



УДК 616.71-007.234:615.22

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ В КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ОСТЕОПОРОЗЕ И ОСТЕОПОРОТИЧЕСКИХ ПЕРЕЛОМАХ НА ФОНЕ ТЕРАПИИ РЕКОМБИНАНТНЫМ ЭРИТРОПОЭТИНОМ, РОЗУВАСТАТИНОМ И ИХ КОМБИНАЦИЕЙ

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

¹Курский государственный
медицинский университет

²Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет

e-mail: pavel_remizov@mail.ru

В эксперименте на самках белых крыс линии Вистар изучалось влияние рекомбинантного эритропоэтина, розувастатина и их комбинации на показатели кровоснабжения костной ткани на модели экспериментального остеопороза. 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, рекомбинантный эритропоэтин, розувастатин, Бивалос.

Остеопороз – системное заболевание скелета, характеризующееся снижением массы кости в единице объема и нарушением микроархитектоники костной ткани, приводящей к увеличению хрупкости костей и высокому риску их переломов. В основе развития остеопоротических нарушений костей скелета лежит дисбаланс между двумя процессами костного ремоделирования: резорбцией и регенерацией [1, 2].

С каждым годом растет число проводимых оперативных вмешательств по поводу переломов костей с применением разнообразных имплантантов, 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 [3].

Кровоснабжение кости играет значительную роль в процессах костного ремоделирования и репаративной регенерации костной ткани кости. Костные микрососуды имеют только эндотелий и не имеют мышечного и соединительнотканного слоев. Следовательно, именно эндотелий опосредует всю гуморальную регуляцию обмена между остеобластами, остеокластами и кровью [4, 5, 6].

Причиной нарушения кровоснабжения костной ткани может быть эндотелиальная дисфункция, которая посредством ухудшения микроциркуляции может приводить к нарушению остеогенеза и остеорепарации, вызывая тем самым остеопороз [7, 8].

При применении препаратов, обладающих эндотелиотропным эффектом, наблюдается улучшение микроциркуляции, а также изменяется структура костной ткани [9, 10].

Известно, что рекомбинантный эритропоэтин и розувастатин обладают эндотелитропным эффектом, однако не исследовано их воздействие на костную ткань, это и явилось причиной изучения данных препаратов.

Цель работы: изучение уровня микроциркуляции в костной ткани при экспериментальном остеопорозе и остеопоротических переломах на фоне терапии рекомбинантным эритропоэтином, розувастатином и их комбинацией.

Материалы и методы. Эксперимент проводили на 240 самках крыс линии Wistar массой 200-250г. Все манипуляции на животных проводили с использованием наркоза (внутрибрюшинно вводился водный раствор хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг). Экспериментальные животные были разделены на 12 групп, по 20 крыс в каждой группе:

I – «интактные» – ложная операция билатеральной овариэктомии (выполнялся лапаротомный разрез без удаления яичников с последующим послойным наложением швов на рану);

II – «контроль» – истинная операция билатеральной овариэктомии (выполнялся лапаротомный разрез с удалением яичников с последующим послойным наложением швов на рану);

III – через 8 недель после овариэктомии и развития остеопороза [9, 10] проводилась терапия рекомбинантным эритропоэтином (50 МЕ/кг подкожно один раз в неделю с девятой по двенадцатую недели включительно);

IV – через 8 недель после овариэктомии проводилась терапия розувастатином (0,86 мг/кг ежедневно внутривенно с девятой по двенадцатую недели включительно);

V – через 8 недель после билатеральной овариэктомии проводили терапию комбинацией эритропоэтина и розувастатином тем же способом, что в группах III и IV;

VI – через 8 недель после билатеральной овариэктомии вводился препарат сравнения Бивалос (стронция ранелат) (171 мг/кг ежедневно внутривенно с девятой по двенадцатую недели включительно);

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

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

IX – билатеральная овариэктомия, через восемь недель моделировался перелом проксимального метафиза бедренной кости, далее проводилась терапия рекомбинантным эритропоэтином (подкожно 50 МЕ/кг один раз в неделю с девятой по двенадцатую недели включительно);

X – билатеральная овариэктомия, через восемь недель моделировался перелом проксимального метафиза бедренной кости, далее проводилась терапия розувастатином (ежедневно внутривенно в дозе 0,86 мг/кг с девятой по двенадцатую недели включительно);

XI – билатеральная овариэктомия, через восемь недель моделировался перелом проксимального метафиза бедренной кости, далее проводили терапию рекомбинантным эритропоэтином и розувастатином тем же способом, что в группах IX и X;

XII – билатеральная овариэктомия, через восемь недель моделировался перелом проксимального метафиза бедра, далее вводился препарат сравнения Бивалос (ежедневно внутривенно в дозе 171 мг/кг с девятой по двенадцатую недели включительно).

