

@ Коллектив авторов, 2012

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ ЭНДОТЕЛИЙАССОЦИИРОВАННОЙ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОПОРОЗА РЕЗВЕРАТРОЛОМ И ЭТОКСИДОЛОМ

А.В. Файтельсон, Г.М. Дубровин, О.С. Гудырев, М.В. Покровский,  
А.В. Иванов, Д.С.Р. Раджкумар

ГОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России

*В эксперименте на 140 самках белых крыс линии Вистар изучалось остеопротективное действие резвератрола и этоксида на модели экспериментального остеопороза. Было выявлено, что после овариэктомии у крыс развивается эндотелиальная дисфункция сосудов микроциркуляторного русла костной ткани, приводящая к возникновению остеопороза. Резвератрол в отличие от этоксида препятствовал снижению уровня микроциркуляции в костной ткани, предупреждал ухудшение процессов костного ремоделирования при развивающемся остеопорозе, что выражалось в замедлении истончения костных трабекул и предотвращении возникновения в них микропереломов.*

**Ключевые слова:** остеопороз, микроциркуляция, эндотелиальная дисфункция, резвератрол, этоксидол, кальций- $D_3$  Никомед.

### *Comparative Assessment of Endothelium-Associated Correction of Experimental Osteoporosis with Resveratrol and Etoksidol*

A.V. Faitel'son, G.M. Dubrovin, O.S. Gudyryn, M.V. Pokrovskiy,  
A.V. Ivanov, D.S.R. Radjkumar

*Osteoprotective action of resveratrol and etoksidol was studied on the model of experimental osteoporosis (140 female Wistar rats). It was detected that endothelial dysfunction of bone tissue microcirculation bed that led to osteoporosis development. In contrast to etoksidol, resveratrol prevented the reduction of bone tissue microcirculation level and the aggravation of bone remodeling processes in developing osteoporosis that was manifested by delayed bone trabeculae thinning and averting of microfractures in them.*

**Key words:** osteoporosis, microcirculation, endothelial dysfunction, resveratrol, etoksidol, calcium- $D_3$  Nicomed.

Остеопороз — заболевание, в основе развития которого лежит дисбаланс между процессами костного ремоделирования, результатом которого чаще всего являются переломы костей скелета [6–8].

Важную роль в процессах ремоделирования и репаративной регенерации костной ткани играет кровоснабжение кости [12]. В костных микрососудах имеется только эндотелий и отсутствуют мышечный и соединительнотканый слои. Следовательно, именно эндотелий опосредует всю гуморальную регуляцию обмена между остеобластами, остеокластами и кровью [1, 14]. Одной из причин ухудшения регионарного кровоснабжения костной ткани является эндотелиальная дисфункция (ЭД), результатом которой может стать нарушение процессов остеогенеза и остеорепарации.

Основным механизмом развития ЭД является снижение образования и биодоступности оксида азота (NO) при одновременном повышении уровня супероксид аниона и продукции мощных вазоконстрикторов, т.е. имеет место нарушение соотношения медиаторов, в норме обеспечивающих оптимальное течение всех эндотелийзависимых процессов [1, 2].

Ранее нами были выявлены положительные остеопротективные эффекты у ангиотензинпревращающего фермента эналаприла и блокатора ангиотензиновых рецепторов лозартана при остеопорозе [3]. Данные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения веществ, с помощью которых можно фармакологически целенаправленно воздействовать на дефицит NO при нарушениях, характерных для остеопороза. Все вышеизложенное указывает на актуальность исследования остеопротективного действия препаратов с доказанными положительными эндотелиотропными эффектами.

