

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-11-42-46

ВЛИЯНИЕ 6-МЕСЯЧНОГО СОВМЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ АТОРВАСТАТИНА И α -КАЛЬЦИДОЛА НА МОРФОЛОГИЧЕСКУЮ КАРТИНУ КОСТНОЙ ТКАНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

С. С. Осочук, О. С. Яковлева*, А. Ф. Марцинкевич, Е. А. Карпенко¹

Целью работы была оценка влияния совместного применения аторвастатина и α -кальцидола (α -К) на размеры вновь образованной костной ткани и количество сосудов в бедренной и нижнечелюстной костях крыс. Беспородным крысам-самцам ежедневно, внутрижелудочно, 6 месяцев вводили аторвастатин (10 мг/кг) и α -К (0,1 мкг/кг). Контролем служили интактные животные, “плацебо”, животные, получавшие только аторвастатин и только α -К. Показано, что стресс внутрижелудочного введения зонда (группа плацебо) уменьшает количество сосудов бедренной кости в среднем на 18 %, $p = 0,024$. Аторвастатин и α -К устраняют негативное действие стресса. Аторвастатин и α -К, вводимые совместно, увеличивают размеры вновь образованной костной ткани со стороны эндоостальной поверхности в среднем на 42,8 %, $p = 0,0075$ и не оказывают влияния на костную ткань челюсти. α -К увеличивает размеры вновь образованной костной ткани со стороны периоста бедренной кости в среднем на 56,36 %, $p = 0,004$ и увеличивает количество сосудов костной ткани нижней челюсти в среднем на 55,77 %, $p = 0,0089$ по сравнению с группой “плацебо”.

Ключевые слова: аторвастатин; витамин D; костная ткань; минерализация; остеопороз; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Остеопороз является одним из наиболее распространенных заболеваний и занимает 4 место по встречаемости после сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний и сахарного диабета [8]. Проблеме остеопороза посвящено значительное количество работ, однако до настоящего времени отсутствует полное понимание патогенетических механизмов, лежащих в его основе. В настоящее время подтверждается точка зрения о взаимосвязи сердечно-сосудистых заболеваний и остеопороза [9], что делает перспективным применение статинов для его профилактики и лечения. Однако мнения по поводу использования статинов для регуляции метаболизма костной ткани противоречивы [5]. Одной из причин, лежащих в основе неоднозначности влияния статинов на метаболизм костной ткани, может быть их способность снижать количество тестостерона [1]. В то же время известно, что уровень тестостерона ассоциирован с уровнем витамина D в крови [4], через регуляцию активности 1α -гидроксилазы почек. Такая последовательность метаболических событий делает оправданным применение совместно со стати-

нами продукта реакции, катализируемой 1α -гидроксилазой, – 1 -гидроксиголекальциферола (α -кальцидола, α -К). Помимо этого, опубликованы результаты исследований, свидетельствующие о позитивном действии совместного применения этих лекарственных средств (ЛС) [11], что также позволяет предполагать возможность положительного результата при сочетанном применении аторвастатина и производных витамина D.

Ранее нами была показана способность α -К потенцировать минерализующую активность аторвастатина [7]. Однако рост минерализации костной ткани может быть обусловлен как активацией остеогенеза, так и снижением активности резорбции костной ткани. При этом рост минерализации костной ткани способен увеличивать твердость кости, одновременно усиливая её хрупкость и снижая прочность [18]. В. Langdahl, et al. показали, что формирование новых костных структур в эндокортикальной поверхности компактной кости свидетельствует о процессах ремоделирования, т.е. о сохранении баланса между резорбцией старых структур и образованием новых [17].

В связи с этим целью нашей работы была оценка влияния совместного длительного (6 мес) применения аторвастатина и α -К на размеры вновь образованной костной ткани и количество сосудов в бедренной и нижнечелюстной костях неимбредных лабораторных крыс.

¹ Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Беларусь, 210009, Витебск, пр-т Фрунзе, 27.

