

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ.О.В.ПАЛЛАДИНА

на правах рукопису

СТЕФАНОВ Михайло Вікторович

Вивчення обміну вітаміну D₃ у печінці
при експериментальному цукровому діабеті

03.00.04 - Біохімія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ - 1997



577.1
Дисертацією є рукопис

Робота виконана у лабораторії медичної біохімії Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України.

Науковий керівник -

кандидат біологічних наук

АПУХОВСЬКА Лариса Іванівна

Науковий консультант -

академік

ЛУК'ЯНОВА Олена Михайлівна

Офіційні опоненти :

доктор біологічних наук, професор

ВЕЛИКИЙ Микола Миколайович ,

доктор біологічних наук

ФЕДОРОВ Олексій Миколайович

Провідна установа - Інститут ендокринології та обміну речовин АМН України.

Захист дисертації відбудеться " 24 " березня 1997 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.84.01, 252601; Київ-30, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України.

Автореферат розісланий " 20 " лютого 1997 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,

кандидат біологічних наук

Кірсенко О.В.

AB - 37.026

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Дані літератури за останній час свідчать про значну роль вітаміну D₃ у регуляції функціональної активності підшлункової залози. Вперше це припущення було висунуто у зв'язку з виявленням у ядрах β-клітин підшлункової залози високоспецифічних рецепторів щодо гормонально активних форм вітаміну D₃ (Christacos et al., 1979, 1981; Clark et al., 1980). Окрім того, було показано, що активні метаболіти холекальціферолу регулюють процеси проліферації та диференціації β-клітин (Clark et al., 1987), а також синтез інсуліну та його рецепторних білків (Cade et al., 1986, 1987).

На підставі зазначеного можна припустити, що D-дефіцитний стан організму може негативно впливати на функціональну активність β-клітин підшлункової залози і бути однією із можливих причин як ризику розвитку цукрового діабету, так і тяжкості даної патології.

З іншого боку показана здатність інсуліну виявляти стимулюючий вплив на активність ферментативних систем, які здійснюють гідроксилування холекальціферолу в його біологічно активні форми (Levin, 1982; Ikeda et al., 1987). Один із етапів цієї трансформації, а саме гідроксилування холекальціферолу до 25-гідроксихолекальціферолу, відбувається у печінці (Dueland et al., 1983; Бауман, 1989). Враховуючи те, що при цукровому діабеті порушується структурно-функціональні характеристики клітин багатьох органів, в тому числі і печінки (Баранов, 1983), можна припустити, що однією із можливих причин зазначеної зміни вмісту активних метаболітів вітаміну D₃ у сироватці крові при даній патології (Hough et al., 1983), є порушення здатності печінки синтезувати 25-гідроксихолекальціферол, який є транспортною формою холекальціферолу в організмі і служить субстратом для синтезу у нирках його більш полярних форм, що мають гормональну активність (DeLuka, 1978).

ЛНБ ім. В. Стефанишина
АН України

Мета дослідження: Вивчення порушень обміну холекальціферолу у печінці за умов експериментального цукрового діабету, а також виявлення можливості корекції вітаміном D₃ метаболічних порушень, що пов'язані з даною патологією.

Відповідно до поставленої мети вирішувались такі завдання:

1. Вивчити всмоктання вітаміну D₃ в тонкому кишечнику щурів при експериментальному цукровому діабеті.
2. Визначити механізм порушення процесу гідроксилювання холекальціферолу у печінці щурів за даної патології.
3. З'ясувати можливості застосування вітаміну D₃ з метою корекції порушень вуглеводного обміну при експериментальному діабеті.

Наукова новизна. Виявлено, що за умов експериментального діабету зменшується всмоктання холекальціферолу у кишечнику внаслідок зміни ліпідних компонентів клітин слизової тканини тонкого кишечника.

Показано, що за умов зазначеної патології порушується обмін вітаміну D₃ в печінці внаслідок зменшення його поглинання цим органом, зміни розподілу холекальціферолу між різними типами клітин печінки та інгібування активності ферментів печінки, які гідроксилюють вітамін D₃.

Показано, що за умов експериментального цукрового діабету екзогенний вітамін D₃ здійснює нормалізуючу дію на структуру та функції β-клітин підшлункової залози.

Практичне та теоретичне значення роботи. Одержані дані дозволяють розширити існуючі уявлення щодо механізму порушення обміну вітаміну D₃ при цукровому діабеті.

Показана можливість використання вітаміну D₃ для профілактики і корекції порушень вуглеводного обміну при експериментальному цукровому діабеті. Спосіб його використання оформлено у вигляді заявки на патент України (пріоритетна довідка В4602438).

Конкретний особистий внесок дисертанта. Автором дисертаційної роботи особисто здійснювалась підготовка та проведення експериментів, самостійно проаналізований весь первинний матеріал, сформульовано положення і висновки роботи.

Апробація роботи. Матеріали роботи були представлені на Загальносоюзній конференції з клінічної вітамінології (Москва, 1991), Міжнародному симпозіумі "Вітаміни и здоровье Белоруси и смежных регионов" (Гродно, 1995), науково-практичній конференції з неінфекційної патології тварин (Біла Церква, 1995), а також на семінарах лабораторії медичної біохімії та Вченій Раді Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 4 статті, тези доповідей конференцій та симпозіумів (три публікації), подана заявка на патент України.

Об'єм дисертації. Дисертаційна робота викладена на 137 сторінках друкованого тексту і складається із вступу, огляду літератури, експериментальної частини, заключення та висновків. Перелік літератури вміщує 394 найменування. Робота ілюстрована 6 таблицями та 16 рисунками.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вивчення поглинання та обміну вітаміну D₃ в печінці, а також його всмоктування у кишечнику при експериментальному цукровому діабеті проводили на щурицях лінії Wistar, які перебували на дієті віварію.

Дослідження проводили на алоксановій моделі цукрового діабету (Баранов та інш., 1983).

Вміст глюкози, концентрацію кальцію, рівень загальних ліпідів та активність лужної фосфатази у сироватці крові визначали при використанні біотест-наборів фірми

"ЛАХЕМА" (Чехословаччина); неорганічний фосфор - за методом Діце (1973); концентрацію холестерину - за реакцією ЕМА (Kamel, 1976).

