УДК 577.15+616-092: 616.71-007.234+57.04.2.2-056.13[547.814.5]

О. А. Макаренко
ІНСТИТУТ СТОМАТОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ, ОДЕСА

ДЕСТРУКТИВНА РОЛЬ ЕЛАСТАЗИ В ПАТОГЕНЕЗІ ОСТЕОПОРОЗУ ТА ІНГІБІЦІЯ ЇЇ АКТИВНОСТІ ФЛАВОНОЇДАМИ

На підставі результатів 9 експериментальних досліджень на щурах розкрита деструктивна роль еластази кісткової тканини при моделюванні остеопорозу різного генезу, фторидній інтоксикації і старінні тварин. Як інгібітори еластази розглядаються флавоноїди, які різною мірою пригнічують активність цієї сильної деструктивної протеїнази. Проведені дослідження розширюють уявлення про патогенетичну роль еластази і вказують напрям пошуку інгібіторів еластази, зокрема флавоноїдів, для підвищення ефективності профілактики і лікування остеопорозу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **експериментальний остеопороз, еластаза, флавоноїди.**

ВСТУП. При розгляді патологічної ролі протеїназ особливу увагу привертає найбільш сильний деструктивний фермент – еластаза (КФ 3.4.21.36 і 37), зростання активності якої в позаклітинному просторі розглядають як основну ланку патогенезу захворювань, пов'язаних з інфільтрацією тканин активованими нейтрофілами [9].

Еластаза руйнує білки плазми і практично всі компоненти сполучної тканини, порушуючи процеси захисту й адаптації організму [2]. Крім того, еластаза шляхом обмеженого протеолізу активує ряд матриксних металопротеїназ, запускаючи каскад деградації структурних білків. Відомо, що ці протеїнази секретуються в латентній проформі й потребують активації для реалізації своєї протеолітичної діяльності. Так, при ревматоїдному запаленні синовіальними фібробластами секретуються неактивні зимогени колагенази, желатинази і стромелізину, які еластаза перетворює на активні форми [9]. Деструкція органічного матриксу кісткової тканини здійснюється цим же "протеолітичним коктейлем", що діє в різних діапазонах pH, поетапно розщеплює молекули колагену і, можливо, є пусковим у патологічній резорбції кісткової тканини при розвитку остеопорозу [12]. Тому є актуальними дослідження початкових процесів резорбції кісткової тканини і пошук їх ефективних інгібіторів. Проведення цього дослідження зумовлене також значним поширенням остеопорозу та інших захворювань з ураженням мінералізованих тканин та відсутністю переконливих даних про особливості лікувально-профілактичної дії препаратів флавоноїдів.

Тому метою даної роботи було розкрити деструктивну роль еластази в патологічній резорбції кісткової тканини при розвитку експериментального остеопорозу та дослідити інгібуючий вплив флавоноїдів на цю протеїназу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Проведено 8 експериментів на 180 щурах-самках лінії Вістар, у яких відтворювали остеопороз різного генезу (4 серії овариоектомії [14], 2 серії – шляхом аліментарного дефіциту кальцію і білка [13], 1 серія – введення преднізолону [5], 1 серія – фторидна інтоксикація [3]), а також досліджували в онтогенезі вікові зміни кісткової тканини в 100 інтактних самців (вік – 6–24 місяці). Після моделювання патології щурів виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) шляхом розтину магістральних судин. Виділяли стегнові кістки: в гомогенатах однієї (75 мг/мл цитратного буфера, pH 6,1) визначали активність еластази по гідролізу N-t-BOC-L-alanin-p-nitrophenyl ester ("Sigma", США) [18], а в другій – щільність кістки за методом, основаним на визначенні маси кістки та її об'єму при зануренні у воду [11].

