

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України



С.В. Кожісаренко

(підпис)
М.П.

АНОТОВАНИЙ ЗВІТ
про виконану роботу у 2020 році в рамках реалізації проєкту
із виконання наукових досліджень і розробок

Нейропротекторна дія вітаміну D₃ за глюкокортикоїд-індукованої нейротоксичності

Назва конкурсу: Підтримка досліджень провідних та молодих учених
Реєстраційний номер Проєкту: 2020.02/0336

Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок (реєстраційний номер та назва Проєкту) 2020.02/0336
«Нейропротекторна дія вітаміну D₃ за глюкокортикоїд-індукованої нейротоксичності»

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу Підтримка досліджень провідних та молодих учених протокол від «16-17» вересня 2020 року № 21

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Тривалість виконання Проєкту
Початок – 8 жовтня 2020 року;
Закінчення – 2022 рік.

Загальна вартість Проєкту, грн. 3500000 грн.

Вартість Проєкту по роках, грн.:
1-й рік 738500 грн.
2-й рік 1 405 750 грн.
3-й рік 1 355 750 грн.

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту буде залучено 6 виконавців, з них:
доктори наук 1;
кандидати наук 5;
інші працівники _____.

3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ СУБВИКОНАВЦЯ ПРОЄКТУ

Грантоотримувач Проєкту:

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна 01054, м. Київ, вул. Леонтовича, 9; тел. (044) 234-63-14; факс 279-63-65

Код ЄДРПОУ 05417288

Код(и) КВЕД М-72.1

Відомча підпорядкованість – Національна академія наук України

Організація субвиконавця Проєкту:

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4; тел. (044) 253-20-13

Код ЄДРПОУ 05417093

Код(и) КВЕД 72.2, 72.11, 72.19, 85.42

Відомча підпорядкованість – Національна академія наук України

4. ОПИС ПРОЄКТУ

4.1. Мета Проєкту З'ясувати участь NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів у розвитку глюкокортикоїд-індукованої нейротоксичності у взаємозв'язку із D-вітамінним статусом і станом D-ауто/паракринної системи у мозку щурів.

4.2. Основні завдання Проєкту

1. Охарактеризувати стан D-ауто/паракринної системи, морфофункціональні та когнітивно-поведінкові порушення, зміни прооксидантних, прозапальних, проліферативних процесів та загибелі нервових клітин за дії преднізолону та вітаміну D₃;
2. Дослідити роль ядерного фактору NF-κB та шляху RANKL-RANK у розвитку глюкокортикоїд-індукованої нейротоксичності та у механізмі нейропротекторної дії вітаміну D₃.

4.3. Детальний зміст Проєкту:

- Сучасний стан проблеми

Тривале застосування глюкокортикоїдів (ГК) підвищує ризик розвитку порушень у ЦНС. Вітамін D₃ проявляє нейропротекторну дію за різних нервових порушень. Актуальним є встановлення залежності між D-вітамінним статусом, змінами NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів та індукцією загибелі клітин і морфофункціональними порушеннями у головному мозку за ГК-індукованої нейротоксичності.

- Новизна Проєкту

Ефективність застосування вітаміну D₃ для корекції і профілактики морфофункціональних і когнітивно-поведінкових порушень за нейротоксичного впливу ГК буде вперше експериментально обґрунтована встановленням зв'язку цих змін з рівнем забезпеченості організму вітаміном D, станом вітамін D-ауто/паракринної системи та сигнальними шляхами NF-κB у головному мозку.

- Методологія дослідження

Для дослідження будуть використані сироватка крові, спинномозкова рідина, головний мозок тварин та його структури. Для реалізації основних завдань роботи будуть використані наступні методи дослідження: гістологічні, імунохімічні, функціонально-біохімічні методи, конфокальна мікроскопія, поведінкові тести, методи молекулярної біології та статистичного аналізу.

5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації Проєкту, зокрема:

5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проєкту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

Ціллю ЕВП №1 було дослідити експресію ключових компонентів сигнальної системи вітаміну D у головному мозку у взаємозв'язку з рівнем циркулюючого 25-гідроксिवітаміну D (25ОНD) та його вмістом у нервовій тканині; з'ясувати індуковані преднізолоном особливості структурно-функціональної організації головного мозку в залежності від рівня забезпеченості організму тварин та нервової системи вітаміном D.