Визначення у сироватці крові інсуліну проводили за методом радіоімунологічного аналізу за допомогою тест-набору РИО-ИНС-ПГ-125І (ОП ИБОХ АН, Білорусія).

Структуру острівкової тканини підшлункової залози і кількість β -клітин визначали методами гістохімічного аналізу (Баранов та інш., 1983).

Вміст активних метаболітів вітаміну D_3 визначали за методом радіоконкурентного зв'язування після їх екстракції з об'єкту дослідження та хроматографічного розподілу (Justova, 1982). Як зв'язуючу систему для $25\text{OH}D_3$ та $24,25(\text{OH})_2D_{33}$ використовували сироватку крові щурів з D -гіповітамінозом, для $1,25(\text{OH})_2D_{33}$ - цитозольний білок слизової тканини тонкого кишечника кроля (Duncan, 1983).

Клітини печінки одержували шляхом її обробки колагеназою і проназою з наступним розподілом клітин за методом диференційного центрифугування (Dueland et al., 1981). Чистоту одержаних фракцій контролювали гістохімічним методом після їх послідовного фарбування гематоксиліном Бомера та еозином.

Інкубацію гепатоцитів з міченим вітаміном D_3 проводили відповідно (Dueland et al., 1981).

Вміст білку визначали за методом Лоурі (1951).

Статистичну обробку одержаних даних здійснювали загальноновизнаними методами (Ойвін, 1961). Дані вважались достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Експериментальна модель цукрового діабету. Експериментальну модель цукрового діабету створювали шляхом внутрішньовенного введення піддослідним тваринам 40 мг алоксану на кг маси тіла. Введення цієї дози алоксану забезпечувало на 20-30 добу

досліді стійке підвищення рівня глюкози до $47,3 \pm 3,1$ ммоль/л в порівнянні з $6,50 \pm 0,44$ ммоль/л у цих тварин до введення алоксану.

Вміст інсуліну у сироватці крові тварин після ін'єкції алоксану знижувався до $1,60 \pm 0,14$ нмоль/л в порівнянні з $5,4 \pm 0,4$ нмоль/л у контрольних тварин. Гістохімічний аналіз підшлункової залози також показав на цей період часу зменшення кількості β -клітин порівняно з контролем з 60 ± 5 до 20 ± 3 одиниць (середнє значення кількості β -клітин у п'яти полях зору мікроскопу з п'яти препаратів підшлункової залози).

Введення меншої дози алоксану (20 мг на кг маси тіла) виявляло менш виражені зміни зазначених показників. Навпаки, використання більш високої концентрації цього хімічного агента (75 мг на кг маси тіла) викликало критичне підвищення рівня глюкози до $83,7 \pm 7,4$ ммоль/л та призводило до загибелі тварин.

Таким чином, дані біохімічних та гістохімічних досліджень свідчать про те, що за умов нашого експерименту введення 40 мг алоксану на кг маси тіла забезпечує на 20-30 добу після його введення розвиток цукрового діабету у щурів. Всі подальші дослідження були проведені у цей період часу.

Порушення мінерального обміну та рівня активних метаболітів вітаміну D₃. Дані літератури про порушення мінерального обміну при цукровому діабеті є досить суперечливі. Так, деякі автори показують зниження вмісту кальцію у крові при цукровому діабеті (Nyomba, 1989), у той час як інші відмічають, що у хворих на цукровий діабет рівень кальцію у сироватці крові не відрізняється від середніх показників здорових людей того ж віку (Хунгу, 1988). У той же час, у хворих на цукровий діабет відмічається розвиток діабетичної остеопенії, однією із можливих причин якої можуть бути істотні порушення мінерального обміну (Bouillon, 1987).

Проведені нами дослідження виявили, що за умов експериментального діабету вміст кальцію у сироватці крові знижується у 1,5 рази порівняно з його вихідним рівнем

(Рис. 1). Можливо подібні зміни є наслідком зниження рівня активних метаболітів вітаміну D₃ у сироватці крові тварин з експериментальним цукровим діабетом.

Дані літератури про зміну вмісту активних метаболітів вітаміну D₃ у сироватці крові при цукровому діабеті нечисленні і часто суперечливі.

За даними деяких авторів при цукровому діабеті концентрація 25OHD₃ у сироватці крові не відрізнялась від такої у контрольної групи тварин (Nyomba, 1985). Рівень загального 1,25(OH)₂D₃ при даній патології знижувався (Nyomba, 1985), в той час як вміст вільного 1,25(OH)₂D₃ наближався до його рівня у контрольних тварин (Pike, 1980; Rappenhimer, 1987).

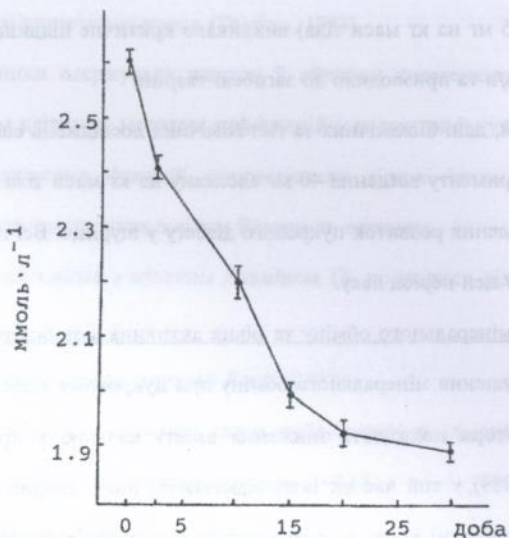


Рисунок 1. Зміна рівня кальцію у сироватці крові шурів при алоксановому діабеті (M ± m; n=8)

Неоднозначні також дані літератури щодо вмісту активних метаболітів вітаміну D₃ у хворих на цукровий діабет (Frazer et al., 1981; Christiansen et al., 1982; Ishida et al., 1985).

Причина подібних розбіжностей, можливо, пов'язана з різною мірою тяжкості захворювання або індивідуальними, більш глибокими ураженнями печінки чи нирок, де відбуваються процеси гідроксилування вітаміну D₃.

