

© Панасюк Я.В., Корда М.М.

УДК: 616.71-007-085.27]-092.9

Панасюк Я.В., Корда М.М.

ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України" (майдан Волі, 1, Тернопіль, Тернопільська область,

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК ЛОВАСТАТИНУ НА ОСТЕОРЕГЕНЕРАЦІЮ ПРИ ТРАВМАТИЧНОМУ КІСТКОВОМУ ДЕФЕКТІ У ЩУРІВ

Резюме. При травматичному кістковому дефекті на фоні трансдермального введення наночастинок ловастатину показано ефект даного середнику на результати біохімічних показників остеорегенерації у щурів у експериментальному дослідженні.

Ключові слова: кістковий дефект, остеорегенерація, наночастинок, ловастатин.

Вступ

Останнім часом у наукових публікаціях вчені відзначають здатність статинів впливати на остеорегенерацію, зокрема стимулювати даний процес. У експериментальних дослідженнях було показано що статини стимулюють синтез кісткового морфогенетичного білка - 2, збільшуючи диференціацію остеобластів та прискорюють остеорегенерації [2, 7]. Також є дані про взаємозв'язок між рівнем ліпідів та мінеральною щільністю кісткової тканини [1, 8, 11].

Доведеним є факт важливої ролі молекулярних факторів росту у процесі остеорегенерації, зокрема кісткових морфогенетичних білків (bone morphogenetic proteins) [3, 7, 9]. Кісткові морфогенетичні білки (КМБ) мають виражену специфічну остеоіндуктивну дію. Серед всіх ізоферментів найбільшу активність стимуляції остеогенезу має КМБ-2 [4, 6, 10]. Тому, альтернативним у стимуляції збільшення кісткової маси є пошук фармакологічних стимуляторів КМБ-2. Одним із таких середників, що викликають підвищену експресію КМБ-2 *in vivo* та *in vitro* є статини [6, 7, 8], хоч результати окремих повідомлень ставлять під сумнів ефективність останніх щодо кісткового метаболізму [10].

Мета роботи - дослідити вплив наночастинок ловастатину на метаболізм кісткової тканини при експериментальній скелетній травмі.

Матеріали та методи

Дослідження виконували на базі віварію та центральної науково-дослідної лабораторії Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського. Експеримент проводили на білих статевозрілих щурах-самцях (n=168). Модель післятравматичного кісткового дефекту створювали за допомогою стоматологічного бору діаметром 2,0 мм у проксимальному відділі. Усім щурам із скелетною травмою протягом перших трьох днів вводили внутрішньом'язево знеболюючі (анальгін у дозі 10 мг/кг) та антибактеріальні (цефтріаксон у дозі 5 мг/кг) препарати для профілактики гнійно-септичних ускладнень.

Експериментальних тварин було поділено на 4 групи: I - інтактні тварини; II - контрольна група (створення кісткового травматичного дефекту); III - тваринам на тлі травми вводили ловастатин у дозі 0,1 мг/кг (IIIa-група),

1,0 мг/кг (IIIб-група), 5,0 мг/кг (IIIв-група); IV - тварини із скелетною травмою, ліковані наночастинками ловастатину в дозі 100 нг/кг. Третій та четвертій групі тварин ловастатин вводили протягом всього експерименту щоденно трансдермально у зоні створеного кісткового дефекту у вищеперерахованих дозах.

Виготовлення наночастинок ЛВ. Полімерні хітозанові наночастинок готували шляхом іонного "зшивання" хітозану з триполіфосфатом натрію (TRP). Розчин хітозану (0,2 %) готували на 1 % розчині оцтової кислоти й інкубували з досліджуваним препаратом протягом 30 хв. при кімнатній температурі. До 25 мл інкубаційної суміші по краплях додавали 10 мл 0,1 % водного розчину TRP. Суміш постійно перемішували за допомогою магнітної мішалки (700 об/хв.). Забій тварин проводили шляхом декапітації під тиопенталом наркозом на 3-й, 7-й, 14-й та 28-й день. У сироватці крові визначали рівень Са та Р (із використанням стандартних наборів), активність кислотої та лужної фосфатази [12], індексу мінералізації (ЛФ/КФ), колагенолітичну активність плазми крові [13] і вміст глікозамінгліканів [11].

Статистичний аналіз результатів проведено у відділі системних статистичних досліджень ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України" з використанням критерію Манна-Уїтні.

