

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

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Лісаковська Ольга Олександрівна**

УДК 577.161.2+577.175.5:616.71-007.234

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**РОЛЬ ВІТАМІНУ D<sub>3</sub> У РЕГУЛЮВАННІ NF-κB-АСОЦІЙОВАНИХ  
СИГНАЛЬНИХ ШЛЯХІВ ЗА ПРЕДНІЗОЛОН-ІНДУКОВАНОГО  
ОСТЕОПОРОЗУ**

Спеціальність 03.00.04 – Біохімія

Галузь знань 091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

---

(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник: Великий Микола Миколайович, доктор біологічних наук,  
професор

Київ – 2019

## АНОТАЦІЯ

*Лісаковська О.О.* Роль вітаміну D<sub>3</sub> у регулюванні NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів за преднізолон-індукованого остеопорозу. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія». - Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2019.

Синтетичні глюкокортикоїди (ГК) широко використовуються у медичній практиці як ефективні протизапальні, імуносупресивні та протиалергічні засоби. Однак їх тривале застосування асоціюється з розвитком патологічних ускладнень, серед яких найбільш поширеним є глюкокортикоїд-індукований остеопороз (ГІО). З'ясування клітинно-молекулярних механізмів розвитку ГІО та шляхів коригування порушень функціонування кісткової тканини за тривалої глюкокортикоїдної терапії є надзвичайно актуальною теоретичною та клінічною проблемою.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню ролі NF-κB-асоційованого регуляторного сигнального шляху RANKL (ліганд рецептора активатора ядерного фактора κB)/ RANK (рецептор активатор ядерного фактора κB)/ OPG (остеопротегерин) у механізмах розвитку порушень ремоделювання кісткової тканини за експериментального глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу та оцінці коригувального впливу вітаміну D<sub>3</sub> (холекальциферолу). У роботі вперше було показано залежність між дефіцитом вітаміну D в організмі та порушеннями NF-κB-залежних сигнальних шляхів у різних тканинах щурів за ГК-індукованого остеопорозу.

Вперше охарактеризовано стан D-ауто/паракринної системи (за вмістом CYP27B1 та VDR) у кістковій тканині, кістковому мозку та печінці й встановлено, що на тлі зниження рівня маркера забезпеченості організму вітаміном D<sub>3</sub> – 25-гідроксивітаміну D (25OHD) у сироватці та вмісту тканинного VDR спостерігаються ГК-індуковані тканинносPECIFIC порушення синтезу CYP27B1: пригнічення синтезу протеїну CYP27B1 у

кістковому мозку та збільшення експресії мРНК у кістковій тканині за дії преднізолону.

Визначено, що одним з побічних ефектів тривалого застосування ГК є ушкодження тканини печінки, внаслідок чого порушується процес гідроксилювання вітаміну D в гепатоцитах та знижується вміст 25ОНD. Показано, що одним з молекулярних механізмів, що лежать в основі проявів гепатотоксичності за дії преднізолону може бути розвиток оксидативно-нітрозативного стресу. Вивлене нами активування NF-κB у печінці призводило до посиленого синтезу протеїну 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. VDR-опосередкований вплив холекальциферолу на тлі дії преднізолону на клітини печінки за рахунок зменшення фосфорилування NF-κB та підвищення рівня IκB можна запропонувати як ключовий механізм участі вітаміну D<sub>3</sub> у попередженні розвитку оксидативно-нітрозативного стресу та загибелі гепатоцитів при тривалому введенні ГК. Більше того, продемонстровано коригувальний ефект вітаміну D<sub>3</sub> на вміст 25ОНD у сироватці крові та на індуковані преднізолоном порушення експресії компонентів D-ауто/паракринної системи (VDR та CYP27B1) у різних тканинах.

Встановлено, що розвиток D-гіповітамінозу та порушення метаболізму холекальциферолу за дії преднізолону вели до порушення мінерального обміну та структурно-функціонального стану кісткової тканини, що виявлялось у гіпофосфатемії, гіпокальціємії, зростанні активності лужної фосфатази у сироватці крові та зменшенні вмісту мінеральних компонентів у кістковій тканині. За допомогою методу «3-х точкового прогинання» показано зниження основних біомеханічних характеристик стегнової кістки, а також виявлено зменшення вмісту маркера процесу остеосинтезу – протеїну остеокальцину. Позитивний ефект призначення вітаміну D<sub>3</sub> на тлі глюкокортикоїдної терапії виявлявся у коригуванні перебігу мінерального обміну, частковому

нормалізуванні біомеханічних параметрів стегнової кістки та повному відновленні вмісту остеокальцину.

З огляду на встановлене порушення процесу остеосинтезу за дії преднізолону, важливо було охарактеризувати також і перебіг процесу резорбції, а саме вивчити стан NF-κB-асоційованого сигнального шляху RANKL/RANK/OPG за ГК-індукованого остеопорузу.

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 поверхні преостеокластів) за тривалого введення преднізолону. Більше того, показано ГК-індуковане 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 та вмісту протеїну RANK, 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 D<sub>3</sub> мало коригувальний ефект на індуковані преднізолоном порушення експресії компонентів систем RANKL/RANK/OPG та NF-κB/IκB у кістковому мозку та кістковій тканині щурів. Вперше показано здатність вітаміну D<sub>3</sub> частково нормалізувати пул циркулюючих преостеокластів.

Вперше продемонстровано участь цитокінової системи RANKL/RANK/OPG у проявах ГК-індукованої гепатотоксичності. Виявлено, що за дії преднізолону знижувався відносний вміст RANK та зростав рівень прозапальних цитокінів RANKL та TNFα, що призводило до активування NF-κB у печінці та хронізації запального процесу. Показано, що вітамін D<sub>3</sub> за дії

преднізолону нормалізував вміст RANKL і RANK та інгібував транслокацію NF-κB до ядра, що корелювало зі зменшенням інтенсивності процесів некрозу та апоптозу гепатоцитів.

Отримані у дисертаційній роботі експериментальні результати мають важливе значення для медичної біохімії, фармакології, токсикології та медицини, оскільки значно поглиблюють та розширюють сучасні уявлення про клітинно-молекулярні особливості розвитку глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу та залучення NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів у патогенез даного захворювання. Завдяки виявленій здатності вітаміну D<sub>3</sub> 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 з метою коригування перебігу процесів остеосинтезу та резорбції кісткової тканини за тривалої терапії глюкокортикоїдами. Результати дослідження слугують теоретичною основою для науково обґрунтованих практичних рекомендацій щодо комплексного застосування вітаміну D<sub>3</sub> як ефективного засобу коригування преднізолон-індукованих порушень ремоделювання кісткової тканини та зниження проявів гепатотоксичності.

**Ключові слова:** глюкокортикоїд-індукований остеопороз, гепатотоксичність, вітамін D<sub>3</sub>, D-ауто/паракринна система, ремоделювання кісткової тканини, цитокінова система RANKL/RANK/OPG, ядерний фактор транскрипції κB.

## **ABSTRACT**

**Lisakovska O.O. The role of vitamin D<sub>3</sub> in the regulation of NF-κB-dependent signalling pathways in prednisolone-induced osteoporosis. – Manuscript is a qualification paper.**

**Thesis for PhD degree by speciality – 03.00.04 «Biochemistry». – Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.**

Synthetic glucocorticoids (GCs) are widely used in medicine as an effective anti-inflammatory, immunosuppressive and antiallergic drugs. However, a prolonged use of GCs is associated with pathologic complications, the most frequent among which is the glucocorticoid-induced osteoporosis (GIO). Thus, it is an important theoretical and clinical problem to determine molecular and cellular mechanisms underlying GC-induced osteoporosis and the ways to correct impairments in the bone tissue functioning during a long-term glucocorticoid therapy.

This PhD thesis is dedicated to studying the role of the NF- $\kappa$ B-dependent signalling pathway RANKL/RANK/OPG in the mechanisms of disturbances in bone tissue remodeling under experimental glucocorticoid-induced osteoporosis and the evaluation of the possible corrective effect of vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol). We demonstrated for the first time the clear dependence between vitamin D deficiency and the impairments in the NF- $\kappa$ B-dependent signalling pathways in various rat tissues under GIO.

The state of the vitamin D auto/paracrine system (based on the CYP27B1 and VDR levels) in the bone tissue, bone marrow, and the liver was characterized; it was shown that along with a decrease in the level of 25-dihydroxivitamin D (25OHD), a vitamin D status marker, in the serum and a decrease in the VDR tissue content there are glucocorticoid-induced tissue-specific disturbances in CYP27B1 level: specifically, an inhibition of the protein CYP27B1 synthesis in the bone marrow and an increase in mRNA expression in the bone tissue.

It was found out that liver tissue damage is one of the adverse effects of the prolonged GC treatment. This, in turn, leads to the aberrant vitamin D hydroxylation in hepatocytes and decreased 25OHD content. We suppose that one of the mechanisms of prednisolone-induced hepatotoxicity is the development of oxidative-nitrosative stress. GC-induced NF- $\kappa$ B activation led to an increased level of NO production (probably, due to the enhanced iNOS expression) and caused the elevation of protein nitration (as determined by the level of 3-nitrotyrosine in the liver tissue). This resulted in an increase in necrotic (based on the number of PI-positive cells) and apoptotic (based on the caspase-3 level) cell death among hepatocytes after

prednisolone action. The VDR-mediated effect of cholecalciferol on hepatocytes based on the reduction of the NF- $\kappa$ B phosphorylation and the raise in the I $\kappa$ B- $\alpha$  level in response to prednisolone-induced NF- $\kappa$ B overactivation and the induction of iNOS synthesis can be proposed as the key mechanism explaining the effectiveness of vitamin D<sub>3</sub> in preventing the development of oxidative-nitrosative stress and cell death under the long-term GC administration. Moreover, the corrective effect of vitamin D<sub>3</sub> on the 25OHD content in the serum and on the prednisolone-induced impairments of the expression of the vitamin D auto/paracrine system components (VDR and CYP27B1) in different tissues was demonstrated.

It was shown that prednisolone-induced vitamin D deficiency and impairments in cholecalciferol metabolism led to the disturbances in mineral metabolism and in the structural and functional state of the bone tissue. It was confirmed by the development of hypophosphatemia, hypocalcemia, increased activity of alkaline phosphatase in the serum, and the reduced content of mineral components in bone tissue. Using the three-point bending test, the reduction of the basic biomechanical parameters of rat femurs was shown. Additionally, a decrease in the content of the main molecular marker of osteosynthesis (osteocalcin) was detected. Vitamin D<sub>3</sub> administration during the glucocorticoid therapy contributed to the correction of mineral metabolism, partial normalization of biomechanical parameters of rat femurs, and complete restoration of the osteocalcin content.

Given the established violation in the osteosynthesis process after prednisolone administration, it was also important to characterize bone resorption, namely, to investigate the role of the NF- $\kappa$ B-associated signalling pathway RANKL/RANK/OPG in the pathogenesis of GC-induced osteoporosis. It was demonstrated that the NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B system is the key molecular switch in the interaction of RANKL/RANK/OPG, VDR- and GR-mediated signalling pathways in different rat tissues. Along with the reduced GR and OPG levels in the bone marrow there was an increase in the content of RANKL and its enhanced binding to RANK (based on a 3D-model of RANKL/RANK interaction on the preosteoclast surface). A reduced OPG/RANKL ratio in bone tissue was found, suggesting impairments in

bone remodeling. After long-term GC administration, NF- $\kappa$ B activation and its translocation to the nuclei in bone marrow cells was shown, while in the bone tissue NF- $\kappa$ B inhibition due to a significant increase in I $\kappa$ B content was observed. An elevation in the number of RANK-positive osteoclast precursors after prednisolone action in the bone marrow, peripheral blood, and spleen was shown for the first time. Vitamin D<sub>3</sub> administration exerted a corrective effect on prednisolone-induced impairments in the expression of the components of RANKL/RANK/OPG axis and NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B system in rat bone marrow and bone tissue. The ability of vitamin D<sub>3</sub> to partially normalize the pool of circulating osteoclast precursors was shown.

The role of the RANKL/RANK/OPG axis in the development of GC-induced hepatotoxicity was demonstrated. After prednisolone administration the RANK content was decreased and the levels of the proinflammatory cytokines RANKL and TNF $\alpha$  were elevated. This led to the activation of NF- $\kappa$ B in the liver and to the development of chronic inflammation process. Vitamin D<sub>3</sub> treatment after prednisolone administration normalized the content of RANKL and RANK and inhibited the NF- $\kappa$ B translocation to the nucleus that may contribute to a decrease in the intensity of necrosis and apoptosis processes in the liver.

The experimental results obtained in this PhD thesis are important for medical biochemistry, pharmacology, toxicology, and medicine, since they considerably deepen and broaden the modern understanding of cellular and molecular aspects of the development of secondary glucocorticoid-induced osteoporosis and the role of NF- $\kappa$ B-associated signalling pathways in the pathogenesis of this disease. Based on the ability of vitamin D<sub>3</sub> to modulate the state of the NF- $\kappa$ B-associated signalling pathways (RANKL/RANK/OPG, VDR and GR) in different organs and tissues, we can recommend to use cholecalciferol in order to correct the impaired balance between osteosynthesis and bone resorption after long-term glucocorticoid therapy. The results of the study are the theoretical basis for scientifically substantiated practical recommendations for application of vitamin D<sub>3</sub> as an effective compound for correcting GC-induced disturbances of bone remodeling and liver functioning.



**Key words:** glucocorticoid-induced osteoporosis, hepatotoxicity, vitamin D<sub>3</sub>, D-auto/paracrine system, bone remodeling, cytokine system RANKL/RANK/OPG, nuclear factor κB.

**Список публікацій здобувача 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 D<sub>3</sub> // Ukr. Biochem. J., 2014, 86 (5): 111-125.
2. Shymanskyu I.O., Lisakovska O.O., Mazanova A.O., Riasniy V.M., Veliky M.M. Effects of vitamin D<sub>3</sub> and vitamin E on prednisolone-induced alterations of phagocyte function // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci., 2016, 20 (7): 1379-1383.
3. Shymanskyu I.O., Lisakovska O.O., Mazanova A.O., Labudzynski D.O., Khomenko A.V., Veliky M.M. Prednisolone and vitamin D<sub>3</sub> 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.
4. Великий Н.Н., Шиманський І.А., Хоменко А.В., Лісаковская О.О., Мазанова А.А., Великий А.Н., Лабудзинський Д.О. Метаболическая роль дефицита витамина Д<sub>3</sub> в развитии патологических состояний организма // Современные проблемы биохимии: сб. науч. ст. (Гродно), 2016, Ч.1: 43-48.
5. Шиманський І.О., Лісаковська О.О., Великий М.М. Молекулярно-клітинні механізми захисної дії вітаміну D<sub>3</sub> при експериментальному преднізолон-індукованому остеопорозі // Біль. Суглоби. Хребет., 2017, 7(3): 93-101. doi: 10.22141/2224-1507.7.3.2017.116863.
6. Lisakovska O.O., Shymanskyu I.O., Mazanova A.O., Khomenko A.V., Veliky M.M. Vitamin D<sub>3</sub> 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.
7. Shymanskyi I.O., Lisakovska O.O., Mazanova A.O., Labudzynski D.O., Veliky M.M. Vitamin D<sub>3</sub> 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.

8. Lisakovska O., Shymanskyu I. Vitamin D<sub>3</sub> 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 D<sub>3</sub> 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 D<sub>3</sub> against prednisolone-induced liver injury in rats // 2<sup>nd</sup> International conference «Vitamin D - minimum, maximum, optimum», European Vitamin D Association (EVIDAS), October 16-17, 2015, Warsaw, Poland. *Standarty Medyczne/Pediatrics*, 5 (12), P. 892.

11. Lisakovska O., Shymanskyu I. Prednisolone-induced impairments in the RANK- and GR-mediated signaling pathways depending on the state of vitamin D<sub>3</sub> 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., Shymanskyu I. Protective effect of vitamin D<sub>3</sub> against prednisolone-induced neurotoxicity in rats // 16th International Conference of Biochemistry and Molecular Biology, July 17-21, 2016, Vancouver, BC, Canada. Abstract book, P. 54.

13. Lisakovska O., Mazanova A., Shymanskyu I. Vitamin D<sub>3</sub> 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, September 3-8, 2016, Ephesus/Kuşadasi, Turkey. *The FEBS Journal*, 283 (Suppl. 1), P. 361.

14. Lisakovska O., Labudzynskyi D., Mazanova A., Shymanskyi I. Receptor activator of NF- $\kappa$ B is involved in vitamin D<sub>3</sub> 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., Labudzynskyi D., Mazanova A., Shymanskyi I. Vitamin D<sub>3</sub> modulates impaired crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) 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., Labudzynskyi D., Savosko S., Shymanskyi I., Veliky M. Vitamin D<sub>3</sub> exerts a protective effect on glucocorticoid-induced neurotoxicity in rats via modulation of signaling through receptor activator of NF- $\kappa$ B // 30th ECNP Congress, September 2-5, 2017, Paris, France. *European Neuropsychopharmacology*, 27 (Suppl. 4), P. S619.
17. Lisakovska O., Shymanskyi I., Labudzynskyi D., Vasylevska V., Veliky M. Vitamin D<sub>3</sub> modulates impaired upstream NF- $\kappa$ B-associated signalling pathways and NF- $\kappa$ 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., Labudzynskyi D., Veliky M. The role of vitamin D<sub>3</sub> 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, 90 (Special Issue), P. 126.

## ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень.....	16
Вступ.....	18
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури.....	26
1.1 Біологічна роль вітаміну D <sub>3</sub> .....	26
1.1.1 Вітамін D-ендокринна система та обмін холекальциферолу.....	26
1.1.2 Молекулярні механізми дії вітаміну D <sub>3</sub> .....	30
1.1.3 Плейотропні ефекти вітаміну D <sub>3</sub> .....	34
1.1.4 Дефіцит вітаміну D <sub>3</sub> як фактор розвитку остеопорозу.....	37
1.2 Глюкокортикоїд-індукований остеопороз та обмін вітаміну D <sub>3</sub> .....	39
1.2.1 Глюкокортикоїди – стероїдні гормони системної дії та медичні препарати.....	39
1.2.2 Біохімічні та клітинно-молекулярні механізми розвитку остеопорозу за довготривалої дії глюкокортикоїдів.....	43
1.2.3 Вплив глюкокортикоїдів на метаболізм вітаміну D <sub>3</sub> .....	47
1.3 Ремоделювання кісткової тканини за участі цитокінової системи RANKL/RANK/OPG.....	48
1.3.1 Процес ремоделювання кісткової тканини та його регулювання.....	48
1.3.2 Характеристика компонентів цитокінової системи RANKL/RANK/OPG.....	50
1.3.3 Роль NF-κB у реалізації функцій цитокінових систем.....	54
1.3.4 Порушення функціонування цитокінової системи RANKL/RANK/OPG за глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу...	57
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	59
2.1 Моделювання глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу у щурів та схема введення вітаміну D <sub>3</sub> .....	59
2.2 Матеріали і обладнання.....	59
2.3 Методи досліджень.....	61
2.3.1 Отримання сироватки крові.....	61

	13
2.3.2 Отримання загальних лізатів та лізатів з ядерної й цитоплазматичної фракцій для проведення вестерн-блот аналізу.....	61
2.3.3 Виділення моноцитів з кісткового мозку та крові щурів.....	62
2.3.4 Виділення спленоцитів.....	63
2.3.5 Виділення гепатоцитів .....	63
2.3.6 Визначення вмісту 25OHD у сироватці крові.....	63
2.3.7 Визначення вмісту загального кальцію та його фракцій у сироватці крові .....	64
2.3.8 Визначення вмісту неорганічного фосфату у сироватці крові.....	64
2.3.9 Визначення активності загальної лужної фосфатази та її ізоензимів у сироватці крові.....	65
2.3.10 Визначення вмісту мінеральних компонентів кісткової тканини.....	65
2.3.11 Вивчення біомеханічних характеристик кісток.....	66
2.3.12 Імуногістохімічне дослідження кісткової тканини.....	66
2.3.13 Визначення рівня продукування активних форм кисню клітинами кісткового мозку та фагоцитуючими клітинами крові.....	67
2.3.14 Визначення рівня продукування оксиду азоту гепатоцитами та клітинами кісткового мозку.....	68
2.3.15 Вивчення характеру загибелі гепатоцитів.....	68
2.3.16 Визначення кількості RANK-позитивних клітин кісткового мозку, крові та селезінки щурів, RANKL- та GR-позитивних клітин кісткового мозку методом протокової цитофлуориметрії та їх візуалізація.....	69
2.3.17 Визначення експресії мРНК CYP27B1, VDR, RANKL, NF-κB, TNFα та PPARγ у різних тканинах щурів.....	70
2.3.18 Вестерн-блот аналіз цільових протеїнів у кістковому мозку, кістковій тканині та тканині печінки щурів.....	71
2.3.19 Визначення рівня транскрипційного активування NF-κB у кістковому мозку, кістковій тканині та тканині печінки щурів.....	73
2.3.20 Статистична обробка результатів.....	73

	14
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їх обговорення.....	74
3.1 Характеристика компонентів D-ауто/паракринної системи у тканинах щурів за тривалої дії преднізолону та при введенні вітаміну D <sub>3</sub> .....	74
3.1.1 Забезпеченість організму вітаміном D та стан D-ауто/паракринної системи у тканинах щурів за дії преднізолону та вітаміну D <sub>3</sub> .....	75
3.1.2 Вміст глюкокортикоїдних рецепторів у кістковому мозку та печінці щурів за дії преднізолону та вітаміну D <sub>3</sub> .....	80
3.1.3 Зв'язок забезпеченості організму вітаміном D із функціональними та біохімічними змінами у тканині печінки за дії преднізолону та вітаміну D <sub>3</sub> .....	83
3.2 Роль вітаміну D <sub>3</sub> у коригуванні преднізолон-індукованого остеопорозу.....	94
3.2.1 Стан мінерального обміну у щурів за тривалого введення преднізолону та ефект холекальциферолу на преднізолон-індуковані порушення мінерального обміну.....	95
3.2.2 Маркерні показники розвитку остеопорозу за тривалого введення преднізолону та при дії вітаміну D <sub>3</sub> .....	101
3.3 Дія преднізолону та вітаміну D <sub>3</sub> на компоненти ключового сигнального шляху ремоделювання кісткової тканини RANKL/RANK/OPG.....	105
3.3.1 Оцінка пулу попередників остеокластів у селезінці, периферичній крові та кістковому мозку щурів .....	106
3.3.2 Стан цитокінової системи RANKL/RANK/OPG у кістковому мозку та кістковій тканині щурів за дії преднізолону та вітаміну D <sub>3</sub> .....	109
3.3.3 Стан цитокінової системи RANKL/RANK/OPG у печінці щурів за дії преднізолону та вітаміну D <sub>3</sub> .....	118
3.4 Транскрипційний фактор NF-κB як регулятор RANK-, VDR- та GR-опосередкованих сигнальних шляхів за глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу та за дії вітаміну D <sub>3</sub> .....	122

3.4.1	Оцінка транскрипційного активування NF-κB у кістковому мозку щурів за дії преднізолону та вітаміну D <sub>3</sub> .....	123
3.4.2	Стан системи NF-κB/IκB у кістковій тканині щурів за дії преднізолону та вітаміну D <sub>3</sub> .....	130
	Аналіз та узагальнення результатів.....	134
	Висновки .....	141
	Список використаних джерел.....	143
	Додатки.....	166

## Перелік умовних скорочень

- 1,24,25(OH)<sub>3</sub>D – кальцитріол  
1,25(OH)<sub>2</sub>D – 1,25-дигідроксивітамін D  
24,25(OH)<sub>2</sub>D – 24,25-дигідроксивітамін D  
25OHD – 25-гідроксивітамін D  
7-ДГХ – 7-дегідрохолестерин  
BSA – бичачий сироватковий альбумін  
CYP27A1 – мітохондріальний ізоензим вітамін D 25-гідроксилази  
CYP27B1 – 25-гідроксивітамін D 1 $\alpha$ -гідроксилаза  
CYP2R1 – мікросомальний ізоензим вітамін D 25-гідроксилази  
D<sub>2</sub> – ергокальциферол  
D<sub>3</sub> – холекальциферол  
DAF-2DA – 4,5-діамінофлуоресцеїну діацетат  
DCF-DA – 2,7-дихлородигідрофлуоресцеїну діацетат  
EGF – епідермальний фактор росту  
ELISA – імуноензимний аналіз  
FGF23 – фактор росту фібробластів 23  
FXR – фарнезоїдний X рецептор  
GR – глюкокортикоїдний рецептор  
GRE – глюкокортикоїд-«чутливий» елемент  
HRP – пероксидаза хрону  
IFN – інтерферон  
IKK – кіназа ІкВ  
IL-1 $\beta$  – інтерлейкін 1 $\beta$   
iNOS – індуцибельна NO-синтаза  
ІкВ – інгібіторна субодиниця ядерного фактора кВ  
M-CSF 1 – колонієстимулюючий фактор росту макрофагів 1  
NFATc1 – ядерний фактор активованих Т-клітин 1  
NFATc2 – ядерний фактор активованих Т-клітин 2



NF-κB – ядерний фактор κB  
NO – оксид азоту  
OC – остеокальцин  
ONOO<sup>-</sup> – пероксинітрит радикал  
PKC – протеїнкіназа C  
OPG – остеопротегерин  
PARP-1 – полі(ADP-рибозо)полімераза-1  
PPAR<sub>γ</sub> – рецептор, що активується пероксисомним проліфератором  $\gamma$   
PXR – прегнановий X рецептор  
RANK – рецептор активатор ядерного фактору κB  
RANKL – ліганд рецептора активатора ядерного фактору κB  
Runx2 – Runt-пов'язаний транскрипційний фактор X2  
RXR – рецептор ретиноевої кислоти  
TGF- $\beta$  – трансформуючий фактор росту  $\beta$   
TNF $\alpha$  – фактор некрозу пухлин  $\alpha$   
TRAF 1, 2, 6 – асоційовані з рецептором TNF фактори 1, 2 та 6  
TRAP – тартрат-резистентна кисла фосфатаза  
VDBP – вітамін D зв'язуючий протеїн  
VDR – рецептор вітаміну D  
VDRE – вітамін D-«чутливий» елемент  
VEGF – фактор росту ендотелію судин  
АФК – активні форми кисню  
ГЮ – глюкокортикоїд-індукований остеопороз  
ГК – глюкокортикоїди  
КФ – кисла фосфатаза  
ЛФ – лужна фосфатаза  
МЩКТ – мінеральна щільність кісткової тканини  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – гідроген пероксид  
ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів  
ПТГ – паратиреоїдний гормон

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Синтетичні глюкокортикоїди (ГК) є загально визнаними ефективними протизапальними, імуносупресивними та протиалергічними препаратами, які широко застосовуються в медицині [1]. Однак відомо, що у пацієнтів, які тривалий час приймають стероїдні протизапальні препарати, виникає підвищений ризик розвитку остеопорозу [2].

Остеопороз – поліетіологічне прогресуюче системне захворювання скелету, що характеризується втратою маси кісток та зниженням їх щільності, порушенням мікроархітекtonіки (руйнуванням трабекул) та підвищенням ризику переломів навіть при мінімальних навантаженнях [3]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, остеопороз як причина інвалідизації й смертності займає четверте місце після захворювань серцево-судинної системи, онкологічних та цукрового діабету [4]. Тому 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 (ГІО) на сьогодні залишаються недостатньо з'ясованими.

Вітамін D<sub>3</sub> (холекальциферол) є регулятором процесу ремоделювання кісткової тканини, а його недостатність вважається одним з провідних чинників розвитку остеопорозу за тривалої дії ГК. Біомаркером забезпеченості організму вітаміном D є вміст 25-гідроксिवітаміну D (25ОНD) у сироватці крові, який в нормі знаходиться в межах 100-150 нмоль·л<sup>-1</sup> (40-60 нг·мл<sup>-1</sup>). 25ОНD є попередником утворення гормональної форми – 1,25-дигідроксिवітаміну D (1,25(ОН)<sub>2</sub>D) з добре вивченими класичними ефектами, пов'язаними з регулюванням кальцієвого гомеостазу [5]. Проте наявність практично у всіх клітинах тканин організму рецепторів вітаміну D (VDR), що функціонують як ліганд-активовані транскрипційні фактори, та експресії 25ОНD-1 $\alpha$ -гідроксилази (CYP27B1), яка забезпечує гідроксилування 25ОНD з утворенням 1,25(ОН)<sub>2</sub>D, обґрунтовує множинні регуляторні ефекти – контроль проліферування та диференціювання клітин, імунної відповіді, ангіогенезу та апоптозу [6].

Відомо, що кальцитріол (гормонально активна форма вітаміну D<sub>3</sub>) забезпечує узгодженість процесів резорбції і формування кісткової тканини. Порушення системного гормонального та місцевого (цитокінового) регулювання активності остеобластів та остеокластів вважається центральною ланкою патогенезу остеопорозу. На молекулярному рівні регулювання процесу ремоделювання кісткової тканини реалізується через VDR-опосередкований вплив на транскрипційне активування NF-κB та експресію залежних від нього генів.

Відкриття цитокінової системи RANKL (ліганд рецептора активатора ядерного фактора κB)/ RANK (рецептор активатор ядерного фактора κB)/ OPG (остеопротегерин), що бере участь у контролі резорбції та діє через активування NF-κB, обумовило значний прогрес у розумінні процесів ремоделювання кісткової тканини та механізмів розвитку захворювань скелету, зокрема остеопорозу [7]. RANKL продукується як стромальними клітинами кісткового мозку і остеобластами, так і активованими дендритними клітинами та Т-лімфоцитами, що підкреслює важливість остеоімунної взаємодії у регулюванні ремоделювання кісткової тканини. Взаємодія RANKL з RANK призводить до активування попередників остеокластів у кістковому мозку та перетворення їх на зрілі активні багатоядерні остеокласти. Остеопротегерин діє як рецептор-пастка RANKL, нейтралізуючи його дію і тим самим блокуючи процес резорбції [8]. Порушення співвідношення OPG/RANKL може бути одним з механізмів розвитку захворювань кісткової тканини. З огляду на це, цитокінова система RANKL/RANK/OPG вважається перспективною молекулярною мішенню для здійснення коригування процесу ремоделювання за різних патологій кісткової тканини.

Актуальним залишається 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-κB, який контролює утворення TNFα, VEGF, інтерлейкінів, iNOS і чи корелюють ці зміни з порушенням процесу

ремоделювання кісткової тканини за ГІО. Особливий медико-біологічний інтерес становить обґрунтування можливості застосування вітаміну D<sub>3</sub> та його активних метаболітів як перспективних засобів для коригування патологічних змін у кістковій тканині за умов тривалого введення глюкокортикоїду преднізолону.

**Зв'язок з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконувалась у 2014-2017 рр. в рамках наукових тем лабораторії медичної біохімії (з 01.03.2016 р. – відділу біохімії вітамінів і коензимів) Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України: 1) «Роль вітамінів А, Е, В<sub>1</sub>, РР, D<sub>3</sub>, убіхінону та їх коензимів у забезпеченні функціонування спеціалізованих клітин за норми та за умов ініціації їх загибелі» (2012-2016 рр., тема № 4, державний реєстраційний номер 0112U002625), розділ теми «Дослідження регуляторної ролі вітаміну D<sub>3</sub> у функціонуванні спеціалізованих клітин в нормі та за патологій, що індукують їх загибель»; 2) «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (2012-2016 рр., тема № 15, державний реєстраційний номер 0112U002624), розділ теми «Взаємозв'язок вітамін D<sub>3</sub>- та NF-κB-сигнальних шляхів в регуляції клітинних функцій у нормі та за патології». Роботу було підтримано стипендіями за результатами конкурсу на кращу наукову роботу Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (2015 р., 2018 р.).

**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 D<sub>3</sub>.

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

- 1) визначити рівень забезпеченості організму піддослідних тварин вітаміном D за вмістом 25ОНD 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 D<sub>3</sub>;
- 3) вивчити стан цитокінової 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 D<sub>3</sub>;
- 5) оцінити рівні тканинного синтезу залежних від NF-κB функціонально важливих протеїнів (фактору росту ендотелію судин – VEGF, фактору некрозу пухлин альфа – TNFα, індукцйбельної NO-синтази – iNOS) та визначити їх роль в процесах вітамін D-опосередкованого ремоделювання кісткової тканини за ГК-індукованого остеопорозу та при дії вітаміну D<sub>3</sub>.

**Об'єкт дослідження:** D-ауто/паракринна система та NF-κB-асоційовані сигнальні шляхи за дії преднізолону.

**Предмет дослідження:** компоненти D-ауто/паракринної системи, компоненти цитокінової 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 D<sub>3</sub>.

**Методи дослідження.** Для реалізації основних завдань дисертаційної роботи були використані наступні методи дослідження:

- біохімічні (спектрофотометрія): для визначення рівня мінеральних компонентів сироватки крові та кісткової тканини, активності загальної лужної фосфатази та її ізоензимів;
- біомеханічні та гістологічні: для встановлення структурних змін кісткової тканини;

- імунохімічні (ELISA, вестерн-блот аналіз, імуноцито- та імуногістохімія): для визначення рівня 25OHD у сироватці крові, відносного вмісту цільових протеїнів у лізатах різних тканин щурів;
- методи молекулярної біології (полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі): для визначення рівня експресії цільових генів;
- протокова цитофлуориметрія: для ідентифікування клітин-попередників остеокластів та визначення рівня продукування активних форм кисню (АФК) та азоту;
- конфокальна мікроскопія: для встановлення колокалізації цільових протеїнів та для підтвердження транслокації NF-κB до ядра в клітинах кісткового мозку;
- методи статистичного аналізу: для обробки результатів досліджень за допомогою комп'ютерних програм MS Excel та Origin.

**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 тканинноспецифічні порушення синтезу CYP27B1: пригнічення синтезу протеїну CYP27B1 у кістковому мозку та збільшення експресії мРНК 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 ІкВ спостерігалось інгібування активності NF-κB у кістковій тканині. Виявлено, що введення вітаміну D<sub>3</sub> 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/ІкВ у кістковому мозку та кістковій тканині щурів. Вперше показано здатність вітаміну D<sub>3</sub> частково нормалізувати пул циркулюючих преостеокластів.

Вперше продемонстровано участь цитокінової системи RANKL/RANK/OPG у проявах ГК-індукованої гепатотоксичності. За дії преднізолону знижувався вміст RANK та зростав рівень прозапальних цитокінів RANKL та TNFα. Активування NF-κB у печінці призводило 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 D<sub>3</sub> 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 ІкВ у печінці, що корелювало зі зменшенням інтенсивності процесів некрозу та апоптозу гепатоцитів.

**Практична значимість.** Отримані у дисертаційній роботі експериментальні результати мають важливе значення для медичної біохімії, фармакології, токсикології та медицини, оскільки значно поглиблюють та розширюють сучасні уявлення про клітинно-молекулярні особливості розвитку вторинного глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу та роль NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів у патогенезі даного захворювання. Завдяки

виявленій здатності вітаміну D<sub>3</sub> модулювати стан сигнального шляху RANKL/RANK/OPG та системи NF-κB/IκB обґрунтована доцільність використання холекальциферолу з метою коригування перебігу процесів остеосинтезу та резорбції кісткової тканини за тривалої терапії глюкокортикоїдами. Результати дослідження слугують теоретичною основою для науково обґрунтованих практичних рекомендацій щодо комплексного застосування вітаміну D<sub>3</sub> як ефективного засобу коригування преднізолон-індукованих порушень ремоделювання кісткової тканини та зниження проявів гепатотоксичності. Результати досліджень використовуються у навчальному процесі та науковій роботі науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем самостійно здійснено пошук та аналіз сучасних джерел літератури відповідно до теми дисертаційної роботи, здійснено підбір та опрацювання молекулярно-біологічних та біохімічних методів дослідження, виконано експериментальну частину роботи протягом 2014-2017 рр., статистично проаналізовано, оформлено та узагальнено одержані результати досліджень.

Планування та розробка загальної концепції роботи, аналіз та обговорення отриманих експериментальних даних, формулювання основних положень і висновків дисертаційної роботи, 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.

Дослідження біомеханічних параметрів кісткової тканини піддослідних тварин методом «3-х точкового прогинання» були виконані на базі відділу анатомії та клітинної біології медичного факультету Університету м. Оулу м.н.с. Лабудзинським Д.О. Гістологічні зрізи кісткової тканини зроблені на базі відділу гістології та ембріології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця у співпраці з к.б.н. Савосько С.І.



**Апробація результатів 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.), 2<sup>nd</sup> 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 як у закордонних, так і у вітчизняних провідних фахових журналах, та 11 тез доповідей у збірниках матеріалів міжнародних та вітчизняних наукових конгресів, конференцій та з'їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення, висновків та списку використаних джерел (220 найменувань). Дисертацію викладено на 162 сторінках друкованого тексту, загальна кількість ілюстрацій – 6 таблиць та 39 рисунків.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Біологічна роль вітаміну D<sub>3</sub>

#### 1.1.1 Вітамін D-ендокринна система та обмін холекальциферолу

В останні роки спостерігається значне підвищення наукового інтересу до вивчення вітаміну D та його метаболізму у зв'язку з поширенням D-вітамінної недостатності в світі. Нещодавно у International Osteoporosis Foundation на основі епідеміологічних даних було складено світову карту забезпеченості вітаміном D і показано, що тільки 11,9% населення мали рекомендовані експертами рівні 25-гідроксिवітаміну D (25OHD) [9], що дає змогу констатувати пандемію D-дефіциту. Епідеміологічні, клінічні й експериментальні дослідження свідчать про тісний взаємозв'язок між дефіцитом 25OHD та підвищеним ризиком розвитку злякисних новоутворень, аутоімунних, серцево-судинних, психічних захворювань, остеопорозу та діабету [10]. На даний час вітамін D розглядають як біомаркер здоров'я людини протягом усього життя й як фактор його довготривалості [11]. У ряді країн було розроблено національні рекомендації щодо добової норми вживання вітаміну D для різних вікових категорій громадян та вибору препаратів вітаміну D. Сьогодні з метою наукового обґрунтування та удосконалення шляхів застосування препаратів вітаміну D для запобігання розвитку асоційованих з дефіцитом холекальциферолу захворювань, велика увага приділяється вивченню молекулярних механізмів його дії, що реалізуються на геномному та негеномному рівнях.

Усі представники вітамінів групи D відносяться до секостероїдів, які мають загальну кільцеву трієнову систему з трьома подвійними зв'язками в молекулі між атомами карбону в позиціях 5-6, 7-8 та 10-19 (Рис. 1.1).

Термін «вітамін D» поєднує групу молекул, серед яких розрізняють 5 форм: D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> та D<sub>5</sub>. Найбільш розповсюдженими представниками є D<sub>2</sub> (C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O, ергокальциферол, що утворюється з ергостеролу під дією сонячного світла здебільшого у рослинах) та D<sub>3</sub> (C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O, холекальциферол, що

утворюється в організмі тварин з 7-дегідрохолестеролу під впливом УФ-опромінення), які традиційно відносять до жиророзчинних вітамінів. Вітамін D<sub>3</sub> не є вітаміном у класичному розумінні, оскільки він біологічно не активний, проте за рахунок двохстадійного гідроксилювання в організмі метаболізує у гормонально активну форму – 1,25-дигідроксихолекальциферол (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) та чинить множинні біологічні ефекти через взаємодію зі специфічними рецепторами [12].

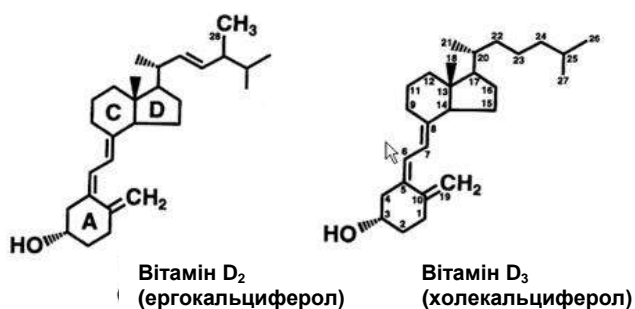


Рис. 1.1 Структурні формули ергокальциферолу та холекальциферолу [13]

Унікальність вітаміну D<sub>3</sub> полягає в тому, що забезпечення ним організму може відбуватися одночасно двома шляхами: через ендогенне утворення в шкірі під впливом ультрафіолетових променів та шляхом асиміляції екзогенного вітаміну D<sub>3</sub> з харчових продуктів чи медичних препаратів [14].

Ендогенне утворення вітаміну D<sub>3</sub> відбувається у кератиноцитах шкіри під дією УФ-опромінення і включає 4 основні стадії: 1) біосинтез сквалену та холестеролу із ацетил-СоА в печінці; 2) перетворення сквалену в 7-дегідрохолестерол (7-ДГХ) у кишечнику та шкірі; 3) фототрансформація 7-ДГХ в результаті фотолітичної неензиматичної реакції за УФ-опромінення (280-320 нм) у термолабільний провітамін D<sub>3</sub>; 4) термічна ізомеризація (при +37°C) провітаміну у холекальциферол у глибоких шарах епідермісу [15].

Іншим шляхом забезпечення потреб організму у вітаміні D є його надходження з харчовими продуктами та фармацевтичними препаратами і подальше всмоктування в проксимальному відділі тонкого кишечника шляхом пасивної дифузії (засвоюваність становить 30-50%) [16]. Жовчні кислоти сприяють солюбілізації жиророзчинного вітаміну в водному середовищі з

утворенням міцелярних структур та подальшим дифундуванням у кишечник, а потім в грудну лімфатичну протоку та кровоносну систему [17].

Як ендогенно утворений, так і екзогенний вітамін D<sub>3</sub> та його метаболіти циркулюють у крові у комплексі з вітамін D зв'язуючим протеїном (VDBP). Окрім транспортної функції VDBP також виконують роль депо 25OHD і буфера для запобігання занадто швидкому його надходженню до клітин-мішеней [18].

Для утворення гормонально активної форми вітаміну D<sub>3</sub> – 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> – необхідним є послідовне двохстадійне гідроксилування: спочатку у 25-, а потім у 1α-положенні (рис. 1.2). Перший етап гідроксилування відбувається у печінці. Із кровотоку близько 70% вітаміну D<sub>3</sub> поглинається клітинами печінки – ретикулоцитами і гепатоцитами.

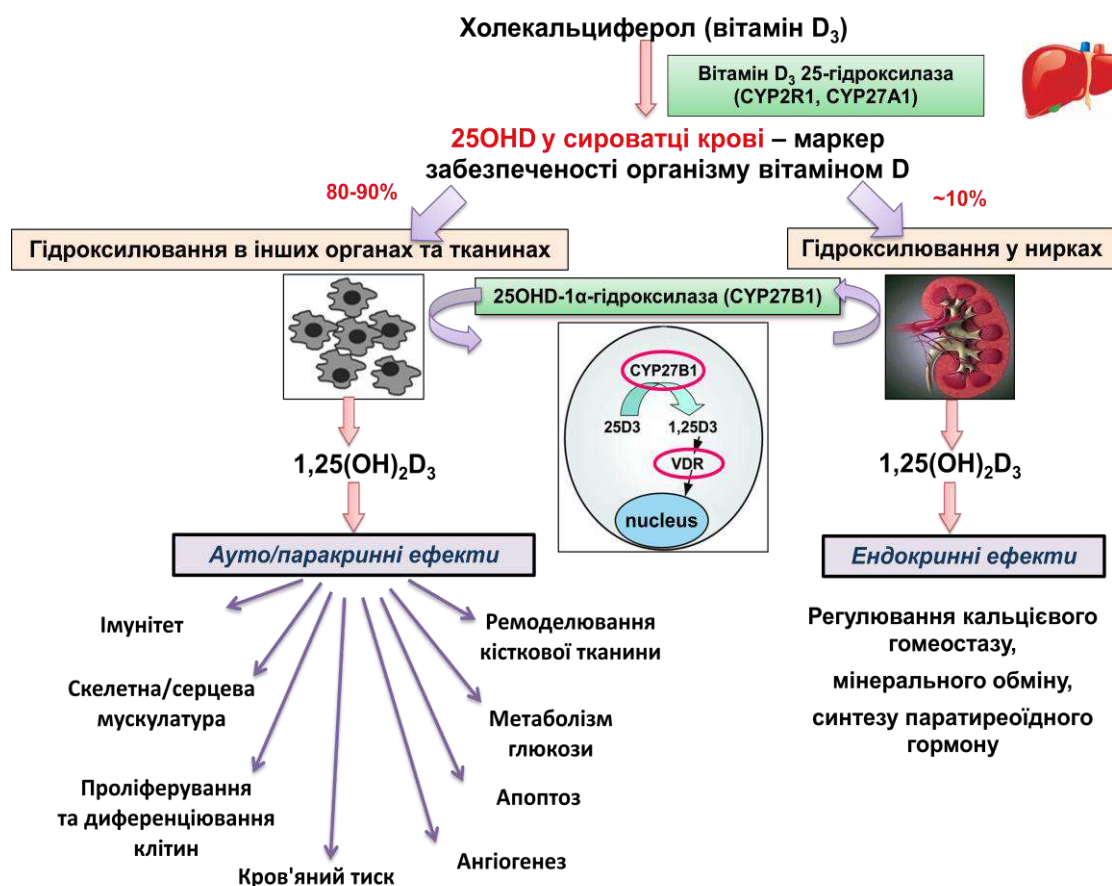


Рис. 1.2 Метаболізм вітаміну D<sub>3</sub> в організмі [19].

В печінці процес 25-гідроксилування вітаміну D<sub>3</sub> здійснюється двома ізоформами гідроксилази: локалізованою на внутрішній мембрані мітохондрій (CYP27A1) та мікросомальними (CYP2D25 і CYP2R1) [20], [21]. Ефективність

процесу 25-гідроксильовання холекальциферолу залежить не тільки від забезпеченості організму вітаміном D та активності гідроксильовуючих ензимів, але й від функціонального стану печінки [22].

Після гідроксильовання в печінці 25ОНD транспортується у зв'язаній з VDBP формі до нирок або до інших органів [23], [24], де метаболізується до  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  або  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (рис. 1.2). Синтез активних похідних здійснюється ензимами 25ОНD  $1\alpha$ -гідроксилазою та 25ОНD 24-гідроксилазою, які локалізовані не тільки у мітохондріях клітин проксимальних звивистих каналців нирок, як вважалось раніше, але й у клітинах головного мозку, м'язів, кератиноцитах, волосяних фолікулах,  $\beta$ -клітинах підшлункової залози, макрофагах, лімфоцитах та інших, що свідчить про важливу роль вітаміну  $\text{D}_3$  у регулюванні їх фізіологічних функцій [25]. Вважається, що ренальний шлях синтезу  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  відповідає за реалізацію «кальціємічної дії» холекальциферолу, а екстраренальний – за ауто/паракринну регуляцію клітинного метаболізму.

Основним регулятором ниркової 25ОНD  $1\alpha$ -гідроксилази є паратиреоїдний гормон (ПТГ), проте залучаються і інші регулятори – фосфат,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , кальцитонін, естрогени, пролактин, гормон росту [26], [27]. При низькому рівні кальцію у сироватці крові переважає синтез  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , а утворення  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  інгібується.

Експресія екстраренального CYP27B1 може регулюватись незалежно від концентрацій циркулюючого ПТГ, кальцію або  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  [28], [29] та індукуватись локальними тканинними факторами, наприклад, у кератиноцитах та макрофагах – фактором некрозу пухлин- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), інтерфероном- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) та іншими цитокінами [30], [31].

Катаболізм вітаміну  $\text{D}_3$  відбувається за участю 25-гідроксивітамін D 24-гідроксилази (CYP24A1), що експресується у всіх клітинах, функції яких регулюються  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  [32]. CYP24A1 перетворює  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  на  $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$  та 25ОНD $_3$  – на  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

Отже, серед регуляторних механізмів метаболізму вітаміну D можна виділити три основних: ПТГ активує  $1\alpha$ -гідроксилазу і знижує активність 24-гідроксилази; кальцитріол, навпаки, інгібує  $1\alpha$ -гідроксилазу та стимулює активність 24-гідроксилази; низькі рівні кальцію у сироватці крові індукують синтез  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  та інгубують  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ; а при високих концентраціях  $\text{Ca}^{2+}$  спостерігається зворотня залежність.

Таким чином, важливі відкриття щодо метаболізму холекальциферолу та залучення його гормонально активних форм у регулювання клітинних функцій дозволили виділити окрему вітамін D ауто/паракринну систему в багатьох органах та тканинах, яка включає рецептори вітаміну D та власні ензими для синтезу і катаболізму  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

### 1.1.2 Молекулярні механізми дії вітаміну D<sub>3</sub>

Гормонально активні метаболіти вітаміну D реалізують біологічну дію двома шляхами: подібно до дії стероїдних гормонів на геномному рівні – через ядерні рецептори вітаміну D (VDR) або негеномним шляхом через мембранні рецептори або модуляцію інших сигнальних шляхів [33], [34].

