

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛЛАДИНА**

ЛАБУДЗИНСЬКИЙ ДМИТРО ОЛЕГОВИЧ



УДК 577.161.2:57.083.3 + 616.379-008.64

**РЕГУЛЯТОРНИЙ ВПЛИВ ВІТАМІНУ D₃ НА ОСТЕОІМУННУ ВЗАЄМОДІЮ
ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна Національної Академії Наук України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Великий Микола Миколайович,
завідувач відділу біохімії вітамінів і коензимів
Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Коваленко Валентина Миколаївна,
завідувач відділу токсикології
ДУ «Інституту фармакології та токсикології
НАМН України»

доктор медичних наук, доцент
Комісаренко Юлія Ігорівна,
завідувач кафедри ендокринології
Національного медичного університету
ім. О.О. Богомольця

Захист відбудеться «24» вересня 2018 року о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат розісланий « » серпня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук



Н. П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми дослідження. Цукровий діабет (ЦД) – це хронічне ендокринно-обмінне захворювання, яке характеризується генетично детермінованим абсолютним або відносним дефіцитом гормону підшлункової залози інсуліну, хронічною гіперглікемією та розвитком хронічних ускладнень [Tracey M. L. et al., 2016]. Останнім часом до групи ускладнень цукрового діабету відносять порушення ремоделювання і обміну речовин у кістковій тканині, які ідентифікують як вторинний остеопороз [Leska-Czernik V. et al., 2010]. Паталогія кісткової системи розвивається на фоні системних метаболічних порушень в організмі, таких як генералізований оксидативно-нітрозативний стрес та запалення і, зокрема, характеризується вираженим дисбалансом регуляторних ланок імунної системи. Дисфункція процесу ремоделювання кісткової тканини на молекулярному рівні опосередковується дефіцитом інсуліну та інших ростових факторів, інтенсифікацією неензиматичного глікозилювання (AGEs), прооксидантних процесів в клітинах кісткової тканини, порушеннями у системах цитокінового регулювання їх функцій, особливо, у остеокіновій системі RANKL/RANK/OPG (ліганда рецептора активації ядерного фактору κB, його рецептора та остеопретегерина) [Maeda K. et al., 2013]. Регуляторні ефекти сигнального шляху RANKL/RANK/OPG відбуваються із залученням ядерного фактору транскрипції κB (NF-κB), який є потужним індуктором прозапальних процесів у організмі і відіграє ключову роль у патогенезі ЦД. Важливим і актуальним аспектом дослідження механізмів, що лежать в основі індукованих цукровим діабетом порушень, є з'ясування ролі та зв'язку порушень NF-κB-асоційованих змін із розладами osteoімунної взаємодії і генералізацією запальних процесів у печінці, що дасть змогу віднайти більш ефективні методи корекції цих порушень.

Відомо, що вітамін D₃ (холекальциферол) є одним з головних регуляторів обміну кальцію і фосфору в організмі хребетних, ключовим фактором остеогенезу та ремоделювання кісткової тканини. Поза тим, гормонально активні форми вітаміну D₃ мають ряд інших біологічних ефектів, не пов'язаних з участю у регулюванні гомеостазу кісткової тканини. Зокрема, встановлено здатність вітаміну D₃ впливати на функціональну активність клітин імунної системи, таких як моноцити, макрофаги, дендритні клітини (DCs), а також T- і B-лімфоцити, результатом чого є модулювання як вродженої, так і набутої імунної відповіді. Також показано, що імунні клітини експресують 25ОНD₃ 1α-гідроксилазу, яка забезпечує перетворення неактивного вітаміну D₃ в активну гормональну форму – 1,25-дигідроксивітамін D₃ (1,25(ОН)₂D₃) [Wolden-Kirk H. et al., 2012].

Для досягнення ефективної корекції порушень osteoімунної взаємодії за цукрового діабету на тлі генералізованого оксидативно-нітрозативного стресу та запалення, важливим є дослідження потенційних терапевтичних ефектів холекальциферолу як сполуки з антиоксидантними, імуномодуляторними та протизапальними властивостями. Дослідження біохімічних, імунологічних та клітинно-молекулярних механізмів розвитку вторинного остеопорозу за цукрового діабету та з'ясування ефективності коригувальної дії вітаміну D₃ створить науково-

теоретичну основу для практичних рекомендацій щодо застосування холекальциферолу у супровідній терапії ускладнень цукрового діабету.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планами наукових досліджень лабораторії медичної біохімії інституту біохімії імені О.В. Палладіна (нині відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії імені О.В. Палладіна НАН України) у відповідності з напрямком науково-дослідних робіт Інституту за темою: "Вивчення біохімічних механізмів регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та системних взаємодій за норми та за патології". Розділ теми: "Взаємозв'язок вітамін D₃- та NF-κB-сигнальних шляхів в регуляції клітинних функцій у нормі та за патології" (2012 – 2016 рр., державний реєстраційний номер 0112U002624).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було дослідження особливостей функціонування NF-κB-залежних механізмів, залучених до реалізації остеοімуної взаємодії і регулюванні системних прозапальних процесів за експериментального цукрового діабету 1 типу (ЦД1) та ролі холекальциферолу у коригуванні індукованих діабетом порушень.

Для реалізації мети були поставлені наступні завдання:

1. Оцінити стан забезпеченості організму тварин вітаміном D₃ (за вмістом 25ОНD у сироватці крові) та рівень експресії у тканинах ключових компонентів вітамін D-ендокринної системи (VDR, VDBP, CYP27A1, CYP2R1, CYP3A11, CYP2J6, CYP27B1).

2. Дослідити інтенсивність мінерального обміну та охарактеризувати структурно-функціональний стан кісткової тканини (біомеханічні властивості, щільність, томографічну структуру і вміст остеотропних регуляторних протеїнів) за експериментального цукрового діабету.

3. Оцінити функціональні властивості фагоцитарної ланки імуного захисту, стан CD4⁺/CD8⁺-популяцій Т-лімфоцитів периферичної крові і селезінки та вивчити гуморальну відповідь на введення рекомбінантного антигену SB (субодиниця Б дифтерійного токсину) за стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету.

4. Дослідити інтенсивність прооксидантних і прозапальних процесів, а також стан системи антиоксидантного захисту у печінці мишей за експериментального ЦД1.

5. З'ясувати роль цитокінової системи RANKL/RANK/OPG та NF-κB-залежних процесів у розвитку порушень остеοімуної взаємодії за цукрового діабету.

6. Дослідити плейотропні ефекти холекальциферолу у корекції NF-κB-залежних механізмів регулювання остеοімуної взаємодії, системних прозапальних процесів та експресії компонентів D-ендокринної системи за експериментального ЦД1.

Об'єкт дослідження. Структурно-функціональні та молекулярно-клітинні зміни у печінці, імуній системі та кістковій тканині мишей за експериментального цукрового діабету.

Предмет дослідження. Молекулярно-біохімічні процеси, асоційовані із остеοімуною взаємодією в організмі мишей за умов ЦД 1 типу та регуляторний вплив холекальциферолу на їх перебіг.

Методи дослідження. При виконанні дисертаційних досліджень було використано біохімічні та спектральні (спектрофотометрія, спектрофлуориметрія, протокова цитометрія, світлова та конфокальна мікроскопія), структурні та гістологічні (З-точковий тест, μ СТ, Н&Е гістологія), фізико-хімічні (гель-електрофорез для розділення протеїнів), молекулярно-біологічні (полімеразна ланцюгова реакція), імунохімічні та цитологічні методи (імуноблотинг, ІФА та імуноцитохімія), методи роботи із первинною культурою клітин еукаріот (культивування та оцінка їх функціонального стану), а також методи статистичного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше показано взаємозалежність між дефіцитом вітаміну D_3 в організмі та порушеннями NF- κ B-опосередкованих регуляторних процесів у кістковій тканині та імунній системі (остеоіmunної взаємодії) за цукрового діабету 1 типу, що обумовлюються змінами вмісту компонентів остеоцитокінової системи RANKL/RANK/OPG. Виявлено зростання рівня експресії остеоцитокіну RANKL (рецептор активації ядерного фактору κ B) та його рецептору RANK у кістковій тканині, печінці і сироватці крові, що свідчить про активацію RANK/RANKL-сигнального шляху та демонструє його інтегральну роль у розвитку порушень остеоіmunної взаємодії. Показано, що на тлі цукрового діабету виникають істотні зміни у різних ланках імунної системи (зменшення функціональної активності фагоцитів крові, збільшення співвідношення $CD4^+$ - та $CD8^+$ -популяцій Т-лімфоцитів периферичної крові і селезінки, зростання гуморальної відповіді на введення рекомбінантного антигену SB). Виявлені пошкодження структурно-функціонального стану кісткової тканини (обумовлена резорбцією втрата мінеральних компонентів, зменшення щільності і погіршення біомеханічних властивостей кісткової тканини), що свідчить про розвиток вторинного остеопорозу. Встановлено, що за експериментального ЦД 1 типу значно зростає експресія прозапальних цитокінів і регуляторних протеїнів у печінці (NF- κ B p65, VEGF, iNOS, TNF- α , IL-6, IL-1 β , апелін, остеоопонтін, RANKL) та у сироватці (TNF- α , TRAP, RANKL). Продемонстровано, що дефіцит вітаміну D_3 за цукрового діабету супроводжується змінами вмісту ензимів обміну та реалізації ефектів вітаміну D_3 у печінці: спостерігається зменшення рівня CYP27A1, VDR, VDDBP та зростання вмісту CYP2R1, CYP27B1. Вперше продемонстровано коригувальний ефект терапевтичного застосування вітаміну D_3 на рівень експресії компонентів D-ендокринної системи (ензими гідроксилювання вітаміна D_3 , VDR, VDDBP), регуляторних протеїнів NF- κ B- та RANKL/RANK/OPG-сигнальних шляхів за цукрового діабету першого типу.

Практичне значення роботи. Отримані у дисертаційній роботі результати досліджень мають важливе значення для фармакології та медицини, оскільки істотно поглиблюють і розширюють сучасні знання щодо ролі NF- κ B- та RANKL/RANK/OPG-опосередкованих процесів у розвитку порушень остеоіmunної взаємодії за вторинного остеопорозу, асоційованого із цукровим діабетом. Було встановлено генералізацію запалення та посилення резорбтивних процесів у кістковій тканині, а також зв'язок цих порушень з дефіцитом вітаміну D_3 в організмі та істотними змінами функціонального стану D-ендокринної системи. Ці дані є

теоретичним підґрунтям для створення та клінічного застосування препаратів вітаміну D₃ у профілактиці та комплексній терапії цукрового діабету та його ускладнень.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно у повній мірі було проведено аналіз сучасних наукових джерел за тематикою дисертаційного дослідження, здійснено підбір сучасних біохімічних та молекулярно-біологічних методів дослідження та їх відпрацювання, а також виконана експериментальна частина роботи і статистична обробка даних.

Гістологічні дослідження печінки та підшлункової залози проводилися спільно із к.б.н. Савосько С.І. (кафедра гістології та ембріології, Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця).

Апробація результатів дисертації. Основні положення і висновки дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на VI міжнародній конференції студентів і аспірантів "Молодь і поступ в біології" (Львів, 2011 р.), на конференції "Vitamin D - minimum, maximum, optimum" (Варшава, 2012 р.), на 48-му, 50-му, 51-му, 52-му та 53-му конгресах EASD - Європейської асоціації з вивчення цукрового діабету (м. Берлін, 2012 р., м. Відень, 2014 р., м. Стокгольм 2015 р., м. Мюнхен 2016 р. та м. Лісабон, 2017 р.), на міжнародній Парнасівській конференції (м. Ієрусалім, 2013 р.), на 39-му конгресі FEBS – Федерації європейських біохімічних товариств (м. Париж, 2014 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації надруковано 6 статей в українських та закордонних наукових фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, і 10 тез доповідей у збірках матеріалів міжнародних наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, переліку опублікованих робіт за темою дисертаційної роботи, вступу, огляду літератури (1 розділ, 3 підрозділи), експериментальної частини (2 розділи), заключення, висновків та списку літератури (267 найменувань). Повний обсяг дисертації – 162 сторінки, загальна кількість ілюстрацій – 7 таблиць та 35 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури

В Огляді літератури систематизовано та представлено сучасні дані щодо основних молекулярно-біохімічних механізмів розвитку цукрового діабету та його ускладнень. Детальне обговорення процесу ремоделювання кісткової тканини та його взаємозв'язку з імунною системою через остеокінову систему RANKL/RANK/OPG розширює розуміння патогенезу діабет-обумовленого вторинного остеопорозу та порушення osteoімунної взаємодії. Висвітлено сучасні уявлення щодо властивостей та механізмів плейотропної дії вітаміну D₃, зокрема у контексті коригування діабет-обумовлених порушень.

