

ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНИХ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КОМПОЗИЦІЇ НА ОСНОВІ АМІНОЦУКРІВ — ПОХІДНИХ ГЛЮКОЗАМІНУ ТА ФЛАВОНОЇДУ КВЕРЦЕТИНУ

К.О.Зупанець, С.Б.Попов, В.Ф.Усенко, І.А.Отрیشко*

Національний фармацевтичний університет
ЗАТ НВЦ “Борщагівський ХФЗ”*

*Ключові слова: глюкозаміну гідрохлорид; N-ацетилглюкозамін; кверцетин;
гостра токсичність, протизапальна активність; скринінгові дослідження*

В експерименті досліджена гостра токсичність та проведено пошук середньоєфективних доз композиції на основі глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну та кверцетину при моделюванні карагенінового запалення. Результати вивчення гострої токсичності при внутрішньоочервинному введенні щуром показали, що досліджувана композиція може бути віднесена до VI класу токсичності — відносно нешкідливі речовини. Це дозволяє вважати композицію перспективним об'єктом для проведення подальших досліджень з вивчення її специфічної активності. Наведені результати дослідження середньоєфективних доз композиції. У результаті проведених досліджень відмічено факт фармакодинамічної взаємодії монокомпонентів у складі композиції (ефект потенціювання та сумачії в залежності від кількісного співвідношення компонентів). Достатня протизапальна активність та нешкідливість композиції на основі глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну та кверцетину створюють передумови для її подальшого вивчення у якості протизапального та хондромодуючого засобу.

Згідно з сучасними уявленнями більшість захворювань опорно-рухового апарату перебігає з перевагою запального та деструктивного компонентів. Для симптоматичної та патогенетичної терапії даних захворювань активно застосовуються нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) та препарати, що модифікують перебіг остеоартритів, так звані хондропротектори [2, 4]. З позицій доказової медицини класичні представники даних груп препаратів мають вагомий доказовий базис та широко застосовуються у світовій ревматологічній практиці. Безсумнівним лідером у групі хонд-

ропротекторів є глюкозаміну гідрохлорид та його ендогенний представник — N-ацетилглюкозамін [3, 11, 12]. Водночас актуальним залишається питання покращення переносимості лікування класичними препаратами з групи НПЗП. Тому на сьогодні зусилля науковців спрямовані на пошук протизапальних засобів для ревматології з принципово відмінними фармакодинамічними характеристиками [6, 9].

У зв'язку з цим нашу увагу привернув кверцетин як новий НПЗП з нетрадиційним механізмом дії завдяки виявленню у нього вираженої активності щодо ін-

гібування 5-ліпооксигенази — ключового ферменту біотрансформації арахідонової кислоти ліпооксигеназним шляхом метаболізму [16, 17, 19]. Біофлавоноїд кверцетин — потужний антиоксидант, інгібітор синтезу лейкотрієнів, комплексний блокатор проведення і реалізації сигналу кальцій-мобілізуєючої поліфосфоінзитидної системи та активатор аденілатциклазного каскаду. Дані механізми є визначальними для більшості фармакологічних ефектів кверцетину, деякі з яких відкриті нещодавно і у теперішній момент інтенсивно вивчаються [13, 14, 15, 18]. Ряд вищевказаних фармакологічних ефектів кверцетину має велике значення при лікуванні захворювань суглобів і дозволяє припустити доцільність включення препаратів на його основі до схем лікування хворих на остеоартрити. Також на відміну від традиційних НПЗП кверцетин не

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

В.Ф.Усенко — здобувач кафедри клінічної фармакології з фармацевтичною опікою Національного фармацевтичного університету, начальник відділу фармакологічного нагляду та клінічного забезпечення ЗАТ НВЦ “Борщагівський ХФЗ” (м. Київ)

Таблиця 1

Антиексудативна активність суміші аміноцукрів (1 : 1), кверцетину та їх композицій у співвідношенні (3 : 1), n = 60

Номер серії	Об'єкт дослідження	Доза, мг/кг	Активність компонентів, %	Активність композиції, %
I	1.1. N-ацГ/А + Г/А г/хл (1:1)	30	13,16±2,04	29,61±2,10 ^{*/**}
	1.2. Кверцетин	10	15,13±1,68	
II	2.1. N-ацГ/А + Г/А г/хл (1:1)	60	25,43±5,70	55,33±2,31 ^{*/**}
	2.2. Кверцетин	20	19,42±3,21	
III	3.1. N-ацГ/А + Г/А г/хл (1:1)	90	36,19±4,54	62,82±3,20 ^{*/**}
	3.2. Кверцетин	30	25,14±2,76	

Примітки:

- 1) * — $p < 0,05$ відносно тварин, які отримували кверцетин;
2) ** — $p < 0,05$ відносно тварин, які отримували суміш аміноцукрів.

