

УДК: 616.71-007.234:615.22

DOI: 10.18413/2313-8971-2015-1-4-32-38

**Коклина Н.Ю.,
Гудырев О.С.,
Файтельсон А.В.****ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТЕОПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ
НАНОПАРТИКУЛИРОВАННЫХ ФОРМ РЕЗВЕРАТРОЛА
И ЛОЗАРТАНА**

- 1) ассистент кафедры травматологии и ортопедии Курского государственного медицинского университета ул. К. Маркса, 3, г. Курск, РФ, 305047. e-mail: ikoklin@mail.ru
- 2) кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии Медицинского института НИУ «БелГУ» ул. Победы, 85, г. Белгород, РФ, 308015. e-mail: gudyrev@bsu.edu.ru
- 3) доктор медицинских наук, доцент кафедры травматологии и ортопедии Курского государственного медицинского университета. л. К. Маркса, 3, г. Курск, РФ, 305047. e-mail: vladimirfaitelson@gmail.com

Аннотация. 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. Нанопартикулированные формы лозартана и резвератрола, обладая эндотелиопротективным действием, эффективно предотвращали 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, дисфункция эндотелия, Бивалос, лозартан, резвератрол.

**Koklina N.U.
Gudyrev O.S.
Faitelson A.V.****THE STUDY OF OSTEOPROTECTIVE PROPERTIES
OF NANOPARTICULATED FORMS OF RESVERATROL AND LOSARTAN**

- 1) Assistant of the Department of Traumatology and Orthopedics of Kursk State Medical University 3 K. Marx St., Kursk, 305047, Russia. e-mail: ikoklin@mail.ru
- 2) PhD in Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology of Belgorod State National Research University. 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia. e-mail: gudyrev@bsu.edu.ru
- 3) Doctor of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Traumatology and Orthopedics of Kursk State Medical University. 3 K. Marx St., Kursk, 305047, Russia. e-mail: vladimirfaitelson@gmail.com

Abstract. The study demonstrated that eight weeks after ovariectomy in female white Wistar rats endothelial dysfunction of bone microvasculature and deterioration of regional blood flow in bone develops, leading to the emergence of generalized osteoporosis. Nanoparticulated forms of losartan and resveratrol, possessing endothelioprotective action, effectively prevents the reduction of regional microcirculation in bone tissue, keeping it at the level of intact rats. It is allowed to maintain an adequate level of bone remodeling processes, which manifested in slowing of the thinning of bone trabeculae and preventing the occurrence of their microfractures.

Key words: osteoporosis, endothelial dysfunction, bivalos, losartan, resveratrol.

Остеопороз (ОП) – это системное заболевание скелета, характеризующееся снижением массы кости в единице объема и нарушением микроархитектоники костной ткани, приводящими к увеличению хрупкости костей и высокому риску их переломов. В основе развития ОП лежит дисбаланс между двумя основными процессами костного ремоделирования: костеобразованием и костной резорбцией [1].

Одним из существенных звеньев в патогенезе ОП является ухудшение кровоснабжения кости [10], приводящее к угнетению активности остеобластов, а также к активации остеокластов. Так, в ходе ранее проведенных исследований нами было обнаружено существование тесной взаимозависимости между адекватностью кровоснабжения костной ткани и ее качеством, выражающимся в толщине костных трабекул, а

также устойчивости костной ткани к внешним воздействиям [8].

Как известно, строение микрососудов костной ткани существенно отличается от морфологии сосудистого русла остальных тканей организма. Костные микрососуды имеют лишь эндотелий, который и опосредует всю гуморальную регуляцию обмена между костными клетками и кровью. В ходе ранее проведенных исследований нами также было продемонстрировано, что генерализованный гипоэстрогениндуцированный ОП у самок крыс линии Вистар сопровождается признаками развития эндотелиальной дисфункции (ЭД), что ведет к ухудшению регионарного кровоснабжения и может приводить к нарушению процессов остеогенеза и остеорепарации, вызывая ОП.

