (1)$$

где D – коэффициент диффузии.

Обычно для анализа большинства диффузионных экспериментов используется второй закон Фика:

$$dc/dt = D (d^2c/dx^2). \quad (2)$$

Из уравнения (2) следует, что изменение концентрации во времени (dc/dt) на некото-

ром расстоянии x от начальной плоскости пропорционально скорости изменения градиента концентрации в направлении x в момент t . Для практического использования уравнение (2) следует проинтегрировать при граничных соответствующих условиях [6, 7].

В настоящее время в литературе отсутствуют систематические работы, посвященные вопросам высвобождения флавоноидов из фитопрепаратов при электрофорезе. Отсюда очевидна актуальность данных исследований.

Цель исследования – изучение кинетики высвобождения биологически активных веществ (флавоноидов) из фитопрепарата при электрофорезе в реабилитации больных остеоартрозом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы для электрофореза 5 % рабочий раствор фитопрепарата (1), 10 % раствор (2) и 15 % раствор (3). Определение содержания флавоноидов проводили по разработанной нами методике с применением спектрофотометрического метода. В основе методики лежит реакция комплексобразования флавоноидов с хлоридом алюминия. Количественное содержание флавоноидов рассчитывали на рутин – преобладающий флавоноид фитопрепарата. Для получения более воспроизводимых результатов реакцию комплексобразования рутина с хлоридом алюминия проводили в присутствии уксусной кислоты. Параллельно измеряли оптическую плотность стандартного образца рутина (R 5143, Sigma), приготовленного аналогично испытываемому раствору. Исследования проводили на спектрофотометре Titrtek MCC 1340 (Finland) при длине волны 415 нм.

Предварительно были исследованы спектры поглощения фитопрепарата и рутина на Specord M40 с автоматической регистрацией спектров и с использованием программы Scan Grap. Установлено, что фитопрепарат не смещает максимум оптической плотности рутина, по интенсивности которого будет проводиться фотометрирование. Кроме того, рутин имел близкий дифференциальный спектр поглощения с дифференциальным спектром поглощения флавоноидов фитопрепарата.

Изучение высвобождения флавоноидов из фитопрепарата при электрофорезе в модельных опытах *in vitro* проводили в модифицированных (под 3-камерные с электродами) диффузионных ячейках Франца (SES GmbH-Analysesysteme, Germany) через мембраны

«Карбосил-П» (ТУ 66-2-512-92) при температуре 36,0 °С. Рабочие растворы фитопрепарата помещались в центральную камеру, боковые камеры были заполнены модельной средой – дистиллированной водой. Электрофорез осуществлялся с использованием различных видов электрического тока: диадинамического (ДДТ) – двухполупериодного непрерывного тока частотой 100 Гц – 1 минута, короткопериодного модулированного тока с частотой модуляции 1,5 с – 3 минуты, при постоянной составляющей аппарата; синусоидальных модулированных токов (СМТ) в выпрямленном режиме – при I и IV роде работ по 5 минут каждый, частоте модуляции – 100 Гц, глубине модуляции – 75 %, длительности полупериодов – 2 и 3 с, силе тока – 5 мА на аппарате «Комби 500» (Gymna Uniphy, Belgium-Germany). Отбор проб проводился через определенные интервалы времени с полной заменой модельной среды (данную систему в первом приближении можно рассматривать как проточную) и при взятии проб по 4 мл с последующим их возвращением и добавлением исходной среды до нужного объема при необходимости (замкнутая система). Последняя методика является общепринятой, однако она не дает достаточно точных результатов изучения кинетики высвобождения биологически активных веществ из фитопрепарата при больших степенях извлечения.

Предварительно была установлена устойчивость стандартных образцов основных флавоноидов фитопрепарата: рутин (R 5143, Sigma), апигенин (42251 Fluka), апигенин-7-глюкозида (44692, Fluka), биоханин А (14,563, Aldrich), гиперозида (00180585, Fluka), даидзеина (D 7802, Sigma), изокверцитрина (00140585, Fluka), кверцетин (Q 0125, Sigma), кверцитрин (00740580, Fluka), а также рабочих растворов фитопрепарата 1, 2, 3 к действию ДДТ и СМТ. Спектры поглощения БАВ и рабочих растворов регистрировались до и после действия электрического тока. Количественное содержание флавоноидов определяли спектрофотометрическим методом при длинах волн: 360 нм (рутин), 339 нм (апигенин), 333 нм (апигенин-7-глюкозид), 326 нм (биоханин А), 365 нм (гиперозид), 302 нм (даидзеин), 362 нм (изокверцитрин), 370 нм (кверцетин), 363 нм (кверцитрин) и 415 нм (сумма флавоноидов в пересчете на рутин при добавлении хлорида алюминия в присутствии уксусной кислоты в рабочих растворах фитопрепарата). Также было показано, что максимальная электро-

