

ІМУНОРЕГУЛЯТОРНІ ЕФЕКТИ ВІТАМІНУ D₃ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1-ГО ТИПУ

Д.О. ЛАБУДЗИНСЬКИЙ, К.Ю. МАНОЙЛОВ, І.О. ШИМАНСЬКИЙ, М.М. ВЕЛИКИЙ

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

Механізм асоційованих з розвитком цукрового діабету порушень функцій клітинної ланки імунного захисту та їх регулювання вітаміном D₃ залишається на сьогодні недостатньо з'ясованим. Робота присвячена вивченню особливостей функціонування Т-клітинної ланки імунного захисту та гуморальної відповіді при штучній імунізації за експериментального цукрового діабету та при довшотривалому введенні вітаміну D₃. Встановлено, що хронічна гіперглікемія за цукрового діабету викликає зниження в 2,3 разу вмісту 25OHD₃ у сироватці – основного маркера-попередника гормонально активних форм вітаміну D₃. Розвиток вітамін D₃-дефіцитного стану супроводжується порушенням проліферативної активності Т-лімфоцитів, зміною співвідношення регуляторної (CD4⁺-позитивні лімфоцити) та цитотоксичної (CD8⁺-позитивні лімфоцити) субпопуляцій. У загальних лізатах Т-лімфоцитів селезінки встановлено зростання вмісту фосфорильованої субодиниці р65 ядерного фактора κВ та посилення її транслокації до ядра. Окрім цього було показано інтенсифікацію гуморальної відповіді IgG на перитоніальне введення рекомбінантної субодиниці В дифтерійного токсину. Виявлені порушення клітинної ланки імунної системи супроводжуються посиленням процесів апоптичної загибелі спленоцитів, детектованої за здатністю мітки Annexin V-GFP зв'язуватися із фосфотидилсерином, який при апоптозі експонується на зовнішній стороні плазмалемі. Тривале введення (протягом 2 місяців) вітаміну D₃ у дозі 20 МО діабетичним тваринам сприяло нормалізації проліферативної активності та співвідношення Т-клітинних субпопуляцій, зменшенню вмісту фосфорильованої субодиниці NF-κB – р65 та збалансованій секреції IgG проти штучного антигена. Ці зміни супроводжувались зменшенням кількості апоптичних подій у цільній популяції спленоцитів. Результати роботи свідчать про вагомий роль вітаміну D₃ у регулюванні функцій імунної системи за цукрового діабету 1-го типу.

Ключові слова: вітамін D₃, 25OHD₃, експериментальний цукровий діабет 1-го типу, Т- і В-лімфоцити, субодиниця р65 NF-κB.

Вступ. Цукровий діабет 1-го типу (ЦД1) є поліетіологічним аутоімунним захворюванням, яке

викликається передчасним руйнуванням інсулін-продукуючих β-клітин підшлункової залози під аутореактивним впливом імунної системи, що призводить до гіпоінсулінемії [1]. ЦД1, як правило, діагностується у дітей і підлітків. За результатами обстеження близько 76 000 дітей у віці менше 15 років виявлено, що захворюваність на ЦД1 у молоді прогресує в середньому на 3 % (діапазон 2–5 %) щорічно [2]. Ключовим фактором, який призводить до виникнення ускладнень цукрового діабету і діабетопосередкованих захворювань, є хронічна гіперглікемія [3]. У більшості випадків гіперглікемія розвивається із різною швидкістю на фоні аутоімунного ураження β-клітин підшлункової залози, яке у великій мірі індукується Т-клітинною ланкою імунітету [4], причому у патогенезі діабету визначальними є обидві субпопуляції Т-клітинної ланки – як CD4⁺, так і CD8⁺-лімфоцити. Інші типи імунних клітин, включаючи НК (натуральні кілери), В-лімфоцити, макрофаги і дендритні клітини, у різній мірі також залучені до імунопатологічних процесів виникнення та розвитку ЦД1. На різних експериментальних моделях ЦД1 продемонстровано, що субпопуляція CD4⁺ CD25⁺ відіграє ключову роль у підтриманні природної ауто толерантності та запобіганні системним аутоімунним реакціям, а також у регулюванні прозапальних процесів [5]. Активовані аутореактивні CD4⁺-лімфоцити першими інфільтруються у тканині острівців Лангерганса, продукуючи широку панель прозапальних цитокінів, які додатково активують макрофаги, В-лімфоцити та інші Т-клітини [6]. Крім субпопуляції активованих CD4⁺-клітин, важливу роль у розвитку ЦД1 та його ускладнень відіграє субпопуляція CD8⁺-лімфоцитів. Останні дослідження довели, що порушення процесів активації, хоумінгу та хемотаксису аутореактивних CD8⁺-клітин залучені у механізми руйнування β-клітин підшлункової залози та сприяють генералізації запального процесу як під

час острівцевої інфільтрації, так і в організмі в цілому [7]. Дослідження на мишах показали, що комплексна терапія антитілами проти-CD4⁺ і проти-CD8⁺ ефективно попереджувала розвиток аутоімунних уражень ендокринної частини підшлункової залози та запобігала розвитку проявів експериментального діабету [8]. Індуковане пригнічення CD8⁺ Т-клітинної ланки зумовлює підвищення стійкості підшлункової залози до ураження та загальне зниження інфільтрації острівців Лангерганса лімфоцитами [9]. Слід зазначити, що за ЦД1 спостерігаються суттєві аномалії у кількості та диспропорції клітин субпопуляцій CD4⁺ і CD8⁺ Т-клітинної ланки у периферичній крові та лімфатичних вузлах, особливо в селезінці [10]. Ці розлади у співвідношенні Т-лімфоцитів ведуть до істотних системних змін цитокинового профілю як в лімфатичній тканині та підшлунковій залозі, так і в організмі в цілому. Зокрема спостерігається активація секреції Т- та В-лімфоцитами компонентів RANK/RANKL/OPG сигнального шляху, який відіграє ключову роль у процесах формування та ремоделювання кісткової тканини [11].

Добре відомо, що вітамін D₃ (холекальциферол) є важливим регулятором обміну кальцію і фосфору в організмі хребетних, ключовим фактором остеогенезу та ремоделювання кісткової тканини. Крім цього, гормонально активні форми вітаміну D₃ проявляють ряд інших біологічних ефектів, не пов'язаних з участю у регулюванні гомеостазу кісткової тканини. Зокрема встановлено здатність вітаміну D₃ впливати на функціональну активність ряду клітин імунної системи, результатом чого є модулювання як вродженої, так і набутої імунної відповіді. Дослідження імунорегуляторних властивостей гормонально активної форми вітаміну D₃ – 1,25(OH)₂D₃ тісно пов'язане із відкриттям VDR (рецептори гормонально активних форм вітаміну D₃) у багатьох типах імунних клітин, в тому числі у активованих CD4⁺ і CD8⁺ Т-лімфоцитах, В-клітинах, гранулоцитах і антиген-презентуючих клітинах (APCs), таких як макрофаги і дендритні клітини (DCs) [12, 13]. У той час як наївні Т-клітини містять незначну кількість VDR, цей рецептор у великій кількості експресується в активованих Т-клітинах [14]. Важливо, що експресія VDR рецепторів у клі-

тинах імунної системи пов'язана із залученням імунних шляхів трансдукції сигналу, зокрема із функціонуванням прозапального сигнального шляху ядерного фактора κB (NF-κB) [15]. Більш того, в імунних клітинах має місце регуляція транскрипції ензимів синтезу гормонально активних форм вітаміну D₃, що зумовлює локальне перетворення неактивної форми вітаміну D₃ у активну 1,25(OH)₂D₃ локально, в межах клітин імунної системи [16]. Дефіцит холекальциферолу спричиняє посилення проліферації Т-лімфоцитів, зокрема формування Т-хелперів 1-го типу, та збільшення продукції прозапальних цитокінів. Встановлено, що 1,25(OH)₂D₃ пригнічує проліферацію Th1-клітин і продукцію ними цитокінів, знижує секрецію IL2 та IFNγ клітинами CD4⁺, а також стимулює утворення IL5 та IL10, внаслідок чого імунна система перемикається з проліферування Th1 на формування Th2 [17]. Таким чином, 1,25(OH)₂D₃ відіграє важливу роль у підтриманні імунного гомеостазу. Виходячи із зазначеного, метою роботи було дослідити вплив забезпеченості організму вітаміном D₃ (за рівнем 25OHD₃ в сироватці крові) на Т-клітинну ланку та гуморальну відповідь при введенні рекомбінантного антигена SB у мишей за експериментального цукрового діабету 1-го типу.

