



ОСТЕОПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ L-АРГИНИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТЕОПОРОЗЕ

О.С. ГУДЫРЕВ¹
Д.С.Р. РАДЖИМАР²
А.В. ФАЙТЕЛЬСОН²
М.В. ПОКРОВСКИЙ¹
В.А. РУЖЕНКОВ¹
О.В. ФИЛИПОВА¹

¹⁾ *Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

²⁾ *Курский государственный
медицинский университет*

e-mail: gudyrev@mail.ru

В результате исследования было продемонстрировано, что через восемь недель после проведения овариэктомии у самок белых крыс линии Вистар развивается нарушение функции эндотелия сосудов микроциркуляторного русла костной ткани и ухудшение регионарного кровотока в кости, приводящее к возникновению генерализованного остеопороза.

L-аргинин, обладая эндотелиопротективным действием, эффективно предотвращал снижение уровня регионарной микроциркуляции в костной ткани, сохраняя его на уровне интактных крыс. Это позволило поддержать на адекватном уровне процессы костного ремоделирования, что проявилось в замедлении истончения костных трабекул и предотвращении возникновения в них микропереломов.

Ключевые слова: остеопороз, микроциркуляция, эндотелиальная дисфункция, L-аргинин.

Введение. L-аргинин – условно незаменимая аминокислота, является субстратом для синтеза оксида азота. Поступивший с пищей L-аргинин всасывается в тонком кишечнике и транспортируется в печень, где основное его количество утилизируется в орнитиновом цикле, а часть L-аргинаина, не метаболизовавшаяся в печени, используется как субстрат для продукции NO [9, 15, 19, 21]. Оксид азота играет важную физиологическую роль, обладая широким спектром биорегуляторных эффектов [11, 12, 22]. Молекула NO является одной из наиболее мелких известных молекул – биологических мессенджеров, и благодаря химической простоте эффекты NO могут регулироваться исключительно его концентрацией и стабильностью. NO легко проникает сквозь мембраны клеток, не нуждаясь в каналах или рецепторах. Инициированный NO сигнальный период достаточно короткий, так как NO быстро окисляется в нитриты и нитраты, поэтому биологические эффекты NO ограничены местом его образования. Мишени воздействия NO зависят от окружающих условий и количества производимого NO. Местный уровень NO детерминирован балансом между интенсивностью его синтеза или экзогенного образования и интенсивностью инактивации. Физиологическое действие NO варьирует в широком пределе от модуляции сосудистой системы до регуляции иммунных процессов (клеточно-опосредованный иммунитет, воздействие нейтрофилов на патогенные микроорганизмы, неспецифическая иммунная защита) и контроля нейрональных функций (передача сигнала в неадренергических холинергических нейронах, синаптическая пластичность в центральной нервной системе, осцилляторная активность нейрональной сети, нейропротекция).

Роль NO в поддержании сосудистого гомеостаза сводится к регуляции сосудистого тонуса, пролиферации и апоптоза, а также регуляции оксидантных процессов. Кроме того, NO присущи ангиопротективные и неангиогенные свойства, также оксид азота – мощный периферический вазодилататор. Хотя внутриклеточная концентрация L-аргинаина значительно выше по сравнению с плазмой или внеклеточной жидкостью, доказано, что внеклеточный L-аргинин может быстро захватываться эндотелиальными клетками для синтеза NO. При низких концентрациях в плазме L-аргинин избирательно улучшает эндотелиальную функцию, при среднем уровне концентрации может оказывать прямую вазодилатацию вследствие стимуляции секреции инсулина и гормона роста, высокие уровни L-аргинаина вызывают неспецифическую вазодилатацию [3, 10, 13, 14].

Ранее нами было показано, что билатеральная овариэктомия у самок крыс линии Вистар приводит к состоянию, сопровождающемуся признаками развития эндотелиальной дисфункции (ЭД), что ведет к ухудшению кровоснабжения костной ткани [7]. А как известно, снижение кровоснабжения костной ткани, приводящее к нарушению баланса активности остеобластов и остеокластов с превалированием эффектов последних, является одним из важнейших звеньев в патогенезе остеопороза (ОП) [1, 18].