Результати. Обговорення

При посттравматичній регенерації кісткової тканини проходять три послідовні стадії: пошкодження, відновлення та ремоделювання кістки [5]. На стадії пошкодження каскад біохімічних процесів перебігає як асептичне запалення: некроз, ішемія травмованих тканин, аутоліз пошкоджених клітин кісткової тканини та гематоми. Пік активності катаболічних процесів спостерігається на 2-3-ю добу. У нашому експерименті через три доби після нанесеного пошкодження отримані дані біохімічних показників відповідали першій стадії відновлення кісткової тканини. У всіх тварин зі створеним кістковим дефектом мало місце статистично достовірне ($p \leq 0,01$) підвищення концентрації мікроелементів (Са і Р) у сироватці крові в порівнянні з інтактними тваринами. Однак, різниця цих показників у тварин, що отри-

мували ловастатин не була достовірною порівняно з контролем (рис. 1, 2). Подібна динаміка змін ЛФ та КФ починаючи з 3-ї доби спостереження зафіксована в експериментальній групі щурів, що отримували ловастатин у різних дозах та у вигляді наночастинок у порівнянні з інтактними тваринами; діагностовано достовірне зростання активності обох ферментів у сироватці крові (рис. 3-4).

Активність ферментів корелювала із коливаннями рівнів мікроелементів сироватки крові спостережуваних тварин, будучи достовірно вищою у групах лікованих ловастатином порівняно з контролем.

Очевидно, отримані нами дані показників Са, Р, ЛФ та КФ у тварин експериментальної серії на 3-ю добу обумовлені початком деструкції осколкових часток травмованої кістки та країв кісткового дефекту, протеолізом некротизованих пошкоджених оточуючих тканин, що ініціює посилене надходження мікроелементів та ферментів до кров'яного руслу.

Активність ЛФ та КФ тісно пов'язана з динамікою ІМ. В інтактних тварин цей показник на 14,63% перевищував контроль ($6,63 \pm 0,37$ проти $5,66 \pm 0,52$), тоді як у тварин, що отримували ловастатин у всіх групах ІМ на 3-ю добу практично не відрізнявся від контролю, але був нижчим за групу інтактних: $5,55 \pm 0,37$ (-16,3%), $5,52 \pm 0,17$ (-16,7%), $5,67 \pm 0,49$ (-14,5%), з найнижчим рівнем у тварин, що отримували наночастинки ловастатину ($5,31 - 19,9\%$). Виявлена тенденція порівняно зі здоровими тваринами зниження ІМ, очевидно, пов'язана з переважанням катаболічних процесів на ранньому етапі відновлення кісткового дефекту (рис. 5).

Змодельований травматичний кістковий дефект призводив до виразного (на 130,85%) зростання вмісту ГЗГ у сироватці крові як індикатора порушень кісткового метаболізму спровокованих травмою починаючи з 3-го дня спостереження та утриманням даних тенденцій протягом наступного періоду експерименту (рис. 6). У тварин, що отримували ловастатин, рівень ГЗГ у групах тварин лікованих різними дозами ловастатину достовірно ($p < 0,01$) перевищував показники інтактних піддослідних ($57,05 \pm 2,56$ мкмоль/л) перевищуючи останній на 116,56

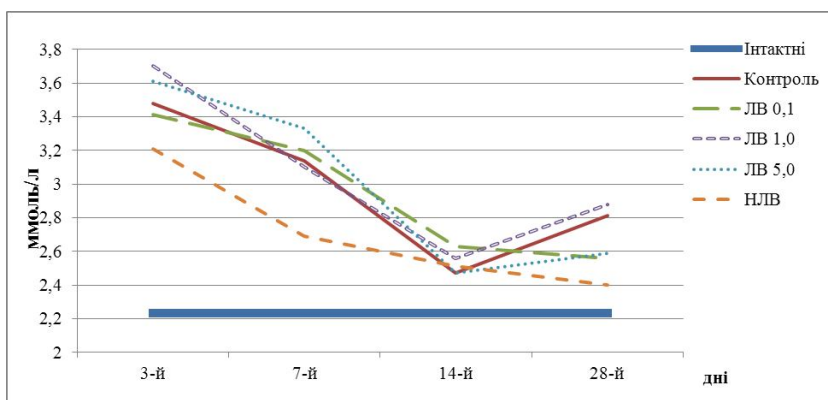


Рис. 1. Динаміка рівня кальцію сироватки крові у тварин досліджуваної групи.

