



ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОПОРОЗА КОМБИНАЦИЕЙ РЕЗВЕРАТРОЛА С ЭНАЛАПРИЛОМ

А.В. ФАЙТЕЛЬСОН

*Курский государственный
медицинский университет*

e-mail: vladimirfaitelson@gmail.com

В эксперименте на самках белых крыс линии Вистар изучалось остеопротективное действие комбинации резвератрола с эналаприлом на модели экспериментального остеопороза. Было выявлено, что после овариэктомии у крыс развивается эндотелиальная дисфункция сосудов микроциркуляторного русла костной ткани, приводящая к возникновению остеопороза. Комбинация резвератрола с эналаприлом предотвращает снижение уровня микроциркуляции в костной ткани, что выражалось в замедлении истончения костных трабекул, и предупреждает возникновение в них микропереломов.

Ключевые слова: остеопороз, микроциркуляция, эндотелиальная дисфункция, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента, эналаприл, фитоалексин, резвератрол.

Важным звеном в патогенезе остеопоротических нарушений является снижение кровоснабжения костной ткани, которое вызывает дисбаланс в процессах ремоделирования и репаративной регенерации костной ткани [11].

Одной из причин ухудшения регионарного кровоснабжения костной ткани, по нашему мнению, является эндотелиальная дисфункция (ЭД), которая посредством негативного влияния на микроциркуляцию может приводить к нарушению процессов остеогенеза и остеорепарации, тем самым вызывая остеопороз [8, 11].

Строение микроциркуляторного русла костной ткани существенно отличается от морфологии сосудистого русла остальных тканей организма. Костные микрососуды имеют только эндотелий и не имеют мышечного и соединительнотканного слоев. Следовательно, именно эндотелий опосредует всю гуморальную регуляцию обмена между остеобластами, остеокластами и костью [1, 10].

В ходе проведенных нами исследований выявлены положительные остеопротективные эффекты у ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) эналаприла [5] и фитоалексина резвератрола при остеопоротических нарушениях [6]. Данные результаты свидетельствуют о целесообразности продолжения изучения этих веществ в комбинации, для целенаправленного фармакологического воздействия на остеопоротические изменения.

Цель исследования: оценка остеопротективных качеств комбинации резвератрола с эналаприлом на модели экспериментального остеопороза в сравнении с кальцием Д3 фирмы Никомед.

Материалы и методы. Опыты проводили на 132 самках белых крыс линии Вистар массой 200-300 г. Все манипуляции в эксперименте выполнялись под наркозом (внутрибрюшинным введением раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг). Для проведения исследования животные были разделены на 5 групп: I – контрольная (интактные животные) (n = 42); II – после овариэктомии (n = 30) – модель остеопороза; III – после овариэктомии животные ежедневно в течение 8 недель получали комбинацию препаратов – резвератрол 2 мг/кг и эналаприл 0,5 мг/кг (n = 20); V – крысы после овариэктомии восемь недель внутрижелудочно получали препарат сравнения – кальций Д3 в дозе 85,7 мг/кг (n = 20).

Системный остеопороз моделировался путем двусторонней овариэктомии [13]. Для подтверждения развития последнего и оценки эффективности исследуемых препаратов через восемь недель (на 57-й день) после овариэктомии проводили гистоморфометрию костной ткани [7].

Перед выведением крыс из эксперимента, через 8 недель после овариэктомии, измерялся уровень микроциркуляции в костной ткани проксимального метафиза бедренной кости [5, 7]. После определения внутрикостного уровня микроциркуляции



проводились пробы на эндотелийзависимую вазодилатацию (ЭЗВД) в ответ на однократное внутривенное введение раствора ацетилхолина в дозе 40 мкг/кг [10] и эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭНВД) в ответ на однократное внутривенное введение раствора нитропрусида натрия в дозе 30 мкг/кг [1].

