

Н. А. Пасатецкая^{1,2}, А. И. Лопатин², Е. В. Лопатина^{1,3}

¹ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Санкт-Петербург

² Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург;

³ «Институт физиологии им. И. П. Павлова» Российской академии наук, Санкт-Петербург

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ АДРЕНОБЛОКАТОРОВ В УСЛОВИЯХ ОРГАНОТИПИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТКАНИ КОСТИ

УДК 612.753

В настоящее время активно обсуждается возможность использования препаратов группы адrenoблокаторов для лечения и профилактики остеопороза. Механизм остеопротективного действия адrenoблокаторов недостаточно изучен. Целью работы являлся сравнительный анализ действия метопролола и пропранолола на рост клеток ткани кости в норме и на фоне высокой концентрации адреналина. В условиях органотипического культивирования препараты не оказывали прямого стимулирующего роста клеток ткани кости действия. Остеопротективный эффект пропранолола был обнаружен на фоне высокой концентрации адреналина.

Ключевые слова: остеопороз, пропранолол, метопролол, β-адренорецепторы, органотипическая культура ткани.

N. A. Pasatetckaja, A. I. Lopatin, E. V. Lopatina

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFECT OF ADRENOBLOCKERS IN THE CONDITIONS OF ORGANOTYPIC BONE TISSUE CULTIVATION

Currently, the possibility of using adreno blockers for the treatment and prevention of osteoporosis is actively discussed. The mechanism of osteoprotective action of adreno blockers is poorly studied. The aim of the study was to compare the effect of metoprolol and propranolol on the growth of bone tissue cells in normal and high concentrations of epinephrine. The drugs did not directly stimulate the growth of bone tissue cells. The non-selective beta-blocker propranolol reduced bone resorption caused by high concentrations of epinephrine.

Key words: osteoporosis, propranolol, metoprolol, β-adrenergic receptors, organotypic tissue culture.

Распространённость остеопороза в мире приобретает характер эпидемии. Как правило, остеопороз развивается на фоне уже имеющейся патологии или формируется в результате применения лекарственных препаратов. Выявление общих патогенетических механизмов, лежащих в основе сочетанных патологий, и путей их фармакокоррекции является актуальным направлением для практического здравоохранения.

Особый интерес представляет развитие остеопороза на фоне сердечно-сосудистых заболеваний. Доказано, что повышение тонуса симпатической нервной системы играет важную роль в развитии артериальной гипертензии [2], а также коррелирует со снижением костной массы, за счет стимуляции остеокластогенеза и процессов резорбции ткани [11]. В связи с этим тонус симпатической нервной системы может рассматриваться как общее звено в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и остеопороза.

Ряд клинических исследований демонстрирует увеличение минеральной плотности

кости и снижение риска развития переломов у пациентов с артериальной гипертензией, получающих терапию адrenoблокаторами [12, 14]. Селективные адrenoблокаторы проявили более выраженный протективный эффект [8]. В других исследованиях не обнаружено положительного влияния адrenoблокаторов на костную ткань [6]. Противоречивые данные могут быть связаны с различным дизайном исследований и наличием неучтенных факторов риска переломов (индекс массы тела, физическая активность, возраст, хронические заболевания, сопутствующая терапия).

Остается открытым вопрос, является ли возможное остеопротективное действие адrenoблокаторов результатом прямого влияния на остеобласты или оно опосредовано системными эффектами.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Проанализировать действие селективного и неселективного β-адrenoблокаторов на рост

клеток ткани кости в норме и на фоне высокой концентрации адреналина.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на эксплантатах ткани кости 10–12-дневных куриных эмбрионов. Каждая серия экспериментов включала 120 контрольных эксплантатов и 120 экспериментальных эксплантатов на каждую исследованную концентрацию действующих веществ. Выделение и культивирование эксплантатов производили по методу, описанному ранее [3]. В питательную среду экспериментальных эксплантатов добавляли пропранолол (10^{-10} М – 10^{-4} М), метопролол (10^{-10} М – 10^{-4} М), адреналин (10^{-4} М). Клетки зоны роста контрольных и экспериментальных эксплантатов окрашивали антителами ab3442 к β_1 -адренорецептору (1:400) и T6778 (1:300) по стандартному протоколу.

