



УДК 616.7-007.234:57.083.3

## ВПЛИВ ВІТАМІНУ D<sub>3</sub> ТА МЕТИЛЕНБІСФОСФОНАТУ НА ІМУННУ СИСТЕМУ ЩУРІВ ЗА ДИСФУНКЦІОНАЛЬНОГО ОСТЕОПОРОЗУ

*В. М. Рясний, Л. І. Апуховська, М. М. Великий,  
І. О. Шиманський, Д. О. Лабудзинський, С. В. Комісаренко*

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, вул. Леонтовича, 9, Київ 01601, Україна  
e-mail: Riasniy@ukr.net*

Дисфункціональний остеопороз є захворюванням скелета, що розвивається за недостатньої фізичної активності, зокрема, у процесі старіння організму. Було досліджено зміни клітинної та гуморальної ланок імунітету за експериментального дисфункціонального остеопорозу й на тлі введення вітаміну D<sub>3</sub> і метиленбісфосфонату. За дисфункціонального остеопорозу, поряд із порушеннями в кістковій тканині, виявлено суттєві зміни в імунній системі. Показано пригнічення В-клітинної ланки імунітету, зниження кількості фагоцитарно активних гранулоцитів і моноцитів та їхньої здатності продукувати бактерицидні біооксиданти (активні форми кисню). Продемонстровано більш виражену дію вітаміну D<sub>3</sub> на фагоцитарну, а метиленбісфосфонату – на гуморальну ланки імунного захисту та доведено ефективність сумісного застосування даних сполук.

**Ключові слова:** дисфункціональний остеопороз, вітамін D<sub>3</sub>, метиленбісфосфонат, фагоцитоз, імуноглобуліни.

### ВСТУП

Остеопороз – системне захворювання скелета, що характеризується порушенням метаболізму кісткової тканини, пошкодженнями її мікроархітекtonіки і дефіцитом кісткової маси з подальшим збільшенням крихкості та імовірності переломів кісток [5].

Процес оновлення кісткової тканини, або ремоделювання, відбувається безперервно та забезпечується функціональною активністю остеолітичних і остеогенних клітинних популяцій – остеокластів та остеобластів, відповідно [11]. Співвідношення між функціональною активністю цих клітин перебувають під постійним контролем локальних і системних регуляторних факторів, що дає змогу в нормі підтримувати постійну щільність кістки [18]. Порушення в контролюванні остеокластно-osteобластної рівноваги призводить або до втрати маси кісткової тканини (остеопороз) та переломів або, навпаки, до її збільшення (остеопетроз) і розвитку компресійних синдромів [1]. Більшість регуляторних взаємодій спрямовані на контролювання процесу резорбції, що здійснюється остеокластами. Ключовим механізмом контролю диференціації й активації остеокластів є сигнальний каскад,

що включає рецептор активатора фактора транскрипції  $\kappa\text{B}$  (RANK – receptor activator of the nuclear factor- $\kappa\text{B}$ ), його ліганд (RANKL) та остеопротегерин (OPG – osteoprotegerin) [14]. RANKL, зв'язуючись із RANK на поверхні преостеокластів, активує їхню диференціацію в остеокласти, що посилює резорбцію кістки. OPG є рецептором, який зв'язує RANKL, блокуючи функціональну активність останнього та призводить до гальмування резорбції кісток [20]. RANKL та OPG експресуються остеобластами (клітини, які беруть участь у формуванні кісткової тканини) та стромальними клітинами кісткового мозку, включаючи дендритні клітини, а також активованими Т-лімфоцитами, а їх співвідношення перебуває під контролем значної кількості гормонів і цитокінів. Високий рівень взаємодії між імунною системою та метаболізмом кісткової тканини можливий завдяки наявності спільних регуляторних ланок. Так відомо, що IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  безпосередньо або опосередковано сприяють остеокластогенезу [23, 24], в той же час IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-3, IL-4, IL-10, IL-13 інгібують утворення остеокластів [16, 19]. Порушення регуляторного впливу цих факторів призводять до розбалансування процесу ремоделювання в кістковій тканині та розвитку патологій, серед яких найпоширенішою є остеопороз [12].

Отже, складний процес ремоделювання кісткової тканини контролюється значною кількістю факторів, дія яких керована на встановлення рівноваги між резорбцією та формуванням кісткової тканини і досягається завдяки узгодженню співвідношення активності остеокластів та остеобластів. Оскільки порушення цих процесів може обумовлюватися змінами в імунній системі, їх слід враховувати у разі використання різних фармакологічних агентів у лікуванні патологій кісткової тканини.

Важливу роль у розвитку остеопорозу також відіграють порушення гормональної регуляції метаболізму кальцію за участю системи паратгормон-кальцитонін-вітамін D<sub>3</sub>. Зокрема, дефіцит вітаміну D<sub>3</sub> та/або порушення утворення його гормонально-активних форм знижує абсорбцію іонізованого кальцію у тонкому кишечнику, підвищує рівень паратгормону та через зниження рівня кальцитоніну призводить до посилення резорбції кісток і остеопорозу [13, 22].

У лікуванні остеопорозу поряд із вітаміном D<sub>3</sub>, здатним ефективно стимулювати процес остеогенезу, досить ефективно використовують бісфосфонати. Це обумовлено властивістю останніх зв'язуватися з кальцієм гідроксиапатиту кісткової тканини та перешкоджати втраті її маси. Молекулярний механізм дії бісфосфонатів хоча і визначається значною мірою особливостями їх структури, в цілому полягає у пригніченні активності остеокластів і їхнього апоптозу. При цьому знижується загибель остеобластів і остеоцитів [9]. У той час як здатність вітаміну D<sub>3</sub> і бісфосфонатів впливати на стан кісткової тканини є добре вивченою, роль імуномодулюючої дії цих сполук у корекції порушень за остеопорозу залишається недостатньо з'ясованою.