Моделирование переломов производилось закрытым методом (рационализаторское предложение № 1975-11 от 15.11.2011 г. «Способ закрытого моделирования метафизарных переломов у мелких лабораторных животных»). При помощи крапцов с надетыми на режущие поверхности силиконовыми трубками выполняли внешнее воздействие на проксимальный метафиз бедренной кости до появления перелома (характерной патологической подвижности, крепитации костных отломков, изменения оси конечности), при этом нагрузка осуществлялась перпендикулярно оси конечности. Фиксация и стабилизация перелома производилась с помощью струбины и спицы Киршнера, проведенной со стороны дистального отдела бедренной кости, интрамедуллярно по костному каналу, плотно зафиксированной в кортикальном слое костной ткани проксимального отдела бедра. Контроль правильности фиксации определялся по отсутствию патологической подвижности в зоне перелома. Фрагмент спицы, выступающий за пределы эпифиза кости, коротко скусывался. Рана ушивалась через все слои одним швом.

Через двенадцать недель (на 85 сутки) после начала эксперимента животным проводили измерение уровня микроциркуляции в костной ткани проксимального метафиза бедра, используя метод лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ). При этом делалось отверстие глубиной 2-3 мм в кортикальном слое костной ткани бедренной кости (в группах животных без переломов) или в костной мозоли, сформированной после перелома бедренной кости (в группах животных с переломами), устанавливали в отверстие игольчатый датчик для проведения измерения внутрикостной микроциркуляции. Экспериментальным животным в I, II, III, IV, V, VI группах, не меняя положение датчика, проводили пробы на эндотелийзависимую вазодилатацию (ЭЗВД) (в ответ на однократное внутривенное введение раствора ацетилхолина в дозе 40 мкг/кг) и эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭНВД) (в ответ на однократное внутривенное введение раствора нитропруссид натрия в дозе 30 мкг/кг). Для подтверждения роли дисфункции эндотелия в развитии нарушения регионарной микроциркуляции рассчитывался 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. Параметры микроциркуляции снимались при помощи лазер-доплеровского флоуметра Biopac systems MP150 и датчика TSD144. Регистрацию и обработку результатов лазерной доплеровской флоуметрии при исследовании микроциркуляции осуществляли с помощью программы AcqKnowledge версий 3.9-4.2, значения микроциркуляции выражались в перфузионных единицах (ПЕ).

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 нашего экспериментального исследования было выявлено, что у «интактных» животных уровень микроциркуляции в проксимальном метафизе бедренной кости через 12 недель после начала эксперимента ($99,91 \pm 3,41$ ПЕ), статистически значимо больше, чем в контрольной группе с остеопорозом ($58,75 \pm 3,76$ ПЕ). КЭД у животных с остеопорозом ($2,57 \pm 0,23$), по сравнению с «интактными» животными ($1,28 \pm 0,18$), наиболее высокий, что свидетельствует о формировании у них признаков развития дисфункции эндотелия сосудов. Нарушение функционирования эндотелия костных сосудов и снижение показателей регионарной микроциркуляции приводят к дисбалансу процессов костного ремоделирования и, следовательно, возникновению и прогрессированию остеопоротических изменений.

Рекомбинантный эритропоэтин, розувастатин и их комбинация при терапии экспериментального остеопороза, достоверно улучшали показатели уровня микроциркуляции в проксимальном метафизе бедренной кости у экспериментальных животных ($80,27 \pm 3,05$ ПЕ, $81,88 \pm 3,39$ ПЕ и $86,30 \pm 2,75$ ПЕ соответственно), в отличие от препарата сравнения Бивалос ($67,48 \pm 2,98$ ПЕ, $p = 0,077$). При этом КЭД на фоне терапии рекомбинантным эритропоэтином, розувастатином и их комбинацией был статистически значимо меньше по сравнению с группой контроля ($1,70 \pm 0,21$, $1,72 \pm 0,18$ и $1,69 \pm 0,23$ соответственно). Препарат сравнения Бивалос, по данным расчета КЭД, не обладал эндотелиопротективной активностью (КЭД = $2,44 \pm 0,19$).

