

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**Біологічні властивості нових піразолвмісних бісфосфонатів, як
потенційних регуляторів метаболізму кісткової тканини**

Допущена до захисту
«__»_____ 2024 р.

Кваліфікаційна робота
бакалавра кафедри
Лукач Єлизавета Сергіївна

Завідувач кафедри

Оцінка «_____»

Голова ЕК _____

«__»_____ 2024 р.

Науковий керівник:
наук. співр. Лабудзинський Д. О.
к.б.н., доцент Ковальова М. К.

Харків 2024

Анотація

Кваліфікаційна робота на тему: «Біологічні властивості нових піразолвмісних бісфосфонатів, як потенційних регуляторів метаболізму кісткової тканини».

Робота включає: 57 сторінок, 8 рисунків, 1 таблиця, 54 джерела.

Мета роботи: дослідження потенційних антирезорбтивних та регуляторних ефектів новосинтезованих піразолвмісних бісфосфонатів на моделях *in vitro* у порівнянні з вже відомими аналогами.

Для досягнення мети було проведено літературний аналіз щодо циклу ремоделювання кісток та ролі мевалонатного шляху у формуванні кісткового гомеостазу. Проаналізовано спосіб впливу бісфосфонатів на регулювання резорбції кісткової тканини.

Отримані результати щодо властивостей нових піразолвмісних бісфосфонатів порівнювали із результатами, що були отримані в ході тестування еталонних сполук золедронової кислоти та метиленбісфосфонової кислоти за аналогічних умов. В результаті аналізу отриманих практичних даних були виявлені окремі представники серед досліджуваних сполук, що мають перспективи для подальших досліджень.

Ключові слова: *піразолвмісні бісфосфонати, клітинні лінії, антиоксидантна активність, інгібувальні ефекти, апоптоз, мевалонатний шлях, остеопороз.*

Abstract

Thesis Title: «Biological Properties of New Pyrazole-Containing Bisphosphonates as Potential Regulators of Bone Tissue Metabolism».

Thesis includes: 57 pages, 8 figures, 1 table, 54 references.

Objective: To investigate the potential antiresorptive and regulatory effects of newly synthesized pyrazole-containing bisphosphonates in vitro models compared to known analogs.

To achieve this objective, a literature review was conducted on the bone remodeling cycle and the role of the mevalonate pathway in maintaining bone homeostasis. The mechanism of bisphosphonates' influence on bone tissue resorption regulation was analyzed.

The properties of the new pyrazole-containing bisphosphonates were compared with the results obtained from testing the standard compounds zoledronic acid and MBPA under similar conditions. The analysis of the practical data identified certain compounds among those studied that have potential for further research.

Keywords: *pyrazole-containing bisphosphonates, cell lines, antioxidant activity, inhibitory effects, apoptosis, mevalonate pathway, osteoporosis.*

ЗМІСТ

СКОРОЧЕННЯ ТА УМОВНІ ПОЗНАЧКИ	6
ВСТУП.....	7
Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Будова кісткової тканини та її роль метаболізму в організмі.....	9
1.2. Цикл ремоделювання кісток	11
1.3. Роль метаболізму в розвитку кісток і гомеостазі.....	14
1.4. Порушення процесу ремоделювання кісткової тканини та їх наслідки 17	
1.5. Визначення бісфосфонатів як класу препаратів для регулювання метаболізму кісткової тканини	22
1.6. Фарнезил пірофосфат синтаза людини (hFPPS)	23
1.7. Терапія із застосуванням бісфосфонатів. Вплив на організм.....	27
1.8. Наслідки застосування бісфосфонатів у лікуванні.....	29
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	32
2.1. Визначення загальної антиоксидантної активності фосфо– молібдатним методом	33
2.2. Дослідження DPPH радикал–нейтралізуючих властивостей	34
2.3. Дослідження вмісту C ¹⁴ –мічених ізопреноїдів та холестеролу мевалонатного шляху у клітинах J774A.1 під дією нових піразолвмісних досліджуваних бісфосфонатів.....	35
2.4. Дослідження інгібувальної дії піразолвмісних бісфосфонатів на ензиматичну активність фарнезил пірофосфат синтази <i>in vitro</i>	37
2.5. Дослідження цитотоксичності піразолвмісних БФ на клітинах лінії J774A1 та первинній культурі гепатоцитів печінки щурів.	38

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ.....	40
3.1. Вивчення про– та антиоксидантних властивостей новосинтезованих піразолвмісних бісфосфонатів <i>in vitro</i> із використанням чутливих хромогенних субстратів.....	40
3.2. Дослідження DPPH радикал–нейтралізуючих властивостей новосинтезованих піразолвмісних бісфосфонатів	41
3.3. Дослідження особливостей утворення ізопреноїдів та холестеролу мевалонатним шляхом під дією нових піразолвмісних бісфосфонатів ...	43
3.4. Дослідження інгібувальної дії піразолвмісних бісфосфонатів на ензиматичну активність фарнезил пірофосфат синтази <i>in vitro</i>	46
3.5. Дослідження впливу нових піразолвмісних бісфосфонатів на виживання/життєздатність клітин за допомогою МТТ методу.....	47
Розділ 4. ОБГОВОРЕННЯ	49
ВИСНОВКИ.....	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	54

СКОРОЧЕННЯ ТА УМОВНІ ПОЗНАЧКИ

Ald – алендронат

BIONJ – бісфосфонат-індукований остеонекроз щелеп

BLCs – встилаючі кістку клітини

CoQ – коензим Q/ убіхінон

DMAPP – диметилаліл пірофосфат

DPPH – 2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозилу

ERK1/2 – позаклітинні сигнал-регульовані кіназа

FPP – фарнезилпірофосфат

FPPS – ензим фарнезилпірофосфатсинтаза

GPP – геранілпірофосфат

Ibn – ібандронат

IPP – ізопентілпірофосфат

J774A.1 – моноцитарно-макрофагальна лінія клітин з миші

M-CSF – макрофагальний колонієстимулюючий фактор

N-БФ – нітрогенвмісні бісфосфонати

OPG – остеопротегерин

PPase – пірофосфатаза

RANK – рецепторний активатор ядерного фактора-κB

RANKL – ліганд рецепторного активатора ядерного фактора-κB

Ris – ризендронат

Zol – золедронат

БФ – бісфосфонати

ГТФази – гуанозинтрифосфатази

МБФК – метиленбісфосфонова кислота

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід

ПТГ – паратгормон/ паратиреоїдний гормон

ВСТУП

Ламкість кісток є сучасною доволі поширеною проблемою охорони здоров'я по всьому світу. Найрозповсюдженішим на сьогоднішній день його проявом є захворювання на остеопороз [1], яке у більшості випадків пов'язане з віковими змінами організму чи наслідком настання постменопаузального стану. До переліку факторів ризику також відносяться такі глобальні прояви, як дефіцит вітаміну D, низький індекс маси тіла чи навіть етнічне походження людини. У сукупності із розповсюдженістю даного захворювання, кількість пацієнтів із яким у всьому світі наближається до 200 млн [2], та його важким хронічним перебігом виникає необхідність у професійному підборі якісних лікарських засобів та дієвої стратегії лікування.

Засобами, які здатні загальмувати втрату кісткової маси за рахунок пригнічення резорбції кісткової тканини, вважаються препарати кальцію, естрогенів, кальцитоніну, бісфосфонатів і препаратів вітаміну D3 [3]. Проте найбільш ефективними та поширеними серед засобів медикаментозного лікування надмірної резорбції кісток вважаються бісфосфонати. Такі препарати можуть застосовуватися як для лікування, так і для профілактики резорбції кісткової тканини. Залежно від терапевтичних цілей застосовуються різні діючі речовини. Найпопулярніший та найбільш досліджений у медичній практиці бісфосфонат, золедренова кислота, має ряд суттєвих обмежень щодо особливостей вживання через високий рівень цитотоксичності бісфосфонатів, а також їх активний прооксидантний вплив, що може викликати порушення окисно-відновного гомеостазу в організмі та призводити до ряду суттєвих захворювань, пов'язаних з проблемами серцево-судинної системи або частковим некрозом тканин.

Загальна ефективність дії бісфосфонатів як лікувальних засобів стимулює розвиток наукових досліджень у напрямку пошуку нових

модифікованих структур, які характеризувалися б нижчим ступенем негативного впливу на організм під час та після проходження повного курсу лікування.

Метою даної роботи було провести порівняльний аналіз властивостей нових піразолвмісних бісфосфонатів, а також провести порівняльну характеристику їх властивостей відносно еталонних сполук серед бісфосфонатів – золедронової кислоти.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані **наступні задачі**:

1. Дослідити антиоксидантні властивості нових піразолвмісних бісфосфонатів, використовуючи фосфомолібдатний метод для визначення загальної антиоксидантної активності, та встановити здатність нових піразолвмісних бісфосфонатів до нейтралізації DPPH радикалів
2. Вивчити вплив нових піразолвмісних бісфосфонатів на синтез ізопреноїдів та холестеролу у клітинах J774A.1, використовуючи ^{14}C -мічені радіоактивні попередники та хроматографічний аналіз.
3. Оцінити інгібувальну дію піразолвмісних бісфосфонатів на активність FPPS, використовуючи ензиматичну реакцію визначення неорганічного фосфату з перетворенням пірофосфату на ортофосфат і спектрофотометричний аналіз.
4. Оцінити цитотоксичність піразолвмісних бісфосфонатів на клітинах J774A1 та первинних гепатоцитах щурів, використовуючи МТТ тест для визначення життєздатності клітин.

Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. БУДОВА КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ТА ЇЇ РОЛЬ МЕТАБОЛІЗМУ В ОРГАНІЗМІ

Основні компоненти кістки. Кістка – це високомінералізований орган [4], що постійно перебуває у стані активного обміну речовин для забезпечення динамічної рівноваги опорно–рухової системи. Цей процес контролюється за рахунок метаболізму кісткової тканини, що є ключовим фактором впливу на стан всіх кісток у організмі людини.

Кісткова тканина першочергово забезпечує опору для м'язів та захист для внутрішніх органів, створюючи оптимальні умови для процесів дихання та руху. Будучи місцем, де виникає більша частина імунних клітин, червоний кістковий мозок (губчаста частина) відіграє важливу роль у імунній системі організму. Крім того, кістка – це резервуар мінеральних солей, зокрема кальцію та фосфатів, що підтримує їх оптимальну концентрацію в крові.

Для виконання свого функціоналу кістка має в складі як мінерали, так і білки. Скомпенсована кількість складників забезпечує довговічність кісткової тканини та усуває можливість передчасного руйнування через крихкість або ж надмірну еластичність відповідно.

Будучи метаболічно активною тканиною, кістка схильна до безперервного процесу ремоделювання. Такий процес триватиме в організмі протягом всього його існування та буде змінювати свою інтенсивність в залежності від віку. Відновлення та руйнування (резорбція) забезпечується за рахунок основних кісткових клітин – остеокластів, остеоцитів та остеобластів [5, 6].

Клітинна складова. До клітин, що забезпечують процес кісткоутворення перш за все відносять остеобласти. Вони походять з мезенхімальних клітин [7], що знаходяться у різних частинах тіла, та весь свій термін існування перебувають на поверхні кісток. Їх функціонал

полягає у продукуванні необхідних факторів для утворення позаклітинного матриксу [8]. До органічної складової синтезованих ними продуктів головним чином відноситься колаген першого типу. Також остеобласти впливають на неорганічну складову: забезпечують середовище, в якому відбувається мінералізація, в ході якої в матриксі накопичується гідроксиапатит [9] (сіль кальцію, фосфату та гідроксиду). Додатково такими клітинами забезпечується продукування білків гідролаз, остеонектину та остеокальцину, необхідних у мінералізації кісток. Крім того, остеобласти здатні керувати дозріванням остеокластів через специфічний ліганд – глікопротеїн RANKL. Така властивість може пригнічувати диференціацію клітин у остеокласти, що посприяє підтримці балансу між відновленням та резорбцією.

Другим типом клітин–будівників вважаються похідні від остеобластів остецити [10]. У дорослому організмі остецити займають від 90% загального обсягу клітинної складової кісткової будови. Такі клітини утворюються шляхом вбудовування остеобластів, прикріплених до поверхні кістки, в мінералізовану матрицю [11]. На відміну від своїх попередників, для них характерна втрата здатності до синтезу компонентів міжклітинної речовини. Головна роль таких клітин – підтримка гомеостазу, що забезпечується рядом факторів: регуляція етапів мінералізації, контроль остеокластогенезу (обмеження чи посилення), продукування сигналів для старту ремоделювання кісток.