Виходячи із зазначеного, метою роботи було дослідити зміни клітинної та гуморальної ланок імунітету за експериментального дисфункціонального остеопорозу та на тлі введення вітаміну D<sub>3</sub> і метиленбісфосфонату (МБФК).

## **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Дослідження проводили на старих (7 місяців) щурах-самицях лінії Wistar масою 250–300 г. Дисфункціональний остеопороз викликали завдяки утриманню щурів у спеціальних клітках малої площі та об'єму протягом 3-х місяців. Контрольні тварини перебували у стандартних умовах віварію. У період адаптації (тиждень) і під час експерименту тварини перебували при температурі 18–22°C, вологості 50–60%, природному світловому режимі “день-ніч”.

Через 90 днів щури з ознаками остеопорозу були поділені на групи: перша група – контроль, щури другої групи отримували вітамін D<sub>3</sub> у вигляді масляної суспензії (400 МО/кг маси тіла, *per os*), щурам третьої групи вводили розроблений в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна метиленбісфосфонат (метиленбісфосфонової кислоти динатрієву сіль, 1,7 мг/кг маси тіла у вигляді водної суспензії, *per os*), щури четвертої групи отримували сумісно вітамін D<sub>3</sub> та МБФК у тих самих дозах. Препарати вводили упродовж 30 днів, при цьому всі тварини перебували за наведених вище експериментальних умов.

Вміст кальцію та загальну активність лужної фосфатази в сироватці крові визначали за допомогою біотест-наборів (ЛАХЕМА, Чехія). Активність лужної фосфатази (КФ 3.1.3.1) визначали за утворенням 4-нітрофенолу в результаті розщеплення субстрату 4-нітрофенілфосфату, використовуючи біотест-систему (Лакхема, Чехія). Активність ізоензимів лужної фосфатази досліджували з використанням інгібіторів, згідно з описаним методом [4]. Вміст неорганічних фосфатів у сироватці крові визначали після осадження протеїнів 12% розчином ТХО методом Duce B. et al. [10]. Вміст гідроксильованого метаболіту вітаміну D<sub>3</sub> – 25ОНD<sub>3</sub> аналізували імуноензимним методом (Vitamin 25ОНD<sub>3</sub>ELISEkit виробництва фірми Immunodiagnostik, Німеччина).

Вплив досліджуваних речовин на стан клітинної ланки імунної системи характеризували за вмістом фагоцитарноактивних моноцитів і гранулоцитів, яку визначали методом проточної цитофлюориметрії на цитометрі COULTER EPICS XL-MCL з використанням тест-набору PHAGOTEST (Біолайн, Росія). Було проведено кількісне визначення процента імунокомпетентних клітин, які фагоцитують флуоресцеїн-мічені бактерії *Escherichia coli*. Візуалізація фагоцитозу проводилась на конфокальному мікроскопі LSM 510 META.

Індекс активності нейтрофілів (ІАН) визначали із застосуванням цитохімічного тесту відновлення нітросинього тетразолію [2]. Його обчислювали з урахуванням клітин із різним вмістом гранул формазану за формулою:

$$\text{ІАН} = \frac{(n_1 \times 0) + (n_2 \times 1) + (n_3 \times 2) + (n_4 \times 4)}{\text{загальна кількість клітин}},$$

де:  $n_1$  – кількість клітин, що містять 0–25% гранул формазану;  $n_2$  – кількість клітин, що містять 25–50% гранул формазану;  $n_3$  – кількість клітин, що містять 50–75% гранул формазану;  $n_4$  – кількість клітин, що містять 75–100% гранул формазану.

Флуоресцентне визначення інтенсивності утворення активних форм кисню й азоту в лейкоцитах проводили з DCF-DA(2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетатом) [7]. Вміст імуноглобулінів класів G і A у сироватці крові досліджували імуноензимним методом, використовуючи спеціальні до певного імуноглобуліну антитіла. Візуалізацію імуноспецифічної взаємодії проводили за допомогою хромогенного субстрату OFD (ортофенілєндіамін), що характеризувало гуморальну ланку імунітету.

Отримані показники обробляли статистично за допомогою програми "Microsoft Excel". Усі маніпуляції з тваринами проводили під легким ефірним наркозом із дотриманням положень Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.)

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Дисфункціональний остеопороз розвивається за відсутності фізичної активності та, як наслідок, розвантаження скелету, що спостерігається при старінні організму або під час іммобілізації [17]. Його розвиток встановлювали за даними біохімічних,

остеометричних та гістологічних досліджень. Результати біохімічних досліджень, які наведені у таблиці, свідчать, що за дисфункціонального остеопорозу відбувалося зниження рівня загального кальцію сироватки крові щурів в 1,3 разу щодо контрольних тварин. Відомо, що кальцій у сироватці крові існує у проєїнзв'язаній формі та у формі, що піддається ультрафільтрації. За остеопорозу вміст вищезгаданих форм кальцію знижувався в 1,3 та 1,2 разу, відповідно. Рівень неорганічних фосфатів у сироватці крові зменшувався в 1,5 разу порівняно з контролем. Отримані дані свідчать про порушення мінерального обміну за експериментального дисфункціонального остеопорозу, що проявляється гіпокальціємією та гіпофосфатемією, ймовірно, обумовленими зниженням вмісту вітаміну D<sub>3</sub>.

