

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

ЛІСАКОВСЬКА ОЛЬГА ОЛЕКСАНДРІВНА



УДК 577.161.2+577.175.5:616.71-007.234

**РОЛЬ ВІТАМІНУ D₃ У РЕГУЛЮВАННІ NF-κB-АСОЦІЙОВАНИХ
СИГНАЛЬНИХ ШЛЯХІВ ЗА ПРЕДНІЗОЛОН-ІНДУКОВАНОГО
ОСТЕОПОРОЗУ**

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

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

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
Бондаренко Лариса Борисівна,
головний науковий співробітник відділу токсикології
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»

доктор медичних наук, професор
Натрус Лариса Валентинівна,
директор Науково-дослідного інституту
експериментальної та клінічної медицини
Національного медичного університету
ім. О.О. Богомольця

Захист відбудеться «25» березня 2019 року о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, Київ, вул. Леонтовича, 9.

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

Автореферат розісланий «9» лютого 2019 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук



Н.П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Синтетичні глюкокортикоїди (ГК) є ефективними протизапальними, імуносупресивними та протиалергічними препаратами, які широко застосовуються в медицині, проте викликають численні побічні ефекти, зокрема розвиток остеопорозу [Поворознюк В.В. та ін., 2000]. Остеопороз – поліетіологічне системне захворювання скелету, що характеризується втратою маси кісток та зниженням їх щільності, порушенням мікроархітекtonіки та підвищенням ризику переломів навіть при мінімальних навантаженнях [Briot K. et al., 2015; Корж Н.А. та ін., 2002]. Коригування порушень функціонування кісткової тканини за тривалої глюкокортикоїдної терапії є надзвичайно актуальною теоретичною та клінічною проблемою, проте молекулярні механізми, що лежать в основі розвитку ГК-індукованого остеопорозу (ГЮ) на сьогодні залишаються недостатньо з'ясованими.

Вітамін D₃ (холекальциферол) є регулятором процесу ремоделювання кісткової тканини, а його недостатність вважається одним з провідних чинників розвитку ГЮ. Наявність практично в усіх клітинах тканин організму рецепторів вітаміну D (VDR) та ензиму 25ОНD-1 α -гідроксилази (CYP27B1), який забезпечує гідроксилування 25ОНD з утворенням гормонально активної форми – 1,25-дигідроксिवітаміну D (1,25(ОН)₂D), обґрунтовує множинні регуляторні ефекти – контроль проліферування та диференціювання клітин, імунної відповіді, ангиогенезу та апоптозу, модулювання стану цитокінових систем [Feldman D. et al., 2018; Bikle D. et al., Holick M., 2018].

Обґрунтування ролі цитокінової системи RANKL (ліганд рецептора активатора ядерного фактора κ B)/RANK (рецептор активатор ядерного фактора κ B)/OPG (остеопротегерин) із залученням ядерного фактору транскрипції NF- κ B у контролі резорбції обумовило значний прогрес у розумінні процесів ремоделювання кісткової тканини та механізмів розвитку захворювань скелету, зокрема остеопорозу [Xiao W. et al., 2016]. Оскільки порушення співвідношення OPG/RANKL може бути одним з механізмів розвитку захворювань кісткової тканини, RANKL/RANK/OPG вважається перспективною молекулярною мішенню для здійснення коригування процесу ремоделювання за остеопорозу.

Актуальними залишаються питання: яким чином дефіцит вітаміну D та порушення синтезу компонентів D-ауто/паракринної системи у органах-мішенях пов'язані зі змінами RANKL/RANK/OPG-сигналювання та експресії транскрипційного фактору NF- κ B, і чи корелюють ці зміни з порушенням процесу ремоделювання кісткової тканини за ГЮ. Особливий медико-біологічний інтерес становить обґрунтування можливості застосування вітаміну D₃ як перспективного засобу коригування патологічних змін у кістковій тканині за умов тривалого введення преднізолону.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами лабораторії. Дисертаційна робота виконувалась у рамках наукових тем відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України: 1) «Роль вітамінів А, Е, В₁, РР, D₃, убіхінону та їх коензимів у забезпеченні функціонування спеціалізованих клітин за норми та за умов ініціації їх загибелі» (2012-2016 рр.,

державний реєстраційний номер 0112U002625); 2) «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (2012-2016 рр., державний реєстраційний номер 0112U002624).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи було дослідити роль NF-κB-асоційованого регуляторного сигнального шляху RANKL/RANK/OPG у механізмах розвитку порушень ремоделювання кісткової тканини за експериментального глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу та оцінити коригувальний вплив вітаміну D₃. Згідно мети були поставлені наступні завдання:

1) визначити рівень забезпеченості організму піддослідних тварин вітаміном D за вмістом 25OHD у сироватці крові та за вмістом VDR та CYP27B1 у кістковому мозку, кістковій тканині та тканині печінки охарактеризувати стан вітамін D-ауто/паракринної системи за експериментального остеопорозу;

2) дослідити стан мінерального обміну в організмі щурів за вмістом кальцію, фосфатів, активністю лужної фосфатази і її ізоензимів у сироватці крові та кістковій тканині за дії преднізолону і вітаміну D₃;

3) вивчити стан цитокинової системи RANKL/RANK/OPG за ГК-індукованого остеопорозу в залежності від рівня забезпеченості організму вітаміном D та за вмістом маркерів ремоделювання кісткової тканини оцінити інтенсивність остеобласто- та остеокластогенезу в нормі та за остеопорозу;

4) охарактеризувати стан системи NF-κB/IκB та дослідити її роль у взаємодії RANK-, VDR- та GR-сигналювання у тканинах щурів за ГК-індукованого остеопорозу та при дії вітаміну D₃;

5) оцінити рівні тканинного синтезу залежних від NF-κB функціонально важливих протеїнів (фактору росту ендотелію судин – VEGF, фактору некрозу пухлин альфа – TNF-α, індукцибельної NO-синтази – iNOS) та визначити їх роль в процесах вітамін D-опосередкованого ремоделювання кісткової тканини за ГК-індукованого остеопорозу та при дії вітаміну D₃.

Об'єкт дослідження. D-ауто/паракринна система та NF-κB-асоційовані сигнальні шляхи.

Предмет дослідження. Компоненти D-ауто/паракринної системи, компоненти цитокинової системи RANKL/RANK/OPG як центрального регулятора ремоделювання кісткової тканини, транскрипційний фактор NF-κB як інтегральний компонент RANK-, VDR- та GR-опосередкованих сигнальних шляхів за дії преднізолону та вітаміну D₃.

Методи дослідження. У роботі були використані біохімічні та спектральні (спектрофотометрія, протокова цитофлуориметрія, світлова та конфокальна мікроскопія), біомеханічні (тест 3-точкового вигину), імунохімічні (ELISA, вестерн-блот аналіз, імуноцит- та імуногістохімія) методи, методи молекулярної біології (полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі) та статистичного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше було показано залежність між дефіцитом вітаміну D в організмі та порушеннями NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів у різних тканинах щурів за ГК-індукованого остеопорозу. Охарактеризовано стан D-ауто/паракринної системи (за вмістом CYP27B1 та VDR) у кістковій тканині, кістковому мозку та печінці та встановлено,

що на тлі зниження вмісту VDR спостерігаються ГК-індуковані тканинносPECIFIC порушення синтезу CYP27B1: пригнічення синтезу протеїну CYP27B1 у кістковому мозку та збільшення експресії mPNC у кістковій тканині.

Продемонстровано, що компоненти системи NF-κB/IκB є ключовими регуляторами у взаємодії RANKL/RANK/OPG, VDR- та GR-опосередкованих сигнальних шляхів у різних тканинах щурів. У кістковому мозку на тлі зменшеного рівня протеїну глюкокортикоїдного рецептору (GR) та OPG спостерігалось збільшення вмісту RANKL та його зв'язування з RANK (за побудованою 3D-моделлю формування комплексів RANKL з RANK на преостеокластах) за тривалого введення преднізолону. Більше того, показано активування (фосфорилування) NF-κB та його транслокація до ядра. Вперше продемонстровано зростання кількості RANK-позитивних попередників остеокластів за дії преднізолону у кістковому мозку, периферичній крові та селезінці. У кістковій тканині виявлено ГК-індуковане зменшення співвідношення OPG/RANKL, що є ознакою порушення процесу ремоделювання. Показано, що за рахунок суттєвого підвищення вмісту IκB спостерігалось інгібування активності NF-κB у кістковій тканині. Виявлено, що введення вітаміну D₃ мало коригувальний ефект на індуковані преднізолоном порушення експресії компонентів D-ауто/паракринної системи (VDR та CYP27B1) та зміни вмісту компонентів систем RANKL/RANK/OPG та NF-κB/IκB у кістковому мозку та кістковій тканині щурів. Вперше показано здатність вітаміну D₃ частково нормалізувати пул циркулюючих преостеокластів.

Вперше продемонстровано участь цитокінової системи RANKL/RANK/OPG у проявах ГК-індукованої гепатотоксичності. За дії преднізолону знижується вміст RANK та зростає рівень прозапальних цитокінів RANKL та TNFα. Активування NF-κB у печінці призводить до посиленого синтезу iNOS, зростання продукування NO, збільшення вмісту нітрозильованих протеїнів (за рівнем 3-нітротирозину в тканині печінки) та посилення некротичної (за кількістю PI-позитивних клітин) і апоптотичної (за вмістом каспази-3) загибелі гепатоцитів. Показано, що вітамін D₃ на тлі дії преднізолону нормалізував вміст RANKL та RANK, зменшував вміст маркерів оксидативно-нітрозативного стресу за рахунок VDR-опосередкованого інгібування NF-κB та підвищення вмісту IκB у печінці, що корелювало зі зменшенням інтенсивності процесів некрозу та апоптозу гепатоцитів.

Практичне значення роботи. Отримані результати мають важливе значення для медичної біохімії, фармакології, токсикології та медицини, оскільки значно розширюють сучасні уявлення про клітинно-молекулярні механізми розвитку ГЮ та роль NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів у його патогенезі. Завдяки виявленій вперше здатності вітаміну D₃ модулювати стан сигнальних шляхів, асоційованих з NF-κB, а саме RANKL/RANK/OPG, VDR та GR у різних органах та тканинах, обґрунтована доцільність використання холекальциферолу у супровідній терапії з метою коригування преднізолон-індукованих порушень ремоделювання кісткової тканини та зниження проявів гепатотоксичності.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно здійснено пошук та аналіз сучасних джерел літератури за темою дисертаційної роботи, здійснено підбір та опрацювання молекулярно-біологічних та біохімічних методів дослідження,

виконано експериментальну частину роботи, статистично проаналізовано та узагальнено результати досліджень. Планування та розробка загальної концепції роботи, обговорення отриманих експериментальних даних, формулювання основних положень дисертаційної роботи та підготовка до друку наукових публікацій проводились спільно з науковим керівником д.б.н., проф. Великим М.М. та керівником наукової групи к.б.н., ст.н.с., Шиманським І.О.

Апробація матеріалів дисертації. Основні наукові положення дисертаційної роботи були представлені у вигляді усних та постерних доповідей на конференції-конкурсі молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, Україна, 2014 та 2016 рр.), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014 р.), 2nd International conference «Vitamin D – minimum, maximum, optimum» (Варшава, Польща, 2015 р.), 16th International Conference of Biochemistry and Molecular Biology (Ванкувер, Канада, 2016 р.), ECNP Workshop for junior scientists in Europe (Ніца, Франція, 2017), 30th ECNP Congress (Париж, Франція, 2017), FEBS Advanced Lecture Course ALC17-012 «Nuclear receptors and epigenomic mechanisms in human disease and aging» (о. Спеце, Греція, 2017), 18th FEBS Young Scientists' Forum та 43rd FEBS Congress (Прага, Чехія, 2018), XI Parnas Conference – Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (Київ, Україна, 2018 р.) та інших.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 7 статей у наукових фахових журналах (4 – у закордонних виданнях) та 11 тез доповідей у збірках матеріалів міжнародних та вітчизняних наукових конгресів, конференцій та з'їздів.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається з анотації, переліку опублікованих робіт за темою дисертації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення, висновків та списку використаних джерел (220 найменувань). Роботу викладено на 162 сторінках, загальна кількість ілюстрацій – 6 таблиць та 39 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури

В огляді літератури представлено актуальні дані щодо основних біохімічних та клітинно-молекулярних механізмів розвитку ГК-індукованого остеопорозу. Проаналізовано стан дослідження проблеми регуляції ремоделювання кісткової тканини за участі NF-κB-залежних сигнальних шляхів, зокрема тріади RANKL/RANK/OPG. Висвітлено сучасні уявлення щодо молекулярних механізмів дії вітаміну D₃ та проаналізовано роль холекальциферолу у коригуванні порушень ремоделювання кісткової тканини.

