

УДК 577.161.2:612.015.6 + 612.751

ЕФЕКТИВНІСТЬ БІОФАРМАЦЕВТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ «МЕБІВІД» У ПОПЕРЕДЖЕННІ ПОРУШЕНЬ ОБМІНУ ВІТАМІНУ D₃ ТА КАЛЬЦІЮ ЗА АЛІМЕНТАРНОГО ОСТЕОПОРОЗУ

С. В. Комісаренко
Л. І. Апуховська
В. М. Рясний
А. В. Калашніков
М. М. Великий

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: veliky@biochem.kiev.ua

Показано, що за аліментарного остеопорозу суттєво (майже в 3 рази) знижується рівень 25-гідроксихолекальциферолу (25ОНD₃) у сироватці крові, за вмістом якого діагностують ступінь забезпеченості організму вітаміном D₃. Стан D-гіповітамінозу зумовлює зниження забезпеченості організму кальцієм, через його біологічно активну ультрафільтрувальну фракцію, та неорганічним фосфором. Водночас зростає активність лужної фосфатази та її ізоензимів у сироватці крові. У структурі тканини стегнової і великогомілкової кісток шурів спостерігається стоншення шару компактної тканини, порушення формування остеонів, вставних пластинок та внутрішніх прилеглих кісткових пластинок. В епіфізарному хрящі кісток виявлено потовщення, переважно за рахунок зони гіпертрофованих хрящових клітин, та сповільнення процесу вrostання судин, що загалом свідчить про гальмування остеогенезу.

Біофармацевтичний препарат «Мєбівід» (комплекс вітаміну D₃, кальцію карбонату та бісфосфонату — динатрієвої солі метиленбісфосфонової кислоти) у разі введення його шурам з аліментарним остеопорозом нормалізує структурно-функціональний стан кісткової тканини, усуває порушення обміну вітаміну D₃ і мінерального обміну, що свідчить про високу специфічну ефективність препарату в попередженні порушень метаболізму за остеопорозу.

Ключові слова: аліментарний остеопороз, вітамін D₃, бісфосфонати, динатрієва сіль метиленбісфосфонової кислоти, кальцій, біофармацевтичний препарат «Мєбівід».

Захворювання опорно-рухового апарату, в основі розвитку яких лежать порушення структурно-функціонального стану кісткової тканини, як правило, супроводжуються остеопорозом [1]. Причинами розвитку остеопорозу є зниження функціональної активності клітин, що веде до зменшення щільності та маси кісткової тканини, підвищення крихкості кісток і збільшення ризику їх переломів. З остеопорозом пов'язано 70% усіх травм у людей, у тому числі переломи кісток та шийки стегна [2]. Одним із важливих чинників, що сприяє розвитку остеопорозу, є недостатність кальцію в організмі внаслідок хронічного D-гіповітамінозу, зумовленого недостатнім надходженням холекальциферолу в організм або порушенням його обміну, зокрема процесів гідроксилювання [3, 4]. Особливо виражена недо-

статність забезпеченості вітаміном D₃ у людей похилого віку, жінок постклімактеричного періоду, у разі довготривалого приймання кортикостероїдів, при онкологічних захворюваннях кісткової тканини тощо [4, 5].

У лікуванні захворювань кісткової тканини поряд з адекватним призначенням кальцію вкрай важливим є забезпечення організму вітаміном D₃, оскільки за його недостатності порушується не лише мінеральний обмін, але передусім процеси проліферації та диференціації клітин, синтез специфічних протеїнів і ензимів, що не дає змоги нормально функціонувати тканинам організму [6]. Новим перспективним напрямом у терапії остеопорозу є широке використання бісфосфонатів — синтетичних аналогів природного неорганічного пірофосфату, які є потужними інгібіторами остеокластопосе-

редкової резорбції кісткової тканини [7, 8]. За однакової з пірофосфатом біологічної активності бісфосфонати мають низку суттєвих переваг, зокрема більш високу афінність до мінеральних компонентів кісток, що зумовлює утворення стабільних комплексів з кальцій-фосфатами гідроксіапатитів, період півжиття яких у в кістковій тканині людини — від декількох місяців до року [9]. Здатність до комплексоутворення забезпечує подвійну дію бісфосфонатів стосовно процесів мінералізації-демінералізації кісткової тканини: з одного боку вони інгібують кальцифікацію, а з іншого, — гальмуючи розпад гідроксіапатиту, ефективно пригнічують резорбцію кісток. Тому призначення бісфосфонатів зменшує ризик переломів стегна, хребців та сприяє нормалізації структури кісткової тканини [8].