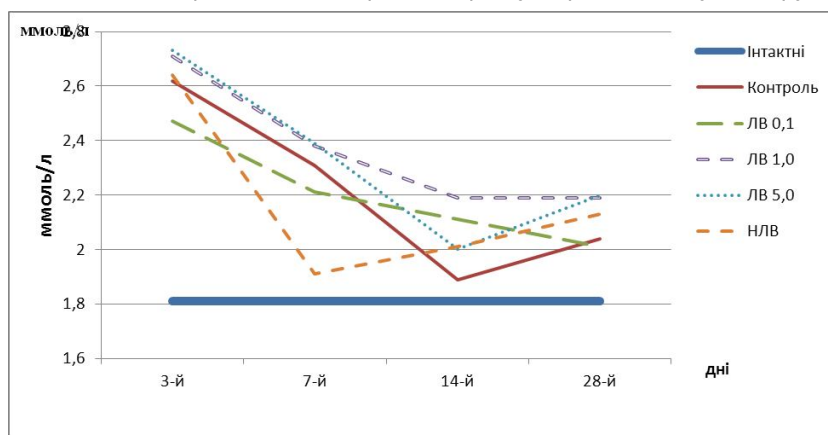


Рис. 2. Динаміка рівня фосфору в досліджуваних тварин.

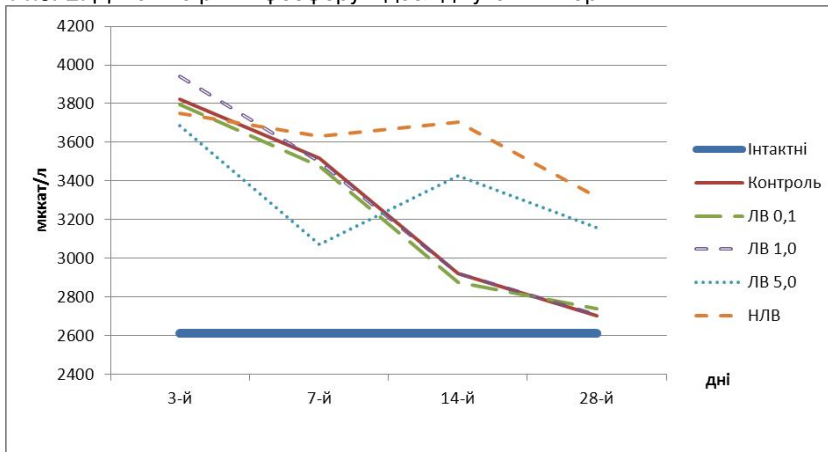


Рис. 3. Динаміка активності ЛФ у сироватці крові щурів з кістковим дефектом в залежності від дози та форми застосування ловастатину.

%, 89,13% і 126,1%, відповідно. Найменш виразне підвищення ГЗГ діагностовано в групі щурів, які отримували ловастатин у вигляді наночастинок - $104,99 \pm 5,91$ мкмоль/л, що на 84% більше за рівень інтактних тварин та достовірно нижче контрольної групи ($p < 0,01$).

На підтвердження протікання асептичного запального процесу в зоні кісткового дефекту з 3-ї доби спостереження в тварин експериментальної групи виявлено статистично достовірне зростання КАПК в по-

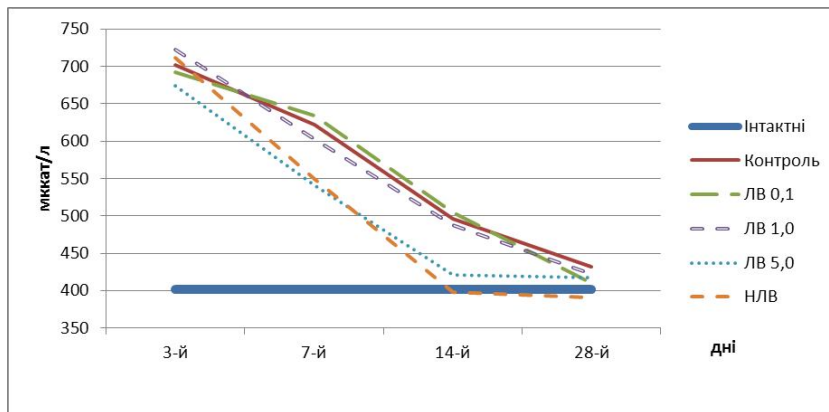


Рис. 4. Динаміка активності КФ у сироватці крові щурів з кістковим дефектом в залежності від дози та форми застосування ловастатину.

