

УДК 616.71-007.234:615.22

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ L-АРГИНИНА И ЕГО КОМБИНАЦИЙ С ЭНАЛАПРИЛОМ И ЛОЗАРТАНОМ НА МОДЕЛИРОВАНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Д.С.Р. РАДЖКУМАР¹**О.С. ГУДЫРЕВ²****А.В. ФАЙТЕЛЬСОН¹****М.В. ПОКРОВСКИЙ²****Л.В. КОРОКИНА²**¹*Курский государственный
медицинский университет*²*Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет**e-mail: vladimirfaitelson@gmail.com*

В эксперименте на самках белых крыс линии Вистар изучалось остеопротективное действие L-аргинина и его комбинаций с эналаприлом и лозартаном на модели экспериментального остеопороза. L-аргинин и его комбинации с эналаприлом и лозартаном предотвращают снижение уровня микроциркуляции в костной ткани, что приводит к замедлению истончения костных трабекул и предупреждению возникновения в них микропереломов.

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

Известно, что пусковым механизмом манифестации остеопороза является дисбаланс между двумя основными процессами костного ремоделирования: костной резорбцией и костеобразованием [1]. Существенным звеном в патогенезе развития остеопороза, особенно иммобилизационного, является нарушение кровоснабжения кости, приводящее к торможению активности и уменьшению количества остеобластов, а также к усиленной деятельности остеокластов [10, 14]. В последнее время в научной литературе появляется все больше эпидемиологических, экспериментальных и клинических данных, свидетельствующих о взаимосвязи сосудистой патологии и остеопороза [2, 6].

Микрососуды костной ткани представлены монослоем эндотелиоцитов и не имеют мышечно- и соединительнотканного слоев, следовательно, именно эндотелий опосредует гуморальную регуляцию обмена между остеоцитами и кровью [14, 16]. Одной из причин нарушения кровоснабжения костной ткани может быть дисфункция эндотелия сосудов, которая посредством ухудшения микроциркуляции может приводить к нарушению остеогенеза, вызывая тем самым остеопороз.

Современные фармакологические исследования показали положительное остеопротективное действие препаратов, корригирующих дисфункцию эндотелия. К ним, в первую очередь, относятся ингибитор ангиотензинпревращающего фермента эналаприл, блокатор ангиотензиновых рецепторов лозартан и фитоалексин резвератрол [3, 7, 8].

Это указывает на актуальность дальнейшего поиска фармакологических агентов для воздействия на процессы костного ремоделирования, а также обосновывает избранное нами направление исследования.

Цель исследования – сравнительное изучение остеопротективного действия L-аргинина и его комбинаций с эналаприлом и лозартаном для фармакологической коррекции экспериментального остеопороза.

Материалы и методы. Опыты производились на 120 белых крысах-самках Вистар с массой тела 200-300 г. Все манипуляции в эксперименте выполнялись под наркозом – внутривенным введением водного раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. Для моделирования остеопороза у крыс проводили операцию – билатеральную овариэктомию. Через восемь недель у животных развивается остеопороз [3]. Исследуемые препараты и их комбинации вводили с девятой по двенадцатую неделю эксперимента включительно. В качестве групп сравнения использовали «контрольных» животных, которым была проведена ложная операция овариэктомии, а также животных с остеопорозом. Степень выраженности остеопороза оценивали гистоморфометрически через двенадцать недель после начала эксперимента.

