

## ВПЛИВ ЛОВАСТАТИНУ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ В ЩУРІВ

*За результатами проведених біохімічних досліджень маркерів кісткової остеорезорбції та остеорегенерації у щурів із травматичним кістковим дефектом, лікованих трансдермальним введенням ловастатину в різних дозах, було встановлено стимулювальний вплив препарату в дозі 5,0 мг/кг на процес остеогенезу. З метою оптимізації корекції порушення післятравматичної кісткової регенерації необхідне подальше вивчення ефективності різних шляхів введення ловастатину і його доставки до місця перелому.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **репаративна остеорегенерація, ловастатин.**

ВСТУП. Поширений травматизм, тривале і дороге лікування переломів кісток, високий відсоток частоти ускладнень визначають медичну та соціально-економічну значимість цієї проблеми і передбачають доцільність пошуку нових ефективних методів стимуляції репаративного остеогенезу.

Нещодавно з'явилися дані експериментальних та клінічних досліджень, які свідчать про можливість впливу ловастатину на процес остеорегенерації. Даний ефект статинів реалізується через підвищення експресії гена кісткового морфогенетичного білка-2 (КМБ-2) [8]. КМБ-2 є найважливішим фактором росту кістки, що має остеоіндуктивні властивості [5]. Проте дослідження щодо можливості застосування статинів для зменшення ризику переломів мають суперечливий характер. Позитивного ефекту статинів на метаболізм кісткової тканини не спостерігають при оральному застосуванні даних препаратів та використанні середньотерапевтичних доз [6]. Тому актуальною є розробка нових шляхів доставки статинів до зони перелому.

Метою роботи стало вивчення стимуляції репаративної остеорегенерації препаратом ловастатину (шляхом трансдермального введення) за умов посттравматичного кісткового дефекту в щурів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на білих статевозрілих щурах масою 200–220 г. У процесі роботи використано 136 щурів. Піддослідних тварин поділили на три групи: © Я. В. Панасюк, М. М. Корда, 2014.

1-ша – інтактні тварини; 2-га – тварини з кістковим дефектом (контрольна група); 3-тя – тварини з кістковим дефектом, які отримували ловастатин. У проксимальному відділі великогомілкової кістки щурів контрольної та експериментальної серій за допомогою стоматологічного бора було створено кістковий дефект (розміром 2,0 мм у діаметрі). Ловастатин вводили трансдермально у зоні дефекту в дозах 0,1, 1 та 5 мг/кг один раз на день протягом усього експерименту. Тварин декапітували під тіопенталовим наркозом на 3-тю, 7-му, 14-ту і 28-му доби після створення кісткового дефекту.

Утримували тварин та проводили експерименти на них відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

Для характеристики метаболізму кісткової тканини визначали такі біохімічні показники сироватки крові: вміст кальцію (Ca) і фосфору (P) (за допомогою стандартних наборів реактивів), активність лужної (ЛФ) та кислої (КФ) фосфатаз [3], вміст оксипроліну [2].

Статистичну обробку результатів виконано у відділі системних статистичних досліджень університету в програмному пакеті Statsoft STATISTIKA. Достовірність отриманих результатів визначали за критерієм Манна–Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Остеорегенерація є складним багатокаскадним фізіологічним процесом, що детермінований генетично. Проте у клінічній практиці часто

необхідно стимулювати регенерацію кісткової тканини. За даними різних авторів, у 10–15 % випадків спостерігають порушення репаративного остеогенезу [4, 9].

Н. А. Корж та співавтори виділяють чотири стадії остеорегенерації [1]:

I – стадія катаболізму;

II – стадія проліферації та диференціювання клітинних елементів;

III – стадія утворення ангіогенної кісткової структури і мінералізації;

IV – стадія ремоделювання кісткової тканини.

