

В. Й. Кресюн, В. В. Годован, Л. С. Годлевський,  
П. Б. Антоненко, Г. О. Сон

## Вітамін D у комплексному лікуванні експериментального цукрового діабету

Одеський національний медичний університет

*Ключові слова: вітамін D, цукровий діабет, інсулін, стрептозотцин, мітохондрії печінки*

Вітаміни – життєві аміни, так вони були названі за їхнього відкриття Казиміром Функом. Понад 100 років вивчається їхня біологічна роль в організмі людини та тварин. Проте дотепер не всі механізми їхньої дії достеменно з'ясовані. Відомо, що вітаміни за своїми фізико-хімічними властивостями поділяються на водо- та жиророзчинні, а за біологічними – на коферментоутворюючі та такі, що їх не утворюють. Властивості коферментоутворюючих вітамінів досить добре вивчені, а розкриті механізми впливу на обмін речовин в організмі дозволили широко застосовувати їх як лікарські засоби, що не можна говорити про вітаміни, які не утворюють в організмі коферментів. Вважалось, що вони регулюють в організмі ті чи інші процеси обміну. Розглянемо цю проблему на прикладі вітаміну D. Згідно з традиційним уявленням, вітамін D регулює кальцієво-фосфорний гомеостаз та впливає на мінеральну щільність кісткової тканини [1]. Проте він не виявляє жодних вітаміноподібних властивостей, більше того, сам він є біологічно неактивним. Вітамін D<sub>2</sub> (ергокальциферол) надходить в організм з продуктами рослинного походження, а D<sub>3</sub> (холекальциферол) надходить в організм з продуктами тваринного походження або утворюється в шкірі під впливом сонячних променів. За рахунок двоступеневого метаболізму вітамін D у печінці спочатку перетворюється на 25(OH) D<sub>3</sub> (25-гідрокси-холекальциферол) або кальцидіол, потім у нирках на 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> (25 дигідрохолекальциферол або кальцитріол). Останній поводить себе як справж-

ній гормон з усіма наслідками, що впливають з цього, а тому він отримав другу назву – D-гормон [2].

До активної форми вітаміну D – 1,25(OH)<sub>2</sub> – в організмі експресуються спеціалізовані рецептори (VDR), яких не має жоден з відомих вітамінів. Активованій вітаміном D рецептор (VDR) стає готовим до взаємодії з відповідними активаторами або супресорами цього рецептора, який дійсно являє собою стероїдний рецептор, а активована форма вітаміну D – 1,25(OH)<sub>2</sub> – є потужним стероїдним гормоном з унікальним спектром системних метаболічних ефектів [3].

Дослідженнями останніх років доведено, що вітамін D суттєво впливає на метаболізм глюкози й інсуліну, а його дефіцит є фактором ризику розвитку інсулінорезистентності, порушення толерантності до глюкози та, в решті решт, виникнення цукрового діабету (ЦД) II типу [4]. Вітамін D впливає на утворення інсуліну безпосередньо через β-клітини шляхом збільшення вмісту внутрішньоклітинного кальцію за допомогою неселективних потенціал-залежних кальцієвих каналів або опосередковано через активацію кальцій-залежної ендопептидази β-клітин, яка перетворює проінсулін в активний інсулін. Незаперечним фактом, доведеним клінічною практикою, є розвиток інсулінорезистентності за ЦД. Також доведено, що вітамін D підвищує чутливість тканин до інсуліну шляхом безпосередньої стимуляції експресії рецепторів інсуліну в клітинах [4] або опосередковано за рахунок збільшення позаклітинного кальцію, що призводить до його підвищеного надходження всередину клітини інсулін-залежних тканин [5]. У свою чергу, кальцій є необхідним для інсулін-опосередкованих внутрішньоклітинних

метаболических процесів [6]. Відсутність наукових даних щодо структури та морфофункціональних особливостей VDR перешкоджає побудові чіткої стратегії застосування вітаміну D за ЦД та інших захворюваннях, пов'язаних з «метаболическим синдромом».

Не викликає сумніву, що порушення обміну вуглеводів призводить до розвитку ЦД та його важких ускладнень, серед яких перше місце посідають ангіопатії. Доведено, що за ЦД не тільки зменшується кількість виробленого інсуліну, але й змінюється його активація, проникнення крізь клітинні мембрани та включення до відповідних метаболических шляхів [7]. Основною причиною цих порушень є зміна чутливості до інсуліну (інсулінорезистентність) з боку інсулінорецепторів. Основною функціональною одиницею останнього є так званий глікоцитранспортер (ГЛЦТ), що активується субстратами рецепторів інсуліну (IRS). Таким чином надходження глюкози в клітину та її метаболізм можливий тільки через активований ГЛЦТ. У свою чергу, активність ГЛЦТ залежить від морфофункціонального стану мембрани, її фосфоліпідного складу, що достеменно було доведено в нашій лабораторії [8].

