

Экспериментальное изучение целесообразности включения экстракта ивы белой в гидрогель противоартрозного действия

Компанцев Д.В.

Experimental study of inclusion expediency of the white willow extract in the hydrogel of anti-arthrosis action

Kompantsev D.V.

Пятигорская государственная фармацевтическая академия, г. Пятигорск

© Компанцев Д.В.

Проведен анализ показателей острой токсичности и противовоспалительного действия экстракта ивы, оценена целесообразность его включения в препараты противоартрозного действия.

Дозозависимое изучение противовоспалительной активности экстракта ивы осуществлялось на модели острого воспалительного отека, вызванного субплантарным введением в заднюю лапу крысы 0,1 мл 10%-й взвеси каолина. Сравнительное противовоспалительное действие глюкозамина сульфата и гидрогеля при экспериментальном остеоартрозе изучалось путем моделирования воспаления (метод ватной гранулемы).

Установлено, что наиболее выраженное противовоспалительное действие имеет экстракт ивы в дозах 100 и 200 мг/кг. Включение экстракта ивы в гранулы существенным образом потенцирует антипролиферативное действие глюкозамина при экспериментальном остеоартрозе. Комбинированное применение экстракта ивы с глюкозамином более эффективно, чем монотерапия глюкозамином, оказывает угнетающее влияние на пролиферативную стадию воспаления при экспериментальном остеоартрозе.

Ключевые слова: глюкозамин, сухой экстракт ивы белой, гидрогель, остеоартроз.

The analysis of acute toxicity and anti-inflammation activity of the willow extract is performed expediency of its inclusion in the preparations with anti-arthrosis activity.

The dose dependent study of anti-inflammatory activity of willow extract was carried out of the model of acute inflammatory swelling which was provoked by introduction of 0.1 ml of 10% kaolin in the hind leg of the rat. Comparative anti-inflammatory activity of glucosamine sulphate and hydrogel in experimental osteoarthritis was studied by modeling of inflammation.

Most marked anti-inflammatory activity was shown to have the willow extract in the doses of 100 and 200 mg/kg. Inclusion of the willow extract in granules increased anti-proliferative activity of glucosamine in experimental osteoarthritis. Combined use of the willow extract with glucosamine more effective than monotherapy by glucosamine, influenced suppressively on proliferative stage of inflammation in experimental osteoarthritis.

Key words: glucosamine, extract of the white willow, hydrogel, osteoarthritis.

УДК 615.322:633.878.31

Введение

Остеоартроз является одним из заболеваний, в патогенезе которых лежит воспаление [3, 5]. При любом остеоартрозном процессе в суставе всегда наблюдаются деструкция хряща и субхондриальной кости и воспалительные процессы в оболочках сустава. Наличие в суставной полости обломков хряща, фагоцитируемых лейкоцитами с освобождением лизосомальных ферментов цитокинов, приводит к периодическому синовиту, а при неоднократных рецидивах — к фиброзным изменениям синови и капсулы, поэтому

при остеоартрозе воспалительный процесс идет постоянно. В связи с вышесказанным значение противовоспалительной терапии при остеоартрозе во многом определяется тем, что у ряда больных местное воспаление выступает на первый план [4, 5, 8].

В последние годы на российском рынке появились биологически активные добавки (БАД) к пище, в состав которых входит сухой экстракт ивы белой — «Ивлаксин» («Артлайт»), «Артриосин» («Нутриофарм»), «Формула С», «Хондра» и др. Введение экстракта ивы в различные БАД

обусловлено наличием у него, прежде всего, выраженного противовоспалительного действия. Клиническая эффективность экстракта ивы при заболеваниях опорно-двигательного аппарата была подтверждена еще в конце 70-х гг. XX в. Противовоспалительное действие коры ивы обусловлено содержанием в ней салицина (5—8%), который в организме под действием фермента саликазы гидролитически расщепляется на агликон салигенин и глюкозу, а салигенин далее окисляется в салициловую кислоту. Кроме салицина в коре ивы имеются и другие фенологликозиды — фрагилин, триандрин, вималин, салидрозид, саликортин, салиперозид, а также катехиновые танины, оксалаты, флавоноиды, албозид [7]. Анализ БАД, имеющих в составе экстракт ивы, свидетельствует, что его рекомендуемая разовая доза колеблется от 15 до 100 мг.