В современной патогенетической терапии ОП не уделяется должного внимания препаратам, обладающим эндотелиопротективными свойствами и, следовательно, положительным воздействием на кровоснабжение костной ткани. Это указывает на актуальность изучения остеопротективного действия препаратов с доказанными положительными эндотелиотропными эффектами, таких, как, например, лозартан и резвератрол. В то же время актуальными проблемами современной экспериментальной и клинической фармакологии являются увеличение эффективности и уменьшение количества побочных эффектов от применения лекарственного средства, что может быть достигнуто нанопартикулированием препарата в сочетании со снижением его дозировки. В связи с этим целью настоящего исследования стало изучение антиостеопоротических свойств нанопартикулированного резвератрола и лозартана.

Методика исследования

Опыты проводили на 267 самках белых крыс линии Вистар массой 250 ± 25 г. Для моделирования системного ОП крыс наркотизировали внутрибрюшинным введением раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг и проводили операцию билатеральной овариэктомии [5]. Развитие генерализованного ОП оценивали через восемь недель (на 57 день) после проведения операции.

Уровень микроциркуляции оценивали в ткани проксимального метафиза бедренной кости. Для этого после фиксации животного на столике для хирургических манипуляций [7] и засверливания в бедре монокортикального отверстия в него с целью стабилизации датчика, используемого для измерения микроциркуляции в кости, вводили стержень-кондуктор [6]. Для получения данных микроциркуляции в кости использовали оборудование компании Biopac

systems: полиграфы MP100 и MP150 с модулем лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) LDF100C и датчиком TSD144. Регистрация результатов ЛДФ производилась с помощью программы AcqKnowledge версий 3.8.–4.2., 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 [16] и эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭНВД) в ответ на болюсное введение раствора нитропруссиды натрия в дозе 30 мкг/кг [2]. Для объективной оценки развития нарушения функции эндотелия при генерализованном ОП рассчитывали коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД) на основе данных ЛДФ в кости [4, 8].

Для подтверждения развития ОП и в комплексной оценке эффективности исследуемых препаратов и их комбинаций проводили морфологическое исследование проксимальных метафизов бедренных костей. Предметные стекла с гистологическими препаратами подвергали световой микроскопии и фотографировали костные балки путем сопоставления объектива фотокамеры и окуляра микроскопа. Для проведения гистоморфометрии костной ткани использовали предварительно откалиброванную программу ImageJ версий 1.39–1.43, с помощью которой измеряли ширину костных трабекул и выражали ее в микрометрах.

Для изучения антиостеопоротического действия нами были выбраны нанопартикулированные формы препаратов, эндотелио- и остеопротективное действие которых было доказано в ходе ранее проведенных исследований: лозартан калия и резвератрол [9]. При проведении экспериментов лозартан (в дозе 6 мг/кг), а также его нанопартикулированную форму (далее – «п-лозартан», в дозе 0,6 мг/кг) вводили внутривенно ежедневно однократно в сутки в течение восьми недель после моделирования остеопороза. Резвератрол (в дозе 2 мг/кг), а также его нанопартикулированную форму (далее – «п-резвератрол», в дозе 0,2 мг/кг) вводили внутрибрюшинно по той же схеме. В качестве препарата сравнения использовали Бивалос в дозе 171 мг/кг.

Группой контроля являлась группа животных с экспериментальным ОП, не получавших фармакологической коррекции. В группу

интактных крыс входили ложнооперированные животные (ложная операция овариэктомии без удаления яичников).

Статистический анализ полученных данных осуществляли в программе Microsoft Excel. «Описательная статистика» применялась для вычисления 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 $p < 0,05$.

Результаты исследования

Результаты ЛДФ позволили констатировать достоверно более низкий уровень микроциркуляции в костной ткани у крыс через восемь недель после овариэктомии ($61,52 \pm 3,74$ ПЕ; $n=42$) по сравнению с интактными животными ($100,51 \pm 4,41$ ПЕ; $n=30$).

В ответ на системное введение ацетилхолина и нитропрусида наблюдали снижение микроциркуляции с последующей нормализацией показателей кровотока. Так, 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 КЭД= $1,3 \pm 0,2$, в группе крыс с экспериментальным ОП КЭД был статистически значимо больше и составлял $2,4 \pm 0,2$.

