

Міністерство охорони здоров'я України  
Національний фармацевтичний університет

ВЕТРОВА КАТЕРИНА ВІКТОРІВНА

УДК: 547.455.623'233.1: 547.814.5:615.065:615.277.3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ДОЦІЛЬНОСТІ КОРЕКЦІЇ  
ТОКСИЧНИХ ЕФЕКТІВ ПРОТИПУХЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ ПОХІДНИМИ  
ГЛЮКОЗАМІНУ ТА ЇХ КОМБІНАЦІЄЮ З КВЕРЦЕТИНОМ

14.03.05 – фармакологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2015

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі клінічної фармакології та клінічної фармації Національного фармацевтичного університету МОЗ України.

**Науковий керівник:** доктор фармацевтичних наук, професор  
**САХАРОВА Тетяна Семенівна,**  
Національний фармацевтичний університет  
МОЗ України (м. Харків),  
професор кафедри клінічної фармакології  
та клінічної фармації

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**МАСЛОВА Наталія Федорівна,**  
Державне підприємство «Державний науковий  
центр лікарських засобів і медичної продукції»  
(м. Харків), вчений секретар

доктор фармацевтичних наук, старший  
науковий співробітник  
**ТУЛЯКОВ Владислав Олександрович,**  
Державна установа «Інститут патології  
хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка  
НАМН України» (м. Харків), провідний  
науковий співробітник відділу  
лабораторної діагностики та імунології

Захист відбудеться «11» березня 2016 р. о 10.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4).

Автореферат розісланий «8» лютого 2016 р.

В. о. вченого секретаря  
спеціалізованої  
вченої ради Д 64.605.03,  
д. фарм. н., професор



К.Г. Щокіна

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** На сьогоднішній день область клінічного застосування протипухлинних препаратів значно розширилась і охоплює не лише онкологію, а й інші напрями практичної медицини – ревматологію, дерматологію, трансплантологію, нефрологію тощо (И. В. Бобрышева, 2013; С. А. Кулева, 2013; В. Ozogula et al., 2013; N. J. Connors et al., 2014). Це обумовлюється механізмом дії згаданої групи препаратів, який полягає у здатності порушувати мітотичний поділ клітин, що є особливо важливим при лікуванні захворювань, які супроводжуються інтенсивною неконтрольованою проліферацією, зокрема, злоякісних новоутворень, аутоімунної патології тощо (P. Crivori et al., 2011; A. Remesh, 2012; G. Tripodo et al., 2014). Однак, через малу широту терапевтичної дії, протипухлинні препарати викликають численні побічні ефекти, серед яких найбільш поширені гемато-, гастро-, гепато-, кардіо- та нефротоксичність (Y. Aimonio et al., 2013; S. Schirm et al., 2014; Е. В. Кузьменко, 2014; Z. Cai et al., 2014; И. Б. Колина, И. Н. Бобкова, 2014; D. Nikitovic et al., 2014). З огляду на наведене у сучасній медицині застосовуються різноманітні підходи для оптимізації та підвищення ефективності лікування протипухлинними препаратами: створення високоселективних цитостатиків та препаратів таргетної терапії; модифікація доз, раціональних режимів застосування; поєднання цитостатичної терапії з іншими методами лікування; удосконалення засобів допоміжної супровідної терапії тощо (А. Ю. Добродеев, 2012; Е. Bruera et al., 2014; С. В. Simone, 2014).

У допоміжному лікуванні побічної дії протипухлинних препаратів важливе місце посідає супровідна або підтримуюча терапія (Е. Bruera et al., 2014; R. Uygur et al., 2014; M. Sochor et al., 2015; А. Macciò et al., 2015). Використання засобів допоміжного супровідного лікування для корекції ускладнень специфічної протипухлинної хіміотерапії регламентується уніфікованими клінічними протоколами медичної допомоги, що затверджені наказами Міністерства охорони здоров'я України (І. Є. Седаков та співавт., 2011; М. К. Хобзей та співавт., 2014). Між тим, лікарські засоби, які застосовуються для корекції токсичних ефектів протипухлинних препаратів, діють переважно симптоматично та мають вузький спектр органотропної дії, що не є сприятливим в умовах системної токсичності, коли пошкодження не носять вибіркового характеру. Також певним обмеженням застосування таких лікарських засобів стають їх побічні ефекти, а у деяких випадках і висока вартість препаратів (В. В. Шепелева, 2009; Ю. А. Кучерявий, С. В. Морозов, 2012; С. Y. Lin, M. Keefe, 2012; Б. Б. Самура, 2013).

Останніми роками дістає розвитку новий підхід до розробки засобів допоміжної супровідної терапії, а саме, створення універсальних ефективних та безпечних коректорів токсичності протипухлинних препаратів, пошук яких здійснюється переважно серед сполук природного походження. Нашу увагу привернули численні дані літератури про біологічну роль та розмаїття фармакологічних ефектів похідних глюкозаміну та їх комбінацій з флавоноїдами, зокрема кверцетином (Л. В. Яковлева и соавт., 1992-2010; И. А. Зупанец, 1993-2014; С. М. Дроговоз и соавт., 1993-2014; Г. В. Зайченко, 2010; T. Gusdinar et al., 2011; В. О. Туляков, 2012; Н. П. Максютини и

соавт., 2012; M. Konrad, D. C. Nieman, 2015; С. Н. Kim et al., 2015). Доведено, що поєднання похідних глюкозаміну з кверцетином сприяє потенціюванню їх фармакологічної активності, а також підвищенню біодоступності та пролонгації дії (К. О. Зупанець, 2011). Крім того, численні дослідження засвідчують наявність власної протипухлинної дії похідних глюкозаміну та кверцетину, а також їхньої здатності до потенціювання протипухлинної активності цитостатиків поряд з нівелюванням токсичності останніх по відношенню до здорових клітин (U. J. Joshi et al., 2011; G. Wang et al., 2012; D. Xiao-Hui et al., 2013; Shu-Ting Chan et al., 2013; S. Masuda et al., 2014; K. H. Song et al., 2014). Наведене дозволяє припустити, що обрані потенційні фармакокоректори, окрім адекватного захисту здорових клітин, не будуть впливати на терапевтичну ефективність основного лікування, що відповідає сучасним принципам раціонального застосування протипухлинних препаратів.

Усе вищезазначене теоретично обґрунтовує доцільність фармакологічного вивчення похідних глюкозаміну (глюкозаміну гідрохлориду, глюкозаміну сульфату, N-ацетилглюкозаміну) та комбінації глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну з кверцетином як потенційних засобів фармакокоректорів токсичних ефектів протипухлинних препаратів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконана за планом науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету, затвердженим МОЗ України, «Фармакологічні дослідження біологічно активних речовин і лікарських засобів синтетичного та природного походження, їх застосування в медичній практиці» (№ держреєстрації 0103U000478), «Фармакологічне вивчення біологічно активних речовин та лікарських засобів» (№ держреєстрації 0114U000956), в яких автор є співвиконавцем.

**Мета і задачі дослідження.** *Мета* роботи – експериментальне обґрунтування доцільності застосування похідних глюкозаміну та їх комбінації з кверцетином для корекції токсичних ефектів протипухлинних препаратів.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні *задачі*:

1. Провести порівняльне дослідження коригуючого впливу похідних глюкозаміну (глюкозаміну гідрохлориду, глюкозаміну сульфату, N-ацетилглюкозаміну) та комбінації глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну з кверцетином при різних режимах введення на прояви загальнотоксичної дії доксорубіцину в умовах «in vivo».
2. Оцінити цитопротекторні властивості похідних глюкозаміну (глюкозаміну гідрохлориду, глюкозаміну сульфату, N-ацетилглюкозаміну) та комбінації глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну з кверцетином в умовах дестабілізуючого впливу доксорубіцину на клітини кісткового мозку щурів у дослідах «in vitro».
3. Вивчити детоксикуючу дію найбільш перспективних об'єктів за умов відтворення доксорубіцин-індукованої інтоксикації у щурів.
4. Оцінити антиапоптотичний потенціал найбільш перспективних об'єктів за вмістом антиапоптотичного білка bcl-2 у гепатоцитах в умовах доксорубіцинової інтоксикації у щурів.
5. Дослідити детоксикуючу дію найбільш перспективних об'єктів за умов відтворення циклофосфамід-індукованої інтоксикації у щурів.

6. Оцінити детоксикуючу дію найбільш перспективних об'єктів за умов відтворення метотрексат-індукованої інтоксикації у щурів.

*Об'єкт дослідження.* Токсичні ефекти протипухлинних препаратів.

*Предмет дослідження.* Фармакокорекція токсичних ефектів, що виникають при застосуванні протипухлинних препаратів, похідними глюкозаміну та їх комбінацією з кверцетином.

