

*В.В.Поворознюк<sup>1</sup>, В.Х.Хавинсон<sup>2</sup>, А.В.Макогончук<sup>1</sup>, Г.А.Рыжак<sup>2</sup>, Е.А.Креслов<sup>1</sup>,  
И.В.Гопкалова<sup>3</sup>*

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЕПТИДНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ

<sup>1</sup> Институт геронтологии АМН Украины, Украина; <sup>2</sup> Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, РФ;

<sup>3</sup> Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины, Украина

**Широкое распространение остеопороза у женщин в постменопаузальном периоде диктует необходимость поиска новых эффективных средств профилактики и коррекции патологических изменений костной ткани.** Проведено исследование влияния пептидных биорегуляторов — препарата хрящей на основе экстракта из хрящевой ткани телят и препарата Т-31 на основе короткого пептида — на минеральную плотность костной ткани крыс в экспериментальной модели остеопороза. В результате исследования установлено остеопротекторное действие обоих изученных препаратов, при этом эффективность препарата на основе экстракта из хрящевой ткани была достоверно выше. Препараты оказали как профилактическое действие на состояние костной ткани, препятствуя уменьшению минеральной плотности костной ткани после овариоэктомии крыс, так и корригирующее действие, повышая сниженную вследствие овариоэктомии плотность костной ткани.

**Ключевые слова:** остеопороз, овариоэктомия, пептидные биорегуляторы, остеопротекторное действие.

Постменопаузальный остеопороз является одной из ключевых проблем здравоохранения в развитых странах. Зарубежные специалисты считают, что заболевание уже приняло характер эпидемии. Медико-социальную значимость постменопаузального остеопороза обусловливают его осложнения, в первую очередь, переломы шейки бедра и позвоночника, которые наряду с ухудшением качества жизни значительно повышают уровень смертности женщин старших возрастных групп [1, 8]. Несмотря на довольно широкий арсенал лекарственных препаратов, которые применяются для лечения системного остеопороза, продолжается поиск новых средств, способных эффективно влиять на состояние костной ткани, предотвращая ее потерю в постменопаузальном периоде. Результаты экспериментального изучения пептидных биорегуляторов позволяют предполагать эффективность их применения для улучшения метаболизма в костной ткани [3].

Экспериментальные модели являются идеальным средством для изучения фармакологических средств перед их внедрением в лечебную практику. Вызвано это тем, что в условиях экспериментальной модели исследователь может, используя все современные методы, изу-

чать молекулярные, клеточные и системные изменения, которые невозможно изучить в условиях клинического исследования [2]. К экспериментальным животным предъявляются определенные требования, среди которых основными являются способность модели в точности воспроизводить изучаемое патологическое состояние у человека; не иметь интеркуррентных заболеваний; быть доступными, дешевыми и безопасными в работе [7, 10].

Больше всего этим правилам в отношении постменопаузальной потери костной ткани отвечают крысы. Во-первых, доказано, что процессы потери костной ткани у крыс после овариоэктомии отображают основные характеристики постменопаузального остеопороза у людей [5, 6]. Во-вторых, у крыс, как и у людей, после овариоэктомии отсутствует тенденция к полному восстановлению костной ткани [4]. И, наконец, крысы являются информативной моделью для изучения потери как губчатой, так и компактной костной ткани [9, 11], что особенно важно для изучения различных видов остеопороза, в том числе и постменопаузального.

Цель исследования: изучить влияние пептидных биорегуляторов в различных дозировках и при разных режимах применения на структурно-функциональное состояние костной ткани в экспериментальной постовариоэктомической модели остеопороза у крыс.

### Материал и методы исследования

Влияние пептидов на состояние костной ткани в эксперименте изучалось на 100 половозрелых самках крыс линии Wistar с массой тела 200–230 г в возрасте 4–6 мес, содержащихся в стандартных условиях вивария Института геронтологии АМН Украины. Животные были разделены на 10 групп по 10 особей в каждой группе в зависимости от вида, дозировки и способа применения препаратов. В качестве исследуемых пептидных биорегуляторов применялись препарат хрящей, представляющий собой экстракт из хрящевой ткани телят, и препарат Т-31 на основе короткого пептида H-Ala-Glu-Asp-OH. Исследуемые препараты вводили крысам внутримышечно в течение 1 месяца: Препарат хрящей в дозах 1 мг и 0,03 мг на крысу; пре-

парат Т-31 — в дозах 10 мкг и 0,3 мкг на крысу в 0,4 мл физиологического раствора натрия хлорида. Для моделирования постменопаузального остеопороза крысам выполнялась двухсторонняя овариоэктомия. В качестве оперативного доступа использовали срединную лапаротомию.

