

УДК 547.814.5:547.455.623'233.1:616.61-008.64-036.12

С.К. ШЕБЕКО, к. фарм. н., доцент  
/Національний фармацевтичний університет, Харків/

## Експериментальне вивчення ефективних доз комбінації кверцетину з похідними глюкозаміну за умов розвитку ниркової недостатності

### Резюме

Хронічна хвороба нирок – найбільш значима патологія серед захворювань сечовидільної системи, перебіг якої призводить до неминучого розвитку ниркової недостатності, інвалідизації хворих та втрати соціальної активності. Тому пошук ефективних засобів її корекції є актуальним завданням сучасної фармакології.

**Мета** дослідження – експериментальне вивчення ефективних доз комбінації кверцетину з похідними глюкозаміну при нирковій недостатності у щурів.

**Матеріали та методи.** Дослідження проведено на моделі ниркової недостатності, викликаній введенням хромату калію, у 50 щурів. У тварин визначали діурез, вміст креатиніну крові й сечі, швидкість клубочкової фільтрації, а також розраховували показник активності та середню ефективну дозу досліджуваної комбінації.

**Результати.** Під впливом комбінації кверцетину з похідними глюкозаміну спостерігали вірогідне збільшення, порівняно з нелікованими тваринами, швидкості клубочкової фільтрації, що мало дозозалежний характер. Так, при застосуванні комбінації в дозі 25 мг/кг активність складала 18,3 %, 50 мг/кг – 40,4 % та 100 мг/кг – 59,2 %. Це дозволило розрахувати методом пробіт-аналізу середню ефективну дозу комбінації для лікування ниркової недостатності, яка складала  $79,7 \pm 10,0$  мг/кг.

**Висновки.** За умов розвитку ниркової недостатності у щурів дослідна комбінація кверцетину з похідними глюкозаміну дозозалежно посилює гломерулярну фільтрацію, при цьому її середня ефективна доза складає 79,7 мг/кг. Цю дозу доцільно використовувати при подальшому експериментальному вивченні даної комбінації як засобу терапії хронічної хвороби нирок.

**Ключові слова:** кверцетин, глюкозаміну гідрохлорид, N-ацетилглюкозамін, ефективна доза, ниркова недостатність

Однією з найвагоміших проблем у вітчизняній клінічній практиці є ефективне лікування хронічної хвороби нирок (ХХН). Ця патологія є найбільш соціально значимою серед захворювань сечовидільної системи, її перебіг призводить до неминучого розвитку тяжких ускладнень, таких як хронічна ниркова недостатність, в результаті чого пацієнти стають інвалідами і втрачають свою соціальну активність [10]. Згідно з даними світової статистики, поширеність ХХН становить 10–16 % від загальної чисельності населення і сягає 30 % у осіб похилого віку [8]. На сьогоднішній день в Україні налічується близько 500 тис. хворих на ХХН, більшість з яких не має можливості отримати відповідну медичну допомогу [2]. У зв'язку з цим пошук ефективних засобів корекції ХХН з нефропротекторною і гіпоазотемічною дією є актуальним завданням сучасної експериментальної та клінічної фармакології.

Великий науковий інтерес при вирішенні даної проблеми становить створення комбінованих препаратів на основі мембранопротекторів та антиоксидантів природного походження, до властивостей яких належить нефропротекторний вплив з різними механізмами дії. З цієї метою перспективним є дослідження фармацевтичної комбінації на основі похідних аміноцукру глюкозаміну – глюкозаміну гідрохлориду, та його біологічно

активної форми – N-ацетилглюкозаміну, а також флавоноїду кверцетину.

У раніше проведених експериментальних дослідженнях було показано високу ефективність глюкозаміну та кверцетину при гломерулонефритах і нирковій недостатності за умов їх окремого застосування [3, 4]. Також в експерименті було доведено, що при комбінуванні похідних глюкозаміну з кверцетином значно підвищується нефропротекторна активність на фоні мембранозного ураження нирок. При цьому найбільш перспективною за нефропротекторними властивостями є комбінація із співвідношенням фракції аміноцукрів та флавоноїдів 3:1 [12]. Для продовження поглиблених експериментальних досліджень даної комбінації необхідним є визначення її ефективної дози за умов розвитку ниркової недостатності.

**Метою** даного дослідження стало експериментальне вивчення ефективних доз комбінації кверцетину з похідними глюкозаміну при нирковій недостатності у щурів.

