

УДК 577.161.2+616.379-008.64+616.71-007.234

©Коллектив авторов

РОЛЬ ВИТАМИНА D₃ В РЕГУЛЯЦИИ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА

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

Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины,
01601 Украина, Киев, ул. Леонтовича, 9; эл. почта: konsument3@gmail.com

При экспериментальном стрептозотоциновом диабете 1 типа у мышей возникает значительный дефицит витамина D₃, детектируемый по снижению уровня 25(OH)D₃ в сыворотке крови. Недостаточность витамина D₃ коррелировала с нарушениями минерального обмена в костной ткани, что свидетельствует о развитии вторичного остеопороза. Наблюдалось уменьшение массы, длины и диаметра (диафиза, проксимального метаэпифиза) большой берцовой кости у животных с диабетом по сравнению с контрольными. В сыворотке крови при диабете была обнаружена выраженная гипокальциемия и гипофосфатемия, а также повышение ферментативной активности щелочной фосфатазы и её изоферментов. Продemonстрировано нарушение экспрессии изоформ витамин D₃ 25-гидроксилазы печени CYP27A1 и CYP2R1, которые являются основными ферментами биотрансформации холекальциферола в 25(OH)D₃ – предшественника гормонально активных форм витамина D₃. Введение витамина D₃ обуславливало нормализацию уровня 25(OH)D₃ в сыворотке крови, что сопровождалось значительным улучшением состояния минерального обмена по сравнению с группой диабета. Нормализация концентрации общего, ультрафильтрационного кальция и неорганического фосфата, уменьшение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови, а также увеличение массы, длины, диаметра (диафиза, проксимального эпиметафиза) большой берцовой кости у диабетических животных, которым вводили холекальциферол, свидетельствовали о уменьшении процессов костной резорбции. Также были отмечены положительные изменения экспрессии изоформ витамин D₃ 25-гидроксилазы печени (CYP27A1 и CYP2R1). Таким образом, нарушения минерального обмена при экспериментальном сахарном диабете у мышей определяются дефицитом витамина D₃ и его гормонально активных форм.

Ключевые слова: витамин D₃, сахарный диабет, вторичный остеопороз, маркеры резорбции костной ткани, CYP27A1, CYP2R1.

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет 1 типа (СД1) является мультифакторным эндокринно-обменным заболеванием, для которого характерен генетически детерминированный дефицит гормона поджелудочной железы – инсулина. Как следствие, развивается устойчивая гипергликемия, хронический воспалительный процесс и нарушается обмен веществ, что ведёт к развитию вторичных осложнений, таких как микро- и макроангиопатии, нефропатии, ретинопатии, нейропатии [1, 2]. В последнее время в группу хронических

осложнений сахарного диабета всё чаще включают патологические изменения костной ткани. Полученные убедительные данные свидетельствуют о том, что при сахарном диабете имеется тенденция к нарушению процессов ремоделирования и метаболизма костной ткани [3]. Это приводит к снижению массы костной ткани и изменению её микроархитектоники, что в большинстве случаев диагностируется как вторичный остеопороз [4, 5]. Дисфункция ремоделирования на молекулярном уровне опосредуется интенсификацией неферментативного гликозилирования (AGEs), прооксидантных

* - адресат для переписки

процессов в клетках костной ткани, нарушениями RANKL-OPG-сигналинга, wnt-сигналинга и системы цитокиновой регуляции [6]. Общепринятыми маркерами костной резорбции являются понижение концентрации ионов кальция (Ca²⁺) и фосфат-анионов (Pi), увеличение активности общей щелочной фосфатазы в сыворотке крови, а также уменьшение метрических показателей, зольности и минеральных компонентов костей экспериментальных животных [7]. При вторичном остеопорозе нарушается гормональное звено метаболизма кальция, что ведёт к изменениям в функционировании системы паратгормон-кальцитонин-витамин D₃ [8]. Витамин D₃ – мощный регулятор кальциево-фосфорного гомеостаза – играет важную роль в поддержании здоровья костей [9]. В частности, дефицит витамина D₃ и нарушение образования его гормонально активных форм снижает абсорбцию ионизированного кальция в тонком кишечнике, повышает уровень паратгормона и через снижение уровня кальцитонина ведёт к усилению резорбции костной ткани и остеопорозу. Гормонально активная форма витамина D₃ (1,25(OH)₂D₃), являясь лигандом ядерных рецепторов NR1H1 (VDR), осуществляет регуляцию экспрессии ряда генов в ядрах остеобластов и остеокластов [10]. В тканях-мишенях VDR функционирует как в клеточных ядрах – в качестве фактора, влияющего на транскрипцию около 3% всего человеческого генома, так и в плазматических мембранах в качестве модулятора активности целого ряда важнейших физико-химических и биохимических процессов. Следует отметить, что возможная патогенетическая роль нарушений обмена витамина D₃ в механизме развития вторичного остеопороза при сахарном диабете на сегодня является не достаточно изученной. Важнейшим ферментом первого этапа биотрансформации холекальциферола в 25-гидроксихолекальциферол (25(OH)D₃) и далее в гормонально активные формы витамина D₃ в организме является витамин D₃ 25-гидроксилаза в печени, а именно митохондриальная CYP27A1 и микросомальная CYP2R1 изоформы цитохрома P450. Именно полиморфизм генов витамин D₃ 25-гидроксилазы или нарушение их экспрессии связывают с дефицитом 25(OH)D₃ в организме [11, 12].

