

УДК 577.1.62-23+612.015

© О.А. Макаренко, А.П. Левицкий, И.В. Ходаков, 2012.

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОСТЕОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ БИОФЛАВОНОИДОВ ПРИ ОСТЕОПОРОЗЕ

О.А. Макаренко, А.П. Левицкий, И.В. Ходаков

ГУ «Институт стоматологии НАМН Украины», лаборатория биохимии (зав. – д.б.н. О.А. Макаренко), г. Одесса.

PATHOPHYSIOLOGY ASPECTS OF OSTEOPROTECTIVE EFFECT OF BIOFLAVONOIDS ON OSTEOPOROSSES

O.A. Makarenko, A.P. Levitsky, I.V. Khodakov

SUMMARY

The experimental work is dedicated to the study of osteotropic efficiency of isoflavons, obtained from soy beans. On the models of osteoporosis, caused by double-sided ovariectomy in the rats of Vistar, alimentary factor or prednisolone line the ability of isoflavons to prevent the changes in activity of osseous enzymes (phosphatases, elastase, catalase, superoxiddismutase and casein proteolytic activity) and to keep mineral density of bones in norm, was shown. Mechanism of osteoprotective effect of isoflavons of soy is inhibition of bone elastase, what decrease of resorbtion of protein matrix of bone.

ПАТОФІЗИОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ОСТЕОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ БІОФЛАВОНІДІВ ПРИ ОСТЕОПОРОЗІ

О.А. Макаренко, А.П. Левицкий, И.В. Ходаков

РЕЗЮМЕ

Експериментальна робота присвячена дослідженню механізмів остеотропної ефективності біофлавоноїдів (ізофлавонів), виділених з бобів сої. На моделях остеопорозу у щурів лінії Вістар, викликаних двосторонньою оварієктомією, аліментарним фактором але довготривалим введенням преднізолону, показана здатність ізофлавонів попереджати зміни активності кісткових ферментів (фосфатаз, еластази, каталази, супероксиддисмутази та загальної протеолітичної активності) і зберігати мінеральну щільність кісток на нормальному рівні. Автори вважають, що механізм остеопротекторної дії ізофлавонів сої здійснюється за рахунок інгібування кісткової еластази, внаслідок чого гальмується руйнування білкової матриці кісткової тканини.

Ключевые слова: экспериментальный остеопороз, изофлавоны сои, эластаза, фосфатазы, антиоксидантные ферменты

Остеопороз (ОП) является одним из наиболее распространенных заболеваний, которое наряду с инфарктом миокарда, инсультом, раком занимает ведущее место в структуре заболеваемости и смертности населения. По определению ВОЗ, ОП – это метаболическое заболевание скелета, характеризующееся уменьшением массы костной ткани и нарушениями её микроархитектоники, что снижает прочность кости и увеличивает риск переломов [1, 7]. Важной задачей здравоохранения является внедрение в практику эффективных методов профилактики и лечения ОП [7, 9].

Современная терапия ОП предусматривает два различных подхода с целью улучшения структурно-функционального состояния костной ткани. К первому относится применение препаратов, уменьшающих резорбцию костной ткани (кальцитонин, бисфосфонаты, эстрогены). Вторую группу составляют препараты, стимулирующие формирование костной ткани (фториды, паратиреоидный гормон, гормон роста, анаболические стероиды, андрогены). Базовая терапия ОП подразумевает обязательное включение препаратов кальция, витамина D и его гормональных форм [1, 7, 9]. При этом нельзя не отметить наличие побочных эффектов, связанных с длительным

приемом гормональных средств. По данным ВОЗ случаи токсических и аллергических осложнений после применения современных лекарств достигают в настоящее время 15 – 20 % [12].

В этой связи привлекают внимание препараты биофлавоноидов из растительного сырья. В настоящее время имеется положительный опыт лечения ОП кверцетином, изофлавонами сои, экстрактом софоры и синтетическим изофлавоном иприфлавоном [3, 5, 8, 17]. Эпидемиологические наблюдения также указывают на то, что среди представителей восточных популяций, потребляющих значительные количества растительной пищи с биофлавоноидами, ОП встречается гораздо реже, чем у европейцев [16, 17]. Важным преимуществом биофлавоноидов по сравнению с синтетическими аналогами лекарственных препаратов является отсутствие отдаленных побочных эффектов [16]. При этом до конца не определены физиологические механизмы действия этих соединений, позволяющих улучшить состояние костной ткани.

