



<http://dx.doi.org/10.15407/dopovidi2016.06.127>

УДК 577.161.2+616.379-008.64

**Д. О. Лабудзинський, К. І. Кубайчук, І. О. Шиманський,
М. М. Великий**

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: konsument3@gmail.com

Регуляторний ефект вітаміну D₃ на прозапальні процеси в печінці мишей з експериментальним цукровим діабетом

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Н.М. Гулою)

Показано, що індукція експресії плюрипотентного прозапального інтерлейкіну 6 (IL-6) у печінці на фоні цукрового діабету супроводжується посиленням експресії остеопонтину (OPN) – молекулярного регулятора синтезу прозапальних цитокінів. Зміни експресії OPN та IL-6 корелюють зі значним дефіцитом вітаміну D₃ в організмі. Нормалізація рівня вітаміну D₃ приводить до істотного зменшення рівня експресії мРНК як OPN, так і IL-6, що свідчить про цитопротекторний вплив холекальциферолу у разі діабет-індукованих пошкоджень печінки.

Ключові слова: вітамін D₃, діабет, цитокіни.

Цукровий діабет 1 типу (ЦД1) є мультифакторним, органоспецифічним та генетично обумовленим аутоімунним захворюванням, яке характеризується прогресуючою втратою інсулінпродукувальних β -клітин підшлункової залози [1]. Інфільтровані в острівцях Лангерганса аутореактивні Т-лімфоцити виділяють значну кількість прозапальних цитокінів, таких як IL-1, IL-6, TNF і INF γ , посилюючи залучення інших субпопуляцій імунних клітин до паренхіми підшлункової залози із подальшим аутоімунним руйнуванням β -клітин [2]. Як наслідок, розвивається хронічна гіперглікемія, яка разом з імунними порушеннями, що супроводжуються генералізацією прооксидантних і прозапальних процесів в організмі, призводить до тяжких і поширених ускладнень цукрового діабету (ангіопатій, нейропатій, остеопорозу, індукованих діабетом уражень печінки тощо) [3].

© Д. О. Лабудзинський, К. І. Кубайчук, І. О. Шиманський, М. М. Великий, 2016

Пов'язана з розвитком діабету активація прозапальних процесів особливо чітко простежується в печінці, обумовлюючи структурно-функціональні зміни гепатоцитів [4]. Значна частина протеїнів гострої фази запалення в плазмі крові, таких як ІЛ-1, ІЛ-6 та TNF- α , є саме печінкового походження і їх вміст залежать від протеїнсинтезувальної здатності цього органа [5]. Слід зауважити, що ІЛ-6 є цитокином із плеїотропними властивостями, який вважається ключовим у регулюванні імунних і неімунних процесів у більшості типів клітин і тканин поза імунною системою [6]. За даними великої кількості епідеміологічних, генетичних, експериментальних робіт, цей інтерлейкін відіграє визначальну роль у патогенезі діабету 1 і 2 типів, ожиріння, інсулінорезистентності та клітинної загибелі.

Як показали останні дослідження, остеопонтин (OPN), крім його добре відомої ролі в метаболізмі кісткової тканини, зокрема біомінералізації і заякорюванні остеокластів у точках резорбції кісткового матриксу, є молекулярним тригером багатьох метаболічних та прозапальних процесів в організмі. Зокрема, одним із біохімічних ефектів його взаємодії з рецепторами інтегрину $\alpha\nu\beta3$ є індукція експресії ІЛ-6 [7]. Відомо, що в промоторі гена OPN містяться специфічні ділянки зв'язування, зокрема для рецепторів глюкокортикоїдів (GR) та вітаміну D₃ (VDR). Наявність таких локусів може відкривати перспективи для регуляції OPN-залежних генів цими біологічно активними регуляторними сполуками.

Крім загальновідомої участі вітаміну D₃ у регулюванні мінерального обміну, мінералізації та ремоделювання кісткової тканини із залученням остеобластів і остеокластів, що відіграють ключову роль у процесах формування і резорбції кісткової тканини, холекальциферол та його гормонально активні форми також виявляють імуномодуляторну, проти-запальну, антипроліферативну дію та можуть сприяти запобіганню розвитку аутоімунних захворювань [8, 9]. Більшість молекулярних ефектів, які забезпечують цитопротекторні властивості вітаміну D₃, переважно реалізуються через геномну регуляцію за участю VDR, механізм якої здебільшого відповідає дії стероїдних гормонів.

