

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 616.71-007.234:547.771:577.161.2
DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2020.v.i3.11513

С. В. Комісаренко¹, В. М. Василевська¹, С. П. Івонін², О. О. Лісаковська¹,
Д. О. Лабудзинський¹, І. О. Шиманський¹, А. О. Мазанова¹, Д. М. Волочнюк², М. М. Великий¹
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О. В. ПАЛЛАДИНА НАН УКРАЇНИ¹, КИЇВ
ІНСТИТУТ ОРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ НАН УКРАЇНИ², КИЇВ

ПОЄДНАНА ДІЯ ПІРАЗОЛОВМІСНИХ БІСФОСФОНАТІВ І ВІТАМІНУ D₃ У КОРЕКЦІЇ ПОРУШЕНЬ МІНЕРАЛЬНОГО ОБМІНУ ЗА АЛІМЕНТАРНОГО ОСТЕОПОРОЗУ В ЩУРІВ

Вступ. За даними ВООЗ, остеопороз займає чільне місце серед усіх відомих захворювань як причина передчасної інвалідності та смертності у світі, а тому розробка ефективної стратегії лікування цього захворювання є одним із пріоритетних напрямків досліджень для наукових та медичних інституцій. До таких підходів належать розробка нових сучасних нітрогеновмісних бісфосфонатів та дослідження їх терапевтичних ефектів на тваринних моделях.

Мета дослідження – вивчити ефективність поєднаної дії синтезованих нітрогеновмісних бісфосфонатів (піразоловмісних аналогів), які пригнічують активність остеокластів та зменшують резорбцію кісткової тканини, і вітаміну D₃, що є основним регулятором процесу ремоделювання кісткової тканини й активатором остеогенезу, в корекції порушень мінерального обміну за остеопорозу.

Методи дослідження. Біологічну ефективність синтезованих піразоловмісних бісфосфонатів досліджували на щурах-самицях лінії Вістар (вік – 1 місяць, вихідна маса – (90±5) г). Аліментарний остеопороз викликали шляхом утримання тварин протягом 30-ти днів на D-гіповітамінозному раціоні відповідно до ДСТУ 11222-65, збалансованому за вмістом кальцію та фосфору. Як коригувальні сполуки використовували per os піразоловмісні бісфосфонати (1,7 мг/кг) та холекальциферол (400 МО/кг маси тіла). 25-Гідроксिवітамін D у сироватці крові досліджували методом ELISA. Кількісний аналіз компонентів мінерального обміну в сироватці крові та кістковій тканині проводили за допомогою загальноприйнятих біохімічних методів.

Результати й обговорення. Досліджувані піразоловмісні бісфосфонати з різною ефективністю гальмували процес демінералізації (резорбції) кісткової тканини та посилювали мінеральний обмін у щурів з аліментарною формою остеопорозу. За дії препаратів зростав вміст кальцію, неорганічного фосфату і знижувалась активність лужної фосфатази та її ізоензимів у сироватці крові. Підвищувались зольність і вміст кальцію та фосфору в золі великогомілкової кістки. Найефективнішим у корекції порушень мінерального обміну за остеопорозу виявилось поєднання піразоловмісних бісфосфонатів і вітаміну D₃, який нормалізує вміст 25-гідроксिवітаміну D у сироватці крові та забезпечує синтез біологічно активних, гідроксильованих форм холекальциферолу.

Висновок. Перспективним для подальших досліджень є вивчення сумісної дії вітаміну D₃ і бісфосфонату І-12 як препарату з найвищою біологічною ефективністю щодо посилення процесу ремоделювання кісткової тканини завдяки поєднанню процесів резорбції та формування кістки.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: піразоловмісні бісфосфонати; аліментарний остеопороз; мінеральний обмін; вітамін D₃; 25-гідроксिवітамін D.

ВСТУП. Процес ремоделювання кісткової тканини за нормальних фізіологічних умов забезпечує узгодження інтенсивності резорбції та формування кістки, а при патологічних станах – відновлення її ушкоджень і підтримання гомеостазу мінеральних компонентів. Під час ремоделювання стара кісткова тканина видаляється остеокластами (завершально диференційованими поліядерними мієлоїдними клітинами, які унікально адаптовані до видалення мінерального матриксу кістки) і заміщається новою з

© С. В. Комісаренко, В. М. Василевська, С. П. Івонін, О. О. Лісаковська, Д. О. Лабудзинський, І. О. Шиманський, А. О. Мазанова, Д. М. Волочнюк, М. М. Великий, 2020.

участю остеобластів (клітин, що формують кістку), які розвиваються з плюрипотентних мезенхімальних стовбурових клітин, експресують остеокластогенні фактори, протеїни матриксу та здійснюють мінералізацію [1, 2].

Втрата маси кісткової тканини є основною причиною більшості захворювань скелета. Остеопороз, як метаболічне захворювання кісткової тканини, супроводжується порушенням узгодженості ремоделювання, переважанням остеокластозалежної резорбції кістки над її остеобластопосередкованим формуванням і мінералізацією, що призводить до втрати щільності,

порушень мікро- та макроструктури кісток і, зрештою, до зростання ризику переломів [3]. Засобами, які здатні загальмувати втрату кісткової маси за рахунок пригнічення резорбції кісткової тканини, вважають кальцій, естрогени, кальцитонін, бісфосфонати і вітамін D₃ [4].

Препаратами першої ланки захисту за остеопорозу є бісфосфонати – синтетичні стабільні аналоги неорганічного пірофосфату. Їх широко застосовують у терапії метаболічних порушень кісткової тканини, таких, як постменопаузальний і глюкокортикоїдіндукований остеопороз, хвороба Педжета, асоційована із запаленням втрата кісткової тканини, а також для прискорення репарацій переломів [5, 6]. У пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями бісфосфонати зменшують метастазування кісток, гальмуючи ріст пухлин та проникнення пухлинних клітин у позаклітинний матрикс [7–9]. Бісфосфонати селективно поглинаються остеокластами кісткового матриксу і викликають їх морфологічні зміни (втрачається гофрована навколишня кайма і руйнується актин), що призводить до пригнічення резорбтивної активності та зменшення розпаду гідроксіапатиту. В кістковому мозку вони індукують апоптоз макрофагів та пригнічують залучення і диференціювання попередників остеокластів завдяки посиленому продукуванню остеобластами протеїнових інгібіторних факторів, що гальмують остеокластогенез [10, 11].

Розрізняють 2 великі групи бісфосфонатів відповідно до їх хімічної структури та молекулярних механізмів дії на клітини кісткової тканини. Бісфосфонати, що не містять у своєму складі нітрогену (етидронат, клодронат, тилудронат), завдяки структурній подібності до неорганічного пірофосфату, приєднуючись до аденозинмонофосфату, утворюють не здатні до гідролізу аналоги АТФ та інгібують численні АТФ-залежні процеси в клітинах, що призводить до апоптозу остеокластів. Нітрогеновмісні бісфосфонати (алендронат, ризедронат, ібандронат, золедронат), завдяки структурній подібності до субстрату, інгібують активність пренілтрансфераз – геранілпірофосфат-синтази і фарнезилпірофосфат-синтази, що значно зменшує утворення фарнезилпірофосфату та геранілгеранілпірофосфату – сполук, необхідних для пренілювання (ізопентенілювання) малих сигнальних G-протеїнів (Rho, Ras, Rac, cdc 42). Така посттрансляційна ковалентна модифікація сигнальних G-протеїнів є передумовою нормального функціонування та міжклітинних взаємодій остеокластів. Зокрема, приєднання ліпідних (ізопреноїдних) хвостів до сигнальних молекул забезпечує їх участь у регулюванні специфічних функцій остеокластів, таких, як кінцеві стадії диферен-

ціювання, приєднання, ендоцитоз, підтримання форми клітин та апоптоз [12, 13]. Бісфосфонати ефективно пригнічують процес демінералізації кісткової тканини, нормалізують мінеральний обмін, але суттєво не впливають на заміщення кісткової тканини.

