

ХІРУРГІЧНІ ВТРУЧАННЯ У ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ ПІСЛЯ СФОРМОВАНИХ КОЛОСТОМ

Бондар Г.В., Башеев В.Х., Псарас Г.Г., Бондаренко Н.В., Золотухін С.Э., Єфімочкін О.Е., Заїка А.Н.

Резюме. В статті представлені дані 60 хворих на рак прямої кишки, яким раніше були сформовані колостоми. У 71,7% випадків була сформована сигмостома, причому в 93,0% випадків вона була сформована на границі зі спадною кишкою. Повторні хірургічні втручання з видаленням пухлини виконані 39 (65,0%) пацієнтам. Усі хворі були прооперовані за розробленими авторами методиками. Частота післяопераційних ускладнень після операцій з видаленням пухлини у 39 хворих склала 28,2% проти 14,3% у хворих, яким були виконані паліативні симптоматичні втручання. Летальність після симптоматичних операцій склала 9,5%, а при операціях, виконаних в обсязі радикальних, - 5,1% ($0,5\% < D < 14,1\%$) ($p > 0,05$).

Ключові слова: рак прямої кишки, колостоми, радикальні хірургічні втручання.

SURGICAL INTERVENTIONS IN PATIENTS WITH RECTAL CANCER AFTER PREVIOUSLY FORMED COLOSTOMY

Bondar' G.V., Basheev V.Kh., Psaras G.G., Bondarenko N.V., Zolotoukhin S.E., Efimochkin O.E., Zaika A.N.

Summary. In the present work the information about surgical treatment of 60 patients with rectal cancer with previously formed colostomy is presented. In 71,7% cases the sigmoidostomy was formed, in 93,0% cases it was formed on the border with descend colon. The surgical intervention with tumor resection were made in 39 (65,0%) patients. All the patients were operated according to the methods of the above authors. The range of post operation complications with tumor resection on 39 patients consisted 28,2% in opposition to 14,3% of patients who had symptomatic interventions. Mortality after symptomatic operation was 9,5% and with operation made on level of radicals - 5,1% ($0,5\% < D < 14,1\%$) ($p > 0,05$).

Key words: rectal cancer, colostomies, radical surgical interventions.

УДК: 577.86-02:615.11:615.03

ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ІНДОМЕТАЦИНУ В БІОЛОГІЧНІЙ РІДИНІ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Азаров О.С., Михайлова І.В., Вербіловський Я.П., Пентюк Н.О., Ільченко О.В.

Кафедра фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім.М.І.Пирогова (вул.Пирогова, 56, м.Вінниця, Україна, 21018)

Резюме. Розроблено простий, швидкий та дешевий метод визначення індометацину в біологічних рідинах. До 0,2 мл сироватки (сечі) додавали 0,02 мл 1 N соляної кислоти. Суміш перемішували, потім до неї додавали 0,6 мл ацетонітрила. Суміш знову перемішували та центрифугували при 3000 об/хв протягом 30 хвилин, а надосадову рідину безпосередньо вводили до хроматографічної колонки. До колонки вводиться 20 мкл цього розведення. Визначення проводили на високоефективному рідинному хроматографі HP 1100 на колонці Hypersil BDS C18 (125x4 мм, 5 мкм). Застосовано ізократичне елюювання. Мобільна фаза: суміш 0,03 M цитратного буфера рН 3,8-4,2 з ацетонітрилом у співвідношенні 1:1 (за об'ємом). Швидкість елюювання - 0,6 мл/хв, УФ детектування велося при довжині хвилі 254 нм. Визначення проводилося при температурі колонки 20°C, при цьому час виходу індометацину з колонки складав 8,45 хвилини. Час виходу всіх домішок, які були присутні у пробі, не перевищував 3 хвилин. Чутливість методу складає 15 нг/мл. Для аналізу достатньо 0,1 мл біологічної рідини. Повний цикл дослідження 10 проб - до 3 годин.

Ключові слова: індометацин, високоефективна рідинна хроматографія.

Вступ

Індометацин (ІМ) - засіб, що належить до нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП). Фармакологічний ефект більшості НПЗП тісно пов'язаний з особливістю їх фармакокінетики. В чисельних дослідженнях була знайдена кореляція між величиною протизапальної дії НПЗП та параметрами їх фармакокінетики - стаціонарною концентрацією препаратів в крові пацієнтів, періодом їх напіввиведення, площею під фармакокінетичною кривою, середнім часом утримання препаратів в плазмі крові [Станіславчук, 1997; Остапчук, 1999; Helleberg, 1981; Orme, 1982; Puluszczak et al., 1989].

