УДК 577.161.2+616.379-008.64

ЗАБЕЗПЕЧЕНІСТЬ ОРГАНІЗМУ ВІТАМІНОМ D_3 ТА ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ФАГОЦИТУЮЧИХ КЛІТИН ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1-ГО ТИПУ

Д. О. ЛАБУДЗИНСЬКИЙ, І. О. ШИМАНСЬКИЙ, В. М. РЯСНИЙ, М. М. ВЕЛИКИЙ

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: konsument3@gmail.com

Дослідження присвячено встановленню взаємозв`язку між рівнем забезпеченості організму вітаміном D_3, вмістом ізоензимів вітамін D_3 25-гідроксилази CYP27A1 і CYP2R1 у тканині печінки та функціональною активністю фагоцитів периферичної крові мишей за експериментального цукрового діабету 1-го типу. Показано, що цукровий діабет супроводжується розвитком вітамін D_3-дефіцитного стану, який характеризується зниженням вмісту $25OHD_3$ у сироватці крові та обумовлений зміною експресії основних ізоформ вітамін D_3 25-гідроксилази гепатоцитів: рівень синтезу CYP27A1 істотно знижується, а CYP2R1 зростає. Виявлено нормалізацію тканинного рівня обох ізоформ та вмісту $25OHD_3$ у разі введення холекальциферолу. Недостатня забезпеченість організму тварин вітаміном D_3 за цукрового діабету корелює зі зниженням фагоцитарної активності гранулоцитів і моноцитів та здатності їх продукувати бактерицидні біооксиданти (активні форми кисню та азоту). Продемонстровано імунорегуляторну роль холекальциферолу в забезпеченні механізму фагоцитарної елімінації антигенів гранулоцитами і моноцитами крові.

Ключові слова: вітамін D_3, $25OHD_3$, CYP27A1, CYP2R1, фагоцитоз, АФК, експериментальний цукровий діабет 1-го типу.

Цукровий діабет (ЦД) – ендокринно-обмінне захворювання, яке характеризується генетично детермінованим абсолютним або відносним дефіцитом інсуліну – гормону підшлункової залози, хронічною гіперглікемією та порушенням переважної більшості ланок обміну речовин [1]. ЦД залишається однією з найважливіших медико-соціальних проблем у всіх країнах світу, видатки на лікування якого зростають з кожним роком. Розповсюдженість ЦД в промислово розвинутих країнах складає приблизно 5–6% від загальної кількості населення і має тенденцію до зростання [2]. Результати епідеміологічних досліджень останніх років демонструють важливу роль холекальциферолу (вітаміну D_3) в зниженні ризику виникнення ЦД та в корекції порушень, що супроводжують розвиток цього захворювання [3].

Відомо, що холекальциферол є важливим регулятором обміну кальцію і фосфору в організмі хребетних, ключовим фактором остеогенезу та ремодуляції кісткової тканини. Крім цього, гормонально активні форми вітаміну D_3 виявляють інші біологічні ефекти, не пов'язані з участю в регулюванні гомеостазу кісткової тканини. Зокрема, встановлено здатність вітаміну D_3 впливати на функціональну активність клітин імунної системи, таких як моноцити, макрофаги, дендритні клітини (DCs), а також Т- і В-лімфоцити, результатом чого є модуляція як вродженої, так і набутої імунної відповіді. Крім того, показано, що імунні клітини експресують $25OHD_3$ 1-гідроксилазу, яка забезпечує перетворення неактивного вітаміну D_3 в активну гормональну форму 1,25 $(OH)_2$ D_3 [4].

Епідеміологічні дослідження пов'язують недостатній рівень вітаміну D_3 з високою схильністю до виникнення автоімунних захворювань і хронічних інфекцій, обумовлених порушеннями в імунній системі. За механізмом дії холекальциферол може виявляти прямий (геномні ефекти, опосередковані активацію рецепторів гормонально активних форм вітаміну D_3 (VDR)) та непрямий (через регуляцію кальцієвого та фосфорного гомеостазу на клітинному і тканинному рівнях) вплив на патофізіологічні процеси, що обумовлюють розвиток ЦД, включаю-

чи деструкцію β-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози, порушення інсулінового обміну та системне запалення [4].

Зниження забезпеченості організму вітаміном D_3 за автоімунного ЦД може виникати внаслідок поліморфізму генів вітамін D_3 25-гідроксилаз, основними з яких є мітохондріальна та мікросомальна ізоформи, CYP 27A1 і 2R1 відповідно. Відомо, що CYP 27A1 виявляє відносно малу спорідненість до субстрату, і ефективно функціонує за наномолярних концентрацій холекальциферолу, в той час як для CYP2R1 характерна висока спорідненість до субстрату, тому оптимумом для його ензиматичної активності є пікомолярні концентрації вітаміну D_3 [5, 6]. Слід також зауважити, що поліморфізм генів VDR-рецепторів (транскрипційних факторів родини ядерних рецепторів) корелює зі змінами механізмів реалізації регуляторного впливу вітаміну D_3 в клітинах імунної системи, що призводить до порушення імунної відповіді, розвитку хронічного запалення та автоімунних процесів [7]. Відомо, що терапевтичне застосування вітаміну D_3 під час вагітності та у ранньому дитинстві нормалізує рівень $25OHD_3$ в сироватці, що сприяє істотному зменшенню ризику розвитку автоімунного ЦД, позитивно впливає на рівень глікемії в пацієнтів, а також піддослідних тварин на ранній стадії захворювання. З нормалізацією рівня $25OHD_3$ також пов'язують і зменшення експресії прозапальних факторів у хворих на ЦД 1-го типу [8]. Отже, завдяки наявності у більшості клітин імунної системи VDR-рецепторів вітамін D_3 є потенційно потужним геномним регулятором, здатним нормалізувати процеси імунної відповіді та елімінації антигенів за ЦД. При цьому необхідною умовою реалізації функцій вітаміну D_3 є адекватна забезпеченість ним організму [9].

Виходячи із зазначеного вище, метою роботи було встановлення зв'язку між рівнем забезпеченості організму вітаміном D_3 (за рівнем $25OHD_3$ в сироватці крові), вмістом ізоензимів вітамін D_3 25-гідроксилази CYP27A1 і CYP2R1 та функціональною активністю фагоцитів периферичної крові мишей за експериментального ЦД 1-го типу.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на самцях мишей лінії C56Bl/J6 масою 21 ±3 г. Експериментальний діабет 1-го типу спричинювали 5-разовим введенням стрептозотоцину (STZ, Sigma-Aldrich, США) в дозі 40 мг/кг маси тіла тварини. Такий спосіб введення STZ широко використовується для індукції діабету 1-го типу в піддослідних мишей [10]. У дослідженні використовували тварин після 6 тижнів розвитку діабету з рівнем глюкози крові 20,4 ± 4,3 ммоль/л. Після розвитку стійкої гіперглікемії мишам вводили препарат вітаміну D_3 (DSM, Netherland) впродовж 2,5 місяців у вигляді водної суспензії (800 МО/кг маси тіла, *per os*). Контрольних тварин утримували на повноцінному раціоні віварію. У період адаптації (тиждень) та під час експерименту тварини знаходились у віварії при температурі 18–22 °С, вологості 50–60%, природному світловому режимі «день-ніч» у стандартних пластикових клітках із вільним доступом до їжі та води і з додержанням «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001). Мишей декапітували, використовуючи для наркозу діетиловий ефір. Підбір тварин та формування груп проводили методом «випадкових чисел» [11].

