

УДК 616.71-007.234:547.771:577.161.2
DOI 10.17724/1728_2748.2020.82.29-35

М. Великий, д-р біол. наук, проф.
Д. Лабудзинський, канд. біол. наук,
О. Лісаковська, канд. біол. наук,
Е. Пасічна, пров. інж.
Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України, Київ, Україна,
С. Івонін, д-р хім. наук
Інститут органічної хімії НАН України, Київ, Україна

СУМІСНА ДІЯ НОВИХ ПІРАЗОЛВМІСНИХ БІСФОСФОНАТІВ І ВІТАМІНУ D₃ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОПОРОЗУ

Нині бісфосфонати є одними з найдієвіших засобів лікування захворювань опорно-рухового апарату, а розробка нових досконаліших їхніх аналогів має широкі перспективи практичного застосування. Комбінуючи методи біоінформатичного аналізу та віртуального скринінгу серед широкого спектра можливих варіантів було відібрано та синтезовано ряд аналогів бісфосфонатів, радикалом яких обрано похідні піразолу. Дослідження присвячено вивченню ефективності поєднаної дії синтезованих нітрогенемісних бісфосфонатів (піразолемісних аналогів) та вітаміну D₃ у корегуванні порушень мінерального обміну за остеопорозу. Роботу проводили на моделі аліментарного остеопорозу у щурів, розвиток якого характеризується гіпокальціємією, гіпофосфатемією, зниженням концентрації 25ОНD у сироватці крові та вираженою демінералізацією кісткової тканини. Синтезовані піразолемісні бісфосфонати з різною ефективністю гальмували процес демінералізації (резорбції) кісткової тканини та покращували мінеральний обмін у щурів з аліментарною формою остеопорозу. За дії обраних сполук зростала концентрація кальцію, неорганічного фосфату та знижувалась активність лужної фосфатази та її ізоензимів у сироватці крові. Підвищувалась зольність, вміст кальцію і фосфору у золі великогомілкової кістки, так само як і її остеометричні характеристики (довжина та товщина проксимального епіметафізу). Особливо ефективним у корекції порушень мінерального обміну за остеопорозу виявилось поєднання експериментальних піразолемісних бісфосфонатів із вітаміном D₃, який нормалізує концентрацію 25ОНD у сироватці крові та забезпечує синтез біологічно активних, гідроксильованих похідних форм холекальциферолу. За результатами роботи, найперспективнішим для подальших досліджень є вивчення сумісної дії вітаміну D₃ з бісфосфонатом ISP-30, як сполукою з найвищою біологічною ефективністю щодо регулювання процесу ремоделювання кісткової тканини, пригнічення резорбції та посилення остеогенезу.

Ключові слова: піразолемісні бісфосфонати, аліментарний остеопороз, мінеральний обмін, вітамін D₃, 25ОНD.

Вступ. Нині, незважаючи на суттєві успіхи у лікуванні системного остеопорозу та його ускладнень, широке використання глюкокортикоїдів у клінічній практиці сприяє зростанню частоти остеопоротичних переломів, зниженню якості життя хворих і збільшенню медико-соціальних витрат на профілактику й лікування цього захворювання [1].

Втрата маси кісткової тканини є основною причиною більшості захворювань скелета. Остеопороз, як метаболічне захворювання кісткової тканини, супроводжується порушенням узгодженості ремоделювання, переважанням остеокласто залежної резорбції кістки над її остеобласт-опосередкованим формуванням і мінералізацією, що веде до втрати щільності, порушень мікроархітектури кісток та, зрештою, до зростання ризику переломів [2]. Засобами, які здатні загальмувати втрату кісткової маси за рахунок пригнічення резорбції кісткової тканини, вважають кальцій, естрогени, кальцитонін, бісфосфонати і вітамін D₃ [3].

Препаратами першої ланки захисту за остеопорозу є бісфосфонати (БФ) – синтетичні стабільні аналоги неорганічного пірофосфату. Вони широко застосовуються у терапії таких метаболічних порушень кісткової тканини: постменопаузний і глюкокортикоїд-індукований остеопороз, хвороба Педжета, асоційована із запаленням втрата кісткової тканини, а також для прискорення репарацій переломів [4, 5]. БФ селективно поглинаються остеокластами кісткового матриксу і викликають їх морфологічні зміни, що веде до пригнічення резорбтивної активності та зменшення розпаду гідроксиапатиту.

Терапевтичне використання бісфосфонатів ефективно пригнічує процес демінералізації кісткової тканини, нормалізуючи мінеральний обмін, але суттєво не впливає на процеси заміщення кісткової тканини або ж остеогенезу. Ключову роль у підтримці балансу ремоделювання кісткової тканини, зокрема остеогенезу, відіграє гормонально активна форма вітаміну D₃ – 1,25(ОН)₂D₃ [6]. Молекулярні ефекти 1,25(ОН)₂D₃ опосередковуються функціонуванням рецепторів вітаміну D₃ (VDR), що належать до родини ядерних рецепторів

стероїдних гормонів і мають класичну доменну структуру. Утворений комплекс 1,25(ОН)₂D₃-VDR проникає у клітинне ядро та зв'язується з X-рецептором ретиноевої кислоти (RXR). Ліганд-залежні конформаційні зміни просторової структури VDR обумовлюють гетеродимеризацію з ретиноїдними X-рецепторами і комплекс 1,25(ОН)₂D₃-VDR/RXR взаємодіє з консенсусною послідовністю промоторної ділянки гена-мішені, відомою як елементи відповіді на вітамін D₃ (vitamin D-responsive elements) (VDRE). Активация промоторної ділянки індукує зростання рівня протеїнів-коактиваторів та подальше формування мультипротеїнового коактиваторного комплексу. Коактиваторний комплекс, у свою чергу, процесує ремоделювання хроматину й регулює активність промоторів за участю компонентів ініціації транскрипції. Отже VDR функціонують як ліганд-активовані транскрипційні фактори, які, зв'язуючись зі специфічними послідовностями ДНК у вітаміні D₃ регульованих генах, змінюють швидкість їхньої транскрипції РНК-полімеразою II й синтез регуляторних протеїнів [7, 8].

Метою роботи було дослідження ефективності синергічної дії новосинтезованих піразолемісних бісфосфонатів, які зменшують кісткову резорбцію, та вітаміну D₃ – основного регулятора процесу ремоделювання кісткової тканини й активатора остеогенезу в коригуванні порушень мінерального обміну за аліментарного остеопорозу.