На протяжении многих лет в Пятигорской государственной фармацевтической академии (ПятГФА) (г. Пятигорск) ведутся исследования по созданию комбинированного лекарственного препарата, содержащего глюкозамина сульфат. В связи с этим представляет интерес изучить влияние комбинированного применения хондропротектора глюкозамина с экстрактом ивы на экссудативную и пролиферативную стадии воспаления при экспериментальном остеоартрозе.

Таким образом, широкое применение экстракта ивы в Российской Федерации делает актуальным проведение анализа показателей острой токсичности и противовоспалительного действия экстракта ивы, а также оценки целесообразности его включения в гранулы для приготовления гидрогеля противоартрозного действия.

Материал и методы

В работе использовали экстракт ивы белой («Хармс», Россия, ТУ 9365-008-33150849-00), глюкозамина сульфат и гранулы для приготовления гидрогеля, содержащие глюкозамина сульфат 0,5 г, экстракт ивы сухой 0,1 г, пектин цитрусовый 0,25 г, сахарозу 0,25 г, кислоту лимонную 0,02 г (изготовлены в ПятГФА).

Этапы исследования:

I этап: изучение острой токсичности экстракта ивы;

II этап: изучение противовоспалительной активности экстракта ивы;

III этап: изучение влияния гидрогеля, содержащего экстракт ивы и глюкозамина сульфат, в сравнении с глюкозами-

ном сульфатом на процесс экссудации и пролиферации при экспериментальном остеоартрозе.

Исследования проводили на крысах линии Вистар массой $(200,0 \pm 10,0)$ г.

При изучении безопасности применения экстракта ивы на доклиническом этапе исследования руководствовались методическими указаниями Государственного фармакологического комитета МЗ РФ [6]. Экстракт ивы белой вводили в виде суспензии перорально. Изучение токсических доз экстракта ивы и их влияния на функциональные показатели и на макроскопические изменения жизненно важных органов проводили на 10 животных.

Дозозависимое изучение противовоспалительной активности экстракта ивы осуществляли на модели острого воспалительного отека, вызванного субплантарным введением в заднюю лапу крысы 0,1 мл 10%-й взвеси каолина. Объем лапок измеряли онкометром до начала опыта и в динамике отека. Динамику воспалительного процесса при введении каолина оценивали через 1, 2, 3, 4, 5, 24 и 48 ч. Опытной группе животных вводили экстракт ивы профилактически (в течение 7 дней до моделирования воспаления) в дозах 10, 50, 100 и 200 мг на 1 кг массы тела. Воспалительную реакцию оценивали по динамике нарастания отека лапки (в процентах от исходных показателей) [6]. О наличии противовоспалительной активности у экстракта ивы судили путем сравнения выраженности отека у леченых животных с контрольными, которым вводили эквивалентный объем физиологического раствора. В группах было по 6 животных, у каждого животного регистрировали по два показателя — объем левой и правой лапы. Таким образом, объем выборки в каждой группе животных составил 12 показателей.

Заключительным этапом исследования явилась оценка воздействия гидрогеля на воспалительный процесс у животных с посттравматическим артрозом тазобедренного сустава, который моделировали путем нанесения стандартного дефекта в виде круглого отверстия диаметром 2 мм, проникающего через суставной хрящ в субхондриальную кость [2]. Для этого под хлоралгидратным наркозом (300 мг на 1 кг массы тела) посредством бокового доступа вскрывали тазобедренный сустав и кератомом проводили резкое надавливание на суставной хрящ головки до специальной отметки на кератоме. Затем рана послойно ушивалась. В каждой группе по 10 животных.

