

ЭФФЕКТ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ ЛОВАСТАТИНА ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ОСТЕОРЕГЕНЕРАЦИИ В УСЛОВИЯХ КОСТНОГО ДЕФЕКТА У КРЫС

Я.В. ПАНАСЮК, М.М. КОРДА

Тернопольский Государственный медицинский университет им. И.Я. Горбачевского, Украина, г. Тернополь

КАЛАМУШЛАР СУЯК НУҚСОНИ ШАРОИТИДА ОСТЕОРЕГЕНЕРАЦИЯНИ ТАКОМИЛЛАШТИРИШ УЧУН ЛОВАСТАТИН ЯНГИ ҚИСМЛАРИНИ ҚЎЛЛАШ АФЗАЛЛИГИ

Я.В. ПАНАСЮК, М.М. КОРДА

И.Я. Горбачевский номидаги Тернополь Давлат медицина университети, Украина, Тернополь

EFFECT OF NANOPARTICLES LOVASTATIN OSTEOREGENERATION FOR OPTIMIZATION IN THE BONE DEFECT IN RATS

Ya.V. PANASYUK, M.M. KORDA

Ternopil State Medical University named after I.Ya. Gorbachevsky, Ukraine, Ternopol

Тадқиқот ишида каламушлар травматик суяк нуқсониди ловастатин янги қисмларини трансдермал киритилгандан сўнг остеорегенерациянинг биохимик кўрсаткичлар натижаси келтирилган. Ишқорий ва кислотали фосфатаза активлиги, минерализация индекси, кон зардобининг колагенолитик фаоллиги ва гликозамингликанлар бўлиши каби бириктирувчи тўқиманинг биохимик маркерлари одатдаги шаклда ловастатинни қўллаш заминада суяк травматикада назорат гуруҳига нисбатан етарли ўзгаришлар билан характерланди. Ловастатин янги қисмлари билан травматик нуқсонни даволашда бириктирувчи тўқима алмашинув кўрсаткичлари натижалари кўринарли бўлди, бу остеорегенерацияни такомиллаштириш учун бундай шаклдаги дори воситасини қўллаш мумкинлигидан дарак берди.

Калит сўзлар: *янги қисмлар, ловастатин, остеорегенерация.*

The results of biochemical parameters of osteoregeneration in rats with traumatic bone defect in the lovastatin nanoparticles transdermal administration have been shown in this study. Biochemical markers of connective tissue, such as alkaline and acid phosphatases activity, index of mineralization, collagenolytic activity of plasma and the content of glycosaminoglycans, in rats with bone trauma treated with lovastatin in regular form were not changed significantly compared to the control. Indicators of connective tissue metabolism markedly improved in rats with traumatic defect treated with lovastatin incorporated into nanoparticles. Our results predict the possibility of the using of lovastatin nanoparticles for the optimization of osteoregeneration.

Keywords: *nanoparticles, lovastatin, osteoregeneration.*

Введение. В современной медицинской практике для регулирования остеорегенерации преимущественно применяют ингибиторы остеорезорбции [2, 4], стабилизирующие костную массу путем подавления активности остеобластов. Наиболее изученными из них являются бисфосфонаты, кальцитонин, эстрогены, витамин Д с аналогами, иприфлавон [1, 2, 10]. Однако, способность вышеперечисленных препаратов увеличивать костную массу является относительно небольшой, и не превышает 2% в год [3, 4]. Поэтому, актуальным является поиск новых препаратов, способных стимулировать остеорегенерацию при помощи других механизмов. Доказан факт важной роли молекулярных факторов роста в процессе остеорегенерации, в частности костных морфогенетических белков (bone morphogenetic proteins) [6, 7, 8, 10]. Костные морфогенетические белки (КМБ) имеют выраженное специфическое остеоиндуктивное дей-

ствие. Среди всех изоферментов наибольшую активность в плане стимуляции остеогенеза имеет КМБ-2 [6, 7]. Поэтому, альтернативным путем в стимуляции репаративного остеогенеза и увеличении костной массы является поиск фармакологических стимуляторов КМБ-2. Такими стимуляторами, вызывающими повышенную экспрессию КМБ-2 *in vivo* и *in vitro*, являются статины [6, 8, 15], хотя результаты отдельных сообщений ставят под сомнение эффективность последних относительно костного метаболизма [6, 7, 8].