Одержані нами результати по визначенню вмісту активних метаболітів вітаміну D₃ у сироватці крові щурів з алоксановим діабетом наведені у Табл. 1.

Таблиця 1. Вміст активних метаболітів вітаміну D₃ у сироватці крові щурів з алоксановим діабетом (M±m; n=5)

Умови дослідю	Активні метаболіти вітаміну D ₃ , нг/мл		
	25OHD ₃	24,25(OH) ₂ D ₃	1,25(OH) ₂ D ₃
Контроль	5,3 ± 0,3	3,4 ± 0,3	0,16 ± 0,01
Діабет	2,3 ± 0,2*	1,3 ± 0,1*	0,080 ± 0,006*

* достовірно відносно контролю

Як видно із цих даних, у щурів експериментальної групи через 30 днів після введення алоксану спостерігається значне зниження всіх досліджуваних метаболітів вітаміну D₃. Необхідно зазначити, що найбільш вираженим є зменшення у сироватці крові вмісту 25OHD₃ та 24,25(OH)₂D₃, кількість яких знижується на 59% та 60% відповідно. Менш вираженою є зміна вмісту 1,25(OH)₂D₃. Його рівень знижується на 50% по відношенню до його вмісту у контрольних тварин.

З нашої точки зору, можливими причинами зниження рівня активних метаболітів холекальціферолу у сироватці крові при експериментальному діабеті може бути як пору-

шення його всмоктування слизовою тканиною тонкого кишечника, так і порушення процесів обміну вітаміну D₃ в організмі.

Всмоктування холекальціферолу у тонкому кишечнику. З метою вивчення всмоктування вітаміну D₃ клітинами слизової оболонки тонкого кишечника тваринам контрольної групи і групі щурів з алоксановим діабетом *per os* вводили 9 пмоль міченого холекальціферолу і досліджували його надходження із тонкого кишечника у кровотік.

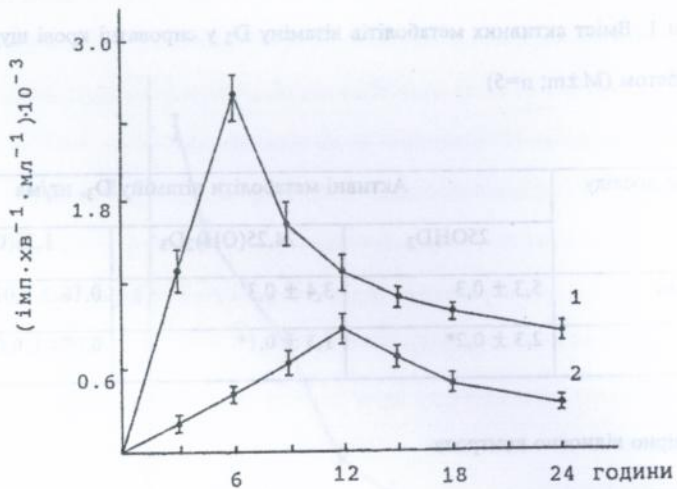


Рисунок 2. Накопичення [³H]-холекальціферолу у крові щурів при його введенні тваринам *per os* (M± m; n=7)

1 - контроль 2 - діабет

Як видно із наведених на Рис. 2 даних, у контрольних тварин в інтервалі часу до 24 годин відбувається збільшення кількості сумарної радіоактивності з максимальним підвищенням на 6 годину.

У щурів з алоксановим діабетом відмічається не тільки зниження у 2,7 рази виходу міченого холекальціферолу у кровотік, але і спостерігається зміщення максимуму накопичення радіоактивності у крові щурів до 12 годин проти 6 годин у контрольних тварин. Подібний зсув максимуму накопичення $[^3\text{H}]$ -холекальціферолу і зменшення порівняно з контролем рівня вмісту радіоактивності протягом всього інтервалу часу у щурів експериментальної групи, очевидно, свідчать про зниження всмоктування вітаміну D_3 слизовою оболонкою тонкого кишечника щурів за данної патології.

Таблиця 2. Зміна вмісту ліпідних компонентів слизової оболонки тонкого кишечника щурів при експериментальному цукровому діабеті ($M \pm m$; $n=8$)

Група	Ліпіди слизової тканини тонкого кишечника, мг/г сирової тканини		
	Загальні ліпіди	Холестерин	Фосфоліпіди
Контроль	$8,10 \pm 0,44$	$2,35 \pm 0,04$	$2,79 \pm 0,25$
Діабет	$14,20 \pm 0,97^*$	$3,73 \pm 0,10^*$	$4,57 \pm 0,40^*$

* достовірно відносно контролю

Можливо, виявлене порушення всмоктування вітаміну D_3 відбувається за рахунок зміни ліпідного складу слизової тканини тонкого кишечника щурів. При проведенні аналізу вмісту ліпідних компонентів слизової тканини тонкого кишечника щурів при експериментальному цукровому діабеті нами були виявлені зміни порівняно з контролем (Табл. 2), які виражались у підвищенні рівня загальних ліпідів, загальних фосфоліпідів та холестерину відповідно на 75%, 64% та 58%.

Подібні зміни, як відомо (Бауман, 1989), можуть призвести до модифікації структури мембран щіткової крайки і порушення їх транспортної функції. Вірогідно, що виявлені нами зміни ліпідного складу слизової тканини тонкого кишечника пояснюють порушення всмоктування холекальціферолу в цьому органі і це є однією із причин зниження забезпеченості організму активними метаболітами вітаміну D₃ при експериментальному цукровому діабеті.

