

Вплив метіоніну на органічний матрикс кісткової тканини щурів лінії вістар різного віку

І.Г. Літовка¹, В.Я. Березовський¹, С.П. Весельський²

¹Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України,

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка; e-mail: litir@biph.kiev.ua

Досліджено вплив метіоніну на показники органічного матриксу кісткової тканини (КТ) молодих та дорослих щурів-самців лінії Вістар. Введення надлишку метіоніну (250 мг/кг протягом 21 доби) у харчовий раціон прискорює фізіологічну регенерацію КТ у молодих щурів. Підвищення у них активності лужної фосфатази у КТ на 54,4 % свідчить про домінування остеосинтетичної фази остеогенезу відносно остеолітичної. Така реакція типова для збільшення кількості активних остеобластів або підвищення чутливості їх рецепторів. На відміну від молодих тварин, у дорослих щурів-самців вікові зміни КТ проявляються у домінуванні остеолітичної фази. Отримані результати свідчать про вікозалежні відмінності впливу однакової дози чинника на процеси фізіологічної регенерації та органічний матрикс КТ щурів-самців, що варто враховувати при використанні медичних препаратів.

Ключові слова: метіонін; фізіологічна регенерація кісткової тканини.

ВСТУП

За даними фахівців-остеологів у сучасній медицині домінує точка зору, що для корекції вікових змін кісткової тканини (КТ) використовують гормональну замісну терапію, бісфосфонати, стероїди або моноклональні антитіла. Проте тривале вживання таких лікарських засобів обмежено через їх побічну дію, а саме: токсичність, екзему, серцево-судинні та онкологічні ускладнення [1-3]. Тому розробка нових стратегій безпечного лікування вікових змін КТ є нагальною і обґрунтованою.

Амінокислоти в останні роки привертають все більшу увагу дослідників через їх унікальну здатність відігравати роль сигнальних факторів у регуляторних шляхах [4-7]. Elefteriou і співавт. [8] показали безпосередній зв'язок між складом продуктів харчуванням і розвитком скелета. Підтверджено важливість амінокислот у формуванні кісток, синтезі колагену та диференціації остеобластів [9]. Ароматичні амінокислоти, на відміну від амінокислот із розгалуженими ланцю-

© І.Г. Літовка, В.Я. Березовський, С.П. Весельський

гами, найбільше стимулюють секрецію інсуліноподібного фактора росту (IGF-1) [10, 11]. З огляду на велику кількість доказів того, що амінокислоти відновлюють КТ за допомогою фізіологічних механізмів, імовірно, що метіонін також має на неї позитивний вплив, а саме на ремоделювання кісток.

Метіонін (CH₃SCH₂CH₂CH(NH₂)COOH) являє собою сірковмісну незамінну амінокислоту і є специфічним джерелом метильних груп. Відомо, що він бере участь у синтезі білків, гемоглобіну, адреналіну, креатину, критичних для синтезу таких життєвоважливих молекул, як цистеїн, карнітин, таурин, лецитин, фосфатидилхолін та здійснює ліпотропний ефект. Метіонін покращує синтез хрящів і тому використовується для лікування артриту [12].

Наведені матеріали сучасних досліджень відносно ролі метіоніну свідчать, що йому належить суттєвий вплив на формування нормальної структури КТ. Контроль за змінами вмісту амінокислот у кістковій системі взагалі і метіоніну зокрема, що відбуваються

з віком, важливий для розуміння сутності метаболічних процесів у КТ. Врахування всіх даних щодо значення метіоніну у підтриманні фізіологічного стану КТ дає змогу розробити відповідні заходи для оптимізації її метаболічних процесів на всіх етапах онтогенезу.

Метою роботи було дослідження впливу метіоніну на процеси фізіологічної регенерації КТ молодих і дорослих щурів-самців лінії Вістар.

МЕТОДИКА

Дослідження впливу метіоніну на показники КТ виконано протягом 21 доби [13] на 43 щурах-самцях лінії Вістар, стан КТ яких, на відміну від самиць, не залежить від періодичних гормональних варіацій. Групи склалися із 22 молодих (3 міс) і 21 дорослих (15 міс) тварин, які відрізнялися високою лабільністю метаболізму КТ у молодих щурів і стабільністю у дорослих. Вони знаходилися під наглядом ветеринарного лікаря у стандартних умовах акредитованого віварію Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України із дотриманням загальних принципів біоетики відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) при природному циклі світ/темрява. Отримували звичайний раціон харчування і вільний доступ до води. Щурам дослідної групи щоденно перорально у дозі 250 мг/кг вводили з їжею метіонін (сирна маса). Візуально контролювали повне поїдання порції. Контрольні шури у той самий час отримували аналогічну кількість сирної маси без метіоніну.