Материалы и методы исследования: В эксперименте использовали 168 белых половозрелых крыс-самцов, разделенных на 4 группы: I - интактные животные, n=8; II - животные с костным дефектом без лечения (контрольная группа), n=32; III - животные с костным дефектом, получавшие ловастатин (ЛВ) в обычной форме в разных дозах (0,1, 1,0 и 5, 0 мг/кг), n=96; IV -

животные, леченные наночастицами ловастатина (НЛВ) в дозе 100 нг/кг, $n=32$.

Группам животных, которым проводилось лечение, ловастатин вводили ежедневно трансдермально в зоне созданного костного дефекта. Модель посттравматического костного дефекта создавали с помощью стоматологического бора диаметром 2,0 мм в проксимальном отделе большеберцовой кости. Всем животным со скелетной травмой в течение первых трех дней вводили внутримышечно обезболивающие (анальгин в дозе 5 мг/кг) и антибактериальные препараты (цефтриаксон в дозе 10 мг/кг) для профилактики гнойно-септических осложнений.

Полимерные хитозановые наночастицы с ловастатином готовили путем ионного «сшивания» хитозана с триполифосфатом натрия (ТРП). Раствор хитозана (0,2%) готовили на 1% растворе уксусной кислоты и инкубировали с исследуемым препаратом в течение 30 мин при комнатной температуре. До 25 мл инкубационной смеси по каплям добавляли 10 мл 0,1% водного раствора ТРП. Смесь постоянно перемешивали с помощью магнитной мешалки (700 об./мин). Полученные наночастицы осаждали центрифугированием (28000 об./мин.) в течение 30 мин.

Забой животных проводили путем декапитации под тиопенталовым наркозом на 3-й, 7-й, 14-й и 28-й день. В сыворотке крови определяли уровень Са и Р с помощью стандартных наборов, активность кислой (КФ) и щелочной (ЩФ) фосфатаз [11], индекс минерализации (ЛФ/КФ), колагенолитическую активность (КАП) и содержание гликозамингликанов (ГАГ) [14]. Статистический анализ результатов проведен в отделе системных статистических исследований Тернопольского государственного медицинского уни-

верситета имени И. Я. Горбачевского с помощью программы STATISTICA-10 (StatSoft) с использованием критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. По характеру протекания биологических процессов при посттравматической регенерации костной ткани можно выделить три основные стадии: повреждения, восстановления и ремоделирования кости [10]. На стадии повреждения течение каскада биохимических процессов происходит по типу асептического воспаления. Происходит некроз и ишемия травмированных тканей, аутолиз поврежденных клеток костной ткани и формируется гематома. Пик активности катаболических процессов наблюдается на 2-3-й день.

В нашем эксперименте через трое суток после нанесенного повреждения полученные данные биохимических показателей соответствовали первой стадии восстановления костной ткани. В частности, у всех животных, которым создавали травматический костный дефект, по сравнению с интактными, отмечали статистически достоверное повышение концентрации Са и Р в сыворотке крови. Стоит отметить, что достоверной разницы между контрольной группой и животными, которые получали ловастатин, не было (рис. 1, 2). На 3-и сутки подобную динамику изменения биохимических показателей наблюдали для щелочной и кислой фосфатаз - по сравнению с интактными животными отмечалось достоверное повышение активности обоих ферментов в сыворотке крови крыс контрольной группы, а ловастатин не способствовал достоверному изменению показателей ЛФ и КФ по сравнению с животными контрольной группы (рис. 3, 4).

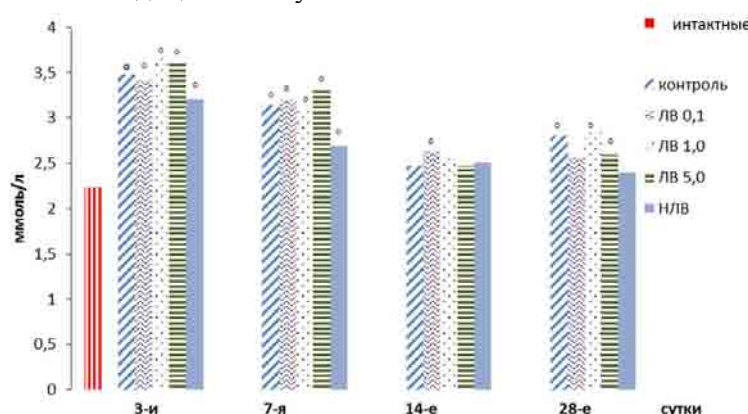


Рис. 1. Динамика уровня Са у животных с посттравматической остеорегенерацией при введении ловастатина и наночастиц ловастатина.

