

УКРАЇНЬСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ І БІОХІМІЇ ТВАРИН

На правах рукопису

БОНДАРЕНКО Лариса Борисівна

БІОЛОГІЧНІ ФУНКЦІЇ  
ВІТАМІНУ D<sub>3</sub>  
І ЙОГО ПОХІДНИХ

Спеціальність 03.00.04 — біохімія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Львів — 1996

AB 34.830

Робота виконана у Інституті біоорганічної хімії та  
нафтохімії НАН України

ЛНБ України ім. В. Стефаника



00740594 (Т)

Його опоненти: доктор біологічних наук, професор В. К. Кібірев  
доктор біологічних наук, професор Р. С. Стойка  
доктор біологічних наук, професор В. Г. Янович.

Провідна організація: Київський університет ім. Т. Г. Шевченка

Захист відбудеться "11" червня 1996 р. о "   " год.  
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 04.14.01 при Інсти-  
туті фізіології і біохімії тварин Української академії аграр-  
них наук за адресою: 290034, м. Львів-34, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту  
фізіології і біохімії тварин УААН.

Автореферат розісланий "8" гравня 1996р.

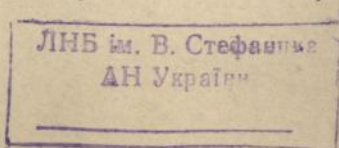
Учений секретар

Спеціалізованої ради

доктор сільськогосподарських

наук

Я. І. Кирилів



### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

Актуальність проблеми. Внаслідок багаторічного вивчення біологічної ролі вітаміну  $D_3$  у організмі було встановлено, що він є головним регулятором гомеостазу кальцію, діючи за механізмом, характерним для стероїдних гормонів (Бауман В.К., 1989).

Послідовне ферментативне гідроксилювання вітаміну  $D_3$  в організмі проводить до утворення ряду його метаболітів, серед яких найбільш біологічний ефект спричиняють  $1\alpha,25$ -дигідроксивітамін  $D_3$  та  $24,24$ -дигідроксивітамін  $D_3$ . Антирахітична активність гідроксипохідних суттєво відрізняється від дії самого вітаміну.  $1\alpha,25$ -дигідроксивітамін  $D_3$  є гормонально активною формою вітаміну  $D_3$ , найбільш ефективною при дії на гомеостаз кальцію. Протягом значного періоду фізіологічна роль гідроксильних груп у молекулі вітаміну  $D_3$  та його похідних залишалась нез'ясованою. Частково її вдалося виявити лише після синтезу та вивчення гідрокс- та фторованих аналогів вітаміну  $D_3$  (Яхмювач Р.І., 1978). Ці дослідження привели до перегляду традиційних уявлень про роль вітаміну  $D_3$  та його похідних в організмі, оскільки в'ясувалось, що модифікація ополук D-вітамінного ряду шляхом введення додаткових гідроксильних груп або атомів фтору істотно розширює їх регуляторний вплив на обмін речовин в організмі. Ці сполуки виявились перспективними антилейкемічними, протівірусними, протипсоріазними, імуномодулюючими препаратами. (Koeffler H, 1984).

Незважаючи на велику кількість робіт, що ведуться різними групами дослідників в метов синтезу нових аналогів вітаміну  $D_3$  і вивчення їх біологічної активності в експериментах з рідкими культурами клітин, залишається нез'ясованим питання про залежність характеру і ступеню впадіння ефектів похідних вітаміну  $D_3$  від їх хімічної будови (Окялпга ч.н., 1992). До того ж проведення досліджень біологічної активності синтетичних гідрокс- та фтораналогів віта-

міну  $D_3$  майже виключно на різноманітних культурах клітин не дає можливості вірогідно передбачати їх вплив на цілісний організм. Нез'ясовано також і питання про ступінь взаємозалежності цих змін у гомеостазі кальцію та іншими проявами біологічної активності вітаміну  $D_3$  та його похідних.

