

УДК: 616.71-001-003.93-085.272.4-022.532

Я. В. Панасюк,**К. С. Волков,****М. М. Корда**

ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України"

**ВИКОРИСТАННЯ КОМБІНАЦІЇ
НАНОАКВАХЕЛАТІВ МЕТАЛІВ І
НАНОЧАСТИНОК ЛОВАСТАТИНУ ДЛЯ
СТИМУЛЯЦІЇ РЕПАРАТИВНОГО
ОСТЕОГЕНЕЗУ В ЩУРІВ****Ключові слова:** *наноаквахелати, ловастатин, наночастинки, остеорегенерація, остеорезорбція, кістковий дефект.***Резюме.** *На 128 білих статевозрілих щурах-самцях вивчено вплив комбінації наноаквахелатів Ca, Cu, Co, Zn, Mg, Fe та наночастинок ловастатину на процеси остеорегенерації та остеорезорбції. Показано доцільність застосування даних середників для оптимізації метаболізму кісткової тканини при скелетній травмі. Позитивний вплив запропонованої комбінації підтверджено достовірними змінами маркерів остеогенезу та динамікою рентгенологічної картини.***Вступ**

Незважаючи на сучасні досягнення ортопедії та травматології, відсоток порушення травматичної кісткової регенерації залишається стабільно високим [7]. Тому пошук нових шляхів корекції порушень остеорегенерації та впливу на кістковий метаболізм на сьогодні є актуальним. Активно вивчається вплив статинів на формування кісткової мозолі [11, 13, 15, 16]. Внаслідок чого виявлено неефективність застосування статинів при їх пероральному введенні [16] та отримано суперечливі результати при трансдермальному застосуванні даних препаратів [5, 14, 15]. У той же час ловастатин у вигляді наночастинок сприяв стимуляції остеогенезу [13, 14, 16]. Вітчизняними вченими показано ефективність застосування наноаквахелатів металів при переломах у щурів, що супроводжувалось швидшим загоєнням ран, консолідацією переломів у оптимальні терміни та зменшенням гнійно-септичних ускладнень [1, 2]. У наших попередніх дослідженнях також констатовано позитивний вплив наноаквахелатів металів та наночастинок ловастатину на кісткову остеорегенерацію [4, 5].

Мета дослідження

Вивчити ефективність комбінації наноматеріалів у ході оптимізації остеорепаративних процесів при кістковій травмі.

Матеріал і методи

Експерименти проводили на білих статевозрілих щурах-самцях (n=136). Модель кісткового дефекту створювали за допомогою стоматологічного бору діаметром 2.0 мм у проксимальному відділі великогомілкової кістки. Для профілактики больового шоку та гнійно-септичних ускладнень всім щурам із скелетною травмою

протягом перших трьох днів внутрішньом'язово вводили знеболювальні (анальгін у дозі 5 мг/кг) та антибактеріальні (цефтріаксон у дозі 10 мг/кг) препарати.

Експериментальні тварини були розподілені на 5 груп: I - інтактні тварини; II - контрольна група (створення кісткового травматичного дефекту без лікування); III - тваринам на тлі травми вводили наноаквахелати металів Ca, Cu, Co, Zn, Mg, Fe; III - тварини із скелетною травмою, ліковані наночастинами ловастатину; IV - тварини, що отримували суміш наноаквахелатів та наночастинок ловастатину.

Наноаквахелати вводили тваринами перорально за допомогою зонда в дозі 1,0 мл одноразово щоденно протягом всього експерименту (1 мл суміші містив 0,02 мг кожного металу). Наночастинки ловастатину протягом всього експерименту щоденно вводили трансдермально в зоні створеного кісткового дефекту у дозі 100 мг ловастатину/кг.

Полімерні хітозанові наночастинки готували шляхом іонного "зшивання" хітозану з триполіфосфатом натрію (ТРР). Розчин хітозану (0,2 %) готували на 1 % розчині оцтової кислоти і інкубували з досліджуваним препаратом протягом 30 хв при кімнатній температурі. До 25 мл інкубаційної суміші по краплях додавали 10 мл 0,1% водного розчину ТРР. Суміш постійно перемішували за допомогою магнітної мішалки (700 об/хв). Отримані наночастинки відцентрифугували (28000 об/хв.) протягом 30 хв. Розмір отриманих наночастинок ловастатину за даними електронної мікроскопії складав близько 40-100 нм (рис. 1).