Якщо попередниками клітин відновлення є мезенхімальні стовбурові клітини, то клітини резорбції відносяться до похідних імунної системи в якості одного з типів макрофагів [12]. Диференціація попередників у остеокласти відбувається під точним контролем клітин відновлення. Першочергово такі клітини синтезують макрофагальний колонієстимулюючий фактор (M-CSF), який стимулює розвиток рецепторного активатора ядерного фактора- κ B (RANK) надалі в залежності

від потреб організму остеобласти або остеоцити продукують ліганд до RANK щоб підвищити темп руйнування, або ж навпаки його блокують остеопротегерином (OPG), що утворює зв'язок з RANKL [13, 14]. Функціонал клітин резорбції полягає у прикріпленні до поверхні кістки за допомогою інтегринів та утворенні зони ущільнення – герметизації простору між остеокластом та кісткою. Надалі в цю обмежену від зовнішнього середовища зону будуть виділятися різні речовини, зокрема протеази, що призведе до руйнування кістки. За рахунок руйнівної дії остеокластів відбувається оновлення кісток в організмі, усунення травм, а також підтримка необхідного рівня мінералів в крові.

1.2. Цикл ремоделювання кісток

Для виконання своїх функціональних завдань, таких як участь у обміні кальцію та фосфату або ж підтримка та захист внутрішнього середовища організму, кістка повинна бути високодинамічним та мінерально активним органом. Це підтримується за рахунок циклу перебудови, який починається ще при внутрішньоутробному розвитку і триває все життя [15, 16]. Для перебігу такого процесу необхідні строго регульовані умови, які поділяються на 5 етапів:

- I. Активація: На даному етапі відбувається рекрутинг та злиття преостеокластів у багатоядерні клітини, які прикріплюються до поверхні кістки і утворюють зону ущільнення для ізоляції місця резорбції. Стимулом для запуску ремоделювання можуть бути остеоцити, які контролюють процеси та передають сигнали за допомогою розгалуженої дендритної мережі. Така реакція є відповіддю на певні ушкодження або на необхідність відновлення старої кістки. Крім того, існує також нецільове ремоделювання, яке розпочинається відповідно до змін у гормональному складі, частіше за все це вплив паратгормону, який потрібен для підтримки гомеостазу концентрації кальцію.

- II. Розсмоктування: Остеобласти, що прикріплені до поверхні кістки, створюють гафровану мережу, яка збільшує площу робочої поверхні. Першим завданням остеокластів є розщеплення мінеральної складової кістки, а саме гідроксиапатиту – основної неорганічної речовини кістки. Це досягається за допомогою карбонат-ангідрази II, яка, як ліаза, каталізує реакцію утворення протонів (H^+). Органічна складова, тобто колаген, руйнується за допомогою протеаз, зокрема катепсину К. Для уникнення надмірного руйнування фаза резорбції закінчується апоптичними реакціями у остеокластах.
- III. Фаза звороту: відбувається реверсія, і замість руйнування кісткова поверхня переходить до відновлення. На цьому ж етапі резорбція об'єднується з процесом утворення щоб унеможливити вірогідність подальшого пошкодження тканин. Такий процес перебуває на стадії дослідження, тому не можна однозначно встановити природу походження сигналу між клітинами розпаду та будови, але припускається, що це може бути ще однією роллю остеокластів, що продукують цитокіни (IL-6). Щодо залишків матриксу, які подолали етап резорбції: чистий колагеновий матрикс без мінералів видаляється, а мінераловмісний матрикс без органічної складової стає підсилювачем остеобластного зчеплення.
- IV. Утворення: формування нової частини кістки займає найбільший проміжок часу відносно інших етапів із циклу. На цьому етапі головну роль відіграють остеобласти, що синтезують остеоїд (матрикс з органічних речовин) та беруть участь у процесі його мінералізації. Під час мінералізації враховується ряд факторів, з поміж яких концентрації кальцію та фосфату – складових головних неорганічних компонентів – кристалів гідроксиапатиту, що вбудовуються в остеоїд та функціонують як чинники міцності та стійкості кістки.
- V. Завершення: останнім етапом у циклі ремоделювання є апоптоз остеобластів. Крім того, клітини відновлення можуть

редиференціюватися і перетворюватися на остеоцити, які занурюються в матрикс, або на встилаючі кістку клітини (BLCs), які утворюють додатковий захисний шар на поверхні. Завершення цього циклу визначається речовинами–антагоністами остеогенезу, які виділяються сигнальними клітинами остеоцитами.

Так як перебудова кістки є асинхронним процесом, то всі вищезазначені етапи можуть проходити паралельно один до одного (в одному часовому проміжку), але в різних місцях, що значно полегшує адаптацію до швидких змін у розмірах кісток під час росту всього організму. Це дозволяє забезпечувати структурну цілісність та регулярне оновлення до 10% від обсягу всього скелету.

Регулятори метаболізму кісток. Комплекс із спеціалізованих кісткових клітин та позаклітинного матриксу стає основою для кісткового метаболізму [17]. Такий процес контролюється системними гормонами та місцевими факторами регуляції.

Головними гормонами–регуляторами рівня мінеральної складової кісток є паратиреоїдний гормон (паратгормон, ПТГ) та кальцитонін [18], що працюють обернено один до одного. Якщо в плазмі крові зафіксується низький рівень Ca^{2+} , то паращитовидна залоза почне інтенсивно продукувати поліпептидний ПТГ для його підвищення. Шляхом непрямого впливу, а саме посиленням активації специфічного ліганда RANKL, паратгормон стимулює перетворення моноцитів на остеокласти, які в свою чергу руйнуватимуть кістку з виділенням мінеральних речовин. Протилежно до дії ПТГ, кальцитонін виділяється з щитовидної залози у випадку надмірної концентрації Ca^{2+} поза межами кістки. Цей гормон зв'язується з специфічним до нього лігандами на поверхні моноцитів та блокує їх диференціацію у клітини резорбції, що сприяє збільшенню відкладення мінеральної складової у кістках. Кальцитонін не має важливого

впливу на організм дорослої людини на відміну від періоду розвитку скелету дітей, коли його дія буде критично важливою.

Також до переліку системних гормонів відносять і ті, які не класифікуються як регулятори метаболізму кальцію та фосфатів. В цю групу підрозділяють насамперед естрогени – гормони, що через бокування інтерлейкінів–6 перешкоджають процесу руйнування кісток [19] та глюкокортикоїди, які виконують аналогічну роль, але націлені на остеобласти. На перевагу таким блокаторам існують і підсилювачі: гормон росту (соматотропін) та гормони щитоподібної залози (тиреотропний гормон, тироксин) [20]. Такі гормони можуть стимулювати розвиток та диференціації як клітин відновлення, так і резорбції.

Місцеві фактори регуляції можна розділити за їх цільовими клітинами: тромбоцитарний, фібробластовий та інсуліноподібний фактори росту посилюють продукування остеобластів, а інтерферони та інтерлейкіни стимулюють остеокласти.

1.3. Роль метаболізму в розвитку кісток і гомеостазі

Скелет, як динамічна система з постійним оновленням, перебуває у безпосередній залежності від головних енергетично обмінних механізмів: анаболізму та катаболізму. Метаболізм жирних кислот, гліколіз, глікогенез, обмін фосфоліпідів та цикл трикарбонових кислот впливають на активність клітин кісткоутворення, проте найбільшу дію забезпечує метаболічний процес синтезу холестерину також відомий як мевалонатний шлях.

Холестерин – це органічна воскоподібна речовина, природний поліциклічний ліпофільний спирт, який міститься у клітинних мембранах та не може добре змішуватися з водою [21, 22]. Він може синтезуватися в організмі з жирів, глюкози та амінокислот, або надходити з їжею, зокрема з жирних продуктів по типу м'яса та молочних продуктів. Норми у

співвідношенні утворення та надходження холестерину становлять, відповідно, 75–80% та 20–25%. Холестерол виконує в організмі ряд важливих функцій, серед яких стимуляція продукування вітаміну D, жовчних кислот та стероїдних гормонів, таких як кортизол або естрогени. Крім того, в ролі складової клітинних мембран, він забезпечує структурну стійкість клітин та функціональність у разі впливу зовнішніх факторів, таких як зміна температур. Кількість цього органічного з'єднання є чітко обмеженою певною концентрацією, вихід за межі якої може призвести до розвитку серцево–судинних захворювань, наприклад, атеросклероз судин.

Повний цикл синтезу холестеролу проходить у печінці або кишківнику і складається з п'яти послідовних фаз перетворень. Відправною точкою для початку продукування ліпофільного органічного з'єднання буде наявність однієї з найбільш поширених молекул–учасниць біохімічних реакцій – ацетил–КоА.

На першому етапі, дві молекули ацетил–КоА, за участю ферменту тіолази (ацилтрансферази), утворюють ацетоацетил–КоА. Далі, під дією специфічної до ацетил–КоА гідроксиметилглутарил–КоА синтази (HMG–CoA–синтази), в цьому циклі прикріплюється третя молекула коензиму А, утворюючи β –гідрокси– β –метилглутарил–КоА. Перша фаза завершується з утворенням мевалонату під дією NADPH–залежної гідрокси метил глутарил–КоА редуктази (HMG–CoA–редуктази). Початок синтезу водночас є фактором, що обмежує швидкість усього процесу, його активність можна підняти за допомогою додавання інсуліну або тиреоїдних гормонів, а також знизити глюкозагом і глюкокортикоїдами.

Друга частина синтезу починається з потрійного фосфорилування мевалонату за підтримки АТФ. Спочатку мевалонат перетворюється у п'ять фосфомевалонат, потім у п'ять пірофосфомевалонат. Нарешті, утворюється нестабільний проміжний 3–фосфо–5–пірофосфомевалонат, який відразу

піддається декарбоксілюванню з дефосфорилюванням для утворення ізопентеніл пірофосфату.

Центральна третя фаза починається ізомеризацією ізопентеніл пірофосфата (IPP–C5) в диметилаліл пірофосфат (DMAPP–C5). Потім стартують три послідовні процеси конденсації, в яких IPP–C5 (інша молекула) з DMAPP–C5 утворюють гераніл пірофосфат (GPP–C10), що конденсується з третьою молекулою IPP–C5 і утворює фарнезил пірофосфат (FPP–C15). На завершення відбувається реакція конденсації двох молекул FPP–C15 для отримання сквалену (C30). Саме ця фаза є предметом фокусування медичних досліджень таргетної терапії лікування остеопорозу з використанням бісфосфонатів нового покоління, спрямованих на фермент фарнезил пірофосфат синтазу (FPPS) – трансферазу з етапу утворення FPP–C15. Більше деталей буде надано у наступних розділах.

Четвертий передостанній етап включає перетворення сквалену на епоксид сквалену за рахунок дії ферменту сквален монооксидази (оксидоредуктаза – окисник у реакції НАДФН у НАДФ+), що циклізується в ланостерин шляхом зміни метильних груп. Це той самий етап, який буде перерваний під впливом бісфосфонатів, оскільки необхідна основа – сквален – не буде синтезована.

У звичайних умовах на п'ятому етапі, завершальні реакції перетворення ланостерину у холестерин відбуваються без застосування будь-яких інгібіторів. Під час цих реакцій змін та новоутворень зазнають етильні групи та подвійні зв'язки.

Будучи однією з найбільш перспективних мішеней при лікуванні хвороб кісток, холестерин повинен спричиняти великий вплив на розвиток як остеобластогенезу, так і остеокластогенезу. Для стимулювання цього у остеобластів залучається третій етап синтезу холестеролу (каскад перетворень ізопентілофосфату у сквален), а саме процес фарнезилювання.

На протидію йому для пригнічення таких результатів застосовується геранілгеранілування, яке також стає стимулом для етапу диференціації клітин резорбції.

1.4. Порушення процесу ремоделювання кісткової тканини та їх наслідки

Всі процеси кісткової перебудови для будь-якого періоду існування організму фіксовані за своїм механізмом. Певні нативні зміни ж базуються на відношенні швидкостей протікання етапів відновлення і руйнування в залежності від віку. Так, зокрема для людського організму характерним буде підтримка та зміцнення кісткової маси у період до 25 років, після чого настає проміжок рівноваги (тривалістю до 5 років), під час якого швидкість резорбції аналогічна кісткоутворенню. Надалі баланс між цими процесами поступово змішується, і темп руйнування кістки починає переважати. Така загальна характеристика властива лише здоровому організму. У випадку, коли з'являється захворювання, що призводить до формування певних дефектів у структурі скелета, незалежно від клінічного походження, його класифікують як метаболічну хворобу кісток [23].

Основною причиною формування аномалій у розвитку кістки постають відхилення від оптимального рівня мінералізації. Проблеми можуть бути спричинені дисфункцією різних факторів гомеостазу у скелетних клітинах [24]. Як правило, у разі успішного усунення першочергового дефекту, такі хвороби є цілком оборотними, хоча процес лікування може мати довгий накопичувальний характер.

Відповідно до предмету дослідження цієї роботи, в якості прикладу буде розглянуто таке поширене метаболічне захворювання кісток як остеопороз [25]. В загальному розумінні – це патологічний стан, спричинений надмірною активністю процесу остеокластогенезу.

Реципієнтами такого типу захворювання можуть ставати різні верстви населення в залежності від як від їх вікової категорії так зовнішніх чинників. Широкий спектр ураження остеопорозом дозволяє розподілити його на різні підтипи в залежності від механізмів розвитку патології на молекулярному рівні та причини їх виникнення.

Кожний підтип [26] цього захворювання (табл. 1.1) йде по однаковому сценарію: збільшення крихкості кісток починається з трабекулярної (внутрішньої) частини після чого доводиться до ураження зовнішньої пористої поверхні. Це обумовлює високу ймовірність перелому кісток.