Матеріали та методи досліджень

Дослідження проводили на білих щурах (самиці лінії Wistar масою 100 ± 5 г), які були розділені на 3 групи: 1 – контрольні тварини; 2 – тварини, яким щодоби вводили преднізолон перорально у дозі 5 мг/кг маси тіла протягом 30 діб; 3 – тварини, яким вводили вітамін D₃ перорально (Sigma, США) у вигляді масляної

суспензії у дозі 1000 МО/кг маси тіла протягом 30 діб на тлі дії преднізолону. Усі маніпуляції проводили з дотриманням загальноприйнятих біоетичних норм поводження з лабораторними тваринами у відповідності до міжнародних та національних положень: «Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986); «Загальні етичні принципи проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2001), Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV (Україна, 2006). Для дослідження використовували тканину печінки, стегнову та гомілкову кістки, кістковий мозок, сироватку крові, ізольовані спленоцити, гепатоцити, мононуклеари периферичної крові та кісткового мозку. Спленоцити ізолювали за стандартною методикою [Stagg A. et al., 2011; Jungblut M. et al., 2008], використовуючи RBC буфер та клітинні сита з діаметром пор 100 мкм. Гепатоцити виділяли шляхом інкубації тонких зрізів тканини печінки у фосфатному буфері (PBS) з 0,05% колагеназою IV типу. Мононуклеарні клітини периферичної крові та кісткового мозку виділяли використовуючи реагент Histopaque-1083 (Sigma, США).

Флуоресцентне визначення рівнів продукування активних форм кисню та азоту гепатоцитами, мононуклеарними клітинами периферичної крові та кісткового мозку проводили зі специфічними зондами 2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїном діацетатом (DCFH-DA, Sigma, США, 2,5 мМ) та 4,5-діамінофлуоресцеїном діацетатом (DAF-2DA, Sigma, США, 10 мкМ) відповідно. Інтенсивність флуоресценції окислених форм барвників аналізували на протоковому цитофлуориметрі COULTER® EPICS™ XL™ при довжинах хвиль збудження/емісії 488/515 нм. Отримані цитофлуорограми обраховували у програмі FCS Express V3.

Оцінку некротичної загибелі гепатоцитів проводили за накопиченням у них пропідію йодиду (PI, Sigma, США, 50 мкг/мл). Флуоресценцію клітин, що акумулювали PI, детектували на протоковому цитофлуориметрі COULTER® EPICS™ XL™ при довжинах хвиль збудження/емісії 488/645 нм.

Визначення концентрації 25ОНD у сироватці крові піддослідних тварин проводили за допомогою розробленої в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна імуноензимної тест-системи [Мазанова А.О. та ін., 2016].

Дослідження біомеханічних властивостей кісткової тканини проводили методом «3-х точкового прогинання» на приладі Instron 3366 Universal Testing Machine (Instron Corp., США). Максимальне навантаження на злам, міцність та жорсткість були вираховані на основі отриманих кривих деформацій стегнових кісток з використанням програмного забезпечення Bluehill 2 software version 2.6.

Імуногістохімічне мічення зрізів стегнової кістки проводили з використанням первинних антитіл RANK (Santa Cruz Biotechnology, США) та специфічних вторинних антитіл з флуоресцентною міткою DyLight 488. Результати мічення зрізів стегнової кістки були оцінені на мікроскопі Carl Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Німеччина) та оброблені за допомогою програми Zeiss LSM Image Browser.

Визначення кількості RANK-позитивних клітин кісткового мозку, крові та селезінки щурів, а також NF-κB-, RANKL- та GR-позитивних клітин кісткового мозку проводили за допомогою імунофлуоресцентного мічення за стандартними протоколами (<http://www.leica-microsystems.com> та <http://www.abcam.com/protocols>),

умови яких були нами оптимізовані. Використовували первинні антитіла у робочому розведенні 1:250 для NF- κ B, RANK, RANKL та GR (Santa Cruz Biotechnology, США). Флуоресцентно мічені клітини візуалізували за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина). Для збудження хромофорів використовували лазери з різними довжинами хвиль: для Hoechst 33258 – 405 нм; для флуоресцентних міток DyLight 488 та Alexa Fluor 488 – 488 нм; для флуоресцентних міток Alexa Fluor 546 та Alexa Fluor 568 – 556 нм. Обробка результатів проводилась за допомогою програми Zeiss LSM Image Browser.

Визначення вмісту мРНК CYP27B1, VDR, TNF- α та PPAR- γ проводили методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (RT-qPCR), попередньо виділяючи РНК зі зразків за допомогою Trizol RNA Prep kit (NEOGENE, Україна) для тканини печінки та кісткової тканини або innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena AG, Німеччина) для кісткового мозку. Специфічні послідовності праймерів генерували за допомогою програмного забезпечення Primer BLAST. У якості референсного гену використовували ген гліцеральдегідтрифосфат дегідрогенази (GAPDH). Обрахунок результатів проводили за допомогою $\Delta\Delta C_t$ методу.

Визначення вмісту цільових протеїнів у тканинах проводили методом вестерн-блот аналізу з використанням первинних антитіл у попередньо підібраних оптимальних концентраціях: RANK (1:400), RANKL (1:250), OPG (1:250), VDR (1:200), CYP27B1 (1:200), VEGF (1:500), остеокальцину (1:500), фосфорильованої за Ser 311 субодиноці p65 NF- κ B (1:200), total p65 pNF- κ B (1:250), І κ B (1:500), каспази-3 (1:400), GR (1:250), iNOS (1:1000), 3-нітротирозину (1:2500), PARP-1 (1:1000), poly(ADP-ribose) (1:1000), ламіну B1 (1:1000) та β -актину (1:20000). Електрофоретичне розділення протеїнів проводили у 10-15% поліакриламідному гелі. Імунореактивні сигнали виявляли за допомогою реагентів для посиленої хемілюмінесценції (люмінол, кумарова кислота та пероксид водню, Sigma, США).

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за допомогою Microsoft Excel загальноприйнятими методами варіаційної статистики з вираховуванням середнього арифметичного значення показника (M) та стандартної похибки середнього значення ($\pm m$). Визначення достовірності відмінностей між одержаними величинами двох вибірок проводили за t-критерієм Стьюдента. Вірогідність розходження між групами порівняння визначали методом однофакторного дисперсійного аналізу (one-way Anova) за допомогою Origin v.9.0. Достовірними вважали відмінності між групами при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Характеристика компонентів D-ауто/паракринної системи у тканинах щурів за дії преднізолону та вітаміну D₃. Вміст 25ОНD у сироватці крові за дії преднізолону знижувався майже у 3 рази порівняно з контролем, що свідчить про розвиток стану D-недостатності (рис. 1). Введення вітаміну D₃ на тлі дії преднізолону нормалізувало вміст 25ОНD у сироватці крові піддослідних тварин.

У різних тканинах проведено дослідження експресії компонентів D-ауто/паракринної системи – VDR та CYP27B1, ензиму, що здійснює гідроксилування 25ОНD з утворенням гормонально активної форми 1,25(ОН)₂D. За дії преднізолону у кістковій тканині вміст як мРНК, так і протеїну VDR знижувався у 1,3 та 1,6 рази відповідно, що може свідчити про істотне порушення VDR-опосередкованого сигналювання у чутливих до дії вітаміну D₃ клітинах (рис. 2). Преднізолон підвищував рівень мРНК CYP27B1 у кістковій тканині у 1,7 рази порівняно з контролем, що може пояснюватись компенсаторною реакцією на зниження рівня субстрату 25ОНD для цього ензиму у сироватці крові.

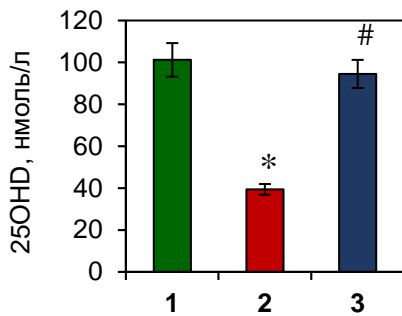


Рис. 1 Вміст 25ОНD у сироватці крові щурів за дії преднізолону та при введенні вітаміну D₃ (M±m, n=10): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D₃; * різниця порівняно з контролем вірогідна (P < 0,05), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна (P < 0,05).

Введення вітаміну D₃ частково відновлювало вміст протеїну VDR у кістковій тканині, водночас достовірно не впливаючи на рівень мРНК, що свідчить про можливий механізм коригувальної дії холекальциферолу на рівні трансляції. Вміст мРНК CYP27B1 компенсаторно знижувався не тільки порівняно з преднізолоновою групою (у 4 рази), але й з контрольною (у 2,4 рази), що може відображати відновлення функціонального стану D-ауто/паракринної системи.

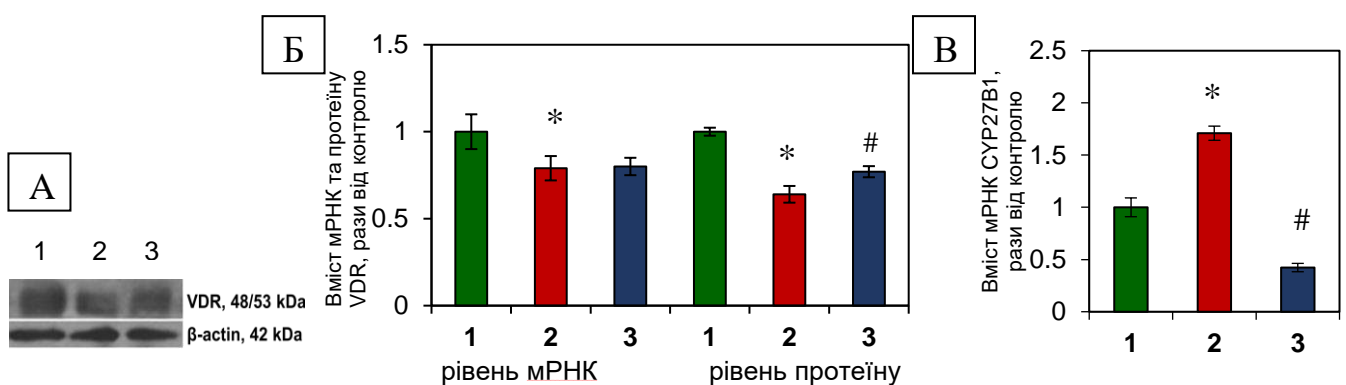


Рис. 2 Відносний вміст VDR та CYP27B1 у кістковій тканині щурів за дії преднізолону та вітаміну D₃, M ± m, n = 7. Імуноблотограма VDR (A) та гістограми вмісту мРНК і протеїну VDR (Б) та мРНК CYP27B1 (В): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D₃. * різниця порівняно з контролем вірогідна (P < 0,05), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна (P < 0,05).

У кістковому мозку за дії преднізолону відбувалось суттєве зниження вмісту як мРНК VDR (у 4,6 рази, рис. 3 Б), так і протеїну CYP27B1 (у 2,1 рази, рис. 3 В). Відповідно, зниження експресії CYP27B1 може обумовлювати гальмування локального синтезу 1,25(OH)₂D та призводити до порушення синтезу остеотропних цитокінів. Виявлено стимулювальний ефект введення вітаміну D₃ на індуковане преднізолоном зниження рівня експресії мРНК VDR та протеїну CYP27B1 (збільшення у 20,0 та 3,2 рази відповідно).