Механізм дії бісфосфонатів полягає у зниженні активності остеокластів і може реалізуватися шляхом утворення нездатних до гідролізу аналогів АТР, що уможлиблює інгібування АТР-залежних процесів у клітинах та апоптоз остеокластів. Ефективність бісфосфонатів великою мірою визначається особливостями їхньої структури. Зокрема, нітрогенвмісні бісфосфонати інгібують активність фарнезилпірофосфатсинтази, ключового регуляторного ензиму в синтезі мевалонової кислоти та холестеролу. Як наслідок, гальмується процес ізопентенілювання — посттрансляційної модифікації протеїнів, включаючи невеликі GTP-протеїни, такі як Rab, Rac, Rho, що відіграють центральну роль у регуляції ключових процесів клітинної активності остеобластів, а їх порушення індукує апоптоз [9, 10].

Метою роботи було дослідити ефективність комплексного біофмацевтичного препарату «Мебівід», у складі якого динатрієва сіль метиленбісфосфонової кислоти поєднана з регуляторами структурно-функціонального стану кісткової тканини — кальцієм і вітаміном D₃, у попередженні порушень обміну вітаміну D₃ та мінерального обміну за експериментального аліментарного остеопорозу.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на щурах Wistar масою 100 ± 5 г. Аліментарну модель остеопорозу створювали, утримуючи щурів на D-гіповітамінозному раціоні зі збалансованим вмістом кальцію (1,2%) та фосфору (0,7%) протягом 30 діб згідно з описаним раніше [4]. Контрольних тварин утримували

на повноцінному раціоні віварію. У період акліматизації (тиждень) і під час експерименту тварини перебували у віварії при температурі 18–22 °С, вологості 50–60%, природному світловому режимі «день-ніч» у стандартних пластикових клітках. Через 30 діб на тлі розвитку характерних ознак остеопорозу щурів розділяли на 2 групи: першу групу утримували далі лише на раціоні без вітаміну D₃, щурам другої групи за допомогою зонду внутрішньошлунково щодоби протягом 30 діб вводили препарат «Мебівід» у вигляді водної емульсії об'ємом 0,1 мл.

Вміст активних метаболітів вітаміну D₃ визначали після екстракції їх з 0,5 мл сироватки крові сумішшю хлороформ:метанол (2:1), послідовного хроматографічного розділення на колонках з оксидом алюмінію та LH-20 з наступним кількісним визначенням методом радіоконкурентного зв'язування згідно з описаним [11, 12].

Рівень кальцію та загальну активність лужної фосфатази в сироватці крові вимірювали за допомогою біотест-наборів (ЛАХЕМА, Чехія), активність ізоензимів лужної фосфатази — з використанням інгібіторів, як описано [13]. Вміст неорганічного фосфору в сироватці крові оцінювали після осадження протеїнів 12%-м розчином ТХУ методом Дусе [14]. Остеометричні та гістоморфологічні дослідження зрізів діафіза та проксимального епіфізарного хряща великогомілкової кістки щурів проводили згідно з [4]. Зольність кісткової тканини визначали методом сухої мінералізації при температурі 500–600 °С після її знежирювання гексаном упродовж 7 діб і розраховували відносно маси кісткової тканини. Вміст мінеральних компонентів у золі встановлювали вищеописаними методами після розчинення золи в 0,5 мл HCl та подальшого розведення бідистильованою водою у співвідношенні 1:40.

Усі маніпуляції з тваринами проводили під легким ефірним наркозом без порушень норм гуманного поводження з лабораторними тваринами, що не суперечить загальноприйнятим біоетичним нормам, з дотриманням відповідних міжнародних положень стосовно проведення експериментальних робіт. Статистичну достовірність результатів оцінювали в програмі SigmaPlot2000 з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

В основі розвитку остеопорозу лежать порушення рівноваги між активністю остеобластів і остеокластів у процесі ремоделювання

кісткової тканини у бік зниження остеобластичної активності, яка контролює процес утворення нової кісткової тканини та її мінералізацію. У результаті виникають порушення структурно-функціональної організації кісткової тканини і мінерального обміну в ній [1, 4, 8].

Результати дослідження остеометрії та вмісту мінеральних компонентів кісткової тканини свідчать, що у тварин, яких утримували на D-гіповітамінозному раціоні протягом двох місяців, коротшає довжина стегнової (на 25,0%) та великогомілкової (на 21,2%) кісток, а також зменшується товщина дистального (на 13,0%) та проксимального (на 15,9%) епіметафізів. Відзначається зниження маси і зольності (на 29,4%) великогомілкової кістки, що супроводжується зниженням вмісту кальцію (на 45,4%) та фосфору (на 33,2%) в кістковій тканині (табл. 1).

Ці результати підтверджуються гістоморфологічними дослідженнями, які показують, що у тварин з аліментарним остеопорозом, порівняно з тваринами контрольної групи, відбувається зміна структурно-функціональної організації як кісткової тканини, так і епіфізарного хряща. Для кісткової тканини діафіза контрольних тварин характерними є чітка структурованість, добре сформовані зовнішні та внутрішні прилеглі кісткові пластини і остеонна зона компактного шару кістки (рис. 1). У щурів з остеопорозом мали місце порушення формування та суттєве зменшення висоти зовнішніх і внутрішніх загальних довколишніх кісткових пластин, а іноді їх відсутність (особливо внутрішніх). Середній, остеонний шар також зазнав перебудови, яка характеризувалася збільшенням кількості та роз-

ширенням центральних судинних і пронизних каналів, а також посиленням рисунка ліній цементування, що свідчить про порушення метаболізму кісткової тканини. Інтегральним структурним показником цих процесів є загальне стоншення шару компактної кісткової тканини стегнової та великогомілкової кісток, порушення формування остеонів, вставних пластинок та внутрішніх прилеглих пластинок (рис. 1).

