

УДК 615.015.21:615.276:616-002.2

ВПЛИВ КОМПОЗИЦІЇ НА ОСНОВІ КОМБІНАЦІЇ ДОКСИЦИКЛІНУ ГІДРОХЛОРИДУ ТА ГЛЮКОЗАМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ НА ІМУНОФЕРМЕНТНІ ПОКАЗНИКИ ЩУРІВ З КОЛАГЕН-ІНДУКОВАНИМ АРТРИТОМ

К.М.Ткаченко, І.А.Отрیشко, С.К.Шебеко

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: доксицикліну гідрохлорид; глюкозаміну гідрохлорид; комбінація; колаген-індукований артрит; ейкозаноїди

THE EFFECT OF THE COMPOSITION CONTAINING THE COMBINATION OF DOXYCYCLINE HYDROCHLORIDE AND GLUCOSAMINE HYDROCHLORIDE ON THE IMMUNOSORBENT INDICATORS IN RATS WITH COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS

К.М. Tkachenko, I.A. Otrishko, S.K. Shebeko

National University of Pharmacy

Key words: doxycycline hydrochloride; glucosamine hydrochloride; combination; collagen-induced arthritis; eicosanoids

On the model of collagen-induced arthritis in rats the anti-inflammatory properties of the composition containing the combination of doxycycline hydrochloride and glucosamine hydrochloride have been studied in comparison with its active monocomponents – doxycycline, glucosamine hydrochloride. According to the results of the experimental studies conducted it has been proven that the composition containing the combination of doxycycline hydrochloride and glucosamine hydrochloride has a strong beneficial effect on the metabolism of the cartilage and bone tissue on the background of the autoimmune arthritis development and leads to inhibition of autoimmune processes in the connective tissue of animals. The normalization of the functional state of the joints and the immunosorbent indicators has been observed. According to the degree of pharmacological effects on the most parameters studied the combination exceeds the reference objects – the substance of doxycycline hydrochloride and glucosamine hydrochloride. The composition containing the combination of doxycycline hydrochloride and glucosamine hydrochloride is a promising corrector of the inflammatory and destructive joint diseases with the autoimmune component, and can be recommended for application in the complex therapy of patients with immuno-inflammatory and inflammatory-destructive diseases of the joints.

Розвиток генних і молекулярних технологій сприяє більш глибокому розумінню патогенезу артритів, що дозволило оптимізувати терапію, спрямовану на пригнічення основних медіаторів запалення. За сучасними уявленнями в патогенезі артритів важливу роль відіграє запалення, яке впливає на всі структури суглоба, що вимагає проведення активного лікування, спрямованого на різні ланки імунного запалення [1].

Характерні порушення у хворих з ревматичними захворюваннями пов'язані з субхондральною кісткою, процесами регуляції кісткоутворення, в якому беруть участь гормони, фактори росту, цитокіни. Особлива роль відводиться прозапальним

цитокінам – інтерлейкінам-1, -6, -17, медіаторам запалення – простагландинам, лейкотрієнам. При впливі на тканини механічних, хімічних або імунологічних стимулів відбуваються синтез і вивільнення ейкозаноїдів, тому запальна реакція завжди супроводжується виділенням простагландинів. Характерною особливістю хондроцитів при артриті є гіперекспресія ферменту циклооксигенази-2, який індукує синтез простагландинів, що беруть участь у розвитку запалення [1]. Перетворення арахідонової кислоти відбувається двома шляхами: циклооксигеназним – за допомогою ферменту циклооксигенази-2 (ЦОГ-2) або ліпоксигеназним, що каталізується ферментом 5-ліпоксигеназою.

Каскад цих перетворень зумовлює надлишкове утворення високоактивних біологічних субстанцій – ейкозаноїдів, серед яких виділяють три основні групи: простагландини (ПГ), тромбоксани (ТХ), лейкотрієни (ЛТ).