**Вміст мінеральних компонентів, 25OHD<sub>3</sub> і активність лужної фосфатази та її ізоензимів у сироватці крові щурів за дисфункціонального остеопорозу, M±m, n=10**

**Content of mineral components, 25OHD<sub>3</sub> and activity of alkaline phosphatase and its isoenzymes in blood serum of rats with disuse osteoporosis, M±m, n = 10**

Досліджувані показники	Контроль	Остеопороз
Загальний кальцій, ммоль·л <sup>-1</sup>	1,30±0,04	1,05±0,05*
Протеїнзв'язаний кальцій, ммоль·л <sup>-1</sup>	0,28±0,08	0,21±0,053*
Кальцій після ультрафільтрації, ммоль·л <sup>-1</sup>	1,01±0,03	0,83±0,02*
Фосфор неорганічний, ммоль·л <sup>-1</sup>	1,41±0,06	0,93±0,05*
Загальна лужна фосфатаза, Од.Чл <sup>-1</sup>	326,8±14,4	451,8±22,04*
Кишковий ізофермент ЛФ, Од.Чл <sup>-1</sup>	105,1±4,8	145,3±8,7*
Кістковий ізофермент ЛФ, Од.Чл <sup>-1</sup>	257,5±13,5	318,8±15,6*
25OHD <sub>3</sub> , (нмоль·л <sup>-1</sup> )	47,8±0,9	35,4±0,7*

**Примітка:** \* – різниця порівняно з контролем вірогідна (p<0,05).

**Comment:** \* – difference compared with control is significant (p<0.05).

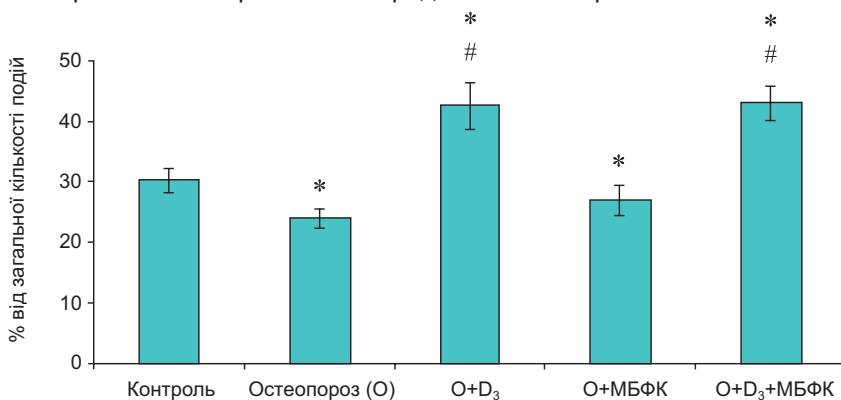
Показником забезпеченості організму вітаміном D<sub>3</sub> є вміст його гідроксильованої форми – 25-гідроксиколекальциферолу (25OHD<sub>3</sub>) у сироватці крові. Встановлено, що розвиток остеопорозу веде до зниження в 1,3 разу рівня 25OHD<sub>3</sub> у експериментальних тварин щодо контрольних. Більше того, рівень даної форми вітаміну D<sub>3</sub> у досліджуваних десятимісячних (старих) контрольних щурів виявився майже в 2 рази нижчим ніж у тримісячних (молодих) тварин, у яких вміст 25OHD<sub>3</sub> становить 112 нмоль/л [3]. Зниження ступеня забезпеченості організму вітаміном D<sub>3</sub> при старінні може відбуватися внаслідок зниження його синтезу в клітинах шкіри й інгібування активності вітаміну D<sub>3</sub> гідроксилази печінки.

Недостатня забезпеченість організму вітаміном D<sub>3</sub> за умов даного експерименту, у свою чергу, супроводжувалася зростанням активності загальної лужної фосфатази як одного з маркерів стану кісткової тканини, в 1,4 разу в сироватці крові щурів з дисфункціональним остеопорозом порівняно з контрольними тваринами. Виявлені зміни обумовлені підвищенням активності її кісткової та кишкової ізоформ. Так, активність кісткового ізоензиму зростала в 1,3 разу, що свідчить про розвиток патологічних змін у кістковій тканині. Крім того, за остеопорозу спостерігалася підвищення

в сироватці крові активності кишкового ізоензиму лужної фосфатази в 1,4 разу, що корелює зі зменшенням вмісту фосфору в сироватці крові та може бути спричинене посиленням виходу цього ензиму із ентероцитів у кров унаслідок порушення щільності їх мембран.

Зміни у структурі кісткової тканини щурів за умов обмеженої рухової активності були продемонстровані в наших попередніх дослідках з використанням остеометричних і гістологічних методів [6]. Так, було показано зниження довжини й товщини дистального епіметафіза великогомілкової кістки у тварин, що перебували в умовах обмеженої рухової активності. Відзначалося зниження зольності великогомілкової кістки, що супроводжувалося зниженням вмісту кальцію та фосфору в ній. Отримані результати узгоджувалися з даними гістологічних досліджень, які свідчили про зменшення щільності компактною кістковою тканиною за рахунок збільшення кількості центральних і пронизуючих судинних каналів, порушення системи внутрішніх оточуючих кісткових пластинок. Також спостерігалось порушення зональної будови та потоншення епіфізарного хряща, зупинка хондро- та ендохондріального остеогенезу [6]. Таким чином, виявлені біохімічні, остеометричні та гістологічні зміни структурної організації кісткової тканини свідчать про розвиток дисфункціональної форми остеопорозу, що доводить адекватність експериментальної моделі та можливість її подальшого використання для вирішення поставленої мети.