В епіфізарному хрящі кісток, які формують колінний суглоб, також відбуваються порушення структури та функції, що характеризуються диспропорцією росту кісток —

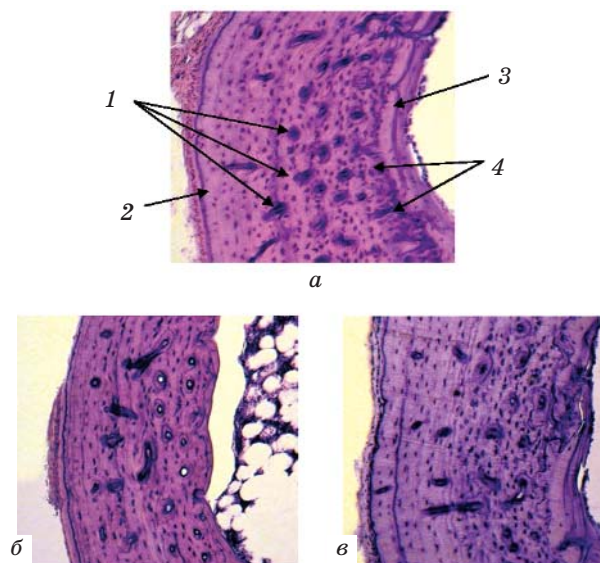


Рис. 1. Поперечні зрізи діафіза (нижньої третини) великогомілкової кістки щурів: а — контроль; б — аліментарний остеопороз; в — щури з аліментарним остеопорозом, що отримували «Мевівід» упродовж 30 діб. Остеони (1), зовнішні (2) та внутрішні (3) прилеглі кісткові пластинки і пронизні судинні канали (4). Гематоксилін і еозин. $\times 60$

Таблиця 1. Остеометричні показники та вміст мінеральних компонентів у кістковій тканині щурів за аліментарної форми остеопорозу та введення препарату «Мевівід» ($M \pm m, n = 10$)

| Досліджувані показники | Контроль | Аліментарний остеопороз | Остеопороз + «Мевівід» |
|--|----------------|-------------------------|------------------------|
| Стегнова кістка | | | |
| Довжина, мм | $32,8 \pm 1,8$ | $24,6 \pm 1,3^*$ | $30,1 \pm 0,9^\#$ |
| Товщина дистального епіметафізу, мм | $6,20 \pm 0,2$ | $5,40 \pm 0,1^*$ | $5,8 \pm 0,3$ |
| Великогомілкова кістка | | | |
| Довжина, мм | $36,3 \pm 1,2$ | $28,6 \pm 0,8^*$ | $33,9 \pm 1,3^\#$ |
| Товщина проксимального епіметафізу, мм | $6,3 \pm 0,3$ | $5,3 \pm 0,1^*$ | $5,9 \pm 0,2^\#$ |
| Зольність, % | $56,8 \pm 2,5$ | $40,1 \pm 1,8^*$ | $54,7 \pm 2,9^\#$ |
| Вміст кальцію, % | $41,0 \pm 1,5$ | $22,4 \pm 0,6^*$ | $41,7 \pm 2,4^\#$ |
| Вміст фосфору, % | $16,3 \pm 0,7$ | $10,9 \pm 0,3^*$ | $16,9 \pm 0,9^\#$ |

* Різниця порівняно з контролем вірогідна ($P < 0,05$).

^\# Різниця порівняно з аліментарним остеопорозом вірогідна ($P < 0,05$).

поздовжнього та в ширину. Гістометрично у тварин виявляли потовщення (збільшення висоти) епіфізарного хряща переважно за рахунок зони гіпертрофованих хрящових клітин. Крім того, сповільнювалось вrostання судин в епіфізарний хрящ та з'являлись численні безклітинні ділянки. Зона первинної спонгіози практично не виявлялась, що свідчить про гальмування остеогенезу і посилене розростання хрящових клітин (рис. 2). Виявлені в остеометричних та гістоморфологічних дослідженнях зміни структурно-функціональної організації кісткової та хрящової тканин підтверджують розвиток остеопорозу у піддослідних тварин.

