

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

Мазанова Анна Олександрівна



УДК 577.161.2+571.27+616.379-008.64+616.71

**РОЗРОБКА ІМУНОЕНЗИМНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ
ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ 25ОНD ЯК МАРКЕРА
ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ ОРГАНІЗМУ ВІТАМІНОМ D
ЗА ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**

03.00.20 – біотехнологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

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

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

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Дзядевич Сергій Вікторович,
головний науковий співробітник
лабораторії біомолекулярної електроніки
Інституту молекулярної біології та генетики НАН України

доктор медичних наук, професор,
Заслужений діяч науки і техніки України
Омельченко Людмила Іванівна,
науковий керівник відділення хвороб сполучної
тканини у дітей з групою психосоматики
та психотерапії,
ДУ Інститут педіатрії, акушерства
і гінекології НАМН України

Захист відбудеться “29” жовтня 2018 року о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, Київ, вул. Леонтовича, 9.

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

Автореферат розісланий “___” вересня 2018 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



Н. П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Вітамін D включає групу біоорганічних сполук секостероїдної природи, в першу чергу холекальциферол (вітамін D₃) та ергокальциферол (вітамін D₂), що мають антирахітичну дію [Carter G.D., 2011]. Не залежно від способу надходження в організм (синтез у шкірі за дії ультрафіолету чи в складі харчових продуктів) вітамін D для перетворення на гормонально-активну форму та прояву біологічних ефектів зазнає двостадійного гідроксилювання [Bandeira F. et al., 2006]. Перший етап відбувається у печінці під дією вітамін D 25-гідроксилази, ензиму родини цитохрому P450, а саме ізоформ CYP27A1 та CYP2R1, з утворенням 25ОНD (основного маркера забезпеченості організму вітаміном D). Наступне гідроксилювання відбувається переважно у нирках під дією 25ОНD 1- α -гідроксилази (CYP27B1) з утворенням 1 α ,25-дигідрокси холекальциферолу (кальцитріолу, 1 α ,25(ОН)₂D), який зв'язується з рецептором вітаміну D (VDR) здатен регулювати експресію більш ніж 200 генів [Wacker M. et al., 2013].

На сьогоднішній день дефіцит вітаміну набуває статусу пандемії. Наслідками вітамін-D недостатності є порушення процесів ремоделювання кісткової тканини та підвищений ризик розвитку низки хронічних захворювань, зокрема остеопорозу, цукрового діабету 1 типу (ЦД 1), ревматоїдного артрити, розсіяного склерозу, серцево-судинних патологій, інфекційних та онкологічних хвороб. Широкий спектр патологій, що асоційовані з дефіцитом вітаміну D, обумовлюється тим, що крім добре вивченого впливу на гомеостаз кальцію і фосфатів, холекальциферол здатен на геномному рівні регулювати проліферування та диференціювання клітин, ангіогенез та апоптоз [Lin Z. et al., 2017]. За останніми даними ВООЗ та IOF (International Osteoporosis Foundation) люди, які не отримують достатню кількість сонячного опромінення або не споживають принаймні 1000 МО вітаміну D щоденно знаходяться у групі ризику розвитку дефіциту вітаміну D [Vieth R. et al., 2007; Maalouf J. et al., 2008; Gordon C.M. et al., 2008; Marwaha R.K. et al., 2005]. Саме тому потреба у характеристиці вітамін D-статусу організму зростає як у лабораторній так і у клінічній практиці.

Серед низки метаболітів вітаміну D, як маркер вітамін D-забезпеченості було обрано 25ОНD, кількісне визначення якого у сироватці є показником вітамін-D статусу з кількох причин: по-перше, період напіврозпаду 25ОНD становить 2-3 тижні, що значно перевищує час циркулювання в крові інших метаболітів вітаміну D; по-друге, гідроксилювання вітаміну D в печінці не є жорстко регульованим і залежить, в основному, лише від концентрації субстрату [Zervekh J.E., 2008]. Оптимальний вміст 25ОНD у сироватці становить 100-150 нмоль/л (40-60 нг/мл).

Методи, які дозволяють визначати 25ОНD у серологічних зразках, можна умовно поділити на дві групи: 1. Фізичні (високоєфективна рідинна хроматографія (HPLC), хроматографія у поєднанні з мас-спектрометрією (LC/MS)); 2. Імунологічні (імуноензимний аналіз (ELISA), (радіоімунний аналіз (RIA)), хемілюмінесцентний аналіз (CLIA)) [Lai J.K.C. et al., 2012]. Слід зазначити, що вимірювання рівня вітаміну D є складним завданням, оскільки він є ліпофільною сполукою, що

транспортується у зв'язаному стані з протеїнами та міститься у крові в наномолярній концентрації. Окрім того, більшість наявних на ринку варіантів тест-систем є достатньо дорогими, потребують складного обладнання або передбачають роботу зі шкідливими радіоактивними елементами.

Таким чином, тестування забезпеченості вітаміном D організму є важливою медико-біологічною задачею, оскільки дефіцит вітаміну D та пов'язане з ним порушення синтезу ключових елементів вітамін D-ендокринної системи обумовлює розвиток низки патологій (зокрема ЦД 1). Саме тому розробка імуноензимних тест-систем для визначення 25ОНD надасть можливість своєчасно виявляти прояви вітамін D-дефіциту з метою подальшого нормалізування його рівня. Відновлення оптимальної забезпеченості організму вітаміном D сприятиме корегуванню метаболічних порушень та VDR-опосередкованого клітинного сигналювання із залученням $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконувалась як розділ бюджетної теми № 4 відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України «Роль вітамінів А, Е, В₁, РР, D₃, убіхінону та їх коензимів у забезпеченні функціонування спеціалізованих клітин за норми та за умов ініціації їх загибелі» (№ д/р 0112U002625, 2012-2016 рр.). Роботу було підтримано Премією інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за кращу наукову роботу молодих учених у 2017 році.

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи була розробка та конструювання імуноензимного діагностикуму для тестування рівня 25ОНD у сироватці крові, зокрема за умов розвитку експериментального цукрового діабету 1 типу.

Для досягнення мети було поставлено низку завдань:

1. Здійснити синтез імуногенних кон'югатів похідних 25ОНD₃, що містять активну карбоксильну групу, з протеїнами-носіями – гемоціаніном молюска (KLH) та альбуміном курячого яйця (OVA), імунізація кролів та характеристика отриманих поліклональних антисироваток методом непрямого ELISA;
2. Провести конструювання імуноензимної тест-системи для визначення 25ОНD у серологічних зразках та подальшу розробку методу візуалізування сигналу з використанням біотин-стрептавідинової системи;
3. Відпрацювати схему постановки реакції та оптимізувати умови сорбції антитіл на поверхні полістиролових планшетів, дослідити різні режими проведення реакції конкурування та провести валідування створеної тест-системи за низкою стандартних характеристик;
4. З'ясувати роль вітаміну D₃ у регулюванні експресії 25ОНD 1- α -гідроксилази (CYP27B1) ензиму, за участю якого синтезується гормонально активна форма вітаміну D – $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, та рецепторів вітаміну D (VDR) за стрептозотоцин (STZ)-індукованого цукрового діабету 1 типу.

Об'єкти дослідження – імунні антисироватки як джерело поліклональних антитіл до 25ОНD для подальшого конструювання імунодіагностикуму, стан забезпеченості організму щурів вітаміном D та обмін вітаміну D у тканинах тварин.

Предмет дослідження – поліклональні кролячі антитіла до 25-гідроксिवітаміну D, рівень експресії мРНК та протеїнів CYP27B1 і VDR.

Методи дослідження. У роботі були використані біохімічні (спектрофотометрія, імуноензимний аналіз), хімічні (синтез імунокон'югатів), молекулярно-біологічні (Вестерн блот аналіз, полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі, конфокальна мікроскопія), статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. В роботі з використанням модифікованого карбодіімідного методу здійснено поетапний трьохстадійний синтез імуногенних кон'югатів 25-гідроксिवітаміну D₃ з гемоціаніном моллюска *Megathura crenulata* (KLH) та альбуміном курячого яйця (OVA). Проведено очищення створених кон'югатів методом гель-фільтрації та визначено співвідношення молекул гаптену до протеїну-носія за допомогою тонкошарової хроматографії. Внаслідок імунізування кролів кон'югатом 25ОНD₃-KLH отримано поліклональні антитіла до 25ОНD, які було очищено та охарактеризовано за допомогою непрямого імуноензимного аналізу. Встановлено, що титр специфічних антитіл становив 1:10000, антитіла не втрачали своєї активності та специфічності після процедур преципітації за допомогою сульфату амонію та очистки діалізом. Вперше сконструйовано імуноензимну тест-систему для визначення 25ОНD у сироватці крові з застосуванням біотин-стрептавідинового конкурентного способу візуалізування сигналу та проведено її валідування за низкою стандартних характеристик: побудовано стандартну калібрувальну криву, визначено ліміт детектування, кількісний ліміт та коефіцієнти варіативності (внутрішньосистемний - Inter CV і міжсистемний - Intra CV). Проведено тестування «матричного» ефекту гемоглобіну, білірубину і триацилгліцеролів та показано, що за умов використання негемолізованих зразків дані сполуки не вносять суттєвої похибки в результати аналізу. Було встановлено, що перехресна реактивність системи з іншими метаболітами вітаміну D лежить у межах 10%. Вперше було з'ясовано негативний вплив експериментального цукрового діабету 1 типу на синтез ключових елементів вітамін D-ендокринної системи – VDR та CYP27B1 – у печінці, нирках, кістковій тканині та кістковому мозку і встановлено доцільність використання вітаміну D₃, як засобу корегування діабет-індукованих змін у синтезі мРНК, протеїну рецепторів вітаміну D та 25ОНD 1- α -гідроксилази.