Таким образом, цель данной работы заключалась в установлении зависимости между обеспеченностью организма витамином D₃ (по содержанию 25(OH)D₃), экспрессией изоформ витамин D₃ 25-гидроксилазы CYP27A1 и CYP2R1 и состоянием минерального обмена при экспериментальном сахарном диабете 1 типа.

МЕТОДИКА

Исследования проведены на самцах мышей линии C56Bl/J6 массой 22±3 г. Диабет 1 типа вызвали 5-кратным введением стрептозотоцина (STZ, “Sigma-Aldrich”, США) в дозе 40 мг/кг веса тела животного. Такой способ введения STZ является оптимальным для индукции развития экспериментального аутоиммунного диабета 1 типа у подопытных мышей [13]. В исследовании использовали животных после 6 недель развития диабета с уровнем глюкозы крови 20,4±4,3 ммоль/л. После развития устойчивой гипергликемии мышам вводили препарат витамина D₃ (“DSM”, Нидерланды) в течение 2-х месяцев в виде водной суспензии (800 МЕ/кг массы тела, *per os*). Контрольных животных содержали на полноценном рационе вивария. В период адаптации (неделя) и во время эксперимента животные находились в виварии при температуре 18-22°C, влажности 50-60%, естественном световом режиме “день-ночь” в стандартных пластиковых клетках со свободным доступом к пище и воде. Подбор животных и формирование групп проводили по методу “случайных чисел” [14]. Эвтаназию животных осуществляли под лёгким эфирным наркозом. Эксперименты проводили в соответствии с международными рекомендациями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и научных целей” (Страсбург, 1986), “Общих этических принципов экспериментов на животных”, утверждённых Первым национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001).

Содержание белка определяли по методу Bradford [15]. Об обеспеченности организма мышей витамином D₃ судили по уровню 25(OH)D₃ сыворотки крови, который определяли иммуноферментным методом (набор ELISA, “Immunodiagnostic Systems Ltd.”, США). Регистрацию осуществляли на автоматическом микропланшеточном ридере (ER-500, “Sinnova”, Китай).

Уровень синтеза изоферментов витамин D₃ 25-гидроксилазы (CYP27A1 и CYP2R1) определяли методом иммуноблоттинга, основанном на детекции целевых белков с помощью специфических к ним иммуноглобулинов. Замороженные образцы ткани печени гомогенизировали в буфере для экстракции белков, содержащем 20 mM трис-HCl, pH 7,5, 1% Тритон X-100, 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1% дезоксихолат натрия и смесь ингибиторов протеиназ и фосфатаз (1 мкМ апротинин, 23 мкМ леупептин, 1,5 мкМ пепстатин, 1 mM фенилметан-сульфонилфторид, 5 mM бензамидин,