### Матеріали та методи дослідження

Експериментальне дослідження виконано з використанням 50 білих нелінійних щурів масою 180–200 г, яких утримували на стан-

дартному харчовому раціоні віварію при вільному доступі до питної води, постійній вологості та температурному режимі [1, 14]. Усі дослідження були проведені відповідно до директиви Ради ЄС 86/609 ЄЕС від 24 листопада 1986 року про дотримання законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою [13].

Ниркову недостатність відтворювали шляхом підшкірного введення 2,5 % розчину хромату калію в дозі 0,7 мл/кг [6]. Ця модель забезпечує підгострий характер перебігу, при якому хвороба набуває розгорнутого характеру через 10 діб.

Тварини були поділені на 5 експериментальних груп по 10 щурів; 1 та 2 групи були використані у якості інтактного контролю та контрольної патології відповідно. В інших групах тварини на фоні ниркової недостатності отримували комбінацію глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну та кверцетину у співвідношенні 3:3:2 під умовною назвою Глюквамін в дозах 25, 50 та 100 мг/кг (за сумою діючих речовин). Досліджуваний засіб вводили внутрішньовенно щоденно у вигляді суспензії, виготовленої на фізіологічному розчині. Щури контрольних груп отримували фізіологічний розчин у еквівалентній кількості.

Для оцінки функціонального стану нирок на 15 добу експерименту у тварин визначали спонтанний добовий діурез за допомогою індивідуальних метаболітних кліток, після чого їх негайно виводили з досліду з метою отримання сироватки крові для біохімічних досліджень. Далі за допомогою біохімічних наборів «DiaSys» («DiaSys Diagnostic Systems GmbH» (Німеччина) із використанням автоматичного біохімічного аналізатора «Express Plus» («Bayer Diagnostics», Німеччина) визначали вміст креатиніну крові й сечі (за реакцією Яффе) [7] та розраховували показник швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) за кліренсом ендogenous креатиніну [5] за формулою:

$$C_{cr} = U_{cr} \times V / P_{cr}, \text{ де}$$

$C_{cr}$  – кліренс креатиніну;

$U_{cr}$  – концентрація креатиніну в сечі;

$P_{cr}$  – концентрація креатиніну в плазмі крові;

$V$  – добова кількість сечі.

Активність препарату визначали за його здатністю зменшувати порушення гломерулярної фільтрації, що, у свою чергу, оцінювалося ступенем посилення ШКФ у порівнянні з контрольною патологією й було розраховано за формулою:

$$A = \frac{\text{ШКФ}_D - \text{ШКФ}_K}{\text{ШКФ}_I - \text{ШКФ}_K} \times 100 \%, \text{ де}$$

$A$  – активність за впливом на гломерулярну фільтрацію;

$\text{ШКФ}_D$  – швидкість клубочкової фільтрації в дослідній групі;

$\text{ШКФ}_K$  – швидкість клубочкової фільтрації в групі контрольної патології;

$\text{ШКФ}_I$  – швидкість клубочкової фільтрації в інтактній групі.

На підставі залежності активності препарату від використаної дози методом пробіт-аналізу [9] розраховували середню ефективну дозу ( $ED_{50}$ ) при застосуванні за умов розвитку ниркової недостатності.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета програм STATISTICA 10.0, використовуючи t-критерій Стюдента для порівняння незалежних вибірок при рівні вірогідності  $p < 0,05$  [11].

## Результати та їх обговорення

Результати проведених досліджень свідчать, що у тварин групи контрольної патології виникає ниркова недостатність з усіма типовими ознаками (табл. 1). При цьому відмічається вірогідне, відносно інтактних тварин, зменшення діурезу у 1,8 раза, збільшення рівня креатиніну крові у 3,7 раза та відповідне зменшення показника ШКФ у 2,3 раза (до 168,7 мл/добу).

При застосуванні досліджуваної комбінації Глюквамін спостерігали вірогідне підвищення гломерулярної фільтрації відносно нелікованих тварин, що мало дозозалежний характер. Так, під впливом дози 25 мг/кг показники діурезу та ШКФ збільшувались у 1,2 раза, а рівень креатиніну крові зменшувався у 1,4 раза.

При застосуванні дози 50 мг/кг діурез збільшувався у 1,3 раза, ШКФ – у 1,5 раза, а вміст креатиніну крові зменшувався у 1,8 раза. Найбільший вплив на ниркову функцію чинила комбінація в дозі 100 мг/кг, що проявлялось у збільшенні діурезу у 1,6 раза, ШКФ – у 1,8 раза та зниженні рівня креатиніну крові у 3,0 рази. За результатами розрахунків, її активність за впливом на гломерулярну фільтрацію складала: при застосуванні дози 25 мг/кг – 18,3 %, 50 мг/кг – 40,4 % та 100 мг/кг – 59,2 % (табл. 1).