Інтенсивне накопичення експериментальних даних, що свідчать про здатність ряду сполук D-вітамінної природи впливати на організм, його окремі органи та тканини чи клітини, не зачіпаючи в значній мірі гомеостазу кальцію, ставить дослідників перед необхідністю докорінного пересмислення біологічної ролі вітаміну  $D_3$  та його метаболітів, що досі розглядалися і досліджувалися майже виключно як антирахітичні препарати.

Особливий інтерес становить з'ясування характеру впливу вітаміну  $D_3$  та його похідних на білки сполучної тканини, адже вони складають до 30% всіх білків організму, а якісні зміни в їх структурі можуть впливати на процеси кальцифікації, морфогенезу, цитодиференціювання (Лебедев Д.О., 1979). Найвні дані про вплив вітаміну  $D_3$  та його похідних на сполучну тканину в організмі нечисленні та протирічливі.

Актуальність досліджень, спрямованих на з'ясування нових аспектів біологічної дії сполук D-вітамінної природи та ступеню їх обумовленості змінами у метаболізмі кальцію, зумовлена також і тим, що отримані результати можуть стати основою для розробки високо-ефективних раціонів, кормових добавок і нових лікарських засобів з широким спектром біологічної дії. Ці препарати, що спричиняють свій вплив у непомірних концентраціях, можуть бути ефективними при лікуванні лейкозів, псоріазу, колагенозів, атеросклерозу, порушень імунітету різної природи.

Мета дослідження: вивчити нові напрямки біологічної активності вітаміну  $D_3$  та його похідних, встановити характер залежності ефектів досліджуваних речовин від їх хімічної структури та змін у обміні кальцію.

Завдання дослідження.

1. Провести порівняльне дослідження впливу D-вітамінних сполук і надлишку кальцію у раціоні на гомеостаз кальцію у сироватці крові і кальцифікацію шляхом визначення змін показників антирахітичної активності.

2. Вивчити ефекти даних речовин на вміст вільних амінокислот та різних фракцій холестерину у сироватці крові, як показники, що характеризують білковий та ліпідний обмін.

3. Виявити вплив досліджуваних речовин на сполучно-тканяний матрикс, зокрема на амінокислотний склад, поверхневий заряд, локалізацію полярних і неполярних зон, вміст вуглеводів у колагенах I та II типів.

4. Дослідити вплив гормонально активної форми вітаміну  $D_3$  на біосинтез білку у системі *in vitro*.

Наукова новизна роботи. В роботі вперше виявлена здатність надлишку  $Ca^{2+}$ , вітаміну  $D_3$  та його похідних викликати зміни в сполучній тканині, зокрема в амінокислотному складі, поверхнево-му заряді, локалізації полярних і неполярних зон вздовж молекули колагену, а також у вмісті його вуглеводного компоненту. Вперше досліджено структуру SLS-кристалітів колагенів типів I і II кістки, шкіри та хряща курчат при рахіті і після введення сполук D-вітамінної природи. З'ясовано, що ефекти сполук D-вітамінної природи на структуру колагенів сполучної тканини не є тотожними

за характером до дії кальцію. Вплив  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  на амінокислотний склад колагенів найменше відрізнявся від дії самого вітаміну, а  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  найсильніше серед інших D-вітамінних сполук впливав на поверхневий заряд цих білків.

Вперше виявлена здатність надлишку кальцію та D-вітамінних сполук змінювати вміст вільних амінокислот та різних фракцій холестерину в сироватці крові. Найсильніший ефект на вміст вільних амінокислот спричинявало введення похідних вітаміну  $\text{D}_3$ , що містили  $1\alpha\text{OH}$  групу, а на вміст холестерину -  $3\beta\text{FD}_3, 24,25(\text{OH})_2\text{D}_3, 1\alpha\text{OHD}_3$ .

Вперше встановлена здатність гормонально активної форми вітаміну  $\text{D}_3$  стимулювати біосинтез білків у безклітинній системі *in vitro*.