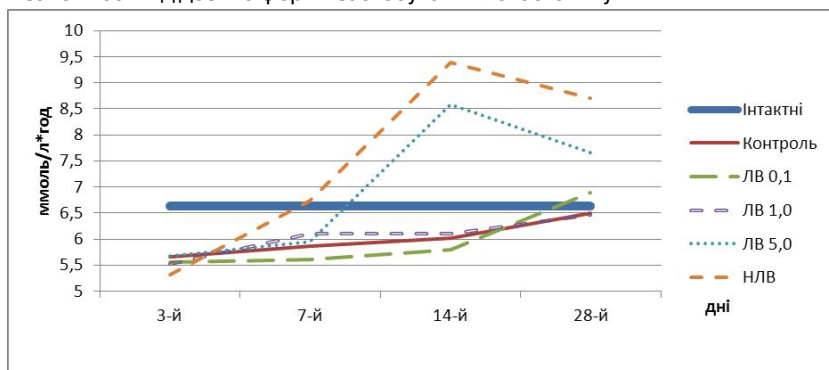


Рис. 5. Показники індексу мінералізації у тварин із кістковим дефектом на тлі лікування ловастатином.

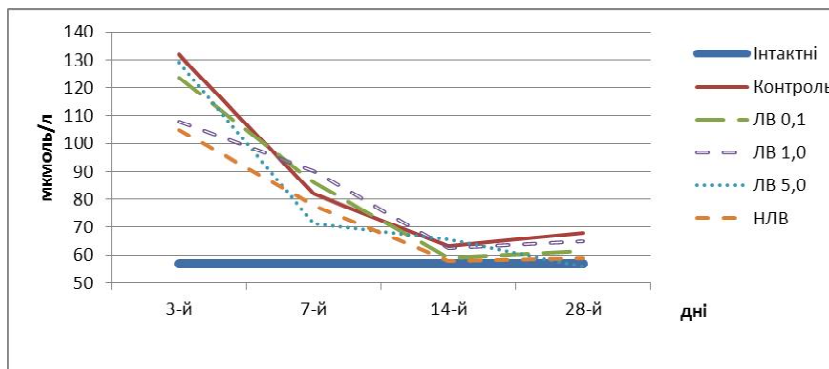


Рис. 6. Динаміка біохімічних показників вмісту глікозамінгліканів у лікованих ловастатином та наночастинками ловастатину тварин із змодельованою посттравматичною остеорегенерацією.

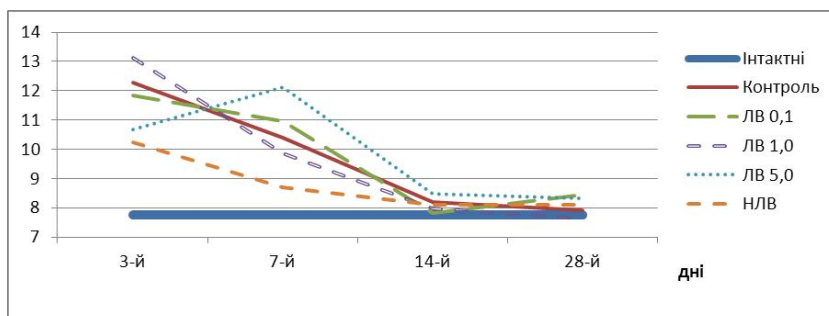


Рис. 7. Динаміка показників КАП у досліджуваних тварин.

рівнянні з інтактними тваринами (рис. 7). У інтактних тварин цей показник зафіксувався на рівні $7,76 \pm 0,33$, різко ($p \leq 0,01$) зростаючи у контрольній групі на 58,12 % та у тварин, що отримували ловастатин у дозі 0,1 (на 52,45 %), у дозі 1,0 мг/кг (на 69,33 %), у дозі 5,0 мг/кг (на 37,63 %). Найменша інтенсивність зростання КАПК діагностована у групі тварин, що отримували наночастинки ловастатину (на 31,96 %), але без достовірної різниці з іншими групами лікованих тварин.

На 7-у добу експерименту в порівнянні з 3-ю ми спостерігали нормалізацію всіх біохімічних маркерів регенерації кісткової тканини. Однак, застосування наночастинок ловастатину не сприяло статистично достовірній різниці показників остеорегенерації і остеорезорбції у порівнянні

із тваринами контрольної групи та тих, що отримували ловастатин у звичайній формі у різних дозах. Отримані результати підтверджують різке зменшення запальних та деструктивних процесів у травмованих тварин на 7-у добу.