Цель исследования: оценить остеопротективное действие новых производных 3-оксипиридина—этоксида и 3,4,5-тригидрокси-транс-стильбена—резвератрола.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на 140 самках белых крыс линии Вистар массой 200–300 г. Все манипуляции в эксперименте выполняли под наркозом (внутрибрюшинно вводили раствор хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг). Для проведения исследования живот-

ные были разделены на 5 групп: 1-я ( $n=42$ ) — контрольная (интактные животные); 2-я ( $n=30$ ) — животные после овариэктомии; 3-я ( $n=20$ ) — крысы после овариэктомии, которым ежедневно 1 раз в сутки внутривенно в течение 8 нед вводили резвератрол в дозе 2 мг/кг; 4-я ( $n=28$ ) — животные после овариэктомии, которым в те же сроки и тем же способом вводили этоксидол по 12,5 мг/кг; 5-я ( $n=20$ ) — крысы после овариэктомии, которые 8 нед ежедневно 1 раз в сутки внутривенно получали препарат сравнения — кальций- $D_3$  Никомед в дозе 85,7 мг/кг в пересчете на кальций (препарат вводили в 1% крахмальном клейстере). Животные 1-й и 2-й групп по той же схеме получали 1% крахмальный клейстер.

Системный остеопороз моделировали путем двусторонней овариэктомии [15]. Для подтверждения развития последнего и оценки эффективности исследуемых препаратов через 8 нед (на 57-й день) после овариэктомии проводили гистоморфометрию костной ткани [10].

Перед выведением крыс из эксперимента, через 8 нед после овариэктомии, оценивали микроциркуляцию в костной ткани проксимального метафиза бедренной кости [3, 10]. После этого проводили пробы на эндотелийзависимую вазодилатацию в ответ на однократное внутривенное введение раствора ацетилхолина в дозе 40 мкг/кг [13] и эндотелийнезависимую вазодилатацию в ответ на однократное внутривенное введение раствора нитропруссид натрия в дозе 30 мкг/кг [2].

Для изучения остеопротективного действия нами были выбраны препараты, обладающие выраженным эндотелиопротективным свойством, доказанным в ходе ранее проведенных исследований в лаборатории кардиофармакологии НИИ Экологической медицины КГМУ: фитоалексин резвератрол (4,5,4'-тригидрокси-транс-стильбен) («Greensyn», Guangzhou Ltd.) [4] и производное 3-оксипиридина этоксидол [3]. Для сравнения использовали известное лекарственное средство, применяемое в лечении остеопороза, — кальций- $D_3$  Никомед.

Статистический анализ полученных данных осуществляли в программе Microsoft Excel при помощи средств пакета анализа. Описательную статистику применяли для нахождения среднего значения показателей ( $M$ ) и ошибки среднего ( $m$ ). Двухвыборочный  $t$ -тест с различными дисперсиями использовали 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

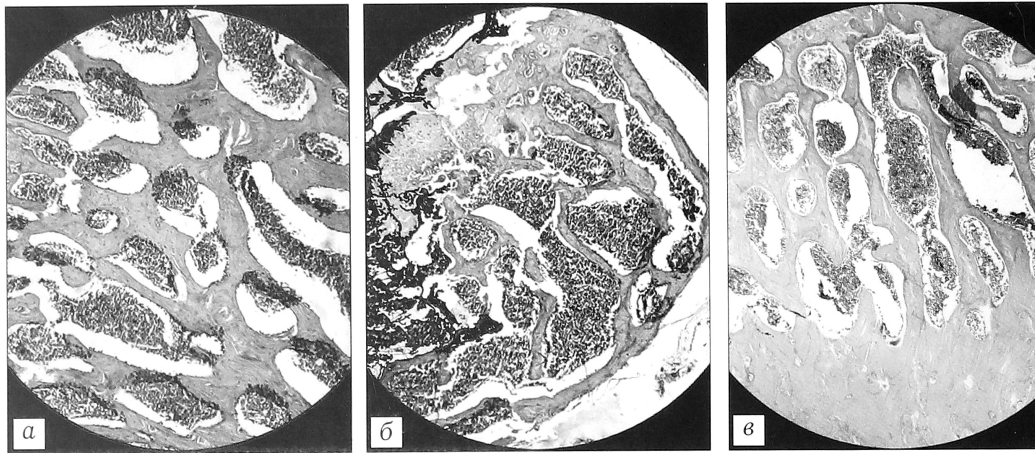
Результаты лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) позволили констатировать достоверно более низкий уровень микроциркуляции в костной ткани у крыс через 8 нед после овариэктомии —  $61,5 \pm 3,7$  перфузионных единиц (п.е.) по сравнению

