

**„Wpływ suplementacji witaminą D<sub>3</sub> na mitochondrialny metabolizm tlenowy i neuroprotekcję w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów”**  
**mgr Daria Korewo-Labelle**

**Wprowadzenie:** Powszechnie wiadomo, że jednym z głównych układów odpowiedzi na stresor jest oś podwzgórze-przysadka mózgowa-kora nadnerczy (PPN), która generuje i moduluje poziom glikokortykosteroidów (GK) w organizmie. Niekorzystne warunki środowiskowe mogą doprowadzić do nadaktywności osi PPN indukując hipersekrecję GK. Hipokamp, wydaje się być szczególnie wrażliwy na negatywne skutki ekspozycji na działanie GK. Podczas wysokiego ich poziomu obserwuje się obniżenie objętości hipokampa, jak również zmiany morfologiczne, metaboliczne i funkcjonalne.

Głównym celem rozprawy doktorskiej było określenie wpływu 28 dniowej suplementacji witaminy D<sub>3</sub> w dawce 600 IU/ kg/ dzień na mitochondrialny metabolizm tlenowy i neuroprotekcję w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów.

**Materialy i metody:** Badania zostały wykonane za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Badań na Zwierzętach w Bydgoszczy (nr 10/2019). W prowadzonych badaniach wykorzystano dwa modele *in vivo* powtarzanej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów. Model egzogenny, związany z podawaniem syntetycznego GK, deksametazonu (DEXA) oraz endogenny, poprzez aktywację osi PPN indukowaną zanurzeniem w zimnej wodzie. Badania przedstawione w niniejszej rozprawie zostały wykonane na szczurach szczepu Wistar, losowo podzielonych na 6 grup: grupę kontrolną, otrzymującą dootrzewnowo 0,9 % roztworu NaCl (n = 4-6); grupę otrzymującą dootrzewnowo roztwór DEXA w dawce 2 mg/ kg/ dzień i suplementowane witaminą D<sub>3</sub> dawce 600 IU/ kg/ dzień (n = 7-8); grupę otrzymującą dootrzewnowo roztwór DEXA w dawce 2 mg/ kg/ dzień i suplementowaną olejem roślinnym (placebo) (n = 6-7); grupę poddawaną cyklicznej ekspozycji na zimno poprzez zanurzenie w wodzie o temperaturze 0-4°C (60 minut dziennie), suplementowaną witaminą D<sub>3</sub> (n = 8-9); grupę poddawaną zanurzeniu w zimnej wodzie i suplementowaną placebo (n = 8-9); grupę poddawaną zanurzeniu w ciepłej wodzie (34-36°C) (n = 6). Pierwszego i ostatniego dnia eksperymentu zwierzęta zostały zważone, pobrano im krew z żyły ogonowej. Stężenie kortykosteronu i metabolitów witaminy D w osoczu oznaczono za pomocą metod: kolejno testu immunoenzymatycznego ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) oraz chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas

(LC-MS/MS). Po uśmierceniu zwierząt, hipokampy wyizolowano, zważono na wadze analitycznej i poddano homogenizacji. Poziom specyficznych receptorów wiążących GK oraz witaminę D, jak również poziom białek związanych z neuroprotekcją i mitochondrialnym metabolizmem energetycznym (kompleks IV łańcucha oddechowego) oceniono na podstawie wyników uzyskanych metodą Western blot. Aktywność enzymatyczną syntazy cytrynianowej oraz oksydazy cytochromu c, zmierzono za pomocą metod kinetycznych. Następnie poziom wolnorodnikowych uszkodzeń lipidów i białek w hipokampie oceniono wykorzystując metodę ELISA oraz metod spektrofotometrycznych.

**Wyniki:** W pracy wykazano, że długotrwała ekspozycja na działanie GK, zarówno syntetycznych, jak i związanych z indukowaniem aktywności osi PPN, powoduje obniżenie masy hipokampa. Suplementacja witaminą D<sub>3</sub> wpłynęła ochronnie na masę hipokampa przy cyklicznemu podawaniu DEXA w przeciwieństwie do ekspozycji na zimno. Zaobserwowano częściową modulację poziomu receptora glikokortykosteroidowego (GR), wzrost poziomu fosforylowanej kinazy serynowo-treoninowej (pAkt), dojrzałej formy neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (mBDNF), podjednostki II oksydazy cytochromu c (COX II) oraz wzrost aktywności syntazy cytrynianowej. Z kolei długotrwała ekspozycja na zimno skutkowałą wzrostem poziomu kortykosteronu w osoczu zwierząt, a włączona suplementacja witaminą D<sub>3</sub> wpłynęła jedynie ochronnie na mitochondrialny metabolizm tlenowy i częściowe wyciszenie stresu oksydacyjnego w hipokampie.

**Wnioski:** Na podstawie zaprezentowanych w pracy wyników można stwierdzić, że suplementacja witaminą D<sub>3</sub> częściowo chroni hipokamp przed negatywnym działaniem GK poprzez wpływ na mitochondrialny metabolizm energetyczny oraz białka związane z neuroprotekcją. Ochronne działanie witaminy D<sub>3</sub> koncentruje się w szczególności na neurobiologicznych efektach związanych z farmakoterapią DEXA. Interesującym jest, że suplementacja witaminą D<sub>3</sub> również częściowo chroniła hipokamp zwierząt narażonych na stres związany z zimnem przed zaburzeniami w mitochondrialnym metabolizmie tlenowym oraz uszkodzeniami wywołanymi stresem oksydacyjnym. Wyniki tych badań mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia neurobiologicznych mechanizmów działania witaminy D w warunkach zwiększonej aktywności osi PPN, jak również w trakcie terapii steroidowej.

Wyniki badań uzyskane w ramach realizacji niniejszej dysertacji doktorskiej częściowo zostały opublikowane w dwóch oryginalnych artykułach:

- Karnia, M.J.; **Korewo, D.**; Myślińska, D.; Ciepielewski, Z.M.; Puchalska, M.; Konieczna-Wolska, K.; Kowalski, K.; Kaczor, J.J. The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients* **2021**, *13*, 936. <https://doi.org/10.3390/nu13030936> (**IF = 4,8; MEiN = 140**).
- **Korewo-Labelle, D.**; Karnia, M.J.; Myślińska, D.; Kaczor, J.J. Supplementation with Vitamin D<sub>3</sub> Protects against Mitochondrial Dysfunction and Loss of BDNF-Mediated Akt Activity in the Hippocampus during Long-Term Dexamethasone Treatment in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13941. <https://doi.org/10.3390/ijms241813941> (**IF = 4,9; MEiN = 140**)