

5. Davidson M.R. Pharmacotherapeutic for osteoporosis prevention and treatment //J. Midwifery Womens Health. — 2003. — N 48. — P. 39–52.
6. Lippuner K.A. Medical treatment of vertebral osteoporosis //Eur. Spine J. — 2003. — N 12. — P. 132–141.
7. Marquis P., Roux C., Diaz-Curiel M. Long-term beneficial effects of strontium ranelate on the quality of life in patients with vertebral osteoporosis (SOTI study) //Osteoporosis Int. — 2007. — N 18. — P. 123.
8. Szpalski M.A., Gunzburg R.B. Vertebral osteoporotic compression fractures. — New York, 2003.

Сведения об авторе: Астапенков Данила Сергеевич — канд. мед. наук, ассистент кафедры травматологии, ортопедии и ВПХ Челябинской ГМА.

Для контактов: 454018, Челябинск, ул. Колхозная, дом 36, кв. 272. Тел.: (351) 231-88-62; 8-912-31-97-750. E-mail: astapenkov@mail.ru

© Коллектив авторов, 2010

## ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОПОРОЗА И ПЕРЕЛОМОВ НА ЕГО ФОНЕ

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

ГОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития»

*В эксперименте на самках белых крыс линии Вистар (222 животных) изучалось остеопротекторное действие препаратов эналаприла и лозартана на моделях экспериментального остеопороза и переломов на его фоне. Выявлено, что после овариэктомии у крыс развивается эндотелиальная дисфункция сосудов микроциркуляторного русла костной ткани, приводящая к возникновению остеопороза и ухудшению сращения экспериментальных переломов. Эналаприл и лозартан предотвращали снижение уровня микроциркуляции в костной ткани, что способствовало замедлению истончения костных трабекул, предупреждало их микропереломы и увеличивало частоту сращений экспериментальных переломов.*

Ключевые слова: остеопороз, микроциркуляция, эндотелиальная дисфункция, ингибитор ангиотензинпревращающего фермента, блокатор ангиотензиновых рецепторов.

### *Pharmacologic Correction in Experimental Osteoporosis and Osteoporotic Fractures*

*A.V. Fattel'son, G.M. Dubrovin, O.S. Gudyrev, M.V. Pokrovskiy, A.V. Ivanov*

*Osteoprotective effect of enalapril and losartan was studied using experimental model of osteoporosis and osteoporotic fractures (222 female Wistar rats). It was detected that in rats after ovariectomy endothelial vascular dysfunction of microcirculation in bone tissue bed developed. Those changes caused osteoporosis and delayed experimental fracture healing. Enalapril and losartan prevented the decrease of microcirculation level in bone tissue that promoted slowing-down of osseous trabecula thinning, prevented microfractures and increased the healing rate of experimental fractures.*

Key words: osteoporosis, microcirculation, endothelial dysfunction, angiotensin converting enzyme inhibitor, angiotensin receptor blockers.

Значительную роль в процессах костного ремоделирования и репаративной регенерации костной ткани играет кровоснабжение кости [4, 7]. 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 [1, 9]. Однако сведений об использовании эндотелия сосудов кости в качестве мишени для целенаправленного фармакологического воздействия при остеопоротических изменениях мы в литературе не нашли. По нашему мнению, одной из причин ухудшения регионарного кровоснабжения костной ткани является эндотелиальная дисфункция, которая посредством

негативного влияния на микроциркуляцию может приводить к нарушению процессов остеогенеза и остеорепаляции, тем самым вызывая остеопороз.

Увеличение частоты остеопороза и его осложнений указывает на то, что в настоящее время нет надежных методов медикаментозного лечения и профилактики этого заболевания. В терапии остеопороза не уделяется должного внимания препаратам, способным оказывать положительное влияние на кровоснабжение костной ткани. Это определяет актуальность исследования остеопротекторного действия препаратов с доказанными положительными эндотелиотропными эффектами.

