

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ БИСФОСФОНАТОВ И СТРОНЦИЯ РАНЕЛАТА

А. И. Венгеровский¹, И. А. Хлусов^{1, 2}, К. А. Нечаев²

Бисфосфонаты как химические аналоги изопреноидных липидов по конкурентному принципу уменьшают в остеокластах активность фанезилдифосфатсинтазы и тормозят пренилирование. Непренилированные малые ГТФазы не прикрепляются к мембране остеокластов, что ослабляет их резорбтивную функцию и ускоряет апоптоз. Стронция ранелат, активируя при участии кальцийчувствительного рецептора Wnt-сигнальный путь и изменяя функции системы RANKL/RANK/OPG, повышает репликационную активность и подавляет апоптоз остеокластов, а также тормозит резорбтивную функцию и ускоряет апоптоз остеокластов.

Ключевые слова: бисфосфонаты; стронция ранелат; остеокласты; остеобласты.

Бисфосфонаты (алендроновая, золендроновая, ибандроновая, клодроновая, памидроновая, тилудроновая, этидроновая кислоты) применяют при болезни Педжета (очаги патологического остеогенеза в костях, содержащие аномальные многоядерные остеокласты), постменопаузальном остеопорозе, остеопорозе, вызванном применением глюкокортикоидов, миеломной болезни, гиперкальциемии, метастазах злокачественных опухолей в костях [1] и несовершенном остеогенезе у детей [2]. Стронция ранелат назначают при дегенеративных заболеваниях костной ткани, постменопаузальном остеопорозе у женщин с целью профилактики переломов позвонков и шейки бедра [3, 36].

Под влиянием бисфосфонатов и стронция ранелата увеличиваются масса трабекулярной части кости, число и толщина трабекул, улучшаются механические свойства кости, снижается риск переломов. При этом стронция ранелат не только подобно бисфосфонатам подавляет резорбцию костной ткани, но и стимулирует костеобразование [8].

Интерес исследователей сфокусирован, в основном, на сравнительных клинических исследованиях лекарственных средств для терапии и профилактики остеопороза [35]. Значительно меньше работ посвящено изучению молекулярных и клеточных эффектов бисфосфонатов и стронция ранелата.

С 1930 гг. стало известно, что пирофосфаты, препятствуя кристаллизации карбоната и других солей кальция, снижают жесткость воды и задерживают образование накипи. Пирофосфаты были обнаружены в

плазме и моче человека. В 1968 г. исследовательская группа Г. Флейша представила отчет о способности пирофосфатов при парентеральном введении препятствовать кальцификации аорты, вызванной в эксперименте введением витамина D₃ в большой дозе [16].

При приеме внутрь пирофосфаты полностью гидролизуются в кишечнике. Для преодоления этого недостатка были синтезированы бисфосфонаты как стабильные к гидролизу аналоги пирофосфатов с антимиерализационными свойствами, хотя при приеме внутрь их биодоступность составляет всего 0,6 – 2 %. В молекуле бисфосфонатов находится центральный атом углерода, фланкированный двумя фосфоновыми группами (P-C-P). Выделяют азотсодержащие и азотнесодержащие бисфосфонаты [12].

Структура P-C-P ответственна за высокую аффинность бисфосфонатов к гидроксипатиту костного матрикса. Монофосфонаты и соединения со структурой P-C-C-P или P-N-P характеризуются меньшей антирезорбтивной активностью [22]. Гидроксил облегчает связывание бисфосфонатов с кристаллами гидроксипатита и способствует его превращению в хелатное соединение [55]. Азотсодержащие бисфосфонаты (алендроновая, золендроновая, ибандроновая, памидроновая кислоты) оказывают в 10 – 10000 раз более выраженное антирезорбтивное влияние, чем бисфосфонаты, не содержащие атом азота или аминокгруппу [45].