Біохімічні показники КТ досліджували за допомогою спектрофотометричних та хроматографічних методів. У сироватці крові визначали активність лужної фосфатази (ЛФ) - показник формування КТ та кислої фосфатази (КФ), тартратрезистентної кислої фосфатази (ТРКФ), глікозаміногліканів (ГАГ) [14] - показники резорбції. Результати

біохімічного дослідження активності фосфатаз розраховували (відповідно до загальноприйнятих остеологами індикаторів стану КТ [15, 16] у вигляді індексу фосфатаз: ЛФ/КФ та ЛФ/ТРКФ, які показують співвідношення остеосинтетичної і остеолітичної фази остеогенезу. В екстракті КТ досліджували вміст уронових кислот [17], гіалуронідазу активність [18], ліпідний та амінокислотний склад. Методом тонкошарової хроматографії визначали концентрацію вільних амінокислот у сироватці крові та КТ і ліпідів у КТ.

Для визначення основних фракцій ліпідів у КТ стегнову кістку очищали від м'язів і відмивали від кісткового мозку. Наважку (100 мг) знежирювали і зневоднювали в спирт:ацетоні (1:2), який потім випарювали. Сухий залишок ліпідів розчиняли в 100 мкл суміші хлороформ-бензол-ацетон (1:2:1) і наносили на розмічену хроматограму мікрошприцем. Хроматографічне розділення загальних ліпідів проводили на фабрично виготовлених пластинах Silufol (Чехія) розміром 15×15 см, попередньо активуючи їх впродовж 1 год в термостаті при 110⁰ С. Водночас у хроматографічну камеру для кращого насичення вносили фільтрувальний папір і наливали суміш розчинників: гександіетиловий ефір-оцтова кислота (7:23:1) [19].

Для визначення амінокислотного складу у КТ знежирену і зневоднену стегнову кістку піддавали гідролізу при 100⁰ С 20 хв у розчині 0,04 М СН₃СООН (1:10). Центрифугували 30 хв при 3000 об/хв. Супернатант випарювали при 40-60⁰ С і розчиняли в 0,1 мл 50 % С₂Н₅ОН. Наносили на розмічену хроматографу мікрошприцем по 20 мкл. Для розгонки використовували систему розчинників, яка включала ізоаміловий спирт-бутиловий спирт-оцтову кислоту-мурашину кислоту-воду (9:7:4:25) за об'ємом [20].

Статистичний аналіз отриманих експериментальних результатів здійснювали на ПК із використанням програми OriginPro 8,5. Оскільки розподіл був нормальним, їх представлено як середнє арифметичне та його

статистичну похибку ($M \pm m$). Вірогідність різниці між контрольними і дослідними зразками оцінювали за критерієм t Стьюдента. При $P < 0,05$ зміни вважали вірогідними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Після перорального введення надлишку метіоніну молодим тваринам активність ЛФ зросла на 54,4% у КТ відносно контролю (рис.1). У сироватці крові не спостерігали вірогідних змін цього показника порівняно з контрольними значеннями.

Лізосомальні ферменти КФ і ТРКФ, що секретуються активно діючими остеокластами і потрапляють у значній кількості в кров'яне русло, у сироватці крові і КТ цих тварин не змінювалися відносно вихідних значень. У сироватці крові контрольних молодих тварин індекс фосфатаз ЛФ/КФ і ЛФ/ТРКФ становив 1,27 і 2,69 відповідно. Після введення метіоніну індекс ЛФ/КФ знизився на 27,5 %, а ЛФ/ТРКФ зріс на 15 %. У КТ індекс ЛФ/КФ для контрольних щурів становив 15,0, а у дослідних збільшився до 34,8, тобто на 132 %. Отримані результати свідчать про те, що додаткове введення метіоніну прискорює фізіологічну регенерацію КТ молодих щурів. Проте асиметричність зміни активності ЛФ та КФ

