

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 616.71-007.234:615.22

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТЕОПРОТЕКТИВНЫХ ЭФФЕКТОВ ТЕТРАГИДРОБИОПТЕРИНА И КЛОПИДОГРЕЛА НА МОДЕЛИ ГИПОЭСТРОГЕННОГО ОСТЕОПОРОЗА

**А.В. ФАЙТЕЛЬСОН¹, О.С. ГУДЫРЕВ²
Л.В. КОРОКИНА², Г.М. ДУБРОВИН¹
А.В. ИВАНОВ¹, Д.С.Р. РАДЖКУМАР¹**

*¹Курский государственный
медицинский университет*

*²Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

e-mail: vladimirfaielson@gmail.com

В эксперименте на самках белых крыс линии Вистар изучалось остеопротективное действие тетрагидробиоптерина и клопидогрела на модели экспериментального остеопороза. Было выявлено, что после овариэктомии у крыс развивается эндотелиальная дисфункция сосудов микроциркуляторного русла костной ткани, приводящая к возникновению остеопороза. Тетрагидробиоптерин и клопидогрел препятствуют снижению уровня микроциркуляции в костной ткани, тем самым предотвращают истончение костных трабекул.

Ключевые слова: остеопороз, микроциркуляция, эндотелиальная дисфункция, клопидогрел, тетрагидробиоптерин.

Одной из причин нарушения кровоснабжения костной ткани может быть дисфункция эндотелия, которая посредством ухудшения микроциркуляции может приводить к нарушению остеогенеза и остеорепарации, вызывая тем самым ряд остеологических заболеваний, в том числе и остеопороз [1].

В настоящее время ряд экспериментальных исследований выявил положительные остеопротективные эффекты у некоторых эндотелиотропных препаратов [1, 8]. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения веществ с выраженными эндотелиопротективными свойствами в свете целенаправленного фармакологического воздействия на дефицит оксида азота при остеопоротических изменениях. Все это указывает на актуальность исследования остеопротективных свойств препаратов с доказанными положительными эндотелиотропными эффектами.

Цель исследования – изучение и анализ остеопротективных свойств тетрагидробиоптерина и клопидогрела при экспериментальном остеопорозе.

Материалы и методы. В эксперименте использовали самок крыс Wistar массой 200–300 г (n=122). Все исследования проводили под наркозом (внутрибрюшинное введение раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг). Остеопороз моделировали путем двусторонней овариэктомии [12]. Животные были разделены на 4 группы: 1 – контрольная (n=42); 2 – после овариэктомии (n=30); 3 – после овариэктомии крысам ежедневно однократно в сутки внутривентрикулярно вводили клопидогрел в дозе 3,3 мг/кг в течение 8 недель (n=25); 4 – после овариэктомии животным тем же способом внутрибрюшинно вводили тетрагидробиоптерин в дозе 10 мг/кг (n=25).

Через 8 недель измеряли уровень микроциркуляции в костной ткани проксимального метафиза бедра. После определения внутрикостного уровня микроциркуляции проводили пробы на эндотелийзависимую вазодилатацию в ответ на однократное внутривенное введение раствора ацетилхолина в дозе 40 мкг/кг и эндотелийнезависимую вазодилатацию в ответ на однократное внутривенное введение раствора нитропрусида натрия в дозе 30 мкг/кг [1, 3].

Параметры микроциркуляции регистрировали при помощи лазерного доплеровского флоуметра Biopac systems MP-100 и датчика TSD-144. Запись и обработку данных осуществляли



с помощью программы AcqKnowledge 3.8. Значения микроциркуляции выражались в перфузионных единицах (ПЕ).

Для количественного определения дисфункции эндотелия был применен модифицированный метод определения стабильных метаболитов оксида азота. Данная методика позволяет после депротеинизации сыворотки крови проводить одноэтапное количественное определение суммарных нитратов и нитритов. В основе метода лежит реакция одновременного восстановления нитратов в нитриты в присутствии хлористого ванадия и реакции диазотирования с последующим развитием окраски, интенсивность которой определяется спектрофотометрически при длине волны 540 нм [5].

Развитие остеопороза и действие препаратов оценивали гистоморфометрически через 8 недель после овариэктомии по средней ширине трабекул в костной ткани проксимального отдела бедра [1, 8].