Животные были распределены на 6 групп (по 20 крыс в каждой): 1 – контрольная (ложная овариэктомия); 2 – через 8 недель после овариэктомии (модель остеопороза); 3 – через 8 недель после овариэктомии крысам вводился L-аргинин в дозе 200 мг/кг в течение 4 недель; 4 – через 8 недель после овариэктомии вводили комбинацию препаратов, состоящую из L-аргинина в дозе 200 мг/кг и эналаприла в дозе 0,5 мг/кг, в течение 4 недель; 5 – через 8 недель после овариэктомии животные в течение 4 недель получали комбинацию препаратов, состоящую из L-аргинина в дозе 200 мг/кг и лозартана в дозе 6 мг/кг; 6 – через 8 недель после овариэктомии в качестве препарата срав-



нения использовали Кальций-Д3 Никомед в дозе 85,7 мг/кг в течение 4 недель. Исследуемые вещества вводили ежедневно однократно в сутки внутривенно в виде суспензии в 1% крахмальной слизи.

Через 12 недель (на 85 сутки) проводилось измерение уровня микроциркуляции в костной ткани проксимального метафиза бедренной кости. Для этого производили хирургический доступ к проксимальному метафизу бедра крысы. После формирования отверстия в кортикальном слое кости глубиной до 2 мм, вводили в него датчик для исследования состояния регионарной микроциркуляции. Микроциркуляцию исследовали с помощью оборудования производства компании Biopac systems, США: полиграфа MP100 с модулем лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) LDF100C и датчиком TSD144. После измерения уровня микроциркуляции в кости, не изменяя положения датчика, проводили пробы эндотелийзависимой вазодилатации (ЭЗВД) в ответ на болюсное внутривенное введение раствора ацетилхолина в дозе 40 мкг/кг и эндотелийнезависимой вазодилатации (ЭНВД) в ответ на болюсное внутривенное введение раствора нитропруссид натрия в дозе 30 мкг/кг [3]. Для оценки развития нарушения функции эндотелия сосудов при остеопорозе рассчитывали коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД) на основании результатов измерения микроциркуляции в костной ткани при проведении функциональных сосудистых тестов. Для этого рассчитывали площади прямоугольных треугольников, сформированных кривыми восстановления уровня микроциркуляции при проведении тестов ЭЗВД и ЭНВД. За меньший из катетов такого треугольника принималась абсолютная величина максимального падения уровня микроциркуляции, за больший – время до нормализации и стабилизации уровня микроциркуляции. КЭД рассчитывали как отношение площади треугольника, формирующегося в ответ на введение нитропруссид к площади треугольника, формирующегося в ответ на введение ацетилхолина [3]. Регистрацию и обработку результатов лазерной доплеровской флоуметрии осуществляли с помощью программы AcqKnowledge версий 3.8.1-4.2.0, значения микроциркуляции выражались в перфузионных единицах (ПЕ).

Для изучения изменений, происходящих в процессе развития экспериментального остеопороза и при его коррекции исследуемыми препаратами и комбинациями препаратов, проводили гистологическое исследование проксимальных метафизов бедренных костей крыс. Предметные стекла с гистологическими препаратами подвергали световой микроскопии при помощи микроскопа Leica CME (увеличение $\times 100$: объектив $\times 10$, окуляр $\times 10$) и фотографированию цифровым фотоаппаратом. Для морфометрического изучения микроархитектоники костной ткани использовали откалиброванную программу ImageJ версий 1.39-1.43. В качестве количественной меры оценки развития остеопороза и эффективности его коррекции использовали ширину костных трабекул проксимального метафиза бедренной кости.

Статистический анализ первичных данных осуществляли в программе Microsoft Excel. Для групповых значений определяли средние значения (M) показателей 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 $p < 0,05$. Для оценки статистической значимости различий между долями использовали двусторонний вариант точного критерия Фишера [4].

Результаты и их обсуждение. Результаты лазерной доплеровской флоуметрии в костной ткани проксимального метафиза бедра позволили установить статистически значимо более низкий уровень микроциркуляции в костной ткани у крыс с экспериментальным остеопорозом ($58,75 \pm 3,76$ ПЕ) по сравнению с контрольными животными ($99,91 \pm 3,41$ ПЕ). В группе контрольных животных получили $KЭД = 1,28 \pm 0,18$, в группе крыс с экспериментальным остеопорозом $KЭД = 2,57 \pm 0,23$.