Типовою особливістю фармакокінетики ІМ також є його швидка біотрансформація в організмі з утворенням фармакологічно неактивних метаболітів. Так, ІМ швидко деалкілюється до О-дезметиліндометацину та деацилується з утворенням 5-оксиіндолілоцтової кислоти, які кон'югуються по вільним та карбоксильним групам з глюкуроновою кислотою і у вигляді кон'югатів виводяться з організму переважно (60%) шляхом ниркової екскреції, а в незміненому вигляді

елімінується близько 10-30% препарату [Helleberg, 1981; Friedman et al., 1991]. Максимальні концентрації препарату в плазмі крові сягають 2,5-5 мкг/мл, а терапевтичні від 150 до 500 нг/мл [Остапчук, 1999; Helleberg, 1981; Orme, 1982]. Є відомості щодо існування прямої відповідності між концентрацією ІМ в крові і вираженістю його побічної дії [Wright et al., 1997].

З урахуванням наведеного стає зрозуміло, чим пояснюється важливість розробки швидкого та дешевого методу визначення концентрації ІМ в біологічних рідинах, що і стало метою проведеного дослідження.

Серед існуючих методів визначення концентрації ІМ в крові вагома частка належить до методів високоефективної рідинної хроматографії.

Всі відомі методи визначення ІМ розподіляються на дві групи, що базуються на рідиннофазній або на твердофазній екстракції. Перша група методів складається з традиційної послідовності операцій, пов'язаних з виділенням препарату

з біологічної рідини з використанням органічних розчинників, наприклад дихлорметану [Jonkman et al., 1983; Smith, Venet, 1984]. Подальше видалення органічного розчинника та реекстрація ІМ займає до 4-х годин [Jawogowicz et al., 1999]. Після реекстрації проба вводиться до хроматографічної колонки, в переважній більшості С18, наприклад Hypersil BDS C18 (5 мкм; 250x4,6 мм) [Niopas, Mamzorida, 1994]. Елюенти також не відрізняються різноманітністю - використовуються переважно варіації сумішей метанолу або ацетонітрилу та фосфатного або цитратного буферу (рН 3,0-4,5), де частка органічного розчинника складає приблизно 40-60%. Спектрофотометричне детектування визначення ведеться на довжині хвилі 230-280 нм, причому межа визначення дорівнює 10 нг/мл [Mawatari et al., 1989].

Проте, така традиційна послідовність дій має певні недоліки. Так, під час екстрагування ІМ з подальшою реекстракцією спостерігається втрата певної кількості речовини - величина втрат може сягати 30%. Ми можемо бути впевненими в тому, що втрачена частка є сталою для ряду паралельних проб лише в тому випадку, коли аналіз проводиться спеціалістом вищої кваліфікації. Це не може не впливати на вартість аналізу. Також на вартість аналізу впливає ускладнення процесу визначення додатковими ступенями методики, що потребує додаткового часу.

Тому в країнах ЄС та США, де більша частина вартості аналітичного визначення припадає на оплату праці спеціаліста, набула поширення друга група методів визначення ІМ, які базуються на використанні твердофазної екстракції [Wang et al., 2001]. Тривалість аналізів, які виконуються з використанням таких методів є невеликою, трудомісткість також незначна. Адже через твердофазно-екстракційний картридж до хроматографічної колонки можна вводити безпосередньо рідину, яка має аналізуватися на вміст ІМ - навіть сироватку або плазму крові. Але в наших умовах ця група методів поки що економічно недоцільна. Пов'язано це з високою, за нашими мірками, ціною - приблизно 50-70 грн. за один картридж для твердофазної екстракції, який використовується для проведення одного аналітичного визначення.

Таким чином, з одного боку існує група методів по визначенню вмісту ІМ з низькою собівартістю, але з великими витратами кваліфікованої ручної праці. Інша група методів не потребує значної кваліфікованої праці, проте має велику собівартість завдяки витратним матеріалам.

Матеріали та методи

0,2 мл сироватки крові підкислювали 0,02 мл 1М соляної кислоти і після перемішування додавали внутрішній стандарт - 0,05 мл розчину німесулід (Sigma, USA) з концентрацією 5 мкг/мл, а після повторного перемішування - 0,6 мл ацетонітрилу. Проба енергійно струшувалась протягом однієї хвилини. За цей час практично весь ІМ, який був зв'язаний з білковими молекулами, переходить до розчину. Після цього пробу центрифугували при 3000 об/хв протягом 30 хв. Надосадову рідину фільтрували на мембранному фторопластовому фільтрі МФФКГ-3 (НПФ "Біохром") з розміром пор 0,45 мкм.