Об'єкт і методи досліджень. Розроблення підходів, дизайн і синтез нітрогенемісних бісфосфонатів (піразолемісних аналогів) здійснювали співробітники Інституту органічної хімії НАН України, які є співавторами цієї статті.

Дослідження біологічної ефективності синтезованих піразолемісних бісфосфонатів проводили на щурах-самцях лінії Wistar (вік – 1 місяць, вихідна маса – 90±5 г). Аліментарний остеопороз викликали шляхом утримання щурів протягом 30 діб на D-гіповітамінному раціоні, згідно з ГОСТ 11222-65 збалансованому за вмістом кальцію та фосфору (вміст кальцію

– 1,2 %, фосфору – 0,8 %, співвідношення Ca^{2+}/P – 1,5). Дослідним тваринам через 30 діб утримання на D-гіповітамінозному раціоні вводили препарати протягом наступних 30 діб один раз на добу внутрішньошлунково об'ємом 0,1 мл за допомогою зонду. Контрольні тварини утримувались на повноцінному раціоні віварію. Усі маніпуляції із тваринами проводили під легким ефірним наркозом. Досліджувані бісфосфонати: ISP-30 та ISP-50 вводили *per os* із розрахунку 1,7 мг/кг маси тіла у вигляді водної суспензії, вітамін D₃ (холекальциферол, Sigma) вводили у вигляді масляної суспензії (400 МО/кг маси тіла).

Забезпеченість організму вітаміном D₃ оцінювали за концентрацією 25OHD₃ у сироватці крові, який визначали методом імуноензимного аналізу згідно з протоколом для використання набору 25-Hydroxy Vitamin D EIA (IDS, США). Реєстрацію сигналу здійснювали на автоматичному мікропланшетному рідері (Sinnova ER-500 BiORad) за довжини хвилі 450 нм. Рівень кальцію в сироватці крові визначали за допомогою біотест-набору (ЛАХЕМА, Чехія), стандартний розчин містив 25 мМ CaCO_3 , розчиненого у 1,7% HCl. Концентрацію неорганічного фосфату вимірювали після осадження протеїнів 12% розчином ТХУ методом Duce [9]. Активність загальної лужної фосфатази визначали біотест-наборами виробництва ЛАХЕМА. Активність ізоензимів лужної фосфатази, а саме кісткової термолабільної ізоформи, визначали після інкубації проб при 55 °C, та кишкової ізоформи – з використанням L-фенілаланіну як інгібітора [10, 11].

Зольність кісткової тканини визначали методом сухої мінералізації за температури 500–600 °C після її знежирювання гексаном протягом 7 діб і розраховували відносно маси кісткової тканини. Вміст мінеральних компонентів у золі визначали вищеописаними методами після розчинення золи в 0,5 мл 1н HCl. В отриманий

розчин солей додавали 9,5 мл бідистильованої води з подальшим розведенням розчину бідистильованою водою у співвідношенні 1:40. Отримані результати піддавали статистичній обробці за допомогою програми "Microsoft Excel". Статистичну значимість оцінювали з використанням *t*-критерію Стюдента, достовірними вважали відмінні при $P < 0,05$.

Результати та їхнє обговорення. Попередній аналіз бази даних MDDR засвідчив відсутність похідних піразолу серед відомих нітрогенвмісних бісфосфонатів [12]. Тому, враховуючи вірогідність існування шести топологічно можливих ізомерів піразолвмісних бісфосфонатів (формули 2–7 на рис. 1) загальної формули Маркуша (формула 1 на рис. 1), співробітниками Інституту органічної хімії НАН України на основі експериментальних досліджень розроблено нові підходи та препаративні методи синтезу 4-R-1,3-діалкілпіразолів і піразолвмісних гідроксибісфосфонатів, які складаються з послідовних перетворень відповідних піразолвмісних карбонових кислот на їх хлорангідриди з подальшою взаємодією із трис(триметилсіліл)фосфітом і гідроксилвмісними аліфатичними сполуками [13]. Віртуальний скринінг отриманої віртуальної бібліотеки передбачав порівняння амінокислотних послідовностей та ідентичності сайтів зв'язування протеїнів-ензимів FPPS людини, миші та щура. На основі результатів докінг-досліджень окреслено групу найперспективніших представників. Різна довжина лінкера, що зв'язує бісфосфонатний фрагмент із піразольним ядром і спосіб приєднання лінкера до атома нітрогену або карбону піразолу було обрано основними характеристиками селекції. У результаті увагу зфокусовано на двох найперспективніших БФ, ISP-30 та ISP-50 і досліджено їх біологічну ефективність окремо, як потенційних лікарських засобів, що нормалізують мінеральний обмін і гальмують розвиток експериментального аліментарного остеопорозу.

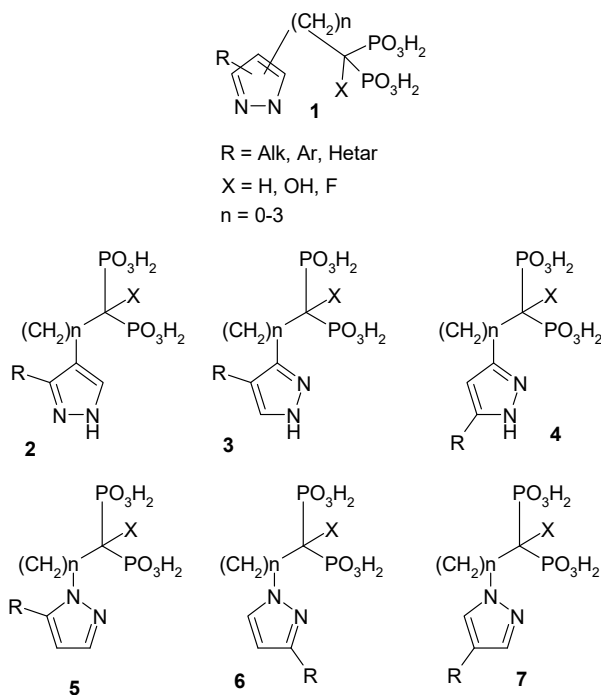


Рис. 1. Топологічно можливі ізомери піразолвмісних бісфосфонатів (формули 2–7) загальної формули Маркуша (1)

Біологічна ефективність синтезованих піразолвмісних бісфосфонатів досліджувалась на моделі аліментарного остеопорозу у щурів, для якої характерними є системні патологічні зміни, зокрема спостерігається

виражена гіпокальціємія, гіпофосфатемія та зростання у сироватці крові активності лужної фосфатази – біомаркера стану мінералізації кісткової тканини. Як нами раніше було продемонстровано, розвиток остеопорозу

у молодих щурів обумовлював сповільнення росту кісток, порушення структури компактної кісткової тканини й епіфізарного хряща, зниження маси і зольності великогомілкової кістки, зниження вмісту в ній мінеральних компонентів і послаблення клітинної ланки імунітету (зниження кількості та гальмування фагоцитарної активності гранулоцитів і моноцитів) [10].