**Методи дослідження.** При виконанні роботи були використані фармакологічні, електрофізіологічні, біохімічні, гістоморфологічні, імуногістохімічні методи дослідження та методи математичної статистики.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше запропоновано підхід до створення засобів допоміжного супровідного лікування побічної дії протипухлинних препаратів на основі універсальних цитопротекторів природного походження. Порівняльна оцінка вираженості детоксикуючої дії похідних глюкозаміну та їх комбінації з кверцетином у скринінгових дослідженнях в умовах «in vivo» та «in vitro» дозволила виявити найбільш перспективні об'єкти в ряду: комбінація глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну з кверцетином > глюкозаміну гідрохлорид > N-ацетилглюкозамін > глюкозаміну сульфат. На підставі даних, отриманих у дослідах «in vitro» на клітинах кісткового мозку, розширені уявлення про цитопротекторний потенціал похідних глюкозаміну та їх комбінації з кверцетином. Показана здатність до стабілізації фізіологічного стану інтактних клітин та підвищення близько у 1,4 рази їх життєздатності на тлі дестабілізуючого впливу доксорубіцину. Отримані нові наукові дані щодо коригуючого впливу глюкозаміну гідрохлориду та комбінації глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну з кверцетином на перебіг цитостатик-індукованої токсичності (на тлі доксорубіцину, циклофосаміду, метотрексату) в експериментах на щурах. Встановлено зменшення під впливом досліджуваних об'єктів ознак токсичної гіпотрофії, що підтверджується відновленням білкового обміну, гальмуванням проявів цитолізу (достовірно зниження рівня гіперферментемії АсАТ та АлАТ у середньому в 1,6 рази), пригніченням процесу перекисного окиснення ліпідів (зниження рівня ТБК-активних продуктів у сироватці крові у середньому в 1,3 рази ( $p \leq 0,05$ )), морфологічними ознаками зменшення запалення та дистрофії, вірогідним зниженням летальності тварин у середньому в 2,25 рази (на моделі доксорубіцин-індукованої токсичності), зменшенням проявів імуносупресії (збільшення індексу фагоцитарної активності у середньому в 2,85 рази ( $p \leq 0,05$ )) на моделі циклофосамід-індукованої токсичності). Уточнені наукові дані про регулюючий вплив окремих похідних глюкозаміну та їх комбінації з кверцетином на процес доксорубіцин-індукованої загибелі клітин, опосередкований втручанням у bcl-2-залежні механізми контролю апоптозу (за достовірно значущим збільшенням кількості bcl-2-позитивних гепатоцитів у середньому в 1,3 та 8,4 рази при введенні доксорубіцину в дозах 10 та 20 мг/кг відповідно). Розширені наукові поняття про синергічну взаємодію глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну з кверцетином, що за сумарним рейтингом досліджених показників підтверджується більшою ефективністю рекомендованої комбінації порівняно з монокомпонентами за умов токсичної дії протипухлинних препаратів.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати дисертаційної роботи експериментально обґрунтовують доцільність розробки лікарського засобу на основі комбінації глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну з кверцетином. На сьогодні досліджена комбінація зареєстрована в Україні як дієтична добавка під назвою «Глюквамін» (висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи ДСЕС МОЗ України № 05.03.02-04/81151 від 05.08.2011 р.) та впроваджена у виробництво на ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ». Отримані дані є фрагментом доклінічного вивчення «Глюкваміну» як потенційного лікарського засобу метаболічної дії, що може застосовуватися з метою фармакологічної корекції токсичних ефектів протипухлинних препаратів. Узагальнені результати дослідження можуть бути використані для подальшого створення лікарських засобів, призначених для корекції токсичних ефектів цитостатиків, на основі метаболітів та речовин природного походження. Це дозволить оптимізувати підходи до профілактики та супровідної терапії типових токсичних ефектів протипухлинних препаратів.

Запропоновані способи фармакологічної корекції кардіотоксичної дії протипухлинних антибіотиків (інформаційний лист МОЗ України з проблеми «Фармація» № 59 – 2014, 2014 р.), а також гематотоксичної та імунодепресивної дії алкілюючих протипухлинних засобів (Патент України на корисну модель № 94718 від 25.11.2014 р.).

Результати роботи впроваджені у науково-педагогічний процес кафедр клінічної фармації, фармакотерапії і управління та економіки фармації факультету післядипломної освіти Запорізького державного медичного університету (протокол № 3 від 03.10.2015 р.), фармакології та медичної рецептури Харківського національного медичного університету (протокол № 5 від 12.10.2015 р.), клінічної фармації Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського (протокол № 3 від 28.10.2015 р.).

**Особистий внесок здобувача.** Робота виконана на базі кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації та ЦНДЛ НФаУ. Разом з науковим керівником визначені мета і завдання дослідження, розроблені методичні підходи, згідно з якими відібрані моделі та методи для виконання експериментальної частини дисертації. Особисто проведені: патентно-інформаційний пошук, експериментальні дослідження, статистична обробка, аналіз та систематизація отриманих результатів, сформульовані висновки дисертації. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертантом наведені результати власних експериментальних досліджень, прийнята участь в аналізі та узагальненні отриманих даних, у написанні статей.

Виконання гістологічних досліджень здійснювалось за консультативної допомоги ст. н. с. ЦНДЛ НФаУ, к. біол. н. Ю. Б. Лар'яновської. Імуногістохімічне дослідження проведено за консультативної допомоги лікаря вищої категорії О. О. Кошик. Дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи викладені та обговорені на VII Національному з'їзді фармацевтів України (Харків, 2010); XXVIII Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ліки –

людині. Сучасні проблеми створення, вивчення та апробації лікарських засобів» (Харків, 2011); IV Національному з'їзді фармакологів України (Київ, 2011); Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 2012); II Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике» (Алматы, 2013); VII Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю з клінічної фармакології «Клиническая фармакология и фармакотерапия заболеваний в свете доказательной медицины» (Вінниця, 2013); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Actual questions of development of new drugs» (Харків, 2014); VII науково-практичній Internet-конференції «Фармакоэкономика в Украине: стан та перспективи розвитку» (Харків, 2014); другій міжнародній науковій конференції молодих вчених та студентів «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (Шымкент, 2014); науково-практичній конференції «Интеграция образования, науки и производства в фармации» (Ташкент, 2014); міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Topical issues of new drugs development» (Харків, 2015).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 18 наукових праць: 6 статей у фахових виданнях, рекомендованих МОН України (з них 2 статті – у зарубіжних виданнях), отримано 1 патент України на корисну модель, видано 1 інформаційний лист МОЗ України та опубліковано 10 тез доповідей.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, чотирьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків та списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації складає 197 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 15 таблицями та 43 рисунками. Список використаних джерел літератури містить 274 найменування, з них 131 – кирилицею та 143 – латиною.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали та методи досліджень.** Об'єктами досліджень обрані похідні глюкозаміну (ГА), зокрема D-(+)-глюкозаміну гідрохлорид (ГА г/х) («Protein Chemicals Ltd», Японія), D-(+)-глюкозаміну сульфат («Protein Chemicals Ltd», Японія), N-ацетил-D-глюкозамін (N-ацГА) («Protein Chemicals Ltd», Японія), а також комбінація глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну з кверцетином (ГА г/х+N-ацГА+Кв) (ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», Україна).

Комбінацію ГА г/х+N-ацГА+Кв досліджували у вигляді капсульної маси дієтичної добавки «Глюквамін» (ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», Україна) зі співвідношенням діючих речовин 3:1 (аміноцукри склали рівні частини обох похідних ГА). Як препарат порівняння в усіх серіях дослідів використовували препарат «Гранули кверцетину» (ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», Україна).

Фармакологічні дослідження проведені на 240 безпородних мишах та 285 безпородних щурах, які були вирощені у розпліднику ЦНДЛ НФаУ (посвідчення ДЕЦ МОЗ України № 21 від 30.04.2009 р.). Всі тварини утримувались у відповідних умовах на стандартному харчовому раціоні згідно з санітарно-гігієнічними нормами

(Ю. М. Кожем'якін та співавт., 2002). При роботі з тваринами дотримувались «Загальних етичних принципів експерименту на тваринах», що узгоджені з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Дотримання біоетичних норм засвідчено висновком комісії з біоетики Національного фармацевтичного університету (протокол № 12 від 17.12.2014 р.).

У рамках фармакологічного скринінгу визначення коригуючого впливу похідних ГА та комбінації ГА г/х+N-ацГА+Кв щодо загальнотоксичної дії протипухлинного антибіотика доксорубіцину (ДОКС) здійснювали в дослідах на мишах при двох режимах введення – лікувальному та лікувально-профілактичному. У дослідженні використовували ГА г/х, ГА сульфат, N-ацГА в умовно-терапевтичній дозі 50 мг/кг (И. А. Зупанец, 1993) та комбінацію ГА г/х+N-ацГА+Кв в умовно-терапевтичній дозі 82 мг/кг у перерахунку на капсульну масу (К. О. Зупанець, 2011). Препарат порівняння «Гранули кверцетину» вводили тваринам у дозах 11 (виходячи з максимальної добової терапевтичної дози для людини відповідно до інструкції у перерахунку на щурів) та 20,5 мг/кг (К. О. Зупанець, 2011). Модель відтворювали шляхом внутрішньоочеревинного введення «Доксорубіцин-КМП» (ПАТ «Київмедпрепарат», Україна) в дозі 20 мг/кг одноразово (Abdel-Moneim M. Osman et al., 2013). Спостереження здійснювали протягом 3 тижнів. Показниками ефективності досліджуваних об'єктів були виживаність мишей (%), що оцінювали на момент загибелі усіх тварин контрольної групи та на кінець експерименту, їх загальний стан, масові коефіцієнти внутрішніх органів (серця, легенів і печінки, %) (А. В. Стефанов и соавт., 2002).

В умовах «in vitro» проводили порівняльне вивчення цитопротекторної дії похідних ГА та комбінації ГА г/х+N-ацГА+Кв на інтактні клітини кісткового мозку щурів, а також на тлі дестабілізуючого впливу ДОКС за валідованою методикою (В. Є. Доброва та співавт., 2011). Діапазон концентрацій досліджуваних об'єктів – 10-100 мкг/мл (Н. А. Корж и соавт., 2007). Ефективність досліджуваних об'єктів оцінювали за середньою часткою мертвих клітин кісткового мозку щурів у пробах (%). Середню частку мертвих клітин кісткового мозку щурів в кожній пробі розраховували через 30 хвилин після впливу досліджуваних об'єктів за відповідною формулою (В. Є. Доброва та співавт., 2011).

На наступних етапах досліджень проводили поглиблене фармакологічне вивчення детоксуючої дії найефективніших об'єктів – ГА г/х (50 мг/кг) та комбінації ГА г/х+N-ацГА+Кв (82 мг/кг) – на тлі токсичного впливу протипухлинних препаратів з різних груп: антибіотика ДОКС, алкілюючого цитостатика циклофосфаміду (ЦФ), антиметаболіту метотрексату (МТ).

Доксорубіцинову інтоксикацію у щурів відтворювали внутрішньоочеревинним введенням «Доксорубіцин-КМП» (ПАТ «Київмедпрепарат», Україна) у дозі 5 мг/кг один раз на тиждень протягом чотирьох тижнів (Т. С. Трофімова, 2008). Досліджувані об'єкти вводили щоденно внутрішньошлунково протягом чотирьох тижнів, починаючи з першого дня введення ДОКС. Виживаність (%), загальний стан тварин, динаміку їх маси тіла, масові коефіцієнти внутрішніх органів (серця, печінки, нирок, %) визначали як у попередньому дослідженні на мишах.