Матеріали і методи. Дослідження проводилися на самцях мишей лінії C56Bl/J6 масою 21 ± 3 г. Діабет 1-го типу викликали п'ятиразовим введенням стрептозотоцину (STZ, Sigma-Aldrich, США) у дозі 40 мг/кг ваги тіла тварини. Такий спосіб введення STZ є загальноприйнятим для індукції розвитку експериментального аутоімунного діабету 1-го типу у піддослідних мишей. 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 D₃ (DSM, Нідерланди) впродовж 2,5 місяців у вигляді водної суспензії (800 МО/кг маси тіла, *per os*). Контрольні тварини утримувались на повноцінному раціоні віварію. В період адаптації (тиждень) та під час експерименту тварини знаходились у віварії при температурі 18–22 °C, вологості 50–60 %, природному світловому режимі «день–ніч» у стандартних пластикових клітках з вільним доступом їх до їжі та води та з додержанням «За-

гальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001). Мишей декапітували, використовуючи для наркозу диетиловий ефір. Підбір тварин та формування груп проводили за методом «випадкових чисел». Про забезпеченість організму мишей вітаміном D₃ судили за рівнем 25ОНD₃ сироватки крові, який визначали імуноензимним методом (набір ELISA, Immunodiagnostic Systems Ltd., США).

Селезінку видаляли та поміщали в середовище RPMI-1640. Спленоцити отримували механічним розтиранням органу на дрібнопористому ситі. Популяційний склад спленоцитів оцінювали за допомогою використання мічених флуоресцентними барвниками антитіл проти CD4 та CD8 клітинних детермінант (ANTI-MS-CD8A PER-CP #MCD0831, RT-X-MS-CD4 FITC, #MCD0401, Invitrogen). Інкубацію з антитілами здійснювали 30 хв на льоду в сольовому розчині Дюльбекко (рН 7,6) з додаванням 15 ммоль HEPES, 0,1 % азиду натрію та 2 % фетальної телячої сироватки. Після відмивання клітини фіксували в 2%-ному розчині параформальдегіду з рН 7,4. Підрахунок відносної кількості мічених лімфоцитів проводили з використанням протокового цитофлуориметра Epics XL (Beckman Coulter).

Проліферацію спленоцитів *in vitro* оцінювали після їх стимуляції фітогемаглютиніном (ФГА, 10 мкг/мл, Sigma-Aldrich GmbH). Клітини культивували в середовищі RPMI-1640, що містило 10 % ембріональної телячої сироватки, 20 ммоль HEPES, 10 ммоль/л 2-меркаптоетанолу, 100 од/мл бензилпеніциліну, 0,1 мг/мл стрептоміцину, протягом 72 год при температурі 37 °С. Індекс стимуляції (ІС), що відповідає інтенсивності проліферації лімфоцитів, вимірювали колориметрично за допомогою методу, що ґрунтується на здатності живих клітин до хімічного відновлення МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide, Sigma) [18]. За 2 год до завершення інкубації в кожному лунку 96-лункового планшета Multi-Sorp (NUNC™, Данія), що містили по 1·10⁶ клітин спленоцитів, додавали по 10 мкл 5%-ного розчину МТТ. Через 2 год в кожному лунку додавали по 150 мкл 0,04 N розчину HCl в ізопропіловому спирті, ретельно перемішували (до повного розчинення осаду, що утворився) і вимірювали оптичну густина надоса-

дової рідини на автоматичному мікроспектрофотометрі μQuant («Biotek», США) при довжині хвилі 540 нм. Результати розраховували за формулою та виражали в умовних одиницях: ІС = оптична густина досліджуваного зразка (мітогенактивованих культур спленоцитів)/оптична густина контрольного зразка (без мітогена).

Т-клітини виділяли із суспензії спленоцитів на колонках із нейлоною ватою (Polysciences, Inc.) за методикою, наданою виробником. Кількість клітин підраховували у камері Горяєва з використанням розчину Тюрка.

Вміст фосфорильованої субодиниці p65 ядерного фактора NF-κB у Т-лімфоцитах селезінки визначали методом вестерн-блоту [19], використовуючи анти-p65 NF-κB поліклональні антитіла (sc33039, Santa Cruz, США). Інтенсивність сигналів на рентгенівських плівках обраховували за допомогою програми GelPro32 [20].

Візуалізація експресії та транслокації p65 NF-κB у Т-лімфоцитах селезінки здійснювалася методом імуноцитохімії з використанням ядерного барвника Hoechst 33258 («Invitrogen», США) та Anti-p65 NF-κB polyclonal antibody (Santa Cruz, США) на конфокальному мікроскопі LSM 510 META [21].

Імунізацію тварин в контексті дослідження гуморальної відповіді проводили за прийнятою схемою. Рекombінантну субодиницю В (SB) дифтерійного токсину масою 50 мкг, який містився в 50 мкл ТBS (50 ммоль Tris-Cl, рН 7,4; 150 ммоль NaCl), емульгували з рівним об'ємом повного ад'юванту Фрейнда («Sigma», США). Отриману емульсію вводили мишам інтраперитоніально. Повторну імунізацію (І буст) виконували через два тижні за тих самих умов, але з використанням неповного ад'юванту Фрейнда («Sigma», США). Забір крові (блідінг) для аналізу проводили на 21-у добу після останнього введення антигена.

За допомогою імуно-ензиматичного аналізу (ІЕА) встановлювали титр антитіл у сироватці крові імунізованих мишей. Для цього до лунок 96-лункового мікропланшета вносили SB, розчинену в NaPBS (0,2 M Na₂HPO₃·H₂O, 0,2 M NaH₂PO₃) у концентрації 1 мкг на 100 мкл розчину, або 1%-й розчин бичачого сироваткового альбуміну (BSA) («Sigma», США) у тому самому об'ємі (контроль неспецифічно-

го зв'язування досліджуваних антитіл). Сорбція протеїнів на поверхні лунок тривала 14–16 год при 4 °С. Після імобілізації антигени, що не зв'язалися, видаляли, плашку відмивали п'ять разів дистильованою водою і п'ять разів NaPBS, рН 7,4. Далі до лунок вносили по 200 мкл 3%-ного розчину знежиреного молока й інкубували протягом 1 год за 37 °С для блокування неспецифічного зв'язування антитіл. Імунну сироватку вносили в серії розведень (1/100 — 1/200 000). Для контролю специфічності імунної відповіді паралельно проводили аналіз сироватки неімунізованої миші. Інкубацію з первинними антитілами здійснювали при 37 °С протягом 1 год. Антитіла, що не зв'язалися, видаляли п'ятиразовим промиванням NaPBS, рН 7,4.