* e-mail: olga.lobkova88@gmail.com

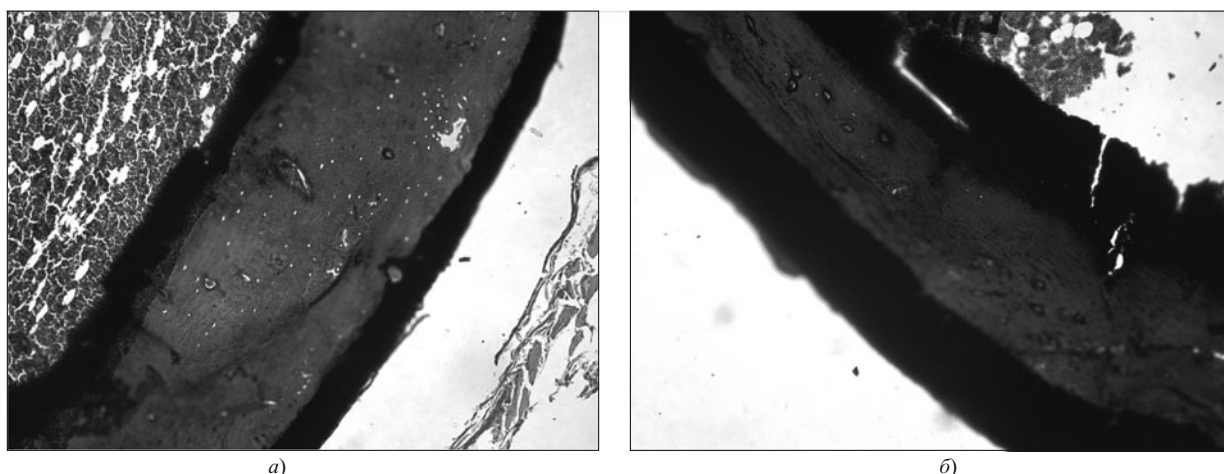


Рис. 1. Фрагмент бедренной кости крысы группы “плацебо” (а) и крысы, получавшей аторвастатин+ α -К (б) (окраска по Ван-Гизону, $\times 200$).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проводили в течение 6 мес на 120 неимбредных лабораторных крысах-самцах в возрасте 3 мес со средней массой тела 260 г (питомник УО “ВГМУ” г. Витебска, РБ). Выбор пола животных обусловлен отсутствием циклических изменений гормонального фона, позволяющим получить меньшую дисперсию изучаемых показателей. Животные были разделены на 5 групп: 1 группа — интактные животные; 2 группа — животные “плацебо” (внутрижелудочное введение 1 мл 1 % крахмала); 3 группа — внутрижелудочное введение аторвастатина в дозе 10 мг/кг в 1 мл 1 % крахмала; 4 группа — введение α -К в дозе 0,1 мкг/кг в 1 мл 1 % крахмала; 5 группа — введение аторвастатина в дозе 10 мг/кг совместно с α -кальцидолом в дозе 0,1 мкг/кг в 1 мл 1 % крахмала. Эксперимент проводили в рамках Национальных стандартов по обращению с лабораторными животными. Вывод животных из опытов осуществляли декапитацией под эфирным наркозом в утренние часы, через сутки после последнего введения ЛС. Непосредственно после вскрытия извлекали и очищали от мягких тканей правые бедренную кость и часть нижней челюсти. Кусочки бедренной кости размером 0,5 см выпиливали в области проксимального метафиза, а ветви нижней челюстной кости — в области диастемы. Фиксацию костей

осуществляли в 10 % растворе нейтрального формалина 48 ч. Для определения отличий между предшествующей и вновь образовавшейся минерализованной костной тканью кусочки костной ткани импрегнировали серебром по Лилли [2]. Декальцинацию костной ткани проводили 10 % раствором ЭДТА (рН 7,0) [12]. Дальнейшее обезвоживание костей осуществляли в автоматическом процессоре Microm STP-120, уплотнение путем заливки в парафин при помощи аппарата ЕС-350 проводили по общепринятым методикам. Срезы (толщиной 4–5 мкм) образцов ткани изготавливали на роторном микротоме Leica RM 2125 и доокрашивали в аппарате Microm HMS-170 по Ван-Гизону [6]. Исследование срезов проводили на микроскопе Olympus BX-40 (окуляр $\times 10$, объективы $\times 20$, 60), оснащенном цифровой камерой. Размер вновь образованной костной ткани, окрашенной солями серебра в черный цвет, измеряли с помощью программы ImageScore-M в срезах бедренной кости грызунов со стороны пери- и эндоостальной поверхностей, а в срезах нижней челюсти — вестибулярной и периодонтальной [3]. Количество кровеносных сосудов подсчитывали в 10 полях зрения микроскопа с последующим расчетом среднего показателя.