У процесі ремоделювання важливими медіаторами активності остеокластів є протеїни остеоцитокінової системи: остеопротегерин (OPG), рецептор-активатор ядерного фактора транскрипції κB – NF-κB (RANK) та його ліганд (RANKL). Процес резорбції кістки стимулюється завдяки посиленому утворенню RANKL клітинами остеобластного ряду. Зв'язування RANKL з його рецептором RANK активує NF-κB-залежний внутрішньоклітинний сигнальний шлях індукції генів остеокластогенезу та посилює резорбцію. Остеопротегерин діє як рецептор-пастка, що не дає ліганду RANKL зв'язуватись із RANK [14]. Найбільш потужними медіаторами активності остеобластів є: протеїни LRP 5/6 (подібні до рецепторів ліпопротеїнів низької щільності), склеростин та остеокальцин, залучені в канонічний Wnt(wingless-type)/β-катеніновий сигнальний шлях диференціювання остеобластів. Фактори, що активують LRP 5/6, стимулюють формування кістки та гальмують її резорбцію. Склеростин – глікопротеїн, що синтезується остеоцитами, є негативним регулятором формування кістки, оскільки, зв'язуючись із LRP5, блокує Wnt-сигнальний шлях та гальмує диференціювання остеобластів. Гормони (паратиреоїдний гормон, естрогени, глюкокортикоїди), фактори росту (TGF-β, IGF-1, BMP2), цитокіни (IL-1, IL-6, TNF-α, простагландини E2) та лікарські засоби здатні впливати на експресію протеїнів остеоцитокінової системи RANKL/RANK/OPG і, тим самим, на оновлюваність кістки [15, 16].

Ключову роль у процесі остеогенезу відіграє гормонально активна форма вітаміну D₃ – 1,25(OH)₂D₃ [17]. Біологічні ефекти 1,25(OH)₂D₃ опосередковуються рецепторами вітаміну D₃ (VDR), що належать до родини ядерних рецепторів стероїдних гормонів та мають класичну доменну структуру. Утворений комплекс 1,25(OH)₂D₃ – VDR проникає в ядро клітини та зв'язується з X-рецептором ретиноєвої кислоти (RXR). Конформаційні зміни VDR при зв'язуванні з лігандом забезпечують гетеродимеризацію з ретиноїдними X-рецепторами, і комплекс 1,25(OH)₂D₃ – VDR/RXR взаємодіє з консенсусною послідовністю промоторної ділянки гена-мішені, відомою як елементи відповіді на вітамін D₃ (vitamin D-responsive elements) (VDRE). Приєднання комплексу 1,25(OH)₂D₃ – VDR/RXR до VDRE індукує утворення значної кількості протеїнів-коактиваторів, які формують мультипро-

теїновий коактиваторний комплекс. Коактиватори індують ремоделювання хроматину та регулюють активність промоторів з участю компонентів ініціації транскрипції. Таким чином, VDR функціонують як лігандактивовані транскрипційні фактори, що, зв'язуючись зі специфічними послідовностями ДНК у вітамін D₃-регульованих генах, змінюють швидкість їх транскрипції РНК-полімеразою II та синтез протеїнів остеоцитокінової системи RANKL/RANK/OPG [18, 19].

Мета дослідження – вивчити ефективність поєднаної дії синтезованих нітрогеновмісних бісфосфонатів (піразоловмісних аналогів), які пригнічують активність остеокластів та зменшують резорбцію кісткової тканини, і вітаміну D₃, що є основним регулятором процесу ремоделювання кісткової тканини й активатором остеогенезу, в корекції порушень мінерального обміну за остеопорозу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Розробкою підходів, дизайном і синтезом нітрогеновмісних бісфосфонатів (піразоловмісних аналогів) займалися співробітники Інституту органічної хімії НАН України, які є співавторами цієї статті.

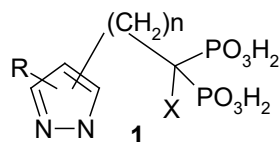
Біологічну ефективність синтезованих піразоловмісних бісфосфонатів досліджували на щурах-самичках лінії Вістар (вік – 1 місяць, вихідна маса – (90±5) г). Аліментарний остеопороз викликали шляхом утримання тварин протягом 30-ти діб на D-гіповітамінозному раціоні відповідно до ДСТУ 11222-65, збалансованому за вмістом кальцію та фосфору (вміст кальцію – 1,2 %, фосфору – 0,8 %, співвідношення Ca²⁺/P – 1,5). Піддослідним тваринам через 30 діб перебування на D-гіповітамінозному раціоні вводили препарати протягом наступних 30-ти діб один раз на добу внутрішньошлунково об'ємом 0,1 мл за допомогою зонда. Контрольні тварини одержували повноцінний раціон віварію. Усі маніпуляції зі щурами виконували під легким ефірним наркозом. Досліджувані бісфосфонати I-12, I-40 та I-42 вводили *per os* із розрахунку 1,7 мг/кг маси тіла у вигляді водної суспензії, вітамін D₃ (холекальциферол, "Sigma") – у вигляді масляної суспензії (400 МО/кг маси тіла).

Забезпеченість організму вітаміном D₃ оцінювали за вмістом 25-гідроксивітаміну D (25OHD) у сироватці крові, який визначали методом імуноензимного аналізу згідно з протоколом для використання набору 25-Hydroxy Vitamin D EIA (IDS, США). Реєстрували сигнал на автоматичному мікропланшетному рідері (Sinnova ER-500 (BiORad)) при довжині хвилі 450 нм. Рівень кальцію у сироватці крові визначали за допомогою біотест-набору (ЛАХЕМА, Чехія), стандартний розчин містив 25 мМ CaCO₃, розчиненого в

1,7 % HCl. Вміст неорганічного фосфату визначали після осадження протеїнів 12 % розчином трихлороцтової кислоти за методом Дусе [20]. Загальну активність лужної фосфатази визначали за допомогою біотест-наборів (ЛАХЕМА, Чехія). Визначали активність ізоензимів лужної фосфатази, а саме: кісткової термолабільної ізоформи – після інкубації проб при 55 °С, кишкової ізоформи – з використанням L-фенілаланіну як інгібітора [21, 22].

Зольність кісткової тканини визначали методом сухої мінералізації при температурі 500–600 °С після її обезжирювання гексаном протягом 7-ми діб і розраховували відносно маси кісткової тканини. Вміст мінеральних компонентів у золі визначали вищеописаними методами після розчинення золи в 0,5 мл 1 N 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 Стьюдента, достовірними вважали відмінності при *p*<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Проведений аналіз бази даних MDDR засвідчив відсутність похідних піразолу серед відомих нітрогеновмісних бісфосфонатів [23]. Тому, враховуючи ймовірність існування 6-ти топологічно можливих ізомерів піразоловмісних бісфосфонатів (формули 2–7 на рис. 1) загальної формули Маркуша (формула 1 на рис. 1), співробітники Інституту органічної хімії НАН України на основі експериментальних досліджень розробили нові підходи і препаративні методи синтезу 4-R-1,3-діалкілпіразолів та піразоловмісних гідроксибісфосфонатів, які складаються з послідовних перетворень відповідних піразоловмісних карбонових кислот в їх хлорангідриди з подальшою взаємодією з трис(триметилсиліл)фосфітом і гідроксильними аліфатичними сполуками [24]. Згідно з останніми тенденціями лід-орієнтованого синтезу, віртуальна бібліотека бісфосфонатів складається з 1777 представників. Подальший віртуальний скринінг отриманої віртуальної бібліотеки передбачав порівняння амінокислотних послідовностей та ідентичності сайтів зв'язування протеїнів-ензимів FPPS людини, миші й щура. На основі результатів докінг-досліджень виокремлено групу найбільш перспективних представників з різною довжиною лінкера, що зв'язує бісфосфонатний фрагмент з піразольним ядром (лінкер приєднувався до атома нітрогену або карбону піразолу). В результаті було синтезовано бісфосфонати I-12, I-40 та I-42 і вивчено



