

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МОНОФОСФОНАТА ДИМЕФОСФОНА И БИФОСФОНАТА КСИДИФОНА НА ГИСТОМОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СТРОЕНИЯ ПОЗВОНКОВ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОИДНОГО ОСТЕОПОРОЗА

Л. Е. Зиганшина, З. А. Бурнашова, И. Х. Валеева, И. Г. Салихов, Д. Э. Цыплаков, А. Ю. Галяутдинова., Ю. В. Гарифуллова, В. С. Валиев¹

На модели стероидного остеопороза исследована эффективность монофосфоната димефосфона в сравнении с бифосфонатом ксидифоном. Преднизолон в микропрепаратах поясничного позвонка понижал общую относительную плотность трабекул за счет хрящевой и костной ткани, уменьшал общую клеточную численность костной ткани, снижал содержание кальция. Димефосфон на фоне преднизолона нормализовал общую относительную плотность трабекул за счет хрящевой ткани, нормализовал общую клеточную численность костной ткани и содержание кальция в позвонке. Ксидифон на фоне преднизолона повышал общую относительную плотность трабекул за счет увеличения содержания собственно костной ткани, не влиял на сниженное преднизолоном содержание хрящевой ткани, общую клеточную численность и содержание кальция в позвонке.

Ключевые слова: остеопороз, глюкокортикостероиды, димефосфон, ксидифон

ВВЕДЕНИЕ

Развитие остеопороза является серьезным осложнением длительной терапии глюкокортикостероидами (ГКС). ГКС влияют на различные механизмы кальциевого гомеостаза и ремоделирования костной ткани. Они уменьшают абсорбцию кальция в кишечнике, усиливают его почечную экскрецию, снижают канальцевую реабсорбцию. Кроме того, ГКС подавляют канальцевую реабсорбцию неорганического фосфата и экспрессию рецепторов витамина D. ГКС ингибируют пролиферацию клеток-предшественников остеобластов, подавляют функцию остеобластов, нарушают синтез костного матрикса, повышают чувствительность остеокластов к паратгормону [9 – 11], что приводит к стимуляции остеолитической функции остеокластов и увеличению площади резорбции костной ткани. Эти факторы обуславливают снижение образования кости и падение абсолютной костной массы под влиянием ГКС [9, 11].

Одной из групп препаратов, применяемых для лечения стероидного остеопороза, являются ингибиторы костной резорбции бифосфонаты [5, 9, 10, 12], в частности, отечественный препарат ксидифон (калия этиднат) [3, 5, 11].

Димефосфон — оригинальный отечественный препарат, относящийся к классу монофосфонатов. Он оказывает антирахитическое действие, нормализуя мик-

роструктуру костей [6], стимулирует процессы регенерации, обладает противовоспалительной активностью [7, 13] тиреотимоактивирующим действием [4]. Димефосфон оказывает сходное с ксидифоном нормализующее влияние на повышенную преднизолоном экскрецию ионов кальция и гидроксипролина с мочой [8].

Целью настоящего исследования было сравнительное изучение влияния ксидифона и димефосфона на измененный преднизолоном минеральный состав и строение губчатой костной ткани поясничных позвонков крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 42 белых беспородных лабораторных крысах-самцах, разделенных на 6 групп (контрольная и пять опытных). Животным первой (контрольной) группы вводили ежедневно в желудок зондом физиологический раствор. Животным второй группы вводили преднизолон ежедневно тем же способом в дозе 50 мг/кг (модель стероидного остеопороза) [12]. Животным третьей группы вводили димефосфон ежедневно в средней терапевтической дозе 208 мг/кг (1 ммоль/кг) [4, 6 – 8, 13]. Животным четвертой группы вводили ксидифон ежедневно в дозе 45 мг/кг, рекомендованной в качестве терапевтической для экспериментальных животных [3]. Животным пятой группы вводили димефосфон и преднизолон, крысам шестой группы вводили ксидифон и преднизолон ежедневно в тех же дозах с интервалом между введениями препаратов как минимум в один час для исключения их взаимодействия на этапе всасывания. На 14-й день под легким эфирным наркозом животных декапитуировали. Для исследования использовали первый поясничный позвонок который фикси-

¹ Кафедра клинической фармакологии и фармакотерапии (зав. — проф. Л. Е. Зиганшина) Казанской государственной медицинской академии, Казань, 420012, ул. Муштары, 11. Кафедра госпитальной терапии (зав. — проф. И. Г. Салихов) Казанского государственного медицинского университета, Казань, 420012, ул. Бутлерова, 49.