Целью нашего исследования была оценка остеопротекторного действия ингибитора ангиотензин-

превращающего фермента эналаприла и блокатора ангиотензиновых рецепторов лозартана на моделях экспериментального остеопороза и переломов на его фоне.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на 222 самках белых крыс линии Вистар массой 200–300 г. Все манипуляции выполнялись под наркозом (внутрибрюшинное введение раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг). Животные были разделены на 8 групп: 1-я группа — контрольная (интактные животные,  $n=42$ ); 2-я группа — овариэктомия ( $n=30$ ); 3-я группа — овариэктомия с последующим ежедневным внутривенным введением эналаприла 0,5 мг/кг в течение 8 нед ( $n=5$ ); 4-я группа — овариэктомия с последующим введением в те же сроки и тем же способом лозартана 6 мг/кг ( $n=35$ ); 5-я группа — интактные животные после остеотомии проксимального метафиза бедра ( $n=20$ ); 6-я группа — овариэктомия и моделирование через 8 нед перелома проксимального метафиза бедра ( $n=20$ ); 7-я группа — овариэктомия, моделирование через 8 нед перелома проксимального метафиза бедра и введение в течение всего периода внутривенно эналаприла 0,5 мг/кг ежедневно один раз в сутки ( $n=20$ ); 8-я группа — овариэктомия, моделирование через 8 нед перелома проксимального метафиза бедра и введение в течение всего периода внутривенно лозартана 6 мг/кг ежедневно один раз в сутки ( $n=20$ ).

Системный остеопороз моделировали путем двусторонней овариэктомии [10]. Для подтверждения его развития и оценки эффективности исследуемых препаратов через 8 нед (на 57-й день) после овариэктомии проводили гистоморфометрию костной ткани. Материал окрашивали гематоксилином и эозином. Предметные стекла с гистологическими препаратами подвергали световой микроскопии при помощи микроскопа Leica CME (объектив 10, окуляр 10) и производили фотографирование костных балок цифровым фотоаппаратом Olympus SP-350 с разрешением 3264×2448 пикселей путем сопоставления объектива фотокамеры и окуляра микроскопа. При выполнении гистоморфометрии костной ткани использовали программу ImageJ версии 1.39, которую предварительно откалибровывали следующим образом: применяя то же оборудование, что и для получения фотографий костных трабекул, фотографировали «линейку» длиной 1 мм на прозрачной подложке; измерив в программе ImageJ «линейку» в пикселях, принимали расстояние в 1425 пикселей равным 1 мм. В дальнейшем измеряли ширину костных трабекул и выражали ее в микрометрах.

В первых четырех группах перед выведением крыс из эксперимента через 8 нед после овариэктомии измеряли уровень микроциркуляции в костной ткани проксимального метафиза бедра. В межвертельной зоне бедренной кости рассверливали

отверстие глубиной 2,5–3 мм, диаметром 1 мм, в которое вводили игольчатый датчик. Для получения данных о состоянии микроциркуляции в кости использовали оборудование производства компании «Biorac systems» — полиграф MP100 с модулем лазерной доплеровской флоуметрии LDF100C и инвазивным игольчатым датчиком TSD144. После определения внутрикостного уровня микроциркуляции, не изменяя положения датчика, выполняли пробы на эндотелийзависимую вазодилатацию (ЭЗВД) в ответ на однократное внутривенное введение раствора ацетилхолина в дозе 40 мкг/кг [8] и эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭНВД) в ответ на однократное внутривенное введение раствора нитропруссид натрия в дозе 30 мкг/кг [2].

Для изучения остеопротекторного действия были выбраны препараты, обладающие выраженным эндотелиопротекторным действием: эналаприл в дозе 0,5 мг/кг и лозартан 6 мг/кг [3, 5, 6]. Препараты вводили ежедневно один раз в сутки внутривенно в виде взвеси в 1% крахмальном клейстере. Животные, не подвергавшиеся лечению, получали по той же схеме 1% крахмальный клейстер.

