

## ДОСЛІДЖЕННЯ РЕФРАКЦІЇ ГЛІКОЗАМІНОГЛІКАНІВ ТА КОЛАГЕНУ ЯК ПОКАЗНИКІВ ХОНДРОМОДУЛЮЮЧОЇ ДІЇ КОМПОЗИЦІЇ НА ОСНОВІ АМІНОЦУКРІВ — ПОХІДНИХ ГЛЮКОЗАМІНУ ТА ФЛАВОНОЇДУ КВЕРЦЕТИНУ У ЩУРІВ З ПОСТТРАВМАТИЧНИМ ОСТЕОАРТРИТОМ

*К.О.Зупанець, Н.В.Дєдух\*, С.Б.Попов, І.А.Отрішко*

Національний фармацевтичний університет  
ДУ "Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І.Ситенка АМН України\*

*Ключові слова: глюкозаміну гідрохлорид; N-ацетилглюкозамін; кверцетин; рефракція ГАГ; рефракція колагену; хондромодуюча дія*

*На моделі посттравматичного остеоартриту у щурів досліджено хондромодуючу дію композиції на основі глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну та кверцетину у порівняльному аспекті з її активними монокомпонентами — сумішшю аміноцукрів та кверцетином. У результаті проведених експериментальних досліджень відмічено достовірне підвищення показників рефракції ГАГ та колагену на різних ділянках суглобового хряща на фоні прийому досліджуваної композиції, що свідчить про підсилення їх ендogenous синтезу, тим самим забезпечуючи активацію регенераторних процесів та сприяючи реалізації хондропротекції. Відмічено фармакодинамічний синергізм компонентів у складі композиції на даній експериментальній моделі. Експериментально підтверджена протизапальна та хондромодуюча активність композиції на основі глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну та кверцетину створює передумови для її подальшого вивчення у якості протизапального та хондромодуючого засобу для використання у комплексній терапії пацієнтів з запально-деструктивним суглобовим синдромом.*

Остеоартрит (ОА) — одне з поширених захворювань суглобів, проблема лікування якого залишається і дотепер повністю не вирішеною [4].

Одними із ефективних складових патогенетичного лікування ОА, підтверджених вагомою доказовою базою, є застосування повільно діючих симптомомодифікуючих препаратів (хондропротекторів). Найбільш застосовуваними із даної групи є препарати на основі аміноцукрів глюкозаміну та хондроїтин сульфату. Не припинюючи безумовних переваг даних активних складових, втім слід зазначити, що за певних клініч-

них умов, зокрема при наявності вираженого запального синдрому, монотерапія даними засобами є неефективною. Тому досить часто терапія хондропротекторами за необхідності доповнюється, як правило, протизапальними засобами із групи НПЗП. Проте ризик розвитку проявів токсикодинаміки НПЗП, особливо у пацієнтів із групи ризику, досить високий (гастротоксичність, хондротоксичність та ін.). То ж на сьогодні актуальними є дослідження з метою пошуку та вивчення ефективних та безпечних поєднань засобів хондропротекторної дії з активними субстанціями, здат-

ними потенціювати їх протизапальні властивості та, на відміну від більшості НПЗП, мати кращу переносимість та бути доступними хворим [7, 9, 10, 11, 14, 15].

Нами в серії проведених раніше досліджень обґрунтована доцільність комбінованого застосування аміноцукрів глюкозаміну — N-ацетилглюкозаміну та глюкозаміну гідрохлориду з флавоноїдом кверцетином. Показана протизапальна фармакодинамічна синергічність даного поєднання, а саме, вплив на різні ланки реалізації запальної реакції — ліпооксигеназний та циклооксигеназний шляхи метаболізму арахідонової кислоти [3, 5].