Вторинні антитіла проти IgG кроля, кон'юговані з пероксидазою хрону («Sigma», США) (1.11.1.7), розводили в NaPBS, рН 7,4, з 0,025 % Tween-20 (NaPBST) у співвідношенні 1:30 000, вносили до лунок мікропланшета в об'ємі 100 мкл та інкубували при 37 °С протягом 1 год. Відмивання від вторинних антитіл, що не зв'язалися, проводили у п'яти змінах дистильованої води, п'яти змінах NaPBST, рН 7,4. Комплекси антиген – антитіло виявляли, використовуючи субстрат пероксидази хрону ТМВ («Sigma Diagnostics», США). Для цього розчиняли 50 мкл 0,1%-ного розчину ТМВ (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine) у 5 мл 0,01 М розчину ацетатного буфера рН 3,3, додаючи 10 мкл 3 % H₂O₂, і вносили до лунок в об'ємі 100 мкл. Оптичну густину вимірювали при $l = 450$ нм на рідері Multiscan EX («Thermo Electron Corporation», Фінляндія) з використанням відповідного програмного забезпечення через 10 хв після внесення розчину субстрату.

Апоптичні зміни детектували методом протокової цитофлуориметрії із застосуванням кон'югованого із GFP аннексину V (Annexin V-EGFP Apoptosis Kit, BioVision Inc.).

Статистичну обробку одержаних даних здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel 2007, до складу якої входить визначення стандартного t-критерію Ст'юдента для некорельованих вибірок.

Результати досліджень та їх обговорення. Ключовим показником розвитку цукрового діабету є гіперглікемія. Вимірювання рівня глюкози у крові тварин за ЦД (таблиця) засвідчило значне її підвищення до $21,3 \pm 4,4$ ммоль/л порівняно з $5,6 \pm 1,2$ у інтактних мишей. У тварин, яким вводився холекальциферол, середній рівень глюкози становив $16,2 \pm 3,6$ ммоль/л. Хронічне запалення, асоційоване з гіперглікемією, збільшення числа Т-клітинних субпопуляцій, ураження панкреатичних острівців, підвищення концентрації розчинних медіаторів апоптозу β-клітин та титру аутореактивних антитіл до них відображають генералізацію клітинно-опосередкованого аутоімунного процесу та системні порушення імунного гомеостазу [22].

Як було сказано раніше, деструкція β-клітин підшлункової залози і, як наслідок, розвиток ЦД1 та його ускладнень є Т-лімфоцит-опосередкованим процесом [6]. Важливим показником, який у значній мірі ілюструє стан аутоімунних процесів в організмі, є співвідношення субпопуляцій CD4⁺- та CD8⁺-лімфоцитів [23, 24]. За даними протокової цитофлуориметрії із використанням антитіл з флуоресцентною міткою проти-CD4⁺ та -CD8⁺ встановлено, що за цукрового діабету відбувається вірогідне підвищення індексу співвідношення CD4⁺- до CD8⁺-лімфоцитів периферичної крові у 1,25 разу

Вміст 25ОНD₃ та глюкози у сироватці за експериментального цукрового діабету 1-го типу та при введенні вітаміну D₃, $M \pm m$, $n = 6$

Група	Вміст 25ОНD ₃		Рівень глюкози у крові, ммоль/л
	нмоль/л	нг/мл	
Контроль	$83,8 \pm 4,06$	$33,5 \pm 1,69$	$5,6 \pm 1,2$
Діабет	$36,2 \pm 1,95$ *	$14,5 \pm 0,77$ *	$21,3 \pm 4,4$ *
Діабет + D ₃	$78,4 \pm 5,39$ **	$31,4 \pm 2,05$ **	$16,2 \pm 3,6$ *

* Різниця порівняно з контролем вірогідна ($p < 0,05$). **Різниця порівняно з групою «Діабет» вірогідна ($p < 0,05$).

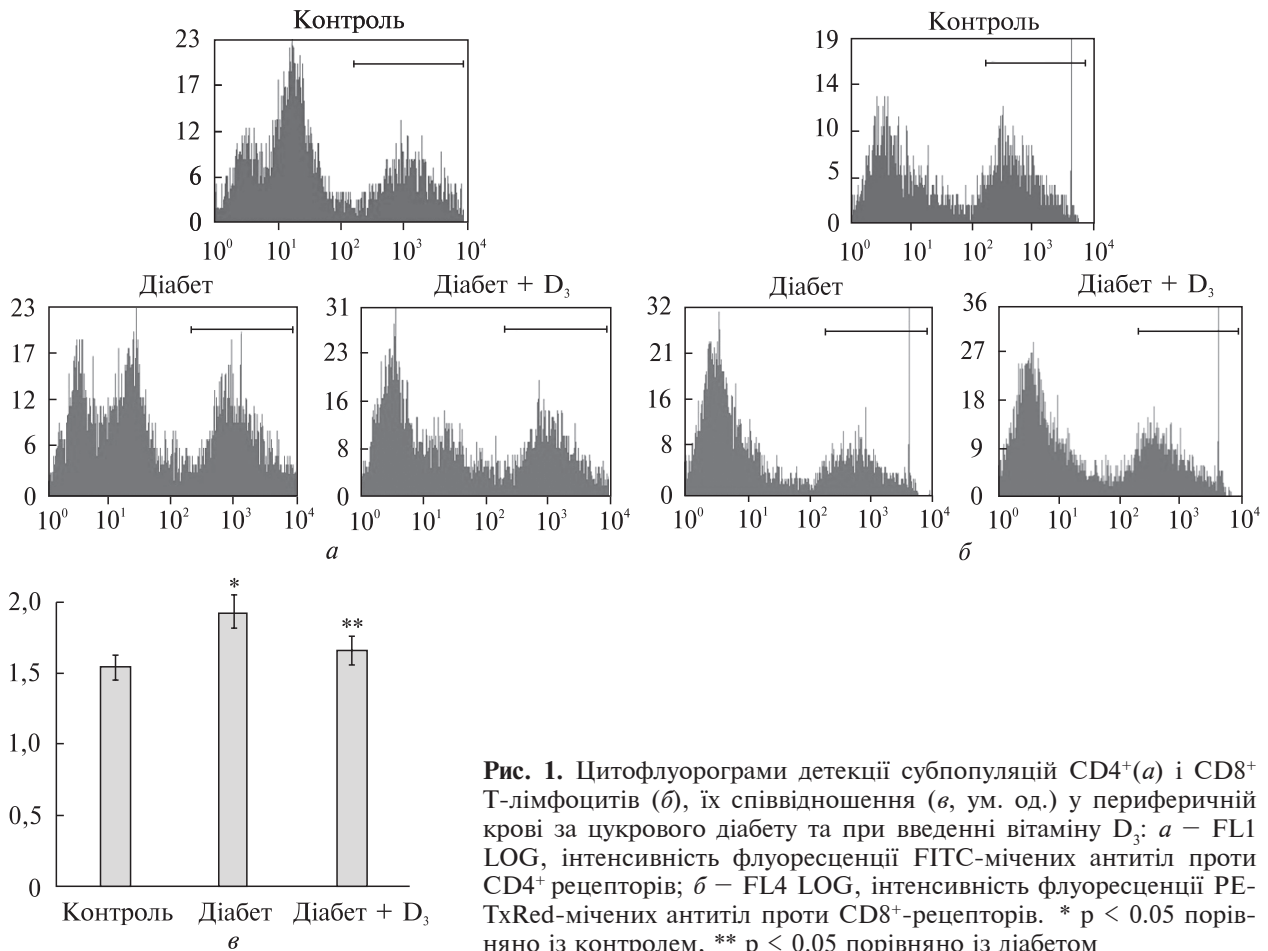


Рис. 1. Цитофлуорограми детекції субпопуляцій CD4⁺(а) і CD8⁺ Т-лімфоцитів (б), їх співвідношення (в, ум. од.) у периферичній крові за цукрового діабету та при введенні вітаміну D₃; а – FL1 LOG, інтенсивність флуоресценції FITC-мічених антитіл проти CD4⁺ рецепторів; б – FL4 LOG, інтенсивність флуоресценції PE-TxRed-мічених антитіл проти CD8⁺-рецепторів. * p < 0.05 порівняно із контролем, ** p < 0.05 порівняно із діабетом

порівняно із контролем (p < 0,05) (рис. 1). У селезінці за експериментального цукрового діабету спостерігалось також значне підвищення CD4⁺-/CD8⁺-співвідношення (в 1,27 разу) порівняно із контролем (p < 0,05) (рис. 2). Таке підвищення може зумовлюватись, зокрема, стрімким зростанням кількості Th1- та Th17-клітин (на відміну від Th2), які орієнтовані на секрецію прозапальних цитокінів і сприяють генералізації запалення. Показано, що стрімке зростання Th1- та Th17-клітин спостерігається за аутоімунних захворювань, у тому числі і за ЦД1 [25].