Визначення фагоцитарної активності гранулоцитів і моноцитів (процент імунокомпетентних клітин, які фагоцитують флуоресцеїн-мічені бактерії *E. coli*), отриманої на основі даних проточної цитофлюориметрії, представлені на рис. 1 та 2, відповідно. Так, за умов експериментального дисфункціонального остеопорозу спостерігається зниження кількості активних гранулоцитів у 1,3 разу. Введення вітаміну D<sub>3</sub> щурам із остеопорозом призводило до збільшення кількості фагоцитуючих гранулоцитів в 1,7 разу. У групі тварин, які отримували МБФК вираженої дії на рівень активних гранулоцитів, не спостерігалось. Введення бісфосфонату разом із вітаміном D<sub>3</sub> призводило до зростання процента імунокомпетентних клітин, які фагоцитують флуоресцеїн-мічені бактерії *E. coli*, але цей ефект не перевищував дію самого вітаміну D<sub>3</sub>. Візуально фагоцитоз гранулоцитів було зафіксовано за допомогою конфокальної мікроскопії та представлено на рис. 3.

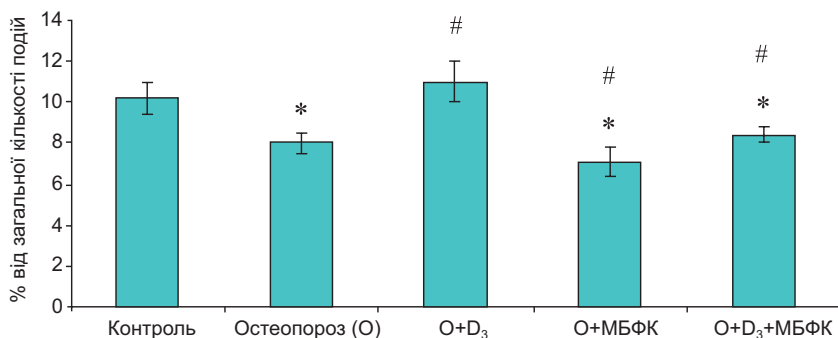


**Рис. 1.** Кількість фагоцитарно активних гранулоцитів  $M \pm m$ ,  $n=10$ .

\* – вірогідність порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ); # – вірогідність порівняно з остеопорозом ( $p < 0,05$ )

**Fig. 1.** The number of phagocytically active granulocytes ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ ).

\* –  $p < 0.05$  compared with control; # –  $p < 0.05$  compared with osteoporosis



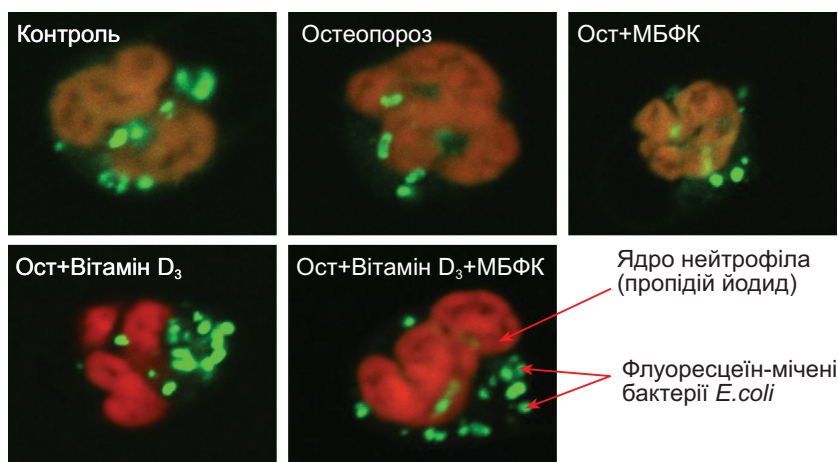
**Рис. 2.** Кількість фагоцитарно активних моноцитів  $M \pm m$ ,  $n=10$ .

\* – вірогідність порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ); # – вірогідність порівняно з остеопорозом ( $p < 0,05$ )

**Fig. 2.** The number of phagocytically active monocytes ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ ).

\* –  $p < 0.05$  compared with control; # –  $p < 0.05$  compared with osteoporosis

Зміни кількості активних моноцитів за дисфункціонального остеопорозу та при введенні досліджуваних речовин мали свої особливості. Так, за умов досліджуваної патології рівень активних моноцитів зменшувався в 1,3 разу, введення вітаміну  $D_3$  призводило до його нормалізації. У групах, які отримували МБФК, кількість фагоцитуючих моноцитів знижувалася в 1,4 разу щодо контролю. За даними літератури відомо про здатність бісфосфонатів викликати апоптоз моноцитів, що може частково пояснювати виявлене зниження процента активних моноцитів у периферичній крові [26]. Сумісне введення вітаміну  $D_3$  разом з МБФК суттєво не впливало на кількість фагоцитуючих моноцитів, порівняно з тваринами, що отримували тільки бісфосфонат.

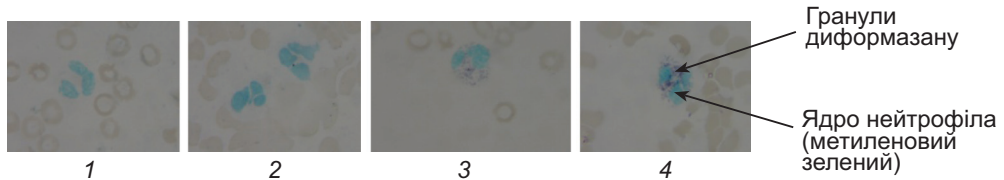


**Рис. 3.** Конфокальна мікроскопія захвату *E. coli* (зелена флюоресценція) нейтрофілами за остеопорозу та при введенні вітаміну  $D_3$  і МБФК

**Fig. 3.** Confocal microscopy of *E. coli* (green fluorescence) captured by neutrophils at osteoporosis and after treatment with vitamin  $D_3$  and MBPA

З метою подальшої характеристики функціонального стану гранулоцитів ми застосували тест із нітросинім тетразолієм (НСТ). Даний метод базується на здатності