Остеопоротические изменения в костях скелета 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. Объективной мерой оценки развития ОП через восемь недель после билатеральной овариэктомии стало достоверное уменьшение средней ширины костных трабекул в изучаемой локализации. Так, средняя ширина костных трабекул в проксимальном метафизе бедра у крыс с экспериментальным ОП ($61,68 \pm 1,24$ мкм) была меньше показателя интактных животных ($97,69 \pm 1,02$ мкм) на $36,8\%$.

При анализе активности изучаемых препаратов было обнаружено, что лозартан ($n=35$), резвератрол ($n=20$) и их нанопартикулированные формы ($n=20$), препарат сравнения Бивалос ($n=20$) эффективно предотвращали снижение уровня регионарного кровотока в костной ткани бедра (рис. 1).

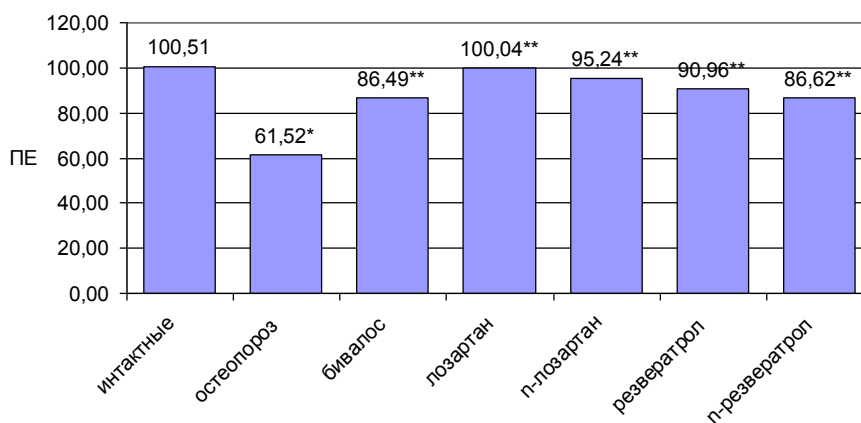


Рисунок 1. Результаты влияния изучаемых препаратов на кровоснабжение костной ткани через 8 недель после билатеральной овариэктомии.

Примечание. Здесь и далее: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой интактных животных; ** – $p < 0,05$ по сравнению с группой крыс с остеопорозом.

Figure 1. Results of the effect of the studied drugs on blood supply of bone at 8 weeks after bilateral ovariectomy.

Note. Hereinafter: * – $p < 0,05$ compared to the group of intact animals; ** – $p < 0,05$ compared to the group of rats with osteoporosis.

Результаты ЛДФ в группах крыс, получавших Бивалос, лозартан, n-лозартан, резвератрол и n-резвератрол, приближались к показателям интактных животных и

статистически не различались между собой, а также достоверно превышали значения в контрольной группе.

Было выявлено, что все изучаемые препараты, за исключением Бивалоса, приводили пропорции между площадями треугольников над кривыми восстановления уровня микроциркуляции в кости в ответ на введение нитропрусида и ацетилхолина к таковым у интактных животных. Тем самым изучаемые препараты статистически значимо снижали КЭД, демонстрируя тем самым эндотелиопротективное действие, до следующих значений: лозартан – $1,5 \pm 0,2$, п-лозартан – $1,5 \pm 0,2$, резвератрол –

$1,3 \pm 0,2$, п-резвератрол – $1,3 \pm 0,1$. Значение КЭД в группе животных, получавших Бивалос, составило $2,1 \pm 0,2$.

При световой микроскопии срезов бедренных костей у крыс, получавших лечение, обнаружили сохранение структуры костной ткани и большую ширину костных трабекул, чем у крыс с ОП, не получавших лечения. Выявили, что Бивалос, лозартан, п-лозартан, резвератрол и п-резвератрол препятствовали снижению средней ширины костных трабекул до уровня животных с экспериментальным ОП, однако средняя ширина трабекул не достигала значения интактных крыс (рис. 2).