На підставі залежності активності препарату від використаної дози методом пробіт-аналізу [9] було розраховано показник  $ED_{50}$  для досліджуваної комбінації кверцетину з похідними глюкозаміну за впливом на гломерулярну фільтрацію у щурів з нирковою недостатністю.

За допомогою табличних даних відсотки активності в кожній групі були переведені у пробіти ( $y$ ), і далі були визначені їх вагові коефіцієнти ( $B$ ) та місця доз ( $x$ ) із проведенням подальших необхідних розрахунків (табл. 2).

При розрахунках показників  $ED_{16}$ ,  $ED_{50}$  та  $ED_{84}$  використовували рівняння, що відображають залежність між дозами та пробітами [9]:

$$y = A_0 + A_1 x$$

**Таблиця 1.** Показники функції нирок щурів з нирковою недостатністю під впливом експериментальної терапії ( $n=50$ )

Досліджувана група	Діурез, мл/доба	Креатинін крові, мкмоль/л	ШКФ, мл/доба	Активність, %
Інтактний контроль	6,9±0,2	57,4±2,7	391,6±12,1	–
Контрольна патологія	3,9±0,1 1	212,8±16,8 1	168,7±8,3 1	–
Глюквамін 25 мг/кг	4,6±0,2 1, 2, 4	154,9±14,1 1, 2, 4	209,5±5,3 1, 2, 3, 4	18,3±2,4 3, 4
Глюквамін 50 мг/кг	5,0±0,1 1, 2, 4	120,7±9,6 1, 2, 4	258,7±8,9 1, 2, 4	40,4±4,0 4
Глюквамін 100 мг/кг	6,1±0,2 1, 2, 3	71,2±4,8 1, 2, 3	300,7±11,1 1, 2, 3	59,2±5,0 3

Примітки: 1 відмінності вірогідні відносно інтактних тварин ( $p < 0,05$ ); 2 відмінності вірогідні відносно групи контрольної патології ( $p < 0,05$ ); 3 відмінності вірогідні відносно тварин, що отримували комбінацію Глюквамін у дозі 50 мг/кг ( $p < 0,05$ ); 4 відмінності вірогідні відносно тварин, що отримували комбінацію Глюквамін у дозі 100 мг/кг ( $p < 0,05$ ).

**Таблиця 2.** Значення доз і рівня активності для визначення  $ED_{50}$  досліджуваної комбінації при нирковій недостатності методом пробіт-аналізу

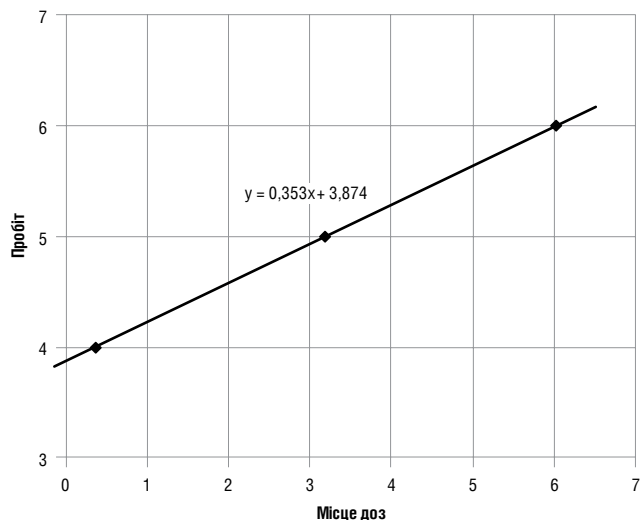
Доза, мг/кг	Активність, %	Місце доз, x	Пробіт, y	Ваговий коефіцієнт, B	xB	x <sup>2</sup> B	yB	xyB
25	18,3	1	4,08	3,7	3,7	3,7	15,10	15,10
50	40,4	2	4,75	4,8	9,6	19,2	22,80	45,60
100	59,2	4	5,23	4,8	19,2	76,8	25,10	100,42
Сума				13,3	32,5	99,7	63,00	161,11

Коефіцієнти  $A_0$  і  $A_1$  розраховували за формулами:

$$A_0 = \frac{(\Sigma B) - (\Sigma x B) A_1}{\Sigma B}$$

$$\frac{\Sigma x B}{\Sigma B} \times [\Sigma y B - (\Sigma x B) A_1] + (\Sigma x^2 B) A_1 = \Sigma x y B$$

У результаті розв'язання даних рівнянь було отримано значення  $A_0$  і  $A_1$ , що дозволило побудувати графік пробіт-аналізу залежності активність–доза, наведений на рисунку 1.