Сравнительное противовоспалительное действие глюкозамина сульфата и гранул для приготовления гидрогеля

при экспериментальном остеоартрозе изучали в дозе 125 мг на 1 кг массы тела (в пересчете на глюкозамин). Выбор данной дозы определен расчетным путем с учетом литературных данных об эффективных терапевтических дозах глюкозамина [5, 8] и коэффициента пересчета дозы для человека на крысу [6].

Исследования проведены на трех группах лабораторных животных: 1-я группа ($n = 6$) — контрольная — животные, у которых моделировали патологию и вводили физиологический раствор; 2-я группа ($n = 6$) — животные, у которых моделировали патологию и проводили терапию гидрогелем; 3-я группа ($n = 6$) — животные, у которых моделировали патологию и проводили терапию глюкозамином сульфатом. Объекты исследования вводили терапевтически (после моделирования патологии) в объеме 10 мл на 1 кг массы тела, в контрольной серии опытов вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. На 23-и сут под хлоралгидратным наркозом моделировали воспаление (метод ватной гранулемы). Выбор именно данной модели воспаления обусловлен тем, что количество грануляционной ткани, образующейся после имплантации стерильного шарика, является прямым критерием эффективности средств для лечения ревматических и системных заболеваний соединительной ткани [3, 4]. Через 30 сут крысы были выведены из опыта путем декапитации под эфирным наркозом.

Расчет статистических показателей проводился на персональном компьютере с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для обработки результатов использовали статистические методы с нахождением среднего арифметического M , ошибки среднего арифметического m и вероятности ошибки по таблицам Стьюдента (для проверки распределения значений изучаемого признака закону нормального распределения использовали критерий нормальности Шапиро—Уилки). Статистическую обработку результатов проводили с помощью t -критерия Стьюдента с поправкой Бонферони [6].

Результаты и обсуждение

Анализ результатов исследования острой токсичности экстракта ивы свидетельствует, что существенной поло-

вой чувствительности к экстракту не выявлено, т.е. токсическое воздействие как на самцов, так и на самок в обеих группах животных было идентичным. DL_{50} экстракта ивы для самцов и самок крыс составила соответственно $(15\,910,7 \pm 193,9)$ и $(14\,250,0 \pm 187,7)$ мг на 1 кг массы тела, что позволяет отнести его согласно классификации опасности веществ по степени воздействия на организм (ГОСТ 12.1.007-76) к VI классу соединений [1].

Токсический эффект больших доз экстракта ивы проявлялся у животных спустя 1—3 ч после введения и выражался отдышкой и угнетением центральной нервной системы. Большинство животных погибало в течение 24—72 ч. У животных, оставшихся в живых, двигательная реакция была угнетена в течение последующих 36—48 ч. В течение всего времени наблюдения (14 сут) была также зафиксирована и отсроченная гибель (через 5—7 сут) экспериментальных животных.

Макроскопическое исследование жизненно важных органов свидетельствует, что гибель животных при введении токсических доз экстракта ивы обусловлена гемодинамическими изменениями в сердце, легких и мозге.

При введении субтоксических доз экстракта ивы отмечались выраженные изменения со стороны функциональных показателей экспериментальных животных: угнетение поведенческих реакций (выраженное снижение двигательной активности, возбудимости, реактивности и агрессивности), расстройства походки, снижение реакции на прикосновение и болевое раздражение, снижение силы схватки. Также выявлены нарушения со стороны вегетативных реакций. Дальнейшее наблюдение в течение 2 нед за выжившими животными, которым вводили экстракт ивы, показало, что у животных присутствовали признаки интоксикации (общее угнетение, скученность, мышечные подергивания, неврологический дефицит).

Проведенное исследование свидетельствует о низкой токсичности экстракта ивы.

При изучении противовоспалительной активности в контрольной серии опытов максимальное увеличение объема лапок экспериментальных животных (более чем на 45% относительно исходных величин) приходилось на 4—5-й ч наблюдения (таблица).