Примечание: здесь и на следующих рисунках:

- - изменения достоверны относительно показателей интактных крыс;
- * - изменения достоверны относительно животных контрольной группы;
- - изменения достоверны относительно животных, получавших ЛВ в дозе 0,1 мг / кг;
- - изменения достоверны относительно животных, получавших ЛВ в дозе 1,0 мг / кг;
- - изменения достоверны относительно животных, получавших ЛВ в дозе 5,0 мг / кг.

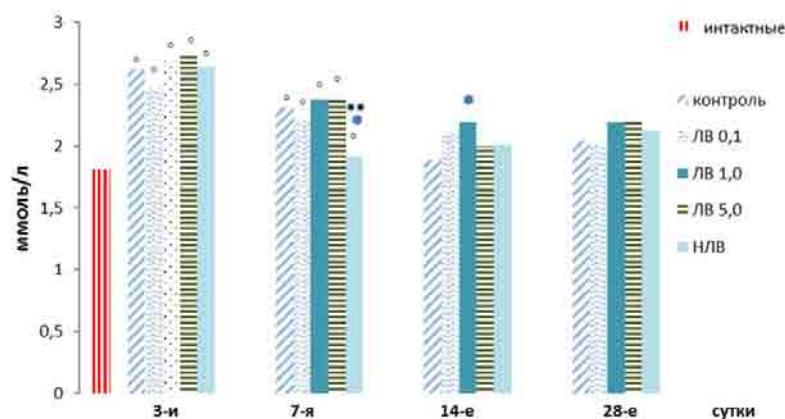


Рис. 2. Динамика уровня Р у животных с посттравматической остеорегенерацией при введении лова-статина и наночастиц ловастатина.

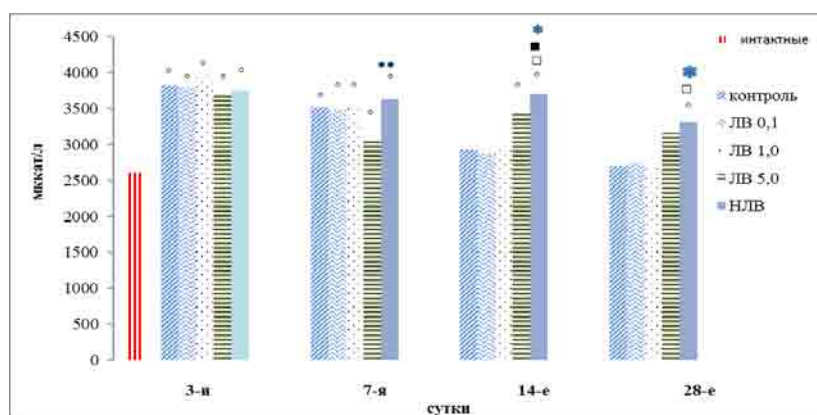


Рис. 3. Динамика активности ЛФ в сыворотке крови крыс с костным дефектом, которым вводили лова-статин в различных дозах и наночастицы ловастатина.

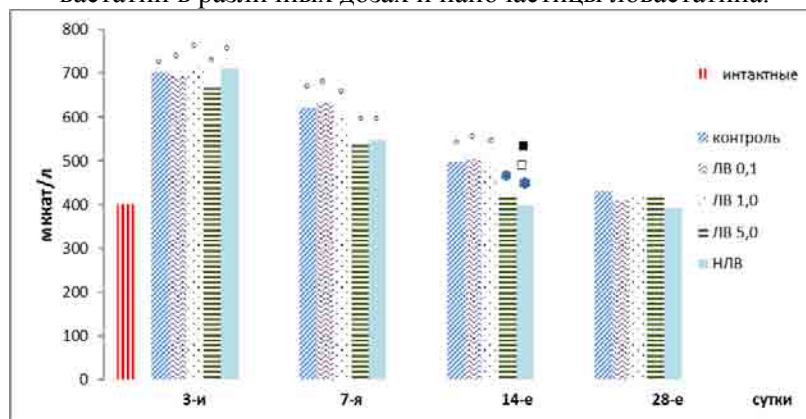


Рис. 4. Динамика активности КФ в сыворотке крови крыс с костным дефектом, которым вводили лова-статин в различных дозах и наночастицы ловастатина.