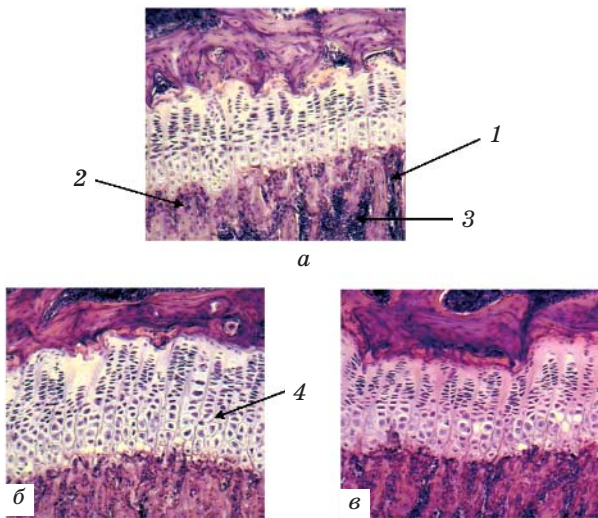


Рис. 2. Зональна структура проксимального епіфізарного хряща великогомілкової кістки щурів:

a — контроль; *б* — аліментарний остеопороз; *в* — щури з аліментарним остеопорозом, що отримували «Мевівід» упродовж 30 діб. Скостенілі звапновані гіпертрофовані хрящові клітини (1); формування первинних (2) та вторинних (3) кісткових перекладок; потовщення зони гіпертрофованих хрящових клітин (4). Гематоксилін та еозин. $\times 100$

Відомо, що утримання щурів на D-гіповітамінному раціоні зумовлює гальмування процесів гідроксилування холекальциферолу і знижує утворення біологічно активних, гідроксильованих форм вітаміну D_3 і відповідно спричинює порушення структурно-функціональної організації кісткової тканини та мінерального обміну в організмі [4, 5]. Найширше використовуваним і достовірним показником забезпеченості організму вітаміном D_3 є вміст його гідроксильованої форми — 25-гідроксихолекальциферолу ($25\text{ OH}D_3$) у крові [3, 11].

Як свідчать результати, наведені на рис. 3, утримання щурів на D-гіповітамінно-

ному раціоні впродовж двох місяців призводило до зниження майже в 3 рази вмісту $25\text{OH}D_3$ у сироватці крові. За результатами аналізу сучасного стану забезпеченості вітаміном D_3 населення найбільш розвинених країн (США, Англія, Німеччина) оптимальний вміст $25\text{OH}D_3$ в сироватці крові має становити $175\text{--}200\text{ нмоль}\cdot\text{л}^{-1}$. Виявлений у дослідних щурів вміст $25\text{OH}D_3$ в сироватці крові дорівнює $34,0\pm 3,7\text{ нмоль}\cdot\text{л}^{-1}$, що згідно з класифікацією забезпеченості вітаміном D_3 характеризується як стан глибокого порушення забезпеченості організму холекальциферолом — D_3 -вітамінний дефіцит [15, 16].

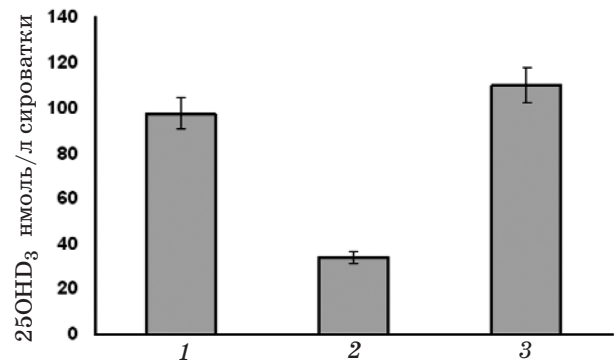


Рис. 3. Вплив препарату «Мевівід» на вміст $25\text{OH}D_3$ у сироватці крові щурів за аліментарного остеопорозу ($M\pm m$, $n = 20$):

1 — контроль; 2 — аліментарний остеопороз; 3 — аліментарний остеопороз + «Мевівід».

Різниця порівняно з контролем вірогідна ($P < 0,05$).

Різниця порівняно з аліментарним остеопорозом вірогідна ($P < 0,05$)

Зниження надходження або порушення обміну вітаміну D_3 в організмі за остеопорозу зумовлює негативний баланс кальцію, свідченням розвитку якого є виражена гіпокальціємія. Рівень кальцію в сироватці крові є однією з найдосконаліших констант організму. Його добові коливання не перевищують 3%, що є необхідною умовою нормального функціонування нервової системи, м'язів, процесів згортання крові, підтримки структури і проникності клітинних мембран, секретії та дії гормонів тощо. Підтримання рівня кальцію та інших мінеральних компонентів у сироватці крові у вузьких фізіологічних межах за рахунок посилення кишкової абсорбції кальцію з харчових продуктів, активації його реабсорбції в процесі ниркової фільтрації та мобілізації кальцію з кісткової тканини забезпечують нормальне функціонування тканин і є одним з основних