Забезпеченість організму мишей вітаміном D_3 оцінювали за рівнем $25OHD_3$ в сироватці крові, який визначали імуноензимним методом (набір ELISA, Immunodiagnostic Systems Ltd., США). Метод ґрунтується на конкурентному зв'язуванні $25OHD_3$ із сироватки та $25OHD_3$-біотину з вітамін D_3-зв'язуючим протеїном (VDBP), іммобілізованим на 96-лунковому імунологічному планшеті.

Рівень синтезу вітамін D_3 25-гідроксилаз (CYP27A1 і CYP2R1) визначали методом імуноблотингу, основою якого є детекція цільових протеїнів за допомогою специфічних до них імуноглобулінів. Заморожені зразки тканини печінки гомогенізували в буфері з екстракцією протеїнів (20 мМ трис-HCl, pH 7,5; 1% тритону X-100, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЕДТА, 1% дезоксихолату натрію та суміші інгібіторів протеїназ і фосфатаз (1 мкМ апротинін, 23 мкМ леупептин, 1,5 мкМ пепстатин, 1 мМ фенілметансульфонілфторид, 5 мМ бензамідин,

1 мМ ортованадат натрію)) у співвідношенні 1 : 10 (вага/об'єм) на льодяній бані. Гомогенат додатково обробляли на ультразвуковому дезінтеграторі (Labsonic M, Sartorius) та залишали екстрагуватися на льоду протягом 20 хв. Нерозчинну в детергенті фракцію осаджували центрифугуванням при 14 000 g протягом 20 хв при 4 °С. Електрофоретично розділені протеїни (50–100 мкг/лунку) у поліакриламідному гелі в буферній системі Леммлі переносили на нітроцелюлозну мембрану (Sigma, США) протягом 1 год при 350 мА у буфері, що містив: 25 мМ трис, 192 мМ гліцин, pH 8,3; 0,1% DSNa, 20% метанолу. Вільні центри зв'язування блокували протягом 1 год 5%-им знежиреним сухим молоком (Applichem, Німеччина) у фосфатному буфері з 0,05% твіну-20. Після кожного етапу інкубації мембрану тричі протягом 5 хв відмивали фосфатним буфером з 0,1%-им твіном-20. Мембрану інкубували ніч при 4 °С з поліклональними антиCYP2R1 (1 : 200), антиCYP27A1 (1 : 200) антитілами (Santa Cruz Biotechnology, США) та протягом 1 год при кімнатній температурі із вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрону (1 : 5000) (Santa Cruz Biotechnology). Для контролю вмісту протеїнів у пробах, мембрану інкубували з моноклональними анти-β-актин антитілами (1 : 10 000) (Sigma, США). Імунореактивні сигнали на мембрані виявляли за допомогою інкубації мембрани з реактивами для посиленої хемілюмінесценції (Sigma, США). Інтенсивність сигналів на рентгенівських плівках обраховували, застосовуючи програму GelPro32 [12].

Рівень фагоцитарної активності досліджували методом протокової цитофлуориметрії (COULTER EPICS XL-MCL) з використанням тест-набору FITC-мічених *E. coli* «PHAGOTEST» (Біолайн, Росія). Визначали кількість імунокомпетентних клітин, які фагоцитують флуоресцеїнмічені бактерії *E. coli* та оцінювали поглинаючу здатність їх (кількість поглинутих бактерій на клітину) за середнім геометричним значенням інтенсивності флуоресценції. Візуалізацію фагоцитозу проводили на конфокальному мікроскопі LSM 510 META. Інтенсивність продукції активних форм кисню (АФК) та азоту було оцінено за допомогою протокової цитофлуориметрії з використанням флуорогенного субстрату 2′,7′-дихлорфлуоресцеїн діацетату (DCF-DA). Принцип визначення полягає у здатності DCF-DA дифундувати всередину живої клітини та відновлюватися внутрішньоклітинними вільними радикалами до флуоресцентно активної деацетильованої форми DCF.

Інтенсивність кисневого метаболізму гранулоцитів оцінювали за допомогою тесту відновлення клітинами нітросинього тетразолію (НСТ-тест) [13]. Метод грунтується на відновленні нейтрофілами нітросинього тетразолію (НСТ) до нерозчинного темно-синього формазану, який легко ідентифікувати у фагоцитах візуально. Серед 100 клітин підраховували частку активованих нейтрофілів (ЧАН, %), які містили гранули диформазану. За кількістю відкладеного в клітинах диформазану визначали їхню метаболічну активність в умовних одиницях, розраховуючи індекс активності нейтрофілів (ІАН) [14]:

$$ІАН = (1 \cdot H_0 + 2 \cdot H_1 + 3 \cdot H_2 + 4 \cdot H_3)/ E_n,$$

де H_0, H_1, H_2, H_3 (%) – групи клітин препарату, в яких об'єм заповнення диформазаном дорівнює 0–25%, 25–50%, 50–75% та 75–100% відповідно; E_n – кількість клітин у зразку.

Статистичну обробку одержаних даних здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «Microsoft Excel». Результати представляли як середнє значення 6 незалежних визначень ± похибка середнього. Статистичну значимість різниці середніх показників оцінювали, використовуючи стандартний *t*-критерій Стьюдента для некорельованих вибірок.

Результати та обговорення

Одним із основних показників розвитку ЦД є гіперглікемія. Вимірювання рівня глюкози в крові тварин за ЦД (таблиця) свідчить про значне її підвищення до 20,4 ± 4,3 ммоль/л порівняно з 5,2 ± 1,1 ммоль/л в інтактних мишей. У тварин, яким вводили холекальциферол, середній рівень глюкози становив 14,5 ± 3,2 ммоль/л.

Дослідження вмісту $25OHD_3$ – основного маркера забезпеченості організму вітаміном D_3 та попередника його гормонально активної форми – показало зниження у сироватці крові тварин за ЦД рівня цього 25-гідроксильованого похідного до 33,9 нмоль/л, що у 2,4 раза нижче, ніж у контрольних тварин (таблиця). Такий рівень $25OHD_3$ свідчить про значний дефіцит вітаміну D_3 за цієї патології, який може бути спричинено кількома чинниками.

