The study of the effect of preparations of glucosamine and acetylsalicylic acid on the behavioral reactions and the physical endurance of rats on the model of acute local cold trauma

Aim. To study effect of preparations of glucosamine and acetylsalicylic acid on behavioral actions and physical endurance on the model of acute local cold trauma (CT) in rats.

Materials and methods. Contact frostbite was modeled by V. V. Boyko method. The rectal temperature was determined in 40 min after the simulation of the local CT. The state of the central nervous system was assessed 1 hour after CT by behavioral reactions in the "open field" test. The motor activity, orienting research activity, emotional reactions and their vegetative support, number of fecal boluses and urinations were determined.

Results and discussion. It has been found that the drugs studied assist to normalization of the rectal temperature, as well as improve the dynamics of recovery of behavioral reactions and the physical activity in rats after acute local cold trauma.

Conclusions. On the model of forced swimming with a load after acute local trauma acetylsalicylic acid increased the time of the physical fatigue onset by 1.4 times, Glucosamine-C BCPP by 1.7 times and glucosamine hydrochloride by 1.66 times. Preparations of glucosamine showed the best protective effect.

Key words: local cold trauma; behavioral reactions; physical endurance; acetylsalicylic acid; glucosamine

Ye. V. Bondarev
National University of Pharmacy, Ukraine

Дослідження впливу препаратів глюкозаміну та ацетилсаліцилової кислоти на поведінкові реакції та фізичну витривалість щурів на моделі гострої локальної холодової травми

Мета. На моделі гострої локальної холодової травми (відмороження) у щурів дослідити вплив препаратів глюкозаміну та ацетилсаліцилової кислоти на поведінкові реакції та фізичну витривалість.

Матеріали та методи. Контактне відмороження моделювали за методом Бойко В. В. Ректальну температуру визначали цифровим термометром WSD-10 через 40 хв після моделювання локальної ХТ. Стан центральної нервої системи оцінювали через 1 годину після ХТ за поведінковими реакціями в тесті "відкрите поле". Визначали рухову активність, орієнтовно-дослідницьку діяльність, емоційні реакції та їх вегетативний супровід, визначали кількість фекальних болясів та уринацій.

Результати та їх обговорення. Встановлено, що досліджувані препарати сприяють нормалізації ректальної температури, позитивно впливають на динаміку відновлення поведінкових реакцій та фізичної витривалості у щурів після гострої локальної холодової травми.

Висновки. На моделі примусового плавання з навантаженням після гострої локальної холодової травми АСК збільшувала час настання фізичного виснаження в 1,4 рази, «Глюкозамін-С БХФЗ» – в 1,7 рази та Г г/х – в 1,66 рази. Препарати глюкозаміну виявили найкращий захисний ефект.

Ключові слова: локальна холодова травма; поведінкові реакції; фізична витривалість; ацетилсаліцилова кислота; глюкозамін

Е. В. Бондарев
Национальный фармацевтический университет, Украина

Исследование влияния препаратов глюкозамина и ацетилсалициловой кислоты на поведенческие реакции и физическую выносливость крыс на модели острой локальной холодовой травмы

Цель. На модели острой локальной холодовой травмы (отморожения) у крыс изучить влияние препаратов глюкозамина и ацетилсалициловой кислоты на поведенческие реакции и физическую выносливость.

Материалы и методы. Контактное обморожение моделировали по методу Бойко В. В. Ректальную температуру определяли цифровым термометром WSD-10 через 40 мин после моделирования локальной ХТ. Состояние центральной нервной системы оценивали через 1 час после ХТ по поведенческим реакциям в тесте "открытое поле". Определяли двигательную активность, ориентировочно-исследовательскую деятельность, эмоциональные реакции и их вегетативное сопровождение, определяли количество фекальных болясей и уринаций.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что исследуемые препараты способствуют нормализации ректальной температуры, позитивно влияют на динамику восстановления поведенческих реакций и физическую трудоспособность у крыс после острой локальной холодовой травмы.

