

УДК 616.727/.728–002–092.9:615.262.1(477)

Дослідження впливу сполук глюкозаміну гідрохлориду на окремі ланки метаболізму сполучної тканини та запальний процес в умовах моделювання кортикостероїдного остеоартрозу

С.М. Осадченко

Державне підприємство «Український медичний центр сертифікації МОЗ України», Київ

The article describes results of a biochemical study of changes in the content of articular cartilage matrix macromolecules in cartilaginous tissue, as well as markers of inflammatory processes and alkaline phosphatase activity in blood serum of rats with a model of corticosteroid dystrophy under the influence of their treatment with compounds of glucosamine hydrochloride plus glucosamine acetylsalicylate with ratios 2:1, 1:1 and 1:2 by weight and a dose of 100 mg/kg. It was found out that in ratios of 2:1 and 1:1 the above compositions produced more pronounced effects to stimulate, in the cartilage matrix, the accumulation of carbon-protein compounds, assessed by the content of hexosamines, and noncollagenous proteins, determined by the content of tyrosine. Data of biochemical studies of blood serum demonstrated reduction in the inflammatory process activity. In order to develop a new antiarthrotic drug with combined chondroprotective and anti-inflammatory effects, a composition with a ratio of 1:1 by weight is recommended.

Представлены результаты биохимического исследования изменения содержания макромолекул матрикса суставного хряща в хрящевой ткани, а также маркеров воспалительных процессов и активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс с моделью кортикостероидной дистрофии под влиянием лечения композициями глюкозамина гидрохлорида с глюкозамина ацетилсалицилатом 2:1; 1:1 и 1:2 по массе в дозе 100 мг/кг. Отмечено, что в соотношениях 2:1 и 1:1 указанные композиции более выражено стимулировали накопление в матриксе хряща углеводно-белковых соединений, оцениваемых по содержанию гексозаминов, и неколлагеновых белков, которые измерили по содержанию тирозина. Данные биохимических исследований сыворотки крови свидетельствуют о снижении активности воспалительного процесса. Для создания нового противоартрозного препарата с сочетанием хондропротекторного и противовоспалительного действия рекомендована композиция в соотношении 1:1 по массе.

Ключові слова: хрящ, кров, тирозин, гексозамін, запалення, біохімія, експеримент, глюкозаміну гідрохлорид, кислота ацетилсалицилова, остеоартроз

Вступ

Однією з найбільш актуальних проблем сучасної фармакології є розробка нових дієвих лікарських засобів для корекції метаболічних процесів у випадках дегенеративно-дистрофічних захворювань сполучної тканини, які часто супроводжуються тяжкими запальними ускладненнями [3]. У випадку уражень суглобів спостерігається вивільнення вуглеводно-білкових сполук із міжклітинного матриксу, що є наслідком порушення біосинтетичних процесів у хондроцитах [12]. Суглобовий хрящ є оптимізованим для витримування фізичних навантажень.

Хондроцити відповідають за синтез макромолекул і цілісність міжклітинного матриксу. Невідповідні навантаження змінюють склад хрящової тканини і можуть бути фактором розвитку остеоартрозу. У деградацію компонентів матриксу хряща у випадку остеоартрозу залучено матриксні металопротеази, які руйнують макромолекули хрящової тканини [11]. Співвідношення агрекан/колаген типу II в остеоартрозовому хрящі було в 10–20 разів нижче порівняно з хрящем у нормі. Це свідчить про те, що баланс між основними структурними білками хряща є критичним для цілісності і функції

тканини [7]. Необхідну стійкість до стиснення та еластичність хрящової тканини забезпечує агрекан шляхом гідратації колагенової мережі. Агрекан відіграє протективну роль у запобіганні деградації колагенових фібрил. Молекули агрекану і колагену типу II спільно забезпечують цілісність хряща і його функціональність [9]. Оскільки інгібування активності матриксних металопротеаз знижує втрати хрящем макромолекул, це свідчить про можливість використання даного ефекту як потенційного терапевтичного втручання [10]. Апоптоз, індукований механічними ушкодженнями, може бути знижений шляхом використання антиоксидантів [5]. У багатьох пацієнтів з остеоартрозом з успіхом використовуються глюкозамін. Високі концентрації глюкозаміну чинять анаболічний і протизапальний ефекти [13].

Метою роботи є розв'язання питання про підсилення протизапальних властивостей глюкозаміну гідрохлориду шляхом його комбінування з глюкозаміну ацетилсаліцилатом.