Статистический анализ данных выполнен при помощи пакета прикладных программ R 3.6.3. В зависимости от распределения признака и равенства диспер-

Таблица 1. Влияние аторвастатина и альфа-кальцидола на толщину вновь образованной костной ткани со стороны эндоостальной поверхности бедренной кости крыс (Me (Q25; Q75), мкм)

Контроль	Плацебо	Аторвастатин	α -К	Аторвастатин + α -К
43,64 (31,90; 66,44)	36,90 (33,16; 41,41)	41,37 (33,49; 48,56)	51,81 (40,17; 72,40)	52,72 (44,16; 66,06)
Критерий Шапиро — Уилка, p				
0,0209	0,9409	0,0130	0,6259	0,2551

Таблица 2. Влияние аторвастатина и альфа-кальцидола на толщину вновь образованной костной ткани со стороны периостальной поверхности бедренной кости грызунов (Me (Q25; Q75), мкм)

Контроль	Плацебо	Аторвастатин	α -К	Аторвастатин + α -К
40,82 (37,63; 50,45)	36,69 (34,59; 40,50)	50,83 (41,80; 61,26)	57,37 (53,55; 62,42)	54,52 (39,83; 61,82)
Критерий Шапиро — Уилка, p				
0,0011	0,8529	0,8274	0,6939	0,2549

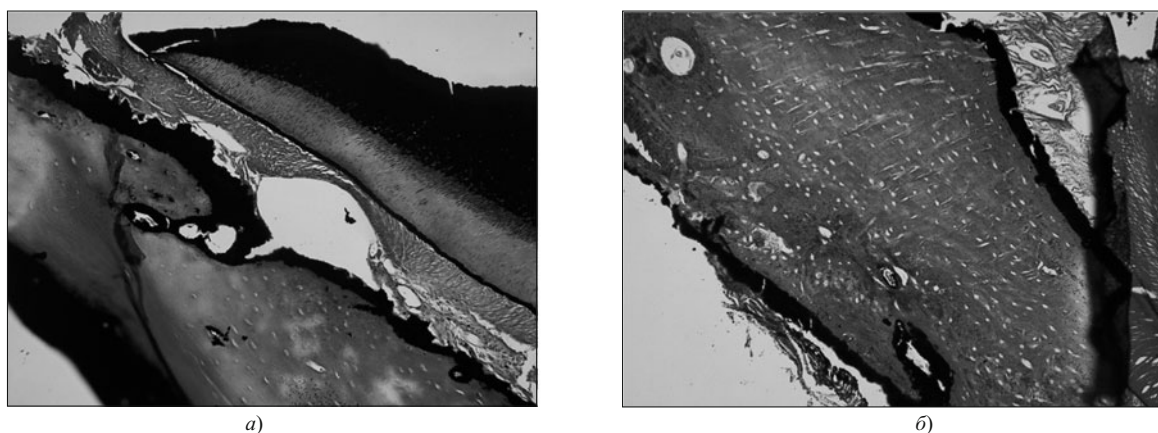


Рис. 2. Фрагмент правой части нижнечелюстной кости интактной крысы (а) и крысы, получавшей α -К (б) (окраска по Ван-Гизону, $\times 200$).

сий применены методы параметрической и непараметрической статистики. Также была использована поправка на множественные сравнения [10]. Размер эффекта оценивали при помощи g-Хеджеса [15]. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка распределения размера вновь образованной костной ткани с эндоостальной поверхности в бедренной кости у экспериментальных животных показала наличие распределения, отличного от распределения Гауа, что обусловило дальнейшее использование критерия Краскела — Уоллиса, показавшего значимое отличие ($p = 0,0075$) (табл. 1, рис. 1).

Попарное сравнение исследуемого параметра с использованием критерия Дана с поправкой Бенджамина — Йекутиели показало его увеличение ($p = 0,0193$) у крыс группы “аторвастатин + α -К”, по сравнению с крысами группы “плацебо”, на 42,8 %, что свидетельствует о влиянии совместного применения испытуемых ЛС средств на остеогенез в бедренной кости (рис. 1).

Оценка распределения размеров вновь образованной костной ткани со стороны периоста бедренной кости крыс также продемонстрировала наличие неправильного распределения в исследуемых группах (табл. 2).