У зв'язку з вищесказаним метою роботи було з'ясування ролі вітаміну D₃ в OPN-опосередкованому регулюванні експресії ІЛ-6 у печінці мишей з експериментальним цукровим діабетом.

Дослідження проводилися на самцях мишей лінії C56Bl/J6 масою 21 ± 3 г. Діабет 1 типу (ЦД1) викликали 5-разовим введенням стрептозотоцину (STZ, "Sigma-Aldrich", США) у дозі 40 мг/кг маси тіла тварини. У дослідженні використовували тварин після 3 тижнів розвитку діабету з рівнем глюкози крові $20,5 \pm 4,1$ ммоль/л. Після розвитку стійкої гіперглікемії мишам вводили препарат вітаміну D₃ (DSM, Нідерланди) протягом 2,5 місяців у вигляді водної суспензії (800 МО/кг маси тіла, per os). Підбір тварин та формування груп здійснювали за методом "випадкових чисел". Досліди проведені з додержанням "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Україна, 2001).

Забезпеченість організму мишей вітаміном D₃ оцінювали за рівнем 25ОНD₃ (попередником гормонально активних форм вітаміну D₃) сироватки крові, який визначали імуноензимним методом (набір ELISA, "Immunodiagnostic Systems Ltd.", США).

Тотальну РНК виділяли з тканини печінки, використовуючи TRIzol ("Sigma-Aldrich") згідно з інструкціями виробника. кДНК синтезували з 1 мкг тотальної РНК, застосовуючи random-праймери та зворотну транскриптазу вірусу лейкозу мишей Молоні ("Life Technologies", Великобританія) [10]. Полімеразну ланцюгову реакцію у реальному часі проводили за допомогою набору Mx3005P Real-Time PCR System ("Stratagene", США). Для кожної проби дослідження виконували в триплетному повторі. Експресію цільових генів

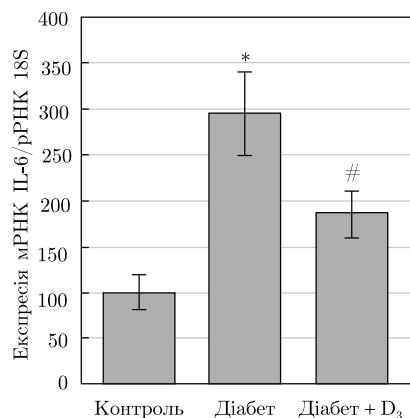


Рис. 1. Рівень експресії мРНК ІЛ-6 у печінці мишей з експериментальним цукровим діабетом та при введенні вітаміну D₃. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з групою “Діабет” ($M \pm m$, $n = 6$)

порівнювали з експресією референтного гена 18S субодиниці рибосоми. Отримані дані інтерпретували як співвідношення між експресією цільових генів та референтного.

Статистичну обробку даних здійснювали з використанням t -критерію Стьюдента та однофакторного дисперсійного тесту Анова. Критичний рівень значущості $< 0,05$.

Показано, що середній рівень глюкози у мишей із експериментальним ЦД1 становив $22,1 \pm 4,4$ ммоль/л, у контролі – $5,7 \pm 1,1$ ммоль/л (табл. 1). На фоні хронічної гіперглікемії нами було виявлено значне (у 2,9 раза) зростання експресії мРНК ІЛ-6 у печінці (рис. 1) порівняно з контрольними тваринами ($p < 0,05$), що може як відображати прозапальні процеси, так і сприяти подальшому ураженню печінки та мати діагностичне значення у разі діабету. Синтезуючись переважно клітинами печінки, ІЛ-6 залучається як у аутокринну, так і в паракринну регуляцію функцій широкого кола інших клітин організму [5]. Встановлено, що надекспресія мРНК ІЛ-6 корелювала зі значним (в 1,8 раза) зростанням експресії мРНК ОРН у печінці (рис. 2) порівняно з контролем ($p < 0,05$). Як було показано в дослідженнях із культурою первинних хондроцитів, отриманих від пацієнтів із остеоартритом [11], при інкубуванні клітин із рекомбінантним ОРН спостерігалася дозозалежна надекспресія мРНК ІЛ-6 і ІЛ-8. Враховуючи зазначене, можна дійти висновку, що збільшення експресії ОРН індукувало надекспресію мРНК ІЛ-6 і у разі метаболічних порушень у печінці, пов'язаних з розвитком діабету. Імовірний механізм дії ОРН полягає у зв'язуванні з $\alpha_v\beta_3$ рецепторами інтегрину печінкових макрофагів та інших лімфоцитів, із наступною стимуляцією трансдукції прозапального сигналіngu в цих клітинах та подальшої надекспресії прозапальних цитокінів, зокрема ІЛ-6 [7].