Практична значимість. Проведений синтез похідних вітаміну D₃ з активною карбоксильною групою та синтез імунокон'югату KLH-вітаміну D₃ з подальшим імунізуванням кролів дозволили отримати поліклональні антитіла, що стали основою створення імунодіагностикуму для визначення рівня 25ОНD у серологічних зразках. Створена тест-система може буде використана для визначення вмісту 25ОНD у сироватці крові людей, хворих на цукровий діабет 1 типу та за інших патологій, в розвитку яких важливу роль відіграють порушення обміну вітаміну D.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним науковим доробком здобувача, що виконана у відповідності до планів експериментальних та теоретичних досліджень, проведених та узагальнених протягом 2014 – 2017 рр. Дисертантом самостійно проведено пошук та аналіз даних наукової літератури за

тематикою роботи, відпрацьовано низку методик та проведено експериментальну роботу у запланованому обсязі. Планування роботи, аналіз та обговорення отриманих експериментальних результатів, формулювання основних положень і висновків дисертаційної роботи проводились спільно з науковим керівником д.б.н., проф. М.М. Великим та к.б.н., ст.н.сп. І.О. Шиманським. Консультування з приводу синтезу імунокон'югатів та проведення полімеразної ланцюгової реакції проводилось з д.б.н., проф. Л.Б. Дробот.

Апробація матеріалів дисертації: Результати дисертаційної роботи було апробовано на XI Українському біохімічному конгресі (2014 рік, Київ, Україна), Конференції-конкурсі «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (2014 рік (II призове місце) та 2015 рік (III призове місце), Київ, Україна), Конференції молодих учених «Conference for Young Scientists» (2015 рік, Київ, Україна), міжнародній конференції «Advances in cell biology and biotechnology» (2015 рік, Львів, Україна), 2^й міжнародній конференції «Vitamin D – minimum, maximum, optimum» – під патронажем European Vitamin D Association (EVIDAS) (2015 рік, Варшава, Польща), X Парнасівській конференції для молодих учених «Molecules in living cells and innovative medicine» (2016 рік, Вроцлав, Польща), 52^й щорічній конференції EASDE (2016 рік, Мюнхен, Німеччина), 3^й міжнародній конференції «Vitamin D – minimum, maximum, optimum» – під патронажем European Vitamin D Association (EVIDAS) (2017 рік, Варшава, Польща).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 14 наукових робіт, з них 7 статей у провідних фахових журналах (4 – у закордонних виданнях) та 7 тез доповідей у збірниках матеріалів вітчизняних і міжнародних наукових конференцій та з'їздів.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається з анотації, переліку умовних скорочень, вступу, опису матеріалів та методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення, висновків та списку використаних джерел (254 найменування). Дисертацію викладено на 165 сторінках друкованого тексту, проілюстровано 32 рисунками та 9 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури

У розділі представлено сучасні підходи щодо принципів створення та функціонування тест-систем для визначення 25ОНD у серологічних зразках, проаналізовано їх переваги та недоліки та обґрунтовано доцільність конструювання імуноензимної тест-системи конкурентного типу для тестування вітамін D-статусу організму, в основу якої покладено поліклональні кролячі антитіла до 25-гідроксिवітаміну D. Проаналізовано можливі методи синтезу та характеристики імуногенних кон'югатів типу гаптен-протеїновий носій, схеми імунізування лабораторних тварин для генерування поліклональних антитіл, методи очистки та концентрування імуноглобулінів з сироватки крові тварин після ін'єкцій антигену. Наведено основні параметри валідування, які тестують під час створення нових імуноензимних тест-наборів. Висвітлено питання про порушення обміну та

сигналювання вітаміну D за експериментального цукрового діабету 1 типу, одним з основних ускладнень якого є розвиток вторинного остеопорозу.

Матеріали та методи досліджень

Синтез кон'югатів 25ОНD₃ з гемоціаніном молюска *Megathura cranulata* (KLH; Sigma, США) та альбуміном курячого яйця (OVA; Sigma, США) проводили з використанням модифікованого карбодіімідного методу з 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіімідом (EDC; Sigma, США). у три стадії, на першій з яких було синтезовано 25-гідроксिवітамін-D₃-3-гемісукцинат, а на наступній - 25-гідроксивітамін-D₃-3-гемісукцинат-N-гідрокси-сукцинімідний ефір, який в подальшому використовували для пришивки до KLH або OVA [Huber E. et al., 2009].

Очищення та концентрування синтезованих кон'югатів проводили за допомогою гель-фільтрації на колонках Econo-Pac 10DG (Bio Rad, США) об'ємом 0,01 л, врівноважених 0,1 М К-фосфатним буферним розчином (рН 7,0). Кількість молекул гаптену (25ОНD₃), яка увійшла в склад кон'югату, визначали методом тонкошарової хроматографії продуктів його омилення та ідентифікували в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм з наступним фарбуванням плям сумішшю FeCl₃ у 50% H₂SO₄. Кількість 25ОНD₃ визначали за стандартом, вираховуючи площу піків [Бауман В.К., 1989]

Для імунізування використовували сірих кролів-самиць масою 3,5-4 кг. Антиген розчиняли у фосфатному буфері (PBS, рН 7,4) до концентрації 100 мкг/мл та додавали рівний об'єм повного ад'юванту Фрейндта (CFA; Sigma, США). Отриману суспензію вводили підшкірно вздовж хребта кроля, обираючи по п'ять точок з кожного боку хребта на відстані 1 см одна від одної. Другу імунізацію (бустерну) проводили через 8 тижнів, а третю - через 1 міс після другої. Далі відбирали кров із вушної вени кроля й отримували сироватку для подальшого визначення титру імуноглобулінів за допомогою імуноензимного аналізу.

Висолювання фракції імуноглобулінів з сироватки крові імунізованих тварин проводили з використанням 50% розчину сульфату амонію ((NH₄)₂SO₄; Sigma, США). Після висолювання з метою очистки суспензії антитіл від домішок сульфату амонію та їх концентрування проводили діаліз проти фосфатного буферного розчину у режимі заміни буфера на свіжий 3 години - ніч - 3 години, надалі PBS змінювали на 50% розчин гліцерину та діалізували у режимі ніч-3 години-ніч. У отриманій суспензії антитіл вимірювали концентрацію протеїну та зберігали при -20⁰С.

Модель цукрового діабету 1 типу (ЦД 1) у експериментальних тварин (білі щури, самці, масою 140±7 г) викликали одноразовим введенням стрептозотоцину (STZ; Sigma, США) у дозі 55 мг/кг маси тіла внутрішньочеревно у цитратному буферному розчині (рН 5,0). Після двотижневого періоду розвитку діабету у щурів проводили контроль рівня глюкози біосенсорним методом (прилад One Touch Select, США) та відповідно до цього показника ділили на групи: 1. контрольна група; 2. діабетична група; 3. діабетична група, щури якої отримували 600 МО вітаміну D₃ (Sigma, США) на 1 кг маси тіла перорально протягом 30 діб після розвитку ЦД 1.

Усі маніпуляції з лабораторними тваринами проводили без порушень загальноприйнятих біоетичних норм гуманного поводження з лабораторними тваринами згідно до відповідних національних та міжнародних положень стосовно проведення експериментальних робіт (Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986); Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV, 2006).

Визначення концентрації 25-гідроксильованої форми вітаміну D у сироватці крові піддослідних тварин проводили за допомогою розробленої імуноензимної тест-системи [Мазанова А.О., та ін., 2016].

Визначення вмісту протеїнів CYP27B1 та VDR проводили методом Вестерн блот аналізу з використанням поліклональних анти-CYP27B1 і моноклональних анти-VDR (Santa Cruz, США) та анти- β -актин первинних антитіл (Sigma, США). Вміст загального протеїну у лізатах тканин визначали методом Лоурі [Lowry O.H. et al., 1951]. Електрофоретичне розділення проводили у буферній системі Лемлі [Laemmli U.K., 1970] з використанням 10% розділяючого та 4,5 % концентруючого поліакриламідного гелю. Для ампліфікації специфічного сигналу використовували люмінол та п-кумарову кислоту (Sigma, США).