1 мМ ортованадат натрия) в соотношении 1:10 (вес/объём) на ледяной бане. Полученный гомогенат дополнительно обрабатывали на ультразвуковом дезинтеграторе Labsonic M, (Sartorius, Германия) и оставляли экстрагироваться на льду в течение 20 мин. Нерастворимую в детергенте фракцию осаждали центрифугированием при 14000 g в течение 20 мин. при 4°C. Белки лизатов разделяли электрофорезом (50–100 мкг/лунку) в полиакриламидном геле в буферной системе Лэммли, переносили их на нитроцеллюлозную мембрану ("Sigma", США) в течение 1 ч при 350 мА в буфере, содержащем 25 мМ трис, 192 мМ глицин, pH 8,3, 0,1% SDS, 20% метанол. Свободные центры связывания блокировали в течении 1 ч 5% обезжиренным сухим молоком ("Applichem", Германия) в фосфатном буфере, содержащем 0,05% твин-20. После каждого этапа инкубации мембрану трижды по 5 мин. отмывали в фосфатном буфере с 0,1% твин-20. Мембрану инкубировали ночь при 4°C с поликлональными антиCYP2R1 (1:200), антиCYP27A1 (1:200) антителами ("Santa Cruz Biotechnology", США) и в течение 1 ч при комнатной температуре с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (1:5000) ("Santa Cruz Biotechnology"). Для контроля содержания белков в пробах, мембрану инкубировали с моноклональными антителами против β -актина (1:10000) ("Sigma"). Иммунореактивные сигналы на мембране выявляли посредством инкубации мембраны с использованием люминол-кумаровой системы ("Sigma"). Интенсивность сигналов на рентгеновских плёнках рассчитывали с помощью программы GelPro32 [16].

Уровень кальция в сыворотке крови определяли с помощью био-тест набора ("LaChema", Чехия), используя в качестве стандартного раствора 25 ммоль/л CaCO_3 , растворенный в 1,7% HCl. Принцип метода основан на способности кальция образовывать с глиоксаль-бис-2(оксианилом), в щелочной среде, комплекс красного цвета, который определяется фотометрически. Содержание

неорганических фосфатов в сыворотке крови определяли по методу Дусе [17].

Активность щелочной фосфатазы (ЩФ – щелочная фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты) определяли по её способности расщеплять 4-нитрофенилфосфат с образованием 4-нитрофенола и фосфата. Мерой каталитической активности фермента служило количество освобождённого 4-нитрофенола, который определялся фотометрически. Активность костной термолабильной изоформы ЩФ определяли после инкубации образцов на водяной бане при 55°C, а активность кишечной изоформы ЩФ была определена с использованием ингибитора L-фенилаланина [18]. Зольность костной ткани определяли методом сухой минерализации при температуре 500-600°C, после её обезжиривания гексаном в течение 7-ми суток, и рассчитывали % относительно массы костной ткани. Содержание минеральных компонентов в золе определяли вышеописанными методами после растворения зола в 0,5 мл HCl. Остеометрические измерения проводили на большой берцовой кости стандартными методами, регистрацией следующих показателей: масса кости, её длина, толщина ПЭМ (проксимального эпиметафиза) и диафиза [19].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью компьютерной программы "Microsoft Excel". Оценку статистической значимости различий средних показателей проводили с использованием стандартного t-критерия Стьюдента для не коррелирующих выборок. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие экспериментального сахарного диабета у подопытных животных сопровождалось стойкой гипергликемией. Уровень глюкозы в крови мышей с СД повышался до $20,4 \pm 4,3$ ммоль/л по сравнению с $5,2 \pm 1,1$ ммоль/л в группе контроля. У животных-диабетиков, которым вводили холекальциферол, средний уровень глюкозы составлял $14,5 \pm 3,2$ ммоль/л (табл. 1).

Таблица 1. Уровень $25(\text{OH})\text{D}_3$ и глюкозы в сыворотке крови при экспериментальном сахарном диабете 1 типа и при введении витамина D_3 .

Экспериментальные группы	Содержание $25(\text{OH})\text{D}_3$		Уровень глюкозы в крови, мМ/л
	нМ/л	нг/мл	
Контроль	$85,6 \pm 4,11$	$34,2 \pm 1,64$	$5,2 \pm 1,1$
Диабет	$33,9 \pm 1,91^*$	$13,56 \pm 0,76^*$	$20,4 \pm 4,3^*$
Диабет + D_3	$81,2 \pm 5,33^\#$	$32,48 \pm 2,13^\#$	$14,5 \pm 3,2^*$

Примечание: Здесь и в таблицах 2, 3 данные представлены в виде средней величины \pm ошибка средней. В каждой группе было по 6 животных. * - Статистически достоверно по сравнению с контролем ($p < 0,05$), # - Статистически достоверно по сравнению с группой "диабет" ($p < 0,05$).