Метою даного дослідження стало експериментальне вивчення хондромодуючої дії композиції на основі суміші аміноцукрів — глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну з кверцетином шляхом вивчення показників рефрак-

**К.О.Зупанець** — магістр клінічної фармації, здобувач кафедри клінічної фармакології з фармацевтичною опікою Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

**Н.В.Дєдух** — доктор біол. наук, професор, завідувачка лабораторії морфології сполучної тканини ДУ "Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І.Ситенка АМН України (м. Харків)

Таблиця 1

**Рефракція глікозаміногліканів (пм) по території суглобового хряща щурів, які отримували досліджувану композицію, у порівнянні з кверцетином та сумішшю аміноцукрів (n=40)**

Досліджуваний об'єкт	Показники рефракції (M±m)	
	поблизу дефекту	на віддаленні від дефекту
Інтактний контроль	по території хряща — 26,9±2,4	
Контрольна патологія	10,2±1,3 p<0,001	14,3±1,7 p<0,001
Композиція	22,7±2,4 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,01 p <sub>3</sub> <0,05	28,4±2,3 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001 p <sub>3</sub> <0,01
Суміш аміноцукрів	15,1±1,4 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,05	8,9±1,4 p<0,05 p <sub>1</sub> >0,05
Кверцетин	12,1±1,5 p<0,001 p <sub>1</sub> >0,05	15,9±1,9 p<0,01 p <sub>1</sub> >0,05

Примітки:

- 1) p — достовірність відмінностей відносно тварин групи інтактного контролю;
- 2) p<sub>1</sub> — достовірність відмінностей відносно тварин групи контрольної патології;
- 3) p<sub>2</sub> — достовірність відмінностей відносно тварин, які отримували кверцетин;
- 4) p<sub>3</sub> — достовірність відмінностей відносно тварин, які отримували суміш аміноцукрів.

ції ГАГ та колагену як маркерних показників реалізації регенераторних процесів у суглобі.

**Матеріали та методи**

Дослідження хондромодуючої дії композиції на основі суміші аміноцукрів — глюкозаміну гід-

рохлориду, N-ацетилглюкозаміну та флавоноїду кверцетину проводили на моделі посттравматичного остеоартриту на 40 білих щурах-самцях віком 3 місяці масою 180-220 г [1, 2].

Тваринам під загальним наркозом (аміназин — 10 мг/кг, ке-

тамін — 50 мг/кг) в асептичних умовах робили розріз шкіри, заднім доступом відкривали головку стегнової кістки та за допомогою зубного бору (діаметром 0,8 мм) виконували кістково-хрящовий дефект на глибину 1 мм. Рану поширено ушивали (м'які тканини кетгутом, шкіру — шовком).

Через 1 добу після проведення операції тваринам починали введення досліджуваних об'єктів. Препарати вводили внутрішньошлунково спеціальним зондом впродовж 30 діб.

Оперованих тварин розділили на наступні групи: 1 група — контрольні (неліковані) тварини одержували розчинник (фізіологічний розчин) у еквівалентній кількості, як і дослідні тварини; 2 група — тварини, що одержували досліджувану композицію у дозі 81,85 мг/кг; 3 група — тварини, що одержували суміш аміноцукрів в дозі 61,39 мг/кг; 4 група — тварини, що одержували кверцетин у дозі 20,46 мг/кг.

Експерименти були виконані відповідно до правил "Європейської конвенції захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних і інших наукових цілях" [13].

Евтаназію щурів здійснювали шляхом передозування ефіру.

При дослідженні матриксу суглобового хряща враховували орієнтаційну упорядкованість і топографію розташування основних макромолекул матриксу суглобового хряща (ГАГ і колагену) при дослідженні результатів гістохімічних реакцій у поляризованому світлі з використанням мікроскопу "Polmu-A" [8]. Стан ГАГ оцінювали шляхом аналізу наявності або відсутності метахромазії, а також її яскравості. Враховували наявність і вираженість рефракції (подвійного променепереломлення): для ГАГ — за гістохімічною реакцією з толудинохим синім (при рН 2,5) [16] та для колагену — з піросиріусом червоним [12].

