

Изучение эффективности и безопасности препарата Хондроитин сульфат в доклинических исследованиях

*Е. В. Мазукина¹, Е. В. Шекунова¹, В. М. Косман², И. Н. Уракова², И. Г. Котельникова³, М. Ю. Фонарев³,
Е. А. Ежова³, Е. В. Закалюкина³, М. Н. Макарова¹, В. Г. Макаров¹

¹ Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ»,
Заводская ул., д. 3, к. 245, г.п. Кузьмоловский, Всеволожский р-н, Ленинградская обл., 188663,
Российская Федерация

² Закрытое акционерное общество «Санкт-Петербургский институт фармации»,
Заводская ул., д. 3, к. 245, г.п. Кузьмоловский, Всеволожский р-н, Ленинградская обл., 188663,
Российская Федерация

³ Федеральное государственное унитарное предприятие «Московский эндокринный завод»,
Новохохловская ул., д. 25, Москва, 109052, Российская Федерация

Резюме. Хондроитина сульфат применяют в комплексной терапии остеоартроза. Необходимо принимать во внимание, что структура и свойства полисахаридов в составе хондроитина сульфата, а также источник его получения значительно влияют на абсорбцию, биодоступность и, как следствие, эффективность и безопасность препаратов при пероральном приеме. **Цель работы:** сравнительное изучение токсических свойств, местнораздражающего действия, иммунотоксичности, основных фармакокинетических параметров, терапевтической эффективности нового производственного препарата Хондроитина сульфат (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия) и препарата Структум («Пьер Фабр Медикамент Продакшн», Франция). **Материалы и методы:** в экспериментах были использованы кролики породы Белый великан. При изучении токсических, иммунотоксических свойств и местнораздражающего действия самцам и самкам кроликов препараты вводили перорально в течение 28 сут ежедневно в дозе 168 мг/кг (около 6 высших терапевтических доз). Период отсроченного наблюдения — 14 сут. Для фармакокинетических исследований образцы крови отбирали на 1–2 сут эксперимента, клинический и биохимический анализы крови проводили на 28 и 43 сут. После эвтаназии животных осуществляли патоморфологические и гистологические исследования органов и тканей. Терапевтическую эффективность изучали на модели остеоартроза, вызванного перерезкой крестообразной связки у кроликов. Терапию препаратами в дозах 16,8, 33,6 и 67,2 мг/кг животные получали в течение 56 сут, начиная с 8 сут после индукции патологии. **Результаты:** препараты не оказали токсического влияния, местнораздражающего и иммунотоксического действия. Установлена NOAEL — 168 мг/кг. Продемонстрирована сопоставимость фармакокинетических профилей препаратов после однократного перорального введения. Максимальную концентрацию действующего вещества ($C_{\max} = 79 \pm 6$ мкг/мл — Хондроитин сульфат; $C_{\max} = 71 \pm 4$ мкг/мл — Структум) в плазме крови наблюдали в интервале 3–4 ч после введения. Препараты в дозах 33,6 и 67,2 мг/кг привели к снижению выраженности структурных повреждений хряща. По результатам количественного определения сульфатированных глюкозаминогликанов в протеогликанах хряща суставной поверхности животных с остеоартритом показано увеличение их содержания в группах, получавших максимальные дозы исследованных препаратов, по сравнению с другими группами. **Выводы:** полученные данные свидетельствуют о наличии у тестируемого препарата благоприятного профиля безопасности, а также наличии терапевтического (хондропротективного) действия, все оцениваемые в ходе исследований параметры препарата Хондроитин сульфат были сопоставимы с таковыми препарата Структум. **Ключевые слова:** хондроитина сульфат; Структум; токсичность; иммунотоксичность; фармакокинетика; доклинические исследования; остеоартроз

Для цитирования: Мазукина ЕВ, Шекунова ЕВ, Косман ВМ, Уракова ИН, Котельникова ИГ, Фонарев МЮ, Ежова ЕА, Закалюкина ЕВ, Макарова МН, Макаров ВГ. Изучение эффективности и безопасности препарата Хондроитин сульфат в доклинических исследованиях. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2021;9(1):43–57. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2021-9-1-43-57>

***Контактное лицо:** Мазукина Елизавета Владимировна; mazukina.ev@doclinika.ru

Preclinical Study of the Efficacy and Safety of Chondroitin Sulfate

*Е. В. Mazukina¹, Е. В. Shekunova¹, В. М. Kosman¹, И. Н. Urakova¹, И. Г. Kotelnikova², М. Ю. Fonarev³, Е. А. Ezhova³,
Е. В. Zakalyukina³, М. Н. Makarova¹, В. Г. Makarov¹

¹ Research and Manufacturing Company “HOME OF PHARMACY”,
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky, Vsevolozhsky District, Leningrad Oblast 188663, Russian Federation

² St. Petersburg Institute of Pharmacy,
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky, Vsevolozhsky District, Leningrad Oblast 188663, Russian Federation

³ Moscow Endocrine Plant,
25 Novokhokhlovskaya St., Moscow 109052, Russian Federation

Abstract. Chondroitin sulfate is used for osteoarthritis combination therapy. It should be taken into account that the structure and properties of polysaccharides included in chondroitin sulfate, as well as the raw materials used for its production, have a significant effect on its absorption, bioavailability, and, as a consequence, on the safety and efficacy of orally administered products. **The aim** of the study was to assess toxic properties, local irritant effect, immunotoxicity, basic pharmacokinetic parameters, and therapeutic efficacy of the new Chondroitin sulfate product (produced by Federal State Unitary Enterprise “Moscow

Endocrine Plant”, Russia) as compared to Structum (produced by “Pierre Fabre Medicament Production”, France). **Materials and methods:** White Giant rabbits were used in the experiments. Toxicity, immunotoxicity and local irritation effects of the products were assessed following daily oral administration at the dose of 168 mg/kg (about 6 Maximum Recommended Therapeutic Doses) to male and female rabbits for 28 days. The follow-up period was 14 days. The pharmacokinetic study included blood sampling on days 1–2 of the experiment, complete blood count and blood chemistry tests were performed on days 28 and 43. After killing the animals, pathomorphological and histological examinations were performed on their organs and tissues. Therapeutic efficacy was studied in an osteoarthritis model made by cruciate ligament transaction in rabbits. The animals received therapy at doses of 16.8 mg/kg, 33.6 mg/kg, and 67.2 mg/kg for 56 days starting from day 8 after the pathology induction. **Results:** the medicines had no toxic, local irritant, or immunotoxic effect. The NOAEL was established at 168 mg/kg. The study demonstrated the comparability of the pharmacokinetic profiles of the studied products following single oral administration. The maximum concentration of the active ingredient ($C_{\max} = 79 \pm 6 \mu\text{g/mL}$ —Chondroitin sulfate; $C_{\max} = 71 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ —Structum) in blood plasma was observed within 3–4 hours after administration. A decrease in the severity of cartilage structural damage was observed for the doses of 33.6 mg/kg and 67.2 mg/kg. The results of quantitative determination of sulfated glycosaminoglycans in the proteoglycans of the cartilage articular surface in the animals with osteoarthritis demonstrated an increase in the level of sulfated glycosaminoglycans in the groups treated with the maximum doses of the studied products, as compared to the other groups. **Conclusions:** the obtained data confirm that the test product has a favourable safety profile, and therapeutic (chondroprotective) effect. All the tested properties of Chondroitin sulfate were comparable to those of Structum.

Keywords: Chondroitin sulfate; Structum; toxicity; immunotoxicity; pharmacokinetics; preclinical studies; osteoarthritis

For citation: Mazukina EV, Shekunova EV, Kosman VM, Urakova IN, Kotelnikova IG, Fonarev MYu, Ezhova EA, Zakalyukina EV, Makarova MN, Makarov VG. Preclinical study of the efficacy and safety of Chondroitin sulfate. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii = Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2021;9(1):43–57. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2021-9-1-43-57>

***Corresponding author:** Elizaveta V. Mazukina; mazukina.ev@doclinika.ru

Хондроитина сульфат (ХС) — один из основных компонентов соединительной ткани, входит в состав кости, хряща, сухожилий, связок. Молекула ХС представляет собой сульфатированный глюкозаминогликан (СГАГ), состоящий из длинных неразветвленных цепей с повторяющимися остатками N-ацетилгалактозамина и глюкуроновой кислоты [1]. ХС широко используют во всем мире в составе лекарственных препаратов и пищевых добавок, в том числе применяемых в комплексной терапии остеоартроза (ОА) [2, 3].

ОА — наиболее часто встречающееся заболевание суставов, клинические симптомы которого присутствуют более чем у 10–20% населения земного шара [4]. В России ОА страдает до 10–12% населения, и распространенность данного заболевания продолжает расти [5]. Данную патологию рассматривают как гетерогенную группу заболеваний суставов, характеризующихся фокальным разрушением суставного хряща, изменениями в субхондральной кости и образованием остеофитов [4]. Разрушение хряща связано с нарушением обмена веществ, в частности метаболизма протеогликанов и гликозаминогликанов, что значительно изменяет свойства хрящевой ткани, делая ее неустойчивой к нагрузкам [6].

Длительное время единственными лекарственными средствами для лечения ОА оставались анальгетики и нестероидные противовоспалительные препараты. Однако большое количество развивающихся при их применении нежелательных реакций (НР) ограничивает применение препаратов данных групп. В настоящее время не существует препарата, предотвращающего развитие ОА, но процесс нарастания

структурных изменений в суставах можно замедлить с помощью так называемых лекарственных препаратов замедленного действия (SYmptomatic SLOW Acting Drugs for OsteoArthritis, SYSADOA). Типичным представителем данной группы препаратов является ХС, который включен в рекомендации по ведению пациентов с ОА¹ [5]. Следует отметить, что среди медленно действующих препаратов для лечения ОА наибольшая доказательная база имеется именно для ХС и глюкозаминсульфата [4].