Для визначення впливу флавоноїдів на еластазу виділяли цей ензим з перитонеального гнійного ексудату методом афінної хроматографії, використовуючи як афінний ліганд

© О. А. Макаренко, 2011.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

інгібітор Баумана-Бірк з бобів сої [10]. Антиеластазну активність флавоноїдів in vitro визначали за залишковою активністю еластази в реакції гідролізу N-t-BOC-L-alanin-p-nitrophenyl ester (“Sigma”, США) [18]. В роботі використовували стандарти флавоноїдів: кверцетин, ціанідин, апігенін, лютеолін, нарингенін, геністеїн, дайдзеїн, гесперетин, рутин, катехін, гесперидин і нарингін (“Sigma”, США) та рослинні флавоноїди: байкалін, флаволігнани, софорикозид (ДУ “Державний науковий центр лікарських засобів та медичної продукції”, Харків). Концентрат ізофлавонів отримували із соєвого борошна шляхом триразової екстракції етанолом за методом [1]. Препарати флавоноїдів розчиняли в диметилсульфоксиді, а потім у воді в декількох концентраціях, що дозволяли визначити концентрацію речовини, яка викликає 50 % інгібування швидкості реакції (IC_{50}). Значення IC_{50} визначали з використанням рівнянь регресії і програми “MS Excel” та виражали в молях (М).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Про наявність остеодистрофії судили за щільністю стегнової кістки. Визначення цього показника в щурів після моделювання остеопорозу різного генезу або при фторидній інтоксикації показало, що залежно від патогенного чинника, віку тварин і тривалості відтворення моделі щільність стегнової кістки щурів знижувалася на 1,0–10,3 % (табл. 1). Дефіцит аліментарних факторів або оваріоектомія викликали більш суттєве зниження цього показника ($p<0,001$), ніж преднізолон ($p<0,05$) або високі дози фтору ($p>0,4$).

Біохімічні дослідження показали різке підвищення активності кісткової еластази на 20,0–154,0 % при моделюванні патології. Після оваріоектомії в щурів встановлено, що чим більше знижується щільність кістки, тим значніше підвищується активність еластази в кістковій тканині. Глюкокортикоїдний остеопороз викликав зменшення щільності кістки, яке посилювалося з часом введенням преднізолону. При цьому ступінь підвищення активності кісткової еластази за 30 днів збільшився, потім знижувався, що розглядалось нами як компенсаторна реакція (табл. 1). Дослідження щільності кісток та активності еластази в кістковій тканині здорових щурів в онтогенезі визначило віковий період з максимальною і стабільною щільністю кісток – це 6–18 місяців. З 9-го місяця збільшувалась активність еластази в кістковій тканині, а в 21 місяць – зменшувалась щільність кісток. Отже, початкові вікові зміни в кістковій тканині пов’язані з активацією еластази.

Аналіз отриманих результатів показав, що зниження щільності кістки при експериментальному остеопорозі, фторидній інтоксикації або старінні супроводжується зростанням активності еластази в кістковій тканині. Проведені дослідження дозволяють зробити висновок про те, що еластаза відіграє деструктивну роль при патологічній і віковій резорбції кісткової тканини. Підтвердженням цього є специфічність еластази до колагену I типу, що становить основу білкової матриці кісток. Крім того, еластаза шляхом обмеженого протеолізу активує матриксні металопротеїнази: колагеназу, желатиназу і стромелізин [9], що беруть участь у деградації колагену кісткової тканини [12].

В літературі є поодинокі повідомлення про інгібуючу дію флавоноїдів на активність деяких протеїназ [4, 7, 16]. На підставі цього виникає питання про можливий вплив флавоноїдів на активність еластази, зі зростанням активності якої починається деструкція кісткової тканини. Щоб відповісти на дане питання, а також з метою пошуку ефективних інгібіторів еластази і резорбції кісткової тканини нами була виділена еластаза з гнійного перитонеального ексудату методом афінної хромато-

Таблиця 1 – **Щільність стегнової кістки та активність еластази при моделюванні остеопорозу в щурів**

