

## РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

### ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ЭНДОГЕННОГО ГЛЮКОЗАМИНА У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ С НЕФРОПАТИЕЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТЕРАПИИ

И. А. Зупанец, С. К. Шебеко<sup>1</sup>

Приведены результаты влияния глюкозамина гидрохлорида, глюкозамина сульфата, N-ацетилглюкозамина, глюкозамина пентаацетата и комбинаций глюкозамина гидрохлорида и N-ацетилглюкозамина с диклофенак-натрием на содержание эндогенного глюкозамина в сыворотке крови и почках крыс с экспериментальной нефропатией. При развитии воспалительно-деструктивных процессов в почках повышается содержание данного аминсахара в сыворотке крови и соответствующее его снижение в ткани почек, что может быть неспецифическим диагностическим критерием степени поражения почек и эффективности фармакотерапии. Под воздействием лечения происходила нормализация исследуемых показателей, что наиболее выражено при использовании глюкозамина гидрохлорида, N-ацетилглюкозамина и их комбинаций с диклофенак-натрием.

**Ключевые слова:** аминсахара, глюкозамин, диклофенак-натрий, эндогенный N-ацетилглюкозамин, адриамициновая нефропатия

#### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что в основе патогенеза большинства иммунно-воспалительных заболеваний почек лежит нарушение структурно-функциональной организации базальной мембраны (БМ) нефронов и, в первую очередь, деструкция ее защитного слоя, образованного гликозаминогликанами (ГАГ) [9, 11]. Подтверждением этого является достоверное повышение концентрации ГАГ и их мономеров в сыворотке крови и моче больных хроническим гломерулонефритом [7].

Защитный слой ГАГ в составе БМ обуславливает наличие отрицательного заряда на ее поверхности, который предотвращает развитие протеинурии и явлений гиперкоагуляции в капиллярах нефронов, а также скрывает ее антигенные зоны и препятствует развитию каскада аутоиммунных реакций [10, 12].

Основным компонентом ГАГ является аминсахар глюкозамин (ГА) — естественный метаболит организма человека [3], который в структуре БМ представлен в виде O- и N-сульфатированных, а также N-ацетилированных производных [2, 10]. В сыворотке крови ГА находится в биологически активной форме в виде N-ацетилглюкозамина (N-ацетилГА) [5, 13]. В ранее проведенных исследованиях на интактных животных показано, что в почках содержание ГА значительно выше, чем в других органах [2]. Это объясняется структурно-функциональными особенностями базаль-

ных мембран, которые на 12 % состоят из глюкозамин-содержащих макромолекул [5].

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что содержание эндогенного N-ацетилГА может быть использовано как маркерный показатель, отражающий течение воспалительно-деструктивных процессов в почках. В связи с этим целью исследования явилось изучение динамики содержания эндогенного N-ацетилГА у лабораторных животных на фоне развития мембранозной нефропатии под воздействием введения таких субстанций, как глюкозамина гидрохлорид, глюкозамина сульфат, N-ацетилглюкозамин, глюкозамина пентаацетат и комбинаций глюкозамина гидрохлорида и N-ацетилглюкозамина с диклофенак-натрием (ДН).

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 120 белых нелинейных крысах массой 175 – 185 г, которых содержали на стандартном пищевом рационе вивария при свободном доступе к питьевой воде, постоянной влажности и температурном режиме. Мембранозную нефропатию воссоздавали путем внутрибрюшинного введения адриамицина (“Sigma”, США) в дозе 10 мг/кг и концентрации 1 мг/мл [4].

Все животные были разделены на 12 групп по 10 крыс в каждой: интактные; контрольные животные с нефропатией; животные, которые на фоне нефропатии получали ГА гидрохлорид, ГА сульфат, N-ацетилГА, ГА пентаацетат в условно-терапевтических дозах 50 мг/кг, комбинации ГА гидрохлорида и N-ацетилГА с диклофенак-натрием (8:1) в дозах 4 мг/кг по ДН (ЕД<sub>50</sub> по противовоспалительной активности); препараты сравнения — ДН в дозах 4 мг/кг (для сравнения с комбинациями) и 8 мг/кг, преднизолон в дозе 1,9 мг/кг (ЕД<sub>50</sub> по противовоспалительной активности), а также фраксипарин в дозе 170 ЕД/кг (средняя терапевтическая доза, пересчитанная по методу Ю. Р. Рыболовлева) [8]. Все препараты вводили 1 раз в сутки

<sup>1</sup> Кафедра клинической фармакологии с фармацевтической опекой (зав. — проф. И. А. Зупанец) Национального фармацевтического университета, Украина, Харьков, 61002, ул. Пушкинская, 53.