ХС является препаратом биологического происхождения. Основным способом его получения является экстракция из тканей различных видов сельскохозяйственных животных, также описан микробиологический способ получения с использованием непатогенного штамма *E. coli* [7]. Источником получения ХС являются ткани животных, что связано с потенциальными проблемами безопасности применения препарата, а именно с возможным присутствием инфекционных агентов (бактерии, вирусы) и возможным развитием аллергических реакций у пациентов. Кроме того, для ХС животного происхождения существует опасность получения плохо воспроизводимого конечного продукта с невоспроизводимой структурой и свойствами. Также возможно загрязнение препарата другими полисахаридами, нуклеиновыми кислотами и белками [7]. Так, при получении ХС из трахеи быков сырье представляет собой смесь молекул ХС различной массы и длины с вариациями в позиции сульфатных групп. Эти отличия могут обуславливать различный эффект ХС в зависимости от источника его получения и степени очистки от примесей [5].

¹ Остеоартроз. Клинические рекомендации Российской Федерации 2013–2017. Общероссийская общественная организация «Ассоциация ревматологов России». <https://diseases.medelement.com/disease/остеоартроз-рекомендации-рф/150>

По мнению экспертов Европейского агентства по безопасности продуктов питания (European Food Safety Authority, EFSA), потребление ХС в качестве добавок к пищевому рациону является относительно безопасным. Однако отсутствуют конкретные данные о различиях в профиле безопасности препаратов ХС в зависимости от способа производства, сырья, состава, степени сульфатирования, а также о возможности экстраполяции результатов, полученных с использованием одного типа ХС, на другие продукты хондроитина². Все это обуславливает необходимость изучения эффективности и безопасности воспроизведенных препаратов ХС еще на этапе доклинических исследований.

Одним из первых зарегистрированных в Российской Федерации препаратов ХС был препарат Структум («Пьер Фабр Медикамент Продакшн», Франция). Терапевтический эффект Структума в отношении ОА был подтвержден в ряде отечественных и зарубежных клинических исследований. Результаты клинических исследований, проведенных в России, показали, что курсовой прием Структума в дозе 1000 мг/сут уменьшает боль и потребность в нестероидных противовоспалительных препаратах, улучшает функциональное состояние суставов, повышает качество жизни большинства пациентов [4]. Актуальной задачей представляется разработка отечественных препаратов с аналогичным составом.

Цель работы — сравнительное изучение токсических свойств (с оценкой местнораздражающего действия), фармакокинетики и специфической фармакологической активности нового воспроизведенного препарата Хондроитин сульфат (ФГУП «Московский эндокринный завод») и препарата Структум («Пьер Фабр Медикамент Продакшн», Франция).

Для достижения цели исследования были поставлены следующие задачи:

- провести сравнительный анализ токсических свойств тестируемого препарата Хондроитин сульфат и препарата сравнения при многократном применении;
- выявить возможные органы-мишени токсического действия;
- установить возможность обратимости вызываемых повреждений;
- провести сравнительную оценку местнораздражающего действия;
- провести сравнительную оценку фармакокинетики (ФК) препаратов при однократном пероральном введении в одной дозе на кроликах;

- провести оценку специфической фармакологической активности тестируемого препарата и препарата сравнения на модели хронического ОА у кроликов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В экспериментах были использованы кролики породы Белый великан обоих полов (питомник АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»). Возраст животных к началу эксперимента составил 2,5–3,5 мес. Планируемые работы были рассмотрены на биоэтической комиссии (БЭК) АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» и одобрены для проведения (протоколы БЭК № 1.78/17 (субхроническая токсичность) и № 2.78/17 (фармакологическая активность) от 27 декабря 2017 г.).

Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, и в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218–14.

Стандартный корм животные получали *ad libitum*, за исключением лишения корма на 4 ч перед эвтаназией и взятием крови. Воду кролики получали без ограничений.

Исследуемые препараты. Тестируемый препарат — Хондроитин сульфат, капсулы 500 мг (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия), серия 121/500-К-020817. Препарат сравнения — Структум, капсулы 500 мг («Пьер Фабр Медикамент Продакшн», Франция), серия G01946.

Субхроническая токсичность

Дизайн исследования был построен с учетом современных норм биоэтики и соблюдения основных принципов 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement: замещение, сокращение, совершенствование) с использованием минимального количества животных [8]. В ходе исследования кроме сравнительной оценки общетоксических свойств и местнораздражающего действия исследуемых препаратов было изучено влияние на иммунокомпетентные органы с целью выявления возможного иммунотоксического действия³, а также был осуществлен отбор образцов крови для изучения основных параметров ФК.

Способ введения и выбор доз. Согласно инструкции по медицинскому применению препарата Структум, высшая терапевтическая доза (ВТД) для человека составляет 1 г/сут или 14,3 мг/кг при

² Risk assessment of chondroitin sulfate in food supplements. BfR; 2018. <https://mobil.bfr.bund.de/cm/349/risk-assessment-of-chondroitin-sulfate-in-food-supplements.pdf>

³ ГОСТ Р 58173–2018 Средства лекарственные для медицинского применения. Исследования иммунотоксичности лекарственных средств, предназначенных для человека.

средней массе тела человека 70 кг. При выборе доз для экспериментального исследования применяли подход с использованием межвидовых коэффициентов пересчета доз⁴.

При перерасчете на кролика ВТД составляет:

$$\frac{14,3 \text{ мг/кг} \times 39}{16,6} = 33,6 \text{ мг/кг}, \quad (1)$$

$$\frac{14,3 \text{ мг/кг} \times 39}{18,5} = 30,1 \text{ мг/кг}, \quad (2)$$

где 39 — коэффициент пересчета для человека массой 70 кг; 16,6 — коэффициент пересчета для кролика массой 3 кг; 18,5 — коэффициент пересчета для кролика массой 3,5 кг. Соответственно ВТД для кроликов массой 3,0–4,0 кг составляет не более 33,6 мг/кг.

Для оценки токсических свойств новых лекарственных препаратов и/или субстанций в эксперименте необходимо изучение препарата-кандидата на трех уровнях доз, минимальная из которых должна быть близка к терапевтической дозе, максимальная — вызывать токсические эффекты, третья доза должна быть промежуточной⁵. Тестируемый препарат ХС не является оригинальным. Лекарственные препараты, содержащие ХС в качестве действующего вещества, имеют длительный опыт клинического применения, более того, опыт клинического применения показывает, что препараты обладают благоприятным профилем безопасности, узким спектром НР, о развитии серьезных НР не сообщалось⁶. В проведенных ранее экспериментах на крысах при введении ХС в дозе 1000 мг/кг токсических эффектов выявлено не было (см. раздел «Обсуждение»). Поскольку целью данного исследования было сравнение эффектов воспроизведенного препарата ХС и препарата Структур, который широко применяется в клинической практике, было сочтено приемлемым для достижения цели исследования ограничиться изучением влияния препарата в одной дозе. При введении использованной в эксперименте дозы было достигнуто превышение клинической экспозиции (по данным исследования ФК). Этот подход позволил снизить количество животных, задействованных в эксперименте, что соответствует современным представлениям биоэтики (правило 3Rs) [8].

Таким образом, для сравнительной оценки возможных общетоксических и иммунотоксических свойств при многократном введении была использована доза, приблизительно соответствующая

6 ВТД — 168 мг/кг (с учетом массы кроликов на начало эксперимента 3,9–4,3 кг). Препараты вводили перорально в виде суспензии в 1% растворе крахмала (концентрация составила 250 мг/мл). Объемы для введения были рассчитаны на основании последних данных массы тела животных, например, объем для введения на животное массой 3 кг — 2,0 мл.

Дизайн исследования. В исследование были включены три группы животных, по 12 самцов и 12 самок в каждой. Животные 1-й группы получали 1% раствор крахмала, 2-й группы — тестируемый препарат Хондроитин сульфат в дозе 168 мг/кг, 3-й группы — препарат сравнения Структур в дозе 168 мг/кг.

Препараты вводили перорально, 1 раз/сут в течение 28 сут ежедневно. Период отсроченного наблюдения — 14 сут. На протяжении всего эксперимента осуществляли еженедельный осмотр животных, взвешивание.

На 28 и 43 сут эксперимента проводили клинический анализ крови на гематологическом анализаторе Mythic 18 Vet (Orphée, Швейцария). Определяли количество эритроцитов, уровень гемоглобина, гематокрит, количество лейкоцитов, количество тромбоцитов, лейкоцитарную формулу.

Биохимические показатели крови определяли (28 и 43 сут) на биохимическом анализаторе Random Access A-25 (BioSystems, Испания) с использованием реагентов фирмы BioSystems S.A. (Испания) и в соответствии с инструкциями производителя. Оцениваемые параметры в сыворотке крови: аминотрансферазы (аланинаминотрансфераза, Ед/л, и аспартатаминотрансфераза, Ед/л), креатинин, ммоль/л, мочевины, ммоль/л, альбумин, г/л, щелочная фосфатаза, Ед/л, общий белок, г/л, триглицериды, ммоль/л, холестерин, ммоль/л, отношение альбумины/глобулины (расчетные значения), глобулин (расчетные значения), общий билирубин, ммоль/л, глюкоза, ммоль/л.

Эвтаназию животных осуществляли посредством передозировки анестетика (Золетил® 50, внутривенно). Шесть животных из каждой группы были эвтаназированы на 29 сут эксперимента, оставшиеся — на 44 сут эксперимента.

Патоморфологическое исследование. После эвтаназии животные были тщательно обследованы на предмет внешних патологических признаков. Органы, извлеченные при некропии, были взвешены.

⁴ Хабриев РУ, ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-е изд. М.: ОАО «Издательство «Медицина»; 2005.

⁵ Хабриев РУ, ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-е изд. М.: ОАО «Издательство «Медицина»; 2005.

Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М: Гриф и К; 2012.