Крысы были разделены на группы по 10 животных в каждой: группу А составили овариоэктомированные крысы, получавшие инъекции препарата Т-31; группу В — овариоэктомированные крысы, которым были выполнены инъекции препарата хрящей; в группу С вошли овариоэктомированные крысы, не получавшие никаких препаратов; контрольную группу (КГ) составили неоперированные животные, получавшие плацебо в виде 0,4 мл физиологического раствора хлорида натрия.

В зависимости от схемы введения препаратов в группах выделяли следующие подгруппы.

Крысы подгруппы А1 получали 10 мкг на крысу препарата Т-31 в день в течение первого месяца с момента овариоэктомии; животные подгруппы А2 — 10 мкг препарата Т-31 в день в течение второго месяца с момента овариоэктомии; животные подгруппы А3 — 0,3 мкг в день в течение первого месяца с момента овариоэктомии; животные подгруппы А4 — 0,3 мкг в день в течение второго месяца с момента овариоэктомии.

В группе В подгруппу В1 составили животные, получавшие 1 мг на крысу препарата хрящей в день в течение первого месяца с момента овариоэктомии; подгруппу В2 — крысы, которым вводили 1 мг препарата хрящей в день в течение второго месяца с момента овариоэктомии; подгруппу В3 — 0,03 мг препарата хрящей в день в течение первого месяца с момента овариоэктомии; подгруппу В4 — 0,03 мг препарата хрящей в день в течение второго месяца с момента овариоэктомии.

Распределение животных по группам представлено в табл. 1.

Минеральную плотность костной ткани (МПКТ) оценивали с помощью двухфотонного рентгеновского денситометра «PRODIGY» (GE Medical systems, Lunar, model 8743, 2005), имеющего в составе программного обеспечения программу «Experimental animals», позволяющую измерять минеральную плотность и

минеральную насыщенность (МНКТ) костной ткани позвоночника и всего скелета мелких лабораторных животных. Денситометрию выполняли трижды: до начала эксперимента, через 30 и 60 дней после начала эксперимента. Изучали динамику показателей МПКТ в абсолютных единицах и в процентах.

Динамику минеральной плотности в процентах вычисляли по формуле:

$$\Delta MPKT(\%) = [(MPKT_{\text{после}} - MPKT_{\text{до}}) / MPKT_{\text{до}}] \times 100.$$

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента для связанных выборок и однофакторного дисперсионного анализа ANOVA.

## Результаты исследования

Анализ полученных результатов показал достоверную эффективность препарата хрящей и пептидного препарата Т-31 в максимальных дозировках при условии их применения с 30-го дня после выполненной овариоэктомии (группы А2 и В2). При данном способе применения пептидов через 1 мес после операции не наблюдалось достоверного увеличения минеральной плотности костной ткани, которое проявилось только через 2 мес с момента овариоэктомии. В случае применения малых доз исследуемых препаратов с 30-го дня после операции наблюдалось достоверное снижение минеральной плотности скелета после окончания приема препаратов по сравнению с исходными величинами МПКТ. Овариоэктомия сама по себе в течение 1 мес на динамику количественных показателей костной ткани не влияла, уменьшение МПКТ начинало проявляться через 2 мес после овариоэктомии (группа С).

Сравнительная динамика показателей минеральной плотности костной ткани представлена в табл. 2 и 3.

В случае месячного курса применения пептидных биорегуляторов с 4-го дня после овариоэктомии наибольшую эффективность продемонстрировал препарат хрящей в максимальной дозировке (1 мг на крысу

Таблица 1

### Распределение животных по группам в зависимости от вида, дозировки и способа применения исследуемого препарата

Группа	Исследуемый препарат	Доза	Начало введения
КГ	применение изотонического раствора натрия хлорида в дозе 0,4 мл с 1-го дня эксперимента без овариоэктомии		
С	овариоэктомия без применения препаратов		
А1	препарат Т-31	10 мкг на крысу	на 4-й день после овариоэктомии
А2	препарат Т-31	10 мкг на крысу	через 1 мес после овариоэктомии
А3	препарат Т-31	0,3 мкг на крысу	на 4 день после овариоэктомии
А4	препарат Т-31	0,3 мкг на крысу	через 1 мес после овариоэктомии
В1	препарат хрящей	1 мг на крысу	на 4-й день после овариоэктомии
В2	препарат хрящей	1 мг на крысу	через 1 мес после овариоэктомии
В3	препарат хрящей	0,03 мг на крысу	на 4-й день после овариоэктомии
В4	препарат хрящей	0,03 мг на крысу	через 1 мес после овариоэктомии

Примечание: длительность применения исследуемых препаратов составила 1 мес.