Выводы. На модели принудительного плавания с нагрузкой после острой локальной холодовой травмы ацетилсалициловая кислота увеличивала время наступления физического утомления в 1,4 раза, «Глюкозамин-С БХФЗ» – в 1,7 раза, а Г г/х – в 1,66 раза. Препараты глюкозамина проявили наилучший защитный эффект.

Ключевые слова: локальная холодовая травма; поведенческие реакции; физическая выносливость; ацетилсалициловая кислота; глюкозамин
Introduction. In the modern world people are affected by a large number of negative environmental factors. Emergency work, adverse climatic conditions, psychotechnogenic impacts, and combat actions are major stress-related factors [1-4]. The damage of the body with low environmental temperatures is very important. Cold traumas (CT) in the structure of injuries in peacetime are 3-10% and accompanied by high disability of victims and mortality [5, 6].

The pathogenesis of the low body temperature affects changes in the central nervous, cardiovascular, endocrine, immune, respiratory, excretory systems, gastrointestinal tract and skin [7].

The arsenal of medicines with the frigoprotective action is rather narrow. In addition, most of these agents affect only one or more components of the pathogenesis of CT. Therefore, the search for new safe and effective frigoprotectors is important. Convincing evidence of the effectiveness of glucosamine hydrochloride (G h/ch) in CT was obtained. G h/ch and the dietary supplement Glucosamine-C BCPP containing G h/ch and ascorbic acid in acute CT has a distinct protective effect: reduces hypothermia, improves animal survival, the motor and physical activity, normalizes rheological properties of the blood, exceeding acetylsalicylic acid (ASA) – the known frigoprotector [8-10]. Under the conditions of CT ASA, Glucosamine-C BCPP and especially G h/ch exhibit distinct anti-inflammatory properties as evidenced by a significant decrease in interleukin IL-1β and an increase in the content of IL-10 [11]. On the acute CT model the highest frigoprotective effect was shown by G h/ch and Glucosamine-C BCPP when no inflammatory reactions and microcirculation disorders in the skin were observed; under the effect of G h/ch the histological structure of the skin was close to that in the intact control group [12].

After 14 days of taking the dietary supplement Glucosamine-C BCPP under the effect of cold during field exercises the cadets of the National Academy of the National Guard of Ukraine had a reduced risk of acute respiratory diseases, an increased adaptation of the organism to a long-lasting effect of low temperatures, an increased concentration of attention and mental working capacity [13].

G h/ch is an effective antihypothermic and antioxidant agent in the local CT [14]. The nootropic action of G h/ch [15] was revealed. This suggests the ability of G h/ch to improve behavioral reactions and physical endurance in CT. The clarification of this ability was the purpose of this study.

The aim of the work was to determine the effect of preparations of glucosamine and acetylsalicylic acid on the body temperature, behavioral responses and physical endurance of rats in conditions of acute local CT.

Materials and methods. Experiments were done on 30 white outbred male rats weighing 200-250 g. Animals were kept on a standard diet of the vivarium with free access to water, with constant temperature and humidity. The protocol of the study is consistent with bioethical standards and corresponds to the “General ethical principles of animal experimentation” (Ukraine, 2001) and is not in contradiction with the provisions of the “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1986) [16].

Contact frostbite was modeled by V. V. Boyko method [17] under thiopental anesthesia (40 mg/kg) on the depilated area of the back skin 1.5 cm away from the spine. A copper plate of 3.5 × 3.0 cm pre-cooled in liquid nitrogen (-196 °C) was applied to the depilated skin for 3 min. This method allows obtaining cold skin lesions that are standard by area and depth and correspond to the III degree of frostbite by clinical classification. The rectal temperature was determined by a WSD-10 digital thermometer in 40 min after the simulation of the local CT.