R = Alk, Ar, Heter
 X = H, OH, F
 n = 0-3

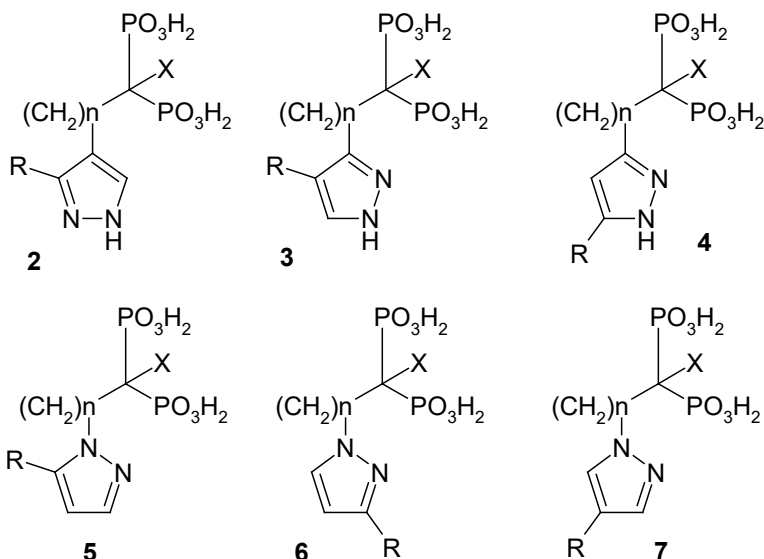


Рис. 1. Топологічно можливі ізомери піразоловмісних бісфосфонатів (формули 2–7) загальної формули Маркуша (1).

їх біологічну ефективність як потенційних лікарських засобів, що нормалізують мінеральний обмін та гальмують розвиток експериментального аліментарного остеопорозу.

Біологічну ефективність синтезованих піразоловмісних бісфосфонатів досліджували на моделі аліментарного остеопорозу в щурів, для якої характерні системні патологічні зміни, зокрема спостерігають виражену гіпокальціємію, гіпофосфатемію і зростання у сироватці крові загальної активності лужної фосфатази – біомаркера стану мінералізації кісткової тканини [21]. Як раніше було продемонстровано, розвиток остеопорозу в молодих щурів зумовлював сповільнення росту кісток, порушення структури компактної кісткової тканини й епіфізарного хряща, зменшення маси і зольності великогомілкової кістки, зниження вмісту в ній мінеральних компонентів та послаблення клітинної ланки імунітету (зменшення кількості й гальмування фагоцитарної активності гранулоцитів і моноцитів) [21, 25].

Підтримання сталої позаклітинної та внутрішньоклітинної концентрації кальцію у вузьких фізіологічних межах (гомеостаз кальцію в організмі) забезпечується узгодженим функціонуванням ряду контролювальних механізмів. Так, позаклітинний іонізований кальцій є первинним

месенджером, оскільки слугує лігандом для мембранних кальцієвих рецепторів, спряжених з G-протеїном (GPCR – G-protein-coupled receptor). Ці рецептори називають кальцієвими, вони містять центр зв'язування Ca^{2+} (CaSR – calcium-sensing receptor) [26]. Головна функція CaSR полягає в підтриманні гомеостазу Ca^{2+} через узгодженість процесів абсорбції кальцію з гастроінтестинального тракту, екскреції нирками, вивільнення та акумулявання кістковою тканиною. На молекулярному рівні CaSR разом із метаботропними глутаматними рецепторами та іншими кальцієзв'язувальними протеїнами мембрани через G-протеїни (після зв'язування Ca^{2+}) запускають ефекторний внутрішньоклітинний сигнальний каскад [27]. Критичну роль у внутрішньоклітинній трансдукції молекулярного сигналу відіграють цитоплазматичні кальцієзв'язувальні протеїни, особливо кальмодулін. Реагуючи на мінімальні зміни концентрації кальцію в цитоплазмі, кальмодулін регулює функціональну активність понад 300 різних ферментів, рецепторів та іонних каналів, включаючи ріанодинові рецептори й IP₃-рецептор ендоплазматичного ретикула [28]. Іони внутрішньоклітинного пулу кальцію, які беруть участь у реалізації сигнальних функцій зазначених кальцієзв'язувальних регуляторних протеїнів, виконують функцію

вторинного месенджера. Злагоджена робота CaSR та кальмодуліноподібних протеїнів зумовлює послідовність передачі кальцієвого сигналіngu від змін концентрації позаклітинного Ca²⁺ на внутрішньоклітинні системи сигналіngu, що є дуже важливим для забезпечення фізіологічної відповіді. Безпосереднє регулювання рівня позаклітинного кальцію здійснюють паратиреоїдний гормон, вітамін D₃ і кальцитонін [29], що можуть слугувати дієвими важелями впливу на мінеральний обмін у кістковому матриксі за умов патології.

Введення щурам на тлі остеопорозу досліджуваних синтезованих піразоловмісних бісфосфонатів суттєво покращувало стан мінерального обміну. Рівень загального кальцію як інтегрального показника забезпеченості організму мінеральними компонентами, який знижувався у сироватці крові на 29,5 % за аліментарного остеопорозу, зростав при введенні експериментальним тваринам досліджуваних бісфосфонатів. Зокрема, при застосуванні бісфосфонату І-12 вміст кальцію збільшувався на 22,8 %, бісфосфонату І-40 – на 7,6 %, бісфосфонату І-42 – на 8,2 % порівняно з остеопорозом (табл. 1). Необхідно зазначити, що виявлені зміни рівня кальцію у сироватці крові відбувалися в основному за рахунок фракції іонізованого (ультрафільтрувального) кальцію, відносний вміст якого у контрольній групі становив 91,0 %. Рівень іонізованого кальцію підвищувався за дії бісфосфонату І-12 на 27,1 %, бісфосфонату І-40 – на 10,1 %, бісфосфонату І-42 – на 10,7 % порівняно з остеопорозом (табл. 1).

Досліджувані бісфосфонати суттєво не впливали на вміст фракції протеїнозв'язаного кальцію. Відомо, що кальцій у сироватці крові представлений декількома функціональними формами. Зокрема, невелика його частина зв'язана з протеїнами (альбуміном і глобулінами), тоді як більшість кальцію перебуває в ультрафільтрувальній формі, що об'єднує іонізований (до 85,0 %) та хелатований (до 15,0 %) із цитратом, фосфатами і бікарбонатом кальцій. Співвідношення між формами кальцію змінюється за різних фізіологічних станів організму та є показником розвитку певної патології [4]. Виявлене зниження співвідношення ультрафільтрувальної форми до протеїнозв'язаної з 10,2 у контрольній групі до 7,8 за остеопорозу свідчить про виражене порушення мінерального обміну. Досліджувані бісфосфонати певною мірою нормалізували мінеральний обмін, однак вміст кальцію та його функціональних форм у сироватці крові не досягав значень, характерних для контрольних тварин.

Гіпокальціємія за остеопорозу супроводжувалася слабо вираженою гіпофосфатемією, вміст фосфатів у сироватці крові знижувався на 25,2 %. Введення досліджуваних препаратів викликало помірне підвищення рівня неорганічного фосфату, зокрема за дії бісфосфонату І-12 – на 21,9 %, інші бісфосфонати не мали суттєвого впливу на вміст фосфату (табл. 1). Виявлені зміни вмісту кальцію та неорганічного фосфату забезпечували підтримання сталості співвідношення Ca²⁺/P_i в межах 1,5, що є константною величиною для організму.