Біохімічні показники, отримані нами на 3-тю добу після травми, відповідали I стадії репаративного остеогенезу. Порівняно з інтактними щурами в цей термін експерименту відмічали достовірне зростання концентрації Ca та P у досліджуваних тварин. Так, рівень Ca в сироватці інтактних тварин склав  $(2,23 \pm 0,125)$  ммоль/л, а P –  $(1,81 \pm 0,1)$  ммоль/л, тоді як у контрольній групі та в групі щурів, які отримували ловастатин, рівень Ca був у межах 3,41–3,7 ммоль/л, а P – 2,47–2,73 ммоль/л (рис. 1). Одержані результати свідчать про руйнування неорганічного компонента кісткової тканини та підвищене виділення Ca і P у кров'яне русло.

На 7-й та 14-й дні відмічали поступове зниження цих показників у 2-й і 3-й групах. Проте концентрація Ca і P знову підвищувалась у всіх групах на 28-му добу, що можна пояснити посиленням остеогенезу та початком мінералізації. Необхідно відзначити, що показники концентрації Ca та P у сироватці крові тварин із змодельованою травмою, яким вводили ловастатин у різних дозах, достовірно не відрізнялися від таких у щурів контрольної групи протягом всього експерименту (рис. 1).

В інтактних тварин показник вмісту в сироватці крові оксипроліну склав  $(55,3 \pm 3,92)$  ммоль/л (рис. 2). Порівняно з інтактними щурами у 2-й групі спостерігали вірогідне підвищення рівня оксипроліну на 3-тю і 7-му доби (на 40,78–90,22 %), що свідчить про значні резорбтивні явища в досліджуваних тварин. Варто відмітити, що в щурів 3-ї групи зі збільшенням дози ловастатину концентрація оксипроліну на 3-тю і 7-му доби мала тенденцію до зменшення, проте різниця була статистично недостовірною. На 14-ту добу вміст оксипроліну в сироватці крові досліджуваних тварин поступово знижувався, що можна пояснити зменшенням остеорезорбції та переважанням остеорегенерації. Застосування ловастатину в дозі 5,0 мг/кг на 14-ту добу асоціювалось із вірогідним зниженням вмісту оксипроліну порівняно з контрольною групою (в контрольній групі рівень оксипроліну становив  $(68,4 \pm 5,69)$  ммоль/л, тоді як у лікованих ловастатином –  $(55,10 \pm 3,10)$  ммоль/л, тобто був на 19,4 % меншим,  $p < 0,05$ ). Показники вмісту оксипроліну на 28-му добу як у 2-й, так і в 3-й групах тварин повернулися практично до норми (рис. 2).

При вивченні активності ЛФ виявлено, що даний показник достовірно зростав на 3-й день після травми (рис. 3). Так, якщо в інтактних тварин активність ЛФ становила  $(2612 \pm 126,6)$  ОД/л, то у контрольній групі –  $(3822,99 \pm 167,5)$  ОД/л, тобто відбувалося підвищення на 46,4 %. У лікованих щурів цей показник зростав на 41,17–50,95 % (різниця відносно контрольної групи статистично не значима). Вірогідною причиною таких змін є збільшення виділення ЛФ внаслідок безпосереднього пошкодження остеобластів, які у великій кількості депонують у своїй плазмі даний фермент. У подальшому (на 7-й