Обмін вітаміну D₃ в печінці щурів. Відомо, що до 70% холекальціферолу із кровотоку поглинається печінкою (Dueland, 1982), де відбувається перший етап його гідроксилування у 25 положенні (Garson-Ватте, 1985). У той же час відомо, що при деяких захворюваннях печінки (цироз, жовтяниця) спостерігається порушення забезпеченості організму активними метаболітами вітаміну D₃ (Maiyar et al., 1991), вірогідно, внаслідок

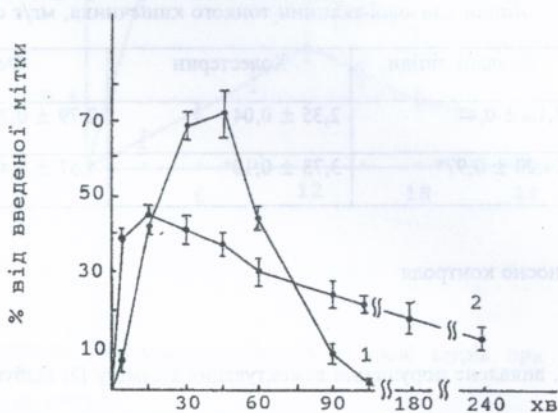


Рисунок 3. Накопичення [³H]-холекальціферолу в печінці щурів (M ± m; n=5)

1 - контроль 2 - діабет

зміни надходження холекальціферолу у печінку, та порушення його гідроксилування в цьому органі. Тому наступним напрямком наших досліджень було вивчення механізмів можливого порушення обміну вітаміну D₃ в печінці при експериментальному діабеті.

З метою вивчення поглинання вітаміну D₃ печінкою контрольній групі та групі тварин з алоксановим діабетом внутрішньовенно вводили 4,5 пмоль [³H]-холекальціферолу. Як видно із наведених даних (Рис. 3), у контрольних тварин до 45 хвилини поглинається 72% холекальціферолу від введеної у кровотік радіоактивності, а на 105 хвилину мічений холекальціферол практично повністю виводиться з печінки.

При алоксановому діабеті розподіл загальної радіоактивності в печінці істотно змінюється. Не звертаючи уваги на те, що максимум накопичення радіоактивності спостерігається вже на 15 хвилину, кількість включеного вітаміну D₃ у точці максимуму знижується до 45%, що свідчить про зниження поглинання вітаміну D₃ печінкою при експериментальному діабеті на 27%. При цьому при даній патології більш, ніж вдвічі подовжується час обміну холекальціферолу у печінці. Якщо у контрольних тварин введений у кровотік [³H]-вітамін D₃ метаболізується протягом 105 хвилин, то за умов цукрового діабету на цей період часу більш, ніж 20% введеної у кровотік загальної радіоактивності лишається у печінці. Ці результати, напевно, свідчать про значне зниження інтенсивності поглинання вітаміну D₃ печінкою та його обміну у цьому органі за даної патології.

При алоксановому діабеті також порушується і процес гідроксилування холекальціферолу в печінці. Як видно із даних Рис. 4, максимум вмісту [³H]-холекальціферолу в печінці контрольних щурів припадає на 30 хвилину після введення радіоактивності. Вміст вітаміну D₃ на цей період часу вдвічі вище, ніж вміст його гідроксильованої форми. Але вже на 45 хвилині досліджу частка [³H]-25-гідроксихолекальціферолу складає 62% від загальної радіоактивності. Рівень негідроксильованої форми вітаміну D₃ помітно зменшувався, і на 105 хвилину в печінці контрольних щурів процес гідроксилування [³H]-холекальціферолу практично завершується. У той же час,

в печінці шурів з експериментальним цукровим діабетом на 45 хвилину експозиції гідроксильється не більше, ніж 20% вітаміну D₃. Причому, протягом всього досліджуваного часу процес перетворення вітаміну D₃ у 25OHD₃ в печінці тварин з алоксановим діабетом є уповільненим, і, навіть, на 240 хвилину більш, ніж 20% від загальної радіоактивності у цьому органі припадає на долю негідроксильованої форми холекальціферолу.

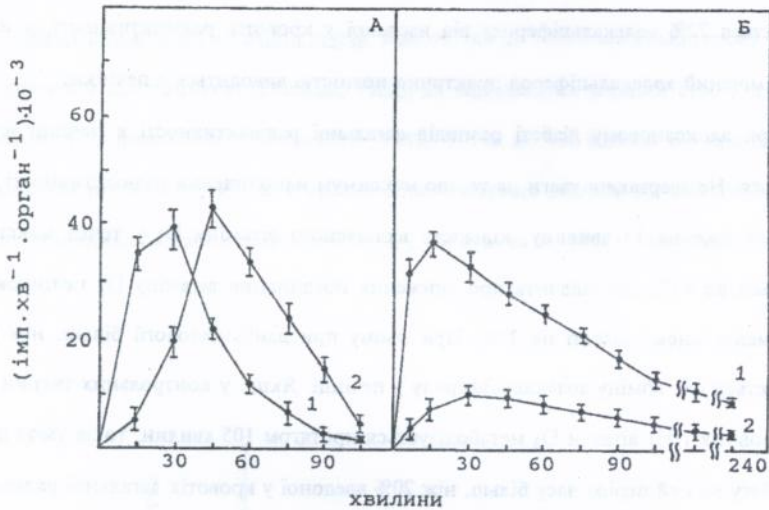


Рисунок 4. Вміст $[^3\text{H}]$ -холекальціферолу (1) та $[^3\text{H}]$ -25-гідроксихолекальціферолу (2) в печінці шурів ($M \pm m$; $n=5$)

A - контроль B - діабет

Проведені дослідження по обміну вітаміну D₃ в печінці підтверджують дані про вміст холекальціферолу та 25OHD₃ у сироватці крові (Рис. 5). Із наведених результатів видно, що у сироватці крові контрольних тварин через 15 хвилин після введення міченого холекальціферолу основна його частина (біля 90%) припадає на долю вітаміну D₃, що корелює з даними про процес його гідроксильовання в печінці. На 45 хвилині експозиції, коли в печінці більша частина радіоактивності представлена у формі $[^3\text{H}]$ -25OHD₃

(Рис. 4), у сироватці крові негідроксильована форма вітаміну D₃ практично відсутня. Основна кількість сумарної радіоактивності у сироватці крові на 45 хвилини, а , особливо, на 60 хв, представлена тільки у формі [³H]-25OHD₃.