с интактными животными —  $100,5 \pm 4,4$  п.е. Было выявлено, что в группе крыс, получавших резвератрол, уровень микроциркуляции составил  $91,0 \pm 12,8$  п.е., у животных, получавших этоксидол, —  $65,5 \pm 3,4$  п.е., у крыс, которым вводили кальций- $D_3$  Никомед, —  $61,5 \pm 3,9$  п.е. Эти данные свидетельствуют о том, что резвератрол эффективно предотвращает снижение уровня регионарного кровотока в костной ткани бедра после овариэктомии, тогда как на фоне приема этоксидола и кальций- $D_3$  Никомеда показатели микроциркуляции достоверно не отличались от параметров у крыс после овариэктомии, не получавших лечение.

Для подтверждения роли дисфункции эндотелия в развитии нарушения регионарной микроциркуляции рассчитывали коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД) на основании данных ЛДФ. В ответ на системное введение ацетилхолина и нитропруссид наблюдается снижение микроциркуляции с последующей нормализацией показателей кровотока. КЭД определяли 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. В группе интактных животных получили КЭД составил  $1,3 \pm 0,2$ , в группе крыс с остеопорозом —  $2,4 \pm 0,2$ , что указывает на развитие дисфункции эндотелия сосудов микроциркуляторного русла костной ткани после овариэктомии. КЭД у крыс, получавших резвератрол, снижался до значений  $1,3 \pm 0,2$  и соответствовал таковому у интактных животных. В группах, где проводилась терапия этоксидолом и препаратом кальций- $D_3$  Никомед КЭД был равен  $2,1 \pm 0,2$  и  $2,2 \pm 0,2$  соответственно и статистически не отличался от КЭД у животных с остеопорозом. Это обстоятельство свидетельствует о том, что этоксидол и кальций- $D_3$  Никомед не обладают эндотелиопротективными эффектами.

Наличие изменений, характерных для остеопороза, было гистологически подтверждено у всех крыс через 8 нед после овариэктомии. Нарушения выражались в истончении костных трабекул и увеличении межтрабекулярного пространства (см. рисунок, а, б). Также в гистологических препаратах отмечались микропереломы костных трабекул. О прижизненном возникновении микропереломов судили по прорастанию соединительной ткани в зоне перелома трабекулы.

По данным микроскопии и гистоморфометрии срезов бедренной кости у крыс, получавших резвератрол, отсутствовали микропереломы трабекул, была сохранена структура костной ткани, а ширина костных трабекул была больше, чем у крыс с остеопорозом, не получавших лечения, и у животных, которым вводили этоксидол (см. рисунок, в). Фитоалексин резвератрол оказывал достоверно значимое положительное влияние на ширину костных трабекул, увеличивал среднее значения пос-



Морфологическая картина проксимального метафиза бедренной кости — у интактной крысы (а), у крысы с генерализованным остеопорозом (б) и у крысы с генерализованным остеопорозом, получавшей резвератрол (в).  
Окраска гематоксилином и эозином, ув. 100.

Средние показатели ширины костной трабекулы в проксимальном метафизе бедренной кости крыс через 8 нед после билатеральной овариэктомии

Группа животных	Ширина костной трабекулы, мкм
Интактные	97,7
Остеопороз	61,7*
Остеопороз+этоксидол	64,7**
Остеопороз+резвератрол	84,8**
Остеопороз+кальций- $D_3$ Никомед	70,5**

\* —  $p < 0,05$  по сравнению с интактными животными;  
\*\* —  $p < 0,05$  по сравнению с крысами с экспериментальным остеопорозом.