Дослідження кальцієвого гомеостазу в організмі є невід'ємною складовою формування терапевтичних стратегій лікування остеопенії й остеопорозу. Враховуючи критичну важливість внутрішньоклітинного пулу кальцію як вторинного месенджера у сигнальних шляхах і кофактора деяких ензимів клітини, важко переоцінити і його позаклітинні ефекти – є фактором згортання крові й елементом гідроксипатитів кісткового матриксу, задіяний у формуванні потенціалу на мембрані збудливих клітин та виступає як первинний месенджер [14]. Остання функція обумовлена тим, що позаклітинний іонізований кальцій слугує лігандом для мембранних кальцієвих рецепторів, спряжених із G-протеїном (GPCR – G-protein-coupled receptor). Такі рецептори отримали назву кальцієві рецептори, що містять центр зв'язування Ca^{2+} (CaSR – calcium-sensing receptor) [15]. Головна функція CaSR полягає у підтриманні гомеостазу Ca^{2+} через узгодженість процесів абсорбції кальцію з гастроінтестинального тракту, екскреції нирками, вивільнення й акумулювання кістковою тканиною. На молекулярному рівні CaSR разом із метаболічними глутаматними рецепторами й іншими кальцій-зв'язувальними протеїнами мембрани через G-білки (після зв'язування Ca^{2+}) запускають ефекторний внутрішньоклітинний сигнальний каскад [16]. Безпосереднє регулювання рівня позаклітинного кальцію здійснюється паратиреоїдним гормоном, вітаміном D_3 і кальцитоніном [7], що може слугувати дієвими важелями впливу на мінеральний обмін у сироватці крові й у кістковому матриксі за умов патології.

Уведення щурам на тлі остеопорозу досліджуваних піразолвмісних БФ суттєво вплинуло на стан мінерального обміну. Рівень загального кальцію як інтегрального показника забезпеченості організму мінеральними компонентами, який знижувався в сироватці крові на 29,5 % за остеопорозу, зростав при введенні піддослід-

ним тваринам досліджуваних бісфосфонатів. Зокрема, під час застосування БФ ISP-30 концентрація кальцію зростала на 33,5 %, а ISP-50 – на 15,2 %, порівняно з остеопорозом (табл. 1). Необхідно зазначити, що виявлені зміни концентрації кальцію у сироватці крові відбуваються в основному за рахунок фракції іонізованого (ультрафільтрувального) кальцію, відносний вміст якого у контролі складає 91 %. Концентрація іонізованого кальцію зростала за дії БФ ISP-30 – на 36,4 %, а ISP-50 – на 16,4 % порівняно з остеопорозом (табл. 1). Досліджувані БФ суттєво не впливали на концентрацію фракції протеїнзв'язаного кальцію. Вони певною мірою нормалізували мінеральний обмін, однак рівень кальцію та його функціональних форм у сироватці крові не досягав значень характерних для контрольних тварин.

Гіпокальціємія за остеопорозу супроводжувалася слабо вираженою гіпофосфатемією, концентрація фосфатів у сироватці крові знижувалася на 25,2 %. Введення досліджуваних препаратів викликало помірне підвищення рівня неорганічного фосфату, зокрема за дії БФ ISP-30 – на 21,2 %, а ISP-50 – на 14,4 % порівняно з остеопорозом (табл. 1). Виявлені зміни рівня кальцію та неорганічного фосфату забезпечували підтримання сталості відношення $\text{Ca}^{2+}/\text{P}_i$ в межах 1,5, що є сталою величиною для організму.

Дослідження активності лужної фосфатази – біомаркерного ензиму, що характеризує інтенсивність процесу мінералізації кісткової тканини, засвідчили її суттєве зростання (на 67,6 %) у сироватці крові за аліментарного остеопорозу. Активність лужної фосфатази сироватки крові за остеопорозу суттєво зростала. Основний вклад у зростання загальної активності ензиму вносить кісткова ізоформа, яка складає 82,9 % загальної активності лужної фосфатази сироватки крові й активність якої зростала за остеопорозу на 78,2 % (табл. 2). Нормалізація обміну кальцію і фосфатів під впливом досліджуваних бісфосфонатів корелювала зі зниженням і наближенням до значень контролю активності загальної лужної фосфатази та її кісткової ізоформи у сироватці крові. Так, загальна активність ЛФ знижувалась під впливом БФ ISP-30 – на 32,2 %, а ISP-50 – на 18,5 %. Активність кісткового ізоензиму знижувалась під впливом БФ ISP-30 – на 35,8 %, а ISP-50 – на 22,4 %.

Таблиця 1. Концентрація мінеральних компонентів у сироватці крові щурів за аліментарного остеопорозу та введення досліджуваних бісфосфонатів і вітаміну D_3 , $\text{M} \pm \text{m}$, $n=9$

Дослідні групи	Кальцій, $\text{ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$			Фосфат неорганічний, $\text{ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$
	Кальцій загальний	Кальцій протеїнзв'язаний	Кальцій ультрафільтрувальний	
Контроль	2,24±0,12	0,20±0,01	2,04±0,10	1,95±0,09
Аліментарний остеопороз	1,58±0,08*	0,18±0,02	1,40±0,08*	1,46±0,07*
Остеопороз + вітамін D_3	2,10±0,12#	0,19±0,02	1,92±0,13	1,78±0,11#
Остеопороз + алендронат	1,71±0,09	0,17±0,03	1,53±0,07#	1,50±0,06
Остеопороз + алендронат + вітамін D_3	2,00±0,15#	0,20±0,02	1,80±0,09#	1,65±0,08#
Остеопороз + ISP-30	2,11±0,14#	0,20±0,01	1,91±0,12#	1,77±0,09#
Остеопороз + ISP-30 + вітамін D_3	2,31±0,16#	0,20±0,02	2,10±0,14#	2,15±0,19#
Остеопороз + ISP-50	1,82±0,09#	0,19±0,01	1,63±0,19	1,67±0,08#
Остеопороз + ISP-50 + вітамін D_3	2,15±0,13#	0,23±0,02#	1,92±0,15#	1,98±0,11#

* – різниця, порівняно з контролем, вірогідна ($p < 0,05$);

– різниця, порівняно з остеопорозом, вірогідна ($p < 0,05$).