Остеопоротические изменения в бедренных костях были подтверждены у всех крыс через двенадцать недель после овариэктомии. В ходе исследования в гистологических препаратах крыс с экспериментальным остеопорозом были обнаружены травматические микроповреждения в виде переломов отдельных костных трабекул (рис. 1). О том, что микропереломы трабекул возникали не по причине повреждения во время забора биоматериала или изготовления микропрепаратов, а прижизненно, можно судить по прорастанию волокон соединительной ткани в месте микроперелома.

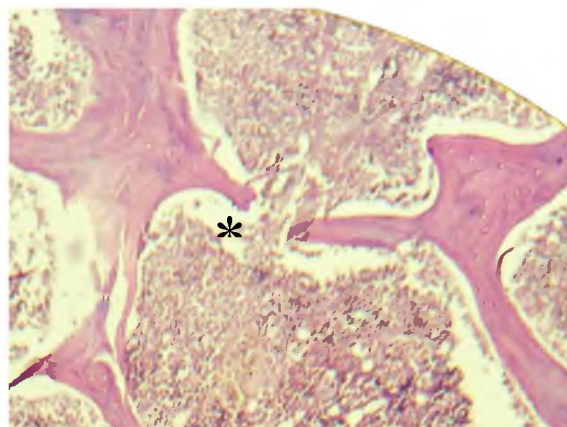


Рис. 1. Гистологическая картина микроархитектоники проксимального метафиза бедренной кости у крысы с экспериментальным остеопорозом.

Примечание: * – микроперелом костной трабекулы (окр. гематоксилин-эозином, ув. 800)

Объективной мерой оценки развития экспериментального остеопороза через двенадцать недель после билатеральной овариэктомии стало статистически значимое уменьшение средней ширины костных трабекул в проксимальном метафизе бедренной кости, которая у крыс с остеопорозом была меньше показателя контрольных животных на 43,4% (рис. 2).

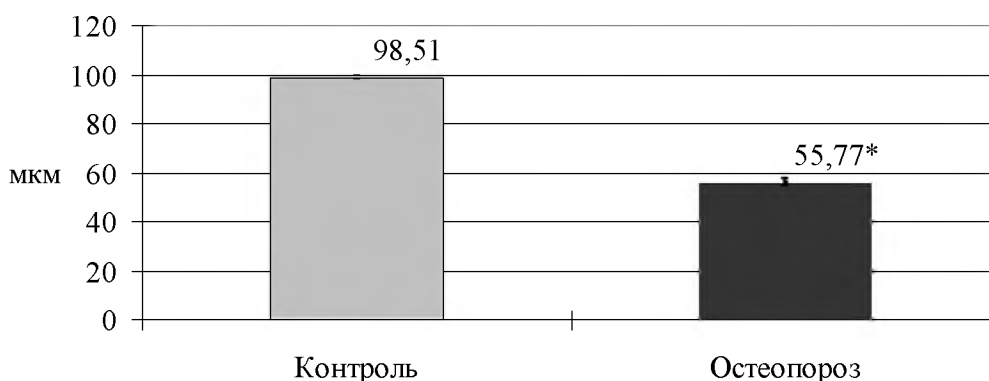


Рис. 2. Показатели средней ширины костных трабекул в проксимальном метафизе бедренной кости у крыс без остеопороза и животных с остеопорозом.

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

Таким образом, через двенадцать недель после проведения билатеральной овариэктомии у белых крыс-самок Вистар развивается системная дисфункция эндотелия сосудов, частным проявлением которой является нарушение функционирования эндотелиоцитов сосудов микроциркуляторного русла костной ткани. Следствием нарушения функционирования эндотелия костных сосудов является снижение показателей регионарной микроциркуляции в костной ткани, приводящее к дисбалансу процессов костного ремоделирования и, следовательно, возникновению и развитию остеопоротических изменений, сопровождающихся истончением костных трабекул и возникновением в них микропереломов. Это позволило нам прийти к заключению о том, что нарушение функции эндотелия сосудов микроциркуляторного русла костной ткани играет значительную роль в патогенезе остеопороза.