виявів участі вітаміну D₃ в регуляції мінерального обміну [2, 4, 5]. Показано, що у відповідь на зниження вмісту кальцію в сироватці крові посилюється секреція паратиреоїдного гормону, функція якого полягає у підвищенні ниркової реабсорбції кальцію та активації 25(OH)D₃-1α-гідроксилази нирок. Разом з тим 1,25(OH)₂D₃ інгібує синтез і секрецію паратиреоїдного гормону, взаємодіючи з негативним елементом відповіді на вітамін D₃ (VDRE) гена цього гормону та спричинюючи його супресію [6]. Водночас 1,25(OH)₂D₃ підвищує чутливість кальційчутливих рецепторів клітин паратиреоїдної залози до їх інгібування кальцієм і, тим самим, регулює синтез та секрецію гормону. Тому за умови недостатності вітаміну D високий вміст паратиреоїдного гормону активує остеобласти, які стимулюють перетворення преостеокластів на зрілі остеокласти. У свою чергу остеокласти посилюють розчинення мінералізованого матриксу кісткової тканини та спричинюють розвиток остеопенії, остеопорозу, підвищуючи ризик переломів [17, 18].

У сироватці крові щурів, у яких розвивався остеопороз, загальний вміст кальцію істотно (на 29,5%) знижувався (табл. 2). Відомо, що кальцій у сироватці крові представлений декількома функціональними формами. Зокрема невелика його частина зв'язана з протеїнами (альбуміном та глобулінами), тоді як переважна більшість кальцію перебуває в ультрафільтрувальній формі, що об'єднує іонізований (85%) та хелатований (до 15%) з цитатом, фосфатами та бікарбонатом кальцій. За остеопорозу вміст протеїнзв'язаного кальцію суттєво не змінювався порівняно із цим показником у контрольних тварин. Зміна рівня загального кальцію за остеопорозу відбувається передусім за рахунок його ультрафільтрувальної фракції, вміст якої значно (на 31,4%) знижувався. Співвідношення між різними формами кальцію може змінюватися залежно від фізіологічного

стану організму. Виявлене в наших дослідженнях зниження співвідношення ультрафільтрувальної форми до протеїнзв'язаної з 10,2 до 7,8 свідчить про виражене порушення мінерального обміну (табл. 2). Гіпокальціємія за остеопорозу супроводжувалася слабо вираженою гіпофосфатемією, вміст фосфатів у сироватці крові знижувався на 25,2%. На тлі гіпокальціємії та гіпофосфатемії, які були охарактеризовані за змінами вмісту різних форм кальцію та фосфатів у сироватці крові, виявлено чітко виражене зниження мінералізації кісткової тканини (табл. 1).

Поряд із вмістом кальцію та фосфатів важливим показником мінерального обміну в організмі є активність лужної фосфатази — ензиму, що забезпечує гідроліз фосфорно-ефірних зв'язків та перенесення фосфат-іонів на органічні компоненти перичелюлярного матриксу кісткової тканини. Розрізняють кісткову, кишкову та плацентарну ізоформи ензиму, що дає змогу використовувати їх з метою діагностики захворювань відповідних органів [11, 14]. Підвищення активності ензиму в сироватці крові виявляється в разі рахіту у дітей, при захворюваннях кісткової тканини, пов'язаних з підвищенням активності остеобластів чи розпадом кісткової тканини, при карциномі кісткової тканини, метастазах пухлин у кістковій тканині, лімфогранулематозі з ураженням кісткової тканини. Тобто підвищення активності лужної фосфатази спостерігається не тільки у період інтенсивного росту кісткової тканини, але й при її ураженнях — остеопорозі та остеомалачії [1, 4, 18]. У разі захворювань кісткової тканини підвищення активності загальної лужної фосфатази відбувається головним чином за рахунок кісткового ізоензиму, який вважають маркером захворювання на остеопороз.

Як впливає з даних, наведених у табл. 2, у сироватці крові активність кісткової ізо-

Таблиця 2. Вплив препарату «Мєбівід» на мінеральний обмін та активність лужної фосфатази у сироватці крові за остеопорозу у щурів ($M \pm m$, $n = 20$)

| Досліджувані показники | Контроль | Аліментарний остеопороз | Аліментарний остеопороз + «Мєбівід» |
|--|-----------|-------------------------|-------------------------------------|
| Загальний кальцій, ммоль · л ⁻¹ | 2,24±0,04 | 1,58±0,01* | 2,31±0,04# |
| Протеїнзв'язаний кальцій, ммоль · л ⁻¹ | 0,20±0,01 | 0,18±0,02 | 0,23±0,01# |
| Ультрафільтрувальний кальцій, ммоль · л ⁻¹ | 2,04±0,01 | 1,40±0,01* | 2,10±0,03# |
| Фосфор неорганічний, ммоль · л ⁻¹ | 1,95±0,01 | 1,46±0,02* | 2,03±0,01# |
| Лужна фосфатаза, загальна, Од. · л ⁻¹ | 230,2±4,7 | 356,0±4,0* | 262,0±2,0# |
| Лужна фосфатаза, кишковий ізоензим, Од. · л ⁻¹ | 48,9±2,2 | 73,0±1,7* | 52,6±1,3# |
| Лужна фосфатаза, кістковий ізоензим, Од. · л ⁻¹ | 190,9±4,3 | 340,2±3,9* | 231,0±2,2# |

форми лужної фосфатази значно (майже в 4 рази) перевищує активність кишкової ізоформи ензиму. За остеопорозу зростає як загальна активність лужної фосфатази (на 54,7%), так і активність її кісткової ізоформи (на 78,2%). За недостатності вітаміну D₃ активність лужної фосфатази підвищується насамперед за рахунок ізоензиму кісткової тканини внаслідок збільшення кількості остеобластів — клітин, в яких синтезується цей ізоензим.