РОЛЬ ВИТАМИНА D₃ В МИНЕРАЛЬНОМ ОБМЕНЕ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА

Результаты последних исследований костной ткани демонстрируют её участие в эндокринной регуляции, а также роль молекулярных продуктов костного метаболизма в энергетическом обмене как в норме, так и при различных патологиях, в том числе и при сахарном диабете [20]. Нарушения фосфорно-кальциевого обмена возможны на разных этапах развития сахарного диабета, однако сведения о характере и степени выраженности этих нарушений немногочисленны и противоречивы, что требует проведения дополнительных исследований. Ряд авторов сообщают о нормокальциемии при сахарном диабете, в то время как в других работах отмечается повышение уровня кальция у таких больных [21, 22]. В то же время в некоторых клинических исследованиях показано снижение уровня биологически активного кальция [23, 24]. В свою очередь было установлено понижение костной плотности и уменьшение уровня остеокальцина и С-телопептида – маркеров ремоделирования, у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа [25].

Результаты наших биохимических исследований, приведенные в таблице 2, демонстрируют значительное падение содержания кальция и неорганического фосфата в сыворотке

крови в 1,4 и 1,3 раза соответственно. Гипокальциемия и гипофосфатемия коррелирует со значительным повышением ферментативной активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови животных с сахарным диабетом. Активность общей щелочной фосфатазы в группе диабета превышала таковую контрольной группы в 1,32 раза. Увеличение активности общей щелочной фосфатазы происходило, главным образом, за счёт изменения активности её костного изофермента. Так, в условиях сахарного диабета активность этой изоформы возросла почти в 1,7 раза относительно контроля, что свидетельствует об интенсификации резорбтивных процессов в костной ткани. Необходимо отметить, что в сыворотке крови диабетических мышей повышалась активность и кишечного изофермента щелочной фосфатазы в 1,45 раза.

Остеометрические показатели свидетельствуют о снижении массы, длины большой берцовой кости, длины и толщины её проксимального эпиметафиза у подопытных животных с сахарным диабетом. Более того, наблюдается снижение зольности большеберцовой кости в 1,2 раза, что сопровождается снижением содержания кальция и фосфора в ней в 1,5 и 1,3 раза соответственно (табл. 3). При длительном

Таблица 2. Содержание минеральных компонентов, активность щелочной фосфатазы и её изоферментов в сыворотке крови при экспериментальном сахарном диабете 1-го типа и при введении витамина D₃.

Исследуемые показатели	Контроль	Диабет	Диабет + D ₃
Общий кальций, ммоль/л	2,28±0,1	1,63±0,08*	2,07±0,6 [#]
Белоксвязанный кальций, ммоль/л	0,29±0,06	0,24±0,045*	0,25±0,034 [#]
Ультрафильтрационный кальций, ммоль/л	1,99±0,06	1,39±0,03*	1,82±0,05 [#]
Неорганический фосфат, ммоль/л	1,88±0,08	1,31±0,05*	1,83±0,06 [#]
Общая щелочная фосфатаза, Ед/л	238,1±6,3	314,7±9,2*	219,5±5,1 [#]
Кишечный изофермент щелочной фосфатазы, Ед/л	44,5±1,68	64,7±1,86*	48,3±1,52 [#]
Костный изофермент щелочной фосфатазы, Ед/л	158,2±5,4	264,3±7,2*	181,6±5,9 [#]

Таблица 3. Остеометрические показатели и содержание минеральных компонентов костной ткани мышей при экспериментальном сахарном диабете 1-го типа и при введении витамина D₃.

Исследуемые показатели	Контроль	Диабет	Диабет + D ₃
Большая берцовая кость:			
Масса, мг	330±11,55	240±10,84*	296±9,48 [#]
Длина, мм	17,7±0,2	16,8±0,2*	18,3±0,2 [#]
Толщина ПЭМ, мм	2,1±0,06	1,9±0,05*	2,15±0,06 [#]
Толщина диафиза, мм	1,6±0,07	1,35±0,05*	1,5±0,06 [#]
Зольность, %	56±2,4	47±1,9*	52±2,0 [#]
Содержание Ca ²⁺ , %	37,6±0,5	25,1±0,7*	38,7±0,6 [#]
Содержание P, %	16,2±0,3	12,3±0,6*	15,0±0,5 [#]

введении препарата витамина D_3 диабетическим животным значения показателей минерального обмена приближались к таковым в контрольной группе, что подчёркивает важную роль витамина D_3 в процессах ремоделирования костной ткани. Также следует отметить, что после курса введения витамина D_3 диабетическим мышам проявления гипокальциемии и гипофосфатемии сыворотки крови снижались, при этом концентрация ионов Ca^{2+} и P достигали значений контроля. У животных этой группы существенно нормализовалась, фактически до уровня контрольных значений, ферментативная активность щелочной фосфатазы и её изоформ.