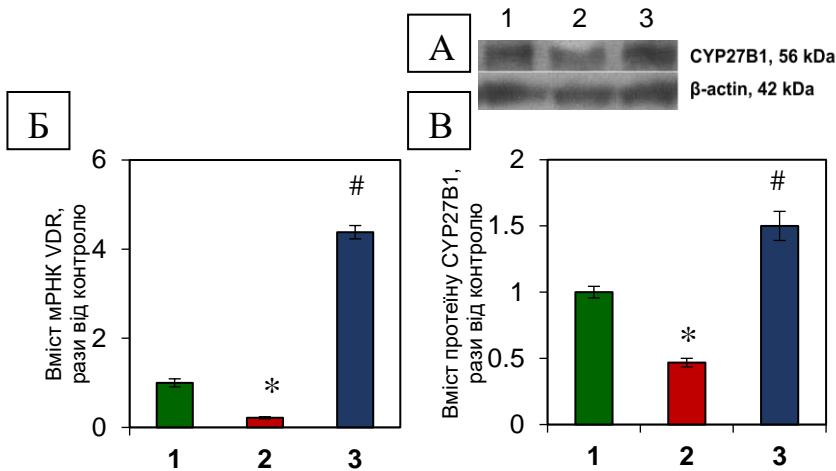


Рис. 3 Відносний вміст VDR та CYP27B1 у кістковому мозку щурів за дії преднізолону та вітаміну D₃, $M \pm m$, $n = 7$. Імуноблотограма CYP27B1 (А) і гістограми вмісту мРНК VDR (Б) та протеїну CYP27B1 (В): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D₃. * різниця порівняно з контролем вірогідна ($P < 0,05$), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна ($P < 0,05$).

У печінці введення преднізолону викликало більш виражене зниження рівня мРНК (у 10,0 разів) та помірне – у 1,2 рази – протеїну VDR у порівнянні з контролем (рис. 4). На тлі відновлення вмісту 25OHD у сироватці крові тварин, які отримували вітамін D₃, рівень VDR підвищувався у порівнянні з дією преднізолону.

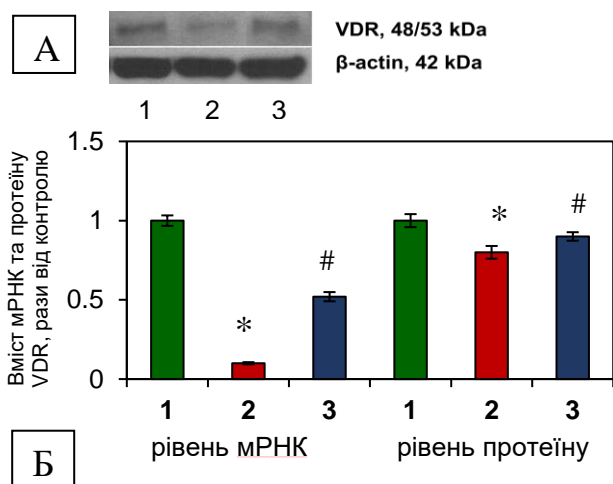


Рис. 4 Відносний вміст VDR у печінці щурів за дії преднізолону та вітаміну D₃, $M \pm m$, $n = 7$. Імуноблотограма VDR (А) та гістограма (Б) вмісту VDR на рівні мРНК та протеїну: 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D₃. * різниця порівняно з контролем вірогідна ($P < 0,05$), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна ($P < 0,05$).

Отже, преднізолон викликає виражені зміни у функціонуванні D-ауто/паракринної системи, не тільки суттєво знижуючи вміст маркера забезпеченості організму вітаміном D – 25OHD, але й порушуючи експресію її ключових

компонентів у різних тканинах. При цьому зниження вмісту 25ОНD у сироватці крові корелювало зі зниженням рівня тканинного VDR. У той час як експресія CYP27B1 у кістковому мозку пригнічувалась за дії ГК, у кістковій тканині спостерігалось зростання, ймовірно компенсаторне, вмісту мРНК CYP27B1. Продемонстровано коригувальний ефект вітаміну D₃ на індуковані преднізолоном порушення експресії VDR та CYP27B1, який був більш виражений у кістковому мозку щурів.

Структурно-функціональні та біохімічні зміни у тканині печінки за дії преднізолону та вітаміну D₃. Одним з побічних ефектів тривалого застосування глюкокортикоїдів є ушкодження тканини печінки, внаслідок чого може порушуватись процес гідроксилування вітаміну D у гепатоцитах щурів.

Визначення ступеня загибелі гепатоцитів проводили на протоковому цитофлуориметрі за кількістю клітин, здатних акумулювати прорідій йодид (PI). Встановлено, що кількість PI-позитивних клітин серед ізольованих гепатоцитів зростала у 1,7 рази за дії преднізолону (рис. 5 А). Відомо, що окрім некротичних клітин, PI-позитивні гепатоцити можуть включати клітини, що перебувають на пізніх стадіях апоптозу. Продемонстровано, що за дії преднізолону рівень маркерного протеїну апоптозу каспази-3 був підвищений у 1,3 рази порівняно з контролем (рис. 5 Б, В). Введення вітаміну D₃ призводило до зменшення кількості як PI-позитивних клітин (у 1,4 рази), так і каспази-3 (у 1,6 разів) порівняно з преднізолоном, що вказує на здатність вітаміну D₃ регулювати процеси некротичної та апоптичної загибелі клітин.

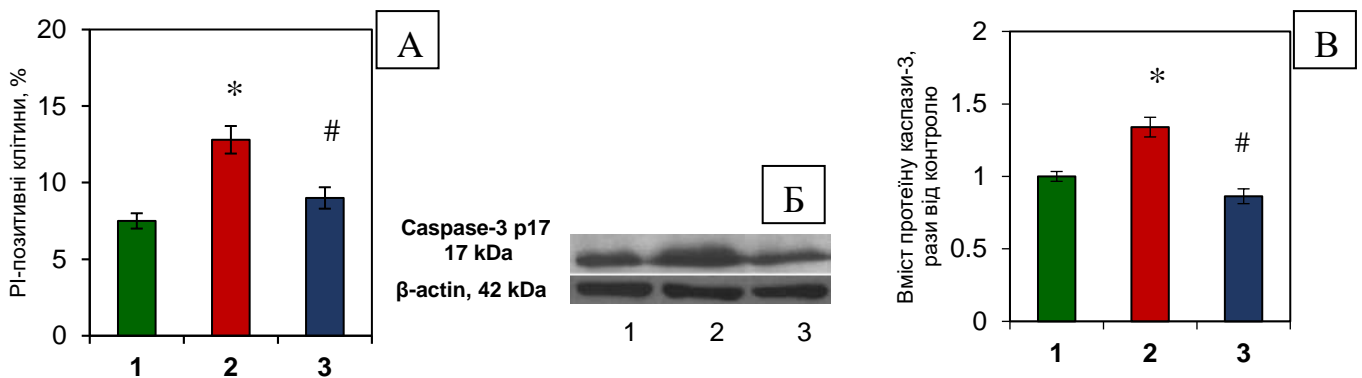


Рис. 5 Загибель клітин печінки за дії преднізолону та вітаміну D₃, $M \pm m$, $n = 7$. Кількісний аналіз цитофлуорограм акумулювання PI (А); імуноблотограма (Б) та гістограма (В) відносного вмісту протеїну каспази-3: 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D₃. * різниця порівняно з контролем вірогідна ($P < 0,05$), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна ($P < 0,05$).

На сьогодні залишаються малоз'ясованими механізми залучення сигнального шляху оксиду азоту (NO) у розвиток порушень функціонування печінки, асоційованих з довготривалим введенням преднізолону. Інтенсивність продукування NO клітинами печінки вимірювали за допомогою флуоресцентного зонду – DAF-2DA. Введення преднізолону призводило до збільшення утворення NO в

ізолюваних гепатоцитах у 1,9 разів порівняно з контролем (рис. 6). Відомо, що NO може взаємодіяти з супероксид аніон-радикалами з утворенням високореактивної сполуки – пероксинітриту, який модифікує протеїни за залишками тирозину, тому вміст 3-нітротирозину розглядається як специфічний маркер розвитку оксидативно-нітрозативного стресу [Reiniers M. et al., 2014]. Показано, що за дії ГК підвищувався рівень нітрозильованих протеїнів в 1,6 рази порівняно з контролем (рис. 7 Б, В).

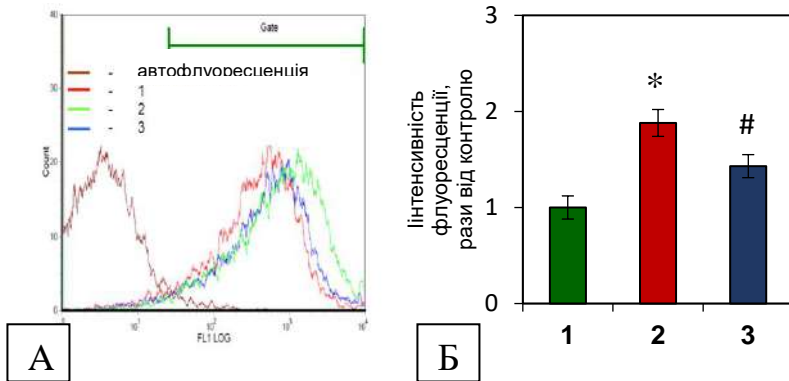


Рис. 6 Цитофлуорограми (А) утворення NO в гепатоцитах за дії преднізолону та вітаміну D₃ та їх кількісний аналіз (Б): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D₃. М ± m, n = 7, * різниця порівняно з контролем вірогідна (P < 0,05), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна (P < 0,05).

Посилення утворення NO та зростання рівня нітрозильованих протеїнів можуть бути пов'язані, ймовірно, з виявленим нами підвищенням у 1,4 рази експресії iNOS у печінці (рис. 7 А, В). Введення вітаміну D₃ нормалізувало вміст iNOS, що виявлялось також у зниженні продукування NO та нітрозильованих протеїнів.

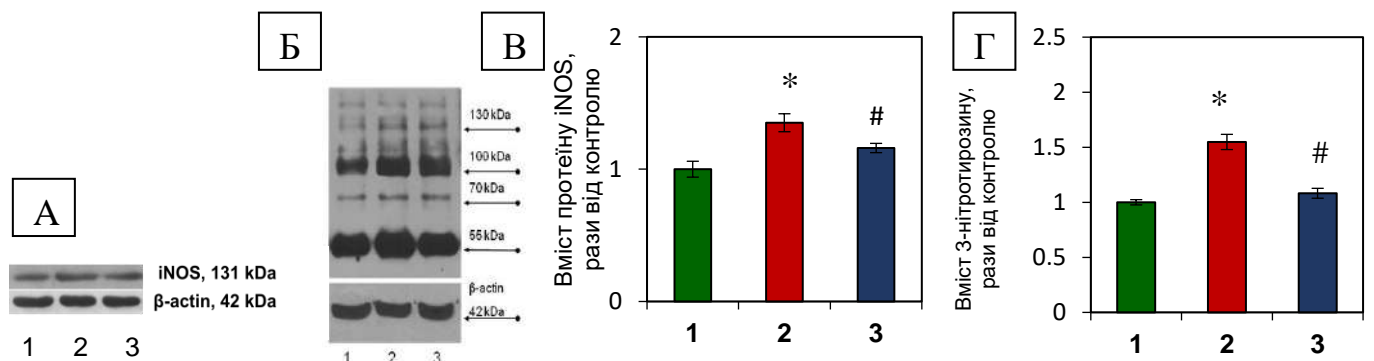


Рис. 7 Відносний вміст iNOS та 3-нітротирозину у печінці щурів за дії преднізолону та вітаміну D₃, М ± m, n = 7. Імуноблоти та гістограми вмісту iNOS (А, В) та нітрозильованих протеїнів (Б, Г): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D₃. * різниця порівняно з контролем вірогідна (P < 0,05), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна (P < 0,05).

Оскільки експресія iNOS може індукуватись NF-κB та зважаючи на провідну роль процесу фосфорильовання у транскрипційному активуванні NF-κB, було визначено рівень фосфорильованої за Ser 311 субодиниці p65 NF-κB та виявлено, що введення ГК викликало значне підвищення її вмісту у печінці – як у загальних лізатах (у 2,2 рази), так і у ядерній фракції (в 1,8 рази) у порівнянні з контролем (рис. 8 Б, В). Преднізолон індукував зниження у 1,4 рази рівня ІκВ у печінці

порівняно з контролем (рис. 8 Г), що свідчить про вивільнення NF-κB p65 з інгібіторного комплексу та транслокацію його до ядра, де він може зв'язуватись з сайтами промоторів специфічних генів та індукувати їх транскрипцію, в тому числі, і iNOS.