В последующих четырех группах животных через 8 нед после овариэктомии выполняли поперечную остеотомию проксимального метафиза бедренной кости. После моделирования перелома производили его интрамедуллярную фиксацию спицей Киришера диаметром 1 мм. Консолидацию отломков оценивали визуально и рентгенологически через 4 нед, предварительно осуществляли измерение параметров микроциркуляции в костной мозоли указанным выше способом.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Microsoft Excel при помощи средств пакета анализа. «Описательную статистику» применяли для нахождения среднего значения ( $M$ ) показателей и ошибки среднего ( $m$ ). «Двухвыборочный  $t$ -тест с различными дисперсиями» использовали для сравнения соответствующих показателей в разных группах животных и определения достоверности различий между ними. Статистически значимыми считали различия при значениях двустороннего  $p < 0,05$ . Зависимость между различными параметрами внутри одной группы оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона ( $r$ ), а также посредством построения точечных диаграмм с проведением линий регрессии. Ввиду невозможности применения критерия  $\chi^2$  (ожидаемые значения таблицы сопряженности 2×2 были менее 5) для оценки достоверности различий между долями использовали двусторонний вариант точного критерия Фишера.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты ЛДФ позволили констатировать достоверно более низкий уровень микроциркуляции в костной ткани крыс через 8 нед после овари-

эктомии ( $n=30$ ) —  $61,5 \pm 3,7$  перфузионных единиц (п.е.) по сравнению с интактными животными ( $n=42$ ) —  $100,5 \pm 4,4$  п.е. В группе крыс, получавших эналаприл ( $n=35$ ), показатель микроциркуляции составил  $93,3 \pm 4,4$  п.е., а у животных, получавших лозартан ( $n=35$ ), —  $100,0 \pm 2,3$  п.е. Эти данные свидетельствуют о том, что указанные препараты эффективно предотвращают снижение уровня регионарного кровотока в костной ткани бедра крыс после овариэктомии.

Для подтверждения роли дисфункции эндотелия в развитии нарушения регионарной микроциркуляции рассчитывали коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД) на основе данных ЛДФ. В ответ на системное введение ацетилхолина и нитропрусида происходило снижение уровня микроциркуляции с последующей нормализацией показателей кровотока (рис. 1). КЭД определяли как отношение площади треугольника над кривой восстановления микроциркуляции при введении нитропрусида к площади треугольника над кривой восстановления микроциркуляции при введении ацетилхолина. В группе интактных животных КЭД равнялся  $1,3 \pm 0,2$ , в группе крыс с остеопорозом —  $2,4 \pm 0,2$ . Эти данные свидетельствуют о формировании изменений, указывающих на дисфункцию эндотелия сосудов микроциркуляторного русла костной ткани после овариэктомии. У крыс, получавших исследуемые препараты, КЭД снижался до  $1,6 \pm 0,1$  для эналаприла и  $1,5 \pm 0,2$  для лозартана.

Остеопоротические изменения в костях через 8 нед после овариэктомии были подтверждены гистологически у всех крыс: в гистологических препаратах определялись истончение костных трабекул и увеличение межтрабекулярного пространства (рис. 2). Кроме того, отмечались микропереломы костных трабекул. О прижизненном возникновении микропереломов судили по прорастанию соединительной ткани в зоне перелома трабекулы (рис. 3).

При микроскопии и гистоморфометрии срезов бедренной кости у крыс, получавших лечение, микропереломы трабекул не обнаруживались, структура костной ткани сохранялась, костные трабекулы имели большую ширину, чем у крыс с остеопорозом, не получавших лечения (см. таблицу).