Забій тварин проводили шляхом декапітації під дією тіопенталового наркозу на 3-й, 7-й, 14-й та 28-й день. У сироватці крові визначали рівень

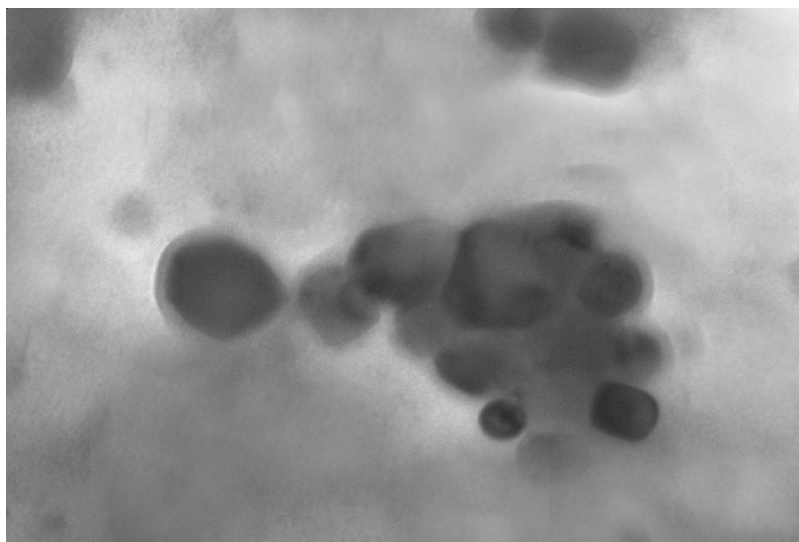


Рис. 1. Наночастинки ловастатину під електронним мікроскопом

Са та Р за допомогою стандартних наборів реактивів, активність кислій фосфатази (КФ) та лужної фосфатази (ЛФ) [3], індекс мінералізації (ІМ=КФ/ЛФ), колагенолітичну активність плазми крові (КАПК) [8] і вміст оксипроліну [6]. Спостереження за динамікою заростання кісткового дефекту проводили рентгенологічно на комп'ютерному томографі в дні забою шурів. Статистичний аналіз результатів здійснено у відділі системних статистичних досліджень ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України" з використанням критерію Манна-Уїтні.

Обговорення результатів дослідження

Пошкодження цілісності кісткової тканини супроводжувалося травмою прилеглих м'яких тканин, тобто розвитком різного ступеня дест-

руктивних змін із крововиливом та некрозом клітин і тканин. На цій пусковій стадії зміни носили запальний характер, в результаті запускався каскад системних та локальних реакцій, спрямованих на відновлення кісткової тканини. У нашому спостереженні відбувався аутоліз некротичних мас на 3-ю добу дослідження та посилене надходження їх до кров'яного русла призвели до достовірного (у порівнянні з інтактними тваринами, $P \leq 0,05$) зростання рівня Са і Р у сироватці крові, зростання активності КФ і ЛФ, КАПК та достовірного підвищення вмісту оксипроліну (рис. 2-8). У всіх групах дослідних тварин у порівнянні із інтактними відмічено тенденцію до зниження ІМ, що підтверджує домінування запальних реакцій на даному терміні дослідження (рис. 6). Статистичної різниці між групами, що отримували наноаквахелати, наночастинки ловастатину та суміш

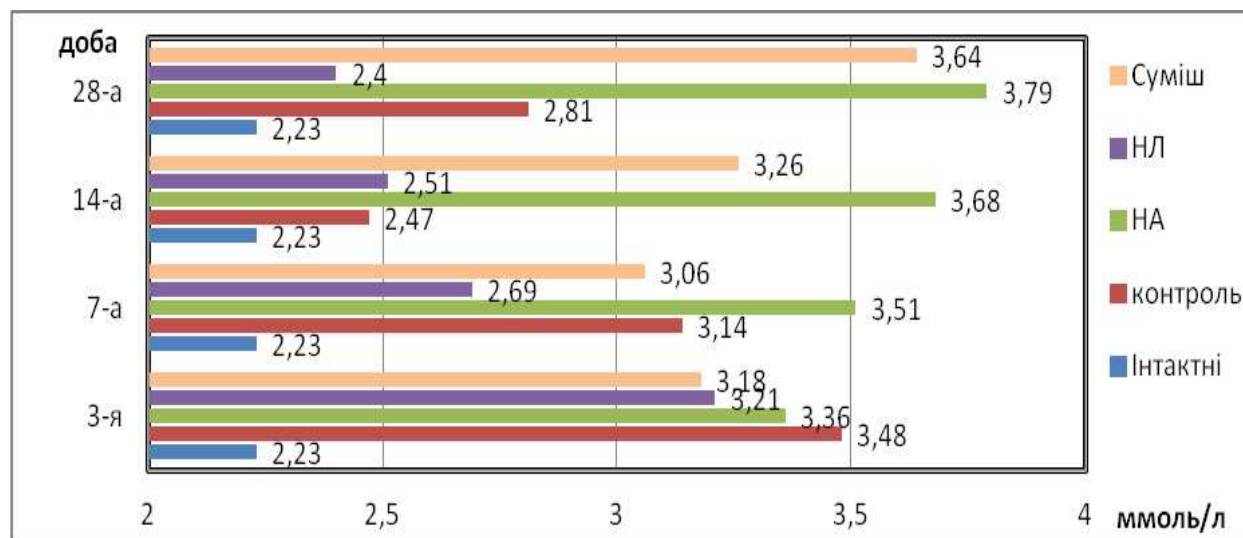


Рис. 2. Динаміка вмісту кальцію в сироватці крові при корекції травматичної остеорегенерації наноматеріалами (тут і на наступних рисунках: НА - група тварин, яким вводили наноаквахелати; НЛ - група тварин, яким вводили наночастинки ловастатину; Суміш - група тварин, яким вводили НА і наночастинки ловастатину).