Поэтому целью настоящей работы явилось экспериментальное изучение механизмов остеопротекторной эффективности наиболее перспективных биофлавоноидов из бобов сои – изофлавонов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе приведены результаты выполнения трёх экспериментов. Первый эксперимент проведен на 30 крысах линии Вистар (самки, 7 месяцев, масса 265 ± 22 г). ОП вызывали при помощи тотальной овариэктомии (ОЭ) [15]. Животные разделены на группы: 1 – псевдооперированные; 2 – ОЭ без профилактики; 3 – ОЭ + изофлавоны сои 0,5 мг/кг. Второй эксперимент проведен на 30 самках крыс (10 месяцев, масса 284 ± 17), которых содержали на неполноценном рационе с низким содержанием кальция, фосфора и белка (алиментарный ОП) [14]. Крысы представлены группами: 1 – интактные; 2 – ОП без профилактики; 3 – ОП + изофлавоны сои 0,5 мг/кг. В третьем – у крыс моделировали глюкокортикоидный ОП введением с питьевой водой преднизолона (5 мг/кг) [3]. Использовали 30 самцов крыс (2 месяца, масса 132 ± 8 г), которых разделили на группы: 1 – интактные; 2 – преднизолоновый ОП; 3 – преднизолоновый ОП + ЕКСО 500 мг/кг (по изофлавоном 0,5 мг/кг). Продолжительность 1-ого и 3-его экспериментов составила 35 дней, 2-ого – 60 дней.

Крысы получали препараты с первого дня эксперимента, внутривенно в виде водных суспензий. Изофлавоны сои выделены из соевых бобов в лаборатории биохимии Института стоматологии и представляют собой концентрат с известным содержанием изофлавонов. ЕКСО – диетическая добавка к пище из сои, выпускаемая НПА «Одесская биотехнология» по ТУ У 013903778-47-97. Крыс выводили из эксперимента под тиопенталовым наркозом (20 мг/кг). Выделяли бедренные кости для определения плотности, большие берцовые – для определения активности кислой и щелочной фосфатаз (КФ и ЩФ), эластазы и общей протеолитической активности (ОПА) [14], а также активности каталазы [2] и супероксиддисмутазы (СОД) [11]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 обобщены результаты исследования плотности костной ткани, активности протеиназ, фосфатаз и антиоксидантных ферментов в костной ткани крыс, у которых воспроизводили различные типы ОП. О наличии остеодистрофических изменений у крыс судили по плотности их бедренной кости. Результаты определения этого показателя у крыс после моделирования ОП различного генеза показали, что в зависимости от патогенного фактора, возраста животных и длительности воспроизведения модели плотность бедренной кости крыс снижалась в различной степени. Дефицит алиментарных компонентов или ОЭ вызывали более существенное снижение этого показателя ($P < 0,001$), чем

воздействие преднизолона ($P < 0,05$). Введение изофлавонов сои или препарата ЕКСО на фоне моделирования ОП во всех рассматриваемых случаях оказывало выраженный остеопротекторный эффект, предотвращая падение плотности костей крыс ($P_1 < 0,001 - 0,02$).

Развитие ОП, независимо от пускового механизма, приводило к угнетению ОПА в костной ткани в среднем в 1,8 раза. На фоне снижения активности этой группы ферментов в костной ткани крыс при моделировании остеопороза установлено достоверное повышение активности эластазы ($P < 0,001 - 0,02$). Полученные нами ранее результаты показали, что снижение плотности костей при экспериментальном ОП, фторидной интоксикации или при старении крыс сопровождалось ростом активности костной эластазы. Эти наблюдения позволили нам заключить, что эластаза выполняет деструктивную роль в патологической и возрастной резорбции костной ткани [4, 5]. В подтверждение следует добавить существование специфичности эластазы к коллагену I типа, который составляет основу белковой матрицы костей. Кроме того, эластаза путём ограниченного протеолиза активирует матриксные металлопротеиназы: коллагеназу, желатиназу и стромелизин [6], которые принимают участие в деградации коллагена костной ткани [13]. Наши исследования показали, что рост активности костной эластазы эффективно купируется профилактическим введением изофлавонов, за исключением преднизолонового ОП. Помимо этого изофлавоны сои предупреждали и падение ОПА – активность этой группы протеиназ во всех случаях соответствовала нормальному уровню.

Характер изменения активности костных фосфатаз на фоне остеопороза не имел чётко определенных закономерностей. Так, активность КФ не изменялась в костной ткани при моделировании преднизолонового ОП и повышалась при дефиците алиментарных факторов ($P < 0,01$) и после ОЭ ($P < 0,002$). На фоне воспроизведения ОП разного генеза активность ЩФ в костной ткани животных достоверно увеличивалась ($P < 0,001 - 0,05$), что свидетельствует об интенсификации функциональной активности остеобластов и можно рассматривать как компенсаторную реакцию, направленную на сохранение функциональной организации костной ткани при влиянии патогенных факторов. Применение изофлавонов при ОП оптимизировало активность обеих костных фосфатаз.