В ході дослідження за допомогою біохімічних наборів фірми «Lachema» (Чеська Республіка) визначали активність аспаратамінотрансферази (АсАТ), аланінамінотрансферази (АлАТ), лактатдегідрогенази (ЛДГ), вміст сечовини, загального білка та рівень глюкози сироватки крові. Для оцінки інтенсивності перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) визначали вміст ТБК активних продуктів (ТБК-АП) – як у сироватці крові, так і у тканинах печінки та міокарду (И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили, 1977).

Дослідження ЕКГ проводили у II стандартному відведенні з використанням електрокардіографа ЕК1Т-03М (Н. Н. Каркищенко и соавт., 2010).

Гістологічні дослідження структури внутрішніх органів (серця, печінки, нирок, селезінки, тимусу) на усіх етапах поглибленого вивчення (доксорубіцин-, циклофосфамід-, метотрексат-індукована токсичність) здійснювали за допомогою стандартних методів світлової мікроскопії (Ю. И. Афанасьев, 2013).

Антиапоптотичний потенціал обраних об'єктів оцінювали в умовах доксорубіцинової інтоксикації у щурів у дозах 10 (перша серія дослідів) та 20 мг/кг (друга серія) (ДОКС вводили одноразово внутрішньоочеревинно на 8 день експерименту) (F. Zolfagharzadeh, V. D. Roshan, 2013; Abdel-Moneim M. Osman, 2013). Тварини отримували досліджувані об'єкти щодня внутрішньошлунково протягом 10 діб. Гістологічні дослідження структури печінки щурів проводили вищеописаним методом. Оцінку апоптозу в препаратах проводили імуногістохімічним методом (ІГХ) за визначенням кількості bcl-2-позитивних клітин, що припадали на 1000 гепатоцитів, і виражали у %. Після попередньої обробки зрізів вивчення препаратів в світлі проводили на дослідному мікроскопі Olympus AX70 (Японія) з цифровою відеокамерою Olympus DP50, з'єднаною з персональним комп'ютером. Мікрофотографування і морфометричне вивчення препаратів виконано з використанням програми AnalySIS Pro 3.2 (фірма «SoftImaging», Німеччина) відповідно до рекомендацій виробника програмного забезпечення.

Циклофосфамідну інтоксикацію у щурів моделювали внутрішньом'язовим введенням «Циклофосфан-КМП» (ПАТ «Київмедпрепарат», Україна) у дозі 10 мг/кг щоденно протягом тижня (сумарно за 7 діб 70 мг/кг), починаючи з 8 доби дослідження (Р. Ф. Єрьоменко, 2012). Тварини отримували досліджувані об'єкти щоденно внутрішньошлунково протягом двох тижнів. Загальний стан тварин, динаміку їх маси тіла, масові коефіцієнти внутрішніх органів (печінки, селезінки, тимусу, %), біохімічні показники (активність АсАТ, АлАТ, концентрацію сечовини, вміст загального білка та ТБК-АП сироватки крові) визначали як у попередньому експерименті з доксорубіциновою інтоксикацією. Активність  $\gamma$ -глутамілтрансферази (ГГТ) визначали за допомогою біохімічного набору фірми «Lachema» (Чеська Республіка). Вміст у крові відновленого глутатіону (ВГ) визначали спектрофотометричним методом з реактивом Елмана (С. С. Чернадчук и соавт., 2010).

Клінічний аналіз периферичної крові та лейкоцитарної формули проводили загальноприйнятими методами (В. С. Камышников, 2013). Фагоцитарну активність нейтрофілів оцінювали за фагоцитарним індексом (ФІ), фагоцитарним числом (ФЧ) та індексом фагоцитарної активності (ІФА) (В. В. Меньшиков и соавт., 1987). Циркулюючі імунні комплекси (ЦІК) визначали методом преципітації з розчином

поліетиленгліколя, а визначення білкових фракцій сироватки крові проводили методом електрофорезу (В. В. Меньшиков и соавт., 1987).

Інтоксикацію метотрексатом у щурів викликали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням «Метотрексат «Ебеве» («EBEWE Pharma», Австрія) у дозі 20 мг/кг на 8 добу дослідження (N. Vardi et al., 2010). Досліджувані об'єкти вводили тваринам щоденно внутрішньошлунково протягом 10 діб. Загальний стан тварин, динаміку їх маси тіла, масові коефіцієнти внутрішніх органів (печінки, селезінки, тимусу) (%), клінічний аналіз периферичної крові та лейкоцитарної формули, біохімічні показники (активність АсАТ, АлАТ, концентрацію сечовини, вміст загального білка та ТБК-АП сироватки крові) визначали як у попередніх експериментах на щурах. Активність лужної фосфатази (ЛФ) визначали за допомогою біохімічного набору фірми «Lachema» (Чеська Республіка).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили методами описової статистики та порівняльних методів аналізу з використанням t-критерію Ст'юдента, непараметричного критерію Крускала-Волліса, методу порівняння частот бінарної ознаки в двох незалежних групах за допомогою комп'ютерних програм Statistika 6.0 та MS Excel 2007 (О. Ю. Реброва, 2006) і представляли у вигляді порівняльних таблиць із результатами різних груп.

**Результати досліджень та їх обговорення.** У скринінгових дослідженнях «in vivo» (на мишах) на тлі доксорубіцинової інтоксикації похідні глюкозаміну та комбінація глюкозаміну гідрохлориду і N-ацетилглюкозаміну з кверцетином в умовах лікувального і лікувально-профілактичного введення чинили детоксикуючу дію, що виявлялася достовірним підвищенням виживаності тварин (до 40 %) та вірогідним зменшенням масових коефіцієнтів їх внутрішніх органів порівняно з групою контрольної патології. За ефективністю коригуючої дії досліджувані об'єкти розташовували у наступному ряду: комбінація ГА г/х+N-ацГА+Кв > ГА г/х > N-ацГА > ГА сульфат.

У дослідженнях в умовах «in vitro» досліджувані об'єкти (за виключенням ГА сульфату та N-ацГА) у діапазоні концентрацій від 10 до 100 мкг/мл не чинили цитотоксичної дії на інтактні клітини кісткового мозку щурів, що підтверджувалося невірогідною ( $p > 0,05$ ) розбіжністю середньої частки мертвих клітин відносно інтактною проби.

В умовах дестабілізуючого впливу ДОКС у концентрації  $LC_{50}$  (1,7 мг/мл) досліджувались ГА г/х та комбінація ГА г/х+N-ацГА+Кв як найбільш ефективні сполуки, визначені у досліді на інтактних клітинах. Доведено, що ГА г/х та комбінація ГА г/х+N-ацГА+Кв нівелювали цитотоксичну дію цитостатика, вірогідно зменшуючи середню частку мертвих клітин кісткового мозку щурів у середньому в 1,5 та 1,2 разу відносно проби з додаванням тільки ДОКС у концентрації  $LC_{50}$  (рис. 1). Досліджувані об'єкти у діапазоні концентрацій 10-100 мкг/мл нівелювали цитотоксичну дію ДОКС, а визначена залежність «концентрація-цитопротекторна дія» носила оборотнопропорційний характер.

За результатами скринінгових досліджень для подальшого поглибленого фармакологічного вивчення були обрані ГА г/х та комбінація ГА г/х+N-ацГА+Кв.

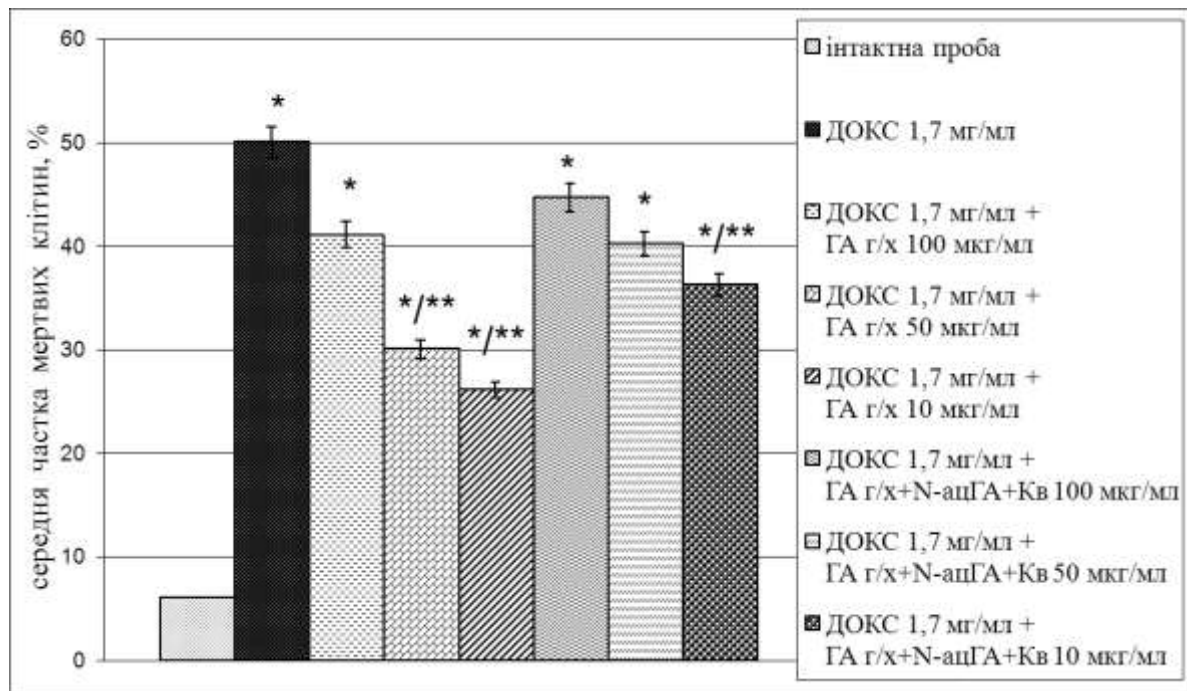


Рис. 1. Вплив досліджуваних об'єктів на життєздатність клітин кісткового мозку щурів в умовах дестабілізуючої дії ДОКС ( $LC_{50} = 1,7$  мг/мл)

Примітки:

1. \* – достовірність відносно інтактної проби ( $p \leq 0,05$ );
2. \*\* – достовірність відносно проби  $LC_{50}$  ДОКС ( $p \leq 0,05$ ).