Таблица 1. Показатели относительной плотности костной ткани первого поясничного позвонка крыс (в 100 произвольно выбранных полях зрения, %) после 14-дневного курса введения преднизолона (50 мг/кг внутрь), ксидифона (45 мг/кг внутрь), димефосфона (208 мг/кг внутрь) и их сочетаний ($n = 7$)

Препараты	$M \pm m$	%	p
Контроль	42,4 ± 1,5	100	–
Преднизолон	31,2 ± 2,0	74	< 0,001
Ксидифон	39,6 ± 3,2	93	> 0,1
Димефосфон	41,8 ± 3,8	99	> 0,1
Преднизолон + ксидифон	44,6 ± 0,9*	105*	> 0,1
Преднизолон + димефосфон	32,9 ± 0,3	78	0,001

Примечание: Здесь и в табл. 2 – 5: * — $p < 0,05$ при сравнении с показателями крыс, которым вводили преднизолон.

рвали в нейтральном формалине, декальцинировали, обезвоживали в спиртах и заключали в парафин. Готовили поперечный срез толщиной 4 – 6 мкм и окрашивали гематоксилин-эозином. Определяли относительную плотность трабекул в губчатой костной ткани позвонка, соотношение в трабекулах хрящевой и костной ткани и общую клеточную численность костной ткани. Подсчет относительного содержания трабекул, костной и хрящевой ткани вели в 100 произвольно выбранных полях зрения с помощью сетки Автандилова [2]. Второй поясничный позвонок сжигали в муфельной печи и определяли в золе содержание кальция методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии на приборе СА10МР.

Результаты исследования обработаны статистически с использованием t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Относительная общая плотность трабекул в микропрепарате первого поясничного позвонка контрольных крыс составила в среднем 60 %, большая часть трабекул была представлена костной тканью (табл. 1 и 2). 14-дневное введение крысам преднизолона приводило к снижению показателей плотности костной и хрящевой ткани (см. табл. 1 и 2). Это повлекло снижение общей относительной плотности трабекул до 39 % (табл. 3). Двухнедельное введение крысам ксидифона (45 мг/кг внутрь) вызывало понижение относительной плотности хрящевой ткани при отсутствии достоверного влияния на плотность костной ткани. При этом отмечена тенденция к уменьшению общей относительной плотности трабекул в микропрепарате поясничного позвонка по сравнению с контрольными показателями (см. табл. 3). Двухнедельное введение димефосфона крысам не вызывало изменений строения губчатой кости первого поясничного позвонка относительно нормальных контрольных показателей. Совместное введение ксидифона и преднизолона не вызывало изменений относительной плотности костной ткани позвонка относительно контроля. Общая относитель-

Таблица 2. Показатели относительной плотности хрящевой ткани первого поясничного позвонка крыс (в 100 произвольно выбранных полях зрения, %) после 14-дневного курса введения преднизолона (50 мг/кг внутрь), ксидифона (45 мг/кг внутрь), димефосфона (208 мг/кг внутрь) и их сочетаний ($n = 7$)

Препараты	$M \pm m$	%	p
Контроль	17,2 ± 1,4	100	–
Преднизолон	7,6 ± 1,5	44	0,001
Ксидифон	9,9 ± 1,8	58	0,012
Димефосфон	14,3 ± 2,4	83	> 0,1
Преднизолон + ксидифон	8,6 ± 1,9	50	0,007
Преднизолон + димефосфон	24,9 ± 1,3*	145*	0,001