Полученные нами данные показателей уровня Са и Р и активности ЛФ и КФ на третий день можно объяснить развитием деструктивных изменений, протеолизом некротической ткани, что в свою очередь способствует повышению поступления микроэлементов и ферментов в кровяное русло. Изменение показателей активности ЛФ и КФ отразилось на динамике индекса минерализации. Если у интактных животных этот показатель составил $6,63 \pm 0,37$, то в контрольной группе - $5,66 \pm 0,52$, что на 14,6% меньше. У жи-

вотных, получавших ловастатин трансдермально в дозе 0,1, 1,0 и 5,0 мг/кг индекс минерализации составил соответственно $5,55 \pm 0,37$ (-16,3%), $5,52 \pm 0,17$ (-16,7%) и $5,67 \pm 0,49$ (-14,5%). В группе животных, получавших наночастицы ловастатина, индекс минерализации был на 19,9% меньше по сравнению с интактными животными (рис. 5). Динамику изменения показателей индекса минерализации можно обосновать преобладанием катаболических процессов на данном этапе восстановления костного дефекта.

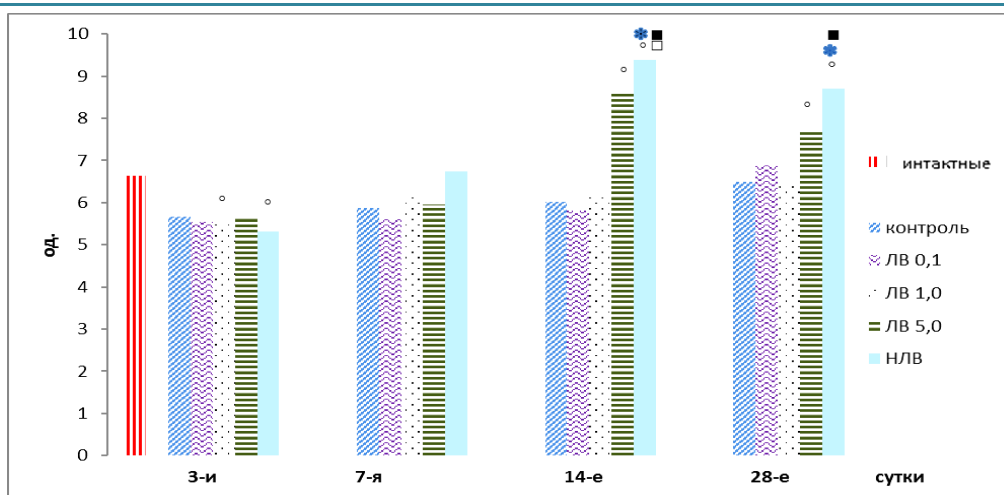


Рис. 5. Показатели индекса минерализации у животных с костным дефектом на фоне лечения ловастатином в различных дозах и наночастицами ловастатина.

Создание травматического костного дефекта также сопровождалось изменением содержания гликозамингликанов в сыворотке крови. В частности, уровень ГАГ в интактных животных составил $57,05 \pm 2,56$ мкмоль/л, тогда как в группе контрольных животных этот показатель вырос на 130,8% ($P \leq 0,01$). Такой рост данного показателя характеризует ухудшение костного метаболизма, спровоцированное харак-

тером травмы. У животных, получавших ловастатин в дозе 0,1, 1,0 и 5,0 мг/кг также отмечалось повышение ГАГ по сравнению с интактными животными на 116,5%, 89,1% и 126,1% соответственно (во всех трех группах $P \leq 0,01$), а у животных получавших ловастатин в виде наночастиц данный показатель составлял $104,9 \pm 5,91$ мкмоль/л и статистически отличался по сравнению с контрольной группой ($P \leq 0,01$).