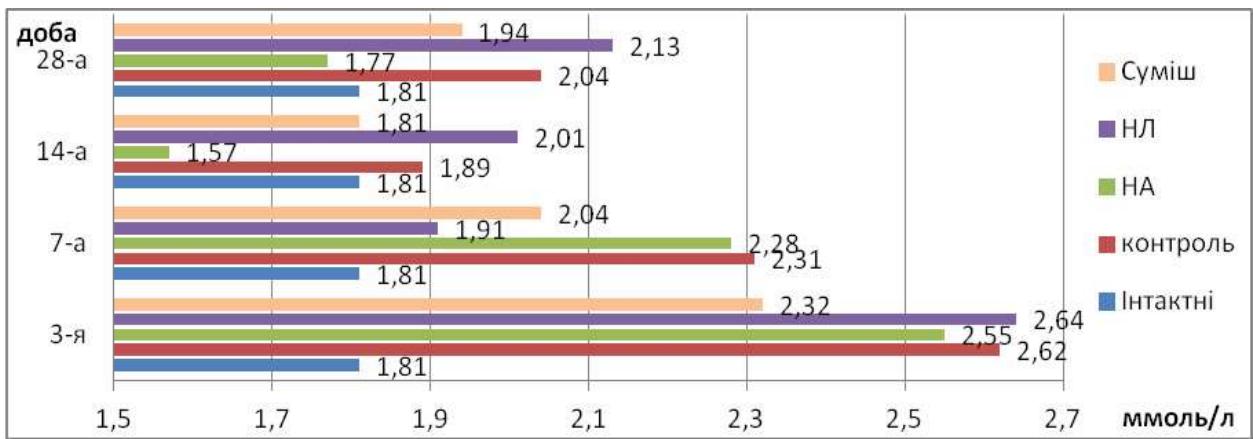


Рис 3. Динаміка вмісту фосфору в сироватці крові при корекції травматичної остеорегенерації наноматеріалами

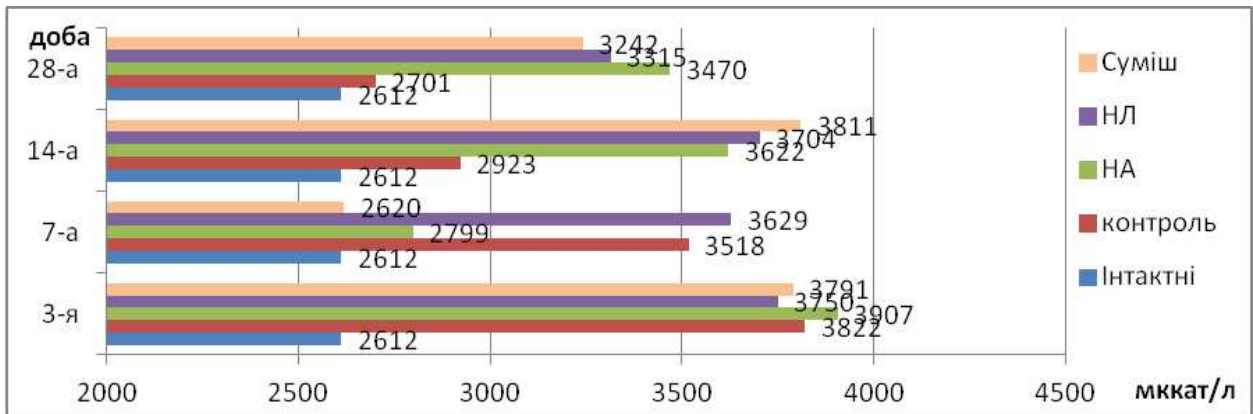


Рис 4. Динаміка активності лужної фосфатази в сироватці крові при корекції травматичної остеорегенерації наноматеріалами