Статистический анализ полученных данных осуществляли по программе Microsoft Excel при помощи средств пакета анализа. «Описательную статистику» применяли для нахождения среднего значения показателей и ошибки среднего. Двухвыборочный тест с различными дисперсиями использовали для сравнения соответствующих показателей в различных группах животных и определения достоверности различий между ними. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ [6].

Результаты и их обсуждение. При выполнении лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) было обнаружено, что у крыс после овариэктомии, получавших терапию тетрагидробиооптерином и клопидогрелем, данные препараты статистически значимо предупреждали снижение уровня микроциркуляции в костной ткани верхнего отдела бедра ($87,6 \pm 3,8$ ПЕ и $89,2 \pm 4,5$ ПЕ, соответственно) до показателей у крыс с остеопорозом без лечения (рис. 1).

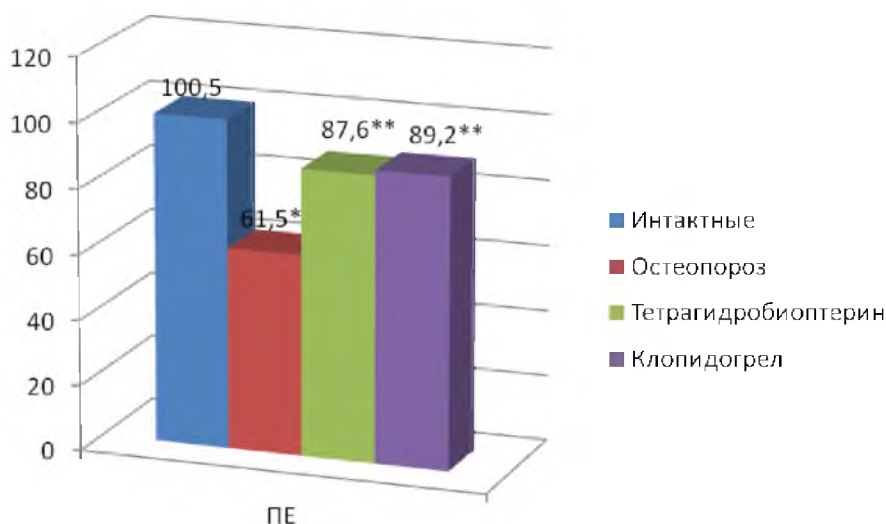


Рис. 1. Влияние клопидогрела и тетрагидробиооптерина на показатели микроциркуляции в проксимальном метафизе бедренной кости у крыс

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой интактных животных;

** – $p < 0,05$ по сравнению с группой крыс с экспериментальным остеопорозом.

После определения показателей микроциркуляции выполнялись функциональные сосудистые пробы на эндотелийзависимое и эндотелийнезависимое расслабление сосудов у животных с остеопорозом на фоне лечения клопидогрелем и тетрагидробиооптерином в течение восьми недель. Производился расчет коэффициента эндотелиальной дисфункции (КЭД) по данным ЛДФ. Выявлено, что тетрагидробиооптерин и клопидогрел оказывали позитивное влияние и на величину коэффициента эндотелиальной дисфункции, который составил в первом случае $1,6 \pm 0,2$, во втором – $1,5 \pm 0,2$. Значения КЭД у интактных крыс составили $1,3 \pm 0,2$, у животных с остеопорозом без лечения – $2,4 \pm 0,2$.

Концентрация стабильных метаболитов оксида азота (NOx) в крови экспериментальных животных, которым поводилось лечение тетрагидробиооптерином и клопидогрелем составила $80,5 \pm 3,3$ мкМоль/л и $77,2 \pm 4,1$ мкМоль/л соответственно. Полученные значения были выше, чем показатели у крыс с остеопорозом без лечения ($68,9 \pm 3,2$ мкМоль). Уровень NOx у животных контрольной группы был равен $100,5 \pm 4,4$ мкМоль/л.

При микроскопии срезов проксимального отдела бедренных костей крыс, получавших лечение тетрагидробиооптерином и клопидогрелем, обнаружили отсутствие микропереломов трабекул и сохранение структуры костной ткани в проксимальном метафизе бедра (рис. 2).

