

ISSN 1561-8331 (Print)

ISSN 2524-2342 (Online)

УДК 577.466 + 615.014

<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-3-314-318>

Поступила в редакцию 14.11.2017

Received 14.11.2017

Д. В. Лопатик¹, Ю. Д. Коваленко², З. И. Куваева¹, Е. А. Манчик¹¹Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь²Белорусский институт системного анализа, Минск, Беларусь**КАЛЬЦИЕВЫЕ СОЛИ АМИНОКИСЛОТ В ЛЕЧЕНИИ ОСТЕОПОРОЗА У ЖИВОТНЫХ**

Аннотация. Описаны результаты исследования лекарственного средства на основе солей аминокислот (кальция диглицинат и кальция ди-L-пролинат) на модели гипоэстрогенного остеопороза животных. Установлено, что исследуемое средство проявляет лучшее терапевтическое действие на регенерацию костной ткани по сравнению с препаратом на основе кальция карбоната. Лекарственное средство, содержащее кальциевые соли глицина и L-пролина, может быть использовано для профилактики и лечения остеопороза.

Ключевые слова: α-аминокислоты, лекарственное средство, кальция диглицинат, кальция ди-L-пролинат, витамин D₃, костная ткань, гипоэстрогенный остеопороз

Для цитирования. Кальциевые соли аминокислот в лечении остеопороза у животных / Д. В. Лопатик [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2018. – Т. 54. – С. 314–318. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-3-314-318>

D. V. Lopatik¹, U. D. Kovalenko², Z. I. Kuvaeva¹, E. A. Manchik¹¹Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Science of Belarus, Minsk, Belarus,²Belarusian Institute of System Analysis, Minsk, Belarus**CALCIUM SALTS OF AMINO ACIDS FOR THE TREATMENT OF OSTEOPOROSIS IN ANIMALS**

Abstract. Results of the study of the drug from calcium salts of amino acids (calcium diglycinate, calcium di-L-proline) on the model of osteoporosis in animals are described. The test substance was found to have better therapeutic effect in the regeneration of bone tissue in comparison with the drug containing calcium carbonate. The drug containing calcium salts of glycine and L-proline can be used for prevention and treatment of osteoporosis.

Keywords: α-amino acids, drug, calcium diglycinate, calcium di-L-proline, vitamin D₃, bone tissue, hypostrogenic osteoporosis

For citation. Lopatik D. V., Kovalenko U. D., Kuvaeva Z. I., Manchik E. A. Calcium salts of amino acids for the treatment of osteoporosis in animals. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2018, vol.54, no. 3, pp. 314–318 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-3-314-318>

Введение. Кальций играет очень важную и многогранную роль в жизнедеятельности животных и человека. Он необходим для образования и сохранения костной ткани. До 99 % содержащегося в организме кальция сосредоточено в костях и зубах. Межклеточное костное вещество содержит соединения кальция вместе с белками (главным образом коллагеном), обеспечивающими твердость и эластичность костей. Особое значение приобретает кальций для организма при возникновении остеопороза – системного заболевания скелета, характеризующегося снижением плотности и нарушением минерального состава костной ткани, приводящих к увеличению хрупкости костей и повышению риска переломов. Остеопороз проявляется болями в пораженных костях, коллапсом позвоночника, переломами позвонков и длинных трубчатых костей, чаще всего дистального отдела костей предплечья и шейки бедренной кости [1]. По данным ВОЗ, это заболевание занимает четвертое место в мире по распространенности среди неинфекционных заболеваний.

После 40 лет у женщин и 50 лет у мужчин костная масса начинает медленно снижаться (1–2 % в год) в результате возрастных нарушений образования костной ткани. При наступлении менопаузы у женщин скорость снижения костной массы значительно увеличивается (от 2–3 до 15 % в год) вследствие недостатка эстрогенов (женских половых гормонов). В конечном итоге, за

несколько лет костная масса снижается до порогового уровня, после чего резко возрастает риск спонтанных переломов. В связи со значительном старением населения во всем мире проблема профилактики и лечения остеопороза является чрезвычайно актуальной.