При выполнении лазерной доплеровской флоуметрии было обнаружено, что у крыс после овариэктомии, которым проводилась терапия L-аргинином и комбинациями L-аргинина с эналаприлом и лозартаном, происходит предупреждение снижения уровня микроциркуляции в проксимальном метафизе бедра у крыс через двенадцать недель после овариэктомии (рис. 3). Причем уровни микроциркуляции у животных, получавших комбинацию L-аргинина с эналаприлом, превышали показатели животных с остеопорозом, а также крыс, получавших Кальций-Д3 Никомед, однако не отличались от результатов в группе с монотерапией L-аргинином ($p = 0,557$). Результаты ЛДФ в группе



крыс, получавших L-аргинин и лозартан, превышали значения микроциркуляции в группе с монотерапией L-аргинином ($p=0,042$).

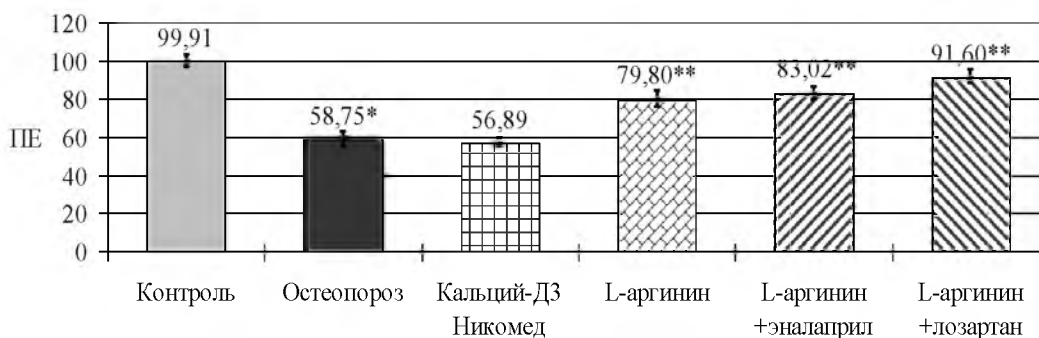


Рис. 3. Результаты влияния комбинаций L-аргинина с эналаприлом и лозартаном на микроциркуляцию в проксимальном метафизе бедра у крыс.

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой контрольных животных;
** – $p < 0,05$ по сравнению с группой крыс с остеопорозом

Также было установлено, что комбинации L-аргинина с эналаприлом и лозартаном снижали КЭД до значений $1,61 \pm 0,18$ и $1,55 \pm 0,16$ соответственно. Значения КЭД у крыс, получавших комбинированную терапию, не отличались достоверно от результатов расчета КЭД в группе животных с монотерапией L-аргинином (рис. 4).

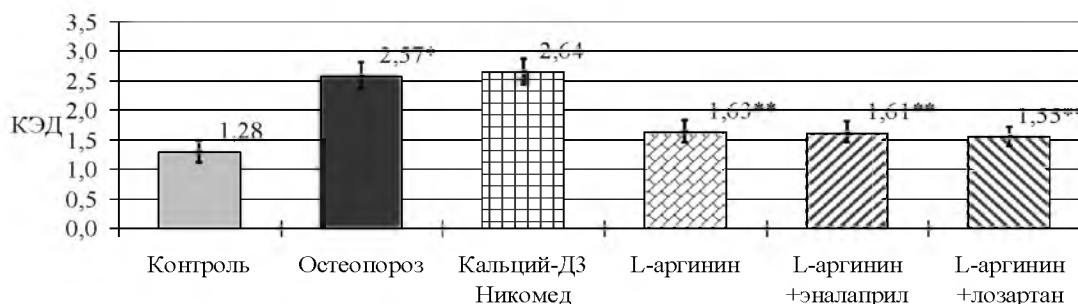


Рис. 4. Результаты влияния комбинаций L-аргинина с эналаприлом и лозартаном на коэффициент эндотелиальной дисфункции, рассчитанный на основании данных лазерной доплеровской флоуметрии в костной ткани