су). При его применении через 1 мес наблюдалось достоверное увеличение МПКТ; достигнутый уровень МПКТ оставался неизменным и через 2 мес с момента начала эксперимента. Максимальная доза препарата Т-31, вводимого сразу после овариоэктомии, через месяц приводила к достоверному увеличению МПКТ. Однако через 1 мес после прекращения введения препарата (т.е. через 2 мес с момента операции) наблюдалось достоверное снижение МПКТ по сравнению с исходным уровнем.

Месячный курс препарата хрящей и Т-31 в малых дозах (0,03 мг и 0,3 мкг на крысу, соответственно), начатый с 3-го дня после овариоэктомии, не привел к улучшению показателей костной ткани. А через месяц после его окончания отмечалось достоверное снижение МПКТ по сравнению с величинами на момент начала эксперимента.

Достоверная зависимость динамики МПКТ от метода лечения была продемонстрирована с помощью дисперсионного метода ANOVA (рисунок).

## Выводы

1. Для профилактики потери костной массы у овариоэктомированных крыс наиболее эффективным является применение препарата на основе экстракта из хрящевой ткани животных в больших дозах (1 мг на крысу) через 1 месяц после овариоэктомии, позволяющее достоверно увеличить через месяц МПКТ по сравнению с исходным уровнем. После прекращения введения препарата показатели МПКТ в течение месяца снижаются до исходного уровня. Для более точного определения продолжительности остеопротекторного влияния препарата хрящей в данной дозировке требуются дальнейшие исследования.

Таблица 2

### Динамика показателей минеральной плотности костной ткани у крыс под влиянием пептидных биорегуляторов

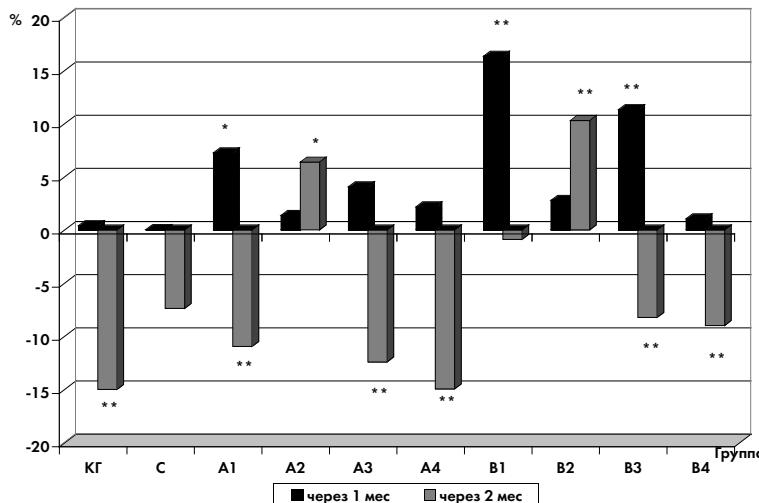
Группа животных	МПКТ, %		
	До овариоэктомии	Через 1 мес после овариоэктомии	Через 2 мес после овариоэктомии
С	0,096±0,007	0,03±2,3	-7,39±2,43
КГ	0,102±0,007	0,40±1,11	-15,0±0,95
A1	0,098±0,005	7,25±1,45	-10,97±1,50
A2	0,098±0,006	1,37±1,57	<b>6,37±1,11</b>
A3	0,094±0,008	4,06±1,08	-12,42±1,45
A4	0,106±0,010	2,17±1,85	-14,95±1,33
B1	0,097±0,010	16,34±2,5	-0,89±1,03
B2	0,085±0,005	2,78±1,48	<b>10,3±1,59</b>
B3	0,091±0,005	11,31±1,3	-8,24±0,6
B4	0,096±0,007	1,05±2,18	-8,99±2,03

Примечание: Здесь и в табл. 3 жирным шрифтом выделены достоверные значения динамики МПКТ.

Таблица 3

### Изменение показателя минеральной плотности костной ткани скелета крыс в зависимости от вида, дозы и способа применения пептидов

Группа животных	МПКТ исходная	МПКТ (г/см <sup>2</sup> )					
		Через 1 месяц после овариоэктомии			Через 2 месяца после овариоэктомии		
		Динамика	t	p	Динамика	t	p
С	0,102±0,002	0,0003±0,002	0,15	0,88	-0,015±0,002	-8,71	<b>0,00002</b>
КГ	0,106±0,003	-0,001±0,004	-0,19	0,85	-0,009±0,005	-1,93	0,09
A1	0,096±0,002	0,007±0,002	2,79	<b>0,02</b>	-0,011±0,003	-4,16	<b>0,003</b>
A2	0,098±0,002	0,001±0,002	0,45	0,67	0,006±0,002	3,30	<b>0,013</b>
A3	0,095±0,003	0,004±0,002	2,04	0,07	-0,012±0,003	-4,38	<b>0,002</b>
A4	0,097±0,003	0,002±0,003	0,48	0,64	-0,015±0,003	-5,83	<b>0,0002</b>
B1	0,085±0,002	0,014±0,003	3,80	<b>0,005</b>	-0,001±0,002	-0,56	0,59
B2	0,098±0,002	0,003±0,003	1,04	0,33	0,010±0,002	3,86	<b>0,008</b>
B3	0,091±0,001	0,010±0,002	4,99	<b>0,001</b>	-0,008±0,001	-7,37	<b>0,0002</b>
B4	0,094±0,003	0,001±0,002	0,35	0,73	-0,009±0,002	-4,35	<b>0,002</b>



Динамика показателей МПКТ в зависимости от схемы введения пептидных биорегуляторов.