The state of the central nervous system (CNS) was assessed 1 hour after CT by behavioral reactions in the “open field” test [18]. The motor activity, orienting research activity, emotional reactions and their vegetative support, number of fecal boluses and urinations were determined [16]. Physical endurance of animals was studied 20-30 min after the “open field” test on the model of forced swimming with a load (7.5% of the body weight at the root of the tail). The criterion for the total exhaustion was the 10-second stay of animals under water and the inability to come to the surface to breathe [5].

The following drugs and substances were used in the study: 0.9% NaCl solution, Glucosamine-C BCPP (PJSC SPC “Borschagovsky CPP”, Ukraine), glucosamine hydrochloride (G h/ch) substance (Sigma-Aldrich, Germany) and soluble ASA tablets (Bayer, Germany). They were administered as a water solution intragastrically (i/g) in the prophylactic mode 30 min before CT. Animals were divided into 5 groups: group 1 – intact control (IC) (n = 6), rats were injected NaCl (1 ml/100 g); group 2 – control pathology (CT) (n = 6), rats were injected NaCl (1 ml/100 g); group 3 – ASA (25 mg/kg) + CT (n = 6); group 4 – Glucosamine-C BCPP in the dose of 82.5 mg/kg corresponding to 50 mg/kg of G h/ch, + CT (n = 6); group 5 – G h/ch (50 mg/kg) + CT (n = 6). Doses of G h/ch of 50 mg/kg and ASA of 25 mg/kg are conventionally effective in CT [19].

The statistical processing of the results was carried out by the methods of variation statistics using “Statistica, V. 6.0” statistical program standard package with the calculation of the average value and its standard error, the significance of differences by Student’s criterion (t) for the normal distribution. In its absence the non-parametric White’s test was used. Differences were considered statistically significant if p < 0.05 [20].

Results and discussion. One hour after the end of the simulation of acute local CT a distinct hypothermia and a severe general condition of animals were observed (Tab. 1).

In all experimental groups a significant reduction in the rectal temperature (p < 0.05) was observed compared to the intact control group. Thus, in the group of CT it decreased on average by 1.8 °C, in the ASA group – by 1.58 °C, in the group of Glucosamine-C BCPP – by 1.4°C and in the G h/ch group – by 1.22 °C. Under the effect of Glucosamine-C BCPP and G h/ch a tendency to re-
Indicators of the rectal temperature in rats before and after CT under the effect of preparations of glucosamine and acetylsalicylic acid, t °C (M ± m, n = 6)

| Period of observation | Animal groups | | | |
|-----------------------|--------------|----------------|-----------------|-----------------|
|                       | Intact control | Control pathology (CT) | ASA, 25 mg/kg | Glucosamine-C BCPP, 82.5 mg/kg | G h/ch, 50 mg/kg |
| Before cold trauma    | 39.20 ± 0.07  | 39.07 ± 0.06  | 39.20 ± 0.09  | 39.23 ± 0.08  | 39.08 ± 0.06  |
| 30 min after cold trauma | –           | 37.4 ± 0.27*  | 37.62 ± 0.12*/** | 37.78 ± 0.15*  | 37.98 ± 0.09*  |

Notes: * – significant in relation to the intact control, p < 0.05; ** – significant in relation to G h/ch, p < 0.05.

Indicators of behavioral and emotional reactions in the “open field” test in rats exposed to acute local cold trauma and effects of preparations of glucosamine and acetylsalicylic acid (M ± m, n = 6)