Визначення вмісту мРНК CYP27B1 та VDR проводили методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (RT-qPCR), попередньо виділяючи тотальну РНК зі зразків тканин колонковим методом (QIAGEN, США). Специфічні послідовності праймерів генерували за допомогою *on-line* програмного забезпечення Primer BLAST на платформі NCBI. У якості референсного гена використовували GAPDH (гліцеральдегідтрифосфат дегідрогеназу). Обрахунок результатів проводили за допомогою $\Delta\Delta C_t$ методу.

Для імуофлуоресцентного мічення CYP27B1 та VDR у клітинах кісткового мозку використовували первинні антитіла до 25OHD 1- α -гідроксилази та рецептора вітаміну D і вторинні антитіла з флуоресцентними мітками DyLight 488 та Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher, США). Ядра клітин фарбували за допомогою барвника Hoechst. Зразки аналізували на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі LSM 510 META з використанням 100-кратного збільшення об'єктива та імерсійної рідини.

Обробку даних проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики з вираховуванням середнього значення (M) й стандартної похибки середнього ($\pm m$). Для визначення достовірності відмінностей між одержаними величинами двох вибірок використовували t-критерій Ст'юдента. Вірогідними вважали відмінності при $p \leq 0,05$. Опрацювання і статистичну обробку результатів проводили з використанням програми Microsoft Excel.

Результати досліджень та їх обговорення

Експериментальна робота була спрямована на створення імунодіагностикуму для визначення вмісту 25-гідроксильованої форми вітаміну D (25OHD) у зразках сироватки крові з метою характеристики вітамін D-статусу організму за низки патологічних станів, зокрема цукрового діабету 1 типу.

Основним складником ELISA-системи є антитіла проти цільового антигену. Генерування антитіл до вітаміну D є складним завданням, оскільки його молекула має малу молекулярну масу і без попереднього кон'югування з протеїном-носієм не здатна індукувати імунну відповідь в організмі тварини-реципієнта ін'єкції. Саме тому, для успішного генерування імунної відповіді до 25ОНD в організмі тварин потрібно створювати кон'югати типу гаптен-протеїновий носій.

У даній роботі як протеїн-носій було обрано гемоціанін молюска (KLH). Хімічне приєднання молекули 25ОНD₃ до KLH було здійснено за допомогою модифікованого карбодимідного методу з використанням EDC, перевага якого є в тому, що карбодимід не стає частиною кон'югату та не створює додаткового епітопу.

На рис. 1 наведено проміжні стадії введення у склад молекули 25ОНD₃ активної карбоксильної групи та активування її за допомогою EDC. Рис. 2 демонструє синтез імуногенного кон'югату 25-гідроксильованої форми вітаміну D₃ з гемоціаніном молюска. Для подальшого проведення непрямого імуноензимного аналізу сироваток імунізованих тварин було створено кон'югат 25ОНD₃ з альбуміном курячого яйця (25ОНD₃-OVA) за наведеною вище схемою.

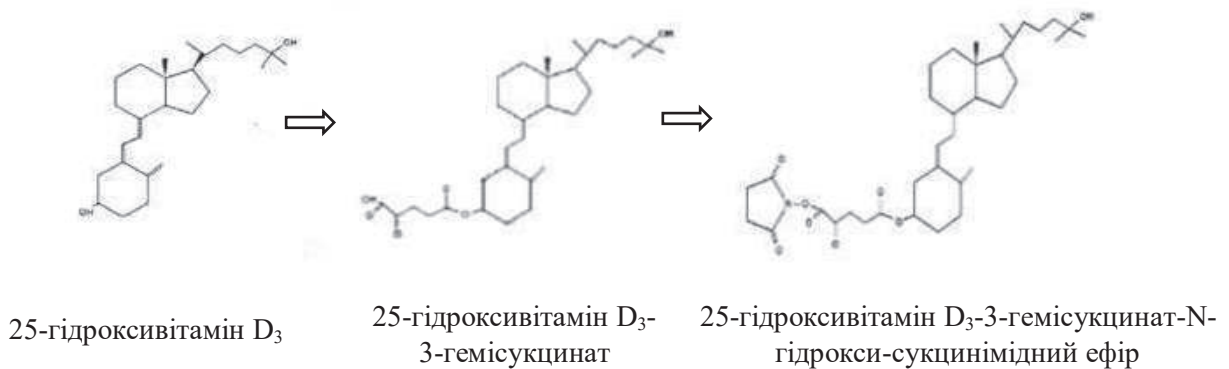


Рис. 1 Стадії синтезу 25-гідроксивітаміну D₃-3-гемісукцинат-N-гідрокси-сукцинімідного ефіру

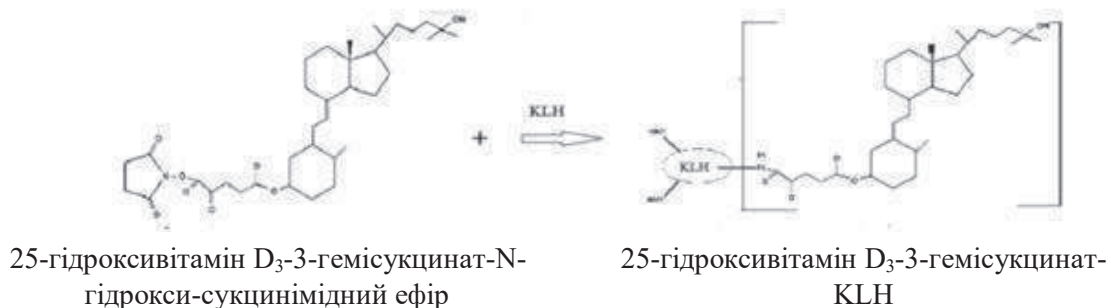


Рис. 2 Синтез 25-гідроксивітаміну-D₃-3-гемісукцинат-KLH

З метою очищення та концентрування синтезованих кон'югатів було проведено гель-фільтрацію. На рис. 3 (А) продемонстровано криву елюювання продуктів кон'югування 25-гідроксивітаміну D₃ з гемоціаніном молюска, що містить

два піки: перший відповідає синтезованому кон'югату, а другий характеризує вихід з колонки 25-гідроксвітамін D₃-гемісукцинат-N-гідрокси-сукцинімідного ефіру, який не прореагував з протеїном-носієм.

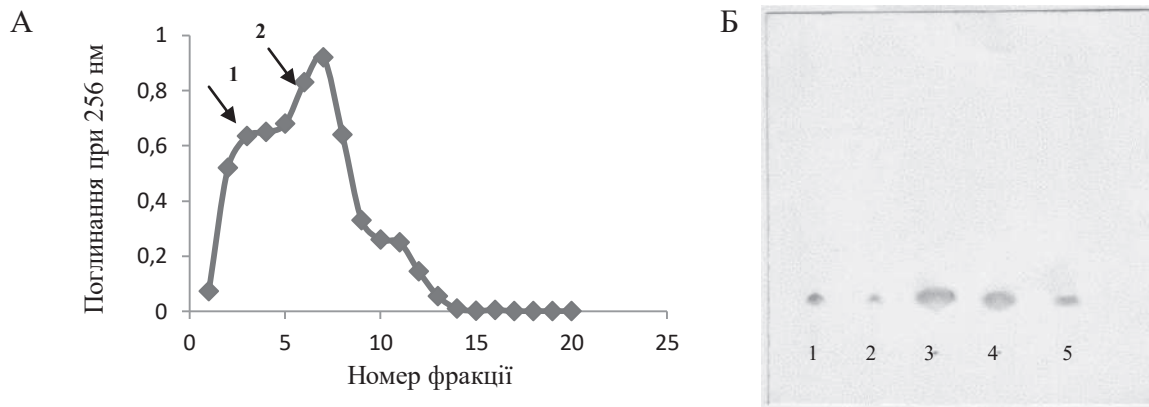


Рис. 3 Крива елюювання кон'югата 25OHD₃-KLH (А) та результати тонкошарової хроматографії продуктів омилення кон'югата (Б) 1. 238 мкг кон'югата, 2. 119 мкг кон'югат, 3. 30 мкг 25OHD₃, 4. 20 мкг 25OHD₃, 5. 10 мкг 25OHD₃

Для оцінки кількості 25OHD₃, яка увійшла у склад обох кон'югатів, використовували омилення сумішшю КОН у метиловому спирті та екстрагування гексаном з подальшим розділенням тонкошаровою хроматографією. Детектування плям проводили за довжини УФ-променів 254 нм. Розрахунок кількості 25-гідроксвітаміну D₃ за площею плям аналізованих розчинів по відношенню до площі плям стандартів на хроматографії показав, що у складі 238 мкг кон'югата з гемоціаніном міститься 3 мкг 25-гідроксвітаміну D₃ (рис. 3 (Б)). Молярне співвідношення стероїду до гемоціаніну становить 10/1.

Кон'югат 25OHD₃-KLH розчиняли у фосфатному буферному розчині з додаванням рівного об'єму повного ад'юванту Фрейндта та використовували для підшкірного мультиточкового імунізування сірих кролів-самиць. На сьомий день після останнього імунізування у кролів відбирали кров з вушної вени та визначали титр специфічних антитіл до 25OHD методом непрямого імуноензимного аналізу.