Матеріали та методи

Дослідження проводилися на самцях мишей лінії C56Bl/6 масою 21±3г. Діабет першого типу викликали 5-разовим внутрішньочеревинним введенням малих доз

стрептозотоцину (STZ, Sigma-Aldrich, США) у дозі 40 мг/кг ваги тіла тварини, який розводили у 0,1 М цитратному буфері (рН 4,5). Тваринам після 3 тижнів розвитку діабету вводили препарат вітаміну D₃ (DSM, Нідерланди) впродовж 2 місяців (800 МО/кг маси тіла, per os). Рівень глюкози крові визначали за допомогою глюкометра One Touch Select Simple (LifeScan Ltd., США). Роботу проведено відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених на Першому Національному конгресі України з біоетики (м. Київ, 2001).

Для дослідження використовували тканину підшлункової залози, печінки, кісток, селезінки, ізольовані лейкоцити та сироватку крові. Лейкоцити отримували в день експерименту з периферичної крові піддослідних тварин після гемолізу еритроцитів. Гепатоцити виділяли шляхом інкубації тонких зрізів тканини печінки у фосфатному буфері з 0,05% колагеназою IV типу. Фагоцитарну активність моноцитів та гранулоцитів визначали з використанням тест-набору PHAGOTEST (Біолайн, Росія) на протоковому цитофлуориметрії (COULTER EPICS XL-MCL). Оксидативний стрес у клітинах оцінювали, використовуючи 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетат (DCF-DA) у кінцевій концентрації 25 мкмоль/л, інтенсивність флуоресценції якого прямо пропорційна вмісту активних форм кисню (АФК) у клітинах. Інтенсивність випромінювання досліджуваних зразків реєстрували за каналом FL1 (515-535 нм) протокового цитофлуориметру, який оснащений аргонним лазером (λзбудж. = 488 нм). Вміст оксиду (II) азоту (NO) у клітинах визначали використовуючи 4',5'-діамінофлуоресцеїн діацетату (DAF-2DA) у кінцевій концентрації 5 мкмоль/л.

Спленоцити отримували механічним розтиранням селезінки на дрібнопористому ситі. Т-клітини виділяли із суспензії спленоцитів на колонках із нейлоною ватою (Polysciences, Inc.) за методикою, наданою виробником. Оцінку перерозподілу між CD4⁺- та CD8⁺-субпопуляціями Т-лімфоцитів давали за допомогою використання мічених флуоресцентними барвниками антитіл проти CD4 та CD8 клітинних детермінант (ANTI-MS-CD8A PER-CP #MCD0831, RT-X-MS-CD4 FITC, #MCD0401, Invitrogen). МТТ-тест проведено згідно методики [Ohno M. et al., 1991].

Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів у тканині печінки визначали за реакцією з ТБК [Janero D. R. et al., 1990]. Вміст SH-груп низькомолекулярних сполук визначали в тканині печінки за реакцією з о-фталевим альдегідом [Hu M. L. et al., 1994]. Визначення активності супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, ксантиноксидази, NAD(P)H-хінон-оксидоредуктази та NAD(P)H-оксидази проводили згідно загальноприйнятим біохімічним методикам [Eriksson J. U. et al., 1991; Kinoshita C. et al., 1991; Heinz F. et al., 1979; Petrova G. V. et al., 2009; Murillo M. M. et al., 2007].

Для остеометричних та біомеханічних досліджень використовували великогомілкову кістку піддослідних мишей. Оцінку біомеханічних параметрів кістки проводили за допомогою тесту 3-точкового вигину у середній ділянці гомілки на приладі Instron 3366 (Instron, США). Результати досліджень було отримано з RAW файлів, що генерувалися програмним забезпеченням Bluehill 2 v2.6 (Instron), з макросами Excel за замовчуванням. Аналіз μСТ з високою роздільною здатністю

проводили як на епіфізній, так і на діафізарній ділянці гомілки на мікротомографі Bruker 1172 (Bruker, Бельгія). Зображення були реконструйовані у середовищі NRecon (версія 1.6.9) та проаналізовані на програмному забезпеченні CTAn (version 1.13.10.1+).

Вміст 25OHD, TRAP, TNF- α , RANKL, OPG у сироватці крові визначали імуноензиматичним методом використовуючи комерційні набори.

Визначення експресії мРНК CYP27B1, CYP2J6, CYP3A11, VDR, VDBP, Rel A (p65 NF- κ B), VEGF, iNOS, TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β у тканині печінки мишей проведено методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) у реальному часі. Аналізували результати за допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator".

Розділення та детектування протеїнів проводили методом електрофорезу в поліакриламідному гелі та Вестерн-блот аналізу. Денситометричний аналіз проведено на програмному забезпеченні TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США), вміст протеїну представлено в умовних одиницях (ум. од.). Концентрації протеїнів визначали за стандартними методами [Bradford M.M., 1976; Stoscheck C. M., 1990].

Імуноцитохімічний аналіз проводили згідно стандартного протоколу [Ku S. K. et al., 2006]. Візуалізацію проводили на мікроскопі Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина). Для збудження хромофорів використовували лазери з довжинами хвиль 405 нм, 488 нм та 543 нм. Рівень флуоресценції оцінювали за трьома каналами 420-480 нм, 505-530 нм та 560 нм, відповідно. Обробку результатів здійснювали за допомогою офіційного програмного забезпечення Zeiss ZEN 2009.

Вірогідність розходження між групами порівняння визначали методом однофакторного дисперсійного аналізу (one way Anova) з наступним тестом Bonferroni (post-hoc test) використовуючи комп'ютерну програму Origin v.9.0. Результати представлені у вигляді середнього значення (M) та стандартної похибки середнього значення ($\pm m$). Вірогідними вважали відмінності при $P < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Характеристика моделі експериментального ЦД1. Вимірювання рівня глюкози у крові мишей засвідчив її підвищення до $20,4 \pm 4,3$ ммоль/л у групі ЦД порівняно з $5,2 \pm 1,1$ ммоль/л у контрольних мишей, що є свідченням розвитку некомпенсованої гіперглікемії у піддослідних тварин (таблиця 1).

Таблиця 1. Рівень глюкози та вміст 25OHD у сироватці мишей ($M \pm m$, $n=6$)

Експериментальні групи	Вміст 25OHD		Рівень глюкози у крові, ммоль/л
	нмоль/л	нг/мл	
Контроль	$85,6 \pm 4,11$	$34,2 \pm 1,64$	$5,2 \pm 1,1$
Діабет	$33,9 \pm 1,91^*$	$13,56 \pm 0,76^*$	$20,4 \pm 4,3^*$
Діабет + D ₃	$75,4 \pm 5,21^\#$	$30,16 \pm 2,02^\#$	$14,5 \pm 3,2^*$

* - Різниця порівняно з контролем вірогідна ($p < 0,05$),

^\# - Різниця порівняно з групою «Діабет» вірогідна ($p < 0,05$)

Гістологічні зміни підшлункової залози при STZ-індукованому діабеті проявлялися зменшенням розміру острівців Лангерганса, їх дегрануляцією і зменшенням числа β -клітин. Екзокринна складова залози, що представлена секреторними ацинусами, змінювалась на рівні залозистих епітеліоцитів, збільшенні просвіту і дистрофії дистальних секреторних каналців. Цитопатологічними проявами STZ-індукованого діабету були дегрануляція і вакуолізація панкреатоцитів. Зміни ендокринної частини залози полягали у деструкції великих острівців Лангерганса і зменшенні площі середніх і малих острівців, що вказує на зниження продукування інсуліну та істотні передумови розвитку гіперглікемії (рис.1).

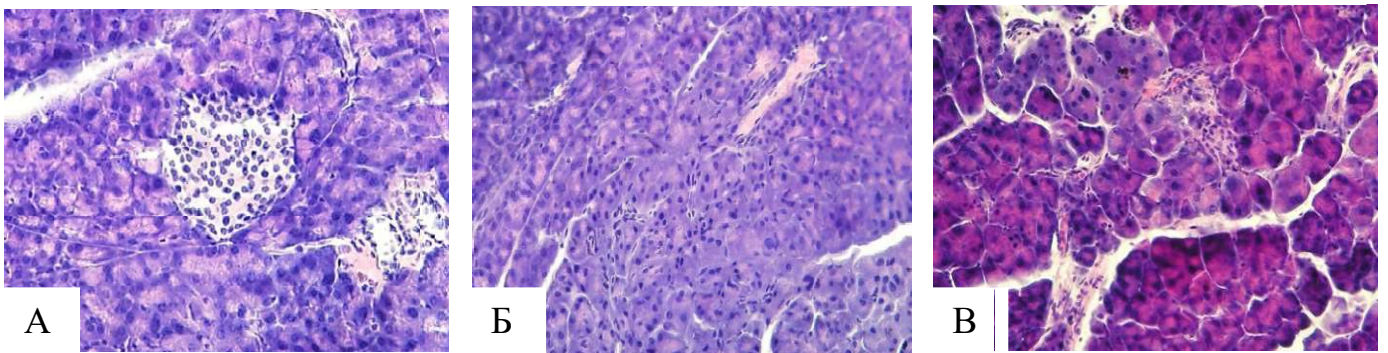


Рис. 1. Гістологічний аналіз зрізів підшлункової залози мишей. А – контроль, Б – діабет, В – Діабет + D_3 . Гематоксилін-еозин, об. $\times 20$, ок. $\times 10$ ($n=4$).

Найбільш інформативним показником ступеня забезпеченості організму вітаміном D_3 є вміст 25ОНD у сироватці крові, оптимальний рівень якого у людини знаходиться в межах $100-150 \text{ нмоль}\cdot\text{л}^{-1}$ ($40-100 \text{ нг}\cdot\text{мл}^{-1}$). Зниження вмісту 25ОНD у сироватці крові нижче $75 \text{ нмоль}\cdot\text{л}^{-1}$ свідчить про розвиток стану D-гіповітамінозу [Pramyothin P. et al., 2012]. Результати, свідчать, що за умови експериментального цукрового діабету рівень 25ОНD у сироватці крові знижувався у більш ніж 2,5 рази ($33,9 \pm 1,91 \text{ нмоль/л}$) порівняно з контролем ($85,6 \pm 4,11 \text{ нмоль/л}$), що відображає недостатню забезпеченість організму вітаміном та гальмування утворення його біологічно активних форм. Введення фізіологічної дози вітаміну D_3 ($800 \text{ МО/кг } D_3$ щодоби протягом 60 діб) супроводжувалось зростанням вмісту 25ОНD у 2,2 рази порівняно з його рівнем у тварин із ЦД та наближувало до значень у контрольних тварин (табл. 1).

Разом з тим, введення вітаміну D_3 сприяло зростанню числа острівців Лангерганса порівняно з групою ЦД ($p<0,01$), їх площі, зменшення набряку і дилатації ацинарної тканини залози. Це вказує на цито- та органопротекторний вплив холекальциферолу після введення STZ. Отримані результати корелюють із роботами інших дослідників [Seshadri K. G. et al., 2011].

Дослідження процесу ремоделювання кісткової тканини за експериментального цукрового діабету та після введення вітаміна D_3 . Результати останніх досліджень кісткової тканини свідчать про її безпосередню участь у ендокринному обміні в організмі, а також важливу роль ростових факторів і цитокінів, які продукуються клітинами кісткової тканини, в енергетичному обміні як

у нормі, так і при патологіях, у тому числі і за ЦД [Clemens T. L. et al., 2011]. Порушення фосфорно-кальцієвого обміну можливі на різних етапах розвитку цукрового діабету, однак відомості про характер і ступінь вираженості цих порушень нечисленні та суперечливі. Результати наших досліджень показують значне падіння вмісту кальцію і неорганічного фосфату у сироватці крові в 1,4 і 1,3 рази відповідно. Гіпокальціємія і гіпофосфатемія корелює зі значним підвищенням ензиматичної активності лужної фосфатази в сироватці крові тварин із ЦД. Активність загальної лужної фосфатази в групі діабету перевищувала контрольні значення у 1,32 рази. Osteометричні показники свідчать про зниження зольності, маси, довжини великої гомілкової кістки, довжини і товщини її проксимального епіметафізу у піддослідних тварин з цукровим діабетом.