Таким образом, субстрат оксида азота L-аргинин, обладающий в том числе выраженными эндотелиопротективными свойствами [16, 17, 20], может являться одним из препаратов для патогенетической эндотелий-ассоциированной коррекции остеопоротических

изменений. Это указывает на актуальность изучения остеопротективного действия L-аргинина, в чем и заключалась цель данного исследования.

Материалы и методы. Опыты проводили на 92 самках белых крыс линии Вистар массой 200-250 г. Для моделирования системного ОП крыс наркотизировали внутривенным введением раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг и проводили операцию билатеральной овариэктомии [5]. Развитие генерализованного ОП оценивали через восемь недель (на 57-й день) после проведения операции.

Уровень микроциркуляции оценивали в ткани проксимального метафиза бедренной кости. Для получения данных микроциркуляции в кости использовали оборудование компании Biopac systems: полиграф MP150 с модулем лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) LDF100C и датчиком TSD144. Регистрация результатов ЛДФ производилась программой AcqKnowledge версии 4.1, значения микроциркуляции выражались в перфузионных единицах (ПЕ).

Развитие гипоэстрогениндуцированной ЭД оценивали после измерения внутрикостного уровня микроциркуляции, для чего проводили пробы на эндотелийзависимую вазодилатацию (ЭЗВД) в ответ на болюсное внутривенное введение раствора ацетилхолина в дозе 40 мкг/кг и эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭНВД) в ответ на болюсное введение раствора нитропруссид натрия в дозе 30 мкг/кг. Для объективной оценки развития нарушения функции эндотелия при генерализованном ОП рассчитывали коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД) на основе данных ЛДФ в кости. Для этого определяли площади прямоугольных треугольников над кривыми восстановления микроциркуляции после проведения реакций ЭЗВД и ЭНВД. При этом за один из катетов треугольника принимали абсолютную величину падения уровня микроциркуляции, за другой – время восстановления и стабилизации показателя микроциркуляции. КЭД рассчитывался как отношение площади треугольника над кривой восстановления микроциркуляции в ответ на введение нитропруссид к площади треугольника над кривой восстановления микроциркуляции в ответ на введение ацетилхолина [4].

Для подтверждения развития ОП и в комплексной оценке эффективности исследуемых препаратов проводили морфологическое исследование проксимальных метафизов бедренных костей. Предметные стекла с гистологическими препаратами подвергали световой микроскопии (увеличение $\times 100$: объектив $\times 10$, окуляр $\times 10$) и фотографировали костные балки путем сопоставления объектива фотокамеры и окуляра микроскопа.

Для проведения гистоморфометрии костной ткани использовали программу ImageJ версии 1.43, предварительно откалиброванную следующим образом. Используя то же оборудование, что и для получения фотографий костных трабекул, сфотографировали «линейку» длиной 1 мм. Измерив в программе ImageJ «линейку» в пикселях, приняли расстояние в 1425 пикселей равным 1 мм. В дальнейшем программно измеряли ширину костных трабекул и выражали ее в микрометрах.

Для изучения остеопротективного действия нами была выбрана доза 200 мг/кг L-аргинина, который вводили внутривенно ежедневно однократно в сутки в течение восьми недель, что соответствует данным доступной литературы и выявляет эффективное эндотелиопротективное действие в ранее проведенных экспериментах [2, 6, 8].

Группой контроля являлась группа животных с экспериментальным ОП, не получавших фармакологической коррекции. В группу интактных крыс входили ложнопериовариотомизированные животные (ложная операция овариэктомии без удаления яичников).

Статистический анализ полученных данных осуществляли в программе Microsoft Excel. «Описательная статистика» применялась для нахождения среднего значения (M) и ошибки среднего (m). «Двухвыборочный t-тест с различными дисперсиями» использовался для сравнения показателей в различных группах животных и определения достоверности различий между ними. Статистически значимыми считали различия при значениях двустороннего $p < 0,05$.

