



УДК 616.71-007.234:615.22

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ L-НОРВАЛИНА, РОЗУВАСТАТИНА И ИХ КОМБИНАЦИИ НА УРОВЕНЬ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ В КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТЕОПОРОЗЕ И ПЕРЕЛОМАХ НА ЕГО ФОНЕ

**М.С. СОБОЛЕВ¹, О.С. ГУДЫРЕВ²
П.П. РЕМИЗОВ¹, Л.В. КОРОКИНА²
А.В. ФАЙТЕЛЬСОН¹
Г.М. ДУБРОВИН¹**

¹Курский государственный
медицинский университет

²Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет

e-mail: mixon_86@mail.ru

В эксперименте на самках белых крыс линии Вистар изучалось влияние L-норвалина, розувастатина и их комбинации на показатели кровоснабжения костной ткани на моделях экспериментального остеопороза и остеопоротических переломов. Обнаружено, что изученные препараты предотвращают снижение уровня микроциркуляции в костной ткани при остеопорозе и в ткани костной мозоли при экспериментальных остеопоротических переломах, благотворно влияя на протекание процессов репаративной регенерации костной ткани.

Ключевые слова: остеопороз, остеопоротический перелом, микроциркуляция, эндотелиальная дисфункция, L-норвалин, розувастатин, Бивалос.

Всемирная организация здравоохранения определяет остеопороз как «системное заболевание скелета, характеризующееся низкой плотностью костной ткани и нарушением ее микроархитектуры», что приводит к увеличению хрупкости костей и риску возникновения переломов. К модифицируемым факторам развития остеопоротических нарушений относят низкое содержание кальция и витамина D, сидячий образ жизни, курение, чрезмерное потребление алкоголя, длительный прием глюкокортикоидов, ревматический артрит, к немодифицируемым факторам можно отнести преклонный возраст, генетическую предрасположенность, снижение веса и менопаузу.

По данным Национального фонда остеопороза, 10 миллионов человек в США страдают остеопорозом, 80% из них – женщины. Переломы являются одной из основных причин гиподинамии у пожилых женщин, что значительно снижает качество их жизни.

Отечественные и зарубежные травматологи-ортопеды утверждают, что смертность при характерном для остеопороза осложнении – переломе шейки бедра – в течение первых 6 месяцев после перелома достигает 30%.

С каждым годом растет число проводимых оперативных вмешательств по поводу переломов костей с применением разнообразных имплантатов, включая использование эндопротезов крупных суставов. По имеющимся данным, на каждую пятую операцию первичного эндопротезирования приходится одно ревэндопротезирование, что чаще всего связано с развитием асептической нестабильности на фоне остеопоротических нарушений в костной ткани.

Весомую роль в нормальном функционировании костной ткани играет кровоснабжение. Особенностью микроциркуляторного русла кости является то, что сосудистая стенка не имеет мышечного и соединительнотканного слоев, а состоит только из эндотелиального слоя. Следовательно, именно эндотелий определяет всю гуморальную регуляцию между остеоцитами и кровью, и, по мнению многих авторов, в основе дисбаланса между процессами костной резорбции и остеогенеза лежит эндотелиальная дисфункция.

Норвалин (α -аминовалериановая кислота, пропилглицин) – нестандартная аминокислота, которая входит в состав некоторых белков, являясь в организме животных антагонистом валина и лейцина. L-норвалин является ингибитором аргиназы (фармакологический агент, механизм действия которого направлен на блокаду активности аргиназы, следовательно, увеличение концентрации L-аргинина и, как следствие, оксида азота в сыворотке крови) – фермента, катализирующего расщепление L-аргинина, субстрата для образования оксида азота – мощного медиатора функционирования сосудистого эндотелия, на орнитин и мочевины.

L-норвалин является одним из таких веществ, но его действие на микроциркуляторное русло костной ткани ранее не исследовалось. Именно этот факт явился поводом для проведения настоящего исследования.

Установлено, что статины оказывают корригирующее влияние при эндотелиальной дисфункции опосредовано – через нормализацию липидного спектра крови и путем прямого воздействия на эндотелий (вне зависимости от изменения липидного спектра крови).

Возможные механизмы улучшения эндотелиальной функции при применении статинов реализуются через увеличение образования оксида азота (NO), посредством благоприятного влияния на

экспрессию эндотелиальной NO-синтазы, снижение секреции эндотелина-1 и увеличение синтеза простаглицина, что благоприятно влияет на сдвиг баланса вазоконстрикторов/вазодилаторов в пользу вазодилатации, восстановление повышенного содержания в плазме сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и индукцию апоптоза эндотелиальных клеток.

Розувастатин – лекарственное средство из группы статинов. В доступной литературе широко представлены работы о роли статинов в коррекции эндотелиальной дисфункции, однако, данных об их действии на микроциркуляторное русло костной ткани недостаточно.