форетическая подвижность тестируемых флавоноидов фитопрепарата достигается при использовании в качестве рабочего катода, так и анода при ДДТ и СМТ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ БСУЖДЕНИЕ

При исследовании высвобождения флавоноидов из рабочих растворов с различной концентрацией фитопрепарата в замкнутой системе при электрофорезе ДДТ и СМТ было показано, что в течение 6 часов эксперимента примерно 47 % флавоноидов диффундировало в модельную среду из рабочего раствора 1, около 30–32 % – из раствора 2, примерно 23–28 % – из раствора 3. Равновесие устанавливалось через 4–6 часов. Скорость высвобождения флавоноидов из рабочих растворов с различным содержанием фитопрепарата в начале эксперимента была прямо пропорциональна исходным концентрациям БАВ в рабочих растворах и резко снижалась к моменту установления равновесия (рис. 1).

Периодическая замена модельной среды (проточная система) позволила получить более полную картину кинетики высвобождения флавоноидов из рабочих растворов фитопрепарата (табл. 1). Максимальная скорость высвобождения флавоноидов из раствора 1 при электрофорезе ДДТ и СМТ достигалась через 30 минут эксперимента, из растворов 2 и 3 – через 20 минут. «Время запаздывания» составляло 1–2 минуты. В первые 20–30 минут опыта (примерная продолжительность процедуры электрофореза) в модельную среду диффундировало до 16–18 % флавоноидов из рабочего раствора 1, 12–15 % – из раствора 2, 9–13 % – из раствора 3. При использовании электрофореза ДДТ в течение первых двух часов эксперимента скорость и степень извлечения флавоноидов из рабочих растворов фитопрепарата были выше, чем при электрофорезе СМТ. Время полного высвобождения флавоноидов при электрофорезе ДДТ сокращалось по сравнению с применением электрофореза СМТ (табл. 1).

На практике эффективность электрофореза во многом зависит от полноты и скорости высвобождения БАВ в первые 20–30 минут. С целью увеличения скорости высвобождения флавоноидов в течение первого часа в рабочие растворы был введен дополнительно диметилсульфоксид (ДМСО). Выбор данного «переносчи-

Высвобождение флавоноидов из рабочих растворов фитопрепарата в дистиллированную воду через мембраны Карбосил в проточной системе при 36 °С при электрофорезе ДДТ и СМТ

Время	Рабочий раствор фитопрепарата					
	1		2		3	
	Скорость высвобождения флавоноидов (V) и процент высвобождения (B)					
	V × 105, г/мл·час	B, %	V × 105, г/мл·час	B, %	V × 105, г/мл·час	B, %
Электрофорез ДДТ						
10 мин.	59,16 ± 0,02	5,48	101,92 ± 0,03	4,72	139,97 ± 0,02	4,32
20 мин.	68,82 ± 0,03	11,85	117,07 ± 0,04	10,14	152,93 ± 0,03	9,04
30 мин.	70,63 ± 0,04	18,57	113,40 ± 0,04	15,39	150,34 ± 0,04	13,68
40 мин.	69,55 ± 0,04	25,01	111,02 ± 0,04	20,53	145,48 ± 0,04	18,17
1 ч	66,26 ± 0,03	37,28	107,57 ± 0,04	30,49	143,05 ± 0,04	27,00
2 ч	39,20 ± 0,03	59,06	90,14 ± 0,04	55,53	110,92 ± 0,03	47,54
4 ч	16,53 ± 0,03	77,43	33,25 ± 0,03	74,00	55,30 ± 0,03	68,02
6 ч	7,16 ± 0,02	85,39	14,51 ± 0,03	82,06	26,87 ± 0,03	77,97
8 ч	0,23 ± 0,03	85,64	1,91 ± 0,03	83,12	11,72 ± 0,03	82,31
Электрофорез СМТ						
10 мин.	51,19 ± 0,02	4,74	82,94 ± 0,02	3,84	99,47 ± 0,02	3,07
20 мин.	60,16 ± 0,02	10,31	96,98 ± 0,02	8,33	108,22 ± 0,03	6,41
30 мин.	61,67 ± 0,01	16,02	96,98 ± 0,02	12,82	106,60 ± 0,02	9,70
40 мин.	58,00 ± 0,01	21,39	94,61 ± 0,01	17,20	101,09 ± 0,02	12,82
1 ч	53,73 ± 0,01	31,34	88,88 ± 0,01	25,43	97,20 ± 0,02	18,82
2 ч	36,13 ± 0,01	51,41	73,69 ± 0,01	45,90	89,86 ± 0,01	35,46
4 ч	18,10 ± 0,01	71,52	38,03 ± 0,01	67,03	55,54 ± 0,01	56,03
6 ч	8,96 ± 0,01	81,48	18,92 ± 0,01	77,54	33,62 ± 0,01	68,48
8 ч	4,13 ± 0,01	86,07	9,25 ± 0,01	82,68	22,49 ± 0,01	76,81
10 ч	0,24 ± 0,01	86,34	4,19 ± 0,01	85,01	11,61 ± 0,01	81,11