Двусторонняя ОЭ приводит и к существенным нарушениям в антиоксидантной системе костной ткани крыс. Так, через 35 дней после моделирования патологии отмечено достоверное снижение активности антиоксидантных ферментов (каталазы – на 20,2%, $P < 0,01$ и СОД – на 26,7%, $0,5 < P < 0,1$). Ещё более достоверно значимое снижение активности

Таблица 1

Влияние остеопоротических факторов и биофлавоноидов на плотность бедренной кости, активность протеиназ, фосфатаз и антиоксидантных ферментов в костной ткани крыс при остеопорозе

Патогенные факторы	Плотность бедренной кости, г/см ³	ОПА, нкат/кг	Активность эластазы, мк-кат/кг	Активность ЩФ, мк-кат/кг	Активность КФ, мк-кат/кг	Активность каталазы, мкат/кг	Активность СОД, ед/кг	
Овариэктомия, n = 10	норма	1,662 ± 0,002	379,2 ± 19,8	5,07 ± 0,54	101,8 ± 7,4	14,0 ± 1,6	3,82 ± 0,08	39,76 ± 4,82
	остеопороз	1,556 ± 0,002 P < 0,001	212,4 ± 29,3 P < 0,001	7,13 ± 0,80 P < 0,02	256,4 ± 34,9 P < 0,05	22,6 ± 1,7 P < 0,002	3,05 ± 0,08 P < 0,01	29,16 ± 2,61 0,05 < P < 0,1
	остеопороз+изофлавоны сои	1,638 ± 0,017 P < 0,02 P ₁ < 0,001	342,2 ± 31,5 P > 0,4 P ₁ < 0,01	4,19 ± 0,46 P > 0,25 P ₁ < 0,01	111,5 ± 13,7 P > 0,5 P ₁ < 0,002	16,1 ± 1,4 P > 0,3 P ₁ < 0,02	4,27 ± 0,41 P > 0,3 P ₁ < 0,001	35,88 ± 3,92 P > 0,5 P ₁ > 0,2
Алиментарный фактор, n = 10	норма	1,596 ± 0,011	342,0 ± 25,1	5,03 ± 0,61	99,9 ± 8,3	15,3 ± 2,1	3,45 ± 0,17	40,53 ± 2,84
	остеопороз	1,508 ± 0,014 P < 0,001	203,1 ± 17,1 P < 0,001	7,87 ± 0,51 P < 0,01	167,6 ± 0,9 P < 0,001	24,6 ± 2,7 P < 0,01	2,51 ± 0,10 P < 0,001	25,09 ± 1,93 P < 0,001
	остеопороз+изофлавоны сои	1,574 ± 0,022 P < 0,4 P ₁ < 0,02	287,4 ± 21,5 P > 0,1 P ₁ < 0,002	5,50 ± 0,47 P > 0,5 P ₁ < 0,02	93,5 ± 14,1 P > 0,7 P ₁ < 0,001	18,6 ± 1,4 P > 0,2 P ₁ < 0,05	3,68 ± 0,09 P > 0,25 P ₁ < 0,001	37,81 ± 2,58 P > 0,5 P ₁ < 0,002
Преднизолон, n = 10	норма	1,380 ± 0,010	218,6 ± 17,9	2,85 ± 0,29	203,7 ± 19,4	7,7 ± 0,9	4,07 ± 0,26	35,42 ± 2,16
	остеопороз	1,348 ± 0,011 P < 0,05	143,7 ± 15,1 P < 0,01	7,24 ± 0,85 P < 0,001	297,5 ± 31,4 P < 0,05	9,1 ± 1,2 P > 0,4	3,18 ± 0,15 P < 0,01	23,90 ± 1,74 P < 0,001
	остеопороз+ЕКСО	1,385 ± 0,007 P > 0,7 P ₁ < 0,05	196,2 ± 18,3 P > 0,4 P ₁ < 0,05	6,81 ± 0,74 P < 0,001 P ₁ > 0,25	185,5 ± 20,7 P > 0,3 P ₁ < 0,05	8,3 ± 1,0 P > 0,7 P ₁ > 0,6	3,95 ± 0,11 P > 0,7 P ₁ < 0,001	38,73 ± 3,06 P > 0,4 P ₁ < 0,001

антиоксидантных ферментов зарегистрировано в костной ткани крыс на фоне дефицита алиментарных факторов и длительного употребления преднизолона (P < 0,001). Профилактическое введение соевых изофлавонов эффективно предупреждало падение активности каталазы (P > 0,25 – 0,7). Несмотря на то, что активность СОД после применения изофлавонов у ОЭ крыс повысилась недостоверно (P₁ > 0,2), её значения одновременно не отличались и от показателя у псевдооперированных животных (P > 0,5). Введение изофлавонов крысам на фоне алиментарного и преднизолонового ОП полностью предотвращало падение активности СОД в костной ткани.