Одержані результати оброблялись методами варіаційної статистики з використанням критерію

Таблиця 2

**Рефракція колагену (пм) по території суглобового хряща щурів, які отримували досліджувану композицію, у порівнянні з кверцетином та сумішшю аміноцукрів (n=40)**

Досліджуваний об'єкт	Показники рефракції (M±m)	
	поблизу дефекту	на віддаленні від дефекту
Інтактний контроль	по території хряща — 36,7±2,4	
Контрольна патологія	19,5±2,4 p<0,001	22,3±2,1 p<0,001
Композиція	28,7±2,1 p<0,05 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,01 p <sub>3</sub> >0,05	37,5±2,6 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,01 p <sub>3</sub> <0,05
Суміш аміноцукрів	24,6±1,7 p<0,001 p <sub>1</sub> >0,05	28,4±1,9 p<0,05 p <sub>1</sub> <0,05
Кверцетин	20,3±1,8 p<0,001 p <sub>1</sub> >0,05	25,6±2,2 p<0,01 p <sub>1</sub> >0,05

Примітки:

- 1) p — достовірність відмінностей відносно тварин групи інтактного контролю;
- 2) p<sub>1</sub> — достовірність відмінностей відносно тварин групи контрольної патології;
- 3) p<sub>2</sub> — достовірність відмінностей відносно тварин, які отримували кверцетин;
- 4) p<sub>3</sub> — достовірність відмінностей відносно тварин, які отримували суміш аміноцукрів.

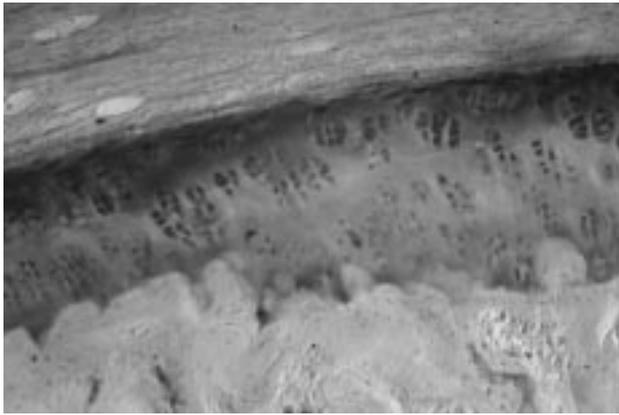


Рис. 1. Нерівномірність метахромазії ГАГ у суглобовому хрящі на віддаленні від дефекту. Світлова мікроскопія. Толуїдиновий синій (рН — 2,5). 30-а доба. Контрольна патологія. Polmu-A. 36. 280.

ривів Фішера-Стьюдента за допомогою комп'ютерних програм [6].

### Результати та їх обговорення

Аналізуючи показники нелікованих тварин з контрольною патологією, ми відмітили досить низь-

кі значення рефракції ГАГ, особливо поблизу дефекту. Так, відносно тварин із групи інтактного контролю рефракція ГАГ була меншою у 2,64 рази (табл. 1). Рефракція колагену також була знижена у тварин з контрольною патологією у 1,88 рази при порівнянні

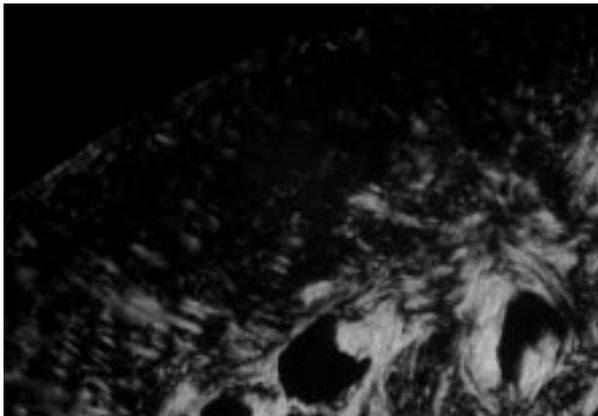


Рис. 2. Нерівномірність рефракції колагену у хрящі, який кальцифікується, та у некальцифікованому суглобовому хрящі. Поляризоване світло. Пікросіріус червоний. 30-а доба. Контрольна патологія. Polmu-A. 36. 280