Попарное сравнение с использованием post-hoc-анализа показало, что совместное введение аторваста-

тина и α -К, а также применение одного α -К привело к достоверному ($p = 0,0024$, $0,004$ соответственно) росту вновь образованной костной ткани со стороны периоста по сравнению с животными группы “плацебо” (рис. 1). Учитывая, что введение одного аторвастатина не оказало влияния на исследуемый показатель, можно заключить, что выявленный эффект был обусловлен введением α -К.

При подсчете количества кровеносных сосудов в срезах бедренной кости наличие его неправильного распределения обусловило применение критерия Краскела — Уоллиса, определившего, что данный показатель отличался в группах крыс ($p < 0,001$) (табл. 3).

Попарное сравнение с поправкой на множественные исследования показало, что у крыс группы “плацебо” количество сосудов в костной ткани было меньше ($p = 0,024$), чем у контрольных животных, что говорит о негативном влиянии стрессирования грызунов внутрижелудочным введением зонда. Учитывая, что физическая нагрузка, как один из вариантов стресса, увеличивает тонус сосудов костной ткани [14] и, таким образом, может способствовать росту напряжения сдвига эндотелия сосудистой стенки, вероятно, механизм негативного действия стресса может быть связан с описанной в работе [13] способностью роста напряжения сдвига ингибировать пролиферацию сосудов.

Таблица 3. Влияние аторвастатина и альфа-кальцидола на среднее число кровеносных сосудов в костной ткани бедра крыс (Me (Q25; Q75))

Контроль	Плацебо	Аторвастатин	α -К	Аторвастатин + α -К
6,70 (6,20; 7,05)	5,50 (4,80; 6,20)	5,50 (4,60; 6,35)	5,40 (5,20; 5,70)	7,70 (6,60; 8,30)
Критерий Шапиро — Уилка, p				
0,9647	< 0,001	0,3524	0,4440	0,4410

Таблица 4. Влияние аторвастатина и альфа-кальцидола на размеры вновь образованной костной ткани со стороны периодонтальной поверхности нижнечелюстной кости у крыс (Me (Q25; Q75), мкм)

Контроль	Плацебо	Аторвастатин	α -К	Аторвастатин + α -К
43,06 (39,19; 44,80)	41,22 (35,49; 45,03)	38,25 (31,08; 42,61)	31,12 (25,27; 39,39)	34,10 (31,88; 41,32)
Критерий Шапиро — Уилка, p				
0,3417	0,4865	0,9910	0,1214	0,6214

Таблица 5. Влияние аторвастатина и альфа-кальцидола на размеры вновь образованной костной ткани со стороны вестибулярной поверхности нижнечелюстной кости у крыс (Ме (Q25; Q75), мкм)

Контроль	Плацебо	Аторвастатин	α -К	Аторвастатин + α -К
44,70 (36,55, 47,58)	43,03 (29,82, 49,72)	48,83 (41,74, 50,88)	54,25 (41,10, 57,46)	51,62 (47,70, 56,01)
Критерий Шапиро — Уилка, p				
0,4007	0,4368	0,0045	0,2212	0,9371

Однако подтверждение гипотезы требует дополнительных исследований.

Введение аторвастатина не смогло устранить негативного влияния стресса на уменьшение количества сосудов. Однако совместное введение аторвастатина и α -К показало увеличение числа сосудов, по сравнению с группой “плацебо” ($p < 0,0001$), что говорит о способности данной комбинации устранять негативное действие стресса. Выявленная особенность позитивного взаимодействия комплекса аторвастатина и α -К может быть обусловлена способностью активной формы витамина D (1,25-дигидроксиколекальциферола) стимулировать CYP3A4 [20], являющегося одним из основных ферментов, метаболизирующих аторвастатин [19] и, таким образом, оказывающего существенное влияние на его активность. Кроме того, витамин D способен позитивно влиять на эндотелий сосудистой стенки [16], что в комплексе и могло позволить получить позитивный результат от их применения.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о негативном действии стресса на лабораторных животных от длительного внутрижелудочного введения зонда и способности аторвастатина и α -К при совместном применении устранять этот эффект.

Изучение размеров вновь образованной костной ткани со стороны периодонта нижнечелюстной кости не выявило статистически значимого отклонения от нормального распределения. Применение ANOVA для параметрических исследований показало, что животные экспериментальных групп имели отличия ($p = 0,0077$) (табл. 4; рис. 2).