Гальмування процесу фізіологічної мінералізації завичай веде до втрати мінеральних компонентів, зниження щільності кісткової тканини та, зрештою, до розвитку остеопорозу. Стан кісткової тканини піддослідних щурів, яким вводили препарати, характеризували за зольністю, вмістом кальцію та фосфору у золі велико-

гомількових кісток, а також за показниками остеометрії. Результати, наведені в табл. 2 свідчать, що за остеопорозу зольність великогомілкової кістки (ВГК) щурів знижувалась на 25,6 %, вміст кальцію на 34,3 %, вміст фосфору на 33,8 % відносно контролю. Введення БФ ISP-30 збільшувало зольність на 22,2 %, вміст кальцію

на 36,6 % та вміст фосфору на 36,1%. Введення експериментального препарату ISP-50 призводило до зростання зольності великогомілкової кістки на 9,7 %, вмісту кальцію на 21,9 %, неорганічного фосфору на 28,7 % порівняно з аліментарним остеопорозом. Слід також зазначити, що нормалізуючі ефекти піразолвмісних БФ

на вміст мінеральних компонентів великогомілкової кістки корелював із покращенням її остеометричних показників. Так, за дії БФ ISP-30 довжина ВГК зростала на 11 %, а ISP-50 – на 15,0 %, у той час як товщина проксимального епіметафізу збільшувалася на 7,1 % та 12,5 % відповідно (табл. 3).

Таблиця 2. Активність лужної фосфатази та її ізоензимів у сироватці крові щурів за аліментарного остеопорозу та введення досліджуваних бісфосфонатів і вітаміну D₃, M±m, n=9

Дослідні групи	Активність лужної фосфатази, од/л		
	Загальна активність	Кишковий ізоензим	Кістковий ізоензим
Контроль	230,2±11,7	48,9±2,2	190,9±12,3
Аліментарний остеопороз	386,0±14,0*	73,0±3,7*	320,2±20,9*
Остеопороз + вітамін D ₃	281,1±7,8	61,9±4,1#	223,3±11,6#
Остеопороз + алєндронат	301,6±16,4#	59,9±4,2#	280,7±13,6
Остеопороз + алєндронат + вітамін D ₃	263,2±5,4#	64,3±3,8	199,2±10,4#
Остеопороз + ISP-30	261,6±16,4#	71,5±5,7	205,6±9,9#
Остеопороз + ISP-30 + вітамін D ₃	232,6±16,6#	62,3±3,4#	191,6±7,8#
Остеопороз + ISP-50	314,6±26,5#	67,8±3,9	248,6±15,6#
Остеопороз + ISP-50 + вітамін D ₃	271,5±19,7#	59,7±4,2#	223,2±13,3#

* – різниця, порівняно з контролем, вірогідна ($p < 0,05$);

– різниця, порівняно з остеопорозом, вірогідна ($p < 0,05$).

Таблиця 3. Остеометрія та вміст мінеральних компонентів у великогомілковій кістці щурів за дії досліджуваних бісфосфонатів і вітаміну D₃ на тлі аліментарного остеопорозу, M±m, n=11

Дослідні групи	Остеометрія великогомілкової кістки		Зольність, % сухої маси	Вміст кальцію, % у золі	Вміст фосфору % у золі
	Довжина, мм	Товщина проксимального епіметафізу, мм			
Контроль	36,3±2,3	7,0±0,3	56,8±2,5	35,3±2,3	16,3±0,6
Аліментарний Остеопороз	28,6±3,1*	5,6±0,4*	42,3±1,8*	23,2±1,6*	10,8±0,4*
Остеопороз + вітамін D ₃	35,3±3,3#	6,8±0,5#	51,7±3,2#	37,3±4,3#	15,4±0,8#
Остеопороз + алєндронат	30,9±2,2	5,9±0,4	45,0±1,7	27,5±1,2#	11,8±0,3#
Остеопороз + алєндронат + вітамін D ₃	32,5±2,7	6,0±0,5	49,3±2,7#	31,4±2,0#	13,5±0,5#
Остеопороз + ISP-30	31,8±3,5	6,0±0,3	51,7±3,1#	31,7±2,1#	14,7±0,6#
Остеопороз + ISP-30 + вітамін D ₃	38,3±2,7#	7,1±0,4#	59,3±3,7#	41,45±2,9 ^{#жквс}	17,5±0,7#
Остеопороз + ISP-50	32,9±3,1	6,3±0,5	46,4±2,8#	28,3±1,7#	13,9±0,6#
Остеопороз + ISP-50 + вітамін D ₃	35,1±3,0#	6,6±0,4#	51,9±4,5#	30,4±2,5#	16,1±0,9#

* – різниця, порівняно з контролем, вірогідна ($p < 0,05$);

– різниця, порівняно з остеопорозом, вірогідна ($p < 0,05$).

Аліментарний остеопороз викликали у молодих щурів шляхом їх утримання протягом двох місяців на D-гіповітамінозному раціоні, що обумовлювало значне (майже у 3 рази) зниження концентрації 25OHD в сироватці крові (34,0±3,7 нмоль·л⁻¹ за остеопорозу проти 97,5±4,3 нмоль·л⁻¹ у контролі). Рівень гідроксильованої форми вітаміну D₃ 25OHD в сироватці крові, вважається найоб'єктивнішим показником забезпеченості організму вітаміном та у нормі складає 75–150 нмоль·л⁻¹ [8, 10]. Виявлений низький рівень 25OHD (рис. 2) у сироватці крові щурів з аліментарним остеопорозом, згідно із сучасною класифікацією забезпеченості організму вітаміном D₃, можна охарактеризувати як стан глибокого D₃-вітамінного дефіциту [6].

Як свідчить велика кількість досліджень, фізіологічна та фармакологічна дія 1,25(OH)₂D₃ із залученням рецепторів вітаміну D₃, притаманих широкому колу клітин-мішеней, обумовлює значний терапевтичний потенціал вітаміну D₃ у контексті значної кількості захворювань, включаючи серцево-судинні, аутоімунні, онкологічні та, особливо, захворювань скелета [7, 8]. Відповідно, дефіцит вітаміну D₃ розглядається як універсальний чинник ризику розвитку мультифакторних

захворювань і підвищує вірогідність смерті від них [17]. Отже, враховуючи достатньо ефективну антирезорбтивну дію нових піразолвмісних бісфосфонатів, актуальним було дослідити їх комплексну дію з холекальциферолом на моделі аліментарного остеопорозу у щурів.