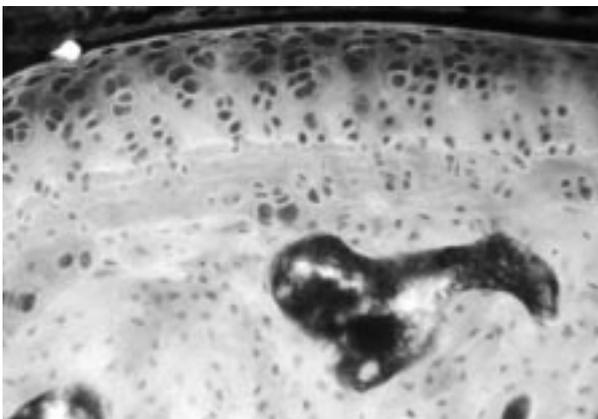


Рис. 3. Яскрава метахромазія ГАГ у поверхневій зоні суглобового хряща на відстані від дефекту. Крупні яскраво забарвлені хондроцити. Толуїдиновий синій (рН — 2,5). 30-а доба. Композиція. 36. 280.

з інтактним контролем (табл. 2). Це свідчить про досить вагомі деструктивні зміни, що спостерігались на різних ділянках суглоба щурів при відсутності лікування на 30 добу.

Метахромазія ГАГ була виражено нерівномірною у тварин з контрольною патологією, практично не визначалася у поверхневій зоні (рис. 1). Рефракція ГАГ була значною лише у територіальному матриці хондроцитів проміжної та глибокої зон.

Порушення рефракції колагену у контрольних тварин спостерігалось не тільки поблизу ділянки травматичного ушкодження, але і на відстані від дефекту (рис. 2). Рефракція колагену не визначалася у поверхневій зоні і виявлялася у вигляді локальних ділянок у глибоких відділах суглобового хряща.

Таким чином, при моделюванні повношарового дефекту суглобового покриття у головці стегнової кістки щурів не зафіксовано повної регенерації суглобового хряща. Загоєння дефекту відбувалося за рахунок формування незрілої грануляційної тканини та осередків колагеноволоконистої тканини в його поверхневих ділянках.

Застосування досліджуваних об'єктів чинило різного ступеня виразності хондромодулюючий вплив на досліджувані показники.

Так, аналіз показників рефракції ГАГ та колагену на різних ділянках суглобів щурів, лікованих досліджуваною композицією, свідчить про найбільш суттєвий лікувальний ефект даного експериментального об'єкту в порівнянні з іншими. Метахромазія та рефракція ГАГ у хрящі поблизу дефекту та на віддаленні від нього не мала достовірних відмінностей в порівнянні з інтактними щурами. Лише показники рефракції колагену поблизу дефекту достовірно відрізнялися від інтактного контролю на кінець експерименту. За показниками рефракції ГАГ досліджувана композиція достовірно відрізнялася від показників тварин з контрольною патологією та тварин, що отримували референс-об'єкти — суміш аміноцук-

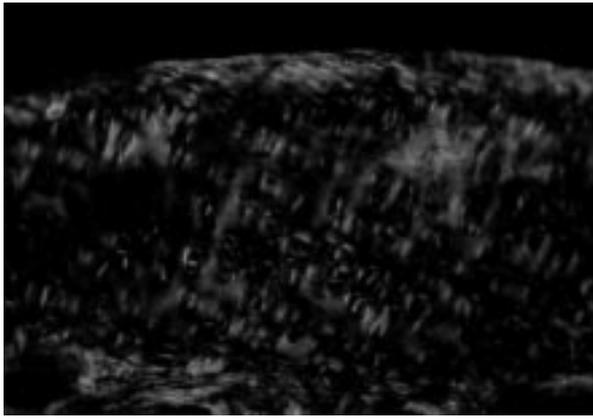


Рис. 4. Рефракція колагену у суглобовому покритті на відстані від ділянки дефекту. Поляризоване світло. Пікросиріус червоний. 30-а доба. Композиція. Зб. 280.