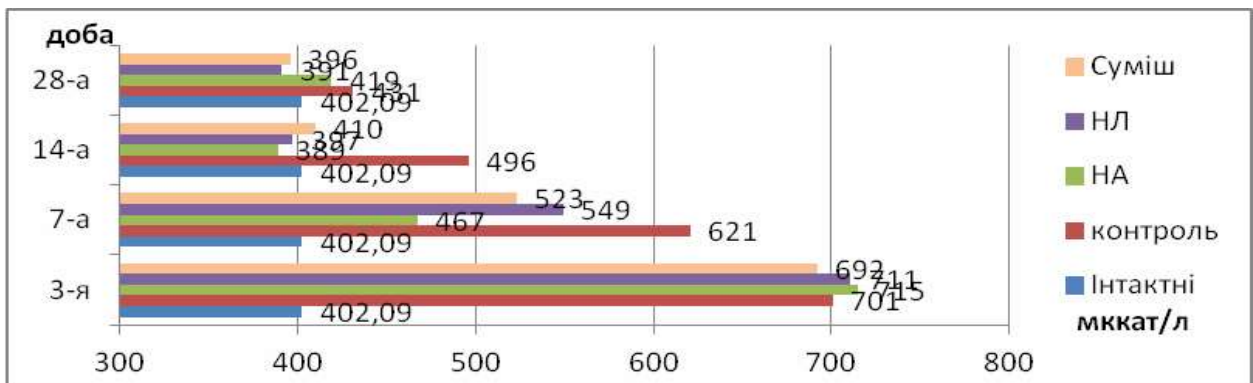


Рис 5. Динаміка активності кислої фосфатази в сироватці крові при корекції травматичної остеорегенерації наноматеріалами

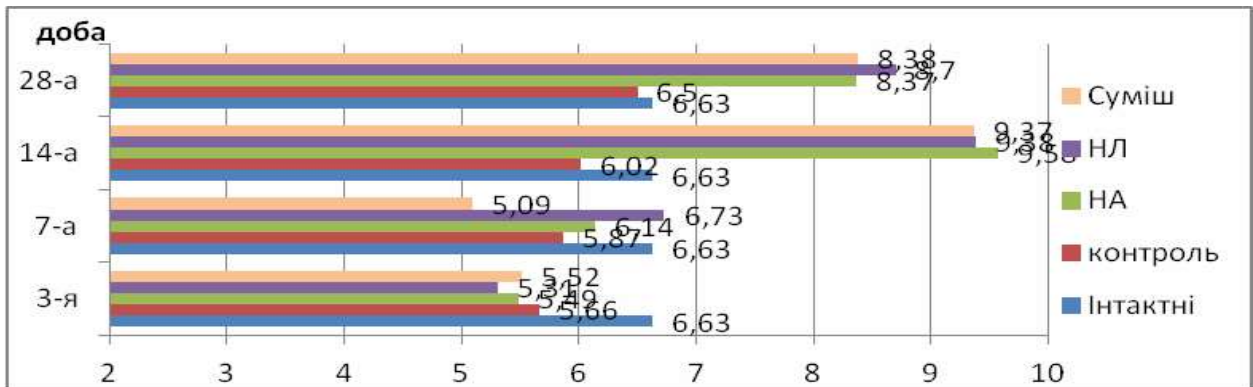


Рис 6. Динаміка індексу мінералізації (ЛФ/КФ) у експериментальних тварин при корекції травматичної остеорегенерації наноматеріалами

наноматеріалів не виявлено. Можливо, що застосовані наноматеріали не мають значущого впливу на інтенсивність запальних реакцій на даному етапі остеорегенерації.

У подальшому катаболічні та запальні реакції поступово згасали, про це засвідчили маркери остеорезорбції та остеорегенерації. На 7-му добу мала місце тенденція до нормалізації практично всіх показників у не лікованих тварин порівняно з 4-ою добою експерименту (рис. 2-8).

На даному етапі остеогенезу варто звернути увагу на особливості динаміки деяких показників. Так, активність ЛФ була найнижчою у групі тва-

рин, що отримували суміш наноматеріалів, у порівнянні із групою, що отримувала наноаквахелати - на 6,4 %, наноловастатин на 27,8 % ($P \leq 0,05$) та контрольною групою - на 25,5% ($P \leq 0,05$) (рис. 4).

Подібну тенденцію спостерігали і для КАПК та вмісту оксипроліну. Достовірно нижчою КАПК у групі тварин, що отримували суміш наноматеріалів, порівняно з контролем на 22% ($P \leq 0,05$) та тваринами, що отримували наноаквахелати на 15,6% ($P \leq 0,05$). Вміст оксипроліну у тварин, після лікування запропонованою сумішшю, виявився достовірно нижчим порівняно з