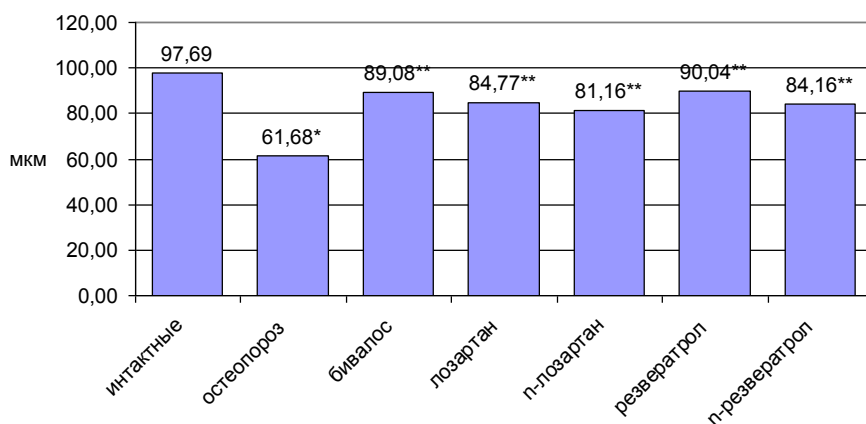


Рисунок 2. Результаты влияния препаратов на ширину костных трабекул
Figure 2. The results of the impact of drugs on the width of bone trabeculae

При изучении активности комбинаций изучаемых препаратов было обнаружено, что комбинации лозартана в дозе 6 мг/кг с резвератролом в дозе 2 мг/кг (n=20), п-лозартана в дозе 0,6 мг/кг с резвератролом в дозе 2 мг/кг (n=20), лозартана в дозе 6 мг/кг с п-резвератролом

в дозе 0,2 мг/кг (n=20) и п-лозартана в дозе 0,6 мг/кг с п-резвератролом в дозе 0,2 мг/кг (n=20) более эффективно предотвращали снижение уровня регионарного кровотока в костной ткани бедра по сравнению с монотерапией препаратами (рис. 3).

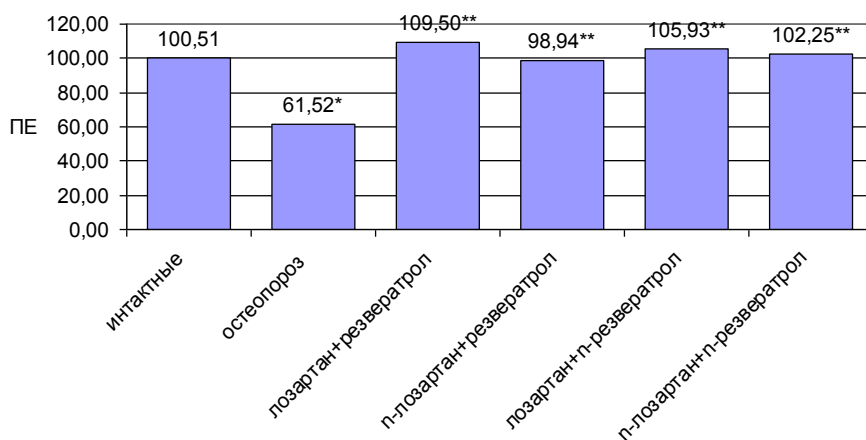


Рисунок 3. Результаты влияния комбинаций препаратов на кровоснабжение костной ткани
Figure 3. The results of the effect of combinations of drugs on the blood supply of the bone tissue

Результаты ЛДФ в группах крыс, получавших комбинированную терапию,

статистически значимо не отличались от показателей интактных животных, а зачастую даже превышали их, достоверно не различались между собой, а также достоверно превышали не только значения в контрольной группе, но и в группе животных, получавших препарат сравнения Бивалос.

Было выявлено, что все изучаемые комбинации препаратов приводили 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 изучаемые комбинации препаратов статистически значимо снижали КЭД, демонстрируя тем самым выраженное

эндотелиопротективное действие, до следующих значений: лозартан + резвератрол – $1,1 \pm 0,1$, п-лозартан + резвератрол – $1,2 \pm 0,1$, лозартан + п-резвератрол – $1,4 \pm 0,2$, п-лозартан + п-резвератрол – $1,2 \pm 0,1$.