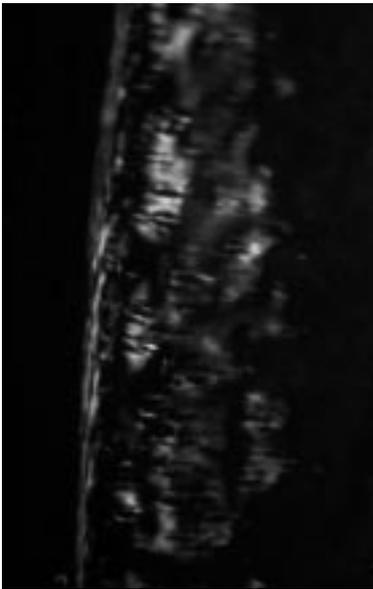


Рис. 5. Нерівномірна рефракція ГАГ у матриці суглобового хряща. Толуїдиновий синій (рН — 2,5). 30-а доба. Суміш аміноцукрів. Polmy-A. Зб. 280.

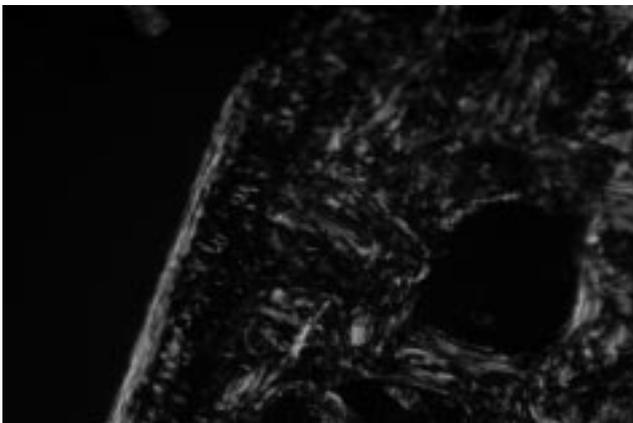


Рис. 6. Висока рефракція колагену у поверхневій зоні суглобового хряща на віддаленні від дефекту. Поляризаційна мікроскопія. Пікросиріус червоний. 30-а доба. Суміш аміноцукрів. Зб. 280.

рів та кверцетин. Аналогічна динаміка спостерігалася і з показниками рефракції колагену, окрім відсутності достовірних відмінностей стосовно показників рефракції колагену поблизу зони дефекту відносно тварин, лікованих сумішшю аміноцукрів.

При поляризаційно-мікроскопічному дослідженні тварин, лікованих досліджуваною композицією, зниження рефракції ГАГ та колагену зберігалися тільки навколо ділянки дефекту. На віддаленні від дефекту метахромазія ГАГ по території суглобового покриття була яскравою (рис. 3). Виражена рефракція спостерігалася у територіальному матриці клітин проміжної та глибокої зон суглобового хряща.

Рефракція колагену у тварин цієї ж експериментальної групи була знижена тільки у ділянках, що прилягають до дефекту; на

віддаленні від дефекту відмінностей у топографії рефракції колагену та її показників у даної групи та інтактного контролю не встановлено. Високою була рефракція колагену і в поверхневій зоні (рис. 4). В інтертериторіальному матриці вона виявлялась навколо поодиноких хондроцитів та їх груп.