Таким образом, воздействие различных остеопоротических факторов приводит к одинаковым метаболическим изменениям в костной ткани. К ним относятся повышение активности фосфатаз, эластазы на фоне снижения ОПА, активности антиоксидантных ферментов СОД и каталазы. Эти нарушения, на наш взгляд, являются причиной снижения плотности костей. Особое внимание необходимо обратить на костную эластазу, рост активности которой имеет особое патогенетическое значение при развитии ОП и направлен на разрушение органической основы костной ткани [4].

Проведенные исследования также показали способность препаратов с биофлавоноидами, с изофлавонами в частности, предотвращать падение плотности костной ткани, индуцированное овариэктомией, преднизолоном и алиментарным дефицитом кальция, фосфора и белка. Патологические механизмы остеопротекторного действия изофлавонов осуществляются, прежде всего, за счёт ингибирования активности костной эластазы, вследствие чего тормозится резорбция белковой основы костной ткани, а также благодаря их влиянию на антиоксидантные ферменты и фосфатазы костной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

- Беневоленская Л.И. Проблема остеопороза в современной медицине / Л.И. Беневоленская // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2003. – № 7. – С. 15 – 18.
- Гирин С.В. Модификация метода определения активности каталазы в биологических субстратах / С.В. Гирин // Лабор. диагностика. – 1999. – № 4. – С. 45 – 46.
- Кропотов А.В. Влияние экстракта

элеутерококка и иприфлавона на развитие глюкокортикоидного остеопороза / А.В. Кропотов, О.Л. Колодняк, В.М. Колдаев // Бюл. exper. биол. и мед. – 2002. – Т. 133, № 3. – С. 295 – 297.

4. Макаренко О.А. Деструктивна роль еластази в патогенезі остеопорозу та інгібіція її активності флавоноїдами / О.А. Макаренко // Медична хімія. – 2011. – Т. 13, № 2 (47). – С. 107 – 111.

5. Макаренко О.А. Биохимические механизмы остеотропного действия флавоноидов. Дис... д-ра. биол. наук.: 03.00.04. – Одесса, 2011 – 396 с.

6. Металлопротеиназы матрикса нормальных тканей человека / П.З. Хасигов, О.В. Подобед, С.А. Кцоева и др. // Биохимия. – 2001. – Т. 66, Вып. 2. – С. 167 – 179.

7. Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика, профилактика и лечение: Монография / Акад. мед. наук Украины; под ред. Н.А. Коржа, В.В. Поворознюка, Н.В. Дедух, И.А. Зупанца. – Х.: Золотые страницы, 2002. – 648 с.

8. Поворознюк В.В. Фитоэстрогены в профилактике и лечении климактерических нарушений у женщин в постменопаузальном периоде / В.В. Поворознюк, Н.В. Григорьева, Е.В. Бондаренко // Doctor. Журнал для практикующих врачей. – 2003. – № 6. – С. 73 – 75.

9. Поворознюк В.В., Григорьева Н.В. Менопауза и костно-мышечная система. – К.: ИПЦ «Экспресс», 2004. – 512 с.

10. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии – М.: Медицина, 2000. – С. 117 – 119.

11. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её активности в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, И. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678 – 681.

12. Шабров А.В., Дадали В.А., Макаров В.Г. Биохимические основы действия микрокомпонентов пищи. – М.: Аввалон, 2003. – 184 с.

13. Щепёткин И.А. Остеокластическая резорбция кости / И.А. Щепёткин // Успехи соврем. биологии. – 1996. – Т. 116, № 4. – С. 474 – 492.

14. Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза. Методические рекомендации / А.П. Левицкий А.П., Макаренко О.А., Деньга О.В. и др. – Киев: ГФЦ МЗ Украины «Авиценна», 2005. – С. 31 – 38.

15. Экспериментальный остеопороз / В. Фролькис, В. Поворознюк, О. Евтушенко, Н. Григорьева // Doctor. – 2003. - № 6. – С. 48 – 52.

16. Andersen O.M., Markham K.R. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Application. – New York : CRC Press, 2005. – 1256 p.

17. Button V.J. Phytoestrogens for osteoporosis / V.J. Button, N. Patel // Clinical Rev. in Bone and Mineral metabolism. – 2004. – Vol. 2, N 4. – P. 341 – 356 (16).