Полученные изображения анализировали при помощи программы ImageJ. Для количественной оценки степени роста эксплантатов применяли морфометрический метод. Морфометрический критерий индекс площади (ИП) рассчитывали как отношение общей площади эксплантата к площади исходной зоны. Значение ИП контрольных эксплантатов принимали за 100 %. Часть исследования выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования «Конфокальная микроскопия» Института

физиологии им. И. П. Павлова РАН. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 10.0. Использовали *t*-критерий Стьюдента для двух независимых выборок. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение ($M \pm \sigma$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для доказательства наличия β_1 -адренорецепторов и их визуализации на поверхности клеток в зоне роста, эксплантаты ткани кости окрашивали антителами к β_1 -адренорецептору. Рецепторы расположены по всей поверхности плазматической мембраны (рис. 1).

Действие неселективного β -адреноблокатора пропранолола (10^{-10} М до 10^{-4} М) на рост эксплантатов ткани кости в органотипической культуре было дозозависимым (рис. 2). В концентрации 10^{-10} М и 10^{-8} М пропранолол практически не оказывал влияния на рост экспериментальных эксплантатов, ИП не отличался от контрольного значения. В концентрации 10^{-6} М пропранолол ингибировал рост эксплантатов исследуемой ткани на $(45 \pm 1,2) \%$ ($n = 120$, $p < 0,05$). Пропранолол практически полностью ингибировал рост экспериментальных эксплантатов в дозе 10^{-4} М (рис. 2).

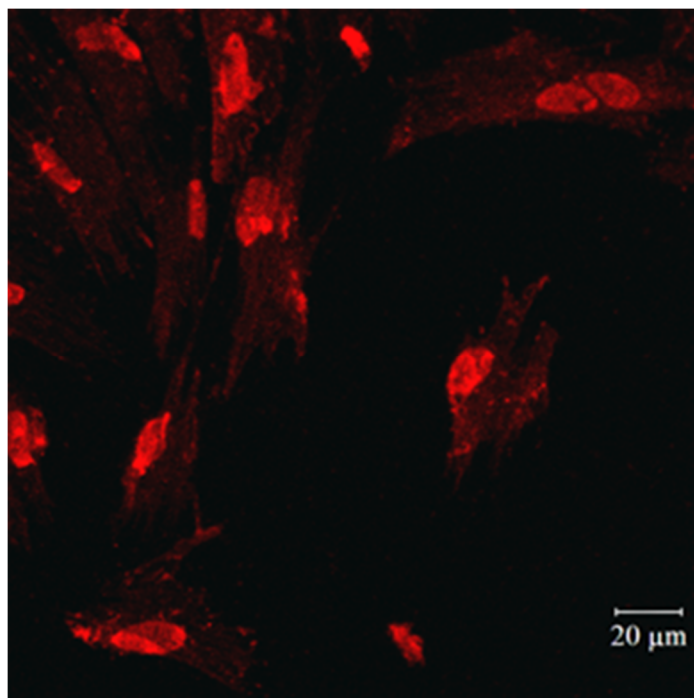


Рис. 1. Распределение β_1 -адренорецепторов в клетках зоны роста эксплантатов ткани кости. Контроль. Окр. антителами к β_1 -адренорецептору (ув. $\times 40$).

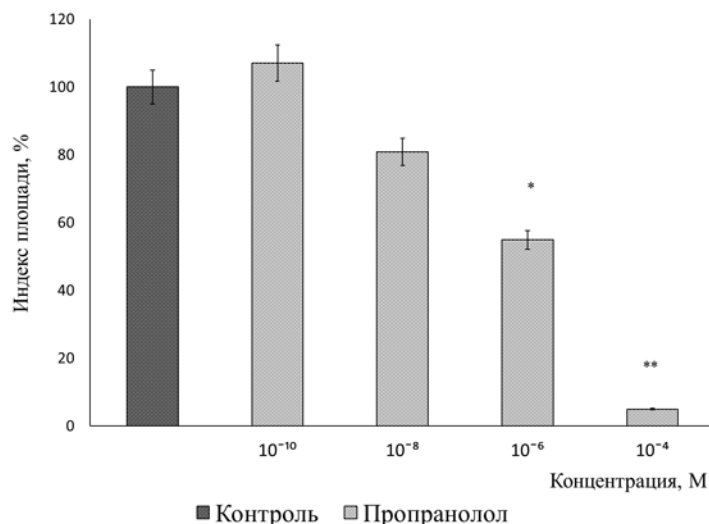


Рис. 2. Дозозависимое действие неселективного β -адреноблокатора пропранолола на рост эксплантатов ткани кости, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, достоверные различия относительно контрольного значения

Действие селективного β_1 -адреноблокатора метопролола также оказалось дозозависимым (рис. 3). Препарат (10^{-8} М и 10^{-6} М) угнетал рост эксплантатов ткани кости на $(22 \pm 1,8) \%$ ($n = 120$, $p < 0,05$) и $(23 \pm 1,4) \%$ ($n = 120$, $p < 0,05$) соответственно. В концентрации 10^{-4} М метопролол угнетал рост эксплантатов на $(45 \pm 1,1) \%$ ($n = 120$, $p < 0,05$).