Всё возрастающий объём современных научных данных убедительно свидетельствует, что недостаточная обеспеченность витамином D_3 , характерная для основной массы населения умеренных географических широт, которое не подвергается достаточному солнечному облучению, является фактором существенно повышающим риск не только заболеваний костной ткани, но и ряда других распространённых патологий: онкологических, сердечно-сосудистых, инфекционных, аутоиммунных, сахарного диабета и ряда других [10].

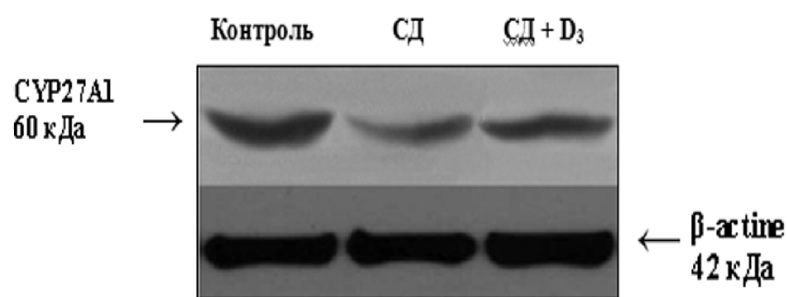
Поскольку гипокальциемия и гипофосфатемия могут обуславливаться нарушениями метаболизма витамина D_3 (D-гиповитаминоз и гиперпаратиреозидизм), актуальным было изучение D-витаминного статуса мышей с сахарным диабетом. Исследование содержания $25(OH)D_3$, основного маркера обеспеченности организма витамином D_3 и предшественника его гормонально активных форм, показало снижение при сахарном диабете уровня этого 25-гидроксилированного производного в сыворотке крови до $33,9$ нМ, что в $2,4$ раза ниже чем у контрольных животных (табл. 1). Такой уровень $25(OH)D_3$ свидетельствует о значительном дефиците витамина D_3 при данной патологии, который может быть вызван несколькими факторами.

Например, в литературе существуют убедительные свидетельства того, что врождённые пороки метаболизма витамина D_3 , обусловленные хромосомными мутациями или полиморфизмом генов некоторых цитохромов ведут к дефициту $25(OH)D_3$, и определяют предрасположенность человека к развитию аутоиммунных заболеваний. Так, показано существование тесной корреляции между пониженным уровнем циркулирующего $25(OH)D_3$ вследствие нарушения гидроксилирования витамина D_3 , обусловленного полиморфизмом определённых

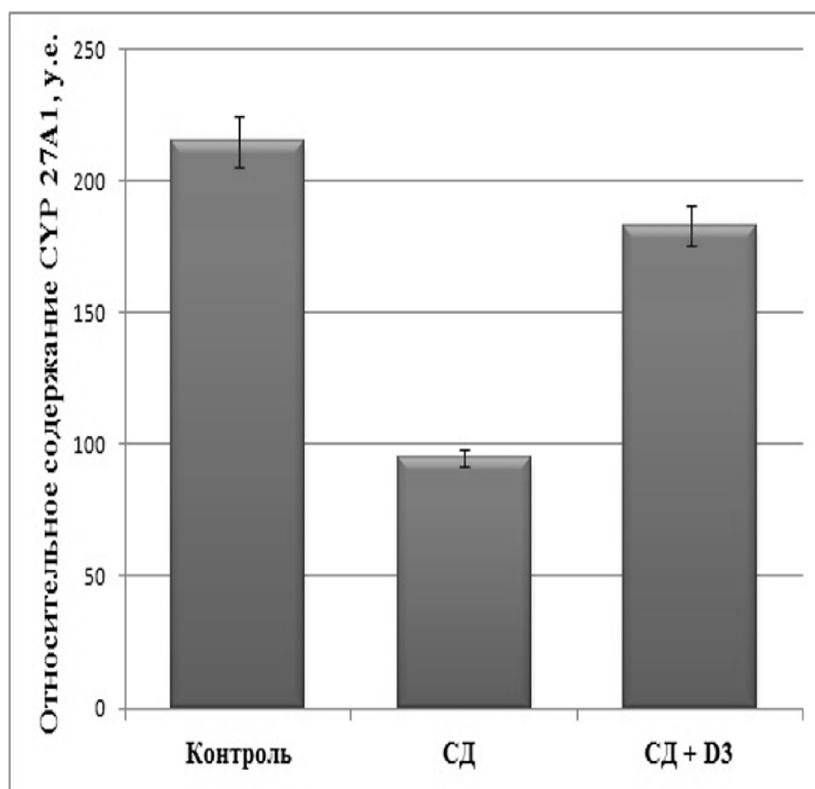
участков гена CYP2R1, и развитием СД1 [26]. Как известно, превращение холекальциферола в $25(OH)D_3$ катализируют две изоформы цитохрома P450 (витамины D_3 25-гидроксилазы): митохондриальная CYP27A1 и микросомальная CYP2R1. Учитывая важную роль ферментов витамина D_3 25-гидроксилазной системы в обмене витамина D_3 , было целесообразно выяснить, не связан ли значительный дефицит $25(OH)D_3$ при сахарном диабете с изменениями содержания этих двух ключевых цитохромов.