На першому етапі поглибленого дослідження вивчали коригуючий вплив обраних об'єктів в умовах доксорубіцинової інтоксикації у щурів. Відтворена у наших дослідах ДОКС-індукована патологія за картиною ушкодження відповідала даним, описаним у літературі, зокрема відносно кардіотоксичної та гепатотоксичної дії ДОКС (Т. С. Трофімова, 2008; A. Pieniżek et al., 2013; I. Salouge et al., 2014; G. Damodar et al., 2014). У групі тварин контрольної патології відзначали високий рівень летальності щурів (40 %), вірогідне зростання масових коефіцієнтів внутрішніх органів, активацію процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), порушення метаболічних функцій, дистрофічні зміни гістоструктури внутрішніх органів (печінки, серця, нирок, тимусу, селезінки). Зміни ЕКГ показників підтверджували зниження скорочувальної активності та розвиток ішемії міокарду під впливом цитостатика, що разом із дистрофічними змінами гістоструктури серця відповідало картині доксорубіцинової кардіоміопатії.

Під впливом ГА г/х та комбінації ГА г/х+N-ацГА+Кв знижувалась летальність щурів (відповідно у 1,5 та 3 рази), вірогідно зменшувалися значення їх масових коефіцієнтів серця, печінки, нирок. Досліджувані сполуки достовірно знижували рівень ТБК-АП сироватки крові, тканин міокарду та печінки відносно аналогічних показників у групі щурів контрольної патології (досліджувана комбінація – в 1,2, 1,8 та 1,8 рази, а ГА г/х – в 1,2, 1,6 та 1,5 рази відповідно) (рис. 2).

Введення тваринам комбінації ГА г/х+N-ацГА+Кв призводило до вірогідного зниження активності ферментів АсАТ, АлАТ та ЛДГ відповідно в 2,1, 1,8 та 1,3 рази, а ГА г/х – в 1,6, 1,5 та 1,3 рази відносно групи контрольної патології (рис. 3).

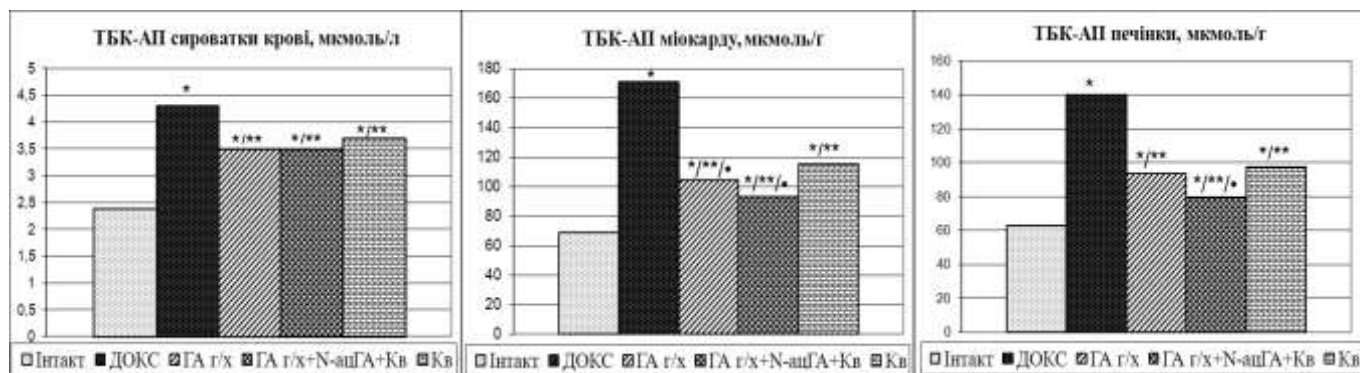


Рис. 2. Вміст ТБК-АП у сироватці крові, тканинах міокарду та печінки щурів на тлі доксорубіцинової інтоксикації

Примітки:

1. \* – достовірність відносно інтактної групи ( $p \leq 0,05$ );
2. \*\* – достовірність відносно групи контрольної патології ( $p \leq 0,05$ );
3. • – достовірність відносно групи Кв ( $p \leq 0,05$ ).

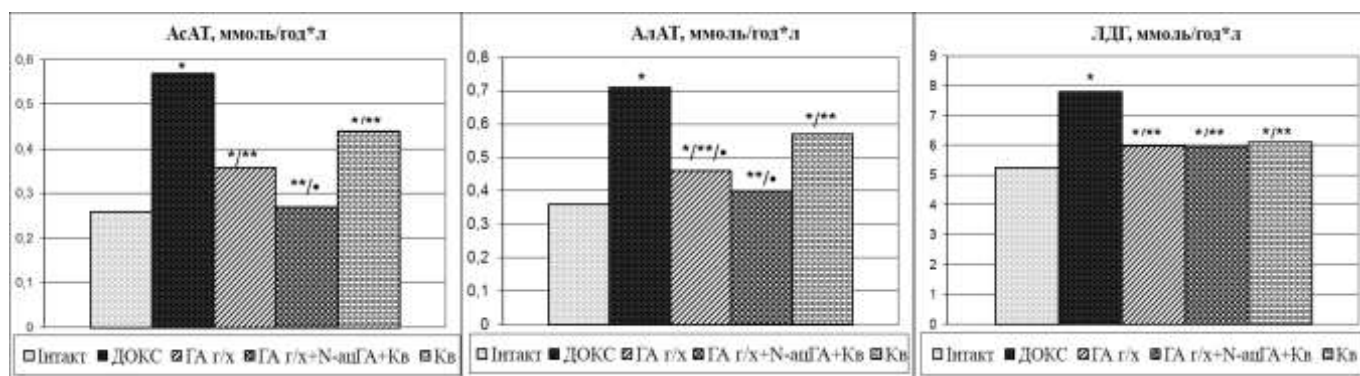


Рис. 3. Активність ферментів у сироватці крові щурів на тлі доксорубіцинової інтоксикації

Примітки:

1. \* – достовірність відносно інтактної групи ( $p \leq 0,05$ );
2. \*\* – достовірність відносно групи контрольної патології ( $p \leq 0,05$ );
3. • – достовірність відносно групи Кв ( $p \leq 0,05$ ).

Застосування досліджуваних об'єктів сприяло зростанню вмісту загального білка в 1,1 разу відносно такого у групі щурів контрольної патології. Концентрація сечовини у групах тварин, які отримували комбінацію ГА г/х+N-ацГА+Кв та ГА г/х була вищою відповідно в 1,2 і 1,1 разу відносно групи нелікованих щурів. Вміст глюкози у сироватці крові щурів, які одержували досліджувану комбінацію та ГА г/х вірогідно знижувався в 1,1 разу відносно такого у групі тварин контрольної патології (рис. 4).

Під впливом досліджуваних об'єктів спостерігали нормалізацію скорочувальної функції серцевого м'язу та антиішемічну активність (зменшення підйому сегменту ST від ізолінії).

Позитивні зміни біохімічних та ЕКГ-показників підтверджувалися результатами гістологічних досліджень. Глюкозаміну гідрохлорид та комбінація ГА г/х+N-ацГА+Кв зменшували негативні прояви морфологічних ознак токсичної

дії цитостатика на органи детоксикації (печінку, нирки), серцевий м'яз, гальмували ступінь органного дефекту тимусу, сприяли відновленню у селезінці більш повноцінної лімфоїдної тканини. За більшістю досліджених показників комбінація ГА г/х+N-ацГА+Кв виявила більшу ефективність у порівнянні з ГА г/х та препаратом порівняння Кв.

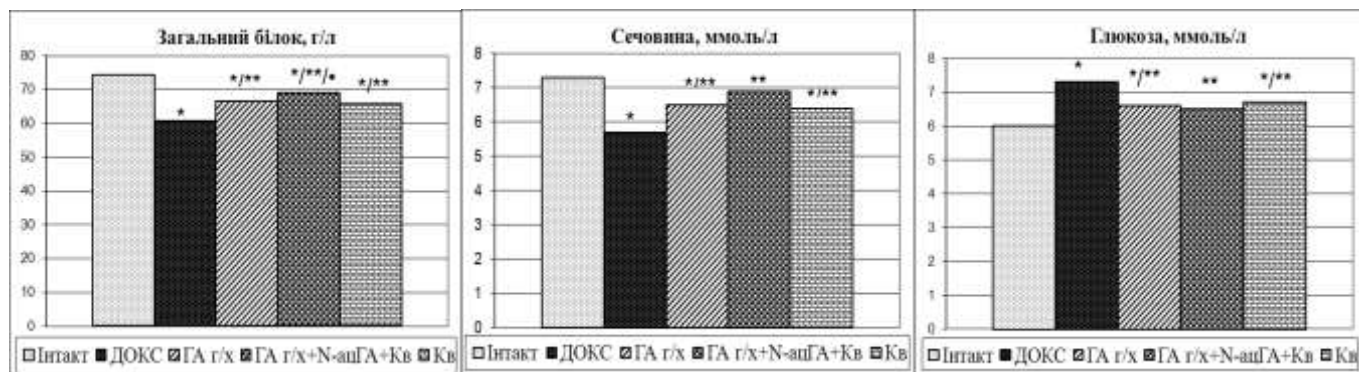


Рис. 4. Вміст загального білка, концентрація сечовини та вміст глюкози у сироватці крові щурів на тлі доксорубіцинової інтоксикації

Примітки:

1. \* – достовірність відносно інтактної групи ( $p \leq 0,05$ );
2. \*\* – достовірність відносно групи контрольної патології ( $p \leq 0,05$ );
3. • – достовірність відносно групи Кв ( $p \leq 0,05$ ).