ледней на 45,9% по сравнению с крысами, страдающими остеопорозом. При этом у животных, у которых применяли кальций- $D_3$  Никомед, увеличение средней ширины трабекул составило только 14,3%. У крыс, которым вводили этоксидол, наблюдалось некоторое повышение данного параметра по сравнению с животными с остеопорозом, однако эти различия не переходили уровень статистической значимости (см. таблицу).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Эндотелий в сосудистой сети играет центральную регуляторную роль, обеспечивая связь с остальными слоями стенки сосуда и адекватно отвечая на их потребности выделением медиаторов [5]. Таким образом, можно предположить, 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.

Представитель группы фитоалексинов резвератрол вызывает эндотелийзависимое расслабление кровеносных сосудов посредством усиления

выработки NO и последующего увеличения уровня цГМФ. Вместе с тем данные эффекты ослабляются при введении конкурентных ингибиторов эндотелиальной NO-синтазы (eNOS)  $N^G$ -монометил-L-аргинина и  $N^G$ -нитро-L-аргинина. Известно, что краткосрочное воздействие на эндотелиоциты резвератрола в невысоких концентрациях (1–10 мкМ) увеличивает количество производимого NO, что объясняется краткосрочным повышением активности eNOS и сокращением продукции супероксидов в эндотелии. Резвератрол стимулирует в хронологическом порядке продукцию eNOS и VEGF. Напротив, ингибирование выработки NO ингибиторами eNOS существенным образом снижает митогенные и ангиогенные эффекты, стимулируемые VEGF. Определенный вклад при гипоестрогениндукцированной 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 агонист рецептора эстрогена [4]. Кроме того, резвератрол усиливает степень сосудистой релаксации, зависящей от эндотелина (в ответ на ацетилхолин) и подобно эстрадиолу предотвращает снижение прочности костной ткани.

Окисленные липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) являются очень токсичными для клеток и могут быть ответственными за повреждение эндотелиального слоя и гибель гладкомышечных клеток [6]. Перекисно модифицированные ЛПНП задерживают образование или инактивируют NO. При гиперхолестеринемии, когда выработка эндотелиальными клетками и макрофагами супероксидного радикала повышена, создаются условия для непосредственного взаимодействия NO с супероксидным радикалом с образованием пероксинитрата (ONNN-), также обладающего сильным окислительным потенциалом. При этом переключение NO на образование пероксинитрата лишает его возможности проявить защитный эффект в отношении эндотелия [5]. Антиоксиданты, в частности новое производное 3-оксипири-

дина этоксилол, ингибируют действие гладкомышечноклеточной (ГМК)-КоА-редуктазы, тем самым оказывают более выраженный защитный эффект на эндотелий сосудов [9]. Это обстоятельство доказывает положительное действие препаратов этой группы при ишемической болезни сердца. Известно, что костные микрососуды не имеют гладкомышечного слоя, только эндотелий. Данный факт объясняет неэффективность этоксилола при остеопорозе.

Таким образом, из исследуемых препаратов только резвератрол, оказывая эндотелиопротективное воздействие на эндотелий микроциркуляторного русла, потенцирует процессы ремоделирования и репаративной регенерации костной ткани.

### ВЫВОДЫ

1. Резвератрол в дозе 2 мг/кг эффективно предупреждает снижение уровня регионарной микроциркуляции в костной ткани, что способствует поддержанию процессов костного ремоделирования при развивающемся остеопорозе.

2. Этоксидол в дозе 12,5 мг/кг не оказывает статистически значимого влияния на уровень регионарной микроциркуляции и ширину костных трабекул.