ная плотность трабекул статистически не отличалась от контрольного показателя, т.е. введение ксидифона в комбинацию с преднизолоном приводило к нормализации сниженных преднизолоном показателей костной плотности. Однако показатель относительной плотности хрящевой ткани был снижен (см. табл. 2). При введении преднизолона в комбинации с димефосфоном общая относительная плотность трабекул не отличалась от контроля. При этом относительная плотность костной ткани была ниже контрольной величины и не отличалась от показателя крыс, которым вводили преднизолон, а относительная плотность хрящевой ткани превышала контрольный уровень и показатели крыс, которым вводили преднизолон.

Преднизолон снижал общую клеточность в микропрепаратах первого поясничного позвонка на 34 % относительно контрольного уровня. Ксидифон в отдельности не влиял на показатели клеточной численности. При моделировании стероидного остеопороза совместное введение ксидифона с преднизолоном вызывало такое же снижение численности клеток, как и применение только преднизолона. Димефосфон в отдельности повышал общую численность клеток в микропрепаратах поясничных позвонков крыс на 31 %. При моделировании стероидного остеопороза введение димефосфона с преднизолоном способствовало повышению показателя общей клеточной численности в микропрепаратах первого поясничного позвонка относительно уровня у крыс, которым вводили преднизолон, однако не до контрольного уровня (табл. 4).

Преднизолон (модель остеопороза) приводил к снижению содержания кальция в позвонке на 17 % относительно контроля. Ксидифон и димефосфон по отдельности не влияли на содержание кальция в позвонке. На фоне преднизолона димефосфон нормализовал сниженное содержание кальция в позвонке (табл. 5).

Таким образом, в результате проведенного исследования выявлены различия между ксидифоном и димефосфоном по влиянию на губчатую костную ткань поясничных позвонков. Так, при введении ксидифона в отдельности выявлена тенденция к снижению общей относительной плотности трабекул за счет уменьше-

Таблица 3. Показатели общей клеточной численности губчатой костной ткани первого поясничного позвонка крыс (в произвольно выбранном поле зрения при просчете 100 полей зрения) после 14-дневного курса введения преднизолона (50 мг/кг внутрь), ксидифона (45 мг/кг внутрь), димефосфона (208 мг/кг внутрь) и их сочетаний ($n = 7$)

Препараты	$M \pm m$	%	p
Контроль	$10,87 \pm 0,25$	100	
Преднизолон	$7,20 \pm 0,44$	66	0,002
Ксидифон	$10,38 \pm 0,55$	96	$> 0,1$
Димефосфон	$14,26 \pm 0,83$	131	0,015
Преднизолон + ксидифон	$7,43 \pm 0,19$	68	$> 0,05$
Преднизолон + димефосфон	$9,32 \pm 0,46^*$	86*	$< 0,05$

ния содержания в них хрящевой ткани. На модели преднизолон-индуцированного остеопороза ксидифон повышал сниженную преднизолоном общую плотность трабекул, увеличивая до контрольного уровня содержание костной ткани и не влияя на содержание хрящевой. Известно, что бисфосфонаты, являясь ингибиторами костной резорбции, приводят к снижению площади резорбции кости, подавляя функцию и количество остеокластов [2, 6], стимулируют пролиферацию клеток-предшественников остеобластов [11, 12], в результате чего повышается относительная плотность трабекул кости и ее масса. Наше исследование подтвердило эффективность ксидифона и выявило новые эффекты димефосфона, отличающие его от ксидифона.