Для регуляції біосинтезу простагландинів і лейкотрієнів застосовуються різні лікарські препарати, які мають протизапальну дію. Їх ефект заснований на інгібуванні ферментів окиснення арахідонової кислоти. Однак ці препарати інгібують окиснення жирних кислот в інших органах і тканинах, викликаючи порушення обміну ейкозаноїдів, що може призводити до негативних побічних ефектів цих препаратів [4]. Таким чином, актуальним є пошук нових та модифікація існуючих засобів з метою створення більш ефективних та безпечних антиартрит-

них препаратів. Одними з таких препаратів є антибактеріальні лікарські засоби, які, окрім свого основного антибактеріального ефекту, мають інші позаантибіотичні властивості [3, 10, 11]. Серія клінічних та експериментальних досліджень свідчить про те, що у тетрациклінів є ряд чинників, що зумовлюють протизапальну активність. У літературі є дані про успішне застосування доксицикліну у хворих ревматологічного профілю. Застосування цього препарату призводить до позитивної динаміки за рядом показників [12]. Проте на шляху більш широкого застосування тетрациклінів стоїть токсичність, пов'язана з відсутністю селективності дії.

Тому представляється доцільним комбінувати тетрацикліни з речовинами, які можуть знижувати їх токсичну дію. Нашу увагу привернув глюкозамін, який здатен пригнічувати активність металопротеїнази, що сприяють деградації матриксу та накопиченню макромолекул у матриксі сполучної тканини [8, 10].

Таким чином, можна припустити, що, створюючи комбіновані засоби на основі доксицикліну та глюкозаміну, можна отримати препарат, який проявляє протизапальну, хондропротекторну та анальгетичну активність і при цьому має покращені токсикологічні характеристики.

Метою даного дослідження стало експериментальне вивчення протизапальних властивостей композиції на основі комбінації доксицикліну гідрохлориду та глюкозаміну гідрохлориду (Д+ГА) у порівнянні з референс-об'єктами на моделі колаген-індукованого артриту у щурів.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на моделі колаген-індукованого артриту (КІА) у щурів, яку відтворювали шляхом підшкірно-

го введення в основу хвоста емульгованої суміші 0,2% розчину бичачого колагену II типу («Sigma-Aldrich», США) в 0,1 М розчині оцтової кислоти та повного ад'юванта Фрейнда («Sigma-Aldrich», США) у співвідношенні 1:1 в дозі 2 мг/кг за колагеном [13]. Через 1 тиждень для потенціювання аутоімунного процесу введення імунізуючої суміші повторювали таким же чином і в тій же дозі. Після закінчення латентного періоду (через 10-14 днів) у тварин розвивався поліартрит задніх і передніх кінцівок. Починаючи з 14-го дня експерименту і впродовж 2 тижнів, усі тварини отримували відповідні лікарські препарати щодня перорально 1 раз на добу у вигляді водних суспензій. Впродовж експерименту оцінювали стан суглобів передніх і задніх кінцівок тварин (ступінь рухливості, набрякості, гіперемії), а також інтенсивність перебігу запальної реакції в місці введення імунізуючої суміші.

В експерименті були використані 60 білих безпородних щурів обох статей віком 3-4 місяці з масою тіла 180-200 г, яких відбирали для дослідження і випадковим чином розподіляли на 6 дослідних груп по 10 тварин у кожній: 1 – інтактний контроль; 2 – контрольна патологія (модель артриту без лікування); 3 – тварини, що одержували досліджувану композицію (1:2) у дозі ED_{40} 44,86 мг/кг [2]; 4 – тварини, що одержували доксицикліну гідрохлорид у дозі ED_{40} 15,03 мг/кг [2]; 5 – тварини, що одержували глюкозаміну гідрохлорид у дозі ED_{40} 29,83 мг/кг [2]; 6 – тварини, що одержували диклофенак натрію у дозі ED_{50} 8,0 мг/кг.

На 28 день тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом та проводили забір біоматеріалу для клінічних та імуноферментних досліджень [5] (вихід-

ні дані та станом на 28-му добу) за допомогою дослідницьких наборів «Prostaglandin E2 ELISA Kit #404110», «6-keto-Prostaglandin F1alpha ELISA Kit #404310», «Thromboxane B2 ELISA Kit #405110» та «Leukotriene B4 ELISA Kit #406110» виробництва «NEOGEN Corporation» (США), в ході яких визначали вміст наступних медіаторів запалення: простагландину E_2 (PGE_2), 6-кето-простагландину $F_{1\alpha}$ (6-кето- $PGF_{1\alpha}$) – метаболіту простагландину I_2 (PGI_2), тромбоксану B_2 (TxB_2) – метаболіту тромбоксану A_2 (TxA_2) та лейкотрієну B_4 (LTB_4).