Распределение бисфосфонатов в организме высокоселективно. Около половины циркулирующей субстанции накапливается в костях, преимущественно в остеокластах [9]. Содержание в других тканях незначительно и быстро снижается в результате почечной экскреции. При назначении бисфосфонатов в одинаковых дозах разным людям в костной ткани создается различная концентрация. Такие вариации обусловлены различиями почечной экскреции и темпа обновления костей. Бисфосфонаты в наибольшей степени на-

¹ Сибирский государственный медицинский университет, 634050, Томск, ул. Московский тракт, 2/ю

² НОЦ “Биосовместимые материалы и биоинженерия” при Томском политехническом университете, Сибирском государственном медицинском университете, Институте физики прочности и материаловедения СО РАН, 634050, Томск, пр. Ленина, 43.

капливаются в позвоночнике и в меньшей концентрации – в шейке бедра. Различается также поглощение бисфосфонатов разными типами костной ткани: более интенсивно они накапливаются в трабекулярной костной ткани. Молекулы бисфосфонатов преимущественно поступают в сайты активного ремоделирования костей [11].

Бисфосфонаты, связанные с гидроксиапатитом, медленно высвобождаются в кровотоки в процессе резорбции костей, затем они экскретируются почками. После начальной быстрой элиминации наступает фаза медленного выведения в течение от нескольких месяцев до 12 лет. В итоге ремоделирование костей длительно остается замедленным после отмены препаратов [4].

Бисфосфонаты подавляют резорбтивную активность и усиливают апоптоз остеокластов [38, 56]. Азотсодержащие бисфосфонаты (клодроновая, тилудроновая, этидроновая кислоты) превращаются в аналог АТФ — аденозин-5'-(β,γ -дихлорометилен)трифосфат. Аминобисфосфонаты — алендроновая, золендроновая, ибандроновая и памидроновая кислоты — не метаболизируются и действуют исходной молекулой [1].

Биохимический механизм действия бисфосфонатов обусловлен нарушением этапа пренилирования в мевалонатном метаболическом пути [51]. В процессе синтеза стероидов из мевалонной кислоты образуются нестероидные изопреноидные липиды — фарнезилдифосфат и геранилгеранилдифосфат. Они участвуют в пренилировании белков — фарнезилировании и геранилгеранилировании. При участии пренилтрансферазы, протеинфарнезилтрансферазы и геранилгеранилтрансферазы I типа 15-углеродная фарнезилная, либо 20-углеродная геранилгеранильная группы присоединяются к цистеину в СААХ-последовательности белков [58]. Так происходит посттрансляционная активация ГТФ-связывающих белков — Ras, Rab и Rho, регулирующих дифференцировку и функционирование клеток [40]. Белок ядерной мембраны ламин А/С фарнезилируется для участия в остеобластогенезе, Ras-подобные белки после геранилгеранилирования активируют эндоцитоз и дифференцировку клеток [41].

Для функционирования остеокластов наибольшее значение имеет пренилирование малых ГТФаз, регулирующих поляризацию клеток и реорганизацию их цитоскелета. Большинство малых ГТФаз подсемейства Rab и некоторые ферменты подсемейства Rho модифицируются геранилгеранилированием, ГТФазы подсемейства Ras и часть белков подсемейства Rho подвергаются фарнезилированию. ГТФазы после пренилирования при участии протеинпренилтрансферазы и посттрансляционной модификации прочно фиксируются на мембране остеокластов [25].

Как известно, остеокласты представляют собой многоядерные поляризованные клетки с уникальной функцией — способностью осуществлять резорбцию минерализованных субстратов, таких как костная ткань, дентин и минерализованный хрящ [24]. В про-

цессе подготовки к резорбции остеокласты реорганизуют мембрану таким образом, что формируются 4 различных домена: зона уплотнения, гофрированная мембрана, базолатеральный домен и секреторный домен. Зона уплотнения — сформированный подосомами участок для прочного прикрепления остеокластов к костному матриксу. Подосомы состоят из плотно упакованных актиновых филаментов и белков, ассоциированных с F-актином, окружены интегринами и белками винкулином и талином. Они изолируют участок под клеткой для последующей деградации матрикса [32]. Затем формируется изогнутая гофрированная граница, через которую секретуются протоны и протеазы, соответственно деминерализующие и растворяющие костный матрикс. Продукты деградации поглощаются механизмом эндоцитоза и затем экскретируются на противоположной стороне клетки секреторным доменом [9].