Результаты исследования. Результаты ЛДФ позволили констатировать достоверно более низкий уровень микроциркуляции в костной ткани у крыс через восемь недель после овариэктомии ($61,5 \pm 3,7$ ПЕ; $n=42$) по сравнению с интактными животными ($100,5 \pm 4,4$ ПЕ; $n=30$). В ответ на системное введение ацетилхолина и нитропруссид наблюдали снижение микроциркуляции с последующей нормализацией показателей. Уменьшение уровня микроциркуляции при проведении пробы ЭЗВД в группе интактных животных в среднем составило $46,7 \pm 3,8\%$ от исходных показателей, в группе крыс с экспериментальным ОП – $38,9 \pm 3,8\%$. При проведении реакции ЭНВД уровень микроциркуляции в группе интактных крыс снизился в среднем на $29,0 \pm 3,5\%$ от исходного значения, в группе контрольных животных – на $27,3 \pm 5,3\%$. В группе интактных животных получили $KЭД=1,30 \pm 0,19$, в группе крыс с экспериментальным ОП КЭД был статистически значимо больше и составлял $2,38 \pm 0,23$.



Остеопоротические изменения были гистологически подтверждены у всех крыс через восемь недель после овариэктомии: наблюдалось истончение костных трабекул и расширение межтрабекулярных пространств. Кроме того, в отдельных гистологических препаратах отмечались микропереломы костных трабекул. О прижизненном возникновении микроперелома свидетельствовало прорастание волокон соединительной ткани в месте перелома трабекулы.

Объективной мерой оценки развития ОП через восемь недель после билатеральной овариэктомии стало достоверное уменьшение средней ширины костных трабекул в проксимальном метафизе бедра. Так, средняя ширина костных трабекул в данной локализации у крыс с экспериментальным ОП ($61,7 \pm 1,2$ мкм) была достоверно меньше показателя интактных животных ($97,7 \pm 1$ мкм) на 36,8%.

При анализе остеопротективной активности L-аргинина было обнаружено, что препарат эффективно предотвращает снижение уровня регионарного кровотока в костной ткани бедра, сохраняя значения микроциркуляции на уровне интактных крыс: результаты ЛДФ в группе крыс, получавших L-аргинин ($98,1 \pm 4,5$ ПЕ; $n=20$), не отличались от таковых у интактных животных ($p=0,736$), а также статистически значимо отличались от показателей в контрольной группе ($p<0,001$).

Было выявлено, что L-аргинин в дозе 200 мг/кг приводил пропорции между площадями треугольников над кривыми восстановления уровня микроциркуляции в кости в ответ на введение нитропруссиды и ацетилхолина к таковым у интактных животных. Тем самым L-аргинин статистически значимо снижал КЭД до значения $1,34 \pm 0,21$ ($p=0,012$).

При световой микроскопии срезов бедренных костей у крыс, получавших лечение L-аргинином, обнаружили сохранение структуры костной ткани и большую ширину костных трабекул, чем у крыс с ОП, не получавших лечения. Выявили, что L-аргинин препятствовал снижению средней ширины костных трабекул до уровня животных с экспериментальным ОП, однако средняя ширина трабекул ($86,6 \pm 1,4$ мкм) не достигала значения интактных крыс. L-аргинин оказывал статистически значимое влияние на среднюю ширину костных трабекул, увеличивая данный показатель в среднем на 40,4% по сравнению с крысами, страдающими ОП ($p<0,001$).