Кількісне визначення ІМ проводили на високоефектив-

ному рідинному хроматографі HP-1100 на колонці розмірами 125x4 мм, заповненій твердою фазою Hypersil BDS C18 з розмірами гранул 5 мкм. В колонку вводили 20 мкл відфільтрованої надосадової рідини. Застосовано ізократичне елюювання зі складом мобільної фази (за об'ємом) - 50% 0,03 М цитратного буферу рН=3,6 і 50% ацетонітрилу, швидкість елюювання - 600 мкл/хв, температура колонки 20°C. Детектування ІМ проводилось при довжині хвилі 254 нм. За цих умов час виходу ІМ з колонки складав 8,45 хв., а час виходу внутрішнього стандарту (німесулід) - 5,92 хв. В діапазоні концентрацій ІМ від 0,2 до 50 мкг/мл зберігається пропорційна залежність між площею хроматографічного піку та кількістю препарату в пробі. Встановлено, що відношення площі піків німесулід (внутрішнього стандарту) до площі піків ІМ є величиною сталою і дорівнює 0,565. Концентрація ІМ в сироватці крові розраховували за наступною формулою:

$$C = \frac{S_n * K_1 * K_2 * C_i}{S_i}$$

де: S_n - площа піку німесулід;

S_i - площа піку ІМ;

K_1 - калібрувальний коефіцієнт - відношення площ піків німесулід та ІМ, взятих у рівних концентраціях (за нашими даними $K_1 = 0,565$);

K_2 - коефіцієнт розведення - відношення об'єму проби після додавання всіх компонентів до вихідного об'єму проби (в умовах проведення визначення $K_2 = 4,35$);

C_i - концентрація внутрішнього стандарту в кожній пробі ($C_i = 5,75$ мкг/мл).

Результати. Обговорення

Для спрощення методики визначення ІМ, підвищення її точності за рахунок усунення втрат речовини в процесах екстрагування-реекстрагування, зниження трудомісткості аналітичного визначення і було модифіковано відому методику визначення ІМ [Cristofol et al., 1998], яка належить до першої групи.

Це стало можливим завдяки заміні міжфазної екстракції (рідина-рідина або у твердофазному патроні) на однофазну екстракцію у ацетонітрил. Оскільки ацетонітрил є ефективним білокосаджуючим агентом, його застосування дозволяє уникнути цілої низки операцій - екстрагування, видалення розчинника, реелюювання. Виключення цієї низки операцій, у свою чергу, зводить втрати ІМ під час пробопідготовки практично до нуля. Зниження концентрації ІМ у рідині, яка вводиться в колонку, не є критичним, чому сприяють велика чутливість сучасних хроматографічних детекторів у поєднанні із значною терапевтичною концентрацією ІМ в крові.

При розробці методу визначення ІМ та встановленні залежності між кількістю препарату в колонці та площею хроматографічних піків певні кількості препарату додавали до сироватки або сечі, яка не містила ІМ. Було показано, що ці біологічні рідини не містять речовин, час виходу яких з колонки співпадав би з часом виходу ІМ. Як стандартний зразок використовували індометацин виробництва SIGMA.

Стандартні зразки підлягали такій самій обробці, як і зраз-

які підлягали визначенню вмісту ІМ.
 При визначенні величини втрат ІМ в процесі пробопідготовки рівні кількості розчину ІМ додавалися до певних об'ємів плазми та води. Концентрація ІМ у розчинах складала 0,5, 4, 8 мкг/мл. Розчини ІМ в плазмі та частина водних розчинів підлягали повному циклу пробопідготовки, інша частина водних розчинів являла собою контроль та вводилася до колонки безпосередньо після фільтрування. Визначено, що відносні втрати ІМ в процесі пробопідготовки не залежать від концентрації та складають 1-2%.

В діапазоні концентрацій ІМ від 0,05 до 5 мкг/мл зберігається пропорційна залежність між площею хроматографічного піку та кількістю препарату в пробі.

Виявилось, що цей метод є достатньо точним, відтворюваним та чутливим. Так, при визначенні ІМ, доданого до

сироватки у концентраціях від 0,3 до 3,0 мкг/мл (серіями по 5 паралельних проб), величина відносної похибки середнього результату не перевищувала 3,0% для довірчого інтервалу $P=0,95$. Нижня межа визначення ІМ складала 15 нг/мл (відношення "сигнал/шум" > 10).

Висновки та перспективи подальших розробок

Розроблено метод кількісного визначення ІМ у сироватці крові на вискоелективному рідинному хроматографі.

Метод базується на процедурі однофазної екстракції, завдяки чому він виявився швидким у виконанні та дешевим.

Метод може бути в подальшому використаний у клінічній практиці для визначення оптимальних доз та частоти прийому ІМ з метою підвищення лікувального ефекту.