Бисфосфонаты по химической структуре близки изопреноидным липидам — фарнезилдифосфату и геранилгеранилдифосфату. Бисфосфонаты уменьшают в остеокластах активность фарнезилдифосфатсинтазы — ключевого фермента мевалонатного пути синтеза изопреноидов [10, 15, 50]. Бисфосфонаты по “медленно-прочному” механизму связываются с активным центром фермента, что сопровождается его конформационными изменениями [13]. Бисфосфонаты также слабо ингибируют другие ферменты мевалонатного пути — геранилгеранилдифосфатсинтазу и скваленсинтазу [43]. Подавление фарнезилдифосфатсинтазной активности остеокластов сопровождается истощением фарнезилдифосфата и геранилгеранилдифосфата, необходимых для пренилирования.

Непренилированные малые ГТФазы не прикрепляются к мембране остеокластов и накапливаются в цитоплазме в ГТФ-связанном состоянии [13]. В итоге остеокласты не поляризуются, утрачивают зону уплотнения, гофрированную мембрану и способность к везикулярному переносу. В гофрированной мембране прекращается формирование F-актинового кольца [43].

Предшественники остеокластов, обработанные азотсодержащими бисфосфонатами, малоспособны к поляризации, у них поврежден цитоскелет и снижена резорбтивная активность. Остеокласты подвергаются ускоренному апоптозу [9, 42]. Кроме того, бисфосфонаты тормозят поступление предшественников остеокластов в костную ткань и их превращение в зрелые остеокласты.

Остеокласты являются компонентами гемопоэтического микроокружения. При их активации усиливается мобилизация клеток-предшественников в кровотоки. Подавление остеокластной активности под влиянием бисфосфонатов нормализует гемопоз [29, 33].

Влияние бисфосфонатов на функции остеобластов более сложное и менее изученное, чем влияние на жизнедеятельность остеокластов. Бисфосфонаты могут дозозависимо стимулировать как пролиферацию и дифференцировку остеобластов, так и нарушать жиз-

недеятельность костеобразующих клеток. В концентрациях 0,01 – 1 мкМ бисфосфонаты усиливают пролиферацию и дифференцировку остеобластов, защищают их от апоптоза [39, 52]. В концентрациях 20 – 100 мкМ они тормозят пролиферацию остеобластов, ускоряют их апоптоз, подавляют способность минерализовать матрикс [27].

Бисфосфонаты ослабляют активирующее влияние остеобластов на функции остеокластов. Рецепторы “остеокластогенных” медиаторов присутствуют на поверхности клеток с характеристиками остеобластов, но не обнаруживаются у предшественников остеокластов [52]. Нарушая пренилирование белков, бисфосфонаты также препятствуют остеобластной дифференцировке мезенхимных стволовых клеток [20, 37].

Молекула стронция ранелата состоит из 2 атомов стабильного стронция и органического остатка — ранеловой кислоты [47]. Стронция ранелат сдвигает процесс ремоделирования кости в сторону восстановления за счет торможения процессов резорбции [23]. Биодоступность стронция ранелата при приеме внутрь выше, чем биодоступность бисфосфонатов, и достигает 19 – 27 %. В костях стронция ранелат связывается с гидроксиапатитом [1].

Главной молекулярной мишенью стронция ранелата считается кальцийчувствительный рецептор. Этот метаболитный, ассоциированный с G-белком рецептор экспрессируется на мембране остеокластов, остеобластов и клеток костного мозга [14, 26, 53]. В структуре кальцийчувствительного рецептора присутствуют 3 домена — внеклеточный (около 600 аминокислот), трансмембранный (200 аминокислот) и короткий внутриклеточный. Внеклеточный домен взаимодействует с ионами и содержит области, критичные для сигнальной трансдукции [48].

Кальцийчувствительный рецептор взаимодействует не только с ионами кальция, но и с другими катионами, имеющими сходство с атомной структурой кальция, — стронцием, естественными полиаминами, некоторыми антибиотиками. Аффинитет неорганических двух- и трехвалентных катионов к кальцийчувствительному рецептору уменьшается в последовательности $La^{3+} > Gd^{3+} > Be^{2+} > Ca^{2+} = Ba^{2+} > Sr^{2+} > Mg^{2+}$ [34].