ка» БАВ также был обусловлен его противовоспалительным, анальгезирующим, противомикробным действием.

Исследования высвобождения флавоноидов из рабочих растворов фитопрепарата, содержащих ДМСО, проводили в проточной системе. Предварительно было установлено, что ДМСО не смещает максимум оптической плотности рутина и не влияет на характер

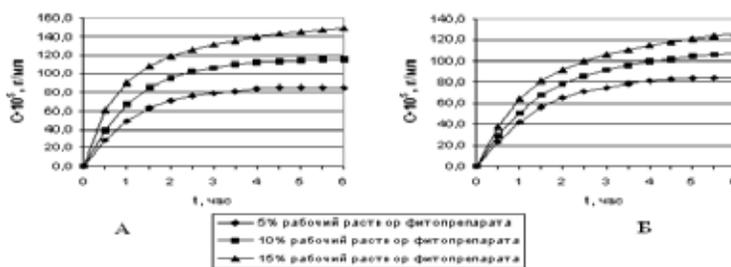


Рис. 1. Высвобождение флавоноидов из рабочих растворов фитопрепарата в дистиллированную воду через мембраны Карбосил при установлении равновесия в замкнутой системе при 36 °С при электрофорезе ДДТ (А) и СМТ (Б) (t – время, С – концентрация флавоноидов в модельной среде).

Таблица 2

Высвобождение флавоноидов из рабочего раствора 2 фитопрепарата, содержащего ДМСО, в дистиллированную воду через мембраны Карбосил в проточной системе при 36 °С при электрофорезе ДДТ и СМТ

Время	Концентрация ДМСО в рабочей растворе, %					
	5		10		15	
	Скорость высвобождения флавоноидов (V) и процент высвобождения (B)					
	V × 10 ⁵ , г/мл·час	B, %	V × 10 ⁵ , г/мл·час	B, %	V × 10 ⁵ , г/мл·час	B, %
Электрофорез ДДТ						
10 мин.	139,61 ± 0,04	6,46	176,54 ± 0,05	8,17	222,76 ± 0,06	10,31
20 мин.	147,55 ± 0,05	13,29	210,74 ± 0,06	17,93	233,65 ± 0,08	21,13
30 мин.	142,50 ± 0,05	19,89	152,51 ± 0,05	24,99	191,50 ± 0,07	30,00
1 ч	120,80 ± 0,04	36,67	130,12 ± 0,05	43,06	137,08 ± 0,05	49,03
2 ч	82,52 ± 0,04	59,59	79,01 ± 0,04	65,01	76,70 ± 0,04	70,34
3 ч	46,03 ± 0,03	72,38	39,13 ± 0,04	75,88	33,32 ± 0,04	79,60
4 ч	23,29 ± 0,03	78,85	19,28 ± 0,03	81,23	13,89 ± 0,03	83,45
5 ч	13,29 ± 0,02	82,54	7,79 ± 0,02	83,40	0,25 ± 0,01	83,52
6 ч	2,29 ± 0,01	83,17	0,21 ± 0,01	83,45	–	–
Электрофорез СМТ						
10 мин.	118,42 ± 0,04	5,48	143,21 ± 0,04	6,63	171,46 ± 0,05	7,94
20 мин.	130,43 ± 0,05	11,52	177,04 ± 0,05	14,83	200,28 ± 0,06	17,21
30 мин.	109,76 ± 0,04	16,60	123,65 ± 0,05	20,55	142,40 ± 0,05	23,80
1 ч	91,32 ± 0,04	29,29	101,30 ± 0,04	34,62	112,32 ± 0,04	39,40
2 ч	77,21 ± 0,03	50,73	72,83 ± 0,03	54,85	72,38 ± 0,02	59,51
3 ч	52,84 ± 0,03	65,41	52,16 ± 0,03	69,34	52,21 ± 0,03	74,01
4 ч	36,53 ± 0,02	75,56	32,25 ± 0,03	78,30	29,44 ± 0,02	82,19
5 ч	22,19 ± 0,02	81,72	16,94 ± 0,02	83,00	10,96 ± 0,01	85,23
6 ч	2,63 ± 0,01	82,45	2,13 ± 0,01	83,59	0,21 ± 0,01	85,29