Вміст $25OHD_3$ у сироватці крові за експериментального цукрового діабету 1-го типу та у разі введення вітаміну D_3 ($M \pm m$, $n = 6$)

Експериментальні групи	Вміст $25OHD_3$		Рівень глюкози в крові, ммоль/л
	нмоль/л	нг/мл	
Контроль	85,6 ± 4,11	34,2 ± 1,64	5,2 ± 1,1
«Діабет»	33,9 ± 1,91*	13,56 ± 0,76*	20,4 ± 4,3*
«Діабет + D_3»	81,2 ± 5,33#	32,48 ± 2,13#	14,5 ± 3,2*

*Різниця порівняно з контролем вірогідна ($P < 0,05$); #різниця порівняно з групою «Діабет» вірогідна ($P < 0,05$)

Зокрема, в науковій літературі існують переконливі свідчення того, що вроджені вади метаболізму вітаміну D_3, обумовлені хромосомними мутаціями або поліморфізмом генів деяких цитохромів та відповідним дефіцитом $25OHD_3$, визначають схильність людини до розвитку автоімунних захворювань. Так, показано існування тісної кореляції між зниженим рівнем циркулюючого $25OHD_3$ внаслідок порушення гідроксилювання вітаміну D_3, обумовленого поліморфізмом певних ділянок гену CYP2R1, та розвитком ЦД 1-го типу [15]. Як відомо, перетворення холекальциферолу у $25OHD_3$ каталізують дві ізоформи цитохрому P450 (вітамін D_3 25-гідроксилази): мітохондріальна CYP27A1 та мікросомальна CYP2R1. З огляду на важливу роль ензимів вітамін D_3 25-гідроксилазної системи в обміні вітаміну D_3 доцільно було з'ясувати, чи не пов'язаний значний дефіцит $25OHD_3$ за ЦД зі змінами вмісту цих двох ключових цитохромів.

Показано, що вміст мітохондріальної ізоформи CYP27A1 у печінці діабетичних тварин знижується у 2,3 раза порівняно з контрольними тваринами (рис. 1). Це може бути пов'язано з порушенням експресії цієї ізоформи цитохрому P450 у разі тривалої гіперглікемії, обумовленої ЦД. Введення вітаміну D_3 діабетичним мишам спричинювало підвищення рівня синтезу CYP27A1 у 1,9 раза, що майже відповідає контрольним значенням. Протилежний характер мали зміни синтезу мікросомальної ізоформи вітамін D_3 25-гідроксилази. Встановлено зростання у 3,2 раза вмісту CYP2R1 у печінці тварин за ЦД (рис. 2). Відомо, що CYP2R1 характеризується більшою спорідненістю до холекальциферолу й має вищу гідроксилазну активність порівняно з CYP27A1. CYP2R1 здатна ефективно перетворювати вітамін D_3 в пікомолярних концентраціях, що є свідченням функціонування ензиму переважно в умовах фізіологічно низьких концентрацій холекальциферолу [16]. У печінці тварин, яким вводили препарат вітаміну D_3, спостерігається істотне зниження вмісту CYP2R1 (у 6,5 раза відносно групи «Діабет»), що перевищує контрольні значення. Таким чином, результати наших досліджень показали, що CYP2R1 є, ймовірно, тією ізоформою вітамін D_3 25-гідроксилази печінки, що виконує за ЦД компенсаторну роль, спрямовану на забезпечення необхідних для реалізації фізіологічних функцій вітаміну D_3 рівнів циркулюючого в крові $25OHD_3$. Нормалізація в експресії вітамін D_3 25-гідроксилаз CYP27A1 та CYP2R1 за хронічного введення холекальциферолу можна пояснити геномною регуляцією транскрипції генів цих ензимів, яка здійснюється гормонально активними формами вітаміну D_3.

Не виключено також, що виявлений за діабету D-гіповітаміноз може додатково поглиблюватись внаслідок порушення всмоктування вітаміну D_3 з кишечника. Прийнято вважати, що апікальне всмоктування холекальциферолу ентероцитами ворсинок його проксимального відділу здійснюється шляхом пасивної дифузії. Зв'язуючись із вітамін D-зв'язувальними протеїнами (VDBP), холекальциферол потрапляє в кров'яне русло через систему портальної вени [17]. Одночасно продемонстровано можливість транспортування холекальциферолу за участю специфічних переносників. У дослідах на лабораторних тваринах і клітинних лініях було продемонстровано, що специфічне інгібування рецепторів зв'язування холестеролу, таких як SRB1 (scavenger receptor class B 1) та рецептор NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1), на поверхні ентероцитів призводить до значного зниження засвоєння холекальциферо-

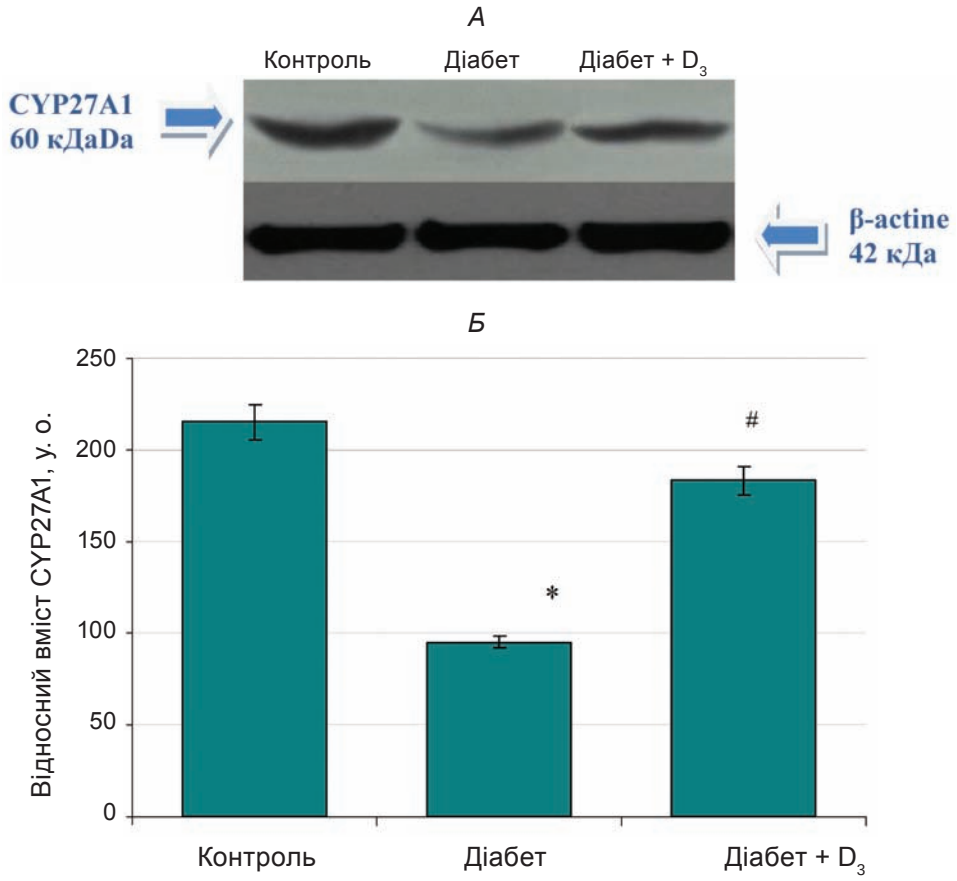

*Рис. 1. Вміст мітохондріальної ізоформи CYP27A1 вітамін D_3 25-гідроксилази в печінці мишей за цукрового діабету та у разі введення вітаміну D_3. А – імуноблотограма протеїну CYP27A1. Б – відносний вміст протеїну CYP27A1 у тканині печінки піддослідних тварин (M ± m, n = 6). *P < 0,05 порівняно з контролем, #P < 0,05 порівняно з групою «Діабет»*

лу в кишечнику [18]. Тому D-гіповітаміноз за ЦД цілком може бути спричинений порушенням функціонування рецепторів холестеролу внаслідок прямих модифікацій їх окисленням або глікозилюванням.