Як показав тест 3-точкового вигину, за цукрового діабету відбувається зменшення витривалості великогомілкової кістки до максимального навантаження у 2,13 рази та жорсткості у 2,3 рази (рис.2).

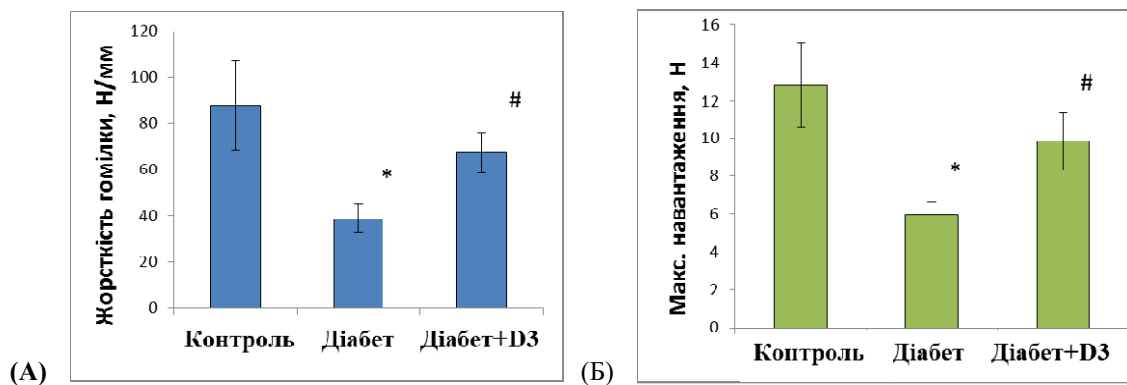


Рис. 2. Біомеханічний тест 3-точкового вигину великогомілкової кістки мишей. (А) Значення жорсткості кістки. (Б) Значення максимального навантаження на кістку. $M \pm m$, $n = 10$. * - $p < 0,05$ порівняно з контролем, # - $p < 0,05$ порівняно з діабетом

Було показано, що цукровий діабет та діабет-індукований дефіцит вітаміну D₃ супроводжується порушенням росту кісток та структурно-функціонального стану кісткової тканини. За цих умов у губчастій тканині великогомілкової кістки відбувалися значні зміни у її структурі. За допомогою μ СТ аналізу у губчастій речовині кісткової тканини проксимального епіметафазу великогомілкової кістки спостерігали достовірне зменшення як об'єму губчастої речовини відносно об'єму усєї кістки на 69,8 %, так і кількості трабекулярних структур на 53,2 % (рис. 3). Для того, щоб дослідити механізм діабет-індукованих біомеханічних і мікротомографічних змін у кістках, було встановлено рівень експресії ряду ключових компонентів кісткової тканини методом вестерн-блот аналізу (протеїнів RANKL, RANK та OPG, а також фосфорильованої субодиниці p65 транскрипційного фактору κ B, рецепторів реалізації гормональних ефектів вітаміну D₃ – VDR та структурного протеїну остеокальцину).

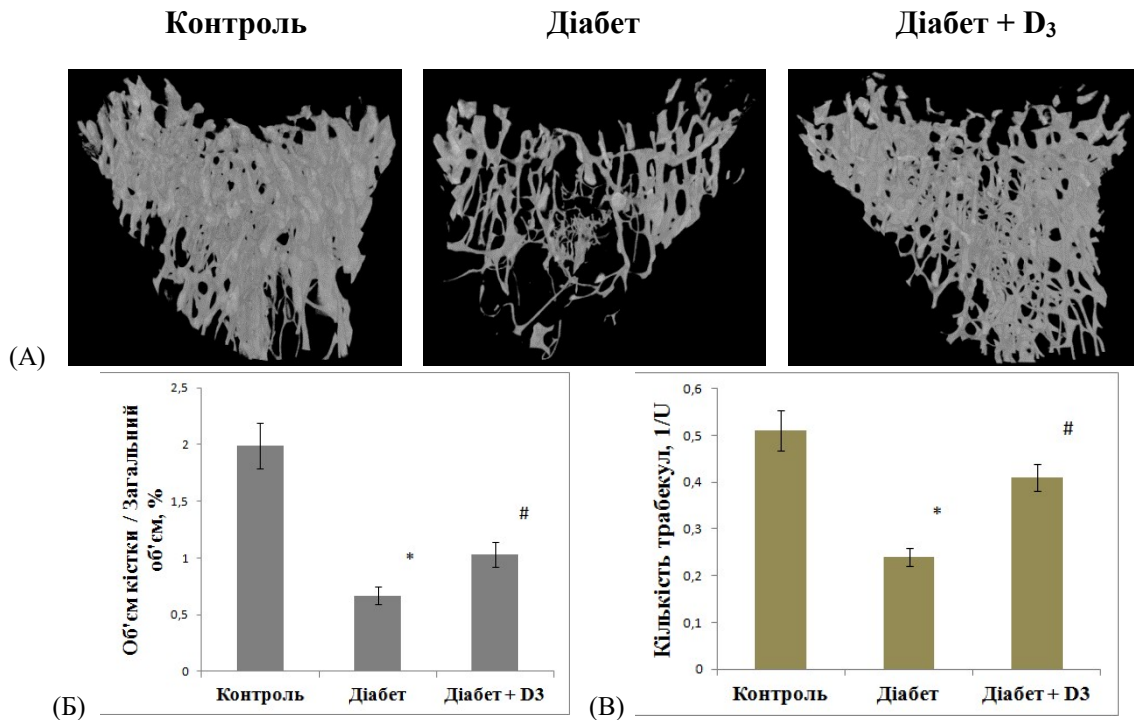


Рис. 3. Репрезентативні зображення μ СТ аналізу губчастої речовини кісткової тканини проксимального епіметафазу великогомілкової кістки (А). Співвідношення об'єму кістки до загального об'єму (Б) та кількості трабекул (В). $M \pm m$, $n = 10$. * - $p < 0,05$ порівняно з контролем, # - $p < 0,05$ порівняно з діабетом

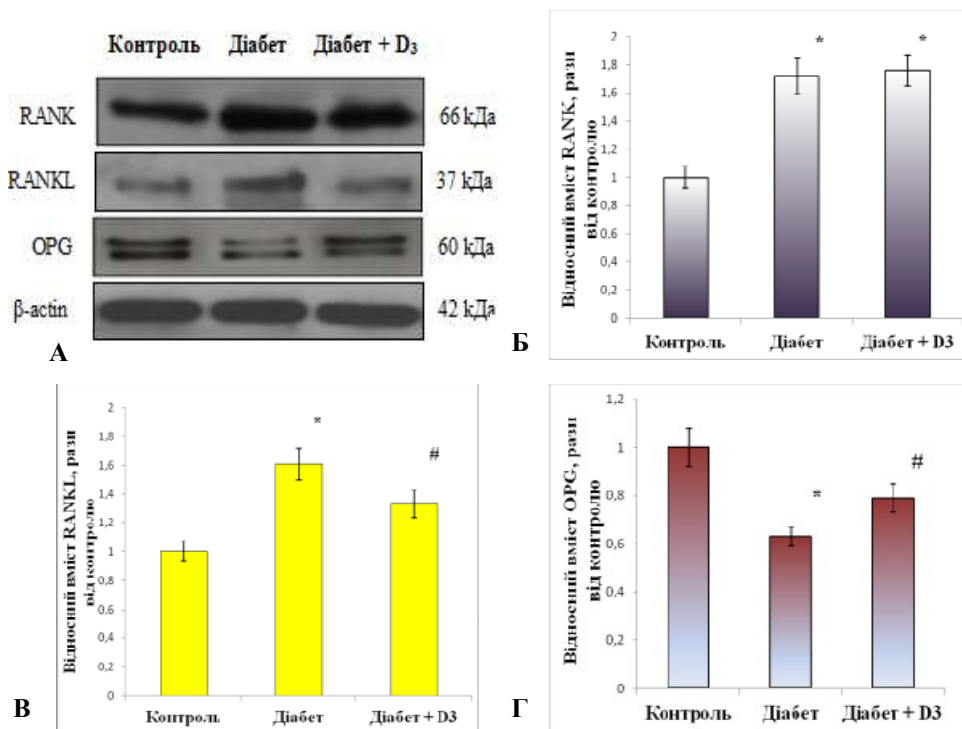


Рис. 4. Вміст RANK, RANKL та OPG у тканині великогомілкової кістки мишей. (А) Імуноблотограма протеїнів. (Б, В, Г) Відносний вміст протеїнів у тканині великогомілкової кістки ($M \pm m$, $n=6$). * - $p < 0,05$ порівняно з контролем, # - $p < 0,05$ порівняно з ЦД

Як свідчать представлені на рис. 4 (Б, В, Г) дані, за цукрового діабету у кістковій тканині спостерігалось значне зростання вмісту ключових регуляторних

протеїнів – рецептора активатора фактора транскрипції κB (RANK), його ліганда RANKL у 1,72 і 1,61 рази відповідно, у той час як вміст його рецептора-пастки остеопротегерина значно знижувався – у 1,59 рази у порівнянні з контролем.

Як свідчать наші дослідження, вміст транскрипційно активної фосфорильованої форми субодиниці p65 ядерного фактору κB у кістковій тканині за експериментального цукрового діабету значно зростав – у 2,3 рази, у той час як рівень експресії VDR знижувався у 1,82 рази порівнянї із контрольними значеннями (рис. 5 Б, В). Разом з тим, спостерігалось зменшення вмісту структурно-функціонального маркера кісткової тканини – протеїна остеокальцина у 1,54 рази (рис. 5 Г).

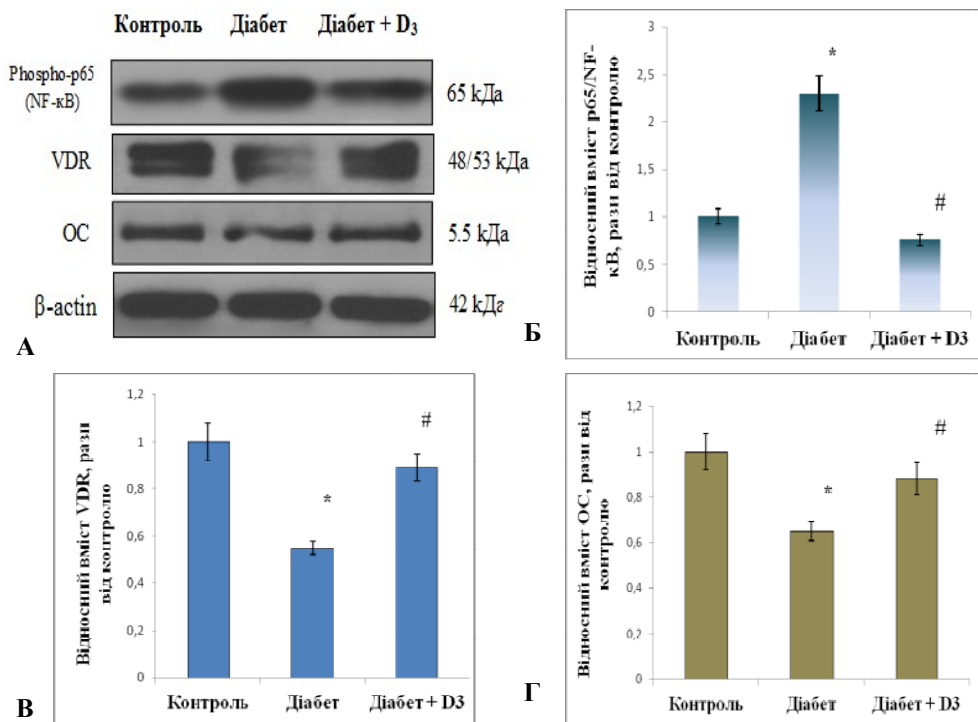


Рис. 5. Вміст фосфоNF-κB p65, VDR та OC у тканині великої гомілкової кістки мишей. (А) Імуноблотограма протеїнів. (Б, В, Г) Відносний вміст протеїнів у тканині великої гомілкової кістки (M±m, n=6). * - p < 0,05 порівняно з контролем, # - p < 0,05 порівняно з ЦД

Виявлені структурні зміни у кістковій тканині за участю цитокінів і порушення стану ремоделювання кісткової тканини частково можуть обумовлюватись хронічним запальним процесом, який супроводжує розвиток цукрового діабету. Існує тісний зв'язок розвитку вторинного остеопорозу за ЦД зі змінами цитокінового профілю внаслідок посилення утворення прозапальних цитокінів [Isidro M. L. et al., 2010].