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

При терапии остеопоротических переломов рекомбинантным эритропоэтином, розувастатином и их комбинацией, показатели микроциркуляции в костной мозоли переломов проксимального метафиза бедра ($96,31 \pm 3,16$ ПЕ, $94,34 \pm 2,54$ ПЕ и $101,05 \pm 2,75$ ПЕ соответственно) были статистически значимо выше показателей в других экспериментальных группах и группе контроля. На фоне применения препарата сравнения Бивалос, отмечалась тенденция к увеличению показателей микроциркуляции в костной мозоли перелома проксимального метафиза бедра у экспериментальных животных на фоне остеопороза, но не превышала порога статистической значимости ($70,39 \pm 2,39$ ПЕ, $p = 0,386$). При этом консолидация экспериментальных остеопоротических переломов под воздействием всех исследуемых препаратов наступала в 100% случаев.

Дисфункция эндотелия характеризуется дисбалансом вазоконстрикторной и дилаторной способности сосудов, обусловленной нарушением баланса между вазодилатирующими и вазоконстрикторными факторами, в частности такими, как оксид азота (NO) и простагландин, эндотелин-1 и ангиотензин II [11]. Эндотелий сосудов костной ткани, являясь неотъемлемой частью кости, играет центральную регуляторную роль [12]. Во многих клинических и экспериментальных исследованиях было показано, что рекомбинантный эритропоэтин является мультифункциональным трофическим фактором, имеет различные сайты экспрессии, специфическую тканевую регуляцию и ряд различных механизмов воздействия. Функциональные рецепторы к эритропоэтину были найдены не только на мембранах клеток красного ростка костного мозга, но и на клетках миелоидного ряда, лимфоцитах, мегакариоцитах, а также на эндотелиальных, мезангиальных, миокардиальных, гладкомышечных клетках и нейронах [13]. Также рекомбинантный эритропоэтин является промоутером пролиферации эндотелиальных клеток, эмбриональных стволовых клеток печени и гладкой мускулатуры [14, 15, 16]. Перспективы применения рекомбинантного эритропоэтина в кардиологии объясняются его плеотропными эффектами. Так, рекомбинантный эритропоэтин способствует антиапоптозу эндотелия, редуцированию гипертрофии сердца, увеличению толерантности к физической нагрузке у больных с хронической сердечной недостаточностью [17, 18]. В опытах на сердцах крыс показано, что лечение рекомбинантным эритропоэтином приводит к улучшению коронарной перфузии, внося значимый вклад в уменьшение конечного диастолического давления в левом желудочке и улучшению его систолической функции [19]. Такой эффект связывают с активацией эндотелиальной NO-синтазы и протеинкиназы B, которая медиатирует фосфорилирование, приводя к длительной NO-зависимой вазодилатации [20]. Также изучено положительное влияние статинов на функцию эндотелия. Путем очень сложного влияния, посредством активации протеинкиназы B и воздействуя в эндотелиальных клетках на процессы фосфорилирования, eNOS (эндотелиальная синтаза NO) вызывает повышение продукции NO [21], которая в свою очередь приводит к NO-зависимой вазодилатации. Все выше сказанное может говорить о том, что ре-



комбинантный эритропоэтин и розувастатин положительно воздействуют на эндотелий сосудов, тем самым улучшают регионарную микроциркуляцию костной ткани.

Выводы:

1. Через 12 недель после билатеральной овариэктомии у экспериментальных животных наблюдаются признаки развития дисфункции эндотелия сосудов, в том числе микроциркуляторного русла костной ткани с последующим снижением показателей регионарной микроциркуляции, что может отрицательно сказываться на балансе костной регенерации и резорбции, приводя к развитию остеопороза.

2. Терапия рекомбинантным эритропоэтином (подкожно 50 МЕ/кг один раз в неделю с девятой по двенадцатую недели включительно), розувастатином (ежедневно внутривенно в дозе 0,86 мг/кг с девятой по двенадцатую недели включительно), а также их комбинацией через 12 недель после билатеральной овариэктомии выявляет признаки наличия эндотелиопротективных свойств у указанных препаратов и их комбинации, что проявляется снижением коэффициента эндотелиальной дисфункции, а также повышением уровня микроциркуляции в костной ткани проксимального метафиза бедра. У препарата сравнения Бивалос не выявлена эндотелиопротективная активность.

3. Консолидация остеопоротических переломов проксимального метафиза бедренной кости через 12 недель после их моделирования у экспериментальных животных протекает на фоне снижения показателей микроциркуляции в костной мозоли, что негативно сказывается на частоте сращения экспериментальных переломов.