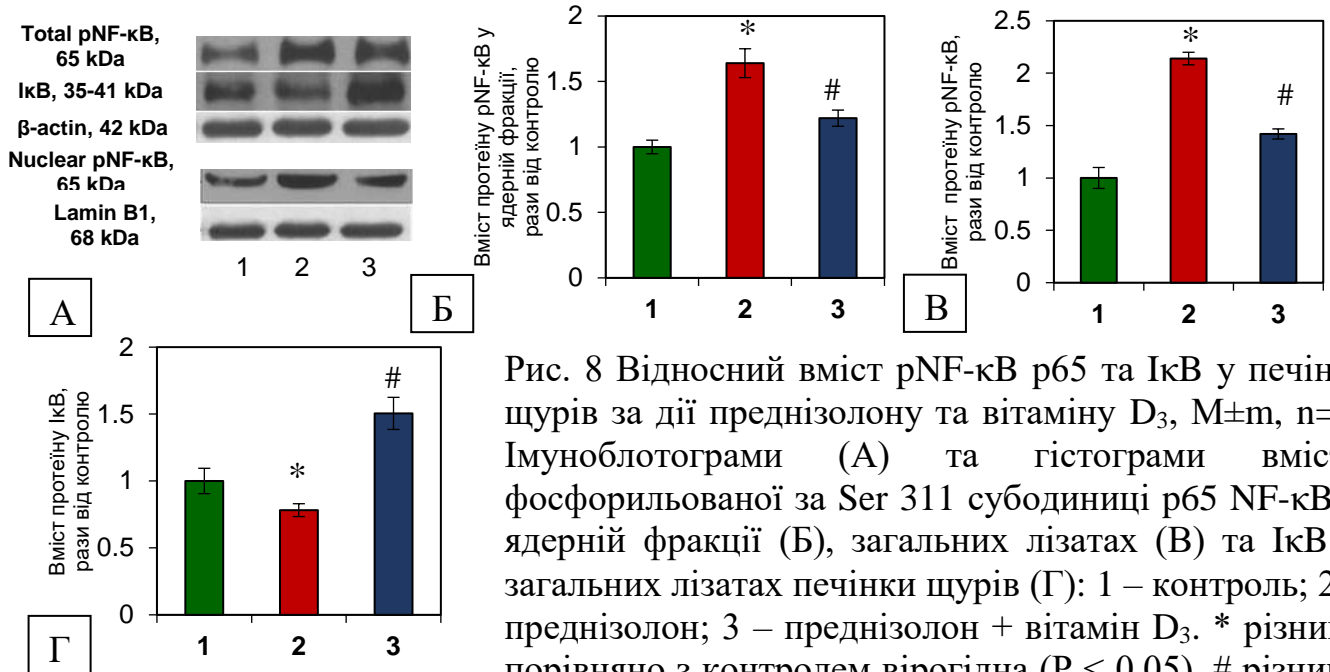


Рис. 8 Відносний вміст рNF-κB p65 та IκB у печінці щурів за дії преднізолону та вітаміну D₃, M±m, n=7. Імуноблоти (А) та гістограми вмісту фосфорильованої за Ser 311 субодиниці p65 NF-κB у ядерній фракції (Б), загальних лізатах (В) та IκB у загальних лізатах печінки щурів (Г): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D₃. * різниця порівняно з контролем вірогідна (P < 0,05), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна (P < 0,05).

Введення вітаміну D₃ за дії преднізолону призводило до зниження вмісту NF-κB p65 та фосфорильованої субодиниці p65 як у загальних лізатах (у 1,3 рази), так і у ядерній фракції (у 1,3 рази) у порівнянні з дією преднізолону. Зважаючи на зростання вмісту IκB вдвічі порівняно з преднізолоновою групою, ці дані свідчать про інгібувальний ефект вітаміну D₃ на ГК-індуковану транслокацію NF-κB до ядра.

Розвиток остеопорозу за тривалого введення преднізолону та роль вітаміну D₃ у його коригуванні. Для підтвердження розвитку порушень структурно-функціонального стану кісткової тканини за введення ГК було визначено біомеханічні параметри стегнової кістки методом «3-х точкового прогинання» та виявлено, що преднізолон знижував у 1,2 рази максимальне навантаження на злам та у 1,3 рази міцність та жорсткість стегнової кістки (табл. 1), що може виявлятися у підвищеній ламкості кісток. Введення вітаміну D₃ призвело до поліпшення параметру жорсткості на 42% та збільшення максимального навантаження на 11% порівняно з введенням преднізолону.

Для виявлення патологічних змін у органічному матриці кісткової тканини було досліджено вміст остеокальцину – маркерного протеїну процесу остеосинтезу (рис. 9). Показано, що тривале введення преднізолону викликало зниження його вмісту у 1,4 рази порівняно з контролем, що відображає порушення процесу формування кісткової тканини. Свідченням покращення метаболічних процесів у

кістковій тканині за введення вітаміну D₃ на тлі дії преднізолону є підвищення експресії остеокальцину до рівня контролю, що цілком узгоджується з даними літератури щодо безпосереднього контролювання гену остеокальцину гормонально активною формою 1,25(OH)₂D через VDR.

Таблиця 1. Біомеханічні параметри стегнової кістки щурів за дії преднізолону та при введенні вітаміну D₃, M±m, n = 5

Досліджувані показники	Контроль	Преднізолон	Преднізолон + D ₃
Максимальне навантаження на злам стегнової кістки (Н)	99,9±5,6	81,2±2,3*	89,7±3,8 [#]
Міцність (Н/мм ²)	355,4±10,9	267,2±10,5*	272,8±7,9
Жорсткість (мДж)	58,3±0,8	43,7±1,2*	62,1±1,4 [#]

* різниця порівняно з контролем вірогідна (P < 0,05), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна (P < 0,05).

Отже, ефект введення вітаміну D₃ за ГК терапії виявляється у частковому нормалізуванні біомеханічних параметрів стегнової кістки та відновленні вмісту молекулярних маркерів остеосинтезу (остеокальцину та VDR).

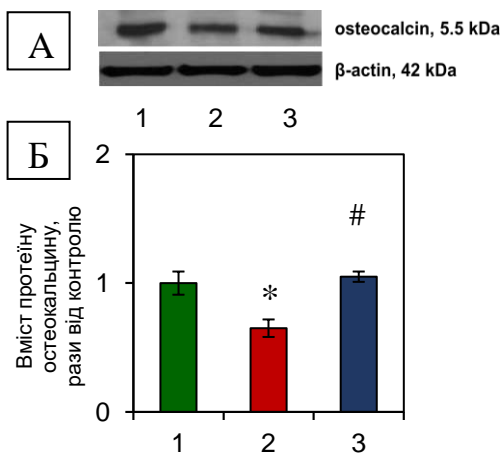


Рис. 9 Імуноблотограма (А) та гістограма (Б) відносного вмісту остеокальцину у кістковій тканині за дії преднізолону та вітаміну D₃, M ± m, n = 7: 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D₃. * різниця порівняно з контролем вірогідна (P < 0,05), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна (P < 0,05).

Дія преднізолону та вітаміну D₃ на компоненти ключового сигнального шляху ремоделювання кісткової тканини RANKL/RANK/OPG. Провідна роль у контролюванні резорбції належить цитокіновій системі RANKL/RANK/OPG. Проте залишається не висвітленим питання яким чином недостатність вітаміну D і порушення процесу ремоделювання кісткової тканини пов'язані зі змінами експресії компонентів RANKL/RANK/OPG у кістковому мозку та кістковій тканині за ГЮ.

Оцінка пулу попередників остеокластів у селезінці, периферичній крові та кістковому мозку щурів. При підрахунку RANK-позитивних клітин кісткового мозку на протоковому цитофлуориметрі було виявлено збільшення їх кількості у 1,7 рази за дії преднізолону порівняно з контрольними щурами (рис. 10 А, Б). Також ці

дані були підтверджені за допомогою конфокальної мікроскопії (рис. 10 В). Більше того, серед моноцитів селезінки та периферичної крові щурів виявлено зростання кількості RANK-позитивних клітин у 1,5 та 3,9 разів відповідно (табл. 2).

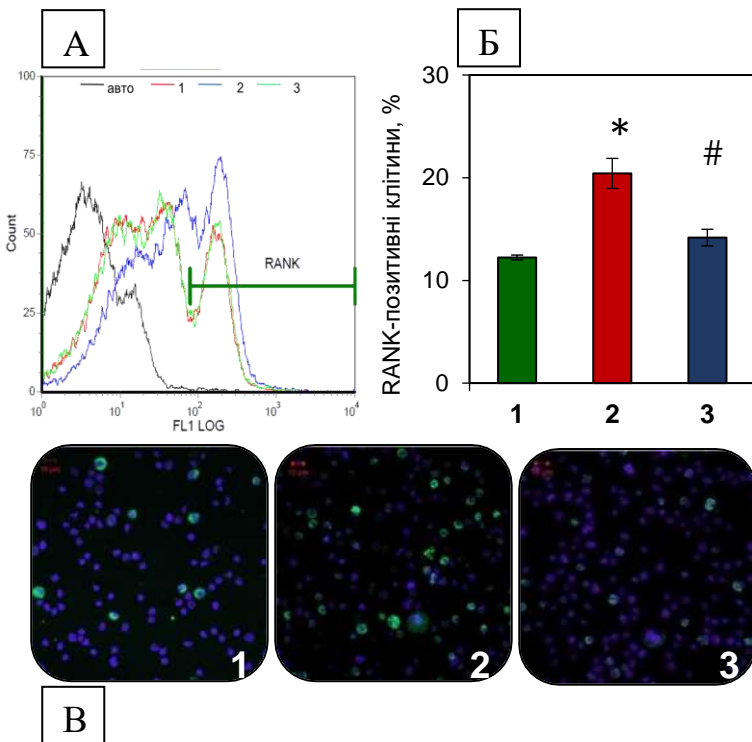


Рис. 10 Кількість RANK-позитивних клітин кісткового мозку щурів за дії преднізолону та вітаміну D₃, $M \pm m$, $n = 7$. Цитофлуорограми (А) (count – кількість подій; FL1 LOG – інтенсивність флуоресценції), їх кількісний аналіз (Б) та знімки (В) преостеокластів (конфокальна мікроскопія, метод непрямого імунофлуоресцентного мічення клітин, RANK – зелений канал; ядра клітин – синій канал, збільшення 400x): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D₃. * різниця порівняно з контролем вірогідна ($P < 0,05$), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна ($P < 0,05$).

Таблиця 2. RANK-позитивні клітини селезінки та периферичної крові щурів за дії преднізолону та вітаміну D₃, $M \pm m$, $n = 7$

Групи	Контроль	Преднізолон	Преднізолон + D ₃
RANK ⁺ клітини селезінки (%)	3,60±0,12	4,53±0,50*	2,36±0,19#
RANK ⁺ клітини периферичної крові (%)	1,14±0,05	4,08±0,92*	1,87±0,09#

* різниця порівняно з контролем вірогідна ($P < 0,05$), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна ($P < 0,05$).

Введення холекальциферолу зменшувало пул циркулюючих попередників остеокластів майже до контрольного рівня у кістковому мозку та периферичної крові. Ефект зменшення кількості RANK-позитивних клітин до рівня, навіть нижчого за контроль, спостерігався у селезінці, що свідчить про коригування ГІО, адже відомо, що селезінка виступає у ролі депо преостеокластів тільки за умов хронізації патологічних процесів. Такий ефект холекальциферолу може бути обумовлений його здатністю виступати в якості регулятора клітинного циклу та знімати «арешт» клітинного циклу RANK-позитивних попередників остеокластів, що може переключати їх диференціювання з остеокластного напрямку у дендритні клітини. Отримані дані свідчать про можливе порушення RANK-опосередкованого

регулювання дозрівання попередників остеокластів та збільшення їх циркулюючого пулу за умов тривалого введення ГК. Виявлений коригувальний ефект холекальциферолу надає можливість обґрунтувати доцільність застосування вітаміну D₃ як потенційного модулятора пулу циркулюючих преостеокластів.

Стан цитокінової системи RANKL/RANK/OPG у кістковому мозку та кістковій тканині щурів. Виявлено, що вміст RANKL у кістковому мозку за дії преднізолону зростав у 4,1 рази на рівні мРНК та у 1,3 рази на рівні протеїну, у той час як вміст OPG знижувався у 1,3 рази порівняно з контролем (рис. 11 В, Г). Вміст протеїну RANK, маркеру гемопоетичних попередників остеобластів, у кістковому мозку за дії преднізолону зростав у 1,5 рази порівняно з контролем (рис. 11 Б), що корелювало з продемонстрованим нами раніше збільшенням кількості преостеокластів у кістковому мозку. За умов одночасного введення преднізолону та вітаміну D₃ спостерігалось зниження мРНК та протеїну RANKL у 2 та 3 рази відповідно порівняно з дією преднізолону, а вміст RANK знижувався до рівня контролю, що вказує на здатність вітаміну D₃ пригнічувати посилене диференціювання попередників остеокластів за дії преднізолону.