Для профилактики и лечения остеопороза организм нуждается в достаточном поступлении в него кальция и витамина D₃. В качестве терапевтических средств назначаются препараты, содержащие в своем составе кальция карбонат и кальция цитрат – Кальцемин (США), Кальцевид (Палестина), Кальций D₃ Никомед (Норвегия), Кальций-D₃-МИК и др.

Проблема получения новых соединений кальция, обладающих лучшей биоусвояемостью по сравнению с препаратами на основе кальция карбоната и более эффективно выполняющих свою роль, остается острой до настоящего времени. Одним из путей решения этой проблемы может быть получение кальциевых солей аминокислот. Об этом свидетельствует появление ряда сообщений о новых лекарственных средствах и БАДов на основе аминокислотных соединений. Запатентована многокомпонентная композиция для лечения болезней суставов и остеопороза, содержащая соли кальция с лизином и глицином [2]. В последнее время на фармацевтическом рынке появился новый эффективный канадский препарат для лечения остеопороза «Бил-кальций» (Bul-calcium), представляющий собой хелатное соединение кальция и L-аспарагиновой кислоты.

Известно, что аминокислоты могут образовывать с ионами металлов как соли, так и хелатные соединения [3]. Эта особенность обусловлена тем, что аминокислоты относятся к бидентным лигандам, образующим хелатные комплексы с рядом металлов. Благодаря наличию циклических фрагментов, хелатные соединения значительно более устойчивы по сравнению с обычными солями. Они обладают уникальными физическими, химическими и биологическими свойствами, что приводит к повышению их биоусвояемости растениями и животными.

Ранее мы уже сообщали о получении кальциевых солей аминокислот – кальция диглицината и кальция ди-L-пролината. При изучении их структуры было установлено, что полученные кальциевые соли частично образуют хелатные формы как в твердом виде, так и в водном растворе [4]. Эти соли были использованы нами для получения лекарственного средства для лечения и профилактики остеопороза.

Выбор указанных аминокислот для представленного исследования был обусловлен тем, что основная белковая составляющая костной ткани – коллаген – представляет собой полипептид из остатков 18 основных аминокислот, при этом доминирующими являются две аминокислоты: глицин и L-пролин. Логично предположить, что эти две аминокислоты могут служить не только носителями элементарного кальция, а также оказывать благотворное влияние на восстановление пораженных частей костных тканей.

Цель исследования – изучение нового лекарственного средства, содержащего в качестве активных веществ кальция диглицинат и кальция ди-L-пролинат, при использовании его для профилактики и лечения остеопороза.

Материалы и методы исследования. В состав разработанного средства для профилактики и комплексной терапии остеопороза входят холекальциферол витамин D₃ (ТУ 64-7-223-83 витамин D₃), кальция диглицинат (ФСП РБ 0980-11, кальция глицинат, субстанция 1,0, 2,0 кг в двухслойных мешках), кальция ди-L-пролинат (ФСП РБ 0981-11, кальция пролинат, субстанция 1,0, 2,0 кг в двухслойных мешках) и вспомогательные вещества при следующем соотношении компонентов, мас. %: холекальциферол (100 000 МЕ/г) – 0,15; кальция диглицинат, кальция ди-L-пролинат или их смесь в соотношении (0,5–1,5):(0,5–1,5) – 74,00; вспомогательные вещества – 25,85.

В качестве вспомогательных веществ используются приемлемые фармацевтические вещества: кальция цитрат (ТУ ВУ 100185198.107-2009 трикальций диглицинат 4-водный), кальция стеарат (ТУ 6-09-4233-76 кальций стеариновокислый), крахмал (ГОСТ Р 53876-2010 крахмал картофельный).

Карбоксианионы глицина и L-пролина, находящиеся в указанном средстве, являются самостоятельно действующими фармакологическими агентами, а не только носителями элементарного кальция. Содержание карбоксианиона глицина и элементарного кальция в 100 г кальция диглицината безводного составляет 80,6 и 19,4 г соответственно, а в 100 г кальция ди-L-пролината – карбоксианиона L-пролина 86,8 г и элементарного кальция 13,2 г.