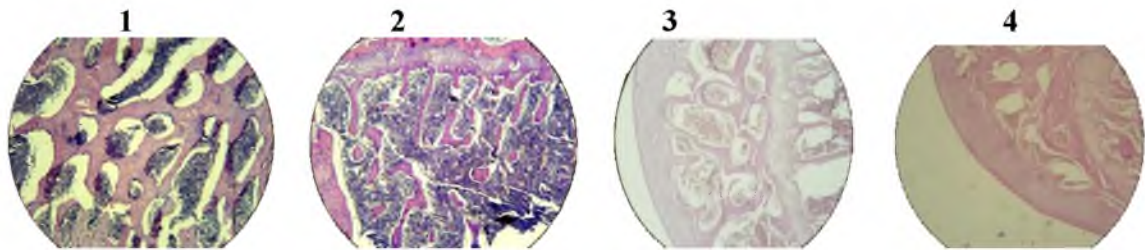


Рис. 2. Морфологическая картина срезов проксимального метафиза бедренной кости (окр. гематоксилин-эозином, ув. 100)

Примечание. 1 – у крысы с остеопорозом; 2 – у крысы после овариэктомии (моделированный остеопороз), 3 – у крысы после овариэктомии, получавшей лечение тетрагидробиоптерином; 4 – у крысы после овариэктомии, получавшей лечение клопидогрелем.

Также было установлено, что тетрагидробиоптерин и клопидогрел препятствовали снижению показателей средней ширины костных трабекул до уровня животных с экспериментальным остеопорозом в исследуемой локализации. Однако данные параметры стремились к значениям интактных крыс и составили в группе клопидогрела $71,7 \pm 1,1$ мкм, в группе тетрагидробиоптерина – $80,6 \pm 0,8$ мкм (рис. 3).

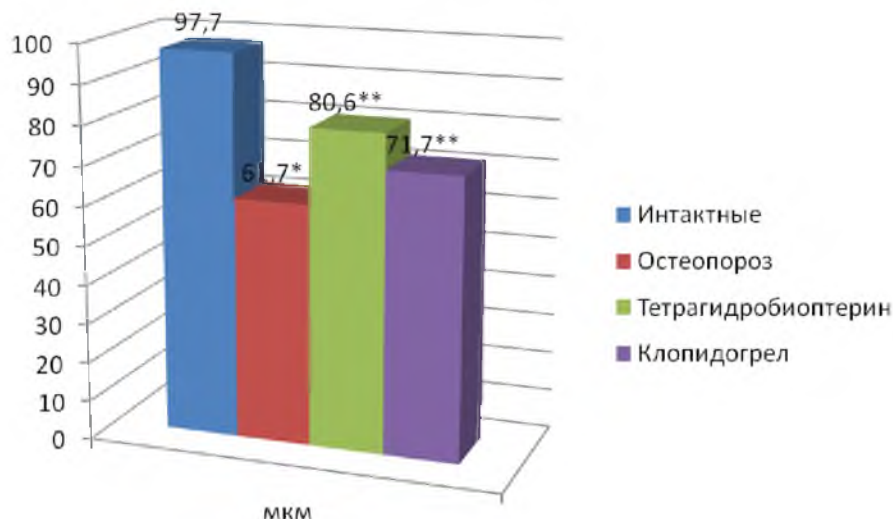


Рис. 3. Влияние клопидогрела, тетрагидробиоптерина на значения средней ширины костных трабекул через восемь недель после овариэктомии в проксимальном метафизе бедренной кости

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой интактных животных;

** – $p < 0,05$ по сравнению с группой крыс с экспериментальным остеопорозом.

Таким образом, тетрагидробиоптерин и клопидогрел в ранее указанных дозировках, через восемь недель после билатеральной овариэктомии, обладая эндотелиопротективным действием, позитивно влияют на кровоснабжение костной ткани. Тем самым, данные препараты положительно воздействуют на процессы регенерации костной ткани при моделированном остеопорозе, свидетельством чего явилось замедление истончения костных трабекул, сохранение микроархитектоники в губчатой части проксимального метафиза бедренной кости у экспериментальных животных.