Таблиця 1. Вміст 25ОНD₃ та глюкози у сироватці мишей з експериментальним цукровим діабетом 1 типу та при введенні вітаміну D₃, $M \pm m$, $n = 6$

Експериментальна група	Вміст 25ОНD ₃		Концентрація глюкози, ммоль/л
	нмоль/л	нг/мл	
Контроль	$81,7 \pm 4,12$	$32,68 \pm 1,65$	$5,5 \pm 1,2$
Діабет	$37,9 \pm 2,12^*$	$15,16 \pm 0,85^*$	$22,1 \pm 4,4^*$
Діабет + D ₃	$77,3 \pm 5,48^\#$	$30,92 \pm 2,19^\#$	$15,2 \pm 3,3$

* Різниця порівняно з контролем вірогідна ($p < 0,05$). # Різниця порівняно з групою “Діабет” вірогідна ($p < 0,05$).

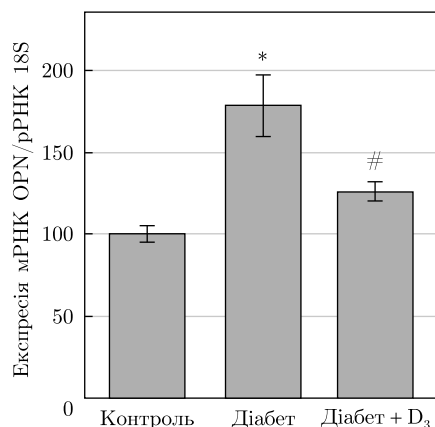


Рис. 2. Рівень експресії мРНК OPN у печінці мишей з експериментальним цукровим діабетом та при введенні вітаміну D₃. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з групою “Діабет” ($M \pm m$, $n = 6$)

Важливо підкреслити, що виявлені зміни відбувалися на фоні значного дефіциту вітаміну D₃ в організмі. Так, рівень 25ОНD₃ у сироватці діабетичних мишей знижувався в 2,2 раза (див. табл. 1) порівняно з контрольними тваринами ($p < 0,05$). На сьогодні достатньо вивчено участь гормонально активної форми вітаміну D₃ – 1,25(ОН)₂D₃ у регулюванні транскрипції багатьох остеокінів, і зокрема OPN, у різних типах клітин кісткової тканини [7, 12]. Крім кісткової тканини інтенсивно досліджується регуляторний вплив вітаміну D₃ на OPN-опосередковані процеси метаболізму в інших тканинах з метою пошуку нових терапевтичних підходів у лікуванні різних хронічних захворювань [13]).

За умов тривалого введення вітаміну D₃ діабетичним тваринам опостерігалася нормалізація рівня 25ОНD₃ (див. табл. 1) у сироватці до контрольних значень ($p < 0,05$). На фоні відновлення забезпеченості організму діабетичних мишей вітаміном D₃ мало місце достовірне зниження (в 1,4 раза) експресії мРНК OPN у печінці тварин (див. рис. 2) порівняно з діабетичною групою ($p < 0,05$). Було показано, що рівень мРНК IL-6 у тканині печінки також знижувався, в 1,6 раза (див. рис. 1) порівняно зі значеннями у діабетичних тварин ($p < 0,05$). Такі зміни свідчать про важливу роль вітаміну D₃ у OPN-опосередкованому регулюванні рівня експресії IL-6 і, як наслідок, гальмування прозапальних процесів, зумовлених індукованими діабетом пошкодженнями печінки. Механізм такої регуляції полягає у зв'язуванні 1,25(ОН)₂D₃ із VDR рецепторами та подальшою транслокацією активного комплексу 1,25(ОН)₂D₃–VDR до ядра. У ядрі цей комплекс взаємодіє з VDR-зв'язувальною ділянкою промотору гена OPN, таким чином регулюючи рівень експресії цього гена [14]. Одним із імовірних механізмів регуляції холекальциферолом експресії мРНК IL-6 може бути шлях, опосередкований регуляторним впливом 1,25(ОН)₂D₃ на функціонування гена OPN.

