

УДК 616-092.4:616.72-002:615.276

К.О. ЗУПАНЕЦЬ, Н.В. ДЕДУХ*, І.А. ОТРИШКО, С.К. ШЕБЕКО

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

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ОЦІНКА ВПЛИВУ КОМПОЗИЦІЇ НА ОСНОВІ КВЕРЦЕТИНУ ТА ПОХІДНИХ ГЛЮКОЗАМІНУ НА ПЕРЕБІГ ОСТЕОАРТРИТУ З СИНОВІТОМ У ЩУРІВ

На вітамінній моделі остеоартриту у щурів досліджено хондромодулюючу дію композиції на основі глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну та кверцетину у порівнянні з її активними монокомпонентами — сумішшю аміноцукрів та кверцетином. У результаті проведених експериментальних досліджень встановлено позитивний вплив композиції на перебіг остеоартриту, ускладненого синовітом, що виявлявся нормалізацією структурної організації як капсули суглоба, так і суглобового хряща. На фоні проведеного лікування на 30 добу деструктивні зміни, що мали місце у суглобі, були охарактеризовані як слабо виражені у тварин, яких лікували досліджуваною композицією і сумішшю аміноцукрів, та помірно виражені — на фоні лікування кверцетином.

Ключові слова: глюкозаміну гідрохлорид; N-ацетилглюкозамін; кверцетин; вітамінна модель остеоартриту; хондромодулююча дія

ВСТУП

Проблема лікування остеоартриту — захворювання з домінуючою деградацією хрящової тканини, яке досить часто призводить до зниження якості життя хворого, його інвалідизації та соціальної дезадаптації, залишається актуальною проблемою сучасної ревматології [3].

На теперішній час згідно з рекомендаціями ELUAR у комплексній терапії пацієнтів з остеоартритами показано застосування структурномодифікуючих засобів (повільно діючих симптом-модифікуючих препаратів).

З кожним роком доказова база по відношенню до даної групи препаратів на основі природних метаболітів (солей аміноцукрів, зокрема глюкозаміну) суттєво поповнюється. Це обумовлює перспективність пошуку їх нових раціональних сполук з іншими біологічно активними речовинами та розробку лікарських засобів на їх основі [5, 7, 8, 9, 10, 12].

Серія раніше проведених нами досліджень підтвердила перспективність сумісного застосування похідних аміноцукру глюкозаміну — глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну з флавоноїдом кверцетином. Таке поєднання

сприяє підвищенню рівня ефективності шляхом фармакологічного синергізму (ефект потенціювання) [1].

Метою даного дослідження стало експериментальне вивчення показників метаболізму суглобового хряща під впливом композиції на основі суміші аміноцукрів — глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну з кверцетином на фоні експериментального моделювання остеоартриту, індукованого внутрішньосуглобовим введенням вітаміну А.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження хондромодулюючої дії композиції на основі суміші аміноцукрів — глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну та флавоноїду кверцетину проводили на моделі вітамінного остеоартриту, індукованого внутрішньосуглобовим введенням вітаміну А [4].

Олійний розчин вітаміну А вводили протягом 2-х днів (по одній ін'єкції щоденно із розрахунку 13,76 мг/кг маси щура). Лікування тварин розпочинали на 3-й день експерименту.

Препарати вводили внутрішньошлунково спеціальним зондом впродовж 30 діб. Оперованих тварин розділили на наступні групи: 1 група — контрольні (неліковані) тварини одержували роз-

© К.О. Зупанець, Н.В. Дедух*, І.А. Отришко, С.К. Шебеко, 2010

чинник (фізіологічний розчин) у еквівалентній кількості, як і дослідні тварини; 2 група — тварини, які одержували досліджувану композицію у дозі 81,85 мг/кг; 3 група — тварини, які одержували суміш аміноцукрів у дозі 61,39 мг/кг; 4 група — тварини, які одержували кверцетин у дозі 20,46 мг/кг.

Експерименти були виконані відповідно до правил «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних і інших наукових цілях» [11].

Евтаназію щурів здійснювали шляхом передозування ефіру.

Проводили макро- та мікроскопічне дослідження суглобів щурів.

Для світлової мікроскопії матеріал (ділянка проксимального відділу стегнової кістки) фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, декальцинували в 5% розчині азотної кислоти, зневоднювали в спиртах зростаючої міцності та заключали в целоїдин. Виготовляли зрізи товщиною 7-8 мкм, які забарвлювали гематоксиліном та еозином [2].