Таблиця 1 – Вміст мінеральних компонентів у сироватці крові щурів за аліментарного остеопорозу та введення досліджуваних бісфосфонатів і вітаміну D₃ (M±m, n=9)

| Дослідна група | Кальцій, ммоль·л ⁻¹ | | | Неорганічний фосфат, ммоль·л ⁻¹ |
|---|--------------------------------|---------------------------|------------------------------|--|
| | кальцій загальний | кальцій протеїнозв'язаний | кальцій ультрафільтрувальний | |
| Контрольна | 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+бісфосфонат І-12 | 1,94±0,14 [#] | 0,17±0,09 | 1,78±0,11 [#] | 1,76±0,08 [#] |
| Остеопороз+бісфосфонат І-12+ вітамін D ₃ | 2,36±0,17 [#] | 0,26±0,02 [#] | 2,10±0,12 [#] | 1,94±0,06 [#] |
| Остеопороз+бісфосфонат І-40 | 1,70±0,90 | 0,19±0,03 | 1,54±0,60 | 1,52±0,07 |
| Остеопороз+бісфосфонат І-40+ вітамін D ₃ | 2,27±0,11 [#] | 0,22±0,01 [#] | 2,05±0,10 [#] | 2,12±0,09 [#] |
| Остеопороз+бісфосфонат І-42 | 1,71±0,60 | 0,16±0,03 | 1,55±0,06 | 1,49±0,60 |
| Остеопороз+бісфосфонат І-42+ вітамін D ₃ | 2,04±0,12 [#] | 0,19±0,01 | 1,85±0,10 [#] | 2,31±0,14 [#] |

Примітки. Тут і в таблицях 2, 3 та на рисунку 2:

1. * – різниця, порівняно з контролем, вірогідна (p<0,05).

2. [#] – різниця, порівняно з остеопорозом, вірогідна (p<0,05).

Результати дослідження загальної активності лужної фосфатази – біомаркерного ензиму, що характеризує інтенсивність процесу мінералізації кісткової тканини, засвідчили її суттєве зростання у сироватці крові (на 67,6 %) за аліментарного остеопорозу. В основному збільшенню загальної активності ензиму сприяла кісткова ізоформа, що становила 82,9 % від загальної активності лужної фосфатази у сироватці крові та активність якої підвищувалась за остеопорозу на 78,2 % (табл. 2). Нормалізація обміну кальцію та фосфату під впливом досліджуваних бісфосфонатів супроводжувалася зниженням і наближенням до значень контролю активності загальної лужної фосфатази та її кісткової ізоформи у сироватці крові. Так, загальна активність лужної фосфатази зменшувалась під впливом бісфосфонату І-12 на 27,4 %, бісфосфонату І-40 – на 22,1 %, бісфосфонату І-42 – на 14,5 %. Активність кісткового ізоензиму знижувалась під впливом бісфосфонату І-12 на 32,3 %, бісфосфонату І-40 – на 28,9 %, бісфосфонату І-42 – на 26,5 %.

Гальмування процесу фізіологічної мінералізації зазвичай призводить до втрати мінеральних компонентів, зниження щільності кісткової тканини та, зрештою, розвитку остеопорозу. Стан

кісткової тканини піддослідних тварин, яким вводили препарати, характеризували за зольністю, вмістом кальцію та фосфору в золі великогомілкової кістки. Результати, наведені в таблиці 3, свідчать про те, що за остеопорозу зольність великогомілкової кістки щурів знижувалась на 25,6 %, вміст кальцію зменшувався на 34,3 %, неорганічного фосфору – на 33,8 % відносно контролю. Введення експериментального препарату бісфосфонату І-12 призводило до збільшення зольності великогомілкової кістки на 18,4 %, вмісту кальцію – на 31,9 %, неорганічного фосфору – на 36,1 %. Експериментальні препарати бісфосфонатів І-40 та І-42 підвищували зольність великогомілкової кістки тварин на 6,8 і 5,2 %, вміст кальцію – на 8,2 та 12,0 %, фосфору – на 18,5 і 10,2 % відповідно.

Аліментарний остеопороз викликали в молодих щурів шляхом їх утримання протягом 2-х місяців на D-гіповітамінозному раціоні, що зумовлювало значне (майже в 3 рази) зниження вмісту 25ОНD у сироватці крові ((34,0±3,7) нмоль·л⁻¹ за остеопорозу проти (97,5±4,3) нмоль·л⁻¹ у контрольній групі). Вміст гідроксильованої форми вітаміну D₃ – 25ОНD у сироватці (плазмі) крові вважають найбільш адекватним показни-

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)

| Дослідна група | Активність лужної фосфатази, Од/л | | |
|--|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| | загальна активність | кишковий ізоензим | кістковий ізоензим |
| Контрольна | 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+алендронат | 301,6±16,4 [#] | 64,3±3,8 | 280,7±13,6 [#] |
| Остеопороз+алендронат+вітамін D ₃ | 263,2±5,4 [#] | 59,9±4,2 [#] | 199,2±10,4 [#] |
| Остеопороз+бісфосфонат І-12 | 280,3±12,6 [#] | 68,7±3,2 | 230,3±11,5 [#] |
| Остеопороз+бісфосфонат І-12+вітамін D ₃ | 223,3±10,8 [#] | 57,5±2,9 [#] | 208,7±12,3 [#] |
| Остеопороз+бісфосфонат І-40 | 300,7±17,3 [#] | 66,4±3,9 | 241,9±15,7 [#] |
| Остеопороз+бісфосфонат І-40+вітамін D ₃ | 253,2±11,2 [#] | 64,3±3,1 | 211,6±9,8 [#] |
| Остеопороз+бісфосфонат І-42 | 330,4±13,4 [#] | 70,1±5,2 | 252,1±16,8 [#] |
| Остеопороз+бісфосфонат І-42+вітамін D ₃ | 261,4±12,8 [#] | 58,4±2,6 [#] | 232,8±11,7 [#] |

Таблиця 3 – Вміст мінеральних компонентів у великогомілкової кістці щурів за аліментарного остеопорозу та введення досліджуваних бісфосфонатів і вітаміну D₃ (M±m, n=9)

| Дослідна група | Зольність, % від сухої маси | Вміст кальцію, % у золі | Вміст фосфору, % у золі |
|--|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Контрольна | 56,8±2,5 | 38,3±2,3 | 16,3±0,6 |
| Аліментарний остеопороз | 42,3±1,8* | 23,2±1,6* | 10,8±0,4* |
| Остеопороз+вітамін D ₃ | 51,7±3,2 [#] | 37,3±4,3 [#] | 15,4±0,8 [#] |
| Остеопороз+алендронат | 45,0±1,7 | 27,5±1,2 [#] | 11,8±0,3 [#] |
| Остеопороз+алендронат+вітамін D ₃ | 49,3±2,7 [#] | 31,4±2,0 [#] | 13,5±0,5 [#] |
| Остеопороз+бісфосфонат І-12 | 50,1±3,2 [#] | 30,6±1,7 [#] | 14,7±0,8 [#] |
| Остеопороз+бісфосфонат І-12+вітамін D ₃ | 58,1±2,4 [#] | 40,1±2,7 [#] | 16,7±0,6 [#] |
| Остеопороз+бісфосфонат І-40 | 45,2±2,9 | 25,1±1,4 | 12,8±0,7 [#] |
| Остеопороз+бісфосфонат І-40+вітамін D ₃ | 55,7±3,1 [#] | 39,4±3,0 [#] | 17,1±0,9 [#] |
| Остеопороз+бісфосфонат І-42 | 44,5±2,8 | 26,0±1,4 | 11,9±0,4 [#] |
| Остеопороз+бісфосфонат І-42+вітамін D ₃ | 52,9±2,8 [#] | 37,5±2,6 [#] | 15,6±0,8 [#] |

ком забезпеченості організму вітаміном, у нормі він становить 75–150 нмоль·л⁻¹ [17]. Виявлений низький рівень 25ОНD у сироватці крові тварин з аліментарним остеопорозом, відповідно до сучасної класифікації забезпеченості організму вітаміном D₃, можна охарактеризувати як стан глибокого D-вітамінного дефіциту [4, 30].