Вважається, що негеномний механізм дії реалізується через асоційовані з мембранами рецептори вітаміну D (mVDR) [35]. Інші джерела свідчать про те, що реалізація швидких ефектів може відбуватись за рахунок безпосереднього модулювання інших сигнальних шляхів або активності ензимів у клітинах-мішенях [36]. Виявлено, що гормонально активні форми вітаміну D регулюють активність ензимів *in vitro* на ізольованих мембранних везикулах за відсутності VDR, без запуску транскрипції та синтезу нових протеїнів, що вказує на їх вплив безпосередньо на плинність мембран та їх функції [13]. Дослідження також показали, що  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  може модулювати стан сигнальних шляхів, які запускаються на плазматичній мембрані через Wnt, трансформуючий фактор росту  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) та епідермальний фактор росту (EGF) [36]. Отже, комплексна біологічна активність  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  опосередковується не тільки геномною дією

через VDR, але й здатністю взаємодіяти з мембранно-асоційованими сигнальними шляхами, модулювати плинність мембран та активність ензимів.

На геномному рівні фізіологічна дія вітаміну D<sub>3</sub> реалізується через високоспецифічні VDR, що належать до родини ядерних рецепторів, підродини рецепторів гормонів щитовидної залози і ретиноєвої кислоти [37]. VDR – протеїн з 427 амінокислотних залишків, з молекулярною масою 72-80 кДа [38], що має класичну доменну структуру:

- 1) аміно-кінець є змінної довжини і містить трансактиваційний домен (AF-1) та ДНК-зв'язувальний домен (DBD) з двома мотивами типу цинкових пальців, які відповідають за протеїн-ДНК взаємодію;
- 2) карбокси-кінець містить ліганд-зв'язувальний домен (LBD) та AF-2 домен. С-кінець складається з 12  $\alpha$ -спіралей, амінокислотні залишки яких утворюють динамічну ліганд-зв'язувальну кишеню. Взаємодія VDR з 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> веде до утворення двох поверхонь для зв'язування, одна з яких полегшує взаємодію з гетеродимерним партнером, необхідним для зв'язування специфічної ДНК, а інша має важливе значення для залучення корегуляторного комплексу, необхідного для модулювання експресії генів [39]–[41].
- 3) шарнірний неструктурований регіон, що зв'язує DBD та LBD [42].

Гормонально активні метаболіти вітаміну D<sub>3</sub> проявляють свій фізіологічний ефект подібно до дії стероїдних гормонів за наступною узагальненою схемою (рис. 1.3):

- 1) 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> проникає у клітину-мішень і зв'язується з вільними цитоплазматичними VDR;
- 2) утворений комплекс 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-VDR проникає до ядра клітини, де зв'язується з X-рецептором ретиноєвої кислоти (RXR). Гетеродимерний комплекс 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-VDR/RXR із залученням різних коактиваторів та корепресорів взаємодіє зі специфічними послідовностями – «елементами відповіді на вітамін D» (VDRE) у проксимальних промоторах та дистальних регуляторних регіонах таргетних генів-мішеней. Коактиваторні комплекси протеїнів взаємодіють з С-кінцевим AF-2 доменом VDR [43].

3)  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR/RXR гетеродимер трансактивує гени-мішені шляхом зв'язування з двома прямими гексамерними повторами (A/G)G(G/T)TCA у VDRE, розділеними трьома неспецифічними нуклеотидами. VDR також опосередковує  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -залежну трансрепресію шляхом зв'язування з негативними VDREs (nVDREs). Проте механізми негативного регулювання через VDR є значно менш вивченими та можуть включати дію VDR в якості кофактора, який пригнічує експресію генів через взаємодію з іншими транскрипційними факторами без прямого зв'язування з ДНК [44].

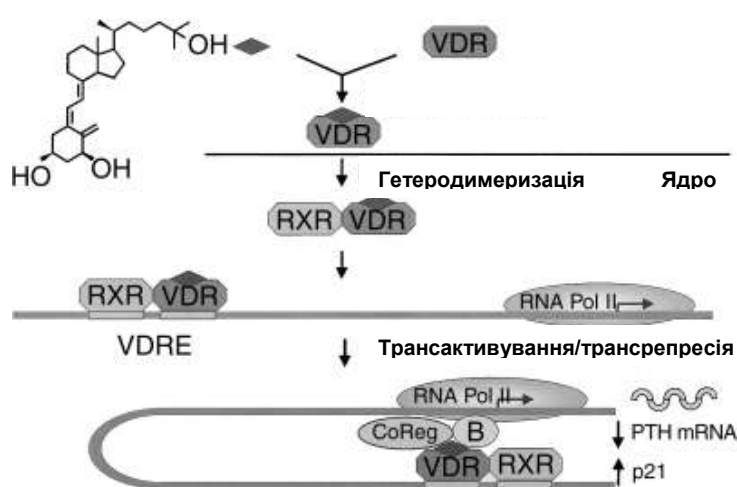


Рис. 1.3 Механізм дії вітаміну D<sub>3</sub> [45]

Отже, VDR, діючи як лігандкерований транскрипційний фактор, здатний генерувати біологічну відповідь у більш ніж 40 тканинах-мішенях, контролюючи прямо або опосередковано експресію понад 500 генів. Більше того, показана здатність VDR функціонувати за відсутності  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , зв'язуючи інші ліпофільні ліганди, такі як токотрієнол, літохолева кислота та поліненасичені жирні кислоти, хоча і з низькою афінністю [38].

Велика кількість VDR знаходиться у клітинах шлунково-кишкового тракту (дванадцятипала, тонка, товста кишки) та остеобластах; менше – в клітинах нирок, щитоподібної залози, шкіри, підшлункової залози, гіпофізу, міокарду, плаценти, лейкоцитах. На сьогодні встановлено, що відповідь на зв'язування  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  з VDR є тканиннспецифічною [26].



Порушення функціонування VDR пов'язане з розвитком патологічних процесів у кістковій тканині (остеопороз, D-резистентний рахіт, остеоартрит, остеопенія), злякисним ростом, імунними, метаболічними, нирковими (сечокам'яна хвороба), серцево-судинними патологіями (атеросклероз, гіпертонія, інфаркт міокарда), запальними захворюваннями (аутоімунний гепатит, цукровий діабет II типу, вовчак, цироз, хвороба Аддісона, псоріаз, хвороба Крона, артрит, астма, пародонтит, розсіяний склероз), неврологічними розладами (бічний аміотрофічний склероз, хвороба Альцгеймера), підвищеною чутливістю до інфекцій і порушеннями росту (низька вага при народженні, низька маса тіла). Миші, нокаутні за VDR, окрім вищезазначених розладів, мають також невелику тривалість життя (рис. 1.4).

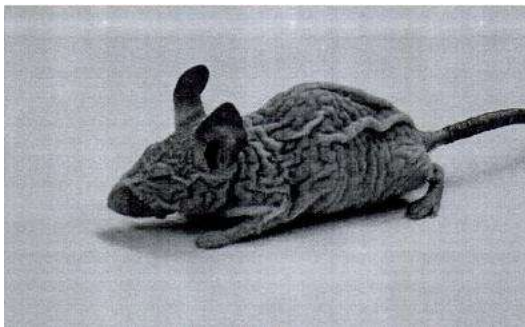


Рис.1.4 Миша, нокаутна за VDR [46]

Такі важкі наслідки, викликані порушенням функцій VDR, пояснюються великою кількістю генів, що знаходяться під його контролем. Окрім генів, що залучені у регулювання мінерального обміну, були ідентифіковані інші гени-мішені, серед яких кальцієві та фосфатні транспортери в кишечнику і нирках, фактор диференціювання остеокластів – ліганд рецептора активатора NF-κB (RANKL) [47], остеокальцин [48], остеопонтін та інші. Вітамін D регулює також генні мережі, задіяні в обміні жовчних кислот, деградації ксенобіотиків, диференціюванні кератиноцитів в шкірі, розвитку волосяних фолікулів [46].

Наразі використовуються нові методики, такі як імунопреципітація хроматину з гібридизацією на ДНК-мікрочипах (ChIP-chip) та з високо-ефективним секвенуванням (ChIP-seq) або робота з трансгенними мишами, які

дозволять в деталях розуміти, як саме комплекс  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR}$  модулює генні мережі у різних типах клітин.

### 1.1.3 Плейотропні ефекти вітаміну $\text{D}_3$

Погляди щодо фізіологічної ролі вітаміну  $\text{D}_3$  в організмі тривалий час обмежувались тільки так званими «класичними» ефектами, а саме його участю у регулюванні мінерального обміну. Проте на сьогодні відомо, що вітамін  $\text{D}_3$  чинить багато інших неklasичних ефектів в різних органах. Плейотропність дії холекальциферолу обумовлена наявністю рецепторів до його гормонально активних форм та ензиму  $1\alpha$ -гідроксилази у різних тканинах. Локальне продукування  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  істотно не впливає на його загальний циркулюючий рівень, проте є активним тканиннспецифічним паракринним регулятором [49].

Виділяють 3 групи процесів від клітинного до системного рівня, що регулюються за участю вітаміну  $\text{D}_3$ :

- 1) регуляція проліферування, диференціювання та апоптозу клітин;
- 2) регуляція обміну речовин в організмі: протеїнового, ліпідного, мінерального; регуляція синтезу рецепторів, ензимів, гормонів (ПТГ, кальцитоніну, тиротропіну, глюкокортикоїдів, пролактину, інсуліну тощо);
- 3) регуляція функціональної активності багатьох органів та систем: імунної, репродуктивної, серцево-судинної, шлунково-кишкового тракту, печінки, нирок, підшлункової залози та інших.

На сьогодні найбільш вивченими є класичні ефекти вітаміну  $\text{D}_3$ , а саме вплив на обмін кальцію та фосфатів. Кальцитріол підтримує рівень кальцію та неорганічних фосфатів в сироватці крові у вузьких фізіологічних межах (2,10-2,55 ммоль/л) [50] за рахунок впливу на їх всмоктування в кишечнику, реабсорбцію в ниркових каналцях та мобілізацію із кісткової тканини.

Молекулярні механізми підтримання кальцієвого гомеостазу та його взаємозв'язок з метаболізмом кісткової тканини є досить складними та тісно переплетеними [51]. При низькій концентрації іонів кальцію запускається механізм резорбтивної мобілізації кальцію з кісткової тканини для підтримання

його нормального рівня у сироватці. Вітамін D<sub>3</sub> в організмі забезпечує гнучку систему підтримання гомеостазу кальцію в залежності від його вмісту в раціоні й сироватці крові, співвідношення активних метаболітів вітаміну D<sub>3</sub> та інших факторів. При нестачі кальцитріолу порушується утворення фосфату кальцію і кристалів гідроксиapatиту в органічному матриксі кісткової тканини, що призводить до розвитку рахіту та остеомалачії [46]. Кальцитріол разом з ПТГ і кальцитоніном складають тріаду кальціотропних гормонів, дія яких спрямована на підтримання сталого рівня кальцію і фосфатів у сироватці в межах фізіологічного діапазону.

Узгоджене функціонування остеолітичних (остеокласти) та остеогенних (остеобласти) клітин забезпечує адекватний перебіг ремоделювання кісткової тканини [52]. Одним з найважливіших факторів, що регулюють ремоделювання кісткової тканини, є гормонально активні форми вітаміну D<sub>3</sub>, які модулюють процеси проліферування і диференціювання клітин кісткової тканини [53]. В кістковій тканині VDR експресується в остеобластах, остеоцитах та хондроцитах [54]. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/VDR сигналювання здійснює прямі фізіологічні ефекти на остеобласти та хондроцити, впливаючи тим самим на мінеральну щільність кісткової тканини (МЩКТ) незалежно від системних ефектів вітаміну D на регулювання обміну кальцію і фосфатів.

Ген остеокальцину був першим геном, для якого показано, що він безпосередньо контролюється VDR, а тому став класичною моделлю для досліджень 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-залежного трансактивування VDR. Окрім остеокальцину, VDR в кістковій тканині контролює експресію генів, що кодують важливі ефектори кісткового та системного гомеостазу: остеопонтін, остеопротегерин (OPG), RANKL, Runt-пов'язаний транскрипційний фактор X2 (Runx2) та фактор росту фібробластів 23 (FGF23) [37]. Окрім того, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> також впливає на остеобласти, що проліферують, збільшуючи синтез ними специфічного протеїну органічного матриксу – колагену, що утворює сітку міжклітинного матриксу, на якій відкладаються солі кальцію і фосфати [55].

Щодо впливу на остеокласти, то на культурі кісткової тканини ембріонів щурів було показано, що  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  володіє високою резорбтивною активністю, діючи вже при концентрації 10 пг/мл, у той час як подібний ефект для  $25\text{OH}\text{D}$  виявлявся при 50 нг/мл, а для  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  – при 500 нг/мл [56].

Оскільки одним з неklasичних ефектів вітаміну D є його роль у регулюванні функціонування печінки, то доцільно припустити, що недостатність вітаміну D може бути одним з факторів порушення злагодженого функціонування кісткової системи та печінки та може лежати в основі розвитку різних захворювань кісткової тканини, наприклад, печінкової остеодистрофії.

Разом з фарнезоїдним X рецептором (FXR) та прегнановим X рецептором (PXR), VDR належить до числа ядерних рецепторів, що активуються жовчними кислотами та відіграють роль у регулюванні гепатобіліарного гомеостазу та секреції жовчі [57]. VDR є сенсором для вторинних жовчних кислот у кишечнику та активується літохолієвою кислотою [58]. В печінці VDR експресується у непаренхіматозних клітинах, таких як клітини Купфера, ендотеліальні клітини, епітеліальні клітини жовчних протоків та стелатні клітини, проте майже не експресується в гепатоцитах [59]. В епітеліальних клітинах жовчних протоків активування VDR жовчними кислотами або вітаміном D індукує експресію антимікробного пептиду кателіцидіну [60], сприяючи підтриманню вродженого імунітету. VDR в активованих стелатних клітинах інгібує їх проліферування та пригнічує синтез колагену, що пояснює антифіброзні ефекти вітаміну D на моделі фіброзу печінки щурів [61].

Оскільки порушення абсорбції жиророзчинних вітамінів є ознакою холестази і важкої дисфункції печінки, як правило, у пацієнтів з холестазом спостерігається низький рівень вітаміну D в сироватці крові, що має негативні наслідки для гомеостазу кісткової тканини. Накопичення літохолоєвої кислоти при холестазі знижує ефекти вітаміну D на остеобласти людини, діючи в якості конкурентного ліганду для VDR [62] і тим самим сприяючи розвитку остеопорозу у пацієнтів з холестазом.

Саме завдяки його множинним ефектам вітамін D<sub>3</sub> може бути залучений до профілактики серцево-судинних захворювань, гіпертонії і цукрового діабету, лікування ревматоїдного артриту, запальних захворювань кишечника, псоріазу та нейродегенеративних патологій [63], [64].

Оскільки вітамін D<sub>3</sub> розглядається одночасно як імуномодулятор та остеопротектор, значна увага в дослідженнях приділяється остеоімунній взаємодії завдяки наявності спільних регуляторних ланок. Головною сполучною ланкою між імунною та кістковою системами вважається цитокінова система RANKL/RANK/OPG [65]. Незважаючи на великий масив експериментальних даних, молекулярні механізми остеоімунної взаємодії та можлива роль її порушення у патогенезі остеопорозу недостатньо висвітлені, тому необхідні дослідження, що дозволять глибше зрозуміти регуляторні ефекти вітаміну D<sub>3</sub> на остеоімунну взаємодію через модулювання стану цитокінової системи RANKL/RANK/OPG.

#### **1.1.4 Дефіцит вітаміну D<sub>3</sub> як фактор розвитку остеопорозу**

Оскільки вітамін D приймає участь у регулюванні обміну речовин в організмі та функціонуванні багатьох органів і систем, вкрай важливим є достатній ступінь забезпеченості організму холекальциферолом, який визначається за рівнем 25ОНD. По-перше, 25ОНD є спільним метаболітом як вітаміну D, що синтезувався у шкірі, так і вітаміну D, що надійшов з їжею; по-друге, вміст 25ОНD у крові є відносно високим; по-третє, значний період його напіврозпаду (2-3 тижні) дає можливість для визначення його концентрації лабораторними методами. Натомість, 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> має період напіврозпаду всього 4-6 годин, а його рівень на порядок нижчий, ніж 25ОНD [66]. Тому, незважаючи на те, що 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> є основною біологічно активною формою холекальциферолу, саме концентрація 25ОНD вважається індикатором D-вітамінного статусу організму [67].

Існує два ступеня забезпеченості вітаміном D. Перший ступінь відповідає рівню 25ОНD у сироватці крові близько 20 нг/мл, щоб задовольнити потребу

організму для ниркового синтезу  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , який регулює засвоєння кальцію, його мобілізацію з кісткової тканини і мінералізацію кісток. Другий ступінь потребує більш високих концентрацій циркулюючого 25ОНD (не менше 40 нг/мл) для забезпечення максимально ефективного перебігу синтезу  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  екстраренально [68].

Раніше вважалось, що за фізіологічних умов потреба у вітаміні D становить 1000-2000 МО на добу [69]. Проте на даний час не існує єдиної думки щодо оптимального статусу забезпеченості вітаміном D та мінімально ефективного рівня 25ОНD, і, як наслідок, лишається відкритим питання щодо дозування вітаміну D для щоденного прийому. Зважаючи на світову тенденцію до персоналізованої медицини, наразі висловлюється концепція «персонального індексу чутливості до вітаміну D» [70]. Впровадження такої концепції, яка відображала би ефективність відповіді організму на прийом препаратів вітаміну D на молекулярному рівні, має допомогти підібрати оптимальний протокол дозування холекальциферолу для кожної людини. Запропоновано розділити високо-, середньо- і низькочутливих до вітаміну D осіб на основі вимірювання вітамін D-чутливих молекулярних параметрів, таких як зміни епігенетичного статусу та транскрипції відповідних генів у імунних клітинах крові, рівня VDBP та метаболітів вітаміну D в сироватці.

Оскільки консенсус відносно оптимального рівня сироваткового 25ОНD досі відсутній, вирізняють кілька класифікацій забезпеченості організму вітаміном D, одна з яких наведена у табл. 1.1 [71]. На думку багатьох експертів, дефіцит вітаміну D існує тоді, коли рівень 25ОНD є нижчим за 20 нг/мл (50 нмоль/л). Оптимальна концентрація 25ОНD повинна підтримуватись на рівні 100-150 нмоль/л (40,0 - 60,0 нг/мл) [66], [72].

Результати епідеміологічних досліджень демонструють, що D-гіповітаміноз спостерігається у близько 1 млрд. людей [73], [74]. Так, співробітниками ДУ «Інститут геронтології імені акад. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України» виявлено, що лише 4,6% жителів України мали рівень 25ОНD у сироватці крові у межах норми, у 13,6% відзначено D-гіповітаміноз, а у 81,8%

– D-вітамінна недостатність [75]. Зважаючи на ці дані, для України питання недостатньої забезпеченості населення вітаміном D є також доволі актуальним.

Таблиця 1.1

Класифікація ступеня забезпеченості організму вітаміном D<sub>3</sub>

№	Концентрація 25ОНD		Діагноз
	нг/мл	нмоль/л	
1	< 10,0	< 25,0	D-вітамінний дефіцит
2	10,0 - 20,0	25,0 - 50,0	D-вітамінна недостатність
3	20,0 - 40,0	50,0 - 100,0	D-гіповітаміноз
4	40,0 - 60,0	100,0 - 150,0	Оптимальний рівень
5	> 100,0	> 250,0	D-гіпервітаміноз

Серед найбільш поширених факторів ризику розвитку D-гіповітамінозного стану необхідно виділити: зменшення часу перебування на сонці, використання сонцезахисних засобів, зменшене надходження екзогенного вітаміну D (обмеження раціону, недостатність у продуктах харчування), порушення метаболізму вітаміну D, розвиток D-резистентності, хронічні захворювання, постменопаузальний стан, вагітність, похилий вік, ожиріння та вплив лікарських препаратів (глюкокортикоїди, антикоагулянти тощо) [71], [76].

Найбільш поширеним наслідком дефіциту вітаміну D, в тому числі і ГК-індукованого, вважається остеопороз – системне захворювання скелету, що характеризується порушенням метаболізму кісткової тканини, пошкодженнями її мікроархітекtonіки та подальшим збільшенням частоти переломів кісток.

## 1.2 Глюкокортикоїд-індукований остеопороз та обмін вітаміну D<sub>3</sub>

### 1.2.1 Глюкокортикоїди – стероїдні гормони системної дії та медичні препарати

Синтетичні ГК – це препарати, за хімічною будовою подібні до природних глюкокортикоїдів (рис. 1.5), які застосовуються для лікування хронічних запальних станів – астми, хронічних обструктивних легеневих захворювань, шкірних та очних інфекцій, а також для пригнічення імунної

відповіді у пацієнтів після трансплантації органів. Окрім протизапальних властивостей, ГК мають також антипроліферативні та антиангіогенні ефекти, а тому застосовуються при лікуванні онкопатологій [77].

Преднізон, преднізолон, дексаметазон і будесонід – найбільш поширені синтетичні ГК у медичній практиці. Як ліпофільні речовини, ГК зв'язуються й транспортуються з протеїнами сироватки крові [78] та метаболізуються мікосомальними ензимами печінки з утворенням неактивних метаболітів.

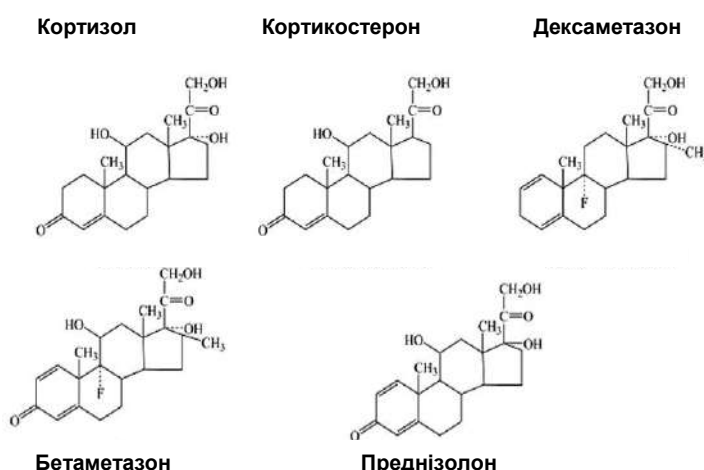


Рис. 1.5 Хімічна будова глюкокортикоїдів та їх синтетичних аналогів.

ГК реалізують біологічні ефекти шляхом геномних і негеномних механізмів, перемикання між якими, як вважається, залежить від дози. Наприклад, за низьких концентрацій ГК ( $\geq 10$ -12 моль/л) проявляються геномні ефекти, для розвитку яких потрібно більше 30 хв, а за високих ( $\geq 100$  моль/л) – негеномні, які проявляються через декілька секунд чи хвилин [79]. Негеномна дія може бути реалізована через активування певних сигнальних систем, таких як MAP-протеїнкіназний шлях [80]. Експериментально підтверджено, що швидкі ефекти ГК спостерігались у серцево-судинній, імунній та нейроендокринній системах [81], [82].

Проте множинні ефекти як природних, так і синтетичних ГК опосередковані геномною дією через зв'язування з глюкокортикоїдними рецепторами (GR), які діють як ліганд-залежні транскрипційні фактори. GR експресуються майже у всіх типах клітин і, відповідно, модулюють численні метаболічні шляхи, включаючи регулювання водно-сольового, ліпідного, вуглеводного і протеїнового обмінів [83]. Проте, через неонатальну летальність



GR-нокаутних мишей, які мали дихальну недостатність [84], фізіологічні функції GR у тканинах дорослих тварин повністю не з'ясовано.

GR, як і VDR, належить до надродини ядерних рецепторів та являє собою модульний протеїн, що містить N-кінцевий трансактиваційний домен (NTD), центральний ДНК-зв'язувальний домен (DBD), C-кінцевий ліганд-зв'язувальний домен (LBD) та гнучкий «шарнірний регіон». Два мотиви типу «цинкових пальців» у складі DBD розпізнають та зв'язують специфічні ДНК-послідовності цільових генів – ГК-чутливі елементи (GREs). DBD та LBD містять специфічну сигнальну послідовність, яка опосередковує транслокацію GR до ядра за імпорин-залежним механізмом [85].

За відсутності ГК, GR знаходиться у цитоплазмі у неактивному стані, входячи до складу мультипротеїнових комплексів з протеїнами теплового шоку (Hsp90, Hsp70) та імунофіліном P59 [86]. Hsp-протеїни підтримують оптимальну конформацію гормонзв'язуючого домену рецептора й забезпечують високу спорідненість рецептора до гормону. Після проходження через ліпідний бішар клітинної мембрани ГК зв'язуються з GR, який при цьому зазнає конформаційних змін, що призводить до дисоціації олігомерного протеїнового комплексу та від'єднання Hsp-протеїнів та імунофіліну. Зв'язаний з лігандом GR транслокується до ядра, гомодимеризується, призводячи до транскрипційного активування або репресії шляхом прямого високоафінного зв'язування з GREs, що виявлені в промоторах та інтрагенних областях генів-мішеней глюкокортикоїдів. Нещодавно були виявлені так звані «негативні» GRE-послідовності, до яких можуть залучатися специфічні корепресори [87].

Таким чином, GR може регулювати експресію генів за 3 механізмами: 1) зв'язування з GRE генів-мішеней та активування транскрипції генів; 2) інгібування транскрипції цільового гену шляхом прямого зв'язування з ДНК; 3) регулювання генів через взаємодію з іншими факторами транскрипції (наприклад, з ядерним фактором κВ) [88].

Прикладами генів, що позитивно регулюються GR є гени, що кодують тирозинову амінотрансферазу, фосфоенолпіруваткарбоксилазу, ГК-індуковану

лейцинову «блискавку» (GILZ), GK-регульовану кіназу 1 сироватки крові та мітоген-активовану протеїнову кіназу фосфатази-1 [89], [90]. Прикладами генів, що негативно регулюються GR, є  $\beta$ -арестін 2, остеокальцин, проопіомеланокортин та власне сам ген GR – NR3C1 [91], [92].

Процеси трансактивування вважаються відповідальними за численні побічні ефекти GK, процеси трансрепресії – за терапевтичні протизапальні та імуносупресивні ефекти [93]. Трансрепресія генів-мішеней може відбуватись за непрямим механізмом – завдяки фізичній взаємодії між мономерними GR та такими факторами транскрипції, як c-Jun, c-Fos та NF- $\kappa$ B, які координують транскрипційне активування генів, залучених до розвитку запальних процесів. Зокрема, три основні домени GR можуть взаємодіяти з p65 субодиницею NF- $\kappa$ B і з обома AP-1 компонентами c-Jun і c-Fos. Такий взаємний антагонізм факторів транскрипції, залучених до цих протеїн-протеїнових асоціацій, перешкоджає зв'язуванню як GR, так і інших транскрипційних факторів зі специфічними послідовностями ДНК. Крім того, GK збільшують синтез I $\kappa$ B і, таким чином, інгібують NF- $\kappa$ B, сприяючи його утриманню в цитозолі. GR також можуть кооперуватись з такими факторами транскрипції як Oct1 та Oct2, CREB та STAT5 [88].

Отже, GR регулюють гени, що кодують ензими вуглеводного, протеїнового, ліпідного метаболізму, гормони та їх рецептори, протеїни гострої фази запалення, ензими метаболізму ксенобіотиків, антибактеріальні компоненти захисту, протеїни, що регулюють розвиток та запрограмовану загибель клітин [94]. Множинні ефекти GK на системи органів, приклади терапевтичного застосування та можливі побічні ефекти наведені у табл. 1.2. Завдяки протизапальним, антипроліферативним, проапоптотичним та антиангіогенним властивостям, GK є ефективними терапевтичними засобами при лікуванні бронхіальної астми, ревматоїдного артриту, червоного вовчаку, лейкозів, дерматозів тощо. Проте, як показано у табл. 1.2, тривале застосування або високе дозування GK може призводити до прояву їх негативних ефектів, серед яких найбільш поширеним є GK-індукований остеопороз.

## Ефекти глюкокортикоїдів на органи-мішені

Фізіологічна система	Фізіологічна роль	Застосування в медицині	Побічні ефекти
Дихальна система	Супресія синтезу цитокінів, хемокінів та молекул клітинної адгезії	Астма, хронічні обструктивні захворювання легень	
Імунна система	Супресія синтезу прозапальних цитокінів, регулювання дозрівання, мігрування та апоптозу імунних клітин	Імуносупресорний ефект при трансплантації органів	Збільшення чутливості до інфекцій
Метаболізм глюкози та печінка	Регулювання рівня глюкози, резистентність до інсуліну, регуляція обміну ліпідів		Ожиріння, гіперглікемія, гіперліпідемія
М'язова та кісткова системи	Протизапальний ефект, регулювання метаболізму м'язів, апоптозу остеобластів та остеокластогенезу	Ревматоїдний артрит	Остеопороз, м'язова слабкість, судоми м'язів
Нервова система	Підтримання фізіологічного гомеостазу, відповідь на стресорні фактори,		Психіатричні розлади, підвищена втомлюваність, підвищення внутрішньочерепного тиску
Органи зору	Протизапальний та протиангіогенний ефекти, виживання фоторецепторних клітин	Увеїт, кератит	Глаукома, підвищення внутрішньоглазного тиску
Репродуктивна система	Регулювання функцій статевих залоз, розвиток та дозрівання органів ембріонів	Стимулювання передчасних пологів	Затримка статевого дозрівання, порушення менструального циклу
Серцево-судинна система	Протизапальний ефект, підтримання сталого кров'яного тиску та тону судин, протиангіогенний ефект		Артеріальна гіпертензія, тромбоемболія, дистрофія міокарда
Шкіра	Протизапальний ефект, регулювання цілісності епітелію	Псоріаз, екзема	Гіперемія шкіри, уповільнення загоєння ран, підвищена пітливість

### 1.2.2 Біохімічні та клітинно-молекулярні механізми розвитку остеопорозу за довготривалої дії глюкокортикоїдів

Згідно епідеміологічних досліджень, 3% населення віком від 50 років та 5,2% – від 80 років використовують ГК [95]. Використання навіть низьких доз преднізолону (7,5 мг/день) має несприятливі наслідки для організму [96]. ГК-індукований остеопороз є одним з найбільш деструктивних побічних ефектів

довготривалої глюкокортикоїдної терапії, оскільки втрата маси кісткової тканини, як правило, є незворотною. Згідно досліджень, у 30% хворих із тривалою ГК терапією (> 6 місяців) розвивається остеопороз [97], а у 50% пацієнтів, які потребують ГК для постійного контролю хронічних запальних легеневих, ревматологічних, аутоімунних, шлунково-кишкових захворювань або для запобігання відторгнення трансплантатів, виникають переломи [98]. Так, ризик переломів хребців підвищений у 2-5 разів в залежності від добової дози преднізону. Показано, що втрата маси кісткової тканини є двофазною: 1) швидка початкова фаза – зниження приблизно на 12% протягом перших кількох місяців; 2) повільна фаза, що настає при подальшому використанні ГК – втрата маси кісткової тканини від 2% до 5% щорічно [99].

ГЮ – це метаболічне захворювання кісткової тканини, що розвивається внаслідок негативного впливу ГК на процес кісткового ремоделювання. Дослідження гістоморфометричних показників пацієнтів, що отримували високі дози ГК без остеопротекторних препаратів, показали загальмовану швидкість остеосинтезу, що було пов'язано із зменшенням кількості остеобластів, тоді як резорбція кісток була незмінною [100]. Інші джерела свідчать про те, що ГК можуть посилювати резорбцію кісткової тканини на тлі гальмування її формування [101], [102]. Проте механізми розвитку ГК-індукованого остеопорозу на клітинному і молекулярному рівнях є недостатньо з'ясованими, що перешкоджає ефективному пошуку препаратів для профілактики та лікування даного захворювання.

Протягом останніх років було з'ясовано, що ГК індукують порушення диференціювання та апоптоз остеобластів та остеоцитів шляхом активування каспази-3 [103] або кінази глікогенсинтази  $3\beta$  (GSK $3\beta$ ), яка відіграє важливу роль у шляху Wnt – сигнальному каскаді, що регулює остеобластогенез [104]. Це призводить до значного гальмування швидкості утворення кісткової тканини та руйнування остеоцитарно-каналцевої мережі [105]. Крім того, ГК можуть гальмувати Wnt-сигналювання за рахунок збільшення продукування його інгібіторів, таких як Dkk-1 [106]. Більше того, ГК гальмують формування

кісткової тканини шляхом пригнічення експресії генів, що є маркерами диференціювання остеобластів, таких як BMP [107], Runx2 та колаген типу I [108]. Крім того, ГК «перемикають» диференціювання стромальних клітин кісткового мозку – клітин-попередників остеобластів – на адипоцитарний шлях, що, в основному, опосередковано збільшеною експресією PPAR $\gamma$  та репресією остеогенного транскрипційного фактору Runx2 [109]. Також високі дози ГК індують адипогенез шляхом гальмування AP-1. Таким чином, трансрепресія AP-1 не тільки опосередковує протизапальні дії ГК, але також приводить до патологічних змін у кістковій тканині [110]. Проте, є експериментальні дані щодо здатності культивованих преостеобластів утворювати мінералізовані осередки у відповідь на вплив ГК [111]. Такий парадокс вказує на те, що супресивні ефекти ГК на формування кісткової тканини *in vivo* можуть відображати дію ГК на неостеобластні клітини або на інші системи, наприклад, гепатобіліарну та імунну, порушення функціонування яких може призводити до продукування паракринних факторів, що негативно впливають на формування кісткової тканини.

Окрім прямого впливу на остеобласти, ГК гальмують апоптоз остеокластів та збільшують тривалість їх життя [112]. Посилення резорбції може опосередковуватись двома основними процесами: за рахунок утворення нових остеокластів або зростання активності зрілих клітин. Проте це твердження є дискусійним, оскільки нещодавні дослідження *in vitro* показали, що прямий вплив ГК на остеокласти призводить до зниження їх резорбтивної активності внаслідок неспроможності прикріпитись до кістки, що обумовлено порушеннями цитоскелету остеокластів [113]. Показано, що дексаметазон збільшував термін життя остеокластів, проте їх загальна резорбтивна активність *in vitro* була пригнічена [114]. Отже, якщо прямий вплив ГК на остеобластну ланку є доволі вивченим, то питання про вплив ГК на остеокласти та диференціювання їх попередників потребує подальших досліджень.

Сьогодні ГЮ розглядають як мультифакторне захворювання, у патогенезі якого лежать не тільки порушення у кістковій тканині, але й порушення у

функціонуванні багатьох інших органів та систем. Крім прямих ефектів на остеобласти, остецити та остеокласти, ГК опосередковано впливають на стан кісткової тканини порушуючи мінеральний, вуглеводний, ліпідний обміни, а також функціонування гепатобіліарної, імунної та статевої систем.

Негативна дія ГК на мінеральний обмін виявляється у пригніченні всмоктування кальцію в кишечнику, підсилюванні його ниркової екскреції й виходу із кісткової тканини, що призводить до розвитку гіпокальціємії і гіперкальціурії; розвитку фосфатурії і зниження каналцевої реабсорбції фосфатів; зменшенні секреції кальцитоніну та кількості одиниць ремоделювання кісткової тканини; інтенсифікації формування ділянок некрозу кісткової тканини тощо [14]. Негативний баланс кальцію в організмі призводить до гіперсекреції ПТГ, що підсилює резорбцію кісткової тканини.

Дія ГК на вуглеводний обмін проявляється у стимуляції глюконеогенезу в печінці, зменшенні проникності мембран для глюкози, гіперглікемії, глюкозурії та розвитку стероїдного діабету. ГК посилюють процеси катаболізму протеїнів, особливо в шкірі, в м'язовій і кістковій тканинах, що веде до схуднення, м'язової слабкості, атрофії шкіри і м'язів, крововиливів, уповільнення загоєння ран. Як наслідок розпаду протеїнового матриксу кісток і гіпокальціємії розвивається остеопороз [115], [116].

Крім того, ГК викликають зниження рівня статевих гормонів [117] та пригнічення секреції соматотропного гормону, що також розглядається як один з факторів розвитку глюкокортикоїдного остеопорозу.

Одним із потенційних механізмів розвитку вторинного остеопорозу може бути втрата кісткової маси у зв'язку з гепатотоксичністю глюкокортикоїдних препаратів [118]. Показано, що глюкокортикоїди відіграють важливу роль у функціонуванні гепатобіліарної системи, регулюючи гомеостаз жовчних кислот та модулюючи експресію транспортерів жовчних кислот – NTCP, ASBT та OST $\alpha/\beta$  [44]. Зважаючи на це, окрім лікування запальних і аутоімунних захворювань, ГК також розглядаються як препарати для коригування різних холестатичних розладів, що діють через модуляцію транспортерів жовчних

кислот [119]. Проте використання ГК обмежене, окрім класичних побічних ефектів, підвищеним ризиком розвитку жовчнокам'яної хвороби [120]. Асоційовані із захворюваннями печінки різноманітні порушення у кістковій тканині на сьогодні класифікують як печінкову остеодистрофію.

Таким чином, тривале застосування ГК призводить до розвитку остеопорозу за рахунок як прямого негативного впливу на кісткову тканину, так і опосередкованих ефектів ГК на метаболізм та функціонування інших органів та систем, в тому числі і на метаболізм холекальциферолу.

### **1.2.3 Вплив глюкокортикоїдів на метаболізм вітаміну D<sub>3</sub>**

За даними клінічних спостережень, довготривалий прийом ГК може обумовлювати різноспрямовані ефекти на рівень 25ОНD та 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в сироватці крові. Так, їх вміст у сироватці крові людей з тривалою ГК терапією може знижуватись, не змінюватись, або, навіть, зростати [121], [122]. Проте експериментальні дослідження на тваринах за умови введення різних ГК свідчать про значне зниження вмісту 25ОНD [123], [124].

Незважаючи на суперечливі дані клінічних спостережень, у багатьох протоколах лікування ГЮ вітамін D розглядається як частина комбінованої терапії з бісфосфонатами, а також самостійно в якості препарату «другої лінії», завдяки його впливу на МЩКТ [125], [126]. Крім того, вітамін D може виступати препаратом «першої лінії» для лікування ГЮ у пацієнтів молодого віку. Вважають, що хронічна ГК терапія може викликати зниження забезпеченості організму вітаміном D за декількома механізмами: шляхом інгібування експресії 25ОНD 1 $\alpha$ -гідроксилази у печінці та посилення експресії ензиму катаболізму – вітамін D 24-гідроксилази в нирках. Зокрема, на остеобластоподібних клітинах було виявлено дозозалежне зростання експресії мРНК 24-гідроксилази та активності ензиму за дії дексаметазону [127].

Нами раніше було показано, що преднізолон порушує метаболізм холекальциферолу в гепатоцитах щурів, пригнічуючи вітамін D 25-

гідроксилазну активність та експресію мітохондріального (CYP27A1) і мікросомального (CYP2R1) ізоензимів 25-гідроксилази [128].

Ефекти введення вітаміну D<sub>3</sub> при ГІО були продемонстровані як на моделях з використанням тварин, так і у клінічних дослідженнях. Так, у щурів введення кальцитріолу разом з ГК попереджало зменшення вмісту OPG в сироватці крові та гістоморфометричні порушення [129]. В значній кількості робіт продемонстровано нормалізуючий вплив вітаміну D<sub>3</sub>, його біологічно активних гідроксильованих форм та композитів із кальцієм на порушення структури та функціонування кісткової тканини у пацієнтів після тривалої ГК терапії [130], [131]. Однак питання щодо вибору препарату вітаміну D для терапії при ГІО залишається дискусійним. Так, при лікуванні ГІО з використанням препаратів кальцитріолу, вітаміну D<sub>2</sub> з кальцієм та бісфосфонатів, для 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> був виявлений найменший терапевтичний ефект [132]. Наразі активно обговорюється питання недоцільності терапевтичного застосування 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, оскільки показано, що саме рівень 25OHD, а не 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, корелює з покращенням стану кісток [133]. Тому на сьогодні за ГІО вважають більш доцільним призначати саме вітамін D<sub>3</sub>, який є субстратом для синтезу гормонально активних форм.

Отже, недостатня забезпеченість організму вітаміном D може бути одним з ключових факторів розвитку ГК-індукованого остеопорозу, тому актуальність подальших наукових досліджень щодо реалізації дії вітаміну D<sub>3</sub> за ГІО та їх важливість для медичної практики не викликає сумнівів.

### **1.3 Ремоделювання кісткової тканини за участі цитокінової системи RANKL/RANK/OPG**

#### **1.3.1 Процес ремоделювання кісткової тканини та його регулювання**

Скелет як людини, так і тварин, є високоспеціалізованим динамічним органом, що постійно оновлюється та підтримує мінеральний статус організму. Кісткова тканина складається з неорганічного матриксу (близько 60%), води (8-10%) та органічних сполук. Неорганічна фаза кісткової тканини представлена



кристалами гідроксиапатиту  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  та аморфним фосфатом кальцію, які нековалентно зв'язані з протеїнами неорганічного матриксу. Органічна фаза представлена колагеном 1 типу, неколагеновими протеїнами, протеогліканами, фосфопропротеїнами і протеоліпідами. Компонентами органічного матриксу є також різноманітні фактори росту, цитокіни та інтерлейкіни – TGF- $\beta$ , OPG, інсуліноподібний фактор росту (IGF), інтерферон- $\gamma$ , ряд факторів некрозу пухлин (TNFs), які є регуляторними протеїнами, що впливають на диференціювання та ріст клітин [133].

Близько 90-95% кісткової тканини складають структурні клітини – остеоцити, 4-6% – клітини, що беруть участь у її формуванні (остеобласти) та 2-3% – клітини, що відповідають за резорбцію (остеокласти).

Остеобласти походять з мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин-попередників і беруть участь в синтезі колагену 1 типу та інших протеїнів кісткового матриксу. Основними регуляторами їх активності є ПТГ, гормонально активні метаболіти вітаміну D, статеві гормони [134].

Остеоцити – вбудовані в мінералізований кістковий матрикс клітини, попередниками яких є остеобласти [134]. На сьогодні остеоцити розглядаються як «оркестратори» процесу ремоделювання кісткової тканини завдяки їх здатності регулювати активність остеобластів та остеокластів. Так, у відповідь на механічне навантаження спостерігається посилене утворення транскрипційних факторів, важливих для регулювання активності остеобластів, таких як Runx2, TCF/LEF1, Osterix і AP-1 [135]. Більше того, остеоцити відіграють роль в індукуванні процесу резорбції, що пов'язано з їх здатністю експресувати RANKL та макрофагальний колонієстимулюючий фактор (MCS-F), які регулюють диференціювання остеокластів. Апоптоз остеоцитів, який посилюється при старінні організму, іммобілізації, мікропошкодженнях, нестачі естрогенів, підвищенні концентрації цитокінів (зокрема, TNF $\alpha$ ), за менопаузи та при лікуванні ГК препаратами, веде до активування остеокластів [136].

Остеокласти – мультиядерні клітини, попередниками яких є гемопоетичні клітини кісткового мозку моноцитарно-макрофагальної лінії. Їх

диференціювання регулюється MCS-F, що секретується остеобластами та їх попередниками, і RANKL, що секретується остеобластами, остеоцитами та стромальними клітинами [137]. Зрілі мультіядерні остеокласти створюють кисле середовище у кістковому матриксі, що призводить до його руйнування. Бісфосфонати, активні форми кисню, оксид азоту та активування кальцієвих каналів на поверхні остеокластів спричиняють їх апоптичну загибель.

Ремоделювання кісткової тканини – це процес узгодженого спільного функціонування остеокластів та остеобластів, який запобігає накопиченню старої та пошкодженої кісткової тканини [138]. Процес ремоделювання регулюється рядом гормонів та інших факторів, серед яких ПТГ, кальцитонін, естрогени та андрогени, а також кальцитріол та глюкокортикоїди. Окрім системних гормонів, цитокінів та факторів росту в регулюванні процесу ремоделювання, а саме контролю диференціювання та активування остеокластів, ключову роль відіграє сигнальний каскад RANKL/RANK/OPG, що включає рецептор активатора ядерного фактору транскрипції  $\kappa$ B (RANK), його ліганд (RANKL) та остеопротегерин (OPG) [139]. Отже, система RANKL/RANK/OPG може бути молекулярною мішенню для дії багатьох регуляторів ремоделювання кісткової тканини, у тому числі і вітаміну D.

### **1.3.2 Характеристика компонентів цитокінової системи RANKL/RANK/OPG**

Інтерес до пошуку факторів, що регулюють остеокластогенез з'явився після постулювання гіпотези Родана та Мартін [140] у 1981 році, щодо впливу остеобластів на формування остеокластів. Наприкінці 1990-х років було виявлено, що остеокластогенез може індукуватись за участі RANKL, який діє через рецептор RANK, в той час як остеопротегерин виступає як розчинний рецептор-пастка для RANKL [141]. Також було показано, що RANKL експресується на поверхні активованих Т- та В-лімфоцитів, відіграючи роль у регулюванні імунітету [142]. Таким чином, Т-клітини, що експресують RANKL,

можуть впливати на остеокластогенез, що пояснює втрату маси кісткової тканини при хронічних запальних захворюваннях [143]. Остаточне підтвердження ролі RANKL у підтриманні імунітету і метаболізмі кісткової тканини було отримано на мишах, нокаутних за RANKL, у яких спостерігались дефекти остеокластогенезу, і, як наслідок, розвиток остеопетрозу, порушення прорізування зубів та формування лімфатичних вузлів [144].

RANKL, або фактор некрозу пухлин надсімейства 11 (TNFSF11) та фактор диференціації остеокластів, є гомотримерним трансмембранним протеїном II типу [145]. Вперше RANKL було ідентифіковано на поверхні остеобластів, та показано, що він бере участь у всіх стадіях остеокластогенезу. Для RANKL ідентифіковано два рецептори – мембранний рецептор RANK, також відомий як рецептор фактору некрозу пухлини надсімейства 11A (TNFRSF11A) та розчинний рецептор-пастка OPG (TNFRSF11B). Виявлено, що RANKL і RANK присутні у багатьох тканинах, у тому числі у лімфатичних вузлах, тимусі, селезінці, головному та кістковому мозку [146].

Ще до відкриття RANKL було відомо, що макрофагальний колонієстимулюючий фактор (M-CSF) є необхідним для блокування апоптозу попередників остеокластів та для їх розвитку [147]. M-CSF діє через рецептор c-Fms та рекрутування фосфатидилінозитол 3K/Akt і фосфоліпази C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) [148]. Разом з RANKL, ці два цитокіни є необхідними сигналами для запуску диференціювання преостеокластів в функціональні зрілі мультиядерні остеокласти: M-CSF діє як фактор виживання для преостеокластів, тоді як взаємодія RANKL/RANK забезпечує ключовий сигнал для диференціювання.

У кістковій тканині глікопротеїн RANKL експресується стромальними клітинами, остеобластами та їх попередниками, в той час як RANK присутній на поверхні остеокластів та їх попередників. Нещодавно показано, що остецити також можуть бути джерелом синтезу RANKL, що свідчить про їх безпосередню роль у активуванні остеокластогенезу.

Зв'язування RANKL з RANK викликає олігомеризацію рецептора та рекрутування одного з адаптерних протеїнів – асоційованих з рецептором TNF

факторів 1, 2 та 6 (TRAF 1, 2, 6), до мембранної проксимальної ділянки RANK [149]. Рекрутування TRAFs призводить до активування декількох сигнальних шляхів, включаючи шляхи NF- $\kappa$ B, сімейства мітоген-активованих протеїнкіназ (MAPK) та/або c-Src, результатом чого є посилення остеокластогенезу [148] (рис. 1.6). Активування NF- $\kappa$ B і та c-Fos є критичними етапами для остеокластогенезу. Це підтвердилось даними, отриманими на мишах, нокаутними за p50 і p52 субодиницями NF- $\kappa$ B або за c-Fos, у яких розвивався остеопетроз через відсутність остеокластів [150]. Рекрутування MAP-кіназ призводить до ядерної транслокації факторів транскрипції c-Fos і c-Jun [151]. Інший фактор транскрипції – ядерний фактор активованих T-клітин (NFATc1) – також є важливим, оскільки саме одночасний запуск експресії c-Fos та NFATc1 викликають реалізацію генетичної програми, необхідної для запуску процесу остеокластогенезу. Разом з ініціюванням злиття одноядерних попередників остеокластів з утворенням багатоядерних активних остеокластів, RANKL ініціює реорганізацію цитоскелету та клітинну поляризацію зрілих остеокластів, індукуючи їх резорбтивну активність [144].