За тривалого введення препарату вітаміну D₃ у діабетичних тварин істотно нормалізувалися вміст мінеральних компонентів, остеометричні та біомеханічні параметри великогомілкових кісток (рис. 2).

Ці зміни корелювали зі збільшенням питомого об'єму трабекулярної тканини метаепіфізу і кількості у ній структурних трабекул (рис.3) порівняно із експериментальним ЦД. Результати наших досліджень показали, що відновлення забезпеченості вітаміном D₃ сприяло нормалізуванню вмісту у кістковій тканині рецепторів його гормонально активних форм. Це супроводжувалося значним падінням рівня фосфорильованої субодиниці NF-κB більш ніж у 2,5 рази та збільшенням вмісту остеокальцину у 1,24 рази у тканині великогомілкової кістки

порівняно з тваринами із ЦД1 ($P < 0,05$). Одночасно відбувалося суттєве зменшення вмісту цитокіну RANKL у 1,21 рази, але особливих змін рівня його рецептору RANK. Показовим стало підвищення рівня OPG у 1,2 рази.

Дослідження стану вітаміну D-ендокринної системи в організмі мишей за експериментального цукрового діабету. Існують переконливі свідчення того, що вроджені вади метаболізму вітаміну D₃, обумовлені хромосомними мутаціями або поліморфізмом генів деяких цитохромів, що спричинює дефіцит 25ОНD, визначають схильність людини до розвитку аутоімунних захворювань. Так, показано існування тісної кореляції між зниженим рівнем циркулюючого 25ОНD внаслідок порушення гідроксилювання вітаміну D₃, обумовленого поліморфізмом певних ділянок гену CYP2R1, та розвитком цукрового діабету 1 типу [Hussein A. G. et al., 2012]. Як відомо, перетворення холекальциферолу у 25ОНD каталізують в основному дві ізоформи цитохрому P450 (вітамін D₃ 25-гідроксилази), переважно в печінці: мітохондріальна CYP27A1 та мікросомальна CYP2R1. З огляду на важливу роль ензимів вітамін D₃ 25-гідроксилазної системи в обміні вітаміну D₃ доцільно було з'ясувати, чи не пов'язаний значний дефіцит 25ОНD за цукрового діабету зі змінами вмісту цих двох ключових цитохромів.

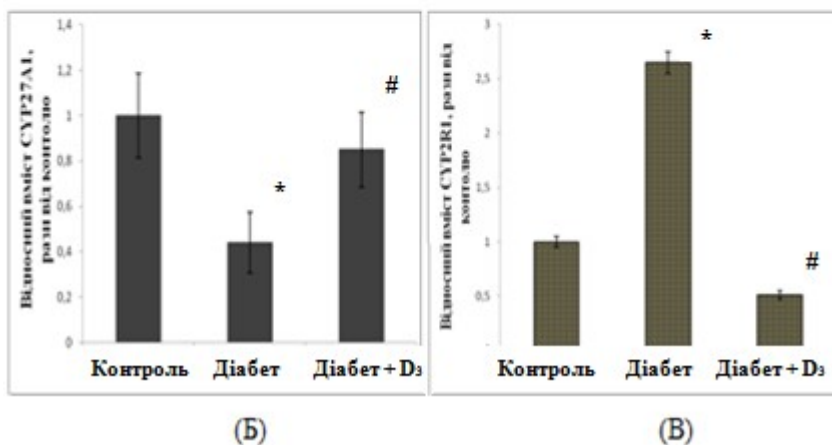
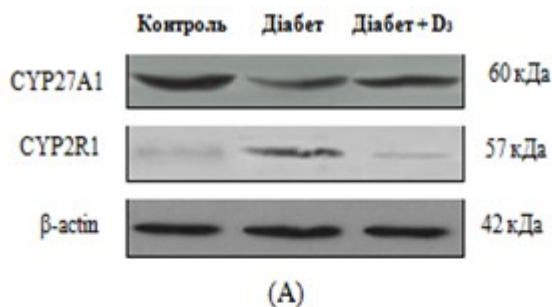


Рис. 6. Вміст мітохондріальної CYP27A1 та мікросомальної CYP2R1 ізоформ вітамін D₃ 25-гідроксилази у печінці мишей за цукрового діабету та після введення вітаміну D₃. (А) Імуноблотограма протеїнів CYP27A1 та CYP2R1. Відносний вміст протеїнів CYP27A1 (Б) та CYP2R1 (В) у тканині печінки піддослідних тварин (M+m, n=6). * - $p < 0,05$ порівняно з контролем, # - $p < 0,05$ порівняно з діабетом

Було показано, що вміст мітохондріальної ізоформи CYP27A1 у печінці діабетичних тварин знижувався у 2,3 рази у порівнянні з контрольними тваринами (рис. 6 Б). Це може бути пов'язано з порушенням експресії даної ізоформи цитохрому P450 за тривалої гіперглікемії, обумовленої ЦД. Введення вітаміну D₃ діабетичним мишам викликало підвищення рівня синтезу CYP27A1 у 1,9 рази, що майже відповідає контрольним значенням.

Протилежний характер носили зміни синтезу мікросомальної ізоформи вітаміну D₃ 25-гідроксилази. Було встановлено зростання у 3,2 рази вмісту CYP2R1 у печінці тварин за ЦД (рис. 6 В). Відомо, що CYP2R1 характеризується більшою спорідненістю до холекальциферолу й має вищу каталітичну активність у порівнянні з CYP27A1. CYP2R1 здатна ефективно перетворювати вітамін D₃ в пікомольних концентраціях, що є свідченням переважного функціонування ензиму за умов фізіологічно низьких концентрацій холекальциферолу [Shinkyu R. et al., 2012].

У печінці тварин, яким вводили препарат вітаміну D₃ спостерігалось суттєве зниження вмісту CYP2R1 (у 6,5 разів відносно групи діабету), що було нижче контрольних значень. Таким чином результати наших досліджень показали, що CYP2R1 є, імовірно, тією індукцибельною ізоформою вітаміну D₃ 25-гідроксилази печінки, що виконує за цукрового діабету компенсаторну роль, спрямовану на забезпечення необхідних для реалізації фізіологічних функцій вітаміну D₃ рівнів циркулюючого у крові 25OHD [Labudzynski D. et al., 2014].

Так як 25OHD₃ 1 α -гідроксилаза (CYP27B1), яка каталізує синтез гормонально активної форми вітаміну D₃ – 1,25(OH)₂D₃ в нирках [Blomberg Jensen M. et al., 2010], також експресується в інших тканинах [Jones G. et al., 2007], ми припустили, що вітамін D₃ може перетворюватись на 25OHD, а потім на 1,25(OH)₂D₃ локально в печінці, де може здійснювати ауто/паракринний регуляторний вплив на функціональну активність клітин через VDR. Цукровий діабет супроводжувався збільшенням (в 1,5 рази) рівня протеїну CYP27B1 у тканині печінки в порівнянні з контрольними тваринами, як показано на рис. 7 Б. Ці зміни можна розглядати як компенсаторну реакцію на вітамін D₃-дефіцитний стан тваринного організму за діабету. Схожа тенденція у надекспресії печінкової 25OHD₃ 1 α -гідроксилази прослідковується і за вікових змін в організмі [Vuica A. et al., 2015]. Також, у тканині печінки мишей із експериментальним цукровим діабетом, відбувалося істотне зниження VDR у 1,7 разів (рис. 7).

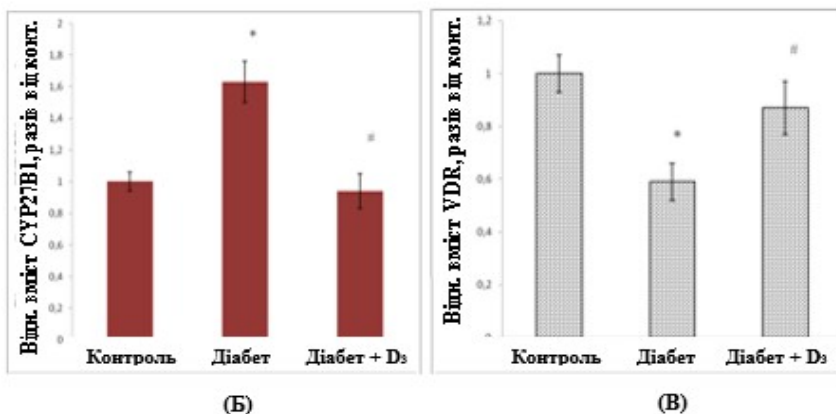
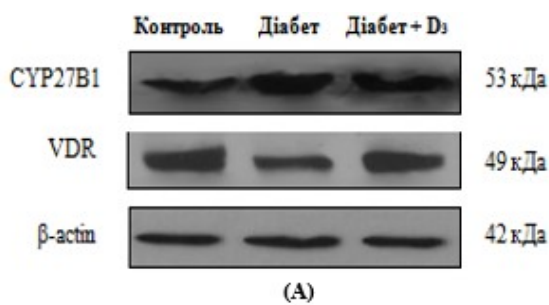


Рис. 7. Вміст протеїну 25OHD₃ 1 α -гідроксилази CYP27B1 та VDR у печінці мишей за цукрового діабету та після введення вітаміну D₃. (А) Імуноблотограма протеїнів CYP27B1 та VDR. Відносний вміст протеїнів CYP27B1 (Б) та VDR (В) у тканині печінки піддослідних тварин (M \pm m, n=6). * - p < 0,05 порівняно з контролем, # - p < 0,05 порівняно з діабетом

Також було зафіксовано діабет-опосередковане порушення експресії мінорних ізоформ вітаміну D₃ 25-гідроксилази – CYP2J6 та CYP3A4. Як показали дослідження, рівень експресії мРНК CYP2J6 та CYP3A11 у печінці мишей із ЦД зростав у 1,36 та 1,71 рази відповідно, порівняно із контролем (рис. 8 А, Б). Окрім того, рівень експресії VDBP у тканині печінки діабетичних тварин знижувався у 1,33 рази, порівняно із контролем (рис. 8 В).

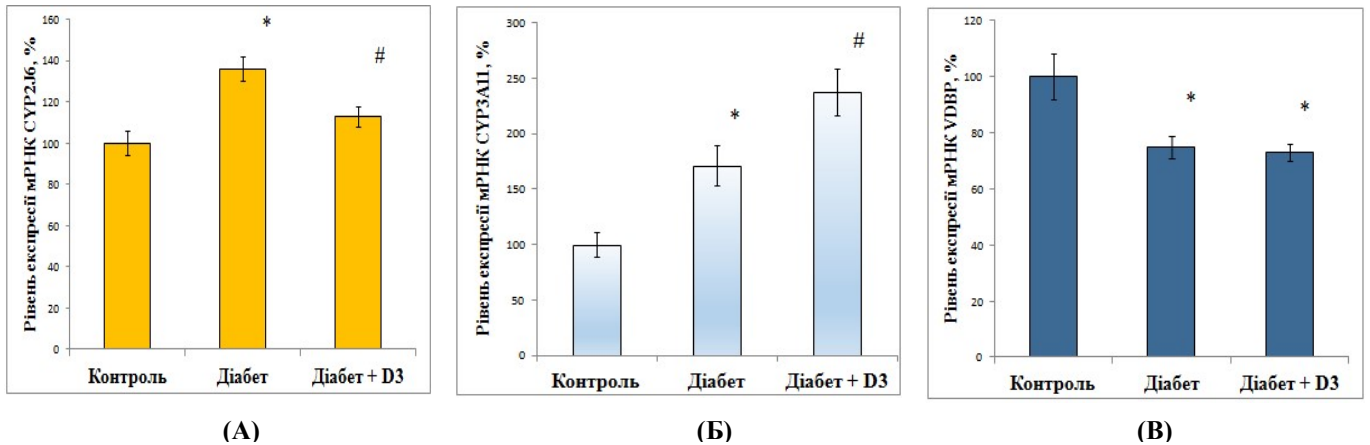


Рис. 8. Рівень експресії мРНК CYP2J6 (А), CYP3A11(Б) та VDBP (В) у печінці мишей за цукрового діабету та після введення вітаміну D₃. M±m, n=6. * - p < 0,05 порівняно з контролем, # - p < 0,05 порівняно з діабетом

Для корекції порушення експресії протеїнів, залучених до обміну вітаміну D₃ було проведено терапевтичне введення холекальциферолу піддослідним тваринам із ЦД1. Показано, що тривале введення вітаміну D₃ достовірно нормалізувало рівень експресії вітаміну D₃ 25-гідроксилаз печінки – CYP27A1 (рис. 6 А), CYP2R1 (рис. 6 Б) та CYP2J6 (рис. 8 А) фактично до контрольних значень (P < 0,05). Вітамін D₃ сприяв відновленню вмісту протеїну 25OHD₃ 1α-гідроксилази CYP27B1 (рис. 7 Б). Слід також відмітити, що введення вітаміну D₃ не мало суттєвого впливу на експресію мРНК вітаміну D₃-зв'язувального протеїну VDBP (рис. 8 В), але при цьому повністю відновлювало вміст рецептора VDR (рис. 7 В) у порівнянні із діабетом.