Отже, результати біохімічних, гістоморфологічних та остеометричних досліджень свідчать про розвиток характерних ознак остеопорозу під час тривалого утримання щурів на D-гіповітамінному раціоні. Аліментарна модель остеопорозу характеризується суттєвим зниженням вмісту 25ОНD₃ у сироватці крові, гіпокальціємією, гіпофосфатемією та чітко вираженими порушеннями формування структури й функції кісткової і хрящової тканин. Використання такої моделі є коректним у дослідженнях ефективності препаратів, що запобігають розвитку остеопорозу.

З метою корекції виявлених за остеопорозу порушень мінерального обміну нами було застосовано препарат «Мєбівід», у складі якого є динатрієва сіль метиленбісфосфонової кислоти — аналог природного неорганічного пірофосфату, поєднана з регуляторами структурно-функціонального стану кісткової тканини — вітаміном D₃ і кальцієм [19]. Враховуючи позитивний вплив компонентів препарату на функціональну активність кісткової тканини, вважали за доцільне дослідити синергізм їх дії у складі препарату.

Аналіз результатів остеометричних та гістоморфологічних досліджень показав, що призначення протягом 30 діб препарату «Мєбівід» щурам з розвиненим (чітко вираженим) остеопорозом, достовірно посилює ріст стегнової та великогомілкової кісток як у довжину, так і в ширину, який був суттєво загальмований за аліментарного остеопорозу (табл. 1). Водночас зростає загальна мінералізація кісткової тканини, зокрема зольність (на 36,4%), вміст кальцію (на 86,2%) та фосфору (на 55,0%) у золі порівняно з тваринами, що не отримували препарату.

Застосування препарату «Мєбівід», за даними гістологічного дослідження, сприяє відновленню структурно-функціональної організації компактної кісткової тканини та епіфізарного хряща. Шар компактної кісткової тканини потовщувався, відновлювалася структура зовнішніх та внутрішніх прилеглих кісткових пластинок і остеоонний шар діафіза (рис. 1). Висота епіфізарного

хряща зменшувалася, з'являвся шар первинної спонгіози на фоні потовщених кісткових перекладок вторинної спонгіози (рис. 2).

Підтримання фізіологічно оптимального рівня гідроксильованих похідних вітаміну D₃ є необхідною умовою нормального перебігу мінерального обміну, оскільки гормонально активні форми вітаміну D₃ регулюють процеси проліферації і диференціації клітин та узгоджують процеси хондрогенезу й остеогенезу в розвитку кісткової тканини [4, 5, 20]. Уведення препарату «Мєбівід» протягом місяця щурам з аліментарним остеопорозом зумовлювало посилення синтезу 25ОНD₃, вміст якого у сироватці крові зростав на 220% порівняно з групою тварин з остеопорозом (рис. 1). Адекватне забезпечення щурів з остеопорозом вітаміном D₃, метиленбісфосфонатом та кальцієм у складі препарату «Мєбівід» сприяло нормалізації вмісту загального кальцію, рівень якого порівняно з остеопорозом зростав у сироватці крові на 46,2% завдяки підвищенню рівня ультрафільтрувальної фракції на 50,0% (табл. 2). Аналогічна спрямованість змін неорганічного фосфору (вміст зростав на 39,1%) у сироватці крові зумовлює близькі значення співвідношення Ca/P, отримані в контрольних щурах (1,15±0,01) та з введенням препарату (1,14±0,02).

Нормалізація мінерального обміну під дією препарату на тлі остеопорозу корелює зі зниженням загальної активності лужної фосфатази та її ізоформ. Так, загальна активність у разі введення препарату зменшувалася на 26,5% порівняно з активністю за аліментарного остеопорозу й практично наближалась до значень контролю. Особливо відчутно (на 50,0%) знижувалася під дією препарату активність кісткового ізоензиму лужної фосфатази, однак залишалась вищою порівняно з контролем. Цей факт можна пояснити, беручи до уваги тривалість введення препарату та особливості обміну вітаміну D₃ і його гідроксильованих похідних в організмі: для холекальциферолу період півжиття становить близько 3 місяців, тимчасом як для 25ОНD₃ (основного метаболіту і транспортної форми) — 15 діб. Ще більш короткий період півжиття, лише 15 год, має гормональна форма вітаміну — 1α,25(ОН)₂D₃ [21].