У дослідях з вивчення антиапоптотичного потенціалу встановлено, що застосування ГА г/х та комбінації ГА г/х+N-ацГА+Кв на тлі токсичної дії ДОКС достовірно збільшувало кількість bcl-2-позитивних гепатоцитів відповідно у 1,2 та 1,4 рази (в дозі ДОКС 10 мг/кг) і у 7 та 9,8 рази (в дозі ДОКС 20 мг/кг) у порівнянні з аналогічним показником у групі нелікованих тварин, та опосередковано свідчило про посилення експресії антиапоптотичного білка bcl-2 (рис. 5).

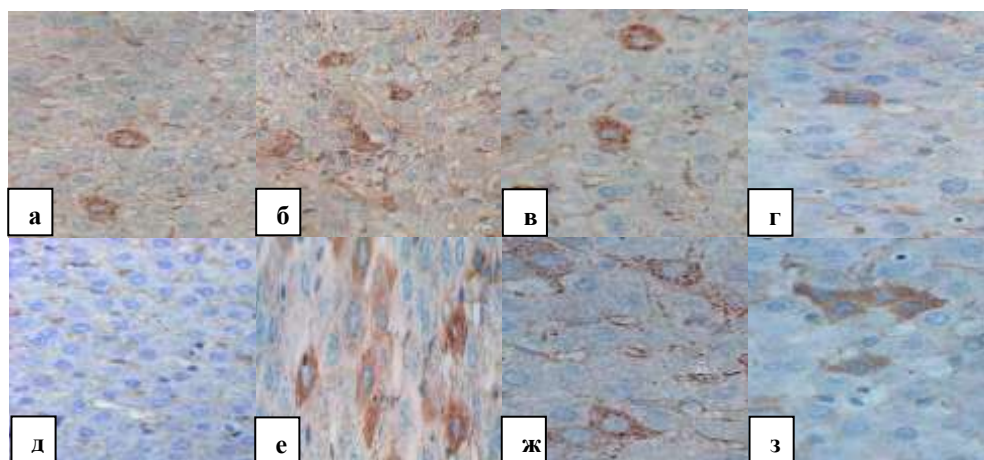


Рис. 5. Печінка: а – щура після введення ДОКС у дозі 10 мг/кг; б, в, г – щурів, які на тлі ДОКС у дозі 10 мг/кг отримували комбінацію ГА г/х+N-ацГА+Кв (б), ГА г/х (в) та Кв (г), д – щура після введення ДОКС у дозі 20 мг/кг; е, ж, з – щурів, які на тлі ДОКС у дозі 20 мг/кг отримували комбінацію ГА г/х+N-ацГА+Кв (е), ГА г/х (ж), Кв (з). ІГХ, фарбування на білок bcl-2. Зб. 400.

На подальшому етапі поглиблених досліджень вивчали детоксикуючий вплив сполук-лідерів за умов розвитку циклофосфамід-індукованої токсичності у щурів. Змодельована інтоксикація виявлялася вірогідним зниженням маси тіла щурів, змінами значень масових коефіцієнтів внутрішніх органів-мішеней, пригніченням лейкопоезу, проявами імуносупресії, активацією процесів ПОЛ, виразною гіперферментемією, розладами білкового обміну у бік катаболічних процесів, некротичними, гіпопластичними змінами печінки, тимусу та селезінки, що узгоджувалося з відомими даними літератури щодо виразної гематотоксичної та імуносупресивної дії ЦФ (Е. А. Сафонова и соавт., 2011; Р. Ф. Єрьоменко, 2012).

Введення ГА г/х та комбінації ГА г/х+N-ацГА+Кв сприяло поліпшенню загального стану тварин про що свідчили стабільність їх маси тіла та нормалізація масових коефіцієнтів внутрішніх органів. Під впливом досліджуваних сполук спостерігалось відновлення лейкоцитарного паростка кровотворення, що підтверджувалося зменшенням лейкопенії (збільшення кількості лейкоцитів відповідно у 1,7 (для ГА г/х) та 2,4 рази (для комбінації ГА г/х+N-ацГА+Кв). Специфічними були зміни у стані імунної системи, що є характерним для токсичної дії ЦФ. Глюкозаміну гідрохлорид і комбінація ГА г/х+N-ацГА+Кв відновлювали імунний захист тварин на тлі імуносупресії про що свідчило збільшення ІФА (у 2,6 та 3,1 разу відповідно) та ЦК (у 1,3 та 1,7 разу) відносно аналогічних показників у групі щурів контрольної патології. Такі результати узгоджуються з даними інших авторів щодо впливу ГА та Кв на різні ланки імунної відповіді (И.А. Зупанец и соавт., 2002; В. О. Туляков, К. О. Зупанець, С. К. Шебеко, 2009; S. Merzoug et al., 2014).

Введення ГА г/х та досліджуваної комбінації пригнічувало процеси ПОЛ (зниження рівня ТБК-АП сироватки крові відповідно у 1,3 та 1,4 рази), підвищувало ступінь антиоксидантного захисту (АОЗ) тварин (збільшення вмісту ВГ сироватки крові відповідно у 1,2 рази), знижувало гіперактивність маркерів цитолізу (у середньому в 1,3 рази), зменшувало гіпопротеїнемію та нормалізувало концентрацію сечовини відносно таких показників у щурів контрольної групи (рис. 6, 7).

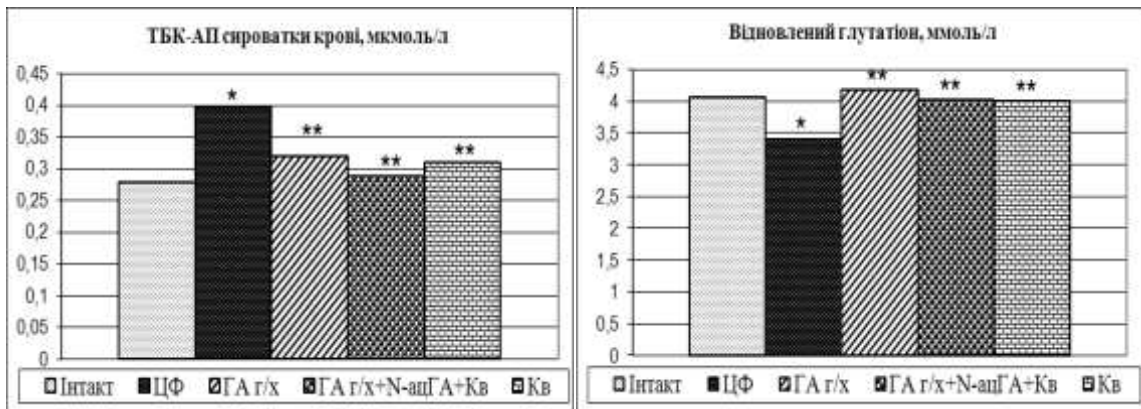


Рис. 6. Вміст ТБК-АП та ВГ у сироватці крові щурів на тлі циклофосфамідної інтоксикації

Примітки:

1. \* – достовірність відносно інтактної групи ( $p \leq 0,05$ );
2. \*\* – достовірність відносно групи контрольної патології ( $p \leq 0,05$ ).



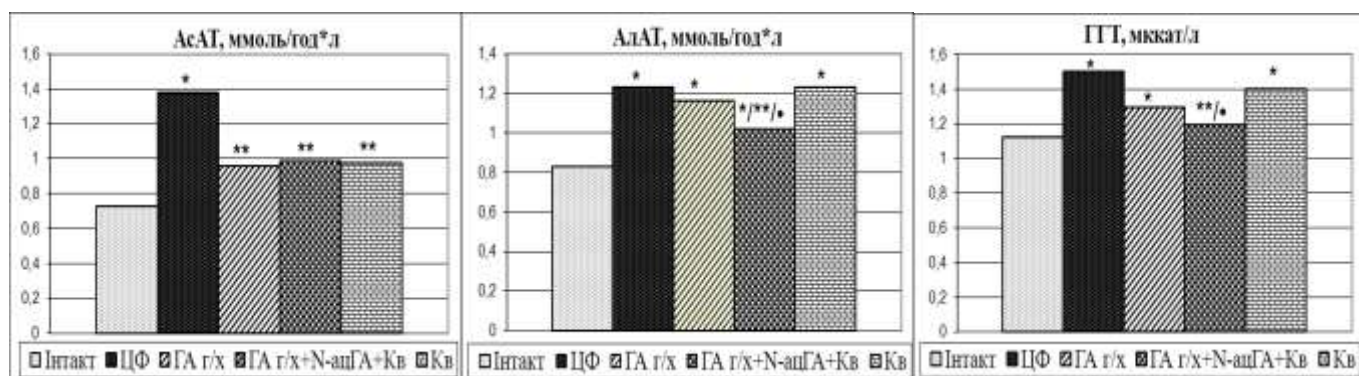


Рис. 7. Активність ферментів у сироватці крові щурів на тлі циклофосфамідної інтоксикації

Примітки:

1. \* – достовірність відносно інтактної групи ( $p \leq 0,05$ );
2. \*\* – достовірність відносно групи контрольної патології ( $p \leq 0,05$ );
3. • – достовірність відносно групи Кв ( $p \leq 0,05$ ).

Результати гістологічних досліджень показали, що введення ГА г/х та комбінації ГА г/х+N-адГА+Кв зменшувало токсичний вплив цитостатика на печінку, знижувало ступінь реактивних змін у тимусі та сприяло зменшенню гіпоплазії білої пульпи селезінки. За сумарним рейтингом досліджених показників детоксуюча дія комбінації ГА г/х+N-адГА+Кв перевершувала таку ГА г/х та Кв.

Коригуючий вплив об'єктів-лідерів досліджували також за умов інтоксикації щурів метотрексатом (МТ). Метотрексат-індукована інтоксикація виявлялася змінами значень масових коефіцієнтів внутрішніх органів, пригніченням лейкопоезу, проявами імуносупресії, активацією процесів ПОЛ, підвищенням активності індикаторних ферментів цитолізу, розвитком гіпопротеїнемії, гіпопластичними, гемодинамічними та дистрофічними змінами органів-мішеней, що повністю відповідало даним, описаним у літературі відносно виразної гепатотоксичної дії МТ (N. Vardi et al., 2010; О. В. Калинина, 2011; Д. А. Лисенко, І. І. Данилюк, 2013).