Добре відомо, що хронічна гіперглікемія негативно впливає на функціональні властивості клітин імунної системи. Такі зміни стосуються ключових функцій гранулоцитів: хемотаксис, хемокінез, фагоцитоз та генерування бактерицидних біооксидантів [26]. За ЦД1 у значній

мірі порушуються механізми презентації антигена АГ-презентуючими клітинами та формування гуморальної відповіді [27]. Наші дослідження показали, що індекс проліферативної активності цільної популяції Т-лімфоцитів селезінки, індукованих ФГА, знижується в 1,85 разу за експериментального цукрового діабету порівняно із контрольними значеннями (p < 0,05) (рис. 3). Ці зміни можуть бути пов'язані із зниженим рівнем інсуліну, який має регуляторний вплив на проліферативну активність різних типів клітин. Разом з тим можливий гальмівний вплив гіперглікемії на експресію ензиму аденозинкінази, що зумовлює значне підвищення клітинного вмісту цАМФ та подальшу надактивацію сигнального шляху протеїнкінази А, що чинить супресорний вплив на проліферативні процеси у клітинах Т-лімфоцитів [28].

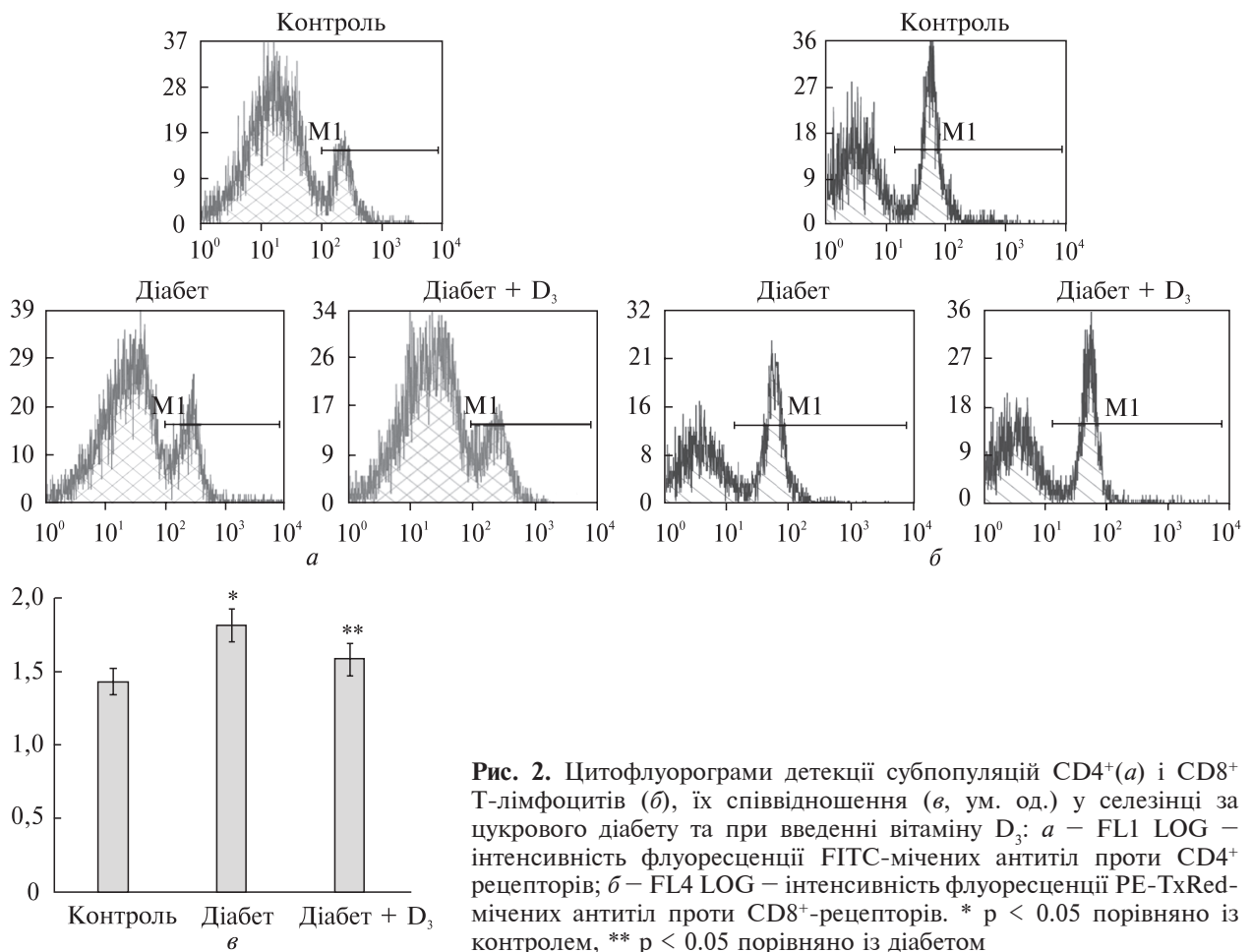


Рис. 2. Цитофлуорограми детекції субпопуляцій CD4⁺(a) і CD8⁺ Т-лімфоцитів (б), їх співвідношення (в, ум. од.) у селезінці за цукрового діабету та при введенні вітаміну D₃; а – FL1 LOG – інтенсивність флуоресценції FITC-мічених антитіл проти CD4⁺ рецепторів; б – FL4 LOG – інтенсивність флуоресценції PE-TxRed-мічених антитіл проти CD8⁺-рецепторів. * p < 0.05 порівняно із контролем, ** p < 0.05 порівняно із діабетом

Процес активації Т-лімфоцитів залежить від узгодженої експресії багатьох регуляторних факторів, як тих, що стимулюють клональну селекцію та експансію Т-клітин (наприклад, IL-2/IL-2R), так і тих, що регулюють ініціацію клітинної загибелі (AICD) [29]. При цьому існують деякі транскрипційні фактори, які здатні регулювати процеси активації, проліферації та клітинної загибелі в комплексі. Зокрема доведено є роль транскрипційного фактора NF-κB, що є плейотропним регулятором багатьох індукційних генів, залучених у процеси запалення та імунної відповіді, серед яких IL-1 і IL-6, TNF-α, лімфотоксин, колонієстимулюючий фактор росту гранулоцитів і макрофагів (GM-CSF) та IFNγ [30]. Більш того, нещодавно встановлено значну роль NF-κB саме як регулятора Т-клітинної активації та апоптозу

в експериментах із тимоцитами, периферичними Т-лімфоцитами та Т-клітинними гібридомами [30]. Таким чином, у даній роботі важливо було з'ясувати вміст фосфорильованої субодиниці p65 (активованої) самого транскрипційного фактора κB та її ядерної транслокації у клітинах Т-лімфоцитів за цукрового діабету. Результати дослідження вказують на істотне зростання, у 2,18 разу, вмісту фосфорильованої субодиниці p65 NF-κB в клітинах цільної популяції Т-лімфоцитів селезінки за експериментального цукрового діабету порівняно із контрольними тваринами (p < 0,05) (рис. 4). Як видно з даних конфокальної мікроскопії (рис. 5), транслокація активованої субодиниці p65 здійснюється у ядро із навколоядерної ділянки цитоплазми. Зазвичай цьому передуює процес дезагрегації неактивовано-