**Влияние терапии на содержание эндогенного N-ацетилглюкозамина в сыворотке крови и паренхиме почек крыс с мембранозной нефропатией (n = 120)**

Группа животных	Срок опыта, нед	Эндогенный N-ацетилглюкозамин	
		сыворотка крови, ммоль/л	ткань почек, мг/г
1 группа (интактный контроль)	исходные данные	6,94 ± 0,43	1,89 ± 0,12
2 группа (контрольная патология)	2	8,68 ± 0,89	1,41 ± 0,14 <sup>2</sup>
	3	11,07 ± 0,79 <sup>2</sup>	0,76 ± 0,08 <sup>2</sup>
3 группа (ГА гидрохлорид)	2	7,16 ± 0,20 <sup>1,3</sup>	1,90 ± 0,12 <sup>1</sup>
	3	7,59 ± 0,35 <sup>1,3</sup>	1,86 ± 0,12 <sup>1,4</sup>
4 группа (ГА сульфат)	2	7,01 ± 0,45 <sup>1</sup>	1,74 ± 0,14
	3	10,37 ± 0,51 <sup>2</sup>	1,42 ± 0,13 <sup>1</sup>
5 группа (N-ацетилГА)	2	7,50 ± 0,14 <sup>1</sup>	1,86 ± 0,11 <sup>1</sup>
	3	7,48 ± 0,33 <sup>1,3</sup>	1,80 ± 0,16 <sup>1,3</sup>
6 группа (ГА пентаацетат)	2	7,63 ± 0,29 <sup>1</sup>	1,68 ± 0,15
	3	7,92 ± 0,36 <sup>1</sup>	1,56 ± 0,14 <sup>1</sup>
7 группа (ГА гидрохлорид + ДН)	2	7,36 ± 0,24 <sup>1</sup>	1,83 ± 0,23 <sup>1</sup>
	3	7,21 ± 0,26 <sup>1,3</sup>	1,78 ± 0,13 <sup>1,3</sup>
8 группа (N-ацетилГА + ДН)	2	7,53 ± 0,23 <sup>1</sup>	1,76 ± 0,16
	3	7,37 ± 0,48 <sup>1,3</sup>	1,72 ± 0,17 <sup>1</sup>
9 группа (ДН, 4 мг/кг)	2	8,42 ± 0,40 <sup>1</sup>	1,52 ± 0,13 <sup>2</sup>
	3	10,35 ± 0,67 <sup>2</sup>	1,01 ± 0,15 <sup>2</sup>
10 группа (ДН, 8 мг/кг)	2	7,94 ± 0,48 <sup>1</sup>	1,66 ± 0,12
	3	9,41 ± 0,52 <sup>2</sup>	1,35 ± 0,11 <sup>1</sup>
11 группа (преднизолон)	2	7,88 ± 0,19 <sup>1</sup>	1,39 ± 0,14 <sup>2</sup>
	3	9,26 ± 0,61 <sup>2</sup>	1,08 ± 0,12 <sup>1</sup>
12 группа (фраксипарин)	2	7,68 ± 0,25 <sup>1</sup>	1,94 ± 0,19 <sup>1</sup>
	3	8,43 ± 0,45 <sup>1</sup>	1,42 ± 0,13 <sup>1</sup>

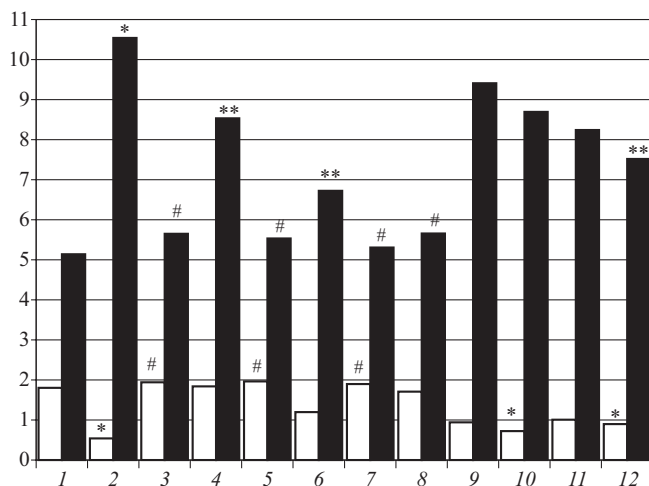
**Примечание.** Различия достоверны ( $p \leq 0,05$ ) относительно: <sup>1</sup> – контрольной патологии; <sup>2</sup> – интактного контроля; <sup>3</sup> – животных 9–11-й групп; <sup>4</sup> – животных 12-й группы.