Патогенний чинник	Тривалість	Зниження щільності кісток, %	Підвищення активності кісткової еластази, %
Оваріоектомія	1 міс.	6,4	68,2
		4,4	63,8
		1,1	40,6
		1,0	33,3
Аліментарний дефіцит	2,5 міс.	5,5	56,5
	4 міс.	10,3	25,9
Преднізолон	15 днів	1,4	20,0
	30 днів	2,3	154,0
	60 днів	6,1	46,9
Фторінтоксикація	1 міс.	1,0	21,9
Вікові зміни	6–24 міс.	1,4	146,4

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

графії. Вихід ферменту склав 94,3 % зі ступенем очищення в 69,9 раза. В дослідженнях in vitro за показником IC_{50} було визначено здатність стандартів і рослинних флавоноїдів інгібувати активність виділеної еластази (табл. 2).

Серед стандартів кверцетин найактивніше інгібував еластазу, незначно поступалися йому ціанідин, апігенін і лютеолін. Інгібіторна активність нарингеніну, геністеїну, дайдзеїну, гесперетину була в 4–6 разів нижчою порівняно з кверцетином. Препарати рутин, катехін і нарингін не впливали на еластазу. Інгібіторна активність рослинних флавоноїдів знижувалася у ряді байкалін > ізофлавони > флаволігнани > софорикозид. Отримані нами результати суттєво розширили перелік флавоноїдів, що інгібують еластазу, який до наших досліджень, за даними I. Dell'Aica et al. [17] і F. Meloni et al. [15], складався з трьох речовин: еріодиктіолу, гіперозиду й епігалокатехінгалату.

При порівнюванні активності досліджених нами флавоноїдів і відомих інгібіторів лейкоцитарної еластази за рівнем IC_{50} важливо відзначити, що інгібуюча здатність найбільш активних інгібіторів еластази (кверцетину, лютеоліну, апігеніну, ціанідину, байкаліну й ізофлавонів) приблизно в 60–100 разів нижча, ніж ендогенного α_1-інгібітора протеїназ, який має вирішальне значення в інактивації еластази при запаленні. Але, з іншого боку, ці флавоноїди володіють вищою активністю, ніж деякі натуральні та синтетичні інгібітори лейкоцитарної еластази. Так, рівень IC_{50} кверцетину в 20 разів нижчий за цей показник в еластиналю, в 25–100 разів менший, ніж у цефалоспоринів, β-лактаму і трифлуорометилкетонів, які використовують для лікування запальних захворювань. Інгібування еластази кверцетином також більш виражене порівняно з дією прийнятих стандартних інгібіторів серинових протеїназ, таких, як овомукоїд, фенілметилсульфонілфторид і апротинін.

З метою з'ясування типу інгібування флавоноїдами еластази було проведено дослідження за визначенням констант Міхаеліса, які визначали графічно за допомогою рівнянь регресії по залежності зворотних координат 1/V від 1/[S] (де V – швидкість реакції, а [S] – концентрація субстрату) для реакцій, що перебігають за відсутності й присутності інгібітора (флавоноїду), – графіки Лайнуівера–Берка. Графічний аналіз і розрахунок константи Міхаеліса показали, що при взаємодії флавоноїду з еластазою графік і точка перетину з віссю абсцис зрушуються вправо. Константа Міхаеліса при цьому збільшується в 1,26-2,34 раза. Отримані результати свідчать про те, що флавоноїди проявляють ефект частково конкурентного (або змішаного) інгібування еластази. Тобто флавоноїди не з'єднуються з активним центром ферменту, але впливають на його структуру, зв'язуючись із поряд розташованою ділянкою настільки близько до активного центру, що відбувається його деформація, внаслідок чого спорідненість ферменту до субстрату зменшується і швидкість перебігу реакції знижується.

Таким чином, наші дослідження не тільки доповнили перелік флавоноїдів з антиеластазною властивістю 16 сполуками, але і вперше показали механізм взаємодії цих речовин з еластазою. Крім того, в численних експериментах на щурах нами підтверджено, що профілактичне введення препаратів флавоноїдів запобігає зниженню щільності стегнової кістки щурів і збільшенню активності еластази в кістковій тканині, викликаному моделюванням остеопорозу [6, 8].