Таблиця 1.1

Зв'язок патогенезу остеопорозу з молекулярними механізмами та типами ризику

Тип остеопорозу	Патогенез	Молекулярний механізм
Віковий	Є результатом природного процесу старіння. Може залежати як від генетичної схильності, так і від способу життя	З віковими змінами в організмі рівень гормонів росту падає. Концентрація ПТГ зростає (через низький рівень Ca^{2+} у крові). Через це пригнічується процес остеобластогенезу

Постмено–паузальний	Виникає внаслідок зменшення рівня гормону естрогену у жінок після менопаузи, що за нормальних концентрацій перешкоджає процесам резорбції	Протизапальний гормон зазвичай знижує вироблення цитокінів, сприяє зменшенню запалення. При дефіциті естрогенів баланс прозапальних цитокінів порушується, кісткоруйнування посилюється
Індукований глюкокорти–коїдами	Глюкокортикоїди – поширений медичний препарат проти запалень, що також має вплив на пригнічення остеобластів	Гормони глюкокортикоїди блокують сигнальний шлях розвитку та диференціації остеобластів з мезенхімних клітин
Моторно безрухомий	Для підтримання своїх нативних функцій кістки потребують помірного регулярного навантаження, без якого розпочнеться процес втрати кісткової маси	Вплив спричинюється на остеоцити, які є регуляторами клітин відновлення та резорбції, в результаті чого співвідношення RANKL:OPG змінюється в бік підвищеної активації остеокластів

Таким чином, остеопороз проявляє себе як одне з найбільш поширених у світі захворювань кісток, фокус якого спрямований на ураження вікової категорії 50+ та жінок у постменопаузальному періоді. Проте існує також ряд вторинних факторів, що викликають дану патологію. Зокрема, це пов'язано із іншими системними захворюваннями (ендокринні хвороби, такі як цукровий діабет чи надниркова недостатність). Також

стимуляторами розвитку крихкості кісток є фармакологічні втручання, такі як препарати з діючою речовиною, що відноситься до глюкокортикоїдів, імунодепресантів, ліки проти епілептичних приступів.

Окрім остеопорозу, існують ще декілька захворювань кісток, які потребують лікування антирезорбційними препаратами типу синтетичних бісфосфонатів. Зокрема, сюди відноситься хвороба Пейджета — поширене порушення, для якого характерна підвищена швидкість обміну кісткової тканини [27, 28]. Це означає, що процес руйнування старої тканини та утворення нової відбувається значно швидше, ніж у нормальному стані. Такі зміни призводять до утворення нових незбалансованих кісткових тканин з підвищеним рівнем крихкості та схильністю до переломів.

Хвороба Пейджета є наслідком мутаційних змін у певному гені і, як наслідок, до функціональних змін у білку, що задіяний у регуляції процесів руйнування та утворення кісткової тканини. Аномальна активація сигнального шляху RANKL під впливом мутантного білка запускає надмірну продукцію клітин резорбції, а у відповідь на їх активну дію клітини відновлення, остеобласти, починають працювати більш інтенсивно, намагаючись компенсувати втрати.

Ще одним поширеним захворюванням, пов'язаним з порушенням кісткового балансу, є гіперкальціємія — патологічний стан, за якого рівень кальцію в крові перевищує загальні норми [29]. Етіологічна кальцієва хвороба може виникати в результаті надлишкової концентрації вітаміну D (кальцитріолу) або в ході надмірної активності паращитоподібної залози, що продукує паратгормон (ПТГ). Кожен із цих шляхів розвитку гіперкальціємії стимулює посилену резорбцію кісток. ПТГ прямо стимулює руйнування кісткової тканини, активуючи остеокласти, що призводить до вивільнення кальцію у кровоток. Вітамін D збільшує всмоктування кальцію у кишечнику, тим самим забезпечуючи його достатню кількість для ремінералізації.

У здоровому організмі обидва гормони працюють у тісній взаємодії для підтримки кальцієвого гомеостазу, але за наявності ряду факторів, таких як надмірне споживання добавок чи хронічне захворювання нирок для вітаміну D, та первинний гіперпаратиреоз в результаті розвитку аденоми паращитоподібних залоз для ПТГ, можуть призводити до розвитку гіперкальціємії.

У лікувальній практиці застосовуються дієти з обмеженням кількості спожитого кальцію або ж стероїди, що знижують рівень кальцитріолу. Також активно використовуються бісфосфонати як препарати для інактивації остеокластів, що буде негативно впливати на процеси резорбції кісток і, відповідно, на вивільнення кальцію.

Фармакологічні втручання. Із урахуванням високого рівня розповсюдженості остеопоротичного захворювання серед людей старшої вікової категорії (одна з трьох жінок та один з п'яти чоловіків можуть мати переломи, спровоковані занадто резервованими кістками), сучасні методи лікування включають до свого переліку ряд можливих механізмів для припинення резорбції, або для підсилення відновлення щоб підтримати природний баланс руйнування/ відновлення кісток.

Для зменшення швидкості процесу ризогенезу наразі існують такі терапевтичні препарати: бісфосфонати (інактивують певний фермент для стимуляції розвитку апоптозу), селективні модулятори естрогенових рецепторів (хімічні ліганди для стимуляції рецепторів естрогенів) та антитіла (перехоплюють глікопротеїни, що потрібні для активації диференціації клітин моноцитарної лінії). Лікування шляхом підвищення концентрації остеобластів менш поширене, до прикладу, сюди відноситься рекомбінантний паратиреотропний гормон, підвищені концентрації якого простимулюють посилене кістковідновлення.

Кожен із цих механізмів терапевтичного впливу має свої відсоткові переваги та недоліки в контексті рівня ефективності порівняно з іншими факторами, такими як побічні ефекти та можливість використання препарату як профілактичного засобу. Попри лідерство деяких з них на глобальному рівні, слід враховувати, що кожен із методів лікування є потенційно актуальним та перспективним, поки не доведено оберненого. Це пов'язано з індивідуальним сприйняттям ліків і необхідністю мати якісну альтернативу у разі потреби.

1.5. Визначення бісфосфонатів як класу препаратів для регулювання метаболізму кісткової тканини

Бісфосфонати (БФ) – це клас хімічних сполук, які використовуються в медицині для лікування надмірної резорбції скелету та мають ряд альтернативних можливих варіантів застосування в інших областях використання поза прив'язки до скелету [30, 31].

За способом дії ці синтетичні речовини поділяються на два класи: в першу чергу це ранні бісфосфонати, які не містили нітрогену [32]. Їх принцип дії полягає у метаболізації до стану цитотоксичних аналогів АТФ, що призводить до отримання нефункціональної молекули. Такі елементи не піддаються гідролізу та сприяють апоптозу клітини. До другого класу відносяться відразу два підкласи бісфосфонатів (N–БФ), які мають у своєму складі нітрогеновмісні ланцюги. Обидва вони працюють за принципом інгібування фарнезил–пірофосфат–синтази у мевалонатному шляху синтезу холестеролу. Різниця між другим та третім поколінням N–БФ полягає лише у довжині нітрогеновмісної структури.

Наразі використання першого покоління бісфосфонатів, таких як етідронат, значно обмежено. Вони не можуть активно конкурувати з іншими типами, оскільки здатні забезпечувати порівняно нижчу антирезорбційну

дію, також їм властива стимуляція зниження рівня мінералізації кісток. На відміну від аналогів АТФ, такі представники нітрогеновмісних бісфосфонатів, як алендронат (Ald), ризендронат (Ris), ібандронат (Ibn) та золедронат (Zol), є головними препаратами активними компонентами препаратів, які на сьогоднішній день можна застосовувати у лікуванні.

Особливість будови бісфосфонатів опосередковується наявністю у їх основі двохфосфатних груп, що ковалентно пов'язані з вуглецем. Це робить їх структурно–аналогічними до субстратних комплексів, які зв'язують фарнезил пірофосфат синтазу. Додатковою складовою є їх радикал: двох бічні ланцюги, один з яких короткий і, у більшості, представлений гідроксильною групою, а інший – довший, може мати різноманітну структуру включно з ароматичними або аліфатичними компонентами. Саме за структурно–переважаючим радикалом визначаються механізми дії бісфосфонатів та їх класифікація, а також, саме тут знаходиться аміногрупа, що визначає тип бісфосфонату.

Основна структура бісфосфонатів робить їх подібними до гідроксиапатиту, природної форми фосфату кальцію, що утворює основну мінеральну частину скелету (60–65%) і забезпечує його міцність. БФ здатні зв'язувати іони кальцію і таким чином накопичуватися в межах кісток. Проте сам процес накопичення досить повільний і вимагає значних затрат, оскільки навіть половина бісфосфонатів не проходить етап зв'язування і виводиться з організму через нирки.

1.6. Фарнезил пірофосфат синтаза людини (hFPPS)

Людська FPPS – це фермент, який належить до класу трансфераз, та відповідає за перенесення алкільної групи від сполуки–донора до сполуки–акцептора [33]. За структурою такий ензим є гомодимером, утвореним з двох аналогічних молекул, кожна з яких має свій окремий активний центр.

Каталітична порожнина утворюється з α -спіралей, що багаті на аспарагінову кислоту (Asp). У цьому контексті наявність високого рівня Asp стає мотивом для зв'язування алільних субстратів, таких як диметилалілпірофосфат та геранілпірофосфат.

Для утворення зв'язку між мотивами з залишків аспарагінової кислоти (DDXXD, де X – довільна амінокислота) та пірофосфатними фрагментами алільних субстратів, обидва з яких є негативно зарядженими, необхідно додати посередника. З'єднання на основі електростатичних взаємодій відбуваються за рахунок кофакторної частини холоферменту – активаторів іонів металів Mg^{2+} . Додаткове зв'язування відбувається на рівні утворення сольових містків, що формуються між алільними субстратами та іншими амінокислотними залишками активного центру ферменту – аргініну та лізину.

За подібним механізмом діють і N-БФ: будучи конкурентними до GPP та DMAPP, вони імітують пірофосфатну групу з нативних субстратів та утворюють аналогічний зв'язок з DDXXD, що призводить до необоротного інгібування ферменту. Бісфосфонати викликають конформаційні зміни в ензиматичній молекулі, утворюючи додатковий центр зв'язування, до якого під'єднується гомоальний субстрат (IPP). Завдяки потрійному зв'язку DDXXD/N-БФ/IPP останнє втрачає свою здатність до зв'язування з молекулами наступних стадій мевалонатного шляху, тим самим обриваючи синтез холестеролу. Зв'язки, які тут утворюються, можуть мати водневий характер і опосередковуватися Н-зв'язками або, навпаки, поєднуватися через непрямі гідрофобні контакти за рахунок сил Ван-дер-Вальса.

Значною перевагою бісфосфонатів нового покоління буде їх нітрогенвмісна група. Бічний радикал R2 може протонуватися і утворювати додаткові зв'язки з мотивами в активному центрі ферменту через Н-зв'язок з карбонілом головної частини амінокислоти лізину та аналогічного зв'язку з гідроксилом триптофану. Ця альтернативна взаємодія стає підґрунтям для

кращого прикріплення бісфосфонатів до поверхні ензиму порівняно з нативними субстратними фрагментами.

Зв'язок між FPPS та остеокластами. Складову ссавців на 2% заповнюють пренільовані білки, що відносяться до форм посттрансляційної модифікації білків. Такі утворення грають ключову роль у передачі сигналів при внутрішньоклітинній комунікації, а також впливають на етапи регуляції росту, проліферації та диференціації клітин.

До переліку пренільованих білків відноситься мультифункціональна родина низькомолекулярних ензимів – малі ГТФази [34]. Вони залучені до регуляції активності клітини від контролю клітинного циклу до апоптозу.

Для отримання пренільованого білку до процесу долучається ензим FPPS, яка стає донором необхідних для синтезу ліпідів – фарнезилу та геранілгеранілу. Весь процес преніляції базується на передачі ізопренових груп, побудованих з 15 чи 20 атомів вуглецю, на залишок амінокислоти цистеїну. Таким чином, на кінці білка, який містить карбоксильну групу, знаходиться певний мотив, визначений конкретною послідовністю амінокислот, серед яких знаходяться цистеїнові залишки, що отримують ізопренові групи [35]. Преніляція білку забезпечує правильне розташування малих ГТФаз на клітинних мембранах та уможливорює створення взаємодії з іншими внутрішньоклітинними регуляторними факторами та сигнальними комплексами. Наприклад, у разі втрати можливості до пренілювання у таких представників малих ГТФаз, як Rho та Rac, у клітині не запусниться процес утворення структурних змін, в результаті чого остеокласт буде не здатен проводити ендоцитоз чи екзоцитоз [36].