Індивідуальне терапевтичне введення досліджуваних бісфосфонатів тваринам з експериментальним остеопорозом практично не впливало на рівень 25OHD в сироватці крові. Водночас щоденне введення піддослідним щурам 40 МО вітаміну D₃ забезпечувало достатню нормалізацію концентрації 25OHD (89,7±5,2 нмоль·л⁻¹) (рис. 2). Найцікавішим став факт спільного введення препарату вітаміну D₃ та досліджуваних бісфосфонатів, результатом якого стала більш ефективна нормалізація рівня 25OHD у сироватці. Було показано, що сумісне ведення вітаміну D₃ із БФ ISP-50 сприяло зростанню рівня 25OHD у сироватці крові щурів до 103,2±8,1, водночас подібне застосування ISP-30 із холекальциферолом значно підвищувало рівень маркерного метаболіту 25OHD до 121,2±6,7 нмоль·л⁻¹, відповідно, порівняно з остеопорозом, та навіть введенням препарату холекальциферолу окремо.

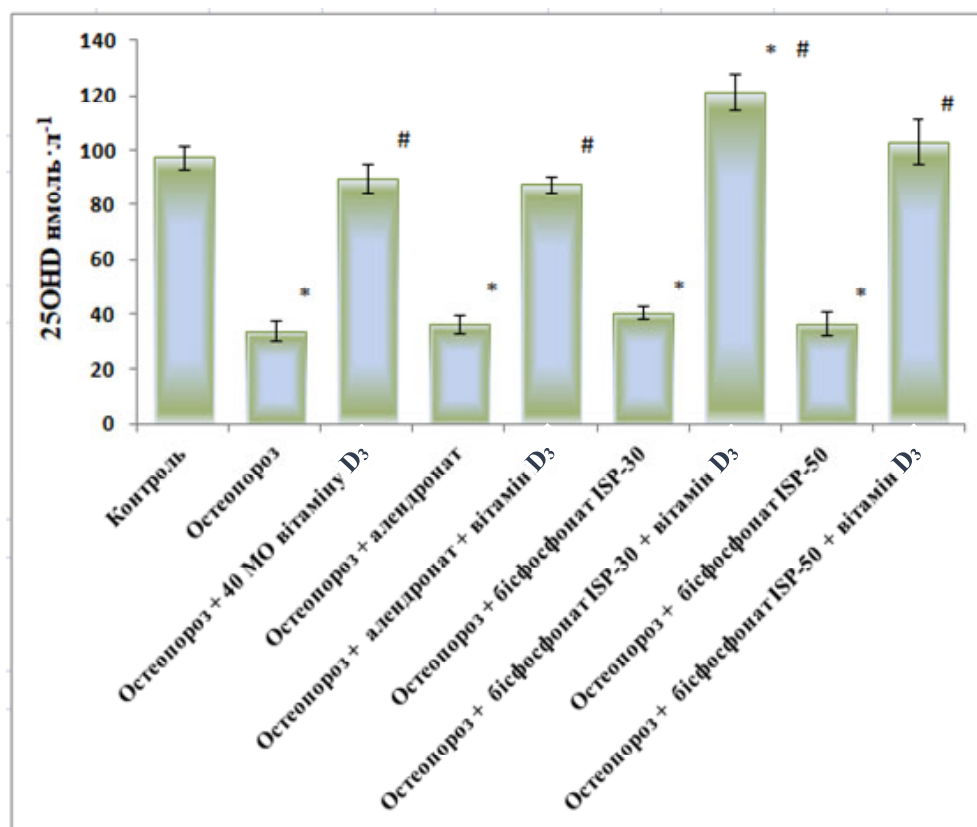


Рис. 2. Концентрація 25OHD в сироватці крові щурів за аліментарного остеопорозу та введення досліджуваних бісфосфонатів і вітаміну D₃, $M \pm m$, $n=9$

* – різниця, порівняно з контролем, вірогідна ($p < 0,05$);

– різниця, порівняно з остеопорозом, вірогідна ($p < 0,05$).

На тлі сумісного терапевтичного введення бісфосфонатів із холекальциферолом спостерігалася виразніша нормалізація рівня мінеральних компонентів у сироватці крові щурів з аліментарним остеопорозом. Так, концентрація загального кальцію зростала у групі терапії ISP-50 із вітаміном D₃ на 36,1 %, а ISP-30 + D₃ на суттєві 46,2 % порівняно з групою остеопорозу (табл. 1). Слід зазначити, що у групі введення ISP-30 + D₃ ілюстративним є виразне зростання рівня ультрафільтрувального кальцію до $2,10 \pm 0,14$ ммоль·л⁻¹, тобто на 50 % вище, ніж у групі остеопорозу. Нормалізуючий вплив комплексної дії бісфосфонатів і холестеролу також виявлявся і на рівень неорганічного фосфату у сироватці крові. У випадку комплексної дії ISP-50 із вітаміном D₃ рівень неорганічного фосфату зростав на 35,6 %, порівняно з остеопорозом, відповідаючи рівню контрольних значень, а використання ISP-30 + D₃ призвело до його збільшення на 47,2 %, що навіть перевершило вміст PO₄³⁻ у сироватці контрольних щурів.

Регуляторна дія піразолвмісних БФ у комбінації з вітаміном D₃ на вміст компонентів мінерального обміну у сироватці крові тісно корелював з їх нормалізуючими ефектами ензиматичної активності лужної фосфатази, включаючи її ізоензими. Терапевтичне введення щурам з остеопорозом ISP-50 + D₃ засвідчило достовірне зниження ензиматичної активності ЛФ на 29,7 %, у той час як застосування комбінації ISP-30 + D₃ дозволяло досягнути зменшення цього показника на 39,7 % порівняно з експериментальним остеопорозом (табл. 2).

Компенсація остеопороз-асоційованої гіпокальціємії гіпофосфатемії у сироватці крові під дією БФ + D₃ терапії супроводжувалася корегувальною дією на мінеральний обмін у кістковій тканині. Результати з табл. 3

свідчать, що група введення ISP-50 + D₃ характеризувалася зростанням зольності великомілкової кістки на 22,7 %, вміст кальцію зріс на 31,0 % та неорганічний фосфат на 49,1 % порівняно з аліментарним остеопорозом, водночас комбінація ISP-30 + D₃ показала зростання на 40,2, 78,7 та 62,0 % відповідно. Більш того, це корелювало з результатами остеометричного аналізу. Так, за дії БФ ISP-50 + D₃ довжина ВГК зростала на 15,7 %, а ISP-30 + D₃ – на 33,9 %, у той час як товщина проксимального епіметафізу збільшувалася на 17,9 та 26,8 % відповідно (табл. 2). Цікавим є факт, що комбінація ISP-30 із холекальциферолом виявилася більш ефективною, ніж така ж препарату порівняння алендронату та групи індивідуального введення вітаміну D₃. Викладене засвідчує і ще раз підтверджує регуляторну роль вітаміну у процесах диференціювання й активації остеобластів [18, 19], а його застосування в комбінованій терапії із піразолвмісними бісфосфонатами посилює остеотропні та протирезорбтивні ефекти БФ.

