

Study of the acute toxicity of the combination of doxycycline with glucosamine hydrochloride

E. M. Tkachenko, *E. F. Grintsov, I. A. Zupanets, S. K. Shebeko

Department of Clinical Pharmacology and Clinical Pharmacy, National University of Pharmacy, Kharkov, Ukraine

*Corresponding author: e.grintsov@mail.ru. Manuscript received May 12, 2014; accepted July 25, 2014

Abstract

Background: a comparative analysis of safety and determination of the mean lethal dose (LD_{50}) of doxycycline hydrochloride and glucosamine combined preparation "Doxycycline with glucosamine" in two ratios 1:1 and 1:2 in order to select the most appropriate one for further study.

Material and methods: The acute toxicity of doxycycline hydrochloride, glucosamine hydrochloride and combinations on their base were investigated in the experiment in different ratios (1:1) and (1:2) by the method of V. B. Prozorovskiy. There were used 36 white rats. They were divided into 6 groups of 6 animals each. Animals of test groups received doxycycline doses ranging from 500 mg/kg to 5000 mg/kg. The drug was administered intraperitoneally in appropriate doses, dissolving it in the necessary amount of physiological saline solution. For the calculation of the median LD_{50} the percentage of mortality in each group was determined after 14 days.

Results: The study found that LD_{50} of doxycycline at single oral administration in rats is 1893.03 ± 286.2 mg/kg. Glucosamine hydrochloride showed $LD_{50} > 15000$ mg/kg. The combination of doxycycline with glucosamine (1:1) demonstrated $LD_{50} = 5197.8 \pm 434.3$ mg/kg. The combination of doxycycline with glucosamine (1:2) had $LD_{50} > 10000$ mg/kg.

Conclusions: Glucosamine reduces the toxic effect of doxycycline in combination from the low toxic class to the class of practically non-toxic substances. It expands the range of its therapeutic effect and increases safety. It allows considering the combination of 1:2 as the promising object for further studies of its specific activity.

Key words: doxycycline hydrochloride, glucosamine hydrochloride, combination, acute toxicity.

Изучение острой токсичности комбинации доксициклина с гидрохлоридом глюкозамина

Введение

Инфекционно-зависимая патология остается одной из наиболее значимых проблем медицины. В ревматологии актуальность данного вопроса обусловлена, как минимум, двумя факторами. В настоящее время хорошо известна и доказана роль различных инфекционных агентов в развитии ревматических заболеваний, при которых микроорганизмы играют триггерную роль, запуская иммунопатологические механизмы воспаления. Не менее значимой является борьба с сопутствующей инфекцией, которая осложняет течение ревматических заболеваний.

Заболевания органов опорно-двигательной системы занимают одно из ведущих мест в структуре общей заболеваемости населения большинства европейских стран, в том числе Украины. Значительную долю составляют такие заболевания как ревматоидный артрит (РА) и остеоартроз (ОА). С учетом распространенности заболеваемости, перспективной является разработка новых методов и подходов к лечению этих болезней. Также, надо иметь в виду и то что, несмотря на разработанные программы терапии РА и ОА, результаты лечения на сегодняшний день остаются неудовлетворительными. Медикаментозное воздействие нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП) и ненаркотическими анальгетиками, имея только симптоматическое действие, часто приводит к развитию побочных эффектов и осложнений [1, 2]. Таким образом, необходим поиск лекарственных средств из других фармакологических групп.

Одними из таких направлений являются антибак-

терияльные препараты, которые кроме своего основного эффекта имеют другие, внеантибиотические свойства. В экспериментальных и клинических исследованиях установлено, что ряд антимикробных средств, в том числе тетрациклины имеют такое фармакологическое действие [3, 4].

Однако выраженное гепатотоксическое действие ограничивает сферу их применения. Представляется целесообразным комбинирование тетрациклинов с веществами, которые могут снижать их токсическое действие. Наше внимание привлек глюкозамин (ГА). Его разнонаправленное положительное влияние на свойства клеточных мембран, биохимизм клеточных и межклеточных взаимодействий, высокая степень тропности к соединительной ткани делает обоснованным и целесообразным дальнейшее изучение разработки новых лекарственных препаратов с улучшенными фармакологическими свойствами для коррекции патологических состояний соединительной ткани, в том числе для лечения РА и ОА [5, 6, 7]. Создание на их основе нового высокоэффективного лекарственного средства для лечения больных ревматического профиля является весьма актуальной задачей.

Одной из важных токсикологических характеристик фармакологического действия лекарственных препаратов является показатель LD_{50} – (среднесмертельная доза), который определяется при изучении острой токсичности и используется для расчетов терапевтического индекса – $TI (LD_{50}/ED_{50})$. Последний определяет широту фармакологического действия и безопасность использования препарата.