Починаючи з 14-ї доби експерименту спостерігались виразні біохімічні зміни в організмі спостережуваних тварин. На цей момент досліду наступила нормалізація рівнів Ca та P у сироватці крові у всіх досліджуваних групах без статистично вірогідної різниці між групами тварин, лікованих ловастатином. Рівень ЛФ нормалізувався у контрольній групі та в групах тварин, що отримували ловастатин у дозі 0,1 та 1,0 мг/кг. Активність ЛФ у групі тварин, що отримували ловастатин в дозі 5 мг/кг та у формі наночастинок утримувалась на високих показниках: $3427,42 \pm 143,41$ мккат/л (на 117 % більше за контрольну групу, $p \leq 0,01$) та $3704,62 \pm 129,9$ мккат/л (на 126,7 % більше за контрольну групу, $p \leq 0,01$), відповідно. Якщо врахувати, що на даному терміні дослідження найбільш активно проходить проліферація кісткової тканини саме за рахунок остеобластів, що містять у великій кількості ЛФ, то можна припустити, що інтенсивність перебігу остеопаративних процесів у цих двох групах на даному етапі вища. На 14-у добу значно знизилась активність КФ у тварин експериментальної групи: в конт-

рольній групі до $496,6 \pm 30,37$ мккат/л та до $504,08 \pm 38,55$ мккат/л $487,42 \pm 3035$ мккат/л у тварин лікованих ловастатином у дозі 0,1 мг/кг і 1,0 мг/кг, відповідно, статистично наблизившись до рівня контрольної групи. Отримані величини свідчать про залишкові остеорезорбтивні явища у досліджуваних групах. Порівняно з контрольною групою виявлено найбільш суттєве зниження активності КФ у тварин, лікованих ловастатином у дозі 5,0 мг ($420,6 \pm 34,28$ мккат/л, що на 15,3 % менше у порівнянні із контролем, $p \leq 0,05$) та в групі тварин, лікованих наночастинками ловастатину ($408,97$ що на 17,65 % менше у порівнянні із контролем, $p \leq 0,05$). Отримані рівні активності КФ свідчать про менш інтенсивну остеорезорбцію на 14-у добу в тварин, що отримували наноловастатин та ловастатин у дозі 5,0 мг/кг.

Аналіз величини ІМ на 14-у добу виявив, що даний біохімічний маркер у порівнянні із контролем достовірно зріс у групі тварин, що ліковані ловастатином у дозі 5,0 мг/кг ($+42,7$ %, $p \leq 0,05$) та наночастинками ловастатину ($+55,8$ %, $p \leq 0,05$). Дана динаміка ІМ засвідчує більш інтенсивну остеорегенерацію у цих тварин. Інші біохімічні показники, ГЗГ та КАПК на цьому ж етапі досліду в тварин лікованих ловастатином статистично не відрізнялись від контрольної групи та від інтактних тварин, що засвідчує про значне згасання запальних процесів у експериментальних тварин на цій стадії дослідження.

На останньому етапі експерименту, на 28-му добу, отримані дані характеризувались нормалізацією практично всіх біохімічних маркерів остеорегенерації, що засвідчило завершення проліферативного процесу.

Утримання достовірно високого рівня ІМ у групі тварин, що отримували ловастатин в дозі 5 мг/кг, та тварин, лікованих наночастинками ловастатину, ймовірно, зумовлені інтенсивнішою рекальцифікацією кісткової мозолі.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Виразні позитивні біохімічні зміни кісткового метаболізму в організмі спостережуваних тварин діагностовано починаючи з 14-ї доби експерименту.

2. Інтенсивність перебігу остеорепаративних процесів на 14-у добу спостереження буда вищою у групі тварин, що отримували лікування ловастатином у дозі 5,0 мг та у вигляді наночастинок.

3. Найнижчу активність остеорезорбтивних процесів за даними рівнів ЛФ, КФ та ІМ виявлено у групі тварин, що отримували лікування ловастатином у дозі 5,0 мг та у вигляді наночастинок.

4. Трансдермальне введення ловастатину у дозах 0,1, 1,0 і 5,0 мг/кг достовірно не впливало на остеорегенерацію зони створеного кісткового дефекту у піддослідних тварин ні на 14-й, ні на 28-й день експерименту.