тільки не володіє ульцерогенною дією, навпаки, проявляє гастропротекторний ефект у зв'язку зі здатністю пригнічувати діяльність H^+K^+ATP -ази, стимулювати вироблення клітинами слизової оболонки шлунка цитопротекторного простагландину E_2 та зменшувати кількість активних форм кисню в тканині шлункової стінки [21, 23]. Крім того, що кверцетин практично нетоксичний, він сам може проявляти антиоксидантний ефект [20, 22].

Зважаючи на вищевикладене, значний науковий інтерес представляє вивчення комбінованих засобів, що одночасно будуть впливати на різні ланки реалізації запальної реакції — ліпооксигеназний та циклооксигеназний шляхи метаболізму арахідонової кислоти. Таке поєднання дозволяє спрогнозувати потенціювання проти-запальних властивостей аміноцукрів біофлавоноїдом кверцетином, що, в свою чергу, буде опосередковано сприяти більш суттєвій реалізації хондропротекції. Тому метою дослідження стало токсикофармакологічне вивчення різноманітних за складом композицій на основі суміші аміноцукрів — глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну з кверцетином.

Матеріали та методи

Вивчення антиексудативної дії проведено на 60 білих безпородних мишах масою 18-22 г на моделі гострого асептичного запалення, індукованого карагенином ("Sigma", США) [1].

Об'єктами дослідження були обрані екстемпоральні суміші аміноцукрів глюкозаміну гідрохлориду і N-ацетилглюкозаміну у співвідношенні 1 : 1 (30, 60 та 90 мг/кг), субстанція кверцетину у трьох дозах 10, 20 та 30 мг/кг; екстемпоральні композиції на основі вищезазначених компонентів у співвідношенні (3 : 1) відповідно у дозах 40, 80 та 120 мг/кг. У дослідженні використовувалися субстанції глюкозаміну гідрохлориду фірми "Protein Chemicals" (Японія), N-ацетилглюкозаміну ("Sigma", США) та субстанція кверцетину, яка була надана НВЦ "Борщагівський ХФЗ".

Досліджувані об'єкти вводили однократно перорально за 1 годину до субплантарного введення 0,05 мл 1% розчину карагенину у відповідних дозах. Було проведено 3 серії досліджень. Через 3 год тварин виводили з досліду (з дотриманням міжнародних біоетичних вимог роботи з тваринами). Антиексудативну активність досліджуваних субстанцій і композицій визначали по різниці маси набряклих і ненабряклих задніх кінцівок, ампутованих на рівні та-зостегнового суглоба.

Активність досліджуваних об'єктів розраховували за формулою:

$$A = 100\% - \frac{(M_{нд} - M_{зд}) \times 100}{M_{нк} - M_{зк}}$$

де: A — антиексудативна активність, %;

$M_{нд}$ — маса набряклої стопи в досліді;

$M_{зд}$ — маса здорової стопи в досліді;

$M_{нк}$ — маса набряклої стопи в контролі;

$M_{зк}$ — маса здорової стопи в контролі.

В усіх випадках маса стопи виражається в мг.

Одержані результати оброблялись методами варіаційної статистики з використанням критеріїв Фішера-Стьюдента за допомогою комп'ютерних програм [7].

З метою визначення середньосмертельної дози (LD_{50}) проведено вивчення гострої токсичності композиції на основі глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну, кверцетину (у співвідношенні — суміш аміноцукрів : кверцетин — 3 : 1) на двох видах тварин (27 щурів, 12 мишей) при одноразовому введенні досліджуваної композиції внутрішньошлунковим та внутрішньоочеревинним шляхами за методикою Т.В.Пастушенко зі співавт. [5].

Результати та їх обговорення

За результатами 3 серій досліджень з вивчення протизапальної активності різних за кількісним складом композицій на основі суміші аміноцукрів та кверцетину у співвідношенні (3 : 1), наведених у табл. 1, відзначено факт фармакодинамічної взаємодії компонентів у складі композиції.

Так, при комбінованому введенні суміші аміноцукрів у дозі 30 мг/кг та кверцетину в дозі 10 мг/кг (серія I) спостерігалось посилення ефекту за рахунок сумарності: $I = 1.1 + 1.2$.

У II експериментальній серії при сумісному введенні суміші аміноцукрів у дозі 60 мг/кг та кверцетину у дозі 20 мг/кг встановлено істотне потенціювання ефекту: $II < 2.1 + 2.2$.