Содержание митохондриальной изоформы CYP27A1 в печени диабетических животных снижалось в $2,3 \pm 0,11$ раза по сравнению с контрольными животными (рис. 1). Это может быть связано с нарушением экспрессии генов данной изоформы цитохрома P450 при длительной гипергликемии, обусловленной сахарным диабетом. Введение витамина D_3 мышам с экспериментальным СД вызвало повышение уровня экспрессии CYP27A1 в $1,9 \pm 0,08$ раза, что почти соответствовало контрольным значениям. Такой рост может объясняться, в первую очередь, геномными эффектами самого витамина D_3 , повышение содержания гормонально активных форм которого могло бы способствовать активации экспрессии CYP27A1.

Противоположный характер носили изменения синтеза микросомальной изоформы витамина D_3 25-гидроксилазы. Было установлено повышение в $3,16 \pm 0,14$ раза содержания CYP2R1 в печени животных с СД (рис. 2). Известно, что CYP2R1 характеризуется большим родством к холекальциферолу и имеет более высокую гидроксилазную активность по сравнению с CYP27A1 [27]. CYP2R1 способна эффективно превращать витамин D_3 в пикомолярных концентрациях, что является свидетельством преимущественного функционирования данного изофермента в условиях низких концентраций холекальциферола [27]. В печени животных, получавших витамин D_3 наблюдалось существенное снижение содержания CYP2R1 в $6,21 \pm 0,29$ раза, по сравнению с группой диабетических животных, не получавших этот витамин. Результаты наших исследований показали, что CYP2R1 является, вероятно, той изоформой витамина D_3 25-гидроксилазы печени, которая выполняет при сахарном диабете компенсаторную роль, направленную на обеспечение необходимого для реализации физиологических функций витамина D_3 уровня циркулирующего в крови $25(OH)D_3$.

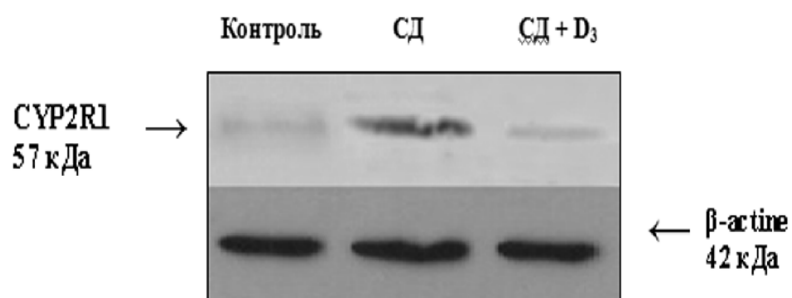


(А)