Димефосфон, не влияя на общую относительную плотность трабекул и соотношение в них костной и хрящевой ткани у интактных крыс, на модели преднизолон-индуцированного остеопороза нормализовал общую относительную плотность трабекул, сниженную преднизолоном, за счет повышения содержания хрящевой ткани. Вероятно, новообразованная хрящевая ткань способна стимулировать кальцификацию, поскольку минерализация кости непосредственно связана с органическим матриксом и начинается через 8 – 14 суток после его формирования (продолжительность на-

Таблица 5. Содержание кальция в первом поясничном позвонке крыс после 14-дневного курса введения преднизолона (50 мг/кг внутрь), ксидифона (45 мг/кг внутрь), димефосфона (208 мг/кг внутрь) и их сочетаний

Препараты	$M \pm m$, мкг/г	%	p
Контроль	$37\ 238 \pm 1740$	100	–
Преднизолон	$31\ 011 \pm 1963$	83	0,05
Ксидифон	$36\ 044 \pm 751$	97	$> 0,1$
Димефосфон	$33\ 658 \pm 2306$	90	$> 0,1$
Преднизолон + ксидифон	$33\ 542 \pm 1761$	90	0,05
Преднизолон + димефосфон	$41\ 784 \pm 3461^*$	112*	$> 0,05$

Таблица 4. Показатели относительной плотности трабекул (костная ткань + хрящевая ткань) первого поясничного позвонка крыс (в 100 произвольно выбранных полях зрения, %) после 14-дневного курса введения преднизолона (50 мг/кг внутрь), ксидифона (45 мг/кг внутрь), димефосфона (208 мг/кг внутрь) и их сочетаний ($n = 7$)

Препараты	$M \pm m$	%	p
Контроль	$59,6 \pm 1,8$	100	
Преднизолон	$39,0 \pm 2,4$	65	$< 0,001$
Ксидифон	$48,7 \pm 5,0$	83	$> 0,05 < 0,1$
Димефосфон	$56,1 \pm 3,9$	94	$> 0,1$
Преднизолон + ксидифон	$53,2 \pm 5,0^*$	89*	$> 0,1$
Преднизолон + димефосфон	$57,8 \pm 1,2^*$	97*	$> 0,1$

шего эксперимента составила 14 дней). Созревание костных и хрящевых клеток, исчезающих при минерализации матрикса, способствует отложению кальция [1]. Влияние димефосфона на созревание соединительной ткани нами показано в работах [8, 13]. Все это создает предпосылки для объяснения стимулирующего влияния димефосфона на костеобразование.

Ксидифон не изменял нормальную общую численность клеток костной ткани при его введении интактным крысам, не влиял на преднизолон-индуцированное снижение общей клеточной численности. Димефосфон повышал общую клеточную численность по сравнению с интактным контролем, а также препятствовал преднизолон-индуцированному снижению содержания клеток. Известно, что бисфосфонаты снижают численность и активность остеокластов [5, 9]. Мы не дифференцировали остеобласты и остеокласты — показатель общей клеточной численности отражает их суммарное содержание. Димефосфон повышал общую клеточную численность костной ткани, сниженную преднизолоном, а при введении здоровым животным не изменял плотность костной ткани и соотношение костная/хрящевая ткань относительно контроля и не усиливал остеопенический эффект преднизолона, поэтому можно предположить, что увеличение общей клеточной численности происходило за счет пула остеобластов. Димефосфон оказывал нормализующее влияние на сниженное преднизолоном содержание кальция в позвонке, ксидифон такого эффекта не оказывал. Одним из объяснений полученных результатов является и то, что димефосфон, активизируя функцию щитовидной железы, повышает секрецию эндогенного кальцитонина [4]. Кальцитонин, как известно, является позитивным фактором кальциевого гомеостаза, стимулирует остеобластную активность и подавляет подвижность остеокластов, резорбирующих кость [1, 10].

Таким образом, стимулирующее влияние димефосфона на хрящевую ткань, увеличение им общей клеточной численности в микропрепаратах поясничных позвонков, нормализация сниженного преднизолоном

содержания кальция в позвонке свидетельствуют об определенных преимуществах димефосфона перед ксидифоном и позволяют рекомендовать его применение для лечения стероидного остеопороза.

ВЫВОДЫ

1. Преднизолон понижает общую относительную плотность трабекул в микропрепаратах первого поясничного позвонка за счет хрящевой и костной ткани, уменьшает общую клеточную численность костной ткани, снижает содержание кальция в позвонке.