Исследование антирезорбтивного действия разработанного средства проводили с использованием модели гипоестрогенного остеопороза, являющегося наиболее адекватной экспериментальной моделью постменопаузального остеопороза [5, 6]. На доклиническом этапе оценка специфического действия исследуемого средства проводилась на шести группах животных, каждая численностью по 24 особи белых половозрелых беспородных крыс-самок массой 200–240 г стадной разводки вивария ЦНИЛ БелМАПО. У крыс опытных групп и группы сравнения (референтной) путем хирургического удаления обоих яичников моделировался гипоестрогенный остеопороз.

Результаты и их обсуждение. По данным лабораторных и инструментальных исследований через три месяца после операции у всех животных, подвергнутых овариоэктомию, было подтверждено наличие остеопороза: уменьшилась толщина кортикальной пластинки бедренной кости задней лапы и площадь костных балок губчатой части кости, снизились минеральная плотность костной ткани и содержание элементарного кальция в сухом остатке кости.

Через три месяца после овариоэктомию на животных проводили изучение влияния композиций, составляющих основу средства для профилактики и комплексной терапии остеопороза, остеопении и их осложнений. Изучению подверглись животные трех опытных групп, а также референтная группа животных, которой вводили препарат сравнения Кальций-Д₃ Никомед Форте.

Критериями оценки эффективности исследуемых лекарственных средств служили: минеральная плотность костной ткани по данным денситометрии; данные гистоморфометрии костных микропрепаратов; данные биохимических исследований минерального состава костной ткани, гормонального состава крови, специфических регуляторов минерального обмена.

Пример 1 (1-я опытная группа животных). После овариоэктомию животным этой группы ежедневно в течение двух месяцев внутрижелудочно вводили холекальциферол – суточная доза холекальциферола составляла 2,3 МЕ на 100 г массы тела, поступление элементарного кальция в суточной дозе 2,0 мг на 100 г массы тела обеспечивалось внутрижелудочным введением кальциевой соли α -аминокислоты – кальция диглицината. После перерыва продолжительностью в один месяц двухмесячный курс введения препарата повторяли еще один раз.

Пример 2 (2-я опытная группа животных). Аналогично описанному в примере 1, только в качестве кальциевой соли α -аминокислоты подопытным животным вводили кальция ди-L-пролинат.

Пример 3 (3-я опытная группа животных). Аналогично описанному в примере 1, только в качестве кальциевой соли α -аминокислоты подопытным животным вводили смесь кальция диглицината и кальция ди-L-пролинат в соотношении 1:1.

Пример 4 (референтная группа животных) для сравнения. Животным этой группы ежедневно в течение двух месяцев внутрижелудочно вводили препарат сравнения Кальций-Д₃ Никомед Форте в дозе, обеспечивающей суточное поступление, 2,3 МЕ холекальциферола и 2,8 мг элементарного кальция на 100 г массы тела подопытного животного. После перерыва продолжительностью в один месяц двухмесячный курс введения препарата повторяли еще один раз. Режим и способ введения испытуемых средств у всех четырех группах был одинаковый.

У животных 1–3 опытных групп обеспечивалось одинаковое в сравнении с животными референтной группы поступление холекальциферола, но меньшее на $\frac{1}{4}$ поступление элементарного кальция, однако дополнительно им скармливались доминирующие аминокислоты коллагена глицин и L-пролин.

Сравнительная оценка специфического действия композиций на основе холекальциферола, кальция диглицината, кальция ди-L-пролината или смеси обеих солей проводилась на основе анализа данных, напрямую характеризующих качество костной ткани: морфометрия микропрепаратов бедренной кости задней лапы (толщина кортикальной пластинки и площадь костных балок губчатой части кости) с использованием результатов атомно-эмиссионной спектрометрии содержания кальция в костных препаратах и ДРА-денситометрия костей головы. Результаты исследований приведены в таблице.