Було продемонстровано, що у тварин наявна реакція імунної системи на пару гаптен-носій. Для молекули-носія сигнал був вищий, ніж для молекули-гаптenu, що пояснюється генетичною віддаленістю молекули KLH від протеїнів організму кроля. Окрім того, можна стверджувати, що у крові піддослідних тварин були наявні антитіла до 25OHD, в той час як перехресна реактивність сироватки з молекулою овальбуміну майже відсутня. На основі титрувальних кривих достовірно визначено титр імуноглобулінів сироватки крові кролів до 25OHD, який становить 1:10000.

З метою виділення глобулінової фракції з сироватки крові імунізованих кролів, використовували метод преципітації з 50% розчином сульфату амонію ((NH₄)₂SO₄) та подальшим очищенням преципітату від домішок методом діалізу проти фосфатного буферного розчину (PBS, pH 7,4). Отримані імуноглобуліни зберігали у 50% розчині гліцерину при -20 °C.

Після висолювання та очищення концентрація протеїну в отриманій суспензії становила 24 мг/мл. Непрямий імуноензимний аналіз для визначення титру специфічних антитіл до 25ОНД демонструє (рис. 4), що після процедур висолювання та діалізу антитіла здатні достовірно розпізнавати 25ОНД. Показано, що отримані антитіла перехресно не реагують з протеїном-носієм кон'югата порівняння – овальбуміном. Отже, отримані поліклональні антитіла можуть бути успішно використані у конструюванні імуноензимної тест-системи для визначення 25ОНД.

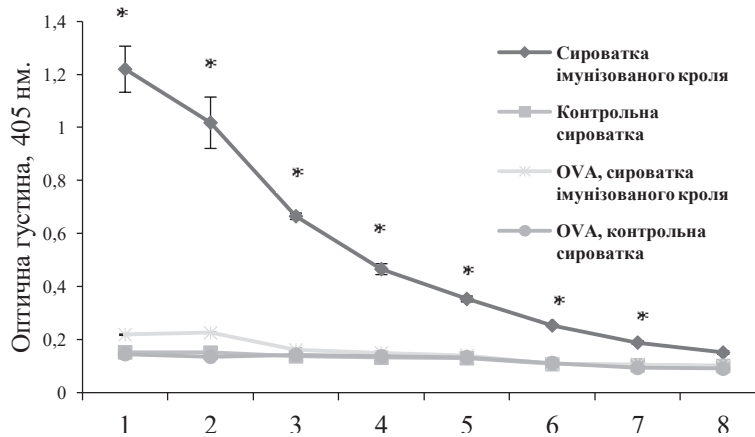


Рис. 4 Титр антитіл до 25ОНД сироватки крові кролів, імунізованих 25ОНД₃-KLH, після висолювання та очищення методом діалізу в серії розведень: 1– 1:500; 2– 1:1000; 3– 1:2000; 4– 1:4000; 5–1:8000; 6-1:16000; 7-1:32000; 8-1:64000. * $p \leq 0,05$, зміни вірогідні у порівнянні з контролем

Спираючись на дані проаналізованої літератури для створення тест-системи було обрано конкурентний варіант ELISA в основі якого лежить конкурування 25ОНД серологічного зразка з 25ОНД₃-LC-біотином за місця зв'язування зі специфічними поліклональними антитілами до 25ОНД. Під час конструювання лабораторного зразка тест-системи було підібрано оптимальну концентрацію поліклональних антитіл для сорбування на дно лунок полістеролових планшетів, яка становила 10 мкг/мл; для блокування вільних місць зв'язування та промивання лунок після кожного раунду інкубування використовували розчин PBS з додаванням 0,05% Tween 20. Як конкуруючий агент було обрано 25ОНД₃-LC-біотин, який тестували у діапазоні концентрацій 200, 400, 600, 800, 1000, 1500 пг на 200 мкл інкубаційного середовища.

Рис. 5 демонструє наявність лінійної ділянки кривої при зв'язуванні сорбованих антитіл з 25ОНД₃-LC-біотином, що вказує на пропорційну залежність сигналу імуноспецифічної взаємодії від наявності вільних центрів зв'язування антитіл, які заповнюються при концентраціях біотинильованого 25ОНД₃ вищих за 1000 пг/200 мкл. Тому у подальшому 25ОНД₃-LC-біотин використовували у концентрації 1000 пг/200 мкл (5 нг/мл).

Для виявлення специфічного сигналу було використано кон'югат стрептавідину з пероксидазою хрому (HRP), а як субстрат – 3,3',5,5'-

тетраметилбензидин, який має найбільшу чутливість серед наявних на ринку субстратів для HRP та може детектуватися при різних довжинах хвилі – 630 (без додавання H_2SO_4) та 450 (з додаванням H_2SO_4).

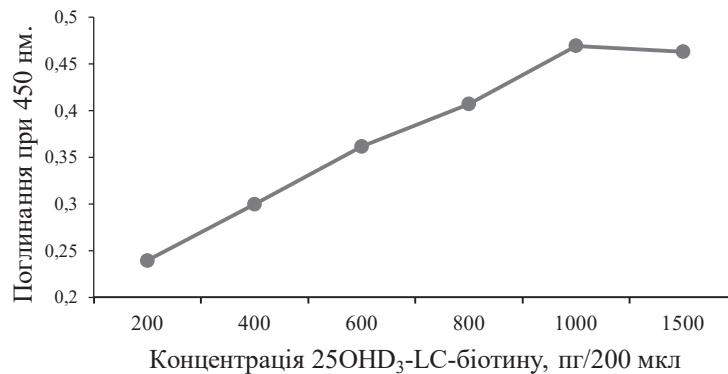


Рис. 5 Підбір оптимальної концентрації конкуруючого агента 25ОНD₃-LC-біотину

Для характеристики новостворених тест-систем проводять тестування за низкою параметрів валідування. Для систем типу ELISA такими характеристиками є: селективність, точність, відтворюваність, стандартна калібрувальна крива, чутливість, наявність «матричного» ефекту складових серологічного зразка, перехресна реактивність.

Стандартну калібрувальну криву було побудовано з використанням набору з семи калібраторів, які містили 0; 1,25; 2,5; 10; 35; 70 та 150 нг/мл 25ОНD₃, розчиненого у фосфатному буфері (рН 7,4). Криву будували у координатах V/V_0 (вісь X) від концентрації калібратора в нг/мл (вісь Y). (рис. 6).

Концентрація 25ОНD ₃ калібратора, нг/мл	Значення екстинції
0	1,790
1,25	1,450
2,5	1,089
10	0,920
35	0,752
70	0,567
150	0,340

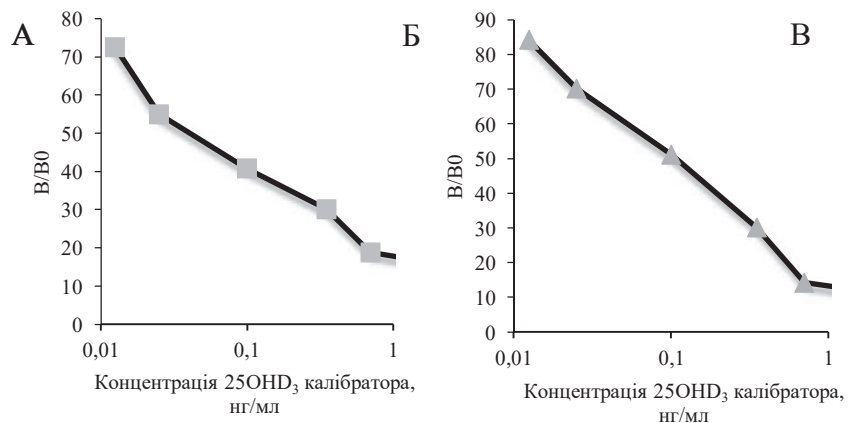


Рис. 6 Залежність оптичної густини від концентрації калібратора (А), стандартна калібрувальна крива створеної тест-системи (Б) та комерційного набору для визначення 25ОНD (IDS 25-Hydroxv vitamin D^s EIA) (В)

При порівнянні стандартної кривої створеного імуноензимного набору зі стандартною кривою комерційно-доступного діагностикому для визначення 25ОНD виробництва німецької компанії 25-Hydroxv vitamin D^s EIA було показано, що обидві криві перекривають діапазон концентрацій від 1,25 нг/мл до 150 нг/мл

25ОНД у зразку. Значення екстинції калібраторів комерційного набору майже не відрізняються від аналогічних для калібраторів розробленої системи (рис. 6).

Використовуючи стандартну калібрувальну криву для кожної тест-системи можна визначити такі важливі параметри як аналітичну або функціональну чутливість, а також нижню межу виявлення, які математично описуються як ліміт детектування (DL) та кількісний ліміт (QL). Ліміт детектування визначали за формулою – $DL=3.3s/a$, де s – стандартне квадратичне відхилення (SD) значень нульового калібатора; a – нахил стандартної кривої до осі X.