⁶ <https://grls.rosminzdrav.ru>

Было проведено гистологическое исследование следующих органов: аорта, сердце, трахея, легкие с бронхами, тимус, желудок, тонкая кишка, толстая кишка, поджелудочная железа, печень, селезенка, почки, мочевой пузырь, семенники (самцы), яичники (самки), подчелюстные лимфатические узлы, щитовидная железа, головной мозг.

Для оценки местнораздражающего действия препаратов при проведении процедуры некропсии были визуально оценены отклонения во внешнем виде органов желудочно-кишечного тракта, а также проведена гистологическая оценка тканей, непосредственно контактировавших с исследуемыми органами.

Для изучения возможного иммунотоксического действия у всех животных оценивали общее количество лейкоцитов в крови, лейкоформулу, уровень глобулинов, проводили патоморфологическое исследование лимфоидных органов (тимус, селезенка, подчелюстные лимфатические узлы), анализировали массовые коэффициенты органов (тимус, селезенка)⁷.

Фармакокинетическое исследование. Кровь забирали у 6 самцов и 6 самок из каждой группы на 1–2 сут эксперимента на следующих временных точках: до введения, через 30 мин, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 24 ч после первого введения препаратов.

Определение содержания ХС в биологических образцах (плазме крови кроликов) выполнено спектрофотометрическим методом (на планшетном спектрофотометре xMark™ Microplate Spectrophotometer, Bio-Rad, США), основанном на развитии в окрашенном растворе метакроминовой реакции сульфатированных глюкозамингликанов с красителем 1,9-диметилметиленовым синим (1,9-dimethylmethylen blue, DMMB)⁸ [9, 10]. Методика была предварительно валидирована в соответствии с рекомендациями⁹ в диапазоне концентраций 4,5–50 мкг/мл. Были определены селективность, нижний предел количественного определения (НПКО), калибровочный диапазон, точность и прецизионность методики. По всем валидационным характеристикам были получены удовлетворительные результаты, что свидетельствовало о возможности дальнейшего использования методики для изучения ФК препаратов на кроликах.

Фармакологическая активность

Индукция патологии. Эксперимент был проведен на кроликах самцах. Экспериментальный ОА моделировали перерезкой передней крестовидной связки коленного сустава кролика по методу, описанному М. Yoshioka и соавт. [11]. Как было показано ранее, данный подход позволяет оценивать эффективность препаратов для лечения ОА, в том числе хондропротекторов [12, 13]. Моделирование патологии проводили на предварительно наркотизированных животных (внутривенное введение препаратов Золетил® 50 в дозе 5 мг/кг и Ксилазин в дозе 1 мг/кг). Перерезали крестовидную связку, операционную рану послойно ушивали. После формирования патологии животным на протяжении 5 сут внутримышечно вводили Байтрил 2,5% в дозе 0,2 мл/кг с целью предотвращения развития инфекционных послеоперационных осложнений и Кеторол® (раствор для внутривенного и внутримышечного введения 30 мг/мл) в дозе 1,0 мг/кг для обезболивания.

Дизайн исследования. В исследование были включены семь групп животных, по 5 самцов. Патология была сформирована у животных всех групп. 1 группа (контрольная) получала 1% раствор крахмала, группы 2–4 — тестируемый препарат Хондроитин сульфат в дозах 16,8, 33,6 и 67,2 мг/кг соответственно, группы 3–7 — препарат сравнения Структум в дозах 16,8, 33,6 и 67,2 мг/кг соответственно.

Способ введения и выбор доз. Препарат Хондроитин сульфат и препарат сравнения Структум вводили перорально один раз в день на протяжении 56 сут, начиная с 8 сут после индукции патологии. Были использованы дозы 16,8 мг/кг (около 0,5 ВТД), 33,6 мг/кг (около 1 ВТД), 67,2 мг/кг (около 2 ВТД). Животные контрольной группы получали 1% раствор крахмала. Для введения готовили суспензии препаратов в 1% растворе крахмала. Объемы для введения были рассчитаны на основании данных массы тела животных, например объем для введения на животное массой 3 кг составил 2,0 мл.

Клинический осмотр. Проводили до индукции патологии и далее на протяжении всего эксперимента еженедельно. Тяжесть развития патологии оценивали в баллах (0 — нет изменений, 1 — слабо выраженный отек и/или покраснение, 2 — умеренно выраженный отек и/или покраснение,

⁷ ГОСТ Р 58173–2018 Средства лекарственные для медицинского применения. Исследования иммунотоксичности лекарственных средств, предназначенных для человека.

⁸ Хубиева АЮ. Фармакокинетическое исследование различных лекарственных форм хондроитина сульфата. Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. М.; 2007.

⁹ Guideline for industry. Q2A Text on validation of analytical procedures. ICH; 1995.

Guidance for industry. Q2B validation of analytical procedures: methodology. ICH; 1996.

Guidance for industry. Bioanalytical method validation. FDA; 2018.

Guideline on bioanalytical method validation (EMA/CHMP/EWP/192217/2009). EMA; 2011.

3 — максимально выраженные изменения). Окружность сустава оценивали в динамике: нулевой уровень (в 1-й день исследования, до операции) и далее еженедельно на протяжении всего эксперимента. Измерение проводилось при помощи гибкой сантиметровой ленты. Эвтаназию осуществляли на 64 сут посредством передозировки анестетиком (Золетил® 50, внутривенно).

Гистологическое исследование. Для гистологического исследования у кроликов выделяли костно-мышечные блоки в области дистальных эпифизов бедренной кости пораженной конечности. Образцы фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 ч и декальцинировали в течение 14 дней, после чего подвергали стандартной гистологической обработке [14]. Морфологическое исследование гистологических препаратов проводилось при помощи светооптического микроскопа.

Характер и выраженность изменений хрящевой ткани сустава оценивали полуколичественно (в баллах, от 0 до 3) по модифицированной шкале Mankin [15, 16], с анализом следующих показателей:

1) структура поверхности (1 балл — неровности, эрозии, 2 балла — трещины, 3 балла — расслоение);

2) клеточный состав (1 балл — незначительное снижение количества хондроцитов, 2 балла — значительное снижение количества хондроцитов, 3 балла — отсутствие клеток в большей части поля зрения);

3) окрашивание (1 балл — незначительное снижение окрашивания, 2 балла — значительное снижение окрашивания, 3 балла — отсутствие окрашивания);

4) пролиферация клеток (1 балл — изогенные группы хондроцитов (по 2–3 клетки в группе), 2 балла — изогенные группы хондроцитов (по 3–5 клеток в группе), 3 балла — очаги пролиферации (более 5 клеток в группе)).

Толщину хряща определяли на сагиттальных срезах медиальных и латеральных мыщелков бедренной кости от поверхности суставного хряща до остеохондрального соединения с захватом фронта минерализации гиалинового хряща.

Количественное определение уровня СГАГ в суставной поверхности гиалинового хряща. Развитие ОА сопровождается изменением соотношения составляющих компонентов хрящевой ткани — протеогликанов (ПГ). Протеогликаны хрящевой ткани состоят из ковалентно связанных между собой центральных нитей белка и цепей полисахаридов — СГАГ. На начальных стадиях ОА снижается общее содержание СГАГ [17].

В данном исследовании было изучено влияние препаратов ХС на содержание ПГ в хряще

суставной поверхности. Изучение компонентов ПГ возможно только после проведения ферментативного гидролиза. Ферментативный гидролиз проводили в условиях, позволяющих выделить ПГ глубоких слоев хряща, тесно связанных с коллагеном [18].

Выделение ПГ. Предварительно высушенные и взвешенные образцы хрящевой ткани сустава измельчали на измельчителе тканей Polytron® PT-MR 1600 E (Kinematica, Швейцария). Гидролиз измельченного материала проводили в течение 48 ч при температуре 65 °С в 0,1 М фосфатном буферном растворе с pH 7, содержащем 0,005 М этилендиаминтетрауксусной кислоты, 0,005 М цистеина гидрохлорида с добавлением папаина из расчета 0,2 мг на 10 мг хряща. По окончании гидролиза к полученным прозрачным растворам добавляли трихлоруксусную кислоту до конечной концентрации 5% (массовая концентрация). Полученные растворы оставляли на ночь при температуре 4–8 °С, затем центрифугировали в течение 30 мин при 8000 об/мин для осаждения белков. Полученные супернатанты отделяли и подвергали химико-аналитическому исследованию.

Методика количественного определения СГАГ. Количественное содержание СГАГ в ПГ, выделенных из хрящевой ткани суставной поверхности, определяли спектрофотометрическим методом по реакции с 1,9-диметил-метиленовым синим [19]. Содержание СГАГ рассчитывали в микрограммах на миллиграмм хряща.

Анализ данных. Полученные данные были проверены на соответствие закону нормального распределения. Проверка на соответствие закону нормального распределения осуществлялась с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для данных, соответствующих нормальному распределению, были рассчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). В случаях несоответствия данных закону нормального распределения были рассчитаны медиана и квартильный размах ($Me (Q_1; Q_3)$). Межгрупповые различия анализировали параметрическими или непараметрическими методами в зависимости от типа распределения. Для оценки данных с признаками нормального распределения был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим межгрупповым сравнением (*post hoc*) с использованием теста Тьюки (*post hoc Tukey's*). Для оценки данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, был применен критерий Краскела–Уоллиса. Различия были определены при уровне значимости $p = 0,05$. Статистический анализ выполнен с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, США).

Параметры ФК (максимальная концентрация C_{max} , время достижения максимальной

концентрации $T_{\max}$, площадь под кривой «концентрация—время» AUC , среднее время удержания MRT , период полувыведения $T_{1/2}$ и показатель скорости всасывания $C_{\max}/AUC_1$ рассчитаны внемоделным методом статистических моментов [20] с использованием приложения PKSolver для Microsoft Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Токсические свойства

Средняя масса тела кроликов на начало эксперимента составляла 4000 ± 67 г (самцы) и 3936 ± 69 г (самки). На протяжении периода введения препаратов и контрольного вещества регистрировали физиологический прирост массы тела у самцов и самок кроликов всех групп. Влияние препаратов на динамику массы тела не установлено. По результатам клинических осмотров и наблюдений состояние животных, получавших исследуемые препараты, не отличалось от показателей животных контрольной группы.