У результаті виконання етапу НДР було виявлено значне зниження 25ОНD в сироватці крові щурів, яким вводили преднізолон в порівнянні з контролем, що вказує на розвиток вираженого глюкокортикоїд-індукованого дефіциту вітаміну D у щурів цієї групи. D-дефіцитний стан тварин в результаті тривалого глюкокортикоїдного навантаження корелював із зниженням рівня 25ОНD в екстрактах тканини головного мозку, що вказує на істотне порушення біодоступності прогормону вітаміну D для ЦНС. Терапевтичне введення вітаміну D₃ тваринам на тлі дії глюкокортикоїду, призводило до повної нормалізації рівня 25ОНD у сироватці крові та часткової у тканинних екстрактах головного мозку у порівнянні з групою щурів, які отримували преднізолон. Нами також було відпрацьовано процедуру проведення атланта-окципітальної пункції та здійснено забір спинномозкової рідини. Було оптимізовано умови проведення імуноензимного визначення вмісту 25ОНD у спинномозковій рідині контрольних щурів. Вміст 25ОНD у ній виявився у 2,5 рази нижчим у порівнянні з відповідним контрольним показником у сироватці крові і становив 6,5 нмоль/мл.

Стан тканинної експресії цитохромів, відповідальних за утворення активних гідроксильованих похідних холекальциферолу, може відігравати істотну роль у порушенні біодоступності вітаміну D та VDR-опосередкованого клітинного сигналювання за глюкокортикоїд-індукованої нейротоксичності та у механізмі нейропротекторної дії вітаміну D₃. Показано, що після введення преднізолону рівень мРНК-транскрипту *Vdr* в тканині головного мозку підвищувався більш ніж в 6 разів. З використанням вестерн-блот аналізу було також виявлено зростання вмісту протеїну VDR, який досягав рівня вищого показників контрольних тварин на 41%. Дослідження експресії 25-гідроксивітамін D 1 α -гідроксилази (CYP27B1), відповідальної за синтез D-гормону 1,25(ОН)₂D, виявило, що преднізолон викликає більш ніж 5-разове збільшення експресії мРНК *Cyp27b1* в тканині головному мозку в порівнянні з контролем. Це може відображати компенсаторну реакцію ауто-/паракринної системи вітаміну D на знижений рівень 25ОНD за довготривалої дії преднізолону. Преднізолон індукував зниження рівня мРНК 25-дигідроксивітамін D-24-гідроксилази (CYP24A1), важливого компоненту ауто-/паракринної системи вітаміну D, що відповідає за інактивацію як 25ОНD, так і гормонально активного похідного (1,25(ОН)₂D) в 5,5 рази в порівнянні з контролем. Одним з вірогідних механізмів, який поряд з порушення першого етапу гідроксильовання холекальциферолу у печінці, частково пояснює виявлений дефіцит вітаміну D₃ за дії глюкокортикоїду, може бути встановлене нами зниження вмісту вітамін D зв'язувального протеїну (VDBP). Було виявлено пригнічення експресії мРНК *Vdbp* у тканині печінки щурів в результаті хронічного введення преднізолону. Терапевтичне введення вітаміну D₃ призводило до повної або часткової нормалізації рівня експресії VDR, CYP27B1, VDBP, але не впливало на синтез CYP24A1.

За станом цитоархітекtonіки у різних структурних ділянках головного мозку щурів (гіпокамп, префронтальна та сенсорно-моторна кора, таламус, мозочок), змінами щільності нейронів та їх якісних характеристик було оцінено частку деструктивно-змінених клітин та тяжкість індукованого преднізолоном ушкодження головного мозку тварин, а також оцінено терапевтичну ефективність введення вітаміну D₃ холекальциферолу. При гістологічному дослідженні виражених ознак ураження мозку (гідроптична дистрофія нейронів, нейродегенерація) не було виявлено. Гістологічне дослідження виявило порушення цитоархітекtonіки у різних структурних ділянках головного мозку. У групі з введенням преднізолону відмічається зменшення щільності клітин в СА2 і СА3 секторах гіпокампу. Пірамідні нейрони демонструють збільшення у об'ємі неушкоджених клітинних ядер, із підвищеним рівнем еухроматину, що вказує на активацію синтетичних процесів в них. Встановлено зростання площі перерізу нейронів V шару префронтальної кори головного мозку, в той час як площа перерізу нейронів цього шару у сенсорно-моторній корі зменшувалась. У гангліонарному шарі мозочка були виявлені ознаки нейродистрофічних змін. Достовірних морфометричних змін в структурних утвореннях таламусу не було зафіксовано.