Вперше показано, що введення в молекулу вітаміну  $\text{D}_3$  додаткових гідроксильних груп або атомів фтору впливає не лише на виявлення антирахітичної активності, але й на його ефекти на вміст вільних амінокислот і холестерину у сироватці крові, амінокислотний склад, поверхневий заряд, структурну частину кристалітів молекул колагенів I і II типів кістки, шкіри та хряща курчат та на вміст їх вуглеводного компоненту.

Одержані результати суттєво розширюють уявлення про механізми дії і біологічну роль D-вітамінних сполук в організмі та дозволяють стверджувати, що їх вплив на організм в цілому та на окремі його тканини і клітини не обмежується лише регуляцією гомеостазу кальцію, але й поширюється на обмін амінокислот, білків, ліпідів і вуглеводів.

Крім того, результати дослідження змін у амінокислотному складі та значеннях поверхневих зарядів молекул колагенів при дефіциті вітаміну  $\text{D}_3$  у раціоні дозволяють характеризувати рахіт, як комплексну патологію сполучної тканини і мінерального обміну.

Теоретичне і практичне значення роботи. Результати вивчення

нових аспектів біологічної активності сполук D-вітамінної природи мають перш за все пріоритетне науково-теоретичне значення. Вони дозволяють з нових позицій оцінити роль D-вітамінних сполук в обмінних процесах клітини та організму в цілому і в основую для подальшого проведення прикладних досліджень з метою розробки фармакологічних засобів D-вітамінної природи. Такі препарати, здатні у дуже малих кількостях нормалізувати порушення у мінеральному обміні, в структурі сполучної тканини, обміні холестерину, лейкоцитів. Вони можуть бути ефективними під час лікування різних запальних процесів, лейкозів, радіаційних уражень, атеросклерозу, ревматизму, вовчка, склеродермії та інших колагенозів, які за даними ВООЗ знаходяться на третьому місці у світі після серцево-судинних та онкологічних захворювань.

Результати детального вивчення взаємозв'язку між структурою похідних вітаміну D<sub>3</sub> та різними напрямками їх біологічної дії дають можливість вести спрямований синтез препаратів, що здатні вибірково нормалізувати стан сполучної тканини чи метаболізм ліпідів, вуглеводів або амінокислот, не впливаючи при цьому помітно на мінеральний обмін. Суттєві зміни обміну кальцію та фосфору викликають усі нині існуючі лікарські препарати на основі вітаміну D<sub>3</sub>, що значно звужує сферу їх застосування у медичній практиці.

Результати дослідження сумісної дії різних доз кальцію і вітаміну D<sub>3</sub> дають можливість розробити більш ефективні способи лікування рахіту та інших патологій мінерального обміну, а також створити нові препарати вітаміну D<sub>3</sub> та його похідних у комбінації з мінеральними добавками для потреб медицини і ветеринарії.

Конкретний особистий внесок дисертанта. Автором дисертаційної роботи особисто розроблено програму і методологію досліджень. Вся підготовка та проведення експериментів виконувались особисто

пошукачем. Окремі фрагменти роботи (амінокислотний аналіз, виділення кальційзв'язуючого білку, радіобіологічні дослідження та вивчення впливу D-вітамінних сполук на структуру GLS-кристалітів) виконані спільно із співавторами опублікованих статей. Автором самостійно проведено аналіз всього первинного матеріалу, сформульовані положення і висновки роботи.

Апробація роботи. Результати дисертації були представлені на конференції "Проблеми мікробного синтезу вітамінів та їх похідних" (Ташкент, 1990), Всесоюзній нараді "Нові аспекти участі біологічно активних речовин у регуляції метаболізму і продуктивності сільськогосподарських тварин" (Боровськ, 1991), 6-му Українському біохімічному з'їзді (премія на конкурсі молодих учених, Київ, 1992), конференції "Біологічно активні сполуки, синтез і застосування" (Пенза, 1992), Республіканській науковій конференції "Еколого-гігієнічні проблеми харчування населення" (Київ, 1992), I-III Мілзузівських науково-методичних конференціях (Полтава, 1992, 1993, 1994), I Міжнародному конгресі міжнародного товариства з вивчення жирних кислот і ліпідів (Лугано, Швейцарія, 1993), 5-й науково-практичній конференції винахідників і підприємців "Наука і виробництво - охороні здоров'я" (Київ, 1993), 9-й Міжнародній конференції з простагландинів та споріднених з ними сполук (Флоренція, Італія, 1994), I Європейському фармакологічному конгресі (Мілан, Італія, 1995), Міжнародній конференції "Вітаміни і здоров'я населення Білорусі та прилеглих районів" (Гродно, Білорусь, 1995).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 39 друкованих робіт.