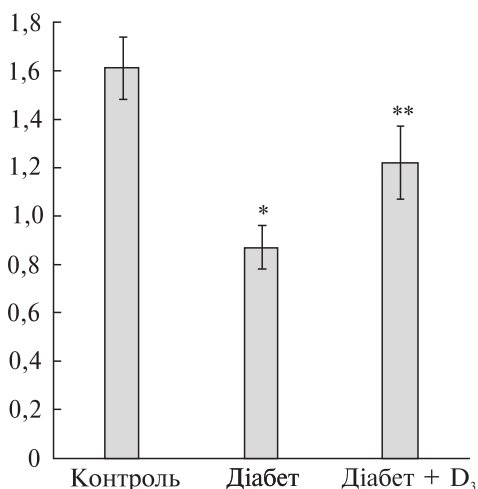


Рис. 3. Індекс ФГА-індукованої проліферативної активності спленоцитів мишей (по вертикалі) за цукрового діабету та при введенні вітаміну D₃ ($M \pm m$, $n = 6$). * $p < 0,05$ у порівнянні з контролем, ** $p < 0,05$ у порівнянні з групою «Діабет»

го гетеродимера, який ініціюється поетапним фосфорилуванням усіх компонентів комплексу, включаючи інгібіторну субодиницю I κ B та p65 [30].

Розвиток ЦД1 і його ускладнень також тісно пов'язаний зі змінами у функціонуванні В-клітинної ланки імунітету. Системне порушення імунотолерантності до власних тканинних антигенів спричиняє зростання аутореактивності до власних протеїнів: активацію презентації аутоантигена іншим клітинам імунної системи (зокрема, макрофагам і CD8⁺ Т-цитотоксичним клітинам) як чужорідних антигенів та значне посилення продукції аутоантитіл [32]. На фоні активізації аутоімунних процесів відбуваються докорінні зміни в ідентифікації, презентуванні екзогенних антигенів (у тому числі збудників інфекційних захворювань) та гуморальній відповіді в цілому. Результати ІЕА сироватки піддослідних мишей, імунізованих рекомбінантною субодиницею В (SB) дифтерійного токсину, подано на рис. 6. Отримані дані свідчать про наявність імунної відповіді на повторне введення антигена і вказують на присутність антитіл, які специфічно реагують з протеїном SB у такому порядку: група «діабет» > група «діабет + вітамін D₃» > група «контроль імунізації» > група «контроль без

імунізації». Як видно з рис. 6, зв'язування IgG сироватки неімунізованих тварин, що використовувалася для контролю специфічності імунної відповіді, із зазначеним антигеном не відбувалося і дорівнювало значенням у групі контролю із BSA. При цьому максимальні значення титру IgG проти SB детектували у сироватці тварин із цукровим діабетом. У випадку внесення антисироватки цієї групи в найменшому розведенні (1/100) значення оптичної густини були нижчими за такі для більшого розведення (1/1000), що свідчить про присутність надлишку сироваткових протеїнів у реакційній суміші й маскуванню місць взаємодії вторинних антитіл з IgG, які зв'язалися з SB, або наявності в антисироватці антиідіотипічних антитіл [32]. Таким чином, за цукрового діабету спостерігається помітне зростання гуморальної відповіді IgG при імунізації рекомбінантною субодиницею дифтерійного токсину порівняно із контролем.

Важливо, що збільшення кількості апоптичних подій у популяції CD8⁺ Т-клітин селезінки пов'язують із надекспресією рецептора IFN 1-го типу. В свою чергу високий вміст рецептора IFN 1 призводить до пригнічення ІЛ-7-опосередкованої активації STAT5- та АКТ-сигнальних шляхів, які є ключовими антиапоптичними чинниками для Т-лімфоцитів [33]. Отримані у роботі результати дослідження апоптичної загибелі клітин за інтенсивністю флуоресценції аннексину V демонструють понад 3,5-разове збільшення інтенсивності флуоресценції апоптичних подій у популяції лімфоцитів селезінки за цукрового діабету порівняно із контролем ($p < 0,05$) (рис. 7).

Як показали останні дослідження, гормонально активні форми вітаміну D₃ через їх рецептори здійснюють значний регуляторний вплив на функціонування ряду клітин імунної системи [14]. Найбільш об'єктивним та інформативним показником ступеня забезпеченості організму вітаміном D₃ є вміст 25OH D₃ у сироватці крові, який знаходиться в межах 100–150 нмоль/л (40–60 нг/мл). Зниження вмісту 25OH D₃ у сироватці крові нижче 75 нмоль/л свідчить про розвиток D-гіповітамінозного стану [34]. Усі встановленні в роботі порушення у функціонуванні як Т-, так і В-клітинної ланок імунної системи спостерігалися на фоні

зниження вмісту 25ОНD₃ у 2,5 разу в сироватці крові діабетичних тварин порівняно з контрольними тваринами. Це відображає глибокий дефіцит вітаміну в організмі та гальмування утворення його біологічно активних гідроксильованих форм за ЦД1.

Введення вітаміну D₃ за цукрового діабету показало зниження співвідношення CD4⁺- до CD8⁺-лімфоцитів у периферичній крові та селезінці у 1,15 та 1,16 разів відповідно ($p < 0,05$), (рис. 1 і 2). Зазначено також, що індекс проліферативної активності цільної популяції Т-лімфоцитів селезінки, індукованих ФГА, зростав у 1,4 разу при введенні вітаміну D₃ порівняно із групою цукрового діабету ($p < 0,05$) (рис. 3).

На фоні тривалого введення холекальциферолу спостерігалось зменшення вмісту фосфорильованої форми субодиниці p65 NF-κB у лізатах цільної популяції Т-лімфоцитів селезінки мишей на 31 % порівняно із групою цукрового діабету ($p < 0,05$) (рис. 4). Імовірним механізмом, який це пояснює, може стати пряма протеїн-протеїнова взаємодія VDR з кіназою ІККβ та наступне пригнічення функцій останньої. Оскільки саме ІККβ, фосфорилуючи інгібіторну субодиницю ІκB, спричиняє подальшу дисоціацію гетеродимера NF-κB-ІκB і активацію p65, то її інгібування може призводити до пригнічення активності субодиниці p65 [35]. Гальмувальний ефект холекальциферолу на клітинний рівень фосфорильованої форми субодиниці p65 NF-κB та її ядерну транслокацію підтверджують також дані конфокальної мікроскопії (рис. 5).

Як показав аналіз сироваток мишей, імунізованих SB, нормалізація рівня IgG проти даного антигена порівняно із групою цукрового діабету (рис. 6) корелювала із тривалістю терапевтичного введення холекальциферолу. Такий регуляторний ефект міг бути зумовлений фактом експресії активованими лімфоцитами VDR на відміну від неактивованих. І як наслідок, 1,25(ОН)₂D₃ через VDR пригнічує надактивацію, проліферацію, надмірне утворення та секрецію імуноглобулінів, а також регулює «апоптичні терези» в активованих В-лімфоцитах [36].