Введення досліджуваної комбінації сприяло нормалізації масових коефіцієнтів внутрішніх органів щурів відносно таких у тварин, які отримували МТ (вірогідне зростання масових коефіцієнтів тимусу та селезінки відповідно в 1,3 та 1,1 разу та зниження масового коефіцієнту печінки в 1,1 разу). У тварин, які отримували ГА г/х, масовий коефіцієнт тимусу достовірно збільшувався в 1,2 разу, а масові коефіцієнти печінки та селезінки не мали достовірно значущих змін з аналогічними показниками у групі нелікованих тварин.

Під впливом ГА г/х та комбінації ГА г/х+N-адГА+Кв спостерігалось зменшення рівня лейкопенії (достовірне збільшення кількості лейкоцитів відповідно в 1,3 та 1,5 разу відносно тварин групи контрольної патології). Про пригнічення активності процесів ПОЛ на тлі введення ГА г/х та комбінації ГА г/х+N-адГА+Кв свідчило вірогідне зниження рівня ТБК-АП сироватки крові в 1,3 рази відносно групи контрольної патології (рис. 8). Введення ГА г/х та досліджуваної комбінації зменшувало цитолітичні процеси та явища холестазу, що відображалось достовірним зниженням рівня відповідних маркерних ферментів (AsAT – у 1,3 та 1,4 рази

відповідно, АлАТ – у 1,8 рази, ЛФ – у 1,8 та 1,9 рази відносно нелікованих тварин) (рис. 8). Застосування ГА г/х та комбінації ГА г/х+N-ацГА+Кв також вірогідно зменшувало гіпопротеїнемію та нормалізувало концентрацію сечовини відносно групи контрольної патології.

Гістологічно під впливом ГА г/х та комбінації ГА г/х+N-ацГА+Кв відзначалось зменшення запально-дистрофічних та підвищення активності регенераційних процесів у печінці, покращення структурно-функціонального стану тимусу та селезінки відносно тварин контрольної групи.

За більшістю вивчених показників комбінація ГА г/х+N-ацГА+Кв виявляла більш виразну коригуючу дію, що перевершувала аналогічну у ГА г/х та Кв.

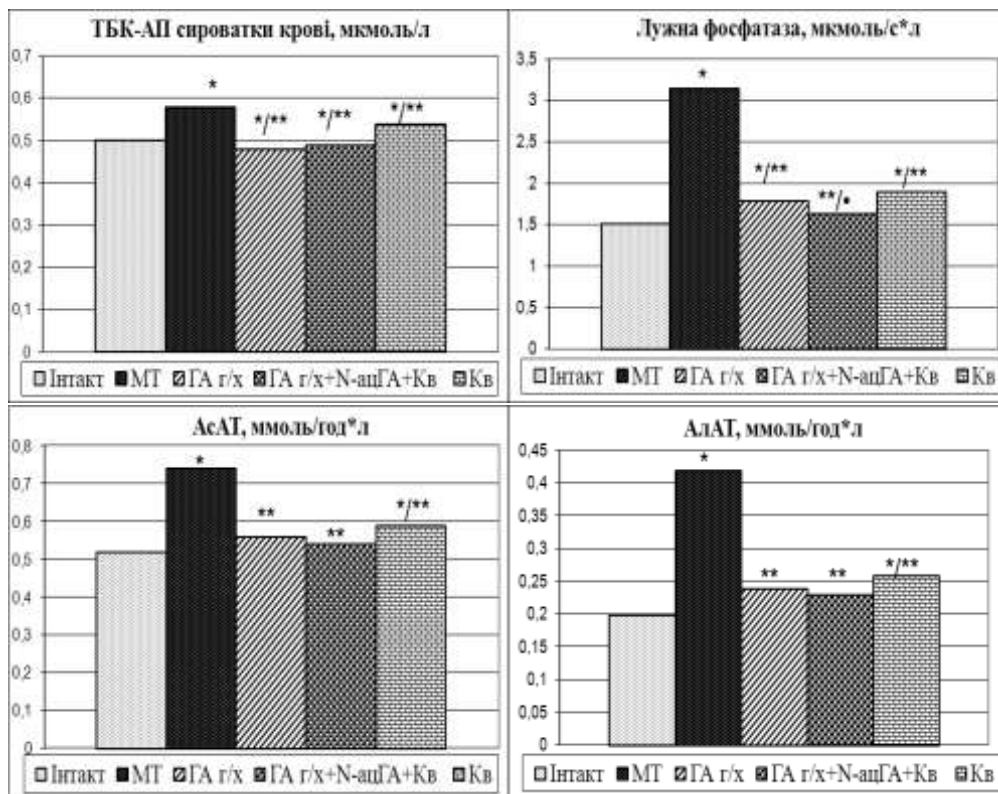


Рис. 8. Вміст ТБК-АП та активність ферментів у сироватці крові щурів на тлі метотрексат-індукованої інтоксикації

Примітки:

1. \* – достовірність відносно інтактної групи ( $p \leq 0,05$ );
2. \*\* – достовірність відносно групи контрольної патології ( $p \leq 0,05$ );
3. • – достовірність відносно групи Кв ( $p \leq 0,05$ ).

Таким чином, поєднання похідних глюкозаміну з кверцетином дозволяє впливати на більшість ланок патогенезу розвитку токсичних ефектів протипухлинних препаратів з різними механізмами дії (антибіотика доксорубіцину, алкілюючого цитостатика циклофосфаміду, антиметаболіту метотрексату). Ефективність комбінації глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну з кверцетином обумовлюється наявністю різноманітних складових у механізмі дії, таких як антиоксидантної, антицитолітичної, мембраностабілізуючої, анаболічної, імунонотропної, антиапоптоїчної, протизапальної тощо.



## ВИСНОВКИ

Проведення допоміжної супровідної терапії побічних ефектів протипухлинних препаратів є одним із сучасних підходів до оптимізації та підвищення ефективності лікування захворювань, що супроводжуються надлишковою проліферацією клітин. Однак існуючі на фармацевтичному ринку України лікарські засоби для корекції цитотоксичної дії протипухлинних препаратів, незважаючи на ефективність, мають вузький спектр органотропної дії та не позбавлені побічних ефектів.

Необхідність пошуку універсальних модифікаторів цитотоксичної дії протипухлинних препаратів сприяла експериментальному вивченню та обґрунтуванню доцільності застосування похідних глюкозаміну та їх комбінації з кверцетином для корекції токсичних ефектів протипухлинних препаратів. Завдяки фармакодинамічним властивостям, доведеному синергізму та потенціюванню фармакологічних ефектів похідних глюкозаміну та кверцетину їх комбінація є перспективною для супровідної терапії під час лікування цитостатичними препаратами.

1. На тлі доксорубіцинової інтоксикації у мишей похідні глюкозаміну та комбінація глюкозаміну гідрохлориду і N-ацетилглюкозаміну з кверцетином в умовах лікувального та лікувально-профілактичного введення чинять детоксикуючу дію, що виявляється достовірним підвищенням виживаності тварин від 33,34 до 40 % та вірогідним зменшенням масових коефіцієнтів їх внутрішніх органів порівняно з нелікованими тваринами. За ефективністю досліджувані об'єкти розташовуються в наступному ряду: комбінація глюкозаміну гідрохлориду і N-ацетилглюкозаміну з кверцетином > глюкозаміну гідрохлорид > N-ацетилглюкозамін > глюкозаміну сульфат.

2. В умовах «in vitro» похідні глюкозаміну (окрім глюкозаміну сульфату та N-ацетилглюкозаміну у концентрації 100 мкг/мл) та комбінація глюкозаміну гідрохлориду і N-ацетилглюкозаміну з кверцетином не чинять цитотоксичної дії на інтактні клітини кісткового мозку щурів у діапазоні концентрацій від 10 до 100 мкг/мл. Досліджувані об'єкти нівелюють дестабілізуючий вплив доксорубіцину в концентрації  $LC_{50}$  (1,7 мг/мл) на клітини кісткового мозку щурів, вірогідно збільшуючи частку живих клітин у середньому в 1,4 разу ( $p \leq 0,05$ ) відносно контрольної проби.

3. Глюкозаміну гідрохлорид та комбінація глюкозаміну гідрохлориду і N-ацетилглюкозаміну з кверцетином чинять виражену захисну дію щодо проявів загальнотоксичної дії доксорубіцину в експерименті на щурах, що підтверджується зниженням летальності тварин у 1,5 та 3 рази відповідно, покращенням їх загального стану, пригніченням процесів ПОЛ (зниження вмісту ТБК-АП у середньому в 1,5 рази ( $p \leq 0,05$ ), зменшенням гіпертрансаміназемії у середньому в 1,75 рази ( $p \leq 0,05$ ), відновленням метаболічних функцій печінки, нормалізацією електрофізіологічного стану міокарду, а також зменшенням дистрофічних змін у гістологічній картині внутрішніх органів лікованих тварин відносно контрольної групи. За сумарним рейтингом досліджених показників найбільш значущу коригуючу дію виявила комбінація аміноцукрів глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну з кверцетином.

4. В умовах доксорубіцинової інтоксикації у щурів доведено регулюючий вплив

глюкозаміну гідрохлориду та комбінації глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну з кверцетином на процес апоптозу, що відбивається достовірно значущим збільшенням кількості bcl-2-позитивних гепатоцитів у середньому в 1,3 та 8,4 рази (при введенні цитостатика в дозах 10 та 20 мг/кг відповідно) у порівнянні з аналогічним показником в уражених тварин і опосередковано свідчить про регулюючий вплив на bcl-2-залежні механізми загибелі клітин.

5. За умов циклофосфамідної інтоксикації у щурів застосування глюкозаміну гідрохлориду та комбінації глюкозаміну гідрохлориду і N-ацетилглюкозаміну з кверцетином зменшує загальнотоксичні прояви цитостатика, що відображається стабілізацією загального стану та маси тіла тварин, відновленням лейкопоезу та обох ланок імунної системи (достовірне збільшення індексу фагоцитарної активності у середньому в 2,8 рази та рівня циркулюючих імунних комплексів у середньому в 1,5 рази), збалансуванням показників ПОЛ/АОЗ, вірогідним зменшенням гіпертрансаміназемії, відновленням метаболічних функцій печінки, підвищенням інтенсивності компенсаторних та регенераторних процесів у тканинах печінки, тимусу, селезінки порівняно з групою нелікованих тварин. За більшістю вивчених показників досліджувана комбінація перевершує коригуючу дію як глюкозаміну гідрохлориду, так і препарату порівняння кверцетину.