$SD= 0,170465$; $a= 0,2456$; **DL=2,3 нг/мл**

Кількісний ліміт визначали за формулою $QL=10s/a$, де s – стандартне квадратичне відхилення (SD) значень нульового калібатора; a – нахил кривої до осі X.

$SD= 0,170465$; $a= 0,2456$; **QL=6,9 нг/мл**

Одним з важливих показників для валідування будь-якої тест-системи є відсутність так званого «матричного» ефекту», який характеризує вплив компонентів зразка (сироватки або плазми) на результати вимірювання. Даний параметр визначається як різниця між показниками екстинції зразка, розведеного на стандартному буферному розчині (калібратора), та зразка сироватки або плазми крові. Основними компонентами сироватки, які можуть чинити інгібувальний вплив на проведення процедури аналізу є гемоглобін, білірубін та триацилгліцероли.

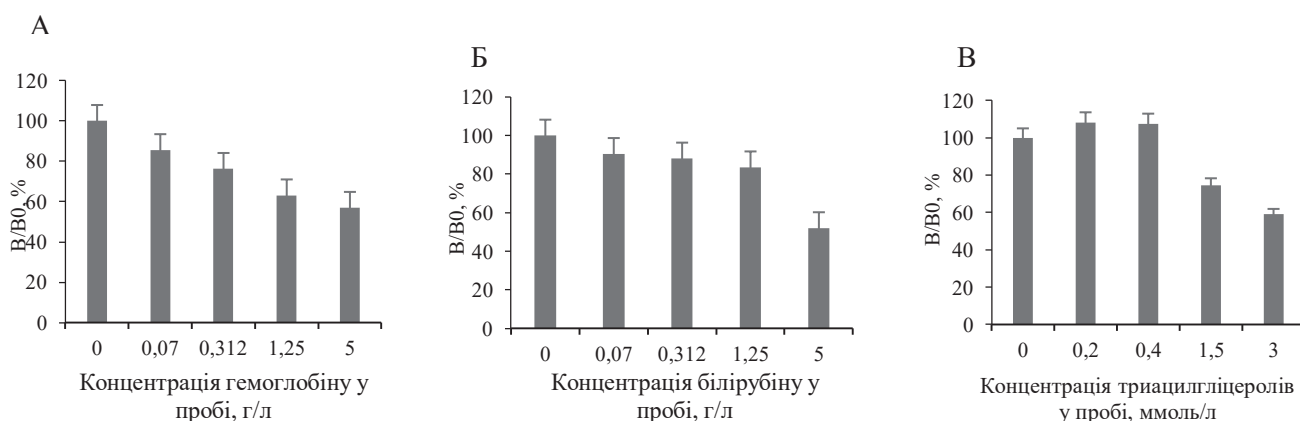


Рис. 7 Визначення «матричного» ефекту гемоглобіну (А), білірубину (Б) та триацилгліцеролів (В) на створену тест-систему

Хоча концентрація гемоглобіну у крові становить 95-180 г/л, для негемолізованих зразків вона не має перевищувати 0,5 г/л. Нами було обрано діапазон концентрацій гемоглобіну 0,07-5 г/л. На рис. 7 (А) показано, що концентрація гемоглобіну 0,07 г/л не викликає інгібування сигналу, а концентрація 5 г/л призводить до зниження значення екстинції на 30%.

Для білірубину нормальна концентрація у крові не перевищує 0,01 г/л (для тотальної фракції). Для тестування нами було обрано діапазон концентрацій 0,07-5 г/л. Рис. 7 (Б) демонструє, що наявність 0,07 г/л білірубину у інкубаційному середовищі не впливає на інтенсивність сигналу, і лише значне підвищення концентрації білірубину, що перевищує нормальний вміст в 500 разів (5 г/л)

викликає зниження екстинції на 50%. Концентрація триацилгліцеролів у зразках не має перевищувати 0,9 ммоль (77.9 мг/дл). За умов підвищення цього показника зразок вважають забрудненим ліпідами та не допускають до аналізу. Для проведення тестування ефекту триацилгліцеролів на ефективність проведення аналізу було обрано діапазон концентрацій 0,2-3 ммоль/л. Показано (рис. 7 (В)), що інгібування специфічного сигналу відбувається за концентрації триацилгліцеролів у зразку що дорівнює 3 ммоль та вище.

Важливими параметрами діагностичних систем є відтворюваність (Inter CV) та повторюваність (Intra CV). Ці показники надають інформацію про ймовірність виникнення помилок під час вимірювання одного зразка у декількох паралелях на одному та на різних планшетах. Результати ELISA прийнято вважати достовірними у випадку, коли Intra CV не перевищує 10%, а Inter CV – 15%. Враховуючи, що 25ОНD міститься у сироватці крові в наномолярних концентраціях, результати сконструйованого тест-набору для визначення вітаміну D вважали достовірними за умов, коли внутрішньосистемний та міжсистемний коефіцієнти варіативності не перевищували 10% (табл. 1).

Таблиця 1

Значення внутрішньосистемного (Intra CV) та міжсистемного (Inter CV) коефіцієнтів варіативності для зразків сироватки крові контрольних щурів

Внутрішньосистемний коефіцієнт варіативності (Intra CV)				Міжсистемний коефіцієнт варіативності (Inter CV)			
Зразок	Кількість повторень	Середнє значення екстинції±SD	CV, %	Зразок	Кількість повторень	Середнє значення екстинції±SD	CV, %
А	3	0,554±0,03	5	А	3	0,449±0,09	9
Б	3	0,549±0,04	7	Б	3	0,657±0,03	5
В	3	0,732±0,05	7	В	3	0,724±0,02	3
Г	3	0,648±0,007	1	Г	3	0,780±0,04	5
Д	3	0,682±0,018	2	Д	3	0,763±0,03	4

Окрім аналіта у зразку можуть перебувати інші схожі за формою на нього молекули. Саме тому важливо визначати перехресну реактивність цих речовин з сорбованими на дно лунок антитілами проти цільового антигена. Для цього, як правило, використовують концентрації потенційних перехресно реагуючих молекул, що у 10 разів перевищують концентрацію першого калібатора. Окрім 25-гідроксिवітаміну D₃ у серологічному зразку можуть перебувати і інші метаболіти вітаміну D, такі як 1α,25(ОН)₂D₃, 25ОНD₂, негідроксильований вітамін D₃ та інші метаболіти вітаміну D, причому як ерго,- так і холекальциферолу, яких наразі у літературі налічується понад 40. Для аналізу було обрано наступні концентрації потенційних перехресно реагуючих молекул: холекальциферол (D₃) – 5-800 нг/мл; ергокальциферол (D₂) - 5-800 нг/мл; 25-гідроксивітамін D₃ – 0-150 нг/мл; 1α,25-дигідроксивітамін D₃ – 0,0025-2 нг/мл, оскільки в нормі концентрація кальцитріолу у серологічних зразках знаходиться у пікомольному діапазоні 15-75 пг/мл.

Провівши порівняльний аналіз створеної тест-системи для конкурентного визначення 25ОНD з комерційними наборами, що використовують аналогічний протокол, було відмічено, що відсоток перехресної реактивності новоствореного

тест-набору з основними метаболітами вітаміну D в більшості випадків не перевищує значення, наведені у супровідних документах до комерційних аналогів. Важливим є факт, що створена тест-система має найменший відсоток перехресної реактивності з кальцитріолом (1 α ,25-дигідроксивітаміном D₃) серед усіх порівняних зразків (табл. 2).

Таблиця 2

Порівняння відсотків перехресної реактивності створеної тест-системи для визначення 25ОНD з комерційно-доступними аналогами

Аналіт	Відсоток перехресної реактивності				
	Розроблена в роботі система	25(OH)-Vitamin D direct ELISA Kit, Австрія	25OH vitamin D total ELISA assay, Бельгія	25-Hydroxu vitamin D ^s EIA, Німеччина	25OH Vitamin D Total ELISA, США
Холекальциферол (D ₃)	2,5%	-	2,9%	<0,01%	2,9%
Ергокальциферол (D ₂)	4,5%	0,3%	1,3%	<0,3%	1,3%
25-гідроксивітамін D ₃	100%	100%	100%	100%	100%
1 α ,25-дигідроксивітамін D ₃	10%	-	20%	-	20%

В останні роки вітамін D розглядають не лише як регулятор гомеостазу кальцію і фосфатів в організмі, а і як потужний модулятор проліферування та диференціювання клітин, проапоптичний та антиангіогенний агент. Вітамін D-дефіцитний стан організму асоціюють з розвитком низки патологій, серед яких одне з перших місць посідає цукровий діабет 1 типу. З метою встановлення порушень у системі гідроксилування та сигналювання холекальциферолу на тлі розвитку цукрового діабету було проведено моделювання ЦД 1 одноразовою ін'єкцією STZ (55 мг/кг, і.п.). Діабетичних тварин біло поділено на дві групи: 1. діабет; 2. діабет+600 МО/кг вітаміну D₃ перорально (30 діб).