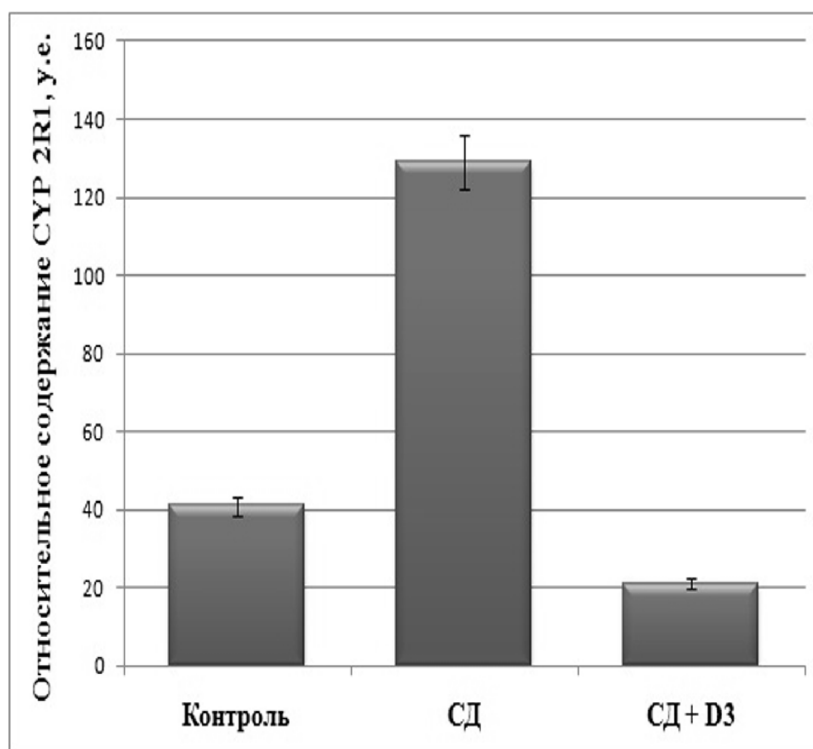


(Б)

Рисунок 1. Содержание митохондриальной изоформы CYP27A1 витамин D₃ 25-гидроксилазы в печени мышей при сахарном диабете и при введении витамина D₃. (А) Иммуноблоттограмма белка CYP27A1. (Б) Относительное содержание белка CYP27A1 в ткани печени подопытных животных (M + m, n = 6). * - Статистически достоверно по сравнению с контролем (p<0,05), # - Статистически достоверно по сравнению с группой "диабет" (p<0,05).



(А)



(Б)

Рисунок 2. Содержание микросомальной изоформы CYP2R1 витамин D₃ 25-гидроксилазы в печени мышей при сахарном диабете и при введении витамина D₃. (А) Иммуноблоттограмма белка CYP2R1. (Б) Относительное содержание белка CYP2R1 в ткани печени подопытных животных (M + m, n = 6). * - Статистически достоверно по сравнению с контролем (p<0,05), # - Статистически достоверно по сравнению с группой "диабет" (p<0,05).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