Рис. 1.6 Участь цитокинової системи RANKL/RANK/OPG у регулюванні ремоделювання кісткової тканини [152]

Розчинний глікопротеїн OPG синтезується мезенхімальними стовбуровими клітинами, стромальними та іншими типами клітин, і діє як

розчинний рецептор-пастка для RANKL. Часткова делеція гену OPG призводить до ювенільного синдрому Педжета через посилену взаємодію RANKL/RANK [153] та, як наслідок, скелетних деформацій, остеопенії і переломів кісток. На відміну від мишей, нокаутних за RANKL або RANK, у OPG-нокаутних мишей розвивається важкий остеопороз внаслідок збільшення кількості та активності остеокластів [154]. Таким чином, OPG інгібує активування остеокластів і остеокластогенез, а отже, забезпечує узгодженість процесів остеосинтезу та резорбції.

Адекватне співвідношення OPG/RANKL є важливою умовою збереження узгодженості між процесами резорбції та формування кісткової тканини та визначальним для маси і міцності кісток. Велика кількість цитокінів, гормонів та лікарських препаратів можуть впливати на співвідношення компонентів системи RANKL/RANK/OPG. Наприклад, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  сприяють остеокластогенезу, в той же час IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-3, IL-4, IL-10, IL-13 інгібують утворення остеокластів. Крім того, ПТГ, IL-11 та простагландини індують експресію RANKL. На культурі клітин показано, що глюкокортикоїди підвищують синтез RANKL та знижують вміст OPG. Натомість, естрогени стимулюють синтез OPG, перешкоджаючи резорбції кісткової тканини.

Вплив вітаміну D<sub>3</sub> на сигнальний шлях RANKL/RANK/OPG є недостатньо вивченим. Вважається, що прямий молекулярний механізм дії вітаміну D<sub>3</sub> на систему RANKL/RANK/OPG полягає у стимулюванні експресії RANKL, що показано на культурі остеобластів [133]. Таким чином, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, посилюючи остеокластогенез, індукує резорбцію і мобілізацію кальцію [155]. Незважаючи на стимулювальний ефект вітаміну D<sub>3</sub> на експресію RANKL, вважається, що його остеопротекторна дія є багатофакторною та може бути опосередкована як за рахунок зниження співвідношення RANKL/OPG, так і за рахунок підвищеної експресії LRP5 – корецептора синального шляху Wnt, який опосередковує анаболічні ефекти на остеобласти [156]. Оскільки остеопротекторні ефекти вітаміну D<sub>3</sub> співіснують разом з його резорбтивними властивостями, визначення направленості дії холекальциферолу, в тому числі і

на систему RANKL/RANK/OPG, за умов різних патологій кісткової тканини потребує подальших досліджень.

### 1.3.3 Роль NF-κB у реалізації функцій цитокинових систем

Транскрипційний фактор NF-κB відіграє важливу роль у регулюванні багатьох фізіологічних процесів в організмі. Найбільш вивченими ефектами NF-κB є участь у розвитку, підтриманні гомеостазу та активуванні імунної системи. Проте ядерний фактор κB також є одним з ключових компонентів регулювання функціонування м'язевої та скелетної систем [157].

До родини NF-κB входять: p65 (RelA), RelB, cRel, p50/p105 (NF-κB1) та p52/p100 (NF-κB2). Ці протеїни мають унікальний N-кінцевий Rel-гомологічний домен для формування гетеро- або гомодимерів і зв'язування з ДНК. За участі C-кінцевого трансактиваційного домену p65, RelB і c-Rel функціонують як активатори таргетних генів, зв'язуючись з p50 або p52 [158]. За нормальних умов димери NF-κB утримуються в цитоплазмі у комплексі з інгібітором κB (IκB). Висока афінність репресорного протеїну IκB до NF-κB забезпечує тонкий контроль активування цього сигнального шляху [159].

NF-κB функціонує як один із найважливіших внутрішньоклітинних ефекторів, і діє на геномному рівні, поєднуючи найрізноманітніші фізіологічні та патологічні сигнали та контролюючи експресію численних генів [160]. Оскільки NF-κB є центральною ланкою у реалізації функцій цитокинових систем, вивчення сигнальних шляхів, до яких він залучений, їх дисфункції та способів модулювання активності NF-κB наблизить до розуміння молекулярних механізмів розвитку багатьох захворювань.

Зважаючи на універсальність NF-κB та його роль як основного медіатора імунної відповіді, його індукторами є бактерії та бактеріальні токсини, віруси, прозапальні цитокіни (IL-1, -2, -12, -15, -17, TNFα), фізіологічні стимули (гіперглікемія, гіперосмотичний шок, оксидативно-нітрозативний стрес), медичні препарати (цисплатина, доксорубіцин, галоперидол, метамфетамін), ліганди рецепторів (CD11b/CD18-ліганд, CD28-ліганд, CD35-ліганд, CD3-

ліганд, CD40-ліганд, CD4-ліганд, Flt-1-ліганд, N-CAM), мітогени, ростові фактори та гормони (bone morphogenic protein 2, -4, гормон росту, інсулін, MCS-F, фактор росту тромбоцитів та інші) [161].

За звичайних умов NF- $\kappa$ B знаходиться у цитоплазмі у вигляді димеру та у комплексі з I $\kappa$ B. У відповідь на стимулювання клітини активується I $\kappa$ B кіназа (IKK), яка фосфорилує I $\kappa$ B, що призводить до його деградації протеасомами. NF- $\kappa$ B вивільнюється з інгібіторного комплексу, транслокується до ядра, де зв'язується за специфічними послідовностями ДНК. Існує два основні шляхи, що опосередковують процес активування NF- $\kappa$ B – класичний (канонічний) та неканонічний, які відрізняються за рівнями цитокінів, що їх ініціюють, складом димерів та біологічними ефектами [161].

Класичний шлях у кістковій тканині активується практично всіма стимулами, що індують NF- $\kappa$ B, включаючи RANKL, TNF $\alpha$  та інші запальні медіатори. Основною регуляторною ланкою для цього шляху є IKK комплекс, компонентами якого є IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  та NEMO/IKK $\gamma$ , які залучені у деградацію I $\kappa$ B. Оскільки одним з перших цільових генів цього шляху є сам I $\kappa$ B, це забезпечує зворотній негативний зв'язок для регулювання активності NF- $\kappa$ B.

В альтернативному шляху NF- $\kappa$ B регуляторною ланкою є NF- $\kappa$ B-індукуюча кіназа (NIK). Тільки окремі цитокіни родини TNF, в тому числі RANKL, але не TNF $\alpha$ , можуть активувати цей шлях, що пояснюється здатністю їх специфічних рецепторів взаємодіяти з TRAF3 [161].

Остеокласти одночасно є як ключовою ланкою ремоделювання кісткової тканини, так і патогенетичним фактором втрати маси кісткової тканини. Після дії RANKL, відбувається активування NF- $\kappa$ B, і попередники остеокластів посилено експресують фактори транскрипції c-Fos і NFATc1, що необхідні для подальшої їх диференціації в зрілі мультіядерні остеокласти [162]. Це високополяризовані клітини, які прикріплюються до поверхні кістки за допомогою  $\alpha$ v $\beta$ 3-інтегринів, утворюючи зону ущільнення, в яку секретуються H<sup>+</sup> та протеази, формуючи таким чином резорбтивну ямку [163]. І хоча поєднання стимулів MCS-F та RANKL призводить до активування багатьох

внутрішньоклітинних шляхів, включаючи  $\text{Ca}^{2+}$ /кальцинейрин, MAPKs, PI3K і Src, активування NF- $\kappa$ B є критичною ланкою, без запуску якої остеокласти не формуються. Саме тому запальні цитокіни мають сильний ефект на резорбцію кісткової тканини, в основному через їх здатність активувати NF- $\kappa$ B та диференціювання остеокластів. Так, один з активаторів класичного шляху активування NF- $\kappa$ B – TNF $\alpha$  – опосередковує втрату маси кісткової тканини, пов'язану з хронічними запальними процесами.

Роль NF- $\kappa$ B у підтриманні гомеостазу кісткової тканини не обмежується лише участю у регулюванні активності остеобластів. NF- $\kappa$ B-асоційоване сигналювання також відіграє важливу роль у функціонуванні остеобластів та остеоцитів. Так, NF- $\kappa$ B може інгібувати диференціювання і активність остеобластів. Ядерна транслокація p65 у остеобластах інгібує їх диференціювання шляхом блокування експресії факторів Runx2, SMAD та знижує їх активність внаслідок зменшення активності JNK та експресії Fra1. Механічні стимули також можуть активувати класичний шлях NF- $\kappa$ B, збільшуючи експресію прозапальних медіаторів, включаючи TNF $\alpha$ . Незважаючи на те, що остеоцити складають до 90-95% всіх клітин кісткової тканини, наразі існує мало досліджень їх внутрішньоклітинного сигналювання із залученням NF- $\kappa$ B через складність модельних систем *in vitro*.

Таким чином, припускається, що у патогенезі ГК-індукованого остеопорозу можуть бути задіяні порушення NF- $\kappa$ B-опосередкованих сигнальних шляхів. Інгібування сигнального шляху NF- $\kappa$ B є ключовим механізмом протизапальної дії глюкокортикоїдів. Відомо, що GR негативно регулює активність NF- $\kappa$ B, напряду взаємодіючи з p65 NF- $\kappa$ B та перешкоджаючи її транслокації до ядра [164] або змінюючи конформацію комплексу у транскрипційно інертну форму [165].

Вітамін D<sub>3</sub>, окрім остеопротекторної, також володіє протизапальною дією, що дозволяє припустити його прямий або опосередкований вплив на NF- $\kappa$ B. Так, відомо, що VDR контролює експресію RANKL, який індукує активування NF- $\kappa$ B. Саме завдяки складності взаємодії цих сигнальних шляхів



та суперечливій інформації щодо ефектів ГК та холекальциферолу на остеокінову систему RANKL/RANK/OPG, в контексті дисертаційної роботи фокус буде зосереджений на ролі NF-κB як сполучної ланки, що інтегрує сигнальний шлях RANKL/RANK/OPG, GR-опосередковане сигналювання та ланку, через яку може чинити свій вплив вітаміну D<sub>3</sub> за участі VDR.

#### **1.3.4 Порушення функціонування цитокінової системи RANKL/RANK/OPG за глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу**

Раніше вважалось, що ГК значно посилюють резорбцію кісткової тканини, проте на сьогодні ця концепція підлягає перегляду через суперечливі експериментальні дані щодо їх впливу на систему RANKL/RANK/OPG. На культурах остеобластних клітин було показано, що наслідком дії ГК є активування експресії RANKL та MCS-F, а також пригнічення експресії osteocalcin та OPG [102], [166]. Оскільки ГК-чутливі елементи були виявлені у гені RANKL, припускають можливість регулювання експресії цього цитокіну через посилення транскрипційної активності GR [167]. У досліджах *in vitro* на культурі стромальних клітин кісткового мозку продемонстровано, що дексаметазон знижував експресію OPG на 40% [166]. Дексаметазон та преднізолон вважаються сильними інгібіторами експресії OPG, оскільки вони гальмують продукування osteoprotegerin на 80% у клітинній лінії остеобластів людини [168]. Дослідження сироваткового рівня OPG пацієнтів після короткотривалої терапії ГК (середня доза 32,5 ± 3,0 мг) також показали суттєве зниження його вмісту [169]. Таким чином, отримані *in vitro* дані свідчать про активування системи RANKL/RANK/OPG за дії ГК.

З іншого боку, дослідження, проведені на кістковій тканині новонароджених мишей продемонстрували, що дексаметазон підвищував експресію мРНК тартрат-резистентної кислоти фосфатази (TRAP), рецептора кальцитоніну, катепсину К, карбоангідази II, OPG та RANK, а також експресію мРНК та протеїну RANKL. На протипагу ефектам дексаметазону, введення 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> знижувало експресію OPG [169].

Пояснення наявності суперечливих експериментальних даних стосовно дії ГК на резорбцію кісткової тканини може бути двохстадійність розвитку ГЮ. На початковій швидкій фазі відбувається суттєва втрата маси кісткової тканини, що може пояснюватись посиленням процесів резорбції за рахунок збільшення кількості нових остеокластів або зростання активності зрілих клітин. У повільній фазі гальмується формування кісткової тканини, як наслідок, продукування RANKL остеобластами також знижується, що веде до дерегулювання функціонування остеокластів (рис. 1.7).

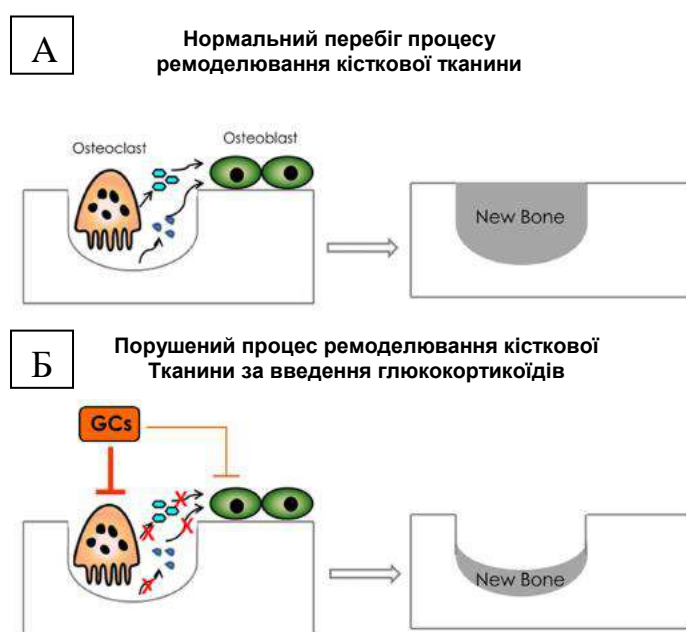


Рис. 1.7 Ефект ГК на ремоделювання кісткової тканини. (А) Нормальний перебіг ремоделювання: остеокласти резорбують старий матрикс, остеобласти мігрують до лакуни та утворюють новий кістковий матрикс. (Б) ГК-індуковане порушення перебігу

ремоделювання: ГК інгібують остеобласти та гальмують активність остеокластів, порушуючи організацію їх цитоскелету та ацетилювання мікротрубочок [170].

Наведені вище експериментальні дані здебільшого стосуються досліджень на культурах клітин або змін у кістковій тканині, пов'язаних з короткотривалим введенням синтетичних ГК у високих дозах. Однак недостатньо з'ясованим залишається питання систематичного дослідження порушень експресії усіх компонентів системи RANKL/RANK/OPG у кістковій тканині та кістковому мозку за довготривалої дії ГК *in vivo*, а також майже відсутні дані щодо впливу вітаміну D<sub>3</sub> на дану остеокінову систему.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1 Моделювання глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу у щурів та схема введення вітаміну D<sub>3</sub>

Дослідження проводили на білих щурах (самиці лінії Wistar масою  $100 \pm 5$  г), які утримувались у стандартизованих умовах: у пластикових клітках на харчовому повноцінному раціоні віварію (вміст кальцію – 1,2%, фосфору – 0,8%), при температурі в межах 18-22°C, вологості 50-60% та природному світловому режимі «день-ніч». Після періоду акліматизації (один тиждень), щурів було розділено на 3 групи за методом «випадкових чисел»: 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 D<sub>3</sub> перорально (Sigma, США) у вигляді масляної суспензії у дозі 1000 МО/кг маси тіла протягом 30 діб на тлі дії преднізолону. Для дослідження використовували тканину печінки, стегнову та гомілкову кістки, кістковий мозок, сироватку крові, ізольовані спленоцити, моноклеари периферичної крові та гепатоцити. 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).

### 2.2 Матеріали і обладнання

При проведенні експериментальної роботи були використані наступні препарати та реактиви: препарат «Преднізолон» (Біофарма, Україна); вітамін D<sub>3</sub> (Sigma, США); 2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїн діацетат (Sigma, США); 4,5-діамінофлуоресцеїн діацетат (Sigma, США); первинні антитіла проти RANK, RANKL, OPG, VDR, CYP27B1, VEGF, остеокальцину, фосфорильованої за Ser

311 субодиниці p65 NF-κB, ІκB, каспази-3, GR (Santa Cruz Biotechnology, США), субодиниці p65 NF-κB (Thermo Fisher Scientific, США), iNOS та 3-нітротирозину (Millipore, США), PARP-1 (Cell Signaling Technology, США), poly(ADP-ribose) (Trevigen, США), мієлопероксидази (Abcam, Великобританія), ламіну B1 та β-актину, кон'югованого з пероксидазою хрому (Sigma, США); вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому: anti-mouse IgG (Fab Specific)-Peroxidase (Sigma, США), anti-rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) та anti-goat IgG (H+L) (Invitrogen, США); вторинні антитіла, кон'юговані з флуоресцентними мітками anti-rabbit IgG DyLight 488, anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 546 conjugate, anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488 conjugate, anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 568 conjugate (Thermo Fisher Scientific, США); барвник Hoechst (Sigma, США); набір для виділення РНК з тканин Trizol RNA Prep kit (NEOGENE, Україна), набір для виділення РНК з тканин innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena AG, Німеччина), набір для синтезу кДНК Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США), набір для проведення ПЛР у реальному часі Maxima SYBER Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США), розчин для отримання мононуклеарів з цільної крові Histopaque-1083 (Sigma, США). Решта реактивів виробництва AppliChem (Німеччина), Sigma (США), Pierce (США) та вітчизняного виробництва класу х.ч. або ч.д.а. Для приготування водних розчинів використовували дистильовану або деіонізовану воду.

Для проведення досліджень використовувались наступні прилади: ваги електронні WPS 110/C/2 (RADWAG, Польща), центрифуга Mikro 200R (Hettich, Німеччина) та LU-418 (Угорщина), змішувач Bio Vortex V1 (BIOSAN, Німеччина), шейкер-термостат ES-20 (BIOSAN, Німеччина), водяна баня БЛ-100 (НХП, Україна), рН-метр рН-301 (ПБФ «ДЕСМК», Україна), спектрофотометр СФ-46 (ЛОМО, Росія), фотоелектроколориметр КФК-2МП (ЗОМЗ, Росія), позитивно заряджені адгезивні скельця Objektträger Microscope slides (Th.Geyer Gruppe, Німеччина), світловий мікроскоп Olympus BX-15 (Olympus, Японія), установка для електрофорезу та електропереносу Mini-

Protein III (Bio-Rad Laboratories, США), ультразвуковий дезінтегратор Labsonic M (Sartorius, Німеччина), мікропланшетний зчитувач ER-500 (SINNOWA, Китай), протоковий цитофлуориметр COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter, США), конфокальний мікроскоп Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина) спектрофотометр/флуориметр для вимірювання концентрацій протеїну та РНК DS-11 (DeNovix, США), ампліфікатор qTOWER 2.0 Standard RT-PCR Thermal Cycler (Analytik Jena AG, Німеччина) та інші.

## **2.3 Методи досліджень**

### **2.3.1 Отримання сироватки крові**

Зібрану у стерильні пробірки кров інкубували 30 хв при +37 °С, після чого відділяли кров'яний згусток від стінок капіляром, центрифугували 10 хв при 3000 g та зберігали при -80°C до моменту використання для дослідження вмісту мінеральних компонентів, 25ОНD та активності ензимів.

### **2.3.2 Отримання загальних лізатів та лізатів з ядерної й цитоплазматичної фракцій для проведення вестерн-блот аналізу**

Для приготування загального протеїнового лізату наважку тканини 200-250 мг розтирали у фарфоровій ступці з рідким азотом, 100 мг подрібненої тканини інкубували протягом 20 хв з буфером екстракції протеїнів RIPA (20 mM трис-НСl, рН 7.5, 1% тритон X-100, 150 mM NaCl, 1 mM ЕДТА, 1% дезоксихолат натрію) у співвідношенні 1:10 (вага/об'єм) та коктейлем інгібіторів протеїназ і фосфатаз (РІС) на льодяній бані. Гомогенат додатково обробляли ультразвуковим дезінтегратором (Cycle 0.8, Ampl. 50%), після чого центрифугували при 14000 g 20 хв при +4°C. Вміст тотального протеїну у аліквотах проб визначали за методом Лоурі. До лізату додавали 1/5 частину об'єму буферу Леммлі (60 mM Tris-Cl, рН 6.8, 2% додецилсульфат натрію, 10% гліцерин, 5% β-меркаптоетанол, 0.01% бромфеноловий синій), перемішували та проварювали на водяній бані +95°C протягом 5 хв, а після охолодження зберігали у фризери при -80°C для подальшої роботи.

Для фракціонування ядерних та цитоплазматичних протеїнів [171], тканину подрібнювали за такою ж схемою як і для загальних лізатів, до 100 мг подрібненої тканини додавали 0,9 мл 0,5% розчину NP40-PBS (фосфатно-сольовий буфер) з сумішшю PIS та інкубували, періодично перемішуючи, протягом 20 хв на льоді. Ядра осаджували центрифугуванням при 1500 g протягом 5 хв, супернатант відбирали, до отриманого осаду вносили 0,5 мл буферу RIPA з сумішшю інгібіторів та перемішували 5 хв на холоді. Супернатант I, що попередньо був відібраний, знову центрифугували при 14000 g на +4°C 20 хв, щоб осадити залишки цитоплазматичних мембран, після чого до супернатанту II додавали буфер Леммлі та обробляли згідно описаному вище для загальних лізатів. В суміші осаду ядер з буфером RIPA руйнували ядерні мембрани ультразвуком за допомогою дезінтегратора двічі (Cycle 0.8, Ampl. 50%) протягом 20 сек, осаджували залишки ядерних мембран центрифугуванням при 14000 g на +4°C протягом 20 хв. Відбирали супернатант (ядерну фракцію), додавали буфер Леммлі та обробляли згідно описаному вище для загальних лізатів. Отримані фракції протеїнів зберігали у фризери при -80°C для подальшої роботи.

### **2.3.3 Виділення моноцитів з кісткового мозку та крові щурів**

Мононуклеарні клітини периферичної крові виділяли за допомогою Histopaque-1083 (Sigma, США) відповідно до стандартного протоколу від виробника. До 3 мл гепаринізованої крові додавали 5 мл PBS та перемішували. У центрифужну пробірку додавали 3 мл розчину Histopaque-1083, на який обережно нашаровували 8 мл суміші крові з PBS та центрифугували при 400 g протягом 30 хв. Верхній шар обережно відбирали до непрозорого кільця з мононуклеарними клітинами. Шар клітин переносили в центрифужну пробірку та відмивали з використанням PBS та послідовного центрифугування при 250 g протягом 10 хв. Після відмивання отримані мононуклеарні клітини периферичної крові ресуспендували у 0,5 мл PBS для подальшої роботи.

Для отримання мононуклеарних клітин кісткового мозку, стегнові кістки очищували від залишків сполучних тканин, медичними кусачками відсікали їх з обох кінців. Шприцем на 1 мл кістковий мозок вимивали з тіла стегнової кістки холодним PBS та центрифугували при 400 g протягом 1 хв при +4°C і ресуспендовали в PBS, фільтрували через фільтри з порами 70 та 40 мкм з подальшими центрифугуванням при 400 g протягом 5 хв при +4°C. Проводили лізис червоних кров'яних клітин у буфері RBC (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) [172], промивали PBS, центрифугували і кінцевий осад мононуклеарів ресуспендували в PBS із розрахунку 0,5×10<sup>6</sup>/мл.

#### **2.3.4 Виділення спленоцитів**

Спленоцити ізолювали за стандартною методикою [173], [174]. Селезінку обережно продавлювали через дрібне сталеве сито у PBS. Отриману суспензію клітин відмивали у PBS, лізували еритроцити у RBC буфері та знову відмивали у PBS двічі. Між промивками суспензію клітин фільтрували через клітинні сита з діаметром пор 100 мкм та зберігали при +4°C не більше 2 годин.

#### **2.3.5 Виділення гепатоцитів**

Гепатоцити ізолювали після перфузії печінки холодним фізіологічним розчином через ворітну вену. 0,5 г тканини печінки подрібнювали на невеликі фрагменти та інкубували у PBS з 0,05% колагеназою IV типу при +37°C протягом 30 хв (120 коливань/хв) з подальшим відмиванням PBS (0,146 M NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% альбуміну, pH 7.4). Після інкубування зразки фільтрували, промивали та центрифугували. Чистоту фракції гепатоцитів контролювали цитохімічним методом після їх фарбування гематоксиліном Бомера. Кількість гепатоцитів підраховували в камері Горяєва [123].

#### **2.3.6 Визначення вмісту 25OHD у сироватці крові**

Про забезпеченість організму вітаміном D судили за рівнем 25ОНD, який визначали імуноензимним методом з використанням тест-набору 25-Hydroxy Vitamin D kit (IDS, США) за протоколом виробника та тест-системи для конкурентного визначення 25ОНD у серологічних зразках з використанням поліклональних антитіл проти 25ОНD і біотин-стрептавідинового способу візуалізації, що була розроблена в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна [175]. Концентрацію 25ОНD виражали в нмоль/л сироватки крові.

### **2.3.7 Визначення вмісту загального кальцію та його фракцій у сироватці крові**

Вміст загального кальцію у сироватці крові визначали за допомогою біо-тест набору (Lachema, Чехія) згідно протоколу від виробника, використовуючи в якості стандартного розчину 25 ммоль/л  $\text{CaCO}_3$  у 1,7 %  $\text{HCl}$ . Кальцій у лужному середовищі здатний утворювати з гліюксаль-біс-(2-оксианілом) комплекс червоного кольору. Інтенсивність забарвлення зразка прямо пропорційна концентрації кальцію й визначається спектрофотометрично при  $\lambda = 540$  нм. Кількість загального кальцію розраховували в ммоль/л сироватки крові. Для визначення вмісту протеїнозв'язаного кальцію у сироватці крові попередньо осаджували протеїни 96% етанолом, центрифугували зразки при 3000 об/хв протягом 15 хв та гідролізували осад 0,4 М розчином  $\text{NaOH}$  при  $+100^\circ\text{C}$  протягом 10 хв. До зразка додавали гліюксаль-біс-(2-оксианіл) і визначали протеїнозв'язаний кальцій як описано вище. Вміст ультрафільтрованої фракції кальцію у сироватці крові визначали за різницею вмісту загального кальцію і кальцію, зв'язаного з протеїнами.

### **2.3.8 Визначення вмісту неорганічного фосфату у сироватці крові**

Вміст неорганічного фосфату в сироватці крові визначали за методом Дусе [176]. Осадження протеїнів проводили 12% розчином трихлороцтової кислоти з подальшим центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10 хв. Безпротеїнові екстракти (0,5 мл) інкубували спочатку при  $+37^\circ\text{C}$  10 хв з



аскорбіновою кислотою (260 мМ) та молібдатом амонію (7 мМ), а потім на льоду протягом 10 хв. Неорганічний фосфат у кислому середовищі утворює з молібдатом амонію фосфорномолібденовий комплекс синього кольору, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації фосфату у пробі. Визначення вмісту неорганічного фосфату проводили спектрофотометрично при  $\lambda=670$  нм та розраховували в ммоль/л сироватки крові.

### **2.3.9 Визначення активності загальної лужної фосфатази та її ізоензимів у сироватці крові**

Активність лужної фосфатази (лужна фосфогідролаза моноєфірів ортофосфорної кислоти, КФ 3.1.3.1) у сироватці крові визначали за допомогою біо-тест набору (Lachema, Чехія) згідно протоколу для використання від виробника. Принцип методу базується на здатності лужної фосфатази (ЛФ) розщеплювати субстрат – 4-нітрофенілфосфат з утворенням 4-нітрофенолу та фосфату. Реакцію зупиняли 30 мМ розчином трилону Б в 1М NaOH. Мірою активності ензиму є кількість вивільненого продукту реакції – 4-нітрофенолу, який у лужному середовищі дає жовте забарвлення, інтенсивність якого визначається спектрофотометрично при  $\lambda=410$  нм. Активність ЛФ виражали в Од/л, де Од – кількість мкмоль 4-нітрофенолу, яка утворюється за 1 хв при  $+37^{\circ}\text{C}$  під дією ЛФ, що міститься у 1 л сироватки крові.

Для визначення активності термостабільної ЛФ проводили термічне інгібування сироватки крові при  $+56^{\circ}\text{C}$  протягом 15 хв. Активність кісткової ізоформи ЛФ вираховували за різницею між активностями загальної та термостабільної лужних фосфатаз. Активність кишкового ізоензиму ЛФ визначали за різницею між активностями загальної та незаінгібованої специфічним інгібітором (5мМ L-фенілаланін) ЛФ [177].

### **2.3.10 Визначення вмісту мінеральних компонентів кісткової тканини**

Зольність кісткової тканини визначали методом сухої мінералізації при температурі  $+600-800^{\circ}\text{C}$  після знежирювання стегнової кістки гексаном

протягом 7 діб. Вміст мінеральних компонентів у золі стегнової кістки визначали після її розчинення сумішшю  $H_2O:kHCl$  (30:1) вищенаведеними методами (2.3.7, 2.3.8) й розраховували в % до маси золи.

### **2.3.11 Вивчення біомеханічних характеристик кісток**

Стегнові кістки очищували від залишків сполучних тканин та фіксували 10% розчином формаліну протягом 2 днів, після чого зберігали у 70% етанолі. Дослідження біомеханічних властивостей кісткової тканини піддослідних тварин проводилось м.н.с. Лабудзинським Д.О. на базі відділу анатомії та клітинної біології медичного факультету Університету м. Оулу. Перед тестуванням стегнові кістки промивали в PBS протягом 24 годин. Тест «3-х точкового прогинання» (з параметрами: span length 5.5 mm, loading speed 0.155 mm/sec) на середину стегнової кістки був зроблений на приладі Instron 3366 Universal Testing Machine (Instron Corp., США). На основі записаних кривих деформації та використовуючи програмне забезпечення Bluehill 2 software version 2.6 (Instron Corp., США) були вираховані максимальне навантаження на злам стегнової кістки (Н), міцність та жорсткість стегнової кістки (Н/мм<sup>2</sup>) [178].

### **2.3.12 Імуногістохімічне дослідження кісткової тканини**

Стегнові кістки щурів очищували від залишків сполучних тканин, з тіла стегнової кістки вимивали кістковий мозок, після чого їх фіксували 10% розчином формаліну протягом 48 годин, промивали та послідовно фіксували сумішшю етилового спирту:формаліну (1:10) та етиловим спиртом зростаючої концентрації. Після повної фіксації проводили декальцифікацію 5% розчином EDTA (рН 6,5), замінюючи його на свіжий кожні 2-3 дні. Про завершення декальцифікації судили за допомогою голкового тесту, після чого зразки промивали та переносили послідовно у 95% та 100% етанол (2 рази протягом 30 хв), витримували у бензолі протягом 30 хв та заливали у парафін при температурі +58°C. Зрізи отримували на ротаційному мікротомі. Для імуногістохімічного мічення кісткових зрізів їх депарафінізували послідовно у

розчинах ксилолу (3 рази по 5 хв), абсолютного етанолу (3 рази по 5 хв), 95%, 85% та 75% етанолу (по 3 хв для кожного), промивали дистильованою водою. Демаскували епітопи антигенів у цитратному буфері (10мМ, рН 6,0) на водяній бані при +95°C протягом 10 хв, промивали та проводили блокування 5% розчином бичачого сироваткового альбуміну (BSA) у PBS протягом 1 год. Промивали та інкубували з первинними антитілами RANK (Santa Cruz Biotechnology, США) у концентрації 1:200 протягом ночі при +4°C. Після відмивання зразків проводили інкубування з вторинними антитілами, кон'югованими з флуоресцентною міткою DyLight 488 (1:500) при постійному перемішуванні протягом 45 хв у темряві з подальшим відмиванням у PBS. Для підготовки зразків для конфокальної мікроскопії їх інкубували з барвником для ядер Hoechst 33258 протягом 10 хв, після чого зрізи наносили на предметне скло, накривали покривним та герметизували спеціальним лаком. Результати імунофлуоресцентного мічення зрізів стегнової кістки були оцінені за допомогою мікроскопа Carl Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Німеччина) та оброблені з використанням програмного забезпечення Zeiss LSM Image Browser.

### **2.3.13 Визначення рівня продукування активних форм кисню клітинами кісткового мозку та фагоцитуючими клітинами крові**

Флуоресцентне визначення вмісту АФК проводили з використанням специфічного зонду 2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїн діацетату (DCFH-DA, Sigma, США) [179]. До 100 мкл суспензії ізольованих клітин кісткового мозку щурів ( $0,5 \cdot 10^6$  клітин) додавали 1 мкл розчину DCFH-DA (2,5 мМ) та інкубували 15 хв при +37°C в темряві. Проби центрифугували при 1500 об/хв 10 хв та промивали 2 рази PBS. Після відмивання осад мононуклеарних клітин ресуспендували у 0,5 мл PBS та аналізували на протоковому цитофлуориметрі COULTER® EPICS™ XL™ (Beckman Coulter, США). Флуоресценцію окисленої форми DCFH-DA – 2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетату (DCF-DA) реєстрували за каналом FL1 (515-535 нм) та при  $\lambda_{зб} = 488$  нм.

Флуоресцентне визначення рівня утворення АФК фагоцитуючими клітинами крові проводили з DCFH-DA. До 100 мкл крові дослідних щурів додавали 1мкл розчину DCFH-DA (2,5 мМ) і інкубували цільну кров 15 хв при +37°C в темряві. Після інкубації проби піддавали гемолізу, додаючи 3 мл H<sub>2</sub>O. Після 35 секунд осмотичний тиск вирівнювали додаванням 1 мл 3,4% NaCl. Проби центрифугували 1500 об/хв 10 хв, промивали 2 рази розчином PBS, осад лейкоцитів ресуспендували у 0,5 мл PBS. Проби аналізували на протоковому цитофлуориметрі COULTER® EPICS™ XL™. Обробку результатів проводили за допомогою програми FCS Express V3.

#### **2.3.14 Визначення рівня продукування оксиду азоту гепатоцитами та клітинами кісткового мозку**

Оцінювання внутрішньоклітинного синтезу оксиду азоту (NO) ізольованими гепатоцитами та клітинами кісткового мозку було проведено з використанням специфічного флуоресцентного зонду 4,5-діамінофлуоресцеїн діацетату (DAF-2DA, Sigma, США). Проникаючи у клітину, діацетат відщеплюється внутрішньоклітинними естеразами, вивільняючи 4,5-діамінофлуоресцеїн (DAF), який специфічно взаємодіє з NO, утворюючи 4,5-діамінофлуоресцеїн триазол, за флуоресценцією якого можна оцінити рівень продукування NO у клітині [180]. Ізольовані гепатоцити та клітини кісткового мозку щурів ( $0,5 \cdot 10^6$  клітин) інкубували з 10 мкМ DAF-2DA у сольовому розчині Хенкса протягом 30 хв при +37°C. Інтенсивність флуоресценції аналізували на протоковому цитофлуориметрі COULTER® EPICS™ XL™ при довжині хвиль збудження/емісії 488/515 нм. Отримані цитофлуорограми обраховували за допомогою програмного забезпечення FCS Express V3, а результати виражали у вигляді умовних одиниць інтенсивності флуоресценції.

#### **2.3.15 Вивчення характеру загибелі гепатоцитів**

Загибель гепатоцитів оцінювали за накопиченням у них інтеркалюючого барвника пропідію йодиду (PI, Sigma, США), що проникає лише у мертві

клітини та ті, у яких пошкоджена цитоплазматична мембрана [181]. Клітини печінки ( $0,5 \cdot 10^6$ /мл) інкубували з розчином PI (50 мкг/мл) протягом 15 хв при кімнатній температурі в темряві. Флуоресценцію клітин, здатних акумулювати PI, детектували на протоковому цитометрі COULTER® EPICS™ XL™ з використанням довжин хвиль збудження/випромінювання 488/645 нм. Було проаналізовано не менше 10000 клітин у кожному зразку. Результати були оброблені за допомогою програми FCS Express V3 та виражені як відсоток загиблих клітин від загального їх числа.

### **2.3.16 Визначення кількості RANK-позитивних клітин кісткового мозку, крові й селезінки щурів, RANKL- та GR-позитивних клітин кісткового мозку методом протокової цитофлуориметрії та їх візуалізація**

Визначення кількості RANK-позитивних клітин кісткового мозку, крові та селезінки щурів, а також RANKL- та GR-позитивних клітин кісткового мозку проводили використовуючи імуофлуоресцентне мічення клітин за стандартними протоколами з ресурсів <http://www.leica-microsystems.com> та <http://www.abcam.com/protocols>, умови яких були оптимізовані та адаптовані до наших потреб. Підготовлені як описано вище у 2.3.3. та 2.3.4 клітини кісткового мозку, крові та селезінки фіксували 4% розчином параформу в PBS протягом 10-15 хв при кімнатній температурі та відмивали тричі PBS. Далі, в залежності від типу антигену, мембрани клітин, якщо необхідно, пермеабілізували 0,1% розчином Triton X-100 в PBS протягом 10 хв при кімнатній температурі та відмивали тричі спочатку у PBS, потім в 1% BSA у PBS. Надалі проводили блокування 1% розчином BSA у PBS при постійному перемішуванні протягом 30-60 хв (в залежності від кількості клітин) при кімнатній температурі, відмивали та інкубували при постійному перемішуванні протягом 30-60 хв при кімнатній температурі з первинними антитілами у робочому розведенні 1:250 для RANK, RANKL та GR. Після відмивання клітин проводили інкубацію зі специфічними вторинними антитілами, кон'югованими з флуоресцентною міткою у експериментально підібраному розведенні при постійному

перемішуванні протягом 45 хв при кімнатній температурі у темряві з подальшим відмиванням у PBS. Відбирали проби на автофлуоресценцію, які інкубували тільки з вторинними антитілами. Флуоресценцію реєстрували на протоковому цитометрі COULTER® EPICS™ XL™ з використанням довжин хвиль збудження/випромінювання 488/530 нм для флуоресцентних міток DyLight 488 та Alexa Fluor 488. Результати обраховували за допомогою програми FCS Express V3 та виражали як відсоток флуоресцентно мічених клітин від їх загального числа. Для підготування проб для конфокальної мікроскопії клітини інкубували з барвником для профарбовування ядер Hoechst 33258 протягом 5-10 хвилин, після чого наносили суспензію на предметне скло, накривали покривним та герметизували спеціальним лаком.

Флуоресцентно мічені клітини кісткового мозку та селезінки візуалізували за допомогою 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 conjugate – 488 нм; для флуоресцентних міток Alexa Fluor 546 conjugate та Alexa Fluor 568 conjugate – 556 нм. Флуоресценція детектувалася за трьома каналами: 420-480 нм, 505-530 нм та >560 нм відповідно. Обробка результатів проводилася за допомогою програмного забезпечення Zeiss LSM Image Browser.

### **2.3.17 Визначення експресії мРНК CYP27B1, VDR, RANKL, NF-κB, TNFα та PPARγ у різних тканинах щурів**

Визначення експресії цільових генів у кістковому мозку, кістковій тканині та тканині печінки щурів проводили методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Тотальну РНК отримували з наважки подрібненої у рідкому азоті тканини за допомогою наборів для виділення РНК згідно інструкцій до їх використання: Trizol RNA Prep kit (NEOGENE, Україна) для тканини печінки та кісткової тканини або innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena AG, Німеччина) для кісткового мозку.

Концентрації мРНК визначали за допомогою спектрофотометру/флуориметру DS-11 (DeNovix, США). Синтез кДНК проводили згідно стандартного протоколу для використання набору для синтезу кДНК Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США) при +50°C протягом 35 хв. Отриману кДНК використовували як матрицю для проведення ПЛР у реальному часі на ампліфікаторі qTOWER 2.0 Standard RT-PCR Thermal Cycler (Analytik Jena AG, Німеччина) з використанням набору Maxima SYBER Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США). Праймери для кожного гену були сгенеровані за допомогою програмного забезпечення Primer BLAST (табл. 1.3) та синтезовані компанією «Metabion International AG».

Таблиця 1.3

Перелік праймерів для проведення кількісної ПЛР у реальному часі

Ген	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'	Довжина продукту
<i>Gapdh</i>	TGAACGGGAAGCTCACTGG	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	307
<i>Vdr</i>	TCATCCCTACTGTGTCCCGT	TGAGTCTCCTTGGTTCGTG	161
<i>Nf-κb</i>	GTA CTTGCCAGACACAGACGA	CTCGGGAAGGCACAGCAATA	149
<i>Cyp27b1</i>	TGGGTGCTGGGAAC TAACCC	TCGCAGACTGATTCACCTC	113
<i>Rankl</i>	CCAGCATCAAAATCCCAAGT	TGAAAGCCCCAAAGTACGTC	201
<i>Tnfa</i>	TCAGCGAGGACACCAAGC	CTCTGCCAGTTCCACATCTC	252
<i>Pparγ</i>	CGGTTGATTTCTCCAGCATT	TCGCACTTTGGTATTCTTGG	301

Отримані дані були нормалізовані за геном-референсом гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназою (GAPDH) та розраховані за методом  $\Delta\Delta C_t$ .

### 2.3.18 Вестерн-блот аналіз цільових протеїнів у кістковому мозку, кістковій тканині та тканині печінки щурів

Визначення вмісту цільових протеїнів у кістковому мозку, кістковій тканині та тканині печінки щурів проводили методом вестерн-блот аналізу. Перед проведенням електрофорезу лізати вирівнювали за концентрацією протеїну та прогрівали при +95°C протягом 5 хв у буфері Леммлі. Електрофоретичне розділення протеїнів у 10-15% поліакриламідному гелі (ПААГ) проводили у трис-гліциновому буфері з рН 8,3 (25 мМ Tris-HCl, 192

мМ гліцину, 0,1% додецилсульфату натрію) (30-100 мкг протеїну на лунку) при напрузі 100-110 V. Для визначення молекулярної маси протеїнів на електрофореграмах використовували протеїнові стандарти (Thermo Scientific, США). Розділені за молекулярною вагою протеїни з ПААГ переносили на нітроцелюлозну мембрану протягом 1 год при 350 mA у трансфер-буфері з рН 8.3 (25 мМ трис, 192 мМ гліцину, 0,1% додецилсульфату натрію, 20% метанолу) [182]. Вільні центри зв'язування блокували 5% знежиреним сухим молоком в PBS з 0,05% Tween-20 (PBST) протягом 1 год. Мембрану відмивали тричі по 5 хв у PBST, інкубували ніч при +4°C з цільовими антитілами 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 субодиниці p65 NF-κB (1:200), NF-κB p65 (1:250), ІκB (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), мієлопероксидази (1:600), ламіну B1 (1:1000) та β-актину (1:20000). Після інкубування з первинними антитілами мембрану тричі по 5 хв відмивали у PBST, після чого протягом 1-1,5 год при кімнатній температурі інкубували зі специфічними вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому у розведенні 1:4000 для anti-mouse, 1:2500 для anti-goat та anti-rabbit антитіл. Надалі мембрану знову відмивали та виявляли імунореактивні сигнали за допомогою реактивів для посиленої хемілюмінесценції (1,25 мМ розчин люмінолу, 2,72 мМ розчин кумарової кислоти та 0,01% розчин гідроген пероксиду в 0,1 М Tris-HCl, рН 8.5). Час експозиції оброблених мембран на рентгенівській плівці залежав від інтенсивності хемілюмінесценції і становив 1-20 хв. Плівку проявляли й фіксували стандартними фотопроявником та фіксажем. Інтенсивність сигналів на рентгенівських плівках обраховували за допомогою програмного забезпечення GELPRO32. Відносний вміст цільових протеїнів було додатково нормалізовано за β-актином (для цитоплазматичної та загальної фракцій) або ламіном B1 (для ядерної фракції) та представлено в умовних одиницях (разах від рівня у контролі).



### **2.3.19 Визначення рівня транскрипційного активування NF-κB у кістковому мозку, кістковій тканині та тканині печінки щурів**

Про рівень транскрипційного активування NF-κB судили за кількома параметрами. По-перше, про вивільнення NF-κB з неактивного комплексу судили за рівнем IκB, який в нормі знаходиться у комплексі з NF-κB у цитоплазмі, перешкоджаючи його транслокації до ядра. По-друге, беручи до уваги ключову роль процесу фосфорилування у транскрипційному активуванні NF-κB [183], [184], методом вестерн-блот аналізу досліджували рівні фосфорильованої та нефосфорильованої субодиниці p65 ядерного фактору κB та їх співвідношення у кістковому мозку, кістковій тканині та тканині печінки щурів. По-третє, зважаючи на те, що транслокація NF-κB до ядра є ознакою траскрипційного активування, оцінювали перерозподіл фосфорильованої субодиниці p65 NF-κB між ядерною та цитоплазматичною фракціями у кістковому мозку щурів. Щоб констатувати транслокацію NF-κB p65 до ядра не тільки спираючись на дані вестерн-блот аналізу, pNF-κB-позитивні клітини кісткового мозку були проскановані в об'ємі з кроком 0,32 мкм за допомогою конфокального мікроскопу та на основі отриманих в результаті сканування серій знімків за допомогою програмного забезпечення LSM Image Browser побудовано 3D-модель транслокації NF-κB до ядра.

### **2.3.20 Статистична обробка результатів**

Статистичну обробку даних проводили з використанням Microsoft Excel загальноприйнятими методами варіаційної статистики з вирахуванням середнього арифметичного значення показника (M) та стандартної похибки середнього значення ( $\pm m$ ). Визначення достовірності відмінностей між одержаними величинами двох вибірок проводили з використанням t-критерію Стьюдента [185]. Вірогідність розходження між групами порівняння визначали методом однофакторного дисперсійного аналізу (one-way Anova) з подальшим post-hoc тестом Bonferroni за допомогою комп'ютерної програми Origin v.9.0. Достовірними вважали відмінності між групами при  $p < 0,05$ .

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### 3.1 Характеристика компонентів D-ауто/паракринної системи у тканинах щурів за тривалої дії преднізолону та при введенні вітаміну D<sub>3</sub>

Клітинно-молекулярні механізми, що лежать в основі розвитку ГІО, на сьогодні залишаються недостатньо висвітленими. Проте відомо, що одним із важливих чинників, що відіграють роль у розвитку остеопорозу, є хронічний D-гіповітаміноз. Зниження забезпеченості організму вітаміном D<sub>3</sub> за дії ГК може обумовлюватись порушенням обміну холекальциферолу, зокрема пригніченням процесів його гідроксилювання з утворенням першого гідроксильованого похідного – 25ОНD [128].

Окрім рівня 25ОНD, важливу роль в реалізації біологічних ефектів вітаміну D відіграють й інші компоненти D-ауто/паракринної системи. Так, недостатнє сигналювання через VDR може бути пов'язаним як зі зниженою концентрацією ліганда – 1,25(ОН)<sub>2</sub>D, так і з порушеною експресією самого VDR. Більше того, деякі клітини-мішені здатні самостійно експресувати 1α-гідроксилазу (CYP27B1), що перетворює 25ОНD у 1,25(ОН)<sub>2</sub>D. Утворений в позаниркових клітинах-мішенях 1,25(ОН)<sub>2</sub>D не потрапляє в кров і не впливає на метаболізм кальцію, а поповнює внутрішньоклітинний пул 1,25(ОН)<sub>2</sub>D, регулюючи диференціювання, проліферування та локальний синтез ензиму 25-гідроксивітамін D-24-гідроксилази, який відповідає за катаболізм 1,25(ОН)<sub>2</sub>D з утворенням біологічно інертної форми – кальцитроевої кислоти.

У цьому розділі було визначено забезпеченість організму вітаміном D, стан вітамін D-ауто/паракринної системи у різних тканинах щурів, оцінено зміни експресії глюкокортикоїдного рецептору при розвитку ГК-індукованого остеопорозу, а також досліджено взаємозв'язок дефіциту вітаміну D із функціональними та біохімічними змінами у тканині печінки за хронічного введення преднізолону та при корекції вітаміном D<sub>3</sub>.

### 3.1.1. Забезпеченість організму вітаміном D та стан D-ауто/паракринної системи у тканинах щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>

Зважаючи на недостатнє висвітлення у сучасній літературі змін стану D-ауто/паракринної системи у різних органах та тканинах за ГК-індукованого остеопорозу, було досліджено рівень ключових компонентів D-ауто/паракринної системи, а саме 25OHD у сироватці крові, VDR та CYP27B1 у тканинах щурів за тривалої дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>.

Показано, що вміст 25OHD у сироватці крові за дії преднізолону знижувався майже у 3 рази порівняно з контролем (рис. 3.1). Це пояснюється продемонстрованим нами раніше порушенням першого етапу метаболізму вітаміну D у гепатоцитах внаслідок пригнічення загальної вітаміну D 25-гідроксилазної активності гепатоцитів та зниженням експресії її ізоензимів CYP27A1 й CYP2R1 [128]. Введення вітаміну D<sub>3</sub> на тлі дії преднізолону нормалізувало вміст 25OHD у сироватці. Отримані результати свідчать про негативний вплив преднізолону на обмін вітаміну D у гепатоцитах, що супроводжується розвитком стану D-недостатності, а також про можливість відновлення рівня 25OHD шляхом перорального введення холекальциферолу.