**Рис. 1.** Графік пробіт-аналізу залежності активність–доза

Далі були знайдені значення місць доз (x) для  $ED_{16}$ ,  $ED_{50}$  та  $ED_{84}$ , з урахуванням того, що значення пробітів (y) дорівнюють для  $ED_{16}$  – 4,  $ED_{50}$  – 5 та  $ED_{84}$  – 6.

Стандартну похибку s значення  $ED_{50}$  було визначено за формулою:

$$s = \frac{ED_{84} - ED_{16}}{2\sqrt{n}}, \text{ де}$$

n – число спостережень;

$ED_{84}$  – доза лікарського засобу, при якій спостерігається активність 84 %;

$ED_{16}$  – доза лікарського засобу, при якій спостерігається активність 16 %.

Підсумкові результати розрахунків наведено в таблиці 3.

У результаті проведених розрахунків було визначено показник  $ED_{50}$  досліджуваної комбінації Глюкзамін за впливом на ШКФ на фоні розвитку ниркової недостатності у щурів, який склав  $79,7 \pm 10,0$  мг/кг.

При перерахунку вказаної дози для людини за константами біологічної активності [1] було отримано значення 19 мг/кг, а, зважаючи на те, що середня маса людини становить 70 кг, добова доза комбінації складає 1330 мг (за сумою діючих речовин).

У подальших експериментальних дослідженнях комбінації кверцетину з похідними глюкозаміну при нирковій недостатності доцільно використовувати середню ефективну дозу, що становить 79,7 мг/кг. При проведенні клінічних досліджень даної комбінації у якості засобу для лікування хворих на ХХН рекомендується використовувати її у добовій дозі 19 мг/кг або 1330 мг з урахуванням середньої маси пацієнта 70 кг.

## Висновки

Досліджувана комбінація Глюкзамін, що містить глюкозаміну гідрохлорид, N-ацетилглюкозамін та кверцетин у співвідношенні 3:3:2, у щурів з нирковою недостатністю чинить вірогідний посилюючий вплив на гломерулярну фільтрацію, який має виражений дозозалежний характер.

Середня ефективна доза даної комбінації за умов розвитку ниркової недостатності у щурів складає 79,7 мг/кг. Цю дозу доцільно використовувати при її подальшому експериментальному вивченні з метою обґрунтування застосування в терапії хворих на ХХН.

## Список використаної літератури

1. Доклинические исследования лекарственных средств : метод. рек. / под ред. А. В. Стефанова. – К. : Авиценна, 2002. – 528 с.
2. Доступність лікування методом гемодіалізу в Україні хворих на ХХН V (2006–2015 рр.) / М. О. Колесник, Н. О. Сайдакова, Н. І. Козлюк [та ін.] // Український журнал нефрології та діалізу. – 2017. – № 1 (53). – С. 3–12.
3. Зупанець І. А. Вплив глюкозаміну гідрохлориду та його комбінації з диклофенаком натрію на перебіг хронічної ниркової недостатності в експерименті / І. А. Зупанець, С. К. Шебеко // Медична хімія. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 67–71.
4. Зупанець І. А. Експериментальне вивчення фармакологічних властивостей парентеральної форми кверцетину в умовах розвитку хронічної ниркової недостатності / І. А. Зупанець, С. К. Шебеко, Д. С. Харченко // Вісник фармації. – 2009. – № 2 (58). – С. 75–78.
5. Клиническая лабораторная диагностика : национальное руководство : в 2 т. – Т. 1. / под ред. В. В. Долгова, В. В. Меньшикова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 928 с.
6. Методи експериментального моделювання ураження нирок для фармакологічних досліджень : методичні рекомендації / С. Штриголь, В. М. Лісовий, І. А. Зупанець [та ін.]. – Х. : Видавництво НФаУ, 2009. – 48 с.
7. Методы клинических лабораторных исследований / под ред. В. С. Камышикова. – 4-е изд. – М. : МЕДпресс-информ, 2011. – 752 с.
8. Нефрологія : національний підручник / за ред. Л. А. Пирого, Д. Д. Іванова. – Донецьк : Видавець Заславський, 2014. – 292 с.
9. Прозоровский В. Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований / В. Б. Прозоровский // Психофармакология и биологическая наркология. – 2007. – Т. 7, № 3–4. – С. 2090–2120.
10. Скворцов В. В. Клиническая нефрология : краткий курс / В. В. Скворцов, А. В. Тумаренко. – СПб. : СпецЛит, 2017. – 199 с.