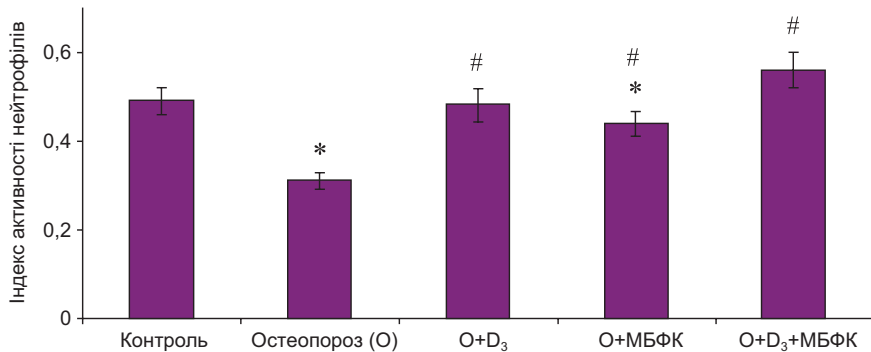
практично безбарвного НСТ відновлюватись активними радикалами кисню в темно-синій формазан, що виявляється у вигляді гранул синього кольору в цитоплазмі нейтрофілів (рис. 4). Для визначення активності нейтрофільних гранулоцитів розраховували індекс активності нейтрофілів (ІАН), або інтегральний фагоцитарний індекс, який комплексно відображає інтенсивність вільнорадикальних процесів і поглинаючу здатність фагоцитуючих клітин.



**Рис. 4.** Цитохімічний тест відновлення НСТ (світлова мікроскопія). Досліджувані нейтрофіли: 1 – n<sub>1</sub> рівня; 2 – n<sub>2</sub> рівня; 3 – n<sub>3</sub> рівня; 4 – n<sub>4</sub> рівня

**Fig. 4.** Cytochemical test of NBT reduction (light microscopy). The neutrophils were assessed: 1 – n<sub>1</sub> level; 2 – n<sub>2</sub> level; 3 – n<sub>3</sub> level; 4 – n<sub>4</sub> level

Результати проведених досліджень (рис. 5) продемонстрували, що за умов досліджуваної патології спостерігається зниження ІАН в 1,6 разу щодо контролю. Це обумовлене зменшенням кількості нейтрофілів із високим вмістом гранул формазану. Це, у свою чергу, на фоні зниженої фагоцитарної активності гранулоцитів, вказує на пригнічення первинних ефektorних реакцій неспецифічного імунного захисту в реалізації антимікробної дії фагоцитуючих клітин. У щурів, що отримували вітамін D<sub>3</sub>, спостерігалася нормалізація величини досліджуваного індексу. Введення бісфосфонату істотно не впливало на індекс активності нейтрофілів. Сумісне введення вітаміну D<sub>3</sub> з МБФК призводило до нормалізації ІАН у щурів, причому ефект від поєднаної дії був більш виражений, ніж у групах щурів, що отримували ці речовини окремо.



**Рис. 5.** Індекс активності нейтрофілів периферичної крові щурів (M±n, n=8).

\* – вірогідність порівняно з контролем (p < 0,05); # – вірогідність порівняно з остеопорозом (p < 0,05)

**Fig. 5.** The index of activity of peripheral blood neutrophils in rats (M±n, n = 8).

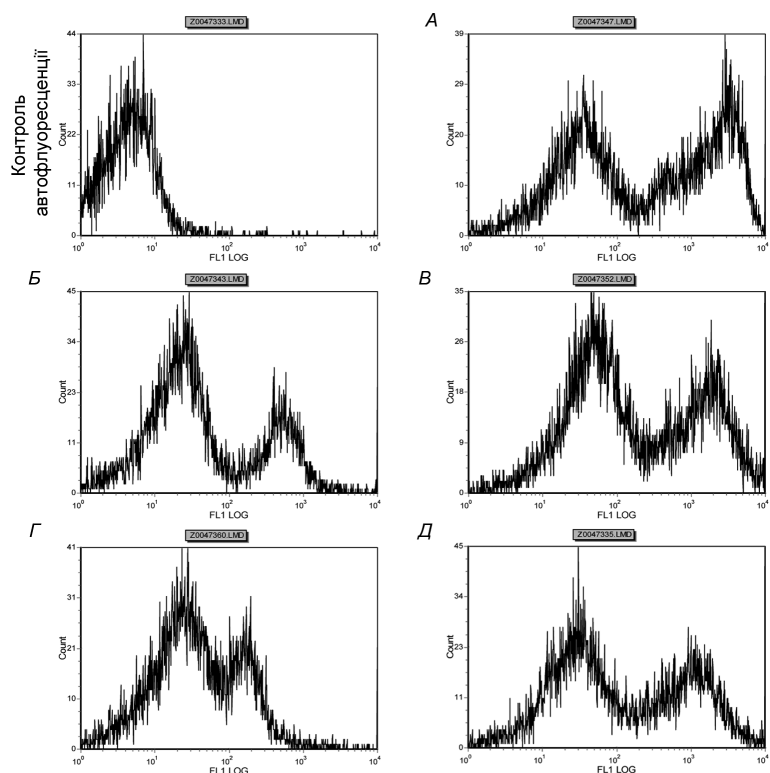
\* – p < 0.05 compared with control; # – p < 0.05 compared with osteoporosis

Встановлена імуностимулююча дія вітаміну D<sub>3</sub> на функціональну активність фагоцитуючих клітин крові узгоджується з даними літератури, які засвідчують, що дефіцит вітаміну D<sub>3</sub> в організмі викликає пригнічення імунної системи та підвищення сприйнятливості до інфекційних захворювань як вірусної, так і бактеріальної

природи – таких як грип, ВІЛ-інфекція, туберкульоз, пневмонія, а також аутоімунні захворювання [8, 15]. Крім того, відомо, що під впливом вітаміну  $D_3$  зростає утворення інтерлейкінів, антимікробних пептидів, підвищується фагоцитарна активність макрофагів тощо [21].