| Markers (for 3 min) | Intact control | Acute local cold trauma (stress) | | | |
|---------------------|----------------|--------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|                     |                | Control pathology CT | ASA, 25 mg/kg | Glucosamine-C BCPP, 82.5 mg/kg | G h/ch, 50 mg/kg |
| Locomotor activity  |                |                           |               |                          |                |
| Passed squares      | 52.83 ± 7.85   | 5.0 ± 1.24*              | 23.67 ± 4.45*/** | 18.83 ± 5.01*/** | 24.0 ± 3.45*/** |
| Holes               | 16.67 ± 2.95   | 2.67 ± 0.96/****         | 1.67 ± 0.72/**** | 4.33 ± 1.17* | 7.83 ± 1.17/**** |
| Postures            | 10.83 ± 1.94   | 1.33 ± 0.62/****         | 2.50 ± 0.62/**** | 4.33 ± 1.33* | 7.33 ± 1.05** |
| Emotional reactions and vegetative support | | | | |
| Fecal boluses       | 1.83 ± 0.48    | 0.33 ± 0.21*             | 0.50 ± 0.34*    | 0.83 ± 0.40    | 0.50 ± 0.22* |
| Urinations          | 0.33 ± 0.21    | 0 ± 0                    | 0 ± 0           | 0.17 ± 0.17    | 0 ± 0          |
| Grooming            | 0.83 ± 0.65    | 0 ± 0*                   | 0.67 ± 0.67     | 2.17 ± 1.25    | 0.17 ± 0.17   |
| In total            | 83.33 ± 11.54  | 9.33 ± 1.61/****         | 29.0 ± 4.52/*** | 30.67 ± 7.14/*** | 39.83 ± 3.55/*** |

Notes: * – significant in relation to the intact control, p < 0.05; ** – significant in relation to the control pathology; *** – significant in relation to the parameters of the G h/ch group, p < 0.05.
Table 3

| Animal groups                      | Time of full fatigue, seconds |
|------------------------------------|-------------------------------|
| Intact control                     | 121.0 ± 8.91                  |
| Control pathology (CT)             | 71.0 ± 3.23*/**               |
| ASA, 25 mg/kg                      | 100.0 ± 2.85**/***            |
| Glucosamine-C BCPP, 82.5 mg/kg    | 121.67 ± 3.37**               |
| G h/ch, 50 mg/kg                   | 118.0 ± 2.70**                |

Notes: * – significant in relation to the intact control, p < 0.05; ** – significant in relation to the control pathology; *** – significant in relation to G h/ch, p < 0.05.

these agents on the CNS, the functional state of the skeletal muscles, and prove their frigoroprotective properties.

Restoration of the rectal temperature prevents severe disorders of the CNS. In acute local CT preparations of glucosamine have marked actoprotective properties. The results of the previous studies [21] on the positive effect of G h/ch on the parameters of the motor and research activity, the muscle tone, coordination of movements, and physical endurance of mice in acute general CT confirmed this study. Thus, the conclusion can be made that G h/ch has a marked frigoroprotective effect for different types of CT (general and local).

Conclusions and prospects for further research

1. Preparations of glucosamine – Glucosamine-C BCPP and glucosamine hydrochloride – in acute local cold trauma (frostbite) prevent the decrease of the body temperature in rats, while glucosamine hydrochloride significantly exceeds the effect of acetylsalicylic acid.

2. Acetylsalicylic acid, Glucosamine-C BCPP, and especially glucosamine hydrochloride, assist to normalization of behavioral reactions in rats after acute local cold trauma according to the results of the “open field” test.

3. On the model of forced swimming with a load glucosamine preparations significantly increase the physical endurance of rats compared to the group of cold trauma, while glucosamine hydrochloride by its actoprotective activity is significantly more effective than acetylsalicylic acid.

4. The results of experiments indicate that the use of glucosamine preparations as frigoprotectors in acute local cold trauma is promising.

Conflict of interests: authors have no conflict of interests to declare.

REFERENCES

1. Zakrevskiy, Y. N. Osobennosti boyolovoy i kombinirovannoy mehano-holdovoy travmy pri morskih katastrofakh (obзор литературы) / Ю. Н. Закревский, Р. И. Матвеев // Медицина катастроф. – 2014. – № 4 (88). – С. 46–49.

2. Balodis, C. Chrezvychaynyye situatsii v naší zhizni / С. Балодис // Гражданская защита. – 2002. – № 4. – С. 32.

3. Будков, А. А. Особенности оказания медицинской помощи при отморожениях в советско-финской войне / А. А. Будков, С. Х. Кичемасов, М. П. Скрощов. // Воен.-мед. журн. – 2000. – С. 73–78.