Вплив вітаміну D₃ на Т-клітинну ланку імунної системи та розвиток гуморальної відповіді за експериментального цукрового діабету. Деструкція β-клітин підшлункової залози і, як наслідок, розвиток ЦД1 та його ускладнень є Т-лімфоцит-опосередкованим процесом [King G. L. et al., 2008]. Важливим показником, який у значній мірі ілюструє стан аутоімунних процесів в організмі є співвідношення субпопуляцій CD4⁺- та CD8⁺-лімфоцитів [Wang J. et al., 2015]. За даними протокової цитофлуориметрії, із використанням антитіл із флуоресцентною міткою проти-CD4⁺ та -CD8⁺ було показано, що за цукрового діабету відбувається вірогідне підвищення співвідношення CD4⁺- до CD8⁺-лімфоцитів периферичної крові на 25% порівняно із контролем (p < 0,05, рис. 9).

У селезінці, за експериментального цукрового діабету, спостерігалось також підвищення CD4⁺/CD8⁺-співвідношення (на 27%) порівняно із контролем (p < 0,05, рис. 10). Таке підвищення може зумовлюватись, зокрема, стрімким зростанням

кількості Th1- та Th17-клітин (на відміну від Th2), які орієнтовані на секрецію прозапальних цитокінів і сприяють генералізуванню процесу запалення. Показано, що стрімке зростання Th1- та Th17-клітин спостерігається за аутоімунних захворювань, у тому числі і за ЦД1 [Reinert-Hartwall L. et al., 2015].

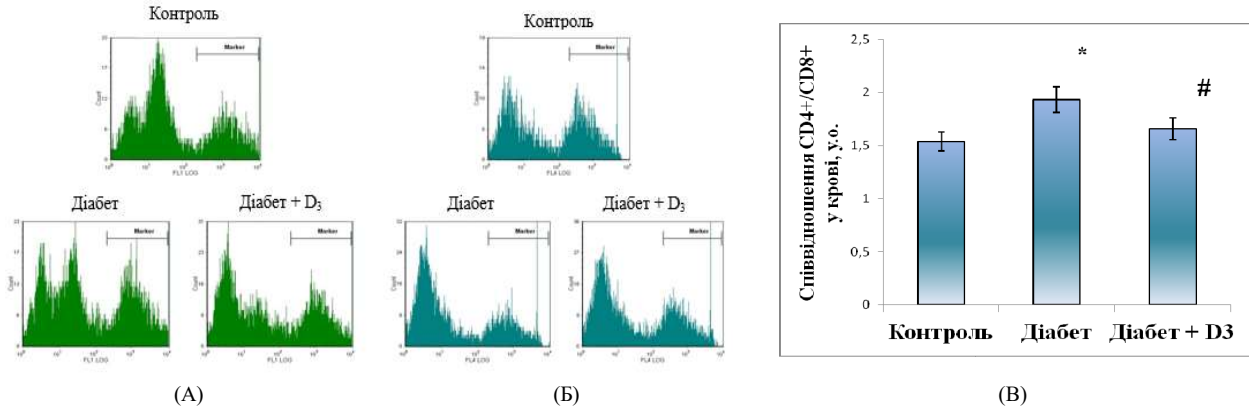


Рис. 9. Цитофлуорограми детектування субпопуляцій CD4⁺ (А) і CD8⁺ (Б) Т-лімфоцитів, їх співвідношення (В) у периферичній крові за цукрового діабету та після введення вітаміну D₃. M_±m, n=6. * - p < 0,05 порівняно з контролем, # - p < 0,05 порівняно з діабетом

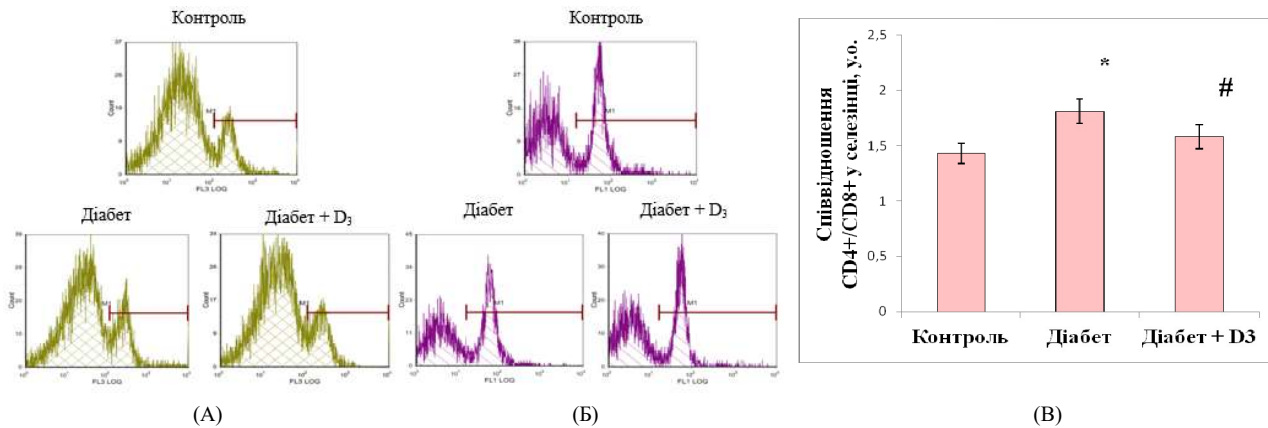


Рис. 10. Цитофлуорограми детектування субпопуляцій CD4⁺ (А) і CD8⁺ (Б) Т-лімфоцитів, їх співвідношення (В) у селезінці за цукрового діабету та після введення вітаміну D₃. M_±m, n=6. * - p < 0,05 порівняно з контролем, # - p < 0,05 порівняно з діабетом

Наші дослідження показали, що індекс проліферативної активності цільної популяції Т-лімфоцитів селезінки, індукованих фітогемаглютиніном, знижується у 1,85 рази за експериментального цукрового діабету, порівняно із контрольними значеннями (p < 0,05, рис. 11).

Доведеною є роль транскрипційного фактору NF-κB – плейотропного регулятора багатьох індукційних генів, залучених у процеси запалення та імунної відповіді, серед яких IL-1 і IL-6, TNF-α, лімфотоксин, колонієстимулюючий фактор

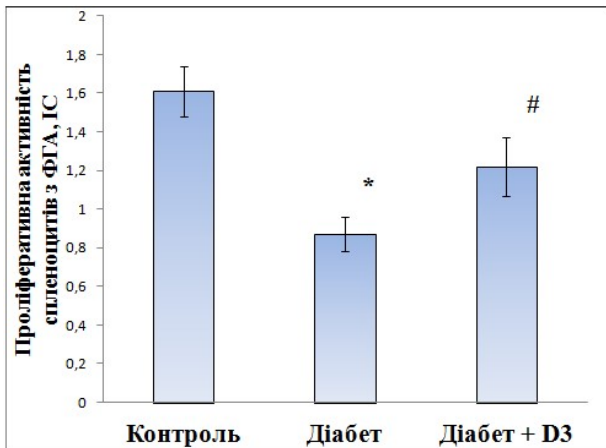


Рис. 11. Індекс ФГА-індукованої проліферативної активності спленоцитів мишей за цукрового діабету та після введення вітаміну D₃. $M \pm m$, $n=6$. * - $p < 0,05$ порівняно з контролем, # - $p < 0,05$ порівняно з діабетом

росту гранулоцитів і макрофагів (GM-CSF) та $IFN\gamma$ [Kang O.-H. et al., 2009]. Більш того, нещодавно було показано значну роль NF- κ B саме як регулятора Т-клітинної активації та апоптозу у експериментах із периферичними Т-лімфоцитами та Т-клітинними гібридами [Gharagozloo M. et al., 2010]. Таким чином, у даній роботі важливим було з'ясування вмісту фосфорильованої (активованої) субодиниці p65 транскрипційного фактора κ B та його транслокації у ядро клітин Т-лімфоцитів за цукрового діабету. Було показано зростання у 2,18 рази вмісту фосфорильованої субодиниці p65 NF- κ B у клітинах цільної популяції Т-лімфоцитів селезінки за експериментального цукрового діабету порівняно із контрольними тваринами ($p < 0,05$, рис. 12 А, Б).

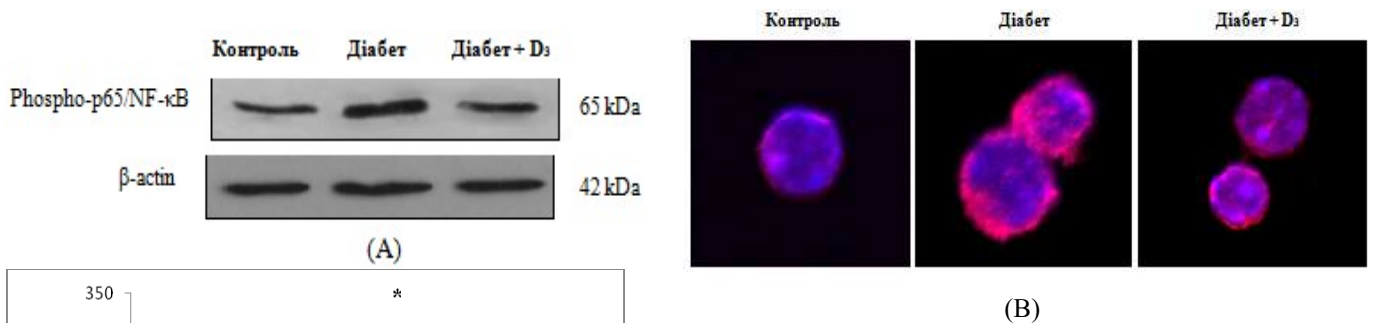


Рис. 12. Рівень фосфорильованої p65 NF- κ B у цільній популяції Т-лімфоцитів селезінки мишей за цукрового діабету та після введення вітаміну D₃. (А) Імуноблотограма фосфорильованої p65 NF- κ B у Т-лімфоцитах селезінки. (Б) Відносний вміст фосфорильованої p65 NF- κ B у Т-лімфоцитах селезінки піддослідних тварин. $M \pm m$, $n=6$. * - $p < 0,05$ порівняно з контролем, # - $p < 0,05$ порівняно з

діабетом. (В) Імунофлуоресцентний аналіз транслокації активованої субодиниці NF- κ B p65 у клітинах цільної популяції Т-лімфоцитів селезінки методом конфокальної мікроскопії. Ядра помічено барвником Hoechst 33258, а фосфоNF- κ B p65 детектовано антитілами, кон'югованими із Alexa Fluor 647

Як видно з даних конфокальної мікроскопії (рис. 12 В), транслокація активованої субодиниці р65 здійснюється у ядро із навколоядерної ділянки цитоплазми.