Зменшення вмісту [³H]-25OHD₃ у сироватці крові після 60 хв є наслідком того, що на цей період часу переважна кількість

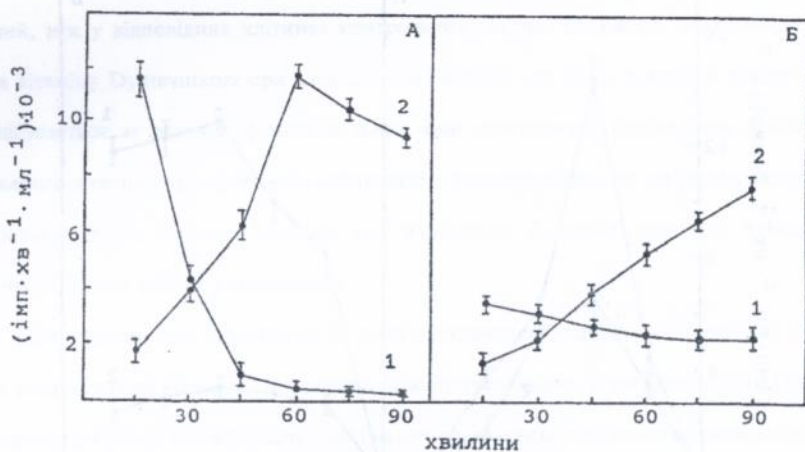


Рисунок 5. Вміст [³H]-холекальціферолу (1) та [³H]-25-гідроксиколекальціферолу (2) у сироватці крові щурів ($M \pm m$; $n=6$)

А - контроль Б - діабет

[³H]-вітаміну D₃ гідроксильована, а інтенсивність виходу гідроксильованої форми холекальціферолу із печінки у кровотік залишається незмінною. У той же час, при експериментальному діабеті зменшення вмісту [³H]-вітаміну D₃ у сироватці крові з 15 до 90 хв експозиції відбувається повільніше. На 90 хв, коли у щурів контрольної групи у сироватці крові виявлений тільки [³H]-25OHD₃, у тварин з експериментальним діабетом до 50% загальної радіоактивності припадає на долю [³H]-холекальціферолу. При цьому,

вміст $[^3\text{H}]\text{-}25\text{OH}\text{D}_3$ на цей період часу становить тільки 40% від його рівня у контрольних тварин, що відповідає більш високому рівню вітаміну D_3 в печінці.

Таким чином, результати досліджень, наведених на Рис. 4 та 5 підтверджують, що при експериментальному діабеті порушується процес гідроксилювання вітаміну D_3 у печінці.

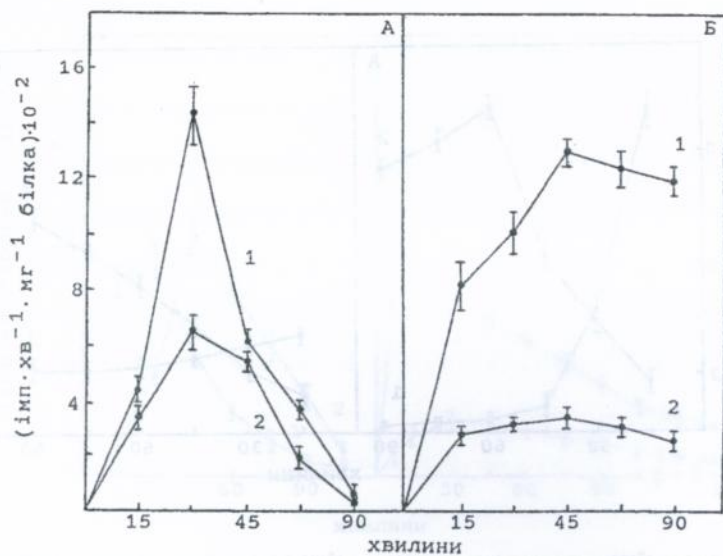


Рисунок 6. Поглинання $[^3\text{H}]\text{-}$ холекальціферолу ретикулоцитами (1) та гепатоцитами (2) ($\text{M} \pm \text{m}$; $\text{n}=5$)

А - контроль Б - діабет

Однією із причин зміни процесу гідроксилювання вітаміну D_3 у печінці, напевно, є порушення його транспорту у гепатоцити. Відомо, що вітамін D_3 із кровотоку поглинається не тільки гепатоцитами, де відбувається його гідроксилювання (Hollis, 1990), але і ретикулоцитами, які виконують щодо холекальціферолу роль депо (Dueland et al., 1981; Апуховська, 1991). Із одержаних даних видно (Рис. 6), що вміст радіоактивності у ретикулоцитах контрольних тварин на 30 хвилину експозиції вдвічі вищий, ніж

у гепатоцитах, але після цього періоду її рівень починає швидко знижуватись, а на 90 хвилині мічений вітамін D_3 у ретикулоцитах практично відсутній. Враховуючи, як було зазначено раніше, що протягом 105 хв весь вітамін D_3 , що був поглинений печінкою, метаболізується у 25-гідроксивітамін D_3 , можна зробити заключення, що вітамін D_3 із ретикулоцитів поступово транспортується у гепатоцити.

При експериментальному діабеті вміст міченого вітаміну D_3 у гепатоцитах значно менший, ніж у відповідних клітинах контрольних тварин. Можливо, зниження поглинання вітаміну D_3 печінкою при алоксановому діабеті, яке було показано раніше (Рис. 3), відбувається за рахунок функціональних змін гепатоцитів. Окрім того, відсутність вираженого зменшення вмісту радіоактивності у ретикулоцитах, як це спостерігається у контрольній групі, напевно, свідчить про порушення за даної патології транспорту вітаміну D_3 із цих клітин у гепатоцити.