Висновки. Результати проведених досліджень свідчать, що розвиток аліментарного остеопорозу, викликаного утриманням щурів на D-авітамінозному раціоні, супроводжується вираженою гіпокальціємією, гіпофосфатемією, зростанням активності лужної фосфатази та її кісткового ізоензиму, а також значними порушеннями вмісту мінеральних компонентів та остеометрії кісток у щурів. Введення тваринам на тлі остеопорозу досліджуваних піразолвмісних бісфосфонатів та препарату порівняння алендронату (4-аміно-1-гідроксибутиліден-бісфосфонату) з різною ефективністю гальмувало процес демінералізації (резорбції) кісткової тканини та посилювало мінеральний обмін у щурів за маркерними показниками крові та кісткової

тканини. Комбінована терапія остеопорозу піразолвмісними бісфосфонатами у поєднанні з холекальциферолом показало ефективніші нормалізуючі ефекти і на мінеральний обмін у сироватці крові, і на вміст мінеральних компонентів у кістковій тканині порівняно з індивідуальним введенням цих сполук. Найпотужніші корегувальні ефекти спостерігалися у групі сумісного введення ISP-30 + D₃. Узагальнюючи викладене, ефективність терапії піразолвмісних БФ у поєднанні з вітаміном D₃ в контексті описаних параметрів мінерального метаболізму була вищою, ніж алендронат із вітаміном D₃, що свідчить про високий остеотропний потенціал досліджуваних бісфосфонатів та спонукає до подальших досліджень їх терапевтичної дії.

Список використаних джерел

1. Langdahl B. L. Treatment of Osteoporosis: Unmet Needs and Emerging Solutions / B. L. Langdahl, J. D. Andersen // Br. J. Clin. Metab. – 2018. – Vol. 25, N 3. – P. 133–140. DOI: 10.11005/jbm.2018.
2. Aging and menopause reprogram osteoclast precursors for aggressive bone resorption / A. M. J. Møller, J. Delaissé, J. B. Olesen et al. // Bone Res. – 2020. – Vol. 8, N 27. – P. 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41413-020-0102-7>.
3. Katsimbri P. The biology of normal bone remodeling / P. Katsimbri // Eur. J. Cancer Care (Engl.). – 2017. – Vol. 26, N 6:10. 1111/ecc.12740. DOI:10.1111/ecc.12740.
4. Riggs M. M. Pharmacometrics and systems pharmacology for metabolic bone diseases / M. M. Riggs, S. Cremers // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2019. – Vol. 85, N 6. – P. 1136–1146. DOI:10.1111/bcp.13881.
5. Kehoe T. Regulatory aspects of the development of drugs for metabolic bone diseases – FDA and EMA perspective / T. Kehoe, E. Blind, H. Janssen // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2019. – Vol. 85, N 6. – P. 1208–1212. DOI:10.1111/bcp.13791.
6. Anderson P. H. Vitamin D Activity and Metabolism in Bone / P. H. Anderson // Curr Osteoporosis Rep. – 2017. – Vol. 15, N 5. – P. 443–449.
7. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects / S. Christakos, P. Dhawan, A. Verstuyf et al. // Physiol. Rev. – 2016. – Vol. 96, N 1. – P. 365–408. DOI: 10.1152/physrev.00014.2015.
8. Rochel N. Structural aspects of Vitamin D endocrinology / N. Rochel, F. Molnár // Mol. Cell. Endocrinol. – 2017. – Vol. 453. – P. 22–35. DOI: 10.1016/j.mce.2017.02.046.
9. Dyce B. J. A rapid nonenzymatic assay for 2,3-DPG in multiple specimens of blood / B. J. Dyce, S. P. Bessman // Arch. Environ. Health. – 1973. – Vol. 27, N 2. – P. 112–115. DOI: 10.1080/00039896.1973.10666331.
10. Імуномодулююча дія вітаміну D₃ та бісфосфонатів при аліментарному остеопорозі в щурів / В. Рясний, Л. Апуховська, М. Великий та ін. // Укр. біохім. журн. – 2012. – Вип. 84 (2). – С. 73–80.
11. Плеханов Б. Щелочная фосфатаза: современное состояние вопроса / Б. Плеханов, Т. Цветкова, Т. Пиперков // Лаб. дело. – 1989. – 11. – С. 4–7.
12. <http://accelrys.com/products/databases/bioactivity/mddr.htm>.
13. N-Alkylhydrazones of aliphatic ketones in the synthesis of 1,3,4-trisubstituted non-symmetric pyrazoles / S. P. Ivonin, B. B. Kurpil', E. B. Rusanov et al. // Tetrahedron Lett. – 2014. – Vol. 55, N 14. – P. 2187–2189. DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.02.058.
14. Carafoli E. Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator / E. Carafoli, J. Krebs // J. Biol. Chem. – 2016. – Vol. 291, N 40. – P. 20849–20857. DOI:10.1074/jbc.R116.735894.
15. Ray K. Calcium-Sensing Receptor: Trafficking, Endocytosis, Recycling, and Importance of Interacting Proteins / K. Ray // Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. – 2015. – Vol. 132. – P. 127–150. doi:10.1016/bs.pmbts.2015.02.006.
16. Design of Calcium-Binding Proteins to Sense Calcium / S. Tang, X. Deng, J. Jiang et al. // Molecules. – 2020. – Vol. 5, N 9. – P. 2148. DOI: 10.3390/molecules25092148.
17. Association between vitamin D supplementation and mortality: systematic review and meta-analysis / Y. Zhang, F. Fang, J. Tang et al. // BMJ. – 2019. – Vol. 366, N 14673. DOI: 10.1136/bmj.14673.