Наявність малих ГТФаз характерна для широкого спектру клітин, проте можливість їх блокування через взаємодію N-BPs з FPPS властива здебільшого лише для остеокластів. Синтетичні аналоги пірофосфатів афінно зв'язуються з гідроксиапатитом, утворюючи міцні стабільні зв'язки,

роз'єднати які здатна лише клітина резорбції. За рахунок деіонізації у резорбційних ямках, що формуються між остеокластом та поверхнею кістки, бісфосфонати від'єднуються. Надалі вільний шляхом ендоцитозу N-VPs потрапляє до везикул клітини резорбції і транспортується до цитозолу, де виконує свою основну функцію інактивації мевалонатного шляху.

Бісфосфонати здатні до мінімальної міграції за рахунок трансцитозу у клітинах резорбції; вони частково вивільняються у позаклітинний простір, де можуть вступити в фазу відновлення і повторно зв'язатися за поверхнею кістки. До відновлення повторного зв'язку мінералізованою частиною кістки вони можуть бути поглинуті місцевими макрофагами. Фактично ці імунні клітини з їх активними процесами поглинання та швидким ендоцитозом стають винятком з запропонованого механізму поглинання бісфосфонатів, якому відповідають лише остеокласти. Це позиціонує макрофаги як зручні об'єкти для вивчення властивостей бісфосфонатів.

Завдяки модельним, попередньо обробленим N-VPs макрофагам та остеокластам було встановлено, що втрата преніляції не пригнічує функціонування малих ГТФаз. Натомість дефектний ензим може стати причиною некоректної активації сигнальних шляхів або повного перекриття подальшої сигналізації.

Паралельно з блокуванням процесу преніляції білків, N-VPs сприяють накопиченню IPP і DMAPP, що активно стимулює імунну відповідь з активацією T-клітин, що виділяють протизапальні цитокіни типу IFN γ у відповідь на надмірний рівень ізопренових ліпідів у супроводі підвищеної температури та хворобливого стану. Окрім індукції адаптивної імунної відповіді, надмірні обсяги IPP і DMAPP спричиняють утворення аналогів АТФ, що інгібують АТФ-залежні протеїнкінази та призводять до апоптозу.

1.7. Терапія із застосуванням бісфосфонатів. Вплив на організм

Загальний функціонал бісфосфонатів базується на їх подібності до побічного продукту метаболічних реакцій – неорганічного пірофосфату. Наявність гідроксильної та фосфатної груп у будові бісфосфонатів робить з них потужні хелати, що здатні таргетно фіксуватися на поверхні кістки і швидко видалятися з кровообігу, не пов'язуючись із м'якими тканинами [37]. З урахуванням того, що бісфосфонати засвоюються лише завдяки утворенню зв'язків з гідроксиапатитом, більша їх частина при потрапленні до організму виводиться [38].

Залишки, які змогли зчепитися з поверхнею кістки, можуть накопичуватися і залишатися в якості резерву протягом років. Це пов'язано з метаболізмом кісток, під час якого поверхневі остеобласти в процесі свого росту та розвитку перетворюються на внутрішньокісткові остеоцити.

Накопичення препарату в організмі надає можливість розглядати бісфосфонати в якості лікувального засобу пролонгованої дії. Розподілення БФ у межах скелету є точковим і здебільшого сфокусованим в місцях резорбції та формування нової кістки. Ефективність дії N–БФ досить суттєво залежить від мінімальних структурних та конформаційних змін на радикалі бісфосфонату, натомість здатність бісфосфонатів створювати умови для зупинки преніляції білку робить з них високоефективні антирезорбційні засоби.

Всі доступні на сьогоднішній день на ринку препарати з вмістом бісфосфонатів характеризуються досить низькою біодоступністю. Рівень засвоюваності варіюється відповідно до класу використаного БФ та методу його введення в організм. Наприклад, пероральне введення будь-якого препарату з вмістом цієї активної речовини на виході буде виводитися з організму в обсязі приблизно 99%, а споживання продукції, вміст якої насичений магнієм, призведе до повного виведення БФ і не спричинить цільового ефекту.

До переліку препаратів, що використовуються для лікування остеопорозу на сьогоднішній день, відносять чотири основні N-БФ: Ald, Ris, Ibn, Zol. Інтенсивність їх впливу на організм залежить від спорідненості до гідроксиапатиту та інтенсивності інгібування ензиму FPPS. Існує залежність, відповідно до якої вища інтенсивність зв'язку з мінеральною складовою кістки призводить до зниженого спектра розподілення препарату на поверхні скелету. Так, найбільш ефективний серед чотирьох наведених бісфосфонатів золедронат утворює міцний та здебільшого локалізований зв'язок без розсіювання, а алендронат займає порівняно більшу площу за рахунок менш активних зв'язків. Така властивість БФ впливає на дозування, що, відповідно, може варіюватися від 5 мг кожні 12 місяців до 70 мг раз на тиждень.

Низька біологічна активність БФ компенсується їх інтенсивним накопичувальним ефектом, що формує в організмі пацієнта лікарський резервуар для забезпечення довготривалого запасу, що зберігається протягом місяців чи років після припинення проведення терапії. Властивість БФ утримуватися в організмі без регулярного поновлення надає можливість робити перерви між лікуванням і забезпечувати та підтримку низького рівня ризику розвитку переломів поза медикаментозним лікуванням, що значно зменшує ризику розвитку побічного впливу. Негативна дія полягає в можливому розвитку остеонекрозу щелепи та раку стравоходу.

З урахуванням актуальності залучення БФ до різних сфер клінічної практики подолання перешкод у вигляді низької біодоступності та можливості розвитку серйозних патологій є потенційно перспективною темою. Наразі можна виділити два окремих підходи для вирішення потенційних завдань: залучення додаткових компонентів для покращення фармакокінетики та пошук нових форм БФ з якіснішими характеристиками.

1.8. Наслідки застосування бісфосфонатів у лікуванні

Будучи потужними синтетичними препаратами, офіційно допущеними до продажу на сьогоднішній день, бісфосфонати мають ряд можливих негативних побічних ефектів на організм реципієнта. Зазвичай це незначні прояви по типу болю у кістках, головного болю чи нудоти, або більш серйозні ушкодження, пов'язані з нирковими порушеннями [39], анемією та сильною гарячкою. Відповідно до властивості бісфосфонатів зв'язуватися в організмі з мінеральною складовою кісткової тканини — гідроксиапатитом, розповсюдженим наслідком БФ терапії також вважається гіпокальціємія та гіпофосфатемія.

До переліку побічного впливу дії бісфосфонатів також відноситься доволі небезпечне захворювання — остеонекроз щелепи (BIONJ) [40]. Розвиток патології саме в межах щелепи не є випадковим, адже для цієї кістки характерне постійне швидкісне ремоделювання, що робить її мішенню для накопичення високої концентрації БФ. Етіологія такого захворювання пов'язується з пригніченням необхідної для цієї частини скелета активної дії остеокластів, в результаті чого формується неактивна капілярна мережа з нефункціонуючих дрібних кровоносних судин і, як наслідок, недостатнім кровопостачанням, що і є причиною тканинної смерті в щелепі. Таке явище найбільш актуальне в контексті розгляду найефективніших представників бісфосфонатів — золедронові кислоти, яка в результаті своєї активної дії може спровокувати BIONJ. До того ж частота та тяжкість такого захворювання зростає з терміном лікування: для терапії протягом 12 місяців вірогідність розвитку остеонекрозу знаходиться у межах 1% [41], лікування бісфосфонатами понад чотирьох років може провокувати таке захворювання з рівнем ризику 21%.

На практиці частота розвитку остеонекрозу коливається від 0,15% до 0,001%: і діагностується у стані спонтанного прояву лише у 25%, інші 75% пов'язані з наслідками стоматологічного втручання [42].

Позаскелетні ефекти бісфосфонатів. На сьогоднішній день бісфосфонати є найкращим методом лікування захворювань кісток, проте їх ефективність також може поширюватися на інші позаскелетні патологічні прояви.

БФ ефективно задіяні у лікуванні пацієнтів з раком, що спричиняє метастатичні захворювання кісток [43]. На основі цього проводився ряд експериментальних досліджень, що виявили протиракові ефекти у цих синтетичних сполуках. У період зростання первинної ракової клітини, асоційовані з пухлиною макрофаги, експресують велику кількість факторів росту FGF- β та перетворюють звичайні фібробласти на асоційовані з пухлиною, роблячи з них основну складову пухлинного середовища. БФ, які активно поглинаються макрофагами, перешкоджають процесу перетворення фібробластів за рахунок індукції апоптозу у макрофагів чи утворення перешкод для макрофагального перетворення у форму, що сприяє росту пухлини.

Також бісфосфонати можуть поглинатися макрофагами і потім впливати на навколишні клітини, включаючи фібробласти. БФ також можуть ініціювати непрямий вплив на лікування раку шляхом позбавлення мембрани ракових клітин холестерину, роблячи їх більш чутливими до препаратів хіміотерапії. Це відбувається через властивий раковим клітинам гіперактивний мевалонатний шлях: надмірна концентрація холестеролу зменшує проникність плазматичних мембран. Вплив бісфосфонатів будь-якого класу зменшує концентрацію холестеролу і робить внутрішньоклітинне середовище доступним для ліків.

При взаємодії з імунною системою БФ можуть як підсилювати, так і зменшувати її дію, залежно від покоління. Так, БФ без нітрогену (перше покоління) функціонують лише як протизапальні сполуки через активацію апоптозу у макрофагів.

Функціонал N-БФ значно ширший, що дозволяє їм при одноразовому внутрішньовенному введенні інтенсивно впливати на імунну систему через різкі зміни концентрації ліків у крові та тим самим стимулювати спонтанну реакцію гострої фази за рахунок активації Т-клітин. Подальші введення припиняють стимулювати Т-клітини, що повертає імунну систему до запального стану відносно цих синтетичних сполук. Додатковим фактором взаємодії бісфосфонатів з імунною системою є спосіб введення препарату, відносно якого відповідь на введення ліків буде моделюватися з різними темпами.

Серед малодосліджених, але перспективних дій БФ виділяються:

- вплив на діабет другого типу: зменшується кількість макрофагів у внутрішніх жирових тканинах, покращуються рівні глюкози та інсулінозалежності. Тривале використання бісфосфонатів пов'язане з меншим ризиком розвитку діабету;
- протидія серцево-судинним захворюванням: зниження концентрації пінистих клітин, які утворюються в результаті макрофагального поглинання ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ, або "поганого" холестерину). А також загальне зниження концентрації холестерину шляхом інгібування мевалонатного шляху;
- зв'язок з неврологічними розладами: однією з характеристик хвороби Альцгеймера є високий рівень холестерину через надмірне функціонування мевалонатного шляху. На моделях *in vivo* з індукованою хворобою Альцгеймера пероральне введення A1d зменшувало симптоми порушення когнітивних функцій та втрату пам'яті. Хвороба Гантінгтона пов'язана з взаємодією між малими ГТФазами та мутантним білком.

Всебічне залучення БФ робить їх перспективними об'єктами досліджень за напрямком пошуку нових більш функціональних представників.

Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Структура новосинтезованих (рис. 2.1 Б) піразолвмісних бісфосфонатів була розроблена із застосуванням біоінформатичних інструментів, орієнтуючись на структурну подібність до золедронової кислоти(рис. 2.1 А).

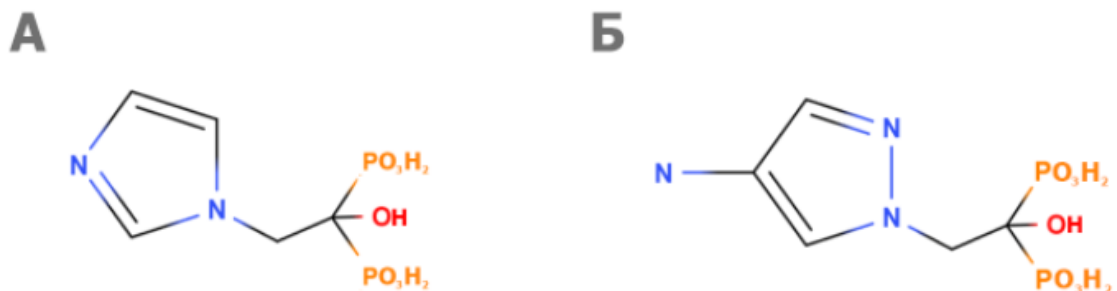


Рисунок 2.1 (А) структура золедронової кислоти Zol; (Б) структура новосинтезованого піразолвмісного бісфосфонату 11N4

Піразольний цикл новостворених БФ, аналогічно імідазольному у золедронаті, містить атоми азоту та додаткову аміногрупу у різних положеннях піразольного циклу, в залежності від чого в результаті було отримано 4 піразолвмісні бісфосфонати: 11N, 11N3, 11N4, 11N5.

В якості тест-систем *in vivo* для деяких із подальших досліджень було обрано два типи клітин: моноцитарно-макрофагальна лінія клітин з миші J774A.1 та гепатоцити щурів.

J774A.1 - клітинна лінія з широким застосуванням у біологічних дослідженнях завдяки своїй доступності та здатності до відтворення якісних результатів. В контексті даного дослідження J774A.1 були обрані через залученість представників свого класу імунних клітин до процесів кісткоруйнування: макрофаги є прекурсорами клітин кісткової резорбції - остеокластів. Тож клітини, що в природних умовах здатні до активного

поглинання синтетичних лікувальних засобів, виявляються актуальними реципієнтами і для БФ, доданих до клітин в експериментальних умовах.