По результатам клинического и биохимического анализов крови не было выявлено клинически значимого влияния препаратов на все исследуемые параметры. Отмеченные межгрупповые отличия не превышали границы внутрилабораторных физиологических норм, носили случайный характер, поэтому рассматривались как клинически незначимые.

На 29 и на 44 сут эксперимента при патологоанатомическом исследовании у всех животных в исследованных органах макроскопически видимых изменений не обнаружено. Гистологическое строение этих органов также соответствовало норме.

При анализе массовых коэффициентов органов кроликов было установлено, что исследуемые препараты не оказали влияния на оцениваемые показатели ни на 29, ни на 44 сут эксперимента.

Местнораздражающее действие. На 29 и на 44 сут эксперимента у всех животных в месте введения (желудок) и в кишечнике макроскопически видимых изменений не обнаружено. Гистологическое строение желудка, тонкой и толстой кишки соответствовало норме.

Иммуотоксические свойства. Отличий от контрольной группы по параметрам клинического и биохимического анализа крови, массовым коэффициентам тимуса и селезенки выявлено не было. Гистологическое строение лимфоидных органов (тимус, селезенка, околушнные лимфатические узлы) у всех животных соответствовало норме. По совокупности полученных данных был сделан

вывод об отсутствии иммуотоксического действия при курсовом введении препаратов в дозе 168 мг/кг.

Таким образом, полученные в ходе оценки общетоксических свойств препаратов ХС данные свидетельствуют об отсутствии НР при многократном применении препаратов в дозе, превышающей ВТД приблизительно в 6 раз.

Исследование фармакокинетики

Согласно данным литературы эндогенный уровень ХС может быть подвержен колебаниям¹⁰. Поэтому был выполнен анализ проб плазмы крови от животных контрольной группы, получавших 1% раствор крахмала. Установлено, что эндогенный уровень ХС в плазме крови кроликов составил 13,1–86,6 мкг/мл, т. е. имел существенные индивидуальные различия. Вместе с тем не было выявлено значительных колебаний уровня эндогенного ХС в течение периода наблюдения (24 ч) после однократного перорального введения 1% раствора крахмала, являющегося инертным носителем для введения готовых твердых лекарственных форм [21, 22]. Поэтому в дальнейшем определяли эндогенный уровень ХС индивидуально для каждого животного, а затем вычитали его из значений концентраций, полученных после введения препаратов¹¹ [23].

Фармакокинетическая кривая ХС в плазме крови после однократного введения препаратов в дозе 168 мг/кг имела схожую форму, характерную для лекарственных форм, применяемых перорально (рис. 1).

Максимальную концентрацию действующего вещества в плазме крови наблюдали в интервале 3–4 ч после введения препаратов. Далее концентрация ХС постепенно снижалась. Через 24 ч после введения препаратов в плазме крови было обнаружено 4,7–5,2% от максимальной концентрации ХС (табл. 1).

Таким образом, показано, что параметры ФК после однократного перорального введения кроликам препаратов Хондроитин сульфат и Структум в дозе 168 мг/кг полностью сопоставимы.

Фармакологическая активность

Средняя масса кроликов на начало эксперимента составляла 3561 ± 66 г. Влияния препаратов на динамику массы тела не установлено.

Перерезка крестовидной связки привела к развитию отека и в некоторых случаях к покраснению околосуставных тканей, отек развивался уже в течение первых суток после индукции патологии. Эти признаки в той или иной степени сохранялись на протяжении всего эксперимента.

¹⁰ Хубиева АЮ. Фармакокинетическое исследование различных лекарственных форм хондроитина сульфата. Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. М.: 2007.

¹¹ Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. М.: Гриф и К; 2013.

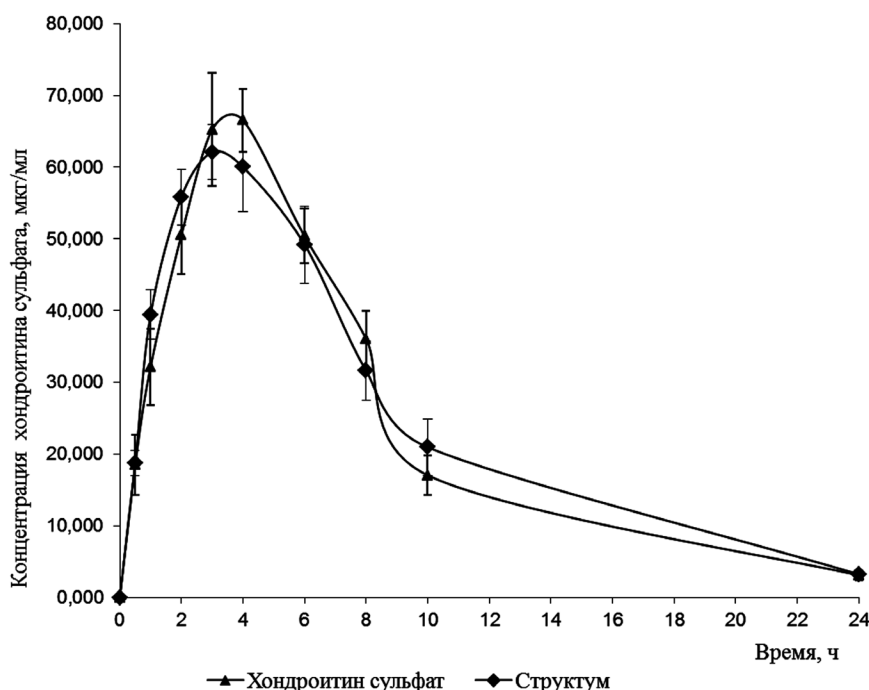


Рис. 1. Зависимость «концентрация–время» хондроитина сульфата в плазме крови после однократного перорального введения препаратов Хондроитин сульфат и Структум в дозе 168 мг/кг в линейных координатах (после вычитания эндогенного уровня для каждого животного, $n = 12$, среднее значение и стандартная ошибка среднего $M \pm m$)

Fig. 1. Plasma chondroitin sulfate concentration-time curve for single oral administration of Chondroitin sulfate and Structum at the dose of 168 mg/kg, plotted on linear coordinates (after subtracting the endogenous level for each animal, $n = 12$, $M \pm m$ — mean value and standard error of the mean)

Таблица 1. Показатели фармакокинетики хондроитина сульфата при однократном пероральном введении препаратов Хондроитин сульфат и Структум в дозе 168 мг/кг*

Table 1. Chondroitin sulfate pharmacokinetic parameters following single oral administration of Chondroitin sulfate and Structum at the dose of 168 mg/kg*

Препарат, который получали животные	$C_{\max}$, мкг/мл	$T_{\max}$, ч	AUC_{0-24} , мкг×ч/мл	$AUC_{0-\infty}$, мкг×ч/мл	MRT , ч	$T_{1/2}$, ч	$C_{\max}/AUC_{0-24}$
Хондроитин сульфат	$78,5 \pm 5,83$	$3,4 \pm 0,29$	579 ± 40	604 ± 42	4584 ± 498	$7,4 \pm 0,51$	$4,6 \pm 0,43$
Структум	$71,0 \pm 3,80$	$3,1 \pm 0,26$	599 ± 56	625 ± 57	4869 ± 559	$7,7 \pm 0,43$	$4,8 \pm 0,46$

Примечание. $C_{\max}$ — максимальная концентрация вещества в плазме; $T_{\max}$ — время достижения максимальной концентрации действующего вещества в плазме; AUC — площадь под фармакокинетической кривой; MRT — среднее время удержания препарата в организме; $T_{1/2}$ — период полувыведения; $C_{\max}/AUC$ — характеристика скорости всасывания.

*Каждый показатель представлен в виде ($M \pm m$) — среднее значение и стандартная ошибка среднего.

Note. $C_{\max}$ — maximum plasma concentration; $T_{\max}$ — time to maximum plasma concentration; AUC — area under the pharmacokinetic curve; MRT — mean residence time of the product in the body; $T_{1/2}$ — half-life; $C_{\max}/AUC$ — characteristic of the absorption rate.

*Each parameter is given as ($M \pm m$) — mean value and standard error of the mean.

На 8 сут эксперимента (до начала введения препаратов) отличий между группами со сформированной патологией по данным клинического осмотра не отмечалось. Начиная с 21 сут наблюдалась тенденция к восстановлению сустава в группах, получающих исследуемые препараты в средней и максимальной дозах.