Изучая индивидуальные показатели микроциркуляции и средней

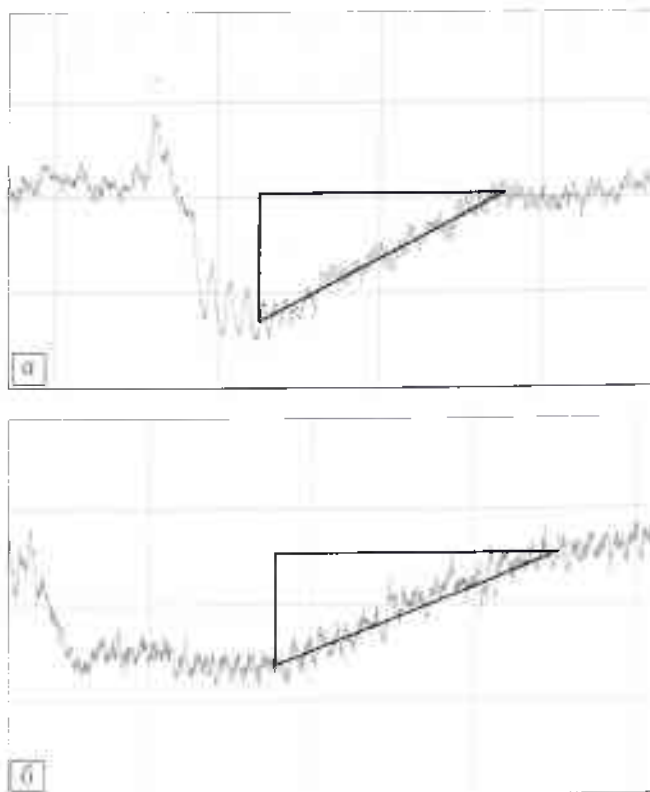


Рис. 1. Пример динамики уровня микроциркуляции в костной ткани при проведении функциональных сосудистых проб у интактных крыс: а — реакция эндотелий-зависимой, б — эндотелийнезависимой вазодилатации.

ширины костной трабекулы в проксимальном метафизе бедренной кости во всех группах животных, мы обратили внимание на наличие определенной зависимости между двумя этими параметрами. Для подтверждения существования та-

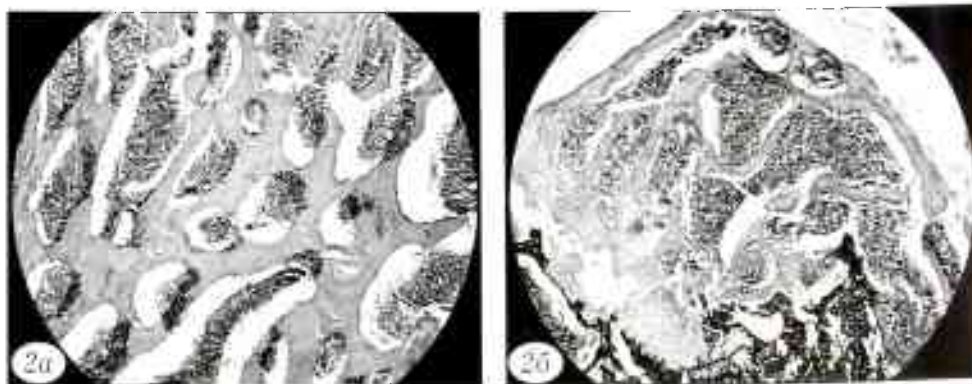


Рис. 2. Морфологическая картина проксимального метафиза бедренной кости интактной крысы (а) и крысы с генерализованным остеопорозом (б). Окраска гематоксилином и эозином, ув. 100.

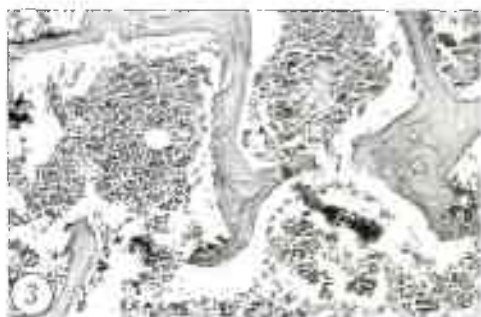


Рис. 3. Микроперелом костной трабекулы (1) в проксимальном метафизе бедренной кости крысы с генерализованным остеопорозом. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 400.

Средняя ширина костных трабекул в проксимальном метафизе бедренной кости крыс через 8 нед после билатеральной овариэктомии при применении эналаприла и лозартана и при отсутствии лечения

Группа животных	Ширина костных трабекул, мкм	Достоверность различий (p)
Интактные (I)	97,7	—
Остеопороз без лечения (II)	61,7	$p_{I-II} < 0,05$
Остеопороз + эналаприл (III)	75,7	$p_{I-III} < 0,05$
Остеопороз + лозартан (IV)	84,8	$p_{I-IV} < 0,05$

кой зависимости рассчитали коэффициент корреляции Пирсона ( $r$ ) между уровнем микроциркуляции и средней шириной костной трабекулы. Кроме того, для сравнения парных значений в группах построили точечные диаграммы зависимости ширины костных трабекул от уровня регионарной микроциркуляции и провели на диаграммах линии регрессии. Оказалось, что в группе интактных животных  $r=0,7$ , в группе крыс с остеопорозом  $r=0,6$ , в группе получавших эналаприл  $r=0,4$ , в группе получавших лозартан  $r=0,8$ . Полученные значения коэффициента свидетельствуют о наличии достаточно тесной прямой зависимости между уровнем микроциркуляции и средней шириной костных трабекул в проксимальном метафизе бедра у крыс всех групп.