Попарное сравнение показало, что в группе животных, получавших только α -К, образование костной ткани со стороны периодонта статистически значимо снижалось, по сравнению с интактными крысами и животными группы “плацебо”, что свидетельствует о негативном влиянии длительного введения α -К на остеогенез челюсти ($p = 0,0052$).

Оценка распределения величины вновь образованной костной ткани со стороны вестибулярной поверхности нижнечелюстной кости показало значимые отклонения от правильного распределения (табл. 5).

Анализ отличий данных параметров между животными с использованием критерия Краскела — Уолли-

Таблица 6. Влияние аторвастатина и альфа-кальцидола на среднее число кровеносных сосудов в костной ткани нижней челюсти крыс (Ме (Q25; Q75))

Контроль	Плацебо	Аторвастатин	α -К	Аторвастатин + α -К
3,20 (2,65; 4,35)	2,60 (2,05; 3,53)	2,80 (2,60; 3,85)	4,05 (3,50; 4,53)	3,00 (2,70; 3,40)
Критерий Шапиро — Уилка, p				
0,3600	0,3388	0,0571	0,7413	0,6265

са показало их статистическую достоверность ($p = 0,0072$). Однако попарное сравнение не выявило отличий.

Таким образом, испытуемые лекарственные средства не оказали влияния на размеры вновь образованной костной ткани со стороны периодонта нижней челюсти.

Оценка характера распределения среднего количества сосудов ткани нижней челюсти показала отсутствие отклонений от распределения Гаусса (табл. 6).

Применение параметрического ANOVA выявило отличия в экспериментальных группах ($p = 0,0089$).

Попарное сравнение количества сосудов в костной ткани нижней челюсти показало, что статистически значимые отличия наблюдались лишь между грызунами, получавшими только α -К и плацебо ($p = 0,0038$). Полученный эффект может быть обусловлен способностью витамина D позитивно влиять на сосудистый эндотелий [16].

Выявленные отличия позволяют сделать заключение, что введение α -К позитивно влияет на количество сосудов в костной ткани нижней челюсти.

ВЫВОДЫ

1. Стрессирование лабораторных животных 6-месячным внутрижелудочным введением зонда в костной ткани бедренной кости уменьшает количество сосудов бедренной кости на 18 %, $p = 0,024$, данное воздействие нивелируется совместным введением аторвастатина (10 мг/кг) и α -кальцидола (0,1 мкг/кг).

2. Совместное применение аторвастатина (10 мг/кг) и α -кальцидола (0,1 мкг/кг) вызывает увеличение вновь образованной костной ткани бедра со стороны эндоостальной поверхности на 42,8 % ($p = 0,0075$) и не оказывает влияние на костную ткань челюсти.

3. α -Кальцидол (0,1 мкг/кг) увеличивает размеры вновь образованной костной ткани со стороны периодонта бедренной кости крыс на 56,36 %, $p = 0,004$ по сравнению с группой “плацебо”.

4. α -Кальцидол (0,1 мкг/кг) увеличивает количество сосудов костной ткани нижней челюсти на 55,77 %, $p = 0,0089$ по сравнению с группой “плацебо”, что может способствовать улучшению питания костной ткани.

Работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований “Фундаментальные и прикладные науки — медицине” (№ ГР 20190142 от 26.02.2019).