Основной причиной ухудшения регионарного кровоснабжения костной ткани является нарушение функции сосудистого эндотелия, которое оказывает негативное воздействие на микроциркуляцию в костной ткани [4], тем самым вызывая дисбаланс в процессах ремоделирования и репаративной регенерации костной ткани. Это обстоятельство подтверждается рядом исследований, например, что VEGF – фактор роста эндотелия сосудов, ведущий к формированию и развитию сосудистой системы, играет значительную роль в процессах ремоделирования [12, 16] и репарации поврежденных костной ткани [10, 17]. Ингибирование же VEGF приводит к снижению интенсивности ангиогенеза и к потере кровеносных сосудов в метафизарных отделах, т.е. к уменьшению образования трабекулярной структуры кости и интенсификации резорбции губчатой костной ткани в ростковых зонах [18]. Уменьшение действия VEGF ведет к снижению прорастания кровеносных сосудов, следствием чего является ухудшение минерализации костной мозоли и нарушение перестройки трабекулярной сети в костной ткани [16].



Таким образом, из всего вышесказанного можно сделать заключение, что эндотелий сосудов костной ткани, являясь неотъемлемой частью кости, играет центральную регуляторную роль, обеспечивая связь с остальными слоями стенки сосуда и, адекватно реагируя на их потребности выделением медиаторов [7, 15], во многом определяет состояние регионарной микроциркуляции, тем самым несет ответственность за поддержание гомеостаза в костной ткани.

Изучение лекарственных веществ, обладающих эндотелиопротективными свойствами, является актуальным в настоящее время. Существующие препараты, воздействующие на дисфункцию эндотелия, имеют различные механизмы влияния. Это положение объясняет внимание исследователей к разным лекарственным средствам для коррекции данной патологии.

К лекарственным веществам, воздействующим на эндотелий сосудов, можно отнести антиагрегант (представитель группы тиенопиридинов) клопидогрел и кофактор птерина тетрагидробиоптерин.

Тетрагидробиоптерин (ВН₄) необходим для активации эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS), которая, в свою очередь, вырабатывает из L-аргинина оксид азота. При недостаточности тетрагидробиоптерина начинается излишнее продуцирование O₂⁻ и H₂O₂, что приводит к увеличению количества дигидробиоптерина [11]. Данная форма инактивирует eNOS, что ведет к развитию оксидантного стресса и эндотелиальной дисфункции [14]. В ряде экспериментальных работ доказано, что введение тетрагидробиоптерина в дозе 10 мг/кг предотвращает развитие гипоестроген-индуцированной NO-дефицитной эндотелиальной дисфункции [2]. Этот фармакологический агент, влияя на эндотелий сосудов микроциркуляторного русла, опосредованно улучшает трофику тканей, в частности костной.

Антиагреганты группы тиенопиридинов, в частности клопидогрел, ингибируя эффекты аденозиндифосфата (АДФ), выделившегося из плотных гранул тромбоцитов, препятствуют дальнейшему освобождению содержимого этих гранул, а также предупреждают агрегацию, вызываемую другими агонистами, такими как, фактор, активирующий тромбоциты, коллаген, низкие концентрации тромбина [13]. Тем самым, этот препарат позитивно влияет на функцию эндотелия сосудов, улучшая кровоснабжение в тканях, что положительно сказывается на процессы регенерации костной ткани.

Выводы:

1. Тетрагидробиоптерин в дозе 10 мг/кг, хотя и незначительно, повышает концентрацию стабильных метаболитов оксида азота, но обладает эндотелиопротективными свойствами, что благоприятно сказывается на показателе средней ширины трабекул в костной ткани проксимального метафиза бедренной кости, то есть обладает остеопротективным действием;

2. Клопидогрел в дозе 3,3 мг/кг, обладая эндотелиопротективным эффектом, предотвращает ухудшение регионарной микроциркуляции и истончение костных трабекул в костной ткани при остеопорозе, то есть обладает остеопротективной активностью.