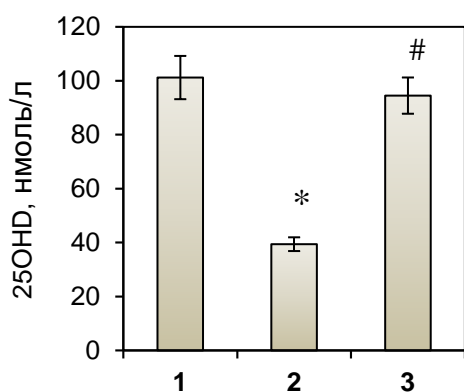


Рис. 3.1 Вміст 25OHD у сироватці крові щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub> (M±m, n=10): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон +вітамін D<sub>3</sub>; \* p < 0,05 порівняно з контролем, # p < 0,05 порівняно з дією преднізолону.

Оскільки компоненти D-ауто/паракринної системи присутні у різних типах клітин, нами було проведено дослідження особливостей експресії в різних тканинах як VDR, так і 25OHD-1 $\alpha$ -гідроксилази (CYP27B1), ензиму, що здійснює гідроксилювання 25-гідроксихолекальциферолу з утворенням гормонально активної форми вітаміну D – 1,25(OH)<sub>2</sub>D.

Класичною тканиною-мішенню для дії  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  є кісткова тканина. VDR міститься у остеобластах, остеоцитах, хондроцитах та остеокластах на різних стадіях розвитку клітин. CYP27B1 експресується у всіх клітинах кісткової тканини, окрім остеокластів. Таким чином, експресія цих двох компонентів D-ауто/паракринної системи більшою мірою може характеризувати процес остеогенезу. Показано, що 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  $\text{D}_3$  клітинах (рис. 3.2). Введення преднізолону підвищувало рівень мРНК CYP27B1 у кістковій тканині у 1,7 рази, що може пояснюватись компенсаторною реакцією на зниження рівня субстрату  $25\text{OH}\text{D}$  для цього ензиму у сироватці крові. Ці дані узгоджуються з проведеними раніше дослідженнями, в яких було виявлено посилення експресії CYP27B1 за дії дексаметазону [186]. Введення вітаміну  $\text{D}_3$  достовірно не впливало на рівень мРНК у кістковій тканині, проте спостерігалась тенденція до відновлення вмісту протеїну VDR, що може свідчити про можливий механізм реалізації коригувальної дії холекальциферолу на рівні трансляції. При цьому, зважаючи на часткове відновлення рівнів  $25\text{OH}\text{D}$  у сироватці та VDR у кістковій тканині, вміст мРНК CYP27B1 компенсаторно знижувався не тільки порівняно з преднізолоновою групою (у 4 рази), але й з контрольною (у 2,4 рази), тим самим відновлюючи стан D-ауто/паракринної системи та адекватне сигналювання через VDR.

Окрім кісткової тканини відносний вміст VDR та CYP27B1 був оцінений в лізатах кісткового мозку щурів. У кістковому мозку VDR відповідає за регулювання процесів проліферування та диференціювання клітин, зокрема, він експресується мезенхімальними стовбуровими клітинами, що є попередниками остеобластів, а також преостеокластами. В свою чергу, на сьогодні бракує експериментальних даних щодо того, які типи клітин кісткового мозку експресують CYP27B1, а також стосовно впливу глюкокортикоїдів на експресію цього ензиму. Показано, що за дії преднізолону відбувалось суттєве

зниження вмісту як мРНК VDR (у 4,6 рази, рис. 3.3 Б), так і протеїну CYP27B1 у клітинах кісткового мозку (у 2,1 рази, рис. 3.3 В). Відповідно, зниження експресії 1 $\alpha$ -гідроксилази може обумовлювати гальмування локального синтезу 1,25(OH)<sub>2</sub>D та призводити до порушення синтезу відповідних остеотропних цитокінів, які прямо чи опосередковано регулюються вітаміном D та залучені у процес ремоделювання кісткової тканини. На тлі падіння вмісту 25OHD такі зміни свідчать про пригнічення функціонування D-ауто/паракринної системи кісткового мозку та, як наслідок, порушення процесів проліферування та диференціювання попередників остеобластів. Продемонстровано коригувальний ефект вітаміну D<sub>3</sub> на індуковані преднізолоном зміни експресії протеїну як VDR, так і CYP27B1. Їх вміст збільшувався у 20,0 та 3,2 рази відповідно порівняно з преднізолоновою групою.

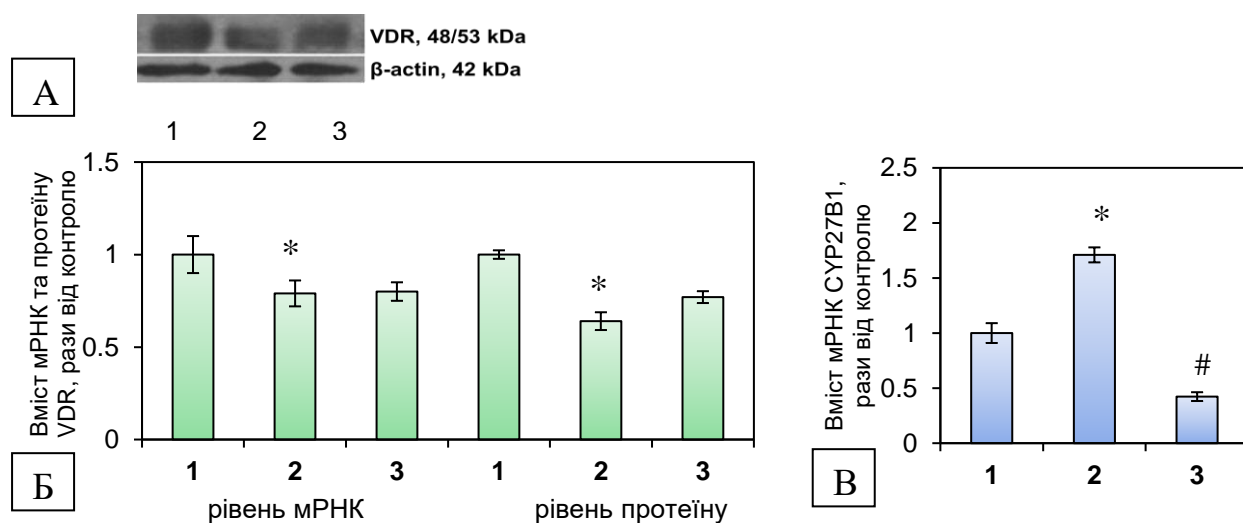


Рис. 3.2 Відносний вміст VDR та CYP27B1 у кістковій тканині щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Імуноблотограма VDR (А) та гістограми вмісту мРНК і протеїну VDR (Б) та мРНК CYP27B1 (В): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Оскільки раніше було показано, що тривале введення преднізолону пригнічує активність вітаміну D<sub>3</sub> 25-гідроксилази та експресію її ізоензимів

CYP27A1 й CYP2R1 у печінці [128], було зроблено припущення, що цей глюкокортикоїд може також впливати на інші компоненти D-ауто/паракринної системи печінки, зокрема на її сигнальну ланку – VDR. Щоб виявити, чи може дефіцит вітаміну D корелювати з порушеннями VDR-сигналювання у печінці було визначено його вміст на транскрипційному та трансляційному рівнях.

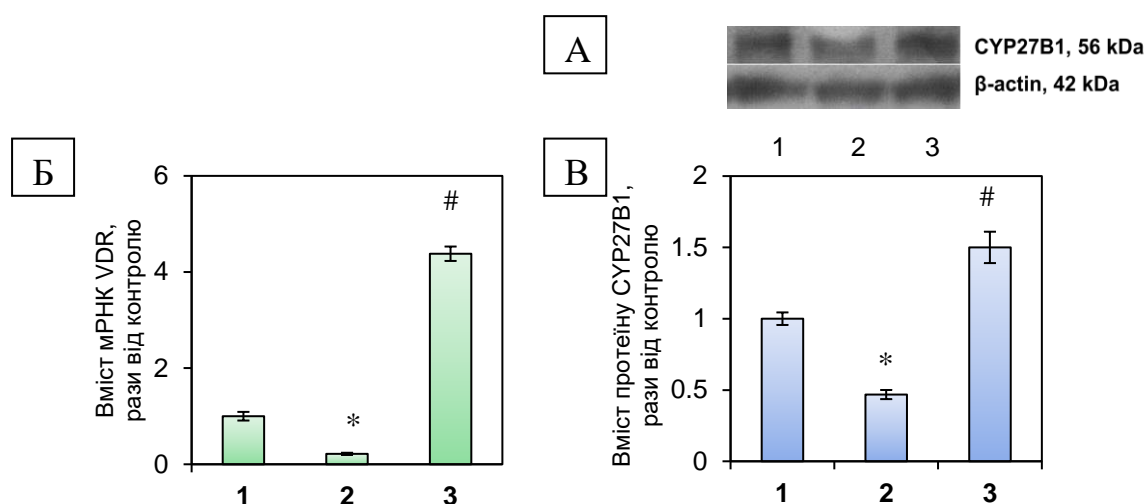


Рис. 3.3 Відносний вміст VDR та CYP27B1 у кістковому мозку щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Імуноблотограма CYP27B1 (A) та гістограми вмісту мРНК VDR (Б) та протеїну CYP27B1 (B): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Хронічне введення преднізолону викликало більш виражене зниження у печінці рівня мРНК (у 10,0 разів) та помірне – у 1,2 рази – вмісту протеїну VDR у порівнянні з контрольними тваринами (рис. 3.4). На тлі відновлення вмісту 25ОНD у сироватці крові тварин, які отримували вітамін D<sub>3</sub>, рівень мРНК VDR достовірно підвищувався у порівнянні з дією преднізолону. Як відомо, VDR у печінці експресується гепатоцитами, холангіоцитами та клітинами Купфера [187], тому індуковані преднізолоном порушення експресії VDR можуть вказувати на зниження чутливості цих клітин до дії вітаміну D<sub>3</sub>, що може

проявляться у порушенні VDR-регульованих процесів у різних типах клітин печінки.

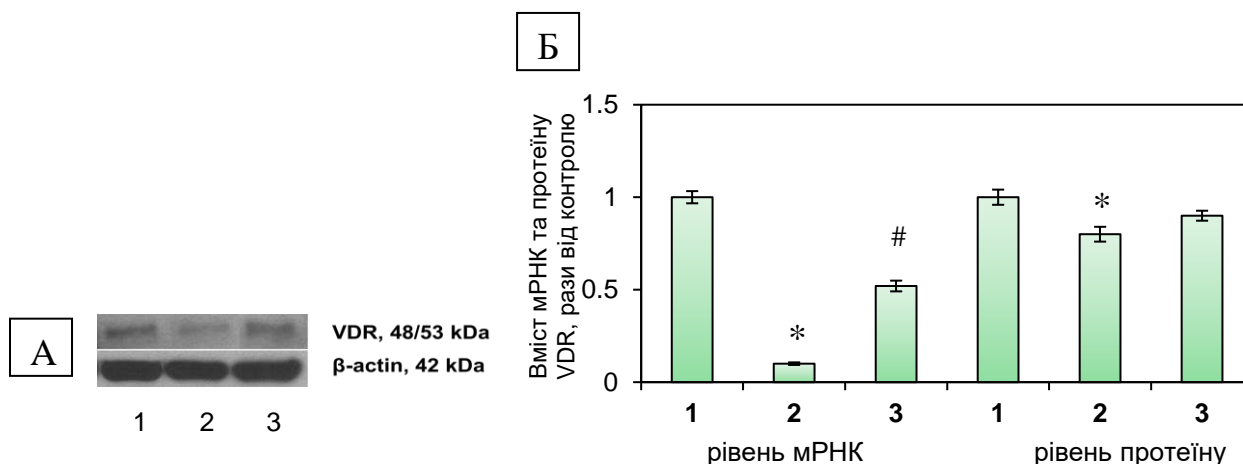


Рис. 3.4 Відносний вміст VDR у печінці щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Імуноблотограма VDR (A) та гістограми (Б) вмісту VDR на рівні мРНК та протеїну: 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Таким чином, отримані результати показали, що 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 (VDR та CYP27B1) у різних тканинах. При цьому зниження вмісту 25OHD у сироватці крові корелювало зі зниженням рівня тканинного VDR. Це узгоджується з даними літератури про те, що ГК можуть модулювати ефекти 1,25(OH)<sub>2</sub>D через пряме регулювання експресії VDR, оскільки GREs були ідентифіковані у гені *Vdr* [188]. У той час як експресія CYP27B1 у кістковому мозку пригнічувалась за дії преднізолону, спостерігалось збільшення, ймовірно компенсаторне, мРНК CYP27B1 у кістковій тканині. Продемонстровано коригувальний ефект вітаміну D<sub>3</sub> на індуковані преднізолоном порушення експресії VDR та CYP27B1, який був більш виражений у кістковому мозку щурів.

### **3.1.2. Вміст глюкокортикоїдних рецепторів у кістковому мозку та печінці щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>**

Геномна дія ГК на клітини-мішені реалізується на рівні регуляції транскрипції генів та опосередковується взаємодією ГК зі специфічними глюкокортикоїдними рецепторами (GR), які виявлені практично у всіх клітинах. Прояви як терапевтичних, так і побічних ефектів глюкокортикоїдів, окрім інших факторів, залежать також від ефективності сигналювання через GR, що належать, як і VDR, до надродини ядерних рецепторів [189]. З огляду на те, що глюкокортикоїди регулюють проліферування, диференціювання та дозрівання клітин кісткового мозку, доцільним було оцінити відносний вміст GR у тканинах щурів.

Відомо, що ГК можуть чинити прямі ефекти на остеобласти та остеокласти, проте, на жаль, детектувати GR у кістковій тканині методом вестерн-блот аналізу не вдалось. Однак, вплив ГК на розвиток клітин-попередників остеобластів і остеокластів стало можливим оцінити за вмістом GR у кістковому мозку. Показано, що преднізолон викликав зниження (у 1,3 рази) відносного вмісту протеїну GR у кістковому мозку порівняно з контролем, в той час як сумісне введення преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub> підвищувало вміст даного рецептору порівняно як з преднізолоновою групою, так і з контрольною (у 2,5 та 1,9 разів відповідно, рис. 3.5 А, Б). Такий ефект преднізолону може пояснюватись компенсаторною відповіддю на довготривале введення гормону. Ці дані були підтверджені результатами підрахунку кількості флуоресцентно мічених GR-позитивних клітин кісткового мозку на протоковому цитофлуориметрі (рис. 3.5 В, Г). Виявлено 3-разове зниження кількості GR-позитивних клітин за дії преднізолону, в той час як введення холекальциферолу підвищувало їх кількість у 10,5 разів порівняно з групою щурів, що отримували лише ГК. За допомогою методу конфокальної мікроскопії були отримані знімки GR-позитивних клітин кісткового мозку, що підтвердили результати, отримані на протоковому цитофлуориметрі (рис. 3.5 Д). Отже, результати вказують на те, що GR-опосередковане сигналювання у



клітинах-попередниках, яке відіграє суттєву роль у підтриманні балансу між остеобласт-опосередкованим формуванням та остеобласт-залежною резорбцією кісткової тканини, може ефективно модулюватись вітаміном D<sub>3</sub>.

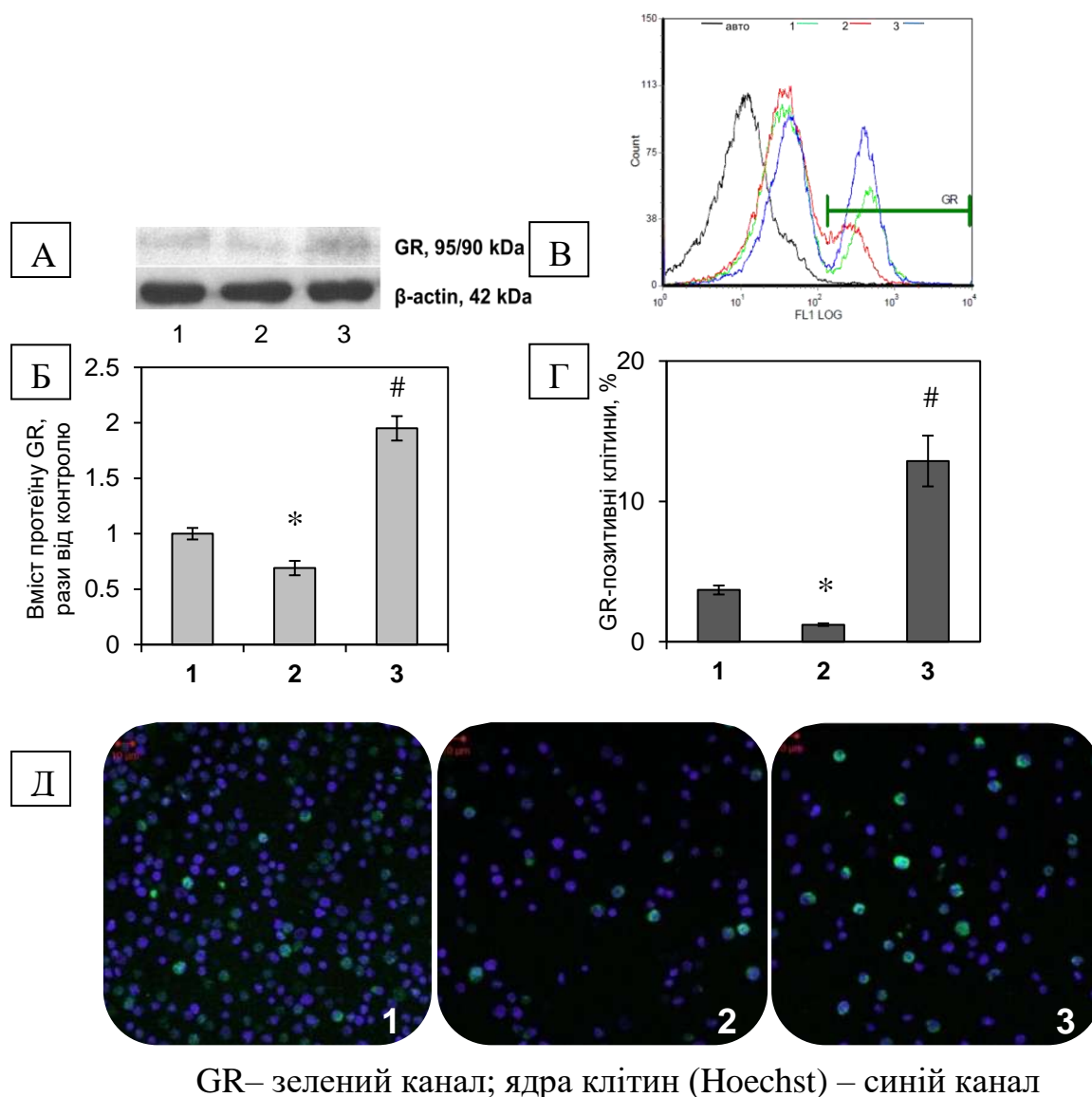


Рис. 3.5 Відносний вміст GR у кістковому мозку щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Імуноблотограма GR (А) та гістограма (Б) вмісту протеїну GR, цитофлуорограми (В) GR-позитивних клітин (count – кількість подій; FL1 LOG – інтенсивність флуоресценції), їх кількісний аналіз (Г) та знімки (Д) GR-позитивних клітин у кістковому мозку щурів (конфокальна мікроскопія, метод непрямого імунофлуоресцентного мічення клітин): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Знижений рівень протеїну GR за дії преднізолону може свідчити про залучення механізму негативного зворотного зв'язку у регулюванні його вмісту або навіть про десенситизацію, викликану надмірним навантаженням організму глюкокортикоїдним препаратом. Зважаючи на суттєве зменшення рівня GR за введення преднізолону, можна припустити, що його побічні ефекти опосередковуються не тільки через GR сигналювання, але й через опосередкований вплив на інші ключові сигнальні системи клітин кісткового мозку. Зокрема, побічні ефекти ГК можуть опосередковуватись його прямим впливом на NF-κB, оскільки відомо, що GR може прямо взаємодіяти з NF-κB, блокуючи його транслокацію до ядра [164]. Так, за нестачі GR у цитозолі NF-κB та за умов зняття інгібіторного контролю над NF-κB, останній може транслокуватись до ядра та чинити свої ефекти на експресію багатьох генів. Також відомо, що одним з механізмів дії ГК є підвищення вмісту IκB, тому за умов зниження рівня GR вміст IκB також може знижуватись, сприяючи тим самим активуванню NF-κB. Крім того, відомо, що ГК «перемикають» диференціювання стромальних клітин кісткового мозку – клітин-попередників остеобластів – на адипоцитарний шлях, що переважно опосередковується збільшенням експресії PPARγ та репресією остеогенного транскрипційного фактору Runx2 [109]. Більше того, високі дози ГК викликають перемикання диференціювання остеобластів на шлях адипогенезу через гальмування AP-1. Тому не виключено, що порушена експресія GR також може негативно впливати на сигнальні шляхи із залученням PPARγ та Runx2.

Оскільки відомо, що GR залучені у регулювання функціонування печінки, було визначено відносний вміст GR також у лізатах цього органу. Виявлено, що преднізолон індукував зменшення відносного вмісту GR в тканині печінки у 2,3 рази порівняно з контролем (рис. 3.6), що може пояснюватись як адаптивним пристосуванням клітин до надмірного надходження ГК, так і посиленою загибеллю клітин, що експресують GR. Цікаво, що введення вітаміну D<sub>3</sub> сприяло подальшому зниженню відносного вмісту GR у 1,7 разів порівняно з преднізолоновою групою та у 3,9 рази порівняно з контрольною, що, ймовірно,

може відігравати гепатопротекторну роль. Проте, щоб з'ясувати за рахунок якого молекулярного механізму вітамін D<sub>3</sub> чинить такий ефект, необхідним є проведення подальших досліджень.

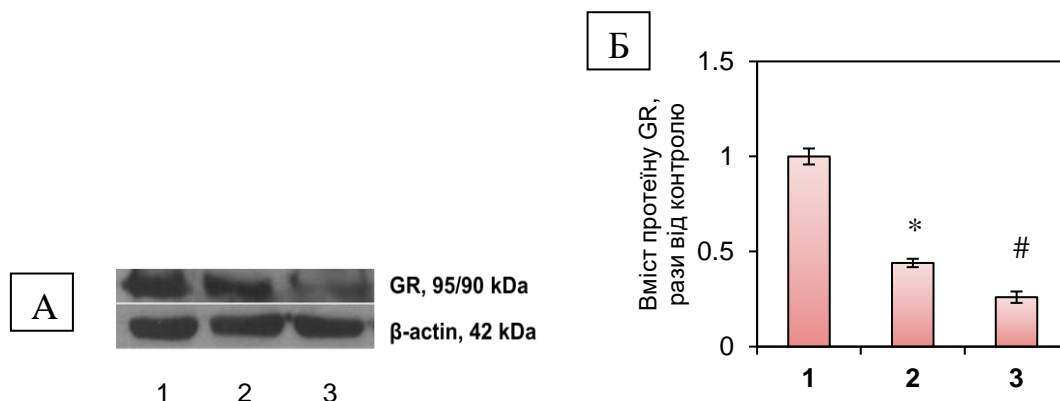


Рис. 3.6 Відносний вміст GR у печінці щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Імуноблотограма GR (А) та гістограма (Б) вмісту протеїну GR: 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Таким чином, дослідження рецепторної ланки сигналювання ГК показало суттєве зменшення вмісту GR як у кістковому мозку, так і у тканині печінки щурів за введення преднізолону, що може пояснюватись компенсаторною відповіддю організму на довготривале введення препарату, а також впливати на сигнальні шляхи із залученням NF-κB. За введення вітаміну D<sub>3</sub> спостерігався різнонаправлений ефект на вміст GR – відновлення у кістковому мозку та подальше його зниження у тканині печінки.

### 3.1.3 Зв'язок забезпеченості організму вітаміном D із функціональними та біохімічними змінами у тканині печінки за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>

Одним з побічних ефектів тривалого застосування глюкокортикоїдів є ушкодження тканини печінки, внаслідок чого може порушуватись процес гідроксилювання вітаміну D в гепатоцитах щурів, призводячи таким чином до зниженого рівня 25OHD [128]. Проте молекулярні механізми глюкокортикоїд-

індукованих порушень функціонування печінки та шляхи їх коригування на сьогодні залишаються недостатньо висвітленими.

Перш за все, було оцінено вплив преднізолону на життєздатність гепатоцитів. Визначення ступеня загибелі гепатоцитів проводили на протоковому цитофлуориметрі за кількістю клітин, здатних акумулювати пропідій йодид (PI) – інтеркалюючий барвник, що проникає через пошкоджені клітинні мембрани некротичних клітин [123]. Встановлено, що кількість PI-позитивних (загиблих) клітин серед ізольованих гепатоцитів зростала у 1,7 рази за дії преднізолону, а саме до 12,8% порівняно з 7,5% у контролі (рис. 3.7 А).

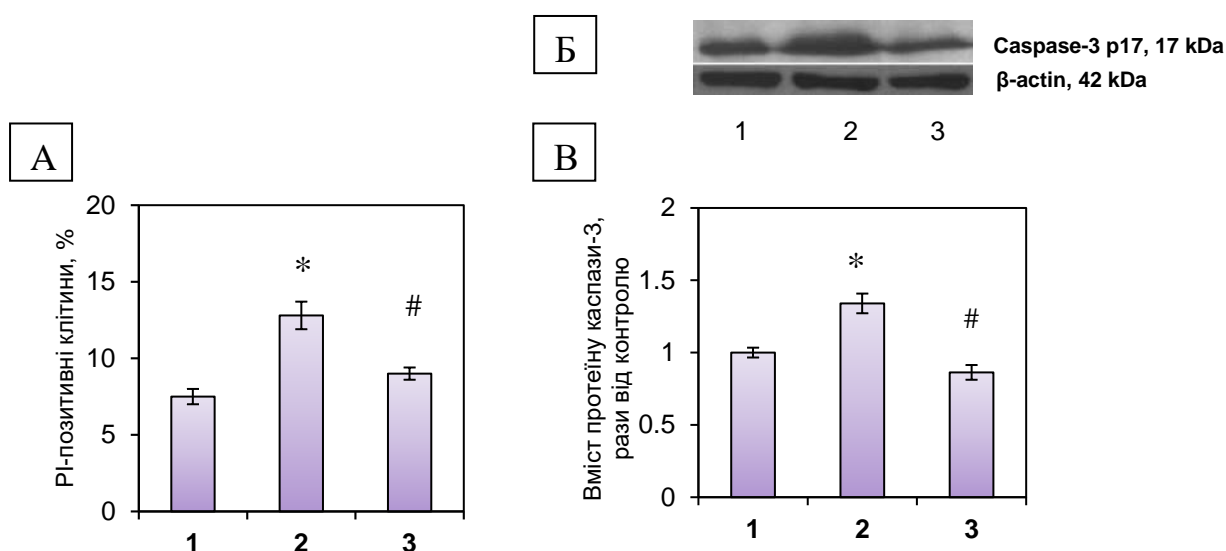


Рис. 3.7 Загибель клітин печінки за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>, M ± m, n = 7. Кількісний аналіз цитофлуорограм загибелі гепатоцитів за акумулюванням PI (А); імуноблотограма (Б) та гістограма (В) вмісту протеїну каспази-3: 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \* p < 0,05 порівняно з контролем, # p < 0,05 порівняно з дією преднізолону.

Відомо, що окрім некротичних клітин, PI-позитивні гепатоцити можуть включати певну кількість клітин, що перебувають на пізніх стадіях апоптозу. З огляду на це важливо було визначити, чи може преднізолон індукувати процес апоптозу у печінці. Оскільки каскадне активування каспаз відіграє ключову роль у запуску апоптозу клітини, було досліджено рівень активної субодиниці

ефекторної каспази-3 – p17. Продемонстровано, що за дії преднізолону рівень протеїну каспази-3 був підвищений у 1,3 рази порівняно з контролем (рис. 3.7 Б, В). Введення вітаміну D<sub>3</sub> на тлі дії преднізолону призводило до значного 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 D<sub>3</sub> регулювати процеси некротичної та апоптичної загибелі клітин [190].

Щоб поглибити розуміння молекулярних механізмів, що лежать в основі глюкокортикоїд-індукованої загибелі клітин та впливу вітаміну D<sub>3</sub> на цей процес, було також досліджено рівень ADP-рибозилування протеїнів – оборотної посттрансляційної модифікації, яка регулює активність протеїнів-мішеней [191]. Приєднання негативно заряджених лінійних або розгалужених молекул полімеру ADP-рибози до акцепторних протеїнів залучене в широкий спектр фізіологічних процесів у клітині, включаючи її загибель. Ензим, який каталізує цей процес – PARP-1 (полі-ADP-рибозополімераза 1) – ще називають молекулярним сенсором генотоксичного стресу. Його активування та синтез PAR із NAD<sup>+</sup> – одна з перших реакцій клітини на ушкодження ДНК, викликане оксидативним та нітрозативним стресом. Виявлено, що рівень PARP-1 залишався незмінним у всіх досліджуваних групах, оскільки це конститутивний ензим, задіяний також в опосередкованих полі-ADP-рибозилуванням сигнальних шляхах, незалежних від ушкодження ДНК (рис. 3.8 Б). Проте, було показано, що вміст фрагменту 89 кДа PARP-1 збільшувався у 1,6 рази (рис. 3.8 В). Це може свідчити про активування загибелі клітин апоптотичним шляхом паралельно з некротичною загибеллю гепатоцитів, що корелює з попередніми даними щодо підвищеного рівня каспази-3 за дії преднізолону. Також було встановлено зростання у 1,8 рази рівня PAR-протеїнів у лізатах печінки щурів за дії преднізолону, що підтверджує активування ензиму у відповідь на ушкодження ДНК, викликане оксидативним стресом. Введення вітаміну D<sub>3</sub> не впливало на рівень PARP-1, проте знижувало як відносний вміст фрагменту 89 кДа PARP-1 (у 1,2 рази), так і PAR-протеїнів (у 1,2 рази) порівняно з дією преднізолону (рис. 3.8 В, Д). Отримані дані свідчать, що тривале введення

преднізолону індукує процес полі-ADP-рибозилування, що поряд з підвищенням вмісту фрагменту 89 кДа PARP-1 вказує на активування апоптотичного шляху загибелі гепатоцитів [190].

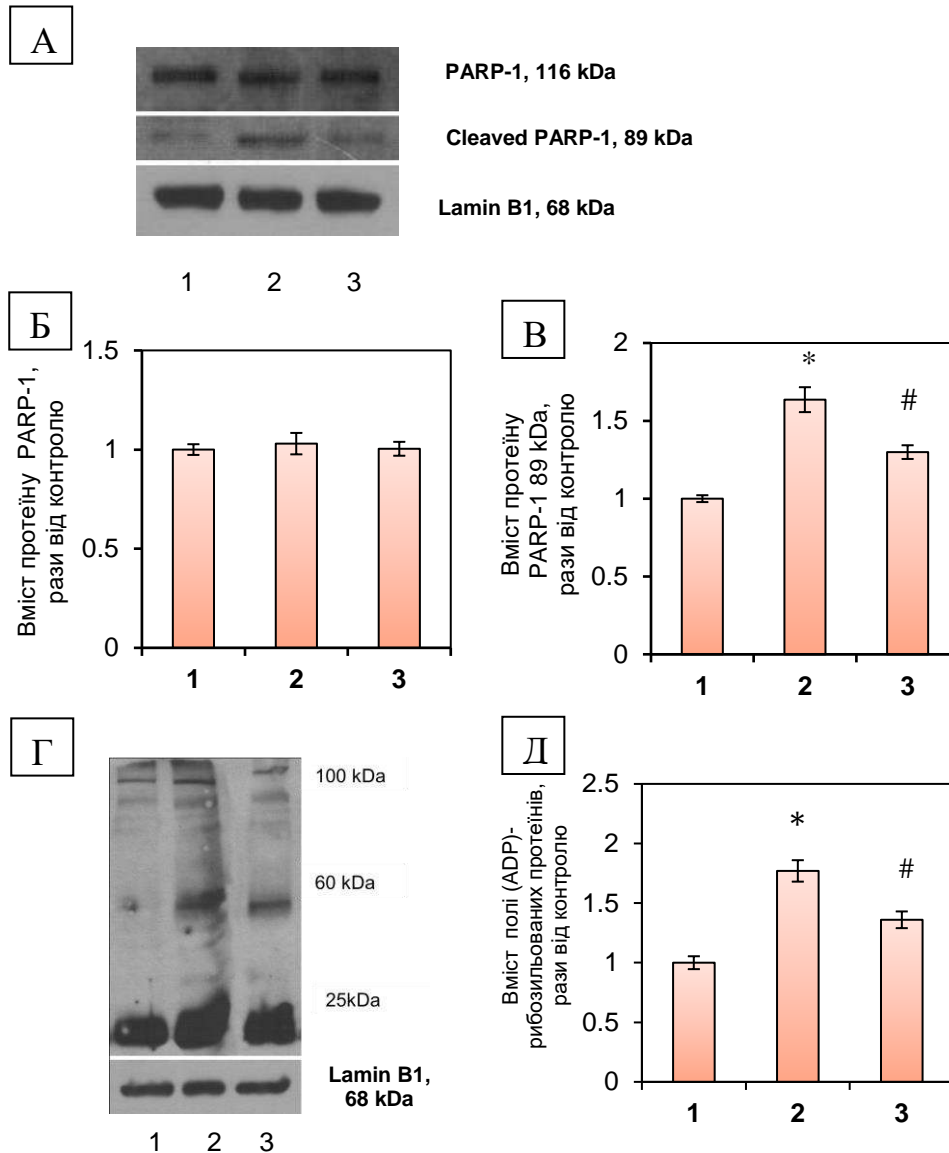


Рис. 3.8 Полі (ADP)-рибозилування протеїнів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Імуноблоти PARP-1 та фрагменту 89 кДа PARP-1 (А), гістограми вмісту протеїнів PARP-1 (Б) та фрагменту 89 кДа PARP-1 (В); імуноблоти розподілу полі-(ADP)-рибозильованих протеїнів за молекулярною вагою (Г) та гістограма вмісту полі-(ADP)-рибозильованих протеїнів (Д): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Індукування загибелі гепатоцитів за дії преднізолону може бути опосередковане розвитком оксидативного стресу, що було показано нами раніше [123]. Проте на сьогодні залишаються малоз'ясованими механізми залучення сигнального шляху оксиду азоту (NO) у розвиток порушень функціонування печінки, асоційованих з довготривалим введенням терапевтичних доз преднізолону. Тому для оцінки участі NO у механізмах індукованого преднізолоном ушкодження печінки, було досліджено рівні утворення NO гепатоцитами, а також вміст одного з ензимів, що відповідають за його синтез (індуцибельної NO-синтази – iNOS) та рівень опосередкованого активними формами нітрогену посттрансляційного нітрування протеїнів.

Інтенсивність продукування клітинами печінки оксиду азоту вимірювали за допомогою NO-чутливого флуоресцентного зонду – діамінофлуоресцеїну діацетату (DAF-2DA). Встановлено, що введення преднізолону призводить до збільшення утворення NO в ізольованих гепатоцитах у 1,9 разів порівняно з контролем (рис. 3.9). Вітамін D<sub>3</sub> частково знижував рівень продукування NO в гепатоцитах у порівнянні з групою тварин, яким вводили глюкокортикоїд.

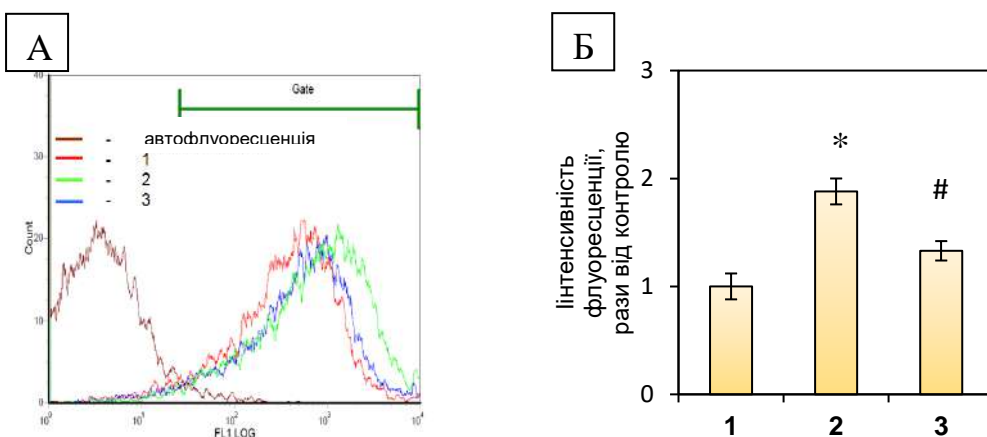


Рис. 3.9 Оцінка продукування гепатоцитами оксиду азоту з зондом DAF-2DA за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Цитофлюорограми (А) утворення NO в ізольованих гепатоцитах (count – кількість подій; FL1LOG – інтенсивність флуоресценції) та їх кількісний аналіз (Б): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Вважається, що надмірне утворення активних метаболітів кисню/нітрогену є одним з основних механізмів, який призводить до пошкодження клітин та їх дисфункції. Цитотоксичні і мутагенні ефекти цих метаболітів пов'язані з посиленням вільнорадикального окислення фізіологічно важливих біомакромолекул (протеїнів, ліпідів, нуклеїнових кислот) [192]. Відомо, що оксид азоту може взаємодіяти з супероксид аніон-радикалами з утворенням нестабільної і високореактивної сполуки – пероксинітриту ( $\text{ONOO}^-$ ), який здатний ковалентно модифікувати протеїни та призводити до втрати їх нативних властивостей та наступної дисфункції, що може відігравати роль у посиленні загибелі гепатоцитів. Залишки тирозину у складі протеїнових молекул є чутливими мішенями до дії пероксинітриту, тому вміст 3-нітротирозину розглядається як специфічний маркер нітрування протеїнів та індикатор розвитку оксидативно-нітрозативного стресу [192]. Встановлено, що преднізолон підвищував рівень нітрозильованих протеїнів в 1,6 рази порівняно з контролем (рис. 3.10 Б, В). Введення вітаміну  $\text{D}_3$  вело до зниження рівня нітрозильованих протеїнів майже до значень контрольних тварин. Отримані нами результати цілком узгоджуються з експериментальними даними щодо кореляції між дефіцитом вітаміну D в організмі тварин, підвищеним рівнем 3-нітротирозину та розвитком нітрозативного стресу в різних тканинах [193].

Посилення утворення NO та зростання рівня нітрування протеїнів можуть бути пов'язані, ймовірно, з виявленим нами підвищенням у 1,4 рази експресії протеїну iNOS у тканині печінки (рис. 3.10 А, В). Натомість, введення вітаміну  $\text{D}_3$  нормалізувало вміст iNOS, що проявлялось також у суттєвому інгібуванні посиленого глюкокортикоїдом процесу нітрування протеїнів.

Відомо, що під контролем NF- $\kappa$ B знаходяться різноманітні клітинні функції, серед яких індукування запальних реакцій та модулювання сигнальних шляхів, відповідальних за виживання клітин [194]. Оскільки експресія iNOS може індукуватись транскрипційним фактором NF- $\kappa$ B, з використанням методів вестерн-блот аналізу та ПЛР у реальному часі було досліджено вміст компонентів сигнального шляху NF- $\kappa$ B (загальна NF- $\kappa$ B p65, фосфорильована



за Ser 311 субодиниця р65 NF-κВ та інгібітор ядерного фактору κВ – ІκВ) у печінці щурів в нормі, за хронічного введення преднізолону та при корекції вітаміном D<sub>3</sub> (рис. 3.11).

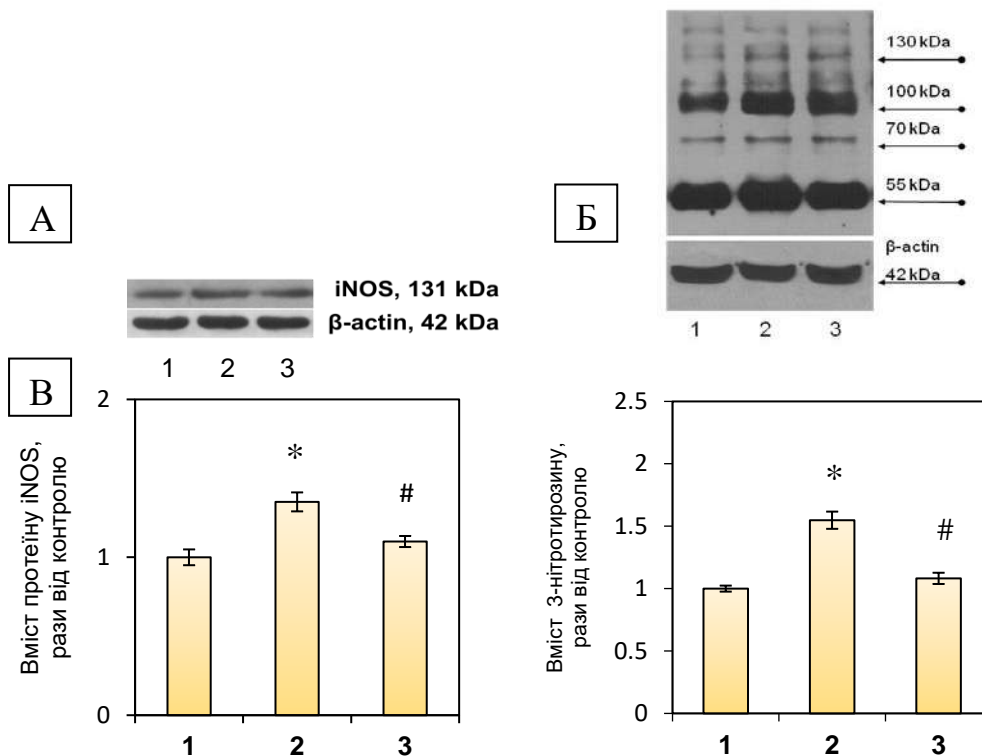


Рис. 3.10 Відносний вміст iNOS та 3-нітротирозину у печінці щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Імуноблоти iNOS (А), нітрозильованих протеїнів (Б), гістограми (В) вмісту iNOS та нітрозильованих протеїнів: 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Введення тваринам преднізолону призводило до збільшення рівня мРНК NF-κВ р65 майже втричі у порівнянні з контрольною групою (рис. 3.11 Б), що цілком узгоджується з раніше отриманими нами даними щодо розвитку преднізолон-індукованого оксидативно-нітрозативного стресу, оскільки NF-κВ, як відомо, є редокс-чутливим фактором транскрипції. Проте характер змін вмісту протеїну NF-κВ р65 відрізнявся від змін на рівні експресії його мРНК. Так, у групі з преднізолоном не виявлено суттєвої різниці у відносному вмісті протеїну NF-κВ р65 в печінці порівняно з контрольною групою (рис. 3.11 В).

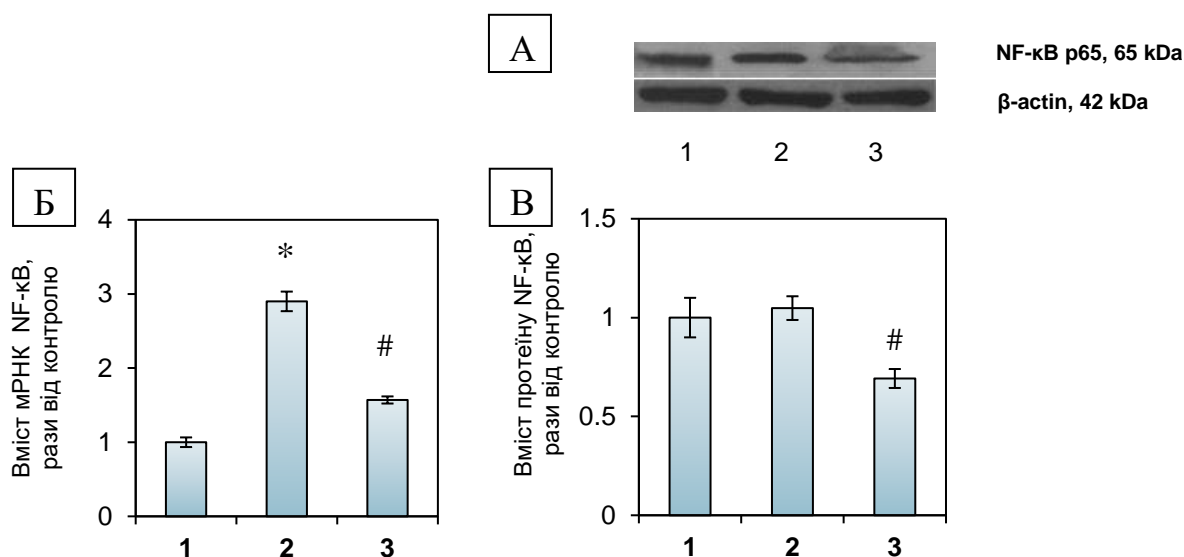


Рис. 3.11 Відносний вміст NF-κB у печінці щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>, M±m, n=7. Імуноблотограма NF-κB (А) та гістограми вмісту NF-κB на рівні мРНК (Б) та протеїну (В): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \* різниця порівняно з контролем вірогідна (P < 0,05), # р < 0,05 порівняно з контролем, # р < 0,05 порівняно з дією преднізолону.

Зважаючи на провідну роль процесу фосфорилування у транскрипційному активуванні NF-κB, було також визначено рівень фосфорильованої за Ser 311 субодиниці p65 NF-κB та виявлено, що введення тваринам преднізолону викликало значне підвищення її вмісту у тканині печінки як у загальних лізатах (у 2,2 рази), так і у ядерній фракції (в 1,8 рази) у порівнянні з контролем (рис. 3.12 Б, В). Нетипова протеїнкіназа (PKC) ξ була запропонована як ензим, що фосфорилує NF-κB за Ser 311 та потребує попереднього вивільнення p65/p50 з інгібіторного комплексу κB (IκB) [195]. Було показано, що преднізолон індукував зниження у 1,4 рази рівня IκB у печінці порівняно з контролем (рис. 3.12 Г), що свідчить про підвищену протеолітичну деградацію IκB, 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, не виключено, і iNOS. Крім того, оскільки продемонстровано підвищений рівень

pNF-кВ р65 у ядерній фракції (рис. 3.12 Б), це додатково є свідченням процесу транслокації NF-кВ р65 з цитоплазми до ядра.

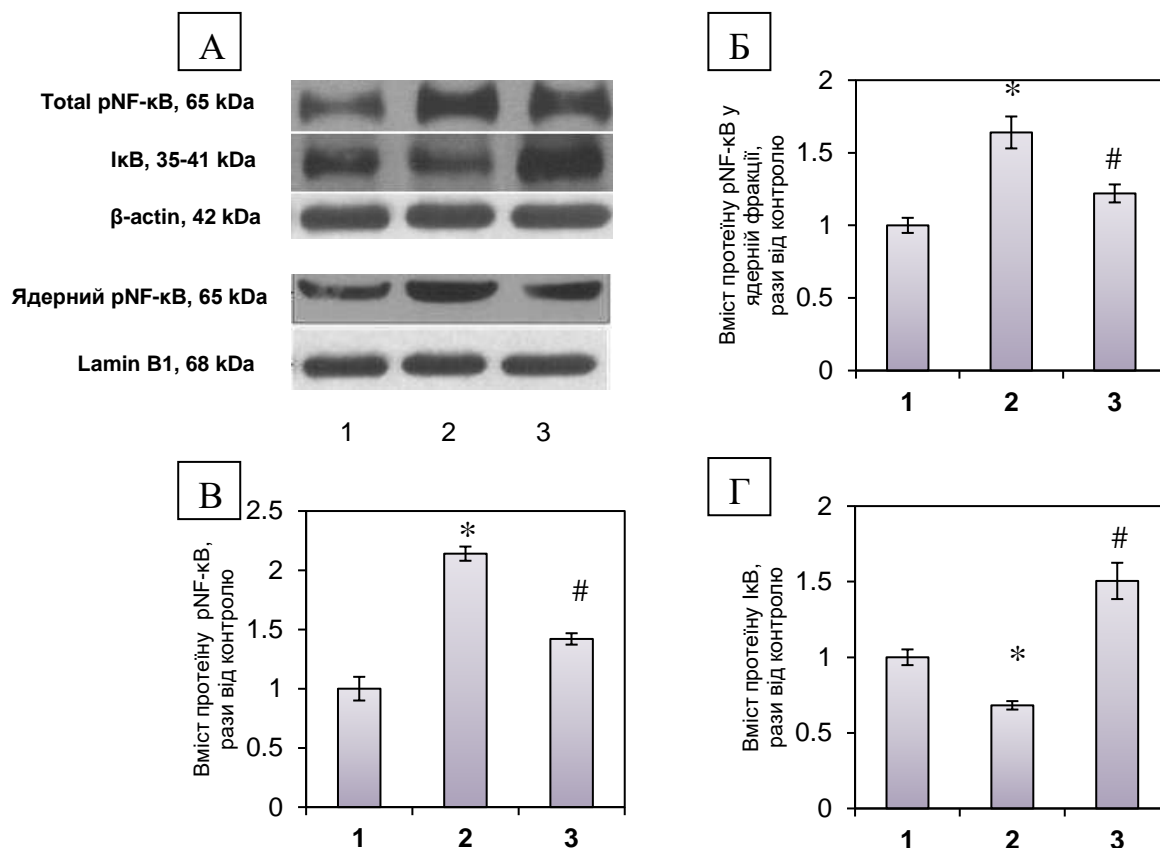


Рис. 3.12 Відносний вміст pNF-кВ р65 та IкВ у печінці щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n=7$ . Імуноблоти (А) та гістограми вмісту фосфорильованої за Ser 311 субодиниці NF-кВ р65 у ядерній фракції (Б), загальних лізатах (В) та IкВ у загальних лізатах печінки щурів (Г): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Введення вітаміну D<sub>3</sub> за дії преднізолону спричиняло зниження відносного вмісту NF-кВ р65 як на рівні транскрипції гену, так і на рівні протеїну, а також зниження рівня фосфорильованої форми р65 як у загальних лізатах (у 1,3 рази), так і у ядерній фракції (у 1,3 рази) у порівнянні з дією преднізолону. Поряд з одночасним зростанням тканинного вмісту IкВ майже вдвічі порівняно з преднізолоновою групою, ці дані свідчать про зниження

активування сигнального шляху NF-κB та демонструють інгібіторний ефект вітаміну D<sub>3</sub> на преднізолон-індуковану транслокацію NF-κB до ядра (рис. 3.11, рис. 3.12). Дія холекальциферолу, що спрямована на інгібування ключових елементів сигнального шляху NF-κB, може бути як опосередкованою, через зниження інтенсивності вільнорадикальних процесів, так і пов'язаною з його здатністю прямо впливати на окремі протеїни в складному сигнальному каскаді за участю NF-κB, зокрема на IκB.