Материал и методы

Исследование острой токсичности пероральной формы доксициклина гидрохлорида, глюкозамина гидрохлорида и комбинации «Доксициклин с глюкозамином» в двух соотношениях 1:1 и 1:2 проводили по методу В. Б. Прозоровского на 36 белых крысах обоего пола, которые были разделены на 6 групп по 6 животных в каждой. Животные исследуемых групп получали доксициклина гидрохлорид в диапазоне доз от 500 мг/кг до 5000 мг/кг. Препарат вводили внутривенно в соответствующих дозах, растворяя его в необходимом количестве физиологического раствора [8]. Для расчета и определения средней летальной дозы (LD₅₀) через 14 дней определяли процент летальности в каждой группе с помощью таблиц, а также расчетов в соответствии с методом пробит-анализа кривых летальности по В. Б. Прозоровскому [9].

Результаты

Наблюдение за животными проводилось в течение двух недель после введения лекарственного средства. Уже на вторые сутки после введения препарата в группах, где использовали доксициклин в дозах 2000-5000 мг/кг, наблюдались первые летальные случаи. В конце первой недели определенный уровень летальности наблюдался уже во всех группах, кроме животных, получавших препарат в дозе 500 мг/кг. И далее средние показатели летальности достигли своего максимума на 8-9 сутки эксперимента (табл. 1).

Среднюю летальную дозу доксициклина рассчитывали на основании зависимости активности препарата от ис-

пользованной дозы методом пробит-анализа. С помощью табличных данных, проценты летальности в каждой группе были переведены в пробиты (у), и далее были определены весовые коэффициенты пробитов (В) и места доз (х) с проведением дальнейших необходимых расчетов (табл. 2) [9].

Для дальнейших расчетов, в результате которых были определены показатели LD₁₆, LD₅₀ и LD₈₄ использовали уравнение, которое отображает зависимость между дозами и пробитами:

$$y = A_0 + A_1x$$

Коэффициенты A₀ и A₁ рассчитывали по следующим формулам:

$$A_0 = \frac{(\sum B) - (\sum xB)A_1}{\sum B}$$

$$\frac{\sum xB}{\sum B} \times [\sum yB - (\sum xB)A_1] + (\sum x^2B)A_1 = \sum xyB$$

В результате решения данных уравнений, получаем значения A₀ и A₁, что позволяет нам построить график пробит-анализа зависимости „летальность-доза” (рис. 1).

Далее находим (у), что составляет для LD₁₆ - 4, LD₅₀ - 5 и LD₈₄ - 6. Полученные значения позволяют рассчитать по уравнению y = A₀ + A₁x значения мест доз (х), для LD₁₆, LD₅₀ та LD₈₄.

Стандартную погрешность s значения LD₅₀ определяем по формуле:

$$s = \frac{LD_{84} - LD_{16}}{2\sqrt{n}}$$

Где n – число наблюдений;

Таблица 1

Показатели летальности крыс при изучении острой токсичности доксициклина гидрохлорида (n = 36)

№ группы	Доза доксициклина, мг/кг	Количество животных	Количество погибших животных					Средняя летальность, %
			1 сутки	4 сутки	7 сутки	10 сутки	14 сутки	
1	500	6	0	0	0	0	0	0
2	1000	6	0	0	1	2	3	50
3	2000	6	0	2	3	3	3	50
4	3000	6	0	1	2	3	4	66,7
5	4000	6	0	3	4	5	5	83,3
6	5000	6	0	4	5	5	6	100

Таблица 2

Значение доз и уровня летальности для определения LD₅₀ доксициклина гидрохлорида у крыс при пероральном введении по методу В. Б. Прозоровского

Доза, мг/кг	Летальность, %	Место доз, х	Пробит, у	Весовой коэффициент, В	хВ	х²В	уВ	хуВ
500	0	1	3,27	1,6	1,6	1,6	5,23	5,23
1000	50,0	2	5,00	5,0	10,0	20,0	25,00	50,00
2000	50,0	4	5,00	5,0	20,0	80,0	25,00	100,00
3000	66,7	6	5,44	4,6	27,6	165,6	25,02	150,14
4000	83,3	8	5,95	3,5	28,0	224,0	20,83	166,60
5000	100	10	7,72	1,2	12,0	120,0	9,26	92,64
Сумма				20,9	99,2	611,2	110,35	564,62

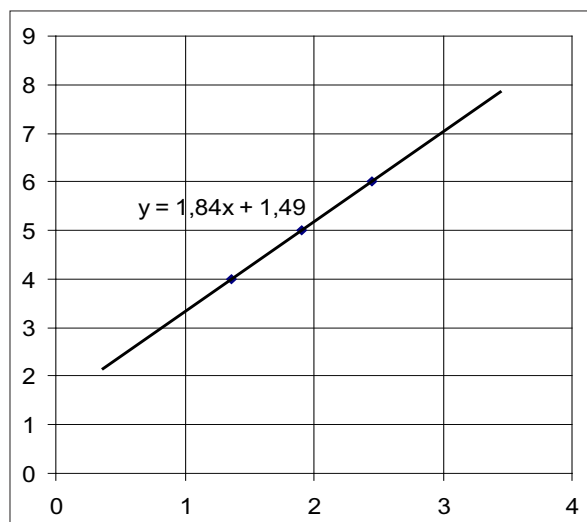


Рис. 1. График пробит-анализа зависимости „летальность-доза“.