Припущення про порушення за умов алоксанового діабету інтенсивності поглинання гепатоцитами вітаміну D_3 знайшло своє підтвердження у дослідях *in vitro* (Рис. 7). Як видно із рисунку, інтенсивність поглинання радіоактивності гепатоцитами контрольних щурів значно вища, ніж включення міченого холекальціферолу у гепатоцити діабетичних щурів. Так, максимальне поглинання $[^3H]$ -вітаміну D_3 у контрольній групі припадає на 60 хвилину інкубації, у той час, як гепатоцити щурів з алоксановим діабетом зв'язують максимальну кількість радіоактивності тільки на 120 хвилину. При цьому, кількість міченого вітаміну D_3 , що був поглинений гепатоцитами у цей інтервал часу, на 25% нижчий від рівня включення ізотопу, який спостерігався у цих клітин контрольної групи щурів. Одержані дані відповідають результатам дослідів *in vivo* (Рис. 6), які теж виявляють більш інтенсивне порівняно з експериментальним діабетом поглинання $[^3H]$ -холекальціферолу гепатоцитами щурів контрольної групи. Зміщення максимуму поглинання вітаміну D_3 гепатоцитами, яке було виявлене нами як у дослідях *in vivo*,

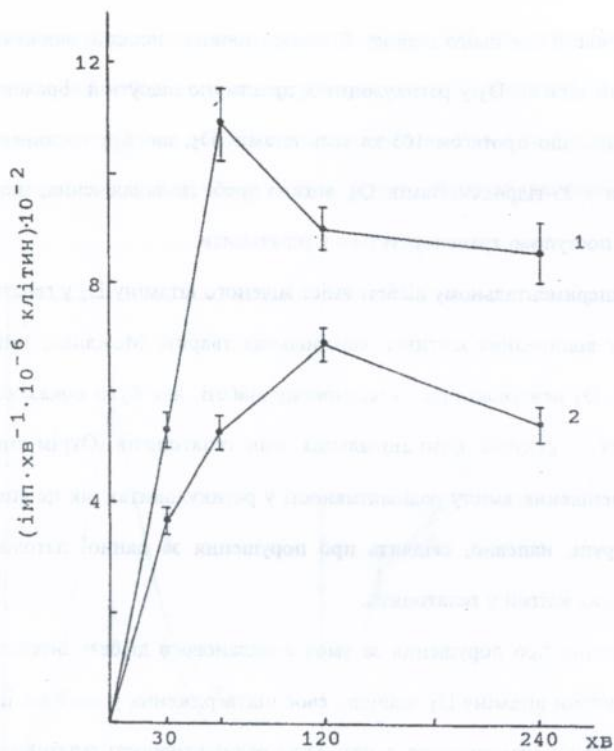


Рисунок 7. Поглинання $[^3\text{H}]$ -холекальциферолу гепатоцитами контрольних (1) та дослідних тварин (2) в системі досліді *in vitro* ($M \pm m$; $n=5$)

так і у досліді *in vitro*, свідчить про лімітування процесу транспорту холекальциферолу у клітини, напевно, за рахунок структурних змін клітинних мембран.

Іще однією із можливих причин порушення обміну вітаміну D_3 в печінці може бути зміна активності вітаміну D_3 25-гідроксилазної системи печінки.

За даними літератури відомо, що процес гідроксилювання вітаміну D_3 у гепатоцитах здійснюється двома ферментами, які локалізовані відповідно у мікросомальній та мітохондріальній фракціях і здатні реалізувати свою дію при різних концентраціях субстрату (Hollis, 1990). Вважають, що мікросомальна вітаміну D_3 25-гідроксилаза функціонує при фізіологічних концентраціях холекальциферолу і має високу спе-

цифічність, але низьку ємність зв'язування (Madhok, 1979). Вітамін D₃ 25-гідроксилаза мітохондрій виявляє свій ефект при високих концентраціях вітаміну D₃ і має низьку

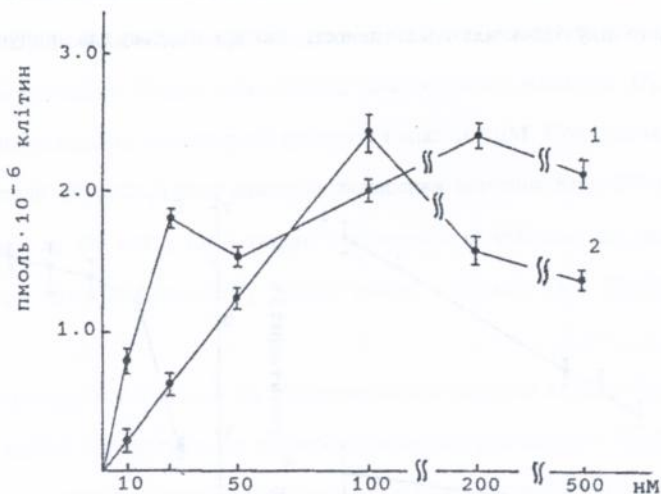


Рисунок 8. 25-Гідроксилювання вітаміну D₃ гепатоцитами контрольних (1) та діабетичних (2) щурів при різних концентраціях субстрату ($M \pm m$; $n=5$)

специфічність, але високу ємність зв'язування субстрату (Bjorkheini, 1978). Нами також була показана наявність цих ферментів у гепатоцитах контрольних тварин (Рис. 8).

Як видно із наведених даних, у контролі спостерігається два піки гідроксилазної активності при концентраціях субстрату 25 та 200 нМ відповідно. Можливо, перший пік зумовлений активністю ферменту, який розташований у фракції мікосом. Збільшення концентрації субстрату понад 25 нМ призводить до інгібування цього ферменту, оскільки, за даними літератури, активність вітамін D₃ 25-гідроксилази мікосом регулюється як концентрацією вітаміну D₃, так і продуктом свого синтезу (Elbaz et al., 1985). Другий пік ферментативної активності при 200 нМ, напевно, зумовлений дією

мітохондріальної вітамін D₃ 25-гідроксилази. Збільшення концентрації субстрату понад 200 нМ супроводжувалось зниженням рівня процесу гідроксилювання, яке, однак, не було достовірним. У випадку алоксанового діабету за умов нашого досліду не було виявлено першого піку гідроксилазної активності, що дає підставу для припущення наяв-