При световой микроскопии срезов бедренных костей у крыс, получавших лечение комбинациями изучаемых препаратов, обнаружили сохранение структуры костной ткани и большую ширину костных трабекул, чем у крыс с ОП, не получавших лечения. Выявили, что комбинации исследуемых препаратов эффективно препятствовали снижению средней ширины костных трабекул до уровня животных с экспериментальным ОП (рис. 4).

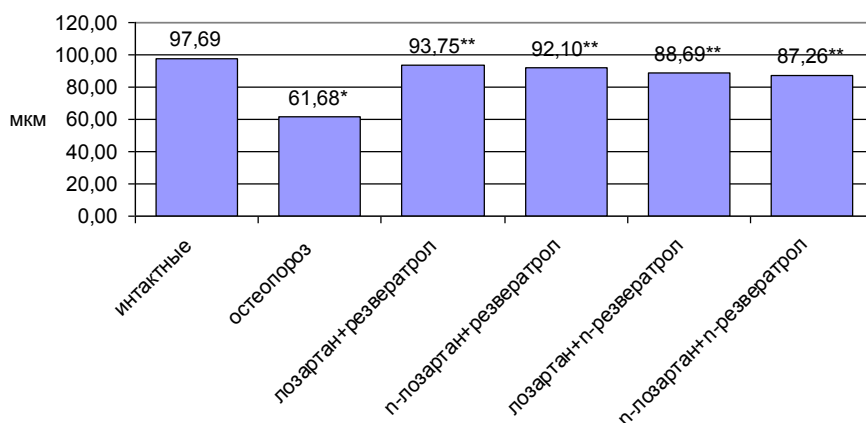


Рисунок 4. Результаты влияния комбинаций препаратов на ширину костных трабекул
Figure 4. The results of the effect of combinations of drugs on the width of bone trabeculae

Обсуждение

Для поддержания гомеостаза кости чрезвычайно важны развитие функционально полноценного микроциркуляторного русла и общее состояние регионарной микроциркуляции в костной ткани. Ухудшение кровоснабжения костной ткани может приводить к развитию таких патологий опорно-двигательного аппарата, как остеонекроз [12], остеомиелит [17] или остеопороз [11, 18]. Эндотелий в зрелой сосудистой сети играет центральную регуляторную роль, обеспечивая связь с остальными слоями стенки сосуда и адекватно отвечая на их потребности выделением медиаторов [3]. Таким образом, по нашему мнению эндотелий сосудов костной ткани, являясь неотъемлемой частью кости, во многом определяет состояние регионарной микроциркуляции, а также тем самым отвечает за поддержание гомеостаза в кости.

Данное положение подтверждается работами ряда авторов, утверждающих, например, что VEGF (ключевой регулятор каскада событий,

приводящих к формированию и развитию сосудистой системы) играет значительную роль в процессах ремоделирования [13] и репарации повреждений [14] костной ткани. Так, было продемонстрировано, что ингибирование VEGF приводит к увеличению ширины феморальной и тиббиальной ростковых зон, снижению интенсивности ангиогенеза в ростковых зонах, потере кровеносных сосудов в метафизарной зоне, а также уменьшению образования трабекулярной структуры кости [13] и интенсификации резорбции губчатой костной ткани [15].

В настоящее время ведется активное изучение препаратов, обладающих эндотелиопротективными свойствами, а также формулируются возможные патогенетические механизмы их воздействия на сосудистый эндотелий.

Эндотелиопротективное влияние антагонистов ангиотензиновых рецепторов реализуется, по-видимому, за счет блокады АТ1-рецепторов, что ведет к уменьшению продукции супероксидных радикалов, снижению степени связывания NO и его накоплению. Так как

стимуляция АТ1-рецепторов способствует образованию супероксидов, инактивирующих NO, а стимуляция АТ2-рецепторов приводит к вазодилатации и усилению натрийуреза за счет активации системы брадикинина, NO и цГМФ, то эффект АТ-2 (усиление синтеза или инактивация NO) зависит от того, с какими рецепторами он преимущественно взаимодействует. Поэтому очевидно, что на фоне блокады АТ1-рецепторов создаются благоприятные условия для интенсифицированного функционирования свободных АТ2-рецепторов, что приводит к накоплению NO.