Слід зазначити, що за остеопорозу у сироватці крові значно підвищується активність кишкового ізоензиму лужної фосфатази, яка забезпечує гідроліз органічних фосфорних ефірів та транспорт фосфатів у кишечнику. Активність цього ізоензиму регулюється вітаміном D₃ як на рівні синтезу, так і посттрансляційної модифікації молекул ензиму.

Зростання кишкової ізоформи ензиму в сироватці крові за остеопорозу може бути наслідком підвищеного його виходу з ентероцитів у кров унаслідок порушення структури мембран цих клітин. У групі щурів, яким вводили препарат «Мєбівід», активність цього ізоензиму в сироватці крові знижувалась порівняно з групою з остеопорозом і практично досягала показників у контрольних тварин, що корелює з нормалізацією обміну фосфатів в організмі за цих умов (табл. 1).

Таким чином, результати досліджень вмісту вітаміну D₃, мінерального обміну та структурно-функціонального стану кісткової тканини за експериментального аліментарного остеопорозу дають підстави зробити такі висновки. Утримання щурів на D-гіповітамінозному раціоні впродовж 30–60 дб зумовлює розвиток характерних ознак остеопору:

у сироватці крові істотно знижується вміст 25OHD₃, розвиваються гіпокальціємія і гіпофосфатемія, гістоморфологічно виявляються значні порушення формування структури кісткової і хрящової тканин. Уведення щурам з аліментарним остеопорозом комплексного препарату «Мєбівід» (комплекс вітаміну D₃, кальцію та бісфосфонату — динатрієвої солі метиленбісфосфонової кислоти) нормалізує структурно-функціональний стан кісткової тканини, усуває порушення мінерального обміну та обміну вітаміну D₃, що свідчить про високу специфічну ефективність препарату в запобіганні остеопорозу. Ефективність препарату зумовлена поєднаною дією бісфосфонату, механізм дії якого полягає у гальмуванні резорбції кісткової тканини, та вітаміну D₃, який активізує включення кальцію та фосфатів у структуру гідроксіапатитів.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Остеопороз* / Под ред. Воложина А. И., Оганова В. С. — М.: Практическая медицина, 2005. — 238 с.
2. Gass M., Dawson-Hughes B. Preventing osteoporosis-related fractures: an overview // *Am. J. Med.* — 2006. — V. 119, N 4, Suppl 1. — P. S3–S11.
3. Holick M. F. MrOs Is D-ficient // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2009. — V. 94, N 4. — P. 1092–1093.
4. Гайко Г. В., Калашников А. В., Бруско А. Т. *и др.* Вітамин D и костная система. — К.: Книга плюс, 2008. — 176 с.
5. Cranney A., Weiler H. A., O'Donnell S., Puil L. Summary of evidence-based review on vitamin D efficacy and safety in relation to bone health // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2008. — V. 88, N 2. — P. 513S–519S.
6. Bikle D. Nonclassic action of vitamin D // *J. Clin. Endocrin. Metab.* — 2009. — V. 94, N 1. — P. 26–34.
7. Fleurence R. L., Iglesias C. P., Johnson J. M. The cost effectiveness of bisphosphonates for the prevention and treatment of osteoporosis: a structured review of the literature // *Pharmacoeconomics.* — 2007. — V. 25, N 11. — P. 913–933.
8. Drake M. T., Clarke B. L., Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice // *Mayo Clin. Proc.* — 2008. — V. 83, N 9. — P. 1032–1045.
9. Russell R. G. Bisphosphonates: Mode of Action and Pharmacology // *Pediatrics.* — 2007. — V. 119, N S2. — P. S150–S162.
10. Kavanagh K. L., Guo K., Dunford J. E. et al. The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2006. — V. 103, N 20. — P. 7829–7834.
11. Ануховська Л. І., Великий М. М., Лотоцька О. Ю., Хоменко А. В. Роль вітаміну Е в регуляції процесу гідроксилування холекальциферолу за умов D-гіповітамінозу та D-гіпервітамінозу // *Укр. біохім. журн.* — 2009. — Т. 81, № 5. — С. 72–79.
12. Ducland S., Holmberg A., Bergs T. Uptake and 25-hydroxylation of vitamin D₃ isolated rat liver cells // *J. Biol. Chem.* — 1981. — V. 256, N 20. — P. 10430–10433.
13. Плеханов Б., Цветкова Т., Пиперков Т., Чиговская М. Щелочная фосфатаза: современное состояние вопроса // *Лаб. дело.* — 1989. — № 11. — С. 4–7.
14. Dyce B. J., Bessman S. P. A rapid nonenzymatic assay for 2,3-DPG in multiple specimens of blood // *Arch. Environ. Health.* — 1973. — V. 27, N 2. — P. 112–115.
15. *The clinical importance of vitamin D (cholecalciferol): a paradigm shift with implications for all healthcare providers. Article experpt.* http://goliath.ecnext.com/coms2/gi_0199-6667365/The-clinical-impotence-of-vitamin.html, 2007.
16. Lanske B., Razzaque M. S. Vitamin D and aging: old concepts and new insights // *J. Nutr. Biochem.* — 2007. — V. 18, N 12. — P. 771–777.
17. Holick M. F. Vitamin D deficiency // *N. Engl. J. Med.* — 2007. — V. 357, N 3. — P. 266–281.
18. De Luca H. F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2004. — V. 80, N 6. — P. 1689S–1696S.
19. Пат. 85494 UA МПК (2009) А61К31/66 А61К33/06. Фармацевтична композиція для лікування захворювань кісткової тка-