Останніми дослідженнями показано, що вітамін D збільшує кількість рецепторів на  $\beta$ -клітинах, що, з одного боку, збільшує секрецію інсуліну за рахунок підвищення внутрішньоклітинного кальцію (непрямий ефект), а з іншого – стимулює  $\alpha$ -гідроксилазу, за рахунок чого активується перетворення кальцидіолу в кальцитриол. Останній, через катіони кальцію  $\text{Ca}^{2+}$  активує кальмодулін-залежну протеїнкіназу, а вона, у свою чергу, активує білки везикул базолатеральних мембран  $\beta$ -клітин та сприяє виходу інсулінових молекул у кров [9]. Таким чином, можливо припустити, що комплексна терапія ЦД з включенням вітаміну D буде вкрай ефективною.

*Мета дослідження* – обґрунтувати доцільність застосування вітаміну D у комплексному лікуванні експериментального ЦД.

**Матеріали та методи.** Дослідження проведено в умовах хронічного експе-

рименту на щурах-самцях лінії Вістар масою від 170 до 320 г. Тварин утримували за стандартних умов експериментально-біологічної клініки ОНМедУ [10]. Дослідження було виконано відповідно до рекомендацій Європейської конвенції щодо експериментів на тваринах і затверджено комісією з біоетики Одеського національного медичного університету (протокол від 10 жовтня 2008 р. № 84). Експериментальний ЦД моделювали одноразовим внутрішньочеревинним (в/о) введенням стрептозотоцину (СТЗ) («Sigma Aldrich ru») натщесерце в дозі 50 мг/кг, який попередньо розчиняли в буферному натрієво-цитратному розчині з рН 4,5 [11]. Визначення вмісту глюкози в крові, яку отримували з хвостової вени щурів, проводили в один і той самий час (о 9 год ранку), починаючи з другого тижня спостереження [12]. Ця серія експериментів була проведена на 70 щурах, поділених на 7 груп по 10 тварин у кожній. Перша група тварин (10 щурів) слугувала контролем. У решті тварин – по 10 щурів у кожній групі – відтворювали ЦД. Для лікування використовували людський генноінженерний препарат інсуліну Актрапід НМ («Nova Nordiks» А/С, Данія) у дозі 3 ОД на щура та в тричі меншій дозі – 1 ОД. Препарат вводили через 2 тижні після відтворення ЦД, коли у крові спостерігалась стійка гіперглікемія, протягом 5 днів на 1 тиждень. Спостереження та лабораторні дослідження цієї серії проводили протягом 6 міс. Вітамін D у вигляді 0,125 % масляного розчину ергокальциферолу (1 мл розчину містить 50,000 МО вітаміну) виробництва НПО «Вітаміни» м. Умань вводили протягом 2 тижнів у дозі 600 МО (0,05 мкг) та 6000 МО (0,5 мкг) на 1 добу ентально. Також вивчали стан мембран мітохондрій печінки тварин, оскільки структурну основу будь-якої, у тому числі мітохондріальної мембрани, становить фосфоліпідний бімолекулярний шар з вбудованими в нього молекулами білка, які знаходяться як на поверхні, так і глибоко занурені всередину бішару. Саме він виконує в мембрані функцію бар'єра, матриці для маркерних ферментів, рецепторів, у тому числі

інсулінових рецепторів та інших ліпідів [13], та забезпечує їхню функцію. Одним з найефективніших методів біофізики в дослідженні цього бішару є флуоресцентне зондування. У нашому дослідженні використовували два флуоресцентні зонди (ФЗ): універсальний – 1-анілінонафталін-8-сульфонат (1,8-АНС), який несе негативний заряд, унаслідок чого не може глибоко занурюватися в ліпідний бішар й розміщується на його поверхні; гідрофобний – М-феніл-1-нафталамін (1-ФНА), який не має сульфогрупи, тому занурюється в мембрану глибше, ніж АНС (на відстань 8 Å від триметиламіногрупи фосфоліпиду). За допомогою даних зондів вивчали такі показники: інтенсивність флуоресценції або «молярну флуоресценцію» (Fmol), питому кількість центрів зв'язування зондів (N), константу зв'язування (K<sub>б</sub>) і константу дисоціації (K<sub>d</sub>). Флуоресценцію збуджували та реєстрували за допомогою спектрофлюориметра «Opton» (Німеччина) за довжини хвилі для АНС 360 і 480 нм; для ФНА — 350–420 нм, щільна 1,6. Дослідження цієї серії виконі на 35 щурах, які були розподілені на 5 груп по 7 тварин у кожній: I група – контрольна, II група – щури через 2 тижні після введення СТЗ; III–VII групи – щури з експериментальним ЦД на тлі введення відповідних лікарських засобів через 1 міс. дослідження, коли визначались найсуттєвіші зміни [14].

Результати дослідження динаміки глюкози в крові та впливу лікарських засобів, що вивчаються, обробляли за допомогою методу ANOVA і статистичного тесту Newman-Keuls, а біофізичних параметрів мембран – за програмою Hewlett Packard 33 E (США).