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

Литература

1. Гудырев, О.С. Остеопротективное действие эналаприла и лозартана при экспериментальном остеопорозе и переломах на его фоне : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.25 / О.С. Гудырев ; Курск. гос. мед. ун-т. – Курск, 2009. – 22 с.
2. Корокин, М.В. Путь фармакологической коррекции патогенетических нарушений метаболизма оксида азота при моделировании эндотелиальной дисфункции : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.25 / М.В. Корокин ; 1-й Моск. гос. мед. ун-т. – М., 2012. – 48 с.
3. Кочкаров, В.И. Резвератрол и его комбинации с основными антигипертензивными препаратами в фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 14.00.25 / В.И. Кочкаров ; Курск. гос. мед. ун-т. – Курск, 2009. – 46 с.
4. Марков, Х.М. Оксидантный стресс и дисфункция эндотелия / Х.М. Марков // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2005. – № 4. – С. 72-77.
5. Метельская, В.А. Возможности лабораторной оценки NO-продуцирующей функции эндотелия / В.А. Метельская / Клинич. и лаб. диагностика. – 2004. - №9. – С. 86.
6. Плавинский, С.Л. О людях и цифрах. Обучение статистике: чему, кого и как учить? / С.Л. Плавинский // Междунар. журн. мед. практики. – 2006. – Вып. 2. – С. 9-16.
7. Покровская, Т.Г. Роль фармакологической коррекции метаболического пути L-аргинина/NO при моделировании дефицита оксида азота / Т.Г. Покровская // Кубан. науч. мед. вестн. – 2008. – № 4. – С. 122-125.
8. Файтельсон, А.В. Сравнительная оценка остеопротективного действия резвератрола и комбинации резвератрола с эналаприлом при лечении экспериментального остеопороза / А.В. Файтельсон, Н.Ю. Коклина, О.С. Гудырев, [и др.] // Журнал «Экспериментальная и клиническая фармакология». – М.: Издательство «Фолиум». – 2012. – том 75, № 5, С 35-38.



9. Childs, S.G. Osteonecrosis: death of bone cells / S.G. Childs // *Orthop. Nurs.* – 2005. – Vol. 24. – P. 295-301.
10. Effect of vascular endothelial growth factor in fracture healing / T.W. Chu, Z.G. Wang, P.F. Zhu [et al.] // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* – 2002. – Vol. 16. – P. 75-78.
11. Free radical production by dysfunctional eNOS / M.C. Verhaar, P.E. Westerweel, A.J. van Zanneveld, T.J. Rabelink // *Heart.* – 2004. – Vol. 90. – P. 494-495.
12. Impact of antihypertensive therapy on postmenopausal osteoporosis: effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor moexipril, 17beta-estradiol and their combination on the ovariectomy-induced cancellous bone loss in young rats / M. Stimpel, W.S. Jee, Y. Ma [et al.] // *J. Hypertens.* – 1995. – Vol. 13. – P. 1852-1856.
13. Onset and extent of platelet inhibition by clopidogrel loading in patients undergoing elective coronary stenting: the plavix reduction of new thrombus occurrence (PRONTO) trial / P.A. Gurbel, C.C. Cummings, C.R. Bell, [et al.] // *Am Heart J.* – 2003. – Vol. 145. – P. 239-247.
14. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension / U. Landmesser, S. Dikalov, S.R. Price, [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2003. Vol. 111. – P. 1201-1209.
15. Rossant, J. Signaling pathways in vascular development / J. Rossant, L. Howard // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* – 2002. – Vol. 18. – P. 541-573.
16. Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis / E. Zelzer, W. McLean, Y.S. Ng [et al.] // *Development.* – 2002. – Vol. 129. – P. 1893-1904.
17. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover / J. Street, M. Bao, L. deGuzman [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2002. – Vol. 99. – P. 9656-9661.
18. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation / H.P. Gerber, T.H. Vu, A.M. Ryan [et al.] // *Nat. Med.* – 1999. – Vol. 5. – P. 623-628.

INVESTIGATION OF OSTEOPROTECTIVE EFFECTS OF TETRAHYDROBIOPTERIN AND CLOPIDOGREL IN HYPOESTROGEN MODEL OF OSTEOPOROSIS

A.V. FAITELSON¹
O.S. GUDYREV²
L.V. KOROKINA²
G.M. DUBROVIN¹
A.V. IVANOV¹
D.S.R. RAJKUMAR¹

¹*Kursk State Medical University*

²*Belgorod National Research University*

e-mail: vladimirfaitelson@gmail.com

In experiment on white Wistar female rats an osteoprotective action of tetrahydrobiopterin and clopidogrel was investigated in experimental osteoporosis. It was revealed, that in rats after ovariectomy the endothelial dysfunction of microcirculation vessels of osteal tissue develops, resulting in occurrence of an osteoporosis. Tetrahydrobiopterin and clopidogrel prevented a microcirculation level depression in an osteal tissue that has shown in retardation of an osteal trabecules thinning.

Key words: osteoporosis, microcirculation, endothelial dysfunction, tetrahydrobiopterin, clopidogrel.