4. Eglin, C. M. Repeated cold showers as a method of habituating humans to the initial responses to cold water immersion / C. M. Eglin, M. J. Tipton // Enr. J. Appy Psisiol. – 2005. – Vol. 93 (5–6). – P. 624–629. https://doi.org/10.1007/s00421-004-1239-6

5. Локальная холодовая травма : вопросы патогенеза, оценки тяжести и лечения (обзор литературы) / Ю. С. Винник, А. Б. Салимова, М. Ю. Юрьева, О. В. Теплякова // Московский хир. журн. – 2011. – Т. 17. – № 4. – С. 42–48.

6. Рощин, А. Г. Медико–социальные проблемы холодовой травмы серед населения Украины / Г. Г. Рощин, Я. С. Кукурдук, І. Й. Сличко // Політрвастию. Сучасна концепція надання медичної допомоги. – 2006. – С. 20–21.

7. Бондарев, Е. В. Влияние препаратов глюкозамина и ацетилсалциловой кислоты на артериальный тишик и показники ЕКГ у больных экспериментальной холодовой травмой / Е. В. Бондарев, С. Ю. Штрыголь // Фармакол. та лікарська токсикол. – 2010. – № 5 (10). – С. 60–65.

8. Бондарев, Е. В. Антигипотермические и антиоксидантные свойства глюкозамина по результатам экспериментальных исследований / Е. В. Бондарев, С. Ю. Штрыголь // Укр. біофарм. журн. – 2017. – № 3 (73). – С. 92–97.

9. Бондарев, Е. В. Состояние свертывающей системы крови у больных экспериментальной холодовой травмой / Е. В. Бондарев, С. Ю. Штрыголь // Вестник фармации. // Вестник фармации. – 2018. – № 2 (80). – С. 64–69.
14. Бондарев, Є. В. Фригопротекторні та антиоксидантні властивості препаратів глюкозаміну та ацетилсаліцилової кислоти в умовах гострої локальної холодової травми / Є. В. Бондарев // Український біофармацевтичний журнал. – 2018. – № 1 (54). – С. 18–24. https://doi.org/10.24959/ubphj.18.153

15. Бондарев, Є. В. Експериментальне обґрунтування застосування глюкозаміну гідрохлориду як засобу ноотропної дії / Є. В. Бондарев // Фармакологія та лікарська токсикологія. – № 1 (37). – 2014. – С. 22–25.

16. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I / Под ред. А. Н. Миронова. – М. : Гриф и К, 2012. – 944 с.

17. Холодова травма : доклінічне вивчення лікарських препаратів з фригопротекторними властивостями: метод. рек. / Є. В. Бондарев, С. Ю. Штриголь, С. М. Дроговоз та ін. – Х., 2018. – 35 с.

18. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. чл.-кор. НАМН України О. В. Стефанова. – К. : ВД «Авіценна», 2001. – 527 с.

19. Бондарев, Є. В. Скринінгове дослідження глюкозаміну гідрохлориду в якості засобу фригопротекторної дії / Є. В. Бондарев, С. Ю. Штриголь // Клінічна фармація. – 2010. – Т. 14, № 4. – С. 47–49.

20. Мастикіць, С. І. Методичне посібне по іспользованию программы STATISTICA при обработке даних біологічних вивченнятів. – Мн : РУП «Інститут рибного господарства», 2009. – 76 с.

REFERENCES

1. Zakrevskii, Iu. N., Matveev, R. P. (2014). Medicina katastrof, 4 (88), 46–49.

2. Balodis, S. (2002). Grazhdanskaia zashchita, 4, 32.

3. Budkov, A. A., Kichemasov, S. Ch., Skvortcov, M. P. (2000). Voenno–medetsinskii zhurnal, 73–78.

4. Eglin, C. M., & Tipton, M. J. (2004). Repeated cold showers as a method of habituating humans to the initial responses to cold water immersion. European Journal of Applied Physiology, 93 (5–6), 624–629. https://doi.org/10.1007/s00421-004-1239-6

5. Vinnik, Iu. S., Salmina, A. B., Iureva, M. Iu., Tepliakova, O. V . (2011). Moskovskii khirurgicheskii zhurnal, 17 (4), 42–48.