У піддослідних тварин проводили вимірювання рівня глюкози а також 25ОНD у сироватці крові за допомогою створеної тест-системи. Згідно отриманих даних (табл. 3) рівень 25ОНD у діабетичних тварин суттєво знижувався (52 \pm 3 нмоль/л) у порівнянні з контрольною групою (97 \pm 0,5 нмоль/л).

Таблиця 3

Рівень глюкози і 25ОНD у щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом та після введення вітаміну D₃ в дозі 600 МО/кг, 30 діб. M \pm m, n = 5

	Рівень глюкози, ммоль/л	Рівень 25ОНD, нмоль/л	Рівень 25ОНD, нг/мл
Контроль	4,9 \pm 0,1	97 \pm 0,5	39 \pm 2,4
Контроль+вітамін D ₃	4,1 \pm 1,3	105 \pm 0,2	42 \pm 1,8*
Діабет	26,8 \pm 1,9*	52 \pm 3*	20,1 \pm 4*
Діабет+вітамін D ₃	15,9 \pm 2,3 [#]	71,3 \pm 3,1 [#]	28 \pm 5 [#]

* p \leq 0,05 зміни вірогідні у порівнянні з контролем; # p \leq 0,05 зміни вірогідні у порівнянні з діабетом.

Введення холекальциферолу діабетичним тваринам протягом місяця у дозі 600 МО/кг призводило до часткового корегування цього показника - 71,3 \pm 3,1 нмоль/л (p \leq 0,05). У щурів, яким вводили STZ, спостерігалось різке підвищення рівня

глюкози у крові з $4,9 \pm 0,1$ ммоль/л до $26,8 \pm 1,9$ ммоль/л, що свідчить про розвиток цукрового діабету 1 типу.

В свою чергу, зниження забезпеченості організму піддослідних тварин вітаміном D призводило до порушень функціонування елементів вітамін D-ендокринної системи у печінці, нирках, кістковій тканині та кістковому мозку.

Показано достовірне зниження рівнів мРНК та протеїну VDR і CYP27B1 у печінці (рис. 8) та кістковому мозку (дані не наведено). Рівень мРНК 25ОНD 1- α -гідроксилази у кістковій тканині значно підвищувався (13,0 разів, $p \leq 0,05$) у тварин з ЦД 1, хоча ці зміни не супроводжувалися ростом вмісту протеїна (рис. 9). Натомість у кістках діабетичних тварин рівні як мРНК (у 3,3 рази, $p \leq 0,05$) та протеїну (в 1,8 разів, $p \leq 0,05$) VDR були зниженими порівняно з контролем.

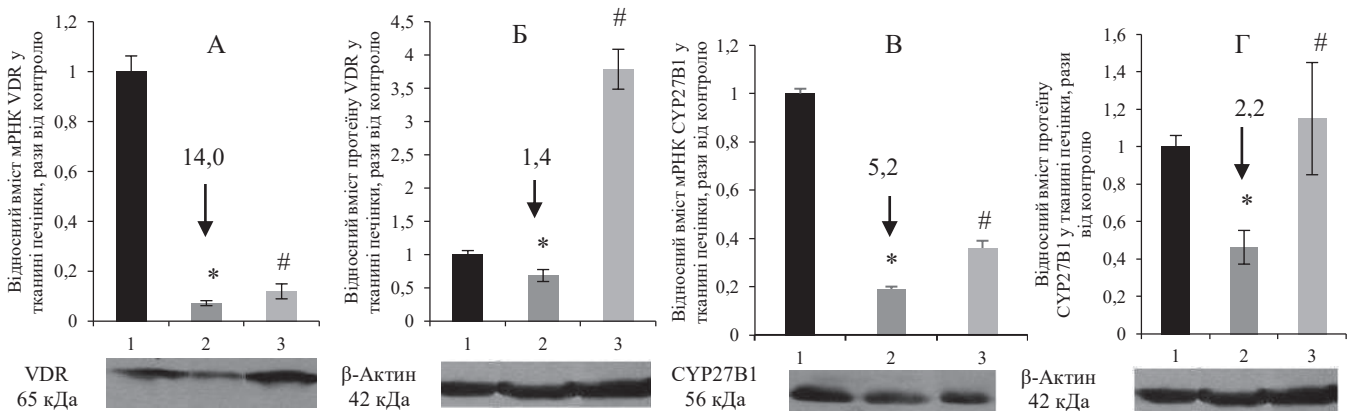


Рис. 8 Відносний вміст мРНК (А) і протеїну (Б) VDR а також мРНК (В) і протеїну (Г) CYP27B1 у тканині печінки діабетичних тварин та після корегування вітаміном D₃. 1-контроль; 2-діабет; 3-діабет+вітамін D₃ протягом 30 діб. Дані представлені у вигляді $M \pm m$, $n=5$. * $p \leq 0,05$ зміни вірогідні порівняно з контролем; # $p \leq 0,05$ зміни вірогідні порівняно з групою діабету.

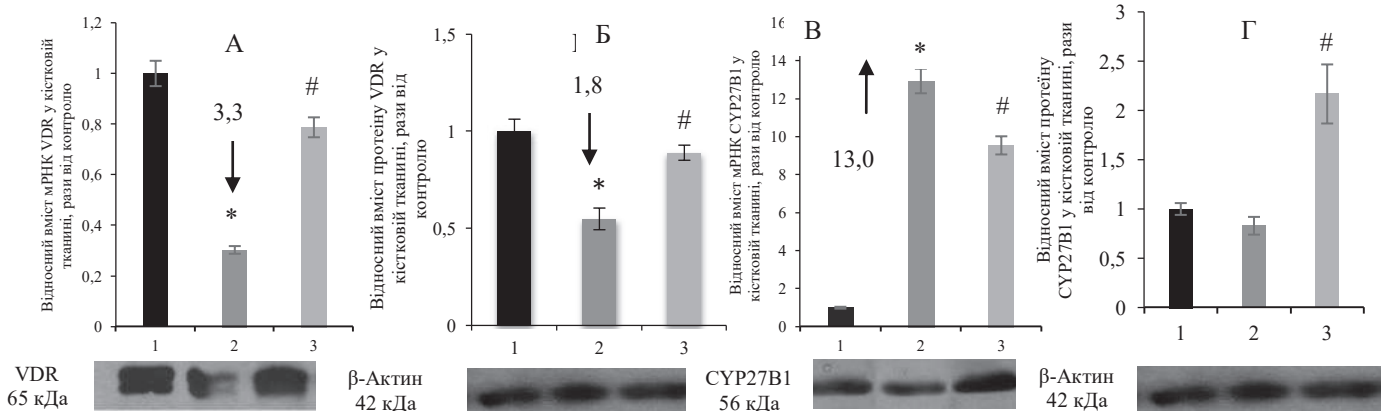


Рис. 9 Відносний вміст мРНК (А) і протеїну (Б) VDR а також мРНК (В) і протеїну (Г) CYP27B1 у кістковій тканині діабетичних тварин та після корегування вітаміном D₃. 1-контроль; 2-діабет; 3-діабет+вітамін D₃ протягом 30 діб. Дані представлені у вигляді $M \pm m$, $n=5$. * $p \leq 0,05$ зміни вірогідні порівняно з контролем; # $p \leq 0,05$ зміни вірогідні порівняно з групою діабету

У відповідь на різке зниження вмісту протеїнів VDR та CYP27B1 у печінці, кістковій тканині та кістковому мозку, спостерігалось компенсаторне підвищення їх синтезу у нирках (рис. 10).

Показано, що рівень мРНК CYP27B1 у нирках діабетичних тварин був у 5,2 рази більшим порівняно з контролем, а рівень протеїну – у 2,0 рази перевищував контрольні значення ($p \leq 0,05$) (рис. 10). Вміст VDR у тканині нирок тварин з ЦД 1 зростав у 5,2 рази, а вміст протеїну в 2,0 рази ($p \leq 0,05$) (рис. 10).