Як свідчить велика кількість досліджень, фізіологічна та фармакологічна дія 1,25(OH)₂D₃ із залученням рецепторів вітаміну D₃, притаманних більшості клітин-мішеней, зумовлює значний терапевтичний потенціал вітаміну D₃ при лікуванні великої кількості захворювань, включаючи серцево-судинні, автоімунні, онкологічні та, особливо, захворювання скелета [18, 19]. Відповідно, дефіцит вітаміну D₃ розглядають як універсальний чинник ризику розвитку мультифакторних захворювань, і він підвищує вірогідність смерті від них [30].

Наявність рецепторів вітаміну D₃ (VDR) та експресія 25-гідроксивітаміну D₃ 1α-гідроксилази (CYP27B1), ензиму, що перетворює 25ОНD у гормонально активний метаболіт 1,25(OH)₂D₃ у 3-х основних типах клітин кістки (остеобластах, остеокластах, остеоцитах), свідчить про аутокринну та паракринну дію вітаміну D₃ у клітинах кісткової тканини [31, 32]. *In vivo* вітамін D забезпечує високу швидкість і ефективність диференціювання клітин-попередників (мезенхімальні стовбурові клітини) у зрілі остеобласти, які здатні продукувати екстрацелюлярний матрикс, що містить колаген типу 1 та неколагенові регуляторні протеїни, включаючи остеокальцин, остеонектин, остеопонтин та інші, а також здійснювати мінералізацію, використовуючи кальцій і неорганічний фосфат для синтезу гідроксіапатитів [33]. Не лише клітини, що формують кістку, але й остеокласти здатні метаболізувати 25ОНD, що може зумовлювати супресію їх резорбтивної функції через гальмування міграції і зменшення адгезивних властивостей преостеокластів [34]. З іншого боку, на культурі клітин преостеокластів лінії RAW264.7 та моноцитів крові продемонстровано здатність як 25ОНD, так і 1,25(OH)₂D₃ дозозалежно посилювати їх диференціювання, дозрівання та перетворення в остеокласти з високою активністю. У механізм активації остеокластів залучені щонайменше 2 цитокіни: колонієстимулювальний фактор макрофагів (M-CSF) та RANKL. Спільна дія гормонально активних форм вітаміну D₃ та остеотропних цитокінів забезпечує ефективне регулювання швидкості дозрівання остеокластів з їх попередників, визначає адгезивні властивості й резорбтивну активність дозрілих мультиядерних клітин, оптимізуючи тим самим процеси ремоделювання кісткової тканини [35, 36].

З огляду на ключову роль вітаміну D₃ в оптимізації процесу ремоделювання кісткової тканини та достатньо ефективну антирезорбтивну дію досліджуваних піразоловмісних бісфосфонатів, актуальним завданням було дослідити їх спільну коригувальну дію щодо порушень мінерального обміну на моделі аліментарного остеопорозу в щурів.

Індивідуальне терапевтичне введення досліджуваних бісфосфонатів щурам з експериментальним остеопорозом практично не впливало на рівень 25ОНD у сироватці крові. Водночас щоденне введення піддослідним тваринам 40 МО вітаміну D₃ забезпечувало достатню нормалізацію рівня 25ОНD ((89,7±5,2) нмоль·л⁻¹) (рис. 2). Особливо ефективним у нормалізації вмісту 25ОНD у сироватці крові щурів з аліментарним остеопорозом виявилось сумісне введення вітаміну D₃ і досліджуваних бісфосфонатів. Так, за введення вітаміну D₃ з бісфосфонатом І-12 рівень 25ОНD у сироватці крові тварин зростав до (115,7±7,1) нмоль·л⁻¹, з бісфосфонатом І-40 – до (108,3±8,4) нмоль·л⁻¹, а з бісфосфонатом І-42 – до (98,1±4,3) нмоль·л⁻¹. Важливо відзначити, що сумісне застосування вітаміну D₃ і бісфосфонатів було більш ефективним порівняно з дією лише холекальциферолу, що може свідчити про взаємну посилювальну дію цих речовин в остеогенезі.

На тлі сумісного терапевтичного введення бісфосфонатів і холекальциферолу спостерігали більш виражену нормалізацію вмісту мінеральних компонентів у сироватці крові щурів з аліментарним остеопорозом. Зокрема, загальний рівень кальцію у крові тварин, які отримували вітамін D₃ разом із бісфосфонатами І-12, І-40 та І-42, зростав, відповідно, на 49,4, 43,7 і 21,9 %. Вказане підвищення забезпечувалося в основному за рахунок фракції ультрафільтрувального кальцію і становило 49,8, 46,4 і 32,1 % відповідно.

Комплексна дія бісфосфонатів та холекальциферолу мала нормалізувальний вплив також на вміст у сироватці крові неорганічного фосфату. В разі спільної дії бісфосфонату І-12 і вітаміну D₃ рівень неорганічного фосфату зростав на 32,8 % порівняно з остеопорозом, відповідаючи контрольним значенням, а використання бісфосфонатів І-40 та І-42 разом із вітаміном D₃ призвело до його збільшення на 45,2 і 58,2 % відповідно, що навіть перевищувало вміст PO₄³⁻ у сироватці крові контрольних тварин.

Регуляторна дія піразоловмісних бісфосфонатів у поєднанні з вітаміном D₃ на вміст компонентів мінерального обміну в сироватці крові тісно корелювала зі змінами ензиматичної активності лужної фосфатази, включаючи її ізоензими. Терапевтичне введення щурам з остео-

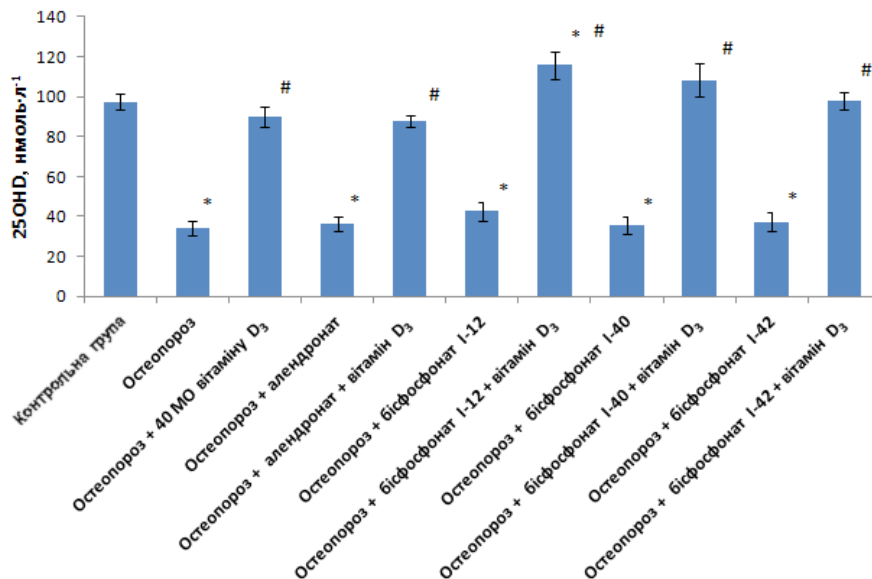


Рис. 2. Вміст 25-гідроксिवітаміну D у сироватці крові щурів за аліментарного остеопорозу та введення досліджуваних бисфосфонатів і вітаміну D₃ (M±m, n=9).

порозом бисфосфонату І-42 з вітаміном D₃ засвідчило достовірне зниження ензиматичної активності лужної фосфатази на 42,2 %, тоді як застосування бисфосфонатів І-40 та І-42 з вітаміном D₃ викликало зменшення активності на 35,1 і 32,3 % відповідно. Важливо, що досліджувані бисфосфонати в поєднанні з холекальциферолом також мали ефективний коригувальний вплив і на ензиматичну активність ізоформ лужної фосфатази – кишкову та кісткову порівняно з остеопорозом. В основному змінювалась активність кісткового ізоензиму (табл. 2).