На 30 добу експерименту проведено оцінку по бальній системі Mankin H.J. порушень в організації суглобового хряща та капсулі суглоба за досліджуваними показниками (структура хряща, клітини, матрикс, синовіальна оболонка, сумарний бал) [13].

Одержані результати оброблялись методами варіаційної статистики з використанням критеріїв Фішера-Стьюдента за допомогою комп'ютерних програм [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тварин з контрольною патологією на 30 добу експерименту макроскопічно в заворотах суглоба визначалися розростання синовіальної оболонки у вигляді панусу. Капсула суглоба була потовщена. Суглобовий хрящ на ділянках був матовий і місцями мав бурий відтінок.

При мікроскопічному дослідженні встановлено, що синовіальна оболонка капсули суглоба потовщена і нерівномірна за клітинним складом. Виявлялися синовіоцити, що мають крупні гіпохромні ядра, фібробласти, розташовані довгою віссю в різних напрямках, скупчення лімфоцитів і макрофагів (рис. 1 і 2). Клітинний склад свідчить про хронічний запальний процес. Субсиновіально в капсулі збільшена щільність фіброblastів, розташованих неупорядковано серед пучків колагенових волокон. Відмічені невеликі скупчення лімфоцитів і макрофагів. У порожнині суглоба розширилися території сполучної тканини у вигляді панусу, який на значному протязі проростав у товщу суглобового хряща.

У суглобовому хрящі також зафіксований прогрес деструктивних порушень. Поверхня суглобового хряща була нерівномірною. Значно розширені території суглобового хряща, покриті панусом. У таких ділянках суглобового покриття хондроцити були відсутні. Виявлялися поля хондроцитів, які містили лізовані ядра і вакуолізовану цитоплазму. Виявлялися також клітини з щільними пікнотичними ядрами.

Отже, на 30 добу після введення вітаміну А в суглобовому хрящі і належній субхондраль-

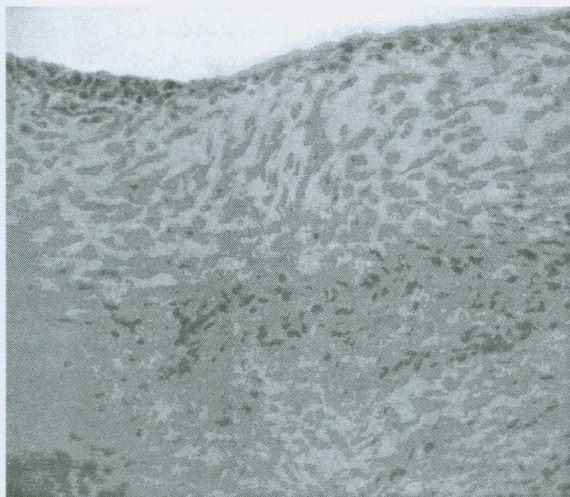


Рис. 1. Фрагмент капсули суглоба. Висока щільність фіброblastів. Осередкові скупчення лімфоцитів і макрофагів у синовіальній оболонці. 30 доба. Контрольна патологія. Гематоксилін і еозин. Зб. 120.

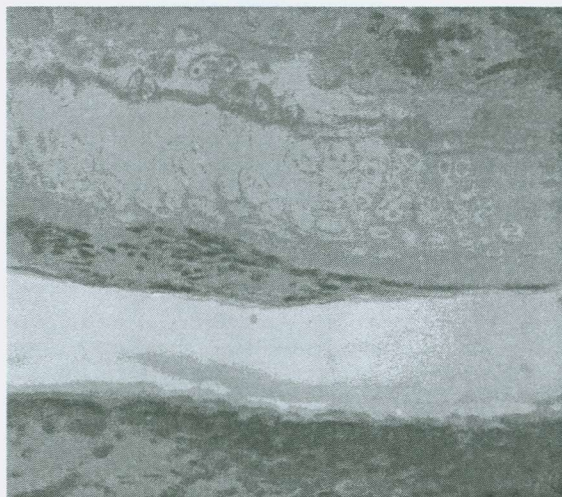


Рис. 2. Розлогі безклітинні поля. Ділянки лізису хондроцитів. Заміщення суглобового хряща сполучною тканиною. 30 доба. Контрольна патологія. Гематоксилін і еозин. Зб. 120.