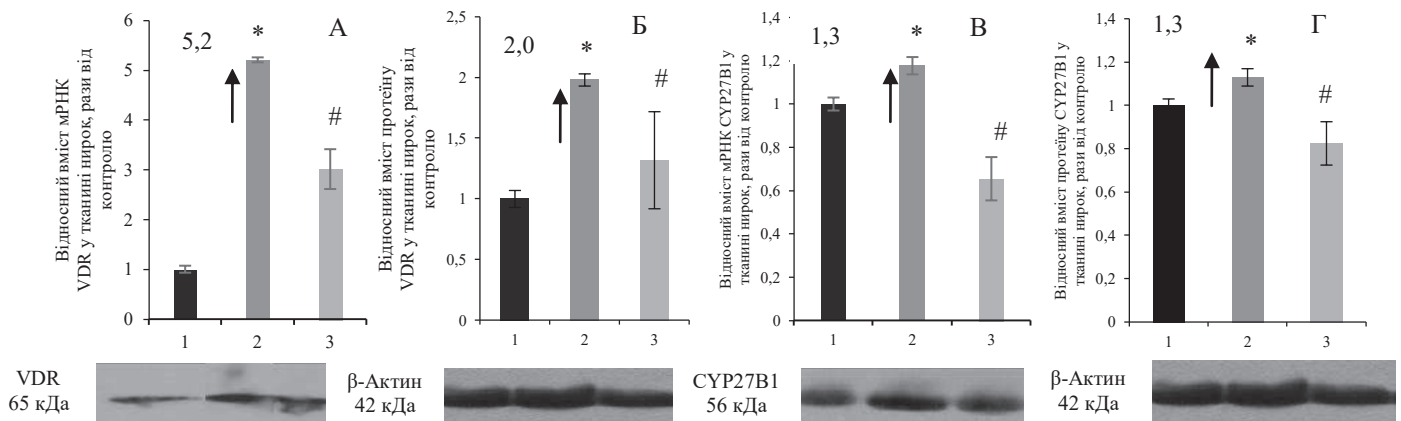


Рис. 10 Відносний вміст мРНК (А) і протеїну (Б) VDR а також мРНК (В) і протеїну (Г) CYP27B1 у тканині нирок діабетичних тварин та після корегування вітаміном D₃. 1-контроль; 2-діабет; 3-діабет+вітамін D₃ протягом 30 діб. Дані представлені у вигляді $M \pm m$, $n=5$. * $p \leq 0,05$ зміни вірогідні порівняно з контролем; # $p \leq 0,05$ зміни вірогідні порівняно з групою діабету.

Введення вітаміну D₃ діабетичним тваринам протягом 30 діб у дозі 600 МО на кг маси тіла призводило до нормалізації рівня 25ОНD у крові - $71,3 \pm 3,1$ нмоль/л з подальшим повним або частковим поверненням до норми вмісту ключових компонентів вітамін D-ендокринної системи у досліджуваних тканинах.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, відповідно до поставленої мети та завдань, вирішено актуальну біотехнологічну проблему – розроблено та сконструйовано імуноензимну тест-систему для визначення 25ОНD у зразках сироватки крові та проведено її валідування за низкою стандартних характеристик. Продемонстровано негативний вплив експериментального цукрового діабету 1 типу на синтез ключових компонентів вітамін D-ендокринної системи та встановлено доцільність застосування холекальциферолу з метою корегування діабет-індукованих порушень.

1. Синтезовано 3-напівсукцинатні (сукцинільовані) похідні 25ОНD₃ з активною карбоксильною групою, які було використано для створення імунокон'югатів з гемоціаніном молюска (KLH) та альбуміном курячого яйця (OVA). В отриманих кон'югатах співвідношення протеїну-носія до молекули 25ОНD₃ становило 1:10, що робить їх придатними для імунізування.

2. Кон'югатом 25ОНD₃-KLH імунізовано лабораторних тварин (кролів), отримано імунні сироватки та за допомогою непрямого ELISA-методу оцінено титр

специфічних анти-25ОНD антитіл, що становив 1:10000. Отримані поліклональні антитіла використано в конструюванні імунодіагностикуму для визначення 25ОНD у серологічних зразках.

3. Проведено оптимізування умов сорбції кролячих поліклональних антитіл на поверхні полістиролових планшетів, підбрано оптимальну концентрацію конкуруючого агента – 25-гідроксिवітамін D₃-LC-біотину, яка становить 5 нг/мл, побудовано стандартну калібрувальну криву та проведено валідування створеної тест-системи за низкою параметрів: визначено ліміт детектування, що становить 2,6 нг/мл 25ОНD₃ та кількісний ліміт, який дорівнює 6,9 нг/мл 25ОНD₃, а також коефіцієнти варіативності (Intra CV-5-7%, Inter CV-7%).

4. Показано, що розвиток експериментального стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету 1 типу призводить до зниження забезпеченості організму тварин вітаміном D, наслідком чого є тканинспецифічні порушення синтезу ключових компонентів вітамін-D ендокринної системи – рецепторів вітаміну D (VDR) та 25ОНD 1- α -гідроксилази (CYP27B1) в тканинах, а також зниження вмісту 25ОНD у крові.

5. Продемонстровано, що за умов ЦД 1 типу синтез мРНК і протеїну рецепторів вітаміну D та 25ОНD 1- α -гідроксилази у нирках (класичному органі утворення гормонально активної форми вітаміну D) суттєво зростає, в той час як у печінці, кістковій тканині та кістковому мозку знижується. У кістковій тканині за умов суттєвого зростання рівня мРНК CYP27B1 спостерігалось зниження вмісту протеїну цього ензиму, що є свідченням розвитку діабет-індукованого вторинного остеопорозу.

6. Введення вітаміну D₃ експериментальним тваринам з ЦД 1 протягом 30 днів у дозі 600 МО/кг призводило до відновлення рівня 25ОНD у крові та повного або часткового корегування рівня мРНК та протеїну VDR і CYP27B1 у печінці, нирках, кістковій тканині та кістковому мозку.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Мазанова АО**, Шиманський Ю, Петухов ДМ, Дробот ЛБ, Великий ММ, Комісаренко СВ Синтез кон'югата 25-гідроксिवітаміну D₃ з гемоціаніном моллюска та одержання імунних сироваток. *Biotechnologia acta*. 2015;8(3):45-55. (Особистий внесок здобувача – синтез кон'югатів 25ОНD₃-KLH/OVA, характеристика кон'югатів методом колонкової хроматографії, імунізування тварин, проведення непрямого ELISA для визначення титру антитіл проти 25ОНD, підготовка матеріалів до друку).
2. Shymanskyu I, Lisakovska O, **Mazanova A**, Riasnyi V, Veliky M. Effects of vitamin D₃ and vitamin E on prednisolone-induced alterations of phagocyte function. *Eur.Rev. Med. Pharmacol. Sci*. 2016;20(7);1379-1383. (Особистий внесок здобувача – робота з експериментальними тваринами, пробопідготовка зразків, визначення вмісту 25ОНD у сироватці крові).
3. **Mazanova AO**, Shymanskyu IO, Veliky MM. Development and validation of immunoenzyme test-system for determination of 25-hydroxyvitamin D in blood serum. *Biotechnologia acta*. 2016;9(2):28-36. (Особистий внесок здобувача – очистка та

концентрування антитіл, розробка схеми проведення аналізу, валідування новоствореного набору за низкою стандартних параметрів).

4. Великий НН, Шиманський ІА, Хоменко АВ, Лисаковская ОО, **Мазанова АА**, Великий АН, Лабудзинський ДО. Метаболическая роль дефицита витамина D₃ в развитии патологических состояний организма. Современные проблемы биохимии. Сборник научных статей НАН Беларуси. 2016;1:43-48. (Особистий внесок здобувача – робота з експериментальними тваринами, пробопідготовка зразків, визначення вмісту 25ОНD у сироватці крові).

5. Lisakovska O, Shymanskyu I, **Mazanova A**, Khomenko A, Veliky M. Vitamin D₃ protects against prednisolone-induced liver injury associated with the impairment of hepatic NF-κB/iNOS/nitric oxide pathway. *Biochem. Cell Biol.* 2017;95(2):213-222. (Особистий внесок здобувача – робота з експериментальними тваринами, пробопідготовка зразків, визначення вмісту 25ОНD у сироватці крові).

6. **Mazanova A**, Shymanskyi I, Lisakovska O, Hajiyeva L, Komisarenko Y, Veliky M. Effects of cholecalciferol on key components of vitamin D-endo/para/autocrine system in experimental Type 1 diabetes. *Int J Endocrinol* [Internet]. 2018 Feb [cited 2018 March 10];2018:[about 9 pp.]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ije/2018/2494016/>. (Особистий внесок здобувача – робота з експериментальними тваринами, пробопідготовка зразків, визначення вмісту 25ОНD у сироватці крові, проведення Вестерн блот аналізу та полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, статистична обробка результатів).

7. **Мазанова АО**, Шиманський ІО, Лісаковська ОО, Василевська ВМ, Лотоцька ОЮ, Макарова ОО, Великий ММ. Порушення синтезу рецептора вітаміну D₃ та активної форми ядерного фактора κВ у кістковій тканині, зумовлені експериментальним цукровим діабетом 1-го типу, та їх корекція холекальциферолом. *Допов. Нац. Акад. наук Укр.* 2018;2:109-116. (Особистий внесок здобувача – робота з експериментальними тваринами, пробопідготовка зразків, визначення вмісту 25ОНD у сироватці крові, проведення Вестерн блот аналізу та полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, статистична обробка результатів).

8. **Mazanova A.O.**, Shymanskyu I.O. Synthesis of 25ОНD₃-KLH conjugates and obtaining anti-25ОНD₃ polyclonal antibodies. *Current problems of biochemistry and biotechnology 2015: Матеріали конф.-конкурсу молодих учених*. (Київ, 23-24 квітня. 2015). Україна, 2015. С. 38.