Незважаючи на велику кількість нез'ясованих питань, наявність тісного зв'язку між недостатньою забезпеченістю організму вітаміном D_3 та розвитком ЦД на сьогодні не викликає сумнівів [5, 6]. При цьому ефекти вітаміну D_3 найімовірніше реалізуються через його гормонально активні форми. Існують переконливі докази того, що $1,25(OH)_2D_3$ регулює важливі процеси життєдіяльності β-клітин із залученням різних механізмів, таких як прямий вплив на секрецію інсуліну через регуляцію внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+}, підвищення стійкості β-клітин до апоптозу, а також, можливо, посилюючи процес регенерації β-клітин. Дефіцит вітаміну D_3 обумовлює розвиток автоімунних процесів, що призводить до руйнування β-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози [19].

В основі розвитку патологічних процесів за ЦД лежить гіперглікемія, яка веде до надмірної продукції АФК. Неконтрольоване зростання концентрації супероксид-аніона, оксиду азоту та пероксинітриту обумовлюють розвиток оксидативно-нітрозативного стресу та посилює процеси неензиматичної модифікації протеїнів (карбонілювання, глікозилювання, нітрування) і вільнорадикальне окислення ліпідів [20, 21]. Зокрема, глікозилювання ліпопротеїнових комплексів сприяє утворенню цитотоксичних кінцевих продуктів глибокого глікування (AGEs), які, взаємодіючи з відповідними рецепторами (RAGE) на клітинній мембрані, запускають вивільнення прозапальних цитокінів, хемокінів та молекул адгезії [22, 23]. Для ЦД 1-го типу характерним є значне посилення автоімунних

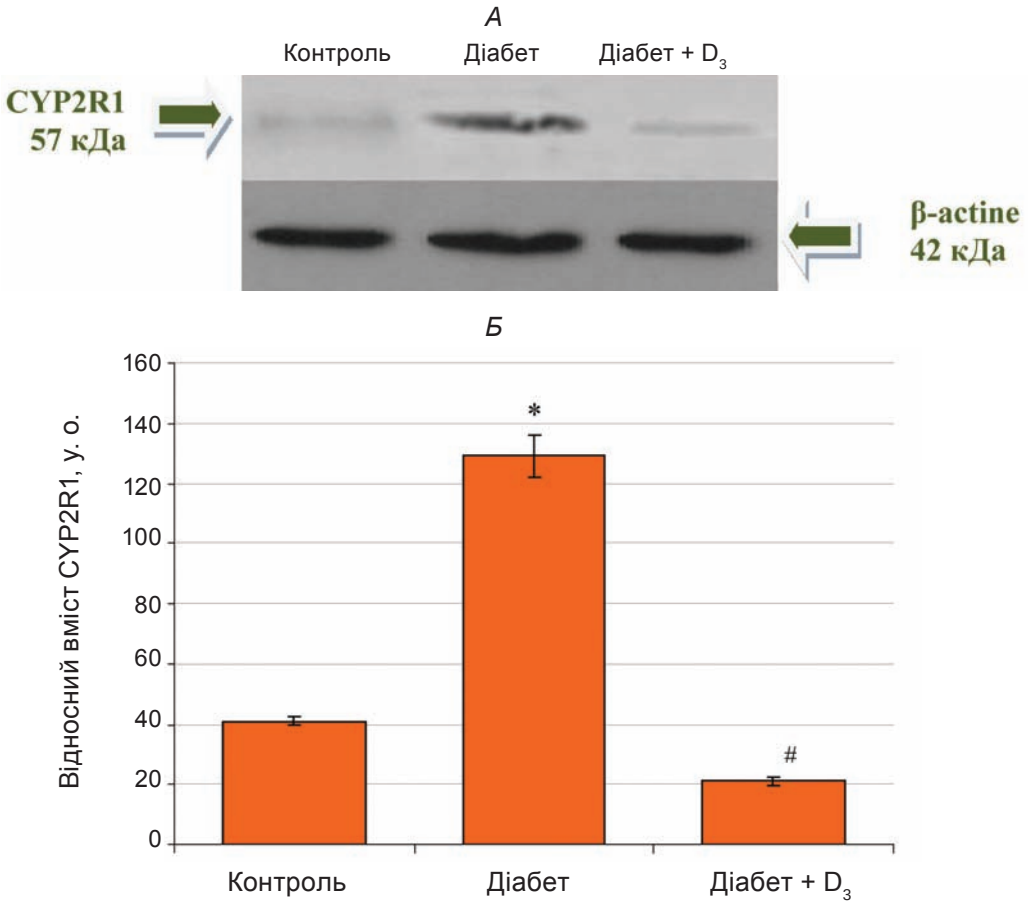

*Рис. 2. Вміст мікросомальної ізоформи CYP2R1 вітамін D_3 25-гідроксилази в печінці мишей за цукрового діабету та у разі введення вітаміну D_3. А – імуноблотограма протеїну CYP2R1. Б – відносний вміст протеїну CYP2R1 у тканині печінки піддослідних тварин (M ± m, n = 6). *P < 0,05 порівняно з контролем, #P < 0,05 порівняно з групою «Діабет»*

реакцій, активація Т-лімфоцитарної ланки, зростання продукції внутрішньоклітинних АФК та посилення ліпопероксидації. При цьому на сьогодні існують неоднозначні відомості стосовно характеру змін інтенсивності генерування АФК та елімінації антигенів фагоцитами за ЦД [24].

На підставі наведеного вище було досліджено вплив забезпеченності організму вітаміном D_3 на функціонально взаємопов'язані процеси неспецифічної ланки клітинного імунітету – фагоцитоз та продукування бактерицидних біооксидантів (АФК).