ній кістковій тканині переважають деструктивні зміни. У капсулі суглоба розвивається синовіт, перебіг якого набуває хронічного характеру. Спостерігається формування панусу, який проростає в порожнину суглоба і нашаровується на суглобовий хрящ. Наявність виражених запальних змін у капсулі суглоба призводить до розвитку деструктивних порушень у суглобовому хрящі.

Оцінюючи в балах зміни структурної організації компонентів суглоба, виявили, що загальний бал виявлених порушень у суглобі склав 15,7, які були класифіковані як маніфестуючі (табл.).

Застосування досліджуваних об'єктів чинило різного ступеня виразності лікувально-профілактичну дію. Так, при спостереженні за тваринами, які одержували досліджувану композицію на основі аміноцукрів та кверцетину, встановлено, що протягом всього терміну спостереження щури були активними.

Макроскопічне дослідження суглобів на 30 добу не виявило виражених порушень. При мікроскопічному аналізі тканин колінних суглобів виявлені слабо виражені структурні порушення. Порожнина суглоба була чистою, поверхня суглобового хряща рівною. У суглобовому хрящі чітко виявлялася зона некальцифікованого хряща і хряща, що кальцифікується, які були розділені тонкою одноконтурною базофільною лінією.

У поверхневій зоні хондроцити розташовувалися в 1-2 шари, не формуючи капсул. Клітини мали овальні гіперхромні ядра, оточені цитоплазмою, витягнутою в краєвих відділах. Довга вісь хондроцитів була орієнтована паралельно поверхні хряща. На окремих ділянках клітини були відсутні або з пікнотичними ядрами. У проміжній і глибокій зонах клітини мали округлу форму, пе-



Рис. 3. Зниження щільності клітин у поверхневій зоні. Невеликі поля хряща без клітин. Хондроцити з пікнотичними ядрами. 30 доба. Композиція. Гематоксилін і еозин. Зб. 65.

реважно розташовувалися в капсулах поодинокі або невеликими групами по 2-4 клітини. Ядра хондроцитів частіше були гіпохромними, їх оточував невеликий обідок слабо базофільної цитоплазми. Щільність клітин по території хряща місцями була нерівномірною — визначалися як ділянки її зниження, так і підвищеної щільності (рис. 3).

Бальна оцінка змін структурної організації компонентів суглобів щурів, яких лікували досліджуваною композицією, за шкалою Mankin Н.Ж. склала 3,7, що було класифіковано як слабо виражені (табл.).

Отже, застосування композиції інгібувало запальний процес у суглобі і пригнічувало розвиток деструктивних і дистрофічних змін у суглобовому хрящі, що виявлялося нормалізацією структурної організації як капсули суглоба, так і суглобового хряща.

Мікроскопічне дослідження суглобів тварин, яких лікували сумішшю аміноцукрів, показало, що синовіальна мембрана потовщена в крайових відділах за рахунок формування проліфератів з лімфоцитів і макрофагів. Фіброзний шар капсули містить одиничні лімфоцити, розташовані серед пучків колагенових волокон і фібробластів. Щільність судин у капсулі суглоба низька. Ознак стазу в кровоносних судинах не виявлено. У крайових відділах суглоба спостерігалася гіперплазія синовіальної оболонки, яка проростала в крайові відділи суглобового хряща у вигляді панусу, що обумовлювало нерівномірну товщину суглобового хряща в таких областях.

Суглобовий хрящ без виражених деструктивних порушень. Проте в поверхневій зоні щільність хондроцитів на ділянках знижена, відмічені невеликі поля без клітин (рис. 4).



Рис. 4. Зниження щільності клітин на невеликих ділянках суглобового покриття. Клітини фібробластичного диферону в крайових відділах суглобового хряща щура. 30 доба. Суміш аміноцукрів. Гематоксилін і еозин. Зб. 100.

Базофільна лінія була одноконтурною без патологічних змін. Зона хряща, що кальцифікується, зберігала характерну організацію. Фронт остеогенезу був відносно рівномірний. У субхондральній кістковій тканині кісткова трабекула була з високою щільністю остеоцитів, субхондральна пластинка — потовщена.

За бальною оцінкою шкали Mankin H.J. сумарний бал порушень у даної групи щурів склав 5,9, що відповідало слабко вираженим змінам (табл.).

Синовіальна оболонка на ділянках суглоба щурів, яким вводили кверцетин, представлена невеликими скупченнями лімфоцитів і одиничними макрофагами. У заворотах суглоба щільність лімфоцитів і фібробластів була високою.