Середні значення рефракції ГАГ поблизу дефекту та на віддаленні від нього у тварин, лікованих сумішшю аміноцукрів, залишалися нижчими (в 1,8 та 1,4 рази відповідно) за показники інтактних тварин. На ділянках поблизу дефекту дані показники достовірно відрізнялися від показників тварин з контрольною патологією та не мали достовірних відмінностей на ділянках, віддалених від зони дефекту. У випадку аналізу рефракції колагену показники щурів, лікованих сумішшю аміноцукрів, достовірно відрізнялися від показників тварин із групи інтактного контролю, контрольною патологією на віддаленні від зони дефекту та не мали достовірних відмінностей поблизу нього.

Навколо дефекту метахромазія ГАГ була слабкою, а рефракція — низькою. Зміна топографії метахроматичного забарвлення ГАГ спостерігалася і на віддаленні від дефекту (рис. 5).

На віддаленні від дефекту топографія виявлення рефракції колагену у суглобовому хрящі тварин, лікованих сумішшю аміноцукрів, не відрізнялася від інтактного контролю (рис. 6).

Показники щурів, яким вводили кверцетин, поступалися іншим дослідним об'єктам як у випадку аналізу рефракції ГАГ, так і колагену. Показники рефракції ГАГ та колагену у хрящі навколо дефекту та на віддаленні від нього залишалися достовірно зниженими в порівнянні з інтактним контролем. Також не мали достовірних відмінностей стосовно тварин з контрольною патологією.

Метахромазія і рефракція ГАГ, а також рефракція колагену були нерівномірними на ділянках хряща тварин, лікованих кверцетином, місцями (особливо поблизу

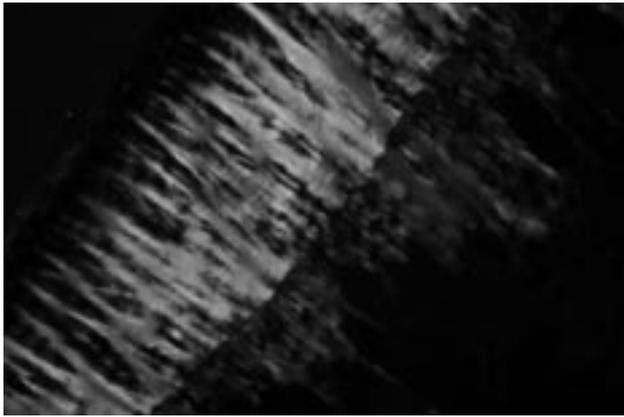


Рис. 7. Відсутність метакромазії у поверхневій зоні суглобового хряща. Поляризаційна мікроскопія. Толуїдиновий синій (рН — 2,5). 30-а доба. Кверцетин. Зб. 280.

дефекту) були відсутні. Значне зниження рефракції відбувалося у поверхневій зоні (рис. 7).

Узагальнюючи дані про макромолекулярну організацію матриксу суглобового хряща та орієнтаційну упорядкованість ГАГ і колагену, можна стверджувати, що лікувально-профілактичне застосування композиції на основі суміші аміноцукрів та кверцетину

сприяє активації синтезу ГАГ і колагену, стимуляції репаративних процесів у суглобовому хрящі.

Така активність підтверджена високими показниками рефракції ГАГ і колагену, що свідчить про стимулюючий вплив досліджуваної композиції на синтез ГАГ і колагену, які відіграють головну роль у реалізації процесів репарації.

Фармакодинамічний синергізм композиції при лікуванні посттравматичного остеоартриту забезпечує її комплексна дія, обумовлена наявністю антиексудативного, антипроліферативного, хондропротекторного ефектів, а також пов'язана із потенціуючим впливом кверцетину на протизапальні властивості аміноцукрів та їх здатністю стимулювати процеси репаративної регенерації.

#### ВИСНОВКИ

1. Експериментально встановлено стимулюючий вплив досліджуваної композиції на синтез ГАГ і колагену, які відіграють головну роль у реалізації регенераторних процесів у суглобі.