Морфологічні зміни нейрональних клітин супроводжувались глюкокортикоїд-індукованими порушеннями синаптичної функції нейронів кори головного мозку. Після деполаризації нервових закінчень у середовищі з високим вмістом K^+ у щурів, які отримували преднізолон, спостерігалось майже дворазове зниження рівня Ca^{2+} -індукованого екзоцитозу, яке досліджували з використанням рН-чутливого флуоресцентного барвника акридинового оранжу. Встановлено, що однією з причин зниження екзоцитозу є порушення процесу злиття синаптичних везикул з плазматичними мембранами (з використанням флуоресцентного зонду хлориду октадецил-родаміну В – R18). Синаптичні везикули, ізольовані з кори головного мозку щурів, які отримували преднізолон, демонстрували значно нижчий рівень Ca^{2+} -залежного злиття (на 29,7%) з синаптичними мембранами в порівнянні з контролем. Оскільки злиття мембран синаптичних везикул може залежати від рівня холестерину в мембранних структурах, було вивчено рівень загального холестерину. Показано збільшення його вмісту в синаптичних плазматичних мембранах, виділених з кори півкуль головного мозку експериментальних тварин. Введення вітаміну D_3 відновлювало рівень екзоцитозу до показників у контрольних тварин. Спостерігався частковий коригувальний ефект терапевтичного застосування вітаміну D_3 на вміст холестерину у синаптичних цитоплазматичних мембранах.

5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами

Наукові результати щодо функціонального стану вітаміну D ауто-/паракринної системи у нервовій системі за глюкокортикоїд-індукованої нейротоксичності отримані вперше. Вони експериментально обґрунтовують необхідність подальшого дослідження наявності зв'язку між рівнем забезпеченості організму піддослідних тварин вітаміном D, станом вітаміну D-ауто-/паракринної системи тканини головного мозку та структурно-функціональними порушеннями у ЦНС і поведінковими змінами за глюкокортикоїд-індукованої нейротоксичності. Ґрунтуючись на даних гістологічних досліджень об'єктами подальших експериментів будуть ті структурні ділянки головного мозку, в яких були виявлені найбільш істотні структурно-функціональні зміни, а саме гіпокамп, префронтальна кора та кора мозочку.

5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проекту для економіки та суспільства (стосується проєктів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)

Отримані наукові результати реалізації проекту у 2020 році є теоретичною основою для подальшого з'ясування молекулярно-клітинних механізмів нейропротекторної дії вітаміну D_3 на наступних етапах виконання проекту, що сприятиме у кінцевому рахунку вирішенню актуальної біомедицинської та соціальної проблеми з експериментального обґрунтування можливості терапевтичного застосування вітаміну D_3 як ефективного засобу корекції глюкокортикоїд-індукованої нейротоксичності.

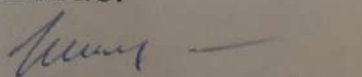
5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проекту в суспільній практиці.

В результаті виконання проекту у 2020 році отримані проміжні дані, які на наступних етапах виконання проекту будуть доповнені та на їх основі буде розроблено фармакологічні підходи направленої регуляції функціональної активності клітин головного мозку за глюкокортикоїд-індукованої нейротоксичності з використанням вітаміну D_3 , що можуть бути застосовані у комплексному лікуванні неврологічних та когнітивних порушень, асоційованих з тривалим введенням глюкокортикоїдів.

Науковий керівник Проекту

Старший науковий співробітник, к.б.н.

Шиманський І.О.



(підпис)