При активации кальцийчувствительного рецептора снижается активность аденилатциклазы и синтез цАМФ. Рецептор также активирует фосфолипазу C, что повышает продукцию инозитолтрифосфата, стимулирующего ядерную транслокацию активатора апоптоза зрелых остеокластов — ядерного фактора каппа В (NF-κB) [30].

Стронция ранелат при участии кальцийчувствительного рецептора активирует Wnt-сигнальный путь с последующим повышением активности протеинкиназы и торможением апоптоза остеобластов [46]. Это вещество как антагонист склеростина, экспрессируемого остеобластами, восстанавливает нарушенное связывание белка Wnt с рецепторами и уменьшает транспорт β-катенина в ядро клеток [31]. Такие эффекты на-

правлены на рост репликационной активности и выживание остеобластов [46].

Стронция ранелат активирует Wnt-сигнальный путь также без участия кальцийчувствительного рецептора. При этом рецепторную функцию выполняет нуклеарный фактор активированных T-клеток, реагирующий на изменение концентрации ионов кальция [19]. Еще одним механизмом активации остеогенеза под влиянием стронция ранелата служит усиление дифференцировки мезенхимных стволовых клеток в остеогенном направлении, что подтверждается увеличением экспрессии щелочной фосфатазы, генов коллагена I типа, остеопонтина и накоплением остеоидного матрикса [54].

Активность остеобластов и остеокластных предшественников регулируется различными медиаторами, включая простагландины и цитокины [57]. Стронция ранелат способен вызывать не только прямой клеточный эффект, но и в процессе ремоделирования кости опосредованно при участии гуморальных факторов влияет на межклеточную кооперацию. В культуре стромальных клеток костного мозга стронция ранелат повышает продукцию простагландина E_2 [7]. Этот локальный медиатор воспаления стимулирует остеогенез и подавляет резорбцию кости [18].

Ключевым фактором, регулирующим образование и резорбцию костей, является система RANKL/RANK/OPG — сигнальный путь, включающий рецепторы RANK (receptor activator of nuclear factor kappa B) и остеопротегерин (OPG) [44, 49]. Белковый лиганд этих рецепторов RANKL входит в многочисленное семейство факторов некроза опухоли и продуцируется остеобластами [5, 21].

Остеопротегерин стимулирует остеогенез. Мыши с нокаутированным геном остеопротегерина формируют фенотип с тяжелой остеопенией. У таких животных повышены темп резорбции и пористость костной ткани, снижена ее плотность [28]. Стронция ранелат повышает экспрессию остеопротегерина и активирует анаболические процессы у преостеобластов и остеобластов [17]. Кроме того, остеопротегерин, связываясь с RANKL, предотвращает взаимодействие данного лиганда с RANK и в результате этого нарушает дифференцировку остеокластов и снижает их резорбтивную активность [6].

Таким образом, бисфосфонаты и стронция ранелат активируют молекулярные системы, тормозящие функции остеокластов и усиливающие остеогенез. Эффект бисфосфонатов на остеобласты менее стабилен и зависит от дозы препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Б. Риггз, Дж. Мелтон, *Остеопороз*, БИНОМ, Невский диалект, Санкт-Петербург (2000).
2. И. А. Хлусов, А. И. Венгеровский, К. А. Нечаев и др., *Клиническая фармакология и терапия*, **22**(2), 78 – 82 (2013).
3. И. А. Хлусов, А. И. Венгеровский, К. А. Нечаев и др., *Экспериментальная и клиническая фармакология*, **76**(1), 35 – 38 (2013).
4. D. Black, A. Schwartz, K. Ensrud, J. Cauley, *J. Am. Med. Assoc.*, **296**(24), 2927 – 2938 (2006).