Література

Остапчук О.І. Вплив антиоксидантів та омепазолу на протизапальну активність, побічну дію та фармакокінетику індометацину // Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.28.- Київ, 1999.- 18с.

Станіславчук М.А. Оптимізація фармакотерапії хворих на ревматоїдний артрит нестероїдними протизапальними та анальгетичними препаратами. Фармакокінетичні та фармакодинамічні підходи: Дис. ... д-ра мед. наук.- Київ, 1997.- 48с.

Determination of indomethacin residues in poultry by high-performance liquid chromatography / C.Cristofol, B.Perez, M.Pons, et al. // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.- 1998, Vol.29.- №709(2).- P.310-314.

Metabolism and disposition of indomethacin in preterm infants / Friedman C.A., Temple D.M., Wender D.F., Parks B.R., Rawson J.E. // Dev. Pharmacol. Ther.- 1991.-Vol.17, №1-2.- P.1-7.

Helleberg L. Clinical Pharmacokinetics of indomethacin // Clin. Pharmacokinetics.- 1981.- Vol.6, №4.- P.245-258.

Jaworowicz D.J., Filipowski M.T., Boje K.M. Improved high-performance liquid chromatographic assay for nimesulide. // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.- 1999.- Vol.19.- 723 (1-2).- P.293-299

Plasma indomethacin assay by reversed-phase ion pair high pressure liquid chromatography / J.H.Jonkman, W.J.Van der Boon, R.Schoenmaker, A.Holtkamp // Pharm.Weekbl.Sci.- 1983.- Vol.16 №5(6).- P.313-318

Mawatari K., Iinuma F., Watanabe M. Fluorimetric determination of indomethacin in human serum by high-performance liquid chromatography coupled with post-column photochemical reaction with hydrogen peroxide. // J.Chromatogr.- 1989.- Vol.21, №491(2).- P.389-396.

Niopas I., Mamzoridi K. Determination of indomethacin and mefenamic acid in plasma by high-performance liquid chromatography. // J. Chromatogr. B Biomed. Appl.- 1994.- Vol.17, №656(2).- P.447-450

Orme M.L. Plasma concentration and therapeutic effect of antiinflammatory and rheumatic drugs // Pharmacol. Ther.- 1982.-Vol.16.- P.167-180.

Pharmacological activity, blood and tissue levels of indomethacin after single oral administration of two long-acting forms in the rat / Puluszezak D., Bianchi A., Chaoui A., Cazin J.C., Cazin M. // Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.- 1989.- Vol.11, №2.- P.73-80.

Smith P.C., Benet L.Z. High-performance liquid chromatographic method for the determination of indomethacin and its two primary metabolites in urine. // J.Chromatogr.- 1984.- Vol.306.- P.315-321.

Wang Z., Dsida R.M., Avram M.J. Determination of ketorolac in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and ultraviolet detection. // J.Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.- 2001.- №755(1-2).- P.383-386.

Wright M.R., Davies N.M., Jamali F. Toxicokinetics of indomethacin-induced intestinal permeability in the rat // Pharmacol. Res.- 1997.- Vol.35, №6.- P.499-504.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ИНДОМЕТАЦИНА В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.С.Азаров, И.В.Михайлова, Я.П.Вербиловский, Н.А.Пентюк, А.В.Ильченко

Резюме. Разработан простой быстрый и дешевый метод определения индометацина в биологических жидкостях. К 0,2 мл сыворотки (мочи) добавляли 0,02 мл 1 N соляной кислоты. Смесь перемешивали, потом к ней добавляли 0,6 мл ацетонитрила. Смесь вновь перемешивали и центрифугировали при 3000 об/мин в течении 30 минут, а надосадочную жидкость после фильтрования вводили в хроматографическую колонку. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл. Определение проводилось на ВЭЖ хроматографе HP 1100, колонка Hypersil BDS C18 (125x4 мм, 5 мкм). Элюирование изократическое. Мобильная фаза: смесь 0,03 M цитратного буфера pH 3,8-4,2 с ацетонитрилом (1:1 об.). Скорость элюирования - 0,6 мл/мин, детектирование при длине волны 254 нм. При температуре колонки 20°C время выхода индометацина составило 8,45 минуты. Чувствительность метода - 15 нг/мл.

Ключевые слова: индометацин, высокоэффективная жидкостная хроматография.

DETERMINATION OF INDOMETACINE IN BIOLOGICAL LIQUID BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Azarov O.S., Mykhailova I.V., Verbilovsky Ya.P., Pentyuk N.O., Il'chenko O.V.

Summary. A simplified high-performance liquid chromatographic procedure was developed for the quantification of Indometacine in biological liquids. A simplified high-performance liquid chromatographic procedure was developed for the quantification Indometacine