Исходя из мощного эндотелеопротективного действия ингибитора аргиназы L-норвалина и селективного и конкурентного ингибитора ГМГ-КоА-редуктазы, розувастатина, возник научный интерес об изучении их комбинированного применения, что и реализовано в данной работе.

Целью работы явилось изучение влияния L-норвалина, розувастатина и их комбинации на уровень микроциркуляции в костной ткани проксимального отдела бедренной кости крыс линии Wistar при экспериментальном остеопорозе и переломах на его фоне.

Материалы и методы. В эксперименте участвовали 240 самок крыс линии Wistar массой 200-250 г. Манипуляции с животными проводились под наркозом (внутрибрюшинное введение водного раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг).

Крысы были разделены на восемь групп, в каждой группе по 20 животных:

I – «интактные» – ложная операция билатеральной овариэктомии (лапаротомный разрез без удаления яичников, ушивание раны);

II – «контроль» – истинная операция билатеральной овариэктомии (выполнялся лапаротомный разрез с удалением яичников с последующим ушиванием раны);

III – через 8 недель после овариэктомии и развития остеопороза [7, 8] ежедневно внутрижелудочно вводился L-норвалин в дозе 10 мг/кг с девятой по двенадцатую неделю включительно;

IV – через 8 недель после овариэктомии ежедневно внутрижелудочно вводился розувастатин в дозе 0,86 мг/кг с девятой по двенадцатую неделю включительно;

V – через 8 недель после овариэктомии ежедневно внутрижелудочно вводилась комбинация L-норвалина в дозе 10 мг/кг и розувастатина в дозе 0,86 мг/кг с девятой по двенадцатую неделю включительно;

VI – через 8 недель после овариэктомии ежедневно внутрижелудочно вводился препарат сравнения Бивалос (стронция ранелат) в дозе 171 мг/кг с девятой по двенадцатую неделю включительно;

VII – ложная операция овариэктомии, через восемь недель моделирован перелом проксимального отдела бедренной кости;

VIII – билатеральная овариэктомия, через восемь недель моделировался перелом проксимального отдела бедренной кости (остеопоротические переломы);

IX – через восемь недель после овариэктомии моделировался перелом проксимального метафиза бедренной кости, далее ежедневно внутрижелудочно вводился L-норвалин в дозе 10 мг/кг с девятой по двенадцатую неделю включительно;

X – через восемь недель после овариэктомии моделировался перелом проксимального метафиза бедренной кости, далее ежедневно внутрижелудочно вводился розувастатин в дозе 0,86 мг/кг с девятой по двенадцатую неделю включительно;

XI – через восемь недель после овариэктомии моделировался перелом проксимального метафиза бедренной кости, далее ежедневно внутрижелудочно вводилась комбинация из L-норвалина в дозе 10 мг/кг и розувастатина дозе 0,86 мг/кг с девятой по двенадцатую неделю включительно;

XII – через восемь недель после овариэктомии моделировался перелом проксимального метафиза бедренной кости, далее ежедневно внутрижелудочно вводился препарат сравнения Бивалос в дозе 171 мг/кг с девятой по двенадцатую неделю включительно.

Моделирование переломов производилось закрытым методом: при помощи крампонов с надетыми на режущие поверхности силиконовыми трубками, перпендикулярно оси конечности производилось внешнее воздействие на проксимальный метафиз бедренной кости до появления характерных признаков перелома (патологической подвижности и крепитации костных отломков). Стабилизация переломов производилась с помощью спиц Киршнера диаметром 1 мм, введенных интрамедуллярно через дистальный отдел бедренной кости.

Измерение уровня микроциркуляции в костной ткани проксимального метафиза бедра проводилось через 12 недель (на 85 сутки) после начала эксперимента с помощью метода лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ), при этом использовали оборудование производства компании Biorac systems, а именно: полиграф MP150 с модулем ЛДФ LDF100C и инвазивным датчиком TSD144. Для этого в кортикальном слое бедренной кости или в костной мозоли делалось отверстие на глубину 2-3 мм, в которое устанавливался указанный датчик. Регистрацию и обработку результатов лазерной доплеровской флоуметрии при исследовании микроциркуляции осуществляли с помощью про-



граммы AcqKnowledge версии 4.1, значения микроциркуляции выражались в перфузионных единицах (ПЕ).

В I, II, III, IV, V и VI группах для подтверждения данных о формировании дисфункции эндотелия сосудов после овариэктомии и степени ее коррекции исследуемыми препаратами, проводились пробы на эндотелийзависимую (ЭЗВД) и эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭНВД) с внутривенным болюсным введением растворов ацетилхолина в дозе 40 мкг/кг и нитропруссид натрия в дозе 30 мкг/кг соответственно. После этого рассчитывали коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД) на основании данных ЛДФ. КЭД определялся 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.