Структура і обсяг роботи. Дисертація подана на 279 сторінках машинописного тексту і складається зі вступу, огляду літератури (3 глави), опису методів, результатів досліджень та їх обгово-

рення (4 глави), заключної частини, висновків, списку літератури-347 робіт (з них 49 робіт вітчизняних авторів і 298 - зарубіжних). Дисертація ілюстрована 18 таблицями і 22 рисунками.

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В експериментах використовували препарати вітаміну  $D_3$ ,  $1\alpha,25$ -дигідроксивітаміну  $D_3$ ,  $1\alpha$ -гідроксивітаміну  $D_3$ ,  $24,25$ -дигідроксивітаміну  $D_3$  та  $3\beta$ -фторвітаміну  $D_3$ . Кристалічний вітамін  $D_3$  був одержаний у лабораторії хімії та технології вітамінів D (ІБОНХ НАН України). Т.пл.  $84-86^\circ C$ ,  $[\alpha]_D^{20} + 105^\circ$  (етанол), УФ-спектр (етанол):  $\lambda_{max}$  265 нм,  $\epsilon$  18 610. Використовували  $1\alpha,25(OH)_2D_3$ ,  $24,25(OH)_2D_3$  та  $1\alpha OH D_3$  (виробництво НПО "Вітаміни", Москва).  $3\beta FD_3$  синтезували за методом Яхимович Р.І. (1974, 1976)  $[\alpha]_D^{20} + 54^\circ$  (хлороформи), УФ-спектр (етанол):  $\lambda_{max}$  265 нм,  $\epsilon$  17 850.

Активність препаратів вітаміну  $D_3$  та його похідних визначали використовуючи курчат породи Хайсеко білий кросс в перший місяць їх життя, тобто у період коли їх ріст і формування скелету, які потребують вітаміну  $D_3$ , відбуваються найбільш інтенсивно. У перші 10 днів життя курчата одержували лише основний раціон, дефіцитний за вітаміном  $D_3$ . На 10-й день поголів'я курчат (1 серія дослідів) розділяли на 9 груп. Перша група (рахіт) продовжувала одержувати лише основний раціон. Птахи групи 2 одержували перорально по 10 МО вітаміну  $D_3$  на день. Раціон групи 3 не містив вітаміну  $D_3$ , а лише надлишок кальцію (2,1%) та фосфору (1,05%). Курчата групи 4 одночасно з підвищеною кількістю кальцію та фосфору отримували по 10 МО вітаміну  $D_3$  на день. П'ята група отримувала по 5000 МО вітаміну  $D_3$  на день на одне курча, а шоста - по 2 МО на день  $1\alpha,25(OH)_2D_3$ . Курчата груп 7-9 отримували препарат  $3\beta FD_3$  відповідно по 10, 100 та 500 МО на птаха на день. В 11-й серії дослідів вивчали біологічну активність  $24,25(OH)_2D_3$  та  $1\alpha OH D_3$ . Раціони курчат груп 1 і 2 були такі самі як і в 1-й серії дослі-

дів. Третя група курчат перорально отримувала  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  з розрахунку по 100 МО на птаха на день, четверта -  $\text{CaOHND}_3$  по 2,5 МО на птаха на день. Препарати вводили на протязі 20 діб. У дослідженні використовували сироватку крові, велику гомішкову кістку та її епіфізарні хрящі, слизову дванадцятипалої кишки, шкіру та паратиреоїдні залози курчат.