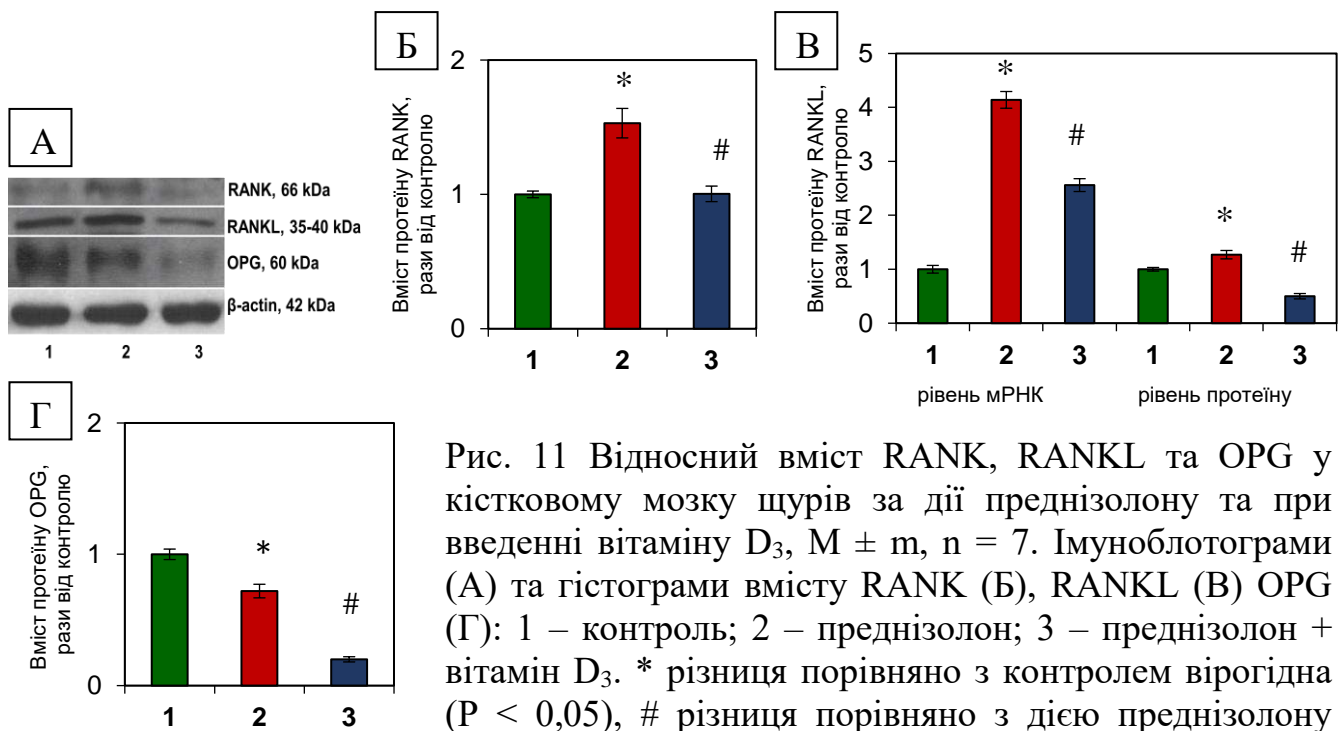


Рис. 11 Відносний вміст RANK, RANKL та OPG у кістковому мозку щурів за дії преднізолону та при введенні вітаміну D₃, $M \pm m$, $n = 7$. Імуноблоти (А) та гістограми вмісту RANK (Б), RANKL (В) OPG (Г): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D₃. * різниця порівняно з контролем вірогідна ($P < 0,05$), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна ($P < 0,05$).

ГК-індуковане зростання рівнів RANKL та RANK було проілюстровано знімками позитивних за RANKL та RANK клітин кісткового мозку (рис. 12 А). На основі сканування поодиноких клітин з кроком 0,32 мкм та отриманих серій знімків побудовано 3D-модель, що ілюструє посилене зв'язування RANK-позитивними клітинами ліганду RANKL за дії преднізолону (рис. 12 Б) порівняно з контрольною групою та з групою, що отримувала сумісно преднізолон та вітамін D₃.

Отже, на фоні індукованого преднізолоном зниженого рівня 25ОНD було виявлено значне порушення співвідношення компонентів системи

RANKL/RANK/OPG: на тлі зменшеного рівня OPG спостерігалось зростання вмісту RANKL та його збільшена взаємодія з RANK, що може призводити до посилення диференціювання преостеокластів у кістковому мозку. Введення холекальциферолу частково нормалізувало вміст RANKL та RANK, проте призводило до подальшого падіння рівня OPG.

У кістковій тканині введення тваринам преднізолону призвело до зниження рівня OPG у 1,3 рази порівняно з контрольними щурами, не викликаючи при цьому істотного підвищення вмісту RANKL (рис. 13). Це викликало зменшення співвідношення OPG/RANKL у 1,5 рази порівняно з контролем, що свідчить про ГК-індуковане порушення процесу ремоделювання. При введенні вітаміну D₃ спостерігалось зростання вмісту OPG у 1,2 рази й зниження вмісту RANKL у 1,2 рази порівняно з їх вмістом за дії преднізолону (рис. 13 В, Г), що виявлялось у майже повному відновленні співвідношення OPG/RANKL, яке було вище у 1,4 рази порівняно з дією преднізолону.

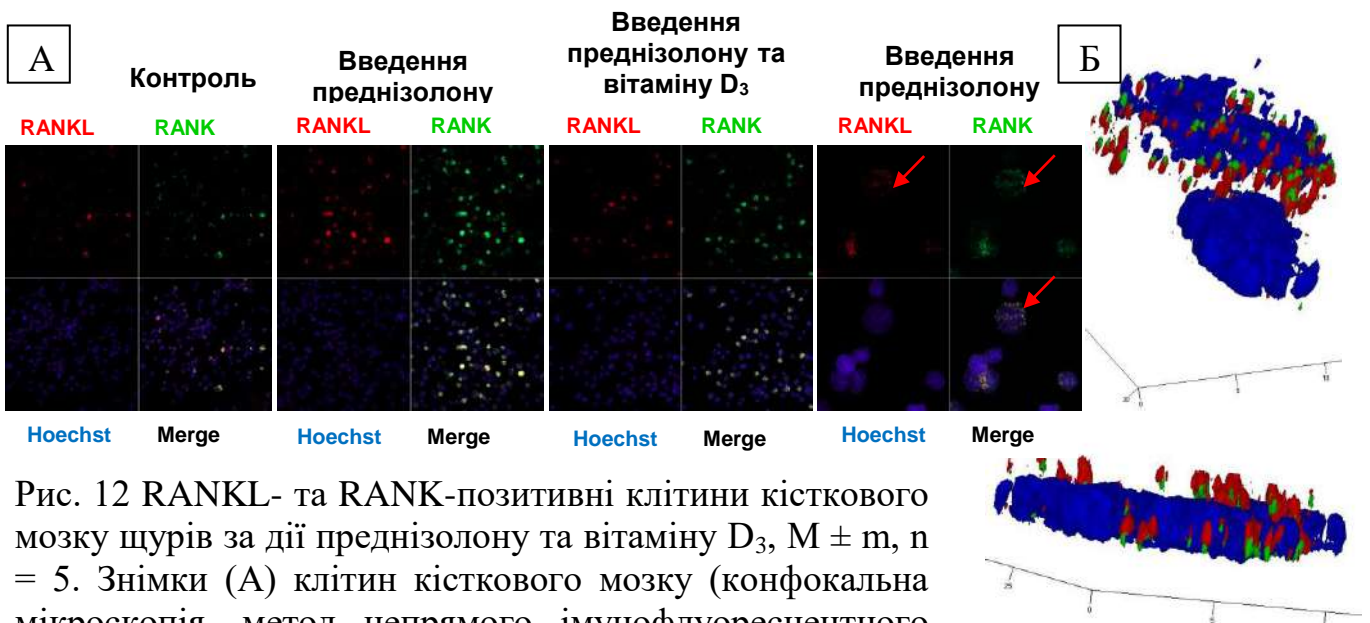


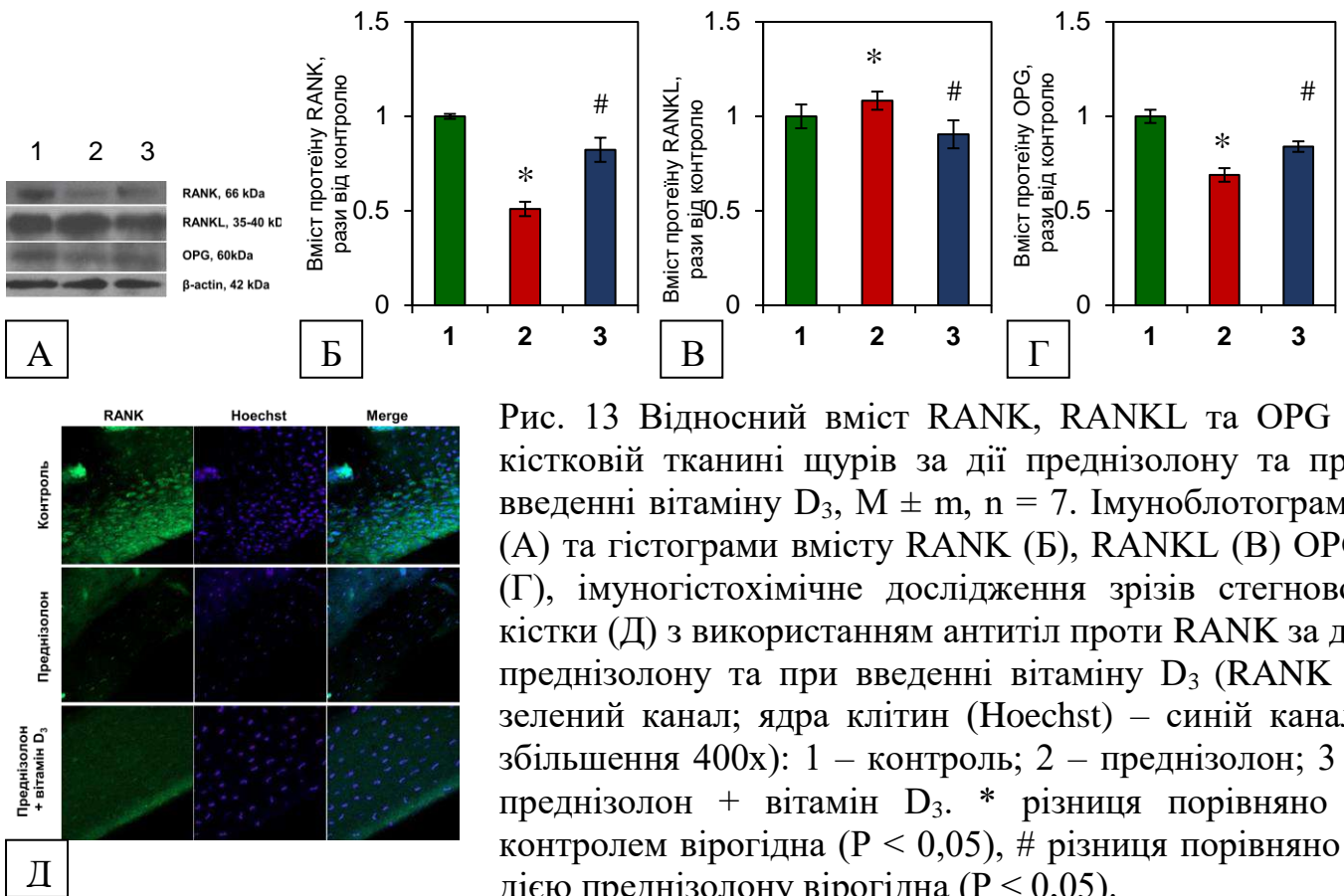
Рис. 12 RANKL- та RANK-позитивні клітини кісткового мозку щурів за дії преднізолону та вітаміну D₃, $M \pm m$, $n = 5$. Знімки (А) клітин кісткового мозку (конфокальна мікроскопія, метод непрямого імуофлуоресцентного мічення, збільшення 400х) та 3D-модель, яка ілюструє

зв'язування RANK-позитивними клітинами ліганду RANKL за дії преднізолону (збільшення 1000х) (Б). RANK – зелений канал; RANKL – червоний канал, ядра клітин (Hoechst) – синій канал; merge – накладання флуоресценції за трьома каналами.