Фагоцитоз у широкому розумінні є складним процесом, який включає низку послідовних стадій: хемотаксис та хемокінез, адгезію, поглинання антигену, утворення фаголізосом, кілінг та лізис об'єкта. Ключовим етапом фагоцитозу є поглинання антигену. Дані поглинаючої здатності фагоцитуючих клітин крові мишей (моноцитів та гранулоцитів) FITC-мічених опсонізованих *E. coli*, одержані за допомогою протокової цитофлуориметрії, демонструють істотні зміни фагоцитарної активності цих клітин за ЦД та за введення вітаміну D_3 (рис. 3). Зміни кількості активних імунокомпетентних клітин, розраховані на основі даних цитофлуорограм, представлено на рис. 4 (*А*). Так, в умовах ЦД кількість активних нейтрофілів зменшується в 1,6 раза порівняно з контролем. Оцінка середньої інтенсивності флуоресценції клітин, що корелює з кількістю поглинутих фагоцитами бактерій, свідчить про істотне пригнічення фагоцитарної активності лейкоцитів за ЦД, рис. 4 (*Б*). Як було встановлено, бактерицидну активність фагоцитів за ЦД можна корегувати деякими біологічно активними сполуками [25], в тому числі і холекальциферолом. Введення діабетичним тваринам терапев-

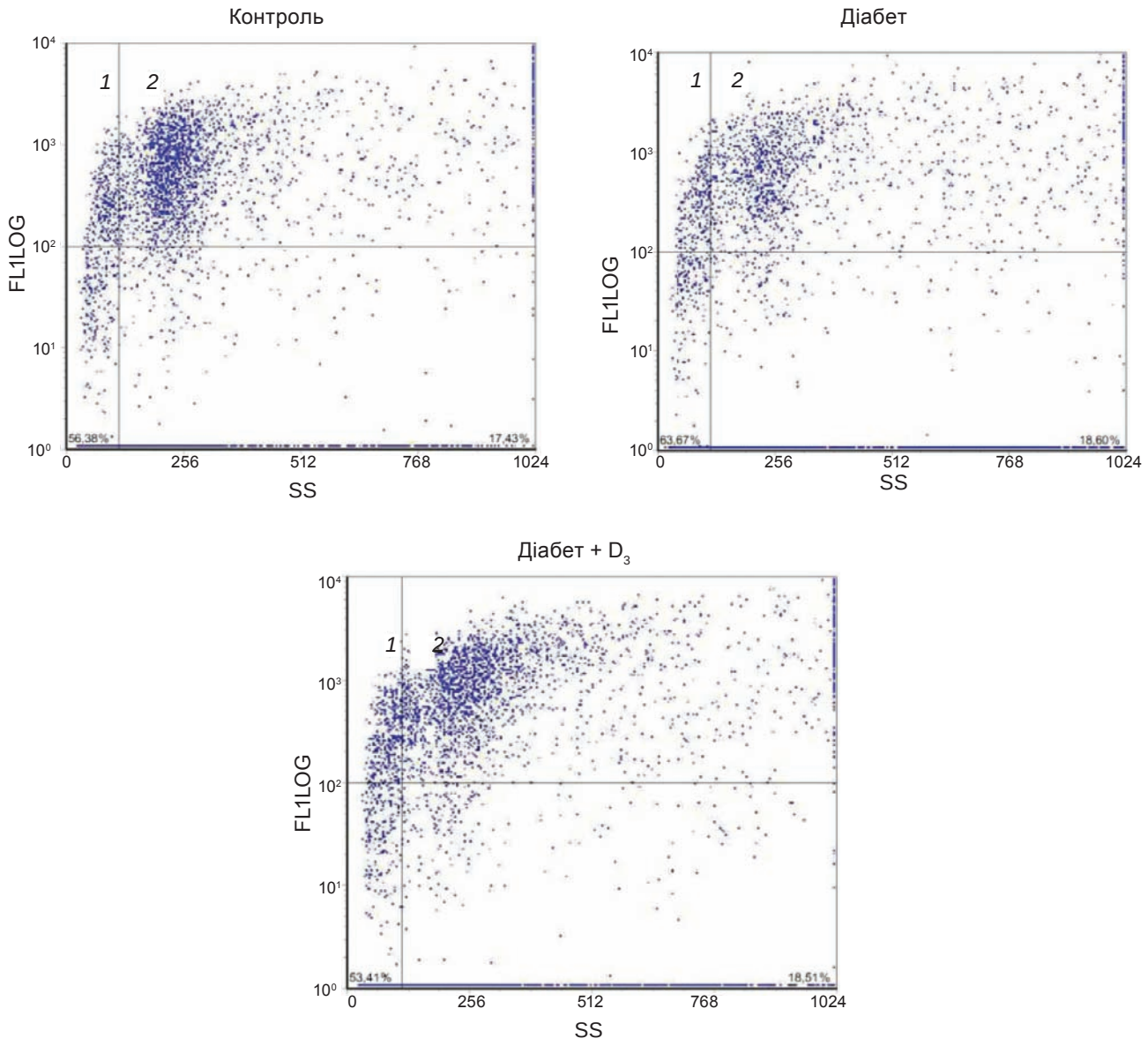

Рис. 3. Дот-плоти поглинання FITC-мічених E. coli фагоцитуючими клітинами периферичної крові. SS – гранулярність клітин; FL1LOG – інтенсивність флуоресценції FITC-мічених E. coli, поглинутих фагоцитами. На всіх цитофлуорограмах: 1 – моноцити; 2 – гранулоцити

тичних доз препарату холекальциферолу (30 МО вітаміну D_3) призводить до підвищення кількості фагоцитуючих моноцитів та нейтрофілів в 1,3 та 1,2 раза відповідно порівняно з показниками в контрольних тварин. Крім того, зростання середньої інтенсивності флуоресценції клітин вказує на істотне збільшення кількості бактерій, поглинутих фагоцитами периферичної крові. Таким чином, цілком очевидно, що фагоцитарна активність гранулоцитів і моноцитів значною мірою залежить від рівня забезпеченості організму тварин вітаміном D_3. Фагоцитоз гранулоцитів візуально зафіксовано за допомогою конфокальної мікроскопії та представлено на рис. 5.

Не менш важливим етапом фагоцитозу є кілінг. Він може бути незалежним від кисню і здійснюється у фаголізосомі через активацію низки літичних ензимів та перфоринів – цитотоксичних протеїнів, які руйнують цитоплазматичну мембрану чужорідної клітини. Однак, якщо інфекційний агент має значні розміри та складну структуру, запускається механізм кисеньзалежного кілінгу. Він включає активацію