Вивчення антирахітичної активності вітаміну  $\text{D}_3$  та його похідних здійснювали використовуючи комплекс фізіологічних та біохімічних показників (Бауман В.К., 1989). Вміст різних фракцій холестерину в сироватці крові курчат визначали за методом Колб В.Г. (1976), що базується на реакції взаємодії реактиву, який містить сірчану, оцтову кислоти та хлорне залізо, з холестерином тієї самої проби сироватки крові при різних температурах. Вміст вільних амінокислот у сироватці крові визначали за методом Бенсон Д.В. (1974) на амінокислотному аналізаторі AAA-88I (Чехія). Вміст оксипроліну визначали за методом Зайдес А.Я. (1964). Кислоторозчинний колаген шкіри курчат одержували за методом Ореховича В.Н. (1948), що передбачає екстракцію даного білку 0,1 М цитратним буфером (рН 4,0) з наступним діалізом проти води і перекристалізацією. Фракцію кислоторозчинного колагену виділяли з кістки, подрібненої і промитої 3% розчином Трилону Б до повного видалення кальцію, екстракцією 15% оцтовою кислотою з наступним діалізом та перекристалізацією за модифікованим методом Miller B. (1967). Колаген I типу шкіри та кісток одержували за модифікованим методом Trelstad R. (1976) обробкою пепсином з наступним диференційним висолюванням різних фракцій колагену. Колаген II типу хряща одержували за методом Trelstad R. (1976) з використанням пепсину та висолювання. Чистоту одержаних фракцій колагену контролювали методом диск-електрофорезу у ПААГ (Маурер Г., 1971). Визначення вмісту вуглеводного компоненту здійснювали за методом Seifter S. (1950), використовую-

ючи антроновий реактив. Ізоелектричне фокусування колагенів проводили за методом Троїцького Г.В.(1984) у борат-поліольній системі. Електронномікроскопічні препарати, одержані за методом Кіппа К. (1966), досліджували за допомогою електронного мікроскопа JEOL JEM 100 В (Японія) та аналізатора зображення ТВАВ-2000 (Австрія) з наступною статистичною обробкою даних на комп'ютері. Біосинтез білку вивчався у системі *in vitro*, запропонованій Берман А.Е.(1972).

Статистичну обробку результатів експериментів проводили за методами, запропонованими Ойвіном І.О.(1960).

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### Вплив надлишку кальцію та речовин D-вітамінної природи на мінеральний обмін

Традиційно вітамін D<sub>3</sub> та його метаболіти розглядаються, як одні з основних регуляторів гомеостазу кальцію і фосфору в організмі, їх надходження і підтримання сталої концентрації цих іонів у сироватці крові, що необхідно для нормального функціонування всіх органів і тканин. У похідних вітаміну D<sub>3</sub> ця здатність виявляється у різній мірі.

Проведені дослідження свідчать, що вітамін D<sub>3</sub> та його похідні викликають вірогідні зміни показників антирахітичної активності у порівнянні з рахітом. Якщо при рахіті (група І) порушується обмін кальцію та фосфору, формування скелету, гіпертрофуються паратиреоїдні залози, відсутній кальційзв'язувачий білок (СаЗБ), сповільнюється ріст, то введення вітаміну D<sub>3</sub> забезпечує нормалізацію стану організму. Введення у раціон курчат надлишку кальцію і фосфору без вітаміну D<sub>3</sub> не дозволяє досягти нормалізації їх стану, тоді як навантаження кальцієм та фосфором в присутності вітаміну D<sub>3</sub> дало неоднозначні результати: при нормалізації біохімічних по-

казників сироватки крові, концентрації СаЗЕ, зольності кістки, ваги паратиреоїдних залоз, щодо приросту ваги курчат даної групи спостерігався антагонізм дії  $D_3$  і надлишку  $Ca^{2+}$ . Більшість показників у групі з гіпервітамінозом  $D_3$  (група 5) вірогідно відрізняється від обох контролів. При гіпервітамінозі відмічено вищий рівень кальцію у сироватці крові, нижчу активність лужної фосфатази, менший вміст СаЗЕ, менший приріст ваги курчат, ніж у групі 2 (10 МОД<sub>3</sub>/день). Отже гіпервітаміноз  $D_3$  і викликана ним гіперкальціємія так само, як і надлишок кальцію у комплексі з  $D_3$ , веде до погіршення показників антирахітичної активності.