Результати підтверджують, що активування NF-κB внаслідок розвитку оксидативного стресу, викликаного преднізолоном, супроводжувалось підвищенням рівня протеїну iNOS у тканині печінки та посиленням синтезу NO в первинних гепатоцитах. Ці дані цілком узгоджуються з раніше отриманими даними щодо індукування iNOS у печінці мишей за дії глюкокортикоїду дексаметазону [196]. Виявлені зміни демонструють взаємозв'язок між розвитком оксидативно-нітрозативного стресу у тканині печінки за умов хронічного введення преднізолону, що опосередковується активуванням сигнального шляху NF-κB, та пов'язаним з дією глюкокортикоїду порушенням метаболізму вітаміну D в організмі тварин.

Оскільки на сьогодні опубліковані нові експериментальні дані щодо можливості нітрозилування протеїнів-мішеней за участю системи мієлопероксидаза (MPO)/нітрит/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [197], нами також було досліджено вміст MPO у тканині печінки. Виявлено зниження експресії мієлопероксидази у 1,3 рази після введення преднізолону, що, ймовірно, виключає залучення MPO як вірогідного альтернативного механізму нітрування протеїнів у печінці за дії ГК (рис. 3.13). Спостерігалась тенденція до збільшення рівня протеїну MPO за введення вітаміну D<sub>3</sub> порівняно з дією преднізолону.

Залучення інших типів клітин печінки, окрім гепатоцитів, до ГК-індукованого активування шляху NF-κB/iNOS/NO є менш імовірним. Зокрема, було показано, що ГК суттєво гальмують експресію iNOS та утворення NO у клітинах Купфера [198]. Це може свідчити про те, що індукування шляху iNOS/NO за дії преднізолону не може бути пов'язаним з активуванням

фагоцитуючих макрофагів у печінці. Більше того, показане нами у печінці зниження відносного вмісту MPO, маркеру рекрутування та активування нейтрофілів/макрофагів, є додатковим доказом, що надмірне продукування NO за дії преднізолону відбувається не за рахунок клітин, що беруть участь у розвитку запалення, що цілком узгоджується з антизапальною дією ГК.

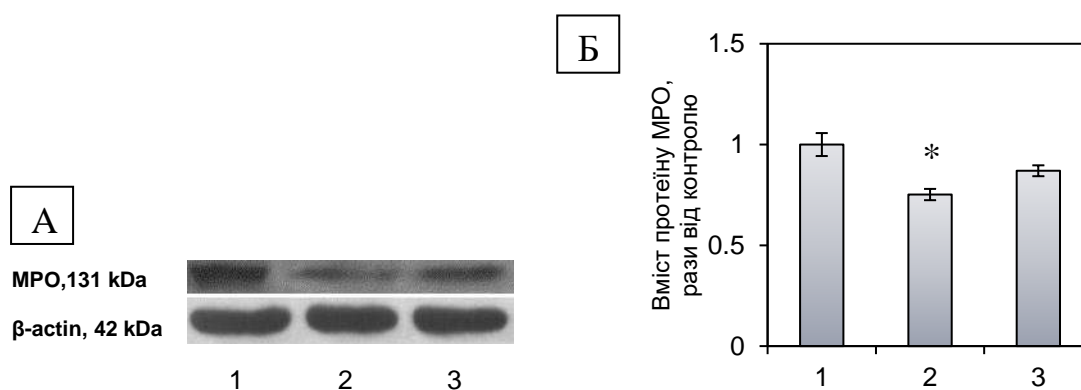


Рис. 3.13 Відносний вміст MPO у печінці щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>, M±m, n=7. Імуноблотограма MPO (А) та гістограма (Б) вмісту протеїну MPO: 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \* p < 0,05 порівняно з контролем, # p < 0,05 порівняно з дією преднізолону.

Таким чином, одним з молекулярних механізмів розвитку гепатотоксичності за дії преднізолону може бути розвиток оксидативно-нітрозативного стресу. Індуковане посиленням продукуванням активних форм кисню активування NF-κB та підвищений рівень продукування NO за рахунок посиленої експресії iNOS обумовлюють збільшення рівня нітрозилування протеїнів (за рівнем 3-нітротирозину в тканині печінки), що призводить до посилення некротичної та апоптичної загибелі гепатоцитів.

Отримані нами дані демонструють, що розвиток індукованих тривалим введенням преднізолону клітинно-молекулярних змін у тканині печінки та посилення загибелі гепатоцитів може обумовлюватись посиленням модифікуванням та ушкодженням протеїнів в результаті розвитку оксидативно-нітрозативного стресу та запальної відповіді. Крім того, довготривале

застосування ГК призводить до розвитку D-дефіцитного стану організму внаслідок зниження рівня 25OHD та порушення експресії ключових компонентів D-ауто/паракринної системи – VDR та CYP27B1. Підвищення продукування АФК та NO за дії ГК може також чинити негативний вплив на VDR-сигналювання, оскільки відомо, що NO та пероксинітрит інгібують утворення комплексу VDR/RXR зі специфічними ділянками ДНК [199]. Більше того, показано, що накопичення літохолієвої кислоти при холестази за тривалою дії ГК знижує ефекти вітаміну D на остеобласти людини, діючи в якості конкурентного ліганду для VDR [62] і тим самим сприяючи розвитку остеопорозу у пацієнтів з холестазом.

Отже, нами підтверджено важливість нормалізування біодоступності вітаміну D<sub>3</sub> для забезпечення нормального функціонування клітин печінки за умов навантаження організму тварин глюкокортикоїдним препаратом – преднізолоном. Більше того, раніше нами вже було показано антиоксидантний ефект вітаміну D<sub>3</sub> у печінці щурів, що отримували преднізолон [123]. VDR-опосередкований вплив холекальциферолу на клітини печінки за рахунок зменшення фосфорилування NF-κB та підвищення рівня IκB у відповідь на надмірне активування NF-κB та індукування iNOS за дії преднізолону можна розглядати як один з ключових механізмів участі вітаміну D<sub>3</sub> у попередженні розвитку оксидативно-нітрозативного стресу та загибелі клітин при тривалому введенні синтетичних ГК.

### **3.2 Роль вітаміну D<sub>3</sub> у коригуванні преднізолон-індукованого остеопорозу**

Вітамін D<sub>3</sub>, як відомо, має виражені кальціємичні ефекти, тому його дефіцит може призводити до глибоких порушень мінерального обміну. Однією з причин порушення структурно-функціонального стану кісткової тканини за ГЮ є виражена D-вітамінна недостатність внаслідок негативного впливу преднізолону на метаболізм холекальциферолу. Оцінку впливу ГК на кісткову тканину здійснюють за біохімічними маркерами кісткового метаболізму, оскільки вони змінюються швидше, ніж денситометричні показники. Зокрема,

рівні маркерів формування кісткової тканини – остеокальцину, N-кінцевого пептиду проколагену типу I, загальної лужної фосфатази та її кісткового ізоензиму – зменшуються внаслідок впливу ГК, а вміст маркерів резорбції – N-кінцевого телопептиду колагену I типу, тартрат-резистентної кислої фосфатази (TRAP) та гідроксипроліну – підвищується [200], [201].

Питання ефективності застосування вітаміну D<sub>3</sub> саме за умов преднізолон-індукованого остеопорозу, його дозування та молекулярні механізми дії залишаються відкритими і потребують подальших досліджень. Отже, ґрунтуючись на оцінці стану мінерального обміну, біомеханічних параметрів стегнової кістки щурів та інших маркерних показників розвитку остеопорозу наступним завданням було дослідити коригувальну дію вітаміну D<sub>3</sub> на преднізолон-індуковані порушення мінерального обміну та структурно-функціонального стану кісткової тканини.

### **3.2.1 Стан мінерального обміну у щурів за тривалого введення преднізолону та ефект холекальциферолу на преднізолон-індуковані порушення мінерального обміну**

Для моделювання експериментального ГЮ раніше було підібрано оптимальні дозу й термін введення синтетичного глюкокортикоїду преднізолону – 5 мг/кг маси тіла щура протягом 30 діб. Отримані нами результати (табл. 3.1 та табл. 3.2), підтверджують, що введення преднізолону супроводжується порушенням мінерального обміну в організмі, про що судили за змінами вмісту мінеральних компонентів у сироватці крові та кістковій тканині. Під впливом преднізолону у сироватці крові у 1,4 рази знижувався вміст загального кальцію та у 1,3 рази – вміст неорганічного фосфату. При цьому зниження загального кальцію відбувалось за рахунок його фізіологічно активної (ультрафільтрованої) фракції. Відомо, що невелика частина кальцію у сироватці крові зв'язана з протеїнами – альбуміном та глобулінами (запасна, біологічно неактивна форма кальцію), тоді як більшість кальцію (близько 85%) перебуває в ультрафільтрованій формі, що включає переважно іонізований та

хелатований з цитратом, фосфатами та бікарбонатом кальцій. Співвідношення між різними формами кальцію змінюється за різних станів організму [202] і має велике фізіологічне значення.

Таблиця 3.1

Вплив преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub> на мінеральний обмін у сироватці крові щурів,  $M \pm m$ ,  $n = 20$

Досліджувані показники	Контроль	Преднізолон	Преднізолон + вітамін D <sub>3</sub>
Кальцій, ммоль·л <sup>-1</sup> загальний	2,32±0,17	1,70±0,09*	2,17±0,10 <sup>#</sup>
протеїнзв'язаний	0,26±0,02	0,24±0,01	0,22±0,01
ультрафільтрований	2,03±0,15	1,46±0,10*	1,95±0,11 <sup>#</sup>
Фосфат неорганічний, ммоль·л <sup>-1</sup>	2,20±0,12	1,71±0,10*	2,19±0,15

\*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Схожа тенденція у характері змін мінеральних компонентів за дії преднізолону відзначалась у кістковій тканині. А саме, у 1,5 рази знижувався вміст кальцію і фосфату (у перерахунку на мг протеїну) порівняно з контролем (табл. 3.2). Такі дані узгоджуються з встановленим вираженим підвищенням активності кісткового ізоензиму ЛФ у сироватці крові за дії преднізолону. Крім того, після озолування великогомілкової кістки було визначено вміст кальцію та фосфору у золі та показано, що за дії преднізолону їх відсоток знижувався у 1,4 та 1,2 рази відповідно.

Окрім основних показників мінерального обміну вважали за доцільне дослідити активність лужної фосфатази – ензиму, що здійснює гідроліз моноєфірів фосфорної кислоти і є одним з маркерів стану кісткової тканини. Показано, що за дії преднізолону практично в 1,5 рази зростає активність загальної лужної фосфатази (ЛФ) та її ізоензимів у сироватці крові (табл. 3.3). Зокрема, суттєве (в 1,7 рази) зростання активності кишкового ізоензиму ЛФ у сироватці крові може бути свідченням посиленого виходу цього ізоензиму із еритроцитів у кров'яне русло при порушенні структури їх мембран внаслідок



D-гіповітамінозу. Зростання активності кісткового ізоензиму ЛФ у 1,5 рази свідчить про преднізолон-індуковане порушення структурно-функціонального стану кісткової тканини, опосередковане посиленням процесу демінералізації кісток та активуванням синтезу даного ізоензиму хондроцитами, кількість яких за цих умов значно зростає, внаслідок інгібування утворення остеобластів. Отже, оскільки ЛФ є біомаркером кісткоутворення, то зростання її активності у сироватці крові за дії преднізолону свідчить про порушення процесу кісткоутворення й активування резорбції кісткової тканини. Це підтверджується іншими даними, які вказують на те, що ГК індукують апоптоз остеобластів, а також зменшують кількість одиниць ремоделювання [33].

Таблиця 3.2

Вплив преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub> на мінеральний обмін у кістковій тканині щурів, M ± m, n = 20

Досліджувані показники	Контроль	Преднізолон	Преднізолон + вітамін D <sub>3</sub>
Кальцій:			
мкмоль/мг протеїну	0,53 ± 0,04	0,36 ± 0,03*	0,38 ± 0,02
мкмоль/100 мг кісткової тканини	0,46 ± 0,02	0,35 ± 0,01*	0,37 ± 0,01
Вміст кальцію у золі, %	44,8±0,2	28,4±0,4*	30,6±0,3
Фосфор неорганічний:			
мкмоль/мг протеїну	0,87 ± 0,04	0,58 ± 0,04*	0,54 ± 0,01
мкмоль/100мг кісткової тканини	0,65 ± 0,02	0,58 ± 0,02*	0,46 ± 0,01 <sup>#</sup>
Вміст фосфору у золі, %	17,8±0,4	15,2±0,2*	16,6±0,2 <sup>#</sup>

\* p < 0,05 порівняно з контролем, # p < 0,05 порівняно з дією преднізолону.

У кістковій тканині відмічається інша картина щодо активності ензимів, аніж у сироватці. Активність ЛФ при введенні преднізолону порівняно з контролем достовірно не змінюється у розрахунку на протеїн (табл. 3.3). Це може бути пов'язано зі збільшенням за цих умов вмісту загального протеїну, що було показано нами раніше. Однак, у розрахунку на масу кісткової тканини активність ензиму зростає у 1,3 рази. Можливо, такий підхід до розрахунку

активності ензимів саме на масу кісткової тканини є більш точним і має бути врахований у подальших дослідженнях.

Таблиця 3.3

Активність лужної фосфатази у сироватці крові та кістковій тканині за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>, M±m

Досліджувані показники	Контроль	Преднізолон	Преднізолон + вітамін D <sub>3</sub>
Сироватка крові, n = 20			
Лужна фосфатаза, Од·л <sup>-1</sup> загальна	230,0±12,0	334,0±20,0*	266,0±15,0 <sup>#</sup>
кишковий ізоензим	52,6±4,0	90,1±6,3*	85,0±4,9 <sup>#</sup>
кістковий ізоензим	200,0±13,0	300,0±16,5*	210,0±12,1 <sup>#</sup>
Кісткова тканина, n = 10			
мкмоль/хв · мг протеїну	1,85 ±0,12	1,94 ± 0,11	2,35 ±0,13 <sup>#</sup>
мкмоль/хв · 100 мг кісткової тканини	1,44 ±0,08	1,87 ± 0,09*	2,29 ±0,12 <sup>#</sup>

\* p < 0,05 порівняно з контролем, # p < 0,05 порівняно з дією преднізолону.

Експериментальні дані показали, що додаткове введення вітаміну D<sub>3</sub> разом з преднізолоном, окрім нормалізування вмісту 25ОНD, супроводжувалось зростанням вмісту загального кальцію у сироватці у 1,3 рази (за рахунок ультрафільтрувальної фракції) та фосфору – також у 1,3 рази порівняно із групою, що отримувала тільки преднізолон. За цих умов знижується активність загальної ЛФ у 1,4 рази порівняно з групою, що отримувала лише преднізолон. При цьому у 1,5 рази знижується активність кісткової ізоформи ензиму, що відображає процес нормалізування функціональної активності кісткової тканини. Отримані дані свідчать про часткове нормалізування процесу мінералізації кісткової тканини із залученням пулу мінеральних компонентів у групі щурів, що отримувала вітамін D<sub>3</sub> сумісно з ГК.

При дослідженні вмісту кальцію і фосфору у кістковій тканині щурів в дослідних групах виявлено, що введення холекальциферолу на тлі преднізолону не впливало на вміст кальцію (як у перерахунку на мг протеїну, так і у золі) та

незначно підвищувало вміст фосфору (у 1,1 рази) у золі кісткової тканини порівняно з групою, яка отримувала лише преднізолон (табл. 3.2). Такий відмінний характер змін мінеральних компонентів за дії холекальциферолу у сироватці крові та кістковій тканині може пояснюватись різним механізмом їх регулювання. У сироватці крові сталий рівень мінеральних компонентів пов'язаний із регулюванням їх транспорту у шлунково-кишковому тракті. У кістковій тканині ці зміни пов'язані із процесом утворення гідроксиапатиту. За умов дії преднізолону регуляторні системи організму, ймовірно, спрямовані на зниження інтенсивності демінералізації кісткової тканини, мобілізуючи пул кальцію та фосфату з крові, а при введенні холекальциферолу інтенсифікується процес транспорту мінеральних компонентів у шлунково-кишковому тракті, що призводить до відновлення їх вмісту у сироватці крові.

Слабко виражений ефект введення вітаміну D<sub>3</sub> спостерігався на загальну лужну фосфатазу у кістковій тканині (як у перерахунку на мг протеїну, так і на масу кісткової тканини), а саме відбувалось незначне підвищення (у 1,2 рази) її активності порівняно з групою, що отримувала тільки преднізолон. Зростання активності фосфатази у кістковій тканині, можливо, є наслідком її інтенсивного синтезу незрілими остеобластами.

Враховуючи дані про негативний вплив глюкокортикоїдів на обмін речовин в організмі та отримані нами результати щодо порушення мінерального обміну кісткової тканини за дії преднізолону, було досліджено також його вплив на приріст маси тіла щурів (рис. 3.14). Показано, що введення преднізолону супроводжувалось зниженням приросту маси тіла порівняно з контролем у 2 рази. Однією з можливих причин зниження маси тіла за умов застосування ГК може бути зниження маси кісткової тканини внаслідок демінералізації та порушення процесу її ремоделювання. Вітамін D<sub>3</sub> викликав частковий приріст маси тіла щурів (у 1,2 рази) порівняно з щурами, що отримували лише преднізолон, ймовірно, за рахунок покращення мінерального обміну та функціонального стану кісткової тканини.

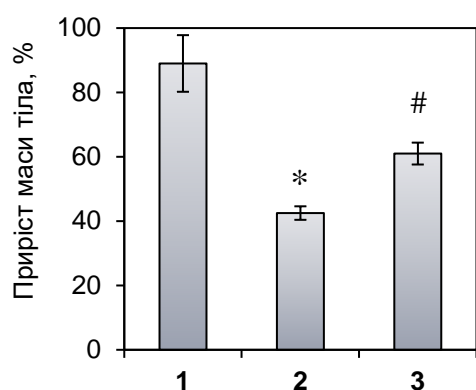


Рис. 3.14 Приріст маси тіла щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 15$ : 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Одна з причин негативного балансу кальцію в організмі за розвитку преднізолон-індукованого остеопорозу, в першу чергу, може бути пов'язана зі зниженням його біодоступності внаслідок негативного впливу ГК на обмін вітаміну D та його фізіологічну функцію у регулюванні кальцієвого гомеостазу. Зниження рівня 25ОНD у сироватці крові під дією преднізолону значною мірою обумовлено гепатотоксичністю глюкокортикоїду, і як наслідок, зниженням вмісту й активності ізоензимів вітаміну D 25-гідроксилази гепатоцитів та компонентів D-ауто/паракринної системи печінки, про що свідчать результати наших досліджень [190]. Ще однією причиною є те, що вітамін D – один з основних регуляторів формування кісткової тканини у процесі її розвитку й ремоделювання протягом усього життєвого циклу. Через пряму дію на клітини кісткової тканини гормонально активна форма вітаміну D контролює процес проліферування мезенхімальних стовбурових клітин, їх диференціювання з утворенням колонок хондроцитів, ростової пластинки й остеобластів, а також може прямо та/або опосередковано регулювати диференціювання та активність остеобластів [54].

Отже, отримані результати свідчать про порушення мінерального обміну у сироватці крові та структурно-функціонального стану кісткової тканини за тривалого введення глюкокортикоїду преднізолону. Зниження рівня 25ОНD у сироватці крові супроводжується гіпофосфатемією, гіпокальціємією, зростанням активності лужної фосфатази у сироватці крові та зменшенням вмісту мінеральних компонентів у кістковій тканині, що свідчить про розвиток ГЮ. Позитивний ефект призначення вітаміну D<sub>3</sub> на тлі глюкокортикоїдної

терапії виявляється у нормалізуванні мінерального обміну у сироватці крові та частково у кістковій тканині, що є основою для подальшого вивчення молекулярних механізмів дії вітаміну D<sub>3</sub> та використання його як препарату супровідної терапії за патологічних станів кісткової тканини.

### 3.2.2 Маркерні показники розвитку остеопорозу за тривалого введення преднізолону та при дії вітаміну D<sub>3</sub>

Окрім дослідження мінерального обміну для ідентифікування розвитку порушень у кістковій тканині за дії преднізолону, а також для вивчення ефекту введення вітаміну D<sub>3</sub> було досліджено біомеханічні параметри стегнової кістки на базі відділу анатомії та клітинної біології медичного факультету Університету м. Оулу методом «3-х точкового прогинання» (рис. 3.15) на приладі Instron 3366 Universal Testing Machine (Instron Corp., США). На основі записаних кривих деформації кістки з використанням програмного забезпечення Bluehill 2 software version 2.6 (Instron Corp., США) були вираховані наступні біомеханічні параметри стегнових кісток: максимальне навантаження на злам стегнової кістки, міцність та жорсткість. Це є структурні механічні параметри, які характеризують стан кістки як «цілого», а саме механічні властивості діяфізу стегнової кістки при поступовому збільшенні навантаження на нього.

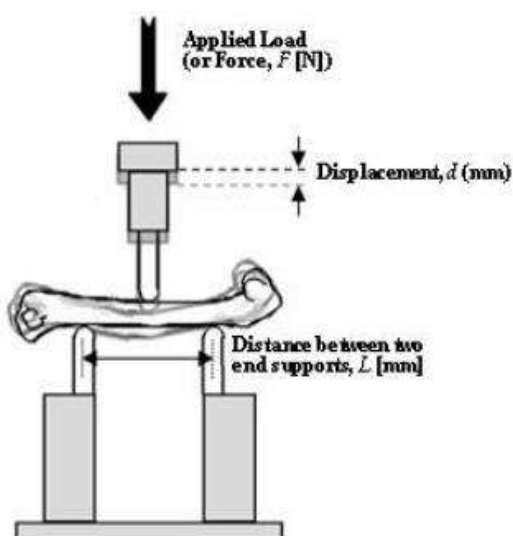


Рис. 3.15 Схематичне зображення методу «3-х точкового прогинання». Чорні лінії відображають цілу кістку, сірі – деформовану. Кістка розміщується між двома опорними точками, третьою є точка навантаження, яке прикладається до середини діяфізу.

Максимальне навантаження на злам стегнової кістки (Н) – максимальне значення навантаження, досягнуте до зламу кістки під час випробування. Це найпростіший параметр структурної цілісності кістки і чим він більший, тим вищим є максимальне навантаження, яке кістка може витримати.

Міцність (Н/мм<sup>2</sup>) – міра опору цілої кістки до прикладеного навантаження до зламу із збереженням її еластичності, здатності повернутись до початкового стану після навантаження, ступінь деформації вздовж осі. Цей показник є аналогом коефіцієнту жорсткості пружини у фізиці. Чим міцніша кістка, тим більше сили потрібно докласти для отримання певного просторового зміщення. Жорсткість (мДж) – міра роботи, яка повинна бути прикладена для руйнування кістки, іноді називається в'язкістю цілісної кістки. Чим жорсткішою є кістка, тим більшої роботи потрібно докласти для її зламу.

Було виявлено, що преднізолон знижував усі 3 параметри стегнової кістки: у 1,2 разів – максимальне навантаження на злам та у 1,3 рази – міцність та жорсткість (табл. 3.4), що може виявлятися у підвищеній ламкості кісток за дії глюкокортикоїдів навіть при невеликих фізичних навантаженнях. Введення вітаміну D<sub>3</sub> призвело до поліпшення жорсткості на 42% та збільшення максимального навантаження на злам на 11% порівняно з введенням преднізолону. Це цілком узгоджується з попередніми даними щодо часткового нормалізування мінерального обміну у кістковій тканині за дії вітаміну D<sub>3</sub>. Крім того, відновлення біомеханічних параметрів відбувається значно повільніше, аніж нормалізування вмісту мінеральних компонентів.

Крім того, для підтвердження патологічних змін у органічному матриксі кісткової тканини був досліджений відносний вміст остеокальцину – маркерного протеїну процесу остеосинтезу. Остеокальцин – вітамін К-залежний неколагеновий протеїн кісткової тканини (вітамін К необхідний для утворення γ-карбоксихильних груп у молекулі остеокальцину, що зв'язує кальцій), складає близько 25% неколагенового матриксу кістки і локалізується переважно у позаклітинному матриксі [203]. Остеокальцин синтезується зрілими остеобластами і є чутливим індикатором перебігу процесу

остеобластогенезу. Більше 90% синтезованого остеобластами остеокальцину у молодих і близько 70% у дорослих людей включається в кістковий матрикс, а інша частина потрапляє в кровотік. Остеокальцин починає експресуватись на пізніх стадіях диференціювання остеобластів на початку мінералізації і надалі його експресія лишається на високих рівнях в остеоцитах і клітинах підкладки [204]. Незважаючи на те, що остеокальцин є найбільш розповсюдженим неколагеновим, специфічним для остеобластів протеїном і може брати участь в підтриманні структурної цілісності кісткової тканини, його роль в скелеті остаточно не визначена. Однак, вміст остеокальцину у кістковій тканині вважається одним з надійних маркерів її формування.

Таблиця 3.4

Біомеханічні параметри стегнової кістки щурів за дії преднізолону та при введенні вітаміну D<sub>3</sub>, M±m, n = 7

Досліджувані показники	Контроль	Преднізолон	Преднізолон + вітамін D <sub>3</sub>
Максимальне навантаження на злам стегнової кістки (Н)	99,9±5,6	80,2±2,3*	89,7±2,8 <sup>#</sup>
Міцність (Н/мм <sup>2</sup> )	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 <sup>#</sup>

\* p < 0,05 порівняно з контролем, # p < 0,05 порівняно з дією преднізолону

Показано, що тривале введення преднізолону викликало зниження відносного вмісту остеокальцину у 1,4 рази порівняно з контролем, що відображає порушення процесу формування кісткової тканини (рис. 3.16). Свідченням нормалізування процесу формування кісткової тканини та покращення метаболічних процесів у ній при введенні вітаміну D<sub>3</sub> на тлі дії преднізолону є підвищення експресії остеокальцину, відносний вміст якого досягав рівня контрольних значень, що цілком узгоджується з даними літератури щодо безпосереднього контролювання гену остеокальцину гормонально активною формою 1,25(OH)<sub>2</sub>D за участі VDR. Отже, через

регулювання експресії гена остеокальцину в кістковій тканині 1,25(OH)<sub>2</sub>D/VDR-сигналювання у остеобластах може впливати на гомеостаз кісткової тканини [205].

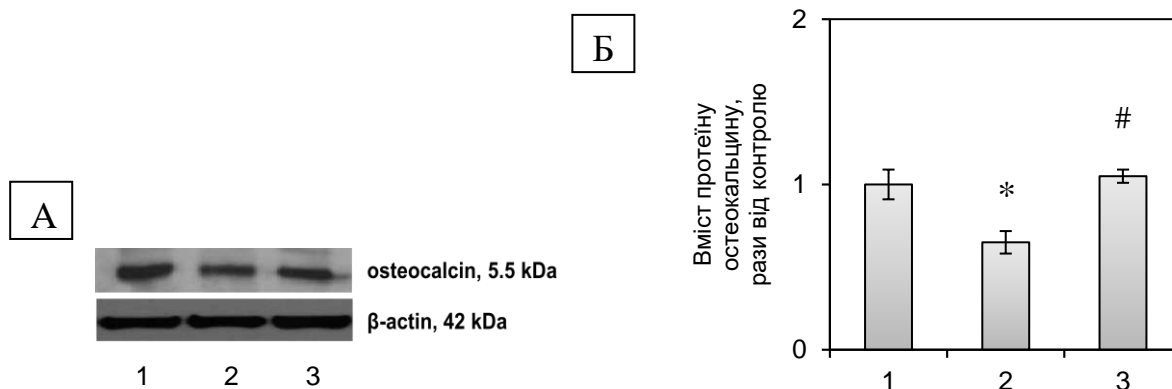


Рис. 3.16 Відносний вміст остеокальцину у кістковій тканині за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Імуноблотограма остеокальцину (А) та гістограма (Б) вмісту протеїну остеокальцину: 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Підсумовуючи експериментальні дані цього розділу можна зробити висновок, що тривале введення преднізолону супроводжується порушеннями мінерального обміну у сироватці крові, структурно-функціонального стану кісткової тканини та зниженим вмістом біомаркерів остеосинтезу, що свідчить про розвиток ГК-індукованого остеопорозу. Оскільки ці патологічні зміни відбуваються на тлі суттєвого зниження рівня 25ОНD у сироватці крові, то додаткове введення вітаміну D<sub>3</sub> за глюкокортикоїдної терапії чинить позитивний ефект, який виявляється у коригуванні мінерального обміну, частковому нормалізуванні біомеханічних параметрів стегнової кістки та повному відновленні вмісту остеокальцину, маркеру метаболізму кісткової тканини. Ці дані можуть бути основою для широкого використання вітаміну D<sub>3</sub> в якості супровідної терапії за глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу.



### **3.3 Дія преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub> на компоненти ключового сигнального шляху ремоделювання кісткової тканини RANKL/RANK/OPG**

Ключова роль у контролюванні процесу ремоделювання кісткової тканини належить остеокіновим системам. Так, зокрема, остеосинтез за участю остеобластів забезпечується регуляторним протеїном остеокальцином, який є валідним маркером формування кісткової тканини, а процес резорбції регулюється остеотропною цитокиновою системою RANKL/RANK/OPG [7]. Опубліковані експериментальні дані щодо впливу ГК на сигнальний шлях RANKL/RANK/OPG здебільшого стосуються досліджень на культурах клітин або змін співвідношення RANKL/OPG у кістковій тканині або сироватці крові, пов'язаних переважно з короткотривалим введенням синтетичних глюкокортикоїдів у високих дозах. Однак недостатньо з'ясованим залишається питання дослідження порушень експресії всіх трьох компонентів системи RANKL/RANK/OPG у кістковій тканині за довготривалої дії терапевтичних доз глюкокортикоїдів *in vivo*. Більше того, оскільки компоненти даного сигнального шляху синтезуються також клітинами-попередниками остеобластів та остеокластів у кістковому мозку, важливим є дослідження стану системи RANKL/RANK/OPG на ранніх етапах дозрівання клітин кісткової тканини, а саме визначення її компонентів у кістковому мозку.

Показано, що гормональна форма вітаміну D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) відіграє важливу роль в контролюванні продукування цитокінів в різних тканинах. За нашими даними, один зі шляхів негативного впливу глюкокортикоїдів проявляється через їх дію на обмін вітаміну D та порушення функціонування D-ауто/паракринної системи у різних органах та тканинах, що може призводити до порушення VDR-опосередкованої тонкої взаємодії різних типів клітин, інтегруючою компонентою якої є система цитокінів. Проте залишається недостатньо висвітленим питання яким чином недостатність вітаміну D і порушення процесу ремоделювання кісткової тканини пов'язані зі змінами у системі RANKL/RANK/OPG у кістковому мозку та кістковій тканині і чи корелюють ці зміни з порушеннями експресії VDR за ГІО.

З огляду на вищезазначене, метою даного розділу роботи було вивчити стан остеотропної цитокінової системи RANKL/RANK/OPG у кістковій тканині, кістковому мозку та печінці щурів в залежності від рівня забезпеченості організму вітаміном D та оцінити інтенсивність остеокластогенезу за вмістом маркерів ремоделювання кісткової тканини в нормі та за експериментального глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу.

### **3.3.1 Оцінка пулу попередників остеокластів у селезінці, периферичній крові та кістковому мозку щурів**

Відомо, що остеокласти походять з моноцитарно-макрофагальних попередників та диференціюються у зрілі остеокласти за умов дії двох факторів – колонієстимулюючого фактору-1 (MCS-F1) та RANKL. Раніше вже було показано, що позитивні одночасно за RANK та рецептором CSF-1 (MCS-F-1R) попередники остеокластів знайдені не тільки у кістковому мозку, але й у селезінці, яка, як вважається, може слугувати для них місцем депонування [206]. Проте існує думка, що селезінка не може виступати як резервуар попередників остеокластів за фізіологічних умов, натомість за патологічних станів їх кількість у селезінці може значно зростати. Також показано, що преостеокласти вільно циркулюють у периферичній крові та кістковому мозку [207]. Так, RANK-позитивні клітини кісткового мозку не мають фагоцитарної і проліферативної активності та диференціюються тільки у остеокласти, але не у дендритні клітини. А RANK-позитивні клітини периферичної крові можуть повільно проліферувати і мають значно довшу тривалість життя, ніж макрофаги, позитивні за макрофагальним маркером F4/80.

Оскільки питання щодо впливу тривалого введення ГК на пул циркулюючих попередників остеокластів є не висвітленим, було важливо оцінити кількість RANK-позитивних клітин серед моноцитів/макрофагів кісткового мозку, периферичної крові та селезінки. Більше того, відкритим залишається питання чи може вітамін D<sub>3</sub> чинити коригувальний вплив на стан пулу попередників остеокластів за ГК-індукованого остеопорозу, оскільки є

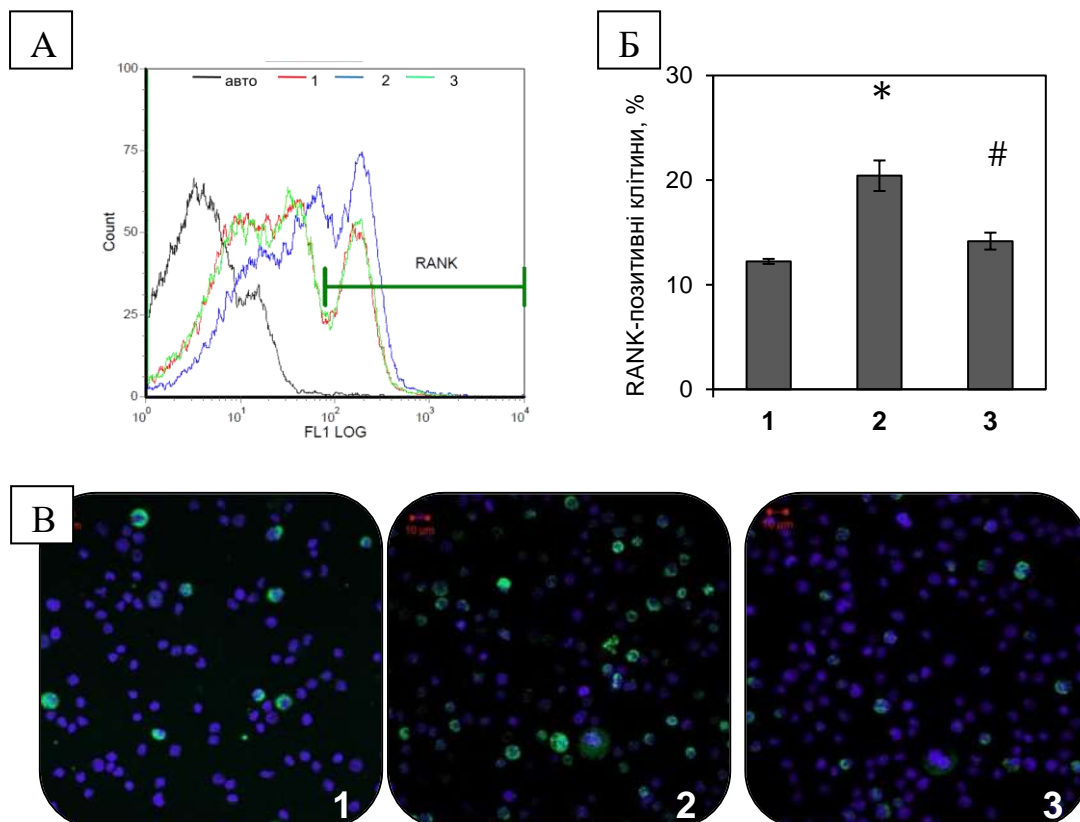
попередні дані, що ІЛ-34, експресія якого знаходиться під контролем вітаміну D<sub>3</sub>, відіграє важливу роль у підтримці пулу попередників остеокластів у селезінці [206].

За допомогою методу непрямого імуофлуоресцентного мічення та 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. 3.17 А, Б). Також ці дані підтвердились знімками з конфокального мікроскопу, які демонструють, що за дії преднізолону кількість RANK-позитивних клітин (відмічені зеленим кольором) значно збільшується (рис. 3.17 В). Більше того, аналогічний підрахунок RANK-позитивних клітин було проведено серед моноцитів селезінки та периферичної крові щурів і виявлено зростання їх кількості у 1,5 та 3,9 разів відповідно (табл. 3.5). Таким чином, преднізолон індукує більш виражені зміни кількості RANK-позитивних клітин у периферичній крові, аніж у селезінці та кістковому мозку. Проте, наразі не можна відповісти на питання яким чином відбувається регулювання преднізолон-індукованого мігрування попередників остеокластів і який механізм лежить в основі їх масового виходу до периферичної крові та перерозподілу пулу між кістковим мозком, кров'яним руслом та селезінкою.

Отже, на тлі індукованого преднізолоном порушення метаболізму вітаміну D та розвитку D-гіповітамінозу було виявлено збільшення пулу циркулюючих RANK-позитивних клітин, що відображає порушення стану ключового рецепторного компоненту остеокінової системи RANKL/RANK/OPG, який забезпечує трансдукцію сигналу RANKL у процесі диференціювання та активування преостеокластів у зрілі остеокласти.

Введення холекальциферолу зменшувало пул циркулюючих RANK-позитивних преостеокластів майже до контрольного рівня у кістковому мозку та периферичній крові. У селезінці спостерігавлось зменшення кількості RANK-позитивних клітин порівняно з преднізолоновою групою, що свідчить про коригування ГЮ, адже відомо, що селезінка виступає у ролі депо

преостеокластів тільки за умов хронізації патологічних процесів. Можна припустити, що такий ефект холекальциферолу може бути обумовлений його здатністю виступати в якості регулятора клітинного циклу та знімати «арешт» клітинного циклу RANK-позитивних попередників остеокластів, так званих «cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors», що може перемикає диференціювання цих клітин з остеокластного напрямку у дендритні клітини.



**RANK**– зелений канал; **ядра клітин (Hoechst)** – синій канал

Рис. 3.17 Кількість RANK-позитивних клітин кісткового мозку щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Цитофлуорограми (А) (count – кількість подій; FL1 LOG – інтенсивність флуоресценції), їх кількісний аналіз (Б) та знімки (В) RANK-позитивних преостеокластів (конфокальна мікроскопія, метод непрямого імуофлуоресцентного мічення клітин, збільшення 400x): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Отже, отримані дані свідчать про порушення RANK-опосередкованого регулювання дозрівання кістково-мозкових попередників остеокластів та

значне збільшення їх циркулюючого пулу за умов тривалого введення преднізолону. Виявлений коригувальний ефект холекальциферолу надає можливість обґрунтувати доцільність застосування вітаміну D<sub>3</sub> як потенційного модулятора пулу циркулюючих попередників остеокластів як у кістковому мозку, з якого вони походять, так і у периферичній крові та селезінці.

Таблиця 3.5

RANK-позитивні клітини селезінки та периферичної крові щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>, M ± m, n = 7

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

\* p < 0,05 порівняно з контролем, # p < 0,05 порівняно з дією преднізолону.

### 3.3.2 Стан цитокінової системи RANKL/RANK/OPG у кістковому мозку та кістковій тканині щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>

Серед негативних ефектів синтетичних ГК є добре відомою їх здатність чинити прямі ефекти на остеобласти, зокрема пригнічувати їх синтетичні функції та індукувати апоптоз. Проте питання щодо впливу синтетичних ГК на остеокласти, зокрема на функціонування системи RANKL/RANK/OPG, залишається на сьогодні дискусійним. Більше того, є актуальним та потребує комплексного дослідження питання наскільки зміни метаболізму вітаміну D корелюють з порушеннями в цитокіновій системі RANKL/RANK/OPG за ГІО.

Як відомо, взаємодія RANKL, що продукується, в основному, остеобластами, з рецептором RANK на поверхні попередників остеокластів призводить до активування ядерного фактору транскрипції NF-κB, його транслокації до ядра та індукування геномної відповіді у попередниках остеокластів, які, внаслідок цього трансформуються у зрілі активні багатоядерні остеокласти, що здійснюють резорбцію кісткової тканини. OPG,

діючи як розчинний рецептор-пастка для RANKL, попереджає його зв'язування з рецептором, тим самим інгібуючи резорбцію кісткової тканини. Адекватне співвідношення між RANKL та OPG є важливою умовою збереження узгодженості між процесами формування та резорбції кісткової тканини. Проте, тонкий баланс між даними цитокінами може порушуватись за дії гормонів та лікарських препаратів, які чинять стимулювальний або інгібувальний ефекти на систему RANKL/RANK/OPG.

Оскільки ГК, як системні гормони, знаходяться у тісній взаємодії з різними регуляторами процесу ремоделювання, спектр патогенетичних впливів на стан кісткової тканини за їх тривалої дії є надзвичайно широким і, на нашу думку, може в тому числі включати зміни у остеокіновій системі RANKL/RANK/OPG. Тому важливо було оцінити направленість змін у експресії компонентів шляху RANKL/RANK/OPG за дії преднізолону як в кістковому мозку, так і в кістковій тканині в залежності від рівня забезпеченості організму вітаміном D та оцінити остеобластно-остеокластну рівновагу за вмістом маркерів ремоделювання кісткової тканини в нормі, за преднізолон-індукованого остеопорозу та при корекції вітаміном D<sub>3</sub>.

Виявлено, що відносний вміст RANKL у лізатах кісткового 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 разів порівняно з контролем (рис. 3.18 В, Г). Такі зміни призводили до зниження співвідношення OPG/RANKL, що свідчить про порушення процесів диференціювання остеокластів за дії преднізолону. Також було оцінено рівень протеїну RANK як маркеру гемопоетичних попередників остеокластів і виявлено, що його вміст у кістковому мозку за дії преднізолону зростав у 1,5 рази порівняно з контролем (рис. 3.18 Б). Цей ефект може бути обумовлений збільшенням кількості пре-остеокластів, що цілком узгоджується з отриманими нами раніше даними щодо зростання відсотку RANK-позитивних клітин кісткового мозку щурів [208].

За умов одночасного введення преднізолону та холекальциферолу спостерігалось зниження мРНК та протеїну RANKL майже у 2 та 3 рази

відповідно порівняно з дією преднізолону (рис. 3.18). Відносний вміст OPG також знижувався за сумісного введення преднізолону та холекальциферолу, призводячи до того, що співвідношення OPG/RANKL залишалось незмінним. Проте при введенні вітаміну D<sub>3</sub> на тлі дії преднізолону відбувалось нормалізування рецепторної ланки системи RANKL/RANK/OPG. Вміст RANK знижувався до рівня, що спостерігався у кістковому мозку контрольних щурів, що при незмінному співвідношенні OPG/RANKL, ймовірно, вказує на деяке зменшення трансдукції сигналу від RANKL, і, як наслідок, свідчить про здатність вітаміну D<sub>3</sub> інгібувати посилене диференціювання попередників остеокластів за дії преднізолону.

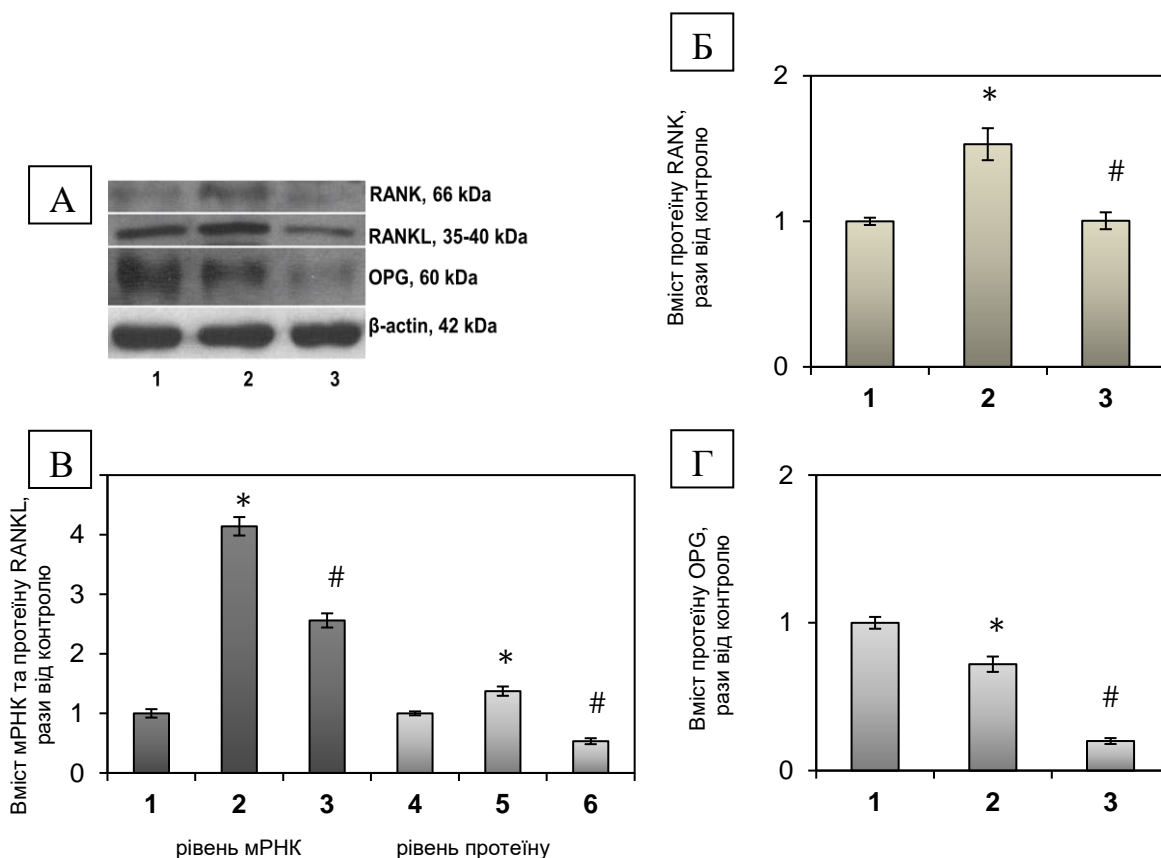


Рис. 3.18 Відносний вміст RANK, RANKL та OPG у кістковому мозку щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Імуноблоти (А) та гістограми вмісту RANK (Б), RANKL (В) OPG (Г): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

З огляду на наявні експериментальні дані, що дозволяють розглядати стромальні клітини кісткового мозку як джерело продукування RANKL у кістковому мозку, а RANK-позитивні клітини – як попередники остеокластів, що знаходяться під контролем цього цитокіну, для їх візуалізації ми використовували метод непрямого імуофлуоресцентного мічення клітин кісткового мозку. Отримані нами дані щодо ГК-індукованого зростання рівнів RANKL та RANK були проілюстровані знімками з конфокального мікроскопу позитивних за RANK та RANKL клітин кісткового мозку (рис. 3.19 А). Більше того, на основі сканування поодиноких клітин з кроком 0,32 мкм та отриманих в результаті серій знімків побудовано 3D-модель, що ілюструє посилене зв'язування RANK-позитивними клітинами ліганду RANKL за дії преднізолону (рис. 3.19 Б), в той час як у контролі та при введенні вітаміну D<sub>3</sub> такого ефекту майже не спостерігалось. Варто також відзначити, що певна частина клітин, які не були позитивні за RANK, демонстрували незначний імуноспецифічний сигнал від RANKL, що свідчить про наявність пулу RANKL-позитивних мезенхімальних клітин – попередників остеобластів у кістковому мозку, але обрахувати їх кількість методом протокової цитофлуориметрії не вдалося.