Окружность сустава до индукции патологии (1 сут) и до начала введения препаратов (8 сут) не различалась между группами. На 8 сут

эксперимента у животных всех групп окружность сустава увеличилась по сравнению с исходной (табл. 2). У животных контрольной группы, не получавших лечения, на протяжении всего эксперимента окружность сустава была значимо увеличена по сравнению с исходной. Аналогичная картина фиксировалась на фоне введения препаратов в минимальной исследованной дозе 16,8 мг/кг (около 0,5 ВТД). Напротив, у животных, получавших исследуемые препараты в дозах 33,6 мг/кг

Таблица 2. Динамика изменения окружности сустава ($n = 5$)

Table 2. Changes of articular circumference with time ($n = 5$)

Препарат, который получали животные	Доза, мг/кг	Окружность сустава ($M \pm m$), мм, на ... сутки исследования									
		1	8	14	21	28	35	42	49	56	63
Хондроитин сульфат	16,8	114 $\pm$ 2	140 $\pm$ 3 ^A	136 $\pm$ 4 ^A	126 $\pm$ 7	126 $\pm$ 2	126 $\pm$ 2	126 $\pm$ 2	128 $\pm$ 2 ^A	128 $\pm$ 2 ^A	128 $\pm$ 2 ^A
	33,6	118 $\pm$ 2	146 $\pm$ 5 ^A	142 $\pm$ 5 ^A	130 $\pm$ 3	130 $\pm$ 3	128 $\pm$ 2	124 $\pm$ 2	122 $\pm$ 2	122 $\pm$ 2	122 $\pm$ 2
	67,2	118 $\pm$ 2	144 $\pm$ 2 ^A	138 $\pm$ 4 ^A	124 $\pm$ 4	124 $\pm$ 2	124 $\pm$ 2	124 $\pm$ 2	124 $\pm$ 2	124 $\pm$ 2	124 $\pm$ 2
Структурм	16,8	116 $\pm$ 2	144 $\pm$ 4 ^A	142 $\pm$ 4 ^A	138 $\pm$ 2 ^A	136 $\pm$ 2 ^A	132 $\pm$ 2 ^A	132 $\pm$ 2 ^A	132 $\pm$ 2 ^A	132 $\pm$ 2 ^A	132 $\pm$ 2 ^A
	33,6	118 $\pm$ 2	144 $\pm$ 2 ^A	134 $\pm$ 4 ^A	130 $\pm$ 3	128 $\pm$ 2	126 $\pm$ 2	124 $\pm$ 2	124 $\pm$ 2	127 $\pm$ 2	128 $\pm$ 2
	67,2	116 $\pm$ 2	146 $\pm$ 2 ^A	142 $\pm$ 4 ^A	132 $\pm$ 2 ^A	128 $\pm$ 4	124 $\pm$ 2	124 $\pm$ 2	124 $\pm$ 2	124 $\pm$ 2	124 $\pm$ 2
Контрольная группа		112 $\pm$ 2	146 $\pm$ 5 ^A	144 $\pm$ 4 ^A	136 $\pm$ 2 ^A	132 $\pm$ 2 ^A	128 $\pm$ 2 ^A	128 $\pm$ 2 ^A	128 $\pm$ 2 ^A	132 $\pm$ 4 ^A	128 $\pm$ 2 ^A

Примечание. n — количество животных в каждой группе; $M \pm m$ — среднее значение и стандартная ошибка среднего.

^AРазличия статистически значимы в сравнении с исходным уровнем (критерий Тьюки, $p < 0,05$).

Note. n —number of animals in each group; $M \pm m$ —mean value and standard error of the mean.

^AStatistically significant difference as compared to the baseline (Tukey's test, $p < 0.05$).

(около 1 ВТД) и 67,2 мг/кг (около 2 ВТД), начиная с 21–28 сут эксперимента статистически значимых отличий от исходного уровня не обнаружили, что свидетельствовало о сопоставимом терапевтическом эффекте препаратов.

При патолого-анатомическом исследовании у животных с экспериментальным ОА были отмечены комплексные изменения суставного хряща, характерные для ОА. У кроликов контрольной группы были выявлены очаги дегенерации хряща в области мыщелков бедренной кости, трещины на поверхности суставного хряща, эрозии, истончение и потеря хряща вплоть до появления участков обнажения костной ткани (рис. 2). При гистологическом исследовании суставные хрящи кроликов контрольной группы характеризовались наличием глубоких эрозивных повреждений. Отмечены трещины и участки расслоения суставного хряща, достигавшие промежуточной и радиальной зон (рис. 3). Степень окрашивания хряща была снижена (табл. 3). Были выявлены дистрофические и некротические повреждения хондроцитов, потеря клеток, а также очаги пролиферации в сохранившихся участках тангенциальной зоны хряща. Морфометрическое исследование показало резкое снижение толщины суставного хряща кроликов контрольной группы по сравнению с животными, получавшими лечение (табл. 4).

У животных, получавших лечение, степень выраженности патологических изменений суставного хряща была ниже, чем у животных контрольной группы, не получавших лечение. Структурные повреждения хряща характеризовались в основном наличием неровностей и эрозивными повреждениями (рис. 4 и 5). Степень окрашивания хряща в основном соответствовала норме (табл. 3). Отмечали восстановление клеточности поверхностной и промежуточной зон хряща, а также толщины суставного хряща в целом, что подтверждено данными морфометрии (табл. 4).

Характер и выраженность изменений хрящевой ткани сустава оценивали в баллах (от 0 до 3). Как видно из данных таблицы 3, отличий между группами, получавшими препараты в эквивалентных дозах, не выявлено.

Результаты морфометрического исследования также подтвердили терапевтическую эффективность препаратов. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил влияние фактора «группа» на толщину суставного хряща ($p < 0,01$). В группе, получавшей тестируемый препарат в максимальной дозе, толщина суставного хряща была выше, чем в группе, получавшей этот препарат в минимальной дозе, что свидетельствует о наличии дозозависимого терапевтического эффекта. Аналогичную тенденцию, не достигшую статистической значимости, наблюдали и на фоне терапии препаратом сравнения (табл. 4).

Таким образом, проведенное экспериментальное изучение фармакологической активности тестируемого препарата и препарата сравнения показало сопоставимость их терапевтических эффектов. Терапия препаратом Хондроитин сульфат в дозах 33,6 и 67,2 мг/кг привела к улучшению клинического состояния сустава с индуцированной патологией уже через 2–3 недели от начала лечения. Значимое клиническое улучшения состояния суставов при применении препаратов в минимальной исследованной дозе не было выявлено. При гистологическом исследовании у животных, получавших тестируемый препарат и препарат сравнения, структурные повреждения хряща были менее выражены по сравнению с животными, не получавшими лечения. Наибольший терапевтический эффект, по данным обзорного гистологического исследования, препараты оказали при введении в максимальной дозе. Отмечалось восстановление клеточности поверхностной и промежуточной зон хряща, а также толщины суставного хряща в целом, что подтверждено данными

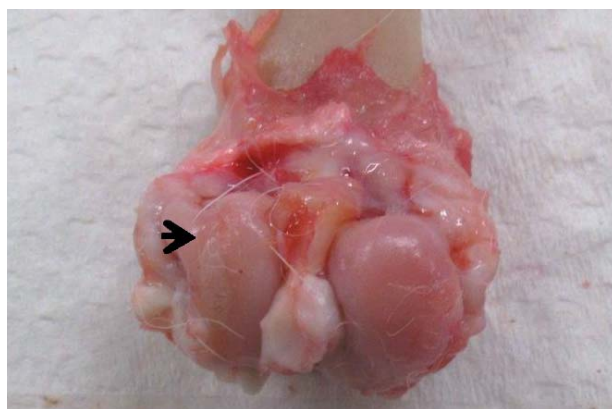


Рис. 2. Суставная поверхность дистального отдела бедренной кости левой конечности кролика, не получавшего лечение

Fig. 2. Articular surface of the distal femur of the left limb of an untreated rabbit

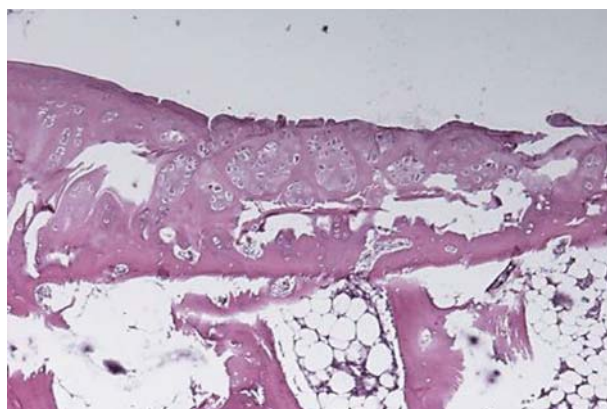


Рис. 3. Срез суставной поверхности дистального отдела бедренной кости левой конечности кролика, не получавшего лечение. Увеличение $\times 50$ (окрашивание гематоксилин-эозином)

Fig. 3. A section of the articular surface of the distal femur of the left limb of an untreated rabbit. Magnification $50\times$ (hematoxylin-eosin staining)

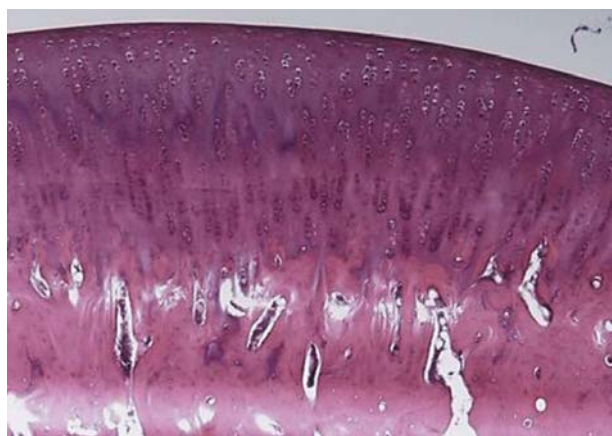


Рис. 4. Срез суставной поверхности дистального отдела бедренной кости левой конечности кролика, получавшего Хондроитин сульфат в дозе 67,2 мг/кг. Увеличение $\times 50$ (окрашивание гематоксилин-эозином)

Fig. 4. A section of the articular surface of the distal femur of the left limb of a rabbit which received Chondroitin sulfate at a dose of 67.2 mg/kg. Magnification $50\times$ (hematoxylin-eosin staining)

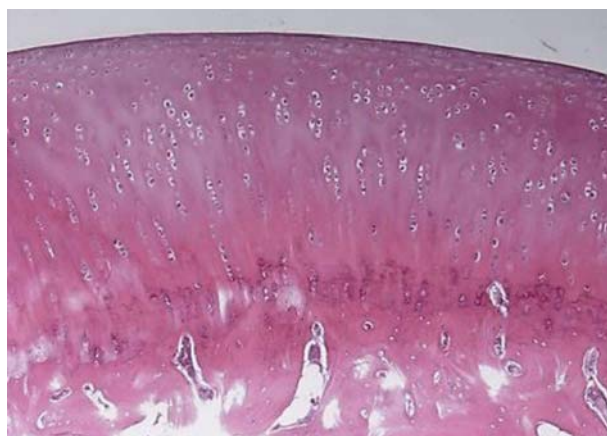


Рис. 5. Срез суставной поверхности дистального отдела бедренной кости левой конечности кролика, получавшего препарат сравнения Структурм в дозе 67,2 мг/кг. Увеличение $\times 50$ (окрашивание гематоксилин-эозином)