Одним із важливих механізмів знешкодження антигенів в організмі є активація ензиматичних систем, які генерують активні форми кисню й азоту у спеціалізованих клітинах імунної системи. Добре відомо, що саме нейтрофільні гранулоцити і моноцити є найбільш потужними генераторами активних форм кисню й азоту в організмі [25]. Враховуючи, що істинна активація нейтрофілів супроводжується “метаболічним і респіраторним вибухом”, який багаторазово збільшує споживання енергії та підвищує потребу клітин у кисні, крім проведення НСТ-тесту, також доцільним було за умов наших експериментів дослідити рівень утворення активних кисневих метаболітів за DCF-DA флюоресценцією у фагоцитуючих клітинах периферичної крові щурів.

На рис. 6 представлені цитофлюорограми, що ілюструють процент клітин периферичної крові (гранулоцитів і моноцитів) щурів, у яких інтенсифіковані прооксидативні процеси. Це відображається у появі другого піку на кривій, який відповідає

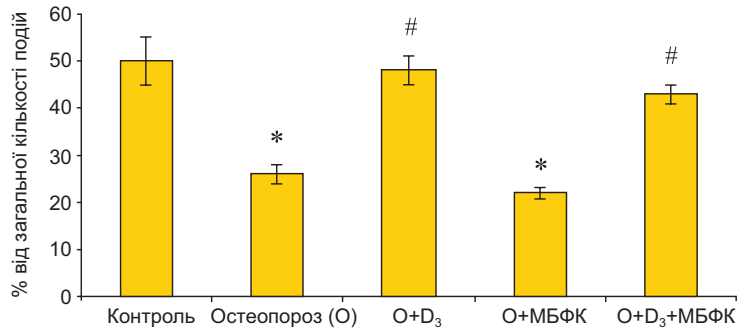


**Рис. 6.** Цитофлюорограма DCF-чутливого утворення активних форм кисню й азоту фагоцитами периферичної крові щурів (count – кількість подій; FL1 LOG – інтенсивність флюоресценції): А – контроль; Б – дисфункціональний остеопороз; В – введення вітаміну  $D_3$ ; Г – введення МБФК; Д – комплексне введення вітаміну  $D_3$  та МБФК

**Fig. 6.** Flow cytometry pattern of DCF-sensitive formation of reactive oxygen and nitrogen species in phagocytes of rat peripheral blood (count – number of events; FL1 LOG – fluorescence intensity): А – control; Б – disuse osteoporosis; В – administration of vitamin  $D_3$ ; Г – administration of MBPA; Д – combined administration of vitamin  $D_3$  and MBPA



клітинам із більш високим значенням флюоресценції. Аналіз цитофлюорограм (рис. 7) показав, що тварини із дисфункціональним остеопорозом характеризуються дворазовим зниженням клітин, здатних інтенсивно утворювати активні форми кисню (АФК) порівняно із контрольними тваринами, і це корелювало з направленистю змін показника НСТ-тесту (рис. 5). На відміну від вітаміну D<sub>3</sub>, введення бісфосфонату суттєво не впливало на кількість клітин із високим рівнем продукції АФК. Однак комбіноване введення вітаміну D<sub>3</sub> та МБФК, як і введення самого вітаміну, сприяло нормалізації. Отримані дані свідчать про важливу роль вітаміну D<sub>3</sub> у стимуляції ферментативних систем, що залучені до генерації АФК в імунокомпетентних клітинах крові.



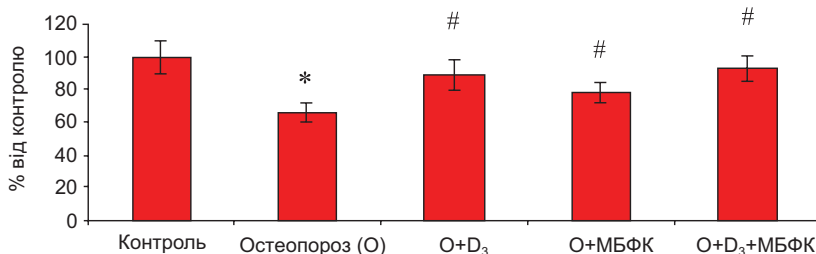
**Рис. 7.** Рівень утворення активних форм кисню й азоту у фагоцитуючих клітинах крові щурів (% клітин у другому піку, який відображає найвищу інтенсивність флюоресценції, від загальної кількості подій,  $M \pm m$ ,  $n = 10$ ).

\* – вірогідність порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ); # – вірогідність порівняно з остеопорозом ( $p < 0,05$ )

**Fig. 7.** The level of formation of reactive oxygen and nitrogen species in phagocytic blood cells of rats (% of cells in the second peak reflecting the highest fluorescence intensity against the total number of events,  $M \pm m$ ,  $n = 10$ ).

\* –  $p < 0.05$  compared with control; # –  $p < 0.05$  compared with osteoporosis

Дослідження гуморальної ланки імунітету за остеопорозу показало зниження рівня IgG в 1,5 разу (рис. 8). Відомо, що імуноглобуліни класу G відіграють ключову роль у забезпеченні довготривалого гуморального імунітету при інфекційних захворюваннях. Основною функцією IgG є утворення комплексу “антиген–антитіло”. Ці імуноглобуліни сприяють нейтралізації бактеріальних екзотоксинів, активують систему комплементу й посилюють фагоцитоз. Виявлене зниження рівня IgG сироватки, що корелює зі зниженням фагоцитарної здатності гранулоцитів, може



**Рис. 8.** Рівень IgG в сироватці крові ( $M \pm n$ ,  $n = 8$ ).

\* – вірогідність порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ); # – вірогідність порівняно з остеопорозом ( $p < 0,05$ )

**Fig. 8.** The level of blood serum IgG ( $M \pm n$ ,  $n = 8$ ).

\* –  $p < 0.05$  compared with control; # –  $p < 0.05$  compared with osteoporosis

свідчити про послаблення опірності організму до інфекцій. Введення вітаміну D<sub>3</sub> та МБФК сприяло підвищенню рівня IgG в 1,3 та 1,2 разу відповідно. Сумісна дія цих речовин призводила до нормалізації вмісту даного імуноглобуліну.