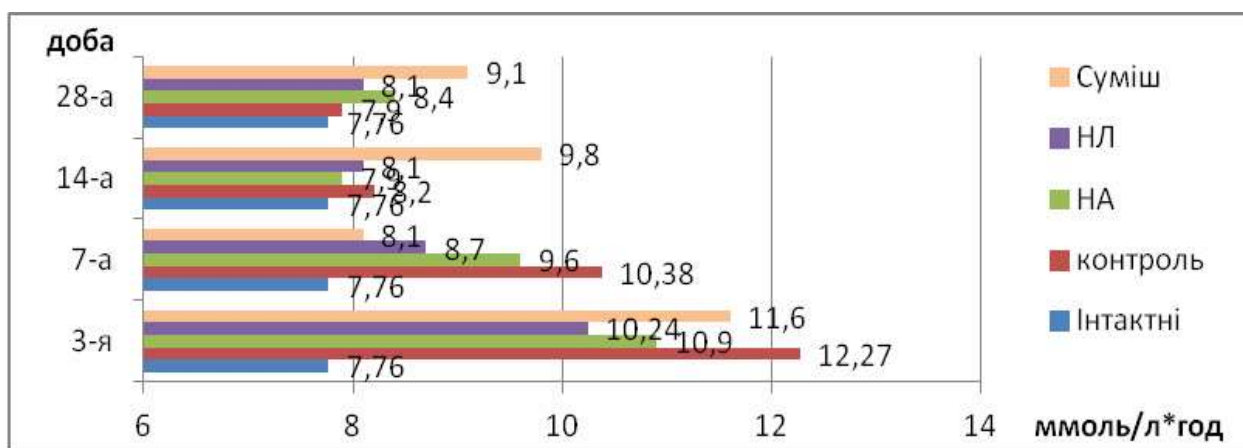


Рис. 7. Динаміка колагенолітичної активності плазми крові у щурів при регенераторному остеогенезі на фоні отримання наноматеріалів

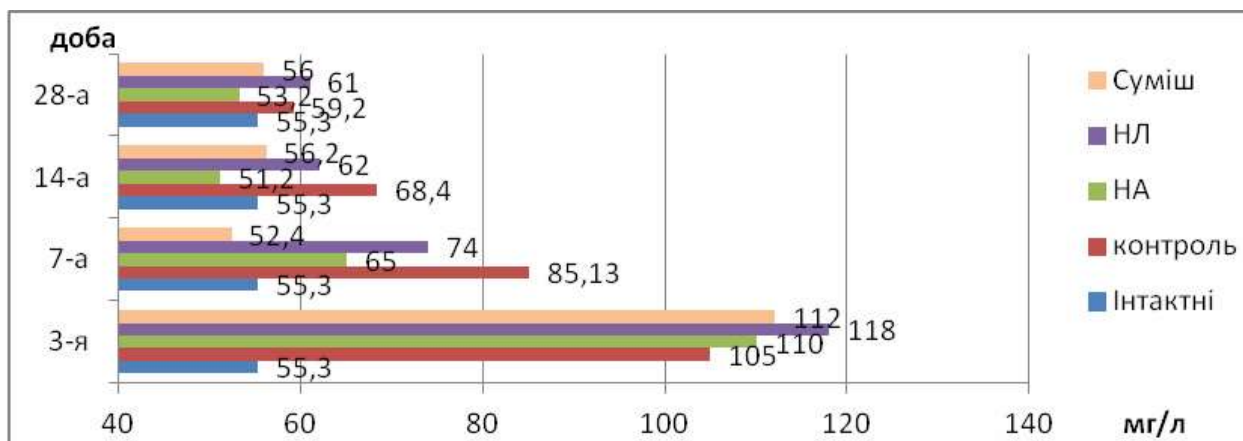


Рис. 8. Динаміка вмісту оксипроліну в сироватці крові (мг/л) щурів при корекції травматичної остеогенерації наноматеріалами

контролем на 38,4% ($P \leq 0,05$) та тваринами, що отримували наноловастатин на 29,2% ($P \leq 0,05$). Зміни рівнів макроелементів Са і Р були менш показовими на даному етапі дослідження. Підсумовуючи отримані дані на 7-му добу, можна зтверджувати про відносно швидшу нормалізацію біохімічних маркерів у групі тварин, що отримували суміш наноаквахелатів і наноловастатину. Мабудь, що до 7-ї доби експерименту запропонована суміш сприяла оптимізації деструктивно-запальних процесів.

Рентгенологічні розміри кісткової мозолі пока-

зали, що на 3-ю та 7-му добу не були інформативними візуально.

У групі тварин, що отримували наноаквахелати, на 14-ту добу експерименту мало місце достовірне підвищення рівня Са порівняно з контрольною групою (рис. 4). На цьому етапі дослідження діагностовано зниження рівня Р у тварин, що отримували наноаквахелати. Ймовірним поясненням такого результату є потрапляння в організм піддослідних тварин кальцію в складі наноаквахелатів (фосфор не вводився), що видозмінило рівень взаємопов'язаних та безпосередньо

залежних від процесів остеогенезу мікроелементів кальцію і фосфору в крові у щурів після лікування.