**Результати та їх обговорення.** Як початкові дані нами було визначено рівень глюкози в крові щурів за моделювання експериментального ЦД у різні проміжки часу. Порівнянням слугувала контрольна група інтактних тварин, котрим визначання рівня глюкози крові проводили в аналогічні проміжки часу. Встановлено, що рівень цукру в крові інтактних тварин протягом 6 міс. дослідження суттєво не змінювався й у середньому складав 6,69

(6,27 ± 7,04) ммоль/л. Дослідження рівня глікемії в разі експериментального ЦД продемонструвало наступне: через 2 тижні після введення СТЗ рівень цукру в крові щурів підвищувався майже в 2,5 разу і складав (16,71 ± 0,31) ммоль/л порівняно з (6,95 ± 0,40) ммоль/л до введення СТЗ. У наступні строки спостереження він продовжував зростати й на другому місяці дослідження сягнув найбільшого значення – (22,23 ± 0,79) ммоль/л (табл. 1).

У подальшому рівень цукру залишався стабільно високим протягом усіх 6 міс. дослідження, що свідчить про коректну та адекватну модель експерименту. Другим етапом дослідження було встановлення ефективності інсуліну на тлі викликаної СТЗ гіперглікемії. За розрахованими даними та на підставі попереднього досвіду нашої лабораторії [8] інсулін вводили в дозі 3 ОД 5 разів на 1 тиждень. Для порівняння застосовували втричі меншу дозу інсуліну – 1 ОД.

Результати дослідження свідчать про те, що інсулін у дозі 3 ОД, введений на тлі експериментального ЦД, значно зменшує вміст цукру в крові, проте не повертає його до контрольних величин. Збільшення дози інсуліну призводить до прямопропорційного ефекту, хоча цей ефект є нестабільним, хвилюподібним. Разом з тим суттєво змінюється поведінка тварин. Вони стають загальмованими, повільно рухаються, шерстний покрив стає кострубатим та зволженим, що свідчить про розвиток гіпоглікемії.

Таким чином, підвищення дози інсуліну є недоцільним. Через 2 тижні після початку введення інсуліну в дозі 3 ОД рівень цукру в крові зменшувався на третину (11,56 ± 0,86) ммоль/л проти (16,71 ± 0,88) без лікування). Через 1 міс. глікемія зменшилася з (21,44 ± 0,90) до (9,21 ± 0,70) ммоль/л (тобто в 2,3 разу, P < 0,05), через 2 міс. – з (22,23 ± 0,79) до (7,56 ± 0,61) ммоль/л (тобто майже в 3 рази, P < 0,05); через 3 міс. – з (21,53 ± 0,69) до (9,03 ± 0,54) ммоль/л, а через 6 міс. з (20,64 ± 0,92) до (10,29 ± 0,63) ммоль/л. Таким чином, доза інсуліну 3 ОД для тварин з експериментальним ЦД виявилася ефективною. За такою самою схе-

Таблиця 1  
Динаміка рівня глюкози в крові шурів за експериментального діабету та фармакологічної корекції, ммоль/л ( $M \pm m$ )

Вид дослідження	Статистичні показники	До початку експерименту	Термін спостереження					
			2 тиж.	1 міс.	2 міс.	3 міс.	6 міс.	
1 Контроль	$M \pm m$	6,61±0,31	6,95±0,40	6,27±0,39	6,83±0,75	7,04±0,70	6,44±0,54	
2 Експериментальний цукровий діабет без лікування	$M \pm m$ %(2-1)	6,61±0,31 —	16,71±0,88 240,4*	21,44±0,90 342,0*	22,23±0,79 324,5*	21,53±0,69 305,8*	20,64±0,92 320,5*	
3 Цукровий діабет + інсулін (3 ОД)	$M \pm m$ %(3-1) %(3-2)	16,71±0,88	11,56±0,86 166,3* 69,1*	9,21±0,70 146,9* 42,9*	7,56±0,61 110,7 34,0*	9,03±0,54 128,3* 41,9*	10,29±0,63 159,8* 49,8*	
4 Цукровий діабет + інсулін (1 ОД)	$M \pm m$ %(4-1) %(4-2) %(4-3)	16,71±0,88	14,42±0,75 204,6* 86,3* 124,7*	15,31±0,61 244,2* 71,5* 166,2*	16,34±0,80 239,2* 73,5* 216,1*	17,11±0,79 243,0* 79,5* 189,5*	13,15±0,68 204,2* 63,7* 127,8*	
5 Цукровий діабет + Вітамін D (6000 МО)	$M \pm m$ %(5-1) %(5-2) %(5-6)	16,71±0,88	10,17±0,39 146,3* 60,9* 129,9*	8,95±0,41 142,7* 41,7* 157,6*	10,12±0,52 148,2* 45,5* 155,6*	11,03±0,39 156,7* 51,2* 145,7*	12,45±0,60 193,3* 60,3* 108,2*	
6 Цукровий діабет + Вітамін D (600 МО)	$M \pm m$ %(6-1) %(6-2)	16,71±0,88	13,21±0,49 190,1* 79,0*	14,11±0,57 225,0* 65,8*	15,75±0,63 230,6* 70,8*	16,07±0,71 228,3* 74,6*	13,47±0,59 209,2* 65,3*	
7 Цукровий діабет + інсулін (1 ОД) + Вітамін D (600 МО)	$M \pm m$ %(7-1) %(7-2) %(7-3) %(7-4) %(7-5) %(7-6)	16,71±0,88	7,34±0,39 105,6 43,9* 63,5* 50,9* 55,6* 72,2*	5,84±0,25 93,1 41,7* 63,4* 38,1* 41,4* 65,2*	7,58±0,45 111,0 34,1* 100,3 46,4* 48,1* 74,9*	8,13±0,30 115 37,8* 90,0 47,5* 50,6* 73,7*	7,03±0,35 109,2 34,1* 68,3* 53,5* 52,2* 56,5*	