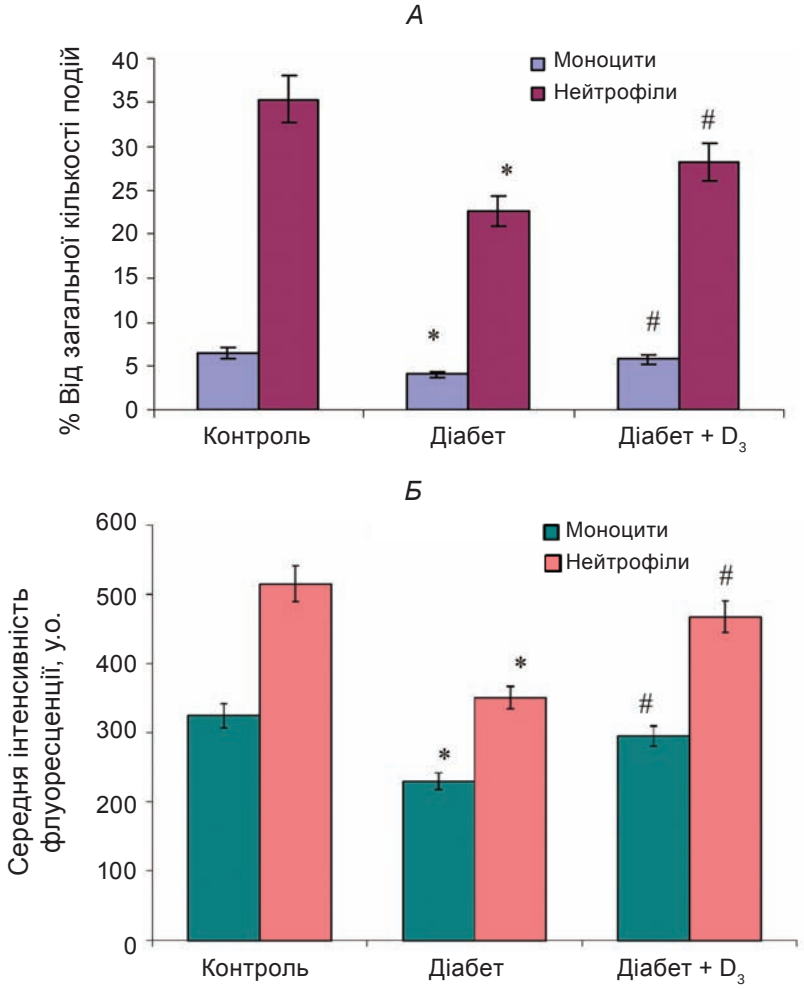

*Рис. 4. А – поглинаюча здатність моноцитів і нейтрофілів (M ± m, n = 6). Б – середня геометрична інтенсивність флуоресценції лейкоцитів (моноцитів і нейтрофілів) за каналом FL1 (M ± m, n = 6). * P < 0,05 порівняно з контролем, #P < 0,05 порівняно з групою «Діабет»*

ензимів, що забезпечують генерування АФК у спеціалізованих клітинах імунної системи (переважно NADPH-оксидаз і мієлопероксидаз), що спричинює респіраторний вибух, спрямований на додаткову деградацію збудника. Таке поєднання лізису і респіраторного вибуху є високоефективним способом елімінації антигену. З огляду на це було проведено дослідження інтенсивності продукції бактерицидних біооксидантів – активних форм кисню та азоту з використанням флуоресцентного зонда DCF-DA та протокової цитофлуориметрії. Неактивний DCF-DA легко дифундує крізь плазмалему і за дії внутрішньоклітинних АФК окислюється до флуоресцентного похідного DCF.

Результати дослідження показали, що за ЦД рівень флуоресценції в навантажених DCF-DA клітинах знижується на 35% порівняно з контролем, що є свідченням опосередкованого діабетом пригнічення інтенсивності утворення активних форм кисню та азоту фагоцитами периферичної крові (рис. 6). За введення діабетичним тваринам вітаміну D_3 інтенсивність флуоресценції зростає на 28%. Таким чином, вітамін D_3 досить ефективно нормалізує рівень продукції бактерицидних АФК у клітинах фагоцитарного ряду.

Ще одним важливим методом, який характеризує функціональну активність нейтрофільних гранулоцитів, є тест із нітросинім тетразолієм (НСТ-тест). Метод базується на здатності практично безбарвного НСТ відновлюватись радикалами кисню та азоту в темно-синій диформазан. За даними НСТ-тесту обчислювали долю активованих нейтрофілів та індекс активності нейтрофілів, які комплексно характеризують кисеньзалежну

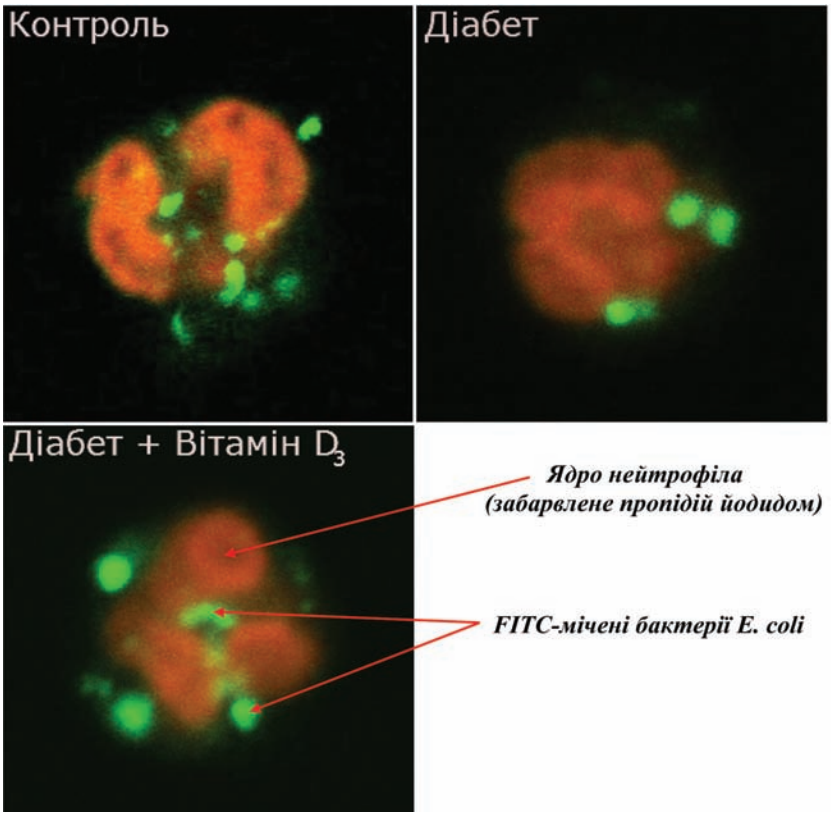

Рис. 5. Конфокальна мікроскопія захвату E. coli (зелена флуоресценція) нейтрофілами за експериментального цукрового діабету та у разі введення вітаміну D_3

систему фагоцитозу нейтрофілів. Одержані дані засвідчили зниження показника ЧАН більш ніж у 1,5 раза в тварин із ЦД порівняно з інтактними мишами (рис. 7). Введення вітаміну D_3 призводить до його підвищення в 1,4 раза на фоні патології. Індекс активності нейтрофілів, який відображає інтенсивність вільнорадикальних процесів та поглинальну здатність фагоцитуючих клітин, знижується в 1,32 раза в діабетичній групі відносно контролю, в той час як введення вітаміну D_3 призводить до підвищення індексу в 1,24 раза (рис. 8). Ці дані узгоджуються з результатами інших досліджень, які демонструють зниження у разі діабету бактерицидної активності нейтрофілів, зменшення кількості активно фагоцитуючих клітин та секреції ензимів лізосом, які зумовлюють лізис [26] та дозволяють стверджувати про тісний зв'язок виявлених змін із вітамін D_3-недостатністю, асоційованою з ЦД.

Таким чином, одержані результати вказують на пригнічення ефекторної ланки імунітету в реалізації фагоцитарного механізму утилізації чужорідного агента за експериментального ЦД. При цьому, очевидно, що однією з головних причин виявлених порушень функціонального стану фагоцитуючих клітин за цієї патології є дефіцит вітаміну D_3 в організмі тварин, який принаймні частково обумовлений змінами експресії основних ізоформ вітамін D_3 25-гідроксилази. Експериментально підтверджено ефективність застосування вітаміну D_3 у терапевтичній дозі для корекції виявлених порушень. Імуномодуляторні ефекти вітаміну D_3 передусім опосередковані його гормонально активними формами, що реалізують свою біологічну дію через VDR, які на сьогодні ідентифіковані в багатьох типах клітин імунної системи [27].