В следующей серии экспериментов оценивали влияние адреноблокаторов на рост эксплантатов ткани кости на фоне высокой концентрации адреналина (10^{-4} М), оказывающей остеоингибирующее действие.

Добавление метопролола (10^{-10} М) в питательную среду не устраняло остеоингибирующий эффект адреналина (10^{-4} М), ИП экспери-

ментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на $(48 \pm 1,3) \%$ ($n = 120$, $p < 0,05$) и не отличался от ИП эксплантатов, культивируемых в питательной среде содержащей только адреналин.

Культивирование эксплантатов ткани кости в питательной среде, содержащей адреналин (10^{-4} М) и пропранолол, показало, что добавление пропранолола в культуральную среду нивелирует ингибирующий эффект адреналина (рис. 4).

ИП экспериментальных эксплантатов составил $(86 \pm 2) \%$ ($n = 120$) от контрольного значения. Отличие от ИП эксплантатов, культивируемых в питательной среде, содержащей один адреналин, составило $(38 \pm 1,3) \%$ ($p < 0,05$).

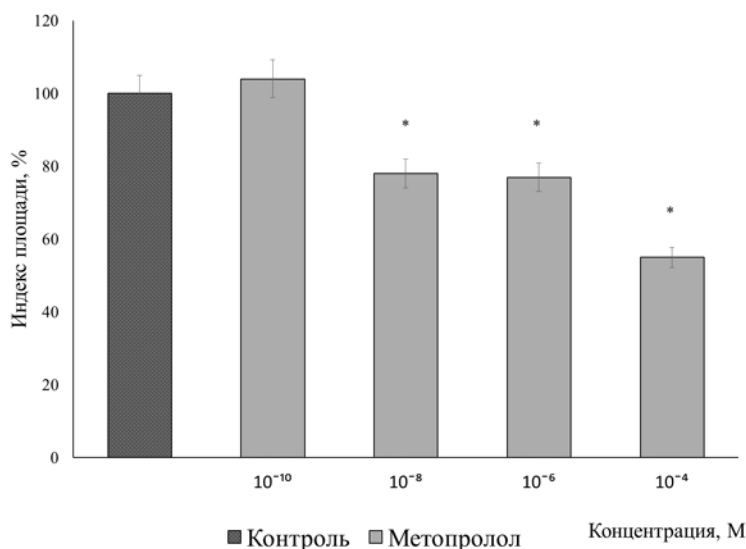


Рис. 3. Влияние селективного β_1 -адреноблокатора метопролола на рост эксплантатов ткани кости 10–12-дневного куриного эмбриона, * – $p < 0,05$, достоверные различия относительно контрольного значения