Примітка. \* $p < 0,05$ ; величини, що порівнювались, позначені відповідними цифрами у графі «Статистичні показники».

мою була вивчена ефективність інсуліну в дозі 1 ОД. Як свідчать отримані результати, інсулін у дозі 1 ОД також викликав зменшення вмісту цукру в крові щурів зі стрептозотоцинозовим ЦД, проте його дія була менш ефективною. У середньому ця доза зменшувала вміст цукру в крові щурів у різні проміжки часу на 20–30 % (табл. 1). Ця доза є оптимальною для вивчення лікарських засобів з передбачуваною потенціуючою дією.

Наступним етапом стало вивчення ефективності застосування вітаміну D за ЦД. На тій самій моделі в ті самі часові проміжки вивчали введення 2 доз вітаміну D – 600 та 6000 МО на 1 тварину. Результати дослідження показали наступне: введення вітаміну D у дозі 600 МО вірогідно зменшувало вміст цукру в крові щурів з експериментальним ЦД у середньому на 20–35 %; на другий тиждень з моменту введення вітаміну D уміст цукру в крові зменшився з  $(16,71 \pm 0,88)$  до  $(13,21 \pm 0,49)$  ммоль/л ( $P < 0,05$ ); через 1 міс. – з  $(21,44 \pm 0,90)$  до  $(14,1 \pm 0,57)$  ммоль/л ( $P < 0,05$ ); через 2 міс. – з  $(21,53 \pm 0,69)$  до  $(16,07 \pm 0,71)$  ммоль/л ( $P < 0,05$ ), а через 6 міс. – з  $(20,64 \pm 0,92)$  до  $(13,47 \pm 0,59)$  ммоль/л ( $P < 0,05$ ).

Введення вітаміну D у дозі 6000 МО на 1 тварину, тобто в 10 разів вищій за попередню, значно ефективніше зменшувало рівень цукру в крові в усі часові проміжки, що вивчались. Зменшення вмісту цукру в крові становило від 40 до 60 %. Зокрема, через 2 тижні рівень глікемії зменшувався з  $(16,71 \pm 0,88)$  до  $(10,17 \pm 0,39)$  ммоль/л ( $P < 0,05$ ); через 1 міс. – з  $(21,44 \pm 0,90)$  до  $(8,95 \pm 0,41)$  ммоль/л ( $P < 0,05$ ); через 2 міс. – з  $(22,23 \pm 0,79)$  до  $(10,12 \pm 0,52)$  ммоль/л ( $P < 0,05$ ); через 3 міс. – з  $(21,53 \pm 0,69)$  до  $(11,03 \pm 0,39)$  ммоль/л ( $P < 0,05$ ); через 6 міс. – з  $(20,64 \pm 0,92)$  до  $(12,45 \pm 0,60)$  ммоль/л ( $P < 0,05$ ).

Вітамін D у дозі 6000 МО на 1 тварину за ефективністю зниження рівня цукру в крові дорівнював ефективності введеного інсуліну (3 ОД на 1 тварину). Зареєстрований факт є надзвичайно важливим для подальшого вивчення можливості комплексного застосування вітаміну D для профілактики та лікування ЦД. Проте він не розкриває механізму цього впли-

ву. Важливим було прослідкувати ефективність сумісного застосування інсуліну та вітаміну D з метою зниження рівня цукру в крові експериментальних тварин. У наших дослідах був застосований інсулін у дозі 1 ОД/тварину та вітамін D у дозі 600 МО/тварину, тобто використані дози були значно менші за ті, які викликали суттєве зниження рівня цукру в крові. Як свідчать отримані результати, сумісне введення зазначених препаратів, починаючи з 2 тижня дослідження, практично нормалізувало рівень цукру в експериментальних тварин. Причому цей рівень глікемії зберігався протягом усіх 6 міс. дослідження. Цю дію можна характеризувати як синергізм потенціуючого характеру (табл. 1).

Отримані результати є багатообіцяючими, оскільки вони свідчать про те, що суттєве зниження рівня цукру в крові можливе за рахунок сумісного введення інсуліну та вітаміну D, причому доза інсуліну в такій комбінації значно зменшується, так само, як і самого вітаміну D. Постає актуальна та важлива задача з розробки методології застосування вітаміну D у комплексній терапії ЦД та його ускладнень, а саме головне, – подальше вивчення механізмів його дії.