Для изучения остеопротективного действия нами была выбрана комбинация препаратов, состоящая из резвератрола и эналаприла, которые обладают выраженным эндотелиопротективным действием, доказанным в ходе ранее проведенных исследований в лаборатории кардиофармакологии НИИ Экологической медицины КГМУ: фитоалексин резвератрол (4,5,4^l-тригидрокси-транс-стильбен) («Greensyn», GuangzhouLtd.) [8] и ингибитор АПФ эналаприла малеат («Рениприл», ОАО «Фармстандарт-Лексредства») [2, 4]. Резвератрол вводился внутривентально в дозе 2 мг/кг ежедневно однократно в сутки в течение восьми недель, что соответствует данным доступной литературы и выявляет эффективное эндотелиопротективное действие данного вещества в экспериментах, ранее проведенных в нашей лаборатории. Эналаприл животные получали ежедневно однократно в сутки внутривентально в виде взвеси в 1% крахмальном клейстере в дозе 0,5 мг/кг. Для сравнительного анализа нами было использовано известное лекарственное средство, применяемое в лечении остеопоротических нарушений, – кальций Д3 (фирмы Никомед) в дозе 85,7 мг/кг (в пересчете на кальций), который также вводился ежедневно однократно в сутки внутривентально в 1% крахмальном клейстере. Животные, не подвергавшиеся лечению, получали по той же схеме 1% крахмальным клейстер.

Статистический анализ полученных данных осуществляли в программе MicrosoftExcel при помощи средств пакета анализа. «Описательная статистика» применялась для нахождения среднего значения (M) показателей и ошибки среднего (m). «Двухвыборочный t-тест с различными дисперсиями» использовался для сравнения соответствующих показателей в различных группах животных и определения достоверности различий между ними. Статистически значимыми считали различия при значениях двустороннего $p < 0,05$.

Результаты. Результаты лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) позволили констатировать достоверно более низкий уровень микроциркуляции в костной ткани у крыс через восемь недель после овариэктомии – $61,5 \pm 3,7$ перфузионных единиц (ПЕ) по сравнению с интактными животными – $100,5 \pm 4,4$ ПЕ. При анализе активности комбинации, в состав которой входили резвератрол и эналаприл, было выявлено, что у животных уровень микроциркуляции был равен $108,6 \pm 19,0$ ПЕ. Эти данные говорят о том, что исследуемые препараты эффективно предотвращают снижение уровня регионарного кровотока в костной ткани бедра после овариэктомии, особенно это выражено у комбинации резвератрола с эналаприлом. Показатель микроциркуляции у группы животных, получавших кальций Д3, составил $61,5 \pm 3,9$ ПЕ, что не отличается от группы крыс после овариэктомии, которым не проводилось лечения.

Для подтверждения роли дисфункции эндотелия в развитии нарушения регионарной микроциркуляции рассчитывался коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД) на основании данных ЛДФ. В ответ на системное введение ацетилхолина и нитропрусида наблюдается снижение микроциркуляции с последующей нормализацией показателей кровотока. КЭД определялся как отношение площади треугольника над кривой восстановления микроциркуляции в ответ на введение нитропрусида к площади треугольника над кривой восстановления микроциркуляции в ответ на введение ацетилхолина. В группе интактных животных получили $КЭД = 1,3 \pm 0,2$, в группе крыс с остеопорозом $КЭД = 2,4 \pm 0,2$. Эти результаты демонстрируют формирование изменений, свидетельствующих о дисфункции эндотелия сосудов микроциркуляторного русла костной ткани после овариэктомии.

Коэффициент эндотелиальной дисфункции у крыс, получавших резвератрол, снижался до $1,3 \pm 0,2$, а у животных, где применялась комбинация резвератрола с эналаприлом, – до $1,2 \pm 0,2$. Данные показатели достоверно не отличались от показателей интактных животных. В группе, где проводилась терапия кальцием Д3, КЭД был равен $2,2 \pm 0,2$. Статистических различий с параметрами КЭД у животных с остеопорозом нет.

Остеопоротические изменения в костях скелета были гистологически подтверждены у всех крыс через восемь недель после овариэктомии и выражались в истончении костных трабекул и увеличении межтрабекулярного пространства (рис. 1). В гистологических препаратах отмечались микропереломы костных трабекул. О прижизненном возникновении микропереломов судили по прорастанию соединительной ткани в зоне перелома трабекулы (рис. 2).