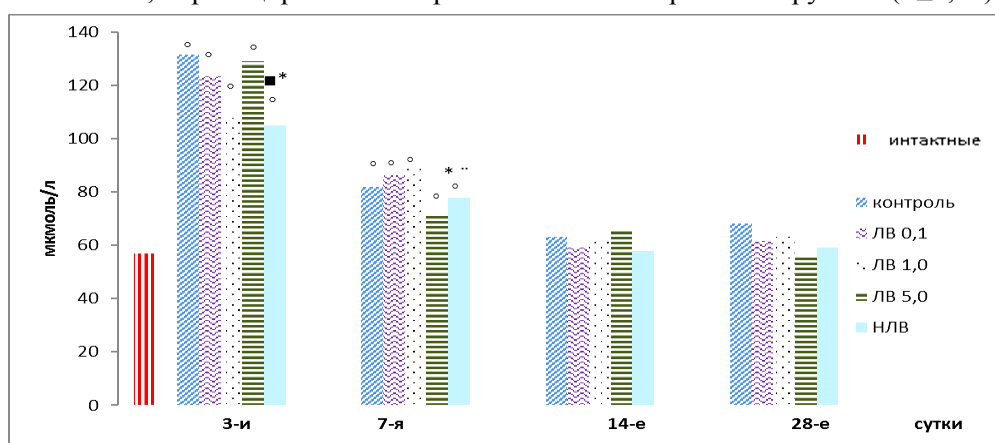


Рис. 6. Показатели содержания гликозаминогликанов у животных с костным дефектом на фоне лечения ловастатином в различных дозах и наночастицами ловастатина.

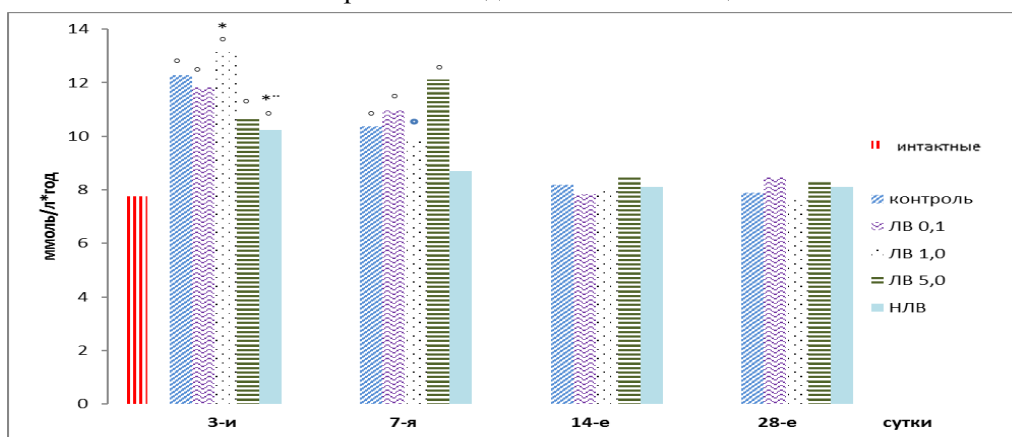


Рис. 7. Динамика колагенолитической активности плазмы крови у животных с костным дефектом на фоне лечения ловастатином в различных дозах и наночастицами ловастатина.

На 3-и сутки также отмечали статистически достоверный рост колагенолитической активности плазмы крови по сравнению с интактными животными, что подтверждает протекание асептического воспалительного процесса в зоне костного дефекта. В интактных животных этот показатель зафиксирован на уровне $7,76 \pm 0,33$. КАП крови резко возрастала в контрольной группе (на 58,1%), у животных получавших ловастатин в дозе 0,1 мг/кг (на 52,4%), в дозе 1,0 мг/кг (на 69,3%), в дозе 5,0 мг/кг (на 37,6%). Наименьший рост КАП крови (на 31,9%) отмечен в группе животных, получавших наночастицы ловастатина.