**Таблиця 3.** Результати розрахунків для визначення  $ED_{50}$  досліджуваної комбінації при нирковій недостатності методом пробіт-аналізу

A1	A0	Рівняння залежності «пробіт–доза»	Місце дози $ED_{50}$	Місце дози $ED_{16}$	Місце дози $ED_{84}$	$ED_{50}$ , мг/кг	s, мг/кг
0,353	3,874	$y = 0,353x + 3,874$	3,19	0,36	6,02	79,7	10,0

11. Трухачева Н. В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н. В. Трухачева. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 379 с.
12. Шебеко С. К. Порівняльне експериментальне дослідження нефропротекторних властивостей похідних глюкозаміну у комбінації з кверцетином / С. К. Шебеко // Український біофармацевтичний журнал. – 2017. – № 5 (52). – С. 40–44.
13. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose : Council of Europe. – Strasbourg, 1986. – 52 p.
14. Guide for the care and use of laboratory animals. – 8-th ed. – Washington : The National Academies Press, 2011. – 246 p.

## Резюме

### Экспериментальное изучение эффективных доз комбинации кверцетина с производными глюкозамина в условиях развития почечной недостаточности

С. К. Шебеко

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Хроническая болезнь почек – наиболее значимая патология среди заболеваний мочевыделительной системы, течение которой приводит к неизбежному развитию почечной недостаточности, инвалидизации больных и потере социальной активности. Поэтому поиск эффективных средств ее коррекции является актуальной задачей современной фармакологии.

**Цель** исследования – экспериментальное изучение эффективных доз комбинации кверцетина с производными глюкозамина при почечной недостаточности у крыс.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на модели почечной недостаточности, вызванной введением хромата калия, у 50 крыс. У животных определяли диурез, содержание креатинина крови и мочи, скорость клубочковой фильтрации, а также рассчитывали показатель активности и среднюю эффективную дозу исследуемой комбинации.

**Результаты.** Под влиянием комбинации кверцетина с производными глюкозамина наблюдалось достоверное увеличение, по сравнению с нелечеными животными, скорости клубочковой фильтрации, которое имело дозозависимый характер. Так, при применении комбинации в дозе 25 мг/кг активность составила 18,3 %, 50 мг/кг – 40,4 % и 100 мг/кг – 59,2 %. Это позволило рассчитать методом пробит-анализа среднюю эффективную дозу комбинации для лечения почечной недостаточности, которая составила  $79,7 \pm 10,0$  мг/кг.

**Выводы.** В условиях развития почечной недостаточности у крыс изученная комбинация кверцетина с производными глюкозамина дозозависимо усиливает клубочковую фильтрацию, при этом ее средняя эффективная доза составляет 79,7 мг/кг. Эту дозу целесообразно использовать при дальнейшем экспериментальном изучении данной комбинации как средства терапии хронической болезни почек.

**Ключевые слова:** кверцетин, глюкозамина гидрохлорид, N-ацетилглюкозамин, эффективная доза, почечная недостаточность

## Summary

### The experimental study of effective doses of the combination of quercetin with glucosamine derivatives in conditions of development of renal failure

S. K. Shebeko

National University of Pharmacy, Kharkov

The chronic kidney disease is the most significant pathology among diseases of the urinary system, the course of which leads to the inevitable development of renal failure, disability of patients and loss of social activity. Therefore the search for effective drugs for its correction is an actual task of modern pharmacology.

**Aim.** The experimental study of effective doses of the combination of quercetin with glucosamine derivatives at renal failure in rats.

**Materials and methods.** The study was performed on a model of renal failure caused by the administration of potassium chromate, using 50 rats. There were determined diuresis, creatinine levels in blood and urine, glomerular filtration rate, and were calculated the indices of activity and mean effective dose of the test combination in animals.

**Results.** Under the influence of the combination of quercetin with glucosamine derivatives there was a significant increase of the glomerular filtration rate relatively to untreated animals, which had a dose-dependent character. Thus when the combination was used at a dose of 25 mg/kg, the activity was 18,3 %, 50 mg/kg – 40,4 %, and 100 mg/kg – 59,2 %. This allowed us to calculate by the probit analysis method the mean effective dose of the combination for the treatment of renal failure, which was  $79,7 \pm 10,0$  mg/kg.

**Conclusions.** In the conditions of development of renal failure in rats the studied combination of quercetin with glucosamine derivatives dose-dependently increases the glomerular filtration, while its mean effective dose is 79,7 mg/kg. This dose is useful for further experimental study of this combination as a drug of treatment of chronic kidney disease.

**Key words:** quercetin, glucosamine hydrochloride, N-acetylglucosamine, effective dose, renal failure