2. Відмічено ефект фармакодинамічного синергізму компонентів у складі композиції при лікуванні посттравматичного остеоартриту у щурів.

3. У реалізації хондропротекторної дії композиції головна роль належить суміші аміноцукрів, протизапальній дії — кверцетину.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Доклинические исследования лекарственных средств: Метод. рекоменд. / Под ред. А.В.Стефанова. — К.: Авиценна, 2002. — 528 с.
2. Зупанец І.А., Корж Н.А., Дедух Н.В. и др. Методические рекомендации по экспериментальному исследованию и клиническому изучению противоартрозных (хондромодулирующих) лекарственных средств. — К., 1999. — 56 с.
3. Зупанец І.А., Попов С.Б., Усенко В.Ф., Отрішко І.А. //Клінічна фармація. — 2009. — Т. 13, №4. — С. 50-53.
4. Остеоартроз: консервативная терапия: Монография / Под ред. Н.А.Коржа, Н.В.Дедух, И.А.Зупанца. — Х.: Золотые страницы, 2007. — 424 с.
5. Попов С.Б., Шебеко С.К., Зупанец К.О. та ін. Модифікація фармакологічних властивостей нестероїдних протизапальних препаратів аміноцукром глюкозаміну гідрохлоридом: Метод. рекоменд. — Х., 2007. — 24 с.
6. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. — 3-е изд. — М.: Медиа Сфера, 2006. — 312 с.
7. Туляков В.О., Зупанец К.О., Шебеко С.К. //Фармакол. та лікарська токсикол. — 2009. — №2 (9). — С. 3-8.
8. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Пер. с англ. — 1980. — 220 с.
9. Ader P., Wessmann A., Wolffram S. et al. //Free Radic. Biol. Med. — 2000. — Vol. 28. — P. 1056-1067.
10. Chi Y.S., Jong H.G., Son K.H. et al. //Biochemistry and Pharmacol. — 2001. — №62. — P. 1185-1191.
11. Chi-Yu Y., Su-Lan H., Kuo-Ching W. et al. //J. of Food and Drug Analysis. — 2005. — Vol. 13. — P. 244-250.
12. Constantine V.S., Mowry R.W. //J. Invest. Derm. — 1968. — №50. — P. 419-423.
13. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. — Strasbourg, 1986. — 52 p.

14. Galisteo M., Garcia-Saura M.F., Jimenez R. et al. // *Molecular And Cellular Biochemistry*. — 2004. — Vol. 259 (1-2). — P. 91-99.
15. Graf B.A., Ameho C., Dolnikowski G.G. // *J. of Nutrition*. — 2006. — Vol. 136. — P. 39-44.
16. Romhanyi G. // *Acta Histochem*. — 1963. — Bd.15. — S. 210-233.

Адреса для листування: 61057, м. Харків,  
вул. Пушкінська, 27. Тел. (57) 706-30-72.  
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 09.02.2010 р.

### **Інформаційне повідомлення відділу фармакологічного нагляду ДП “Державний фармакологічний центр” МОЗ України**

Про підозрювану побічну дію препарату, який містить **комплекс екстрактів лікарських рослин** (корінь алтею, кору дуба, траву кульбаби) (Комплексний гомеопатичний препарат. Код АТС R05X)

Дитині (1 рік) з діагнозом: ГРВІ було призначено препарат, який містить комплекс екстрактів лікарських рослин (перорально по 5 крапель 3 рази на добу). Через 6 годин від початку лікування препаратом, який містить комплекс екстрактів лікарських рослин, у дитини з’явилися висипання по всьому тілі, відчуття свербіж, неспокій. Препарат, який містить комплекс екстрактів лікарських рослин, було відмінено, для корекції стану призначено супрастин. Після вжитих заходів зазначені явища минули без наслідків. В анамнезі у дитини прояви харчової алергії.

Інформація надійшла від регіонального відділення м. Києва ДП “Державний фармакологічний центр” МОЗ України