Слід також зазначити, що введення вітаміну D₃ корелювало із 1,3-разовим зменшенням інтенсивності флуоресценції аннексину V у популяції лімфоцитів селезінки порівняно із гру-

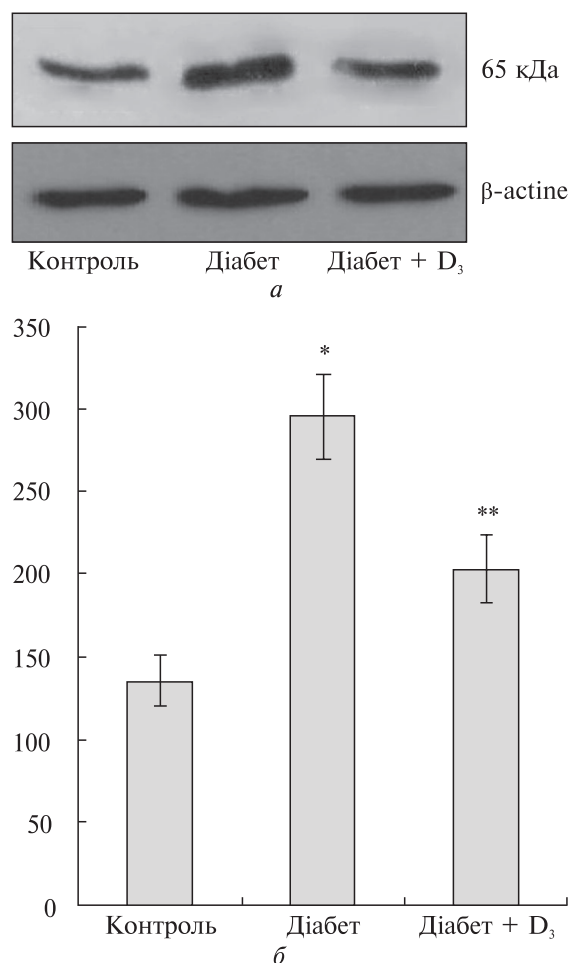


Рис. 4. Рівень фосфорильованої p65/NF-κB у цільній популяції Т-лімфоцитів селезінки мишей за цукрового діабету та при введенні вітаміну D₃; *a* – імуноблотограма Т-фосфорильованої p65/NF-κB; *б* – відносний вміст фосфорильованої p65/NF-κB (по вертикалі), ум. од., у Т-лімфоцитах селезінки піддослідних тварин ($M \pm m, n = 6$). * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,05$ порівняно з групою «Діабет»

пою цукрового діабету ($p < 0,05$) (рис. 7). Це свідчить про те, що введення вітаміну D₃ істотно підвищує виживання спленоцитів, знижуючи відсоток загиблих клітин, що може бути обумовлено гальмуванням утворення вільнорадикальних сполук та окисної модифікації біомолекул за хронічної гіперглікемії. За даними літератури кальцитріол (гормональна форма вітаміну D₃) також може посилювати шлях елімінації реактивних форм кисню та азоту, збільшуючи внутрішньоклітинний пул відновленого глутатіону [37].

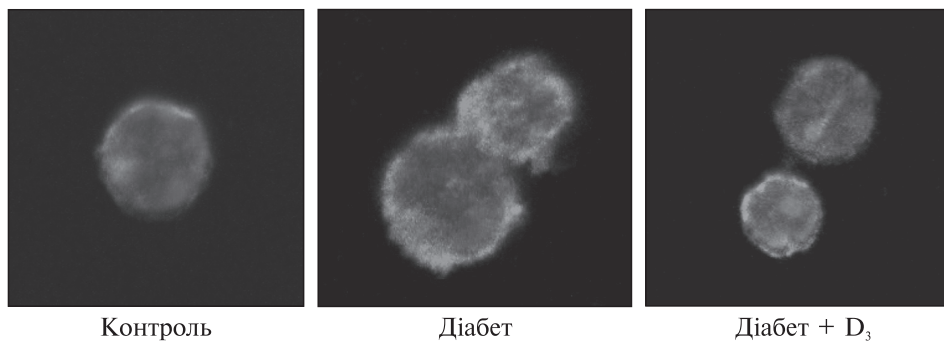


Рис. 5. Імунофлуоресцентний аналіз транслокації активованої субодиниці фосфорильованої p65 NF-κB у клітинах цільної популяції Т-лімфоцитів селезінки методом конфокальної мікроскопії. Ядра помічено барвником Hoechst 33258, а фосфо-p65 детектовано антитілами, кон'югованими із Alexa Fluor 647

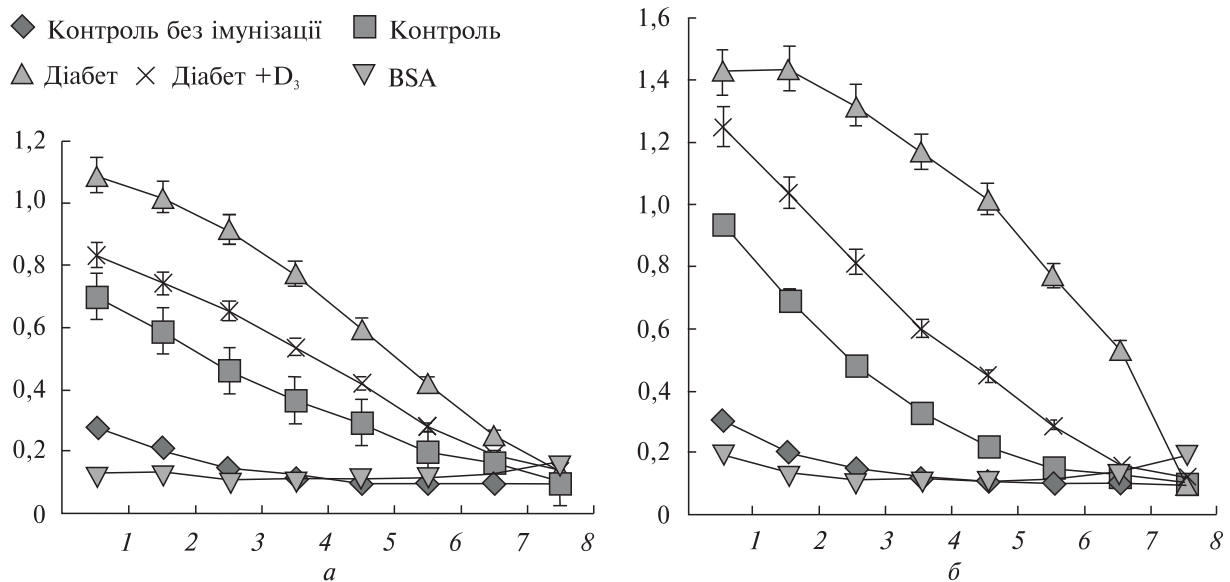


Рис. 6. Взаємодія антисироватки мишей, імунізованих рекомбінантною субодиницею дифтерійного токсину, із імобілізованим SB антигеном. Забір сироватки відбувся на 14-й (а) і на 21-й день (б) після першої імунізації Розведення: 1 – 1/100; 2 – 1/1000; 3 – 1/5000; 4 – 1/10 000; 5 – 1/50 000; 6 – 1/100 000; 7 – 1/200 000; 8 – антисироватка відсутня

Таким чином, аналіз отриманих експериментальних даних демонструє, що за цукрового діабету виникають системні порушення у функціонуванні імунної системи, зокрема її клітинної ланки – Т- і В-лімфоцитів. Хронічна гіперглікемія і генералізоване запалення за цукрового діабету індукують порушення процесів проліферації Т-клітин, співвідношення їх регуляторних і ефекторних субпопуляцій, що спостерігається на фоні істотного збільшення вмісту активованої фосфорильованої субодиниці p65 NF-κB та її транслокації у ядро в цільній

популяції Т-лімфоцитів. Надпродукція IgG проти субодиниці В дифтерійного токсину є свідченням дисбалансу в процесах гуморальної відповіді на фоні інтенсифікації аутоімунних процесів за цукрового діабету. Прямим наслідком порушень функціонування субпопуляцій лімфоцитів за гіперглікемії може бути значне збільшення проапоптичних подій у цільній популяції спленоцитів селезінки. Встановлено, що рівень забезпеченості організму вітаміном D₃ (за вмістом 25OHD₃ у сироватці крові) є істотним фактором у нормалізації структурно-