Таблиця 2 – **Інгібування флавоноїдами еластази**

Флавоноїди		IC_{50}, М
Флавоноїди "Sigma"	Кверцетин	$0{,}799 \cdot 10^{-3}$
	Лютеолін	$1{,}390 \cdot 10^{-3}$
	Апігенін	$1{,}543 \cdot 10^{-3}$
	Ціанідин	$1{,}175 \cdot 10^{-3}$
	Нарингенін	$3{,}309 \cdot 10^{-3}$
	Гесперетин	$4{,}398 \cdot 10^{-3}$
	Геністеїн	$3{,}760 \cdot 10^{-3}$
	Дайдзеїн	$4{,}563 \cdot 10^{-3}$
	Гесперидин	$6{,}919 \cdot 10^{-3}$
	Рутин	Неактивний
	Нарингін	Неактивний
	Катехін	Неактивний
Препарати рослинних флавоноїдів	Ізофлавони сої	$0{,}904 \cdot 10^{-3}$
	Байкалін	$1{,}921 \cdot 10^{-3}$
	Флаволігнани	$2{,}716 \cdot 10^{-3}$
	Софорикозид	$7{,}354 \cdot 10^{-3}$

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ВИСНОВКИ. 1. Зниження щільності стегнової кістки в щурів при експериментальному остеопорозі, фторидній інтоксикації або старінні супроводжується зростанням активності еластази в кістковій тканині, що дозволяє говорити про деструктивну роль еластази в патологічній резорбції кісткової тканини.

2. Встановлено інгібуючу активність флавоноїдів відносно лейкоцитарної еластази людини. Кінетичні дослідження показали частково конкурентний тип інгібування.

3. На підставі проведених досліджень запропоновано для застосування в комплексному лікуванні й профілактиці остеопорозу препарати флавоноїдів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барышева И. А. Особенности выделения и анализа изофлавонов из растительного сырья / И. А. Барышева, О. А. Макаренко, А. П. Левицкий // Вісник стоматології. – 2006. – № 3 (53), спецвипуск. – С. 9.

2. Биць Ю. В. Роль еластази та її інгібіторів у патогенезі артеріосклерозу / Ю. В. Биць, В. Є. Досенко // Проблемы медицины. – 1999. – № 9–10. – С. 10–17.

3. Горохивский В. Н. Лечебно-профилактическое действие комплекса адаптогенных препаратов на стоматологический статус у детей в зоне эндемического флюороза : дис. … канд. мед. наук / В. Н. Горохивский. – Одесса, 2001. – 191 с.

4. Калиман П. А. Влияние кверцетина на некоторые показатели системы протеиназа – ингибитор протеиназ у крыс при введении им хлорида кобальта / П. А. Калиман, А. А. Самохин, Л. М. Самохина // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 6. – С. 127–130.

5. Кропотов А. В. Влияние экстракта элеутерококка и иприфлавона на развитие глюкокортикоидного остеопороза / А. В. Кропотов, О. Л. Колодняк, В. М. Колдаев // Бюл. экспер. биологии и медицины. – 2002. – **133**, № 3. – С. 295–297.

6. Левицький А. П. Використання препарату остеовіту для профілактики глюкокортикоїдного остеопорозу / А. П. Левицький, О. А. Макаренко // Ендокринологія. – 2008. – **13**, № 1. – С. 92–97.

7. Макаренко О. А. Антипротеиназная активность флавоноидов / О. А. Макаренко, А. П. Левицкий, И. В. Ходаков // Вісник Одеського нац. університету. – 2010. – **15**, вип. 17, Біологія. – С. 29–36.

8. Макаренко О. А. Перспективы применения биофлавоноидов для профилактики постменопаузального остеопороза / О. А. Макаренко // Фітотерапія. Часопис. – 2007. – № 4. – С. 28–33.