За дії преднізолону рівень RANK знижувався у 1,5 рази відносно контролю (рис. 13 Б), що, вірогідно, відображає гальмування інтенсивності остеокластогенезу на даному етапі розвитку ГЮ. Отримані дані узгоджуються з висунутою концепцією щодо дії ГК на кісткову тканину [Kim H., 2010], яка говорить про те, що їх прийом пригнічує функціонування як остеобластів, що підтверджується показаним нами падінням вмісту VDR, OPG та остеокальцину, так і остеокластів. А отже, порушується нормальний перебіг процесу ремоделювання в цілому, що веде до зменшення утворення нової кісткової тканини та до розвитку остеопенії.

Введення тваринам вітаміну D₃ за дії преднізолону призводило до збільшення вмісту RANK у 1,6 рази порівняно з контролем. Ці дані були підтверджені знімками з конфокального мікроскопу, отриманими після імуногістохімічного мічення зрізів стегнової кістки з використанням антитіл проти RANK (рис. 13 Д).

Отримані результати продемонстрували, що порушення в остеокіновій системі RANKL/RANK/OPG на тлі порушень метаболізму вітаміну D можуть обумовлювати втрату маси кісткової тканини за тривалого введення ГК. Введення преднізолону індукувало збільшення пулу преостеокластів у кістковому мозку, крові та селезінці, в той час як у кістковій тканині, навпаки, спостерігалось зниження кількості зрілих остеокластів. Вітамін D₃ здатний нормалізувати виявлені порушення ремоделювання кісткової тканини через VDR-опосередкований вплив на клітини кісткової тканини та їх попередники, зміщуючи остеобласт/остеокластне співвідношення в бік посилення остеосинтезу та гальмування процесу резорбції.



Транскрипційний фактор NF-κB як регуляторна ланка для RANK-, VDR- та GR-опосередкованих сигнальних шляхів за глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу та при дії вітаміну D₃. Процес формування остеокластів потребує залучення сигналювання через ядерний фактор каппа В (NF-κB), що активується у відповідь на основні «остеокластогенні» цитокіни, зокрема RANKL та M-CSF 1.

Оцінка транскрипційного активування NF-κB у кістковому мозку щурів. Виявлено, що відносний вміст як загальної, так і фосфорильованої за Ser 311

субодиниці p65 NF-κB у кістковому мозку за дії преднізолону зростав у 1,6 та 1,5 разів відповідно (рис. 14 Б, В), у той час як відносний вміст ІκB знижувався у 1,2 рази порівняно з контролем (рис. 14 Г). Беручи до уваги ключову роль процесу фосфорилування у транскрипційному активуванні NF-κB, було визначено також рівні pNF-κB p65 у ядерній та цитоплазматичній фракціях та виявлено їх збільшення у 1,8 та 1,3 рази відповідно (рис. 15), що свідчить про посилення ядерної транслокації NF-κB за дії ГК.

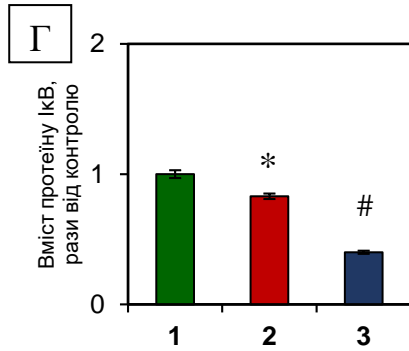
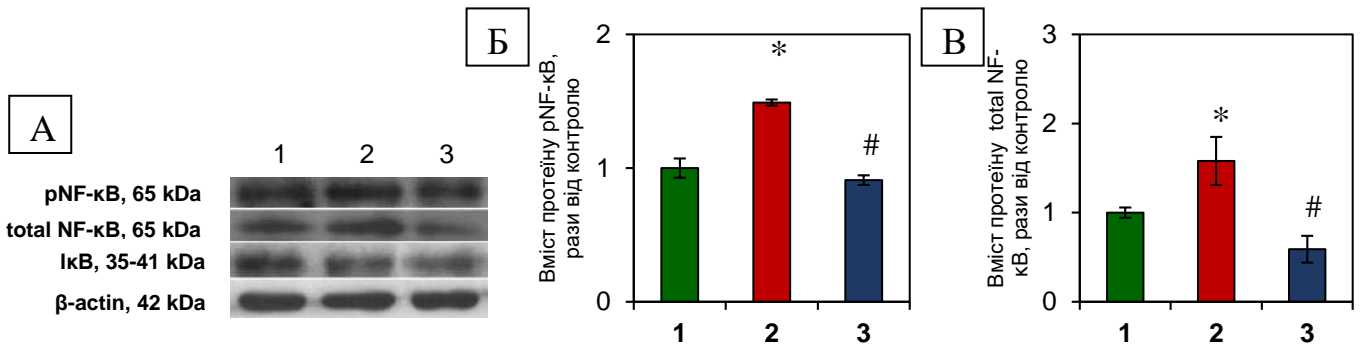


Рис. 14 Відносний вміст NF-κB та ІκB у загальних лізатах кісткового мозку щурів за дії преднізолону та при введенні вітаміну D₃, M ± m, n = 7. Імуноблоти (А) та гістограми вмісту фосфорильованої за Ser 311 субодиниці p65 NF-κB (Б), загальної p65 NF-κB (В) та ІκB (Г): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D₃. * різниця порівняно з контролем вірогідна (P < 0,05), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна (P < 0,05).

На основі сканування NF-κB-позитивних клітин кісткового мозку побудовано 3D-модель транслокації NF-κB до ядра за дії преднізолону, в той час як у контролі та при введенні вітаміну D₃ NF-κB був дифузно розподілений у цитоплазмі (позначено червоними стрілками на рис. 16).

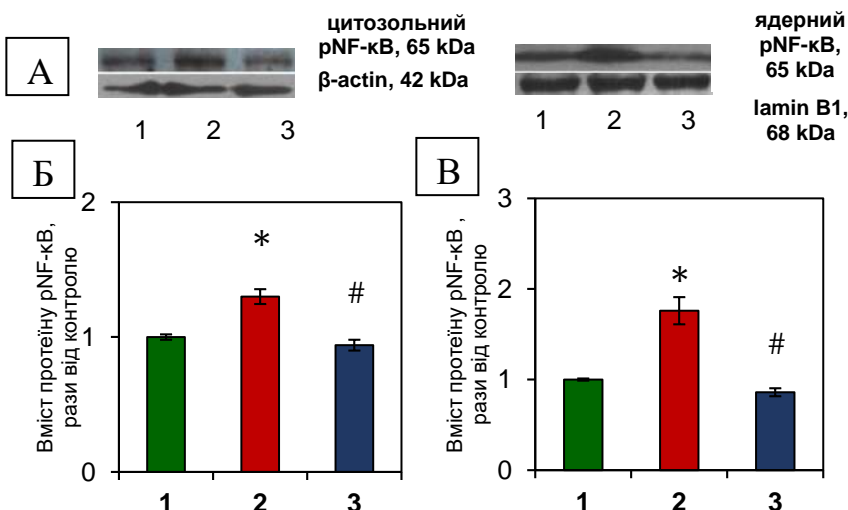


Рис. 15 Відносний вміст pNF-κB у фракціях кісткового мозку щурів за дії преднізолону та при введенні вітаміну D₃, M ± m, n = 7. Імуноблоти (А) та гістограми вмісту pNF-κB p65 у цитоплазматичній (Б) та ядерній фракціях (В): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D₃. * різниця порівняно з контролем вірогідна (P < 0,05), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна (P < 0,05).

При введенні вітаміну D₃ на тлі дії преднізолону відбувалось нормалізування відносного вмісту pNF-κB p65 як у загальній, так і у ядерній та цитоплазматичній фракціях до рівня, що спостерігався у кістковому мозку контрольних щурів, а також зниження відносного вмісту NF-κB p65 та IκB порівняно не тільки з введенням преднізолону, але й з контрольною групою.

Отже, показано, що вітамін D₃ здатний інгібувати індуковане преднізолоном фосфорилування та активування сигнального каскаду NF-κB у клітинах кісткового мозку щурів, відновлюючи узгодженість процесів остеосинтезу та резорбції кісткової тканини.

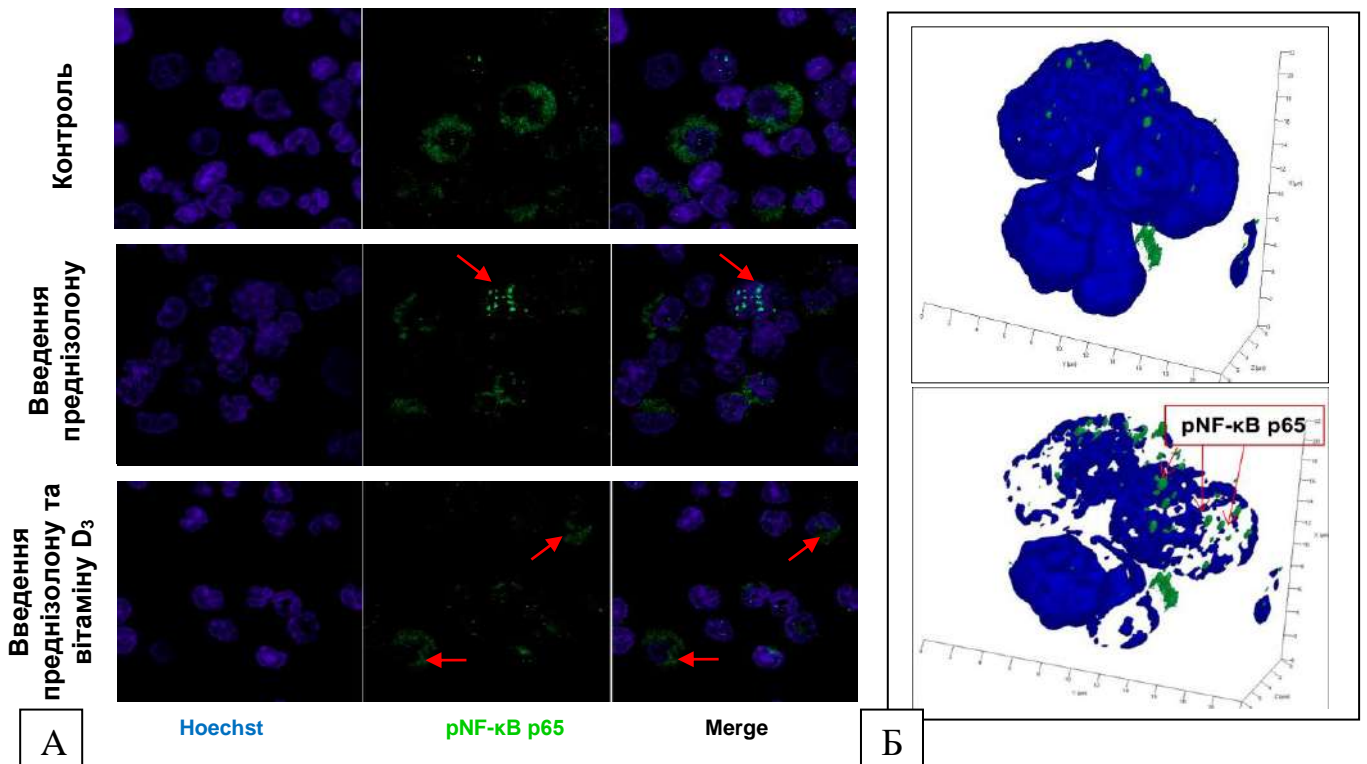


Рис. 16 pNF-κB-позитивні клітини кісткового мозку щурів за дії преднізолону та вітаміну D₃, $M \pm m$, $n=3$. Знімки (А) клітин кісткового мозку (конфокальна мікроскопія, метод непрямого імуофлуоресцентного мічення клітин, збільшення 400x) та 3D-модель (Б) транслокації pNF-κB p65 до ядра клітин кісткового мозку за дії преднізолону (збільшення 1000x). pNF-κB p65 – зелений канал; ядра клітин (Hoechst) – синій канал; merge – накладання флуоресценції.