Н. Великий, д-р биол. наук, проф., Д. Лабудзинский, канд. биол. наук, О. Лисаковская, канд. биол. наук., Е. Пасичная, вед. инж. Институт биохимии имени А. В. Палладина НАН Украины, Киев, Украина, С. Ивонин, д-р хим. наук Институт органической химии НАН Украины, Киев, Украина

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВЫХ ПИРАЗОЛСОДЕРЖАЩИХ БИСФОСФОНАТОВ И ВИТАМИНА D₃ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТЕОПОРОЗЕ

Бисфосфонаты являются одними из наиболее эффективных препаратов для лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата, а разработка их более совершенных аналогов имеет широкие перспективы для дальнейшего практического применения. Комбинируя методы биоинформационного анализа и виртуального скрининга среди широкого спектра возможных вариантов были отобраны и синтезированы аналоги бисфосфонатов, радикалом которых являются производные пиразола. Исследование посвящено изучению эффективности комбинированного действия синтезированных азотсодержащих бисфосфонатов (пиразолсодержащих аналогов) и витамина D₃ в коррекции нарушений минерального обмена при остеопорозе. Работу выполняли на модели алиментарного остеопороза у крыс, раз-

18. Role of nutritional vitamin D in osteoporosis treatment / Y. C. Hou, C. C. Wu, M. T. Liao et al. // Clin Chim Acta. – 2018. – Vol. 484. – P. 179–191. DOI:10.1016/j.cca.2018.05.035.
19. Bhattarai H.K. Vitamin D, Calcium, Parathyroid Hormone, and Sex Steroids in Bone Health and Effects of Aging / H.K. Bhattarai, S. Shrestha, K. Rokka, R. Shakya // J. Osteoporos. – 2020. – Vol. 2020, N 9324505. 10.1155/2020/9324505.

References

1. Langdahl B.L., Andersen J.D. Treatment of Osteoporosis: Unmet Needs and Emerging Solutions. J. Bone Metab. 2018 Aug; 25(3): 133–140. doi: 10.11005/jbm.2018.25.3.133.
2. Møller A.M.J., Delaissé J.M., Olesen J.B. et al. Aging and menopause reprogram osteoclast precursors for aggressive bone resorption. Bone Res. 2020 Jul 1; 8: 27. doi: 10.1038/s41413-020-0102-7.
3. Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. Eur J Cancer Care (Engl). 2017; 26(6): 10.1111/ecc.12740. doi:10.1111/ecc.12740.
4. Riggs MM, Cremers S. Pharmacometrics and systems pharmacology for metabolic bone diseases. Br. J. Clin. Pharmacol. 2019; 85(6): 1136–1146. doi:10.1111/bcp.13881.
5. Kehoe T., Blind E., Janssen H. Regulatory aspects of the development of drugs for metabolic bone diseases – FDA and EMA perspective. Br. J. Clin. Pharmacol. 2019; 85(6): 1208–1212. doi:10.1111/bcp.13791.
6. Anderson P.H. Vitamin D Activity and Metabolism in Bone. Curr Osteoporosis Rep. 2017 Oct; 15(5):443–449. doi: 10.1007/s11914-017-0394-8.
7. Christakos S., Dhawan P., Verstuyf A. et al. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. Physiol Rev. 2016 Jan; 96(1): 365–408. doi: 10.1152/physrev.00014.2015.
8. Rochel N., Molnár F. Structural aspects of Vitamin D endocrinology. Mol Cell Endocrinol. 2017 Sep 15; 453: 22–35. doi: 10.1016/j.mce.2017.02.046.
9. Dyce B.J., Bessman S.P. A rapid nonenzymatic assay for 2,3-DPG in multiple specimens of blood. Arch Environ Health. 1973 Aug; 27(2): 112–5. doi: 10.1080/00039896.1973.10666331.
10. Riasnyi V.M., Apukhovska L.I., Veliky M.M. et al. Immunomodulatory effects of vitamin D₃ and bisphosphonates in nutritional osteoporosis in rats. Ukr Biokhim Zh. 2012 Mar-Apr; 84(2): 73–80.
11. Plekhanov B. Shchelochynaya fosfataza: sovremennoye sostoyaniye voprosa. Laboratornoye delo. 1989. Vyp. 11. S. 4–7.
12. <http://accelrys.com/products/databases/bioactivity/mddr.htm>.
13. Ivonin, S.P., Kurpil', B.B., Rusanov, E.B. et al. N-Alkylhydrazones of aliphatic ketones in the synthesis of 1,3,4-trisubstituted non-symmetric pyrazoles. Tetrahedron Lett., 55 (14): 2187–2189. doi: 10.1016/j.tetlet.2014.02.058.
14. Carafoli E., Krebs J. Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator. J Biol Chem. 2016; 291(40): 20849–20857. doi:10.1074/jbc.R116.735894.
15. Ray K. Calcium-Sensing Receptor: Trafficking, Endocytosis, Recycling, and Importance of Interacting Proteins. Prog Mol Biol Transl Sci. 2015; 132: 127–150. doi:10.1016/bs.pmbts.2015.02.006.
16. Tang S., Deng X., Jiang J. et al. Design of Calcium-Binding Proteins to Sense Calcium. Molecules. 2020 May 4; 25(9): 2148. doi: 10.3390/molecules25092148.
17. Zhang Y., Fang F., Tang J. et al. Association between vitamin D supplementation and mortality: systematic review and meta-analysis. BMJ. 2019 Aug 12; 366: l4673. doi: 10.1136/bmj.l4673.
18. Hou Y.C., Wu C.C., Liao M.T. et al. Role of nutritional vitamin D in osteoporosis treatment. Clin Chim Acta. 2018; 484: 179–191. doi:10.1016/j.cca.2018.05.035.
19. Bhattarai H.K., Shrestha S., Rokka K. et al. Vitamin D, Calcium, Parathyroid Hormone, and Sex Steroids in Bone Health and Effects of Aging. J Osteoporos. 2020; 2020: 9324505. Published 2020 Jun 17. doi:10.1155/2020/9324505.

Надійшла до редколегії 3.09.2020

Отримано виправлений варіант 5.10.2020

Підписано до друку 5.10.2020

Received in the editorial 3.09.2020

Received a revised version on 5.10.2020

Signed in the press on 5.10.2020

вигляд якого характеризується гіпокальціємією, гіпофосфатемією, зниженням концентрації 25OHD в сировотці крові і вираженою демінералізацією костної тканини. Синтезовані піразолсодержащіє бісфосфонати з різною ефективністю інгібували процес демінералізації (резорбції) костної тканини і улучшали мінеральний обмін у крыс з аліментарною формою остеопороза. Діяльність вибраних сполучень приводило до росту концентрації кальція, неорганічного фосфата і зниженню активності щелочної фосфатази і її ізоензимів в сировотці крові. Також підвищувалась зольність, содержание кальція і фосфора в золе большеберцової кістки, улучшались її остеометрические показателі (длина і товщина проксимального епіметафіза). Но більш ефективним в корекції порушень мінерального обміну при остеопорозі оказалось сочетание піразолсодержащих бісфосфонатів і вітаміна D₃, который нормалізує рівень 25OHD в сировотці крові і забезпечує синтез біологічески активних, гідроксилізованих производних форм холекальциферолу. Согласно результатам работы, самым перспективным для дальнейших исследований является изучение совместного действия вітаміна D₃ з бісфосфонатом ISP-30, как веществом с наиболее высокой биологической эффективностью в регуляции процесса ремоделирования костной ткани, ингибирования резорбции и интенсификации остеогенеза.

