

**ODREĐIVANJE REZIDUA DIKLOFENAKA U TKIVIMA
SVINJA POSLE INTRAMUSKULARNE PRIMENE***
*DETERMINATION OF DICLOFENAC RESIDUE IN SWINE TISSUE
FOLLOWING INTRAMUSCULAR ADMINISTRATION*

Zorica Pejčić, Milanka Jezdimirović, Milena Pokrajac**

Rezidue diklofenaka (DF) u tkivima svinja (jetra, bubreg, mišić, injekciono mesto) ispitivane su metodom tečne hromatografije (HPLC) i to 15 časova, 72 časa i 120 časova posle *i.m.* primene pojedinačne terapijske doze diklofenak-natrijuma. Posle 15 časova od primene, najviša koncentracija DF nađena je u bubregu (0.614 mg/kg), dok je oko dva puta niža koncentracija nađena u jetri (0.316 mg/kg). Na injekcionom mestu, koncentracija DF bila je 0.432 mg/kg, dok se u mišiću izvan injekcionog mesta, DF zadržao u veoma niskoj koncentraciji (0.052 mg/kg), najnižoj u odnosu na sva ostala ispitivana tkiva. Posle 72 časa od primene, DF je bio prisutan u svim ispitivanim tkivima, ali su njegove koncentracije bile niže od granice određivanja primenjenim analitičkim postupkom. Tragovi primenjenog leka gube se posle isteka karence (120 h) u svim tkivima, osim na injekcionom mestu. Duže zadržavanje leka na injekcionom mestu može da bude posledica lokalnog zapaljenja, odnosno iritacije koja bi prouzrokovala sniženje pH vrednosti okoline injekcionog mesta i tako prouzrokovala sporije rastvaranje i duže zadržavanje diklofenaka na mestu primene.

Ključne reči: diklofenak, rezidue, svinje, tkiva

Uvod / Introduction

Ispitivanje lekova koji se koriste u veterinarskoj praksi veoma je važno za zaštitu zdravlja, kako ciljnih životinja, tako i zdravlja ljudi u čijoj se ishrani koriste tkiva ovih životinja. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL) imaju izuzetan značaj u farmakoterapiji, s obzirom na njihovu sposobnost da delimično ili potpuno zaustavljaju proces zapaljenja koji je osnova mnogih patoloških stanja. Osnovna terapijska dejstva NSAIL, kao što su antiinflamatorno, analgetičko i anti-

* Rad primljen za štampu 28. 6. 2005. godine

** Mr Zorica Pejčić, asistent, dr Milanka Jezdimirović, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, dr Milena Pokrajac, redovni profesor, Farmaceutski fakultet, Beograd

piretičko, proizilaze iz njihove sposobnosti da inhibišu biosintezu prostaglandina, medijatora u procesu zapaljenja. Upotreba ovih lekova u veterinarskoj i humanoj medicini veoma je široka, jer se koriste kod oboljenja u kojima je akutna ili hronična zapaljenjska reakcija izazvala različite poremećaje funkcija organa, bol ili povišenu telesnu temperaturu. Broj ovih lekova koji su do sada uvedeni u veterinarsku praksu neopravdano je mali. Najčešće se koriste aspirin, fenilbutazon, fluniksini-meglumin, naproksen, meklofenaminska kiselina, ketoprofen, meloksikam, a sada i diklofenak [1].

Diklofenak (DF) je nesteroidni antiinflamatorni lek, koji ima izraženu antiinflamatornu, analgetičku i antipiretičku aktivnost, kao i veoma dobru podnošljivost. Kumulira se na mestu zapaljenja, na kome postiže koncentracije koje su više nego u zdravom tkivu, a približne koncentracijama u plazmi [2]. Poluvreme eliminacije je kratko (jedan do dva časa), tako da su neželjeni efekti koje diklofenak izaziva najčešće blagi i prolazni, zbog čega ima bolju podnošljivost od mnogih drugih lekova iz grupe NSAIL [3]. Diklofenak je u medicinu uveden 1973. godine, a za veterinarsku upotrebu u našoj zemlji 1996. godine.