Проведение ЛДФ у крыс с экспериментальными переломами показало, что при сращении переломов на фоне генерализованного остеопороза ( $n=20$ ) средний уровень микроциркуляции в костной мозоли был значительно ниже, чем у крыс без остеопороза ( $n=20$ ) — соответственно  $69,7 \pm 5,9$  и  $87,6 \pm 6,3$  п.е. У животных, получавших эналаприл, уровень микроциркуляции был выше ( $102,2 \pm 5,4$  п.е.), чем у животных с переломами бедра без остеопороза. У крыс, получавших лозартан, показатель микроциркуляции в зоне перелома равнялся  $123,1 \pm 5,0$  п.е., что также достоверно выше, чем у крыс с переломами бедренной кости без остеопороза, и выше, чем у крыс, получавших эналаприл.

При визуальной оценке зоны перелома проксимального метафиза бедра у большинства крыс во всех группах через 4 нед после перелома отмечались признаки формирования костной мозоли, однако наблюдались и неудовлетворительные исходы — несращение перелома. У интактных (без остеопороза) животных через 4 нед после остеотомии несращение отломков обнаружено в 4, а у крыс с остеопорозом — в 8 случаях из 20. У животных, получавших исследуемые препараты, несращение перелома отмечено лишь в одном случае — у крысы, получавшей эналаприл 0,5 мг/кг. В группе с применением лозартана 6 мг/кг случаев несращения не было.

Таким образом, консолидация экспериментальных переломов проксимального метафиза бедренной кости на фоне остеопороза у самок крыс линии Вистар через 12 нед после овариэктомии протекает в условиях снижения кровоснабжения зоны перелома, что, несомненно, негативно отражается на исходах переломов, приводя к значительному увеличению частоты несращений. Применение эналаприла и лозартана в течение 12 нед после овариэктомии повышало уровень микроциркуляции в межотломковой зоне, способствуя тем самым достоверному увеличению частоты сращения экспериментальных переломов.

## ВЫВОДЫ

1. Через 8 нед 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. Эналаприл в дозе 0,5 мг/кг и лозартан в дозе 6 мг/кг эффективно предупреждают снижение уровня регионарной микроциркуляции в костной ткани, что способствует поддержанию процессов костного ремоделирования при развивающемся остеопорозе, при этом более выраженным остеопротекторным действием обладает лозартан.

3. Сращение экспериментальных переломов проксимального метафиза бедра на фоне остеопороза по сравнению с аналогичными переломами у крыс без остеопороза протекает на фоне сниженного уровня микроциркуляции в костной ткани (до 20%), что негативно отражается на исходах переломов, приводя к увеличению вдвое частоты несращения отломков.

4. Эналаприл и лозартан повышают показатели микроциркуляции в зоне перелома проксимального метафиза бедренной кости крыс до значений, превышающих показатели крыс с экспериментальными переломами на фоне остеопороза на 30 и 40% соответственно, а также увеличивают частоту сращения переломов. Влияние лозартана на микроциркуляцию в зоне перелома превосходит действие эналаприла.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Брошусь В.В. Оксид азота как регулятор защитных и гомеостатических реакций организма // Укр. ревматол. журн. — 2003. — № 4. — С. 3–11.
2. Галиган М.Е., Широколова А.В., Вакин А.Ф. Гипотензивное действие оксида азота, продуцируемого из экзо- и эндогенных источников // Вопр. мед. химии. — 1991. — Т. 37, № 1. — С. 67–70.
3. Корокия М.В., Носов А.М., Покровский М.В. Сравнительное исследование эндотелио-кардиопротективных свойств фураностаноловых гликозидов из культуры клеток растения *Dioscorea cleftoidea* и 17 $\beta$ -эстра-