6. Roshchin, H. H., Kukurudz, Ya. S., Slychko, I. Y . (2006). Politravma. Suchasna kontseptsiia nadannia medychnoi dopomohy, 20–21.

7. Bondarev, E. V ., Shtryhol, S. Yu. (2017). Farmakolozhhiia ta likarska toksykolozhhiia, 5 (10), 60–65.

8. Bondarev, E. V ., Shtryhol, S. Yu. (2016). Vestnik farmacii. Belorussiya, 3 (73), 92–97.

9. Bondarev, E. V ., Shtryhol, S. Yu. (2017). Respublikanskiy nauchnyiy zhurnal “Vestnik”. Kazakhstan, 2 (79), 30–36.

10. Bondarev, E. V ., Shtryhol, S. Yu., Gorbach, T. V . (2018). Farmakolozhhiia ta likarska toksykolozhhiia, 57, 21–25.

11. Bondarev, E. V ., Shtryhol, S. Yu., Drogovoz, S. M., & Larianovska, Y . B. (2018). Effect of glucosamine and acetylsalicylic acid preparations on the skin histostructure after acute cold trauma. Zaporozhye Medical Journal, 4. https://doi.org/10.14739/2310-1210.2018.4.135381.

12. Bondarev, E. V ., Shtryhol, S. Yu., Drogovoz, S. M. (2018). Vestnik farmacii, 2 (80), 64–69.

13. Bondarev, E. V . (2018). Antioxidant and frigoprotective properties of glucosamine preparations and acetylsalicylic acid under conditions of acute local cold trauma. Ukrains'kij biofarmacevtichniy zhurnal, 1 (54), 18–24. https://doi.org/10.24959/ubphj.18.153

14. Bondarev, E. V . (2014). Farmakolozhhiia ta likarska toksykolozhhiia, 1 (37), 22–25.

15. Mironov, A. N. (2012). Rukovodstvo po provedeniiu doklinicheskikh issledovanii lekarstvennyh sredstv. Moscow : Grif i K, 944.

16. Bondarev, E. V ., Shtryhol, S. Yu., Drogovoz, S. M. (2018). Kholodova travma : doklinichne vyvchenia likarsykh preparativ z fryhoprotektornymi vlastyvostiamy. Metodychnyi rekomendatsii. Kharkiv, 35.

17. Stefanov, O. V . (2001). Doklinichni doslidzhennya likars'k hazobiv : metodychni rekomendatsii. Kyiv: “Avicena”, 527.

18. Bondarev, E. V ., Shtryhol, S. Yu. (2010). Ukrains'kij biofarmacevtichniy zhurnal, 5 (10), 60–65.

19. Bondarev, E. V ., Shtryhol, S. Yu. (2016). Vestnik farmacii. Belorussiya, 3 (73), 92–97.

20. Bondarev, E. V ., Shtryhol, S. Yu., Drogovoz, S. M. (2018). Vestnik farmacii, 2 (80), 64–69.

Information about authors: Bondarev Ye.V., Candidate of Pharmacy (Ph. D), associate professor of the Department of Pharmacology, National University of Pharmacy. E-mail: jck.bond@gmail.com. ORCID: http://orcid.org/0000-0002-9958-0986

Відомості про авторів: Бондарев Є. В., канд. фармац. наук, доцент кафедри фармакології, Національний фармацевтичний університет. E-mail: jck.bond@gmail.com. ORCID: http://orcid.org/0000-0002-9958-0986

Сведения об авторах: Бондарев Е. В., канд. фармац. наук, доцент кафедры фармакологии, Национальный фармацевтический университет. E-mail: jck.bond@gmail.com. ORCID: 0000-0002-9958-0986

Надійшла до редакції 26.10.2018 р.