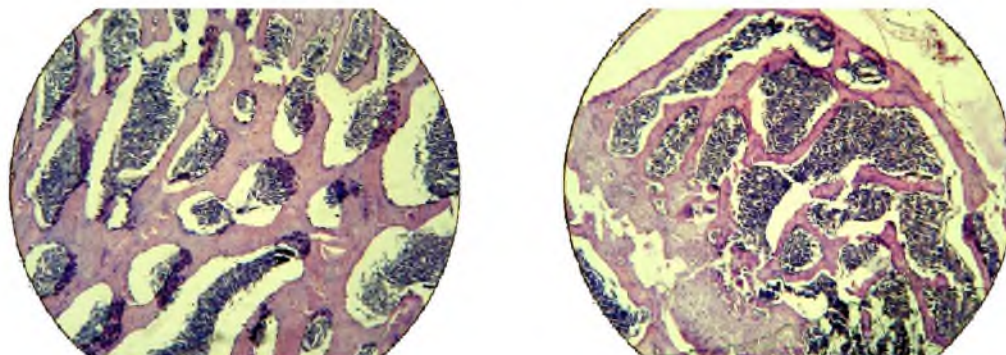


Рис. 1. Морфологическая картина проксимального метафиза бедренной кости. Слева – у интактной крысы, справа – у крысы с генерализованным остеопорозом. Окраска гематоксилин-эозином, ув. 100

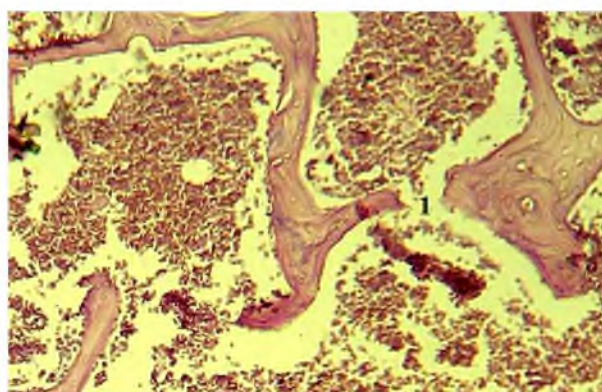


Рис. 2. Микроперелом костной трабекулы (1) в проксимальном метафизе бедра. Окраска гематоксилин-эозином, ув. 400

При микроскопии и гистоморфометрии срезов проксимального отдела бедренной кости у крыс, получавших лечение, обнаружили отсутствие микропереломов трабекул, сохранение структуры костной ткани и большую ширину костных трабекул, чем у крыс с остеопорозом, не получавших лечения (рис. 3). Резвератрол и комбинация резвератрола с эналаприлом оказывали статистически значимое влияние на среднюю ширину костных трабекул: резвератрол увеличивал среднюю ширину трабекул на 45,9%, а комбинация резвератрола с эналаприлом – на 52,7% по сравнению с крысами, страдающими остеопорозом. При этом у животных, которым проводилась терапия остеопороза кальцием Д3, увеличение средней ширины трабекул составило только 14,3% (рис. 4).

Обсуждение. Эндотелий в сосудистой сети играет центральную регуляторную роль, обеспечивая связь с остальными слоями стенки сосуда и адекватно отвечая на их потребности выделением медиаторов [3, 9]. Таким образом, можно думать, что эндотелий сосудов костной ткани, являясь неотъемлемой частью кости, во многом определяет состояние регионарной микроциркуляции, а также тем самым отвечает за поддержание гомеостаза в костной ткани.