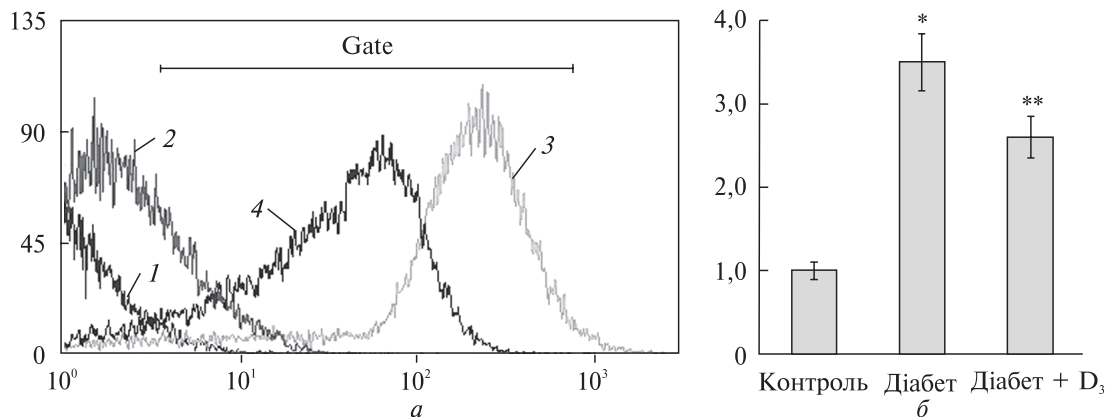


Рис. 7. Узагальнююча гістограма апоптичних змін у популяції лімфоцитів селезінки (а) та її кількісний аналіз (б). На гістограмі зображені піки флуоресценції аннексину В, кон'югованого із GFP: 1 – контроль аутофлуоресценції; 2 – експериментальний контроль; 3 – експериментальний діабет; 4 – введення вітаміну D₃ за цукрового діабету. * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,05$ порівняно з групою ЦД (M ± m, n = 6)

функціональних порушень лімфоцитів, обумовлених тривалою гіперглікемією. Довготривале терапевтичне введення вітаміну D₃ продемонструвало його нормалізуючий вплив на більшість досліджуваних параметрів.

IMMUNOREGULATORY EFFECTS OF VITAMIN D₃ IN EXPERIMENTAL TYPE 1 DIABETES

D.O. Labudzynskyi, K.U. Manoylov, I.O. Shymanskyi, M.M. Veliky

O.V. Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv
E-mail: konsument3@gmail.com

The mechanisms of diabetes-associated impairment of cellular immune defense and its regulation by vitamin D₃ are not fully elucidated. The study was devoted to investigating the functional state of T-cell immunity as well as humoral immune activity in response to artificial immunization in experimental diabetes and after prolonged administration of vitamin D₃. It was established that diabetes is characterized by a 2.3 times decrease in blood serum 25OHD₃ content. Vitamin D₃ deficiency was accompanied by the failures in proliferative activity of T-lymphocytes and alterations of the regulatory (CD4⁺-positive lymphocytes) and cytotoxic (CD8⁺-positive lymphocytes) cell subpopulations. It was found an increase in the content of phosphorylated p65 subunit of nuclear factor κB in total lysates of spleen T lymphocytes and its enhanced translocation to the nucleus. In addition, it was shown intensification of humoral IgG response to administration of recombinant diphtheria toxin subunit B. Revealed impairments in

the cellular link of the immune system were associated with an increase in splenocytes apoptosis, which was detected by Annexin V-GFP ability to bind phosphatidyl serine that is specifically located on the outer surface of plasmalemma in apoptosis. Prolonged vitamin D₃ treatment (within 2 months) in a dose of 20 IU/animal leads to normalization of the proliferative activity and the ratio of T-cell subpopulations, reduces the formation of phosphorylated subunit of NF-κB – p65 and contributes to a balanced secretion of IgG against artificial antigen. These changes were accompanied by a decrease in apoptotic events in the total population of splenocytes. Our findings suggest an important role of vitamin D₃ in the regulation of the immune system abnormalities related to type 1 diabetes.

ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ВИТАМИНА D₃ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-го ТИПА

Д.О. Лабудзинский, К.Ю. Манойлов, И.А. Шиманский, Н.Н. Великий

Механизм ассоциированных с развитием сахарного диабета нарушений функции клеточного звена иммунитета и ее регулирование витамином D₃ остается на сегодняшний день недостаточно изученным. Работа посвящена исследованию особенностей функционирования Т-клеточного звена иммунитета и гуморального ответа при искусственной иммунизации в условиях экспериментального сахарного диабета и при длительном введении витамина D₃. Установлено, что хроническая гипергликемия при сахарном диабете вызывает понижение в 2,3 раза содержания 25OHD₃ активного метаболита в сыворотке крови. Развитие витамин D₃-дефицитного состояния со-

проводится нарушением пролиферативной активности Т-лимфоцитов, изменением соотношения регулирующей (CD4⁺-позитивные лимфоциты) и цитотоксической (CD8⁺-позитивные лимфоциты) субпопуляций. В цельных лизатах Т-лимфоцитов селезенки отмечено возрастание содержания фосфорилированной субъединицы р65 ядерного фактора κВ и усиление ее транслокации в ядро. Кроме того, показана интенсификация гуморального ответа IgG вследствие перитонеальной иммунизации рекомбинантной субъединицей В дифтерийного токсина. Обнаруженные нарушения клеточного звена иммунной системы сопровождались усилением апоптической гибели спленоцитов, детектируемой по свойству метки Annexin V-GFP связываться с фосфотидилсерином, экспозиция которого на внешней стороне плазмалеммы наблюдается при апоптозе клеток. Продолжительное введение (в течение двух месяцев) витамина D₃ в дозе 20 МЕ диабетическим животным способствовало нормализации пролиферативной активности и соотношения Т-клеточных субпопуляций, уменьшению уровня образования фосфорилированной субъединицы NF-κB – р65 и сбалансированной секреции IgG при иммунизации рекомбинантным антигеном. Эти изменения сопровождались уменьшением уровня апоптических событий в целевой популяции спленоцитов. Результаты работы свидетельствуют о существенной роли витамина D₃ в регулировании функций иммунной системы при сахарном диабете 1-го типа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Harrison, L.C., Honeyman, M.C., Morahan, G., Wentworth, J.M., Elkassaby, S., Colman, P.G., and Furlanos, S., Type 1 diabetes: lessons for other autoimmune diseases?, *J. Autoimmun.*, 2008, vol. 31, no. 3, pp. 306–310.
- Aanstoot, H.J., Anderson, B.J., Daneman, D., Danne, T., Donaghue, K., Kaufman, F., Réa, R.R., and Uchigata, Y., The global burden of youth diabetes: perspectives and potential, *Pediatr. Diabet.*, 2007, suppl. 8, pp. 1–44.
- Rubinstein, R., Genaro, A.M., Motta, A., Cremaschi, G., and Wald, M.R., Impaired immune responses in streptozotocin-induced type I diabetes in mice. Involvement of high glucose, *Clin. Exp. Immunol.*, 2008, vol. 154, no. 2, pp. 235–246.
- Jailwala, P., Waukau, J., Glisic, S., Jana, S., Ehlenbach, S., Hessner, M., Alemzadeh, R., Matsuyama, S., Laud, P., Wang, X., and Ghosh, S., Apoptosis of CD4⁺ CD25⁺ T cells in type 1 diabetes may be partially mediated by IL-2 deprivation, *PLoS One*, 2009, vol. 4, no. 8, pp. 1–22.
- Vignali, D.A., Collison, L.W., and Workman, C.J., How regulatory T cells work, *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, vol. 8, no. 7, pp. 523–532.
- Yoon, J.W., and Jun, H.S., Autoimmune destruction of pancreatic beta cells, *Am. J. Ther.*, 2005, vol. 12, no. 6, pp. 580–591.
- Tsai, S., Shameli, A., and Santamaria, P., CD8⁺ T cells in type 1 diabetes, *Adv. Immunol.*, 2008, vol. 100, pp. 79–124.
- Phillips, J.M., Parish, N.M., Raine, T., Bland, C., Sawyer, Y., De La Peca, H., and Cooke, A., Type 1 diabetes development requires both CD4⁺ and CD8⁺ T cells and can be reversed by non-depleting antibodies targeting both T cell populations, *Rev. Diabet. Stud.*, 2009, vol. 6, no. 2, pp. 97–103.
- Hultcrantz, M., Jacobson, S., Hill, N.J., Santamaria, P., and Flodström-Tullberg, M., The target cell response to cytokines governs the autoreactive T cell repertoire in the pancreas of NOD mice, *Diabetologia*, 2009, vol. 52, no. 2, pp. 299–305.
- Ilonen, J., Surcel, H.M., and Käär, M.L., Abnormalities within CD4 and CD8 T lymphocyte subsets in type 1 (insulin-dependent) diabetes, *Clin. Exp. Immunol.*, 1991, vol. 85, no. 2, pp. 278–281.
- Pacifici, R., T cells and postmenopausal osteoporosis in murine models, *Arthrit. Res. Ther.*, 2007, vol. 9, no. 2, pp. 102–106.
- Aranow, C., Vitamin D and the immune system, *J. Investig. Med.*, 2011, vol. 59, no. 6, pp. 881–886.
- Holick, M.F., Vitamin D deficiency, *N. Engl. J. Med.*, 2007, vol. 357, pp. 266–281.
- Baeke, F., Korf, H., Overbergh, L., Verstuyf, A., Gysemans, C., and Mathieu, C., Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the immune system, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2010, vol. 121, no. 1–2, pp. 221–227.
- Yin, K., and Agrawal, D.K., Vitamin D and inflammatory diseases, *J. Inflamm. Res.*, 2014, vol. 7, no. 29, pp. 69–87.
- Kongsbak, M., Levring, T.B., Geisler, C., and von Essen, M.R., The vitamin D receptor and T cell function, *Front. Immunol.*, 2013, vol. 4, pp. 148–158.
- VanEtten, E., Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2005, vol. 97, no. 1–2, pp. 93–101.
- Mosman, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immunol. Meth.*, 1983, vol. 65, no. 1, pp. 55–63.
- Stavniichuk, R., Obrosova, A.A., Drel, V.R., Nadler, J.L., Obrosova, I.G., and Yorek, M.A., 12/15-Lipoxygenase inhibition counteracts MAPK phosphorylation in mouse and cell culture models of diabetic peripheral neuropathy, *J. Diabet. Mellitus*, 2013, vol. 3, no. 3.
- Harper, D.R., and Murphy, G., Nonuniform variation in band pattern with luminol/horseradish pe-