Динамика нарастания отека лапки в контрольных опытах и в опытах с экстрактом ивы, % от исходных показателей

Условие опыта	Исходный объем лапок	Изменение объема лапок после введения каолина ($M \pm m$)						
		Время наблюдения, ч						
		1	2	3	4	5	24	48
Контроль	$1,32 \pm 0,03$	$+15,9 \pm 1,3$	$+22,0 \pm 1,7$	$+30,9 \pm 4,4$	$+45,2 \pm 3,0$	$+45,6 \pm 2,8$	$+23,0 \pm 5,3$	$+15,1 \pm 3,2$

Доза, мг на 1 кг массы тела:	Изменение объема лапок у животных, которым вводили экстракт ивы								
10	1,36 ± 0,02	+25,0 ± 6,3	+24,4 ± 2,3	+30,1 ± 3,6	+35,6 ± 3,6	+28,9 ± 1,8*	+16,3 ± 2,0	+6,7 ± 1,6*	
50	1,38 ± 0,03	+16,7 ± 3,6	+13,0 ± 3,6*	+25,0 ± 2,5	+26,5 ± 3,3*	+24,1 ± 1,9*	+2,0 ± 1,7*	+4,3 ± 1,7*	
100	1,31 ± 0,02	+12,3 ± 2,7	+5,0 ± 1,7*	+15,3 ± 1,4*	+18,4 ± 2,9*	+13,9 ± 2,1*	+7,6 ± 2,1*	+2,7 ± 1,1*	
200	1,34 ± 0,02	+13,7 ± 1,6	+6,6 ± 2,0*	+18,1 ± 2,2*	+16,7 ± 1,5*	+10,1 ± 1,7*	+2,3 ± 0,8*	0+1,1 ± 0,8*	

Примечание. «+» — усиление воспалительной реакции.

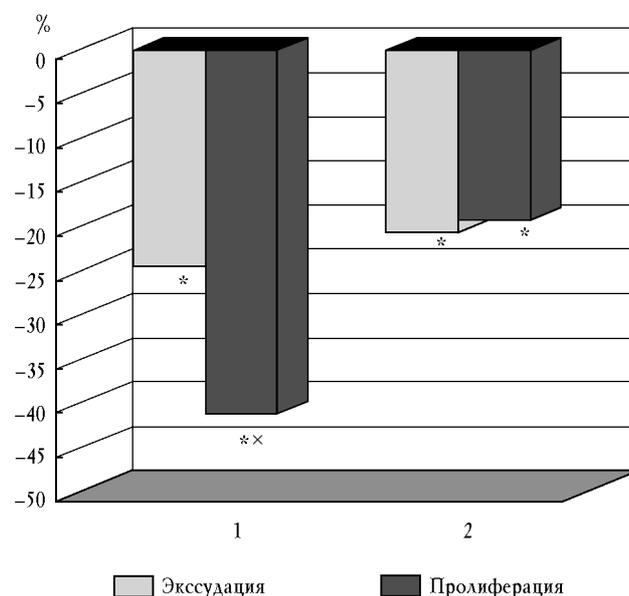
* Статистически значимые изменения ($p < 0,05$) относительно контрольной группы животных.

Применение экстракта ивы во всех исследуемых дозах приводило к статистически значимому подавлению экссудативной фазы воспаления, но наиболее выраженное противовоспалительное действие было выявлено при использовании экстракта ивы в дозах 100 и 200 мг на 1 кг массы тела (таблица). Важно отметить, что эффективность противовоспалительной терапии экстрактом ивы в указанных дозах сопоставима. Данное обстоятельство явилось обоснованием включения экстракта ивы в количестве 0,1 г в состав гранул для приготовления противоартрозного геля.