U veterinarskoj medicini, diklofenak je indikovano kod svinja, goveda i konja za lečenje artritisa, zapaljenjskih i degenerativnih promena posle trauma, akutne i hronične šepavosti tokom artritisa, tendinitisa i miozitisa, Terapijska doza diklofenaka za sve pomenute vrste životinja iznosi 2,5 mg/kg, jednom dnevno, *i.m.* [1]. Primenjuje se i u veterinarskoj oftalmologiji, u terapiji zapaljenjskih stanja vezanih, pre svega, za hirurške intervencije na oku [4], a takođe i kao dodatak primarnoj antibiotskoj i antišok terapiji, u kojoj poboljšava opšte stanje, ubrzava oporavak i pomaže preživljavanje životinje [5, 6, 7].

U izveštaju Evropske agencije za procenu lekova (EMEA) određena je vrednost prihvatljivog dnevnog unošenja (ADI) za diklofenak koja iznosi 0,5 µg/kg, ili 30 µg po osobi. Maksimalni rezidualni nivoi (MRL) za diklofenak u tkivima svinja iznose: 5 µg/kg za mišić i jetru, 1 µg/kg za kožu sa masnim tkivom i 10 µg/kg za bubreg [8]. Karenca koju je dao proizvođač jedinog kod nas registrovanog preparata diklofenaka za veterinarsku primenu, traje pet dana.

Ciljevi ovog istraživanja bili su razvijanje odgovarajućeg analitičkog postupka za određivanje diklofenaka u tkivima svinja, kao i dobijanje preliminar-nih podataka o eventualnim reziduama diklofenaka u onim tkivima svinja koja se najviše koriste u ishrani ljudi (mišić), kao i ona koja imaju najveću metaboličku aktivnost (jetra, bubreg).

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

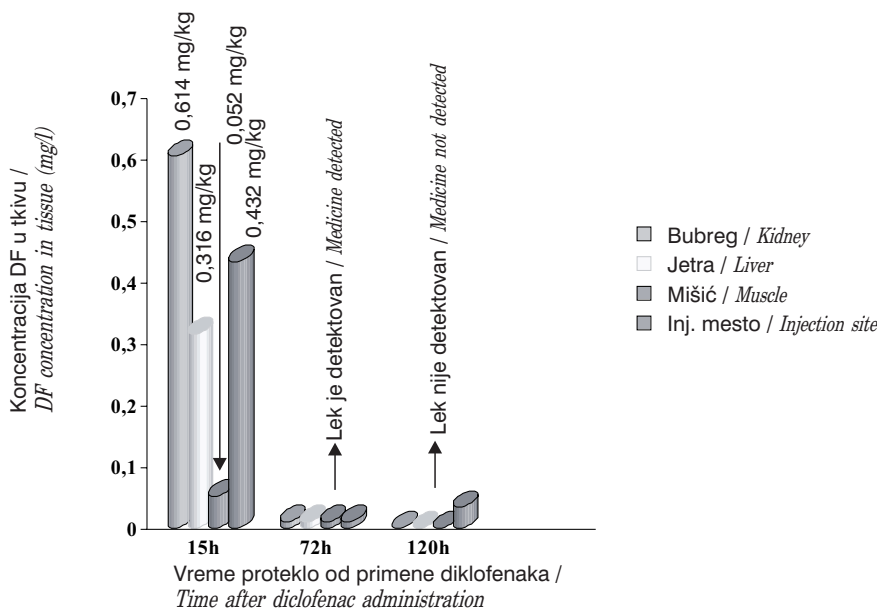
Lekovi / Medicines. U analitičkom postupku korišćeni su diklofenak-natrijum i flurbiprofen (interni standard), koji su dobijeni iz fabrike lekova Galenika a.d. Životinjama se primenjivao injekcioni preparat *Reuflogin^R ad us. vet.* (Fatro, Italija) koji u 1 ml sadrži 50 mg diklofenak-natrijuma.