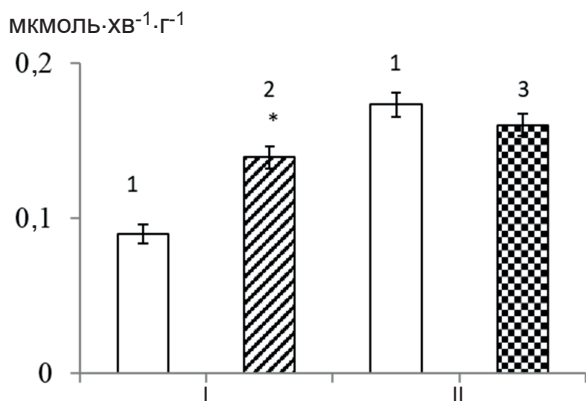


Рис. 1. Активність лужної фосфатази в кістковій тканині контрольних (1), 3-місячних (2) та 15-місячних (3) щурів після впливу метіоніну; I – 3 міс, II – 15 міс. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

може супроводжуватися втратою кісткової маси [21,22].

У процесі ремоделювання КТ важливу роль відіграють органічні компоненти позаклітинного матриксу. ГАГ – кислі полісахариди, що входять до міжклітинної речовини сполучної тканини і забезпечують поперечні зшивки між фібрилами колагену, беруть участь у синтезі кісткового колагену. Крім того, вони відповідають за впорядкованість і міцність бічних з'єднань колагенових фібрил, характеризують реактивність сполучної тканини на зовнішні подразники. Додаткове введення зазначених доз метіоніну не змінило концентрацію ГАГ порівняно з вихідними значеннями.

Гіалуронідазна активність - це поєднана дія двох лізосомальних ферментів гіалуроноглюкозоамінідази і гіалуроноглюкоронідази, які розщеплюють ГАГ у КТ. У сироватці крові молодих тварин цей показник підвищився на 30,6% (рис.2). Такі зміни не сприяють підтриманню цілісності органічного матриксу та фіксації неорганічного компоненту сполучної тканини - кристалів гідроксіапатиту. Вони можуть вказувати на інтенсифікацію темпів резорбції КТ.

Концентрація уранових кислот у КТ після введення надлишку метіоніну підвищилася на 18,8 % порівняно з контрольними значеннями (рис.3). Додаткове введення метіоніну сприяє їх накопиченню, що закиснює між-

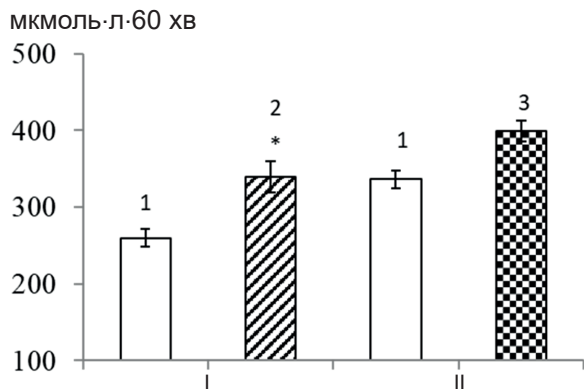


Рис. 2. Гіалуронідазна активність сироватки крові контрольних (1), 3-місячних (2) та 15-місячних (3) щурів після впливу метіоніну; I – 3 міс, II – 15 міс. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

клітинні рідини КТ. Кислотність середовища впливає на регуляцію процесів формування і резорбції, зокрема зниження рН середовища зумовлює активацію дегенеративних процесів у КТ [23].

Введення надлишку метіоніну в раціон прискорює фізіологічну регенерацію КТ молодих щурів, яка може супроводжуватися втратою кісткової маси. Підвищення активності ЛФ у КТ свідчить про домінування остеосинтетичної фази остеогенезу відносно остеолітичної. Така реакція дає змогу зробити припущення про вірогідне збільшення кількості активних остеобластів або підвищення чутливості їх рецепторів. Отже, надлишок метіоніну (250 мг/кг протягом 21 доби) в раціоні тварин молодого віку створює початкові зрушення між процесами остеорезорбції та остеосинтезу, які при збільшенні дози або тривалості експерименту можуть призвести до руйнування КТ.