6. Використання глюкозаміну гідрохлориду та комбінації глюкозаміну гідрохлориду і N-ацетилглюкозаміну з кверцетином на тлі інтоксикації метотрексатом нівелює загальнотоксичний вплив цитостатика на організм щурів, що віддзеркалюється поліпшенням загального стану тварин, покращенням гематологічних показників (вірогідне зменшення лейкопенії), пригніченням процесів ПОЛ (вірогідне зниження рівня ТБК-АП сироватки крові у 1,3 разу), зменшенням проявів цитолізу та холестази (зниження активності амінотрансфераз у середньому в 1,6 разу, лужної фосфатази – у 1,9 разу ( $p \leq 0,05$ ), відновленням білкового обміну, покращенням структурно-функціонального стану печінки, тимусу та селезінки відносно контрольної групи. Найбільшу ефективність виявила комбінація похідних глюкозаміну з кверцетином, що переважала за вираженістю дії глюкозаміну гідрохлорид та кверцетин.

7. Отримані результати виступають експериментальним обґрунтуванням подальшого пошуку засобів допоміжного лікування побічних ефектів протипухлинних препаратів серед засобів природного походження. Комбінація глюкозаміну гідрохлориду і N-ацетилглюкозаміну з кверцетином є перспективним об'єктом для подальшого доклінічного, клінічного вивчення та впровадження у практичну медицину як модифікатора токсичної дії протипухлинних препаратів для підвищення ефективності та безпеки лікування захворювань, що супроводжуються надлишковою проліферацією клітин.

## **СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Можливості корекції токсичних ефектів протипухлинного антибіотика доксорубіцина похідними глюкозаміну та їх комбінаціями / І. А. Зупанець, К. В. Ветрова, Т. С. Сахарова, Е. Л. Торянік // Український біофармацевтичний журнал. – 2013. – № 4 (27). – С. 87-90 (*особистий внесок здобувача: участь в*

*експерименті, аналіз даних, підготовка статті).*

2. Експериментальне вивчення гепатотропної дії похідних глюкозаміну та їх комбінацій з кверцетином в умовах циклофосфанової інтоксикації у щурів / І. А. Зупанець, К. В. Ветрова, Т. С. Сахарова, С. В. Місюрьова // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: збірник наукових праць. – Київ; Луганськ, 2013. – Випуск 6 (120). – С. 174-183 (*особистий внесок здобувача: участь в експерименті, аналіз даних, підготовка статті*).
3. Корекція доксорубіциніндукованої гепатотоксичності похідними глюкозаміну та їх комбінаціями з кверцетином в експерименті на щурах / І. А. Зупанець, К. В. Ветрова, Т. С. Сахарова, Р. В. Деркач // Клінічна фармація. – 2014. – Т. 18, № 2. – С. 4-9 (*особистий внесок здобувача: участь в експерименті, аналіз даних, підготовка статті*).
4. Коррекция производными глюкозамина дестабилизирующего влияния доксорубицина на клетки костного мозга крыс в опытах «in vitro» / И. А. Зупанец, Е. В. Ветрова, Т. С. Сахарова, В. Е. Доброва // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2014. – № 3. – С. 128-132 (*особистий внесок здобувача: участь в експерименті, аналіз даних, підготовка статті*).
5. Фармакологічна корекція метотрексат-індукованої цитотоксичності в експерименті / І. А. Зупанець, Т. С. Сахарова, К. В. Ветрова, М. А. Мусмарі // Одеський медичний журнал. – 2015. – № 1 (147). – С. 8-14 (*особистий внесок здобувача: участь в експерименті, аналіз даних, підготовка статті*).
6. Изучение влияния производных глюкозамина на доксорубицин-индуцированную гибель клеток в эксперименте / И. А. Зупанец, Т. С. Сахарова, Е. В. Ветрова, Е. А. Зупанец // Вестник фармации. – 2015. – № 1 (67). – С. 83-88 (*особистий внесок здобувача: участь в експерименті, аналіз даних, підготовка статті*).
7. Патент 94718 України на корисну модель, МПК А61Р 37/02, А61Р 7/00. Застосування комбінації глюкозаміну гідрохлориду і N-ацетилглюкозаміну з кверцетином для корекції гематотоксичної та імунодепресивної дії алкілюючих протипухлинних засобів / І. А. Зупанець, Т. С. Сахарова, К. В. Ветрова; заявник та патентовласник Національний фармацевтичний університет. – № u 2014 06771 ; заявл. 16.06.2014; опубл. 25.11.2014, бюл. № 22, 4 с (*особистий внесок здобувача: здійснення патентного пошуку, участь в експерименті, підготовка патенту*).
8. Ветрова К. В. Порівняльна оцінка ефективності режимів введення похідних глюкозаміну при патології, викликаній доксорубіцином / К. В. Ветрова // IV Національний з'їзд фармакологів України : тези доповідей, м. Київ, 10-12 жовтня 2011 р. // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. – № 5 (24). – С. 49 (*особистий внесок здобувача: участь в експерименті, підготовка тез*).
9. Musmari M. Prospects of glucosamine use for the therapy of cancer disease / M. Musmari, K. V. Vetrova // Актуальні питання створення нових лікарських засобів : Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів та молодих вчених у 2-х томах : Т. 2, м. Харків, 19-20 квітня 2012 р. – Х.: НФаУ, 2012. – С. 456 (*особистий внесок здобувача: участь в експерименті, підготовка тез*).

10. Ветрова К. В. Порівняльне вивчення дії похідних глюкозаміну та їх комбінацій на клітини кісткового мозку щурів в умовах «in vitro» / К. В. Ветрова, Т. С. Сахарова // Актуальні питання створення нових лікарських засобів : Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів та молодих вчених у 2-х томах : Т. 2, м. Харків, 19-20 квітня 2012 р. – Х.: НФаУ, 2012. – С. 461 (*особистий внесок здобувача: участь в експерименті, підготовка тез*).
11. Рускин А. С. Изучение кардиопротекторных свойств оригинальных комбинаций с кверцетином в условиях экспериментальной пластической сердечной недостаточности / А. С. Рускин, Р. В. Деркач, Е. В. Ветрова // Клиническая фармакология и фармакотерапия заболеваний в свете доказательной медицины : Материалы VII Всеукраинской научно-практической конференции с международным участием по клинической фармакологии, г. Винница, 25-26 ноября 2013 г. – Винница, 2013. – С. 208-209 (*особистий внесок здобувача: участь в експерименті, підготовка тез*).
12. Сахарова Т. С. Современное состояние проблемы осложнений противоопухолевой терапии и направления их фармакокоррекции / Т. С. Сахарова, Е. В. Ветрова, Е. В. Бевз // Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике : сборник материалов II научно-практической конференции с международным участием, г. Алматы, 27 ноября 2013 г. – Алматы, 2013. – С. 10-11.
13. Multifaceted use of glucosamine and its combination with flavonoids and NSAIDs / O. V. Bevz, K. V. Vetrova, N. V. Davishnya, T. S. Sakharova // Actual questions of development of new drugs: Abstracts of XX International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students, Kharkiv, April 22-23, 2014. – Kh.: NUPh, 2014. – P. 204-205.
14. Ветрова Е. В. Изучение глюкозамина гидрохлорида как потенциального корректора токсичности метотрексата / Е. В. Ветрова, И. А. Зупанец, Т. С. Сахарова // Интеграция образования, науки и производства в фармации : Материалы республиканской научно-практической конференции (с международным участием), г. Ташкент, 11-12 ноября 2014 г. – Ташкент, 2014. – С. 302-303 (*особистий внесок здобувача: участь в експерименті, підготовка тез*).
15. Шляхи фармакокорекції ускладнень протипухлинної хіміотерапії / І. А. Зупанець, К. В. Ветрова, О. С. Рускін, Т. С. Сахарова // Фармакоекономіка в Україні: стан та перспективи розвитку : Матеріали VII науково-практичної Internet-конференції, м. Харків, 20 листопада 2014 р. – Х.: Видавництво НФаУ, 2014. – С. 130-131 (*особистий внесок здобувача: участь в експерименті, підготовка тез*).
16. Ветрова Е. В. Глюкозамина гидрохлорид – перспективный фармакокорректор токсичности циклофосфана / Е. В. Ветрова, И. А. Зупанец, Т. С. Сахарова // Перспективы развития биологии, медицины и фармации : Материалы второй международной научной конференции молодых ученых и студентов, Республика Казахстан, г. Шымкент, 9-10 декабря 2014 г. – Шымкент, 2014. – № 4 (69). – С. 186-188 (*особистий внесок здобувача: участь в експерименті, підготовка тез*).

17. The influence of glucosamine derivatives on apoptosis of cells in experiments / K. V. Vetrova, N. V. Davishnya, T. S. Sakharova, S. K. Shebeko // Topical issues of new drugs development : abstracts of International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student, Kharkiv, April 23, 2015. – Kh.: NUPh, 2015. – P. 393-394 (*особистий внесок здобувача: участь в експерименті, підготовка тез*).
18. Фармакологічна корекція кардіотоксичної дії протипухлинних антибіотиків / І. А. Зупанець, Т. С. Сахарова, К. В. Ветрова, О. С. Рускін // Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 59-2014. – Укрмедпатентінформ МОЗ України. – Випуск 18 з проблеми «Фармація». – К., 2014. – 5 с (*особистий внесок здобувача: участь в експерименті, аналіз даних, підготовка інформаційного листа до видання*).

### АНОТАЦІЯ

**Ветрова К. В. Експериментальне обґрунтування доцільності корекції токсичних ефектів протипухлинних препаратів похідними глюкозаміну та їх комбінацією з кверцетином. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2015.

Робота присвячена експериментальному обґрунтуванню застосування похідних глюкозаміну та їх комбінації з кверцетином для оптимізації підходів до профілактики та корекції токсичних ефектів протипухлинних препаратів.