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой контрольных животных;
** – $p < 0,05$ по сравнению с группой крыс с остеопорозом

В результате изучения гистологических препаратов бедренных костей крыс, получавших L-аргинин в комбинациях с эналаприлом и лозартаном, обнаружили сохранную микроархитектонику и большую ширину костных трабекул, чем у крыс с остеопорозом. Обнаружили, что комбинации L-аргинина с эналаприлом и лозартаном частично предотвращали истончение костных трабекул, однако средняя ширина трабекул не достигала значений контрольных крыс (рис. 5). Показатели средней ширины костных трабекул в проксимальном метафизе бедра у крыс, получавших L-аргинин в комбинации с эналаприлом, достоверно не отличались от показателей крыс, получавших L-аргинин в качестве монотерапии ($p=0,228$), а у крыс, получавших L-аргинин в комбинации с лозартаном, статистически значимо отличались не только от значений животных с остеопорозом и крыс, получавших Кальций-Д3 Никомед, но также и от значений крыс, получавших L-аргинин в качестве монотерапии ($p=0,019$).

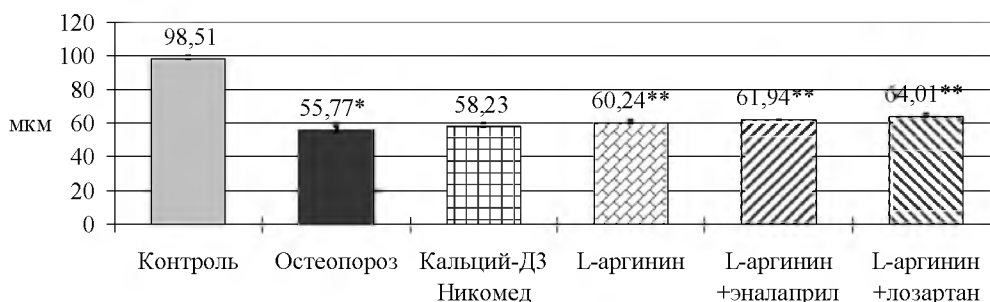


Рис. 5. Результаты влияния комбинаций L-аргинина с эналаприлом и лозартаном на среднюю ширину костных трабекул в проксимальном метафизе бедренной кости у крыс.

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой контрольных животных;

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

Таким образом, L-аргинин и комбинации L-аргинина с эналаприлом и лозартаном, обладая эндотелиопротективной активностью, предотвращают снижение уровня микроциркуляции в костной ткани проксимального метафиза бедра. Это позволяет поддерживать на должном уровне нарушенное при остеопорозе протекание процессов костного ремоделирования, свидетельством чего является сохранение микроархитектоники костной ткани, а именно замедление истончения и предотвращение возникновения микропереломов костных трабекул. Наибольшая степень выраженности фармакологической активности на выбранной модели патологии была отмечена у комбинации L-аргинина с лозартаном.

В адекватности протекания процессов костного ремоделирования и репаративной регенерации ключевая роль принадлежит правильному функционированию микроциркуляторного русла костной ткани. При ухудшении кровоснабжения кости наблюдаются различные остеологические заболевания, такие как остеонекроз, остеомиелит или остеопороз [11, 15].

В свою очередь, центральным звеном в обеспечении адекватного функционирования зрелой сосудистой сети костной ткани является эндотелий – основной регуляторный момент межтканевых взаимодействий.