спектра. Экспериментальные данные показали, что введение ДМСО в рабочие растворы фитопрепарата при электрофорезе ДДТ и СМТ оказывает значительное влияние на высвобождение флавоноидов из растворов: с увеличением концентрации ДМСО в рабочих растворах фитопрепарата возрастает скорость извлечения флавоноидов и сокращается время полного высвобождения. Так, из рабочего раствора 2, не содержащего ДМСО, практически полное извлечение флавоноидов при использовании ДДТ наблюдалось через 8 часов (табл. 1); из раствора, содержащего 10 % ДМСО – через 6 часов; из раствора, содержащего 15 % ДМСО – через 5 часов (табл. 2). Значительное влияние ДМСО проявлялось в первые часы опыта. Например, через 20 минут эксперимента скорость высвобождения флавоноидов из рабочего раствора фитопрепарата, содержащего 15 % ДМСО, при действии ДДТ возрастала почти в 2 раза по сравнению с раствором, не содержащим ДМСО, и достигала максимального значения (табл. 2).

ВЫВОДЫ

В результате исследования кинетики высвобождения флавоноидов из фитопрепарата при электрофорезе диадинамическими и синусоидальными модулированными токами в модельных опытах были определены основные параметры процессов, установлена зависимость скорости высвобождения флавоноидов от исходной их концентрации в рабочем растворе фитопрепарата. Изучено влияние вида электрического тока и диметилсульфоксида на высвобождение биологически активных веществ из рабочего раствора фитопрепарата. Показано, что введение диметилсульфоксида в рабочие растворы увеличивает скорость высвобождения флавоноидов из фитопрепарата, что особенно актуально в первые 20–30 минут электрофореза. Полученные результаты дают основание для проведения дальнейших исследований характера и механизма действия биологически активных веществ фитопрепарата, предлагаемого для электрофореза при остеоартрозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Улащик В.С., Пономаренко Г.Н. Лекарственный электрофорез. – СПб., 2010. – 288 с.
2. Улащик В.С. Электрофорез лекарственных веществ: руководство для специалистов. – Минск: Белорусская наука, 2010. – 404 с.
3. Корсун В.Ф., Корсун Е.В. Фитотерапия. – М.: Эксмо, 2010. – 880 с.
4. Бабаскин В.С., Бабаскин Д.В. Разработка фитопрепарата для электрофореза в реабилитации больных остеоартрозом // Человек и лекарство: Тез. докл. XVIII Российского нац. конгр. 11–15 апр. 2011 г. – М., 2011. – С. 500.
5. Бабаскин Д.В. Фито- и физиотерапия в реабилитации больных остеоартрозом // Матер. XVI Междунар. конгресса по реабилитации в медицине. Париж, Франция, 30 апр. – 3 мая 2011 г. // Аллергология и иммунология. – 2011. – Т. 12. – № 1. – С. 60–61.
6. Даниэльс Ф., Олбери Р. Физическая химия. – М.: Мир, 1978. – 645 с.
7. Чанг Р. Физическая химия с приложением к биологическим системам. – М.: Мир, 1980. – 662 с.

Адрес автора

К.м.н. Бабаскин Д.В.
Доцент кафедры маркетинга и товароведения в здравоохранении ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова
babaskind@yandex.ru