Отримані результати власних досліджень потребують подальшого ґрунтовного вивчення можливості використання ловастатину для зменшення ризику переломів. Доцільно також провести морфологічний аналіз формування кісткової мозолі на різних стадіях остеорегенерації під впливом різних форм ловастатину.

Список літератури

- Balasundaram G. Nanotechnology and biomaterials for orthopedic medical applications. Review / G. Balasundaram, T.J. Webster // *Nanomedicine*. (Lond). - 2006. - Vol. 1(2). - P. 169-176.
- Effects of osteoporosis and nutrition supplements on structures and nanomechanical properties of bone tissue / Y.T. Chang, C.M. Chen, M.Y. Tu [et al.] // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* - 2011. - Vol. 4 (7). - P. 1412-1420.
- No Y. J. Nanomaterials: the next step in injectable bone cements / Y.J. No, S.I. Roohani-Esfahani, H. Zreiqat // *Nanomedicine* (Lond). - 2014. - Vol. 9 (11). - P. 1745-1764.
- Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering / E. Saiz, E.A. Zimmermann, J.S. Lee [et al.] // *Dent Mater.* - 2013. - Vol. 29 (1). - P. 103-115.
- Pleshko N. Nanotechnology in orthopaedics / N. Pleshko, D.A. Grande, K.R. Myers // *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* - 2012. - Vol. 20 (1). - P. 60-62.
- Reconstruction of alveolar bone defects using bone morphogenetic protein 2 mediated rabbit dental pulp stem cells seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide) / H.C. Liu, L.L. E, D.S. Wang [et al.] // *Tissue Eng. Part A*. - 2011. - Vol. 7 (19-20). - P. 2417-2433.
- 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 / Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 1992. - Vol. 267. - P. 20352-20362.
- Serum bone formation marker correlation with improved osseointegration in osteoporotic rats treated with simvastatin / Z. Du, J. Chen, F. Yan [et al.] // *Clin. Ora. Implants Res.* - 2013. - Vol. 24 (4). - P. 422-427.
- Streicher R. M. Nanosurfaces and nanostructures for artificial orthopedic implants. Review / R.M. Streicher, M. Schmidt, S. Fiorito // *Nanomedicine*. - 2007. - Vol. 2 (6). - P. 861-874.
- Bone morphogenetic protein-2-encapsulated grafted-poly-lactic acid-polycaprolactone nanoparticles promote bone repair / X. Xu, J. Yang, L. Ding, J. Li // *Cell Biochem. Biophys.* - 2015. Vol. 71 (1). P. 212-225.
- Шварц Г. Я. Статины и формирование кости / Г. Я. Шварц // *Osteoporosis and osteopathy*. - 2003. - Vol. 3. - P. 17-20.
- Експериментальні методи дослідження стимуляторів остеогенеза: метод. інстр. / [Левицький А. П., Макаренко О. А., Деньга О. В. і др.]. - Kyiv: Avicena; 2005.
- Определение коллагенолитической активности плазмы крови / П.Н. Шараев, В.Н. Пишков, Н.Г. Зворыгина [и др.] // *Лабораторное дело*. - 1987. - № 1. - С. 60-62.

Панасюк Я.В., Корда М.М.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЛОВАСТАТИНА НА ОСТЕОРЕГЕНЕРАЦИЮ ПРИ ТРАВМАТИЧЕСКОМ КОСТНОМ ДЕФЕКТЕ У КРЫС

Резюме. При травматическом костном дефекте на фоне трансдермального введения наночастиц ловастатина показано

эффект данного средник на результаты биохимических показателей остеорегенерации у крыс в экспериментальном исследовании.

Ключевые слова: *костный дефект, остеорегенерация, наночастицы, ловастатин.*

Panasiuk Y.V., Korda M.M.

THE IMPACT OF NANOPARTICLES OF LOVASTATIN ON OSTEOREGENERATION AT TRAUMATIC BONE DEFECT IN RATS

Summary. *Demonstrated the effect of the transdermal administration of lovastatin nanoparticles in traumatic bone defect on the biochemical parameters of osteoregeneration in rats in the experimental study.*

Key words: *bone defect, osteoregeneration, nanoparticles, lovastatin.*

Рецензент - д.мед.н., проф. Гунас І.В.

Стаття надійшла до редакції 23.11.2015 р.

Панасюк Ярослав Вікторович - здобувач кафедри медичної хімії ТДМУ ім. І.Я. Горбачевського; +38 068 603-82-13
Корда Михайло Михайлович - д.мед.н., проф., ректор ТДМУ ім. І.Я. Горбачевського