9. **Mazanova A.O.**, Shymanskyu I.O., Lisakovska O.O. Obtaining of polyclonal antibodies against 25ОНD₃ and their characterization. *Conference for young scientists, CYS: Матеріали 1 міжнр. конф.* (Київ, 21-25 вересня. 2015). Україна, 2015. - С. 114.

10. **Mazanova A.O.**, Shymanskyu I.O. Production and characterization of polyclonal antibodies against 25ОНD₃. *Advances in cell biology and biotechnology: Матеріали міжнр. конф.* (Львів, 11-13 жовтня. 2015), Україна, 2015. С. 105.

11. Shymanskyu I., Labudzynskyi D., **Mazanova A.**, Veliky M. Ameliorative effect of vitamin D₃ against liver disorders and impaired bone remodeling associated with experimental type 1 diabetes. *Vitamin D – minimum, maximum, optimum: Матеріали 2 міжнр. конф.* (Варшава, 16-17 жовтня, 2015). Польща, 2015. С. 885.

12. **Mazanovа А.О.**, Shymanskyу I.O. Design and validation of immunoenzyme test-system for 25OHD determination in serological samples *Current problems of biochemistry and biotechnology 2016*: Матеріали конф.-конкурсу молодих учених. (Київ, 26-27 травня. 2016). Україна, 2016. С. 30.
13. **Mazanovа А.**, Lisakvska O., Shymankyy I., Veliky M. Effect of cholecalciferol on diabetes-induced impairment of vitamin D₃ signaling in the skeletal system. *Molecules in living cells and innovative medicine*: Матеріали Х Парнасівської конф. мол. уч. (Вроцлав, 10-12 липня. 2016). Польща, 2016. С. 23.
14. **Mazanovа А.**, Labudzynski D., Shymanskyу I. Derangements of vitamin D-endocrine system and NF-κB-dependent signaling are implicated in diabetes-associated osteoporosis: effect of chronic vitamin D₃ treatment. *Vitamin D – minimum, maximum, optimum*: Матеріали 3 міжнр. конф. (Варшава, 22-23 вересня, 2017). Польща, 2017.

АНОТАЦІЯ

Мазанова А.О. Розробка імуноензимної тест-системи для визначення 25ОНD як маркера забезпеченості організму вітаміном D за цукрового діабету. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20- біотехнологія. – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2018.

Дисертація присвячена розробці імуноензимного діагностикуму для визначення рівня 25ОНD у сироватці крові з метою характеристики вітамін D-статусу організму за низки патологічних станів, зокрема цукрового діабету 1 типу. Для генерування поліклональних антитіл в організмі кролів було синтезовано кон'югат 25ОНD₃ з гемоціаніном молюска (KLH) за допомогою модифікованого карбодіімідного методу. Кон'югати було охарактеризовано методами гель-фільтрації та тонкошарової хроматографії. Після імунізування, у сироватці крові кролів було визначено титр специфічних антитіл до 25ОНD, що становив 1:10000. З метою концентрування антитіл проводили їх висолювання за допомогою сульфату амонію ((NH₄)₂SO₄). Для конструювання імунодіагностикуму проводили підбір концентрації конкуруючого агента – 25ОНD₃-LC-біотину, яка становила 5 нг/мл. Валідування створеної тест-системи проводили за низкою характеристик: було побудовано стандартну калібрувальну криву у діапазоні концентрацій калібраторів 25ОНD₃ 0-150 нг/мл; визначено ліміт детектування (2,3 нг/мл) та кількісний ліміт (6,9 нг/мл); показано відсутність «матричного» ефекту гемоглобіну, білірубіну та триацилгліцеролів на проведення аналізу; визначено Intra CV та Inter CV, що лежать у межах допустимих 10%; продемонстровано, що перехресна реактивність системи з іншими метаболітами вітаміну D не перевищував 10%. Отже, створений діагностикум може бути використаний для визначення 25ОНD у серологічних зразках.

Показано, що розвиток експериментального цукрового діабету 1 типу супроводжується значним зниженням вмісту 25ОНD у сироватці крові тварин, що призводить до порушення синтезу ключових елементів вітамін D-ендокринної системи у нирках, печінці, кістковій тканині та кістковому мозку. Відновлення

забезпеченості організму експериментальних тварин вітаміном D сприяє корегуванню порушень обміну вітаміну D та VDR-опосередкованого клітинного сигналювання за участю $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$.

Ключові слова: вітамін D₃, імуноензимний аналіз, поліклональні антитіла, цукровий діабет 1 типу, остеопороз, вітамін D-ендокринна система.

АННОТАЦІЯ

Мазанова А.А. Разработка иммуноферментной тест-системы для определения 25ОНD как маркера обеспеченности организма витамином D при сахарном диабете. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20- биотехнология. - Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена разработке иммуноферментной тест-системы для определения уровня 25ОНD в сыворотке крови с целью характеристики витамин D-статуса организма при ряде патологических состояний, в частности сахарного диабета 1 типа. Для генерирования поликлональных антител в организме кролей было синтезировано конъюгат 25ОНD₃ с гемоцианином моллюска (KLH) с помощью модифицированного карбодиимидного метода. Конъюгаты были охарактеризованы методами гель-фильтрации и тонкослойной хроматографии. После иммунизации в сыворотке крови кролей был определен титр специфических антител к 25ОНD, который составил 1:10000. С целью концентрирования антител проводили их высаливание с помощью сульфата аммония ((NH₄)₂SO₄). Для создания тест-системы проводили подбор концентрации конкурирующего агента - 25ОНD₃-LC-биотина, которая составляла 5 нг/мл. Верификация созданной тест-системы проводили по ряду характеристик: построена стандартная калибровочная кривая в диапазоне концентраций калибраторов 25ОНD₃ 0-150 нг/мл; определен минимальный лимит определения (2,3 нг/мл) и количественный лимит (6,9 нг/мл); показано отсутствие «матричного эффекта» гемоглобина, билирубина и триацилглицеролов на проведение анализа; определены Intra CV и Inter CV, лежащие в пределах допустимых 10%; продемонстрировано, что перекрестная реактивность системы с другими метаболитами витамина D не превышала 10%. Таким образом, созданная тест-система может быть использована для определения 25ОНD в серологических образцах. Показано, что развитие экспериментального сахарного диабета 1 типа сопровождается значительным снижением содержания 25ОНD в сыворотке крови животных, что приводит к нарушению синтеза ключевых элементов витамин D-эндокринной системы в почках, печени, костной ткани и костном мозге. Восстановление обеспеченности организма экспериментальных животных витамином D способствует корректровке нарушений обмена витамина D и VDR-опосредованной клеточного сигнальной трансдукции с участием $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$.

Ключевые слова: витамин D₃, иммуноферментный анализ, поликлональные антитела, сахарный диабет 1 типа, остеопороз, витамин D-эндокринная система.

ABSTRACT

Mazanov A.O. Development of immunoenzyme test system for the determination of 25OHD as a marker of vitamin D availability in Type 1 diabetes. - The manuscript.

Thesis for a candidate degree in biological sciences (doctor of philosophy) in specialty 03.00.20 "Biotechnology". - Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, 2018.

The thesis is devoted to the development of a immunoenzyme test-system for 25OHD determining in serum for the purpose of characterizing the vitamin D status of the body in a number of pathological conditions, in particular Type 1 diabetes mellitus. To generate polyclonal antibodies in the rabbits, the 25OHD₃ conjugate with keyhole limpet hemacyanin (KLH) was synthesized using a modified carbodiimide method. The conjugates were characterized by gel-filtration and thin-layer chromatography methods. After immunization, in the serum of rabbits, the titer of specific antibodies to 25OHD was 1:10000. In order to concentrate the antibodies, they were salted out with ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄). To construct an immunoassay, the concentration of the competing agent - 25OHD₃-LC-biotin 5 ng/ml, was selected. Validation of the created test-system was carried out according to a number of characteristics: a standard calibration curve was constructed in the range of concentrations of calibrators 25OHD₃ 0-150 ng/ml; detection limit (2.3 ng/ml) and quantitative limit (6.9 ng/ml) were determined; the absence of a "matrix effect" of hemoglobin, bilirubin and triacylglycerol for analysis was shown; Intra CV and Inter CV defined within the permissible 10%; it has been shown that the cross-reactivity of the system with other metabolites of vitamin D did not exceed 10%. Consequently, the created immunoenzyme test-system can be used to detect 25OHD in serological samples.

It has been shown that the development of experimental Type 1 diabetes is accompanied by a significant decrease in the content of 25OHD in experimental animal serum, which leads to a disturbances of the synthesis of key elements of the vitamin D-endocrine system in the kidneys, liver, bone marrow and bone marrow. Normalization of vitamin D level in diabetic animals contributes to the correction of vitamin D metabolism and VDR-mediated cell signaling involving 1 α ,25(OH)₂D.

Key words: vitamin D₃, immunoenzyme analysis, polyclonal antibodies, type 1 diabetes mellitus, osteoporosis, vitamin D-endocrine system.