Дослідження рівня IgA сироватки, основна функція якого полягає у захисті дихальних, сечостатевої шляхів і шлунково-кишкового тракту від інфекцій, показало зниження вмісту даного імуноглобуліну в 2 рази у щурів із дисфункціональною формою остеопорозу щодо контрольних тварин (рис. 9). Вітамін D<sub>3</sub> майже не впливав на рівень IgA за остеопорозу, на відміну від МБФК, який як самостійно, так і в комбінації з вітаміном D<sub>3</sub> збільшував його в 1,7 разу.

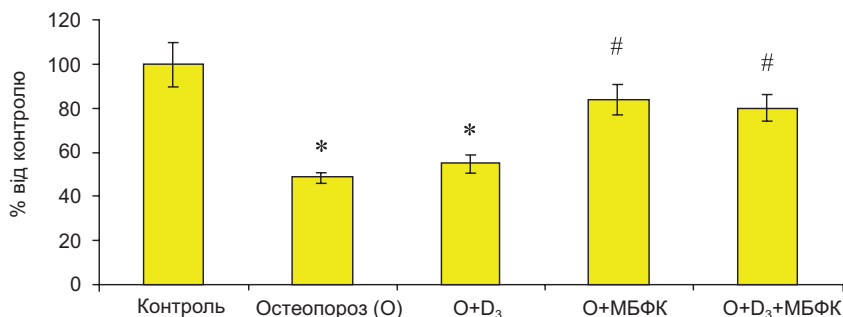


Рис. 9. Рівень IgA в сироватці крові (M±n, n=8).

\* – вірогідність порівняно з контролем (p < 0,05); # – вірогідність порівняно з остеопорозом (p < 0,05)

Fig. 9. The level of blood serum IgA (M±n, n=8).

\* – p < 0.05 compared with control; # – p < 0.05 compared with osteoporosis

Таким чином, дисфункціональний остеопороз супроводжується структурно-функціональними порушеннями у кістковій тканині, що викликані віковими змінами в організмі тварин, і зниженням локомоторної функції. Встановлено, що за досліджуваної патології, поряд зі змінами в кістковій тканині, виявлено суттєві порушення в імунній системі. Продемонстровано зниження кількості фагоцитарно активних гранулоцитів і їхньої здатності продукувати бактерицидні біооксиданти (пероксид водню, супероксидний аніон-радикал, гідроксильний радикал) за остеопорозу. Показано нормалізацію цих процесів за введення вітаміну D<sub>3</sub>, що вказує на важливу роль холекальциферолу в забезпеченні функціонального стану фагоцитуючих клітин крові. Виявлено зниження рівнів IgG та IgA сироватки крові за даної патології. Встановлено позитивний вплив МБФК на гуморальну ланку імунітету щурів.

1. Волков Н.М. Физиология метаболизма костной ткани и механизм развития метастазов в кости. **Практическая онкология**, 2011; 12(3): 97–102.
2. Герасимов И.Г., Калуцкая О.А. Кинетика реакции восстановления нитросиногетразоля нейтрофилами крови человека. **Цитология**, 2000; 42(2): 160–165.
3. Комісаренко С.В., Апуховська Л.І., Рясний В.М. Ефективність препарату “Мебівід” в попередженні порушень обміну вітаміну D<sub>3</sub> та кальцію за аліментарного остеопорозу. **Біотехнологія**, 2011; 4(1): 74–81.
4. Плеханов Б., Цветкова Т., Пилерков Т., Чиговская М. Щелочная фосфатаза: современное состояние вопроса. **Лаб. дело**, 1989; 11: 4–7.
5. Поворознюк В.В., Григорьева Н.В. **Менопауза и остеопороз**. К.: ВПЦ “Експрес”, 2002. 356 с.