Многочисленными исследованиями установлено, что тканевые изменения, сопровождающие развитие экспериментальных гранул, во многом напоминают аналогичные процессы в соединительной ткани при хронических воспалительных заболеваниях [5]. Поэтому наблюдается хорошая корреляция между противовоспалительной активностью в эксперименте на моделях гранул и клинической эффективностью лекарственных средств при заболеваниях соединительной ткани. Известно также, что антиэкссудативные свойства глюкозамина не уступают существующим нестероидным противовоспалительным препаратам, в том числе и ацетилсалициловой кислоте, бутадиону, а в механизме антиэкссудативного действия глюкозамина основная роль принадлежит его влиянию на биологические активные амины (гистамин), стабилизацию мембран, антипротеазное действие [6, 10]. В связи с этим следующим этапом работы явилось исследование влияния совместного применения экстракта ивы с хондропротектором глюкозамина сульфатом на воспалительную реакцию при посттравматическом остеоартрозе в сравнении с монотерапией глюкозамином. Для реализации данной задачи были изготовлены гранулы для приготовления противоартрозного гидрогеля, в состав которых помимо хондропротектора глюкозамина сульфата входит экстракт ивы.

Опытным путем установлено, что гидрогель при экспериментальном остеоартрозе более эффективно (на 41,2%), чем глюкозамина сульфат (на 19,2%), тормозит пролифера-

тивную стадию воспаления (рисунок). Выявлено также, что использование гидрогеля, как и глюкозамина, ограничивает экссудативную фазу воспаления более чем на 20% (рисунок).



Влияние гидрогеля и глюкозамина на процесс воспаления при посттравматическом остеоартрозе: 1 — гидрогель, 2 — глюкозамина сульфат. Изменения статистически значимы ($p < 0,05$): * — относительно контрольных опытов, × — относительно опытов с глюкозамином

Таким образом, включение экстракта ивы в гранулы для приготовления гидрогеля существенным образом потенцирует антипролиферативное действие глюкозамина при экспериментальном остеоартрозе.

Выводы

Полученные в ходе исследования результаты дают основания сделать следующие выводы:

1. В соответствии с классификацией опасности веществ экстракт ивы по степени воздействия на организм (ГОСТ 12.1.007-76) можно отнести к VI классу соединений.

2. Экстракт ивы в широком диапазоне доз ограничивает выраженность экссудативной стадии воспаления.

3. Комбинированное применение экстракта ивы с глюкозамином более эффективно, чем монотерапия глюкозамином, оказывает угнетающее влияние на пролиферативную стадию воспаления при экспериментальном остеоартрозе.

Литература

1. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности // Хим.-фарм. 2003. Т. 37. № 3. С. 32—33.
- 2.

3. Зупанец И.А., Дроговоз С.М., Бездетко Н.В., Дедух Н.В. Экспериментальное моделирование посттравматического остеоартроза тазобедренного сустава у крыс // Оценка фармакологической активности химических соединений: принципы и подходы: Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. М., 1989. Ч. 2. С. 132.
4. Коваленко В.Н. Остеоартроз: Практическое руководство. М., 2003. 448 с.
5. Корж А.А., Черных В.П., Филиппенко В.А. и др. Остеоартроз. Харьков: Основа, 1997. 88 с.
6. Окороков А.Н. Лечение болезней внутренних органов: Практическое руководство: В 3 т. Минск: Высш. шк.; Белмедкнига, 1996. Т. 2. 596 с.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. М., 2005. 832 с.
8. Современная фитотерапия / Под ред. В. Петкова. София, 1988. 504 с.
9. Энциклопедия лекарств (Регистр лекарственных средств). М.: ООО «РЛС-2005». 2005. 1600 с.
10. Яковлева Л.В., Зупанец И.А., Дроговоз С.М. и др. Взаимосвязь антиальтеративного и антипролиферативного эффектов индометацина, вольтарена, пироксикама и D-глюкозамина // Фармакология и токсикология. 1988. Т. 51. № 3. С. 70—72.

Поступила в редакцию 31.10.2005 г.