Матеріал і методи

Кортикостероїдну дистрофію у білих щурів-самців лінії вістар 3-місячного віку моделювали шляхом внутрішньом'язового введення 200 мг/кг гідрокортизону ацетату протягом 14 діб [8]. 24 тварини випадковим чином розподілили на 4 групи по 6 тварин у кожній. Досліджувані комбінації медикаментозних препаратів вводили експериментальним тваринам внутрішньошлунково у вигляді водного розчину або суспензії без стабілізатора 1 раз на добу протягом 21 доби. Перша група — контрольна, тварини якої замість лікування отримували 0,5 мл фізіологічного розчину на добу; тварин другої групи лікували композицією глюкозаміну гідрохлориду з глюкозаміну ацетилсаліцилатом (1:2 за масою) у дозі 100 мг/кг; тварин третьої лікували композицією 1:1 за масою у тій же дозі; тварини четвертої групи одержували композицію препаратів у співвідношенні 2:1 за масою в тій же дозі. Водночас використовували групу з 6 інтактних тварин. Після досліду тварин було виведено з експерименту декапітацією під ефірним наркозом. Для біохімічних досліджень у них було взято кров і хрящове покриття з головок кульшового та плечового суглобів, а також із виростків колінного суглоба. У хрящі суглобів визначали вміст вуглеводно-білкових сполук за концентрацією гексозамінів [6], неколагенових білків за тирозином [4]. У сироватці крові визначали вміст глікопротеїнів, сіалових кислот як маркерів запального процесу, а також активність лужної фосфатази, що одночасно показує перебіг процесів запалення і перебудови кісткової тканини [1].

Результати досліджень було статистично оброблено за допомогою пакету програм Microsoft Excel із використанням *t*-критерію Стьюдента з визначенням середніх арифметичних, стандартного відхилення і вірогідності ряду. Після цього результати рядів експериментальних груп порівнювали з даними інтактною та контрольною груп, а також між собою. Статистично вірогідним вважали розходження, якщо $P < 0,05$ і менше [2].

Результати і їх обговорення

Результати досліджень показали, що введення упродовж двох тижнів експериментальним тваринам 200 мг/кг гідрокортизону ацетату призводило до розвитку у останніх вираженої кортикостероїдної дистрофії із поєднанням дегенеративних і вторинних запальних процесів.

Накопичення вуглеводно-білкових сполук у хрящовій тканині щурів було зниженим (таблиця). Було зафіксовано маніфестування запальних змін. Відбувалася перебудова кісткової тканини зі збільшенням активності лужної фосфатази (таблиця).

Після лікування експериментальних тварин композицією глюкозаміну гідрохлориду із глюкозаміну ацетилсаліцилатом у співвідношенні 1:2 за масою вміст вуглеводно-білкових сполук суглобового хряща був цілком нормалізований, зокрема в експериментальних тварин цей показник перевищував рівень на 130,56% порівнянно з таким у нелікованих щурів (таблиця).

Слід відзначити високу протизапальну активність аналізованої композиції. Так, вона знижувала вміст глікопротеїнів і сіалових кислот у сироватці крові експериментальних щурів на 21,94% і 18,71% відповідно порівняно з такими у контрольних тварин (таблиця). Проте вміст глікопротеїнів у сироватці крові все ще залишався на 8,99% більшим, ніж такий у інтактних тварин (таблиця).

Відзначено зниження на 38,56% активності лужної фосфатази в сироватці крові щурів порівняно із такою у тварин контрольної групи, що служить маркером як інтенсивності остеоартротичного процесу, так і перебудови кісткової тканини. За даним показником тварини, яких лікували розглянутою композицією, переважали інтактних щурів на 24,65% (таблиця).

Композиція глюкозаміну гідрохлориду з глюкозаміну ацетилсаліцилатом у співвідношенні 1:1 за масою діяла на гіаліновий хрящ експериментальних тварин з кортикостероїдною дистрофією більш сприятливо, що, імовірно, стало наслідком використання більш оптимальних доз компонентів. Після лікування в суглобовому хрящі щурів було зафіксовано нормалізацію вмісту тирозину та гексоз-

Таблиця. Біохімічні показники сироватки крові та суглобового хряща експериментальних щурів з кортикостероїдною дистрофією, яких лікували композиціями глюкозаміну гідрохлориду з глюкозаміну ацетилсаліцилатом ($M \pm m$)