2. Применение препарата Т-31 в максимальной дозе (10 мкг на крысу) также достоверно улучшает МПКТ скелета, однако после отмены препарата наблюдается ее снижение, что позволяет предположить необходимость постоянного применения данного препарата.

3. Малые дозы пептидов оказались эффективными лишь в случае применения препарата хрящей сразу же после овариоэктомии, что позволило достоверно улучшить структурно-функциональное состояние костной ткани подопытных животных, но только на время введения препарата, что также позволяет предположить необходимость постоянного применения последнего.

## Литература

- Поворознюк В.В., Григорьева Н.В. Менопауза и костно-мышечная система.—К., 2004.—512 с.
- Фролькис В.В., Поворознюк В.В., Евтушенко О.А. Экспериментальный остеопороз (модели, механизмы развития возрастного остеопороза) // Поворознюк В.В. Захорування кістково-м'язової системи в людей різного віку (вибрані лекції, огляди, статті): У 2 томах. Т.1.—К., 2004.—С. 356–388.
- Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. Пептидные биорегуляторы и старение.—СПб.: Наука, 2003.—223 с.
- Abe T, Chow JWM, Lean JM, Chambers TJ. Estrogen does not restore bone lost after ovariectomy in the rat // J Bone Miner Res.—1993.—Vol. 8.—P. 831–838.
- Aerssenss J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies difference in bone composition, density and quality: Potential implications for *in vivo* bone research // Endocrinology.—1998.—139.—P. 663–670.
- Barlet JP, Coxam V, Davicco MJ, Gaumet N. Modeles animaux d'osteoporose post-menopausique // Reprod Nutr Rev.—1994.—34.—P. 221–236.
- Davidson MK, Lindsey JR, Davis JK. Requirements and selection of an animal model // Isr J Med Sci.—1987.—23.—P. 551–555.
- Marcus R, Wong M, Heath H, Stock J. Antiresorptive Treatment of Postmenopausal Osteoporosis : Comparison of Study Designs and Outcomes in Large Clinical Trials With Fracture as an Endpoint // Endocrine Reviews.—2002.—Vol. 23 (1).—P. 16–37.
- Sietsma WK. Animal models of cortical porosity // Bone.—1995.—Vol. 17.—P. 297–305.
- Simon AT. Animal models of osteoporosis — necessity and limitations // European Cells and Materials.—2001.—Vol. 1.—P. 66–81.
- Wronski TJ, Yen CF. The ovariectomised rat as an animal model for postmenopausal bone loss // Cells and Materials.—1991.—Suppl. 1.—P. 69–74.

Adv. gerontol.—2007.—Vol. 20, № 2.—P. 134–137

V.V. Povoroznyuk<sup>1</sup>, V.Kh. Khavinson<sup>2</sup>, A.V. Makogonchuk<sup>1</sup>, G.A. Ryzhak<sup>2</sup>, E.A. Kreslov<sup>1</sup>,  
I.V. Gopkalova<sup>3</sup>

## STUDY OF PEPTIDE REGULATORS EFFECT ON THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATUS OF RAT BONE TISSUE IN AGEING

<sup>1</sup> Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Ukraine; <sup>2</sup> St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, Russia; <sup>3</sup> V.Ya. Danilevsky Institute for the Problems of Endocrine Pathology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Ukraine

The wide spread of osteoporosis in women in the post-menopausal period stipulates the need for new effective means of prevention and correction of pathologic alterations in the bone tissue. Effect of two peptide bioregulators: cartilages preparation based on the cartilaginous tissue extract and T-31 substance on the mineral density of rat bone tissue has been studied in the experimental model of osteoporosis. The study has revealed an osteoprotective effect of both studied substances, with significantly higher efficacy of the preparation based on cartilaginous tissue extract. The substances exerted both prophylactic effect on the status of the cartilaginous tissue, preventing the decrease of mineral density of the bone tissue in rats after ovariectomy, and corrective effect by increasing the bone tissue density, which was reduced as a result of ovariectomy.

**Keywords:** osteoporosis, ovariectomy, peptide bioregulators, osteoprotective effect.