Ключевые слова: піразолсодержащіє бісфосфонати, аліментарний остеопороз, мінеральний обмін, вітамін D₃, 25OHD.

M. Veliky, Dr Sci., D. Labudzynski, PhD, O. Lisakovska, PhD, E. Pasichna, Sen. Engin.
Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine,
S. Ivonin, Dr Sci.
Institute of Organic Chemistry of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

COACTION EFFECT OF NEW PYRAZOLE-CONTAINING BISPHOSPHONATES AND VITAMIN D₃ IN EXPERIMENTAL OSTEOPOROSIS

Bisphosphonates remain one of the most effective drugs to treat diseases of the musculoskeletal system. Among a wide range of possible options, the methods of bioinformatic analysis were developed, selected and synthesized analogs of bisphosphonates, the radical of which were selected pyrazole derivatives. The development of new advanced bisphosphonate analogues has broad prospects for medical application. The study is devoted to the investigation of the combined action of synthesized nitrogen-containing bisphosphonates (pyrazole-containing analogues) and vitamin D₃ in the correction of mineral metabolism disturbances in osteoporosis. The work was performed on a rat model of alimentary osteoporosis, which was characterized by the development of hypocalcemia, hypophosphatemia, decreased serum 25OHD concentration and severe bone tissue demineralization. New pyrazole-containing bisphosphonates inhibited the process of bone demineralization (resorption) and improved mineral metabolism in rats with alimentary osteoporosis with varying efficiency. The action of the investigated substances resulted in an increase in the concentration of calcium, inorganic phosphate and a decrease in the activity of alkaline phosphatase and its isoenzymes in the serum. The ash content, calcium and phosphorus level in the ash of the tibia was increased as well, along with improving osteometric characteristics of the tibia (length and thickness of the proximal epimetaphysis). The combination of pyrazole-containing bisphosphonates and vitamin D₃, which normalizes the concentration of 25OHD in the serum and provides the synthesis of biologically active, hydroxylated form of cholecalciferol, has been more effective in the correction of mineral metabolism impairments in rats with alimentary osteoporosis. According to the experimental results, the combination of vitamin D₃ with bisphosphonate ISP-30, as a substance with the highest biological efficiency in regulating bone remodeling, enhancing osteogenesis and inhibition of resorption, is the most promising for further research.

Keywords: pyrazole-containing bisphosphonates, alimentary osteoporosis, mineral metabolism, vitamin D₃, 25OHD.

УДК 535.212-57.083

DOI 10.17721/1728_2748.2020.82.35-41

^{1,2} О. Клімова, д-р біол. наук, ² А. Коробов, канд. фіз.-мат. наук, ^{1,2} К. Биченко, мол. наук. співроб.,
^{1,2} О. Лавінська, канд. біол. наук, ¹ Т. Кордон, канд. біол. наук, ¹ Л. Дроздова, канд. біол. наук
¹ ДУ "Інститут загальної та невідкладної хірургії імені В. Т. Зайцева НАМНУ", Харків, Україна
² Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна

ВПЛИВ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ОПТИЧНОГО ДІАПАЗОНУ СПЕКТРА (λ=630–660 НМ) НА ПОКАЗНИКИ ІМУНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ У ТВАРИН 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ПЕРИТОНИТОМ

Лікування запальних і септичних станів представляє серйозну проблему через існуючу стійкість до антибіотиків. Необхідні нові методи лікування з використанням біологічних і фізичних факторів, що впливають на перебіг запальних реакцій під час хронічних процесів. Важливим є досягнення розуміння механізмів взаємодії світлових фотонів із клітинними акцепторами, які забезпечують реактивність і резистентність.

Мета – оцінити вплив низькоінтенсивного світла червоного спектра (λ = 630–660 нм) на перебіг запального процесу у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом. Було виділено 3 групи: А – інтактні тварини; Б – тварини з перитонітом, викликаним внутрішньочеревинним введенням ЛПС; В – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом після багаторазового впливу червоного світла. Експерименти проводили світлодіодними матрицями Коробов А. В. – Коробов В. В. "Барва-Флекс/24ФМ", які випромінюють у червоній області спектра. Використовували методи світлової мікроскопії (оцінювання бар'єрної функції нейтрофілів у киснегенезі фагоцитозу, визначення ступеня лімфоцитотоксичності) та спектрофотометрії (визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів).

У тварин після індукції перитоніту (група В) спостерігали пригнічення фагоцитозу, яке проявлялося у зниженні адгезії й ендоцитозу антигенів нейтрофілами порівняно з контролем. Використання світлової дії червоного спектра (група С) активувало фагоцитарні клітини і зменшувало ступінь лімфоцитотоксичності і концентрацію циркулюючих імунних комплексів на різних стадіях запального процесу. Отже, дія червоного світла сприяла нормалізації імунорезистентності у тварин, тим самим знижуючи антигенне навантаження за рахунок активації інфільтраційної й ексудаційної стадії запального процесу й індуції регенеративних процесів після повторного опромінення в кінці експерименту.

Ключові слова: запалення, низькоінтенсивне випромінювання, фагоцитоз, цитотоксичність.

Вступ. Нині в багатьох медичних установах із терапевтичною метою застосовують видиме низькоінтенсивне червоне світло [1–3]. Дослідження щодо його впливу свідчать про здатність цього типу випромінювання змінювати функціональний стан тканин та органів, а також впливати на перебіг запальних процесів у організмі [4]. Біологічним компонентом світлової терапії є його здатність впливати на функціональну активність різних імунокомпетентних клітин в осередках запального про-

цесу [5]. За потрапляння світла в клітини-рецептори відбувається складна внутрішньоклітинна реакція, що приводить до активації клітин імунної системи, які різною мірою реагують на різних стадіях запальної реакції [6].

Низькоінтенсивна світлова терапія (НІСТ) відома вже близько половини сторіччя, проте досі не отримала широкого поширення через недостатню з'ясованість молекулярних і клітинних механізмів дії. Відомо, що НІСТ із використанням світлодіодів і лазерів, дає екві-