На седьмой день эксперимента наблюдали нормализацию всех биохимических маркеров регенерации костной ткани по сравнению с третьим днем. Применение наночастиц ловастатина не способствовало статистически достоверной разнице показателей остеорегенерации и остеорезорбции по сравнению с животными контрольной группы (рис. 1-7). Полученные результаты указывают на уменьшение воспалительных и деструктивных процессов в травмированных животных на седьмой день.

На четырнадцатые сутки отмечали последующую нормализацию показателей Са и Р в сыворотке крови во всех исследуемых группах. У животных, которым вводили ловастатин статистически достоверной разницы между группами не выявлено (рис. 1-2). Показатели активности щелочной фосфатазы на четырнадцатый день также уменьшались в контрольной группе, и в группе животных, получавших ловастатин в дозе 0,1 и 1,0 мг/кг. Их величины приближались к показателям интактных животных и статистически с ними не отличались (табл. 1-2). В то же время активность щелочной фосфатазы в группе животных, получавших ловастатин в дозе 5 мг/кг и в виде наночастиц оставалась достаточно высокой - $3427,4 \pm 143,4$ мккат/л (на 117% больше контрольной группы, $P \leq 0,01$) и $3704,6 \pm 129,9$ мккат/л (на 126,7% больше контрольной группы, $P \leq 0,01$). Если учесть, что на данном сроке исследования наиболее активно проходит пролиферация костной ткани именно за счет остеобластов, содержащих в большом количестве ЛФ, то можно утверждать, что интенсивность течения остеорепаративных процессов в этих двух группах на данном этапе выше.

Активность КФ на четырнадцатый день значительно снизилась. Так, в контрольной группе данный показатель составил $496,6 \pm 30,3$ мккат/л. Близкими были показатели активности КФ у животных, которым вводили ловастатин в дозе 0,1 мг/кг ($504,0 \pm 38,5$ мккат/л) и 1,0 мг/кг

($487,4 \pm 30,5$ мккат/л), в этом случае данные показатели статистически не отличались от контрольной группы. Полученные величины могут свидетельствовать о завершении остеорезорбтивных явлений в исследуемых группах. По сравнению с контрольной группой более существенным оказалось уменьшение активности КФ у животных, которым вводили ловастатин в дозе 5,0 мг ($420,6 \pm 34,2$ мккат/л, что на 15,3% меньше по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$) и в группе животных, леченных наночастицами ловастатина ($408,9$ мккат/л, что на 17,6% меньше по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$). По данным уровней активности КФ можно говорить о менее интенсивной остеорезорбции на четырнадцатый день у крыс, получавших наноловастатин и ловастатин в дозе 5,0 мг/кг.

Индекс минерализации по сравнению с контролем достоверно вырос в группе животных, леченных ловастатином в дозе 5,0 мг/кг ($+42,7\%$, $p \leq 0,05$) и наночастицами ловастатина ($+55,8\%$, $p \leq 0,05$). Вероятно, такая динамика ИМ свидетельствует о более интенсивной остеорегенерации в данных животных.

Биохимические показатели ГАГ и КАП крови на четырнадцатый день у животных III-й и IV-й групп статистически не отличались от контрольной группы и от интактных животных, что свидетельствует о значительном угасании воспалительных процессов у экспериментальных животных на этой стадии исследования.

На 28-е сутки полученные данные характеризовались нормализацией практически всех биохимических маркеров остеорегенерации, что может свидетельствовать о завершении пролиферативных явлений. Отмечали только достоверное увеличение показателя ИМ в группе животных, получавших ловастатин в дозе 5 мг/кг, и животных, получавших наночастицы ловастатина. Вероятно, данные изменения обусловлены интенсивной рекальцификацией костной мозоли в этот период исследования.

Выводы. 1. Трансдермальное введение ловастатина в дозах 0,1, 1,0 и 5,0 мг/кг существенно не способствует стимуляции остеорегенерации в посттравматическом периоде. 2. Введение наночастиц ловастатина способствует достоверным изменениям показателей активности кислой и щелочной фосфатазы, индекса минерализации на 14-й и 28-й день после травмы, что свидетельствует о положительной динамике стимуляции остеорегенерации. 3. Использование ловастатина, заключенного в хитозановые наночастицы, может быть перспективным методом восстановления травматического костного дефекта.