4. Терапия рекомбинантным эритропоэтином, розувастатином и их комбинацией улучшает показатели микроциркуляции в костной мозоли переломов проксимального метафиза бедра у экспериментальных животных, а также положительно действует на процессы репаративной регенерации костной ткани, приводя к увеличению количества сращений экспериментальных переломов на фоне остеопороза. При применении Бивалоса также наблюдается повышение «качества» сращения остеопоротических переломов проксимального метафиза бедра у экспериментальных животных.

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. Руководство по остеопорозу / под ред. Л.И. Беневоленской. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. – 524 с.
3. Миронов, С.П. Остеопороз как медико-социальная проблема / С.П. Миронов // Проблема остеопороза в травматологии и ортопедии : материалы III конф. с междунар. участием (14-15 фев. 2006 г., г. Москва). – М. : ЦИТО им. Н.Н. Приорова, 2006. – С. 4.
4. Брошусь, В.В. Оксид азота как регулятор защитных и гомеостатических реакций организма / В.В. Брошусь // Укр. ревматол. журн. – 2003. – № 4. – С. 3-11.
5. Грибкова, И.В. NO активировывает 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.
6. Napoli, C. Nitric oxide and atherosclerosis / C. Napoli, L.J. Ignarro // Nitric Oxide. – 2001. – Vol. 5. – P. 88-97.
7. Дисфункция эндотелия у больных гипертонической болезнью / Мартынов, Н.Г. Аветян, Е.В. Акатова и др. // Кардиология. – 2005. – Т. 45, № 10. – С. 101-104.
8. Небиеридзе, Д.В. Микроциркуляторные расстройства при артериальной гипертензии и перспективы их коррекции / Д.В. Небиеридзе, Е.В. Шилова, С.Н. Толпыгина // Кардиоваскуляр. терапия и профилактика. – 2004. – № 4. – С. 28-32.
9. 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.
10. 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.
11. Laufs U., La Fata V., Plutzky J., Liao J.K. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors // Circulation. – 1998. – № 97. – P. 1129 – 1135.
12. Марков Х.М. Оксидантный стресс и дисфункция эндотелия. Патол. физиология и эксперим. терапия. 2005. – № 4. – С. 5-9.
13. Buemi M., Cavallaro E., Floccari F. et al. Erythropoietin and the brain: from neurodevelopment to neuroprotection. // Clinical Science. – 2002. – № 103. – P. 275 – 282.



14. Anagnostou A., Liu Z., Steiner M. et al. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1994. – № 91. – P. 3974 – 3978.
15. Ohneda O., Yanai N., Obinata M. Erythropoietin as a mitogen for fetal liver stromal cells which support erythropoiesis. // *Exp Cell Res.* – 1993. – № 208. P. 327 – 331.
16. Ogilvie M., Yu X., Nicolas-Metral V. et al. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. // *J Biol Chem.* – 2000. – № 275. P. 39754 – 39761.
17. Smith K.J., Bleyer A.J., Little W.C., Sane D.C. The cardiovascular effects of erythropoietin. // *Cardiovasc Res.* – 2003. – № 59(3). P. 538 – 548.
18. Manolis A.S., Tzeis S., Triantafyllou K. et al. Erythropoietin in heart failure and other cardiovascular diseases: hematopoietic and pleiotropic effects. // *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* – 2005. № 5(5). – P. 355 – 375.
19. Cai Z., Semenza G. L. Phosphatidylinositol-3-Kinase Signaling Is Required for Erythropoietin-Mediated Acute Protection Against Myocardial Ischemia // *Reperfusion Injury Circulation.* – 2004. – № 109. P. 2050 – 2053.
20. Chong Z.Z., Kang J.Q., Maiese K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt and mitochondrial modulation of cysteine proteases. // *Circulation.* – 2002. – № 106. – P. 2973 – 2979.
21. 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 LEVEL OF MICROCIRCULATION IN BONE IN OSTEOPOROSIS AND OSTEOPOROTIC FRACTURES DURING THERAPY WITH RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN, ROSUVASTATIN AND THEIR COMBINATION

P.P. REMIZOV¹
O.S. GUDYREV²
M.S. SOBOLEV¹
L.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 recombinant erythropoietin, rosuvastatin and their combination on parameters of blood supply to the bone on the model of experimental osteoporosis. 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, recombinant erythropoietin, rosuvastatin, Bivalos.