3. Кальций-Д<sub>3</sub> Никомед в дозе 85,7 мг/кг на модели остеопороза у крыс не оказывает влияния на кровоснабжение костной ткани, но незначительно увеличивает ширину костных трабекул в проксимальном метафизе бедренной кости.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Брошусь В.В. Оксид азота как регулятор защитных и гомеостатических реакций организма // Укр. ревматол. журн. — 2003. — N 4. — С. 3-11.
2. Галаган М.Е., Широколова А.В., Ванин А.Ф. Гипотензивное действие оксида азота, продуцируемого из экзо- и эндогенных источников // Вопр. мед. химии. — 1991. — Т. 37, N 1. — С. 67-70.
3. Гудырев О.С., Файтельсон А.В., Покровский М.В. и др. Протективное действие эналаприла и лозартана при экспериментальном остеопорозе // Курский науч.-

практ. вестн. «Человек и его здоровье». — 2011. — N 2. — С. 9-14.

4. Кочкаров В.И., Покровский М.В., Корнеев М.М. и др. Эндотелиопротективные эффекты резвератрола и его комбинаций с эналаприлом и лозартаном при экспериментальном моделировании дефицита оксида азота // Кубан. науч.-мед. вестн. — 2006. — N 9 (90). — С. 150-152.
5. Марков Х.М. Оксидантный стресс и дисфункция эндотелия // Патол. физиология и эксперим. терапия. — 2005. — N 4. — С. 5-9.
6. Медведев Ю.В. Гипоксия и свободные радикалы в развитии патологических состояний организма — М., 2000. — С. 74-75.
7. Насонов Е.Л. Вторичный остеопороз: патогенез и клиническое значение при воспалительных заболеваниях суставов // Остеопороз и остеопатии. — 1998. — N 3. — С. 18-20.
8. Руководство по остеопорозу / Под ред. Л.И. Беневоленской. — М., 2003.
9. Смирнов Л.Д. Современные средства и методы антиоксидантной фармакотерапии. 1. Гетероароматические антиоксиданты — универсальные средства антиоксидантной фармакотерапии // Энциклопедия инженера-химика. — 2007. — N 5. — С. 16-24.
10. Файтельсон А.В., Дубровин Г.М., Гудырев О.С. и др. Фармакологическая коррекция экспериментального остеопороза и переломов на его фоне // Вестн. травматол. ортопед. — 2010. — N 3. — С. 47-51.
11. Якушев В.И., Стабровская Н.В., Рагулина В.А. и др. Влияние антиоксидантов на эндотелиальную дисфункцию при моделировании L-name-индуцированного дефицита оксида азота // Кубан. науч.-мед. вестн. — 2010. — N 9 (123). — С. 186-190.
12. Alagiakrishnan K., Juby A., Hanley D. et al. Role of vascular factors in osteoporosis // J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci. — 2003. — Vol. 58. — P. 362-366.
13. Laursen J.B., Rajagopalan S., Galis Z. et al. Role of superoxide in angiotensin II-induced but catecholamine-induced hypertension // Circulation. — 1997. — Vol. 95. — P. 588-593.
14. Napoli C., Ignarro L.J. Nitric oxide and atherosclerosis // Nitric Oxide. — 2001. — Vol. 5. — P. 88-97.
15. Stimpel M., Jee W. S., Ma Y. et al. 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 // J. Hypertens. — 1995. — Vol. 13. — P. 1852-1856.

**Сведения об авторах:** Файтельсон А.В. - канд. мед. наук, доцент кафедры травматологии, ортопедии и ВПХ КГМУ; Дубровин Г.М. — профессор, доктор мед. наук, зав. кафедрой травматологии, ортопедии и ВПХ КГМУ; Гудырев О.С. — канд. мед. наук, докторант кафедры клинической фармакологии КГМУ; Покровский М.В. — профессор, доктор мед. наук, зав. кафедрой фармакологии и фармацевтических дисциплин ИПМО НИУ «БелГУ»; Иванов А.В. — доктор мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии КГМУ; Раджжумар Д.С.Р. — аспирант кафедры травматологии, ортопедии и ВПХ КГМУ.

**Для контактов:** Файтельсон Александр Владимирович. 305004, Курск, ул. Ленина, дом 65, кв.22. Тел.: 8(4712)58-73-14. E-mail: vladimirfaitelson@gmail.com