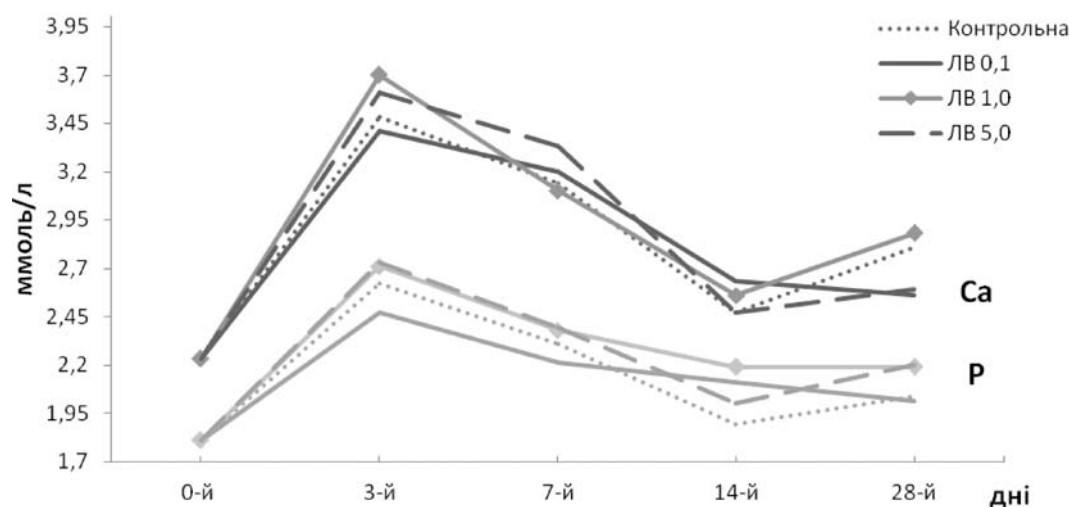


Рис. 1. Динаміка вмісту Ca та P у сироватці крові щурів із кістковим дефектом, яким вводили ловастатин у різних дозах.

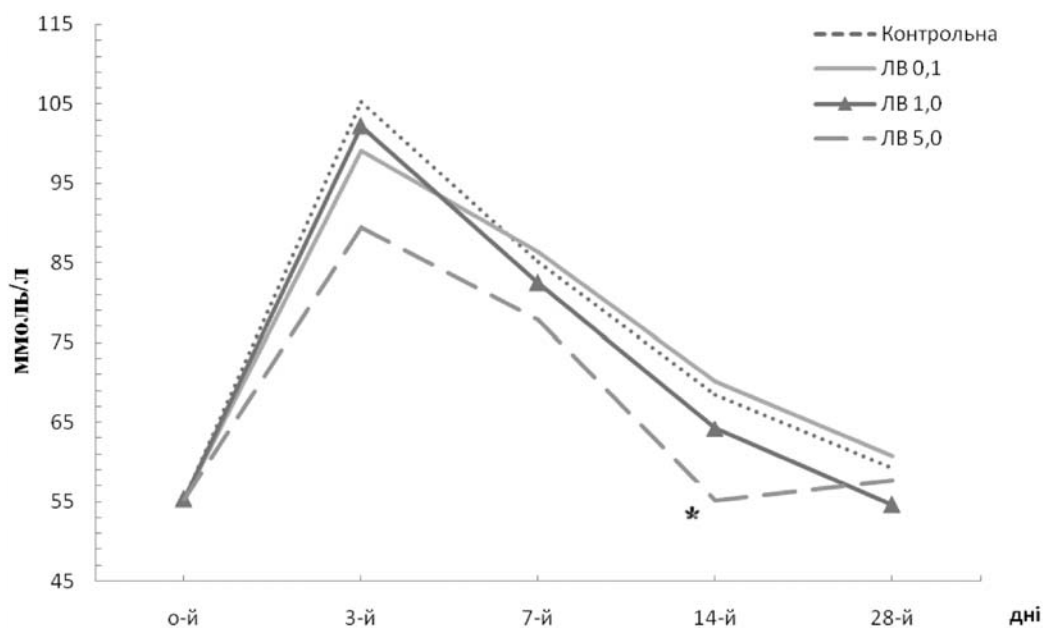


Рис. 2. Динаміка вмісту оксипроліну в сироватці крові щурів із кістковим дефектом, яким вводили ловастатин у різних дозах.

Примітка. Тут і на наступних рисунках: \* – зміни достовірні порівняно з відповідними показниками в контрольних тварин ( $p < 0,05$ ).