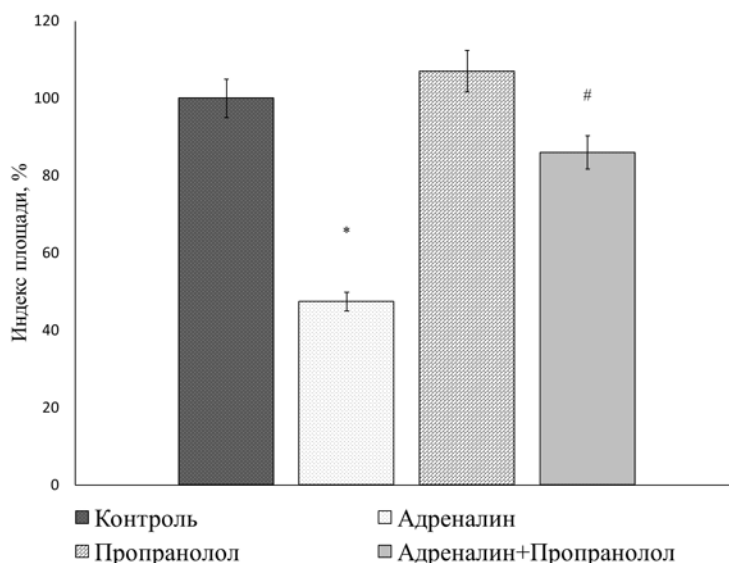


Рис. 4. Пропранолол (10^{-10} М) устраняет ингибирующий рост эксплантатов ткани кости эффект адреналина (10^{-4} М): * – $p < 0,05$, достоверные различия относительно контрольного значения, # – $p < 0,05$, достоверные различия относительно ИП эксплантатов, культивируемых в среде в присутствии адреналина (10^{-4} М)

Долгое время считалось, что клетки ткани кости животных и человека экспрессируют только β_2 -адренорецепторы. Экспрессия β_1 -адрено-рецепторов была описана только на клетках линий SaOS-2, TE-85, OHS-4 и связывалась с низкой дифференцировкой исходных клеток [7]. Khosla с соавт. проанализировали экспрессию всех подтипов β -адренорецепторов в образцах биопсии ткани кости и первичной культуре остеобластов человека и обнаружили уменьшение экспрессии рецепторов в ряду $\beta_2 > \beta_1 \gg \beta_3$ [8]. В условиях органотипической культуры ткани нами доказано наличие β_1 -адренорецепторов на поверхности клеток зоны роста эксплантатов ткани кости 10–12-дневных куриных эмбрионов.

Блокаторы широко применяются в клинической практике для лечения артериальной гипертензии. Родоначальник группы β -адрено-блокаторов – пропранолол был синтезирован в 1962 г. Именно он является препаратом сравнения для лекарственных средств, относящихся к данной группе. Некоторые адреноблокаторы обладают помимо основного β -адренобло-кирующего действия рядом дополнительных эффектов: наличием внутренней симпатомиметической активности, α -адреноблокирующего действия, мембраностабилизирующего и вазодилатирующего эффектов [1]. Другие β -адрено-блокаторы являются частичными или обратными агонистами адренорецепторов.

Пропранолол является полным антагонистом β -адренорецепторов и не способен их активировать или проявлять свойства обратного агониста. Обнаружено, что пропранолол может акти-

вировать внеклеточную сигнал-регулируемую киназу 1/2 (ERK 1/2), запускать сигнальные каскады и транскрипцию генов через механизмы, не связанные с активацией $G_{s/i}$ -белков [5]. Экспериментальные данные, полученные Patrizio с соавт. с использованием культуры кардиомиоцитов новорожденных мышей, доказали способность пропранолола (25×10^{-6} М) активировать экспрессию гена *Erg1* (принимającego участие в регуляции клеточного цикла и дифференцировки клеток) через β -адренорецепторы. Причем механизм регуляции экспрессии генов не зависит от способности пропранолола блокировать эффект катехоламинов [9]. Исследование системного введения низких доз пропранолола (0,1 мг/кг) на регенерацию кости после переломов не обнаружило положительного или отрицательного действия препарата на заживлении остеотомии у крыс и механическую прочность кости [10]. При локальном введении препарата в места остеотомии с использованием скаффолдов, обеспечивающих длительное высвобождение пропранолола ($0,12 \times 10^{-6}$ М и $2,18 \times 10^{-6}$ М), зарегистрировано усиление остеогенеза, миграции стволовых клеток и снижение остеокластогенеза [13]. В условиях органотипического культивирования мы не обнаружили стимулирующее рост ткани кости действие пропранолола в диапазоне концентраций от 10^{-4} М до 10^{-10} М.

Метопролол относится к липофильным селективным β_1 -адреноблокаторам без внутренней симпатомиметической активности. В работе Zang с соавт. введение метопролола в культуру

первичных остеобластов новорожденных крысят (10^{-9} М – 10^{-7} М) увеличивало пролиферацию остеобластов, активность щелочной фосфатазы и минерализацию кости. Максимальный эффект наблюдался в концентрации 10^{-7} М через 7 суток культивирования. В модели *in vivo* у крыс после овариоэктомии при пероральном введении метопролола (150 мг/кг и 250 мг/кг) сохранялись биомеханические свойства и минеральная плотность костной ткани [15]. Мы не обнаружили стимулирующего рост ткани кости действия препарата в диапазоне концентраций от 10^{-10} М до 10^{-4} М. Различие результатов может быть связано с большей чувствительностью эмбриональной ткани и меньшим сроком культивирования. Ранее в аналогичных экспериментальных условиях зарегистрировано ингибирующее рост эксплантатов ткани сердца действие метопролола [4]. Так же, как и при культивировании эксплантатов ткани сердца, метопролол ингибировал рост эксплантатов ткани кости в диапазоне концентраций от 10^{-8} М до 10^{-4} М.