LD_{84} – доза доксициклина гидрохлорида, при которой наблюдается летальность 84%;

LD_{16} – доза доксициклина гидрохлорида, при которой наблюдается летальность 16%.

Результаты расчетов приведены в таблице 3.

Результаты нашего исследования и проведенных расчетов позволяют сделать вывод, что LD_{50} доксициклина гидрохлорида при однократном пероральном введении у крыс составляет $1893,03 \pm 286,20$ мг/кг.

Ранее было установлено, что глюкозамина гидрохлорид относится к VI классу токсичности – относительно безвредные вещества ($LD_{50} > 15000$ мг/кг) [10].

Далее было интересно проследить, как будет проявляться острая токсичность доксициклина в комбинации с глюкозамином в соотношениях 1:1 и 1:2. Исследования по определению LD_{50} указанных объектов проводили по схеме, аналогичной определению LD_{50} субстанции доксициклина. Результаты исследования и проведенных расчетов позволяют сделать вывод, что LD_{50} доксициклина с глюкозамином в соотношении 1:1 при однократном пероральном введении у крыс составляет $5197,8 \pm 434,3$ мг/кг. А отсутствие летальности крыс позволяет считать, что значение LD_{50} для комбинации «Доксициклин с глюкозамином» в соотношении 1:2 превышает максимальную дозу, которую использовали в эксперименте, то есть у крыс при внутрижелудочном введении $LD_{50} > 10000$ мг/кг.

Таблица 3

Результаты расчетов для определения LD_{50} доксициклина гидрохлорида на крысах при пероральном введении по методу В. Б. Прозоровского

A_1	A_0	Уравнение зависимости „пробит-доза“	Место дозы LD_{50}	Место дозы LD_{16}	Место дозы LD_{84}	LD_{50}	s
0,291	3,89	$y = 1,84x + 1,49$	3,786	0,352	7,220	1893	286,2

Выводы

1. LD_{50} доксициклина гидрохлорида при однократном пероральном введении у крыс составляет $1893,03 \pm 286,20$ мг/кг.

2. Глюкозамина гидрохлорид относится к VI классу токсичности – относительно безвредные вещества ($LD_{50} > 15000$ мг/кг).

3. LD_{50} доксициклина с глюкозамином в соотношении 1:1 при однократном пероральном введении у крыс составляет $5197,8 \pm 434,3$ мг/кг.

4. LD_{50} доксициклина с глюкозамином в соотношении 1:2 при однократном пероральном введении у крыс > 10000 мг/кг.

5. Глюкозамин способствует снижению токсического действия доксициклина в комбинации из класса малотоксичных в класс практически нетоксичных веществ, расширению спектра его терапевтического действия и повышению уровня безопасности

References

- Nasonov EL. Revmatoidnyy artrit kak obshchemeditsinskaya problema [Rheumatoid arthritis as a medical problem]. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2004;5:5-7.
- Chichasova NV. Problema boli pri osteoartroze [The problem of

pain in osteoarthritis]. *Lechaschiy vrach [Medical practitioner]*. 2007; 2:22-26.

- Belov BG. Doksitsiklin v revmatologii: problemy i perspektivy [Doxycycline in rheumatology: problems and prospects]. *Russkiy meditsinskiy zhurnal [Russian Medical Journal]*. 2001;23:42-44.
- Golub LM, Lee HM, Lehrer G, et al. *Journal Periodontal Res*. 1983;18:516-526.
- Tulyakov VO, Zupanets KO, Shebeko SK. Farmakologichni vlastyosti glyukozaminu: membranostabilizuyuchi, protyzapalni, antyoksidantni ta imunotropni [Pharmacological properties of glucosamine: membrane, anti-inflammatory, antioxidant and immunotropic]. *Farmakologiya ta likarska toksykologiya [Pharmacology and drug toxicology]*. 2009;3(10):3-9.
- Altman RD. Glucosamine therapy for knee osteoarthritis: pharmacokinetic considerations. *Expert Review Clinical Pharmacology*. 2009;2(4):359-371.
- Dodge GR, Jimenez SA. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003;11(6):424-432.
- Stefanov AV. Doklinicheskie issledovaniya lekarstvennykh sredstv [Preclinical studies of drugs]. *Doklinicheskie rekomendatsii [Guidelines]*. 2002;528.
- Prozorovskiy VB. Prakticheskoe posobie po uskorennomu opredeleniyu srednikh effektivnykh i kontsentratsii biologicheski aktivnykh veschestv [A practical tool for rapid determination of the average effective dose and concentration of biologically active substances]. *Institut ekologicheskoy toksikologii [Institute of Environmental Toxicology]*. 1994;46.
- Sidorov KK. O klassifikatsii toksichnosti yadov pri parenteralnykh sposobah vvedeniya [About the classification of the toxicity of poisons in parenteral routes of administration]. *Toksikologiya novykh promyshlennykh khimicheskikh veschestv [Toxicology of new industrial chemicals]*. 1973;13:47-57.