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

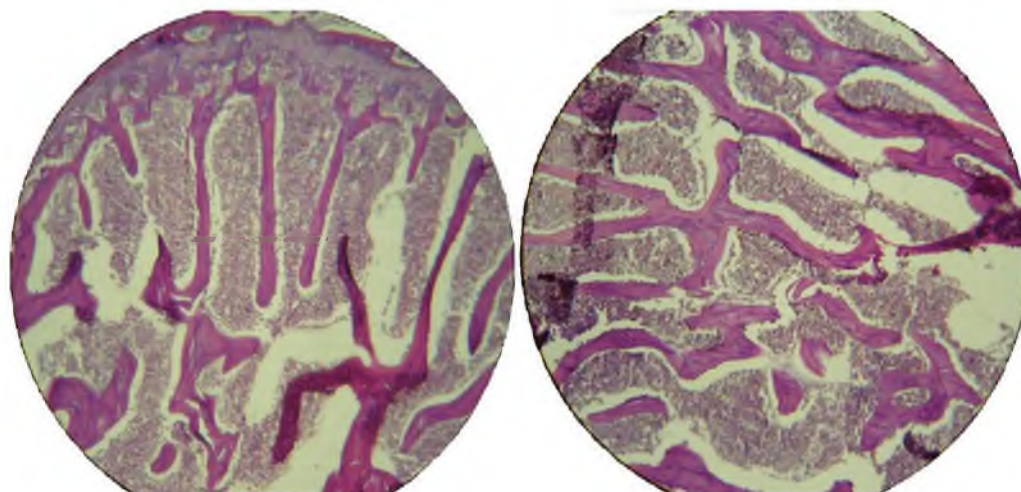


Рис. 3. Морфологическая картина проксимального метафиза бедренной кости. Слева – у крысы после овариэктомии, получавшей кальций Д3, справа – у крысы после овариэктомии, получавшей комбинацию резвератрола с эналаприлом. Окраска гематоксилин-эозином, ув. 100

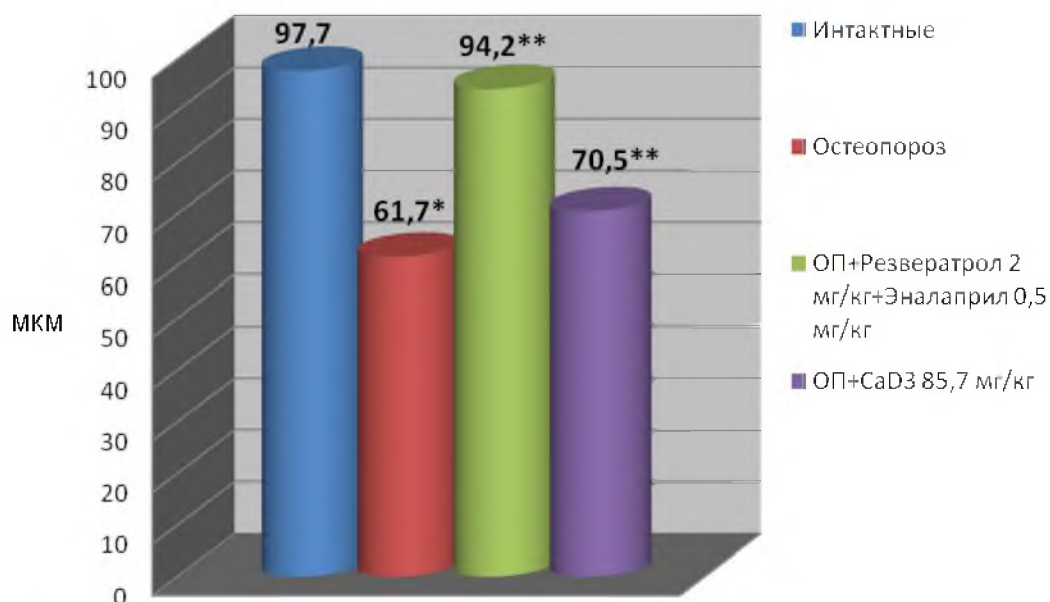


Рис. 4. Влияние резвератрола, комбинации резвератрола с эналаприлом и кальция Д3 на среднюю ширину костных трабекул в проксимальном метафизе бедра крыс.
* – $p < 0,05$ по сравнению с группой интактных животных; ** – $p < 0,05$ по сравнению с группой крыс с экспериментальным остеопорозом

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-мометил-L-аргинина и N^G-нитро-L-аргинина. Известно, что краткосрочное воздействие на эндотелиоциты резвератрола в невысоких концентрациях (1-10 μ M) 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. Определенный вклад при гипоэстрогениндуцированной эндотелиальной дисфункции вносят эстрогенные свойства резвератрола. Последний связывается с рецепторами эстрогена,



активируя тем самым процесс матричного синтеза чувствительных к эстрогену генов-репортеров. У крыс, после овариэктомии, резвератрол действует как антагонист рецептора эстрогена [8]. Кроме того, резвератрол усиливает степень сосудистой релаксации, зависящей от эндотелина (в ответ на ацетилхолин) и подобно эстрадиолу предотвращает возможность снижения прочности костной ткани.