Поскольку известно, что повышение тонуса симпатической нервной системы и увеличение содержания катехоламинов в плазме крови является одним из факторов развития сердечно-сосудистых заболеваний, ранее в условиях органотипического культивирования было исследовано влияние адреналина (10^{-14} М – 10^{-4} М) на рост эксплантатов ткани кости 10–12-дневных куриных эмбрионов [3]. Адреналин не оказывал трофотропного действия на рост эксплантатов ткани кости. В концентрации 10^{-4} М препарат угнетал рост эксплантатов на 53 %. Введение в питательную среду атенолола (10^{-4} М) не устраняло остеотоксическое действие адреналина [3]. Аналогичным образом добавление в питательную среду метопролола (10^{-10} М) не устраняло остеоингибирующий эффект адреналина. Культивирование эксплантатов ткани кости в питательной среде, содержащей неселективный β -адреноблокатор пропранолол (10^{-10} М) и адреналин, приводило к нивелированию остеоингибирующего действия катехоламина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в условиях органотипического культивирования, исследованные адреноблокаторы не оказывали прямого стимулирующего рост клеток ткани кости действия.

Остеопротективный эффект пропранолола был обнаружен на фоне высокой концентрации адреналина.

Работа поддержана субсидией молодым ученым, молодым кандидатам наук вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга в 2019 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ивлева, А. Я.* // Consilium medicum. – 2003. – Т. 5, № 11. – С. 641 – 648. – Текст : непосредственный.
2. *Лопатина Е. В., Кипенко А. В., Пенниайнен В. А. [и др.]* // Успехи физиологических наук. – 2016. – № 2. – С. 45 – 61. – Текст : непосредственный.
3. *Пасатецкая Н. А., Лопатин А. И., Кипенко А. В., Лопатина Е. В.* // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2017. – № 4 (56). – С. 47 – 50. – Текст : непосредственный.
4. *Цырлин В. А., Лопатина Е. В., Пенниайнен В. А.* // Артериальная гипертензия. – 2006. – Т. 12, № 3. – С. 248 – 251. – Текст : непосредственный.
5. *Azzi M., Charest P. G., Angers S. [et al.]* // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2003, Vol. 100, № 20. – P. 11406 – 11411.
6. *Graham S., Hammond-Jones D., Gamie Z. [et al.]* // Expert Opin. Investig. Drugs – 2008. – Vol. 17, № 9. – P. 1281 – 1299. – Direct text.
7. *Kellenberger S., Muller K., Richener H. [et al.]* // Bone. – 1998. – Vol. 22. – P. 471 – 478. – Direct text.
8. *Khosla S., Drake M. T., Volkman T. L. [et al.]* // J. Clin. Invest. – 2018. – Vol. 128, № 11. – P. 4832 – 4842. – Direct text.
9. *Patrizio M., Musumeci M., Stati T. [et al.]* // Eur. J. Pharmacol. – 2008. – Vol. 587, № 1–3. – P. 85 – 89. – Direct text.
10. *Smitham P., Crossfield L., Hughes G. [et al.]* // J. Orthop. Res. – 2014. – Vol. 32, № 7. – P. 887 – 893. – Direct text.
11. *Takeuchi T., Tsuboi T., Arai M. [et al.]* // Biochem. Pharmacol. – 2001. – Vol. 61. – P. 579 – 86. – Direct text.
12. *Toulis K. A., Hemming K., Stergianos S. [et al.]* // Osteoporos Int. – 2014. – Vol. 25, № 1. – P. 121 – 129. – Direct text.
13. *Wu H., Song Y., Li J. [et al.]* // Cell Prolif. – 2020. – Vol. 53, № 1. – P. e12725. – Direct text.
14. *Yang S., Nguyen N. D., Center J. R. [et al.]* // Bone. – 2011. – Vol. 48, № 3. – P. 451 – 455. – Direct text.
15. *Zang Y., Tan Q., Ma X. [et al.]* // Menopause. – 2016. – Vol. 23, № 9. – P. 1019 – 1025. – Direct text.