На 14-у добу корекції травматичного дефекту наноматеріалами зафіксовано достовірну зміну динаміки активності фосфатаз. Під впливом суміші наноматеріалів порівняно з контролем відбулося зниження активності КФ на 17,4% ($P \leq 0,05$) та активізація ЛФ на 30,4% ($P \leq 0,05$) (рис. 4-5). Динаміка ІМ є віддзеркаленням змін активності фосфатаз: у тварин що отримували НА, НЛ і суміш наночастинок ІМ достовірно зріс відносно контрольної групи, де показник був 6,02, і складав 9,58 (+59,1%), 9,38 (+55,8%) і 9,37 (+55,6%) (Рис. 6). Рівень КАПК на 14-у добу нормалізувався у

всіх групах і достовірно не відрізнявся від відповідних показників інтактних тварин. Отже, на 14-у добу біохімічні показники засвідчили інтенсифікацію остеорегенерації у всіх тварин, які отримували наноматеріали, з виразнішою репаративною активністю у тварин, що отримували суміш НА і НЛ.

Те, що стосується рентгенологічного дослідження (згідно даних комп'ютерної томографії), встановлено, що на 14-у добу у тварин, які отримували суміш наноаквахелатів спостерігали швидше закриття створеного кісткового травматичного дефекту (рис. 9).

В останньому етапі спостереження на 28-добу інтенсивність метаболізму кісткової тканини

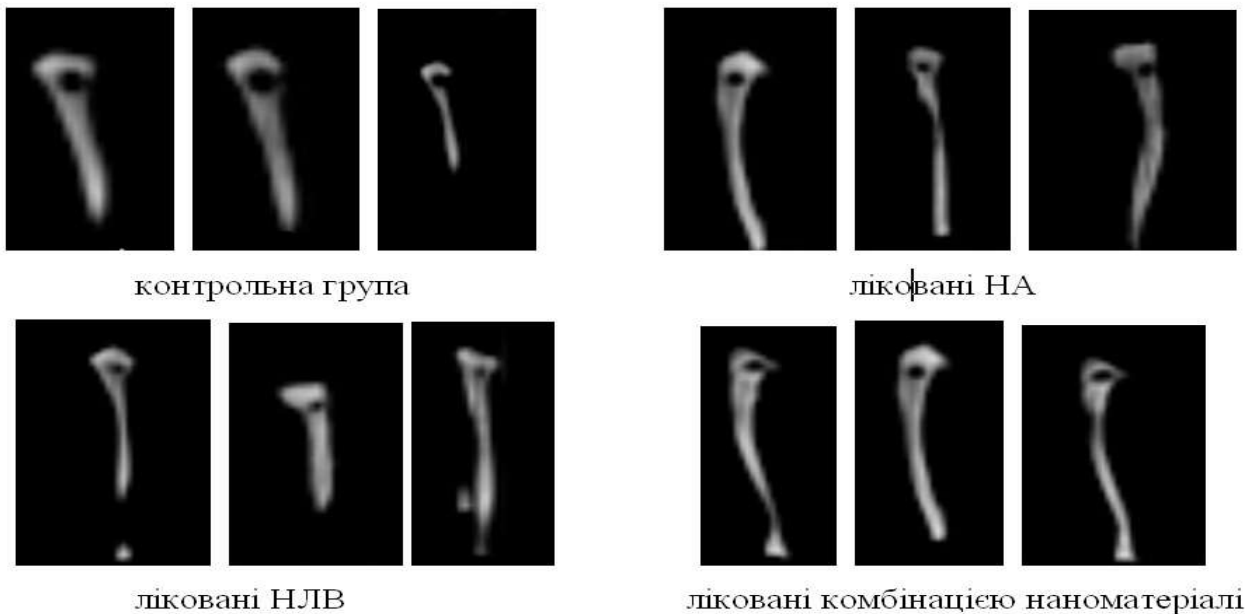


Рис. 9. Комп'ютерна томографія великогомілкових кісток у тварин контрольної групи, після лікування наноаквахелатами, наночастинками ловастатину і сумішшю наноматеріалів на 14-ту добу експерименту