Все полученные данные лабораторных и инструментальных исследований были обработаны статистически с использованием методов вариационной статистики, адекватных объемам выборки. Из приведенных результатов видно, что по завершении приема испытуемых лекарственных средств у животных всех трех опытных групп, получавших кальциевые соли глицина и L-пролина, показатели всех тестов свидетельствовали о выраженном улучшении качества костной тка-

Результаты лабораторных и инструментальных тестов специфического действия сравнимых лекарственных средств

Results of laboratory and instrumental tests of the specific action of the compared medicinal agents

Наименование теста, единицы измерения	Группы наблюдения, наименование испытуемого лекарственного средства и значения показателей ($\bar{X} \pm Sx$)					
	группа интактных животных	плацебо	кальция диглицинат + D_3 Пример 1	кальция ди-L-пролинат + D_3 Пример 2	кальция глицинат и кальция ди-L-пролинат (1:1) + D_3 Пример 3	кальций- D_3 Никомед Форте Пример 4
Толщина костной кортикальной пластинки, мм	0,52±0,016	0,40±0,004 + /	0,49±0,008 + /+ /+ (1)	0,44±0,007 + /+ /-	0,48±0,007 + /+ /+	0,42±0,004 + /+ /
Площадь костных балок в губчатой кости, %	26,1±1,0	13,8±0,5 + /	16,0±0,6 + /+ /-	17,6±0,4 + /+ /+ (1)	16,0±0,5 + /+ /-	14,7±0,5 + / - /
Минеральная плотность костной ткани, г/см ²	0,55±0,007	0,50±0,006 + /	0,54±0,007 + /+ /+ (1)	0,54±0,008 + /+ /+	0,53±0,007 + /+ /-	0,52±0,007 + / - /
Содержание Са в сухом остатке кости, г/кг	284±6,4	192±7,0 + /	229±11,0 + /+ /-	282±8,0 + /+ /+ (1)	242±11,0 + /+ /-	240±10,2 + /+ /

Примечания: +/ наличие или -/ отсутствие достоверных различий ($P < 0,05$) с показателями группы интактных животных; /+ наличие или /- отсутствие достоверных различий с показателями группы животных с гипострогенным остеопорозом, получавших «плацебо»; / /+ наличие или / /- отсутствие достоверных различий с показателями группы животных с гипострогенным остеопорозом, получавших препарат сравнения Кальций- D_3 Никомед Форте; (1) – наилучший показатель по тесту у животных, получавших препарат на основе кальция диглицината, кальция ди-L-пролината или смеси этих солей.

ни в сравнении с группой животных, получавших плацебо. У животных референтной группы, получавших препарат сравнения Кальций- D_3 Никомед Форте, прирост площади костных балок и минеральной плотности кости оказался недостаточным для признания его статистически достоверным. При сравнении данных лабораторного и инструментального мониторинга животных референтной группы с данными мониторинга трех опытных групп оказалось, что по каждому из тестов, свидетельствующих об улучшении качества костной ткани, наилучшие показатели были в группах, получавших препарат на основе кальция диглицината и кальция ди-L-пролината.

Разработанное новое лекарственное средство, содержащее в качестве активного вещества кальциевые соли глицина и L-пролина, предназначено для профилактики и лечения остеопороза [7]. Указанное лекарственное средство запатентовано в Республике Беларусь [8].

Вывод. Доклинические исследования специфического действия фармацевтических композиций на основе кальция диглицината, кальция ди-L-пролината или их смеси показали, что наличие в составе лекарственного средства анионов глицина и L-пролина в сочетании с витамином D_3 обеспечивает более выраженное терапевтическое действие даже при меньшем содержании элементарного кальция в составе лекарственного средства по отношению к препарату сравнения Кальций- D_3 Никомед Форте.