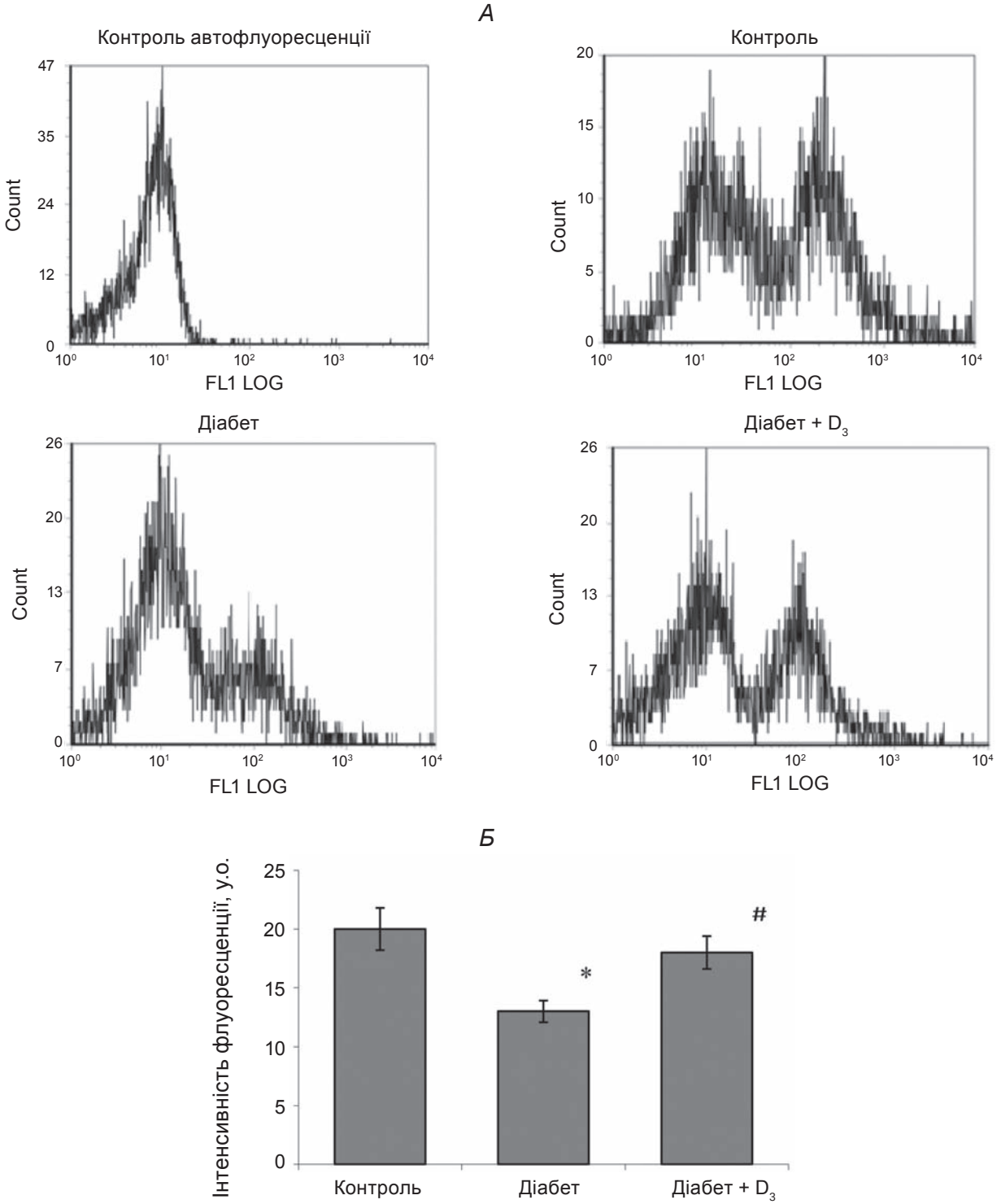

*Рис. 6. Інтенсивність утворення активних форм кисню та азоту фагоцитами периферичної крові мишей за діабету та за введення вітаміну D_3 (M ± m, n = 6). А – цитофлуорограми флуоресценції DCF-DA. Б – середня інтенсивність флуоресценції за каналом FL1, що корелює з рівнем утворення АФК. *P < 0,05 порівняно з контролем, #P < 0,05 порівняно з групою «Діабет»*

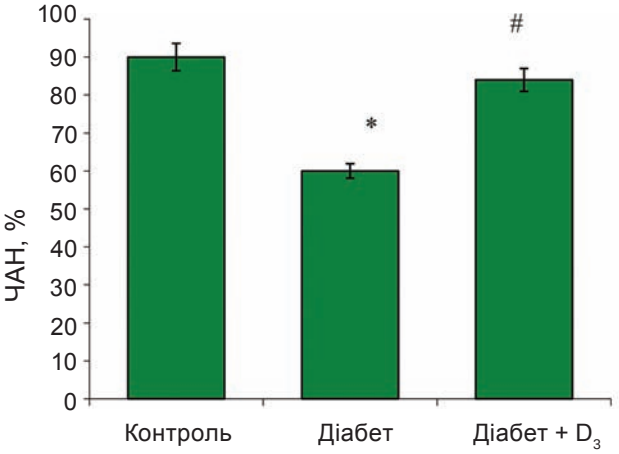

*Рис. 7. Частка активованих нейтрофілів (ЧАН) периферичної крові мишей (M ± m, n = 6). * P < 0,05 порівняно з контролем, # P < 0,05 порівняно з групою «Діабет»*

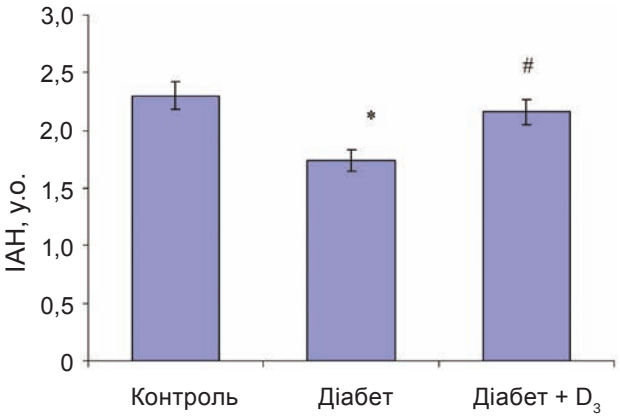

*Рис. 8. Індекс активності нейтрофілів (ІАН) периферичної крові мишей (M ± m, n = 6). * P < 0,05 порівняно з контролем, # P < 0,05 порівняно з групою «Діабет»*

ОБЕСПЕЧЕННОСТЬ ОРГАНИЗМА ВИТАМИНОМ D_3 И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТИРУЮЩИХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-ГО ТИПА