Таким чином, на підставі результатів дослідження приходимо до висновку, що дефіцит вітаміну D₃, який виникає на фоні цукрового діабету, призводить до інтенсифікації прозапальних процесів і запускає механізм подальших ушкоджень печінки, шляхом OPN-опосередкованої надекспресії мРНК IL-6. Введення вітаміну D₃ сприяє нормалізації рівня 25ОНD₃ у сироватці крові, як показника оптимальної забезпеченості організму вітаміном D₃, та зниженню експресії генів обох прозапальних факторів. Отримані результати свідчать про регуляторне значення холекальциферолу в гальмуванні прозапальних процесів у печінці, спричинених цукровим діабетом.

Цитована література

1. *Todd J. A.* Etiology of type 1 diabetes // *Immunity*. – 2010. – **32**, No 4. – P. 457–467.
2. *Diaz-Valencia P. A., Bougnères P., Valleron A. J.* Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review // *BMC Public Health*. – 2015. – **15**, No 255. – P. 1–15.
3. *Giacco F., Brownlee M.* Oxidative stress and diabetic complications // *Circ. Res.* – 2010. – **107**, No 9. – P. 1058–1070.
4. *Ban C. R., Twigg S. M.* Fibrosis in diabetes complications: Pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers // *Vasc. Health Risk Manag.* – 2008. – **4**, No 3. – P. 575–596.
5. *Bastard J. P., Maachi M., Lagathu C., Kim M. J., Caron M., Vidal H., Capeau J., Feve B.* Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance // *Eur. Cytokine Netw.* – 2006. – **17**, No 1. – P. 4–12.
6. *Kristiansen O. P., Mandrup-Poulsen T.* Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? // *Diabetes*. – 2005. – **54**, No 2. – P. 114–124.
7. *Kahles F., Findeisen H. M., Bruemmer D.* Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes // *Mol. Metab.* – 2014. – **3**, No 4. – P. 384–393.
8. *Baeke F., Takiishi T., Korf H., Gysemans C., Mathieu C.* Vitamin D: modulator of the immune system // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2010. – **10**, No 4. – P. 482–496.
9. *Лабудзинський Д. О., Шиманський І. О., Рясний В. М., Великий М. М.* Забезпеченість організму вітаміном D₃ та функціональна активність фагоцитуючих клітин периферичної крові за експериментального цукрового діабету 1-го типу // *Ukr. Biochem. J.* – 2014. – **86**, № 2. – С. 107–118.
10. *Marcotorchino J., Romier B., Gouranton E., Riollot C., Gleize B., Malezet-Desmoulins C., Landrier J. F.* Lycopene attenuates LPS-induced TNF-alpha secretion in macrophages and inflammatory markers in adipocytes exposed to macrophage-conditioned media // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2012. – **56**, No 5. – P. 725–732.
11. *Yang Y., Gao S. G., Zhang F. J., Luo W., Xue J. X., Lei G. H.* Effects of osteopontin on the expression of IL – 6 and IL – 8 inflammatory factors in human knee osteoarthritis chondrocytes // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2014. – **18**, No 23. – P. 3580–3586.
12. *Staal A., Van Wijnen A. J., Desai R. K., Pols H. A., Birkenhäger J. C., Deluca H. F., Denhardt D. T., Stein J. L., Van Leeuwen J. P., Stein G. S., Lian J. B.* Antagonistic effects of transforming growth factor-beta on vitamin D₃ enhancement of osteocalcin and osteopontin transcription: reduced interactions of vitamin D₃ receptor/retinoid X receptor complexes with vitamin E response elements // *Endocrinology*. – 1996. – **137**, No 5. – P. 2001–2011.
13. *Lau W. L., Leaf E. M., Hu M. C., Takeno M. M., Kuro-o M., Moe O. W., Giachelli C. M.* Vitamin D receptor agonists increase klotho and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet // *Kidney Int.* – 2012. – **82**, No 12. – P. 1261–1270.
14. *Haussler M. R., Jurutka P. W., Mizwicki M., Norman A. W.* Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH)₂ vitamin D₃: genomic and non-genomic mechanisms // *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2011. – **25**, No 4. – P. 543–559.