Гепатоцити щурів стають другими перспективними реципієнтами для бісфосфонатів через найвищі рівні експресії фарнезилпірофосфатсинтази, які характерні для клітин печінки.

Для кожного із обрахунків застосовувався t-критерій (Коефіцієнт Стьюдента) для малої вибірки досліджень:

$$t = 5\% < p 0.05$$

Де p – можлива помилка

Статистична достовірність між контролем та дослідом (t) обраховувалася за формулою:

$$t = \frac{M_k - M_d}{\sqrt{M_k^2 + M_d^2}}$$

Де M_k – середнє значення контролю

M_d – середнє значення дослідю

2.1. Визначення загальної антиоксидантної активності фосфомолібдатним методом

Метод заснований на принципах відновлення $Mo(VI)$ до $Mo(V)$ досліджуваними сполуками та утворенні комплексу зеленого кольору з фосфату та $Mo(V)$ за кислих значень рН [44]. Початково цей метод був розроблений для визначення неорганічного фосфату, але потім був модифікований для визначення будь-яких антиоксидантів, які можуть взаємодіяти з вільними радикалами, запобігаючи окисленню та захищаючи клітини від пошкоджень. Оптимальним часом реакції для утворення комплексу було визначено приблизно 90 хвилин, при цьому підвищення температури збільшує вихід утворення зеленого комплексу, хоча реакція також може відбуватися за кімнатної температури. Як антиоксидантні

стандарти можуть застосовуватися аскорбінова кислота, глутатіон, α -токоферол та бутильований гідрокситолуол.

Для експерименту було застосовано 0,5 мл зразків БФ/стандарту в концентрації 1 мМ із додаванням розведеної у 4 рази сироватки та без сироватки. Зразки змішували з 1% амонію молібдату, 3 мл реакційної суміші, що містить 0,6 М сірчаної кислоти та 28 мМ фосфату натрію. Розчини інкубували при 95°C протягом 10 хв. Після охолодження до кімнатній температурі поглинання зразка вимірювали за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 695 нм. З кожним зразком концентрації БФ експеримент проводився повторно протягом трьох разів. Отримана на виході підвищена абсорбція (концентрація комплексів зеленого кольору) вказувала на збільшення загального антиоксидантного потенціалу бісфосфонатів.

2.2. Дослідження DPPH радикал–нейтралізуючих властивостей

Здатність БФ поглинати вільні радикали була досліджена за допомогою методу нейтралізації радикалів метанольного розчину 2,2–дифеніл–1–пікрилгідразилу (DPPH) [45]. Метод ґрунтується на здатності досліджуваних сполук до донорства протону водню. Принцип візуалізації методу пов'язаний із забарвленням: DPPH в розчині метанолу має фіолетовий колір, а після додавання антиоксидантів видозмінюється на жовтий.

Окремо розведені у метанолі 2,4 мл 0,1 мМ DPPH та 1,6 мл 1 мМ розчину БФ було змішано із додаванням розведеної сироватки та без неї. Реакційну суміш інкубували протягом 30 хв у темному місці за кімнатної

температури. Поглинання вимірялося шляхом спектрофотометрії на 517 нм. Активності поглинання радикалів DPPH розраховувалася за формулою:

$$\% \text{ DPPH} = \left\{ \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right\} \times 100$$

де A_0 – абсорбція контролю,

A_1 – абсорбція розчину досліджуваних БФ

2.3. Дослідження вмісту ^{14}C –мічених ізопреноїдів та холестеролу мевалонатного шляху у клітинах J774A.1 під дією нових піразолвмісних досліджуваних бісфосфонатів

Метод заснований на визначенні рівня радіоактивного випромінювання фракції ізопреноїдних спиртів (ізопентенолу з гераніолом), отриманої шляхом хроматографічного розділення компонентів гексанового екстракту після кислотного гідролізу ізопентенілпірофосфату та геранілпірофосфату.

Екстракти з осадів клітин J774A.1 отримували методом Folch [46], що базується застосуванні суміші з хлороформу та метанолу у співвідношенні 2:1. Метанольну фазу обробляли 2,5 NHCl для гідролізу пірофосфатів. Після нейтралізації суміші ізопреноїдні спирти екстрагували гексаном. Для розділення і ідентифікації ізопентенолу та гераніолу у зразках використовували метод тонкошарової хроматографії (ТШХ) [47] на аналітичних платівках Sorbfil, використовуючи як стандарти відповідні сполуки (Sigma). Розділення компонентів суміші ТШХ, в якому застосовується принцип порціонування на пластині з нереакційного твердого матеріалу покритого тонким шаром поглинаючої частини, проводилося згідно до умов попереднього насичення посудини парами

розчинників з покриттям фільтрувальним папером. Для візуалізації фракцій використовували модифікований реагент з анісовим альдегідом.

У порівнянні до контролю результати вмісту холестеролу та ізопреноїдів після 6-денної/18-ти годинної інкубації з, відповідно, 10 мкМ/100мкМ піразолвмісних бісфосфонатів виглядають наступним чином:

$$\text{Показник} = M \pm m, n = 10; * - p < 0.05$$

Де M – середнє значення

m – стандартна похибка середнього

n – кількість незалежних повторів, які були проведені

p – рівень значущості, який показує ймовірність того, що різниця між контрольним зразком і досліджуваним зразком є випадковою

* – результати є статистично значущими, а різниця в рівнях накопичення радіоактивно міченого ацетату між контрольними зразками і зразками, обробленими піразолвмісними бісфосфонатами, є істотною і не випадковою

Стандартну похибку середнього m визначали за формулою:

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Де σ – значення, що дорівнює $\sqrt{\frac{\sum a^2}{n-M}}$

Де a – різниця між M і значенням кожного досліджу

2.4. Дослідження інгібувальної дії піразолвмісних бісфосфонатів на ензиматичну активність фарнезил пірофосфат синтази *in vitro*

Кінцеву ензиматичну активність FPPS визначали шляхом поєднання двох складових активностей.

По–перше, була залучена FPPS з пероксисома–збагаченої фракції печінки щурів. Цей ензим каталізує реакцію конденсації геранілпірофосфату (GPP) та ізопентілпірофосфату (IPP), в результаті якої утворюється фарнезилпірофосфат (FPP) і пірофосфат.

По–друге, була використана пірофосфатаза дріжджів (PPase; Sigma). PPase перетворює утворений пірофосфат на ортофосфат, який визначається спектофотометрично за допомогою уніфікованого метода визначення неорганічного фосфату з використанням CytoPhos реагенту (Cytoskeleton).

Для приготування пероксисомальної (збагаченої) фракції використовували метод диференційного центрифугування [48], що функціонує за рахунок різної швидкості седиментації у градієнті щільності під дією відцентрової сили. Осадження проводилося в 4 етапи з поступовим збільшенням обертів/хв. Визначення активності FPPS з деякими модифікаціями здійснювали за методом, описаним Schmidberger J.W. [49]: Ортофосфат, який утворився з пірофосфату, проявлявся за допомогою модифікованого аналізу малахітового зеленого - органічного барвника для виявлення фосфатів Як контроль використовували проби, у які фракцію пероксисом додавали безпосередньо перед інактивацією ензиму шляхом термічної обробки. 60 мкл супернатанту переносили до 96–лункового планшету і додавали 140 мкл CytoPhos реактиву. Після інкубації 10 хв при кімнатній температурі вимірювали оптичну густину при 650 нм на планшетному СФ рідері.

Дослідження інгібувального ефекту нітрогенвмісних бісфосфонатів здійснювали за методом, описаним вище. Бісфосфонати використовували у

концентраціях 10 мкМ. Відповідну кількість попередньо інкубували з пероксисомальною фракцією в інкубаційному середовищі протягом 30 хв при кімнатній температурі у загальному об'ємі 70 мкл, після чого додавали PPase та запускали реакцію FPPS додаванням 20 мкл суміші субстратів. Як контроль використовували проби, у яких замість БФ використовували еквіваленту кількість інкубаційного середовища, а БФ додавали після інактивації ензиму.

Аналогічно до дослідження вмісту C^{14} -мічених ізопреноїдів та холестеролу для інгібувальної властивості застосовується аналогічний показник середнього значення з похибкою

$$\text{Показник} = M \pm m, n = 10; * - p < 0.05$$

2.5. Дослідження цитотоксичності піразолвмісних БФ на клітинах лінії J774A1 та первинній культурі гепатоцитів печінки щурів

Цитотоксичність піразолвмісних БФ або життєздатність клітин під їх дією вивчали за допомогою методу МТТ [50]: жовтий тетразолійовий барвник 3-(4,5-диметилтиазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід проникає через клітинну мембрану і відновлюється у живих клітинах до нерозчинного у воді фіолетового формазану за допомогою ферментів дегідрогеназ. За 3 години до завершення інкубації в кожному лунку 96-лункового планшету, які містили по $2,5 \cdot 10^4$ клітин/лунку, додавали по 10 мкл 5 % розчину МТТ. Через 3 години в кожному лунку додавали по 150 мкл 0,04 N розчину HCl в ізопропіловому спирті, ретельно перемішували до повного розчинення осаду, що утворився і вимірювали оптичну густину надосадової рідини на автоматичному мікроспектрофотометрі при довжині хвилі 570 нм. Кількість утвореного формазану, що пропорційна кількості життєздатних клітин, вимірювали за допомогою

спектрофотометра. Результати розраховували за формулою та виражали в умовних одиницях:

$$IC = \frac{\text{Оптична густина досліджуваного зразка}}{\text{Оптична густина контрольного зразка}}$$

Де *Оптична густина досліджуваного зразка* – це значення оптичної густини зразка, в який додали піразолвмісні БФ.

Оптична густина контрольного зразка – це значення оптичної густини зразка, в який піразолвмісні БФ не додавали.

IC (індекс цитотоксичності) є показником, що відображає життєздатність клітин під впливом піразолвмісних біологічно активних речовин (БФ).

Показник кількості незалежних повторів, які були проведені, становив n=5

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ

3.1. Вивчення про– та антиоксидантних властивостей новосинтезованих піразолвмісних бісфосфонатів *in vitro* із використанням чутливих хромогенних субстратів

Дослідження відновлювальних властивостей піразолвмісних БФ фосфомолібдатним методом *in vitro* (концентрація зразку становила 1 мМ) показало (рис. 3.1 А), що найбільш виражені відновлювальні властивості у водному розчині проявилися у 11N3 (16,7%) та 11N5 (15,1%). Результати дії БФ 11N та 11N4 складала – 5,6% та 3,3% відповідно. Стандартний контроль (0,01% розчин аскорбату), що використовувався для встановлення базового рівня антиоксидантної активності, відновлювальних властивостей майже не виявив. У середовищі 4х–кратно розведеної сироватки найбільш вираженими відновлювальними властивостями відзначилися сполуки 11N5, 11N та 11N3 – 8,5%, 4,6% та 4,6% відповідно (відносно контрольних зразків аскорбату). БФ порівняння золедронат та метилбісфосфонат кальцію (МБФК) у середовищі 25% сироватки проявляли прооксидантні властивості – 4,6% та –3,3% відповідно.

Аналогічне дослідження піразолвмісних БФ у концентрації сполук 10мМ показало (рис. 3.1 Б), що найбільш потужні відновлювальні властивості у водному розчині продемонстрували 11N5 (104,6%) та 11N3 (53,4%). Для зразків 11N та 11N4 результати виявилися нижчими – 23% та 12,5% відповідно. Сполуки порівняння виявили слабо відновні властивості.

У середовищі 25% сироватки відновлювальні властивості сполук були пропорційно відповідними результатам дослідження у водному середовищі, тільки з меншою інтенсивністю. Порівняно з концентрацією в 1мМ,

контрольні БФ золендрат та МБФК на 10мМ у середовищі 25% сироватки не проявляли виражених відновлювальних властивостей.