Следовательно, от полноценности функционирования эндотелиоцитов, в том числе в микроциркуляторном русле костной ткани, зависит как общее состояние регионарной микроциркуляции кости, так и процессы физиологического ремоделирования костной ткани и результаты репаративной регенерации повреждений. Данные рассуждения подтверждаются результатами работ ряда авторов, свидетельствующих, например, о том, что фактор роста эндотелия сосудов (ключевой регулятор каскада событий, приводящих к формированию и развитию сосудистой системы) играет значительную роль в процессах ремоделирования [12, 17] и репарации повреждений [13] костной ткани.

На основании изложенного в ходе выполнения исследования мы придерживались рабочей гипотезы, согласно которой качество процессов ремоделирования и репаративной регенерации костной ткани находится в прямой зависимости от качества функционирования эндотелия сосудов, определяющего уровень регионарной микроциркуляции в костной ткани.

В настоящее время не прекращается поиск и изучение новых препаратов, обладающих эндотелиопротективными свойствами. Стоит отметить, что отдельного класса лекарственных средств для специфической коррекции дисфункции эндотелия в настоящее время не выделено, в связи, с чем внимание экспериментаторов привлекают представители различных фармакологических групп препаратов, обладающих плеiotропной эндотелиопротективной активностью.

По нашему мнению, наибольшего внимания заслуживает L-аргинин – аминокислота, являющаяся в организме субстратом для синтеза оксида азота – основного медиатора функционирования эндотелиальной системы [5, 9]. Кроме того, такие препараты, как представители ингибиторов АПФ и блокаторов ангиотензиновых рецепторов, а именно эналаприл и лозартан [3, 8], обладающие положительным влиянием на функцию эндотелия, способны, на наш взгляд, вступать с L-аргиномом в положительное фармакодинамическое взаимодействие в отношении остеопротективного эффекта.

Выводы:

1. L-аргинин в дозе 200 мг/кг на модели экспериментального остеопороза обладает выраженным эндотелиопротективным действием, проявляющимся в снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции, предотвращает снижение уровня микроциркуляции в костной ткани проксимального метафиза бедренной кости, удерживая его на значениях, статистически значимо превышающих показатели в группе крыс с экспериментальным остеопорозом без лечения и получавших Кальций-Д3 Никомед в дозе 85,7 мг/кг, а также, увеличивая среднюю ширину костных трабекул по



сравнению с крысами с остеопорозом и предотвращая возникновение микропереломов, обладает остеопротективным действием.

2. Комбинация L-аргинина в дозе 200 мг/кг и эналаприла в дозе 0,5 мг/кг на модели экспериментального остеопороза, обладая выраженным эндотелиопротективным действием, предотвращает повышение коэффициента эндотелиальной дисфункции; комбинация препаратов эффективно повышает показатели кровотока в костной ткани проксимального метафиза бедра, удерживая их на уровне, статистически значимо превышающем значения в группах крыс с экспериментальным остеопорозом без лечения и получавших Кальций-Д3 Никомед в дозе 85,7 мг/кг, и обладает выраженным остеопротективным действием, увеличивая среднюю ширину костных трабекул в проксимальном метафизе бедренной кости.

3. Комбинация L-аргинина в дозе 200 мг/кг и лозартана в дозе 6 мг/кг на модели экспериментального остеопороза обладает выраженным эндотелиопротективным действием – значительно снижает коэффициент эндотелиальной дисфункции; комбинация препаратов эффективно предотвращает снижение микроциркуляции в костной ткани проксимального метафиза бедра, в большей степени, чем монотерапия L-аргинином в дозе 200 мг/кг, приближая ее значения к показателям контрольных животных, и имеет более выраженное остеопротективное действие, чем Кальций-Д3 Никомед в дозе 85,7 мг/кг и L-аргинин в дозе 200 мг/кг, достоверно увеличивая среднюю ширину костных трабекул проксимального метафиза бедра.