5. B. F. Boyce, L. Xing, *Arch. biochem. biophys.*, **473**(2) 139 – 146 (2008).
6. A. V. Campenhou, J. Golledge, *Atherosclerosis.*, **204**(2), 321 – 329 (2009).
7. S. Choudhary, N. Halbout, C. Alander, et al., *J. Bone Miner. Res.*, **22**(7), 1002 – 1010 (2007).
8. B. Cortet, *Rheumatology*, **48**(Suppl 4), iv1 – iv2 (2009).
9. F. Coxon, A. Taylor, *Semin. Cel. Dev. Biol.*, **19**(5), 424 – 433 (2008).
10. F. Coxon, K. Thompson, A. J. Roelofs, F. H. Ebetino, *Bone*, **42**(5), 848 – 860 (2008).
11. S. Cremers, S. Papapoulos, *Bone*, **49**(1), 42 – 49 (2011).
12. M. T. Drake, L. Bart, B. L. Clarke, S. Khosla, *Mayo Clin. Proc.*, **83**(9), 1032 – 1045 (2008).
13. J. E. Dunford, M. J. Rogers, F. H. Ebetino, et al., *J. Bone Miner. Res.*, **21**(5) 684 – 694 (2006).
14. M. Dvorak-Ewell, T. H. Chen, N. Liang, C. Garvey, *J. Bone Miner. Res.*, **26**(12), 2935 – 2947 (2011).
15. J. E. Fisher, E. Rosenberg, A. C. Santora, A. A. Reszka, *Calcif. Tissue Int.*, **92**(6), 531 – 538 (2013).
16. H. Fleisch, *Breast Cancer Res.*, **4**(1), 30 – 34 (2002).
17. J. E. Fonseca, *Rheumatology (Oxford)*, **47**(1), 17 – 19 (2008).
18. R. N. Fracon, J. M. Teofilo, R. B. Satin, T. Lamano, *J. Oral Sci.*, **50**(3), 247 – 252 (2008).
19. O. Fromigue, E. Hay, A. Barbara, J. Marie, *J. Biol. Chem.*, **285**(28), 25251 – 25258 (2010).
20. L. Fu, T. Tang, Y. Miao, et al., *Bone*, **43**(1), 40 – 47 (2008).
21. P. Geusens, *Clin. Interv. Ag.*, **4**(2), 241 – 250 (2009).
22. R. Graham, G. Russell, *Bone.*, **49**(1), 2 – 19 (2011).
23. A. N. Hamdy, *Rheumatology (Oxford)*, **48**(4), 9 – 13 (2009).
24. K. Henriksen, J. Bollerslev, V. Everts, M. Karsdal, *Endocr. Rev.*, **32**(1), 31 – 63 (2011).
25. G. Hooff, W. G. Wood, W. E. Müller, G. Eckert, *Biochim. Biophys. Acta*, **1801**(7), 896 – 905 (2010).
26. A. S. Hurtel-Lemaire, R. Mentaverri, A. Caudrillier, et al., *J. Biol. Chem.*, **284**(1), 575 – 584 (2009).
27. A. I. Idris, J. Rojas, I. R. Greig, et al., *Calcif. Tissue Int.*, **82**(3), 191 – 201 (2008).
28. A. E. Kearns, S. Khosla, J. Kostenuik, *Endocr. Rev.*, **29**(2), 155 – 192 (2008).
29. M. Kotani, J. Kikuta, F. Klauschen, et al., *J. Immunol.*, **190**(2), 605 – 612 (2013).
30. G. S. Lee, N. Subramanian, A. I. Kim, et al., *Nature*, **492**(7427), 123 – 127 (2012).
31. C. Lin, X. Jiang, Z. Dai, et al., *J. Bone Miner. Res.*, **24**(10), 1651 – 1661 (2009).
32. C. Luxenburg, S. Winograd-Katz, L. Addadi, B. Geiger, *J. Cel. Sci.*, **125**(7), 1666 – 1672 (2012).
33. S. Lymperi, N. Horwood, S. Marley, et al., *Blood*, **111**(11), 1173 – 1181 (2008).
34. A. L. Magno, B. K. Ward, T. Ratajczak, *Mol. Persp. Endocrin. Rev.*, **32**(1), 3 – 30 (2011).
35. C. MacLean, S. Newberry, M. Maglione, et al., *Ann. Intern. Med.*, **148**(3), 197 – 213 (2008).
36. P. J. Meunier, D. Slosman, P. Delmas, et al., *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **87**(18), 2060 – 2066 (2002).
37. H. Mo, H. Yeganehjoo, A. Shah, W. K. Mo, *J. Nutr. Biochem.*, **23**(12), 1543 – 1551 (2012).