Protokol / Protocol. Eksperiment je izveden na zdravim svinjama (n=3) rase jorkšir, muškog pola, uzrasta između dva i tri meseca. Životinjama je aplikovana terapijska doza diklofenak-natrijuma od 2.5 mg/kg telesne mase, duboko intramuskularno iza uha. Hranu i vodu svinje su dobijale *ad libitum* tokom celog eksperimenta. Rezidue diklofenaka u tkivima (bubreg, jetra, mišić i injekciono mesto) određivane su posle 15 časova, 72 časa i 120 časova od primene leka. Tkiva su uzorkovana neposredno posle žrtvovanja životinja i to po jedna životinja za svako navedeno vreme. Kao slepe probe korišćena su tkiva netretiranih životinja. Svaki uzorak imao je masu od oko 5 grama. Uzorak sa injekcionog mesta uzet je tako da obuhvati tkivo kroz koje je prošla igla pri aplikaciji leka i okolno tkivo iz koga se lek resorbovao (širine oko 10 cm i dubine oko 6 cm) [9]. Tkiva su zatim homogenizovana, zamrznuta na temperaturi od -18°C i tako čuvana do ispitivanja.

Analitički postupak. Uzorci tkiva analizirani su tečnom hromatografijom sa UV detekcijom (HPLC/UV), uz odgovarajuću prethodnu ekstrakciju [10].

Rezultati ispitivanja i diskusija / Results and discussion

Koncentracije diklofenaka u ispitivanim tkivima tretiranih svinja (bubreg, jetra mišić i mišić na injekcionom mestu), dobijene u različitim vremenskim intervalima posle i.m. primene pojedinačne doze diklofenaka od 2,5 mg/kg, prikazane su grafički (grafikon 1).



Grafikon 1. Koncentracija diklofenaka u tkivima svinja u različitim vremenskim intervalima posle njegove jednokratne i.m. primene u terapijskoj dozi od 2,5 mg/kg /

Graph. 1. Diclofenac concentration in swine tissue at different time intervals following a single i.m. administration of a therapeutic dose of 2.5 mg/kg

Ispitivanje sadržaja diklofenaka u tkivima svinja sprovedeno je radi procene raspodele leka, kao i određivanja njegovih rezidua u tkivima, koje nastaju kao posledica raspodele. Ispitivani su bubreg i jetra zbog svog značajnog uticaja na eliminaciju leka, mišić izvan injekcionog mesta kao tkivo koje čini najveći deo telesne mase životinje i u ishrani ljudi se najviše koristi, i mišić na injekcionom mestu zbog procene resorpcije diklofenaka sa mesta primene, kao i zbog moguće precipitacije i dužeg zadržavanja leka na ovom mestu, što može da utiče na karencu leka.

Posle 15 časova od primene, najviša koncentracija diklofenaka nađena je u bubregu (0,614 mg/kg), dok je oko dva puta niža koncentracija nađena u jetri (0,316 mg/kg). Ove koncentracije bile su više nego u plazmi u istom periodu. Dobijeni rezultati mogu da se objasne značajnom ulogom ovih organa u eliminaciji leka, njihovom dobrom prokrvljenošću i činjenicom da, verovatno, pripadaju centralnom prostoru. Riess i sar [11] takođe su našli da su bubreg i jetra pacova organi u kojima diklofenak postiže najviše koncentracije. Niža koncentracija diklofenaka u jetri u odnosu na bubreg, mogla bi da se protumači brzim stvaranjem metabolita diklofenaka u jetri [12, 13], zbog čega u ovom tkivu koncentracija nepromenjenog leka brzo opada. Za razliku od jetre, nepromenjeni diklofenak se zbog svoje lipofilnosti veoma malo eliminiše bubregom [13], što bi mogao da bude uzrok sporijeg opadanja koncentracija leka u ovom organu.

Na injekcionom mestu, koncentracija diklofenaka posle 15 časova od primene bila je 0,432 mg/kg, što je, verovatno, posledica zaostatka jednog dela primenjene doze koji se do tog trenutka još nije resorbovao, a ne posledica raspodele. Moguće je da je deo lekovite supstancije iz preparata precipitirao u mišiću i tako stvorio mali depo, odakle se sporije rastvarao i resorbovao [14]. Kako je u konkretnom slučaju primenjeno ukupno 55 mg diklofenaka po životinji, odnosno 2,5 mg/kg, može da se zaključi da je taj zaostatak veoma mali i da se lek skoro potpuno resorbovao sa injekcionog mesta. Istovremeno, u mišiću izvan injekcionog mesta, diklofenak se zadržao u veoma niskoj koncentraciji (0,052 mg/kg), najnižoj u odnosu na sva ostala ispitivana tkiva i nižoj nego u plazmi. Ovaj podatak je u skladu sa rezultatima dobijenim kod pacova [11], kao i sa malim stepenom raspodele diklofenaka u mišićnom tkivu koje, verovatno, pripada perifernom prostoru.