Отже, на тлі індукованих преднізолоном порушень метаболізму вітаміну D був виявлений значний дисбаланс співвідношення компонентів цитокінової системи RANKL/RANK/OPG, а саме – на тлі зменшеного рівня OPG спостерігалось збільшення вмісту RANKL та його посилене взаємодія з RANK, що може призводити до каскаду геномних перетворень попередників остеокластів у кістковому мозку. Введення холекальциферолу частково нормалізувало вміст RANKL та RANK, проте призводило до подальшого падіння вмісту OPG.

Оскільки відомо, що відносні концентрації RANKL і OPG в кістковій тканині детермінують показники маси та механічної міцності кісток, наступним завданням було оцінити стан сигнального шляху RANKL/RANK/OPG саме у кістковій тканині. Представлені на рис. 3.20 результати свідчать, що введення тваринам преднізолону, не викликаючи істотного підвищення вмісту RANKL у



кістковій тканині, призводило до зниження рівня остеопротегерину у 1,3 рази порівняно з контрольними щурами.

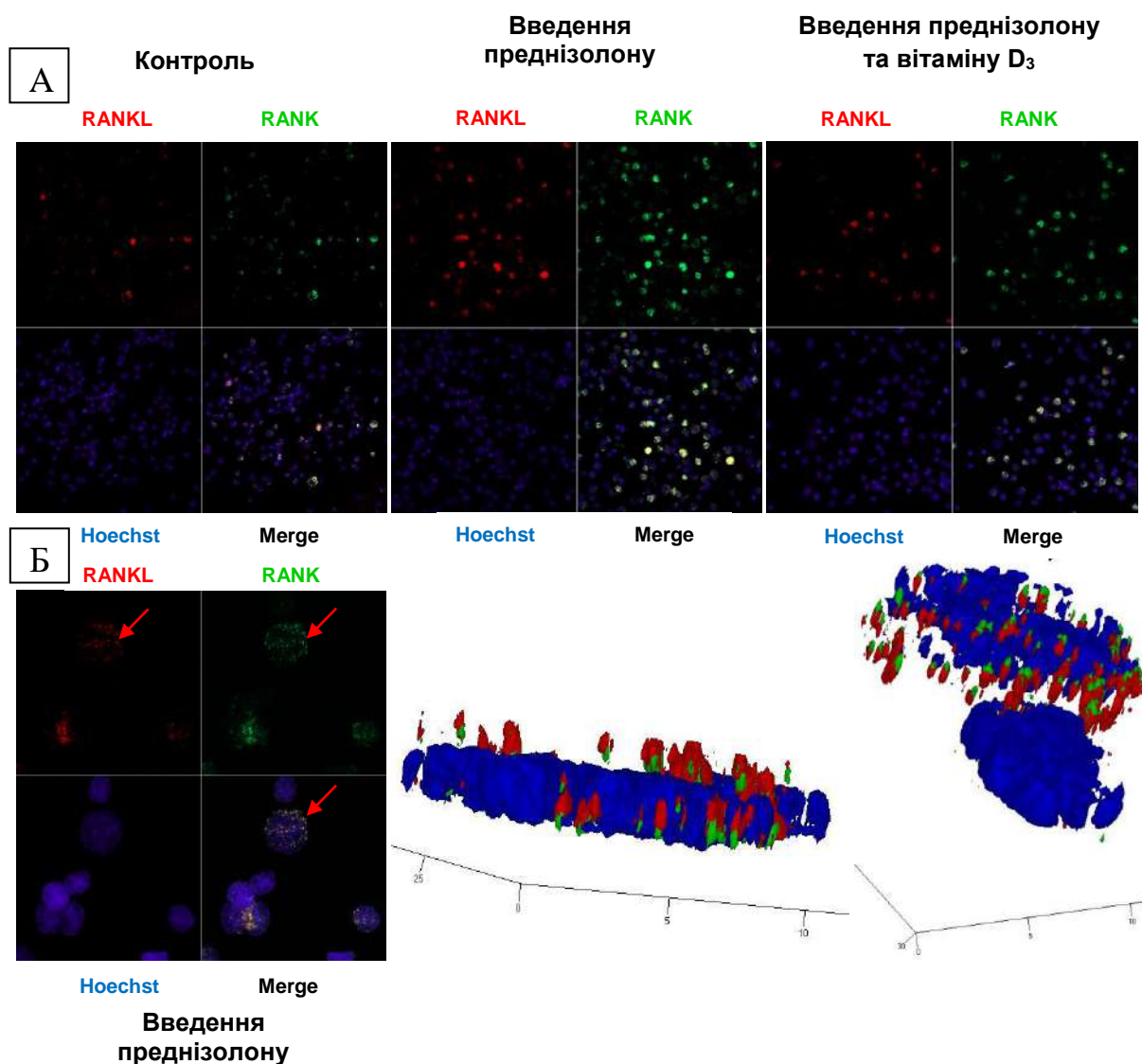


Рис. 3.19 RANKL- та RANK-позитивні клітини кісткового мозку щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 5$ . Знімки (А) клітин кісткового мозку (конфокальна мікроскопія, метод непрямого імуофлуоресцентного мічення клітин, збільшення 400x) та 3D-модель, що ілюструє зв'язування RANK-позитивними клітинами ліганду RANKL за дії преднізолону (збільшення 1000x) (Б). RANK – зелений канал; RANKL – червоний канал, ядра клітин (Hoechst) – синій канал; merge – накладання флуоресценції за трьома каналами.

Незначне підвищення тканинного рівня RANKL, з одного боку, та досить різке пригнічення продукції OPG з іншого за тривалої дії преднізолону, призвело до зменшення співвідношення даних регуляторних протеїнів (OPG/RANKL) у 1,5 рази порівняно з контролем (рис. 3.21), що свідчить про ГК-індуковане порушення процесу ремоделювання кісткової тканини.

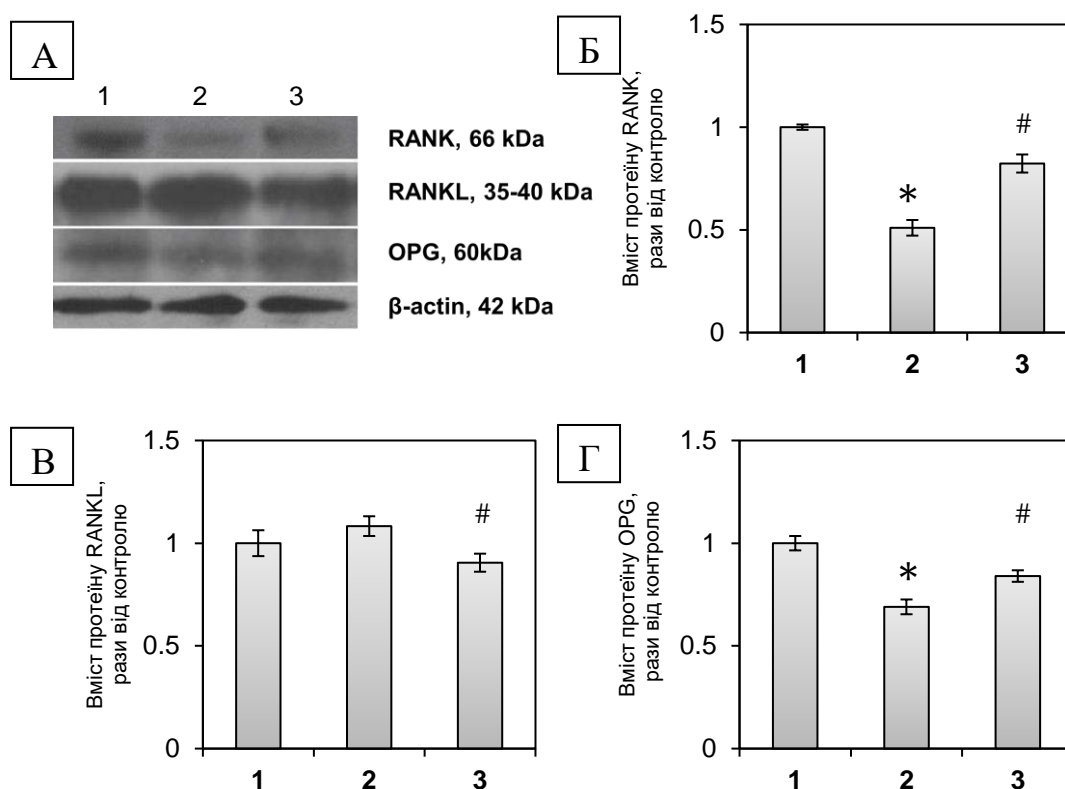


Рис. 3.20 Відносний вміст RANK, RANKL та OPG у кістковій тканині щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Імуноблоти (А) та гістограми вмісту RANK (Б), RANKL (В) та OPG (Г): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

При введенні вітаміну D<sub>3</sub> спостерігалось зростання відносного вмісту OPG у 1,2 рази й зниження вмісту RANKL у 1,2 разів у кістковій тканині порівняно з їх вмістом за дії преднізолону (рис. 3.20 В, Г). Отже, введення вітаміну D<sub>3</sub> за дії преднізолону викликало майже повне відновлення співвідношення вмісту OPG/RANKL (рис. 3.21), яке було вище у 1,4 рази

порівняно з дією преднізолону, що свідчить про нормалізування процесу остеокластогенезу. Таким чином, вітамін D<sub>3</sub> може бути одним з потенційних модуляторів сигнального шляху RANKL/RANK/OPG через пряме регулювання синтезу RANKL та OPG у кістковій тканині із залученням VDR і у такий спосіб забезпечувати узгодженість процесів остеосинтезу та резорбції кісткової тканини і контролювати перебіг процесу ремоделювання.

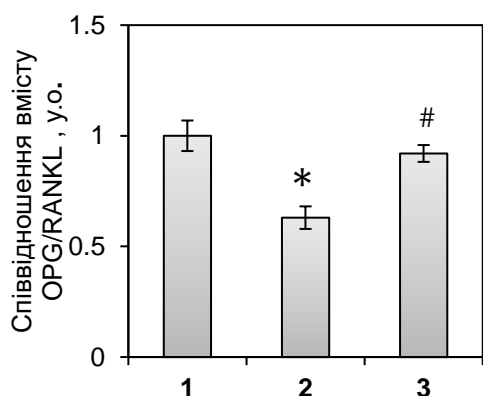


Рис. 3.21 Співвідношення вмісту протеїнів OPG та RANKL у кістковій тканині щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ : 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Також було визначено рівень протеїну RANK – ключового компоненту системи активування остеокластів, який локалізований на клітинній поверхні преостеокластів і забезпечує трансдукцію сигналу RANKL, а також є маркером зрілих остеокластів у кістковій тканині. Виявлено, що за дії преднізолону рівень RANK знижується у 1,5 рази відносно контролю (рис. 3.20 Б), що, скоріше за все, відображає гальмування інтенсивності остеокластогенезу на даному етапі розвитку глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу. Відомо, що клітинами, які синтезують RANK у кістковій тканині є зрілі багатоядерні остеокласти, тому зменшення відносного вмісту цього рецептору у кістковій тканині може свідчити про знижену активність та/або кількість остеокластів у другій, повільній фазі втрати маси кісткової тканини. Однак з іншого боку відомо, що резорбтивна активність остеокластів і характер ремоделювання кісткової тканини здебільшого визначається співвідношенням протеїнів OPG та RANKL [11]. Остеопротегерин, що синтезується переважно остеобластами та остеоцитами, зв'язуючи RANKL, запобігає активуванню RANK, що гальмує як остеокластогенез, так і резорбтивну активність остеокластів. Виявлене нами

падіння рівня OPG, ймовірно, відображає гальмування активності остеобластів за дії ГК та/або їх посилену загибель, що може сприяти посиленню RANKL-опосередкованої резорбції кісткової тканини.

Таким чином, встановлене ГК-індуковане суттєве зниження співвідношення OPG/RANKL у кістковій тканині порівняно з контролем свідчить про дерегулювання остеокінової системи RANKL/RANK/OPG за глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу. Отримані дані узгоджуються з нещодавно висунутою новою гіпотезою щодо дії глюкокортикоїдів на кісткову тканину [170]. У сучасному розумінні, тривалий прийом глюкокортикоїдів пригнічує не тільки функціонування остеобластів, що підтверджується показаним нами падінням вмісту VDR, остеокальцину та остеопротегерину, а й остеокластів також, таким чином порушуючи нормальний перебіг процесу ремоделювання в цілому. Як результат – зменшується утворення нової кісткової тканини та розвивається остеопенія.

Так, введення тваринам вітаміну D<sub>3</sub> на тлі дії преднізолону призводило до збільшення вмісту RANK у 1,6 рази порівняно з контролем. Свідченням відновлення, принаймні часткового, процесу формування кісткової тканини та покращення метаболічних процесів у ній було підвищення експресії маркера остеосинтезу остеокальцину та нормалізування показників мінерального обміну у сироватці крові та кістковій тканині щурів, що було висвітлено нами у попередньому розділі.

Більше того, як дія преднізолону, так і вплив вітаміну D<sub>3</sub> на вміст RANK були підтверджені результатами імуногістохімічного мічення зрізів стегнової кістки з використанням антитіл проти RANK та специфічних флуоресцентно мічених вторинних антитіл (рис. 3.22). Проте механізми, яким саме чином вітамін D<sub>3</sub> може впливати на вміст протеїну RANK у кістковій тканині лишаються нез'ясованими і потребують подальших досліджень.

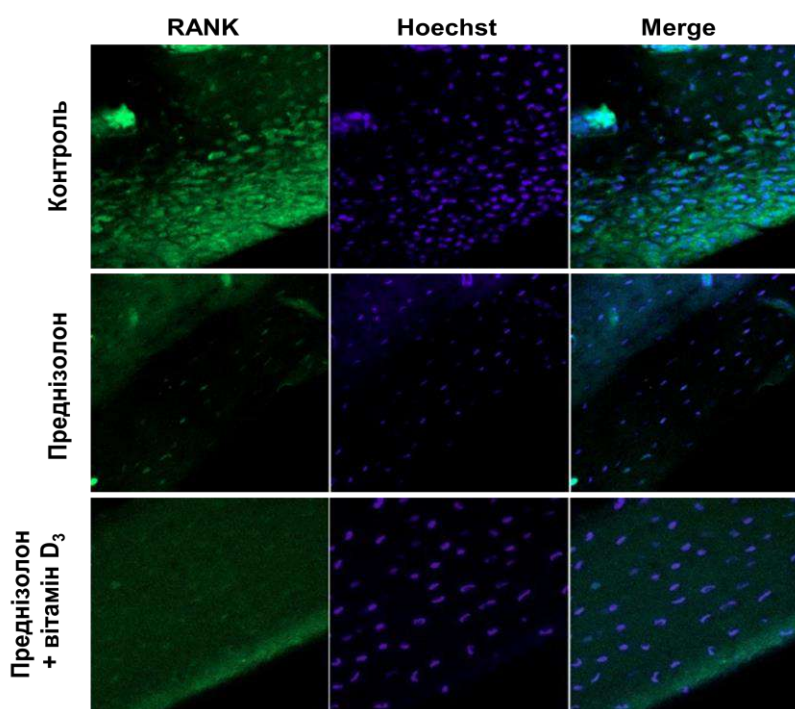
В цілому отримані результати узгоджуються з даними літератури щодо можливості негативних ефектів глюкокортикоїдів на стан цитокінової системи RANKL/RANK/OPG [102], [117], [166], [167]. Незважаючи на відсутність

істотних змін експресії RANKL і зниження рівня RANK, недостатнє утворення OPG може свідчити про пригнічення функціональної активності остеобластів та переважання, принаймні на першому етапі, втрати маси кісткової тканини, що було підтверджено даними щодо порушень мінерального обміну. Більше того, зважаючи на роль остеокальцину як гідроксиапатит-зв'язувального протеїну й одного з детермінантних факторів, що відображають стан остеобласт-опосередкованого формування кісткового матриксу та зниження його вмісту за дії ГК, можна констатувати чітко виражене гальмування остеосинтезу та подальшу демінералізацію кісткової тканини за дії преднізолону [209]. Додатковим свідченням пригнічення функціональної активності клітин, відповідальних за остеосинтез (остеобласти та остеоцити) є виявлене нами зниження вмісту у кістковій тканині маркерного для цих клітин протеїну – VDR [210]. Глюкокортикоїди змінюють інтенсивність синтезу й активність факторів росту остеобластів, інгібують диференціювання клітин-попередників та індують апоптоз остеобластів [100], що частково може пояснювати встановлене нами зниження рівнів маркерних для остеобластів протеїнів – остеокальцину, остеопротегерину та VDR – у кістковій тканині.

З огляду на наявність вираженого дефіциту вітаміну D за умов глюкокортикоїдної терапії та ефективність введення холекальциферолу, виявлені зміни вмісту досліджуваних остеокінів та їх співвідношення, можуть, принаймні частково, бути обумовленими порушеннями механізмів реалізації біологічної дії холекальциферолу в регулюванні кісткового ремоделювання і вказувати на пряме чи опосередковане залучення D-гормону до цих процесів.

Таким чином, за рівнем експресії ключових маркерів ремоделювання було досліджено інтенсивність та характер змін формування та резорбції кісткової тканини за глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу у взаємозв'язку із забезпеченістю організму тварин вітаміном D. Отримані результати продемонстрували, що порушення в цитокіновій системі RANKL/RANK/OPG, які відбуваються на тлі недостатньої забезпеченості організму вітаміном D, можуть відповідати за втрату маси кісткової тканини при тривалому введенні

преднізолону. 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 D<sub>3</sub> здатний нормалізувати виявлені порушення ремоделювання кісткової тканини через VDR-опосередкований вплив на клітини кісткової тканини та їх попередників, зміщуючи остеобласт/остеокластне співвідношення в бік посилення остеосинтезу та нормалізування процесу резорбції.



RANK – зелений канал; ядра клітин (Hoechst) – синій канал

Рис. 3.22 Імуногістохімічне дослідження зрізів стегнової кістки з використанням антитіл проти RANK за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 5$  (збільшення 400х).

### 3.3.3 Стан цитокінової системи RANKL/RANK/OPG у печінці щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>

Традиційно вважається, що цитокінова система RANKL/RANK/OPG регулює процес остеокластогенезу. Проте нещодавно компоненти цієї тріади були знайдені у багатьох органах та тканинах. Зокрема, рецептор RANK, окрім кісткової тканини та кісткового мозку, був ідентифікований у тимусі,

кишечнику, молочних залозах, простаті, підшлунковій залозі, серці, легенях, мозку, скелетних м'язах, нирках, шкірі, а також у печінці [211]. Ліганд RANKL окрім кісткової системи, знайдений у скелетних м'язах, тимусі, товстому та тонкому кишечнику, наднирниках, епітеліальних клітинах молочної залози, простаті, підшлунковій залозі та печінці. OPG переважно експресується стромальними клітинами кісткового мозку, В-лімфоцитами та дендритними клітинами, проте його мРНК була детектована у шкірі, легенях, серці та печінці [212]. Існує невелика кількість експериментальних даних щодо ролі системи RANKL/RANK/OPG у печінці, які вказують на можливість регулювання гомеостазу глюкози за участю RANKL у печінці [213], свідчать про протекторну роль RANKL за умов ішемії печінки у мишей [214] та демонструють залученість RANKL/OPG у патогенез хронічних захворювань печінки, таких як біліарний цироз та хронічний гепатит С [214]. Проте, роль сигнального шляху RANKL/RANK/OPG у функціонуванні печінки та його участь у розвитку різних патологій залишається на сьогодні не вивченою. Тому важливо було оцінити направленість дії преднізолону на компоненти даної цитокінової системи в печінці щурів за ГК-індукованого остеопорозу та визначити роль вітаміну D<sub>3</sub> як потенційного модулятора її стану.

Було встановлено, що рівень протеїну RANKL у лізатах тканини печінки за дії преднізолону зростав у 1,2 рази (рис. 3.23 В), що може пояснюватись посиленням експресії RANKL Т-лімфоцитами та клітинами Купфера. Ці результати підтверджуються експериментальними даними, які вказують, що за умов запалення у печінці може індукуватись експресія RANKL та OPG [214]. За введення преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub> рівень RANKL достовірно знижувався у порівнянні як з дією преднізолону, так і з контролем. Відносний вміст остеопротегерину у всіх трьох піддослідних групах достовірно не змінювався (рис. 3.23 Г). Рівень протеїну RANK у тканині печінки за дії преднізолону знижувався у 1,5 рази (рис. 3.23 Б). При сумісному введенні преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub> спостерігалось збільшення його рівня у 1,4 рази порівняно з ефектом глюкокортикоїду. Оскільки відомо, що RANK експресується у

гепатоцитах [214], зниження його вмісту у печінці за дії преднізолону може пояснюватись їх дисфункцією та посиленою загибеллю внаслідок оксидативно-нітрозативного стресу, який був показаний нами раніше. Введення вітаміну D<sub>3</sub>, який володіє протизапальними ефектами, на тлі дії преднізолону покращує функціональний стан гепатоцитів, протидіє проявам оксидативно-нітрозативного стресу, та, як наслідок, нормалізує рівень RANK у печінці.

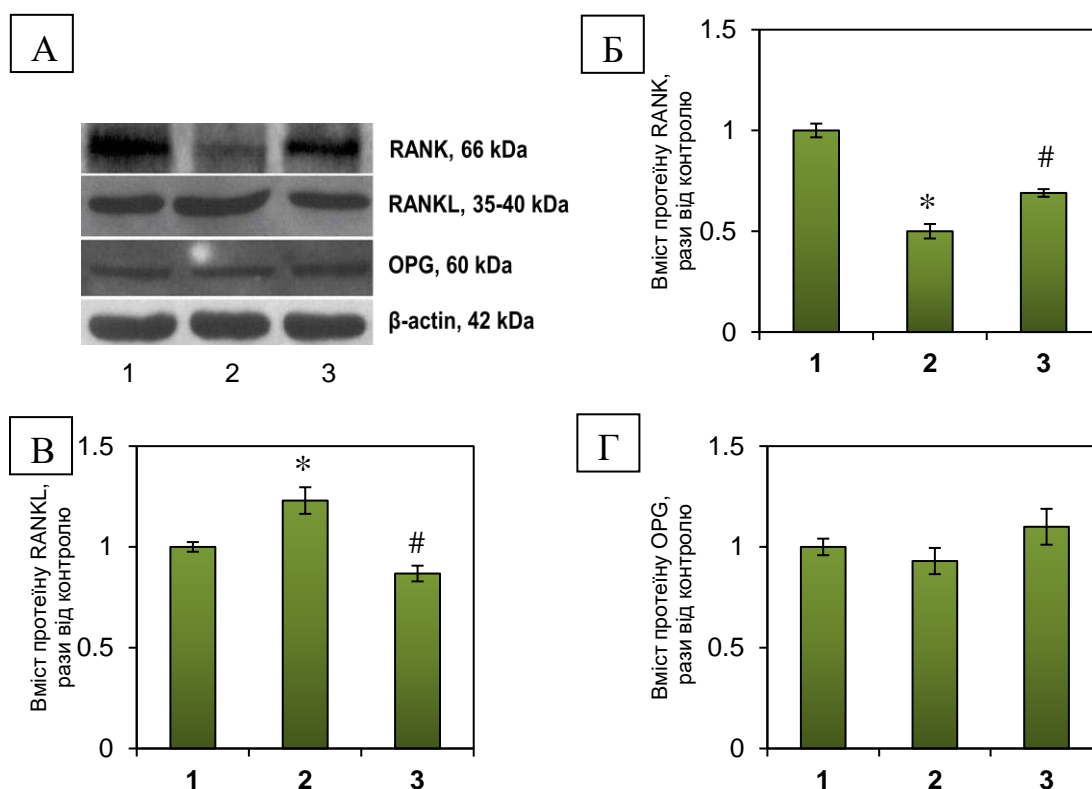


Рис. 3.23 Відносний вміст RANK, RANKL та OPG у печінці щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Імуноблоти (А) та гістограми вмісту RANK (Б), RANKL (В) OPG (Г): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Отримані результати вказують на порушення функціонування системи RANKL/RANK/OPG у печінці при довготривалому введенні преднізолону, оскільки при незмінному рівні OPG та незначному підвищенні вмісту RANKL, відносний вміст рецепторної ланки (RANK) суттєво знижувався. Зважаючи на те, що під прямим контролем сигнального шляху RANKL/RANK/OPG



знаходиться NF-κB, ймовірно, пригнічення сигналювання не може пояснювати встановлене нами раніше посилене індукування та транслокацію NF-κB p65 до ядра за дії ГК. Отже, система RANKL/RANK/OPG, вірогідно, не відіграє ключову роль у активуванні NF-κB у печінці за дії преднізолону, а тому необхідно було визначити інші фактори, які могли чинити такий ефект.

Відомо, що фактор некрозу пухлин α (TNFα), взаємодіючи з власним рецептором, також, як і RANKL/RANK, здатний активувати NF-κB через опосередковане PKCξ фосфорилування залишку серину 311 p65 субодиниці NF-κB [214]. Нами було висунуто припущення про можливе залучення цього прозапального цитокіну у ГК-індуковане активування вісі NF-κB/iNOS за умов ушкодження тканини печінки. Тому було визначено рівень TNFα у печінці і показано, що преднізолон індукував збільшення рівня мРНК TNFα у 1,5 рази, що свідчить про залучення даного цитокіну у процес активування NF-κB за дії ГК (рис. 3.24). Це спостереження ставить питання щодо типу клітин, які можуть бути відповідальні за збільшення експресії TNFα. З огляду на протизапальні властивості ГК внесок імунних клітин у продукування TNFα маловірогідний, що було підтверджено зниженим рівнем MPO. Раніше було показано можливість продукування гепатоцитами різних прозапальних цитокінів, а тому числі і TNFα [215], що може свідчити про їх роль в якості можливого джерела TNFα за дії ГК. Введення вітаміну D<sub>3</sub> не змінювало достовірно рівень TNFα, що свідчить про інший механізм дії холекальциферолу на інгібування активування NF-κB p65, ймовірно, через суттєве підвищення рівня ІκВ, що показано нами раніше.

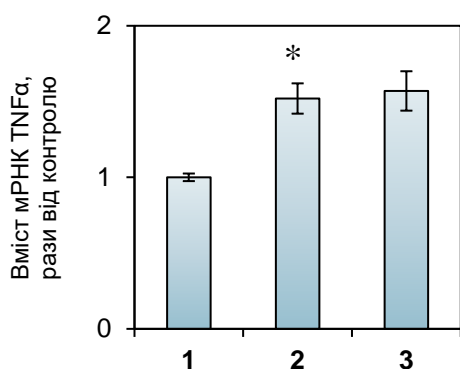


Рис. 3.24 Відносний вміст мРНК TNFα у печінці щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>, M±m, n=7: 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \* p < 0,05 порівняно з контролем.

Таким чином, отримані експериментальні дані свідчать про зниження сигналювання через цитокінову систему RANKL/RANK/OPG у печінці за тривалої дії ГК, що вказує на відсутність залучення даного сигнального шляху у преднізолон-індуковане активування NF-κB p65 та ушкодження тканини печінки. Натомість, підвищений рівень TNFα за дії ГК, як і підвищене продукування активних форм кисню, може бути індуктором транслокування NF-κB p65 до ядра та пов'язаних з цим негативних ефектів преднізолону на функціонування печінки. Виявлено, що вітамін D<sub>3</sub> чинив коригувальний ефект на співвідношення компонентів системи RANKL/RANK/OPG та не впливав на ГК-індукований підвищений рівень TNFα.

### **3.4 Транскрипційний фактор NF-κB як регулятор RANK-, VDR- та GR-опосередкованих сигнальних шляхів за глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу та при дії вітаміну D<sub>3</sub>**

За останні 20 років були досягнуті значні успіхи у розумінні молекулярних механізмів остекластогенезу, а саме відкрито, що процес формування остеокластів потребує залучення сигналювання через NF-κB, що активується у відповідь на основні «остеокластогенні» цитокіни, зокрема RANKL та MCS-F1. RANKL та деякі прозапальні цитокіни, включаючи TNFα, активують NF-κB-асоційовані сигнальні шляхи, індукуючи c-Fos та ядерний фактор активованих Т-клітин (NFATc1), а також інгібують репресори NFATc1-сигналювання, позитивно регулюючи таким чином формування і подальше функціонування остеокластів.

Канонічний шлях NF-κB-сигналювання швидко активується у попередниках остеокластів у відповідь на зв'язування RANKL з RANK. Так, показано, що протягом години спостерігається швидке збільшення рівня експресії мРНК RelA (p65 субодиниця NF-κB) та p50 [216]. Протягом цього періоду RelA та p50 разом з ядерним фактором активованих Т-клітин 2 (NFATc2, який, на відміну від NFATc1, не потрібний для утворення

остеокластів), залучаються до промотору NFATc1, який вважається головним регулятором остеокластогенезу, та індукують його експресію [217].

Зважаючи на те, що у відповідь на зв'язування RANKL з RANK активується NF-κB, завданням даного розділу було охарактеризувати наступну ланку сигнального шляху RANKL/RANK/OPG, а саме – систему NF-κB у різних тканинах щурів в залежності від рівня забезпеченості організму вітаміном D в нормі, за преднізолон-індукованого остеопорозу та при корекції вітаміном D<sub>3</sub>.

### **3.4.1 Оцінка транскрипційного активування NF-κB у кістковому мозку щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>**

Зважаючи на ключову роль NF-κB у остеокластогенезі було визначено вміст компонентів системи NF-κB (NF-κB p65, фосфорильована за Ser 311 субодиниця p65 NF-κB та IκB) у кістковому мозку щурів методом вестерн-блот аналізу, а також рівні фосфорильованої за Ser 311 субодиниці p65 NF-κB (pNF-κB p65) у ядерній та цитоплазматичній фракціях й перерозподіл між ними в нормі, за хронічного введення преднізолону та при корекції вітаміном D<sub>3</sub>.

Відомо, що активування сигнального каскаду NF-κB із залученням субодиниці p65 (RelA) відбувається за класичним шляхом, який відповідає за виживання остеокластів та гальмування дозрівання остеобластів. Так, було виявлено, що відносний вміст як нефосфорильованої, 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. 3.25 Б, В), у той час як відносний вміст IκB знижувався у 1,2 рази порівняно з контролем (рис. 3.25 Г).

Враховуючи 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. 3.26), що безперечно свідчить про посилення ядерної транслокації NF-κB.

Щоб констатувати транслокацію NF-κB p65 до ядра за дії преднізолону не тільки спираючись на дані вестерн-блот аналізу щодо його перерозподілу між

ядерною та цитоплазматичною фракціями, було візуалізовано pNF-κB-позитивні клітини кісткового мозку з використанням методу непрямого імуофлуоресцентного мічення. На основі сканування поодиноких NF-κB-позитивних клітин та отриманих в результаті серій знімків побудовано 3D-модель транслокації NF-κB до ядра за дії преднізолону, в той час як у контролі, та при введенні вітаміну D<sub>3</sub> NF-κB був дифузно розподілений у цитоплазмі (позначено червоними стрілками на рис. 3.27).

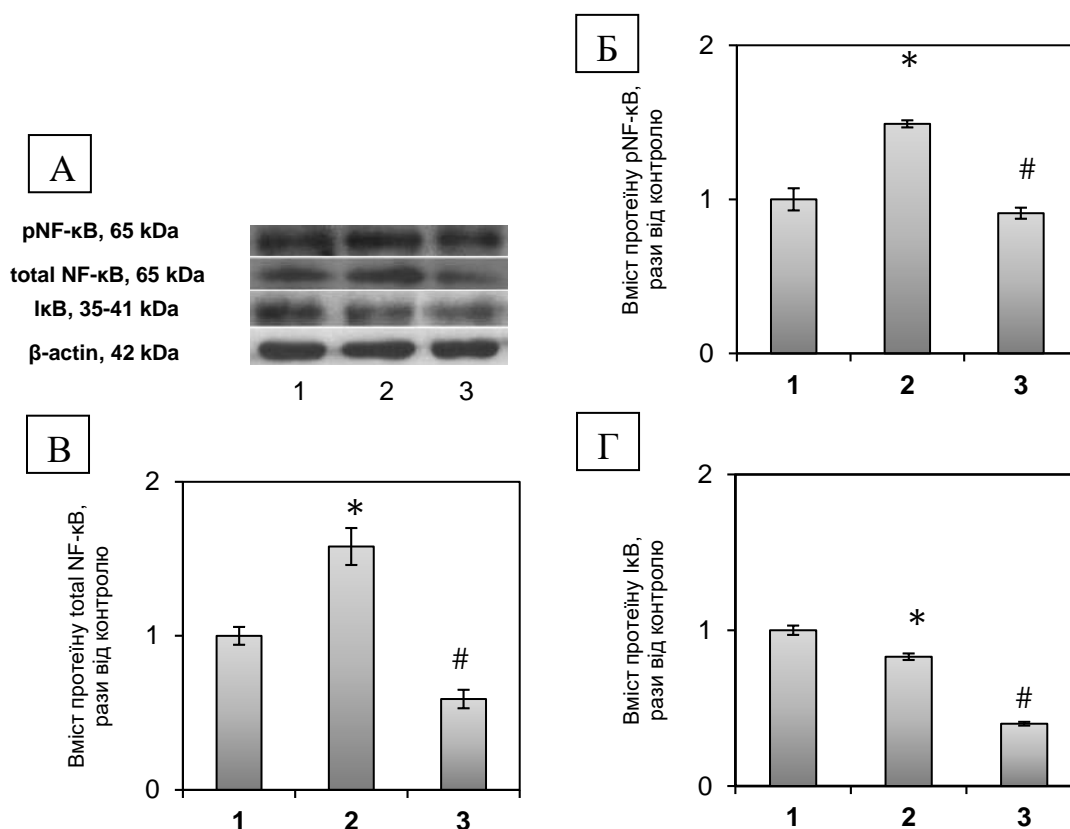


Рис. 3.25 Відносний вміст NF-κB та IκB у загальних лізатах кісткового мозку щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Імуноблоти (А) та гістограми вмісту фосфоNF-κB p65 (Б), NF-κB p65 (В) та IκB (Г): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Зважаючи на показане нами у попередньому розділі зростання відносного вмісту RANK та RANKL та посилення їх взаємодії у кістковому мозку за дії

преднізолону, активування сигнального каскаду NF-κB з залученням p65, який в свою чергу індукує експресію c-Fos та NFATc1, необхідних для диференціювання попередників остеокластів, може також свідчити про посилення процесу диференціювання преостеокластів з гемопоетичних клітин-попередників та збільшення їх кількості.

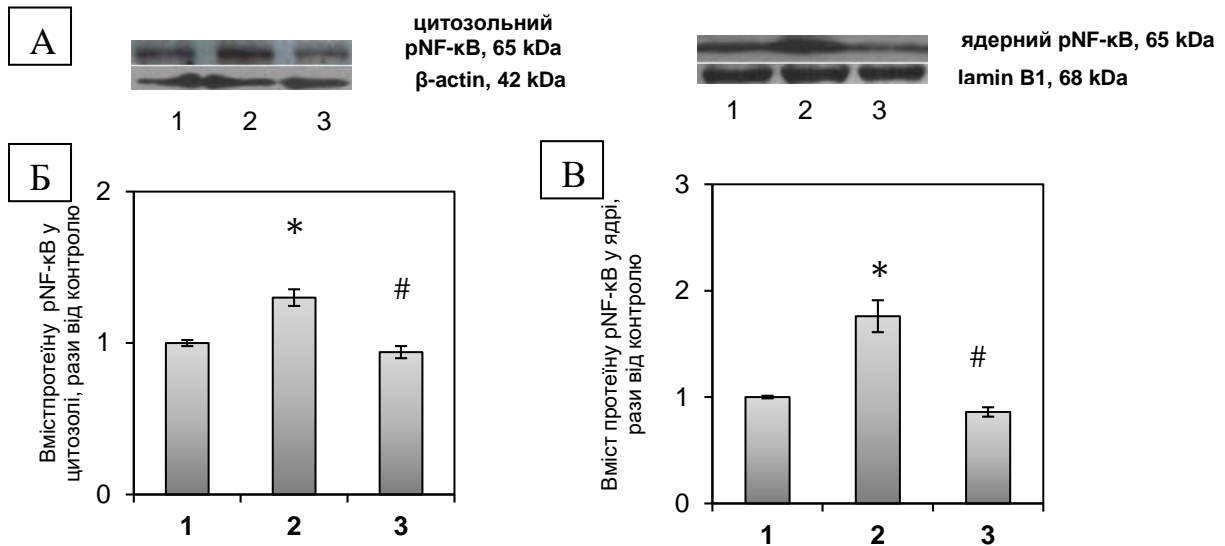


Рис. 3.26 Відносний вміст рNF-κB у фракціях кісткового мозку щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Імуноблоти (А) та гістограми вмісту фосфоNF-κB p65 у цитоплазматичній (Б) та ядерній фракціях (В): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

При введенні вітаміну D<sub>3</sub> на тлі дії преднізолону відбувалось нормалізування відносного вмісту рNF-κB p65 як у загальній, так і у ядерній та цитоплазматичній фракціях до рівня, що спостерігався у кістковому мозку контрольних щурів, а також суттєве зниження відносного вмісту NF-κB p65 та ІκB порівняно не тільки з введенням преднізолону, але й з контрольною групою. Отже, показано, що вітамін D<sub>3</sub> інгібує індуковане преднізолоном фосфорилування та активування сигнального каскаду NF-κB у клітинах кісткового мозку щурів, модулюючи стан NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів та сприяючи таким чином відновленню узгодженості між процесами остеосинтезу та резорбції кісткової тканини.

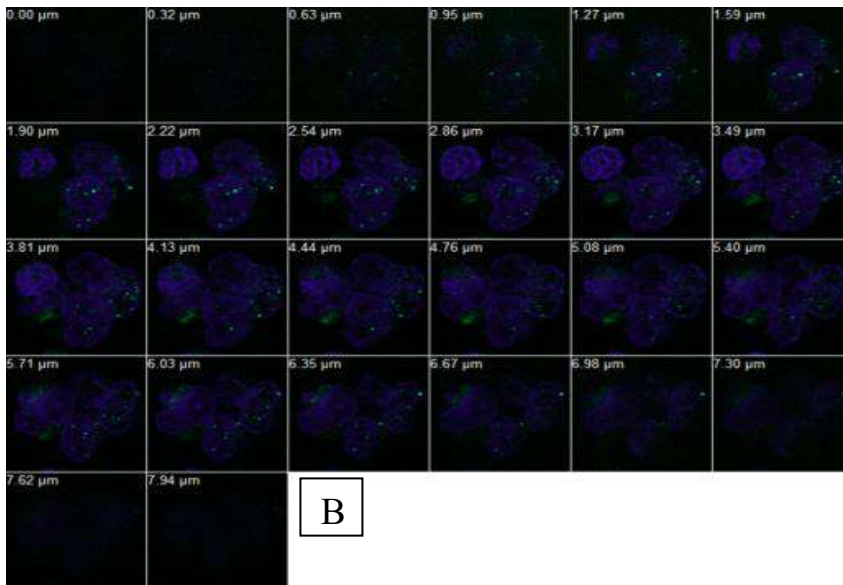
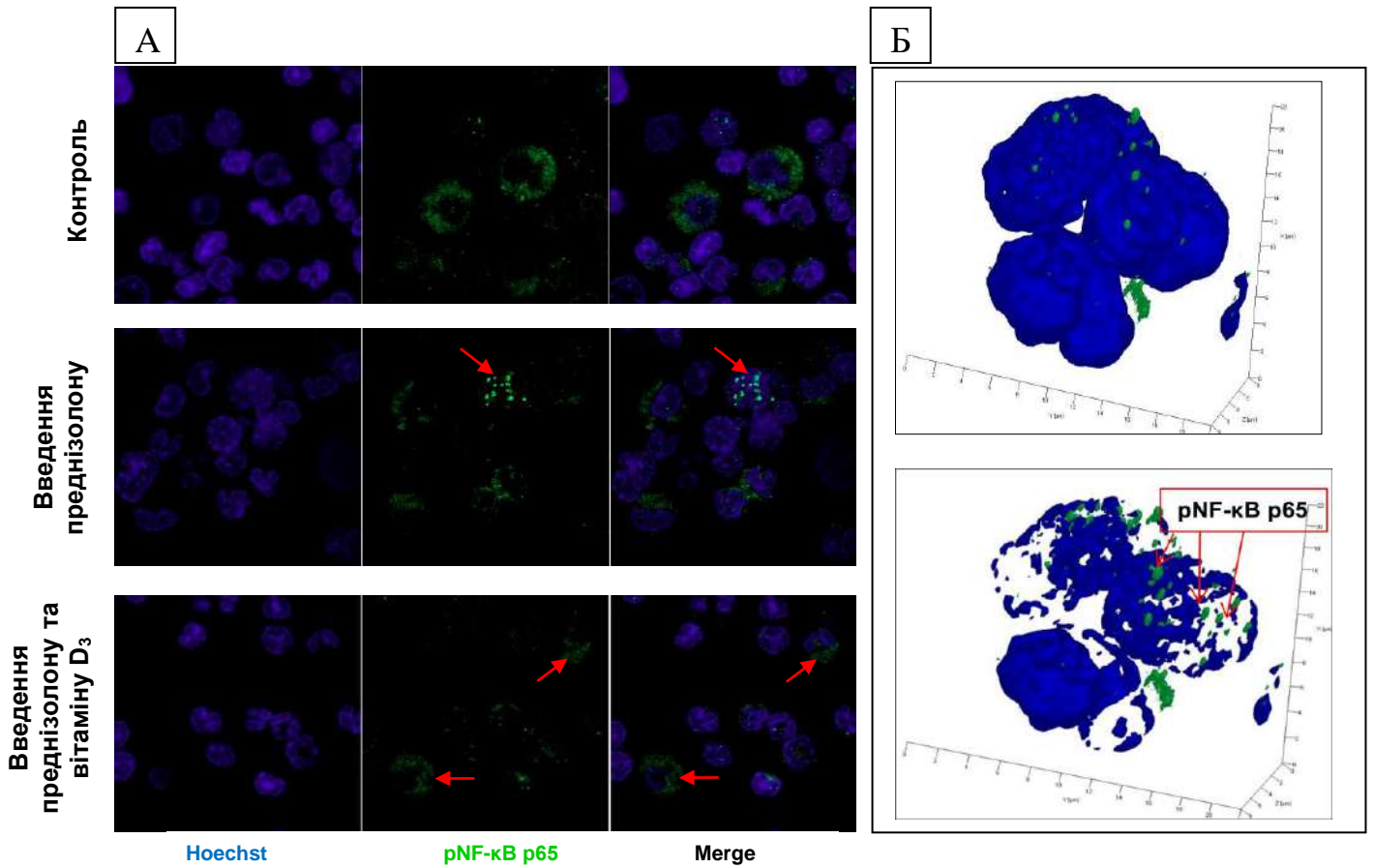


Рис. 3.27 pNF-κB p65-позитивні клітини кісткового мозку щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>, M±m, n=3. Знімки (А) клітин кісткового мозку (конфокальна мікроскопія, метод непрямого імуофлуоресцентного мічення клітин, збільшення 400х) та 3D-модель (Б) транслокації pNF-κB p65 до ядра клітин кісткового мозку за дії преднізолону, побудована на основі серій знімків, отриманих при скануванні з кроком 0,32 мкм pNF-κB p65-позитивних клітин (збільшення 1000х) (В). pNF-κB p65 – зелений канал; ядра клітин (Hoechst) – синій канал; merge – накладання флуоресценції за зеленим та синім каналами.

імуофлуоресцентного мічення клітин, збільшення 400х) та 3D-модель (Б) транслокації pNF-κB p65 до ядра клітин кісткового мозку за дії преднізолону, побудована на основі серій знімків, отриманих при скануванні з кроком 0,32 мкм pNF-κB p65-позитивних клітин (збільшення 1000х) (В). pNF-κB p65 – зелений канал; ядра клітин (Hoechst) – синій канал; merge – накладання флуоресценції за зеленим та синім каналами.

З огляду на те, що NF- $\kappa$ B є добре відомим редокс-чутливим фактором, його активування може бути відповіддю на розвиток оксидативного стресу. Крім того, відома здатність вітаміну D<sub>3</sub> чинити прямі і непрямі антиоксидантні ефекти як за нормальних, так і за патологічних станів, ефективно інгібуючи перекисне окислення ліпідів та окислювальне ушкодження протеїнів клітин, що на структурному рівні веде до збереження клітинної цілісності та відновлення функціональної активності пошкоджених клітин. Тому цікаво було дослідити перебіг оксидативних процесів у мононуклеарних клітинах кісткового мозку та периферичної крові. Для вимірювання на протоковому цитофлуориметрі рівня продукування активних форм кисню та азоту використовували два специфічні флуоресцентні барвники – 2,7-дихлородигідрофлуоресцеїну діацетат (DCFH-DA) та 4,5-діамінофлуоресцеїну діацетат (DAF-2DA).

Ступінь окислення DCFH, що відображає інтенсивність прооксидантних процесів у клітинах периферичної крові та кісткового мозку за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub> представлена у табл. 3.6. На тлі преднізолон-індукованого дефіциту та порушення обміну вітаміну D були виявлені значні зміни в окисному метаболізмі у клітинах периферичної крові та кісткового мозку. Так, хронічне введення преднізолону стимулювало продукування АФК в ізольованих мононуклеарних клітинах крові у 1,4 рази у порівнянні з контрольними тваринами. Введення вітаміну D<sub>3</sub> чинило нормалізуючий ефект на надмірне ГК-індуковане генерування активних форм кисню. На відміну від моноцитів крові, рівень утворення АФК в мононуклеарних клітинах кісткового мозку залишився достовірно незмінним після введення преднізолону, проте за сумісного введення преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub> рівень продукування АФК підвищувався у 1,3 рази порівнянні з групою, що отримувала глюкокортикоїд.

Щоб оцінити, чи може залучатись оксид азоту та його метаболіти до ГК-індукованих змін функціонування клітин кісткового мозку, було досліджено рівень продукування цими клітинами NO з використанням флуоресцентного зонду DAF-2DA. Відомо, що оксид азоту чинить біфазні ефекти на процес резорбції кісткової тканини. Низькі його концентрації стимулюють IL-1-

залежну резорбцію, що було показано у дослідах *in vitro* [218]. Вважається, що конститутивне продукування NO остеокластами є важливим для їх нормального функціонування, оскільки є дані, що свідчать про здатність інгібіторів NO-синтази пригнічувати активність та рухливість ізольованих остеокластів. Високі концентрації NO також інгібують остеокластогенез, гальмуючи формування та активування остеокластів.

Таблиця 3.6

Утворення DCF-чутливих активних форм кисню в ізольованих мононуклеарних клітинах периферичної крові та кісткового мозку за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>, M±m, n=10

Групи	Контроль	Преднізолон	Преднізолон + вітамін D <sub>3</sub>
Мононуклеари периферичної крові, у.о.	452,3±21,2	668,7±46,31*	535,1±23,6 <sup>#</sup>
Мононуклеари кісткового мозку, у.о.	150,5±9.9	138,9±10,4	186,3±13,7 <sup>#</sup>

\*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Виявлено, що преднізолон не впливав на генерування NO в мононуклеарах кісткового мозку (рис. 3.28), що також було підтверджено відсутністю змін вмісту 3-нітротирозину, який є маркером нітрування протеїнів пероксинітридом (рис. 3.29).

Вітамін D<sub>3</sub> спричинював посилення утворення NO у 2,5 рази та зростання нітрування протеїнів у 2,4 рази порівняно з дією преднізолону (рис. 3.28, рис. 3.29). Оскільки відомо, що високі концентрації NO інгібують формування та активування остеокластів за рахунок індукування NO-опосередкованого апоптозу попередників остеокластів, то можна припустити, що один з механізмів гальмування резорбції кісткової тканини за умов введення холекальциферолу полягає саме у стимулюванні продукування NO і, як наслідок, індукування апоптозу попередників остеокластів у кістковому мозку.