Компенсація остеопорозасоціюваної гіпокальціємії та гіпофосфатемії у сироватці крові під дією бисфосфонатів і вітаміну D₃-терапії супроводжувалася нормалізацією вмісту мінеральних компонентів у кістковій тканині. Високу ефективність поєднаної дії у коригуванні вмісту мінеральних компонентів у великогомілкової кістці встановлено для спільної дії бисфосфонату І-12 і вітаміну D₃. Зольність кістки збільшувалась на 37,4 %, вміст кальцію в золі зростав на 74,3 %, фосфору – на 16,7 % (табл. 3). За спільної дії бисфосфонату І-40 і вітаміну D₃ зольність, вміст кальцію і фосфору збільшувались на 32,1, 70,2 та 58,3 %, а при введенні бисфосфонату І-42 з вітаміном D₃ – на 25,2, 62,3 і 44,1 % відповідно.

Слід зауважити, що в усіх групах сумісного введення синтезованих піразоловмісних бисфосфонатів та холекальциферолу ефективність нормалізувальної дії на мінеральний обмін як у сироватці крові, так і в тканині кістки була більш вираженою, ніж у групі поєднаного введення вітаміну D₃ та препарату порівняння – алендронату. Це свідчить про високу ефективність до-

сліджуваних нітрогеновмісних бисфосфонатів третього покоління, а їх остеопротекторний терапевтичний вплив у складі комплексу з холекальциферолом є однією з потенційно ефективних стратегій коригування надмірної кісткової резорбції та лікування остеопорозу [10].

ВИСНОВКИ. Результати проведених досліджень вказують на те, що розвиток аліментарного остеопорозу, який викликали шляхом утримування щурів на D-гіповітамінозному раціоні, супроводжувався вираженою гіпокальціємією, гіпофосфатемією, зростанням активності лужної фосфатази та її кісткового ізоензиму, а також значними порушеннями вмісту мінеральних компонентів у кістковій тканині. Введення тваринам на тлі остеопорозу досліджуваних піразоловмісних бисфосфонатів з різною ефективністю гальмувало процес демінералізації (резорбції) кісткової тканини і посилювало мінеральний обмін у щурів за маркерними показниками крові та кісткової тканини. Поєднана терапія остеопорозу піразоловмісними бисфосфонатами і холекальциферолом продемонструвала ефективніші нормалізувальні ефекти як на мінеральний обмін у сироватці крові, так і на вміст мінеральних компонентів у кістковій тканині порівняно з індивідуальним введенням цих сполук. Найбільш виражені коригувальні ефекти спостерігали у групі сумісного введення бисфосфонату І-12 і вітаміну D₃, що свідчить про високий остеотропний потенціал досліджуваного бисфосфонату та спонукає до подальших досліджень його терапевтичної дії. Отримані результати підтверджують регуляторну роль вітаміну D₃

у процесах мінерального обміну з участю остеобластів та остеокластів, а його застосування у комбінованій терапії з піразоловмісними бісфосфонатами посилює остеотропні й протирезорбтивні ефекти останніх.

Роботу виконано в рамках цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України “Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва” на 2014–2016 роки.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Cellular and molecular aspects of bone remodeling / W. Xiao, Y. Wang, S. Pacios [et al.] // *Front Oral Biol.* – 2016. – **18**. – P. 9–16. DOI: 10.1159/000351895.
2. Nagy V. The RANKL-RANK Story / V. Nagy, J. M. Penninger // *Gerontology.* – 2015. – **61** (6). – P. 534–542. DOI: 10.1159/000371845.
3. Langdahl B.L. Treatment of osteoporosis: Unmet needs and emerging solutions / B. L. Langdahl, J. D. Andersen // *J. Bone Metab.* – 2018. – **25** (3). – P. 133–140. DOI: 10.11005/jbm.2018.25.3.133.
4. Вітамін D і костная система / [Г. В. Гайко, Ан. В. Калашников, А. Т. Бруско и др.]. – К. : Книга плюс, 2008. – 176 с.
5. Drugs for the treatment of metabolic bone diseases / M. T. Drake, S. Cremers, R. G. Russell, J. P. Bilezikian // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2019. – **85** (6). – P. 1049–1051. DOI: 10.1111/bcp.13857.
6. Bisphosphonates: molecular mechanisms of action and effects on bone cells, monocytes and macrophages / A. J. Roelofs, K. Thompson, F. H. Ebetino [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* – 2010. – **16** (27). – P. 2950–2960. DOI: 10.2174/138161210793563635.
7. Мєбїфон – ефективний вітчизняний препарат групи бісфосфонатів / В. М. Півнюк, Н. І. Шарикіна, Т. В. Дехтяр [та ін.] // *Онкологія.* – 2007. – **9**, № 2. – С. 145–150.
8. Kolmas J. Synthesis, characterization and in vitro evaluation of new composite bisphosphonate delivery systems / J. Kolmas, M. Sobczak, E. Ołędzka [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – **15** (9). – P. 16831–16847. DOI: 10.3390/ijms150916831.
9. Clézardin P. Bisphosphonates in preclinical bone oncology / P. Clézardin, I. Benzaïd, P. I. Croucher // *Bone.* – 2011. – **49** (1). – P. 66–70. DOI: 10.1016/j.bone.2010.11.017.
10. Plotkin L. I. In vitro and in vivo studies using non-traditional bisphosphonates / L. I. Plotkin, S. Buvinic, J. Balanta-Melo // *Bone.* – 2020. – **134** (115301). DOI: 10.1016/j.bone.2020.115301.
11. Drake M. T. Bisphosphonate therapeutics in bone disease: the hard and soft data on osteoclast inhibition / M. T. Drake, S. C. Cremers // *Mol. Interv.* – 2010. – **10** (3). – P. 141–152. DOI: 10.1124/mi.10.3.5.
12. Risks and benefits of bisphosphonate therapies / C. Reyes, M. Hitz, D. Prieto-Alhambra [et al.] // *J. Cell Biochem.* – 2016. – **117** (1). – P. 20–28. DOI: 10.1002/jcb.25266.
13. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates / F. H. Ebetino, A. L. Hogan, S. Sun [et al.] // *Bone.* – 2011. – **49** (1). – P. 20–33. DOI: 10.1016/j.bone.2011.03.774.
14. Martin T. J. Historically significant events in the discovery of RANK/RANKL/OPG / T. J. Martin // *World J. Orthop.* – 2013. – **4** (4). – P. 186–197. DOI: 10.5312/wjo.v4.i4.186.
15. Liu W. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues / W. Liu, X. Zhang // *Mol. Med. Rep.* – 2015. – **5** (11). – P. 3212–3218. DOI: 10.3892/mmr.2015.3152.
16. Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions / M. Baud'huin, L. Duplomb, S. Teletchea [et al.] // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2013. – **24** (5). – P. 401–409. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2013.06.001.
17. Anderson P. H. Vitamin D activity and metabolism in bone // *Curr. Osteoporos. Rep.* – 2017. – **15** (5). – P. 443–449. DOI: 10.1007/s11914-017-0394-8.
18. Dimitrov V. Non-classical mechanisms of transcriptional regulation by the vitamin D receptor: Insights into calcium homeostasis, immune system regulation and cancer chemoprevention / V. Dimitrov, R. Salehi-Tabar, B. S. An [et al.] // *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* – 2014. – **144** (A). – P. 74–80. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2013.07.012.
19. Protective role of the vitamin D receptor / L. Yang, J. Ma, X. Zhang [et al.] Protective role of the vitamin D receptor // *Cellular Immunology.* – 2012. – **279** (2). – P. 160–166. DOI: 10.1016/j.cellimm.2012.10.002.
20. 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. – **27** (2). – P. 112–115. DOI: 10.1080/00039896.1973.10666331.
21. Ефективність біофармацевтичного препарату “Мєбївід” у попередженні порушень обміну вітаміну D₃ та кальцію за аліментарного остеопорозу / С. В. Комісаренко, Л. І. Апуховська, В. М. Рясний [та ін.] // *Biotechnologia acta.* – 2011. – **4**, № 1. – С. 74–81.
22. Щелочная фосфатаза: современное состояние вопроса / Б. Плеханов, Т. Цветкова, Т. Пиперков, М. Чиговская // *Лаб. дело.* – 1989. – **11**. – С. 4–7.
23. <http://accelrys.com/products/databases/bio-activity/mddr.htm>.
24. N-Alkylhydrazones of aliphatic ketones in the synthesis of 1,3,4-trisubstituted non-symmetric pyrazoles / S. P. Ivonin, B. V. Kurpil', E. V. Rusanov [et al.] // *Tetrahedron Lett.* – 2014. – **55**. – P. 2187–2189. DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.02.058.
25. Імуномодулююча дія вітаміну D₃ та бісфосфонатів при аліментарному остеопорозі в щурів / В. М. Рясний, Л. І. Апуховська, М. М. Великий [та ін.] // *Укр. біохім. журн.* – 2012. – **84**, № 2. – С. 73–80.
26. Zhang C. The calcium sensing receptor: from calcium sensing to signaling / C. Zhang, C. L. Miller, E. M. Brown [et al.] // *Sci. China Life Sci.* – 2015. – **58** (1). – P. 14–27. DOI: 10.1007/s11427-014-4779-y.
27. Design of calcium-binding proteins to sense calcium / S. Tang, X. Deng, J. Jiang [et al.] // *Molecules.* – 2020. – **5** (9). – P. 2148. DOI: 10.3390/molecules25092148.
28. A novel mechanism for calmodulin-dependent inactivation of transient receptor potential vanilloid 6 /