Таким образом, в результате проведенного исследования было продемонстрировано, что L-аргинин, вводимый лабораторным животным внутрижелудочно в дозе 200 мг/кг в течение восьми недель после билатеральной овариэктомии, нормализовал нарушенную функцию эндотелия сосудов, в том числе костной ткани, свидетельством чему явилось статистически значимое снижение величины коэффициента эндотелиальной дисфункции по сравнению с животными контрольной группы. L-аргинин достоверно предотвращал снижение уровня микроциркуляции в проксимальном метафизе бедра до значений, достоверно не отличающихся от таковых у интактных крыс, а также оказывал статистически значимое положительное влияние на среднюю ширину костных трабекул по сравнению с крысами, страдающими остеопорозом.

Следовательно, L-аргинин, оказывая эндотелиопротективное воздействие на эндотелий микроциркуляторного русла костной ткани, эффективно предотвращает снижение регионарного кровоснабжения в костной ткани при экспериментальном остеопорозе и обладает остеопротективным действием, заключающимся в положительном влиянии на процессы костного ремоделирования и остеорепарации.

Выводы:

1. Через восемь недель после билатеральной овариэктомии у самок крыс линии Вистар развивается нарушение функции эндотелия сосудов микроциркуляторного русла костной ткани, свидетельством чего является увеличение коэффициента эндотелиальной дисфункции, рассчитанного по результатам лазерной доплеровской флоуметрии в костной ткани, до $2,38 \pm 0,23$ по сравнению с $1,30 \pm 0,19$ у интактных животных. Значительно ухудшается регионарный кровоток в костной ткани ($61,5 \pm 3,7$ ПЕ по сравнению с $100,5 \pm 4,4$ ПЕ у интактных крыс), что приводит к развитию генерализованного остеопороза, сопровождающегося истончением костных трабекул в среднем на 36,8% и возникновением в них микропереломов.

2. L-аргинин в дозе 200 мг/кг на модели билатеральной овариэктомии имеет выраженное эндотелиопротективное действие, проявляющееся в снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции до $1,34 \pm 0,21$, предотвращает снижение уровня микроциркуляции в костной ткани бедра, удерживая его на значениях, не отличающихся от таковых у интактных крыс ($98,1 \pm 4,5$ ПЕ), а также, увеличивая ширину костных трабекул в среднем на 40,4% по сравнению с группой крыс с остеопорозом и предотвращая возникновение микропереломов, обладает остеопротективным действием.

Литература

1. Беневоленская, Л.И. Руководство по остеопорозу / Л.И. Беневоленская. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. – 524 с.