Описательную статистику и статистический анализ первичных данных исследования осуществляли в программе Microsoft Excel. Для групповых значений определяли средние значения показателей (M) и ошибку среднего (m). Оценка статистической значимости различий при межгрупповых сравнениях производилась по двустороннему t-критерию Стьюдента для независимых групп. Различия считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных экспериментов обнаружили, что у «интактных» животных уровень микроциркуляции в проксимальном метафизе бедренной кости через 12 недель после начала эксперимента составил $99,91 \pm 3,41$ ПЕ, что было статистически значимо больше, чем в контрольной группе крыс с остеопорозом ($58,75 \pm 3,76$ ПЕ). Кроме того, на основании данных расчета коэффициента эндотелиальной дисфункции обнаружили достоверное повышение указанного показателя у крыс с остеопорозом (КЭД= $2,57 \pm 0,23$) по сравнению с «интактными» животными (КЭД= $1,28 \pm 0,18$), что свидетельствует о формировании у них признаков развития дисфункции эндотелия сосудов, в том числе микроциркуляторного русла костной ткани.

Таким образом, через 12 недель после проведения билатеральной овариэктомии у самок крыс развивается дисфункция эндотелия сосудов, в том числе микроциркуляторного русла костной ткани. Следствием нарушения функционирования эндотелия костных сосудов является снижение показателей регионарной микроциркуляции, приводящее к дисбалансу процессов костного ремоделирования и, следовательно, возникновению и развитию остеопоротических изменений.

Выявили, что L-норвалин, розувастатин и их комбинация улучшали показатели микроциркуляции в проксимальном метафизе бедренной кости у крыс на фоне остеопороза ($92,46 \pm 2,29$ ПЕ, $81,88 \pm 3,39$ ПЕ и $88,02 \pm 3,03$ ПЕ соответственно) в отличие от препарата сравнения Бивалос, несмотря на имеющуюся тенденцию к улучшению ($67,48 \pm 2,98$ ПЕ, $p = 0,077$). При этом L-норвалин в дозе 10 мг/кг, розувастатин в дозе 0,86 мг/кг и их комбинация обладали также эндотелиопротективной активностью, эффективно снижая показатель КЭД до значений $1,64 \pm 0,21$ (для L-норвалина), $1,72 \pm 0,18$ (для розувастатина) и $1,68 \pm 0,25$ (для комбинации), что может являться причиной улучшения регионарной микроциркуляции. У препарата Бивалос эндотелиотропных свойств не было обнаружено (КЭД= $2,44 \pm 0,19$).

На модели экспериментальных переломов проксимального метафиза бедренной кости была обнаружена схожая картина. Так, процессы репаративной регенерации у крыс с остеопорозом протекали на фоне статистически значимого снижения уровня микроциркуляции в костной мозоли ($66,59 \pm 3,61$ ПЕ) по сравнению с животными с переломами бедра без остеопороза ($89,30 \pm 4,75$ ПЕ). При этом консолидация переломов у животных без остеопороза наступала в 75% случаев, у крыс с остеопоротическими переломами бедренной кости – в 55% случаев.

L-норвалин в дозе 10 мг/кг эффективно повышал показатели микроциркуляции в костной мозоли проксимального метафиза бедра до $107,14 \pm 3,37$ ПЕ, что формировало благоприятные условия для консолидации переломов на фоне остеопороза.

Розувастатин в дозе 0,86 мг/кг повышал значения микроциркуляции до $94,34 \pm 2,54$ ПЕ, а его комбинация с L-норвалином – до $104,1 \pm 3,90$ ПЕ.

У препарата сравнения Бивалос отмечалась тенденция к увеличению показателей микроциркуляции в костной мозоли перелома проксимального метафиза бедра у крыс на фоне остеопороза, не переходящая порога статистической значимости ($70,39 \pm 2,39$ ПЕ, $p = 0,386$). При этом стоит отметить, что консолидация экспериментальных остеопоротических переломов под воздействием L-норвалина, комбинации с розувастатином, так и Бивалоса, наступала в 100% случаев.

Основываясь на полученных данных можно сделать следующие **выводы**:

1. Через 12 недель после билатеральной овариэктомии у самок крыс наблюдаются признаки развития дисфункции эндотелия сосудов, в том числе микроциркуляторного русла костной ткани, с последующим снижением показателей регионарной микроциркуляции, что может негативно сказываться на «качестве» кости, приводя к развитию остеопороза.