- N. Bate, R. E. Caves, S. P. Skinner [et al.] // *Biochemistry*. – 2018. – **57** (18). – P. 2611–2622. DOI: 10.1021/acs.biochem.7b01286.
29. Ramasamy I. Inherited disorders of calcium homeostasis / I. Ramasamy // *Clin. Chim. Acta*. – 2008. – **394** (1–2). – P. 22–41. DOI: 10.1016/j.cca.2008.04.011.
30. Zhang Y. Association between vitamin D supplementation and mortality: systematic review and meta-analysis / Y. Zhang, F. Fang, J. Tang [et al.] // *BMJ*. – 2019. – **366** (I4673). DOI: 10.1136/bmj.I4673.
31. The pleiotropic effects of vitamin D in bone / P. H. Anderson, N. N. Lam, A. G. Turner [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2013. – **136**. – P. 190–194. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2012.08.008.190–194.
32. Vitamin D activities and metabolic bone disease / J. W. Ryan, P. H. Anderson, A. G. Turner, H. A. Morris // *Clin. Chim. Acta*. – 2013. – **425**. – P. 148–152. DOI: 10.1016/j.cca.2013.07.024.
33. Milat F. Osteoporosis treatment: a missed opportunity / F. Milat, P. R. Ebeling // *Med J Aust*. – 2016. – **205** (4). – P. 185–190. DOI: 10.5694/mja16.00568.
34. Modulation of osteoclastic migration by metabolism of 25(OH)-vitamin D₃ / M. Kogawa, D. M. Findlay, P. H. Anderson [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2013. – **136**. – P. 59–61. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2012.09.008.
35. Vitamin D receptor expression in human bone tissue and dose-dependent activation in resorbing osteoclasts / A. Zarei, A. Morovat, K. Javaid, Brown [et al.] // *Bone Res.* – 2016. – **4** (16030). DOI: 10.1038/boneres.2016.30.
36. 1,25-dihydroxy vitamin D₃ and interleukin-6 blockade synergistically regulate rheumatoid arthritis by suppressing interleukin-17 production and osteoclastogenesis / H. Kim, S. Baek, S. M. Hong [et al.] // *J. Korean Med. Sci.* – 2020. – **35** (6): e40. DOI: 10.3346/jkms.2020.35.e40.
- istry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone*, 49 (1), 20-33.
14. Martin, T.J. (2013). Historically significant events in the discovery of RANK/RANKL/OPG. *World J. Orthop.*, 4 (4), 186-197.
15. Liu W., Zhang X. (2015). Receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues. *Mol. Med. Rep.*, 5 (11), 3212-3218.
16. Baud'huin, M., Duplomb, L., Teletchea, S., Lamoureux, F., Ruiz-Velasco, C., & Heymann, D. (2015). Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 24 (5), 401-409.
17. Anderson, P.H. (2017). Vitamin D activity and metabolism in bone. *Curr. Osteoporos. Rep.*, 15 (5), 443-449.
18. Dimitrov, V., Salehi-Tabar, R., Beum-Soo, A., & White, J.H. (2014). Non-classical mechanisms of transcriptional regulation by the vitamin D receptor: Insights into calcium homeostasis, immune system regulation and cancer chemoprevention. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 144 (A), 74-80.
19. Yang, L., Ma, J., Zhang, X., Fan, Y., & Wang, L. (2012). Protective role of the vitamin D receptor. *Cellular Immunology*, 279 (2), 160-166.
20. Dyce, B.J., & Bessman, S.P. (1973). A rapid nonenzymatic assay for 2,3-DPG in multiple specimens of blood. *Arch. Environ. Health*, 27 (2), 112-115.
21. Komisarenko, S.V., Apukhovska, L.I., Riasniy, V.M., Kalashnikov, A.V., & Veliky, M. M. (2011). Efektyvnist biofarmatsevtichnoho preparatu "Mebivid" u poperedzhenni porushen obminu vitaminu D₃ ta kaltsiiu za alimentarnoho osteoporozu ["Mebivid" biopharmaceutical preparation efficacy against vitamin D₃ and calcium metabolism disorders in alimentary osteoporosis]. *Biotehnologhiia acta – Biotechnologia Acta*, 4 (1), 74-81 [in Ukrainian].
22. Plekhanov, B. (1989). Shchelochynaya fosfataza: sovremennoye sostoyaniye voprosa [Alkaline phosphatase: state of the art]. *Laboratornoye delo – Laboratory Work*, 11, 4-7 [in Russian].
23. <http://accelrys.com/products/databases/bioactivity/mddr.htm>.

24. Ivonin, S.P., Kurpil', B.B., Rusanov, E.B., Grygorenko, O.O., & Volochnyuk, D.M. (2014). N-Alkylhydrazones of aliphatic ketones in the synthesis of 1,3,4-trisubstituted non-symmetric pyrazoles. *Tetrahedron Lett.*, 55, 2187-2189.
25. Riasniy V.M., Apukhovska L.I., Veliky M.M., Shymanskyi I.O., Labudzynski D.O., & Komisarenko S.V. (2012). Immunomoduliuucha diia vitaminu D₃ ta bisfosfonativ pry alimentarnomu osteoporozu v shchuriv [Immunomodulatory effects of vitamin D₃ and bisphosphonates in nutritional osteoporosis in rats. *Ukr. Biokh. Zhurn. – The Ukrainian Biochemical Journal*, 84 (2), 73-80 [in Ukrainian].
26. Zhang, C., Miller, C.L., Brown, E.M., & Yang, J.J. (2015). The calcium sensing receptor: from calcium sensing to signaling. *Sci. China Life Sci.*, 58 (1), 14-27.
27. Tang, S., Deng, X., Jiang, J., Kirberger, M., & Yang, J.J. (2020). Design of Calcium-Binding Proteins to Sense Calcium. *Molecules*, 5 (9), 2148.
28. Bate, N., Caves, R.E., Skinner, S.P., Goult, B.T., Basran, J., Mitcheson, J.S., & Vuister, G.W. (2018). A novel mechanism for calmodulin-dependent inactivation of transient receptor potential Vanilloid 6. *Biochemistry*, 57 (18), 2611–2622.
29. Ramasamy, I. (2008). Inherited disorders of calcium homeostasis. *Clin. Chim. Acta*, 394 (1-2), 22-41.
30. Zhang, Y., Fang, F., Tang, J., Jia, L., Feng, Y., Xu, P., & Faramand, A. (2019). Association between vitamin D supplementation and mortality: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 366 (l4673).
31. Anderson, P.H., Lam, N.N., Turner, A.G., Davey, R.A., Kogawa, M., Atkins, G.J., & Morris, H.A. (2013). The pleiotropic effects of vitamin D in bone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 136, 190-194.
32. Ryan, J.W., Anderson, P.H., Turner, A.G., & Morris, H.A. (2013). Vitamin D activities and metabolic bone disease. *Clin. Chim. Acta*, 425, 148-152.
33. Milat, F., & Ebeling, P.R. (2016). Osteoporosis treatment: a missed opportunity. *Med J Aust.*, 205 (4), 185-190.
34. Kogawa, M., Findlay, D.M., Anderson, P.H., & Atkins, G.J. (2013). Modulation of osteoclastic migration by metabolism of 25(OH)-vitamin D₃. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 136, 59-61.
35. Zarei, A., Morovat, A., Javaid, K., & Brown, C.P. (2016). Vitamin D receptor expression in human bone tissue and dose-dependent activation in resorbing osteoclasts. *Bone Res.*, 4 (16030).
36. Kim, H., Baek, S., Hong, S.M., Lee, J., Jung, S.M., Lee, J., Cho, M., Kwok, S.K., & Park, S.H. (2020). 1,25-dihydroxy vitamin D₃ and interleukin-6 blockade synergistically regulate rheumatoid arthritis by suppressing interleukin-17 production and osteoclastogenesis. *J. Korean Med. Sci.*, 35 (6): e40.