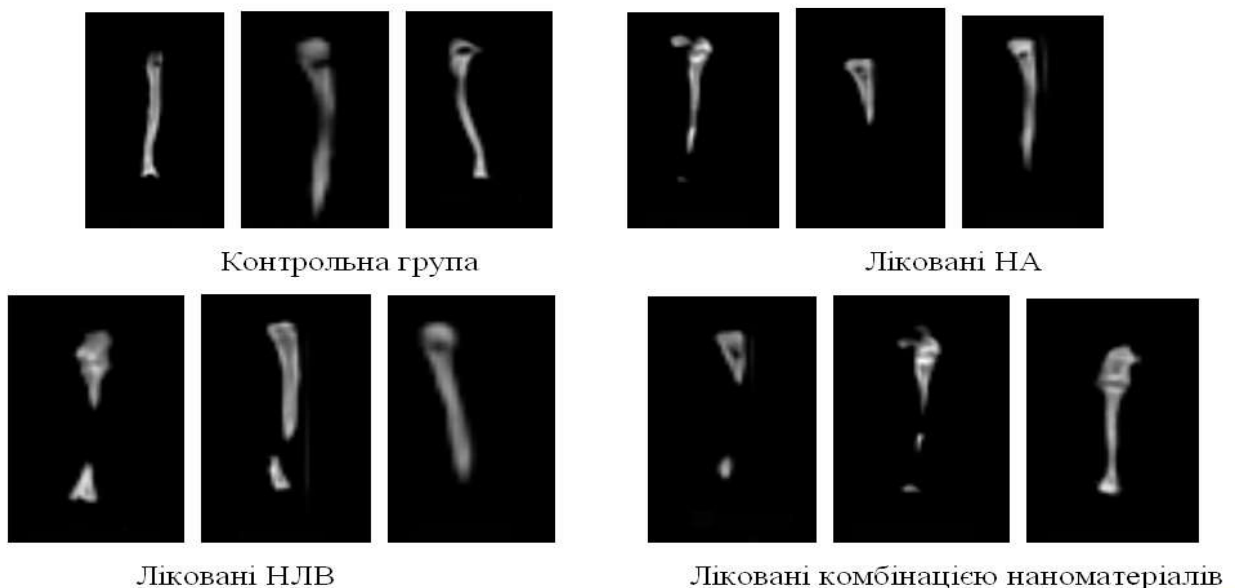


Рис. 10. Комп'ютерна томографія в/гомілкових кісток у тварин контрольної групи, лікованих наноаквахелатами, наночастинками ловастатину і сумішшю наноматеріалів на 28-ту добу експерименту

виразно знизилась. Досліджувані показники КАПК, оксипроліну, активності КФ, вміст Р у тварин експериментальної серії були близькими до відповідних величин у інтактних тварин. Проте, порівняно з контролем, у тварин, які отримували НА, НЛ і суміш наноматеріалів спостерігалось достовірне зростання активності ЛФ (на 28,5%, 22,7% і 20,0% відповідно, $P \leq 0,05$) та ІМ (28,8%, 33,8% і 28% відповідно, що свідчить про вищу інтенсивність мінералізації кісткової мозолі в цих групах спостереження на даному етапі дослідження. Достовірне зростання вмісту Са у сироватці крові тварин, що отримували НА (на 34,8%) і комбінацію наноматеріалів (на 29,5%) порівнянно з контролем, можливо, є наслідком вживання даного мікроелемента перорально у складі суміші наноаквахелатів.

Аналізуючи дані комп'ютерної томографії на 28-му добу експерименту, можна зробити висновок, що у тварин, які отримували суміш наночастинок мало місце майже повне закриття кісткового дефекту з формуванням кісткової мозолі. У решти тварин все ще залишався частковий дефект кісткової тканини (рис. 10).

Висновки

1. На основі отриманих біохімічних даних маркерів остеорезорбції та остеорегенерації можна стверджувати, що запропонована суміш наноаквахелатів металів та наночастинок ловастатину призводить до оптимізації катаболічних процесів на 7-му добу експериментальних досліджень.

2. Суміш наноматеріалів викликає більш інтенсивну остеорегенерацію на 14-у та 21-у добу, що проявляється достовірним зростанням активності лужної фосфатази, колагенолітичної активності плазми крові, рівня індексу мінералізації, вмісту Са у сироватці крові.

3. У тварин, що отримували наноаквахелати металів та наночастинок ловастатину, за даними рентгенологічного дослідження комп'ютерної томографії відмічається швидке закриття кісткового травматичного дефекту.

Перспективи подальших досліджень

Враховуючи отриманий позитивний ефект від використаної суміші наноматеріалів, доцільно провести подальші ґрунтовні дослідження впливу наноаквахелатів металів та наночастинок ловастатину на кістковий метаболізм. Варто провести морфогістологічні дослідження кісткових травматичних дефектів при застосуванні запропонованої суміші на всіх стадіях остеорегенерації.

Література. 1. Борисевич В.Б. Наноматеріали в біології.