Субстанція, композиція, n=6	У сироватці крові			У суглобовому хрящі	
	Вміст глікопротеїнів, ммоль/л	Вміст сіалових кислот, ммоль/л	Активність лужної фосфатази, ммоль/л год.	Вміст тирозину, г/100 г	Вміст гексозамінів, г/100 г
1	2	3	4	5	6
Інтактні тварини	2,869±0,063	3,965±0,143	2893±121	0,54±0,06	1,04±0,12
Контрольна група	4,006±0,011 +39,63 % ¹⁾ P<0,001 ¹⁾	5,112±0,090 +28,94 % ¹⁾ P<0,001 ¹⁾	5964±273 +106,15 % ¹⁾ P<0,001 ¹⁾	0,40±0,09 -25,93 % ¹⁾ P>0,05 ¹⁾	0,36±0,08 -65,38 % ¹⁾ P<0,001
Глюкозаміну гідрохлорид + глюкозаміну ацетилсаліцилат 1:2, 100 мг/кг	3,127±0,076 +8,99 % ¹⁾ P<0,05 ¹⁾ -21,94 % ²⁾ P<0,001 ²⁾	4,156±0,156 +4,82 % ¹⁾ P>0,05 ¹⁾ +18,71 % ²⁾ P<0,001 ²⁾	3664±149 +26,65 % ¹⁾ P<0,01 ¹⁾ -38,56 % ²⁾ P<0,001 ²⁾	0,47±0,10 -12,96 % ¹⁾ P>0,05 ¹⁾ +17,47 % ²⁾ P>0,05 ²⁾	0,83±0,14 -2,19 % ¹⁾ P>0,05 ¹⁾ +130,56 % ²⁾ P<0,05 ²⁾
Глюкозаміну гідрохлорид + глюкозаміну ацетилсаліцилат 1:1, 100 мг/кг	3,178±0,095 +10,77 % ¹⁾ P<0,05 ¹⁾ -20,67 % ²⁾ P<0,001 ²⁾	4,201±0,144 +5,95 % ¹⁾ P>0,05 ¹⁾ -17,82 % ²⁾ P<0,001 ²⁾	3321±144 +14,79 % ¹⁾ P<0,05 ¹⁾ -44,32 % ²⁾ P<0,001 ²⁾	0,50±0,11 -7,41 % ¹⁾ P>0,05 ¹⁾ +25,04 % ²⁾ P<0,05 ²⁾	0,99±0,12 -4,81 % ¹⁾ P>0,05 ¹⁾ +175,03 % ²⁾ P<0,01 ²⁾
Глюкозаміну гідрохлорид + глюкозаміну ацетилсаліцилат 2:1, 100 мг/кг	3,478±0,131 +21,22 % ¹⁾ P<0,01 ¹⁾ -13,18 % ²⁾ P<0,01 ²⁾	4,697±0,156 +18,46 % ¹⁾ P<0,01 ¹⁾ -8,12 % ²⁾ P<0,05 ²⁾	3547±146 +22,60 % ¹⁾ P<0,01 ¹⁾ -40,53 % ²⁾ P<0,001 ²⁾	0,40±0,12 -25,92 % ¹⁾ P>0,05 ¹⁾ +0,00 % ²⁾ P>0,05 ²⁾	1,01±0,13 -2,88 % ¹⁾ P>0,05 ¹⁾ +180,56 % ²⁾ P<0,01 ²⁾

Примітки: ¹⁾ порівняно з результатами інтактної групи тварин; ²⁾ порівняно з результатами контрольної групи тварин

амінів, що свідчить про стимуляцію досліджуваною композицією накопичення неколагенових білків і вуглеводно-білкових сполук. Водночас збільшення вмісту гексозамінів у суглобовому хрящі експериментальних тварин сягало 175,03% (таблиця).

Аналіз показників запалення вказував на значне зниження вмісту глікопротеїнів (на 20,67%) і сіалових кислот (на 17,82%) у сироватці крові дослідних щурів порівняно із таким у контрольних тварин. За вмістом глікопротеїнів у сироватці крові досліджувані тварини продовжували переважати інтактних щурів на 10,77% (таблиця).

Активність лужної фосфатази в сироватці крові щурів після лікування даною комбінацією стала меншою на 44,32%, ніж така у контрольних тварин, але залишалася на 14,79% вищою, ніж у щурів інтактної групи (таблиця), що може свідчити про вщухання процесів патологічної перебудови субхондральної кісткової тканини.

Після лікування експериментальних тварин композицією глюкозаміну гідрохлориду із глюкозаміну ацетилсаліцилатом у масовому співвідношенні 2:1 вміст неколагенових білків у хрящовій тканині знизився на 16,66% відносно до такого у здорових тварин, але перевищував на 12,5% відповідний показник у нелікованих щурів (таблиця). Вміст вуглеводно-білкових сполук у хрящі суглобів відповідав такому у щурів інтактної групи, перевищуючи показники контрольної групи на 180,56% (таблиця).