Довготривале терапевтичне введення вітаміну D₃ продемонструвало його нормалізуючий вплив, суттєво нівелювавши відмінності у співвідношенні CD4⁺ - та CD8⁺-позитивних Т-лімфоцитів як у крові, так і у селезінці (рис. 9 та рис. 10); збільшивши індекс проліферативної активності спленоцитів (рис. 11); зменшивши рівень активованої фосфо-NF-κB у цільній популяції Т-лімфоцитів селезінки та її транслокацію у ядро (рис. 12).

Дослідження ролі вітаміну D₃ у прооксидантних та прозапальних процесах за експериментального цукрового діабету.

За даними протокової цитофлуориметрії з використанням чутливого до утворення АФК зонду, DCF-DA, було встановлено, що хронічна гіперглікемія за ЦД стимулює утворення активних метаболітів кисню у ізольованих гепатоцитах, підвищуючи інтенсивність флуоресценції зонду на 90,4% (p < 0,05) у порівнянні з контрольними тваринами (рис. 13 А, Б). Аналогічно, за ЦД було показано значне підвищення флуоресценції DAF-DA, специфічного зонду до оксиду азоту (NO), кількість якого зросла на 73,1% (p < 0,05) у порівнянні із інтактними тваринами (рис. 13 В, Г).

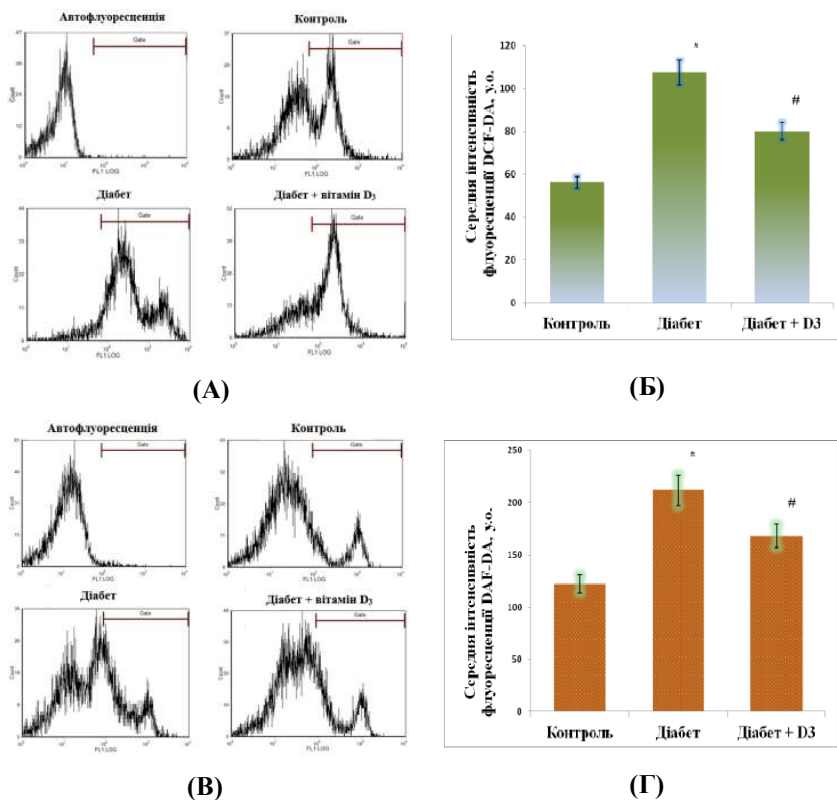


Рис. 13. (А) Продукування АФК гепатоцитами мишей за інтенсивністю флуоресценції DCF-DA за експериментального ЦД. (Б) Середня інтенсивність флуоресценції DCF-DA. (В) Середня інтенсивність флуоресценції DAF-DA за експериментального ЦД. (Г) Середня інтенсивність флуоресценції DAF-DA. M_±m, n=6. * - p < 0,05 порівняно з контролем, # - p < 0,05 порівняно з діабетом

Окрім цього, у тканині печінки було зареєстровано зростання активності ряду ензимів, залучених до прооксидантних процесів, а саме: NAD(P)H-хінон-оксидоредуктази у 2,2, ксантиноксидази у 1,4 та NAD(P)H-оксидази у 1,6 рази

відповідно. Разом з тим спостерігалось падіння активності СОД та каталази на 35 та 27% відповідно.

При гістологічному дослідженні печінки на тлі експериментального цукрового діабету встановлено класичну часточкову організацію структури паренхіми печінки. Було виявлено діабет-асоційоване збільшення просвіту гемокапілярів (на 52%, $P < 0,001$) та центральної вени часточок (на 28%, $P < 0,01$), розвиток дистрофічних змін гепатоцитів балок часточок. Портальні тракти дещо розширювались за рахунок повнокрів'я судин. Цитоплазма більшості гепатоцитів зерниста з невеликими вакуолями (рис. 14 Б), в частині клітин відмічено гіперхромні пікнотичні або гіпертрофовані ядра (індекс атипових ядер збільшився в 4,8 разів), площа гепатоцитів збільшилась в 2,2 рази, а ядер клітин – в 2,4 рази, що свідчить про розвиток в них некротичних змін. Загальна щільність клітин в полі зору досліджуваних зразків зменшилась на 28,2% ($P < 0,01$), разом з тим збільшилась кількість двоядерних клітин (індекс амітозів зростав на 76,7%, $P < 0,02$).

Таким чином, при цукровому діабеті в печінці розвиваються виражені структурно-функціональні порушення, що на морфологічному рівні проявляються у розладах мікроциркуляції (стазовані, розширені мікросудини), дистрофічних змінах паренхіми органу (порушенні цитологічної структури гепатоцитів та їх мітотичної активності).

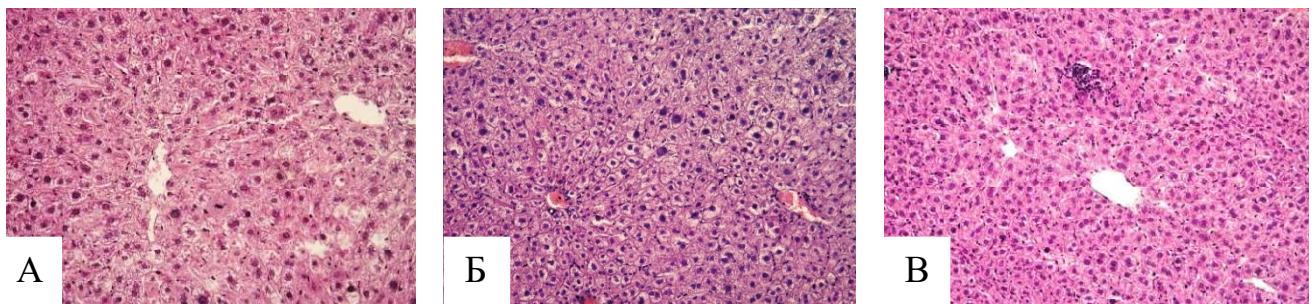


Рис. 14. Гістологія мікроструктури печінки за експериментального ЦД. А – контроль; Б – цукровий діабет; В – цукровий діабет+вітамін D₃. Гематоксилін-еозин, об. 20, ок. 10.

Терапевтичне введення вітаміну D₃ виявило зниження інтенсивності DCF-чутливого утворення вільнорадикальних АФК та NO на 25,1 та 20,6% відповідно (рис. 13). Введення холекальциферолу значно вплинуло й на розвиток структурних змін печінки за ЦД. На основі морфометричного аналізу (рис.14) показано зменшення дистрофічних змін на рівні часточкових гемокапілярів (зменшення стазованого просвіту на 27%, $P < 0,01$), площі гепатоцитів та загальної кількості гепатоцитів (збільшення на 20,7%, $P < 0,007$).

Як показують сучасні дослідження, ключову роль у індукції та модулюванні прозапальних процесів відіграє ядерний (транскрипційний) фактор κB [D'Ignazio L. et al., 2016]. Приймаючи до уваги центральне місце печінки у метаболізмі вітаміну D₃, в ініціюванні та розвитку системної запальної відповіді, було досліджено зв'язок між NF-κB-асоційованим прозапальними процесами тканини печінки та рівнем

забезпеченості організму тварин вітаміном D₃ за STZ-індукованого цукрового діабету, а також з'ясовано ефективність дії вітаміну D₃ у корекції викликаних діабетом порушень.

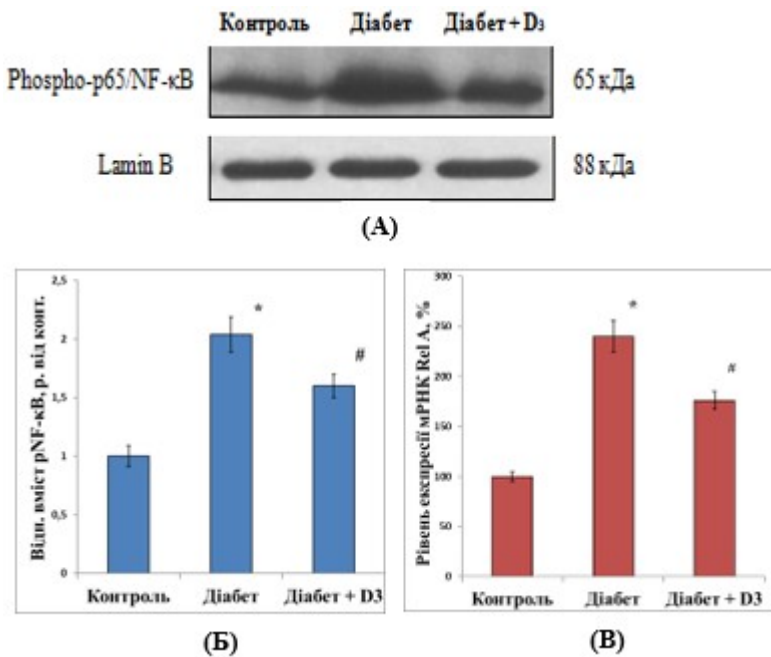


Рис. 15. Вміст у ядрі фосфорильованої субодиниці p65 NF-κB та загальний рівень експресії її мРНК p65 NF-κB (RelA) у печінці мишей за ЦД. (А) Імуноблотограма протеїну фосфоNF-κB p65. Відносний вміст протеїну фосфоNF-κB p65 (Б) та мРНК RelA (В) відповідно у тканині печінки мишей. (M±m, n=6). * - p < 0,05 порівняно з контролем, # - p < 0,05 порівняно з діабетом

Було встановлено, що рівень експресії мРНК p65 ядерного фактору κB у тканині печінки зростає у 2,5 рази, а вміст фосфорильованого протеїну NF-κB p65 у ядерній фракції клітин печінки за ЦД збільшувався у 2,1 рази, у порівнянні з контролем (рис. 15).

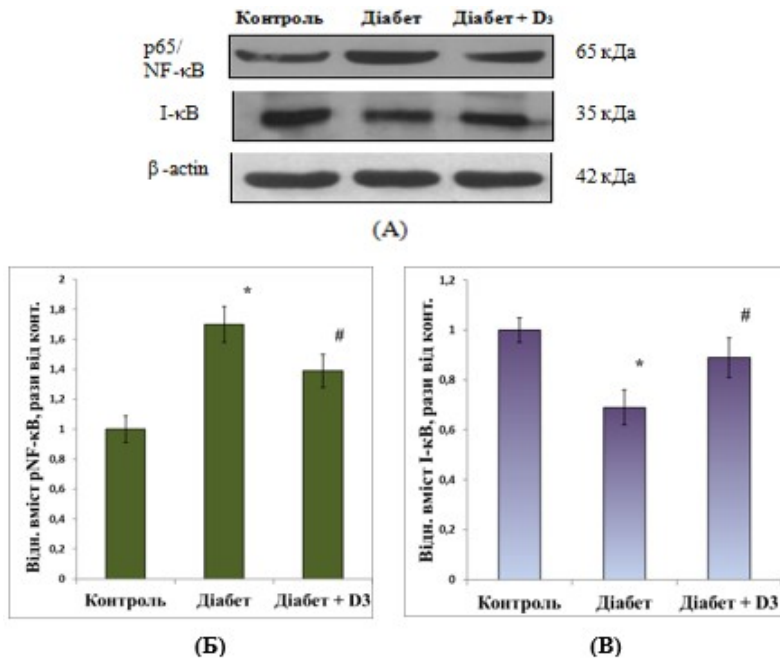


Рис.16. (А) Імуноблотограма протеїнів. Вміст фосфорильованої субодиниці p65 NF-κB в цитозолі (Б) та загальний вміст протеїну IκB (В) у печінці мишей за цукрового діабету та після введення вітаміну D₃. (M±m, n=6). * - p < 0,05 порівняно з контролем, # - p < 0,05 порівняно з діабетом

При цьому, як свідчать результати дослідження, представлені на рис. 16, за цукрового діабету також спостерігається зростання фосфоNF-κB p65 у більш ніж у 1,6 рази у цитоплазмі клітин печінки порівняно із контрольними тваринами. Так, з

урахуванням отриманих результатів, можна говорити про значний перерозподіл фосфоNF-κB p65 між цитозольною та ядерною фракціями клітин печінки у бік останньої.