Оскільки важливу роль у фармакологічному ефекті вітаміну D відіграють його спеціалізовані рецептори (VDR), активація яких, у першу чергу, залежить від фосфоліпідного матриксу мембран, точніше його «плинності», подальші дослідження були присвячені вивченню властивостей мембран мітохондрій печінки, які поряд з мембранами еритроцитів є стандартом у дослідженні біологічних мембран.

Тому наступна серія експерименту була присвячена вивченню біологічних властивостей мембран, точніше інтегральних показників, отриманих за допомогою ФЗ. Молекула ФЗ АНС, який було використано в даній роботі, містить в собі заряджену сульфгідрильну групу ( $pK_a = 1$ ), яка не дозволяє їй глибоко занурюватись у ліпідний бішар. Тобто, вона розміщується на поверхні таким чином, що одна поверхня фенольного кільця примикає до гліцеринових ділянок фосфоліпиду, а друга – контактує з водою. Молекула ФЗ ФНА не містить у

собі сульфогрупи, а тому занурюється в мембрану значно глибше, ніж молекула АНС. Практично доведено, що вона розміщується на відстані понад 8 Å від триметиламіногрупи фосфоліпиду. Враховуючи недостатню електронну щільність атома азоту й можливість утворення водневих зв'язків, розташування молекули ФНА уявляється переважно в ділянці карбонільних груп фосфоліпідів. Таким чином, флуоресценція зондів, які були застосовані в наших дослідженнях, відображає зміни в різних зонах мембрани, які виникають за моделювання ЦД та його корекції фармакологічними засобами. Достеменно відомо, що за допомогою ФЗ, які були використані, можна дослідити зміну в'язкості, температури, структурних перебудов поверхневих зарядів, трансмембранного потенціалу, концентрації інших молекул-гасників флуоресценції, акцепторів і донорів енергії збудження тощо.

У дослідженні вивчали стан мембран мітохондрій печінки за моделювання експериментального стрептозотоцинового ЦД та його корекції інсуліном, вітаміном D і за умов їхнього сумісного застосування. Для порівняння використовували мембрани інтактних щурів. Мембрани мітохондрій печінки було обрано не випадково. Відомо, що початок гідроксилювання вітаміну D, тобто початок його перетворення з неактивної в активну форму, починається в печінці. Також у печінці активується фермент CYP24A1 (24-гідроксилаза), яка інактивує активну форму вітаміну D, тобто є регулятором активності. Також відомо, що вітамін D через мітохондріальні механізми регулює експресію понад 9000 генів [2].

Результати вивчення мембран мітохондрій за допомогою ФЗ АНС свідчать про те, що ЦД суттєво погіршує функціональний стан поверхневих шарів мембран. Так, інтегральний показник стану фосфоліпідів мембран, а саме сумарна флуоресценція (Fmol) за ЦД зменшувалась більше ніж у 17 разів – з  $1,96 \cdot 10^6$  до  $1,11 \cdot 10^5$ . Внаслідок суттєвої переорієнтації молекул бішару поверхневих ділянок мембран суттєво збільшувалась константа зв'язування зонда (Kb – binding) – у 4,5 разу (табл. 2); у 5 разів збільшувалась кількість центрів зв'язу-

вання зонда (N) з молекулами. Водночас більше ніж у 4 рази зменшувалась константа дисоціації ФЗ (Kd – dissociation), тобто його розщеплення, яка є зворотною величиною до константи зв'язування (Kb). Тобто зміни цих показників функціонування мембран повністю збігаються з інтегральним показником – сумарною флуоресценцією (Fmol).

Корекція ЦД інсуліном і вітаміном D, введеними окремо, визначила позитивну тенденцію до нормалізації стану поверхневих шарів мембран мітохондрій. А їхнє поєднане введення практично повертало ці зміни до контрольних величин. Міжмолекулярні зв'язки мембран за даними сумарної флуоресценції нормалізувалися повністю: зменшувалася кількість центрів зв'язування до початкових величин, нормалізувалися константи зв'язування та дисоціації зонда. Ці дані свідчать про те, що сумісне введення інсуліну та вітаміну D у дозах, значно менших за терапевтичні, нормалізує міжмолекулярні зв'язки в поверхневих шарах мембран.

Вивчення більш глибоких шарів мембран за допомогою ФЗ ФНА показало, що вони теж суттєво змінюються за формування експериментального ЦД, хоча й менш виразно, ніж поверхневі (табл. 3). Сумарна флуоресценція зонда ФНА також зменшувалася, проте тільки в 2,6 разу. Це свідчить про те, що в більш глибоких шарах теж відбуваються певні структурні зміни, проте вони менш виражені, ніж у поверхневих, тобто глибокі шари пошкоджувались у наших дослідженнях менше. Проте суть змін залишалась односпрямованою. Кількість центрів зв'язування (N) для ФЗ ФНА за формування ЦД зростала більше ніж удвічі. Константа дисоціації зонда зменшувалася в 2,6 разу, а константа зв'язування збільшувалась майже в 3 рази. Сумісне введення інсуліну та вітаміну D практично нормалізувало показники, що вивчались (табл. 3).