Список использованных источников

1. Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика, профилактика и лечение / Н.А. Корж [и др.]. – Харьков: Золотые страницы, 2002. – 648 с.
2. Composition for the treatment and/or the prevention and/or inflammatory joint diseases: pat. EP 1286667 A2 : WO2001091734A2 / Н. Buchholz, J. Meduski, M. Frohne; publ. date: 05.03.2003.
3. Greenstein, J.P. Chemistry of the Amino Acids / J.P. Greenstein, M. Winitz. – New York: Wiley, 1961. – Vol. 3. – P. 569–573, 647.
4. Кальциевые соли глицина и L-пролина / З.И. Куваева [и др.]. // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2011. – №3. – С. 94–98.
5. Поворознюк, В.В. Менопауза и костно-мышечная система / В.В. Поворознюк, Н.В. Григорьева. – Киев: Экспресс, 2004. – 512 с.
6. Поворознюк, В.В. Экспериментальный остеопороз / В.В. Поворознюк [и др.]. – Киев, 2012. – 228 с.
7. Разработка состава и технологии таблеток аминокальцид для профилактики и лечения остеопороза / С.Э. Ржеусский [и др.]. // Вестн. Витеб. гос. мед. ун-та. – 2010. – Т. 9, №3. – С. 183–190.
8. Средство для профилактики или комплексной терапии остеопороза: пат. 15346 Респ. Беларусь / Ю.Д. Коваленко, В. В. Кугач, Д. В. Лопатик, Т. А. Николаева, С. Э. Ржеусский, Э. В. Руденко; дата публ. 28.02.2012.

References

1. Korzh N. A., Povoroznyuk V. V., Dedukh N. V., Zupanets I. A. *Osteoporosis: epidemiology, clinic, diagnosis, prevention and treatment*. Kharkov, Zolotye stranitsy Publ., 2002. 648 p. (in Russian).
2. Buchholz H., Meduski J., Frohne. *Composition for the treatment and/or the prevention and/or inflammatory joint diseases*. Patent no. EP 1286667 A2 : WO2001091734A2, 2003.
3. Greenstein J. P., Winitz M. *Chemistry of the Amino Acids*. Vol. 3. New York, Wiley, 1961, pp. 569–573, 647.
4. Kuvaeva Z. I., Lopatik D. V., Nikolaeva T. A., Pushkarchuk A. L. Calcium salts of glycine and L-proline. *Vestsi Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2011, vol. 3, pp. 94–98 (in Russian).
5. Povoroznyuk V. V., Grigoryeva N. V. *Menopause and Musculoskeletal System*. Kiev, Express Publ., 2004. 512 p. (in Russian).
6. Povoroznyuk V. V., Dedukh N. V., Grigoriev N. V., Kopcanova I. V. *Experimental osteoporosis*. Kiev, 2012. 228 p. (in Russian).
7. Rzheussky S. E., Kugach V. V., Tarasyuk I. V., Sivakov A. A. Development of composition and technology of tablets aminocell for the prevention and treatment of osteoporosis. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Vestnik of Vitebsk State Medical University*, 2010, vol. 9, no. 3, pp. 183–190 (in Russian).
8. Kovalenko Yu. D., Kugach V. V., Lopatin D. V., Nikolaeva T. A., Rzewski S. E., Rudenko E. V. *Agent for the prevention or treatment of osteoporosis*. Patent Republic of Belarus no. 15346, 2012 (in Russian).

Информация об авторах

Лопатик Дина Владимировна – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, Институт физико-органической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: aminoacid@ifoch.bas-net.by

Коваленко Юрий Дмитриевич – канд. мед. наук, зав. сектором, Белорусский институт системного анализа (пр. Победителей, 7, 220004, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kovalenko@belisa.org.by

Куваева Зоя Ивановна – доктор, хим. наук, профессор, зав. отделом, Институт физико-органической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: extract@ifoch.bas-net.by

Манчик Екатерина Александровна – мл. науч. сотрудник, Институт физико-органической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: aminoacid@ifoch.bas-net.by

Information about the authors

Dina V. Lopatik – Ph. D. (Chemistry), Senior researcher, Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aminoacid@ifoch.bas-net.by

Uryi D Kovalenko – Ph. D. (Medicine), Head of the Department, Belarusian Institute of System Analysis (7, Pobeditelei Ave., 220004, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kovalenko@belisa.org.by

Zoya I. Kuvaeva – D. Sc. (Chemistry), Professor, Head of the Department, Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: extract@ifoch.bas-net.by

Ekaterina A. Manchik – Junior researcher, Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aminoacid@ifoch.bas-net.by