внутри (кроме фраксипарина, который вводили подкожно) на протяжении трех недель, начиная с первого дня эксперимента.

В конце второй и третьей недели исследования животных выводили из эксперимента по 5 особей из каждой группы (методом декапитации под эфирным наркозом с наблюдением международных биоэтических требований по работе с животными) с целью получения сыворотки крови и паренхимы почек для биохимических анализов.

Интенсивность воспалительно-деструктивных процессов оценивали по содержанию эндогенного N-ацетилГА в гомогенате почечной ткани, а также его свободной и связанной фракций в сыворотке крови. С этой целью использовали метод, основанный на реакции взаимодействия гексозамина с ацетилацетоном и реактивом Эрлиха в спиртовой среде соответственно нашей модификации [1, 2]. Связанную фракцию эндогенного N-ацетилГА определяли после осаждения гликопротеинов 5 % раствором трихлоруксусной кислоты. Свободную фракцию рассчитывали как разницу между общим и связанным N-ацетилГА [1].

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием критериев Фишера-Стьюдента с помощью компьютерных программ [6].



Содержание свободной и связанной фракций эндогенного N-ацетил-глюкозамина в сыворотке крови крыс на третью неделю развития нефропатии.

По оси ординат — содержание эндогенного N-ацетилглюкозамина (ммоль/л); по оси абсцисс: 1 – интактный контроль; 2 – контрольная патология; 3 – ГА гидрохлорид; 4 – ГА сульфат; 5 – N-ацетилГА; 6 – ГА пентаацетат; 7 – ГА гидрохлорид + ДН; 8 – N-ацетилГА + ДН; 9 – ДН (4 мг/кг); 10 – ДН (8 мг/кг); 11 – преднизолон; 12 – фраксипарин. Светлые столбики — свободный, темные — связанный эндогенный N-ацетилглюкозамин. Различия достоверны ( $p \leq 0,05$ ) относительно: \* – интактного контроля; \*\* – контрольной группы; # – животных 9–12 групп (препараты сравнения).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования динамики содержания эндогенного N-ацетилГА в сыворотке крови и ткани почек крыс с нефропатией под влиянием лечения приведены в таблице.

Так, в группе контрольной патологии по сравнению с интактной уже на вторую неделю эксперимента наблюдалось повышение содержания эндогенного N-ацетилГА в сыворотке крови и его снижение в паренхиме почек животных. На третью неделю происходило усиление данной тенденции: уровень N-ацетилГА в крови был выше в 1,6 раза, а в почках ниже почти в 2,5 раза. Описанные изменения свидетельствуют об интенсивном течении деструктивных процессов в почках. Разрушение БМ, в первую очередь, ее защитного слоя, состоящего из ГАГ, приводит к выходу эндогенных аминокислот в кровяное русло и, соответственно, повышению их концентрации в сыворотке крови.

В отличие от описанной выше картины в группах, получавших ГА гидрохлорид, N-ацетилГА и их комбинации с ДН (группы 3, 5, 7 и 8), вышеупомянутые показатели были на уровне интактных крыс и имели достоверные отличия по сравнению с животными, которые получали препараты сравнения. Особо следует отметить, что по содержанию N-ацетилГА в паренхиме почек крысы 3-й группы достоверно превосходили животных, которым вводили препарат сравнения фраксипарин, несмотря на то, что по химической природе он является гликозаминогликаном. Это свиде-

льствует о значительно меньшей интенсивности воспалительно-деструктивных явлений в почках животных рассмотренных групп.

В процессе изучения динамики содержания свободной и связанной фракций эндогенного N-ацетилГА в сыворотке крови животных с нефропатией под воздействием лечения на третью неделю получены результаты, которые представлены на рисунке.

Так, у интактных животных соотношение связанного и свободного N-ацетилГА было равно 2,85, в то время как в группе с контрольной патологией этот показатель составил 19,5 на фоне двукратного увеличения связанной фракции и снижения свободной фракции N-ацетилГА более чем в 3 раза. Данную картину можно объяснить захватом свободного эндогенного N-ацетилГА из сыворотки крови и включением его в защитный слой поврежденной БМ почек на фоне выхода из нее остатков разрушенных ГАГ, содержащих N-ацетилГА, которые и увеличивают уровень связанной фракции.