Основи нановетеринарії// Борисевич В.Б., Каплушенко В.Г., Косінов М.В.// ВД "Авіцена"- Київ-2010. 2.Здобутки нанотехнології в лікуванні та профілактиці хвороб тварин. Нановетеринарія (впровадження інноваційних технологій) / [В.Б. Борисевич, Б.В. Борисевич, Н.М. Хоминтаїн.]; Заред. В.Б. Борисевича. - К.: Діа, 2009. - 182 с. 3. Левицький А. П. Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза: Метод. рекомендации / А. П. Левицький, О. А. Макаренко, О. В. Деньга, О. И. Сукманський, Р. П. Подорожная, Л. Н. Россаханова, И. В. Ходаков, Ю. В. Зеленина. - К.: ГФЦ, 2005. - 30с. КФ і ЛФ і ІМ 4. Панасюк Я. В. Біохімічна характеристика посттравматичного репаративного остеогенезу при застосуванні наноаквахелатів металів / Я. В. Панасюк, М. М. Корда. - Літопис травматології та ортопедії. - №1-2, 2014. - С.62-65. 5. Панасюк Я. В. Вплив ловастатину на регенерацію кісткової тканини у щурів / Я. В. Панасюк, М. М. Корда. - Медична хімія. - 2014. - Т. 16, № 3. - С. 36-40. 6. Тетянец С. С. Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови / / Лаб. дело. - 1985. - № 1. - С. 61-62. 7. Чинники ризику, діагностика та лікування порушень репаративного остеогенезу при діафізарних переломах довгих кісток: [методичні рекомендації] / М.О. Корж, Л.Д. Горидова, К.К. Романенко, Н.В. Дедух. - К., 2005. - 20 с. 8. Шараев П.Н., Пишков В.Н., Зворыгина Н.Г., Шинкарева Л.Ф., наполевских В.М., Роготнев А.Н., Ибатов А.Д. Определение коллаген-литической активности плазмы крови // Лаб. Дело. - 1987. - № 1. - С. 60-62. 9. Agrawal V. A review on carrier systems for bone morphogenetic protein-2 / Agrawal V, Sinha M. // J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater. 2016. - P. 351-357. 10. Biomaterials with Antibacterial and Osteoinductive Properties to Repair Infected Bone Defects. / [Lu H, Liu Y, Guo J. et al.] // Int. J. Mol. Sci. 2016. - Vol. 17. - P. 135-142. 11. Can low doses of simvastatin enhance fracture healing? An experimental study in rabbits. / [Chissas D., Stamatopoulos G., Verettas D. et al.] // Injury. 2010. - Vol. 41. - P. 687-692. 12. Local drug delivery for enhancing fracture healing in osteoporotic bone. / [Kyllonen L., D'Este M., Alini M. et al.] // Acta. Biomater. 2011. - P. 412-434. 13. Local injection of lovastatin in biodegradable polyurethane scaffolds enhances bone regeneration in a critical-sized segmental defect in rat femora. / [Yoshii T., Hafeman A. E., Esparza J. M. et al.] // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2014. - Vol. 8. - P. 589-595. 14. Percutaneous lovastatin accelerates bone healing but is associated with periosteal soft tissue inflammation in a canine tibial osteotomy model. / [Bleedorn J. A., Sullivan R., Lu Y. et al.] // J. Orthop. Res. 2014. - Vol. 32. - P. 210-216. 15. Statins: under investigation for increasing bone mineral density and augmenting fracture healing. / [Tang Q. O., Tran G. T., Gamie Z. et al.] // Expert Opin. Investig. Drugs. 2008. - Vol. 17. - P. 1435-1436. 16. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins / Mundy G., Garrett R., Harris S. et al. // Science. 1999. - Vol. 286. - P. 1946-1949.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМБИНАЦИИ НАНОАКВАХЕЛАТИВ МЕТАЛЛОВ И НАНОЧАСТИЦ ЛОВАСТАТИНА ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА У КРЫС

Я. В. Панасюк, К. С. Волков, М. М. Корда

Резюме. На 128 белых половозрелых крысах-самцах изучено влияние комбинации наноаквахелатив Са, Cu, Co, Zn, Mg, Fe и наночастиц ловастатина на процессы остеорегенерации и остеорезорбции. Показана целесообразность применения данных средств для оптимизации метаболизма костной ткани при скелетной травме. Положительное влияние комбинации подтверждено достоверными изменениями маркеров остеогенеза и динамикой рентгенологической картины.

Ключевые слова: наноаквахелаты, ловастатин, наночастицы, остеорегенерация, остеопороза резорбция, костный дефект.

USING A COMBINATION OF METALS NANOAKVAHELAT AND NANOPARTICLES OF LOVASTATIN TO STIMULATE REPARATIVE OSTEOGENY IN RATS

Ya. V. Panasiuk, K. S. Volkov, M. M. Korda

Abstract. Studied the effect of a combination of nanoaquachelates Ca, Cu, Co, Zn, Mg, Fe and nanoparticles of lovastatin on the processes of osteoregeneration and osteoresorption at 128 white mature male rats. The expediency of application of these means to optimize metabolic bone at skeletal trauma. The positive impact of the proposed combination is confirmed by significant changes in markers of bone formation and dynamics of X-ray pictures.

Key words: nanoaquachelates, lovastatin, nanoparticles, osteoregeneration, osteo resorption, bone defect.

**Higher State Educational Establishment of Ukraine
"Ternopil State Medical University", Chernivtsi**

Clin. and experim. pathol.- 2016.- Vol.15, №2 (56).ч.2.-P.53-59.

Надійшла до редакції 28.04.2016

Рецензент – доц. А.А. Ходоровська

© Я. В. Панасюк, К. С. Волков, М. М.Корда, 2016