ЛИТЕРАТУРА

1. С. В. Буянова, С. С. Осочук, *Вестник ВГМУ*, **13**(1), 31 – 37 (2014); elib.vsmu.by / handle / 123 / 6814.
2. *Гистохимическое определение металлов*, Д. Э. Коржевский (ред.), Санкт-Петербург (2016).
3. Я. А. Гушин, В. В. Кванчиани, *Лабораторные животные для научных исследований*, **1**, 9 – 22 (2020); doi.org / 10.29296 / 2618723X-2020-01-02.
4. Е. А. Жидкова, А. Н. Оранская, М. Р. Калинин, К. Г. Гуревич, *Медицина труда и промышленная экология*, **4**, 219 – 222 (2019); doi: 10.31089 / 1026-9428-2019-59-4-219-222.
5. В. В. Кашталап, О. Н. Хрячкова, О. Л. Барбараш, *Креативная кардиология*, **10**(4), 317 – 323 (2016); doi: 10.15275 / kreatkard.2016.04.06.
6. *Морфологическая диагностика. Подготовка материала для гистологического исследования и электронной микроскопии*, Д. Э. Коржевский (ред.), Санкт-Петербург (2017).
7. С. С. Осочук, О. С. Яковлева, *Лаборатор. диагностика. Вост. Европа*, **7**(2), 250 – 257 (2018); doi: 10.22263 / 2312-4156.2019.6.23.
8. Л. М. Пасиешвили, *Ревматология*, **1**(2), 16 – 24 (2015); doi: 10.15407 / internalmed2015.01.016.
9. С. Ю. Царенок, *Клиницист*, **11**(3 – 4), 50 – 58 (2017); doi: 10.17650 / 1818-8338-2017-11-3-4-50-58.
10. Y. Benjamini, D. Yekutieli, *Ann. Statist.*, **29**(4), 1165 – 1188 (2001); doi: 10.1214 / AOS%2F1013699998.
11. S. Bhattacharyya, K. Bhattacharyya, A. Maitra, *QJM: An International Journal of Medicine*, **10**(5), 487 – 491 (2012); doi: 10.1093 / qjmed / hcs001.
12. G. Callis, D. Sterchi, *J. Histotechnol.*, **21**(1), 49 – 58 (1998); doi: 10.1179 / his.1998.21.1.49.
13. G. Chouinard-Pelletier, E. D. Jahnsen, E. A. V. Jones, *Angiogenesis*, **16**, 71 – 83 (2013); doi: 10.1007 / s10456-012-9300-2.
14. P. M. Gross, D. D. Heistad, M. L. Marcus, *Am. J. Physiol.*, **237**(4), H440 – 8 (1979); doi: 10.1152 / ajpheart.1979.237.4.H440.
15. L. Hedges, I. Olkin, *Statistical Methods for Meta-Analysis*, Academic Press, Orlando FL (1985); doi: 10.1177 / 014662168701100108.
16. H. Kim, C. A. Meza, H. Clarke, et al., *Nutrients*, **12**(2), 575 (2020); doi: 10.3390 / nu12020575.
17. B. Langdahl, S. Ferrari, D. W. Dempster, *Ther. Adv. Musculoskel. Dis.*, **8**(6), 225 – 235 (2016); doi: 10.1177 / 1759720x16670154.
18. Y. Luo, *Osteoporos Int.*, **31**(2), 371 – 377 (2020); doi: 10.1007 / s00198-019-05165-6.
19. J.-E. Park, K.-B. Kim, S. K. Bae, et al., *Xenobiotica*, **38**(9), 1240 – 1251 (2008); doi: 10.1080 / 00498250802334391.
20. Z. Wang, E. G. Schuetz, Y. Xu, K. E. Thummel, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **136**, 54 – 58 (2013); doi: 10.1016 / j.jsbmb.2012.09.012.

Поступила 20.11.20

THE EFFECT OF 6-MONTH CO-ADMINISTRATION OF ATORVASTATIN AND α -CALCIDOL ON THE MORPHOLOGICAL PICTURE OF BONE TISSUE IN THE EXPERIMENT

S. S. Osочuk, O. S. Yakovleva*, A. F. Martsinkevich, E. A. Karpenko

Vitebsk State Medical University, 27 Frunze ul., Vitebsk, 210009 Belarus

* e-mail: olga.lobkova88@gmail.com

The aim of the study was to evaluate the effect of the combined use of atorvastatin (ATV) and α -calcidol (α -K) on the size of newly formed bone tissue and the number of vessels in the femur and mandibular bones of rats. Outbred male rats were injected daily, intragastrically, for 6 months with ATV (10 mg/kg) and α -K (0.1 mg/kg). Intact animals, which received only ATV and only α -K served as control (placebo) groups. It is shown that the stress resulted from intragastric introduction of the probe (placebo group) reduces the number of femoral vessels by an average of 18%, $p = 0.024$. Administration of ATV and α -K eliminate the negative effects of the stress. ATV and α -K administered together increase the size of the newly formed bone tissue from the side of the endosteal surface by an average of 42.8%, $p = 0.0075$ and do not affect the jaw bone tissue. Administration of α -K increases the size of the newly formed bone tissue from the side of the femoral periosteum by an average of 56.36%, $p = 0.004$ and increases the number of vessels in the lower jaw bone tissue by an average of 55.77%, $p = 0.0089$.

Keywords: atorvastatin; vitamin D; bone tissue; mineralization; osteoporosis; rats.