- диола //Кубанский науч. мед. вестн. — 2006. — N 9 (90). — С. 137–140.
4. **Насонов Е.Л.** Вторичный остеопороз: патогенез и клиническое значение при воспалительных заболеваниях суставов //Остеопороз и остеопатии. —1998. — N 3. — С. 18–20.
  5. Пат. 2369390 РФ. Способ коррекции остеопороза и профилактики возникновения остеопоротических переломов эналаприлом /Покровский М.В., Гудырев О.С., Файтельсон А.В. и др. — Бюл. № 28, зарегистрирован 10.10.09
  6. Пат. 2369391 РФ. Способ коррекции остеопороза и профилактики возникновения остеопоротических переломов лозартаном /Покровский М.В., Гудырев О.С., Файтельсон А.В. и др. — Бюл. № 28, зарегистрирован 10.10.09.
  7. **Atagiakrishnan 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.
  8. **Laursen J.B., Rajagopalan S., Galis Z. et al.** Of superoxide in angiotensin II-induced but catecholamine-induced hypertension //Circulation — 1997. — Vol. 95. — P. 588–593.
  9. **Napoli C., Iquarro L.J.** Nitric oxide and atherosclerosis //Nitric. Oxide. — 2001. — Vol. 5. — P. 88–97.
  10. **Stimpel M., Jee W. S., Ma Y. et al.** Impact of anti-hypertensive 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 КГМУ; **Иванов А.В.** — профессор, доктор мед. наук, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии КГМУ. **Для контактов:** Файтельсон Александр Владимирович. 305004, Курск, ул. Ленина, дом 65-22. Тел.: (4712) 58-73-14. E-mail: vladimirfatelson@gmail.com

© Коллектив авторов, 2010

## НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ОПТИМИЗАЦИИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА ПРИ ПЕРЕЛОМАХ ДЛИННЫХ КОСТЕЙ

*Е.Ю. Масленников, И.И. Таранов, Т.М. Аль-Надджар, И.Б. Вовченко*

ГОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет Минздравсопразвития», Ростов-на-Дону

*Целью исследования было изучение роли некоторых протеолитических ферментов (катепсина-D и нейтральной протеиназы серинового ряда) в формировании регенерата костной ткани при переломах костей. Исследования проведены у 138 больных с переломами длинных костей — свежими (80 переломов), несросшимися (38) и консолидированными (20). В качестве тестируемой среды использовали периостальный и промежуточный (межотломковая ткань) регенераты костной ткани. Материал для исследований получали во время операций остеосинтеза, выполнявшихся в разные сроки после травмы. Результаты исследования дают основание предположить, что кислые и нейтральные пептид-гидролазы играют определенную роль в реализации процессов синтеза и распада макромолекулярных компонентов органического матрикса кости при репаративном остеогенезе. Полученные данные позволяют наметить некоторые новые пути оптимизации репаративных процессов при переломах костей.*

**Ключевые слова:** переломы, регенерация, протеолиз.

### *Some Aspects of Reparative Osteogenesis Optimization in Long Bone Fractures*

*E.Yu. Maslennikov, I.I. Taranov, T.M. Al-Naddzhar, I.B. Vovchenko*

*The aim of the examination was to study the influence of some proteolytic enzymes (cathepsin-D, neutral proteinase of serine group) upon formation of bone regenerate in fractures. There were 138 patients with bone fractures: 80 fractures were fresh, 38 — nonunited, 20 — nonconsolidated. Periosteal and transfragmental tissues were studied. Those materials were obtained during osteosynthesis that was performed at different terms after trauma. Results obtained allowed to make a suggestion that acid and neutral peptide-hydrolyases influence the osteosynthesis and degradation of macromolecular components of bone organic matrix during reparative osteogenesis. That allowed detecting the new ways for optimization of reparative processes in fractures.*

**Key words:** fractures, regeneration, proteolysis.

Разработка методов регулирующего воздействия на репаративную регенерацию костной тка-

ни является актуальнейшей задачей травматологии. Процесс консолидации костных отломков при