Значну роль у трофічних процесах КТ відіграють складові білкового метаболізму – амінокислоти. При вивченні складу вільних амінокислот у КТ молодих щурів після введення надлишку метіоніну виявлено вірогідні зміни відносно лейцину. Його концентрація знизилася на 27,9 % відносно контролю.

У дорослих щурів контрольної групи порівняно з молодими контрольними віро-

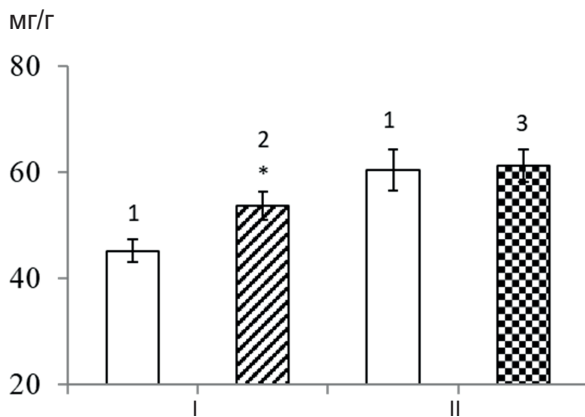


Рис.3. Концентрація уранових кислот у кістковій тканині контрольних (1), 3-місячних (2) та 15-місячних (3) щурів після впливу метіоніну; I – 3 міс, II – 15 міс. *P < 0,05 порівняно з контролем

гідно вищою була гіалуронідазна активність (на 29,6 %) у сироватці крові, концентрація уранових кислот (на 33,8 %) та активність ЛФ (на 92,2 %). Це можна розглядати як вікові відмінності метаболізму КТ.

Після введення надлишку метіоніну не спостерігали вірогідних змін активності ЛФ а ні у сироватці крові, а ні у КТ порівняно з контрольними значеннями дорослих щурів. Дослідження показників резорбції КТ у цих тварин показало вірогідне зростання активності КФ у сироватці крові на 57,5 % (P < 0,05, рис. 4, а), тоді як у КТ цей показник не змінювався порівняно з контролем. Активність ТРКФ зросла на 96,9 % відносно контрольних значень (див.рис. 4, б). Тобто у дорослих тварин під впливом екзогенно

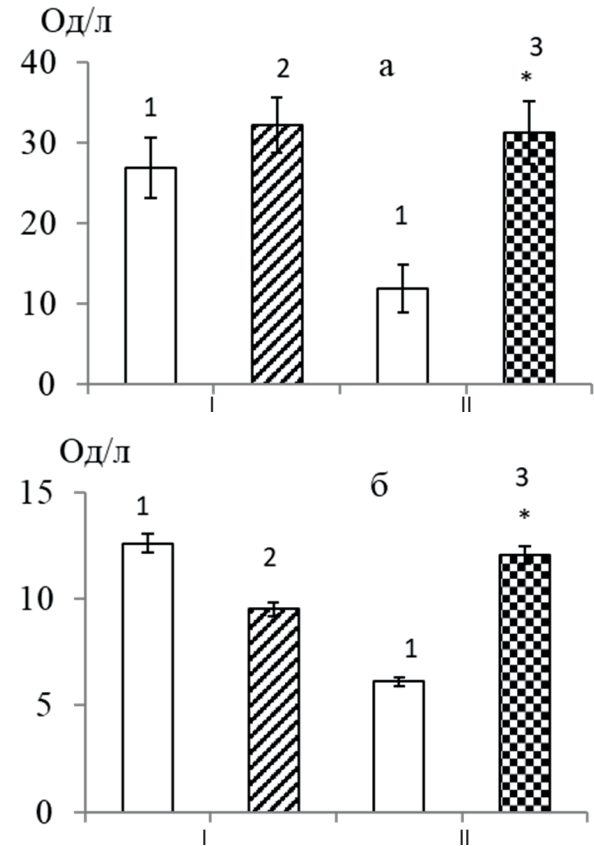


Рис.4. Активність кислої фосфатази (а) та тартратрезистентної кислої фосфатази (б) у сироватці крові контрольних (1), 3-місячних (2) та 15-місячних (3) щурів після впливу метіоніну; I – 3 міс, II – 15 міс *P < 0,05 порівняно з контролем

введеного метіоніну відбуваються виражені зміни активності лізосомальних ферментів. Підвищення активності КФ і ТРКФ у сироватці крові може свідчити про активацію процесу резорбції у них.