38. K. Ohgi, H. Kajiyu, F. Okamoto, et al., *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.*, **386**(7), 589 – 598 (2013).
39. L. I. Plotkin, S. C. Manolagas, T. Bellido, *Bone*, **39**(4), 443 – 452 (2006).
40. M. D. Resh, *Trends Mol. Med.*, **18**(4), 206 – 214 (2012).
41. D. Rivas, W. Li, R. Akter, et al., *J. Gerontol.*, **64**(10), 1015 – 1022 (2009).
42. A. J. Roelofs, K. Thompson, F. H. Ebetino, et al., *Cur. Pharm. Des.*, **16**(27), 2950 – 2960 (2010).
43. M. J. Rogers, J. C. Crockett, F. Coxon, J. Mönkkönen, *Bone.*, **49**(1), 34 – 41 (2011).
44. N. Rucci, *Clin. Cases Miner. Bone Metab.*, **5**(1), 49 – 56 (2008).
45. R. G. Russell, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1068**(2), 367 – 401 (2006).
46. M. S. Rybchyn, M. Slater, A. D. Conigrave, R. S. Mason, *J. Biol. Chem.*, **286**(27), 23771 – 23779 (2011).
47. T. Sibai, E. F. Morgan, T. A. Einhorn, *Clin. Ortho Relat. Res.*, **469**(8), 2215 – 2224 (2011).
48. S. Smajilovic, *J. Tfelt-Hansen Cardiovasc. Res.*, **75**(3), 457 – 467 (2007).
49. S. T. Tat, J. Pelletier, C. R. Velasco, et al., *Keio J. Med.*, **58**(1), 29 – 40 (2009).
50. A. Ueno, M. A. Terkawi, M. Yokoyama, et al., *Parasitol. Int.*, **62**(2), 189 – 192 (2013).
51. B. M. Wasko, J. Smits, L. Shull, et al., *J. Lipid Res.*, **52**(11), 1957 – 1964 (2011).
52. J. Xiong, C. A. O'Brien, *J. Bone Miner. Res.*, **27**(3), 499 – 505 (2012).
53. Y. Xue, Y. Xiao, J. Liu, et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **302**(7), 841 – 851 (2012).
54. F. Yang, D. Yang, J. Tu, et al., *Stem Cells.*, **29**(6), 981 – 991 (2011).
55. J. Yewle, D. Puleo, L. Bachas, *Bioconjug. Chem.*, **22**(12), 2496 – 2506 (2011).
56. V. Zanin, A. Marcuzzi, E. Piscianz, et al., *Inflam. Res.*, **61**(12), 1363 – 1367 (2012).
57. B. Zhao, L. B. Ivashkiv, *Arthr. Res. Ther.*, **13**(4), 234 – 240 (2011).
58. E. A. Zverina, C. L. Lamphear, E. Wright, C. A. Fierke, *Cur. Opin. Chem. Biol.*, **16**(5 – 6), 544 – 552 (2012).

Поступила 21.05.14

MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION OF BISPHOSPHONATES AND STRONTIUM RANELATE

A. I. Vengerovskii¹, I. A. Khlusov², and K. A. Nechaev²

¹ Department of Pharmacology, Siberian State Medical University, Moskovskii Trakt 2, Tomsk, 634050 Russia

² Joint Education and Research Center for Biocompatible Materials and Bioengineering, pr. Lenina 43, Tomsk, 634050 Russia

Bisphosphonates are chemical analogs of isoprene lipids, which competitively decrease the activity of farnesyl diphosphate synthase in osteoclasts and thus retard prenylation. The non-prenylated small GTPases cannot attach to the membrane of osteoclasts, which decreases their resorptive function and accelerates apoptosis. Strontium ranelate activates the Wnt signal pathway (with participation of calcium-sensitive receptor), increases the replication activity (by changing the function of RANKL/RANK/OPG system) thus suppressing the apoptosis of osteoblasts, and retards the resorptive function by accelerating the apoptosis of osteoclasts.

Keywords: bisphosphonates; strontium ranelate; osteoclasts; osteoblasts