- oxidase western blotting, *Anal. Biochem.*, 1991, vol. 192, no. 1, pp. 59–63.
21. Ayroldi, E., Migliorati, G., Bruscoli, S., Marchetti, C., Zollo, O., Cannarile, L., D'Adamio, F., and Riccardi, C., Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB, *Blood*, 2001, vol. 98, no. 3, pp. 743–753.
 22. Sun, C., Sun, L., Ma, H., Peng, J., Zhen, Y., Du-an, K., Liu, G., Ding, W., and Zhao, Y., The phenotype and functional alterations of macrophages in mice with hyperglycemia for long term, *J. Cell Physiol.*, 2012, vol. 227, no. 4, pp. 1670–1679.
 23. Wang, J., Lv, C., Xie, T., and Ouyang, J., The variance of peripheral blood lymphocyte subsets of streptozotocin-induced diabetic mice after bone marrow transplantation, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015, vol. 8, no. 3, pp. 4115–4121.
 24. Eman, M.S., Nidhal, A.M., and Majed, A.J., Abnormal lymphocyte subsets in children with type 1 diabetes mellitus, *Menoufia Med.*, 2008, vol. 7, no. 1, pp. 9–14.
 25. Reinert-Hartwall, L., Honkanen, J., Salo, H.M., Nieminen, J.K., Luopajarvi, K., Härkönen, T., Veijola, R., Simell, O., Ilonen, J., Peet, A., Tillmann, V., Knip, M., and Vaarala, O., Th1/Th17 plasticity is a marker of advanced β cell autoimmunity and impaired glucose tolerance in humans, *J. Immunol.*, 2015, vol. 194, no. 1, pp. 68–75.
 26. Labudzynski, D.O., Shymanskyi, I.O., Riasnyi, V.M., and Veliky, M.M., Vitamin D₃ bioavailability and functional activity of peripheral blood phagocytes in experimental type 1 diabetes, *Ukr. Biochem. J.*, 2014, vol. 86, no. 2, pp. 107–118.
 27. Yan, G., Shi, L., Penforinis, A., and Faustman, D.L., Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells, *J. Immunol.*, 2003, vol. 170, no. 1, pp. 620–627.
 28. Sakowicz-Burkiewicz, M., Kocbuch, K., Grden, M., Szutowicz, A., and Pawelczyk, T., Diabetes-induced decrease of adenosine kinase expression impairs the proliferation potential of diabetic rat T lymphocytes, *Immunology*, 2006, vol. 118, no. 3, pp. 402–412.
 29. Green, D.R., and Ware, C.F., Fas-ligand: privilege and peril, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, no. 12, pp. 5986–5990.
 30. Kang, O.H., Jang, H.J., Chae, H.S., Oh, Y.C., Choi, J.G., Lee, Y.S., Kim, Y.C., Park, H., and Kwon, D.Y., Anti-inflammatory mechanisms of resveratrol in activated HMC-1 cells: pivotal roles of NF-kappaB and MAPK, *Pharmacol. Res.*, 2009, vol. 59, no. 5, pp. 330–337.
 31. Gharagozloo, M., Velardi, E., Bruscoli, S., Agostini, M., Di Sante, M., Donato, V., Amirghofran, Z., and Riccardi, C., Silymarin suppress CD4⁺ T cell activation and proliferation: Effects on NF-kB activity and IL-2 production, *Pharmacol. Res.*, 2010, vol. 61, no. 5, pp. 405–409.
 32. Wong, F.S., and Wen, L., B cells in autoimmune diabetes, *Rev. Diabet. Stud.*, 2005, vol. 2, no. 3, pp. 121–135.
 33. Tarui, T., Majumdar, M., Miles, L.A., Ruf, W., and Takada, Y., Plasmin-induced migration of endothelial cells a potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin, *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, no. 37, pp. 33564–33570.
 34. Mahmoud, M.H., Badr, G., Badr, B.M., Kassem, A.U., and Mohamed, M.S., Elevated IFN-alpha/beta levels in a streptozotocin-induced type I diabetic mouse model promote oxidative stress and mediate depletion of spleen-homing CD8⁺ T cells by apoptosis through impaired CCL21/CCR7 axis and IL-7/CD127 signaling, *Cell Signal.*, 2015, vol. 27, no. 10, pp. 2110–2119.
 35. Saggese, G., Vierucci, F., Boot, A.M., Czech-Kowalska, J., Weber, G., Mallet, E., Fanos, M., Shaw, N.J., and Holick, M.F., Vitamin D in childhood and adolescence: an expert position statement, *Eur. J. Pediatr.*, 2015, vol. 174, no. 5, pp. 565–576.
 36. Yunzi, C., Jing, Z., Xin, G., Jie, D., Dilip, K.D., and Yan, C.L., Vitamin D receptor inhibits nuclear factor κ B activation by interacting with I κ B kinase β protein, *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288, no. 27, pp. 19450–19458.
 37. Chen, S., Sims, G.P., Chen, X.X., Gu, Y.Y., Chen, S., and Lipsky, P.E., Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human B cell differentiation, *J. Immunol.*, 2007, vol. 179, pp. 1634–1647.
 38. Bao, B.Y., Ting, H.J., Hsu, J.W., and Lee, Y.F., Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells, *Int. J. Cancer*, 2008, vol. 122, no. 12, pp. 2699–2706.

Надійшла 26.08.15