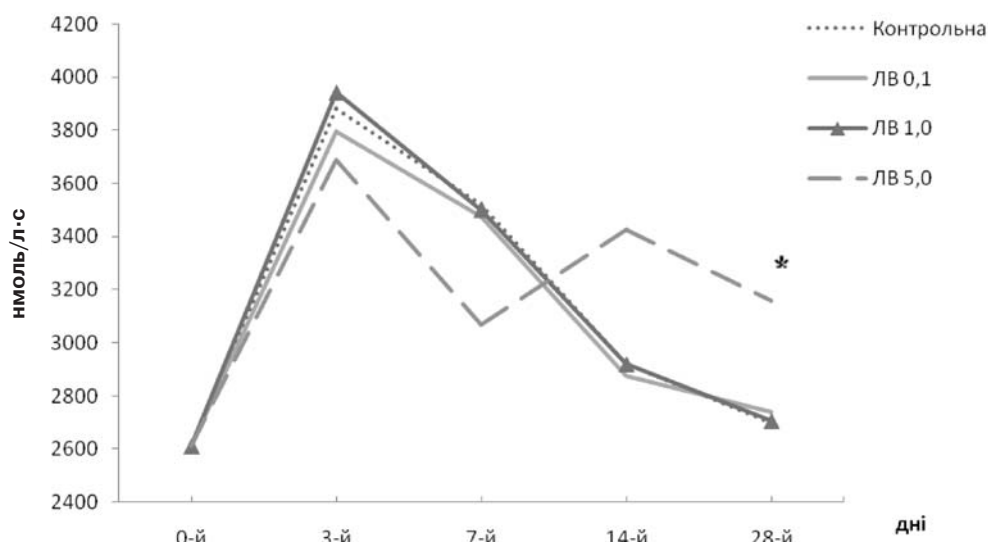


Рис. 3. Динаміка активності ЛФ у сироватці крові щурів із кістковим дефектом, яким вводили ловастатин у різних дозах.

та 14-й дні) рівень ЛФ у сироватці крові щурів 2-ї і 3-ї груп поступово знижувався. Цікаво відмітити, що у тварин, які отримували ловастатин у дозі 5,0 мг/кг, на 14-ту добу різко зростала активність даного ферменту (рис. 3). Такі зміни можуть свідчити про підсилення остеорегенерації за рахунок активізації остеобластів. Цю тенденцію також спостерігали і на 28-й день дослідження (застосування ловастатину в найбільшій дозі призводило до вірогідного підвищення активності ЛФ на 16,9 % порівняно з контрольною групою,  $p < 0,05$ ) (рис. 3).

Цінним інформативним біохімічним показником є інший фермент – КФ (маркер остеорезорбції) [7]. У нашому експерименті рівень КФ у сироватці крові інтактних щурів становив  $(402,1 \pm 27,1)$  нмоль/л·с, тоді як у тварин контрольної групи на 3-тю добу –  $(701,6 \pm 44,9)$  нмоль/л·с (+74,5 %), а в щурів, які отримували ловастатин у дозах 0,1, 1,0 та 5,0 мг/кг, –  $(692,1 \pm 23,1)$  (+72,1 %),  $(722,4 \pm 44,1)$  (+79,6 %) і  $(673,9 \pm 45,4)$  нмоль/л·с (+67,6 %) відповідно. На 7-му добу відмічали зниження активності КФ у сироватці крові всіх досліджуваних тварин.

На цьому етапі дослідження статистично достовірних відмінностей активності КФ між контрольною та дослідними групами не було. Активність КФ на 14-ту добу продовжувала зменшуватися як у 2-й, так і в 3-й групах щурів.

При цьому у тварин, лікованих ловастатином у дозі 5,0 мг/кг, даний показник був нижчим на 15,3 % порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ). На 28-му добу активність КФ у всіх досліджуваних тварин наближалася до норми (рис. 4).