В то же время в 3, 5, 7 и 8-й группах соотношение связанного и свободного N-ацетилГА было на уровне интактных животных, хотя наблюдалось недостоверное повышение связанной фракции. Также следует отметить достоверно меньшее содержание связанного и большее содержание свободного N-ацетилГА у животных данных групп по сравнению с крысами, получавшими препараты сравнения, что свидетельствует о меньшей интенсивности воспалительно-деструктивных процессов в почках. На наш взгляд, в основе данного явления лежит длительное поддержание в сыворотке крови крыс концентрации свободного N-ацетилГА, достаточной для его интенсивного включения в структуру БМ почек.

Таким образом, результаты экспериментов свидетельствуют о том, что ГА гидрохлорид, N-ацетилГА и их комбинации с ДН нормализуют обмен эндогенного N-ацетилГА и, следовательно, замедляют ход деструктивных процессов в почках крыс на фоне мембранозной нефропатии.

## ВЫВОДЫ

1. Уровень эндогенного глюкозамина является информативным диагностическим критерием, отражающим течение воспалительно-деструктивных процессов в почках при их поражении.

2. Введение глюкозамина гидрохлорида, N-ацетилглюкозамина и их комбинаций с диклофенак-натрием нормализует негативные изменения содержания исследуемого аminosахара в сыворотке крови и паренхиме почек лабораторных животных на фоне развития мембранозной нефропатии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. И. А. Зупанец, С. М. Дроговоз, Марван Мансур и др., *Информация, письмо*, РПК "Фармация", Харьков (1996), вып. 3, с. 4.
2. І. А. Зупанець, Н. В. Бездітко, В. В. Прописнова, *Клінічна фармація*, **6(2)**, 54 – 56 (2002).
3. И. А. Зупанец, Н. В. Бездетко, Н. В. Дедух, И. А. Отришко, *Экспер. и клин. фармакол.*, **65(6)**, 67 – 69 (2005).
4. І. А. Зупанець, С. К. Шебеко, *Клінічна фармація*, **8(3)**, 36 – 40 (2004).
5. І. А. Зупанець, С. Б. Попов, С. К. Шебеко та ін., *Клінічна фармація*, **8(4)**, 34 – 37 (2004).
6. С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич, *Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel*, Морион, Киев (2000).
7. С. Б. Павлов, *Клин. мед.*, **76(2)**, 41 – 43 (1998).
8. Ю. Р. Рыболовлев, Р. С. Рыболовлев, *Докл. АН СССР*, **247(6)**, 1513 – 1516 (1979).
9. W. M. Deen, M. J. Lazzara, and B. D. Myers, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **281**, F579 – F596 (2001).
10. G. Gambaro and F. Van Der Woude, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **11**, 359 – 368 (2000).
11. P. Mundel and S. Shankland, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **13**, 3005 – 3015 (2002).
12. I. C. Raats, J. Van Den Born, M. A. Bakker, et al., *Am. J. Pathol.*, **156(5)**, 1749 – 1765 (2000).
13. I. Setnikar, *Arzneimittel. Forschung*, **36(4)**, 729 – 735 (1986).

Поступила 22.08.05

## THE INFLUENCE OF EXPERIMENTAL THERAPY ON THE DYNAMICS OF ENDOGENOUS GLUCOSAMINE CONTENT IN LABORATORY ANIMALS WITH NEPHROPATHY

I. A. Zupanets and S. K. Shebeko

National University of Pharmacy, ul. Pushkinskaya 53, 61002 Kharkov, Ukraine

The effects of glucosamine hydrochloride, glucosamine sulfate, N-acetylglucosamine, glucosamine pentaacetate, and combinations of glucosamine hydrochloride and N-acetylglucosamine with diclofenac sodium on the endogenous glucosamine (aminosugar) content in the blood and kidney of rats with experimental nephropathy have been studied. The development of inflammatory and destructive processes in kidneys is accompanied by an increase in the aminosugar content in the blood serum and the corresponding decrease in renal tissues. This fact can be used as a nonspecific diagnostic criterion for the level of kidney damage and for the efficacy of pharmacotherapy. Normalization of these indices in the case of successful therapy was observed, which was most pronounced upon the administration of glucosamine hydrochloride, N-acetylglucosamine, and their combinations with diclofenac sodium.