Таким чином, за даними біофізичних досліджень встановлено, що сумісне введення лікарських засобів, що вивчаються, нормалізує міжмолекулярні зв'язки як поверхневих, так і більш глибоких шарів мембран мітохондрій, що звичайно зберігає їхню функціональну активність.

Функціональний стан мембран мітохондрій печінки щурів за експериментального цукрового діабету та його медикаментозної корекції за даними флуоресцентного зондування універсальним зондом АНС

Показник, що досліджується	Kb		Kd		N		Fmol	
	M <sup>-1</sup> (абсол. знач.)	%	M (абсол. знач.)	%	M / мг білка (абсол.знач.)	%	абсол. значення	%
Контроль	1,50 · 10 <sup>-2</sup>	100,0	57,6	100,0	1,29 · 10 <sup>-4</sup>	100,0	1,96 · 10 <sup>6</sup>	100,0
Цукровий діабет без лікування	6,75 · 10 <sup>-2</sup>	450,0***	13,5	23,4***	6,69 · 10 <sup>-4</sup>	518,6***	1,11 · 10 <sup>5</sup>	5,7***
Цукровий діабет + інсулін (1 ОД)	4,86 · 10 <sup>-2</sup>	324,0***	46,3	80,4**	4,57 · 10 <sup>-4</sup>	354,3***	7,35 · 10 <sup>5</sup>	37,5***
Цукровий діабет + вітамін D (600 МО)	5,11 · 10 <sup>-2</sup>	340,7***	40,5	70,3**	4,32 · 10 <sup>-4</sup>	334,9***	9,12 · 10 <sup>5</sup>	46,5***
Цукровий діабет +інсулін (1 ОД) + Вітамін D (600 МО)	1,75 · 10 <sup>-2</sup>	116,7*	55,6	96,5	1,45 · 10 <sup>-4</sup>	112,4*	1,79 · 10 <sup>6</sup>	91,3

Примітка. Тут і в табл. 3: \*Значення коефіцієнта кореляції порівняно з контролем, причому: \* – 0,30 – слабкий рівень зв'язку; \*\* – 0,30–0,69 – середній ступінь зв'язку; \*\*\* – 0,70 і більше – високий ступінь кореляційного зв'язку.

Функціональний стан мембран мітохондрій печінки щурів за експериментального цукрового діабету та його медикаментозної корекції за даними флуоресцентного зондування гідрофобним зондом ФНА

Показник, що досліджується	Kb		Kd		N		Fmol	
	M <sup>-1</sup> (абсол. знач.)	%	M (абсол. знач.)	%	M / мг білка (абсол.знач.)	%	абсол. значення	%
Контроль	5,27 · 10 <sup>4</sup>	100,0	2,34 · 10 <sup>-5</sup>	100,0	6,27 · 10 <sup>-4</sup>	100,0	4,13 · 10 <sup>5</sup>	100,0
Цукровий діабет без лікування	15,64 · 10 <sup>4</sup>	296,8***	0,87 · 10 <sup>-5</sup>	37,2***	15,09 · 10 <sup>-4</sup>	240,7***	1,56 · 10 <sup>5</sup>	37,8***
Цукровий діабет + інсулін (1 ОД)	13,75 · 10 <sup>4</sup>	260,9***	1,27 · 10 <sup>-5</sup>	54,3***	13,12 · 10 <sup>-4</sup>	209,2***	2,20 · 10 <sup>5</sup>	53,3***
Цукровий діабет + вітамін D (600 МО)	14,05 · 10 <sup>4</sup>	266,6***	1,10 · 10 <sup>-5</sup>	47,0***	12,95 · 10 <sup>-4</sup>	206,5***	2,44 · 10 <sup>5</sup>	59,1***
Цукровий діабет +інсулін (1 ОД) + Вітамін D (600 МО)	5,49 · 10 <sup>4</sup>	104,2	2,51 · 10 <sup>-5</sup>	107,3	7,13 · 10 <sup>-4</sup>	113,7	3,91 · 10 <sup>5</sup>	94,7

## Висновки

1. Доведено, що рівень глюкози в крові за експериментального стрептозоточного діабету регулюється сумісним введенням інсуліну та вітаміну D, причому в дозах, значно менших за терапевтичні. Це свідчить про синергізм у дії цих лікарських засобів з вираженими ознаками потенціювання.

2. Доведено ефективність сумісного введення інсуліну та вітаміну D щодо нормалізації біофізичних показників, які характеризують функціональний стан мембран мітохондрій печінки щурів за ЦД.

3. Нагальною задачею в подальшому є поглиблене вивчення механізмів, що призводять до вираженої ефективності сумісного застосування цих лікарських засобів у разі ЦД.