Експерименти проводились у відповідності з директивою Ради ЄС 2010/63/EU про дотримання законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментальної та іншої наукової мети [7, 9].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерних програм методами варіаційної статистики з використанням критеріїв Фішера-Стьюдента [6].

Результати та їх обговорення

Після моделювання КІА у всіх тварин спостерігали розвиток поліартриту, що виявлявся появою гіперемії та набряком кінцівок, збільшенням їх розмірів та болісністю при напружуванні. Максимальний прояв ознак поліартриту спостерігався на 12-14 день експерименту після повторного введення імунізуючої суміші. Тварини були менш рухливими, знижувалося споживання їжі та води і їх загальна активність протягом дня.

Одним з найінформативніших показників інтенсивності перебігу аутоімунного артриту та ефективності експериментальної терапії є динаміка вмісту ейкозаноїдів у сироватці крові тварин під впливом компози-

Таблиця

Вплив композиції «Доксицикліну гідрохлориду та глюкозаміну гідрохлориду» (1:2) та референтних об'єктів на вміст ейкозаноїдів у сироватці крові щурів з колаген-індукованим артритом (n=60)

Дослідна група	PGE ₂ , пг/мл	6-keto-PGF _{1α} (метаболіт PGI ₂), пг/мл	TxB ₂ (метаболіт TxA ₂), пг/мл	LTB ₄ , пг/мл
Вихідні дані				
Інтактний контроль	879,8±12,5	261,6±4,2	242,6±9,5	261,4±6,3
28 доба				
Контрольна патологія	1248,4±26,1 ¹	294,3±4,1 ¹	493,2±4,8 ¹	421,3±4,7 ¹
Композиція	964,1±8,3 ^{1,2,5,6}	270,3±3,2 ^{2,5}	298,3±5,2 ^{1,2,5,6}	380,1±2,8 ^{1,2,5,6}
Доксицикліну гідрохлорид	987,2±8,3 ^{1,2,5,6}	283,4±7,5 ¹	312,5±6,7 ^{1,2,5,6}	386,2±4,7 ^{1,2,5}
Глюкозаміну гідрохлорид	1101,5±11,6 ^{1,2,3,4,6}	289,7±8,1 ^{1,3}	468,7±3,5 ^{1,2,3,4,6}	408,5±4,2 ^{1,3,4}
Диклофенак натрію	925,5±13,6 ^{1,2,3,4,5}	279,2±5,4 ^{1,2}	265,4±5,9 ^{1,2,3,4,5}	398,3±6,5 ^{1,2,3}

Примітки:

- 1) ¹ – p ≤ 0,05 відносно інтактних тварин;
- 2) ² – p ≤ 0,05 відносно контрольних тварин;
- 3) ³ – p ≤ 0,05 відносно тварин, що отримували композицію;
- 4) ⁴ – p ≤ 0,05 відносно тварин, що отримували доксицикліну гідрохлорид;
- 5) ⁵ – p ≤ 0,05 відносно тварин, що отримували глюкозаміну гідрохлорид;
- 6) ⁶ – p ≤ 0,05 відносно тварин, що отримували диклофенак натрію.

ції та препаратів порівняння. Результати дослідження вмісту ейкозаноїдів на тлі розвитку КІА у щурів та під впливом дослідних об'єктів наведені в таблиці.

У ході дослідження було виявлено, що на тлі розвитку патології відмічалось вірогідне підвищення вмісту ейкозаноїдів у сироватці крові щурів відносно інтактних тварин. При цьому застосування досліджуваної композиції сприяло нормалізації вмісту ейкозаноїдів у сироватці крові щурів, підтверджене наявністю вірогідних розбіжностей з нелікованими контрольними тваринами. Так, рівень PGE₂ знижувався в 1,3 рази; вміст PGI₂ – в 1,1 рази; TxB₂ – 1,7 рази та рівень LTБ₄ – в 1,1 рази. За вмістом PGE₂ зафіксовані достовірні відмінності досліджуваної композиції, що майже в 1,1 рази перевершували показники тварин, які отримували глюкозаміну гідрохлорид та доксициклін. Показники вмісту PGI₂ на фоні лікування композицією (Д+ГА) мали чітку тенденцію до нормалізації (інтактні тварини), вірогідно відрізнялися від тварин із групи контрольної патології та

тварин, які отримували глюкозаміну гідрохлорид.