Вивчення тканинного вмісту основної ізоформи інгібітору ядерного фактору κB – ІκB-α, у печінці показало його зниження майже на 30% за цукрового діабету у порівнянні з контрольними тваринами (рис. 16). У сукупності отримані дані вказують на посилену транслокацію активної форми NF-κB до ядра, що може сприяти активуванню експресії прозапальних генів у клітинах печінки.

Дослідження останніх років переконливо свідчать, що як активні форми кисню, так і активування запальних процесів відіграють центральну роль в розвитку численних ускладнень ЦД, та наголошують на залученні NF-κB, як прозапального фактору, у клітинній відповіді на оксидативний стрес за умов діабету [Laveti D. et al., 2013].

На рис. 17 продемонстровано, що за діабету у тканині печінки відбувається активування NF-κB-опосередкованої експресії протеїну індукцйбельної синтази оксиду азоту (iNOS) рівень якого зростає на 30% у порівнянні з контролем. Показано також, що розвиток ЦД1 супроводжується зростанням у 1,6 рази вмісту димерної форми VEGF-A у печінці порівняно із контрольними тваринами (рис. 17).

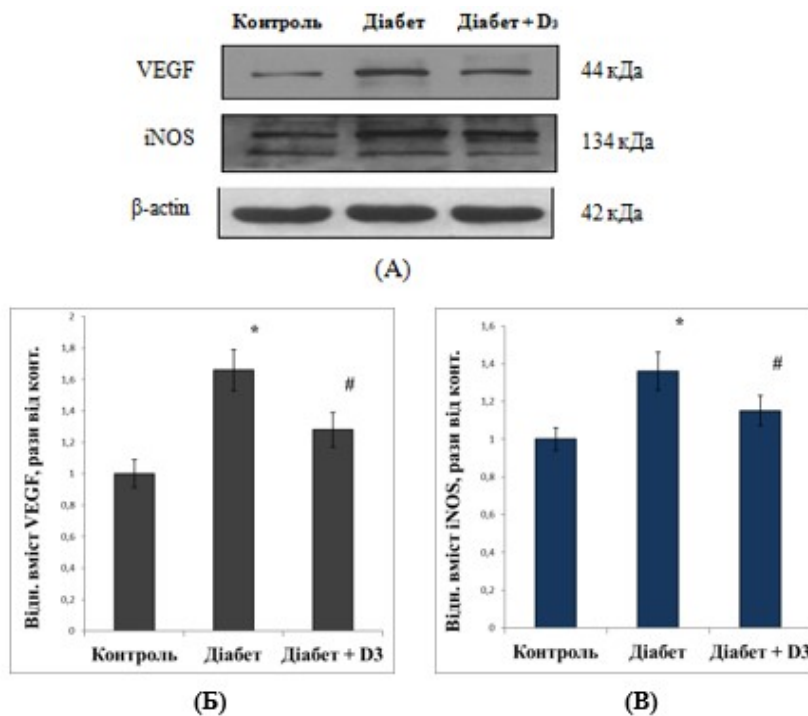


Рис. 17. (А) Імуноблотограма протеїнів. Загальний вміст протеїну iNOS (Б) та VEGF (В) у печінці мишей. (M±m, n=6). * - p < 0,05 порівняно з контролем, # - p < 0,05 порівняно з ЦД.

Відомо, що сигнальна система RANKL/RANK/OPG відіграє ключову роль у функціонуванні клітин кісткової системи. Як продемонстрували наші дослідження, у печінці піддослідних тварин із ЦД1 спостерігалось більш ніж 1,4-разове зростання рівня RANKL та 1,25-разове падіння вмісту OPG, порівняно із контролем (рис. 18).

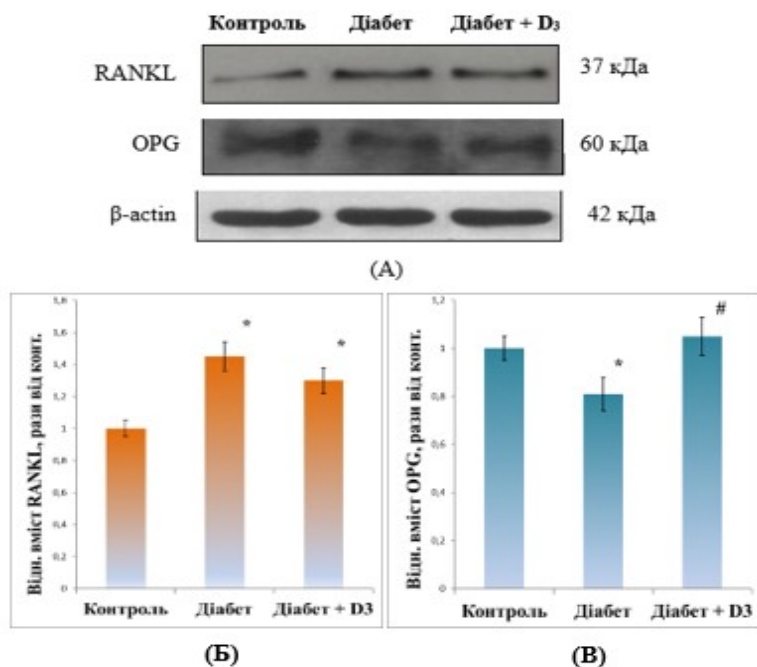


Рис. 18.

(А) Імуноблотограма протеїнів. Вміст RANKL (Б) та OPG (В) у печінці мишей за цукрового діабету та після введення вітаміну D₃. $M \pm m$, $n=6$. * - $p < 0,05$ порівняно з контролем, # - $p < 0,05$ порівняно з діабетом

Можна припустити, що діабет-асоційовані структурні порушення у печінці, розвиток оксидативно-нітрозативного стресу, запалення і активування проапоптичних процесів, принаймні частково, були пов'язані із глибоким дефіцитом вітаміну D₃, оскільки відновлення рівня 25OHD у сироватці крові після введення вітаміну D₃ супроводжувалось частковою або повною нормалізацією продукування гепатоцитами АФК та NO, рівня експресії протеїнів прозапального профілю (NF- κ B, iNOS, VEGF) та протеїнів остеокінової системи RANKL, RANK та OPG.

ВИСНОВКИ

Вивчення ролі RANKL/RANK/OPG та NF- κ B-асоційованих сигнальних шляхів у механізмах коригування діабет-індукованих ускладнень ЦД 1 типу за участі вітаміну D₃ наразі залишається актуальним завданням сучасної біомедицини. У дисертації вперше проведено системний аналіз функціонування сигнальних шляхів, що забезпечують остеοіммунну взаємодію та їх зв'язок із прооксидантними і прозапальними процесами в організмі за експериментального цукрового діабету 1 типу. Було досліджено плеїотропні ефекти холекальциферолу у корекції індукованих діабетом порушень на тлі вітамін D₃ дефіцитного стану.

1. Показано, що за експериментального цукрового діабету 1 типу розвивався глибокий дефіцит вітаміну D₃ (рівень 25OHD у сироватці крові знижувався у 2,5 рази) внаслідок порушення синтезу компонентів вітамін D-ендокринної системи печінки. Зменшувався рівень експресії як мРНК, так і протеїнів цитохрому CYP27A1, рецептору VDR та зв'язуючого протеїну VDBP.

2. Зменшення вмісту мінеральних компонентів великої гомілкової кістки та збільшення активності лужної фосфатази корелювало з погіршенням біомеханічних властивостей кісток. На молекулярному рівні зміни супроводжувались підвищенням експресії протеїну RANK, RANKL, фосфоNF- κ B p65 та зменшенням вмісту протеїнів VDR, OPG та остеокальцину, що свідчить про переважання резорбтивних процесів над остеосинтезом.

3. Продемонстровано, що розвиток ЦД 1 типу супроводжувалося порушенням співвідношення популяцій регуляторних лімфоцитів – $CD4^+$ - та $CD8^+$ -позитивних клітин у крові та селезінці з переважанням $CD4^+$ -позитивних клітин. У діабетичних тварин виявлено зменшення проліферативного потенціалу спленоцитів, посилення експресії активної фосфорильованої субодиниці ядерного фактору κB та зростання відсотку апоптичних клітин у ізольованій популяції Т-лімфоцитів селезінки, а також посилення гуморальної відповіді В-лімфоцитів на введення тваринам рекомбінантного імуногену субодиниці дифтерійного токсину SB.

4. У ізольованих гепатоцитах діабетичних тварин спостерігалось посилене продукування активних форм кисню та азоту. На тлі D-вітамінної недостатності виявлено значне зменшення активності ензимів антиоксидантного захисту (СОД, каталаза) та зростання активності АФК-продукуючих ензимів (DT-діафораза, NADPH-оксидаза, ксантиноксидаза), що супроводжувалось накопиченням ТБК-реактивних продуктів та дієнових кон'югатів у тканині печінки.

5. Показано, що підвищення NF- κB -залежної експресії прозапальних цитокінів (iNOS, VEGF-A, TNF- α , IL-6, IL-1 β) у тканині печінки за цукрового діабету обумовлювало розвиток оксидативно-нітрозативного стресу. Встановлено підвищення вмісту RANKL і зниження вмісту OPG у сироватці крові та вмісту RANKL у тканині печінки, що корелювало з розвитком запальних процесів та ознаками вторинного остеопорозу.

6. Виявлені структурно-морфологічні зміни у печінці за ЦД1 корелювали зі збільшенням відсотку апоптичних і некротичних клітин у ізольованих гепатоцитах, та зростанням у них вмісту ензиматично активних фрагментів каспази 3 і полі(ADP)рибозильованих протеїнів.

7. Встановлено здатність вітаміну D_3 за ЦД 1 типу знижувати інтенсивність прозапальних процесів та розвиток оксидативно-нітрозативного стресу шляхом нормалізації синтезу 25ОНD, активності ензимів та рівня експресії VDR у тканинах. Коригувальна дія вітаміну D_3 на процеси ремоделювання кісткової тканини здійснювалась шляхом регулювання експресії остеотропних цитокінів RANKL, RANK та OPG.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Лабудзинський Д.О., Шиманський І.О., Рясний В.М., Великий М.М.** Забезпеченість організму вітаміном D_3 та функціональна активність фагоцитуючих клітин периферичної крові за експериментального цукрового діабету 1 типу // Укр. біохім. журнал. – 2014. – Т. 86, № 2. – С. 107-118. (*Особистий внесок – пробопідготовка та визначення рівня генерування АФК лейкоцитами та ступеня функціональної активності фагоцитів периферичної крові, Вестерн-блот аналіз експресії CYP27A1 та CYP2R1 у тканині печінки, обробка результатів та підготовка статті до друку*).

2. **Labudzynski D.O., Lisakovska O.A., Shymansky I.A., Riasnyi V.M., Veliky M.M.** The role of vitamin D_3 in the regulation of the mineral metabolism in experimental type 1 diabetes / Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2015. – 9 (1). – P.: 72–78 (*Особистий внесок – робота із експериментальними тваринами, вивчення остеометричних показників великої гомілкової кістки та*

маркерів мінерального обміну, обробка результатів та підготовка статті до друку).

3. **Labudzynski D.O.**, Zaitseva O.V., Latyshko N.V., Gudkova O.O., Veliky M.M. Vitamin D₃ contribution to the regulation of oxidative metabolism in the liver of diabetic mice // Ukr. Biochem. J. – 2015. – 87 (3). – P.: 75-90. (*Особистий внесок – робота із експериментальними тваринами, Вестерн-блот аналіз вмісту нітрованих протеїнів, визначення ензиматичної активності NADPH-хіноноксидоредуктази та NADPH-оксидази у печінці, дослідження інтенсивності продукування АФК та NO у тканині печінки, обробка результатів та підготовка статті до друку*).