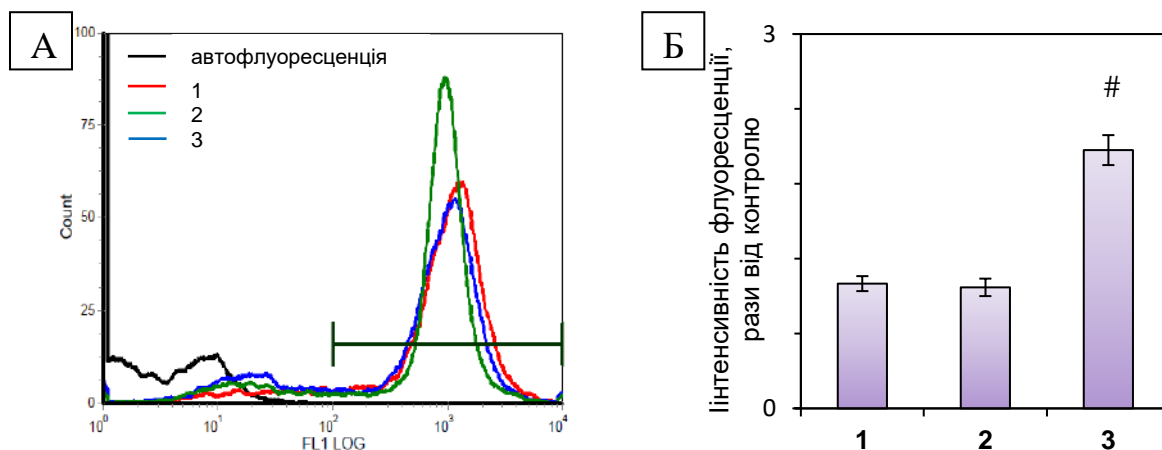


Рис. 3.28 Продукування NO мононуклеарними клітинами кісткового мозку за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n=7$ . Цитофлюорограми (А) утворення оксиду азоту мононуклеарами кісткового мозку (count – кількість подій; FL1LOG – інтенсивність флуоресценції) та кількісний аналіз цитофлюорограм (Б): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону ( $P < 0,05$ ).

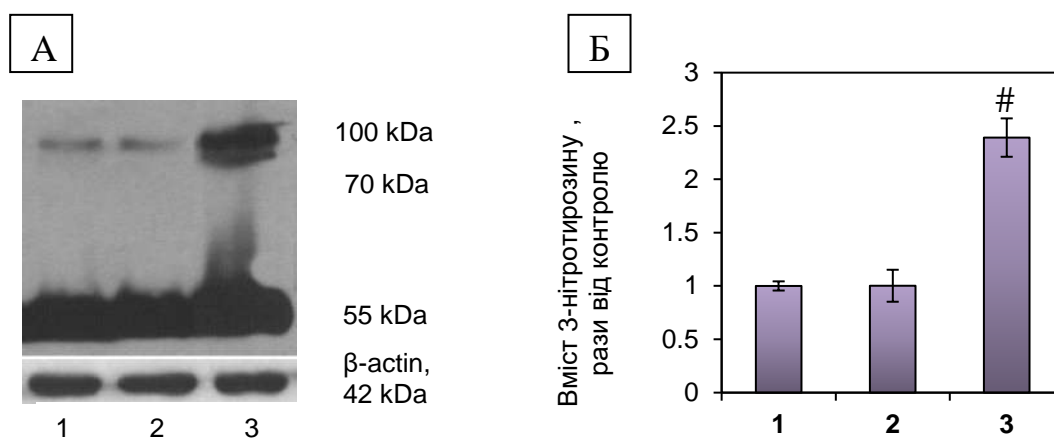


Рис. 3.29 Відносний вміст 3-нітротирозину у кістковому мозку щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n=7$ . Імуноблотограми (А) та гістограми вмісту нітрозильованих протеїнів (Б): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону ( $P < 0,05$ ).

Отже, за дії преднізолону показано транскрипційне активування каскаду NF- $\kappa$ B за класичним шляхом у клітинах кісткового мозку. Активні форми

кисню та 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. В свою чергу, вітамін D<sub>3</sub> інгібує індуковане преднізолоном надмірне активування NF-κB та стимулює NO-індукований апоптоз попередників остеокластів у кістковому мозку, відновлюючи узгодженість між процесами формування та резорбції кісткової тканини.

### **3.4.2 Стан системи NF-κB/IκB у кістковій тканині щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>**

З огляду на те, що NF-κB відіграє важливу роль у функціонуванні трьох типів клітин кісткової тканини – остеоцитів, остеобластів та остеокластів, доцільним було визначити вміст фосфорильованої за Ser 311 субодиниці p65 NF-κB та IκB у кістковій тканині методом вестерн-блот аналізу та мРНК NF-κB методом ПЛР у реальному часі. Встановлено, що відносний вміст pNF-κB p65 за дії преднізолону знижувався у 1,6 рази порівняно з контролем (рис. 3.30 Б), що цілком узгоджується з попередньо отриманими нами даними щодо недостатності сигналювання через RANK у кістковій тканині. Пригнічення активування класичного каскаду NF-κB підтверджується також зростанням у 1,4 рази у кістковій тканині відносного вмісту IκB (рис. 3.30 Г), який знаходиться у комплексі з NF-κB і таким чином, перешкоджає його транслокації до ядра.

Враховуючи те, що на 90-95 % кісткова тканина складається з остеоцитів – клітин, що вбудовані в мінералізований кістковий матрикс, і лише на 4-6 % та 2-3 % з остеобластів та остеокластів відповідно, доцільно припустити, що основний внесок у загальний пул NF-κB у кістковій тканині здійснюють саме остеоцити, проте функціональна роль сигнального каскаду NF-κB у цих клітинах на сьогодні не висвітлена. Введення вітаміну D<sub>3</sub> підвищувало рівень pNF-κB p65 у 1,5 рази порівняно з дією преднізолону, а також відновлювало рівень IκB до контрольних значень. Отже, вітамін D<sub>3</sub> здійснював коригувальний вплив на NF-κB-асоційовані сигнальні каскади, функціонування яких у клітинах кісткової тканини було порушено внаслідок хронічного введення ГК.

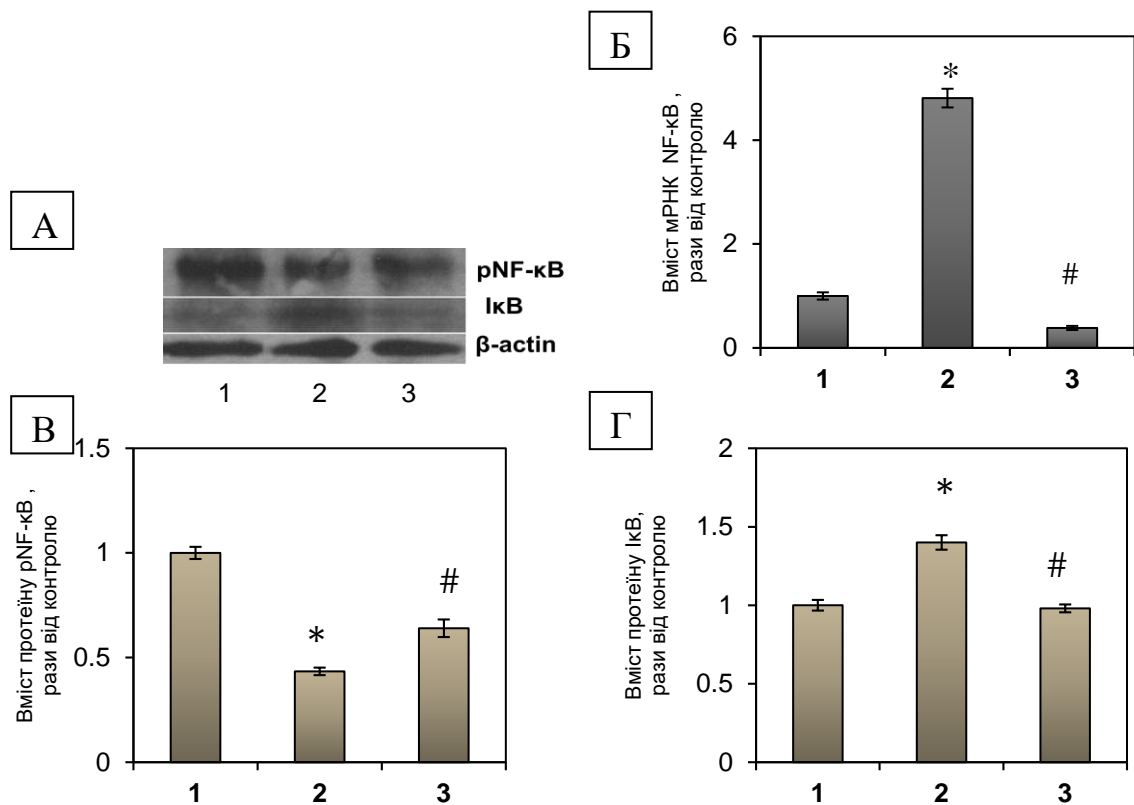


Рис. 3.30 Відносний вміст NF-κB та IκB у кістковій тканині щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>, M±m, n=7. Імуноблоти (А) та гістограми вмісту мРНК NF-κB (Б), фосфорильованої за Ser 311 субодиниці p65 NF-κB (В) та IκB (Г): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \* p < 0,05 порівняно з контролем, # p < 0,05 порівняно з дією преднізолону (P < 0,05).

Оскільки молекулярні механізми дії вітаміну D<sub>3</sub> на PPARγ- та HIF-1α/VEGF-сигналювання як шляхів, що відповідають за остеогенез/ангіогенез у кістковій тканині за ГК-індукованого остеопорозу залишаються недостатньо висвітленими, наступним етапом було оцінити їх залученість у патогенез ГЮ та можливість коригування їх спряженості шляхом введення вітаміну D<sub>3</sub>. Щоб оцінити, наскільки VEGF – регулятор ангіогенезу у кістковій тканині, може бути задіяний у патогенезі ГЮ, було визначено рівень його димерної форми, яка вважається активною. Незважаючи на зростання рівня мРНК ключових регуляторів VEGF: HIF-1α у 1,8 рази (рис. 3.31 Б) та NF-κB у 4,8 рази (рис. 3.30 Б), рівень протеїну VEGF у 6,9 разів знижувався після хронічного застосування ГК, відображаючи порушення узгодженості між процесами остеогенезу та

ангіогенезу. Це може пояснюватись продемонстрованим нами раніше зниженим рівнем фосфоNF-κB p65 (рис. 3.30 В), яка є активною формою і транслокується до ядра. Таким чином, ці дані вказують на важливість процесу фосфорилування NF-κB p65 в регулюванні рівня VEGF у кістковій тканині.

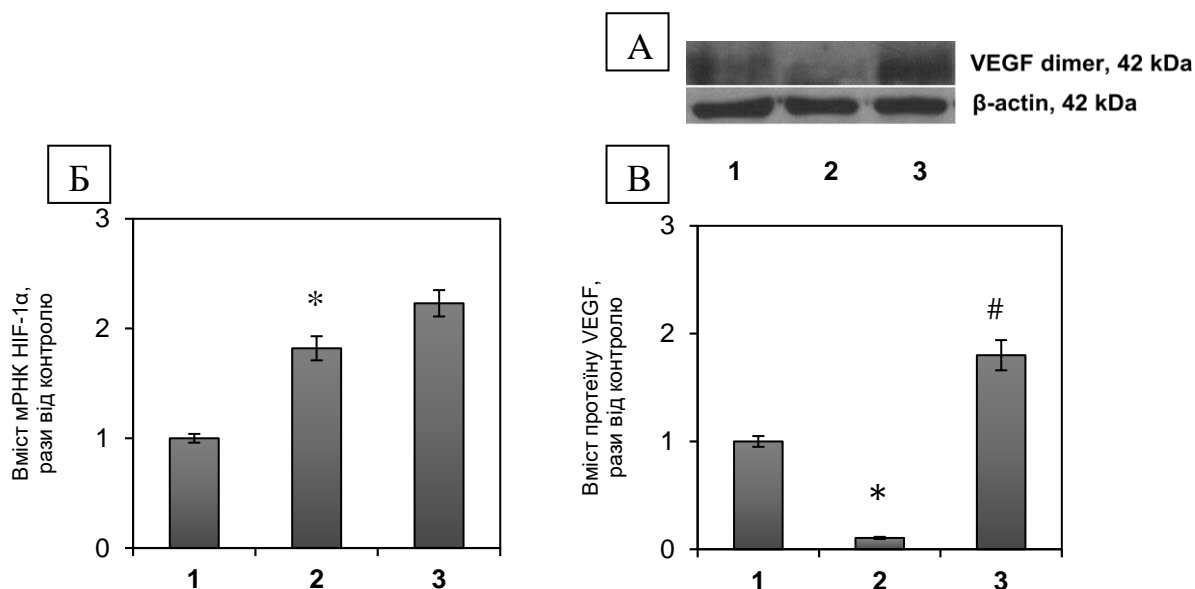


Рис. 3.31 Відносний вміст HIF-1α та VEGF у кістковій тканині щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>, M±m, n=7. Імуноблотограма (А) та гістограма вмісту протеїну VEGF (В) та мРНК HIF-1α (Б): 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \* p < 0,05 порівняно з контролем, # p < 0,05 порівняно з дією преднізолону.

Преднізолон знижував вміст мРНК TNFα у кістковій тканині у 1,3 рази (рис. 3.32 А), що узгоджується з його антизапальною дією та разом з падінням вмісту RANK пояснює знижений рівень pNF-κB за дії ГК. Оскільки відомо, що PPARγ активується у відповідь на дію TNFα, то було визначено його експресію у кістковій тканині та встановлено зростання рівня мРНК PPARγ у 10 разів за дії преднізолону (рис. 3.32 Б). Так само як і VDR, PPARγ є ядерним рецептором, який діє через рецептор-партнер RXR, тому він може конкурувати з VDR за зв'язування з ним, тим самим перешкоджаючи реалізації геномних ефектів VDR. Оскільки PPARγ задіяний як у регулюванні остеобластогенезу, так і у підтриманні функціонування остеоцитів, а його надмірна експресія може

обумовлювати їх загибель за апоптичним шляхом, то у сукупності ці результати можуть вказувати на порушення гомеостазу кісткової тканини. Не виключено, що ці зміни обумовлюють анти-остеобластну та про-остеокластну дію ГК.

Введення вітаміну D<sub>3</sub> підвищувало рівень VEGF у 12 разів (рис. 3.31 В) порівняно з дією преднізолону, що свідчить про посилення інтенсивності процесу ангіогенезу у кістковій тканині. Можна припустити, що такий ефект холекальциферолу міг бути обумовлений тенденцією до зростання рівня HIF1- $\alpha$  (рис. 3.31 Б), а також запобігати прямій інгібувальній дії ГК на VEGF, проте це питання потребує додаткових досліджень. Подальше зниження рівня TNF $\alpha$  за сумісної дії преднізолону та холекальциферолу (рис. 3.32 А) може обумовлювати інгібування ГК-індукованої оверекспресії мРНК NF- $\kappa$ B. Про відновлення процесу остеогенезу за дії холекальциферолу свідчить нормалізування рівня мРНК PPAR $\gamma$  до контрольних значень (рис. 3.32 Б).

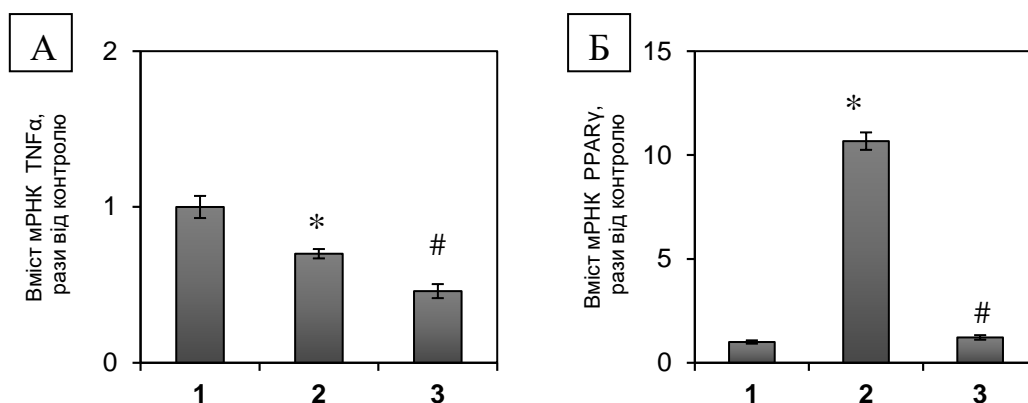


Рис. 3.32 Відносний вміст мРНК TNF $\alpha$  (А) та PPAR $\gamma$  (Б) у кістковій тканині щурів за дії преднізолону та вітаміну D<sub>3</sub>,  $M \pm m$ ,  $n=7$ : 1 – контроль; 2 – преднізолон; 3 – преднізолон + вітамін D<sub>3</sub>. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем, #  $p < 0,05$  порівняно з дією преднізолону.

Таким чином, виявлено ГК-індуковане пригнічення активування каскаду NF- $\kappa$ B у кістковій тканині, що може вести до інгібування процесів остеогенезу/ангіогенезу, в той час як вітамін D<sub>3</sub> здійснював коригувальний вплив на порушені внаслідок введення преднізолону NF- $\kappa$ B-асоційовані сигнальні каскади, відновлюючи рівень I $\kappa$ B та запобігаючи фосфорилуванню NF- $\kappa$ B p65.

## АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Синтетичні глюкокортикоїди (ГК) є ефективними протизапальними, імуносупресивними та протиалергічними препаратами, які широко застосовуються в медицині, проте викликають численні побічні ефекти, зокрема, розвиток остеопорозу [1]. ГК впливають на проліферування, диференціювання та метаболізм клітин кісткової тканини як прямо, так і опосередковано, порушуючи роботу цитокінових систем. Однією з причин розвитку ГК-індукованого остеопорозу (ГІО) можуть бути порушення у цитокіновій системі рецептора активатора NF-κB (RANK), його ліганду (RANKL) та остеопротегерину (OPG), що контролює процес остеокластогенезу.

Вітамін D<sub>3</sub> відповідає за узгодженість між процесами формування та резорбції кісткової тканини, а його недостатність вважається однією з провідних причин розвитку ГІО [56]. Актуальним залишається питання яким чином D-вітамінна недостатність та порушення експресії компонентів D-ауто/паракринної системи у цільових органах пов'язані зі змінами RANKL/RANK/OPG-сигналювання та експресії транскрипційного фактору NF-κB і чи корелюють ці зміни з порушенням процесу ремоделювання кісткової тканини за ГК-індукованого остеопорозу. На сьогодні обґрунтування можливості застосування вітаміну D<sub>3</sub> як перспективного засобу коригування патологічних процесів у кістковій тканині за умов тривалого введення ГК є актуальною медико-біологічною проблемою.

У дисертаційній роботі увагу зосереджено на дослідженні ролі NF-κB-асоційованого регуляторного сигнального шляху RANKL/RANK/OPG у механізмах розвитку порушень ремоделювання кісткової тканини за експериментального глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу та оцінці плейотропних регуляторних ефектів вітаміну D<sub>3</sub> за даної патології.

Для підтвердження експериментальної моделі остеопорозу за умов тривалого введення преднізолону було вивчено стан мінерального обміну та визначено маркерні показники розвитку остеопорозу, а саме біомеханічні

параметри стегнової кістки та вміст протеїну остеокальцину – маркеру процесу остеосинтезу. Показано, що введення преднізолону супроводжувалось порушенням мінерального обміну у сироватці крові та кістковій тканині (гіпокальціємією, гіпофосфатемією та зростанням активності лужної фосфатази), зниженням біомеханічних параметрів стегнової кістки та зменшенням вмісту маркерів остеосинтезу (остеокальцину, OPG та VDR) у кістковій тканині, що безперечно свідчить про розвиток ГК-індукованого остеопорозу. Оскільки ГК-індуковані патологічні зміни у кістковій тканині відбувались на тлі розвитку D-дефіциту (3-разового зниження рівня 25OHD у сироватці крові), то додаткове введення вітаміну D<sub>3</sub> за ГК терапії чинило позитивний ефект, який виявлявся у коригуванні стану мінерального обміну, частковому нормалізуванні біомеханічних параметрів стегнової кістки та повному відновленні вмісту протеїну остеокальцину [123], [128].

Вперше показано, що тривале введення преднізолону на тлі зниження рівня 25OHD також порушувало синтез компонентів D-ауто/паракринної системи (VDR та CYP27B1) у кістковому мозку, кістковій тканині та печінці, тим самим вказуючи на важливість адекватного функціонування даної системи для нормального перебігу процесу ремоделювання кісткової тканини.

Сьогодні ГЮ розглядають як мультифакторне захворювання, у патогенезі якого лежать не тільки порушення у кістковій тканині, але й порушення у функціонуванні багатьох інших органів та систем. Недостатність вітаміну D може бути одним з факторів порушення злагодженого функціонування кісткової та гепатобіліарної систем, що може лежати в основі патогенезу так званих печінкових остеодистрофій та розглядатись як один з механізмів розвитку преднізолон-індукованого остеопорозу.

Нами було припущено, що преднізолон-індуковане порушення процесу гідроксилування вітаміну D за 25 положенням в гепатоцитах може обумовлюватись гепатотоксичною дією ГК. Тому наступним етапом було дослідити молекулярні механізми ушкодження тканини печінки і оцінити роль вітаміну D<sub>3</sub> у нормалізації ГК-індукованих порушень функціонування

гепатоцитів. Виявлено, що в основі гепатотоксичної дії преднізолону лежить посилене продукування активних форм кисню та азоту гепатоцитами. Оскільки відомо, що NF-κB є редокс-чутливим транскрипційним фактором, також було досліджено його вміст і виявлено, що преднізолон викликав виражене підвищення вмісту фосфорильованої (активної) субодиниці p65 NF-κB як у загальних лізатах, так і у ядерній фракції, на тлі одночасного зниження рівня інгібітору κB, що свідчить про активування NF-κB та його транслокацію до ядра [190]. Більше того, вперше показано, що у преднізолон-індукованому активуванні NF-κB, окрім АФК, можуть бути задіяні GR, прозапальний цитокін TNFα та система RANKL/RANK/OPG. Встановлено, що введення преднізолону призводило до зменшення рівня протеїну GR, який в нормі блокує транслокацію субодиниці p65 NF-κB до ядра за рахунок прямого зв'язування з нею. Більше того, активуванню NF-κB може сприяти виявлене нами суттєве збільшення продукування TNFα, що в свою чергу також є свідченням пошкодження тканини печінки, а також рівня RANKL.

Оскільки відомо, що під контролем NF-κB знаходиться індукбельна NO-синтаза, і крім того, залишаються малоз'ясованими механізми залучення оксиду азоту у розвиток порушень функціонування печінки, було досліджено маркери нітрозативного стресу. З огляду на активування NF-κB за дії глюкокортикоїду, було виявлено збільшення рівня протеїну iNOS у тканині печінки, що корелювало із збільшенням продукування NO та зростанням опосередкованого пероксинітритом рівня нітрозилування протеїнів. ГК-індукований оксидативно-нітрозативний стрес може бути причиною ушкодження ДНК, а отже, відповідальний за активування PARP-1, що призводило до збільшення рівня полі(ADP)-рибозильованих протеїнів. В свою чергу, інтенсифікація вільнорадикальних процесів та збільшення відносного вмісту активного фрагменту 89 кДа фрагменту PARP-1 корелювали зі зростанням відсотку некротичних та апоптичних клітин серед гепатоцитів за дії преднізолону. За умов хронічного застосування ГК цей механізм може лежати в основі розвитку D-дефіцитного стану організму внаслідок падіння



рівня 25OHD та зниження вмісту як мРНК, так і протеїну VDR (Додаток 2А). Більше того, в основі порушення сигналювання через VDR може лежати не тільки недостатність вмісту ліганду та знижений рівень рецептору, але й активний процес нітрозилування протеїнів, в тому числі і VDR [219], адже необоротно нітрозильований VDR не здатний утворювати комплекс з RXR, а отже, реалізувати свої геномні ефекти.

Введення вітаміну D<sub>3</sub> за дії преднізолону виявлялось у зниженні продукування АФК, фосфорилування NF-κB та повному нормалізуванні вмісту IκB і iNOS (та як наслідок, зниження рівня NO та нітрозилування протеїнів), а також частковому – рівнів PAR-протеїнів та 89 кДа фрагменту PARP-1 [190]. Це цілком узгоджується з даними щодо здатності гормонально активних форм вітаміну D<sub>3</sub> чинити антиоксидатні ефекти та виступати в ролі інгібітору активності PARP-1. Показано, що вітамін D<sub>3</sub> на тлі дії преднізолону нормалізував також 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 (Додаток 2Б). Таке покращення функціонування печінки за дії холекальциферолу, ймовірно, вело до нормалізування процесу гідроксилування 25OHD у гепатоцитах та відновлення його рівня у сироватці крові, що може мати позитивний ефект на ремоделювання кісткової тканини.

Відомо, що гомеостаз кісткової тканини підтримується за умов збалансованого перебігу процесів остеосинтезу, резорбції та ангіогенезу. Кожен з цих процесів контролюється певними сигнальними шляхами, наприклад для остеокластогенезу – це сигнальна система RANKL/RANK/OPG, для остеобластогенезу – остеокальцин, ядерні рецептори PPARγ та VDR, для ангіогенезу – вісь HIF-1α/VEGF. Компоненти системи NF-κB/IκB можуть виступати ключовою інтегруючою ланкою для взаємодії RANKL/RANK/OPG, VDR- та GR-опосередкованих сигнальних шляхів, задіяних у підтриманні гомеостазу кісткової тканини. Тому на другому етапі нами було

охарактеризовано стан ключових сигнальних шляхів у кістковому мозку та кістковій тканині, а також за рівнем експресії ключових маркерів ремоделювання досліджено характер змін формування та резорбції кісткової тканини за ГІО у взаємозв'язку із забезпеченістю організму тварин вітаміном D.

Нами вперше продемонстровано збільшення кількості RANK-позитивних попередників остеокластів за дії преднізолону у кістковому мозку, периферичній крові та селезінці. Введення преднізолону також активувало систему RANKL/RANK/OPG у кістковому мозку, про що судили за зменшенням рівня OPG та збільшенням вмісту протеїнів RANKL і RANK, а також за посиленням формування комплексів RANKL з RANK на преостеокластах [208]. Наслідком активування системи RANKL/RANK/OPG було активування (фосфорилування) NF-κB та його транслокація до ядра, що може опосередковувати про-остеокластні ефекти. Більше того, у процесі активування NF-κB можуть бути задіяні IκB та GR, адже за дії преднізолону спостерігалось зменшення їх рівнів, а отже зниження ступеня блокування субодиниці p65 NF-κB за рахунок протеїн-протеїнових взаємодій з IκB та GR. В той же час спостерігались порушення у D-ауто/паракринній системі, а саме зниження вмісту протеїнів VDR та CYP27B1, що свідчить про пригнічення остеобластної ланки. Сумарно ці дані відображають порушення диференціювання та дозрівання попередників остеобластів та остеокластів у кістковому мозку за дії ГК (Додаток 3А). Одним з ключових моментів, виявлених у даній роботі, був цікавий механізм анти-резорбтивної дії вітаміну D<sub>3</sub>, а саме інгібування NF-κB у кістковому мозку не тільки внаслідок пригнічення функціонування тріади RANKL/RANK/OPG, але й за рахунок суттєвого зростання вмісту GR, що може напряду зв'язуватись з NF-κB, блокуючи його. Крім того, показано, що вітамін D зменшував пул циркулюючих попередників остеокластів, а також суттєво збільшував рівень продукування NO [220], тим самим опосередковуючи NO-індукований апоптоз преостеокластів (Додаток 3Б).

Отже, за дії преднізолону показано транскрипційне активування сигнального каскаду NF-κB у клітинах кісткового мозку. Активні форми кисню та 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. В свою чергу, вітамін D<sub>3</sub> інгібував індуковане преднізолоном активування NF-κB та стимулював NO-залежний апоптоз попередників остеокластів у кістковому мозку, відновлюючи узгодженість між процесами формування та резорбції кісткової тканини.

У кістковій тканині було виявлено ГК-індуковане зменшення співвідношення OPG/RANKL, що є ознакою порушення перебігу процесу остеокластогенезу. За рахунок суттєвого підвищення вмісту ІκB (що є проявом класичного механізму дії ГК) спостерігалось інгібування активності NF-κB у кістковій тканині, що корелювало з виявленим нами падінням вмісту протеїну-маркера зрілих остеокластів RANK та зниженням рівня мРНК TNFα, що цілком узгоджується з антизапальною дією преднізолону як медичного препарату. Крім того, продемонстровані порушення у остеобластній ланці, про що свідчили знижені рівні VDR, OPG та остеокальцину. Також введення преднізолону значно підвищувало рівень мРНК PPARγ, що може обумовлювати загибель остеоцитів та остеобластів за апоптичним шляхом. Збільшений рівень PPARγ може перешкоджати реалізації геномних ефектів VDR за рахунок конкурування за RXR, оскільки обидва ці ядерні рецептори потребують зв'язування з ним та формування гетеродимеру [53]. Для оцінки процесу ангиогенезу у кістковій тканині було визначено вміст VEGF та виявлено, що незважаючи на зростання рівня мРНК ключових регуляторів VEGF – HIF-1α та NF-κB, рівень протеїну VEGF знижувався після хронічного застосування ГК. Ці зміни підтвердили антиангіогенні властивості преднізолону та свідчать про порушення узгодженості між процесами остеогенезу та ангиогенезу. Це може пояснюватись продемонстрованим нами зниженим рівнем фосфорильованої за Ser311 субодиниці p65 NF-κB. Таким чином, продемонстровано важливість процесу фосфорильовання NF-κB p65 в регулюванні рівня VEGF у кістковій

тканині. Отже, за дії преднізолону виявлено порушення спряження між процесами ангіогенезу, остеобластогенезу та остеокластогенезу, що виявлялось у зниженні біомеханічних параметрів стегнової кістки (Додаток 4А).

Введення вітаміну D<sub>3</sub> здійснювало коригувальний вплив на вміст компонентів системи NF-κB/ІκB та маркерів адекватного перебігу остеобластогенезу – VDR, PPARγ, остеокальцину та остеопротегерину. Відновлення рівня фосфоNF-κB за введення холекальциферолу призводило до нормалізування вмісту VEGF до контрольних значень та до подальшого зниження рівня TNFα, що свідчить про відновлення нормального перебігу ангіогенезу та узгоджується з даними щодо протизапальних властивостей вітаміну D<sub>3</sub>. Таким чином, введення холекальциферолу відновлювало узгодженість між процесами остеобластогенезу, остеокластогенезу та ангіогенезу, що виявлялось у частковому відновленні біомеханічних параметрів кісткової тканини, а отже, може розглядатись як один з ключових молекулярних механізмів участі вітаміну D<sub>3</sub> у відновленні процесу ремоделювання кісткової тканини за умов тривалої глюкокортикоїдної терапії (Додаток 4Б).

Отже, одним з важливих моментів, встановлених у даній роботі, було те, що зміни експресії компонентів систем RANKL/RANK/OPG та NF-κB/ІκB відбувались на тлі порушення метаболізму вітаміну D та можуть відповідати за втрату маси кісткової тканини при тривалому введенні преднізолону. Преднізолон індукував збільшення пулу преостеокластів у кістковому мозку, крові та селезінці, в той час як у кістковій тканині навпаки, спостерігалось зниження кількості зрілих остеокластів. Показано, що вітамін D<sub>3</sub> 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 нормалізування процесу резорбції. Отже, ці дані можуть бути обґрунтуванням для широкого використання вітаміну D<sub>3</sub> в якості супровідної терапії за глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу.

## Висновки

З'ясування клітинно-молекулярних механізмів розвитку глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу та шляхів його коригування залишається актуальною медико-біологічною проблемою. У дисертаційній роботі вперше показано зв'язок між дефіцитом вітаміну D<sub>3</sub> в організмі та тканиннспецифічними порушеннями NF-κB-залежних сигнальних шляхів за преднізолон-індукованого остеопорозу. Продемонстровано здатність вітаміну D<sub>3</sub> 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 25OHD 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 D<sub>3</sub> на вміст 25OHD у сироватці крові та на індуковані преднізолоном порушення експресії VDR та CYP27B1 у різних тканинах. Введення вітаміну D<sub>3</sub> 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 фосфорилуванням 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 IκB та зменшення рівня NF-κB призводило до гальмування процесу остеосинтезу.

7. Продемонстровано здатність вітаміну D<sub>3</sub> 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/IκB, відновлюючи узгодженість між процесами остеосинтезу та резорбції.

### Список використаних джерел

- [1] D. Cruz-Topete and J. A. Cidlowski, “One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids.,” *Neuroimmunomodulation*, vol. 22, no. 1–2, pp. 20–32, 2015.
- [2] K. Hartmann, M. Koenen, S. Schauer, S. Wittig-Blaich, M. Ahmad, U. Baschant, and J. P. Tuckermann, “Molecular Actions of Glucocorticoids in Cartilage and Bone During Health, Disease, and Steroid Therapy.,” *Physiol. Rev.*, vol. 96, no. 2, pp. 409–447, Apr. 2016.
- [3] I. Zofkova and J. Blahos, “New molecules modulating bone metabolism - new perspectives in the treatment of osteoporosis.,” *Physiol. Res.*, vol. 66, no. Supplementum 3, pp. S341–S347, Sep. 2017.
- [4] M. Wacker and M. F. Holick, “Vitamin D - effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation.,” *Nutrients*, vol. 5, no. 1, pp. 111–148, Jan. 2013.
- [5] R. Bouillon, N. M. Van Schoor, E. Gielen, S. Boonen, C. Mathieu, D. Vanderschueren, and P. Lips, “Optimal vitamin D status: a critical analysis on the basis of evidence-based medicine.,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 98, no. 8, pp. E1283–304, Aug. 2013.
- [6] M. Caprio, M. Infante, M. Calanchini, C. Mammi, and A. Fabbri, “Vitamin D: not just the bone. Evidence for beneficial pleiotropic extraskeletal effects.,” *Eat. Weight Disord.*, vol. 22, no. 1, pp. 27–41, Mar. 2017.
- [7] W. Xiao, Y. Wang, S. Pacios, S. Li, and D. T. Graves, “Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling.,” *Front. Oral Biol.*, vol. 18, pp. 9–16, 2016.
- [8] W. Liu and X. Zhang, “Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review).,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 11, no. 5, pp. 3212–3218, May 2015.
- [9] I. Bendik, A. Friedel, F. F. Roos, P. Weber, and M. Eggersdorfer, “Vitamin D: a critical and essential micronutrient for human health.,” *Front. Physiol.*, vol. 5, p. 248, 2014.
- [10] А. Н. Казюлин, *Витамин D*. Москва: ООО НТИЦ АМТ, 2007.
- [11] M. F. Holick, “The D-lemma: to screen or not to screen for 25-hydroxyvitamin

- D concentrations.," *Clin. Chem.*, vol. 56, no. 5, pp. 729–731, May 2010.
- [12] A. W. Norman, "From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health.," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 88, no. 2, p. 491S–499S, Aug. 2008.
- [13] H. F. DeLuca, "Overview of general physiologic features and functions of vitamin D.," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 80, no. 6 Suppl, p. 1689S–96S, Dec. 2004.
- [14] В. К. Бауман, *Биохимия и физиология витамина D*. Рига: «Зинатне», 1989.
- [15] D. A. Hanley, A. Cranney, G. Jones, S. J. Whiting, W. D. Leslie, D. E. C. Cole, S. A. Atkinson, R. G. Josse, S. Feldman, G. A. Kline, and C. Rosen, "Vitamin D in adult health and disease: a review and guideline statement from Osteoporosis Canada.," *CMAJ*, vol. 182, no. 12, pp. E610-8, Sep. 2010.
- [16] D. Hollander, K. S. Muralidhara, and A. Zimmerman, "Vitamin D-3 intestinal absorption in vivo: influence of fatty acids, bile salts, and perfusate pH on absorption.," *Gut*, vol. 19, no. 4, pp. 267–272, Apr. 1978.
- [17] J. G. J. Hoenderop, B. Nilius, and R. J. M. Bindels, "Calcium absorption across epithelia.," *Physiol. Rev.*, vol. 85, no. 1, pp. 373–422, Jan. 2005.
- [18] M. Speeckaert, G. Huang, J. R. Delanghe, and Y. E. C. Taes, "Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism.," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 372, no. 1–2, pp. 33–42, Oct. 2006.
- [19] A. Al-Hendy and M. Badr, "Can vitamin D reduce the risk of uterine fibroids?," *Womens. Health (Lond. Engl.)*, vol. 10, no. 4, pp. 353–358, Jul. 2014.
- [20] E. Axen, H. Postlind, H. Sjoberg, and K. Wikvall, "Liver mitochondrial cytochrome P450 CYP27 and recombinant-expressed human CYP27 catalyze 1 alpha-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D3.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 21, pp. 10014–10018, Oct. 1994.
- [21] E. Axen, T. Bergman, and K. Wikvall, "Microsomal 25-hydroxylation of vitamin D2 and vitamin D3 in pig liver.," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 51, no. 1–2, pp. 97–106, Oct. 1994.
- [22] A. Didriksen, G. Grimnes, M. S. Hutchinson, M. Kjaergaard, J. Svartberg, R. M. Joakimsen, and R. Jorde, "The serum 25-hydroxyvitamin D response to vitamin D supplementation is related to genetic factors, BMI, and baseline levels.," *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 169, no. 5, pp. 559–567, Nov. 2013.



- [23] G. Jones, "Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1 $\alpha$ -hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3).," *Semin. Dial.*, vol. 20, no. 4, pp. 316–324, 2007.
- [24] D. Zehnder, R. Bland, M. C. Williams, R. W. McNinch, A. J. Howie, P. M. Stewart, and M. Hewison, "Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1  $\alpha$ -hydroxylase.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 86, no. 2, pp. 888–894, Feb. 2001.
- [25] D. E. Prosser and G. Jones, "Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D.," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 29, no. 12, pp. 664–673, Dec. 2004.
- [26] M. R. Haussler, P. W. Jurutka, M. Mizwicki, and A. W. Norman, "Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 $\alpha$ ,25(OH)(2)vitamin D(3): genomic and non-genomic mechanisms.," *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 25, no. 4, pp. 543–559, Aug. 2011.
- [27] M. Kozai, H. Yamamoto, M. Ishiguro, N. Harada, M. Masuda, T. Kagawa, Y. Takei, A. Otani, O. Nakahashi, S. Ikeda, Y. Taketani, K.-I. Takeyama, S. Kato, and E. Takeda, "Thyroid hormones decrease plasma 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D levels through transcriptional repression of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP27B1).," *Endocrinology*, vol. 154, no. 2, pp. 609–622, Feb. 2013.
- [28] P. H. Anderson, P. D. O'Loughlin, B. K. May, and H. A. Morris, "Modulation of CYP27B1 and CYP24 mRNA expression in bone is independent of circulating 1,25(OH)2D3 levels.," *Bone*, vol. 36, no. 4, pp. 654–662, Apr. 2005.
- [29] E. Kallay, G. Bises, E. Bajna, C. Bieglmayer, W. Gerdenitsch, I. Steffan, S. Kato, H. J. Armbrecht, and H. S. Cross, "Colon-specific regulation of vitamin D hydroxylases--a possible approach for tumor prevention.," *Carcinogenesis*, vol. 26, no. 9, pp. 1581–1589, Sep. 2005.
- [30] D. D. Bikle, S. Pillai, E. Gee, and M. Hincenbergs, "Tumor necrosis factor- $\alpha$  regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D production by human keratinocytes.," *Endocrinology*, vol. 129, no. 1, pp. 33–38, Jul. 1991.
- [31] M. R. Gyetko, C. H. Hsu, C. C. Wilkinson, S. Patel, and E. Young, "Monocyte 1  $\alpha$ -hydroxylase regulation: induction by inflammatory cytokines and

suppression by dexamethasone and uremia toxin.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 54, no. 1, pp. 17–22, Jul. 1993.

[32] F. Sassi, C. Tamone, and P. D'Amelio, "Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator.," *Nutrients*, vol. 10, no. 11, Nov. 2018.

[33] S. Segaert and R. Bouillon, "Vitamin D and regulation of gene expression.," *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 1, no. 4, pp. 347–354, Jul. 1998.

[34] E. Marcinkowska, "A run for a membrane vitamin D receptor.," *Biol. Signals Recept.*, vol. 10, no. 6, pp. 341–349, 2001.

[35] C. L. Richard, M. C. Farach-Carson, B. Rohe, I. Nemere, and K. A. Meckling, "Involvement of 1,25D3-MARRS (membrane associated, rapid response steroid-binding), a novel vitamin D receptor, in growth inhibition of breast cancer cells.," *Exp. Cell Res.*, vol. 316, no. 5, pp. 695–703, Mar. 2010.

[36] M. J. Larriba, J. M. Gonzalez-Sancho, F. Bonilla, and A. Munoz, "Interaction of vitamin D with membrane-based signaling pathways.," *Front. Physiol.*, vol. 5, p. 60, 2014.

[37] Y. Imai, M.-Y. Youn, K. Inoue, I. Takada, A. Kouzmenko, and S. Kato, "Nuclear receptors in bone physiology and diseases.," *Physiol. Rev.*, vol. 93, no. 2, pp. 481–523, Apr. 2013.

[38] M. A. Maestro, F. Molnar, A. Mourino, and C. Carlberg, "Vitamin D receptor 2016: novel ligands and structural insights.," *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 26, no. 11, pp. 1291–1306, Nov. 2016.

[39] Barsony J., "VDR and RXR Subcellular Trafficking," in *Vitamin D Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*, 2nd Editio., H. M.F., Ed. Humana Press of Springer Science, 2010, pp. 153–173.

[40] C. L. Smith and B. W. O'Malley, "Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators.," *Endocr. Rev.*, vol. 25, no. 1, pp. 45–71, Feb. 2004.

[41] J. K. Burmester, R. J. Wiese, N. Maeda, and H. F. DeLuca, "Structure and regulation of the rat 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 85, no. 24, pp. 9499–9502, Dec. 1988.

[42] P. Rotkiewicz, W. Sicinska, A. Kolinski, and H. F. DeLuca, "Model of three-dimensional structure of vitamin D receptor and its binding mechanism with

- 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3).,” *Proteins*, vol. 44, no. 3, pp. 188–199, Aug. 2001.
- [43] J. W. Pike, M. B. Meyer, S.-M. Lee, M. Onal, and N. A. Benkusky, “The vitamin D receptor: contemporary genomic approaches reveal new basic and translational insights.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 127, no. 4, pp. 1146–1154, Apr. 2017.
- [44] E. Halilbasic, A. Baghdasaryan, and M. Trauner, “Nuclear receptors as drug targets in cholestatic liver diseases.,” *Clin. Liver Dis.*, vol. 17, no. 2, pp. 161–189, May 2013.
- [45] A. S. Dusso, “Vitamin D receptor: mechanisms for vitamin D resistance in renal failure.,” *Kidney Int. Suppl.*, no. 85, pp. S6-9, Jun. 2003.
- [46] D. David Feldman, J. Wesley Pike, Roger Bouillon, Edward Giovannucci and M. H. Goltzman, *Vitamin D: Volume 1: Biochemistry, Physiology and Diagnostics*. Elsevier Academic Press, 2017.
- [47] E. Jimi, S. Akiyama, T. Tsurukai, N. Okahashi, K. Kobayashi, N. Udagawa, T. Nishihara, N. Takahashi, and T. Suda, “Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function.,” *J. Immunol.*, vol. 163, no. 1, pp. 434–442, Jul. 1999.
- [48] K. Ozono, J. Liao, S. A. Kerner, R. A. Scott, and J. W. Pike, “The vitamin D-responsive element in the human osteocalcin gene. Association with a nuclear proto-oncogene enhancer.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 35, pp. 21881–21888, Dec. 1990.
- [49] M. R. Haussler, C. A. Haussler, L. Bartik, G. K. Whitfield, J.-C. Hsieh, S. Slater, and P. W. Jurutka, “Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention.,” *Nutr. Rev.*, vol. 66, no. 10 Suppl 2, pp. S98-112, Oct. 2008.
- [50] A. C. Hall and M. B. Juckett, “The role of vitamin D in hematologic disease and stem cell transplantation.,” *Nutrients*, vol. 5, no. 6, pp. 2206–2221, Jun. 2013.
- [51] S. Christakos, P. Dhawan, A. Verstuyf, L. Verlinden, and G. Carmeliet, “Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects.,” *Physiol. Rev.*, vol. 96, no. 1, pp. 365–408, Jan. 2016.
- [52] E. F. Eriksen, “Cellular mechanisms of bone remodeling.,” *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, vol. 11, no. 4, pp. 219–227, Dec. 2010.
- [53] H. Zuo and Y. Wan, “Nuclear Receptors in Skeletal Homeostasis.,” *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 125, pp. 71–107, 2017.

- [54] R. St-Arnaud, "The direct role of vitamin D on bone homeostasis.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 473, no. 2, pp. 225–230, May 2008.
- [55] Y. Wang, J. Zhu, and H. F. DeLuca, "Identification of the vitamin D receptor in osteoblasts and chondrocytes but not osteoclasts in mouse bone.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 29, no. 3, pp. 685–692, Mar. 2014.
- [56] D. D. Bikle, "Vitamin D and bone.," *Curr. Osteoporos. Rep.*, vol. 10, no. 2, pp. 151–159, Jun. 2012.
- [57] W. Xie, A. Radomska-Pandya, Y. Shi, C. M. Simon, M. C. Nelson, E. S. Ong, D. J. Waxman, and R. M. Evans, "An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 6, pp. 3375–3380, Mar. 2001.
- [58] M. Makishima, T. T. Lu, W. Xie, G. K. Whitfield, H. Domoto, R. M. Evans, M. R. Haussler, and D. J. Mangelsdorf, "Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor.," *Science*, vol. 296, no. 5571, pp. 1313–1316, May 2002.
- [59] M. Gascon-Barre, C. Demers, A. Mirshahi, S. Neron, S. Zalzal, and A. Nanci, "The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells.," *Hepatology*, vol. 37, no. 5, pp. 1034–1042, May 2003.
- [60] E. D'Aldebert, M.-J. Biyeyeme Bi Mve, M. Mergey, D. Wendum, D. Firrincieli, A. Coilly, L. Fouassier, C. Corpechot, R. Poupon, C. Housset, and N. Chignard, "Bile salts control the antimicrobial peptide cathelicidin through nuclear receptors in the human biliary epithelium.," *Gastroenterology*, vol. 136, no. 4, pp. 1435–1443, Apr. 2009.
- [61] S. Abramovitch, L. Dahan-Bachar, E. Sharvit, Y. Weisman, A. Ben Tov, E. Brazowski, and S. Reif, "Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats.," *Gut*, vol. 60, no. 12, pp. 1728–1737, Dec. 2011.
- [62] S. Ruiz-Gaspa, N. Guanabens, A. Enjuanes, P. Peris, A. Martinez-Ferrer, M. J. M. de Osaba, B. Gonzalez, L. Alvarez, A. Monegal, A. Combalia, and A. Pares, "Lithocholic acid downregulates vitamin D effects in human osteoblasts.," *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 40, no. 1, pp. 25–34, Jan. 2010.
- [63] M. F. Holick, "Vitamin D: A millenium perspective.," *J. Cell. Biochem.*, vol. 88, no. 2, pp. 296–307, Feb. 2003.

- [64] A. V. Kalueff, K. O. Eremin, and P. Tuohimaa, "Mechanisms of neuroprotective action of vitamin D(3).," *Biochemistry. (Mosc.)*, vol. 69, no. 7, pp. 738–741, Jul. 2004.
- [65] Z. Yao, W. Lei, R. Duan, Y. Li, L. Luo, and B. F. Boyce, "RANKL Cytokine Enhances TNF-induced Osteoclastogenesis Independently of TNF Receptor Associated Factor (TRAF) 6 by Degrading TRAF3 in Osteoclast Precursors.," *J. Biol. Chem.*, Apr. 2017.
- [66] P. Tuohimaa, L. Tenkanen, M. Ahonen, S. Lumme, E. Jellum, G. Hallmans, P. Stattin, S. Harvei, T. Hakulinen, T. Luostarinen, J. Dillner, M. Lehtinen, and M. Hakama, "Both high and low levels of blood vitamin D are associated with a higher prostate cancer risk: a longitudinal, nested case-control study in the Nordic countries.," *Int. J. cancer*, vol. 108, no. 1, pp. 104–108, Jan. 2004.
- [67] M. Hewison, F. Burke, K. N. Evans, D. A. Lammas, D. M. Sansom, P. Liu, R. L. Modlin, and J. S. Adams, "Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human health and disease.," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 103, no. 3–5, pp. 316–321, Mar. 2007.
- [68] M. F. Holick, "Calcium and vitamin D. Diagnostics and therapeutics.," *Clin. Lab. Med.*, vol. 20, no. 3, pp. 569–590, Sep. 2000.
- [69] M. F. Holick, "The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention.," *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, May 2017.
- [70] C. Carlberg and A. Haq, "The concept of the personal vitamin D response index.," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Dec. 2016.
- [71] M. F. Holick, N. C. Binkley, H. A. Bischoff-Ferrari, C. M. Gordon, D. A. Hanley, R. P. Heaney, M. H. Murad, and C. M. Weaver, "Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 96, no. 7, pp. 1911–1930, Jul. 2011.
- [72] C. Gomez Alonso, M. Naves Diaz, M. Rodriguez Garcia, J. L. Fernandez Martin, and J. B. Cannata Andia, "[Review of the concept of vitamin D 'sufficiency and insufficiency'].," *Nefrologia*, vol. 23 Suppl 2, pp. 73–77, 2003.
- [73] A. Zittermann, S. Iodice, S. Pilz, W. B. Grant, V. Bagnardi, and S. Gandini, "Vitamin D deficiency and mortality risk in the general population: a meta-analysis of prospective cohort studies.," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 95, no. 1, pp. 91–100, Jan.