При аналізі показників активності об'єктів серії III можна стверджувати, що активність композиції реалізується шляхом незначного взаємопотенціювання, що не можна вважати суттєвим. Причому активність композиції даної серії не мала достовірних відмін-

Таблиця 2

Показники летальності мишей при вивченні гострої токсичності композиції на основі глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну, кверцетину при внутрішньошлунковому введенні, n = 12

Доза, мг/кг	Кількість тварин	Спостерігаємий ефект, загибель тварин/кількість тварин
500	3	0/3
1000	3	0/3
3000	3	0/3
5000	3	0/3

Таблиця 3

Показники летальності щурів при вивченні гострої токсичності композиції на основі глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну, кверцетину при внутрішньошлунковому введенні, n = 15

Доза, мг/кг	Кількість тварин	Спостерігаємий ефект, загибель тварин/кількість тварин
500	3	0/3
1000	3	0/3
3000	3	0/3
5000	3	0/3
10000	3	0/3

ностей відносно активності композиції II експериментальної серії.

За результатами проведених серій експериментів нами були розраховані середньоєфективні дози для композиції на основі суміші аміноцукрів і кверцетину та власне суміші і кверцетину. Так, за результатами розрахунків за методом найменших квадратів ED₅₀ композиції склала 81,85 мг/кг. Середньоєфективні дози суміші аміноцукру глюкозаміну та N-ацетилглюкозаміну і окремо кверцетину склали відповідно 61,39 та 20,46 мг/кг.

Результати проведених експериментальних досліджень дозволяють зробити перерахунки доз з урахуванням коефіцієнту видової чутливості тварин і людини та надати поради технологам щодо вмісту активних субстанцій у лікарській формі. Так, відповідно до методики Ю.Р.Риболовлева зі співавт. [8] вміст кверцетину в лікарській формі складає 80 мг, глюкозаміну гідрохлориду — 125 мг, N-ацетилглюкозаміну — 125 мг.

Оскільки перебіг суглобової патології вимагає тривалого медикаментозного лікування в якості

Таблиця 4

Показники летальності щурів при вивченні гострої токсичності композиції на основі глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну, кверцетину при внутрішньоочеревинному введенні, n = 12

Доза, мг/кг	Кількість тварин	Спостерігаємий ефект, загибель тварин/кількість тварин
500	3	0/3
1000	3	0/3
3000	3	0/3
5000	3	0/3

лікарської форми нами запропоновані капсули.

Вивчення токсикологічних параметрів композиції на основі глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну, кверцетину при внутрішньошлунковому введенні здійснено на двох видах тварин: у діапазоні доз 500-5000 мг/кг для мишей та 500-10000 мг/кг — для щурів. Спостереження проводили протягом двох тижнів.

Результати досліджень, представлені в табл. 2, свідчать про відсутність загибелі мишей при внутрішньошлунковому однократному введенні композиції на основі глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну, кверцетину в інтервалі доз 500-5000 мг/кг.

На наступному етапі були проведені дослідження з визначення LD₅₀ композиції на основі глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну, кверцетину для щурів при однократному внутрішньошлунковому введенні. Результати експериментів представлені в табл. 3.

Результати проведених досліджень свідчать, що протягом всього дослідження не зареєстровано жодного випадку летальності щурів у експериментальних групах.

Також було проведено дослідження токсичності композиції на щурах при внутрішньоочеревинному введенні (табл. 4).

При вивченні показників токсичності композиції при внутрішньоочеревинному шляху введення щурам у діапазоні доз 500-5000 мг/кг також не було жодного випадку загибелі тварин.

Під час спостереженнями за тваринами (миші, щури) протягом 14 днів при введенні середніх та низьких доз композиції видимих ознак впливу на загальний стан, зміни поведінки, апетит, стан шкіри та видимих слизових оболонок не було зареєстровано. При введенні високих доз композиції (вище 3000 мг/кг) у перші дні після введення тварини були менш активні, відзначалися незначна слабкість та млявість, які потім зникали.

Відсутність летальності тварин дозволяє вважати, що значення LD₅₀ композиції на основі глюкоз-

аміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну, кверцетину перевищує 5000 мг/кг при внутрішньоочеревинному введенні. Відповідно до класифікації К.К.Сидорова [10] композиція на основі глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну, кверцетину при однократному внутрішньоочеревинному введенні щурам може бути віднесена

до VI класу токсичності — відносно нешкідливі речовини.

ВИСНОВКИ

1. Значення LD₅₀ композиції на основі глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну, кверцетину перевищує максимально досліджувану дозу, тобто LD₅₀ > 5000 мг/кг (внутрішньоочеревинне введення).