нини / Комісаренко С. В., Колибо Д. В., Апуховська Л. І., Безусяк А. І., Василевська В. М. — Опубл. 26.01.2009; Бюл. № 2.
20. Rizzolia R., Boonenb S., Brandic M. L. et al. The role of calcium and vitamin D in the

management of osteoporosis // Bone. — 2008. — V. 42, N 2. — P. 246–249.
21. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity // Am. J. Clin. Nutr. — 2008. — V. 88, N 2. — P. 582S–586S.

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ
БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА
«МЕБИВИД» В ПРЕДУПРЕЖДЕНИИ
НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ВИТАМИНА D₃
И КАЛЬЦИЯ ПРИ АЛИМЕНТАРНОМ
ОСТЕОПОРОЗЕ**

*С. В. Комисаренко, Л. И. Апуховская,
В. М. Рясный, А. В. Калашников, Н. Н. Великий*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: veliky@biochem.kiev.ua

Показано, что при алиментарном остеопорозе существенно (почти в 3 раза) снижается уровень 25-гидроксиголекальциферола (25ОНD₃) в сыворотке крови, по содержанию которого диагностируется степень обеспеченности организма витамином D₃. Состояние D-гиповитаминоза обуславливает снижение обеспеченности организма кальцием за счет его биологически активной ультрафильтруемой фракции, а также неорганическим фосфором. Одновременно возрастает активность щелочной фосфатазы и ее изоэнзимов в сыворотке крови. В структуре тканей бедренной и большеберцовой костей крыс наблюдается значительное истончение слоя компактной костной ткани, нарушение формирования остеонов, вставных пластинок и внутренних окружающих костных пластинок. В эпифизарном хряще костей обнаружено утолщение, преимущественно за счет зоны гипертрофированных хрящевых клеток, и замедление процесса врастания сосудов, что в совокупности свидетельствует о торможении остеогенеза. Биофармацевтический препарат «Мевивид» (комплекс витамина D₃, кальция карбоната и бисфосфоната — динатриевой соли метиленибисфосфонової кислоти) при его введении крысам с алиментарным остеопорозом нормализует структурно-функциональное состояние костной ткани, устраняет нарушения обмена витамина D₃ и минерального обмена. Полученные данные свидетельствуют о высокой специфической эффективности препарата в предупреждении нарушений метаболизма при остеопорозе.

Ключевые слова: алиментарный остеопороз, витамин D₃, бисфосфонаты, динатриевая соль метиленибисфосфонової кислоти, кальций, биофармацевтический препарат «Мевивид».

**«MEBIVID» BIOPHARMACEUTICAL
PREPARATION EFFICACY AGAINST
VITAMIN D₃ AND CALCIUM
METABOLISM DISORDERS
IN ALIMENTARY OSTEOPOROSIS**

*S. V. Komisarenko, L. I. Apukhovska,
V. M. Riasniy, A. V. Kalashnikov, N. N. Veliky*

Palladian Institute of Biochemistry of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: veliky@biochem.kiev.ua

The alimentary osteoporosis was shown to be associated with substantial (approximately 3-fold) lowering of 25-hydroxycholecalciferol (25ОНD₃) levels in blood serum, suggesting reduced vitamin D₃ availability. Vitamin D-hypovitaminosis causes calcium deficiency due to lack of its biologically active ultrafiltrated fraction. At the same time, the activity of alkaline phosphatase and its isoenzymes is increased in blood serum. Significant thinning of compact tissue layer and alterations in formation of osteons, inserted plates and internal surrounding bone plates were observed in femoral bones, indicating deleterious changes in the bone tissues structure. It was demonstrated nodes formation in the epiphyseal cartilage of femoral bones that occurs mainly due to the involvement of the hypertrophied cartilaginous cells. Deceleration of blood vessels growing was also seen. On the whole, these observations say for delay in osteogenesis.

«Mebivid» biopharmaceutical preparation (complex of vitamin D₃, calcium carbonate and bisphosphonate — methylenbisphosphonic acid disodium salt) administration to rats suffering from alimentary osteoporosis normalizes the structure and functional state of bone tissue, obviates disorders of vitamin D₃ and mineral metabolism. Findings suggest the strong specific efficiency of preparation in prevention and treatment of osteoporosis.

Key words: alimentary osteoporosis, vitamin D₃, bisphosphonates, methylenbisphosphonic acid disodium salt, calcium, «Mebivid» biopharmaceutical preparation.