Суглобовий хрящ з дистрофічними і деструктивними порушеннями: виявлялися ділянки загибелі хондроцитів, розташовані в основному в поверхневій і проміжній зонах, хондроцити з пікнотичними ядрами, лізовані хондроцити. У крайових відділах суглобового хряща виявлялися стрічкоподібні проліферати, що складаються з фібробластів (рис. 5).

За шкалою порушень Mankin H.J. сумарний бал у щурів даної групи склав 8,1 (помірно виражені) (табл.).

Отже, лікування тварин кверцетином на тлі вираженого запального процесу в суглобі сприяло зниженню запальних проявів і уповільненню розвитку деструктивних порушень у суглобовому хрящі.

Таким чином, застосування досліджуваних об'єктів сприяло зниженню прояву запальних та деструктивно-дегенеративних процесів у суглобовому хрящі.



Рис. 5. Ділянка капсули і суглобового хряща колінного суглоба щура. Відсутність клітин у некальцифікованому суглобовому хрящі. Дифузна інфільтрація капсули суглоба. Висока щільність фібробластів. 30 доба. Кверцетин. Гематоксилін і еозин. Зб. 80.

ВИСНОВКИ

1. Експериментально встановлено позитивний вплив досліджуваної композиції на перебіг остеоартриту, ускладненого синовітом, що виявлявся нормалізацією структурної організації як капсули суглоба, так і суглобового хряща.
2. На фоні проведеного лікування на 30 добу деструктивні зміни, що спостерігалися у суглобі, були охарактеризовані як слабко виражені у тварин, яких лікували досліджуваною композицією та сумішшю аміноцукрів, та помірно виражені на фоні лікування кверцетином.

Таблиця

ВИРАЖЕНІСТЬ (У БАЛАХ) ЗМІН СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ СУГЛОБОВОГО ХРЯЩА ТА КАПСУЛИ СУГЛОБА ПІСЛЯ МОДЕЛЮВАННЯ КІСТКОВО-ХРЯЩОВОГО ДЕФЕКТУ НА 30 ДОБУ ЕКСПЕРИМЕНТУ НА ФОНІ ЗАСТОСУВАННЯ КОМПЗИЦІЇ ТА РЕФЕРЕНС-ОБ'ЄКТІВ

Досліджувані показники суглоба					
об'єкт дослідження	структура хряща	клітини	матрикс	синовіальна оболонка	сумарний бал
Контрольна патологія	5,2	3,4	3,5	3,6	15,7±0,3 (порушення, що маніфестують)
Композиція	1,1	1,1	0,8	0,7	3,7±0,5 (слабко виражені)
Суміш аміноцукрів	1,5	1,3	1,3	1,2	5,9±0,6 (слабко виражені)
Кверцетин	2,3	1,8	1,8	2,2	8,1±0,6 (помірно виражені)

3. За результатами проведених досліджень композиція на основі суміші аміноцукрів та кверцетину може бути рекомендована для подальшого клінічного вивчення в якості хондропротекторного засобу у пацієнтів з деструктивно-запальними захворюваннями суглобів.

**ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ
ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ**

1. Дослідження токсичних та протизапальних властивостей композиції на основі аміноцукрів — похідних глюкозаміну та флавоноїду кверцетину / І.А. Зупанець, С.Б. Попов, В.Ф. Ксенко, І.А. Отришко // Клінічна фармація. — 2009. — Т. 13, №4. — С. 50-53.
2. Микроскопическая техника: руководство / Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. — М.: Медицина, 1996. — 544 с.
3. Остеоартроз — консервативная терапия: [монография] [Корж Н.А., Хвисяк А.Н., Дедух Н.В. и др.]; под ред. Н.А. Коржа, Н.В. Дедух, И.А. Зупанца. — Х.: Золотые страницы, 2007. — 424 с.
4. Пат. 79206 Україна, МПК G 09 B 23/28. Спосіб моделювання остеоартрозу з синовітом / В.М. Коваленко, М.О. Корж, Н.В. Дедух та ін. (Україна). Заявник та патентовласник Нац. наук. центр «Інститут кардіології ім. акад. М.Д. Стражеска АМН України». — № а 2005 10418. — Заявл.: 04.11.05. Опубл.: 25.05.07. — Бюл. №7.
5. 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.
6. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О.Ю. Реброва — М.: Медиа Сфера, 2006. — 312 с.
7. Туляков В.О. Фармакологічні властивості глюкозаміну: мембраностабілізуючі, протизапальні, антиоксидантні та імунотропні / В.О. Туляков, К.О. Зупанець, С.К. Шебеко // Фармакол. та лікарська токсикол. — 2009. — №2 (9). — С. 3-8.
8. Ader P., Wessmann A., Wolfram S. et al. Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig / P. Ader, A. Wessmann, S. Wolfram et al. // Free Radic. Biol. Med. — 2000. — Vol. 28. — P. 1056-1067.
9. Chi Y. S., Jong H. G., Son K. H. et al. Effects of Naturally Occurring Prenylated Flavonoids on Enzymes Metabolizing Arachidonic Acid: Cyclooxygenases and Lipoxygenases / Y. S. Chi, H. G. Jong, K. H. Son et al. // Biochemistry and Pharmacol. — 2001. — №62. — P. 1185-1191.
10. Chi-Yu Y., Su-Lan H., Kuo-Ching W. et al. Bioavailability and Metabolic Pharmacokinetics of Rutin and Quercetin in Rats / Y. Chi-Yu, H. Su-Lan, W. Kuo-Ching et al. // J. of Food and Drug Analysis. — 2005. — Vol. 13. — P. 244-250.
11. 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.
12. Graf B.A., Ameho C., Dolnikowski G.G. Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin / B.A. Graf, C. Ameho, G.G. Dolnikowski // J. of Nutrition. — 2006. — Vol. 136. — P. 39-44.
13. Mankin H.J. Biochemical and Metabolic Abnormalities in Articular Cartilage from Osteo-Arthritic Human Hips / H.J. Mankin // J. Bone Joint Surgery. — 1957. — Vol. 53 A, №3. — P. 523-537.

УДК 616-092.4:616.72-002:615.276

Е.А. Зупанец, Н.В. Дедух, І.А. Отришко, С.К. Шебеко

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ КВЕРЦЕТИНА И ПРОИЗВОДНЫХ ГЛЮКОЗАМИНА НА ТЕЧЕНИЕ ОСТЕОАРТРИТА С СИНОВИТОМ У КРЫС

На витаминной модели остеоартрита у крыс исследовано хондромодулирующее действие композиции на основе глюкозамина гидрохлорида, N-ацетилглюкозамина и кверцетина в сравнении с ее активными монокомпонентами — смесью аминсахаров и кверцетином. В результате проведенных экспериментальных исследований установлено позитивное влияние композиции на течение остеоартрита, осложненного синовитом, который проявлялся нормализацией структурной организации как капсулы сустава, так и суставного хряща. На фоне проведенного лечения на 30 сутки деструктивные изменения, которые имели место в суставе, были охарактеризованы как слабо выраженные у животных, леченых исследуемой композицией и смесью аминсахаров, и умеренно выраженные — на фоне лечения кверцетином.

Ключевые слова: глюкозамина гидрохлорид; N-ацетилглюкозамин; кверцетин; витаминная модель остеоартрита; хондромодулирующее действие

UDC 616- 092.4:616.72- 002:615.276

K.O. Zupanets, N.V. Dedukh, I.A. Otrishko, S.K. Shebeko

EXPERIMENTAL ESTIMATION OF INFLUENCE OF COMPOSITION CONTAINING QUERCETIN AND GLUCOSAMINE DERIVATES ON FOLOWING OF OSTEOARTHRITIS WITH SYNOVITIS IN RATS

On the vitamin model of osteoarthritis it has been studied the chondromodulative action of composition containing glucosamine hydrochloride, N-acetylglucosamine and quercetine in comparison with it active monocomponents — mixture of aminosugars and quercetine on the model of posttraumatic osteoarthritis in rats. As a result of the conducted experimental researches it has been marked the positive influence of composition on the folowing of osteoarthritis, complicated with synovitis, which showed up with normalization of structural organization of both joint capsule and articular cartilage. On the background of the conducted treatment on 30 day the destructive changes which took place in joint were described as poorly expressed in animals, treated with composition and mixture of aminosugars and moderato expressed, — on the background quercetine treatment.

Key words: glucosamine hydrochloride; N-acetylglucosamine; quercetine; vitamin model of osteoarthritis; chondromodulative action

Адреса для листування:

61002, м. Харків,

вул. Пушкінська, 27.

Кафедра клінічної фармакології

з фармацевтичною опікою НФаУ;

тел./факс: (057) 706-30-72; 706-30-76;

e-mail clinpharm@ukrfa.kharkov.ua

Надійшла до редакції:

08.01.10