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

Литература

1. Беневоленская, Л.И. Проблема остеопороза в современной медицине / Л.И. Беневоленская // *Consilium Medicum*. – 2004. – Т. 6, № 2. – С. 8-11.
2. Верткин, А.Д. Распространенность и течение остеопороза у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями / А.Д. Верткин, А.В. Наумов, В.С. Иванов [и др.] // *Соврем. ревматология*. – 2008. – № 1. – С. 52-59.
3. 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.
4. 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.
5. Покровская, Т.Г. Комбинированная фармакологическая коррекция метаболического пути L-аргинина/NO при моделировании дефицита оксида азота : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 14.00.25 / Т.Г. Покровская ; Курск. гос. мед. ун-т. – Курск, 2009. – 42 с.
6. Скрипникова, И.А. Взаимосвязь сердечно-сосудистых заболеваний, обусловленных атеросклерозом, и остеопороза у женщин в постменопаузе / И.А. Скрипникова // *Соврем. ревматология*. – 2008. – № 1. – С. 41-47.
7. Стабровская, Н.В. Исследование эндотелио – и остеопротективных эффектов некоторых антиоксидантов : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.03.06 / Н.В.Стабровская ; Курск. гос. мед. ун-т. – Курск, 2011. – 22 с.
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»*. – Москва. – Издательство «Фолиум». – 2012. – том 75, № 5, С 35-38.
9. Acute intravenous L-arginine infusion decreases endothelin-1 levels and improves endothelial function in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms: Correlation with asymmetric dimethyl-L-arginine / P. Piatti, G. Fragasso, L.D. Monti [et al.] // *Circulation*. – 2003. – Vol. 107. – P. 429-436.
10. Carano, R.A. Angiogenesis and bone repair / R.A. Carano, E.H. Filvaroff // *Drug Discov. Today*. – 2003. – Vol. 8. – P. 980-989.
11. Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study / R. Burkhardt, G. Kettner, W. Bohm et al. // *Bone*. – 1987. – Vol. 8. – P. 157-164.
12. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? / F. Villars, L. Bordenave, R. Bareille, J. Amedee // *J. Cell. Biochem*. – 2000. – Vol. 79. – P. 672-685.
13. Frost, H. M. The Microdamage (MDx) Connection // Frost H. M. *The Utah Paradigm of Skeletal Physiology*. – Athens, Greece ; ISMNI. – 2004. –Vol. 1, N 4. – P.208-219.
14. Madeddu, P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration / P. Madeddu // *Exp. Physiol*. – 2005. – Vol. 90. – P. 315-326.
15. Role of vascular factors in osteoporosis / K. Alagiakrishnan, A. Juby, D. Hanley et al. // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci*. – 2003. – Vol. 58. – P. 362-366.
16. Streeten, E.A. Biology of bone endothelial cells / E.A. Streeten, M. L. Brandi // *Bone Miner*. – 1990. – Vol. 10. – P. 85-94.
17. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats / S. Uchida, A. Sakai, H. Kudo [et al.] // *Bone*. – 2003. – Vol. 32. – P. 491-501.



THE STUDY OF INFLUENCE OF L-ARGININE AND ITS COMBINATIONS WITH ENALAPRIL AND LOSARTAN ON BONE MODELING IN THE EXPERIMENT

D.S.R. RAJKUMAR¹

O.S. GUDYREV²

A.V. FAITELSON¹

M.V. POKROVSKIY²

L.V. KOROKINA²

*¹Kursk State
Medical University*

*²Belgorod National
Research University*

e-mail: vladimirfaitelson@gmail.com

In experiment on white Wistar female rats the osteoprotective action of L-arginine and its combinations with enalapril and losartan was investigated on experimental osteoporosis model. L-arginine and its combinations with enalapril and losartan prevented a microcirculation level depression in an osteal tissue, that leading to retardation of an osteal trabecules thinning and to prevention of occurrence of microfractures.

Key words: osteoporosis, microcirculation, endothelial dysfunction, enalapril, losartan, L-arginine.