З огляду на те, що NF-κB є редокс-чутливим фактором, а його активування може бути відповіддю на оксидативно-нітрозативний стрес, було досліджено рівень продукування клітинами кісткового мозку NO та виявлено, що преднізолон не впливав на генерування NO в мононуклеарах кісткового мозку (рис. 17 А, Б), що також було підтверджено відсутністю змін вмісту 3-нітротирозину (рис. 17 В, Г). Введення вітаміну D₃ на тлі дії преднізолону спричинювало посилення утворення NO у 2,5 рази та зростання нітрозилування протеїнів у 2,4 рази порівняно з дією преднізолону. Оскільки відомо, що високі концентрації NO інгібують формування

та активування остеокластів, індукуючи NO-опосередкований апоптоз їх попередників [van't Hof R. et al., 2001], можна припустити, що один з механізмів гальмування резорбції кісткової тканини за введення холекальциферолу полягає саме у стимуляції продукування NO і, як наслідок, індукування апоптозу преостеокластів.

Отже, за дії преднізолону показано транскрипційне активування NF-κB у клітинах кісткового мозку. Активні форми азоту не задіяні у ГК-індукованому активуванні NF-κB, тому процес його транслокації до ядра відбувається, ймовірно, лише у відповідь на зв'язування RANKL з RANK. Вітамін D₃ пригнічує індуковане преднізолоном надмірне активування NF-κB та стимулює NO-індукований апоптоз попередників остеокластів у кістковому мозку.

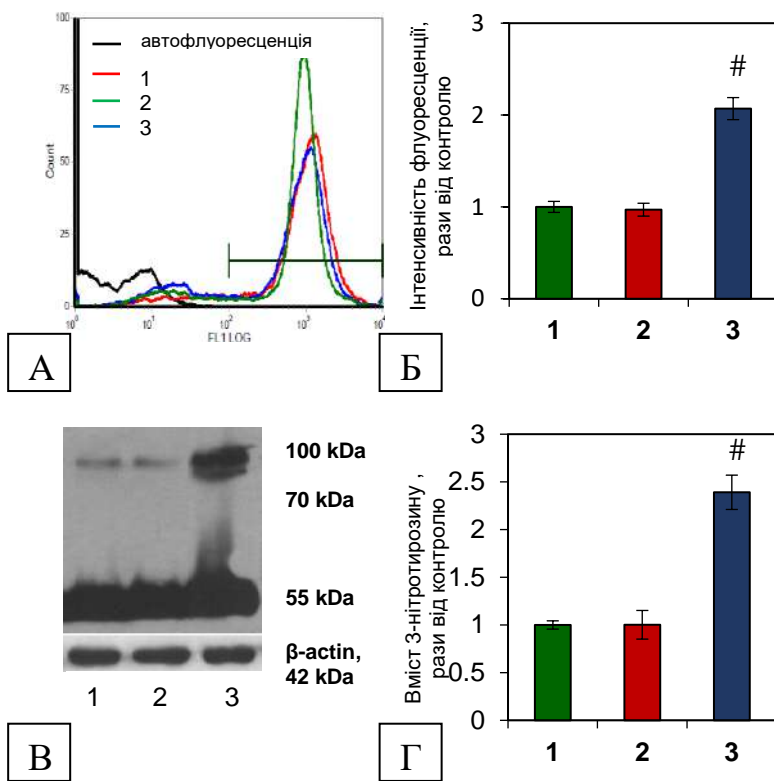


Рис. 17 Продукування NO мононуклеарами кісткового мозку з зондом DAF-2DA та відносний вміст 3-нітротирозиу за дії преднізолону та вітаміну D₃, M±m, n=7. Цитофлуорограми (А) утворення оксиду азоту мононуклеарами кісткового мозку (count – кількість подій; FL1LOG – інтенсивність флуоресценції), кількісний аналіз цитофлуорограм (Б), імуноблотограми (В) та гістограми вмісту нітрованих протеїнів (Г): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D₃. * різниця порівняно з контролем вірогідна (P < 0,05), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна (P < 0,05).

NF-κB/IκB у кістковій тканині щурів. Встановлено, що вміст pNF-κB p65 за дії преднізолону знижувався у 1,6 рази порівняно з контролем (рис. 18 В), що цілком узгоджується з попередньо отриманими нами даними щодо недостатності сигналювання через RANK у кістковій тканині. Пригнічення активування NF-κB підтверджується також зростанням у 1,4 рази вмісту IκB (рис. 18 Г). Введення вітаміну D₃ за дії ГК підвищувало рівень pNF-κB p65 у 1,5 рази порівняно з дією преднізолону, а також відновлювало рівень IκB до контрольних значень.

Таким чином, було виявлено ГК-індуковане пригнічення активування NF-κB у кістковій тканині, в той час як вітамін D₃ здійснював коригувальний вплив на порушені внаслідок хронічного введення преднізолону NF-κB-асоційовані сигнальні каскади, відновлюючи рівень IκB та запобігаючи фосфорилуванню NF-κB p65.

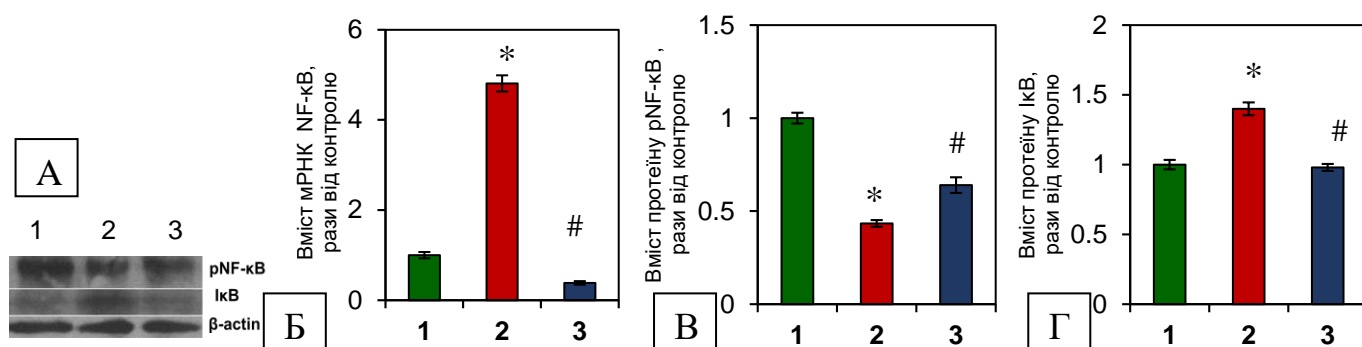


Рис. 18 Відносний вміст NF-κB та IκB у кістковій тканині щурів за дії преднізолону та при введенні вітаміну D₃, M±m, n=7. Імуноблоти (А) та гістограми вмісту мРНК NF-κB (Б), фосфорильованої за Ser 311 субодиниці p65 NF-κB (В) та IκB (Г): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D₃. * різниця порівняно з контролем вірогідна (P < 0,05), # різниця порівняно з дією преднізолону вірогідна (P < 0,05).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше показано зв'язок між дефіцитом вітаміну D₃ в організмі та тканиннспецифічними порушеннями NF-κB-залежних сигнальних шляхів за преднізолон-індукованого остеопорозу. Продемонстровано здатність вітаміну D₃ регулювати вміст компонентів систем RANKL/RANK/OPG та NF-κB/IκB, що обґрунтовує доцільність використання холекальциферолу у супровідній терапії з метою нормалізування перебігу процесів остеосинтезу та резорбції кісткової тканини за тривалої терапії глюкокортикоїдами.

1. Показано, що введення преднізолону призводило до розвитку глибокої D-вітамінної недостатності (за рівнем 25ОНD у сироватці крові), викликаній порушеннями метаболізму холекальциферолу. Дослідження компонентів D-ауто/паракринної системи виявили, що на тлі зниження вмісту VDR у кістковій тканині, кістковому мозку та печінці спостерігались ГК-індуковані тканиннспецифічні порушення синтезу CYP27B1: зниження вмісту протеїну CYP27B1 у кістковому мозку та збільшення експресії мРНК у кістковій тканині.

2. Встановлено, що преднізолон-індуковані порушення метаболізму холекальциферолу обумовлюються гепатотоксичною дією ГК. Індуковане активними формами кисню активування NF-κB вело до підвищення рівня продукування NO, збільшення рівня нітрозилування протеїнів (за рівнем 3-нітротирозину) та посилення некротичної (за кількістю PI-позитивних клітин) та апоптотичної (за вмістом каспази-3) загибелі гепатоцитів.

3. Продемонстровано коригувальний ефект вітаміну D₃ на вміст 25ОНD у сироватці крові та на індуковані преднізолоном порушення експресії VDR та CYP27B1 у різних тканинах. Введення вітаміну D₃ за дії преднізолону зменшувало вміст маркерів оксидативно-нітрозативного стресу шляхом VDR-опосередкованого інгібування NF-κB, що корелювало зі зниженням загибелі гепатоцитів.

4. Встановлено, що ГК-індукований D-дефіцит та порушення метаболізму холекальциферолу сприяли розвитку гіпокальціємії, гіпофосфатемії та зростанню активності лужної фосфатази. Порушення мінерального обміну супроводжувалось зниженням біомеханічних параметрів стегнової кістки та зменшенням вмісту маркерів остеосинтезу (остеокальцину та VDR) у кістковій тканині, що свідчить про розвиток остеопорозу.

5. У кістковому мозку, периферичній крові та селезінці введення преднізолону збільшувало кількість циркулюючих RANK-позитивних преостеокластів. На тлі зменшеного рівня GR та OPG спостерігалось ГК-індуковане збільшення вмісту RANKL та його комплексів з RANK, що супроводжувалось фосфорилюванням та транскрипційним активуванням NF-κB p65 у клітинах кісткового мозку.

6. У кістковій тканині виявлено зменшення співвідношення OPG/RANKL та вмісту RANK за дії преднізолону, що свідчить про порушення процесу ремоделювання кісткової тканини. ГК-індуковане підвищення вмісту ІκВ та зменшення рівня NF-κB призводило до гальмування процесу остеосинтезу.

7. Продемонстровано здатність вітаміну D₃ зменшувати пул преостеокластів, частково нормалізувати вміст RANKL та RANK, інгібувати індуковане преднізолоном активування NF-κB p65 внаслідок посилення експресії протеїну GR та стимулювати NO-індукований апоптоз попередників остеокластів у кістковому мозку. У кістковій тканині введення холекальциферолу нормалізувало ГК-індуковані порушення експресії компонентів систем RANKL/RANK/OPG та NF-κB/ІκВ, відновлюючи узгодженість між процесами остеосинтезу та резорбції.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Шиманський І.О., Хоменко А.В., Лісаковська О.О., Лабудзинський Д.О., Апуховська Л.І., Великий М.М. АФК-генеруюча та антиоксидантна системи печінки щурів за дії преднізолону та вітаміну D₃ // Ukr. Biochem. J., 2014, 86 (5): 111-125 (*Особистий внесок – робота з експериментальними тваринами, пробопідготовка зразків, визначення інтенсивності генерування АФК гепатоцитами, активності NAD(P)H-хінон-оксидоредуктази, статистична обробка результатів*).
2. Shymanskyu I.O., Lisakovska O.O., Mazanova A.O., Riasniy V.M., Veliky M.M. Effects of vitamin D₃ and vitamin E on prednisolone-induced alterations of phagocyte function // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci., 2016, 20 (7): 1379-1383 (*Особистий внесок здобувача – робота з експериментальними тваринами, визначення рівня інтенсивності генерування АФК нейтрофілами, підготовка матеріалів до друку*).
3. Shymanskyu I.O., Lisakovska O.O., Mazanova A.O., Labudzynskyi D.O., Khomenko A.V., Veliky M.M. Prednisolone and vitamin D₃ modulate oxidative metabolism and cell death pathways in blood and bone marrow mononuclear cells // Ukr. Biochem. J., 2016, 88 (5): 38-47. doi: 10.15407/ubj88.05.038 (*Особистий внесок здобувача – робота з експериментальними тваринами, пробопідготовка зразків, визначення рівня продукування АФК та NO клітинам крові та кісткового мозку, ступеня апоптичної та некротичної загибелі клітин, проведення вестерн-блот аналізу 3-нітротирозину у кістковому мозку, підготовка матеріалів до друку*).