При экспериментальном сахарном диабете 1 типа нарушаются процессы минерального обмена в костной ткани, происходит интенсификация процесса костной резорбции, что в конечном итоге приводит к вторичному остеопорозу. Об этом свидетельствует гипокальциемия и гипофосфатемия, повышение ферментативной активности щелочной фосфатазы в сыворотке и её изоформ, изменения метрических показателей костей и содержание в них минеральных компонентов. Данные изменения строго коррелируют со снижением уровня 25(OH)D₃ в организме животных с сахарным диабетом. Наше исследование подтвердило, ключевую роль двух изоферментов витамин D₃ 25-гидроксилазы печени – митохондриального CYP27A1 и микросомального CYP2R1 в метаболизме витамина D₃. При сахарном диабете выявлено нарушение синтеза исследованных цитохромов и соответственно экспрессии их генов. Длительное введение диабетическим мышам холекальциферола способствовало нормализации содержания 25(OH)D₃ в сыворотке крови. При этом наблюдалась нормализация биохимических и остеометрических показателей костной резорбции, а также экспрессии изоферментов витамин D₃ 25-гидроксилазы печени. Полученные результаты доказывают важную роль витамина D₃ в процессах ремоделирования костной ткани при сахарном диабете. Обнаруженный дефицит витамина D₃ и нарушение образования его гормонально активных форм экспериментально обосновывает возможность использования витамина D₃ для профилактики и лечения вторичного остеопороза, как осложнения сахарного диабета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sicree R., Shaw J., Zimmet P. (2010) Diabetes. Res. Clin. Pract., **87**(1), 4–14.
2. Brownlee M. (2005) Diabetes, **54**, 1615–1625.
3. Рожинская Л.Я. (2000) Системный остеопороз: Практическое руководство для врачей, “Мокеев”, Москва.
4. Lecka-Czernik B. (2010) Curr. Osteoporos. Rep., **8**, 178–184.
5. Шишкин А.Н., Мануленко В.В. (2008) Вестн. Санкт-Петерб. Унив., **11**(3), 70–79.
6. Maeda K., Takahashi N., Kobayashi Y. (2013) J. Mol. Med. (Berl.), **91**, 15–23.
7. Ануховская Л.И., Василевская В.Н. и др. (2008) Биотехнология, **1**(2), 2008.
8. Цейтлин О.Я. (2002) Вестн. РАМН., №3, 54–57.
9. Liu J. (2013) Нуро Hyperglycemia, **1**, 1–8.
10. Спиричев В.Б. (2011) Педиатрия, **90**(6), 113–119.
11. Cooper J., Smyth D., Walker N., Stevens H., Burren O., Wallace C., Greissl C., Hyppönen E., Dunger D., Spector T., Ouweland W., Wang T., Badenhoop K., Todd J. (2011) Diabetes, **60**, 1624–1631.
12. Ramos-Lopez E., Brück P., Jansen T., Herwig J., Badenhoop K. (2007) Diabetes Metab. Res. Rev., **23**(8), 631–636.
13. Sachin A., Shreesh K. (2009) Global J. Pharmacol., **3**, 81–84.
14. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабиц П.Н. (2000) Морион, с.320.
15. Bradford M. (1976) Anal. Biochem., **72**, 248–254.
16. Harper D., Murphy G. (1991) Anal. Biochem., **192**, 59–63.
17. Dyce B., Bessman S. (1973) Arch. Environ. Health., **27**, 112–115.
18. Вагнер В.К., Путилин В.М., Харабуга Г.Г. (1981) Вопр. мед. химии, **27**, 752–754.
19. Гайко Г.В., Ануховская Л.И., Бруско А.Т. и др. (2005) Вестн. ортопед., травматол. и протез., **1**, 5–13.
20. Clemens T., Karsenty G. (2011) J. Bone Miner. Res., **26**, 677–680.
21. Levin M.E., Boisseau V.C., Avioli L.V. (1976) New Engl. J. Med., **294**, 241.
22. Hodgson S., Watts N. (2003) Endocr. Pract., **9**, 544–564.
23. Auwerx J., Dequeker J., Bouillon R. (1988) Diabetes., **37**, 8–12.
24. Балаболкин М.И., Хасанова Э.Р., Мкртумян А.М., (1988) Клинич. Медицина, №3, 86–88.
25. Gogas Yavuz D., Keskin L., Kiyici S., Sert M., Yazici D., Sahin I., Yüksel M., Deyneli O., Aydin H., Tuncel E., Akalin S. (2011) Acta Diabetol., **48**, 329–336.
26. Hussein A., Mohamed R., Alghobashy A. (2012) Cell Immunol., **279**, 42–45.
27. Barchetta J., Carotti S., Labbadia G. (2012) Hepatology, **56**, 2180–2187.
28. Shinkyo R., Sakaki T., Katakura M., Ohta M., Inouye K. (2004) Biochem. Biophys. Res. Commun., **324**, 451–457.

Поступила: 23. 12. 2013.

**THE ROLE OF VITAMIN D₃ IN THE REGULATION OF THE MINERAL METABOLISM
IN EXPERIMENTAL TYPE 1 DIABETES**

D.O. Labudzynskyi, O.A. Lisakovska, I.A. Shymanskyi, V.M. Riasnyi, N.N. Veliky

Palladin Institute of Biochemistry,
ul. Leontovicha, 9, Kyiv, 01601 Ukraine; e-mail: konsument3@gmail.com

Diabetes was shown to be associated with a considerable lowering of 25(OH)D₃ in blood serum of mice. Vitamin D₃ deficiency was correlated with impaired mineral metabolism in bone tissue, indicating the development of secondary osteoporosis. A decrease in weight, length and diameter (diaphysis, proximal metaepiphysis) of tibia in diabetic animals was observed as compared with control. Diabetes caused hypocalcemia, hypophosphatemia and increased enzymatic activity of alkaline phosphatase (ALP) and its isoenzymes in serum. These changes were accompanied by the impairments of vitamin D₃ 25-hydroxylase isoforms (CYP27A1 and CYP2R1) expression, which are the main enzymes of cholecalciferol biotransformation to 25(OH)D₃ – precursor of hormonally active form of vitamin D₃. A decrease in bone resorption processes was established after vitamin D₃ administration as it is evident from normalization of bone morphometrical parameters and mineral metabolism in diabetic mice. Vitamin D₃ ability to counter diabetes-induced alterations in bone tissue can be ascribed, at least in part, to its positive effects on the formation of vitamin D₃ hormonally active forms.

Key words: vitamin D₃, diabetes, secondary osteoporosis, bone resorption markers, CYP27A1, CYP2R1.