Posle 72 časa od primene, diklofenak je bio prisutan u svim ispitivanim tkivima, ali su njegove koncentracije bile niže od granice određivanja primenjenim analitičkim postupkom. Dobijeni rezultati u skladu su sa kratkim poluvremenom eliminacije iz plazme i malim volumenom distribucije diklofenaka.

Imajući u vidu karencu, brzinu eliminacije i volumen distribucije diklofenaka, očekivalo se da posle 120 časova od primene ni u jednom od ispitivanih tkiva ne bude tragova leka. Međutim, na injekcionom mestu diklofenak je bio prisutan u koncentraciji od 0.034 mg/kg, što verovatno nije posledica raspodele, već sporije resorpcije leka. Ovaj zaostatak diklofenaka na injekcionom mestu povezan je sa mogućom precipitacijom leka u mišiću [14], koja nastaje zbog nje-

gove slabe rastvorljivosti, posebno u kiseloj sredini [15]. Kako dobijeni neočekivani rezultat potiče samo od jedne ispitane životinje, može da se pretpostavi da je posledica neke njene individualne farmakokinetičke karakteristike, ili precipitacije leka na injekcionom mestu. Takođe, možda bi pomenuti rezultat mogao da bude posledica zapaljenja na samom injekcionom mestu, odnosno iritacije koja bi prouzrokovala sniženje pH vrednosti okoline injekcionog mesta i tako uzrokovala sporije rastvaranje i duže zadržavanje diklofenaka na mestu primene.

Zaključak / Conclusion

U ispitivanim tkivima svinja najviše koncentracije diklofenaka nađene su u bubregu, nešto niže na injekcionom mestu, zatim u jetri i najniže u mišiću izvan injekcionog mesta. Tragovi diklofenaka prisutni su u svim ispitivanim tkivima svinja posle 72 časa od primene leka. Ovi tragovi leka gube se posle isteka karence (120 časova), osim u slučaju injekcionog mesta na kome se diklofenak neočekivano nalazi u merljivoj količini. Za dobijanje detaljnijih podataka o reziduama diklofenaka u tkivima svinja, neophodno je da se obave dodatna ispitivanja koja bi kao osnovu mogla da koriste metodološki i eksperimentalni pristup praćenju rezidua iznet u ovom radu.

Literatura / References

1. Jezdimirović M.: Veterinarska farmakologija. Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 2005. - 2. Menasse R., Hedwall P. R., Kraetz J., Pericin C., Reisterer L., Sallmann A., Ziel R., Jaques R.: Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. *Scand. J. Rheumatology, Suppl.* 22, 5-16, 1978. - 3. Small R. E.: Diclofenac Sodium. *Clin. Pharm.*, 8, 545-558, 1989. - 4. Moore C. P.: Ophthalmic Pharmacology. In: *Veterinary pharmacology and therapeutics*, 7th ed. R. H. Adams, Iowa State University Press, Ames. 1105-1129. 1995. - 5. Mozes T., Meiligers J. P., Tak C. J., Zijlstra F. J., Ben-Efraim S., Saxena P. R., Bonta I. L.: Protective effect of diclofenac sodium against endotoxic shock in anaesthetized pigs. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids*. 48, 2, 193-200, 1993. - 6. Weitzberg E.: The endothelin receptor antagonist bossetin, in combination with the cyclooxygenase inhibitor, diclofenac, counteracts pulmonary hypertension in porcine endotoxin shock. *Crit. Care. Med.* 25, 5, 848-857, 1997. - 7. Wanecek M., Rudehill A., Hensen A., Lundberg J. M., Weitzberg E.: The endothelin receptor antagonist bossetin, in combination with the cyclooxygenase inhibitor, diclofenac, counteracts pulmonary hypertension in porcine endotoxin shock. *Crit. Care. Med.* 25, 5, 848-857, 1997. - 8. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA), Committee for Veterinary Medicinal Products (MRL): Diclofenac (Summary report), 2003. - 9. Anonimus: Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Forty-fifth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series 864, Geneva, 1996. - 10. Pejčić Z.: Procena farmakokinetike i rezidua diklofenaka u svinja, Magistarski rad, Farmaceutski fakultet Beograd, 2001. - 11. Riess J. W., Stierlin H., Degen P., Faigle J. W., Gerardin A., Moppetr J., Sallmann A., Schmid K., Schweizer A., Sulc M., Theobald W., Eagner J.: Pharmacokinetics and metabolism of the antiinflammatory agent Voltaren. *Scand. J. Rheumatology, Suppl.* 22, 17-29, 1978. - 12. Fowler P. D., Dawes P. T., John V. A., Shotton P. A.: Plasma and synovial fluid concentrations of diclofenac sodium and its hydroxylated metabolites