2012.

[74] R. Nair and A. Maseeh, "Vitamin D: The 'sunshine' vitamin.," *J. Pharmacol. Pharmacother.*, vol. 3, no. 2, pp. 118–126, Apr. 2012.

[75] V. V. Povoroznyuk, N. I. Balatska, V. Y. Muts, F. V. Klymovytsky, and O. V. Synenky, "Vitamin D deficiency in Ukraine: A demographic and seasonal analysis," *Gerontologija*, vol. 13, no. 4, pp. 191–198, 2012.

[76] J. Wortsman, L. Y. Matsuoka, T. C. Chen, Z. Lu, and M. F. Holick, "Decreased bioavailability of vitamin D in obesity.," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 72, no. 3, pp. 690–693, Sep. 2000.

[77] M. Vilasco, L. Communal, N. Mourra, A. Courtin, P. Forgez, and A. Gompel, "Glucocorticoid receptor and breast cancer.," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 130, no. 1, pp. 1–10, Nov. 2011.

[78] H.-Y. Lin, Y. A. Muller, and G. L. Hammond, "Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin.," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 316, no. 1, pp. 3–12, Mar. 2010.

[79] J. Haller, E. Mikics, and G. B. Makara, "The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings.," *Front. Neuroendocrinol.*, vol. 29, no. 2, pp. 273–291, May 2008.

[80] E. Ayroldi, L. Cannarile, G. Migliorati, G. Nocentini, D. V Delfino, and C. Riccardi, "Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways.," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 26, no. 12, pp. 4805–4820, Dec. 2012.

[81] M.-A. Bellavance and S. Rivest, "The neuroendocrine control of the innate immune system in health and brain diseases.," *Immunol. Rev.*, vol. 248, no. 1, pp. 36–55, Jul. 2012.

[82] S. R. Lee, H. K. Kim, J. B. Youm, L. A. Dizon, I. S. Song, S. H. Jeong, D. Y. Seo, K. S. Ko, B. D. Rhee, N. Kim, and J. Han, "Non-genomic effect of glucocorticoids on cardiovascular system.," *Pflugers Arch.*, vol. 464, no. 6, pp. 549–559, Dec. 2012.

[83] A. J. Rose, A. Vegiopoulos, and S. Herzig, "Role of glucocorticoids and the glucocorticoid receptor in metabolism: insights from genetic manipulations.," *J.*

*Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 122, no. 1–3, pp. 10–20, Oct. 2010.

[84] T. J. Cole, J. A. Blendy, A. P. Monaghan, K. Kriegstein, W. Schmid, A. Aguzzi, G. Fantuzzi, E. Hummler, K. Unsicker, and G. Schutz, “Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation.,” *Genes Dev.*, vol. 9, no. 13, pp. 1608–1621, Jul. 1995.

[85] R. H. Oakley and J. A. Cidlowski, “Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 5, pp. 3177–3184, Feb. 2011.

[86] R. Newton, “Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important?,” *Thorax*, vol. 55, no. 7, pp. 603–613, Jul. 2000.

[87] S. H. Meijsing, M. A. Pufall, A. Y. So, D. L. Bates, L. Chen, and K. R. Yamamoto, “DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity.,” *Science*, vol. 324, no. 5925, pp. 407–410, Apr. 2009.

[88] O. Kassel and P. Herrlich, “Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects.,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 275, no. 1–2, pp. 13–29, Sep. 2007.

[89] P. J. Barnes, “Glucocorticosteroids: current and future directions.,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 163, no. 1, pp. 29–43, May 2011.

[90] J.-C. Wang, M. K. Derynck, D. F. Nonaka, D. B. Khodabakhsh, C. Haqq, and K. R. Yamamoto, “Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 44, pp. 15603–15608, Nov. 2004.

[91] R. H. Oakley, J. Revollo, and J. A. Cidlowski, “Glucocorticoids regulate arrestin gene expression and redirect the signaling profile of G protein-coupled receptors.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 43, pp. 17591–17596, Oct. 2012.

[92] S. Ramamoorthy and J. A. Cidlowski, “Ligand-induced repression of the glucocorticoid receptor gene is mediated by an NCoR1 repression complex formed by long-range chromatin interactions with intragenic glucocorticoid response elements.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 33, no. 9, pp. 1711–1722, May 2013.

[93] R. S. Weinstein, J.-R. Chen, C. C. Powers, S. A. Stewart, R. D. Landes, T.

Bellido, R. L. Jilka, A. M. Parfitt, and S. C. Manolagas, "Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids.," *J. Clin. Invest.*, vol. 109, no. 8, pp. 1041–1048, Apr. 2002.

[94] K. Scheschowitsch, J. A. Leite, and J. Assreuy, "New Insights in Glucocorticoid Receptor Signaling-More Than Just a Ligand-Binding Receptor.," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 8, p. 16, 2017.

[95] J. A. Kanis, H. Johansson, A. Oden, O. Johnell, C. de Laet, L. J. Melton III, A. Tenenhouse, J. Reeve, A. J. Silman, H. A. P. Pols, J. A. Eisman, E. V McCloskey, and D. Mellstrom, "A meta-analysis of prior corticosteroid use and fracture risk.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 19, no. 6, pp. 893–899, Jun. 2004.

[96] J. A. P. Da Silva, J. W. G. Jacobs, J. R. Kirwan, M. Boers, K. G. Saag, L. B. S. Ines, E. J. P. de Koning, F. Buttgereit, M. Cutolo, H. Capell, R. Rau, and J. W. J. Bijlsma, "Safety of low dose glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis: published evidence and prospective trial data.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 65, no. 3, pp. 285–293, Mar. 2006.

[97] B. Gudbjornsson, U. I. Juliusson, and F. V Gudjonsson, "Prevalence of long term steroid treatment and the frequency of decision making to prevent steroid induced osteoporosis in daily clinical practice.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 61, no. 1, pp. 32–36, Jan. 2002.

[98] G. Mazziotti, A. Giustina, E. Canalis, and J. P. Bilezikian, "Glucocorticoid-induced osteoporosis: clinical and therapeutic aspects.," *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, vol. 51, no. 8, pp. 1404–1412, Nov. 2007.

[99] K. Natsui, K. Tanaka, M. Suda, A. Yasoda, Y. Sakuma, A. Ozasa, S. Ozaki, and K. Nakao, "High-dose glucocorticoid treatment induces rapid loss of trabecular bone mineral density and lean body mass.," *Osteoporos. Int.*, vol. 17, no. 1, pp. 105–108, Jan. 2006.

[100] R. S. Weinstein, R. L. Jilka, A. M. Parfitt, and S. C. Manolagas, "Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone.," *J. Clin. Invest.*, vol. 102, no. 2, pp. 274–282, Jul. 1998.

[101] Y. Ishida and J. N. Heersche, "Glucocorticoid-induced osteoporosis: both in vivo and in vitro concentrations of glucocorticoids higher than physiological levels



attenuate osteoblast differentiation.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 13, no. 12, pp. 1822–1826, Dec. 1998.

[102] E. Canalis, "Clinical review 83: Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 81, no. 10, pp. 3441–3447, Oct. 1996.

[103] Y. Liu, A. Porta, X. Peng, K. Gengaro, E. B. Cunningham, H. Li, L. A. Dominguez, T. Bellido, and S. Christakos, "Prevention of glucocorticoid-induced apoptosis in osteocytes and osteoblasts by calbindin-D28k.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 19, no. 3, pp. 479–490, Mar. 2004.

[104] S.-I. Yun, H.-Y. Yoon, S.-Y. Jeong, and Y.-S. Chung, "Glucocorticoid induces apoptosis of osteoblast cells through the activation of glycogen synthase kinase 3beta.," *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 27, no. 2, pp. 140–148, 2009.

[105] C. A. O'Brien, D. Jia, L. I. Plotkin, T. Bellido, C. C. Powers, S. A. Stewart, S. C. Manolagas, and R. S. Weinstein, "Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength.," *Endocrinology*, vol. 145, no. 4, pp. 1835–1841, Apr. 2004.

[106] F.-S. Wang, J.-Y. Ko, D.-W. Yeh, H.-C. Ke, and H.-L. Wu, "Modulation of Dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation, and bone mass loss.," *Endocrinology*, vol. 149, no. 4, pp. 1793–1801, Apr. 2008.

[107] R. C. Pereira, A. M. Delany, and E. Canalis, "Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression.," *Bone*, vol. 30, no. 5, pp. 685–691, May 2002.

[108] R. M. Pereira, A. M. Delany, and E. Canalis, "Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture.," *Bone*, vol. 28, no. 5, pp. 484–490, May 2001.

[109] X. M. Shi, H. C. Blair, X. Yang, J. M. McDonald, and X. Cao, "Tandem repeat of C/EBP binding sites mediates PPARgamma2 gene transcription in glucocorticoid-induced adipocyte differentiation.," *J. Cell. Biochem.*, vol. 76, no. 3, pp. 518–527, Jan. 2000.

[110] I. Carcamo-Orive, A. Gaztelumendi, J. Delgado, N. Tejedos, A. Dorransoro, J. Fernandez-Rueda, D. J. Pennington, and C. Trigueros, "Regulation of human bone

marrow stromal cell proliferation and differentiation capacity by glucocorticoid receptor and AP-1 crosstalk.,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 25, no. 10, pp. 2115–2125, Oct. 2010.

[111] J. E. Aubin, “Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation.,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 72, no. 3, pp. 396–410, Mar. 1999.

[112] L. C. Hofbauer, F. Gori, B. L. Riggs, D. L. Lacey, C. R. Dunstan, T. C. Spelsberg, and S. Khosla, “Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis.,” *Endocrinology*, vol. 140, no. 10, pp. 4382–4389, Oct. 1999.

[113] H.-J. Kim, H. Zhao, H. Kitaura, S. Bhattacharyya, J. A. Brewer, L. J. Muglia, F. P. Ross, and S. L. Teitelbaum, “Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 116, no. 8, pp. 2152–2160, Aug. 2006.

[114] H.-J. Kim, “New understanding of glucocorticoid action in bone cells.,” *BMB Rep.*, vol. 43, no. 8, pp. 524–529, Aug. 2010.

[115] V. G. Moisiadis and S. G. Matthews, “Glucocorticoids and fetal programming part 2: Mechanisms.,” *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 10, no. 7, pp. 403–411, Jul. 2014.

[116] A. Tacey, L. Parker, A. Garnham, T. C. Brennan-Speranza, and I. Levinger, “The effect of acute and short term glucocorticoid administration on exercise capacity and metabolism.,” *J. Sci. Med. Sport*, vol. 20, no. 6, pp. 543–548, Jun. 2017.

[117] E. Canalis, G. Mazziotti, A. Giustina, and J. P. Bilezikian, “Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy.,” *Osteoporos. Int.*, vol. 18, no. 10, pp. 1319–1328, Oct. 2007.

[118] A. Loraschi, P. Banfi, M. Mauri, F. Sessa, G. Bono, and M. Cosentino, “Hepatotoxicity after high-dose methylprednisolone for demyelinating disease.,” *Clin. Neuropharmacol.*, vol. 33, no. 1, pp. 52–54, 2010.

[119] R. Poupon, “Treatment of primary biliary cirrhosis with ursodeoxycholic acid, budesonide and fibrates.,” *Dig. Dis.*, vol. 29, no. 1, pp. 85–88, 2011.

[120] Y. Yamanishi, Y. Nosaka, H. Kawasaki, C. Hirayama, and S. Ikawa, “Sterol and bile acid metabolism after short-term prednisolone treatment in patients with chronic active hepatitis.,” *Gastroenterol. Jpn.*, vol. 20, no. 3, pp. 246–251, Jun. 1985.

- [121] R. W. Chesney, A. Hamstra, P. Rose, and H. F. DeLuca, "Vitamin D and parathyroid hormone status in children with the nephrotic syndrome and chronic mild glomerulonephritis.," *Int. J. Pediatr. Nephrol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–4, Mar. 1984.
- [122] F. Cosman, J. Nieves, J. Herbert, V. Shen, and R. Lindsay, "High-dose glucocorticoids in multiple sclerosis patients exert direct effects on the kidney and skeleton.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 9, no. 7, pp. 1097–1105, Jul. 1994.
- [123] I. O. Shymans'kyi, A. V Khomenko, O. O. Lisakovs'ka, D. O. Labudzyns'kyi, L. I. Apukhovs'ka, and M. M. Velykyi, "[The ROS-generating and antioxidant systems in the liver of rats treated with prednisolone and vitamin D3].," *Ukr. Biochem. J.*, vol. 86, no. 5, pp. 111–125, 2014.
- [124] H. L. Henry, "Effect of dexamethasone on 25-hydroxyvitamin D3 metabolism by chick kidney cell cultures.," *Endocrinology*, vol. 118, no. 3, pp. 1134–1138, Mar. 1986.
- [125] L. Buckley, G. Guyatt, H. Fink, and T. McAlindon, "2017 American College of Rheumatology Guideline for the Prevention and Treatment of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis.," *Arthritis Care Res. (Hoboken)*, Sep. 2017.
- [126] T. Miki and K. Okamoto, "[Glucocorticoid and Bone. Efficacy of active vitamin D on glucocorticoid-induced osteoporosis].," *Clin. Calcium*, vol. 24, no. 9, pp. 1387–1392, Sep. 2014.
- [127] N. Akeno, A. Matsunuma, T. Maeda, T. Kawane, and N. Horiuchi, "Regulation of vitamin D-1 $\alpha$ -hydroxylase and -24-hydroxylase expression by dexamethasone in mouse kidney.," *J. Endocrinol.*, vol. 164, no. 3, pp. 339–348, Mar. 2000.
- [128] A. V Khomenko, "[Cholecalciferol hydroxylation in rat hepatocytes under the influence of prednisolone].," *Ukr. biokhimichniy zhurnal (1999)*, vol. 85, no. 3, pp. 90–95, 2013.
- [129] W. F. Lems, G. J. Van Veen, M. I. Gerrits, J. W. Jacobs, H. H. Houben, H. J. Van Rijn, and J. W. Bijlsma, "Effect of low-dose prednisone (with calcium and calcitriol supplementation) on calcium and bone metabolism in healthy volunteers.," *Br. J. Rheumatol.*, vol. 37, no. 1, pp. 27–33, Jan. 1998.
- [130] J. Y. Reginster, D. Kuntz, W. Verdict, M. Wouters, L. Guillevin, C. J. Menkes, and K. Nielsen, "Prophylactic use of alfacalcidol in corticosteroid-induced osteoporosis.," *Osteoporos. Int.*, vol. 9, no. 1, pp. 75–81, 1999.

- [131] L. M. Buckley, E. S. Leib, K. S. Cartularo, P. M. Vacek, and S. M. Cooper, "Calcium and vitamin D3 supplementation prevents bone loss in the spine secondary to low-dose corticosteroids in patients with rheumatoid arthritis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial.," *Ann. Intern. Med.*, vol. 125, no. 12, pp. 961–968, Dec. 1996.
- [132] P. N. Sambrook, M. Kotowicz, P. Nash, C. B. Styles, V. Naganathan, K. N. Henderson-Briffa, J. A. Eisman, and G. C. Nicholson, "Prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: a comparison of calcitriol, vitamin D plus calcium, and alendronate plus calcium.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 18, no. 5, pp. 919–924, May 2003.
- [133] P. H. Anderson and G. J. Atkins, "The skeleton as an intracrine organ for vitamin D metabolism.," *Mol. Aspects Med.*, vol. 29, no. 6, pp. 397–406, Dec. 2008.
- [134] R. Florencio-Silva, G. R. da S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simoes, and P. S. Cerri, "Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells.," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, p. 421746, 2015.
- [135] L. F. Bonewald, "The amazing osteocyte.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 26, no. 2, pp. 229–238, Feb. 2011.
- [136] B. S. Noble, H. Stevens, N. Loveridge, and J. Reeve, "Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone.," *Bone*, vol. 20, no. 3, pp. 273–282, Mar. 1997.
- [137] B. F. Boyce and L. Xing, "Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 473, no. 2, pp. 139–146, May 2008.
- [138] L. J. Raggatt and N. C. Partridge, "Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling.," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 33, pp. 25103–25108, Aug. 2010.
- [139] B. F. Boyce and L. Xing, "Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin.," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 9 Suppl 1, p. S1, 2007.
- [140] G. A. Rodan and T. J. Martin, "Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - a hypothesis.," *Calcified tissue international*, vol. 34, no. 3. United States, p. 311, May-1982.
- [141] N. Nakagawa, M. Kinoshita, K. Yamaguchi, N. Shima, H. Yasuda, K. Yano, T. Morinaga, and K. Higashio, "RANK is the essential signaling receptor for osteoclast

differentiation factor in osteoclastogenesis.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 253, no. 2, pp. 395–400, Dec. 1998.

[142] D. M. Anderson, E. Maraskovsky, W. L. Billingsley, W. C. Dougall, M. E. Tometsko, E. R. Roux, M. C. Teepe, R. F. DuBose, D. Cosman, and L. Galibert, “A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function.,” *Nature*, vol. 390, no. 6656, pp. 175–179, Nov. 1997.

[143] Y. Y. Kong, U. Feige, I. Sarosi, B. Bolon, A. Tafuri, S. Morony, C. Capparelli, J. Li, R. Elliott, S. McCabe, T. Wong, G. Campagnuolo, E. Moran, E. R. Bogoch, G. Van, L. T. Nguyen, P. S. Ohashi, D. L. Lacey, E. Fish, W. J. Boyle, and J. M. Penninger, “Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand.,” *Nature*, vol. 402, no. 6759, pp. 304–309, Nov. 1999.

[144] V. Nagy and J. M. Penninger, “The RANKL-RANK Story.,” *Gerontology*, vol. 61, no. 6, pp. 534–542, 2015.

[145] C. C. Lynch, A. Hikosaka, H. B. Acuff, M. D. Martin, N. Kawai, R. K. Singh, T. C. Vargo-Gogola, J. L. Begtrup, T. E. Peterson, B. Fingleton, T. Shirai, L. M. Matrisian, and M. Futakuchi, “MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL.,” *Cancer Cell*, vol. 7, no. 5, pp. 485–496, May 2005.

[146] T. Wada, T. Nakashima, N. Hiroshi, and J. M. Penninger, “RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease.,” *Trends Mol. Med.*, vol. 12, no. 1, pp. 17–25, Jan. 2006.

[147] D. L. Lacey, E. Timms, H. L. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y. X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney, and W. J. Boyle, “Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation.,” *Cell*, vol. 93, no. 2, pp. 165–176, Apr. 1998.

[148] M. P. Yavropoulou and J. G. Yovos, “Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives.,” *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, vol. 8, no. 3, pp. 204–216, 2008.

[149] A. P. Armstrong, M. E. Tometsko, M. Glaccum, C. L. Sutherland, D. Cosman,

and W. C. Dougall, "A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 46, pp. 44347–44356, Nov. 2002.

[150] A. E. Grigoriadis, Z. Q. Wang, M. G. Cecchini, W. Hofstetter, R. Felix, H. A. Fleisch, and E. F. Wagner, "c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling.," *Science*, vol. 266, no. 5184, pp. 443–448, Oct. 1994.

[151] M. Matsumoto, T. Sudo, M. Maruyama, H. Osada, and M. Tsujimoto, "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is crucial in osteoclastogenesis induced by tumor necrosis factor.," *FEBS Lett.*, vol. 486, no. 1, pp. 23–28, Dec. 2000.

[152] D. H. Jones, Y.-Y. Kong, and J. M. Penninger, "Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 61 Suppl 2, pp. ii32-9, Nov. 2002.

[153] M. P. Whyte, S. E. Obrecht, P. M. Finnegan, J. L. Jones, M. N. Podgornik, W. H. McAlister, and S. Mumm, "Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 347, no. 3, pp. 175–184, Jul. 2002.

[154] A. Mizuno, N. Amizuka, K. Irie, A. Murakami, N. Fujise, T. Kanno, Y. Sato, N. Nakagawa, H. Yasuda, S. Mochizuki, T. Gomibuchi, K. Yano, N. Shima, N. Washida, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, and H. Ozawa, "Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 247, no. 3, pp. 610–615, Jun. 1998.

[155] T. Suda, Y. Ueno, K. Fujii, and T. Shinki, "Vitamin D and bone.," *J. Cell. Biochem.*, vol. 88, no. 2, pp. 259–266, Feb. 2003.

[156] L. Sun, J. Pan, Y. Peng, Y. Wu, J. Li, X. Liu, Y. Qin, W. A. Bauman, C. Cardozo, M. Zaidi, and W. Qin, "Anabolic steroids reduce spinal cord injury-related bone loss in rats associated with increased Wnt signaling.," *J. Spinal Cord Med.*, vol. 36, no. 6, pp. 616–622, Nov. 2013.

[157] S. Ghosh and M. S. Hayden, "Celebrating 25 years of NF-kappaB research.," *Immunological reviews*, vol. 246, no. 1. England, pp. 5–13, Mar-2012.

[158] E. O'Dea and A. Hoffmann, "The regulatory logic of the NF-kappaB signaling system," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 1, p. a000216, Jan. 2010.

[159] M. Hinz, S. Ç. Arslan, and C. Scheidereit, "It takes two to tango: IκBs, the multifunctional partners of NF-κB," *Immunol. Rev.*, vol. 246, no. 1, pp. 59–76, Mar.

2012.

[160] M. S. Hayden and S. Ghosh, "NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions," *Genes Dev.*, vol. 26, no. 3, pp. 203–234, Feb. 2012.

[161] D. V. Novack, "Role of NF-kappaB in the skeleton.," *Cell Res.*, vol. 21, no. 1, pp. 169–182, Jan. 2011.

[162] V. Iotsova, J. Caamano, J. Loy, Y. Yang, A. Lewin, and R. Bravo, "Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2.," *Nat. Med.*, vol. 3, no. 11, pp. 1285–1289, Nov. 1997.

[163] D. V. Novack and R. Faccio, "Osteoclast motility: putting the brakes on bone resorption.," *Ageing Res. Rev.*, vol. 10, no. 1, pp. 54–61, Jan. 2011.

[164] G. Nelson, G. J. C. Wilde, D. G. Spiller, S. M. Kennedy, D. W. Ray, E. Sullivan, J. F. Unitt, and M. R. H. White, "NF-kappaB signalling is inhibited by glucocorticoid receptor and STAT6 via distinct mechanisms.," *J. Cell Sci.*, vol. 116, no. Pt 12, pp. 2495–2503, Jun. 2003.

[165] J. Liden, I. Rafter, M. Truss, J. A. Gustafsson, and S. Okret, "Glucocorticoid effects on NF-kappaB binding in the transcription of the ICAM-1 gene.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 273, no. 3, pp. 1008–1014, Jul. 2000.

[166] H. Brandstrom, T. Bjorkman, and O. Ljunggren, "Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 280, no. 3, pp. 831–835, Jan. 2001.

[167] C. Shi, J. Qi, P. Huang, M. Jiang, Q. Zhou, H. Zhou, H. Kang, N. Qian, Q. Yang, L. Guo, and L. Deng, "MicroRNA-17/20a inhibits glucocorticoid-induced osteoclast differentiation and function through targeting RANKL expression in osteoblast cells.," *Bone*, vol. 68, pp. 67–75, Nov. 2014.

[168] D. W. Dempster, "Bone histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporosis.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 137–141, Apr. 1989.

[169] C. Swanson, M. Lorentzon, H. H. Conaway, and U. H. Lerner, "Glucocorticoid regulation of osteoclast differentiation and expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappaB in mouse calvarial bones.," *Endocrinology*, vol. 147, no. 7, pp. 3613–3622, Jul. 2006.

- [170] H. J. Kim, “New understanding of glucocorticoid action in bone cells,” *BMB Rep.*, vol. 43, no. 8, pp. 524–529, 2010.
- [171] S.-J. Moon, I. E. Ahn, H. Jung, H. Yi, J. Kim, Y. Kim, S.-K. Kwok, K.-S. Park, J.-K. Min, S.-H. Park, H.-Y. Kim, and J. H. Ju, “Temporal differential effects of proinflammatory cytokines on osteoclastogenesis,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 31, no. 4, pp. 769–777, Apr. 2013.
- [172] A. Ramakrishnan, B. Torok-Storb, and M. M. Pillai, “Primary marrow-derived stromal cells: isolation and manipulation,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1035, pp. 75–101, 2013.
- [173] A. J. Stagg, F. Burke, S. Hill, and S. C. Knight, “Isolation of mouse spleen dendritic cells,” *Methods Mol. Med.*, vol. 64, pp. 9–22, 2001.
- [174] M. Jungblut, K. Oeltze, I. Zehnter, D. Hasselmann, and A. Bosio, “Preparation of single-cell suspensions from mouse spleen with the gentleMACS Dissociator,” *J. Vis. Exp.*, no. 22, Dec. 2008.
- [175] A. O. Mazanova, I. O. Shymanskyi, and M. Velyky, “Development and validation of immunoenzyme test-system for determination of 25-hydroxyvitamin D in blood serum,” *Biotechnol. ACTA*, vol. 9, no. 2, pp. 28–36, 2016.
- [176] B. J. Dyce and S. P. Bessman, “A rapid nonenzymatic assay for 2,3-DPG in multiple specimens of blood,” *Arch. Environ. Health*, vol. 27, no. 2, pp. 112–115, Aug. 1973.
- [177] X. Г. . Вагнер В.К., Путилин В.М., “Методы и результаты исследования изоферментов (кишечной и печеночной фракций) сывороточной щелочной фосфатазы при острых хирургических заболеваниях органов брюшной полости,” *Вопр. мед. химии*, vol. 27, no. 6, pp. 752–754, 1981.
- [178] A. E. Borjesson, H. H. Farman, C. Engdahl, A. Koskela, K. Sjogren, J. M. Kindblom, A. Stubelius, U. Islander, H. Carlsten, M. C. Antal, A. Krust, P. Chambon, J. Tuukkanen, M. K. Lagerquist, S. H. Windahl, and C. Ohlsson, “The role of activation functions 1 and 2 of estrogen receptor-alpha for the effects of estradiol and selective estrogen receptor modulators in male mice,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 28, no. 5, pp. 1117–1126, May 2013.
- [179] J. Das, J. Ghosh, P. Manna, and P. C. Sil, “Taurine provides antioxidant defense against NaF-induced cytotoxicity in murine hepatocytes,” *Pathophysiol.*



- Off. J. Int. Soc. Pathophysiol.*, vol. 15, no. 3, pp. 181–190, Oct. 2008.
- [180] E. Gumpricht, R. Dahl, B. Yerushalmi, M. W. Devereaux, and R. J. Sokol, “Nitric oxide ameliorates hydrophobic bile acid-induced apoptosis in isolated rat hepatocytes by non-mitochondrial pathways.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 28, pp. 25823–25830, Jul. 2002.
- [181] B. Ning, M. Bai, and W. Shen, “Reduced glutathione protects human hepatocytes from palmitate-mediated injury by suppressing endoplasmic reticulum stress response.,” *Hepatogastroenterology.*, vol. 58, no. 110–111, pp. 1670–1679, 2011.
- [182] S.-M. Ju, H.-O. Pae, W.-S. Kim, D.-G. Kang, H.-S. Lee, and B.-H. Jeon, “Role of reactive oxygen species in p53 activation during cisplatin-induced apoptosis of rat mesangial cells.,” *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 18, no. 8, pp. 1135–1141, 2014.
- [183] K. A. Sheppard, D. W. Rose, Z. K. Haque, R. Kurokawa, E. McInerney, S. Westin, D. Thanos, M. G. Rosenfeld, C. K. Glass, and T. Collins, “Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 19, no. 9, pp. 6367–6378, Sep. 1999.
- [184] L. Vermeulen, G. De Wilde, P. Van Damme, W. Vanden Berghe, and G. Haegeman, “Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1).,” *EMBO J.*, vol. 22, no. 6, pp. 1313–1324, Mar. 2003.
- [185] B. P. N. . Lapach S.N., Chubenko A.V., *Statistical methods in biomedical studies using Excel*. Kyiv: Morion, 2000.
- [186] C. Wegler, K. Wikvall, and M. Norlin, “Effects of Osteoporosis-Inducing Drugs on Vitamin D-Related Gene Transcription and Mineralization in MG-63 and Saos-2 Cells.,” *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 119, no. 5, pp. 436–442, Nov. 2016.
- [187] I. Barchetta, S. Carotti, G. Labbadia, U. V. Gentilucci, A. O. Muda, F. Angelico, G. Silecchia, F. Leonetti, A. Fraioli, A. Picardi, S. Morini, and M. G. Cavallo, “Liver vitamin D receptor, CYP2R1, and CYP27A1 expression: relationship with liver histology and vitamin D3 levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis or hepatitis C virus.,” *Hepatology*, vol. 56, no. 6, pp. 2180–2187, Dec.

2012.

[188] A. A. Hidalgo, D. L. Trump, and C. S. Johnson, "Glucocorticoid regulation of the vitamin D receptor.," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 121, no. 1–2, pp. 372–375, Jul. 2010.

[189] R. H. Oakley and J. A. Cidlowski, "The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease.," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 132, no. 5, pp. 1033–1044, Nov. 2013.

[190] O. Lisakovska, I. Shymansky, A. Mazanova, A. Khomenko, and M. Veliky, "Vitamin D3 protects against prednisolone-induced liver injury associated with the impairment of the hepatic NF-kappaB/iNOS/NO pathway.," *Biochem. Cell Biol.*, vol. 95, no. 2, pp. 213–222, Apr. 2017.

[191] C. Liu and X. Yu, "ADP-ribosyltransferases and poly ADP-ribosylation.," *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 16, no. 6, pp. 491–501, 2015.

[192] M. J. Reiniers, R. F. van Golen, T. M. van Gulik, and M. Heger, "Reactive oxygen and nitrogen species in steatotic hepatocytes: a molecular perspective on the pathophysiology of ischemia-reperfusion injury in the fatty liver.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 21, no. 7, pp. 1119–1142, Sep. 2014.

[193] J. T. R. Keeney, S. Forster, R. Sultana, L. D. Brewer, C. S. Latimer, J. Cai, J. B. Klein, N. M. Porter, and D. A. Butterfield, "Dietary vitamin D deficiency in rats from middle to old age leads to elevated tyrosine nitration and proteomics changes in levels of key proteins in brain: implications for low vitamin D-dependent age-related cognitive decline.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 65, pp. 324–334, Dec. 2013.

[194] T. Luedde and R. F. Schwabe, "NF-kappaB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma.," *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 8, no. 2, pp. 108–118, Feb. 2011.

[195] J. Moscat and M. T. Diaz-Meco, "Fine tuning NF-kappaB: new openings for PKC-zeta.," *Nature immunology*, vol. 12, no. 1. United States, pp. 12–14, Jan-2011.

[196] Q. X. Yuan, Y. Nagao, B. A. French, Y. J. Wan, and S. W. French, "Dexamethasone enhances mallory body formation in drug-primed mouse liver.," *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 69, no. 3, pp. 202–210, Dec. 2000.

[197] N. Lu, J. Li, Y. He, R. Tian, and Q. Xiao, "Nitrate modifications of alpha-enolase in hepatic proteins from diabetic rats: the involvement of myeloperoxidase.,"

*Chem. Biol. Interact.*, vol. 220, pp. 12–19, Sep. 2014.

[198] K. Ikeda, S. Kubo, K. Hirohashi, H. Kinoshita, K. Kaneda, N. Kawada, E. F. Sato, and M. Inoue, “Mechanism that regulates nitric oxide production by lipopolysaccharide-stimulated rat Kupffer cells.,” *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, vol. 28, no. 4, pp. 239–253, 1996.

[199] K.-D. Kroncke, L.-O. Klotz, C. V. Suschek, and H. Sies, “Comparing nitrosative versus oxidative stress toward zinc finger-dependent transcription. Unique role for NO.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 15, pp. 13294–13301, Apr. 2002.

[200] O. V. Zaitseva, S. G. Shandrenko, and M. M. Veliky, “Biochemical markers of bone collagen type I metabolism.,” *Ukr. Biochem. J.*, vol. 87, no. 1, pp. 21–32, 2015.

[201] K. Kaneko and S. Kawai, “[Mechanisms and therapeutics of glucocorticoid-induced osteoporosis].,” *Nihon Rinsho Meneki. Gakkai Kaishi*, vol. 34, no. 3, pp. 138–148, 2011.

[202] C. S. Kovacs and H. M. Kronenberg, “Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation.,” *Endocr. Rev.*, vol. 18, no. 6, pp. 832–872, Dec. 1997.

[203] M. Fusaro, M. C. Mereu, A. Aghi, G. Iervasi, and M. Gallieni, “Vitamin K and bone.,” *Clin. Cases Miner. Bone Metab.*, vol. 14, no. 2, pp. 200–206, 2017.

[204] G. S. Stein, J. B. Lian, J. L. Stein, A. J. Van Wijnen, and M. Montecino, “Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation.,” *Physiol. Rev.*, vol. 76, no. 2, pp. 593–629, Apr. 1996.

[205] N. K. Lee and G. Karsenty, “Reciprocal regulation of bone and energy metabolism.,” *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, vol. 8, no. 4, p. 351, 2008.

[206] Y. Nakamichi, T. Mizoguchi, A. Arai, Y. Kobayashi, M. Sato, J. M. Penninger, H. Yasuda, S. Kato, H. F. DeLuca, T. Suda, N. Udagawa, and N. Takahashi, “Spleen serves as a reservoir of osteoclast precursors through vitamin D-induced IL-34 expression in osteopetrotic op/op mice.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 25, pp. 10006–10011, Jun. 2012.

[207] A. Muto, T. Mizoguchi, N. Udagawa, S. Ito, I. Kawahara, Y. Abiko, A. Arai, S. Harada, Y. Kobayashi, Y. Nakamichi, J. M. Penninger, T. Noguchi, and N. Takahashi, “Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle down into bone.,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 26, no. 12, pp. 2978–2990, Dec. 2011.

- [208] I. Shymanskyi, O. Lisakovska, A. Mazanova, D. Labudzynski, and M. Veliky, "Vitamin D3 Modulates Impaired Crosstalk Between RANK and Glucocorticoid Receptor Signaling in Bone Marrow Cells After Chronic Prednisolone Administration.," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 9, p. 303, 2018.
- [209] L. Song, "Calcium and Bone Metabolism Indices.," *Adv. Clin. Chem.*, vol. 82, pp. 1–46, 2017.
- [210] В. М. М. ШИМАНСЬКИЙ І.О., Лісаковська О.О., "Молекулярно-клітинні механізми захисної дії вітаміну D при експериментальному преднізолон-індукованому остеопорозі," *Біль.Суглоби.Хребет*, vol. 7, no. 3, pp. 93–101, 2017.
- [211] M. C. Walsh and Y. Choi, "Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond.," *Front. Immunol.*, vol. 5, p. 511, 2014.
- [212] A. Lleo, Z. Bian, H. Zhang, Q. Miao, F. Yang, Y. Peng, X. Chen, R. Tang, Q. Wang, D. Qiu, J. Fang, C. Sobacchi, A. Villa, L. Di Tommaso, M. Roncalli, M. E. Gershwin, X. Ma, and P. Invernizzi, "Quantitation of the Rank-Rankl Axis in Primary Biliary Cholangitis.," *PLoS One*, vol. 11, no. 9, p. e0159612, 2016.
- [213] "RANKL signaling to the liver associated with type 2 diabetes risk.," *Bonekey Rep.*, vol. 2, p. 365, 2013.
- [214] R. Poulton, A. Caspi, B. J. Milne, W. M. Thomson, A. Taylor, M. R. Sears, and T. E. Moffitt, "NIH Public Access Author Manuscript Hepatology. Author Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) Protects Against Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Mice," *Lancet*, vol. 360, no. 9346, pp. 1640–1645, 2013.
- [215] P. Kostecka, A. Holy, H. Farghali, Z. Zidek, and E. Kmonickova, "Differential effects of acyclic nucleoside phosphonates on nitric oxide and cytokines in rat hepatocytes and macrophages.," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 12, no. 2, pp. 342–349, Feb. 2012.
- [216] B. F. Boyce and L. Xing, "Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 473, no. 2, pp. 139–146, 2008.
- [217] H. Takayanagi, S. Kim, T. Koga, H. Nishina, M. Isshiki, H. Yoshida, A. Saiura, M. Isobe, T. Yokochi, J. Inoue, E. F. Wagner, T. W. Mak, T. Kodama, and T. Taniguchi, "Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2)

integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts.,” *Dev. Cell*, vol. 3, no. 6, pp. 889–901, Dec. 2002.

[218] R. J. van’t Hof and S. H. Ralston, “Nitric oxide and bone.,” *Immunology*, vol. 103, no. 3, pp. 255–261, Jul. 2001.

[219] Y. Sha and H. E. Marshall, “S-nitrosylation in the regulation of gene transcription.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1820, no. 6, pp. 701–711, Jun. 2012.

[220] I. O. Shymanskyi, O. O. Lisakovska, A. O. Mazanova, D. O. Labudzynski, A. V. Khomenko, and M. M. Veliky, “Prednisolone and vitamin D(3) modulate oxidative metabolism and cell death pathways in blood and bone marrow mononuclear cells.,” *Ukr. Biochem. J.*, vol. 88, no. 5, pp. 38–47, 2016.

## 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 D<sub>3</sub> // 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 D<sub>3</sub> 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., Labudzynski D.O., Khomenko A.V., Veliky M.M. Prednisolone and vitamin D<sub>3</sub> 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 клітинами крові та кісткового мозку, ступеня апоптичної та некротичної загибелі клітин, проведення вестерн-блот аналізу 3-нітротирозину у кістковому мозку, статистична обробка результатів, 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 D<sub>3</sub> 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., Лісаковська О.О., Великий М.М. Молекулярно-клітинні механізми захисної дії вітаміну D<sub>3</sub> 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 D<sub>3</sub> 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-нітротирозину, PARP-1, каспази-3, мієло-пероксидази, 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 D<sub>3</sub> 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).*

### **Відомості про апробації матеріалів дисертації**

1. **Lisakovska O.**, Shymanskyu I. Vitamin D<sub>3</sub> 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 (Очна участь, усна доповідь, доповідач – Лісаковська О.О.).*
2. **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 D<sub>3</sub> treatment // *XI Український біохімічний конгрес, 6-10 жовтня 2014, Київ, Україна. Ukr. Biochem. J., 86 (5) (Suppl. 2), P. 97 (Очна участь, постер).*
3. **Lisakovska O.**, Shymanskyu I., Khomenko A., Veliky M. The protective effect of vitamin D<sub>3</sub> against prednisolone-induced liver injury in rats // *2<sup>nd</sup> 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 (Очна участь, усна доповідь та постер, доповідач – Шиманський І.О.).*
4. **Lisakovska O.**, Shymanskyu I. Prednisolone-induced impairments in the RANK- and GR-mediated signaling pathways depending on the state of vitamin D<sub>3</sub> 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 (Очна участь, усна доповідь, доповідач – Лісаковська О.О.).*
5. **Lisakovska O.**, Shymanskyu I. Protective effect of vitamin D<sub>3</sub> against prednisolone-induced neurotoxicity in rats // *16th International Conference of*



*Biochemistry and Molecular Biology, July 17-21, 2016, Vancouver, Canada. Abstract book, P. 54 (Очна участь, усна доповідь та постер, доповідач – Лісаковська О.О.).*

6. **Lisakovska O.**, Mazanova A., Shymanskyi I. Vitamin D<sub>3</sub> 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 (Заочна участь).*

7. **Lisakovska O.**, Labudzynski D., Mazanova A., Shymanskyi I. Receptor activator of NF-κB is involved in vitamin D<sub>3</sub> 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 (Очна участь, постер).*

8. **Lisakovska O.**, Labudzynski D., Mazanova A., Shymanskyi I. Vitamin D<sub>3</sub> modulates impaired crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) 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 (Очна участь, усна доповідь та постер, доповідач – Лісаковська О.О.).*

9. **Lisakovska O.**, Labudzynski D., Savosko S., Shymanskyi I., Veliky M. Vitamin D<sub>3</sub> 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 (Очна участь, постер).*

10. **Лісаковська О.О.** Роль вітаміну D<sub>3</sub> у регулюванні NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів за преднізолон-індукованого остеопорозу // Науковий семінар «Актуальні проблеми сучасної біохімії» Інституту біохімії ім. О.В.

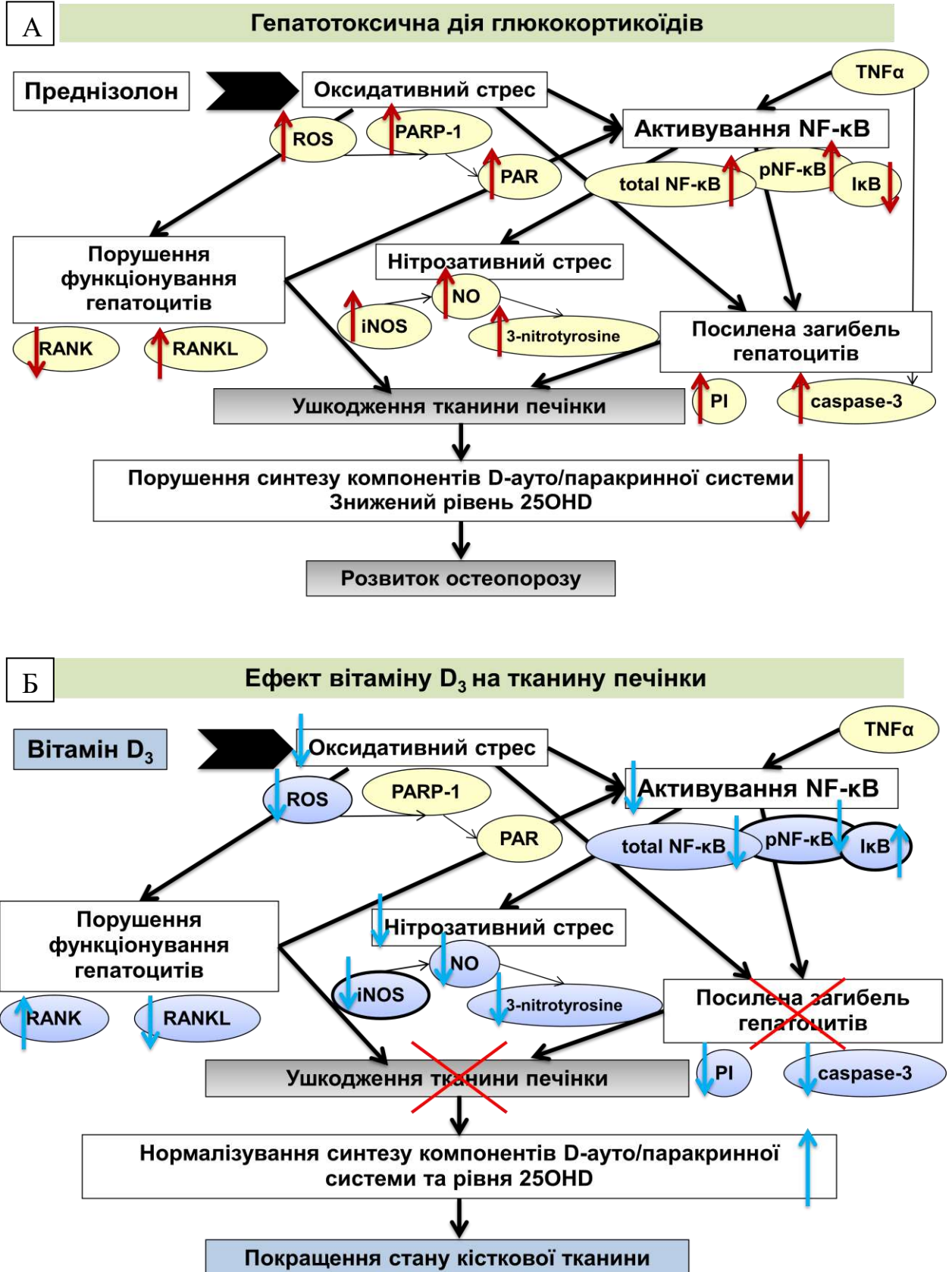
Палладіна НАН України, 26 червня 2018, Київ, Україна (*Усна доповідь, доповідач – Лісаковська О.О.*).

11. **Lisakovska O.**, Shymanskyi I., Labudzynski D., Vasylevska V., Veliky M. Vitamin D<sub>3</sub> modulates impaired upstream NF-κB-associated signalling pathways and NF-κB 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 (*Очна участь, усна доповідь та постер, доповідач – Лісаковська О.О.*).

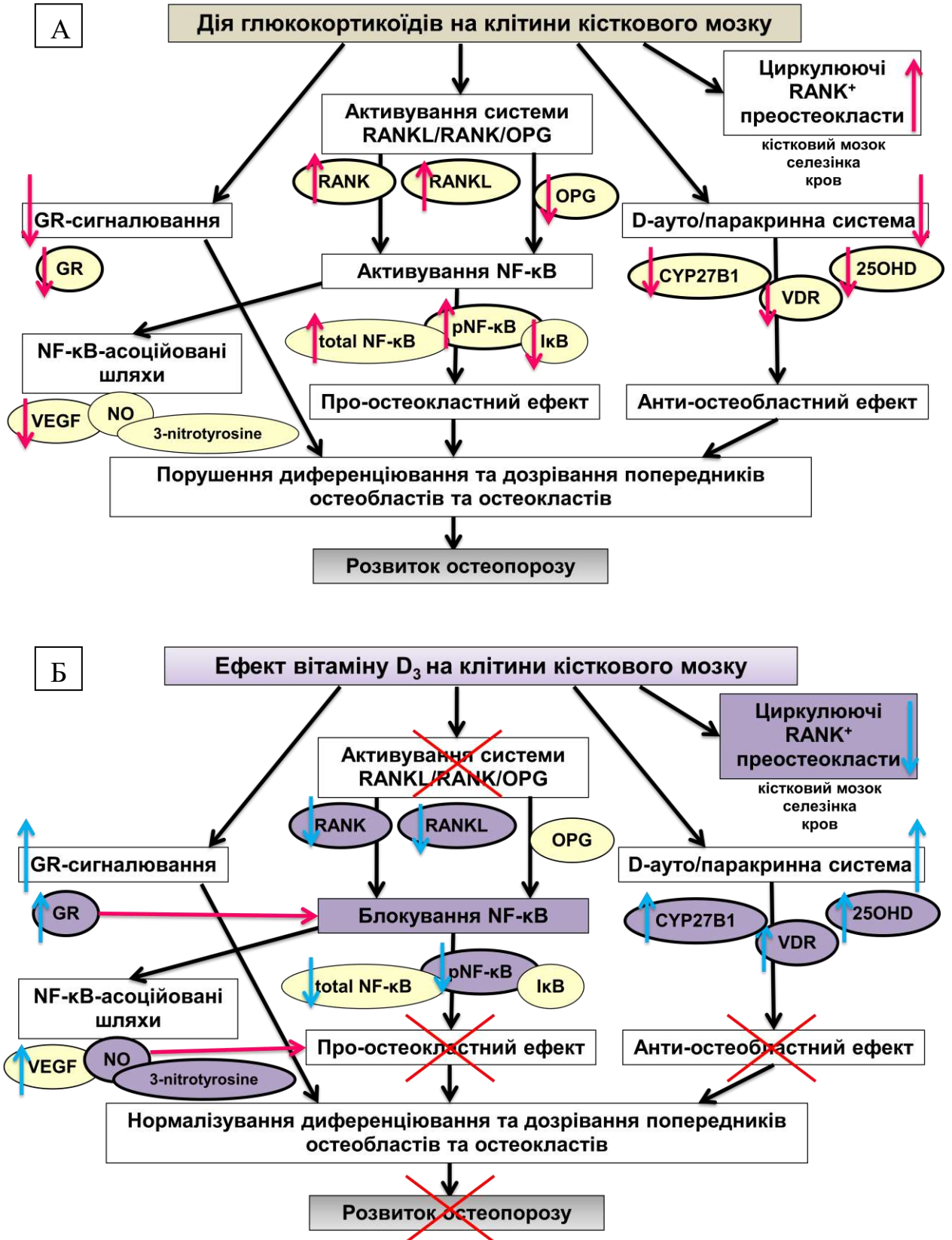
12. **Lisakovska O.**, Shymanskyi I., Labudzynski D., Veliky M. The role of vitamin D<sub>3</sub> in modulation of glucocorticoids-induced changes in angiogenesis/osteoblastogenesis/osteoclastogenesis coupling // *XI Parnas Conference – Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative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

Молекулярні механізми гепатотоксичної дії глюкокортикоїдів

та ефект вітаміну D<sub>3</sub>



Вплив глюкокортикоїдів на клітини кісткового мозку  
та ефект введення вітаміну D<sub>3</sub>



Молекулярні механізми дії глюкокортикоїдів на кісткову тканину та коригувальний ефект вітаміну D<sub>3</sub>