Представитель группы фитоалексинов резвератрол вызывает эндотелийзависимое расслабление кровеносных сосудов посредством усиления выработки оксида азота и последующего увеличения уровня цГМФ. Вместе с тем данные эффекты ослабляются при введении конкурентных ингибиторов NO-синтазы N^G-монометил-L-аргинина и N^G-нитро-L-аргинина. Известно, что краткосрочное воздействие на эндотелиоциты резвератрола в невысоких концентрациях (1-10 μM) увеличивает количество производимого оксида азота, что объясняется краткосрочным повышением активности eNOS и сокращением продукции супероксидов в эндотелии. Резвератрол стимулирует в хронологическом порядке экспрессию eNOS и VEGF. Напротив ингибирование выработки NO ингибиторами eNOS существенным образом снижает митогенные и ангиогенные эффекты, стимулируемые VEGF.

Использование нанопартикулированных форм лозартана и резвератрола в настоящем исследовании позволило добиться двукратного уменьшения доз исследуемых препаратов с сохранением сопоставимого терапевтического эффекта. При этом нанопартикулированные формы лозартана и резвератрола продемонстрировали эффективное остеопротективное действие как в виде монотерапии, так и в комбинациях.

Таким образом, нанопартикулированные формы блокатора АТ1-рецепторов лозартана, а также представителя группы фитоалексинов резвератрола, оказывая эндотелиопротективное воздействие на эндотелий микроциркуляторного русла костной ткани, эффективно предотвращают снижение регионарного кровоснабжения в костной ткани при экспериментальном остеопорозе и обладают остеопротективным действием, заключающимся в положительном влиянии указанных препаратов на процессы костного ремоделирования и остеорепарации.

Литература

1. Беневоленская, Л.И. Руководство по остеопорозу. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. – 524 с.
2. Галаган, М.Е. Гипотензивное действие оксида азота, продуцируемого из экзо- и эндогенных источников / М.Е. Галаган, А.В. Широколова, А.Ф. Ванин // Вопр. мед. химии. – 1991. – Т. 37, № 1. – С. 67-70.
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. 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; опублик. 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. Файтельсон, А. В. Пат. 62505 Российская Федерация, МПК⁷ А61В 17/68. Канюлированный стержень-кондуктор для проведения экспериментальных измерений / заявители и патентообладатели Файтельсон А.В., Гудырев О.С. – № 2006144474/22; заявл. 13.12.06; опублик. 27.04.07, Бюл. № 12. – 3 с.: ил.
7. Файтельсон, А. В. Пат. 62512 Российская Федерация, МПК⁷ А61D 3/00. Стол для хирургических манипуляций на мелких лабораторных животных / заявители и патентообладатели Файтельсон А.В., Гудырев О.С. – № 2006144475/22; заявл. 13.12.06; опублик. 27.04.07, Бюл. № 12. – 4 с.: ил.
8. 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.
9. Эндотелиопротективные эффекты резвератрола и его комбинаций с эналаприлом и лозартаном при экспериментальном моделировании дефицита оксида азота / В.И. Кочкаров, М.В. Покровский, М.М. Корнеев и др. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2006. – № 9 (90). – С. 150-152.
10. Alagiakrishnan, K. Role of vascular factors in osteoporosis / K. Alagiakrishnan, A. Juby, D. Hanley // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. – 2003. – Vol. 58. – P. 362-366.
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. Childs, S.G. Osteonecrosis: death of bone cells / S.G. Childs // Orthop. Nurs. – 2005. – Vol. 24. – P. 295-301.

13. Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state / J.J. Haigh, H.P. Gerber, N. Ferrara, E.F. Wagner // *Development*. – 2000. – Vol. 127. – P. 1445-1453.

14. 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 KeZaZhi*. – 2002. – Vol. 16. – P. 75-78.

15. Increase of both angiogenesis and bone mass in response to exercise depends on VEGF / Z. Yao, M.H. Lafage-Proust, J. Plouet et al. // *J. Bone. Miner. Res.* – 2004. – Vol. 19. – P. 1471-1480.

16. Laursen J. B., Rajagopalan S., Galis Z. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension / J.B. Laursen, S. Rajagopalan, Z. Galis // *Circulation*. – 1997. – Vol. 95. – P. 588-593.