Fig. 5. A section of the articular surface of the distal femur of the left limb of a rabbit which received the reference product Structum at a dose of 67.2 mg/kg. Magnification $50\times$ (hematoxylin-eosin staining)

Таблица 3. Результаты оценки выраженности изменений хрящевой ткани сустава ($n = 5$)

Table 3. The results of assessment of the severity of changes in the articular cartilage ($n = 5$)

Препарат, который получали животные	Доза, мг/кг	Патологические признаки изменений (Me (Q ₁ ; Q ₃)), баллы				
		структура поверхности	клеточный состав	снижение окрашивания	пролиферация клеток	сумма по всем патологическим признакам
Хондроитин сульфат	16,8	1,0 (1,0;2,0)	1,0 (1,0;1,0)	1,0 (1,0;1,0)	1,0 (1,0;2,0)	5,0 (4,0;5,0)
	33,6	1,0 (1,0;2,0)	0,0 (0,0;1,0)	1,0 (0,0;1,0)	1,0 (1,0;1,0)	4,0 (3,0;5,0)
	67,2	1,0 (0,0;2,0)	1,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;0,0) ^A	1,0 (1,0;1,0)	3,0 (1,0;4,0) ^A
Структурм	16,8	1,0 (1,0;2,0)	1,0 (0,0;2,0)	1,0 (1,0;1,0)	2,0 (1,0;2,0)	6,0 (3,0;6,0)
	33,6	1,0 (1,0;1,0)	1,0 (1,0;1,0)	1,0 (1,0;1,0)	1,0 (1,0;2,0)	4,0 (3,0;5,0)
	67,2	1,0 (0,0;2,0)	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;1,0)	1,0 (1,0;2,0)	2,0 (2,0;5,0)
Контрольная группа		2,0 (2,0;3,0)	2,0 (2,0;2,0)	2,0 (2,0;2,0)	3,0 (3,0;3,0)	9,0 (8,0;10,0)

Примечание. n — количество животных в каждой группе; Me (Q₁; Q₃) — медиана и квартильный размах.

^AСтатистически значимое отличие от контрольной группы, сравнение средних рангов, $p < 0,05$.

Note. n —number of animals in each group; Me (Q₁; Q₃)—median, and interquartile range.

^AStatistically significant difference as compared to the control group, comparison of mean ranks, $p < 0.05$.

морфометрии: у животных в группах, получавших терапию, толщина хряща была выше по сравнению с животными контрольной группы. Более того, у животных в группе, получавшей тестируемый препарат в максимальной дозе, по данным морфометрии толщина суставного хряща была выше, чем в группе, получавшей этот препарат в минимальной дозе, что свидетельствует о наличии дозозависимого терапевтического эффекта.

Количественное определение СГАГ в протеогликанах хряща суставной поверхности

У животных в группах, получавших препараты в средней и максимальной дозах, было показано значимое увеличение содержания СГАГ относительно контрольной группы (ANOVA, $p < 0,05$) (табл. 5). При введении в минимальной дозе эффект препарата сравнения был статистически значим. В группе, получавшей тестируемый препарат, наблюдали аналогичную тенденцию.

Более того, в образцах хряща суставной поверхности у животных из групп, получавших тестируемый препарат и препарат сравнения в максимальной и средней дозах, содержание СГАГ было выше, чем в группах, получавших исследуемые препараты в минимальной дозе, что свидетельствовало

о наличии дозозависимого терапевтического эффекта.

Таким образом, установлено, что в образцах хряща суставной поверхности у животных контрольной группы, не получавших лечения, содержание ХС было минимальным. Наибольшее его содержание обнаружено в образцах групп, получавших тестируемый препарат и препарат сравнения в максимальной исследованной дозе. В результате проведенного исследования было выявлено статистически значимое увеличение содержания СГАГ у животных во всех группах, получавших препараты, по сравнению с животными контрольной группы. Наиболее выраженное увеличение (на 45–50% по сравнению с контрольной группой) наблюдали в группах, получавших препараты в средней (33,6 мг/кг) и максимальной (67,2 мг/кг) дозах.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показали сопоставимость параметров ФК, фармакологической активности и профиля безопасности воспроизведенного препарата Хондроитин сульфат и препарата Структум.

Таблица 4. Результаты морфометрического исследования суставного хряща ($n = 5$)

Table 4. The results of morphometric analysis of articular cartilage ($n = 5$)

Показатель	Контрольная группа	Препарат, который получали животные					
		Хондроитин сульфат			Структум		
		16,8 мг/кг	33,6 мг/кг	67,2 мг/кг	16,8 мг/кг	33,6 мг/кг	67,2 мг/кг
Толщина суставного хряща ($M \pm m$), мкг/мг	366 ± 16	$504 \pm 19^{A, B}$	532 ± 17^A	582 ± 17^A	518 ± 20^A	532 ± 9^A	563 ± 14^A

Примечание. n — количество животных в каждой группе; $M \pm m$ — среднее значение и стандартная ошибка среднего.

^AРазличия статистически значимы в сравнении с контрольной группой (критерий Тьюки, $p < 0,05$).

^BРазличия статистически значимы в сравнении с группой, получавшей тестируемый препарат в максимальной дозе (критерий Тьюки, $p < 0,05$).

Note. n —number of animals in each group; $M \pm m$ —mean value and standard error of the mean.

^AStatistically significant difference as compared to the control group (Tukey's test, $p < 0,05$).

^BStatistically significant difference as compared to the group which received the test product at the maximum dose (Tukey's test, $p < 0,05$).

Таблица 5. Суммарное содержание сульфатированного глюкозаминогликана (СГАГ) в суставной поверхности гиалинового хряща ($n = 5$)

Table 5. Total content of sulfated glycosaminoglycan (sGAG) in the articular surface of hyaline cartilage ($n = 5$)

Показатель	Контрольная группа	Препарат, который получали животные					
		Хондроитин сульфат			Структум		
		16,8 мг/кг	33,6 мг/кг	67,2 мг/кг	16,8 мг/кг	33,6 мг/кг	67,2 мг/кг
Содержание СГАГ ($M \pm m$), мкг	$1,4 \pm 0,09$	$1,6 \pm 0,04^B$	$2,1 \pm 0,08^A$	$2,1 \pm 0,07^A$	$1,7 \pm 0,04^{A, B}$	$2,1 \pm 0,09^A$	$2,1 \pm 0,05^A$

Примечания. n — количество животных в каждой группе; $M \pm m$ — среднее значение и стандартная ошибка среднего.

^AРазличия статистически значимы в сравнении с контрольной группой (критерий Тьюки, $p < 0,05$).

^BРазличия статистически значимы в сравнении с группами, получавшими исследуемые препараты в средней и максимальной дозах (критерий Тьюки, $p < 0,05$).

Note. n —number of animals in each group; $M \pm m$ —mean value and standard error of the mean.

^AStatistically significant difference as compared to the control group (Tukey's test, $p < 0,05$).

^BStatistically significant difference as compared to the groups which received the test product at the medium and maximum doses (Tukey's test, $p < 0,05$).

Оценка параметров ФК является необходимым этапом разработки препаратов биологического происхождения. Препараты ХС не являются исключением, поскольку структура и свойства полисахаридов в составе ХС, так же как и источник получения ХС, значительно влияют на их абсорбцию и биодоступность при пероральном приеме¹² [24, 25]. Основным результатом проведенного эксперимента является то, что установлена полная сопоставимость профилей ФК двух препаратов ХС ($C_{\max}$ тестируемого препарата — 78,5 мкг/мл, препарата сравнения — 71,0 мкг/мл, $T_{\max}$ — 3,4 ч для тестируемого препарата и 3,1 ч для препарата сравнения).

Полученные нами данные в целом сопоставимы с данными литературы. В экспериментах на кроликах после перорального введения капсул, содержащих 250 мг ХС, уровень $C_{\max}$, наблюдаемый через 3 ч после введения, составил около 40–70 мкг/мл. В клинических условиях у здоровых добровольцев после приема 750 мг ХС максимальную концентрацию наблюдали через 2 ч на уровне около 24 мкг/мл. В обзоре, посвященном изучению ФК ХС на различных видах животных и при различных путях введения, отмечено, что $C_{\max}$ после перорального приема достигается примерно через 2–4 ч после введения ХС [26]. Следует отметить, что сопоставление абсолютных значений параметров ФК, полученных разными авторами, затруднительно из-за различных биологических моделей, исследуемых препаратов, вводимых доз, вариативности как эндогенного уровня ХС, так и аналитических подходов. По данным разных авторов эндогенный уровень ХС в плазме крови человека составляет от 1,5 до 20 мкг/мл [7, 23, 28–30], а у лошадей может достигать 60–80 мкг/г [9]. Но можно выявить определенные закономерности и заключить, что данные как по эндогенному уровню ХС в плазме крови (около 13–86 мкг/мл по нашим данным, 1,5–80 мкг/мл по данным литературы), так и по основным параметрам ФК согласуются с данными литературы (уровни $C_{\max}$ по данным разных авторов варьировали в диапазоне 1–70 мкг/мл; $T_{\max}$ — 2–24 ч¹³) [7, 24, 26, 27]. При сравнительном изучении параметров ФК на здоровых добровольцах $C_{\max}$ после однократного приема 200 мг ХС неживотного (микробиологического) происхождения составила $1,83 \pm 1,66$ мкг/мл, $C_{\max}$ после однократного приема 600 мг ХС животного происхождения составила $1,84 \pm 2,34$ мкг/мл [7].