Литература:

1. Balasundaram G. Nanotechnology and biomaterials for orthopedic medical applications. Review / G. Balasundaram, T. J. Webster // *Nanomedicine*. - 2006. - Vol. 2. - P. 169-76.
2. Effects of osteoporosis and nutrition supplements on structures and nanomechanical properties of bone tissue / [Chang Y. T., Chen C. M., Tu M. Y. et all.] // *Mech. Behav. Biomed. Mater.* — 2011. — Vol. 7. - P.1412-20.
3. No Y. J. Nanomaterials: the next step in injectable bone cements / Y. J. No, S. I. Roohani-Esfahani, H. Zreiqat // *Nanomedicine*. - 2014. - Vol. 11. - P. 1745-64.
4. Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering / [Saiz E., Zimmermann E. A., Lee J.S. et all.]. *Dent Mater.* - 2013. P. 103-15.
5. Pleshko N. Nanotechnology in orthopaedics / Pleshko N., Grande D. A., Myers K. R. // *J. Am Acad. Orthop. Surg.* - 2012. - P. 60-62.
6. Reconstruction of alveolar bone defects using bone morphogenetic protein 2 mediated rabbit dental pulp stem cells seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide) / [Liu HC, E LL, Wang DS et all.]. - *Tissue Eng Part A*. — 2011. - P. 2417-33.
7. Sampath T.K., Maliakal G.C., Hauschka P.V. Recombinant human osteogenic protein-1 (rhOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro // *J. Biol. Chem.* - 1992. - P. 20352-20362.
8. Serum bone formation marker correlation with improved osseointegration in osteoporotic rats treated with simvastatin / [Du Z, Chen J, Yan F et all.]. - *Clin. Oral. Implants Res.* - 2013. - Vol. 24-A. - P. 422-427. 2013 Apr;24(4). - 422-7 p.
9. Streicher R. M. Nanosurfaces and nanostructures for artificial orthopedic implants. Review / Streicher RM, Schmidt M, Fiorito S. - *Nanomedicine*. — 2007. - P. 861-874.
10. Xu X. Bone morphogenetic protein-2-encapsulated grafted-poly-lactic acid-polycaprolactone nanoparticles promote bone repair / [Xu X, Yang J, Ding L, Li J.]. - *Cell BiochemBiophys.* - 2015. - Vol. 71. - P. 212-225
11. Левицкий А.П. Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза: Метод. рекомендации / А. П. Левицкий, А. Макаренко, А. В. Деньгаи др. - М.: ГФЦ, 2005. - 30 с.
12. 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.
13. Панасюк Я. В. Вплив ловастатину на регенерацію кісткової тканини у щурів / Я. В. Панасюк, М. М. Корда. — Медична хімія. - 2014. - Т. 16, № 3. - С. 123.
14. Шараев П. Н., Пишков В. Н., Зворыгина Н.Г., Шинкарева Л.Ф., напольских В. М., Роготнев А.Н., Ибатов А.Д. Определение коллагенолитической активности плазмы крови // *Лаб. Дело*. - 1987. - № 1. - С. 60-62.
15. Шварц Г.Я. Статины и формирование кости // *Остеопороз и остеопатии*. 2003. No 3. С. 17–20.

ЭФФЕКТ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ ЛОВАСТАТИНА ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ОСТЕОРЕГЕНЕРАЦИИ В УСЛОВИЯХ КОСТНОГО ДЕФЕКТА У КРЫС

Я.В. ПАНАСЮК, М.М. КОРДА

Тернопольский Государственный медицинский университет им. И.Я. Горбачевского,
Украина, г. Тернополь

В работе приведены результаты исследования биохимических показателей остеорегенерации у крыс при травматическом костном дефекте на фоне трансдермального введения наночастиц ловастати́на. Биохимические маркеры соединительной ткани, такие как активность щелочной и кислой фосфатаз, индекс минерализации, колагенолитическая активность плазмы крови и содержание гликозамингликанов, при костной травме на фоне использования ловастати́на в обычной форме характеризовались достоверными изменениями относительно контроля. Более информативными были результаты показателей обмена соединительной ткани при лечении травматического дефекта наночастицами ловастати́на, что свидетельствовало о возможности использования такой формы препарата для оптимизации остеорегенерации.

Ключевые слова: наночастицы, лова-
статин, остеорегенерация.