На фоні лікування досліджуваною композицією вміст TxB₂ достовірно відрізнявся від нелікованих тварин з патологією та в 1,1 рази перевершував дані показники для тварин, яких лікували диклофенаком натрію і доксицикліном та в 1,6 рази – показники тварин, які застосовували глюкозаміну гідрохлорид.

Лікувальне застосування доксицикліну гідрохлориду сприяло зниженню проявів запалення та деструкції у суглобах. Він достовірно нормалізував вміст PGE₂, TxB₂ та LTБ₄ стосовно контрольних тварин і тварин, яких лікували глюкозаміну гідрохлоридом (перевершували в 1,1 рази).

Глюкозаміну гідрохлорид достовірно нормалізував вмістом PGE₂ та TxB₂ стосовно контрольних тварин.

Протизапальні властивості комбінації на основі доксицикліну гідрохлориду і глюкозаміну гідрохлориду обумовлені синергічною взаємодією її компонентів.

Аналіз динаміки показників на фоні застосування диклофе-

наку натрію свідчить про більш виразний вплив даного НПЗП на циклооксигеназний шлях метаболізму арахідонової кислоти, що віддзеркалювалося переважним інгібуванням синтезу ПГ і тромбоксанів та повністю узгоджувалося з літературними даними.

Таким чином, за результатами проведених клінічних та імуноферментних досліджень доведено, що композиція на основі комбінації доксицикліну гідрохлориду та глюкозаміну гідрохлориду чинить виражений сприятливий вплив на показники обміну хрящової та кісткової тканини на тлі розвитку аутоімунного артриту та призводить до гальмування імунозапальних процесів у сполучній тканині тварин. Також варто відзначити більшу виразність лікувального ефекту композиції (Д+ГА) порівняно із обраними референс-об'єктами – субстанцією доксицикліну та глюкозаміну.

ВИСНОВКИ

1. Композиція на основі комбінації доксицикліну гідрохлориду та глюкозаміну гідрохлориду чинить позитивний вплив

на перебіг колаген-індукованого артриту, що супроводжується нормалізацією імунзапальних процесів у сполучній тканині тварин.

2. За ступенем фармакологічного впливу на більшість до-

сліджуваних показників композиція (Д+ГА) перевершує референс-об'єкти – субстанцію доксицикліну та глюкозаміну.

3. Комбінація на основі доксицикліну гідрохлориду і глюкозаміну гідрохлориду проявляє

протизапальні властивості, обумовлені синергічною взаємодією його компонентів.

4. Композиція (Д+ГА) є перспективним коректором запально-деструктивних захворювань суглобів з аутоімунним компонентом.

ЛІТЕРАТУРА

1. Балабанова Р.М. // Современная ревматол. – 2014. – №2. – С. 92-95.
2. Зупанець І.А., Ткаченко К.М., Отрішко І.А., Грінцов Є.Ф. // Укр. журн. клінічної та лабораторної медицини. – 2014. – Т. 9, №3. – С. 37-40.
3. Зупанець І.А., Ткаченко Е.М., Сахарова Т.С. // Эксперимент. и клин. фармакол. – 2012. – №12. – С. 49-50.
4. Камышников В.С. Лабораторная диагностика внутренних и хирургических болезней: Учеб. пособие. – Мн: Адукацыя і выхаванне, 2012. – 584 с.
5. Каратеев А.Е., Успенский Ю.П., Пахомова И.Г., Насонов Е.Л. // Научно-практ. ревматол. – 2012. – №3. – С. 101-133.
6. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – 2-е изд. – К.: Морион, 2001. – 407 с.
7. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-6.0:2008. Лікарські засоби. Належна лабораторна практика (видання офіційне) / О.Стефанов, Т.Бухтіарова, В.Коваленко та ін. – К.: Моріон, 2009. – С. 37-68.
8. Остеоартроз: консервативная терапия: Монография / Под ред. Н.А.Коржа, Н.В.Дедух, И.А.Зупанца. – Х.: Золотые страницы, 2007. – 424 с.
9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I / Под ред. А.Н.Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
10. Чичасова Н.В. // Лечащий врач. – 2007. – №2. – С. 22-26.
11. Altman R.D. // Expert Rev. Clinical Pharmacol. – 2009. – Vol. 2 (4). – P. 359-371.
12. O'Dell J.R., Elliott J.R., Mallek J.A. // Arthritis & Rheumatism. – 2006. – Vol. 2. – P. 621-627.
13. Remmers E.F., Joe B., Griffiths M.M. et al. // Arthritis & Rheumatism. – 2002. Vol. 46, №8. – P. 2225-2234.