during once-daily administration of a 100 mg slow-release formulation. Eur. J. Clin. Pharmacol. 31, 4, 469-472, 1986. - 13. Degen P., Dieterle W., Schneider W., Theobald W., Sinterhauf U.: Pharmacokinetics of diclofenac sodium and five metabolites after single doses in healthy volunteers and after repeated doses in patients. Xenobiotica, 18, 12, 1449-1455, 1988. - 14. Peris-Ribera J. E., Pla-Delfina J. M.: Comparative oral and parenteral bioavailability of diclofenac: animal studies. Rev. Farmacol. Clin. Exp. 2, 1, 37-46, 1985. - 15. Chan K. K. H., Mojaverian P., Ziehmer B. A., John V. A.: Application of radiotelemetric technique in evaluating diclofenac sodium absorption after oral administration of various dosage forms in healthy volunteers. Pharm. Res. 7, 10, 1026-1032, 1990.

ENGLISH

DETERMINATION OF DICLOFENAC RESIDUE IN SWINE TISSUE FOLLOWING INTRAMUSCULAR ADMINISTRATION

Zorica Pejčić, Milanka Jezdimirović, Milena Pokrajac

Diclofenac residue (DF) in swine tissue (liver, kidney, muscle, injection site) were examined using the method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 15h, 72h, and 120h after i.m. administration of an individual therapeutic dose of diclofenac-sodium. At 15h after administration, the highest concentration of DF was found in the kidney (0.614 mg/kg), while a concentration about two times lower was found in the liver (0.316 mg/kg). At the injection site, the DF concentration was 0.432 mg/kg, while DF remained in a very low concentration (0.052 mg/kg) in the muscle outside the injection site, which was the lowest concentration in comparison with all the other examined tissues. At 72h after administration, DF was present in all examined tissues, but its concentrations were lower than the level that could be determined using the analytic procedure. Traces of the administered medicine disappeared after the waiting period of 120h in all tissues, except for the injection site. The longer presence of the medicine at the injection site could be a consequence of local inflammation, or irritation, that could cause a reduction in pH values of the area around the injection site, thus leading to slower dissolving and a longer presence of the DF at the injection site.

Key words: Diclofenac, residue, swine, tissue

РУССКИЙ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТКОВ ДИКЛОФЕНАКА В ТКАНЯХ СВИНЕЙ ПОСЛЕ ВНУТРИ-МЫШЧЕНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Зорица Пейчић, Миланка Ездимирић, Милена Покрајач

Остатки диклофенака (ДФ) в тканях свиней (печень, почка, мышца, инъекционное место) испытывались методом жидкой хроматографии (HPLC) а именно 15 ч., 72 ч. и 120 ч. после в. м. применения отдельные терапевтические дозы диклофена-натрия. После 15 ч. от применения, наивысшая концентрация ДФ найдена в почке (0,614 мг/кг), пока около 2 раза более низкая концентрация найдена в

печени (0,316 мг/кг). На инъекционном месте, концентрация ДФ составляла 0,432 мг/кг, пока в мышце извне инъекционного места. ДФ задержался в очень низкой концентрации (0,052 мг/кг), наиболее низкой в отношении всех остальных испытываемых тканей. После 72 ч. от применения, ДФ был присутствующий во всех испытываемых тканях, но его концентрации были ниже границы определения применённым аналитическим поступком. Следы, применённого лекарства теряются по истечению каренцы (120 ч.) во всех тканях, кроме на инъекционном месте может быть следствие локального воспаления, то есть ирритации, которая бы причинила снижение *pH* стоимости окрестности инъекционном месте и так привела до более медленного растворения и более долгой задержки ДФ на месте приемнения.

Ключевые слова: диклофенак, остатки, свиньи, ткани