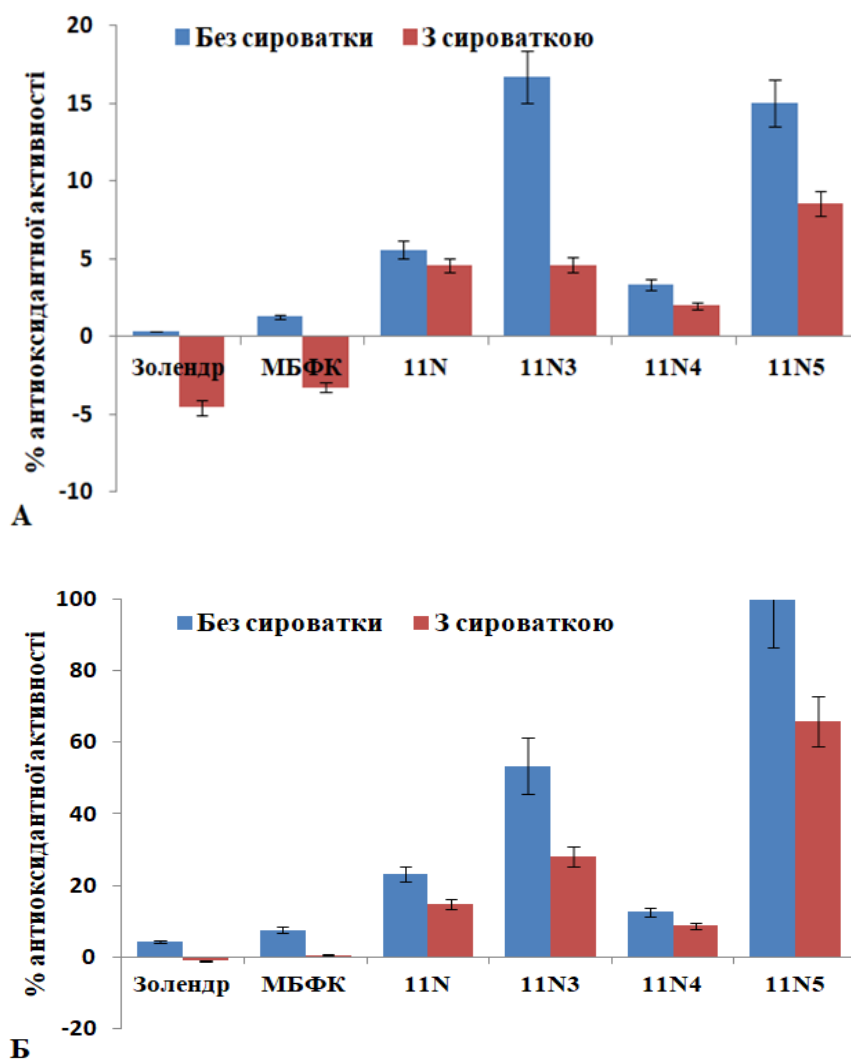


Рис. 3.1 Загальна антиоксидантна активність піразолвмісних БФ на основі фосфомолібдатного методу у концентрації 1 мМ (А) та 10 мМ (Б) із додаванням 25% сироватки та без сироватки. За 100% взято еквівалент антиоксидантної дії 0,01% аскорбату.

3.2. Дослідження DPPH радикал–нейтралізуючих властивостей новосинтезованих піразолвмісних бісфосфонатів

Вивчення DPPH радикал–нейтралізуючих властивостей *in vitro* у концентрації сполук 1 мМ показало (рис. 3.2 А), що найбільш виражений радикал–зв’язувальний ефект у водному розчині продемонструвала дія 11N3

(18,6%), та 11N5 – (8,8%), що фактично відповідало радикал–нейтралізуючим значенням золедронату – 9,6%. Дослідження проводилося відносно контрольного 0,01% розчину аскорбінової кислоти. У середовищі 25% сироватки найкращу радикал–зв’язувальну дію продемонструвала речовина 11N5 (4,5%), натомість для інші сполук такі умови стали чинником для утворення від’ємних показників:

Zol: –0,75	11N: –8,3	11N4: –9,8
МБФК: –7,6	11N3: –2,3	

Умови контрольного розчину зберігалися незмінними.

Виявлення DPPH радикал–нейтралізуючих властивостей *in vitro* (рис. 3.2 Б) у концентрації сполук 10 мМ показало, що найбільш виражений радикал–зв’язувальний ефект у водному розчині був характерним для 11N4 – 26,3%, та 11N3 – 16%. DPPH радикал–нейтралізуюча здатність 11N та сполук порівняння (МБФК, Zol) була подібною та складала 5%, а застосування 11N5 в результаті виявило –2%. У середовищі 25% сироватки найкращу радикал–зв’язувальну дію продемонструвала речовина 11N3 – 43,1%, у той час як інші сполуки мали нижчі показники:

Zol: 29,4	11N: 27,4	11N4: 15,7
МБФК: 35,3	11N3: 43,1	

Сполука 11N4 виявила значний від’ємний результат –35,3.

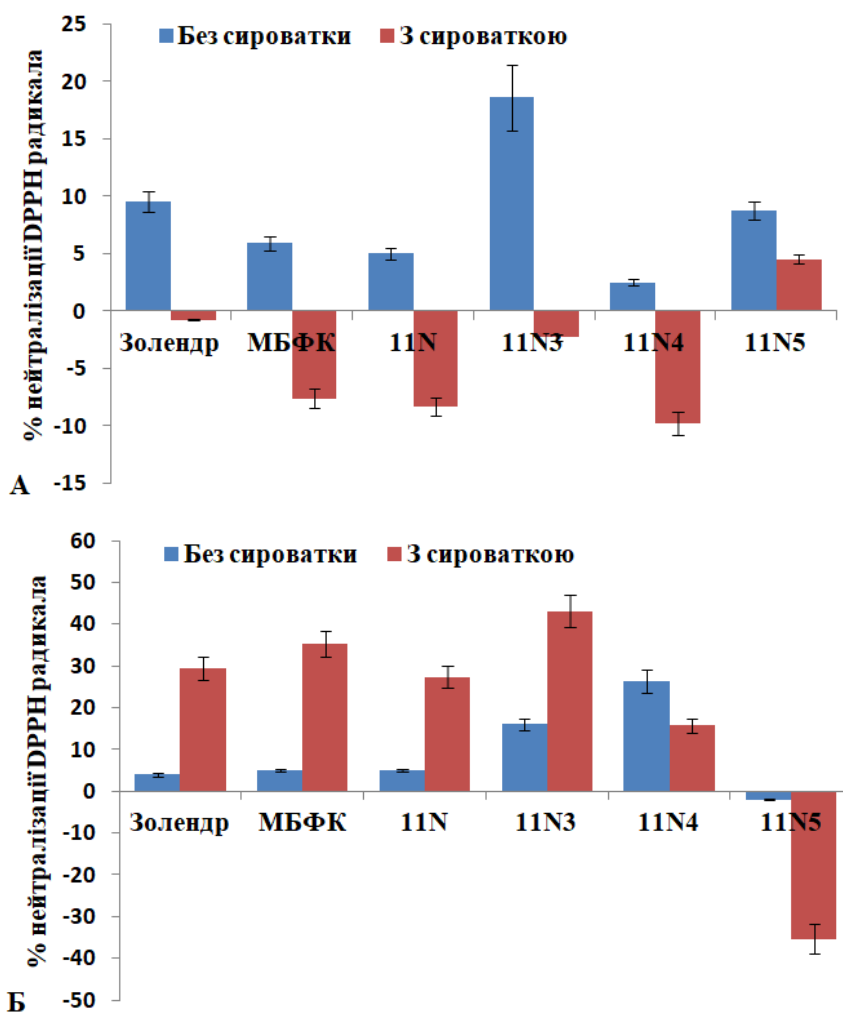


Рисунок 3.2 DPPH–радикал нейтралізуюча активність піразолвмісних БФ у концентрації 1 мМ (А) та 10 мМ (Б) із додаванням 25% сироватки та без сироватки. За 100% взято еквівалент антиоксидантної дії 0,01% аскорбату.

3.3. Дослідження особливостей утворення ізопреноїдів та холестеролу мевалонатним шляхом під дією нових піразолвмісних бісфосфонатів

Було досліджено рівень утворення ізопреноїдів та холестеролу мевалонатного шляху під дією нових піразолвмісних бісфосфонатів за допомогою використання радіоактивно міченого ацетату (^{14}C) на моделі моноцитарно–макрофагальної лінії клітин J774A.1.

Дослідження включення радіоактивно міченого попередника у фракцію холестеролу у лізатах клітин J774A.1, як кінцевого продукту мевалонатного шляху, не показало (рис. 3.3 А) суттєвої різниці у порівнянні зі значеннями контролю.

Після 6–денної інкубації, серед досліджуваних речовин найбільш потужний інгібувальний ефект на синтез ізопреноїдів мевалонатного шляху клітинами J774A.1 спостерігався (рис. 3.3 Б) при застосуванні БФ 11N5, 11N та 11N3 (52%, 62% та 63%).

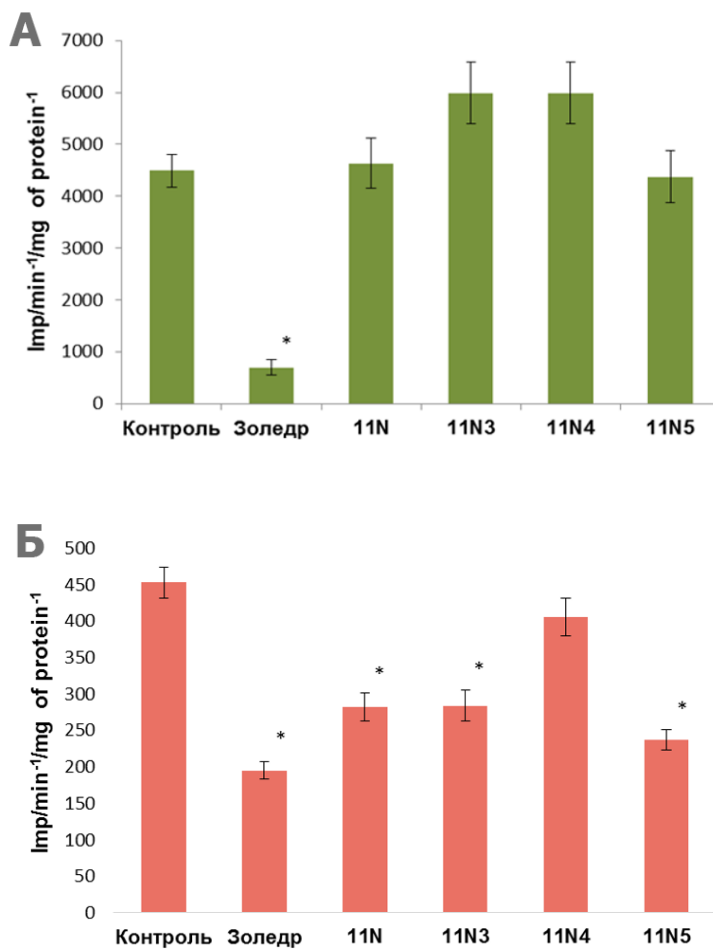


Рисунок 3.3 Вплив піразолвмісних бісфосфонатів на рівень накопичення радіоактивно міченого ацетату (¹⁴C) у складі ізопреноїдів та холестеролу у клітинах лінії J774A.1. Інкубація проводилася із концентрацією БФ 10 мкМ. (А) Вміст холестеролу після 6–денної інкубації БФ. (Б) Вміст ізопреноїдів після 6–денної інкубації БФ.

Слід відмітити, що включення радіоактивно міченого попередника у ізопреноїди з лізатів клітин J774A.1 за дії сполуки 11N5 наближувався до інгібувального ефекту контрольного бісфосфонату – золедронату (43%).

Дослідження вмісту радіоактивного холестеролу у лізатах клітин, як кінцевого продукту мевалонатного шляху, після 18-ти годинної інкубації (рис. 3.4) аналогічно 6-денній, не показало суттєвої різниці у порівнянні зі значеннями контролю.

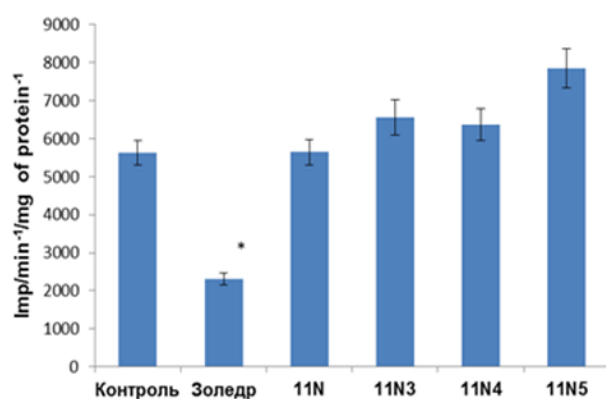


Рисунок 3.4 Вплив піразолвмісних бісфосфонатів на рівень накопичення радіоактивно міченого ацетату (^{14}C) у складі холестеролу у клітинах лінії J774A.1 після 18-годинної інкубації з БФ. Інкубація проводилася із концентрацією БФ 100мкМ.

У той же час, інкубування із 100 мкМ концентрацією бісфосфонатів впродовж 18-ти годин продемонструвала (рис. 3.5), що найбільш ефективно пригнічували включення попередника мевалонатного шляху у фракцію ізопреноїдів (клітини лінії J774A.1) сполуки 11N3 та 11N5 – на 58% та 41%, порівняно із контрольними значеннями. БФ Стандартний бісфосфонат золедронова кислота зменшувала цей показник на 53% відносно контролю.