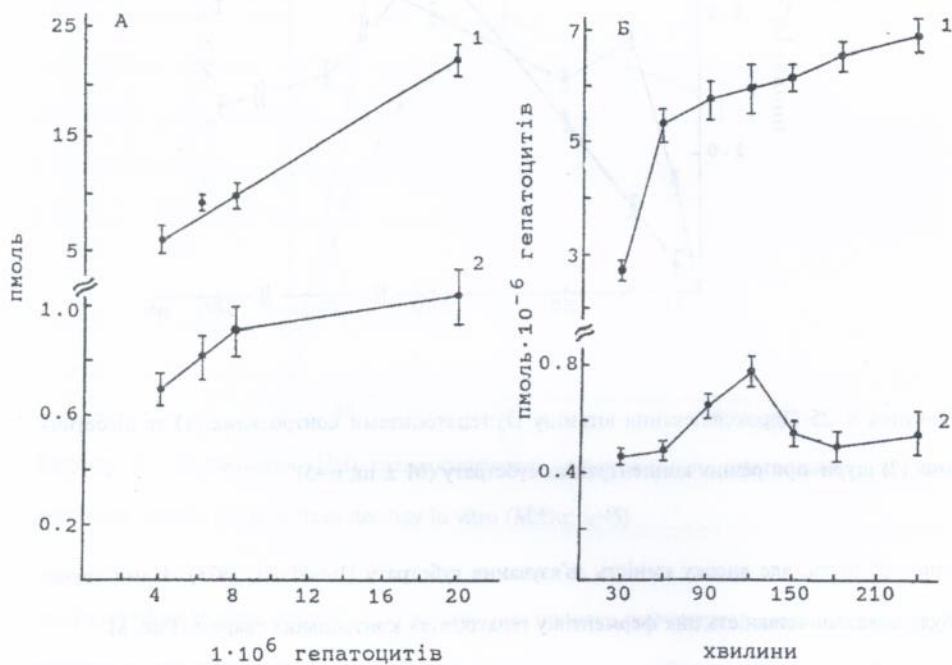


Рисунок 9. 25-Гідроксилювання вітаміну D₃ гепатоцитами контрольних (1) та діабетичних (2) шурів у залежності від часу інкубації (Б) та кількості клітин у середовищі інкубації (А) ($M \pm m$; $n=5$)

ності більш вираженого за даної патології порушення активності вітамін D₃ 25-гідроксилази мікросом. При експериментальному діабеті відмічається один максимум утворення 25-гідроксिवітаміну D₃ при концентрації субстрату 100 нМ. При цьому, на відміну від вітамін D₃ 25-гідроксилази мітохондрій контрольних тварин, активність цього ферменту при алоксановому діабеті більше залежить від забезпеченості вітаміном D₃, оскільки знижується при збільшенні концентрації субстрату понад 100 нМ. При розрахунку кінетичних параметрів цієї реакції було виявлено збільшення значення K_m з 200 нМ у контрольних тварин до 400 нМ у групі тварин з алоксановим діабетом, що свідчить про інгібування при експериментальному діабеті також і вітамін D₃ 25-гідроксилази мітохондрій.

Зниження активності вітамін D₃ 25-гідроксилазної системи печінки при експериментальному діабеті підтверджується також результатами дослідження 25-гідроксилювання холекальціферолу гепатоцитами в залежності від часу інкубації та кількості клітин у середовищі інкубації (Рис. 9).

Таким чином, можна сказати, що зниження рівня активних метаболітів холекальціферолу при алоксановому діабеті, напевно, пов'язане як зі зниженням інтенсивності всмоктування вітаміну D₃ слизовою тканиною тонкого кишечника, так і порушень його гідроксилювання в печінці внаслідок порушення транспорту холекальціферолу в гепатоцити та інгібування активності 25-гідроксилазної системи печінки.

На основі одержаних даних, а також за даними літератури про вплив вітаміну D₃ на структуру та функції β-клітин підшлункової залози (Christacos et al., 1981; Cade et al., 1987) виявилось доречним з'ясувати можливість холекальціферолу попереджувати або послаблювати перебіг захворювання на цукровий діабет.

Таблиця 3. Вміст глюкози, інсуліну у сироватці крові, кількість β -клітин підшлункової залози щурів ($M \pm m$; $n=15$)

Умови дослідю	Вміст глюкози, ммоль/л	Вміст інсуліну, нмоль/л	Кількість β -клітин, од.
Контроль	$6,5 \pm 0,6$	$6,1 \pm 0,5$	$63,0 \pm 1,6$
Діабет (48 годин після введення алоксану)	$45,1 \pm 2,5$	$1,9 \pm 0,2$	$38,8 \pm 1,8$
Діабет (30 діб після введення алоксану)	$38,4 \pm 1,2$	$1,5 \pm 0,1$	$22,3 \pm 1,2$
Діабет + 10 МЕ вітаміну D ₃	$7,7 \pm 0,7^*$	$5,7 \pm 0,4^*$	$59,2 \pm 1,7^*$

* достовірно відносно діабетичного стану на 30 добу дослідю

З метою з'ясування протекторної дії вітаміну D₃ щурам на другу добу після ін'єкції алоксану щоденно, протягом 30 діб вводили 10 МЕ (фізіологічна доза) холекальціферолу (Табл. 3).

Представлені дані показують, що введення фізіологічної дози вітаміну D₃ попереджує розвиток цукрового діабету у щурів, про що свідчить факт збереження на толерантному рівні концентрацій глюкози та інсуліну порівняно з групою тварин, які холекальціферолу не одержували. Окрім того, в групі щурів, які одержували вітамін D₃ не спостерігалось пошкоджень структури β -клітин підшлункової залози.

Таблиця 4. Вміст глюкози і інсуліну у сироватці крові щурів ($M \pm m$; $n=15$)

Умови дослідю	Вміст глюкози, ммоль/л	Вміст інсуліну, нмоль/л
Контроль	$6,8 \pm 0,3$	$5,62 \pm 0,48$
Діабет (30 діб після введення алоксану)	$38,4 \pm 1,2$	$1,54 \pm 0,12$
Діабет (60 діб після введення алоксану)	$37,9 \pm 1,1$	$1,17 \pm 0,09$
Діабет + 80 МЕ D ₃	$20,7 \pm 2,1^*$	$4,03 \pm 0,21^*$
Діабет + 2 МЕ інсуліну	$16,7 \pm 1,5^*$	$4,81 \pm 0,39^*$
Діабет + 80 МЕ D ₃ + 1 МЕ інсуліну	$17,0 \pm 1,8^*$	$3,84 \pm 0,33^*$

* достовірно відносно діабетичного стану на 60 добу дослідю.