1. Шварц Г. Я. Вітамін Д і Д-гормон / Г. Я. Шварц. – Москва : Анахарсис, 2005. – 152 с.
2. Castro L. S. The vitamin D endocrine system / L. S. Castro // *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* – 2011. – V. 55 (8). – P. 566–575.
3. Association between vitamin D and diabetic neuropathy in a nationally representative sample: results from 2001–2004 NHANES / L. H. Sanderstrom, S. P. Johnson, V. A. Diaz, A. G. Mainous // *Diabetic Medicine.* – 2012. – V. 29 (1). – P. 50–55.
4. Mathieu C. Vitamin D and diabetes / C. Mathieu, C. Gysemans // *Av. Diabetol.* – 2006. – V. 22 (3). – P. 187–193.
5. Association between plasma 25-OH vitamin D and testosterone levels in men / K. Nimptsch, E. A. Platz, W. C. Willet, E. Giovannucci // *Clin. Endocrinol. (Oxf).* – 2012. – V. 77 (1). – P. 106–112.
6. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes / A. G. Pittas, I. Lau, F. B. Hu, B. Dawson-Hughes // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – V. 92. – P. 2017–2029.
7. IDF diabete: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030 / D. R. Whiting, L. Guariguata, C. Weil [et al.] // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2011. – V. 94, № 3. – P. 311–321.
8. Кресюн Н. В. Стан мембран мітохондрій печінки щурів при цукровому діабеті та медикаментозній корекції / Н. В. Кресюн, Л. С. Годлевський, Г. О. Сон // *Одеський медичний журнал.* – 2017. – № 1 (159). – С. 5–12.
9. Vitamin D and human health: Lessons from vitamin D receptor nullmice / R. Bouillon, G. Carmeliet, L. Verlinder [et al.] // *Endocrine Reviews.* – 2008. – V. 29. – P. 720–726.
10. Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals / R. Robinson, V. A. Barathi, S. S. Chaurasia [et al.] // *Dis. Model Mech.* – 2012. – V. 5, № 4. – P. 444–456.
11. Kowluru R. A. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy / R. A. Kowluru, J. Tang, T. S. Kern // *Diabetes.* – 2001. – V. 50. – P. 1938–1942.
12. Retinal microaneurysm counts and 10-year progression diabetic retinopathy / R. Klein, S. M. Meuer, S. M. Moss, B. E. Klein // *Arch. Ophthalmol.* – 1995. – V. 113. – P. 1386–1391.
13. Ивков В. Г. Динамическая структура липидного бислоя / В. Г. Ивков, Г. Н. Берестовский. – Москва : Наука, 1981. – 296 с.
14. Кресюн Н. В. Особливості морфофункціонального стану еритроцитів у хворих з простою формою діабетичної ретинопатії / Н. В. Кресюн // *Одеський медичний журнал.* – 2003. – № 6 (80). – С. 84–87.

### **В. Й. Кресюн, В. В. Годован, Л. С. Годлевский, П. Б. Антоненко, Г. О. Сон** **Вітамін D у комплексному лікуванні експериментального цукрового діабету**

*Мета дослідження* – обґрунтувати доцільність застосування вітаміну D (ергокальциферолу) у комплексному лікуванні експериментального цукрового діабету (ЦД).

Експериментальний ЦД моделювали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням стрептозоточину в дозі 50 мг/кг у щурів. Після виникнення стабільної гіперглікемії тваринам вводили інсулін (3 ОД або 1 ОД на 1 тварину), масляний розчин ергокальциферолу (6000 або 600 МО) або комбінацію (інсулін 1 ОД і ергокальциферол 600 МО на 1 тварину) від 2 тижнів до 6 міс. Функціональний стан мембран мітохондрій печінки тварин вивчали за допомогою флуоресцентного зондування бішару.

Після введення інсуліну в дозі 3 ОД рівень цукру в крові тварин з експериментальним ЦД зменшувався на 30–66 % протягом періоду від 2 тижнів до 6 міс. Інсулін у дозі 1 ОД зменшував уміст цукру в крові щурів у різні проміжки часу на 20–30 %. Ця доза є оптимальною для вивчення лікарських засобів з передбачуваною потенціуючою дією. Уведення вітаміну D у дозі 600 і 6000 МО вірогідно зменшувало вміст цукру в крові щурів з експериментальним діабетом у середньому на 20–35 і на 40–60 % відповідно. Сумісне введення інсуліну (1 ОД) і ергокальциферолу (600 МО) практично нормалізувало рівень цукру в експериментальних тварин, уже починаючи з 2 тижня дослідження, що свідчить про наявність синергізму потенціуючого характеру даної комбінації.

Корекція ЦД інсуліном і вітаміном D, введеними окремо, визначила позитивну тенденцію до нормалізації стану поверхневих шарів мембран мітохондрій. А їхнє поєднане введення практично повертало ці зміни до контрольних величин. Міжмолекулярні зв'язки мембран, за даними сумарної флуоресценції,



---

нормалізувалися повністю. Ці дані свідчать про те, що сумісне введення інсуліну та вітаміну D у дозах, значно менших за терапевтичні, нормалізує міжмолекулярні зв'язки в поверхневих шарах мембран.

Нагальною задачею в подальшому є поглиблене вивчення механізмів, які призводять до вираженої ефективності сумісного застосування цих лікарських засобів за ЦД.