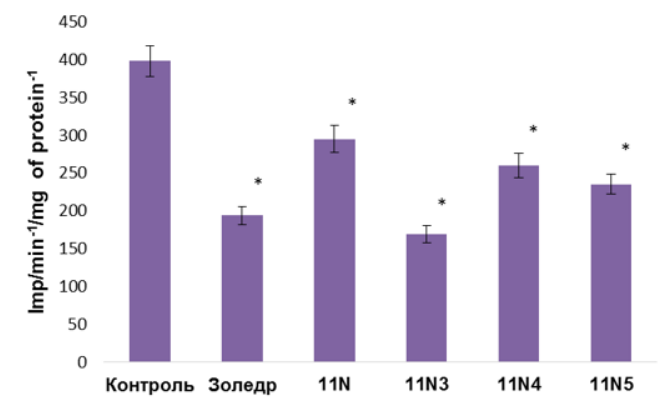


Рисунок 3.5 Вплив піразолвмісних бісфосфонатів на рівень накопичення радіоактивно міченого ацетату (¹⁴C) у складі ізопреноїдів у клітинах лінії J774A.1 після 18-годинної інкубації з БФ. Інкубація проводилася із концентрацією БФ 100мкМ.

3.4. Дослідження інгібувальної дії піразолвмісних бісфосфонатів на ензиматичну активність фарнезил пірофосфат синтази *in vitro*

Дослідження вмісту ізопреноїдів у лізатах клітин J774A.1 за інгібувальної дії піразолвмісних БФ корелювало із дослідженням їх впливу на активність таргетного ензиму мевалонатного шляху – фарнезил пірофосфат синтази (FPPS) *in vitro*.

Як показав експеримент, усі досліджувані бісфосфонати чинили виражену інгібувальну дію ензиматичної активності фарнезил пірофосфат синтази. Найбільш перспективними сполуками у концентрації 10 мкМ виявилися (рис. 3.6) 11N та 11N5, що пригнічували ензиматичну активність FPPS на 69,5% та 65,2%, відповідно. Додатково зразок для порівняння – золедронат виявляв найпотужніший інгібувальний ефект, пригнічуючи активність ензиму FPPS на 92%, порівняно з контролем.

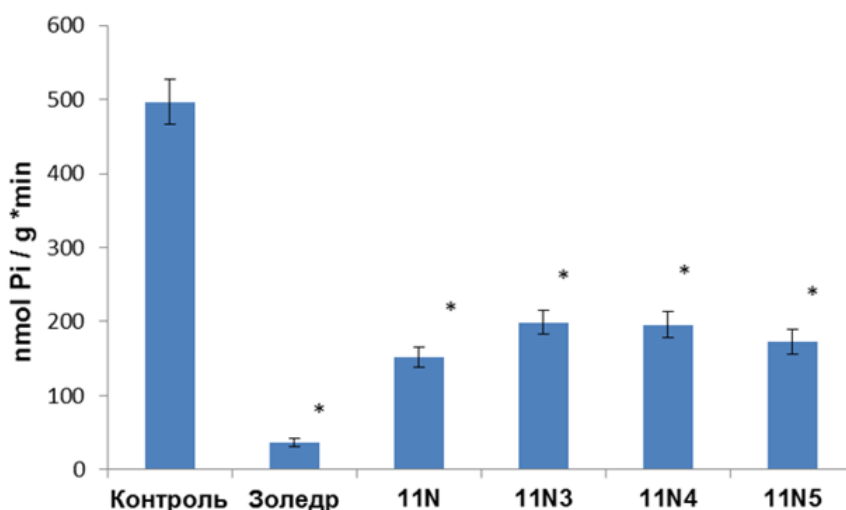


Рисунок 3.6 Інгібувальний вплив піразолвмісних бісфосфонатів на ензиматичну активність фарнезил пірофосфат синтази. Інкубація проводилася впродовж 1 години у присутності БФ із концентрацією 10 мкМ.

3.5. Дослідження впливу нових піразолвмісних бісфосфонатів на виживання/життєздатність клітин за допомогою МТТ методу

Дослідження на виявлення рівня цитотоксичності проводилося за методом МТТ і базувалося на зміні забарвлення клітин за рахунок перебігу реакції відновлення жовтого 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду до фіолетового формазану у живих клітинах. В якості експериментальних систем були використані клітини моноцитарно-макрофагальної лінії J774A.1 та гепатоцити.

Серед досліджуваних речовин (рис. 3.7 А) найбільш потужний інгібувальний ефект на клітини J774A.1 у концентрації сполук $0,5 \cdot 10^{-3}$ М спостерігався при застосуванні 11N4 (28,4% життєздатних клітин), за концентрації $1 \cdot 10^{-4}$ М - 11N5 (35,5%) та за $0,5 \cdot 10^{-5}$ М - 11N4 (51,7%) у порівнянні із золедреновою кислотою.

Відповідно до досліджень БФ на клітинах первинної культури гепатоцитів щурів (рис. 3.7 Б) у концентрації сполук $0,5 \cdot 10^{-3}$ М найефективніша інгібувальна дія спостерігалася при застосуванні 11N4

(45,4%), за концентрації $1 \cdot 10^{-4}$ М - 11N4 (57,9%) та за $0,5 \cdot 10^{-5}$ М знову 11N4 (68,7%).

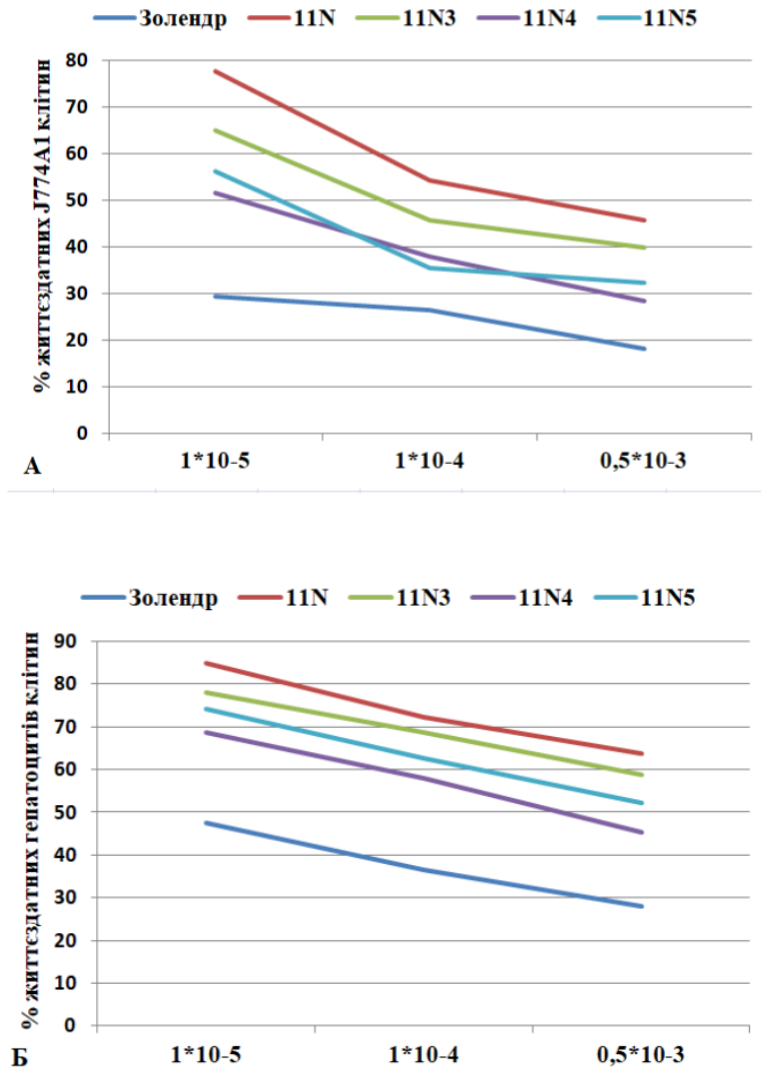


Рисунок 3.7 Життєздатність клітин лінії J774A.1 (А) та первинної культури гепатоцитів щурів (Б) за дії різних концентрацій досліджуваних БФ; час інкубації 24 год.

Розділ 4. ОБГОВОРЕННЯ

Згідно до біоінформаційних розрахунків саме існування систем спряження електронів між атомами азоту і піразольного циклу та їх можлива конформаційна взаємодія з дифосфоною групою викликає інтерес у контексті впливу на редокс–процеси як *in vitro*, так і *in vivo*. Дослідження антиоксидантних властивостей новостворених бісфосфонатів, так як і їх цитотоксичності, допоможе поглибити розуміння молекулярно–кінетичних їх властивостей та з'ясувати терапевтичний потенціал.

За результатами, отриманими в ході експериментальної діяльності, деякі з нових піразолвмісних бісфосфонатів проявляли властивості сильних антиоксидантів. Найбільш активну дію виявили сполуки 11N5 та 11N3. Отримані результати досліджень АО властивостей БФ у середовищі із додаванням сироватки мали пропорційні значення у порівнянні зі зразками без використання сироватки, проте із меншою інтенсивністю. Таку закономірність можна пов'язати з наявністю біологічних умов, наближених до реальних, у яких поряд із бісфосфонатами є ряд природних компонентів крові, що цілком здатні впливати на антиоксидантну активність БФ.

Наявність високостабільних рівнів антиоксидантної дії піразолвмісних бісфосфонатів у майбутньому може розглядатися в області лікування або профілактики захворювань, пов'язаних з окисним стресом, таких як нейродегенеративні хвороби, серцево – судинні захворювання, а також онкологічні патології, в лікуванні якого активно застосовують стратегії зміни фіксованої схеми керування оксидативним стресом. Зростання ефективності антиоксидантної активності залежно від підвищення концентрації бісфосфонатів є важливим фактором в оптимізації дозувань у потенційних фармакологічних застосуваннях.

Еталонний та найефективніший бісфосфонат сучасності – золедронат в дослідженнях проявляв прооксидантні властивості. Пік дії золедронату як

прооксиданта найактивніше формувався в середовищі із сироваткою за умов низької концентрації сполуки. Підвищення відсоткового вмісту та відсутність сироватки зпроектували дію золедронової кислоти до прояву антиоксидантних властивостей. Такий механізм дії може бути пов'язаний з неефективністю нейтралізації всіх наявних прооксидантних факторів у сироватці, що теоретично пригнічують антиоксидантну дію золедронату та стимулюють загальний прооксидантний ефект у клітинах. Також на це може мати вплив на дефіцит ендогенних антиоксидантів, що перманентно продукуються у відповідь на формування надмірної кількості активних форм кисню.

Результати визначення тотальної антиоксидантної активності бісфосфонатів чітко корелюються з даними, отриманими при аналізі концентрації ізопреноїдів та холестеролу мевалонатного шляху з міченим вуглецем ^{14}C , а також із даними інгібувальної дії бісфосфонатів на ензиматичну активність фарнезил пірофосфат синтази. В кожному з досліджень золедронат проявляв себе як найактивніший інгібітор мевалонатного шляху синтезу холестеролу шляхом активного інгібування ензиму FPPS, що стало підґрунтям для суттєвого зниження рівня утворення ізопреноїдів.

Як показали нещодавні дослідження [51], нітроген-вмісним бісфосфонатам властива здатність викликати сильний окислювальний стрес і прозапальний стан у клітинах (особливо для золедронату). Також з дією цього типу бісфосфонатів пов'язане пригнічення сигнального шляху ERK1/2 [52] (позаклітинні сигнал–регульовані кінази, що контролюють гомеостаз м'язових серцевих клітин та відповіді серця на стрес). Цей внутрішньоклітинний молекулярний шлях трансдукції сигналу має критичну залежність від процесу пренілювання складових протеїнів. Окремо бісфосфонати мають негативний вплив на виробництво коензиму Q – одного з ключових переносників електронів у дихальному ланцюзі

(системі спряження) мітохондрій. [53, 54]. Учасник процесу окисного фосфорилування убіхінон (кофермент Q) локалізується в кожній клітинній мембрані, де виконує роль антиоксиданту. CoQ має пряму залежність від N-бісфосфонатів, що блокують FPPS: поліізопреноїдний ланцюг, одна з двох складових CoQ, є проміжним продуктом мевалонатного шляху. Продукування коензиму Q в клітинах може призводити до збільшення рівня активних форм кисню та, відповідно, до розвитку окисного стресу. Завдяки іншим внутрішньоклітинним антиоксидантам, таким як глутатіонредуктаза та супероксиддисмутаза, можливий частковий контроль над порушеним окисно-відновним гомеостазом. Проте довготривалий курс лікування сучасними бісфосфонатами при захворюваннях, таких як остеопороз, призводить до постійного негативного прооксидантного впливу. Натомість отримані характеристики нових піразолвмісних бісфосфонатів вказують на їх меншу інгібувальну властивість на ензим FPPS, що дозволить зменшити відхилення від стандартних рівнів окисно-відновного гомеостазу. Також завдяки високим антиоксидантним властивостям піразолвмісні бісфосфонати можуть спричинити додаткову підтримку іншим внутрішньоклітинним антиоксидантам, що збільшить імовірність стабілізації балансу.

За найменших концентрацій кожен із досліджуваних піразолвмісних БФ проявляв властивості низько цитотоксичної сполуки порівняно до Zol. Зі збільшенням концентрації рівень цитотоксичності різко зростав, на відміну від показників золедронові кислоти, які піднімалися доволі повільно. Найбільше наближення до золедронату за різницею показників концентрацій $1 \cdot 10^{-3}$ М та $0,5 \cdot 10^{-5}$ М має сполука 11N4. Але найбільш ефективними у перспективі для подальших досліджень за результатами перевірки на цитотоксичність, ймовірно, можна вважати 11N3, так як відсоткова різниця у концентраціях життєздатних клітин J774A.1 при зміні концентрації у 5 разів з $1 \cdot 10^{-4}$ М до $0,5 \cdot 10^{-5}$ М була майже однаковою. Це

вказує на їх теоретично нижче коливання у цитотоксичній дії на клітини при збільшеній концентрації відносно інших досліджених БФ.