У скринінгових дослідженнях на мишах показана здатність похідних глюкозаміну та їх комбінації з кверцетином зменшувати загальнотоксичну дію протипухлинного антибіотика доксорубіцину. У дослідях «in vitro» доведено, що похідні глюкозаміну та їх комбінація з кверцетином не чинять цитотоксичної дії на інтактні клітини кісткового мозку щурів та підвищують їх життєздатність на тлі дестабілізуючого впливу доксорубіцину.

На етапах поглибленого фармакологічного вивчення встановлено коригуючий вплив глюкозаміну гідрохлориду та комбінації глюкозаміну гідрохлориду і N-ацетилглюкозаміну з кверцетином на перебіг цитостатик-індукованої токсичності (на тлі доксорубіцину, циклофосфаміду, метотрексату) в експериментах на щурах. Під впливом досліджуваних об'єктів спостерігається пригнічення процесу ПОЛ та проявів цитолізу, зменшення запалення та дистрофії, вірогідне зниження летальності тварин (на моделі доксорубіцинової інтоксикації), зменшення проявів імуносупресії (на моделі циклофосфамідної інтоксикації). Доведено регулюючий вплив досліджуваних об'єктів на процес доксорубіцин-індукованої загибелі клітин, опосередкований втручанням у bcl-2-залежні механізми контролю апоптозу.

На підставі проведеного комплексу фармакологічних досліджень обрано перспективний об'єкт – комбінацію глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну з кверцетином – який планується для подальшого впровадження.

*Ключові слова:* похідні глюкозаміну, кверцетин, протипухлинні препарати, токсичні ефекти, детоксикуюча дія.

## АННОТАЦИЯ

**Ветрова Е. В. Экспериментальное обоснование целесообразности коррекции токсических эффектов противоопухолевых препаратов производными глюкозамина и их комбинацией с кверцетином. – На правах рукописи.**

Диссертация на соискание научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2015.

Работа посвящена экспериментальному обоснованию применения производных глюкозамина и их комбинации с кверцетином для оптимизации подходов к профилактике и коррекции токсических эффектов противоопухолевых препаратов.

В скрининговом исследовании «*in vivo*» (на мышах) показана способность производных глюкозамина (ГА) и их комбинации с кверцетином (Кв) уменьшать проявления общетоксического действия противоопухолевого антибиотика доксорубицина (ДОКС), что подтверждается снижением летальности животных (до 40 %), нормализацией массовых коэффициентов их внутренних органов относительно аналогичных показателей в группе контрольной патологии. По эффективности защитного действия производные ГА и их комбинацию с Кв можно расположить в следующем ряду: комбинация глюкозамина гидрохлорида и N-ацетилглюкозамина с кверцетином (комбинация ГА г/х+N-ацГА+Кв) > глюкозамина гидрохлорид (ГА г/х) > N-ацетилглюкозамин (N-ацГА) > ГА сульфат.

В опытах «*in vitro*» исследуемые объекты (за исключением N-ацГА и ГА сульфата) в диапазоне концентраций от 10 до 100 мкг/мл не оказывают цитотоксического действия на интактные клетки костного мозга крыс, что подтверждается недостоверным ( $p > 0,05$ ) расхождением средней доли мертвых клеток относительно интактной пробы. Глюкозамина сульфат во всех выбранных концентрациях и N-ацГА в концентрации 100 мкг/мл оказывают собственное цитотоксическое действие, что стало причиной их исключения из дальнейших исследований. Доказано, что ГА г/х и комбинация ГА г/х+N-ацГА+Кв нивелируют цитотоксическое действие ДОКС, достоверно уменьшая среднюю долю мертвых клеток костного мозга крыс в среднем в 1,5 и 1,2 раза относительно пробы с добавлением только цитостатика в концентрации  $LC_{50}$  (1,7 мг/мл). В опытах прослеживалась обратнопропорциональная зависимость в ряду «концентрация-цитопротекторное действие»: снижение концентрации исследуемых объектов вело к увеличению средней доли живых клеток костного мозга крыс.

По результатам скрининговых исследований для дальнейшего углубленного фармакологического изучения (в условиях доксорубицин-, циклофосфамид-, метотрексат-индуцированной интоксикации) выбраны ГА г/х в условно-терапевтической дозе 50 мг/кг и комбинация ГА г/х+N-ацГА+Кв в дозе 82 мг/кг.

В условиях доксорубициновой интоксикации у крыс ГА г/х и комбинация ГА г/х+N-ацГА+Кв снижают выраженность проявлений общетоксического

действия цитостатика, что подтверждается снижением летальности соответственно в 1,5 и 3 раза ( $p \leq 0,05$ ), нормализацией значений массовых коэффициентов внутренних органов (сердца, печени, почек), угнетением процесса ПОЛ (снижение уровня ТБК-АП сыворотки крови, тканей миокарда и печени в среднем в 1,5 раза ( $p \leq 0,05$ ), снижением гипертрансаминаземии в среднем в 1,75 раза, восстановлением метаболических функций печени, нормализацией сократительной функции миокарда и улучшением гистоструктуры сердца, органов детоксикации (печени, почек), тимуса и селезенки.

Установлено регулирующее влияние ГА г/х и комбинации ГА г/х+N-ацГА+Кв на процесс ДОКС-индуцированной гибели клеток, опосредованное вмешательством в bcl-2-зависимые механизмы контроля апоптоза (по увеличению количества bcl-2-положительных гепатоцитов в среднем в 1,3 и 8,4 раза при введении цитостатика в дозах 10 и 20 мг/кг соответственно).

В условиях развития циклофосфамид-индуцированной интоксикации у крыс введение исследуемых объектов уменьшает общетоксические проявления цитостатика, что отражается стабилизацией общего состояния и массы тела животных, восстановлением лейкопоза и двух звеньев иммунной системы (достоверное увеличение индекса фагоцитарной активности в среднем в 2,8 раза и уровня циркулирующих иммунных комплексов в среднем в 1,5 раза), нормализацией показателей ПОЛ/АОЗ, уменьшением гипертрансаминаземии, восстановлением метаболических функций печени, повышением интенсивности компенсаторных и регенераторных процессов в тканях печени, тимуса, селезенки по сравнению с группой нелеченых животных.

Глюкозамина гидрохлорид и комбинация ГА г/х+N-ацГА+Кв на фоне интоксикации метотрексатом нивелируют общетоксическое влияние цитостатика на организм крыс, что подтверждается улучшением общего состояния животных, улучшением гематологических показателей (достоверное уменьшение лейкопении), угнетением процесса ПОЛ (снижение уровня ТБК-АП сыворотки крови в 1,3 раза ( $p \leq 0,05$ ), уменьшением проявлений цитолиза и холестаза (снижение активности аминотрансфераз в среднем в 1,6 раза, щелочной фосфатазы – в 1,9 раза ( $p \leq 0,05$ ), восстановлением белкового обмена, улучшением структурно-функционального состояния печени, тимуса и селезенки относительно контрольной группы.

Таким образом, в условиях токсического действия противоопухолевых препаратов с разными механизмами действия (антибиотика доксорубицина, алкилирующего цитостатика циклофосфамида, антиметаболита метотрексата) по суммарному рейтингу исследованных показателей наиболее значимое корригирующее действие проявляет комбинация ГА г/х+N-ацГА+Кв. Комбинация ГА г/х+N-ацГА+Кв является перспективным объектом для дальнейшего доклинического, клинического изучения и внедрения в практическую медицину как модификатора токсического действия противоопухолевых препаратов для повышения эффективности и безопасности лечения заболеваний, сопровождающихся избыточной пролиферацией клеток.

*Ключевые слова:* производные глюкозамина, кверцетин, противоопухолевые препараты, токсические эффекты, детоксицирующее действие.

## SUMMARY

**Vetrova K. V. Experimental evidence of the expediency of correction of the toxic effects of anticancer drugs by derivatives of glucosamine and their combination with quercetin. – As a manuscript.**

Thesis for Candidate degree in Pharmaceutical Studies. Speciality 14.03.05 – Pharmacology. – National University of Pharmacy Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2015.

The dissertation work is concerned with the experimental justification of the application of glucosamine derivatives and their combination with quercetin to optimize the approaches to the prevention and correction of the toxic effects of anticancer drugs.

It have been demonstrated the ability of glucosamine derivatives and their combination with quercetin to reduce general toxic effect of anticancer antibiotic doxorubicin in screening studies in mice. It have been proved that glucosamine derivatives and their combination with quercetin do not have cytotoxic effect on rat's intact cells of bone marrow and enhance their viability under the destabilizing influence of doxorubicin in the experiments «in vitro».

At the advanced stages of the pharmacological study it have been found the corrective influence of glucosamine hydrochloride and combination of glucosamine hydrochloride and N-acetylglucosamine with quercetin on the cytostatic-induced toxicity (under the influence of doxorubicin, cyclophosphamide, methotrexate) in experiments on rats. Under the influence of the objects it have been observed the inhibition of the process of lipid peroxidation and displays of cytolysis, reduced inflammation and dystrophy, a significant decrease of the animals mortality (model of intoxication with doxorubicin), decrease of the immunosuppression (model of intoxication with cyclophosphamide). It have been proved the regulating effect on the process of doxorubicin-induced cell death by the investigated objects mediated with the interference in the bcl-2-dependent mechanisms of the apoptosis controls.

Based on the complex of the pharmacological studies it have been selected the perspective object – the combination of glucosamine hydrochloride and N-acetylglucosamine with quercetin – which is planned for the future implementation.

*Key words:* glucosamine derivatives, quercetin, anticancer drugs, toxic effects, antitoxic action.



Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 0,9. Тир. 100 прим. Зам. 053-16.  
Підписано до друку 05.02.16. Папір офсетний.

Надруковано з макету замовника у ФОП Бровін О.В.  
61022, м. Харків, вул. Трінклера, 2, корп.1, к.19. Т. (057) 758-01-08, (066) 822-71-30  
Свідоцтво про внесення суб'єкта до Державного реєстру  
видавців та виготовників видавничої продукції серія ДК 3587 від 23.09.09 р.