2. Исследование эндотелиопротективного эффекта L-аргинина и его комбинаций с эналаприлом и лозартаном / Т.Г. Покровская, В.И. Кочкаров, М.В. Покровский и др. // Биомедицина. – 2006. – Т. 1, № 4. – С. 107-108.
3. Марков, Х.М. Оксидантный стресс и дисфункция эндотелия / Х.М. Марков // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2005. – № 4. – С. 5-9.
4. Покровский, М.В., Покровская Т.Г., Кочкаров В.И. и др. Пат. 2301015 Российская Федерация, МПК⁷ А61В 5/02. Способ оценки эндотелиальной дисфункции / заявители и патентообладатели Покровский М.В., Покровская Т.Г., Кочкаров В.И. – № 2005113243/14; заявл. 04.05.2005; опубл. 20.06.07, Бюл. № 17. – 7 с.: ил.
5. Способы экспериментального моделирования эндотелиальной дисфункции / М.В. Корокин, М.В. Покровский, Е.Б. Артюшкова и др. // Аллергология и иммунология. – 2008. – Т. 9, № 3. – С. 327.
6. Фармакологическая коррекция метаболического пути L-аргинин/eNOS/NO / М.В. Покровский, М.В. Корокин, Т.Г. Покровская и др. // Биомедицина. – 2011. – Т. 1, № 4. – С. 115-117.
7. Эндотелий костных сосудов как мишень фармакологического воздействия при экспериментальном остеопорозе // А.В. Файтельсон, О.С. Гудырев, М.В. Покровский и др. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2009. – № 5 (110). – С. 116-121.
8. Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Е.Б. Артюшкова, Т.Г. Покровская // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – № 2. – С. 29-31.
9. A pilot study of L-arginine supplementation on functional capacity in peripheral arterial disease / R.K. Oka, A. Szuba, J.C. Giacomini, J.P. Cooke // Vasc. Med. – 2005. – Vol. 10(4). – P. 265-274.
10. Böger, R.H. The pharmacodynamics of L-arginine / R.H. Böger // J. Nutr. – 2007. – Vol. 137. – P. 1650S-1655S.
11. Chatterjee, A. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation / A. Chatterjee, J.D. Catravas // Vascul. Pharmacol. – 2008. – Vol. 49(4-6). – P. 134-140.
12. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development / N.S. Bryan, K. Bian, F. Murad // Frontiers in Bioscience. – 2009. – Vol. 14. – P. 1-18.
13. Gornik, H.L. Arginine and endothelial and vascular health / H.L. Gornik, M.A. Creager // J. Nutr. – 2004. – Vol. 134. – P. 2880S-2887S.
14. L-arginine improves endothelial function and reduces LDL oxidation in patients with stable coronary artery disease / W.H. Yin, J.W. Chen, C. Tsai et al. // Clin. Nutr. – 2005. – Vol. 24(6). – P. 988-997.
15. L-arginine-mediated vasoreactivity in patients with a risk of stroke / C. Zimmermann, M. Wimmer, R.L. Haberl // Cerebrovasc. Dis. – 2004. – Vol. 17(2-3). – P. 128-133.
16. Oral L-arginine improves endothelial dysfunction in patients with essential hypertension / J.P. Lekakis, S. Papanathanassiou, T.G. Papaioannou et al. // Int. J. Cardiol. – 2002. – Vol. 86(2-3). – P. 317-323.
17. Oral L-arginine improves endothelial function in healthy individuals older than 70 years / Bode-S.M. Böger, J. Muke, A. Surdacki et al. // Vasc. Med. – 2003. – Vol. 8(2). – P. 77-81.
18. Role of vascular factors in osteoporosis / K. Alagiakrishnan, A. Jubly, D. Hanley et al. // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. – 2003. – Vol. 58. – P. 362-366.
19. Short-term oral administration of L-arginine improves hemodynamics and exercise capacity in patients with precapillary pulmonary hypertension / N. Nagaya, M. Uematsu, H. Oya et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2001. – Vol. 163(4). – P. 887-891.
20. The impact of oral L-arginine supplementation on acute smoking-induced endothelial injury and arterial performance / G. Siasos, D. Tousoulis, C. Vlachopoulos et al. // Am. J. Hypertens. – 2009. – Vol. 22(6). – P. 586-592.
21. Visek, W.J. Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation / W.J. Visek // J. Nutr. – 1986. – Vol. 116. – P. 36-46.
22. Wu, G. 1998 Arginine metabolism: nitric oxide and beyond / G. Wu, S.M. Morris Jr. // Biochem. J. – 1998. – Vol. 336. – P. 1-17.

OSTEOPROTECTIVE ACTION OF L-ARGININE IN EXPERIMENTAL OSTEOPOROSIS

O.S. GUDYREV¹
D.S.R. RAJKUMAR²
A.V. FAITELSON²
M.V. POKROVSKIY¹
V.A. RUZHENKOV¹
O.V. FILIPPOVA¹

¹⁾ Belgorod National Research University

²⁾ Kursk State Medical University

e-mail: gudyrev@mail.ru

During an investigation it has been shown, that in eight weeks after ovariectomy at females of white Wistar rats the disturbance of an osteal tissue endothelium function and deterioration of regional blood flow in a bone develops, resulting to occurrence of a generalized osteoporosis.

L-arginine, possessing the endothelioprotective action, effectively prevented a regional microcirculation level depression in an osteal tissue, conserving it at level of intact rats. It has allowed to sustain at adequate level processes of an osteal remodeling, that has shown in retardation of an osteal trabecules thinning and prevention of microfractures occurrence in them.

Keywords: osteoporosis, microcirculation, endothelial dysfunction, L-arginine.