Для з'ясування можливості використання холекальціферолу для нормалізації структури і функції β -клітин и підшлункової залози щурам з глибоким алоксановим діабетом, тобто через 30 діб з часу введення алоксану, протягом 30 днів вводили 80 МЕ (лікувальна доза) вітаміну D₃. Одержані дані показують (Табл. 4), що в групі тварин, які одержували вітамін D₃, відмічається зниження рівня глюкози і підвищення вмісту інсуліну у сироватці крові, що наближується до подібних значень у групі тварин, яким вводили 2 МЕ інсуліну.

При сумісному використанні вітаміну D₃ та 1/2 дози інсуліну також відмічається порівняно з діабетичним станом достовірно зниження вмісту глюкози та збільшення рівня інсуліну.

Одержані результати, напевне, дозволяють говорити про стимулюючу дію вітаміну D₃ на β-клітин и підшлункової залози і про опосередкований через цю дію гіпоглікемічний ефект холекальціферолу.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що при експериментальному цукровому діабеті порушується мінеральний обмін внаслідок зниження забезпеченості організму активними метаболітами вітаміну D₃: 25-гідроксихолекальціферолом, а також 24,25- та 1,25-дигідроксихолекальціферолом.

2. Установлено, що при алоксановому діабеті відбувається зниження інтенсивності всмоктування холекальціферолу клітинами слизової оболонки тонкого кишечника шурів.

3. Виявлено, що за умов досліджуваної патології у слизовій тканині тонкого кишечника збільшується вміст загальних ліпідів, холестерину та загальних фосфоліпідів на 75%, 58% і 64% відповідно.

4. Показано, що при експериментальному цукровому діабеті на 36% знижується поглинання холекальціферолу печінкою шурів із кровотоку.

5. Установлено, що при алоксановому діабеті порушується розподіл холекальціферолу між різними типами клітин печінки, і на 73% знижується його поглинання гепатоцитами.

6. Виявлено, що за умов досліджуваної патології порушується обмін вітаміну D₃ в печінці: збільшується час і знижується інтенсивність його гідроксилювання у 25OHD₃ внаслідок інгібування вітамін D₃ 25-гідроксилазної системи.

7. Показано доцільність використання вітаміну D₃ у комплексній терапії цукрового діабету, яка обумовлюється його здатністю знижувати рівень глюкози і підвищувати концентрацію інсуліну у сироватці крові експериментальних тварин.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Транспорт витамина D₃ через кишечник и его обмен в печени крыс при аллоксановом диабете /Л.И.Апуховская, М.В.Стефанов, Л.В.Антоненко, Л.И.Омельченко // Пробл. эндокринологии.- 1993.- N2.- С.43-46.
2. Влияние различных концентраций аллоксана на содержание глюкозы, кальция и активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс / М.В.Стефанов // Укр. биохим. журн.- 1993.- N3. - С.107-110.
3. Особенности обмена витамина D₃ в клетках печени при экспериментальном сахарном диабете / М.В.Стефанов, Л.И.Апуховская // Укр. биохим. журн.- 1996.-т.68, N1.- С.66-72.
4. Современные представления о механизме биологического действия витамина D₃ в организме /Л.И. Апуховская, М.В. Стефанов, Л.И. Омельченко, Ю.Г. Антипкин // Журн. Акад. мед.наук Украины - 1996. - №1. -С.15-32
5. Стефанов М.В., Антоненко Л.В., Апуховская Л.И. Всасывание витамина D₃ в кишечнике и его 25-гидроксилирование в печени крыс с экспериментальным диабетом // Всесоюз. науч. конф. "Клиническая витаминология" (Москва, июнь 1991г.): Тез. докл.- М., 1991.- С.318-319.
6. Стефанов М.В., Апуховская Л.И. Обмен витамина D₃ в клетках печени при аллоксановом диабете и возможное его применение для профилактики и лечения данной патологии // Межд. симп. "Витамины и здоровье населения Беларуси и смежных регионов" (Гродно, 1995г.): Тез. докл. - Г., 1995.- С.175.
7. Апуховська Л.І., Стефанов М.В. Фізіологічна функція вітаміну D₃ // Наук.-практ. конф. "Неінфекційна патологія тварин" (Біла Церква, червень 1995 р.): Мат. наук.-практ. конф.- Б.Ц., 1995.- С.24-26.

Stefanov M.V. "Study of vitamin D₃ metabolism in liver with experimental diabetes mellitus". The dissertation on degree of candidate of biological science, speciality 03.00.04 - biochemistry. A.V. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine.

The results of experimental studies in rat liver vitamin D₃ metabolism in experimental diabetes mellitus are defended. The pathology tested revealed that vitamin D₃ metabolism disturbance had place in the liver due to the hydroxylation process change in the organ, as a consequence of cholecalciferol distribution injury in the hepatic cells, and its transport into hepatocytes, where the process its hydroxylation in the 25th position and inhibition of the liver vitamin D₃ 25-hydroxylase system activity took place. The data displayed provides for the statement about the vitamin D₃ application advisability in the complex curative therapy of diabetes mellitus, that have been claimed as an application for the patent of Ukraine.

Стефанов М.В. "Изучение обмена витамина D₃ в печени крыс при экспериментальном диабете". Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия. Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины.

Защищаются результаты экспериментальных исследований по обмену витамина D₃ в печени крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Установлено, что при изучаемой патологии происходит нарушение обмена витамина D₃ в печени, связанное с изменением процесса его гидроксирования в этом органе, вследствие нарушения распределения холекальциферола по клеткам печени, его транспорта в гепатоциты, где осуществляется процесс его гидроксирования в 25 положении, и ингибирования активности витамин D₃ 25-гидроксилазной системы печени. Приведены результаты, которые позволяют говорить о целесообразности применения витамина D₃ в комплексной терапии сахарного диабета. Эти данные оформлены в виде заявки на патент Украины.

Ключові слова: експериментальний цукровий діабет, вітамін D₃, гепатоцити, вітамін D₃ 25-гідроксилазна система.



Підписано до друку 11.02.97р. Формат 60x84/16.
Ум. друк. арк. 1,0. Обл.-вид. арк. 1,0.
Наклад 100. Зам. 35.

Відділ оперативної поліграфії
Центру Міжнародної освіти
227-41-23, 227-12-75, 227-37-86

434928

AB 37.026