Ингибитор АПФ эналаприл влияет на эндотелиальную дисфункцию путем восстановления метаболизма брадикинина: блокада тканевого АПФ приводит не только к уменьшению синтеза АТ-2, но и замедлению деградации брадикинина [2]. Также под действием эналаприла возможно снижение базальной и инсулин-индуцированной секреции эндотелина-1 и увеличение продукции NO, что по нашему мнению благотворно опосредованно действует на регенерацию костной ткани [5].

Таким образом, комбинация резвератрола с эналаприлом, оказывая эндотелиопротективное воздействие на эндотелий микроциркуляторного русла, потенцирует процессы ремоделирования и репаративной регенерации костной ткани.

Выводы:

1. Через восемь недель после овариэктомии у самок крыс линии Вистар развивается эндотелиальная дисфункция сосудов микроциркуляторного русла костной ткани со значительным (до 40%) ухудшением регионарного кровотока, что в свою очередь приводит к истончению костных трабекул в среднем на 39,4% и возникновению в них микропереломов, т. е. к остеопорозу.

2. Кальций Д3 (Никомед) в дозе 85,7 мг/кг на модели остеопороза не оказывает влияния на кровоснабжение костной ткани, но обладает незначительным положительным воздействием на ширину костных трабекул в проксимальном метафизе бедренной кости у крыс.

3. Комбинация лекарственных средств, состоящая из резвератрола в дозе 2 мг/кг и эналаприла в дозе 0,5 мг/кг, обладает наиболее ярким эндотелиопротективным действием, тем самым эффективно предотвращая снижение уровня регионарной микроциркуляции в костной ткани, следствием чего является выраженный остеопротективный эффект.

Литература

1. Брошусь, В.В. Оксид азота как регулятор защитных и гомеостатических реакций организма / В.В. Брошусь // Укр. ревматол. журн. – 2003. – № 4. – С. 3-11.
2. Майчук, Е.Ю. Современные представления об использовании ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента для лечения артериальной гипертензии / Е.Ю. Майчук, И.В. Воеводина // Рус. мед. журн.: Кардиология. – 2005. – Т. 13, № 19. – С. 1287-1291.
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., Гудырев О.С., Файтельсон А.В. и др. Патент РФ «Способ коррекции остеопороза и профилактики возникновения остеопоротических переломов эналаприлом», № 2369390, бюл. № 28, зарегистрирован 10.10.2009 г.
5. Протективное действие эналаприла и лозартана при экспериментальном остеопорозе / О.С. Гудырев, А.В. Файтельсон, М.В. Покровский и др. // Человек и его здоровье. – 2011. – №2. – С. 9-14.
6. Остеопротективное действие эналаприла, лозартана и резвератрола при экспериментальном остеопорозе / О.С. Гудырев, А.В. Файтельсон, М.В. Покровский и др. // «Научные ведомости» Белгородского государственного университета. – 2011. – № 22(117), вып. 16/2. – С. 9-14.
7. Фармакологическая коррекция экспериментального остеопороза и переломов на его фоне / А.В. Файтельсон, Г.М. Дубровин, О.С. Гудырев и др. // Вестник травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова. – 2010. – № 3. – С. 47-51.
8. 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. // Кубан. науч. мед. вестн. – 2006. – № 9(90). – С. 150-152.
9. 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.
10. Role of superoxide in angiotensin II-induced but catecholamine-induced hypertension / J.B. Laursen, S. Rajagopalan, Z. Galis et al. // Circulation. – 1997. – Vol. 95. – P. 588-593.



11. Napoli, C. Nitric oxide and atherosclerosis / C. Napoli, L.J. Ignarro // Nitric Oxide. – 2001. – Vol. 5. – P. 88-97.
12. 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.
13. 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.

PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF EXPERIMENTAL OSTEOPOROSIS OF COMBINATION RESVERATROL WITH ENALAPRIL

A.V. FAITELSON

Kursk State Medical University

e-mail: vladimirfaitelson@gmail.com

In experiment on white Wistar female rats the osteoprotective action of combination resveratrol with enalapril was investigated on 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. Combination resveratrol with enalapril prevented a microcirculation level depression in an osteal tissue, that has shown in retardation of an osteal trabecules thinning and in preventing the occurrence of these microfractures.

Key words: osteoporosis, microcirculation, endothelial dysfunction, angiotensin converting enzyme inhibitor, enalapril, fitoalexine, resveratrol.