References

1. *Todd J. A.* *Immunity*, 2010, **32**, No 4: 457–467.
2. *Diaz-Valencia P. A., Bougnères P., Valleron A. J.* *BMC Public Health*, 2015, **15**, No 255: 1–15.
3. *Giacco F., Brownlee M.* *Circ. Res.*, 2010, **107**, No 9: 1058–1070.
4. *Ban C. R., Twigg S. M.* *Vasc. Health Risk Manag.*, 2008, **4**, No 3: 575–596.
5. *Bastard J. P., Maachi M., Lagathu C., Kim M. J., Caron M., Vidal H., Capeau J., Feve B.* *Eur. Cytokine Netw.*, 2006, **17**, No 1: 4–12.
6. *Kristiansen O. P., Mandrup-Poulsen T.* *Diabetes*, 2005, **54**, No 2: 114–124.
7. *Kahles F., Findeisen H. M., Bruemmer D.* *Mol. Metab.*, 2014, **3**, No 4: 384–393.
8. *Baeke F., Takiishi T., Korf H., Gysemans C., Mathieu C.* *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2010, **10**, No 4: 482–496.
9. *Labudzynski D. O., Shymanskyi I. O., Riasnyy V. M., Veliky M. M.* *Ukr. Biochem. J.*, 2014, **86**, No 2: 107–118.
10. *Marcotorchino J., Romier B., Gouranton E., Riollot C., Gleize B., Malezet-Desmoulins C., Landrier J. F.* *Mol. Nutr. Food Res.*, 2012, **56**, No 5: 725–732.

11. Yang Y., Gao S. G., Zhang F. J., Luo W., Xue J. X., Lei G. H. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci., 2014, **18**, No 23: 3580–3586.
12. Staal A., Van Wijnen A. J., Desai R. K., Pols H. A., Birkenhäger J. C., Deluca H. F., Denhardt D. T., Stein J. L., Van Leeuwen J. P., Stein G. S., Lian J. B. Endocrinology, 1996, **137**, No 5: 2001–2011.
13. Lau W. L., Leaf E. M., Hu M. C., Takeno M. M., Kuro-o M., Moe O. W., Giachelli C. M. Kidney Int., 2012, **82**, No 12: 1261–1270.
14. Haussler M. R., Jurutka P. W., Mizwicki M., Norman A. W. Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., 2011, **25**, No 4: 543–559.

Надійшло до редакції 18.11.2015

Д. О. Лабудзинский, К. И. Кубайчук, И. О. Шиманский, Н. Н. Великий

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев

E-mail: konsument3@gmail.com

Регуляторный эффект витамина D₃ на провоспалительные процессы в печени мышей при экспериментальном сахарном диабете

Показано, что индукция экспрессии плюрипотентного провоспалительного интерлейкина 6 (IL-6) в печени при сахарном диабете сопровождается усилением экспрессии остеопонтина (OPN) — молекулярного регулятора синтеза провоспалительных цитокинов. Изменения экспрессии OPN и IL-6 коррелируют со значительным дефицитом витамина D₃ в организме. Нормализация уровня витамина D₃ приводит к существенному уменьшению уровня экспрессии мРНК как OPN, так и IL-6, что свидетельствует о цитопротекторном влиянии холекальциферола при диабетиндуцированных повреждениях печени.

Ключевые слова: витамин D₃, диабет, цитокины.

D. O. Labudzynski, K. I. Kubaichuk, I. O. Shymanskyi, M. M. Veliky

Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: konsument3@gmail.com

Regulatory effect of vitamin D₃ on proinflammatory processes in liver of diabetic mice

It is shown that the induction of pluripotent proinflammatory interleukin 6 (IL-6) in liver in diabetes is accompanied by increased expression of osteopontin (OPN) — molecular regulator of the synthesis of proinflammatory cytokines. Changes in the OPN and IL-6 expression correlate with a significant deficiency of vitamin D₃ in organism. Normalization of the vitamin D₃ level leads to a substantial reduction of the expression level of both OPN and IL-6 mRNA, showing the cytoprotective effect of cholecalciferol in diabetes-induced liver disorders.

Keywords: vitamin D₃, diabetes mellitus, cytokines.