4. Великий Н.Н., Шиманський І.А., Хоменко А.В., Лисаковская О.О., Мазанова А.А., Великий А.Н., Лабудзинський Д.О. Метаболическая роль дефицита витамина D₃ в развитии патологических состояний организма // *Современные проблемы биохимии: сб. науч. ст. (Гродно), 2016, Ч.1: 43-48 (Особистий внесок здобувача – робота з експериментальними тваринами).*
5. Шиманський І.О., Лисаковська О.О., Великий М.М. Молекулярно-клітинні механізми захисної дії вітаміну D₃ при експериментальному преднізолон-індукованому остеопорозі // *Біль. Суглоби. Хребет, 2017, 7(3): 93-101. doi: 10.22141/2224-1507.7.3.2017.116863 (Особистий внесок здобувача – робота з експериментальними тваринами, пробопідготовка зразків, визначення рівнів VDR, остеокальцину, RANKL, RANK і OPG у кістковій тканині методом вестерн-блот аналізу, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до друку).*
6. Lisakovska O.O., Shymanskyu I.O., Mazanova A.O., Khomenko A.V., Veliky M.M. Vitamin D₃ protects against prednisolone-induced liver injury associated with the impairment of hepatic NF-κB/iNOS/nitric oxide pathway // *Biochemistry and Cell Biology, 2017, 95(2): 213-222, doi: 10.1139/bcb-2016-0070 (Особистий внесок здобувача – робота з експериментальними тваринами, пробопідготовка зразків, визначення ступеня некротичної загибелі гепатоцитів, інтенсивності генерування NO гепатоцитами, рівнів iNOS, 3-нітротирозу, PARP-1, каспази-3, мієлопероксидази, NF-κB, фосфорильованої субодиниці p65 NF-κB, IκB, VDR у тканині печінки методом вестерн-блот аналізу, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до друку).*
7. Shymanskyi I.O., Lisakovska O.O., Mazanova A.O., Labudzynskyi D.O., Veliky M.M. Vitamin D₃ modulates impaired crosstalk between RANK and glucocorticoid receptor signaling in bone marrow cells after chronic prednisolone administration // *Front. Endocrinol., 2018, 9:303. doi: 10.3389/fendo.2018.00303 (Особистий внесок здобувача – робота з експериментальними тваринами, пробопідготовка зразків, визначення рівнів RANK, RANKL, OPG, CYP27B1, NF-κB, фосфорильованої субодиниці p65 NF-κB, IκB, GR у кістковому мозку методом вестерн-блот аналізу, визначення експресії мРНК RANKL та VDR, імуноцитохімічне мічення клітин крові, кісткового мозку та селезінки, протокова цитофлуориметрія та конфокальна мікроскопія RANK, VDR- та GR-позитивних клітин, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до друку).*
8. Lisakovska O., Shymanskyu I. Vitamin D₃ protects against oxidative-nitrosative stress-induced insults to hepatic cells associated with prednisolone action // *Конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2014», 29-30 травня, 2014, Київ, Україна. Abstract book, P. 39, Ukr. Biochem. J., 86 (4), P. 207.*
9. Lisakovska O., Khomenko A., Lototska O., Shymanskyu I. Oxidative-nitrosative stress and cell death in liver associated with prednisolone action in rats: effects of vitamin D₃ treatment // *XI Український біохімічний конгрес, 6-10 жовтня 2014, Київ, Україна. Ukr. Biochem. J., 86 (5) (Suppl. 2), P. 97.*
10. Lisakovska O., Shymanskyu I., Khomenko A., Veliky M. The protective effect of vitamin D₃ against prednisolone-induced liver injury in rats // *2nd International conference*

«Vitamin D - minimum, maximum, optimum», *European Vitamin D Association (EVIDAS), October 16-17, 2015, Warsaw, Poland*. *Standardy Medyczne/Pediatrics*, 5 (12), P. 892.

11. **Lisakovska O.**, Shymanskyi I. Prednisolone-induced impairments in the RANK- and GR-mediated signaling pathways depending on the state of vitamin D₃ endocrine system in rat bone marrow // *Конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016»*, 26-27 травня, 2016, Київ, Україна. Abstract book, P. 27, *Ukr. Biochem. J.*, 88 (4), P. 103.

12. **Lisakovska O.**, Shymanskyi I. Protective effect of vitamin D₃ against prednisolone-induced neurotoxicity in rats // *16th International Conference of Biochemistry and Molecular Biology, July 17-21, 2016, Vancouver, Canada*. Abstract book, P. 54.

13. **Lisakovska O.**, Mazanova A., Shymanskyi I. Vitamin D₃ protects against impairments of cytokine RANK/RANKL/OPG system in rat bone marrow associated with long-term prednisolone administration // *41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better Life (cancelled), September 3-8, 2016, Ephesus/Kuşadası, Turkey*. *The FEBS Journal*, 283 (Suppl. 1), P. 361.

14. **Lisakovska O.**, Labudzynski D., Mazanova A., Shymanskyi I. Receptor activator of NF- κ B is involved in vitamin D₃ deficiency-mediated neurotoxicity in rats induced by prednisolone // *ECNP Workshop for junior scientists in Europe, March 9-12, 2017, Nice, France*. *European Neuropsychopharmacology*, 27 (Suppl.1), P.2.

15. **Lisakovska O.**, Labudzynski D., Mazanova A., Shymanskyi I. Vitamin D₃ modulates impaired crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and vitamin D receptor (VDR) signaling pathways in bone tissue after chronic glucocorticoid treatment // *FEBS Advanced Lecture Course ALC17-012 «Nuclear receptors and epigenomic mechanisms in human disease and aging»*, August 27-September 1, 2017, Island of Spetses, Greece. Abstract book, p. 84.

16. **Lisakovska O.**, Labudzynski D., Savosko S., Shymanskyi I., Veliky M. Vitamin D₃ exerts a protective effect on glucocorticoid-induced neurotoxicity in rats via modulation of signaling through RANK // *30th ECNP Congress, September 2-5, 2017, Paris, France*. *European Neuropsychopharmacology*, 27 (Suppl. 4), P. S619.

17. **Lisakovska O.**, Shymanskyi I., Labudzynski D., Vasylevska V., Veliky M. Vitamin D₃ modulates impaired upstream NF- κ B-associated signalling pathways and NF- κ B downstream target genes in rat bone marrow after chronic glucocorticoid treatment // *The 18th FEBS Young Scientists' Forum, July 4-7, 2018, The 43rd FEBS Congress, July 7-12, 2018, Prague, Czech Republic*. Abstract book, p. 55. *FEBS Open Bio*, 2018, 8 (Suppl. S1), P. 209. doi: 10.1002/2211-5463.12453.

18. **Lisakovska O.**, Shymanskyi I., Labudzynski D., Veliky M. The role of vitamin D₃ in modulation of glucocorticoids-induced changes in angiogenesis/osteoblastogenesis/osteoclastogenesis coupling // *XI Parnas Conference – Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine»*, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. *Ukr. Biochem. J.*, 2018, Vol. 90, Special Issue, P. 126.

АНОТАЦІЯ

Лісаковська О.О. Роль вітаміну D₃ у регулюванні NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів за преднізолон-індукованого остеопорозу. – Рукопис.

Дисертація на здобуття ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2019.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню стану NF-κB-асоційованого регуляторного сигнального шляху RANKL/RANK/OPG за глюкокортикоїд(ГК)-індукованого остеопорозу та оцінці коригувального впливу вітаміну D₃ (холекальциферолу). Вперше встановлено, що на тлі зниження вмісту маркера забезпеченості організму вітаміном D – 25OHD у сироватці та рівня VDR спостерігались ГК-індуковані тканинноспецифічні порушення синтезу CYP27B1: зменшення вмісту протеїну CYP27B1 у кістковому мозку та збільшення експресії мРНК у кістковій тканині за дії преднізолону.

Виявлено, що одним з механізмів гепатотоксичної дії преднізолону є розвиток оксидативно-нітрозативного стресу. Індуковане посиленням продукуванням АФК активування NF-κB, збільшення синтезу NO та нітрозилування протеїнів призводило до посилення некротичної та апоптичної загибелі гепатоцитів за дії преднізолону. Показано, що один з ключових механізмів участі вітаміну D₃ у попередженні розвитку оксидативно-нітрозативного стресу та загибелі гепатоцитів за тривалого введення синтетичних ГК полягає у VDR-опосередкованій дії холекальциферолу на гепатоцити за рахунок зменшення фосфорилування NF-κB та підвищення рівня IκB.

Показано, що ланка NF-κB/IκB може бути ключовим молекулярним перемикачем у взаємодії RANKL/RANK/OPG, VDR- та GR-опосередкованих сигнальних шляхів у різних тканинах щурів. У кістковому мозку на тлі зменшеного рівня GR та OPG спостерігалось збільшення вмісту RANKL та його зв'язування з RANK. У кістковій тканині виявлено зменшення співвідношення OPG/RANKL, що є ознакою порушення ремоделювання кісткової тканини. За введення преднізолону показано активування NF-κB та його транслокація до ядра у клітинах кісткового мозку, в той час як у кістковій тканині спостерігалось інгібування NF-κB за рахунок суттєвого підвищення вмісту IκB. За дії преднізолону вперше показано зростання кількості RANK-позитивних попередників остеокластів у кістковому мозку, периферичній крові та селезінці. Продемонстровано, що введення вітаміну D₃ мало коригувальний ефект на індуковані преднізолоном порушення експресії компонентів систем RANKL/RANK/OPG та NF-κB/IκB у кістковому мозку та кістковій тканині щурів.

Завдяки виявленій здатності вітаміну D₃ нормалізувати пул циркулюючих преостеокластів та модулювати стан NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів у різних органах та тканинах, обґрунтована доцільність його використання у супровідній терапії з метою коригування преднізолон-індукованих порушень ремоделювання кісткової тканини та проявів гепатотоксичності.

Ключові слова: глюкокортикоїд-індукований остеопороз, гепатотоксичність, вітамін D₃, D-ауто/паракринна система, ремоделювання кісткової тканини, цитокінова система RANKL/RANK/OPG, ядерний фактор транскрипції κB.

ABSTRACT

Lisakovska O.O. The role of vitamin D₃ in the regulation of NF- κ B-dependent signaling pathways in prednisolone-induced osteoporosis. – Manuscript.

Thesis for PhD's degree by speciality 03.00.04 – biochemistry. – Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

This PhD thesis is dedicated to studying the role of the NF- κ B-dependent signaling pathway RANKL/RANK/OPG in the mechanisms of disturbances in bone tissue remodeling under glucocorticoid(GC)-induced osteoporosis and the evaluation of the possible corrective effect of vitamin D₃ (cholecalciferol). It was shown for the first time that along with a decrease in the level of serum 25OHD and reduced VDR tissue content, GC-induced tissue-specific abnormalities in the CYP27B1 level were found: an inhibition of the protein CYP27B1 synthesis in the bone marrow and an increase in mRNA expression in the bone tissue after prednisolone administration.

It was found that oxidative-nitrosative stress is one of the mechanisms of prednisolone-induced hepatotoxicity. NF- κ B activation, induced by the enhanced production of reactive oxygen species, increased level of NO production and protein nitration were associated with the increase in both necrotic and apoptotic cell death among hepatocytes after prednisolone action. The effect of cholecalciferol on hepatocytes, based on the reduction of the NF- κ B phosphorylation and the raise in the I κ B level, can be proposed as the key mechanism of vitamin D involvement in preventing the development of oxidative-nitrosative stress and cell death under the long-term GC action.

NF- κ B/I κ B system was shown to be the key molecular switch in the interaction of RANKL/RANK/OPG, VDR- and GR-mediated signaling pathways in different tissues. Along with the reduced GR and OPG levels in the bone marrow there was an increase in the RANKL content and an elevated RANKL binding to RANK. A reduced OPG/RANKL ratio in bone tissue was found, suggesting impairments in bone remodeling. Prednisolone administration caused NF- κ B activation and its translocation to the nuclei in bone marrow cells, while in the bone tissue NF- κ B inhibition due to a significant increase in I κ B content was observed. An elevated number of RANK-positive osteoclast precursors after prednisolone action in the bone marrow, peripheral blood, and spleen was shown for the first time. Vitamin D₃ administration exerted a corrective effect on GC-induced impairments in the expression of the components of RANKL/RANK/OPG and NF- κ B/I κ B systems in rat bone marrow and bone tissue.

Based on the ability of vitamin D₃ to partially normalize the pool of circulating osteoclast precursors and to modulate the state of the NF- κ B-associated signaling pathways in different tissues, we can recommend to use cholecalciferol in order to correct prednisolone-induced disturbances of bone remodeling and liver functioning.

Key words: glucocorticoid-induced osteoporosis, hepatotoxicity, vitamin D₃, D-auto/paracrine system, bone remodeling, cytokine system RANKL/RANK/OPG, nuclear factor κ B.