Важно отметить, что в проведенном исследовании показано, что максимальные концентрации ХС в плазме крови кроликов после введения дозы 168 мг/кг многократно превышали концентрации, которые достигаются в плазме крови человека после приема терапевтических доз [24, 27]. Это доказывает, что достигнуто многократное превышение терапевтической экспозиции и, соответственно, результаты, полученные при изучении токсических свойств, являются валидными и имеют прогностическую ценность для анализа спектра возможных побочных эффектов в клинической практике.

Результаты оценки токсических свойств показали, что исследуемые препараты при многократном пероральном введении в течение 28 сут в дозе, которая по результатам исследования ФК многократно превышала терапевтическую, не оказали токсического действия на организм лабораторных животных. Исследуемые препараты не оказали местнораздражающего действия на слизистую оболочку желудка и кишечника. По данным проведенного исследования установлена доза, не вызывающая видимого нежелательного эффекта (NOAEL), — 168 мг/кг.

Хотя объем данных литературы по экспериментальному изучению субхронической токсичности продуктов, содержащих ХС, не велик, по имеющимся данным можно заключить, что ХС не оказывает токсического действия. Ограниченный объем данных, возможно, обусловлен тем, что ХС длительное время применяется в качестве биологически активной добавки к пище и не во всех странах зарегистрирован как лекарственный препарат. При изучении безопасности гидролизованного куриного хряща, содержащего запатентованную комбинацию природного гидролизованного коллагена типа II (60%), ХС (20%) и гиалуроновой кислоты (10%), на крысах линии Sprague-Dawley максимальная изученная доза, эквивалентная 200 мг/кг ХС, не вызывала каких-либо НР¹⁴. В другом исследовании изучение токсических свойств ХС (микробиологического происхождения) проводили на 120 крысах линии Sprague-Dawley (60 самцов и 60 самок). Животным в течение 90 дней внутрижелудочно вводили препарат хондроитина сульфат натрия (Mythocondro®) в виде суспензии в воде в дозах 250, 500 и 1000 мг/кг, животным контрольной группы вводили дистиллированную воду. По результатам исследования была установлена NOAEL — 1000 мг/кг/сут [7].

¹² Volpi N. Different analyses measure chondroitin pharmacokinetics. May 01, 2006. Orthopedicstoday. <https://www.healio.com/orthopedics/arthritis/news/print/orthopedics-today/%7B08daeedf-4ff3-497c-8aae-0e3099491a2f%7D/different-analyses-measure-chondroitin-pharmacokinetics>

¹³ Хубиева АЮ. Фармакокинетическое исследование различных лекарственных форм хондроитина сульфата. Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. М.; 2007.

¹⁴ GRAS notification for chondroitin sodium sulfate. <https://www.fda.gov/media/100238/download>

В ходе проведенного исследования кроме сравнительной оценки общетоксических свойств и местнораздражающего действия было изучено влияние воспроизведенного препарата ХС и препарата сравнения Структум на иммунокомпетентные органы с целью выявления возможного иммунотоксического действия¹⁵. Полученные результаты позволили заключить, что при введении в дозе, соответствующей около 6 ВТД, в течение 28 сут препараты не оказали иммунотоксического действия.

Сравнительный анализ фармакологической активности воспроизведенного препарата ХС и препарата Структум на модели экспериментального ОА на кроликах показал, что терапия исследуемыми препаратами привела к улучшению клинического состояния сустава с индуцированной патологией, структурные повреждения хряща были менее выражены, отмечалось восстановление целостности поверхностной и промежуточной зон хряща, а также толщины суставного хряща в целом. Содержание СГАГ у животных во всех группах, получавших препараты, увеличено по сравнению с животными контрольной группы. Следует заметить, что в зависимости от источника происхождения ХС характер влияния ХС на метаболические процессы в хрящевой ткани сустава может варьировать и, соответственно, может наблюдаться различный терапевтический эффект [31]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ХС, входящий в состав воспроизведенного препарата, обладает хондропротективной активностью, и эта активность сопоставима по выраженности с препаратом, положительно рекомендовавшим себя в терапии ОА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное экспериментальное исследование безопасности и фармакологической эффективности препарата Хондроитин сульфат (ФГУП «Московский эндокринный завод») в сравнении с зарегистрированным в Российской Федерации препаратом Структум («Пьер Фабр Медикамент Продакшн», Франция) позволило сделать следующие выводы.

1. При многократном пероральном введении в дозе 168 мг/кг (около 6 ВТД) кроликам тестируемый препарат и препарат сравнения не оказали токсического влияния и местнораздражающего действия, не было обнаружено признаков, свидетельствующих о наличии иммунотоксических реакций. По данным проведенного исследования установлена NOAEL — 168 мг/кг.

2. Сравнительная оценка параметров ФК тестируемого препарата и препарата сравнения

после однократного перорального введения в дозе 168 мг/кг (около 6 ВТД) продемонстрировала сопоставимость их профилей ФК. Фармакокинетическая кривая ХС в плазме крови после введения препаратов имела схожую форму, характерную для лекарственных форм, применяемых перорально. Максимальную концентрацию действующего вещества ($C_{\max} = 79 \pm 6$ мкг/мл — Хондроитин сульфат; $C_{\max} = 71 \pm 4$ мкг/мл — Структум) в плазме крови при введении препаратов в исследованной дозе наблюдали в интервале 3–4 часа после введения ($T_{\max} = 3,4 \pm 0,24$ ч — Хондроитин сульфат; $T_{\max} = 3,1 \pm 0,26$ ч — Структум).

3. По результатам оценки терапевтической эффективности препаратов на модели ОА у кроликов не было выявлено различий между тестируемым препаратом и препаратом сравнения по всем изученным параметрам и оба препарата показали эффективность в дозах, соответствующих терапевтическим. Терапия в дозах 33,6 и 67,2 мг/кг привела к улучшению клинического состояния сустава с индуцированной патологией, структурные повреждения хряща были менее выражены, толщина хряща была выше по сравнению с таковой у животных, не получавших лечения. Наибольший терапевтический эффект препараты оказали при введении в максимальной дозе.

4. По результатам количественного определения суммы СГАГ в ПГ хряща суставной поверхности показано увеличение их содержания у животных в группах, получавших максимальные дозы препаратов, по сравнению с другими группами. В группах, получавших тестируемый препарат и препарат сравнения в максимальной и средней дозах, содержание СГАГ было выше, чем в группах, получавших эти препараты в минимальной дозе, что свидетельствовало о наличии дозозависимого терапевтического эффекта.

Полученные данные свидетельствуют о наличии у тестируемого препарата благоприятного профиля безопасности, а также о наличии терапевтического (хондропротективного) действия. Все оцениваемые в ходе исследований параметры препарата Хондроитин сульфат были сопоставимы с таковыми для препарата Структум. Учитывая положительный опыт применения препарата Структум в клинической практике в терапии ОА, данные, полученные относительно нового препарата ХС, позволяют прогнозировать его аналогичную эффективность и безопасность.

Вклад авторов. *Е. В. Мазукина* — координация планирования и выполнения исследовательской работы, сбор, анализ и интерпретация данных, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; *Е. В. Ше-*

¹⁵ ICH S8. Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals. EMA; 2006.

кунова — существенный вклад в концепцию работы, анализ данных литературы, нормативных документов, подготовка текста; **В. М. Косман** — проведение анализа фармакокинетических параметров; **И. Н. Уракова** — проведение анализа содержания СГАГ в хрящах; **И. Г. Котельникова** — анализ данных литературы и нормативных документов, написание и редактирование рукописи; **М. Ю. Фонарев** — идея, концепция и дизайн исследования; **Е. А. Ежова** — анализ данных литературы; **Е. В. Закалюкина** — сбор и анализ данных литературы, написание и редактирование рукописи, работа с табличным материалом; **М. Н. Макарова** — критический пересмотр содержания статьи; **В. Г. Макаров** — критический пересмотр содержания статьи и утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Authors' contributions. **Elizaveta V. Mazukina**—coordination of the planning and implementation of the study, collection, analysis, and interpretation of data, approval of the final version of the paper for publication; **Elena V. Shekunova**—participation in the elaboration of the study concept, review of scientific literature and regulations, writing of the text; **Vera M. Kosman**—analysis of the pharmacokinetic parameters; **Irina N. Urakova**—analysis of cartilage sGAG

content, **Irina G. Kotelnikova**—review of scientific literature and regulations, writing and editing of the text; **Mikhail Yu. Fonarev**—elaboration of the study idea, concept, and design; **Ekaterina A. Ezhova**—review of scientific literature; **Eugenia V. Zakalyukina**—collection and analysis of scientific literature, writing and editing of the text, preparation of the tables; **Marina N. Makarova**—revision of the paper; **Valery G. Makarov**—revision of the paper and approval of the final version of the paper for publication.