ВПЛИВ КОМПОЗИЦІЇ НА ОСНОВІ КОМБІНАЦІЇ ДОКСИЦИКЛІНУ ГІДРОХЛОРИДУ ТА ГЛЮКОЗАМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ НА ІМУНОФЕРМЕНТНІ ПОКАЗНИКИ ЩУРІВ З КОЛАГЕН-ІНДУКОВАНИМ АРТРИТОМ

К.М.Ткаченко, І.А.Отрішко, С.К.Шебеко

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: доксицикліну гідрохлорид; глюкозаміну гідрохлорид; комбінація; колаген-індукований артрит; ейкозаноїди

На моделі колаген-індукованого артриту у щурів досліджені протизапальні властивості композиції на основі комбінації доксицикліну гідрохлориду та глюкозаміну гідрохлориду у порівняльному аспекті з її активними монокомпонентами – доксицикліну гідрохлоридом, глюкозаміну гідрохлоридом. У результаті проведених експериментальних досліджень доведено, що композиція на основі комбінації доксицикліну гідрохлориду та глюкозаміну гідрохлориду чинить виражений сприятливий вплив на показники обміну хрящової та кісткової тканини на тлі розвитку аутоімунного артриту та призводить до гальмування імунзапальних процесів у сполучній тканині тварин. Відмічена нормалізація функціонального стану суглобів та імунферментних показників. За ступенем фармакологічного впливу на більшість досліджуваних показників комбінація перевершує референс-об'єкти – субстанцію доксицикліну та глюкозаміну гідрохлориду. Композиція є перспективним коректором запально-деструктивних захворювань суглобів з аутоімунним компонентом та може бути рекомендована до застосування у складі комплексної терапії пацієнтів із імунзапальними та запально-деструктивними захворюваннями суглобів.

ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ КОМБИНАЦИИ ДОКСИЦИКЛИНА ГИДРОХЛОРИДА И ГЛЮКОЗАМИНА ГИДРОХЛОРИДА НА ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРЫС С КОЛЛАГЕН-ИНДУЦИРОВАННЫМ АРТРИТОМ**Е.М.Ткаченко, И.А.Отришко, С.К.Шебеко****Национальный фармацевтический университет**

Ключевые слова: доксициклина гидрохлорид; глюкозамина гидрохлорид; композиция; диклофенак натрия; коллаген-индуцированный артрит

На модели коллаген-индуцированного артрита у крыс исследованы противовоспалительные свойства композиции на основе комбинации доксициклина гидрохлорида и глюкозамина гидрохлорида в сравнительном аспекте с ее активными монокомпонентами – доксициклином, глюкозамина гидрохлоридом. В результате проведенных экспериментальных исследований доказано, что композиция на основе комбинации доксициклина гидрохлорида и глюкозамина гидрохлорида оказывает выраженное благоприятное влияние на показатели обмена хрящевой и костной ткани на фоне развития аутоиммунного артрита и приводит к торможению аутоиммунных процессов в соединительной ткани животных. Отмечена нормализация функционального состояния суставов и иммуноферментных показателей. По степени фармакологического воздействия на большинство исследуемых показателей комбинация превосходит референс-объекты – субстанцию доксициклина и глюкозамина гидрохлорида. Композиция является перспективным корректором воспалительно-деструктивных заболеваний суставов с аутоиммунным компонентом и может быть рекомендована к применению в составе комплексной терапии пациентов с иммуновоспалительными и воспалительно-деструктивными заболеваниями суставов.

Адреса для листування:

61057, м. Харків, вул. Пушкінська, 27.

Тел. (57) 706-30-72. E-mail: clinpharm@nuph.edu.ua.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 01.08.2016 р.