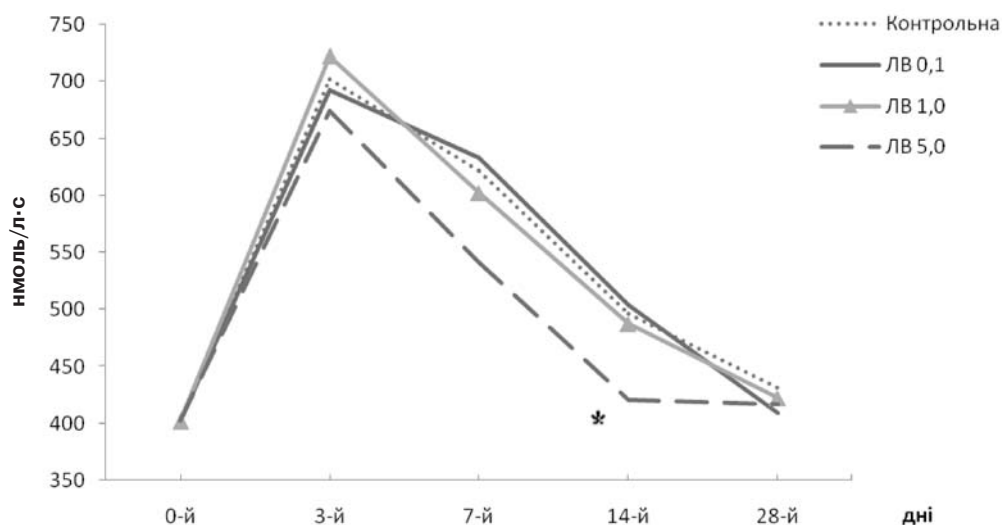


Рис. 4. Динаміка активності кислоти фосфатази в сироватці крові досліджуваних тварин при трансдермальній введенні ловастатину у різних дозах.

**ВИСНОВОК.** Тривале трансдермальне застосування препарату ловастатину у великих дозах (5 мг/кг) призводить до швидшого від-

новлення кісткового дефекту в експериментальних щурів.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Корж Н. А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации / Н. А. Корж, Н. В. Дедух // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – №1. – С. 76–84.
2. Тетянец С. С. Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови / С. С. Тетянец // Лаб. дело. – 1985. – № 1. – С. 61–62.
3. Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза : метод. рекомендации / [А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, О. В. Деньга и др.]. – К. : ГФЦ, 2005. – 30 с.
4. Locally delivered lovastatin nanoparticles enhance fracture healing in rats / I. R. Garrett, G. E. Gutierrez, G. Rossini [et al.] // J. Orthop. Res. – 2007. – **25**. – P. 1351–1357.
5. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors / E. A. Wang, V. Rosen, P. Cor-

- desetal [et al.] // Proceedings of the Natural Acad. of Sciences USA. – 1988. – **85**. – P. 9484–9488.
6. Skoglund B. Simvastatin improves fracture healing in mice / B. Skoglund, C. Forslund, P. Aspenberg // J. Bone Miner. Res. – 2002. – **17**. – P. 2004–2008.
7. Statin stimulates bone morphogenetic protein-2, aggrecan, and type 2 collagen gene expression and proteoglycan synthesis in rat chondrocytes / H. Hatano, A. Maruo, M. E. Bolander, G. Sarkar // J. Orthop. Sci. – 2003. – **8**. – P. 842–848.
8. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins / G. Mundy, R. Garrett, S. Harris et al. [et al.] // Science. – 1999. – **286**. – P. 1946–1949.
9. Transdermal application of lovastatin to rats causes profound increases in bone formation and plasma concentrations / G. E. Gutierrez, D. Lalka, I. R. Garrett [et al.] // Osteoporos. Int. – 2006. – **17**. – P. 1033–1042.

## ВЛИЯНИЕ ЛОВАСТАТИНА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ КОСТНОЙ ТКАНИ У КРЫС

### Резюме

По результатам проведенных биохимических исследований маркеров костной остеорезорбции и остеорегенерации у крыс с травматическим костным дефектом, леченных трансдермальным введением ловастатина в различных дозах, было установлено стимулирующее влияние препарата в дозе 5,0 мг/кг на процесс остеогенеза. С целью оптимизации коррекции нарушения посттравматической костной регенерации необходимо дальнейшее изучение эффективности различных путей введения ловастатина и его доставки к месту перелома.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: репаративная остеорегенерация, ловастатин.

Ya. V. Panasiuk, M. M. Korda

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPII STATE MEDICAL UNIVERSITY

## EFFECT OF LOVASTATIN ON BONE REGENERATION IN RATS

### Summary

The results of the study of bone osteoresorption and osteoregeneration biochemical markers in rats with traumatic bone defect treated with transdermal administration of lovastatin at different doses showed a stimulatory effect of the drug at a dose of 5.0 mg/kg on the process of bone formation. In order to optimize the correction of disorders of posttraumatic bone regeneration the further study of the effectiveness of different routes of lovastatin administration and its delivery to the site of the fracture is required.

KEY WORDS: reparative osteoregeneration, lovastatin.

Отримано 08.07.14

Адреса для листування: Я. В. Панасюк, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.