4. **Labudzynski D.O.**, Manoylov K.U., Shymanskyu I.O., Veliky M.M. Immunoregulatory effects of vitamin D₃ in experimentally induced type 1 diabetes // Cytology and Genetics. – 2016. – 50 (4). – P. 231–240. (*Особистий внесок – робота із експериментальними тваринами, Вестерн-блот аналіз вмісту p65 NF-κB у ізольованих T-лейкоцитах селезінки, проведення імунізування тварин SB та визначення рівня гуморальної відповіді IgG проти SB, оцінка проліферативної активності спленоцитів, дослідження співвідношення CD4⁺- та CD8⁺-лімфоцитів у крові та селезінці, обробка результатів та підготовка статті до друку*).

5. **Labudzynski D.O.**, Shymanskyu I.O., Veliky M.M. Role of vitamin D₃ in regulation of interleukin-6 and osteopontin expression in liver of diabetic mice // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. – 2016. – 20 (13). – P.: 2916-2919. (*Особистий внесок – робота із експериментальними тваринами, ПЛР аналіз рівня експресії мРНК ІЛ-6 та остеопонтину у тканині печінки, обробка результатів та підготовка статті до друку*).

6. **Лабудзинський Д.О.**, Кубайчук К.І., Шиманський І.О., Великий М.М. Регуляторний ефект вітаміну D₃ на прозапальні процеси в печінці мишей з експериментальним цукровим діабетом // Доповіді Національної академії наук України. – 2016. – № 6. – С. 127-132. (*Особистий внесок – робота із експериментальними тваринами, визначення рівня 25ОНD у сироватці крові, ПЛР аналіз рівня експресії прозапальних цитокінів у тканині печінки, обробка результатів та підготовка статті до друку*).

7. **Labudzynski D.O.**, Shymansky I.A., Veliky M.M. Role of vitamin D₃ in regulation of phagocytic function and CD4/CD8 splenic lymphocyte ratios in mice with STZ-induced diabetes // 48th EASD Annual Meeting, Berlin, Germany, 1-5 October 2012. – P.191.

8. **Labudzynski D.O.**, Shymansky I.A., Veliky M.M. Effects of vitamin D₃ on the expression of cytochrome P450 (27A1 and 2R1 isoforms) in the liver of diabetic mice // 48th EASL annual meeting, Amsterdam, Netherlands, 24-28 April 2013. – P.121.

9. **Labudzynski D.** Role of vitamin D₃ in regulation of hepatic pNF-κB expression and Casp3 activity in experimental type 1 diabetes // IX Jakub K. Parnas Conference: Proteins – from Birth to Death, IAS Jerusalem, Israel, 29 September – 2 October 2013. – P.73-74.

10. **Labudzynski D.**, Shymanskyu I., Veliky M. Relation of vitamin D₃ availability to RANKL/RANK/OPG signaling pathway in remodeling of bone tissue in experimental type 1 diabetes // 15th International EMBL PhD Symposium, 21-23 November 2013, Heidelberg, Germany. – P. 48.

11. **Labudzynski D.O.**, Shymansky I.A., Veliky M.M. Diabetes-induced liver injury associated with inflammatory pathway activation: effects of chronic vitamin D₃ administration // 50th FEBS-EMBO Congress, Paris, France, 30 August – 4 September 2014. – P.98.
12. **Labudzynski D.**, Shymansky I., Mazanova A., Lisakovskaya O., Veliky M. Pro- and antioxidant status in dependence on vitamin D₃ availability in the development of diabetes-induced liver injury // 50th EASD Annual Meeting, 15-19 September 2014, Vienna, Austria. – P.266.
13. **Labudzynski D.**, Shymansky I., Mazanova A., Lisakovskaya O., Veliky M. Relation of 25OHD availability to VDR expression and NF-κB-dependent proinflammatory signalling pathway in diabetes-induced liver failure // 51th EASD Annual Meeting, 14-18 September 2015, Stockholm, Sweden. – Diabetologia (2015) 58 (Suppl 1). – P. 552.
14. **Labudzynski D.**, Shymansky I., Bonnet L., Landrier J. F., Veliky M. Vitamin D₃ in ameliorating diabetes-induced liver failure associated with impaired VDR signaling and inflammation // 41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better Life (cancelled), September 3-8, 2016, Ephesus/Kuşadasi, Turkey. – The FEBS Journal – 2016. – 283 (Suppl. 1). – P. 352.
15. **Labudzynski D.**, Shymansky I., Mazanova A., Koskela A., Tuukkanen J., Veliky M. Vitamin D₃ improves bone biomechanical properties and structure through VDR and RANKL/RANK/NF-κB signaling pathways in diabetes // 52nd EASD Annual Meeting 12 - 16 September, 2016, Munich, Germany. – Diabetologia (2016) 59 (Suppl 1). – P. 522.
16. **Labudzynski D.**, Shymansky I., Savosko S., Bonnet L. Relation between renal vitamin D-endocrine system and RANK/RANKL-signalling pathway in diabetes nephropathy: effect of vitamin D₃ treatment // 53rd EASD Annual Meeting 11 - 15 September, 2017, Lisbon, Portugal. – Abstract book. – P. 242.

АНОТАЦІЯ

Лабудзинський Д.О. Регуляторний вплив вітаміну D₃ на osteoімунну взаємодію за експериментального цукрового діабету. – Рукопис.

Дисертація на здобуття ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. – 2018 р.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню особливостей функціонування NF-κB-асоційованих механізмів, залучених до реалізації osteoімунної взаємодії та системних прозапальних процесів за експериментального цукрового діабету 1 типу та ролі вітаміну D₃ у їх коригуванні. Вперше показано взаємозв'язок між дефіцитом вітаміну D₃ в організмі та порушеннями NF-κB-залежних регуляторних процесів у кістковій тканині та імунній системі (osteoімунної взаємодії) за цукрового діабету, що обумовлюються змінами функціонального стану цитокинової системи RANKL/RANK/OPG. Було встановлено, що цукровий діабет призводить до порушення процесів ремоделювання кісткової тканини, зокрема до активування NF-κB-опосередкованих сигнальних шляхів.

Встановлено, що асоційоване з діабетом порушення osteoімунної взаємодії супроводжувалося змінами у різних ланках імунної системи. Зокрема, виявлено істотний дисбаланс у співвідношенні популяцій регуляторних CD4⁺- та CD8⁺-

лімфоцитів, зменшення проліферативного потенціалу та зростання вмісту у спленоцитах активованої субодиниці p65 NF-κB. Розвиток структурно-функціональних порушень у тканині печінки за цукрового діабету корелював з підвищенням експресії ключових прозапальних цитокінів (iNOS, VEGF-A, TNF-α) та компонентів системи RANKL/RANK/OPG.

У роботі з'ясовано, що застосування терапевтичних доз вітаміну D₃ за експериментального цукрового діабету нормалізує рівень 25OHD у сироватці крові та експресію компонентів вітамін D-ендокринної системи у печінці мишей. Підвищення рівня біодоступності вітаміну D сприяло частковій корекції дисбалансу у досліджуваних ланках імунної системи, активності ензимів системи про-/антиоксидантного захисту та експресії NF-κB-опосередкованих про-/протизапальних факторів у тканині печінки. Це корелювало з істотним покращенням біомеханічних та біохімічних параметрів великогомілкової кістки та відновленням порушеного балансу osteoімунної взаємодії у процесі ремоделювання кісткової тканини.

Ключові слова: цукровий діабет, вітамін D₃, osteoімунна взаємодія, кісткове ремоделювання, osteokінова система RANKL/RANK/OPG.

ABSTRACT

Labudzynsky D.O. Regulatory effect of vitamin D₃ on the osteoimmune interaction in experimental diabetes mellitus. – Manuscript.

Thesis for PhD's degree by speciality – 03.00.04 – Biochemistry. – Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

The PhD thesis is devoted to studying the involvement NF-κB-associated mechanisms in the realization of osteoimmune interaction and systemic proinflammatory processes in experimental type 1 diabetes mellitus and to evaluating the role of vitamin D₃ in the correction of diabetes-induced changes. We are the first who showed the close relationship between vitamin D₃ deficiency and disorders of NF-κB-dependent regulatory processes in the bone tissue and immune system (osteoimmune interaction) in diabetes mellitus. These changes were associated with the impairment of the functional state of the cytokine system RANKL/RANK/OPG that led to the activation of NF-κB-mediated signaling pathways and caused disorders of bone tissue remodeling.

It was found that diabetes-related abnormalities in the osteoimmune interaction were accompanied by changes in different segments of the immune system. In particular, we found a significant imbalance in the ratio of regulatory CD4⁺- and CD8⁺-lymphocytes, a decrease in the proliferative potential and an increase in the content of the activated p65 NF-κB subunit in splenocytes. The development of the associated structural and functional changes in liver tissue in the liver correlated with an increase in the expression of key pro-inflammatory cytokines (iNOS, VEGF-A, TNF-α) and elements of the RANKL/RANK/OPG axis.

It was found out that the use of therapeutic doses of vitamin D₃ in experimental diabetes normalized the level of 25OHD in serum and the expression of the vitamin D-endocrine system components in the liver of mice. By increasing the bioavailability of vitamin D, cholecalciferol contributed to a partial correction of the revealed alterations in the immune system, enzymatic activities of the pro-/antioxidant defense system, and the

expression of NF- κ B-mediated pro-/ anti-inflammatory factors in the liver tissue. These changes correlated with significant improvement of the biomechanical and biochemical parameters of the tibia and restoration of the disturbed balance of osteoimmune interaction in the process of bone tissue remodeling.

Key words: diabetes mellitus, vitamin D₃, osteoimmune interaction, bone remodeling, osteokine system RANKL/RANK/OPG.

АННОТАЦИЯ

Лабудзинский Д.О. Регуляторное влияние витамина D₃ на osteoimmune взаимодействие при экспериментальном сахарном диабете. – Рукопись.

Диссертация на получение степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины. – 2018 г.

Диссертационная работа посвящена исследованию особенностей функционирования NF- κ B-ассоциированных механизмов, вовлеченных в реализацию osteoimmune взаимодействия и системных провоспалительных процессов при экспериментальным сахарном диабете 1 типа и роли витамина D₃ в их коррекции. Впервые показано взаимосвязь между дефицитом витамина D₃ в организме и нарушениями NF- κ B-зависимых регуляторных процессов в костной ткани и иммунной системе (osteoimmune взаимодействия) при сахарном диабете, что обусловлено изменениями функционального состояния цитокиновой системы RANKL/RANK/OPG. Было установлено, что сахарный диабет приводит к нарушениям процесса ремоделирования костной ткани, в частности к активации NF- κ B-опосредованных сигнальных путей.

Установлено, что ассоциированное с диабетом нарушение osteoimmune взаимодействия сопровождалось изменениями в разных звеньях иммунной системы. В частности, обнаружен существенный дисбаланс в соотношении популяций регуляторных CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов, уменьшение пролиферативного потенциала и увеличение содержания в спленоцитах активированной субъединицы p65 NF- κ B. Развитие структурно-функциональных изменений в ткани печени при сахарном диабете коррелировало с повышением экспрессии ключевых провоспалительных цитокинов (iNOS, VEGF-A, TNF- α) и компонентов системы RANKL/RANK/OPG.

В работе установлено, что применение терапевтических доз витамина D₃ при экспериментальном сахарном диабете нормализовало уровень 25OHD в сыворотке крови и экспрессию компонентов витамин D-эндокринной системы в печени мышей. Повышение уровня биодоступности витамина D способствовало частичной коррекции дисбаланса в исследуемых звеньях иммунной системы, активности ферментов про-/антиоксидантной защиты и экспрессии NF- κ B-опосредованных про-/противовоспалительных факторов в ткани печени. Это коррелировало со значительным улучшением биомеханических и биохимических параметров большой берцовой кости и возобновлением нарушенного баланса osteoimmune взаимодействия в процессе ремоделирования костной ткани.

Ключевые слова: сахарный диабет, витамин D₃, osteoimmune взаимодействие, костное ремоделирование, RANKL/RANK/OPG.