Індекси ЛФ/КФ і ЛФ/ТРКФ у сироватці крові контрольних дорослих тварин становили 1,35 і 4,37 відповідно. Після введення надлишку метіоніну індекс ЛФ/КФ знизився до 0,93 (на 31,1%), а ЛФ/ТРКФ до 2,4 (на 45,1%). У КТ цей показник для контрольних щурів становив 43,3, а для дослідних знизився до 26,0. Вочевидь у дорослих тварин після впливу метіоніну змінюються баланс процесів фізіологічної регенерації КТ.

Показники стану органічного матриксу, а саме концентрація ГАГ, гіалуронідазна активність у сироватці крові дорослих тварин та вміст уронових кислот і вільних амінокислот у КТ вірогідно не відрізнялися від значень у контрольних тварин. Виявлені вікові зміни біохімічних показників КТ позначаються на хімічному складі органічного матриксу.

Отримані результати дають підстави вважати, що введення надлишку метіоніну (250 мг/кг протягом 21 доби) у харчовий раціон прискорює фізіологічну регенерацію КТ у молодих щурів. Підвищення у них активності ЛФ свідчить про домінування остеосинтетичної фази остеогенезу відносно остеолітичної. Така реакція дає змогу зробити припущення про вірогідне збільшення кількості активних остеобластів або підвищення чутливості їх рецепторів. На відміну від молодих тварин у дорослих щурів-самців вікові зміни КТ проявляються у домінуванні остеолітичної фази. Наші результати свідчать про вікозалежні відмінності впливу однакової дози чинника на процеси фізіологічної регенерації та органічний матрикс КТ щурів, що варто враховувати при використанні медичних препаратів.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or

individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

**И.Г. Литовка, В.Я. Березовский,
С.П. Весельский**

ВЛИЯНИЕ МЕТИОНИНА НА ОРГАНИЧЕСКИЙ МАТРИКС КОСТНОЙ ТКАНИ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Исследовано влияние метионина на показатели физиологической регенерации костной ткани (КТ) молодых и взрослых крыс-самцов линии Вистар. Введение избытка метионина (250 мг / кг в течение 21 сут) в пищевой рацион ускоряет физиологическую регенерацию КТ у молодых крыс. Повышение у них активности щелочной фосфатазы в КТ на 54,4 % свидетельствует о доминировании остеосинтетической фазы остеогенеза относительно остеолитической. Такая реакция типична для увеличения количества активных остеобластов или повышения чувствительности их рецепторов. В отличие от молодых животных, у взрослых крыс-самцов возрастные изменения КТ проявляются в доминировании остеолитической фазы. Полученные результаты свидетельствуют о возрастных отличиях влияния одинаковой дозы препарата на процессы физиологической регенерации и органический матрикс КТ крыс-самцов, что следует учитывать при использовании медицинских препаратов.

Ключевые слова: метионин; физиологическая регенерация костной ткани.

I.G.Litovka ¹, V.Ya.Berezovsky ¹, S.P.Veselsky ²

THE EFFECT OF METHIONINE ON THE ORGANIC MATRIX OF THE BONE TISSUE OF WISTAR RATS OF DIFFERENT AGES

The effect of methionine on bone remodeling parameters of young and adult male rats Vistar was studied. The introduction of excess methionine (250 mg / kg for 21 days) in the diet raises the physiological regeneration of bone tissue in young rats. Increasing their alkaline phosphanase activity in bone tissue testifies to the domination of the osteosynthetic phase of osteogenesis relative to osteolytic. Such a reaction is typical for increasing the number of active osteoblasts or increasing the sensitivity of their receptors. Unlike young animals, in adult male rats, age-related bone tissue changes are manifested in the domination of the osteolytic phase. The obtained results testify to the disease-dependent differences in the effect of the same factor dose on the processes of physiological regeneration and the organic matrix of bone tissue rats in males, which should be taken into account when using medicinal preparations.

Key words: methionine; physiological regeneration of bone tissue.