Д. О. Лабудзинский, И. А. Шиманский, В. М. Рясный, Н. Н. Великий

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: konsument3@gmail.com

Исследование посвящено определению взаимосвязи между уровнем обеспеченности организма витамином D_3, содержанием изоэнзимов витамин D_3 25-гидроксилазы CYP27A1 і CYP2R1 в ткани печени и функциональной активностью фагоцитов периферической крови мышей при экспериментальном сахарном диабете 1-го типа. Показано, что сахарный диабет сопровождается витамин D_3-дефицитным состоянием, которое характеризуется снижением содержания $25OHD_3$ в сыворотке крови и связано с изменением экспрессии основных изоформ витамин D_3 25-гидроксилазы: синтез CYP27A1 существенно уменьшается, а CYP2R1 увеличивается. При введении холекальциферола выявлена нормализация тканевого уровня исследуемых изоэнзимов и содержания $25OHD_3$. Недостаточное обеспечение организма животных витамином D_3 при сахарном диабете коррелирует со снижением фагоцитарной активности гранулоцитов и моноцитов и их способности продуцировать бактерицидные биооксиданты (активные формы кислорода и азота). Продемонстрировано корректирующее влияние витамина D_3 на эти процессы, что свидетельствует о важной иммунорегуляторной роли холекальциферола в обеспечении механизмов фагоцитарной элиминации инородных агентов гранулоцитами и моноцитами крови.

Ключевые слова: витамин D_3, $25OHD_3$, CYP27A1, CYP2R1, фагоцитоз, АФК, экспериментальный сахарный диабет 1-го типа.

VITAMIN D_3 AVAILABILITY AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD PHAGOCYTES IN EXPERIMENTAL TYPE 1 DIABETES

D. O. Labudzynskyi, I. O. Shymanskyy, V. M. Riasnyi, M. M. Veliky

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: konsument3@gmail.com

The study was devoted to identifying the relation between vitamin D_3 availability (assessed by the level of circulatory $25OHD_3$), content of vitamin D_3 25-hydroxylase isozymes CYP27A1 and CYP2R1 in hepatic tissue and functional activity of peripheral blood phagocytes in mice with experimental type 1 diabetes. It has been shown that diabetes is accom-

panied by the development of vitamin D_3-deficiency which is characterized by decreased $25OHD_3$ content in blood serum and determined by changes in tissue expression of the major isoforms of vitamin D_3 25-hydroxylase. The level of hepatic CYP27A1 was revealed to be markedly reduced with a concurrent significant augmentation of CYP2R1. Cholecalciferol administration resulted in normalization of tissue levels of both isoforms of vitamin D_3 25-hydroxylase and blood serum $25OHD_3$ content. Diabetes-associated vitamin D3 deficiency correlated with a decrease in phagocytic activity of granulocytes and monocytes, and their ability to produce antibacterial biooxidants such as reactive oxygen and nitrogen forms. Vitamin D_3 efficacy to attenuate these abnormalities of immune function was established, indicating an important immunoregulatory role of cholecalciferol in the phagocytic mechanism of antigens elimination implemented by granulocytes and monocytes.

Key words: vitamin D_3, $25OHD_3$, CYP27A1, CYP2R1, phagocytosis, ROS, experimental type 1 diabetes.

1. *Joshi S.K., Shrestha S.* // Kathmandu Univ. Med. J. – 2010. – **8**, N 29. – P. 109–115.
2. *Salsali A., Nathan M.* // Am. J. Ther. – 2006. – **13**, N 4. – P. 349–361.
3. *Pittas A. G., Dawson-Hughes B.* // Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2010. – **121**, N 1–2. – P. 425–429.
4. *Baeke F., Takiishi T., Korf H. et al.* // Curr. Opin. Pharmacol. – 2010. – **10**, N 4. – P. 482-496.
5. *Cooper J. D., Smyth D. J., Walker N. M. et al.* // Diabetes. – 2011. – **60**, N 5. – P. 1624–1631.
6. *Ramos-Lopez E., Brück P., Jansen T., Herwig J., Badenhoop K.* // Diabetes Metab. Res. Rev. – 2007. – **23**, N 8. – P. 631–636.
7. *Mohammadnejad Z., Ghanbari M., Ganjali R. et al.* // Mol. Biol. Rep. – 2012. – **39**, N 2. – P. 831–837.
8. *Devaraj S., Yun J. M., Duncan-Staley C. R., Jialal I. et al.* // Am. J. Clin. Pathol. – 2011. – **135**, N 3. – P. 429–433.
9. *Комісаренко Ю. І., Скрипник Р. Л., Антоненко О. В.* // Ендокринологія. – 2012. – **27**, № 4. – С. 56–58.
10. *Sachin Arora, Shreesh K. Ojha, Divya Vohora* // Global J. Pharmacol. – 2009. – **3**, N 2. – P. 81–84.
11. *Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н.* Статистические методы в биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2000. – С. 320.
12. *Harper D. R., Murphy G.* // Anal. Biochem. – 1991. – **192**, N 1. – P. 59–63.
13. *Герасимов И. Г.* // Цитология. – 2000. – **42**, № 2. – С. 160–165.
14. *Виксман М. Е., Маянский А. Н.* Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: Метод. рекомендации. – Казань: Казанский НИИЭМ, 1979. – С. 11.
15. *Hussein A. G., Mohamed R. H., Alghobashy A. A.* // Cell Immunol. – 2012. – **279**, N 1. – P. 42–45.
16. *Shinkyo R., Sakaki T., Kamakura M. et al.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – **324**, N 1. – P. 451–457.
17. *Hollander D., Rim E., Morgan D.* // Am. J. Physiol. – 1979. – **236**, N 4. – P. 441–445.
18. *Reboul E., Goncalves A, Comera C. et al.* // Mol. Nutr. Food Res. – 2011. – **55**, N 5. – P. 691–702.
19. *Стефанов М. В., Апуховская Л. И.* // Укр. біохім. журн. – 1996. – **68**, № 1. – С. 66–72.
20. *Mathieu C., Gysemans C., Giulietti A., Bouillon R.* // Diabetologia. – 2005. – **48**, N 7. – P. 1247–1257.
21. *Takiishi T., Gysemans C.* // Rheum. Dis. Clin. North. Am. – 2012. – **38**, N 1. – P. 179–206.
22. *Дрель В. Р.* // Біологічні студії. – 2010. – **4**, № 2. – С. 141–158.
23. *Шиманський І. О., Кучмеровська Т. М., Донченко Г. В. та ін.* // Укр. біохім. журн. – 2002. – **74**, № 5. – С. 89–95.
24. *Marée A. F., Komba M., Finegood D. T., Edelstein-Keshet L.* // J. Appl. Physiol. – 2008. – **104**, N 1. – P. 157–169.
25. *Гузик М. М., Дякун К. О., Яніцька Л. В., Кучмеровська Т. М.* // Укр. біохім. журн. – 2013. – **85**, № 1. – С. 62–70.
26. *Alba-Loureiro T., Munhoz C. et al.* // Braz. J Med. Biol. Res. – 2007. – **40**. – P. 1037–1044.
27. *Baeke F., Korf H. et al.* // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2010. – **121**, N 1–2. – P. 221–227.

Отримано 21.06.2013