2. Середньоєфективна доза композиції, що рекомендується для подальших експериментальних досліджень, складає 81,85 мг/кг.

3. У якості референс-об'єктів запропоновано використовувати монокомпоненти композиції (3 : 1) у відповідних дозах: суміш аміноцукрів — 61,39 мг/кг та кверцетин — 20,46 мг/кг.

ЛІТЕРАТУРА

1. Доклинические исследования лекарственных средств: Метод. рекоменд. / Под ред. А.В.Стефанова. — К.: Авиценна, 2002. — 528 с.
2. Зупанець І.А., Шебеко С.К. Порівняльна токсикодинамічна характеристика протиартрозних засобів на основі субстанцій аміноцукру глюкозаміну // Матер. Всеукр. наук.-практ. конф. за міжнародної участі "Сучасні проблеми судово-токсикологічної науки і практики". — Х.: Вид-во НФаУ, 2009. — С. 28-29.
3. Зупанець І.А., Шебеко С.К., Отрішко І.А. // Клінічна фармація. — 2009. — Т. 13, №1. — С. 42-46.
4. Остеоартроз: консервативная терапия: Монография / Под ред. Н.А.Коржа, Н.В.Дедух, И.А.Зупанца. — Х.: Золотые страницы, 2007. — 424 с.
5. Пастушенко Т.В., Маруший Л.Б., Жуков А.А., Пилипенко Ю.А. // Гигиена и санитария. — 1985. — №6. — С. 46-48.
6. Попов С.Б., Шебеко С.К., Зупанець К.О. та ін. Модифікація фармакологічних властивостей нестероїдних протизапальних препаратів аміноцукром глюкозаміну гідрохлоридом: Метод. рекоменд. — Х., 2007. — 24 с.
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. — 3-е изд. — М.: Медиа сфера, 2006. — 312 с.
8. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. // Доклады АН СССР. — 1979. — Т. 247, №6. — С. 1513-1516.
9. Сигидин Я.А., Шварц Г.Я., Арзамасцев А.П., Либерман С.С. Лекарственная терапия воспалительного процесса: экспериментальная и клиническая фармакология противовоспалительных препаратов. — М.: Медицина, 1988. — 240 с.
10. Сидоров К.К. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения. В кн.: Токсикология новых промышленных химических веществ. — М., 1973. — Вып. 13. — С. 47-57.
11. Туляков В.О., Зупанець К.О., Шебеко С.К. // Фармакол. та лікарська токсикол. — 2009. — №3 (10). — С. 3-9.
12. Туляков В.О., Зупанець К.О., Шебеко С.К. // Фармакол. та лікарська токсикол. — 2009. — №2 (9). — С. 3-8.
13. Ader P., Wessmann A., Wolffram S. et al. // Free Radic. Biol. Med. — 2000. — Vol. 28. — P. 1056-1067.
14. Anjaneyulu M., Chopra K. // Clinical and Experimental Pharmacol. and Physiol. — 2004. — №31. — P. 244-248.
15. Beretz A., Cazenave J. P., Anton R. et al. // Agents Actions. — 1982. — №12. — P. 382-387.
16. Chi Y.S., Jong H.G., Son K.H. et al. // Biochemistry and Pharmacol. — 2001. — №62. — P. 1185-1191.
17. Chi-Yu Y., Su-Lan H., Kuo-Ching W. et al. // J. of Food and Drug Analysis. — 2005. — Vol. 13. — P. 244-250.
18. De Boer V.C.J., Dihal A.A., van der Woude H. et al. // J. of Nutrition. — 2005. — Vol. 135. — P. 1718-1725.
19. Galisteo M., Garcia-Saura M.F., Jimenez R. et al. // Molecular and Cellular Biochemistry. — 2004. — Vol. 259 (1-2). — P. 91-99.
20. Graefe E.U., Derendorf H., Veit M. et al. // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. — 1999. — Vol. 37. — P. 219-233.
21. Graf B.A., Ameho C., Dolnikowski G.G. // J. of Nutrition. — 2006. — Vol. 136. — P. 39-44.
22. Khaled A. Khaled, Yousry M. El-Sayed, Badr M. Al-Hadiya // Drug Development and Industrial Pharmacy. — 2001. — Vol. 29, №4. — P. 397-403.
23. Xiao Chen, Ophelia Q.P. Yin, Zhong Zuo et al. // Pharmac. Res. — 2005. — Vol. 22, №6. — P. 892-901.

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Пушкінська, 27. Тел. (57) 706-30-72.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 22.09.2009 р.