Негативним фактором композиції глюкозаміну гідрохлориду із глюкозаміну ацетилсаліцилатом у масовому співвідношенні 2:1 є слабке пригнічення активності запальних процесів. Так, після лікування експериментальних щурів зазначеною композицією вміст глікопротеїнів і сіалових кислот у сироватці крові залишався більшим на 21,22% і 18,46%, ніж у інтактних тварин відповідно, але був меншим за значення таких показників у контрольних щурів на 13,18% та 8,12% відповідно (таблиця). Після лікування даною композицією не відбувалося нормалізації активності лужної фосфатази в сироватці крові, що знизилася на 40,53% порівняно із такою у нелікованих тварин, але перевищувала рівень у інтактних щурів на 22,6% (таблиця).

Результати аналізу маркерів запалення показали, що композиція глюкозаміну гідрохлориду з глюкозаміну ацетилсаліцилатом у співвідношенні 2:1 за масою не має достатніх протизапальних властивостей.

Висновки

1. Лікування експериментальних тварин із кортикостероїдною дистрофією композиціями глюкозаміну гідрохлориду із глюкозаміну ацетилсаліцилатом у діапазоні співвідношень 2:1–1:2 за масою збільшувало накопичення вуглеводно-білкових сполук. Даний ефект був максимальним у композиції зі співвідношенням компонентів 2:1 та 1:1 за масою. Композиція із

масовим співвідношенням компонентів 1:2 мала менш виражені властивості.

2. Композиції глюкозаміну гідрохлориду з глюкозаміну ацетилсаліцилатом зі співвідношенням компонентів 1:1 та 1:2 за масою чинили виражену протизапальну дію, що виявлялося в зменшенні значень маркерів запальних процесів у щурів, пролікованих даними складами. Для композиції із масовим співвідношенням компонентів 2:1 зазначений ефект був менш вираженим.
3. Враховуючи дані проведених досліджень, для створення нового протиаартрозного препарату з поєднанням стимулювального ефекту на суглобовий хрящ та протизапальної дії за найбільш перспективну визнано композицію глюкозаміну гідрохлориду з глюкозаміну ацетилсаліцилатом у співвідношенні 1:1 за масою.

Література

1. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: справочник в 2-х т. Т.1 / В.С. Камышников. — Минск: Интерсервис, 2003. — 495 с.
2. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Губенко, П.Н. Бабич. — К.: Морион, 2000. — 320 с.
3. Остеоартроз. Консервативная терапия / Н.А. Корж, А.Н. Хвисьюк, Н.В. Дедух и др.; под ред. Н.А. Коржа, Н.В. Дедух, И.А. Зупанца. — Х.: Золотые страницы, 2007. — 424 с.
4. Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани: монография / Л.И. Слуцкий. — Л.: Медицина, 1969. — 375 с.
5. Antioxidants block cyclic loading induced chondrocyte death / B.R. Beecher, J.A. Martin, D.R. Pedersen et al. // *Iowa Orthop. J.* — 2007. — Vol. 27. — P. 1–8.
6. Boas N.F. Method for the determination of hexosamines in tissues / N.F. Boas // *J. Biol. Chem.* — 1953. — Vol. 204, № 2. — P. 553–562.
7. Decreased metalloproteinase production as a response to mechanical pressure in human cartilage: a mechanism for homeostatic regulation / J. Monfort, N. Garcia-Giralt, M.J. López-Armada et al. // *Arthritis Res. Ther.* — 2006. — Vol. 8, № 5. — P. 149.
8. Gray R.G. Intra-articular corticosteroids. An Updated Assessment / R.G. Gray, N.L. Gottlieb // *Clin. Orthop. Rel. Res.* — 1983. — № 177. — P. 235–263.
9. Ishiguro N. Role of aggrecanase and MMP in cartilage degradation / N. Ishiguro, T. Kojima // *Clin. Calcium.* — 2004. — Vol. 14, № 7. — P. 38–44.
10. Mechanical injury potentiates proteoglycan catabolism induced by interleukin-6 with soluble interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha in immature bovine and adult human articular cartilage / Y. Sui, J.H. Lee, M.A. DiMicco et al. // *Arthritis Rheum.* — 2009. — Vol. 60. — P. 2985–2996.
11. Mechanisms and kinetics of glycosaminoglycan release following in vitro cartilage injury / M.A. DiMicco, P. Patwari, P.N. Sriparsky et al. // *Arthr. Rheum.* — 2004. — Vol. 50, № 3. — P. 840–848.
12. The effect of glycosaminoglycan loss on chondrocyte viability: a study on porcine cartilage explants / S. Otsuki, D.C. Brinson, L. Creighton et al. // *Arthritis Rheum.* — 2008. — Vol. 58, № 4. — P. 1076–1085.
13. The reverse glucosamine sulfate pathway: application in knee osteoarthritis / G. Herrero-Beaumont, L.C. Rovati, S. Castaneda et al. // *Expert. Opin. Pharmacother.* — 2007. — Vol. 8. — P. 215–225.