С. В. Комисаренко¹, В. Н. Василевская¹, С. П. Ивонин², О. А. Лисаковская¹, Д. О. Лабудзинский¹,
И. А. Шиманский¹, А. А. Мазанова¹, Д. М. Волоchnik², Н. Н. Великий¹
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А. В. ПАЛЛАДИНА НАН УКРАИНЫ¹, КИЕВ
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАН УКРАИНЫ², КИЕВ

СОЧЕТАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ПИРАЗОЛСОДЕРЖАЩИХ БИСФОСФОНАТОВ И ВИТАМИНА D₃ В КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА ПРИ АЛИМЕНТАРНОМ ОСТЕОПОРОЗЕ У КРЫС

Резюме

Вступление. По данным ВОЗ, остеопороз занимает ведущее место среди всех известных заболеваний как причина преждевременной инвалидности и смертности в мире, а поэтому разработка эффективной стратегии лечения этого заболевания является одним из приоритетных направлений исследований для научных и медицинских учреждений. К таким подходам относятся разработка новых современных азотсодержащих бисфосфонатов и исследование их терапевтических эффектов на животных моделях.

Цель исследования – изучить эффективность сочетанного действия синтезированных азотсодержащих бисфосфонатов (пиразолсодержащих аналогов), которые подавляют активность остеокластов и уменьшают резорбцию костной ткани, и витамина D₃, который является основным регулятором процесса ремоделирования костной ткани и активатором остеогенеза, в коррекции нарушений минерального обмена при остеопорозе.

Методы исследования. Биологическую эффективность синтезированных пиразолсодержащих бисфосфонатов исследовали на крысах-самках линии Вистар (возраст – 1 месяц, исходная масса – (90±5) г). Алиментарный остеопороз вызывали путем содержания животных в течение 30-ти дней на D-гиповитаминозном рационе согласно ГОСТу 11222-65, сбалансированном по содержанию кальция и фосфора. В качестве корректирующих соединений использовали пер ос пиразолсодержащие бисфосфонаты (1,7 мг/кг) и холекальциферол (400 МЕ/кг массы тела). 25-Гидроксивитамин D в сыворотке крови исследовали методом ELISA. Количественный анализ компонентов минерального обмена в сыворотке крови и костной ткани проводили с помощью общепринятых биохимических методов.

Результаты и обсуждение. Исследуемые пиразолсодержащие бисфосфонаты с разной эффективностью ингибировали процесс деминерализации (резорбции) костной ткани и интенсифицировали минеральный обмен у крыс с алиментарной формой остеопороза. При действии препаратов возрастало содержание кальция, неорганического фосфата и снижалась активность щелочной фосфатазы и ее изоэнзимов в сыворотке крови. Повышались зольность и содержание кальция и фосфора в золе большеберцовой кости. Наиболее эффективным в коррекции нарушений минерального обмена при остеопорозе оказалось сочетание пиразолсодержащих бисфосфонатов и витамина D₃, который нормализует содержание 25-гидроксивитамина D в сыворотке крови и обеспечивает синтез биологически активных, гидроксिलированных форм холекальциферола.

Вывод. Перспективным для дальнейших исследований является изучение совместного действия витамина D₃ и бисфосфоната I-12 как препарата с наиболее высокой биологической эффективностью по усилению процесса ремоделирования костной ткани благодаря согласованности процессов резорбции и формирования кости.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пиразолсодержащие бисфосфонаты; алиментарный остеопороз; минеральный обмен; витамин D₃; 25-гидроксивитамин D.

S. V. Komisarenko¹, V. M. Vasylevska¹, S. P. Ivonin², O. O. Lisakovska¹, D. O. Labudzynski¹,
I. O. Shymanskyi¹, A. O. Mazanova¹, D. M. Volochnyuk², M. M. Veliky¹

PALLADIN INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE¹, KYIV
INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE², KYIV

COMBINED EFFECT OF PYRAZOLE-CONTAINING BISPHOSPHONATES AND VITAMIN D₃ IN THE CORRECTION OF MINERAL METABOLISM IN ALIMENTARY OSTEOPOROSIS IN RATS

Summary

Introduction. According to the WHO, osteoporosis ranks central position among all known diseases as a cause of premature disability and mortality, and therefore the development of effective treatment strategies for this disease is one of the priority research areas for scientific and medical institutions. One of these areas is the development of new modern bisphosphonates and the study of their therapeutic effects in animal models.

The aim of the study – to explore the effectiveness of combined action of synthesized nitrogen-containing bisphosphonates (pyrazole-containing analogs), which inhibit osteoclast activity and bone resorption, and vitamin D₃ – the main regulator of bone remodeling and osteogenesis, in the correction of mineral metabolism disturbances accompanying the development of osteoporosis.

Research Methods. The study of the biological effectiveness of the synthesized pyrazole-containing bisphosphonates was carried out on female Wistar rats (1 month old, initial weight (90±5) g). Alimentary osteoporosis was induced by keeping the rats for 30 days on a D-hypovitaminosis diet according to GOST 11222-65, balanced in calcium and phosphorus. Pyrazole-containing bisphosphonates (1.7 mg/kg) and cholecalciferol (400 IU/kg body weight) were used per os as corrective compounds. Serum 25OHD was tested by ELISA. The quantitative analysis of the components of mineral metabolism in the blood serum and bone tissue was determined by routine biochemical methods.

Results and Discussion. Our pyrazole-containing bisphosphonates inhibited the process of bone tissue demineralization (resorption) and enhanced mineral metabolism in rats with alimentary osteoporosis with various efficiency. After bisphosphonate supplementation, the content of calcium and inorganic phosphate increased, while the activity of alkaline phosphatase and its isoenzymes in blood serum decreased. The ash content and the levels of calcium and phosphorus in the ash of the tibia have been increased. The combination of pyrazole-containing bisphosphonates with vitamin D₃, which normalizes the serum 25OHD content and provides the synthesis of biologically active hydroxylated forms of cholecalciferol, has been effective in the correction of mineral metabolism abnormalities in osteoporotic rats.

Conclusions. The study of the combined action of vitamin D₃ and bisphosphonate I-12, as the substance with the highest biological efficiency in enhancing the bone remodeling through a balanced combination of bone resorption and formation, is most promising for further research.

KEY WORDS: pyrazole-containing bisphosphonates; alimentary osteoporosis; mineral metabolism; vitamin D₃; 25OHD.

Отримано 10.08.20

Адреса для листування: Д. О. Лабудзинський, Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, вул. Леонтовича, 9, Київ, 01030, Україна, e-mail: konsument3@gmail.com.