17. Lazzarini, L. Long Bone Osteomyelitis / L. Lazzarini, F. De Lalla, J.T. Mader // *Curr. Infect. Dis. Rep.* – 2002. – Vol. 4. – P. 439-445.

18. 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.

References

1. Benevolenskaya L. I. Guidelines on Osteoporosis. M.: BINOM. Knowledge Laboratory. 2003. 524 p.

2. Galagan M. E., Shirokolova A. V., Vanin A. F. The antihypertensive effect of nitric oxide produced from exogenous and endogenous sources. *Questions of Med. Chem.* Vol. 37, № 1. (1991): P. 67-70.

3. Markov, X.M. Oxidative stress and endothelial dysfunction. *Patol. Phys. and Exp. Ther.* Vol. 4. (2005): P. 5-9.

4. Pokorvsky M.V., Pokrovskaya T.G., Kochkarov V.I. et al. Pat. 2301015 Russian Federation, MPK⁷ A61B 5/02. A method of evaluating endothelial dysfunction / applicants and patent holders Pokorvsky M.V., Pokrovskaya T.G., Kochkarov V.I. № 2005113243/14; petition 04.05.2005; publ. 20.06.07, Bull. 17. 7 p.: ill.

5. Korokin M.V., Pokrovsky M.V., Artyushkova E.B. et al. Methods of experimental modeling of endothelial dysfunction. *Allergology and immunology.* Vol. 9, № 3 (2008): P. 327.

6. Faitelson A. V., Gudyrev O. S., Dubrovin G. M. et al. Pat. 62505 Russian Federation, MPK⁷ A61B 17/68. Cannulated rod-conductor for experimental measurements / applicants and patent holders Faitelson A.V., Gudyrev O.S. № 2006144474/22; petition 13.12.06; publ. 27.04.07, Bull. 12. 3 p.: ill.

7. Faitelson A. V., Gudyrev O. S., Dubrovin G. M. et al. Pat. 62512 Russian Federation, MPK⁷ A61D 3/00. Table for surgical procedures on small laboratory animals / applicants and patent holders Faitelson A.V., Gudyrev O.S. № 2006144475/22; petition 13.12.06; publ. 27.04.07, Bull. 12. 4 p.: ill.

8. Faitelson A.V., Gudyrev O.S., Pokrovsky M.V. et al. Vascular endothelium of bone as a target of pharmacological effects in experimental osteoporosis. *Kuban Research Medical Gazette.* Vol. 5 (110) (2009): P. 116-121.

9. Kochkarov V.I., Pokrovsky M.V., Korneev M.M. et al. Endothelioprotective effects of resveratrol and its combination with enalapril and losartan in experimental modeling of deficiency of nitric oxide. *Kuban Research Medical Gazette.* Vol. 9 (90). (2006): P. 150-152.

10. Alagiakrishnan K., Juby A., Hanley D. et al. Role of vascular factors in osteoporosis. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* Vol. 58 (2003): P. 362-366.

11. Burkhardt R., Kettner G., Bohm W. et al. Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study. *Bone.* Vol. 8. (1987): P. 157-164.

12. Childs, S.G. Osteonecrosis: death of bone cells. *Orthop. Nurs.* Vol. 24. (2005): P. 295-301.

13. Haigh J.J., Gerber H.P., Ferrara N. Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state. *Development.* Vol. 127. (2000): P. 1445-1453.

14. Chu T.W., Wang Z.G., Zhu P.F. et al. Effect of vascular endothelial growth factor in fracture healing. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai KeZaZhi.* Vol. 16 (2002): P. 75-78.

15. Yao Z., Lafage-Proust M.H., Plouet J. et al. Increase of both angiogenesis and bone mass in response to exercise depends on VEGF. *J. Bone. Miner. Res.* Vol. 19 (2004): P. 1471-1480.

16. Laursen J. B., Rajagopalan S., Galis Z. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation,* Vol. 95 (1997): P. 588-593.

17. Lazzarini L., De Lalla F., Mader J.T. Long Bone Osteomyelitis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* Vol. 4 (2002): P. 439-445.

18. Alagiakrishnan K., Juby A., Hanley D. et al. Role of vascular factors in osteoporosis. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* Vol. 58 (2003): P. 362-366.