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Конфликт интересов. И. Г. Котельникова, М. Ю. Фонарев, Е. А. Ежова, Е. В. Закалюкина являются сотрудниками ФГУП «Московский эндокринный завод». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Irina G. Kotelnikova, Mikhail Yu. Fonarev, Ekaterina A. Ezhova, Eugenia V. Zakalyukina are employees of the Federal State Unitary Enterprise “Moscow Endocrine Plant”. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Harris ED, Budd RC, Firestein GS, Genovese MC, Sergent JS, Ruddy S. Structure and function of bone, joints, and connective tissue. In: Harris E, Budd RC, Firestein GS, Genovese MC, Sergent JS, Ruddy S, Sledge CB, eds. *Kelley's textbook of rheumatology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005.
- McAlindon TE, LaValley MP, Gulin JP, Felson DT. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and meta-analysis. *JAMA*. 2000;283(11):1469–75. <https://doi.org/10.1001/jama.283.11.1469>
- Volpi N, Maccari F. Quantitative and qualitative evaluation of chondroitin sulfate in dietary supplements. *Food Anal Methods*. 2008;1(3):195–204. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9020-9>
- Чичасова НВ. Хондроитин сульфат (Структурм): возможности в лечении остеоартроза и влияние на сопутствующие заболевания. *Трудный пациент*. 2011;9(10):43–50. [Chichasova NV. Chondroitin sulfate: possibilities to treat osteoarthritis and effect on concomitant diseases. *Trudnyy patsient = Difficult Patient*. 2011;9(10):43–50 (In Russ.)]
- Аникин СГ, Алексеева ЛИ. Хондроитина сульфат: механизмы действия, эффективность и безопасность при терапии остеоартроза. *Современная ревматология*. 2012;6(3):78–82. [Anikin SG, Alekseeva LI. Chondroitin sulfate: the mechanisms of action, its efficacy and safety in the therapy of osteoarthritis. *Sovremennaya revmatologiya = Modern Rheumatology Journal*. 2012;6(3):78–82 (In Russ.)] <https://doi.org/10.14412/1996-7012-2012-753>
- Родичкин ПВ, Шаламанов НС. Клиническая фармакология хондропротекторов. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2012;10(3):18–27. [Rodichkin PV, Shalamanov NS. Clinical pharmacology of cartilage protectors. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii = Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2012;10(3):18–27 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/RCF10318-27>
- Miraglia N, Bianchi D, Trentin A, Volpi N, Soni MG. Safety assessment of non-animal chondroitin sulfate sodium: subchronic study in rats, genotoxicity tests and human bioavailability. *Food Chem Toxicol*. 2016;93:89–101. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.04.013>
- Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen & Co; 1959.
- Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta*. 1986;883(2):173–7. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(86\)90306-5](https://doi.org/10.1016/0304-4165(86)90306-5)
- Welch CA, Potter GD, Gibbs PD, Eller EM. Plasma concentration of glucosamine and chondroitin sulphate in horses after an oral dose. *J Equine Vet Sci*. 2012;32(1):60–4. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2011.08.004>
- Yoshioka M, Coutts RD, Amiel D, Hacker SA. Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage*. 1996;4(2):87–98. [https://doi.org/10.1016/s1063-4584\(05\)80318-8](https://doi.org/10.1016/s1063-4584(05)80318-8)
- Ковалева МА, Гушин ЯА. Апробация модели хронического остеоартроза на кроликах. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2019;4(17):17–24. [Kovaleva M, Gushin Ya. Approval of model of chronic osteoarthritis on rabbits. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy = Laboratory Animals for Science*. 2019;4(17):17–24 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-04-03>
- Tiralocche G, Girard C, Chouinard L, Sampalis J, Moquin L, Ionescu M, Reiner A, et al. Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2005;52(4):1118–28. <https://doi.org/10.1002/art.20951>
- Гушин ЯА, Мужикян АА. Влияние фиксирующих жидкостей на микроскопическую структуру органов мелких лабораторных животных. *Международный вестник ветеринарии*. 2014;3(88):88–95. [Gushin YaA, Muzhikyan AA. Effect of fixing liquids on microscopic structure of small laboratory animals. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii = International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2014;3(88):88–95 (In Russ.)]
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am*. 1971;53(3):523–37.
- Шекунова ЕВ, Кашкин ВА, Мужикян АА, Макарова МН, Макаров ВГ. Сравнительный анализ двух экспериментальных моделей хронического артрита у крыс. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2016;79(10):22–8. [Shekunova EV, Kashkin VA, Muzhikyan AA, Makarova MN, Makarov VG. Comparative study of two experimental models of chronic arthritis in rats. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*. 2016;79(10):22–8 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2016-79-10-22-28>
- Русова ТВ, Байтов ВС. Структура гликозаминогликанов суставного хряща у больных остеоартрозом: влияние топографии коленного сустава. *Бюллетень СО РАМН*. 2012;32(2):54–60. [Rusova TV, Baitov VS. The structure of ar-

- ticular cartilage glycosaminoglycans in osteoarthritis patients: influence of knee topography. *Byulleten' SO RAMN = The Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2012;32(2):54–60 (In Russ.)]
18. Русова ТВ, Байтов ВС. Биохимические изменения протеогликанов суставного хряща при прогрессирующем остеоартрозе. *Бюллетень СО РАМН*. 2008;2(130):25–9. [Rusova TV, Baitov VS. Biochemical changes in proteoglycans of articular cartilage in progressive osteoarthritis. *Byulleten' SO RAMN = The Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2008;2(130):25–9 (In Russ.)]
19. Barbosa I, Garcia S, Barbier-Chassefière V, Caruelle JP, Martelly I, Papu-García D. Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology*. 2003;13(9):647–53. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg082>
20. Пиотровский ВК. Метод статистических моментов и интегральные модельно независимые параметры фармакокинетики. *Фармакология и токсикология*. 1986;49(5):118–27. [Piotrovsky VK. The method of statistical moments and integral model-independent parameters of pharmacokinetics. *Farmakologiya i toksikologiya = Pharmacology and Toxicology*. 1986;49(5):118–27 (In Russ.)]
21. Косман ВМ, Пожарицкая ОН, Шиков АН, Гущина СВ, Макарова МН. Оценка стабильности суспензий лекарственных препаратов для введения лабораторным животным. *Международный вестник ветеринарии*. 2016;(1):71–81. [Kosman VM, Pozharitskaya ON, Shikov AN, Gushchina SV, Makarova MN. Evaluation of stability of solid drug suspensions for administration to laboratory animals. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii = International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2016;(1):71–81 (In Russ.)]
22. Гущина СВ, Косман ВМ, Макарова МН, Шиков АН. Оценка стабильности суспензий, приготовленных из готовых лекарственных форм для доклинических исследований. *Фармация*. 2017;66(3):27–32. [Gushchina SV, Kosman VM, Makarova MN, Shikov AN. Preclinical studies of the stability of suspensions prepared from ready-made drugs. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2017;66(3):27–32 (In Russ.)]
23. Еременко НН, Горячев ДВ, Ших ЕВ. Оценка фармакокинетики эндогенных соединений на примере препаратов кальция. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2017;7(2):104–10. [Eremenko NN, Goryachev DV, Shikh EV. Evaluation of endogenous compounds pharmacokinetics as illustrated by calcium. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Product*. 2017;7(2):104–10 (In Russ.)]
24. Volpi N. Oral bioavailability of chondroitin sulfate (Condro-sulf®) and its constituents in healthy male volunteers. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(10):768–77. <https://doi.org/10.1053/joca.2002.0824>
25. Du J, White N, Eddington ND. The bioavailability and pharmacokinetics of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate after oral and intravenous single dose administration in the horse. *Biopharm Drug Dispos*. 2004;25(3):109–16. <https://doi.org/10.1002/bdd.392>
26. Lamari FN, Theocharis AD, Asimakopoulou AP, Malavaki CJ, Karamanos NK. Metabolism and biochemical/physiological roles of chondroitin sulfates: analysis of endogenous and supplemental chondroitin sulfates in blood circulation. *Biomed Chromatogr*. 2006;20(6–7):539–50. <https://doi.org/10.1002/bmc.669>
27. Toffoletto O, Tavares A, Casarini DE, Redublo BM, Rideiro AB. Pharmacokinetic profile of glucosamine and chondroitin sulfate association in healthy male individuals. *Acta Ortop Bras*. 2005;13(5):235–7.
28. Jackson CG, Plaas AH, Sandy JD, Hua C, Kim-Rolands S, Barnhill JG, et al. The human pharmacokinetics of oral ingestion of glucosamine and chondroitin sulfate taken separately or in combination. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(3):297–302. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.10.013>
29. Myers AL, Upreti VV, Khurana M, Eddington ND. Characterization of total plasma glycosaminoglycan levels in healthy volunteers following oral administration of a novel antithrombotic odiparil with aspirin or enoxaparin. *J Clin Pharmacol*. 2008;48(10):1158–70. <https://doi.org/10.1177/0091270008323751>
30. Zinellu A, Pisanu S, Zinellu E, Lepedda AJ, Cherchi GM, Sotgia S, et al. A novel LIF-CE method for the separation of hyaluronan- and chondroitin sulfate-derived disaccharides: application to structural and quantitative analyses of human plasma low- and high-charged chondroitin sulfate isomers. *Electrophoresis*. 2007;28(14):2439–47. <https://doi.org/10.1002/elps.200600668>
31. Tat SK, Pelletier JP, Mineau F, Duval N, Martel-Pelletier J. Variable effects of 3 different chondroitin sulfate compounds on human osteoarthritic cartilage/chondrocytes: relevance of purity and production process. *J Rheumatol*. 2010;37(3):656–64. <https://doi.org/10.3899/jrheum.090696>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Мазукина Елизавета Владимировна. Elizaveta V. Mazukina. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1448-921X>

Шекунова Елена Васильевна, канд. биол. наук. Elena V. Shekunova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2689-6891>

Косман Вера Михайловна, канд. фарм. наук. Vera M. Kosman, Cand. Sci. (Pharm.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>

Уракова Ирина Николаевна, канд. хим. наук. Irina N. Urakova, Cand. Sci. (Chem.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0833-3371>

Котельникова Ирина Геннадьевна, канд. фарм. наук. Irina G. Kotelnikova, Cand. Sci. (Pharm.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1584-8739>

Фонарев Михаил Юрьевич, канд. юр. наук. Mikhail Yu. Fonarev, Cand. Sci. (Leg.).

Ежова Екатерина Александровна. Ekaterina A. Ezhova.

Закалюкина Евгения Викторовна. Eugenia V. Zakalyukina.

Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук. Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>

Макаров Валерий Геннадьевич, д-р мед. наук, профессор. Valery G. Makarov, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>

Статья поступила 27.01.2021

После доработки 16.02.2021

Принята к печати 01.03.2021

Article was received 27 January 2021

Revised 16 February 2021

Accepted for publication 1 March 2021