9. Металлопротеиназы матрикса нормальных тканей человека / П. З. Хасигов, О. В. Подобед, С. А. Кцоева [и др.] // Биохимия. – 2001. – **66**, вып. 2. – С. 167–179.

10. Соевый ингибитор Баумана-Бирк как аффинный лиганд для выделения лейкоцитарной эластазы. Ингибирование гидролиза эластина, катализируемого лейкоцитарной эластазой / Т. В. Тихонова, Н. И. Ларионова, И. П. Гладышева, Н. Ф. Казанская // Биохимия. – 1993. – **58**, вып. 11. – С. 1669–1676.

11. Ходаков І. В. Спосіб визначення щільності кісток лабораторних тварин / І. В. Ходаков // Досягнення біології та медицини. – 2004. – № 2 (4). – С. 38–41.

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

13. Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза : метод. рекомендации / [А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, О. В. Деньга и др.]. – К. : ГФЦ МЗ Украины “Авиценна”, 2005. – С. 31–38.

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

15. Effects of 3’-hydroxyfarrerol (1dB 1031), a novel flavonoid agent, on phagocyte products / F. Meloni, P. Ballabio, M. Gorrini [et al.] // Inflammation. – 1995. – **19**. – P. 689–699.

16. Kuhad A. Highlights from the 3rd International Conference on Polyphenols and Health. Current trends in polyphenol research: from Mother Nature to Molecular mechanisms / A. Kuhad, K. Chopra // Drugs of the Future. – 2008. – **33** (3). – P. 249–287.

17. New phytoweapons to curb leukocyte elastase / I. Dell’Aica, R. Caniato, S. Biggin, S. Garbisa // Drugs of the Future. – 2006. – **31** (9). – P. 827–835.

18. Visser L. The use of p-nitrophenyl-N-test-butyloxycarbonyl-l-alaninate as subsrate for elastase / L. Visser, E. R. Blout // Biochem. Of biophys. Acta. – 1972. – **268**, № 1. – P. 275–280.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

О. А. Макаренко
ИНСТИТУТ СТОМАТОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ, ОДЕССА

ДЕСТРУКТИВНАЯ РОЛЬ ЭЛАСТАЗЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТЕОПОРОЗА И ИНГИБИРОВАНИЕ ЕЁ АКТИВНОСТИ ФЛАВОНОИДАМИ

Резюме

На основании результатов 9 экспериментальных исследований на крысах раскрыта деструктивная роль эластазы костной ткани при моделировании остеопороза разного генеза, фтористой интоксикации и старении животных. В качестве ингибиторов эластазы рассматриваются флавоноиды, в различной степени подавляющие активность этой мощной деструктивной протеиназы. Проведенные исследования расширяют представления о патогенетической роли эластазы и указывают направление поиска ингибиторов эластазы, в частности флавоноидов, для повышения эффективности профилактики и лечения остеопороза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **экспериментальный остеопороз, эластаза, флавоноиды.**

O. A. Makarenko
INSTITUTE OF DENTISTRY OF AMS OF UKRAINE, ODESSA

THE DESTRUCTIVE ROLE OF ELASTASE IN PATHOGENESIS OF OSTEOPOROSIS AND INHIBITION OF ITS ACTIVITY WITH FLAVONOIDS

Summary

On the basis of the results of 9 experimental studies with rats the destructive role of elastase of osseous tissue at simulation of osteoporosis of different genesis, fluoride intoxication and at rats aging, was disclosed. Flavonoids, depressing in different degree the activity of this powerful destructive proteinase, are observed like inhibitors of elastase. The held investigations widen the conception of the pathogenic role of elastase and show the direction of the search of elastase inhibitors, flavonoids in particular, for the raising the effectiveness of prevention and treatment of osteoporosis.

KEY WORDS: **experimental osteoporosis, elastase, flavonoids.**

Отримано 18.03.11

Адреса для листування: *О. А. Макаренко, Інститут стоматології АМН України, вул. Рішельєвська, 11, Одеса, 65026, Україна.*

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com