2. L-норвалин в дозе 10 мг/кг, розувастатин в дозе 0,86 мг/кг, а также комбинация L-норвалина и розувастатина в указанных дозах через 12 недель после билатеральной овариэктомии, в отличие от препарата сравнения Бивалос, обладают эндотелиопротективным действием, проявляю-



щимся в снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции, а также достоверно повышают уровень микроциркуляции в костной ткани проксимального метафиза бедра, создавая благоприятную почву для протекания процессов костного ремоделирования.

3. Сращение остеопоротических переломов бедренной кости у крыс через 12 недель после овариэктомии сопровождается снижением показателей микроциркуляции в костной мозоли и, как следствие, ухудшением показателей их консолидации.

4. L-норвалин в дозе 10 мг/кг, розувастатин в дозе 0,86 мг/кг и комбинация указанных препаратов улучшали показатели микроциркуляции в костной мозоли переломов проксимального метафиза бедра у крыс, а также создавали благоприятные условия для протекания процессов репаративной регенерации, что приводило к увеличению показателей эффективности сращения экспериментальных остеопоротических переломов. Бивалос также оказывал положительное влияние на качество сращения переломов бедренных костей у крыс на фоне остеопороза.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-3136.2014.4.

Литература

1. Аврунин, А.С. Формирование остеопоротических сдвигов в структуре костной ткани (Костные органы, структура костной ткани и её ремоделирование, концепция патогенеза остеопороза, его диагностика и лечение) / А.С. Аврунин, Н.В. Корнилов, А.В. Суханов – СПб., 1998. – 68 с.
2. Брошусь, В.В. Оксид азота как регулятор защитных и гомеостатических реакций организма / В.В. Брошусь // Укр. ревматол. журн. – 2003. – № 4. – С. 3-11.
3. Грибкова, И.В. NO активирует Ca²⁺-активируемый K⁺ ток гладкомышечных клеток хвостовой артерии крысы через GMP-зависимый механизм / И.В. Грибкова, Р. Шуберт, В.П. Серебряков // Кардиология. – 2002. – № 8. – С. 34-39.
4. Дисфункция эндотелия у больных гипертонической болезнью / Мартынов, Н.Г. Аветян, Е.В. Акатова и др. // Кардиология. – 2005. – Т. 45, № 10. – С. 101-104. Руководство по остеопорозу / под ред. Л.И. Беневоленской. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. – 524 с.
5. Марков Х.М. Оксидантный стресс и дисфункция эндотелия. Патол. физиология и эксперим. терапия. 2005. № 4. С. 5-9.
6. Небиеридзе, Д.В. Микроциркуляторные расстройства при артериальной гипертонии и перспективы их коррекции / Д.В. Небиеридзе, Е.В. Шилова, С.Н. Толпыгина // Кардиоваскуляр. терапия и профилактика. – 2004. – № 4. – С. 28-32.
7. Протективное действие эналаприла и лозартана при экспериментальном остеопорозе / О.С. Гудырев, А.В. Файтельсон, М.В. Покровский и др. // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2011. – № 2. – С. 9-14.
8. Сравнительная оценка фармакологической коррекции эндотелий-ассоциированной коррекции экспериментального остеопороза резвератролом и этоксиололом / А.В. Файтельсон, Г.М. Дубровин, О.С. Гудырев и др. // Журнал «Вестник травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова». – 2012. – № 1. – С. 8-11.
9. Laufs U., La Fata V., Plutzky J., Liao J.K. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998; 97:1129-1135.
10. Napoli, C. Nitric oxide and atherosclerosis / C. Napoli, L.J. Ignarro // *Nitric Oxide*. – 2001. – Vol. 5. – P. 88-97.
11. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals / Kureishi Y., Luo Z., Shiojima I. et al. // *Nat. Med.* – 2000. – V. 6. – P. 1004-1100.

STUDY OF THE INFLUENCE OF L-NORVALINE, ROSUVASTATIN AND THEIR COMBINATION ON THE LEVEL OF MICROCIRCULATION IN BONE TISSUE IN EXPERIMENTAL OSTEOPOROSIS AND FRACTURES ON HIS BACKGROUND

M.S. SOBOLEV¹, O.S. GUDYREV²
P.P. REMIZOV¹, I.V. KOROKINA²
A.V. FAITELSON¹
G.M. DUBROVIN¹

¹*Kursk State Medical University*

²*Belgorod National Research University*

e-mail: pavel_remizov@mail.ru

In the experiment on female white Wistar rats investigated the effects of L-norvaline, rosuvastatin and their combination on parameters of blood supply to the bone on models of experimental osteoporosis and osteoporotic fractures. It was found that the studied drugs prevent reduction of microcirculation in bone in osteoporosis and in callus tissue in experimental osteoporotic fractures, positively influencing on the course of reparative regeneration of bone tissue.

Keywords: osteoporosis, osteoporotic fracture, microcirculation, endothelial dysfunction, L-norvaline, rosuvastatin, Bivalos.