2. Димефосфон на фоне преднизолона нормализует общую относительную плотность трабекул за счет хрящевой ткани, не влияя на преднизолоновое снижение содержания собственно костной ткани, повышает до контрольного уровня общую клеточную численность костной ткани, нормализует сниженное преднизолоном содержание кальция в позвонке.

3. Ксидифон на фоне преднизолона повышает сниженную преднизолоном общую относительную плотность трабекул за счет увеличения содержания собственно костной ткани, не влияет на сниженное преднизолоном содержание хрящевой ткани, общую клеточную численность и содержание кальция в позвонке.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. С. Аврунин, Н. В. Корнилов и др., *Морфология*, № 4, 7 – 12 (1998).

2. Г. Г. Автандилов, *Медицинская морфометрия*, Медицина, Москва (1990).
3. И. В. Алексеева, *Автореф. дис. канд. биол. наук*, Москва (1982).
4. Л. И. Анчикова, *Автореф. дис. докт. мед. наук*, Казань (1988).
5. Л. И. Беневоленская, *Клин. фармакол. и тер.*, № 5, 66 – 69 (1996).
6. Л. И. Булатов В. П., И. А. Студенцова, *Современные методы исследования в клинике и эксперименте: Матер. науч. конф., посвящ. 35-летию ЦНИЛ КГМУ*, Казань, (1997), сс. 23 – 24.
7. Л. Е. Зиганшина, А. У. Зиганшин, *Каз. мед. журн.*, № 3, 212 – 216 (1996).
8. Л. Е. Зиганшина, З. А. Бурнашова, И. Х. Валеева и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, № 6, С. 39 – 42 (2000).
9. Ю. Франке, Г. Рунге, *Остеопороз*, Медицина, Москва (1995).
10. Э. А. Юрьева, О. Г. Архипова и др., *Деп. научных работ, Естественные точные науки*, Техника, Москва, Медицина, ВИНТИ (1986).
11. P. S. Gulko and A. L. Mulloy, *Clin. Exp. Rheum.*, **14**, 99 – 206 (1996).
12. J. C. Ambrus, J. C. Robin, et al., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **22**(1), 3, (1978).
13. Л. Е. Зиганшина, И. А. Студенцова, Р. S. Garaev, et al., *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, **72**(1), 273 (1994).

Поступила 17.07.01

A COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECTS OF DIMEPHOSPHON AND XYDIPHONE ON THE VERTEBRAL MORPHOLOGY IN RATS WITH GLUCOCORTICOSTEROIDAL OSTEOPOROSIS MODEL

L. E. Ziganshina¹, Z. A. Burnashova², I. Kh. Valeeva², I. G. Salikhov², D. E. Tsyplakov¹, A. Yu. Galyautdinova¹, Yu. V. Garifullova¹, and V. S. Valiev¹

¹ Department of Clinical Pharmacology and Pharmacotherapy, Kazan State Medical Academy, ul. Mushtari 11, Kazan, Tatarstan, 420012 Russia

² Department of Internal Diseases, Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, Tatarstan, 420012 Russia

The efficacy of monophosphonate dimephosphon and diphosphonate xydiphon was compared by experiments in rats with an osteoporosis model induced by the chronic administration of prednisolone. The glucocorticosteroid decreased the total density of trabecules (in both bone and cartilage tissues) in histological micropreparations of lumbar vertebrae and reduced the total bone cell count and the calcium content in the bone tissue. Dimephosphon, administered on the prednisolone background over the same period of time, normalized the total relative density of trabecules (by increasing the cartilage content), the total bone cell count, and the calcium content. Under the same conditions, xydiphone normalized the total relative density of trabecules (by increasing the bone content), but did not influence the prednisolone-decreased content of cartilage, total cell count, and calcium content in the vertebrae. Thus, the test results reveal a significant advantage of dimephosphon over xydiphone.