*Ключові слова:* вітамін D, цукровий діабет, інсулін, стрептозоточин, мітохондрії печінки

**V. I. Kresyun, V. V. Godovan, L. S. Godlevskiy, P. B. Antonenko, A. A. Son**  
**Вітамін D в комплексном леченні експериментального сахарного діабета**

*Цель исследования* – обосновать эффективность использования витамина D (эргокальциферола) в комплексном лечении экспериментального сахарного диабета (СД).

Експериментальний СД моделювали одноразовим внутрібрюшинним введенням стрептозоточина крысам в дозе 50 мг/кг. После возникновения стабильной гипергликемии животным вводили инсулин (3 ЕД или 1 ЕД на 1 животное), масляный раствор эргокальциферола (6000 или 600 МЕ) или комбинацию (инсулин 1 ЕД и эргокальциферол 600 МЕ на 1 животное) от 2 недель до 6 мес. Функциональное состояние мембран митохондрий печени животных изучали с помощью флуоресцентного зондирования биослоя.

После введения инсулина в дозе 3 ЕД уровень сахара в крови животных с экспериментальным СД уменьшался на 30–66 % на протяжении периода от 2 недель до 6 мес. Инсулин в дозе 1 ЕД уменьшал содержание сахара в крови крыс в разные промежутки времени на 20–30 %. Эта доза является оптимальной для изучения лекарственным средством с предполагаемым потенцирующим действием. Введение витамина D в дозе 600 и 6000 МЕ достоверно уменьшало содержание сахара в крови крыс с экспериментальным диабетом в среднем на 20–35 и на 40–60 % соответственно. Совместное введение инсулина (1 ЕД) и эргокальциферола (600 МЕ) практически нормализовало уровень сахара у экспериментальных животных, уже начиная со 2 недели исследования, что свидетельствует о наличии синергизма потенцирующего характера у данной комбинации.

Коррекция СД инсулином и витамином D, введенными отдельно, определяла позитивную тенденцию к нормализации состояния поверхностных слоев мембран митохондрий. А их совместное введение практически возвращало эти изменения до уровня контрольных показателей. Межмолекулярные связи мембран, по данным суммарной флуоресценции, нормализовались полностью. Эти данные свидетельствуют о том, что совместное введение инсулина и витамина D в дозах, значительно меньших, чем терапевтические, нормализует межмолекулярные связи в поверхностных слоях мембран.

Важной задачей в дальнейшем является углубленное изучение механизмов, которые обеспечивают выраженную эффективность совместного применения этих лекарственных средств при СД.

*Ключевые слова:* витамин D, сахарный диабет, инсулин, стрептозоточин, митохондрии печени

**V. I. Kresyun, V. V. Godovan, L. S. Godlevsky, P. B. Antonenko, G. O. Son**  
**Vitamin D in the complex therapy of experimental diabetes mellitus**

*The aim of this work* was to prove the effectiveness of the use of vitamin D (ergocalciferol) in the complex treatment of experimental diabetes mellitus (DM).

The experimental DM has been reproduced by single intra-peritoneal injection of streptozotocin at a dose of 50 mg/kg in rats. After the development of persistent hyperglycemia, animals were given insulin (3 U or 1 U per animal), oil solution of ergocalciferol (6000 or 600 International Units, IU) or a combination (insulin 1 U and ergocalciferol 600 IU per animal) from 2 weeks to 6 months. Functional condition of mitochondrial biomembranes of the animals' liver was studied by fluorescent probing of a bilayer.

After the introduction of insulin at a dose of 3 U, the blood sugar level in animals with experimental diabetes decreased by 30–66 % over a period from 2 weeks up to 6 months. Insulin in a dose of 1 U reduced the sugar level in the blood of the rat at different times by 20–30 %. This dose is optimal for the study drugs with foreseen potentiating effects.

Introduction of vitamin D in a dose of 600 and 6000 IU significantly reduced the blood sugar level in rats with experimental diabetes by an average of 20–35 and 40–60 %, respectively. Co-administration of insulin (1 U) and ergocalciferol (600 IU) practically normalized the sugar level in experimental animals, starting from the 2<sup>nd</sup> week of study, which indicates the synergism action of this drugs under their joint administration.

Correction of diabetes with insulin and vitamin D administered separately, determined a positive trend in the normalization of the functional state of the surface layers of mitochondrial membranes. And their joint administration almost returned these changes to the initial level. The inter-molecular bonds of the membranes, according the total fluorescence data, were completely normalized. These data are the evidences that the joint administration of insulin and vitamin D, at doses significantly less than therapeutic, normalizes inter-molecular bonds in the surface layers of membranes.

There is an important task in the future to fulfill a profound investigation of pathogenetic mechanisms, that lead to significant effectiveness of combined administration of these agents in diabetes mellitus.

*Key words:* vitamin D, diabetes mellitus, insulin, streptozotocin, liver mitochondria

---

*Надійшла:* 14 листопада 2017 р.

**Контактна особа:** Годован В. В., доктор медичних наук, професор, Одеський національний медичний університет, буд. 2, Валіховський пров., м. Одеса, 65082. Тел.: + 38 0 48 723 42 49