6. *Рясний В.М., Великий О.М., Калашніков О.В., Шиманський І.О.* Синергізм дії вітаміну D<sub>3</sub> та метиленбісфосфонові кислоти в регуляції мінерального обміну за експериментального дисфункціонального остеопорозу. **Медицина хімія**, 2012; 14(4): 12–18.
7. *Bass D.A., Parce J.W., Dechatelet L.R.* Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **J. Immunol**, 1983; 130(4): 1910–1917.
8. *Campbell G.R., Spector S.A.* Hormonally active vitamin D<sub>3</sub> ( $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol) triggers autophagy in human macrophages that inhibits HIV-1 infection. **Biol. Chem**, 2011; 286(21): 18890–18902.
9. *Drake M.T., Clarke B.L., Khosla S.* Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clin. Proc**, 2008; 83(9): 1032–45.
10. *Dyce B.J., Bessman S.P.* A rapid nonenzymatic assay for 2,3-DPG in multiple specimens of blood. **Arch. Environ. Health**, 1973; 27(2): 112–115.
11. *Eriksen E.F.* Cellular mechanisms of bone remodeling. **Rev. Endocr. MetabDisord**, 2010; 11(4): 219–227.
12. *Geusens P., Lems W.F.* Osteoimmunology and osteoporosis. **Arthritis Res. Ther**, 2011; 13(5): 242.
13. *Hausler M.R., Jurutka P.W., Mizwicki M., Norman A.W.* Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 $\alpha$ ,25(OH) vitamin D<sub>3</sub>: genomic and non-genomic mechanisms. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab**, 2011; 25(4): 543–559.
14. *Hofbauer L.C., Heufelder A.E.* The role of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, 2000; 85(7): 2355–2363.
15. *Holick M.F., Chen T.C.* Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. **Am. J. Clin. Nutr**, 2008; 87(4): 1080S–1086S.
16. *Huang W., O'Keefe R.J., Schwarz E.M.* Exposure to receptor-activator of NF $\kappa$ B ligand renders preosteoclasts resistant to IFN $\gamma$  by inducing terminal differentiation. **Arthritis Res. Ther**, 2003; 5: 49–59.
17. *Jiang S., Jiang L., Dai L.* Effects of spinal cord injury on osteoblastogenesis, osteoclastogenesis and gene expression profiling in osteoblasts in young rats. **OsteoporosInt**, 2007; 18: 339–349.
18. *Jones D., Glimcher L.H., Aliprantis A.O.* Osteoimmunology at the nexus of arthritis, osteoporosis, cancer, and infection. **J. Clin. Invest**, 2011; 121(7): 2534–42
19. *Khapli S.M., Mangashetti L.S., Yogesha S.D., Wani M.R.* IL-3 acts directly on osteoclast precursors and irreversibly inhibits receptor activator of NF  $\kappa$ B ligand-induced osteoclast differentiation by diverting the cells to macrophage lineage. **J. Immunol**, 2003; 171: 142–151.
20. *Khosla S.* Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology**, 2001; 142(12): 5050–5055.
21. *Krutzik S.R., Hewison M., Liu P.T.* IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. **J. Immunol**, 2008; 181(10): 7115–7120.
22. *Kozai M., Yamamoto H., Ishiguro M., Harada N.* Thyroid Hormones Decrease Plasma 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D Levels Through Transcriptional Repression of the Renal 25-Hydroxyvitamin D3 1 $\alpha$ -Hydroxylase Gene (CYP27B1). **Endocrinology**, 2013; 154(2): 609–622.
23. *Palmqvist P., Persson E., Conaway H.H., Lerner U.H.* IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF  $\kappa$ B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF $\kappa$  B in mouse calvariae. **J. Immunol**, 2002; 169: 3353–3362.
24. *Sabokbar A., Kudo O., Athanasou N.A.* Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis. **J. Orthopaed Res**, 2003; 21: 73–80.
25. *Steevels T.A., Meyaard L.* Immune inhibitory receptors: essential regulators of phagocyte function. **Eur. J. Immunol**, 2011; 41(3): 575–87.
26. *Seeman E.* Bone modeling and remodeling. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, 2009; 19(3): 219–233.

## EFFECTS OF VITAMIN D<sub>3</sub> AND METHYLENEBISPHOSPHONATE ON IMMUNE SYSTEM OF RATS AT DISUSE OSTEOPOROSIS

*V. M. Riasnyi, L. I. Apukhovska, N. N. Veliky,  
I. O. Shymanskyi, D. O. Labudzynskyi, S. V. Komisarenko*

*Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, 9, Leontovych St., Kyiv 01601, Ukraine  
e-mail: Riasnyi@ukr.net*

Disuse osteoporosis is a skeletal disease that develops due to insufficient physical activity, in particular, as the result of aging process. The study was designed to examine changes in cellular and humoral immunity associated with experimental disuse osteoporosis and to assess the efficacy of vitamin D<sub>3</sub> and methylenebisphosphonate treatment. It was found that the disuse osteoporosis, in addition to impairments in bone tissue, is accompanied by significant alterations in the immune system. Marked suppression of B-cell immunity, decrease in number of active phagocytic granulocytes and monocytes, and their ability to produce antibacterial biooxidants (reactive oxygen species) were established. More profound effect of vitamin D<sub>3</sub> on phagocytic function whereas methylenebisphosphonate was shown to be more effective on humoral immune defense. The effectiveness of combined use of vitamin D<sub>3</sub> and methylenebisphosphonate was demonstrated.

**Keywords:** Disuse osteoporosis, vitamin D<sub>3</sub>, methylenebisphosphonate, phagocytosis, immunoglobulins.

## ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА D<sub>3</sub> И МЕТИЛЕНБИСФОСФОНАТА НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ КРЫС ПРИ ДИСФУНКЦИОНАЛЬНОМ ОСТЕОПОРОЗЕ

*В. М. Рясний, Л. И. Апуховская, Н. Н. Великий,  
И. А. Шиманский, Д. О. Лабудзинский, С. В. Комисаренко*

*Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины  
ул. Леонтовича, 9, Киев 01601, Украина  
e-mail: Riasnyi@ukr.net*

Дисфункциональный остеопороз является заболеванием скелета, которое развивается при недостаточной физической активности, обусловленной, в частности, процессом старения организма. Были исследованы изменения клеточного и гуморального звеньев иммунитета при экспериментальном дисфункциональном остеопорозе и при введении витамина D<sub>3</sub> и метиленбисфосфоната. Показано, что при дисфункциональном остеопорозе, наряду с изменениями в костной ткани, обнаружены существенные изменения в иммунной системе. Установлены угнетение В-клеточного звена иммунитета, снижение количества фагоцитарно активных гранулоцитов и моноцитов и их способности продуцировать бактерицидные биооксиданты (активные формы кислорода). Продемонстрировано более выраженное действие витамина D<sub>3</sub> на фагоцитарное, а метиленбисфосфоната – на гуморальное звенья иммунной защиты и доказана эффективность совместного применения данных соединений.

**Ключевые слова:** дисфункциональный остеопороз, витамин D<sub>3</sub>, метиленбисфосфонат, фагоцитоз, иммуноглобулины.

Одержано: 02.07.2013