¹*O.O. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine,*

²*Institute of High Technologies of the Taras Shevchenko National University of Kyiv, litir@biph.kiev.ua*

REFERENCES

- Lorentzon MJ. Treating osteoporosis to prevent fractures: current concepts and future developments. *J Intern Med.* 2019 Jan 18.
- Koller G, Katz S, Charrois TL, Ye C. Glucocorticoid-induced osteoporosis preventive care in rheumatology patients *Arch Osteoporos.* 2019 Feb 5;14(1):16.
- Bridgeman MB, Pathak R. Denosumab for the reduction of bone loss in post menopausal osteoporosis: a review. *Clin Ther.* 2011;33:1547-49.
- Brandy ML. New treatment strategies: ipriflavone, strontium, vitamin D metabolites and analogs. *Am J Med.* 1993; 95: 69S-74S.
- Kerstetter JE, O'Brien K, Insogna KL. Dietary protein, calcium metabolism and skeletal homeostasis revisited. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78: 584S-92.
- Kimball SR, Jefferson LS. Molecular mechanisms through which amino acids mediate signaling through the mammalian target of rapamycin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004; 7: 39-44.
- Kimball SR, Jefferson LS. New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83: 500S-7S.
- Elefteriou F, Benson MD, Sowa H, Starbuck M, Liu X, Ron D et al. ATF4 mediation of NF1 functions in osteoblast reveals a nutritional basis for congenital skeletal dysplasiae. *Cell Metab.* 2006; 4: 441-5.
- Ouattara A, Cooke D, Gopalakrishnan R, Huang T, Ables G.P. Methionine restriction alters bone morphology and affects osteoblast differentiation. *Bone Reports.* 2016; 5: 33-42.
- Bihuniak JD, Insogna KL. The effects of dietary protein and amino acids on skeletal metabolism. *Mol Cell Endocrinol.* 2015; 410: 78-86.
- Dawson-Hughes B, Harris SS, Rasmussen HM, Dallal GE. Comparative effects of oral aromatic and branched-chain amino acids on urine calcium excretion in humans. *Osteoporos Int.* 2007; 18: 955-61.
- Ursini F, Pipicelli G. Nutritional supplementation for osteoarthritis: alternative and complementary therapies. *Altern Complement Ther.* 2009;15:173-7.
- Vijayan V, Khandelwal M, Manglani K, Gupta S, Suroliya A. Methionine down-regulates TLR4/MyD88/NF-κB signalling in osteoclast precursors to reduce bone loss during osteoporosis. *Br J Pharmacol.* 2014; 171(1): 107-121. Published online 2013 Dec 10.
- Klyatskin SA, Lifshitz RI. Determination of glycosaminoglycans by orsin method in patients' blood. *Lab Work.* 1989; 10:51-3. [Russian].
- Riggs BL, Melton III L. J. Osteoporosis: Trans. with English. - M.; SPb: Joint-Stock Company «Publishing house BINOM», Nevsky dialect », 2000. [Russian].
- Nakoskin A.N. Molecular-Biological study of the extreme matrix of the bone tissue of animals of different types and the influence of its specific xenocomponents on osteogenesis: the dissertation ... Doctors of Biological Sciences: 03.03.01. - Chelyabinsk, 2016. [Russian].
- Leontiev VK, Petrovich VK. Biochemical Methods in Clinical and Experimental Dentistry. Omsk:1976:93. [Russian].
- Sharaev PN, Strelkov NS, Guncha VV, Sosulina LL. Determination of hyaluronidase activity in biological fluids. *Clin Lab Diagnost.* 1996; 3:21-2. [Russian].
- Veselskiy SP, Lyaschenko PS, Kostenko SI, Gorenko ZA, Kurovska LF. Way of sample preparation of bioliquids detecting in lipids determination. *Pryroda. Patent for invention №33564A, 15.02.2001.* [Ukrainian].
- Kaznacheeva AI, Sinister NC. The content of free amino acids in healthy blood plasma, erythrocytes and urine. *Lab Work.* 1976; 8:479-80. [Russian].
- Dolgov VV, Ermakova IP. Laboratory diagnosis of bone tissue exchange. *Osteoporosis and osteopathy.* 2000; 4: 29-39.
- Berezovsky VYa, Litovka IG, Chaka OG. Infusion of doses per year to the development of situational osteopenia. *Fiziol Zh.* 2000; 46(1): 10-6. [Ukrainian].
- Khismatullina ZN. Factors affecting the metabolism of bone tissue and leading to diseases of the bone system. *Bull Technol University.* 2015; 18 (22): 165 -72.

Матеріал надійшов до редакції 18.10.2018