За результатами роботи із клітинами гепатоцитів показано, що найменш токсичними виявилися сполуки 11N3 та 11N.. Хоча відповідно до рівнів загиблих клітин під дією золедронової кислоти кожна із демонстрували менші показники цитотоксичності.

З урахуванням дослідження нових піразолвмісних бісфосфонатів на радикал-нейтралізуючий ефект та рівень інгібування мевалонатного шляху, можна виокремити сполуку 11N3 як найефективнішого представника серед досліджуваних зразків, яка має тенденцію для подальшого вивчення її властивостей та впливу як на внутрішньоклітинне середовище, так і на організм в цілому.

ВИСНОВКИ

1. Усі досліджувані піразолвмісні бісфосфонати у різному ступені виявляють антиоксидантні, радикал-нейтралізуючі властивості. Деякі з параметрів нових сполук виявлялися кращими у порівнянні з обраною за еталонний зразок золедроновую кислотою. Серед усіх піразолвмісних БФ, що досліджувалися у цій роботі, найбільш ефективною виявилася сполука 11N3.

2. Застосування піразолвмісних БФ виявило значне зменшення синтезу ізопреноїдів мевалонатного шляху у клітинах лінії J774A.1: найвищий рівень активності виявили 11N3 та 11N5 за концентрації сполук 10 та 100 мкМ.

3. Виявлено високу ефективність інгібування ензиматичної активності фарнезил пірофосфат синтази досліджуваними БФ *in vitro*: найбільш перспективними сполуками у концентрації 10 мкМ виявилися 11N та 11N5, що пригнічували ензиматичну активність FPPS на 69,5% та 65,2%, відповідно, порівняно із до контролем.

4. Дослідження цитотоксичності методом МТТ показало, що сполука 11N4 є найбільш ефективною проти клітин J774A.1 і гепатоцитів, демонструючи значну інгібувальну дію порівняно із золедроновую кислотою. Сполуки 11N5 та 11N3 також виявили високий інгібувальний ефект на клітини J774A.1.

5. За результатами комплексу досліджень, які були застосовані для вивчення характеристик нових піразольних сполук, найкращі властивості проявлялися у N-БФ 11N3. Це робить його потенціальним об'єктом для подальших досліджень із перспективою застосування у медичній галузі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Aibar-Almazán A, Voltes-Martínez A, Castellote-Caballero Y, Afanador-Restrepo DF, Carcelén-Fraile MDC, López-Ruiz E. Current Status of the Diagnosis and Management of Osteoporosis. *Int J Mol Sci*. 2022 Vol.23, N 16. P.9465.
2. Akkawi I, Zmerly H. Osteoporosis: Current Concepts. *Joints*. 2018. Vol.6, N 2. P.122-127.
3. Szamatowicz M, Szamatowicz J. Recent advances in prophylactics and treatment of osteoporosis. *Prz Menopauzalny*. 2022 Vol.21, N 2 P.133-137.
4. Baig MA, Bacha D. Histology, Bone. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541132/> (Updated 01.05.2023).
5. Boskey AL, Robey PG. The Composition of Bone. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 2018. P. 84-92.
6. Šromová V, Sobola D, Kaspar P. A Brief Review of Bone Cell Function and Importance. *Cells*. 2023. Vol.12, N 21. P.2576.
7. Sun Y, Wan B, Wang R, Zhang B, Luo P, Wang D, Nie JJ, Chen D, Wu X. Mechanical Stimulation on Mesenchymal Stem Cells and Surrounding Microenvironments in Bone Regeneration: Regulations and Applications. *Front Cell Dev Biol*. 2022. Vol. 10, N 808303.
8. Bradley EW, Westendorf JJ, van Wijnen AJ, Dudakovic A. Osteoblasts: function, development, and regulation. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 2018. P. 31-37.
9. Boskey AL, Robey PG. The Composition of Bone. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 2018. P. 84-92.
10. Bonewald LF. Osteocytes. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 2018. P. 38-45.

11. Tresguerres FGF, Torres J, López-Quiles J, Hernández G, Vega JA, Tresguerres IF. The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. *Ann Anat.* 2020. Vol. 227. P. 151422.
12. H. Takayanagi. Osteoclast biology and bone resorption. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* 2018. P. 46–53.
13. Sun Y, Li J, Xie X, Gu F, Sui Z, Zhang K, Yu T. Recent Advances in Osteoclast Biological Behavior. *Front Cell Dev Biol.* 2021. Vol. 9. P. 788680.
14. Arnett T. Osteoclast biology. *Marcus and Feldman's Osteoporosis.* 2021. Vol. 5, P. 99-110.
15. Delaisse J.M., Andersen T.L., Kristensen H.B., Jensen P.R., Andreasen C.M., Soe K. Re-thinking the bone remodeling cycle mechanism and the origin of bone loss. *Bone.* 2020. Vol. 141, P. 115628.
16. Veis D.J., O'Brien C.A. Osteoclasts, Master Sculptors of Bone. *Annu Rev Pathol.* 2023. Vol. 18, P. 257-281.
17. Yao D, Huang L, Ke J, Zhang M, Xiao Q, Zhu X. Bone metabolism regulation: Implications for the treatment of bone diseases. *Biomed Pharmacother.* 2020. Vol, 129. P. 110494.
18. Rowe P, Koller A, Sharma S. Physiology, Bone Remodeling.. *In: StatPearls.* URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499863/> (Updated 17.03.2023).
19. Wawrzyniak A, Balawender K. Structural and Metabolic Changes in Bone. *Animals.* 2022. Vol. 12, N 15. P. 1946.
20. Bhattarai HK, Shrestha S, Rokka K, Shakya R. Vitamin D, Calcium, Parathyroid Hormone, and Sex Steroids in Bone Health and Effects of Aging. *J Osteoporos.* 2020. P. 9324505.
21. Guo J, Chen S, Zhang Y, Liu J, Jiang L, Hu L, Yao K, Yu Y, Chen X. Cholesterol metabolism: physiological regulation and diseases. *MedComm.* 2024. Vol. 5, N 2. P. e476.

22. Suzuki A, Minamide M, Iwaya C, Ogata K, Iwata J. Role of Metabolism in Bone Development and Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2020 Vol. 21, N 23. P. 8992.
23. El Demellawy D, Davila J, Shaw A, Nasr Y. Brief Review on Metabolic Bone Disease. *Academic Forensic Pathology.* 2018. Vol. 8, N 3. P. 611-640.
24. Oton-Gonzalez L, Mazziotta C, Iaquinta MR, Mazzone E, Nocini R, Trevisiol L, D'Agostino A, Tognon M, Rotondo JC, Martini F. Genetics and Epigenetics of Bone Remodeling and Metabolic Bone Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, N 3. P. 1500.
25. Baxter, vV. K., G. C. Shaw, C. M. Garrett, K. A. Metcalf. Bone, Muscle, and Skeletal Disease. *The Common Marmoset in Captivity and Biomedical Research* 2nd ed. 2019. P. 1-104.
26. Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem.* 2018. Vol. 55, N 3. P. 308-327.
27. Galliera E., Massimiliano M., Romanelli C. Molecular Basis of Bone Diseases. *Molecular Pathology.* 2018. P. 627-649.
28. Ralston SH. Bisphosphonates in the management of Paget's disease. *Bone.* 2020. Vol. 138. P. 115465.
29. Sadiq NM, Anastasopoulou C, Patel G. Hypercalcemia. *In: StatPearls* URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430714/> (Updated 07.05.2024).
30. Ebetino FH, Sun S, Cherian P, Roshandel S, Neighbors JD, Hu E, Dunford JE, Sedghizadeh PP, McKenna CE, Srinivasan V, Boeckman RK, Russell RGG. Bisphosphonates: The role of chemistry in understanding their biological actions and structure-activity relationships, and new directions for their therapeutic use. *Bone.* 2022. N 156. P. 116289.
31. Mitchell A, Watts AE, Ebetino FH, Suva LJ. Bisphosphonate use in the horse: what is good and what is not? *BMC Vet Res.* 2019. Vol. 15, N 1. P. 211.

32. Suzuki K, Takeyama S, Murakami S, Nagaoka M, Chiba M, Igarashi K, Shinoda H. Structure-Dependent Effects of Bisphosphonates on Inflammatory Responses in Cultured Neonatal Mouse Calvaria. *Antioxidants (Basel)*. 2020. Vol. 9, N 6. P. 503.
33. Park J, Pandya VR, Ezekiel SJ, Berghuis AM. Phosphonate and Bisphosphonate Inhibitors of Farnesyl Pyrophosphate Synthases: A Structure-Guided Perspective. *Front Chem*. 2021. Vol 6, N 8. P. 612728.
34. Roy M, Roux S. Rab GTPases in Osteoclastic Bone Resorption and Autophagy. *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21, N 20. P. 7655.
35. Gendaszewska-Darmach E, Garstka MA, Błażewska KM. Targeting Small GTPases and Their Prenylation in Diabetes Mellitus. *J Med Chem*. 2021. Vol. 64, N 14. P. 9677-9710.
36. Song S, Cong W, Zhou S, Shi Y, Dai W, Zhang H, Wang X, He B, Zhang Q. Small GTPases: Structure, biological function and its interaction with nanoparticles. *Asian J Pharm Sci*. 2019. Vol. 14, N 1. P. 30-39.
37. Cremers S, Ebetino FH, Phipps R. On the pharmacological evaluation of bisphosphonates in humans. *Bone*. 2020. P.139.
38. Cremers S, Drake MT, Ebetino FH, Rogers MJ, Bilezikian JP, Russell RGG. Clinical and translational pharmacology of bisphosphonates. *In: Principles of Bone Biology*. 2020. P. 1671–1687.
39. de Roij van Zuijdewijn C, van Dorp W, Florquin S, Roelofs J, Verburgh K. Bisphosphonate nephropathy: A case series and review of the literature. *Br J Clin Pharmacol*. 2021. Vol. 87, N 9. P. 3485-3491.
40. On SW, Cho SW, Byun SH, Yang BE. Various Therapeutic Methods for the Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ) and Their Limitations: A Narrative Review on New Molecular and Cellular Therapeutic Approaches. *Antioxidants (Basel)*. 2021. Vol. 10, N 5. P.680.

41. Gupta M, Gupta N. Bisphosphonate Related Jaw Osteonecrosis. (Updated 24.06.2023). *In: StatPearls* . URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534771/> .
42. Singh M, Gonegandla GS. Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws (BIONJ). *J Maxillofac Oral Surg*. 2020. Vol. 19, N 2. P. 162-167.
43. Panagiotakou A, Yavropoulou M, Nasiri-Ansari N, Makras P, Basdra EK, Papavassiliou AG, Kassi EN. Extra-skeletal effects of bisphosphonates. *Metabolism*. 2020. Vol. 110. P. 154264.
44. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*. 1999. Vol. 269, N 2. P. 337-341.
45. Gulcin İ, Alwasel SH. DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes*. 2023. Vol. 11, N 8. P. 2248.
46. Ranjith Kumar R, Hanumantha Rao P and Arumugam M. Lipid extraction methods from microalgae: a comprehensive review. *Front*. 2015. Vol. 2, P. 61.
47. Silver J. Let Us Teach Proper Thin Layer Chromatography Technique! *J. Chem. Educ*. 2020. Vol. 97, N 12. P. 4217–4219.
48. Sharifian Gh M, Norouzi F. Guidelines for an optimized differential centrifugation of cells. *Biochem Biophys Rep*. 2023. Vol. 36. P. 101585.
49. Schmidberger JW, Schnell R, Schneider G. Structural characterization of substrate and inhibitor binding to farnesyl pyrophosphate synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2015. Vol. 71, N 3. P. 721-731.
50. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol*. 2017. Vol. 1601. P. 1-17.

51. Budzinska A, Galganski L, Jarmuszkiewicz W. The bisphosphonates alendronate and zoledronate induce adaptations of aerobic metabolism in permanent human endothelial cells. *Sci Rep*. 2023. Vol.13, N 1. P.16205.
52. Gilbert CJ, Longenecker JZ, Accornero F. ERK1/2: An Integrator of Signals That Alters Cardiac Homeostasis and Growth. *Biology (Basel)*. 2021. Vol. 10, N 4. P. 346.
53. Hernández-Camacho JD, García-Corzo L, Fernández-Ayala DJM, Navas P, López-Lluch G. Coenzyme Q at the Hinge of Health and Metabolic Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2021. Vol 10, N 11. P. 1785.
54. Staiano C, García-Corzo L, Mantle D, Turton N, Millichap LE, Brea-Calvo G, Hargreaves I. Biosynthesis, Deficiency, and Supplementation of Coenzyme Q. *Antioxidants (Basel)*. 2023. Vol. 12, N 7. P. 1469.