Серед досліджуваних нами сполук найбільшу антирахітичну активність виявив  $1\alpha,25(OH)_2D_3$ , що містить OH-групи в С-1, С-3 та С-25 положеннях, що узгоджується з даними Каніа Ж.А. (1982). Ефект  $1\alpha OH D_3$  (25-OH група відсутня) на 20% менший, а сам вітамін  $D_3$  (без  $1\alpha OH$  та 25-OH груп) приблизно в 5 разів слабше впливає на гомеостаз кальцію, ніж  $1\alpha,25(OH)_2D_3$ .  $24,25(OH)_2D_3$  у 10 разів менш активний, ніж вітамін  $D_3$ . Антирахітична активність  $3\beta FD_3$  (не має OH-груп) була у 50 разів менша, ніж у вітаміна  $D_3$  і у 250 разів - ніж у  $1\alpha,25(OH)_2D_3$ .

Таким чином, ми встановили значення гідроксильних груп у молекулах вітаміну  $D_3$  і його похідних для виявлення ними антирахітичної активності. Відсутність  $3\beta OH$  групи має критичне значення для виявлення здатності D-вітамінних сполук до регуляції гомеостазу кальцію. Наявність 24-OH групи також знижує антирахітичну активність, що цілком узгоджується з даними літератури (Бауман В., 1989)

#### Вплив кальцію та речовин D-вітамінної природи на вміст вільних амінокислот сироватки крові

Окрім участі у підтриманні гомеостазу кальцію і фосфору та формуванні скелету,  $Ca^{2+}$  і D-вітамінні сполуки можуть впливати на процеси проліферації і диференціації клітин. Є підстави при-

пускати (Simpson R.U., 1986), що при цьому відбуваються значні зміни у процесах обміну білків у організмі. Одним з найбільш чутливих показників цих процесів є вміст вільних амінокислот сироватки (Кайнова А.С., 1974), який значною мірою відображає спектр вільних амінокислот органів та тканин.

Одержані нами результати свідчать, що зміни вмісту амінокислот після введення надлишку  $\text{Ca}^{2+}$  (без  $\text{D}_3$ ) у групі 3 більше нагадують зміни при рахіті (група 1), ніж після введення 10 МО/день  $\text{D}_3$  (група 2) (Рис. I). Ефекти вітаміну  $\text{D}_3$  та надлишку  $\text{Ca}^{2+}$  не співпадають не тільки за ступенем виявлення, але й за характером. У групі курчат, які одержували надлишок  $\text{Ca}^{2+}$  на фоні вітаміну  $\text{D}_3$  (група 4), спостерігалася вірогідна різниця з обома контролями за вмістом 4-х амінокислот, з групою 1 - 5-ти, а з групою 2 - 4-х амінокислот. Очевидно, надлишок  $\text{Ca}^{2+}$  при нормальному вмісті вітаміну  $\text{D}_3$  у раціонах викликає значні відхилення у обміні білків і амінокислот, які хоч і нагадують до деякої міри зміни при рахіті, але не тотожні їм. Вміст більшості амінокислот сироватки під впливом різних доз вітаміну  $\text{D}_3$  змінюється аналогічним чином, однак у різній мірі. Відмінності, які спостерігаються між ефектами 10 МО/день  $\text{D}_3$  та 5000 МО/день  $\text{D}_3$  можливо свідчать про те, що гіперкальціємія зачіпає і обмін амінокислот.

У двох серіях дослідів з'ясувалось (Рис. I), що ефекти самого вітаміну  $\text{D}_3$  і його гідроксипохідних на вміст вільних амінокислот сироватки крові хоч і були подібними за характером, але повністю не співпадали.  $1\alpha\text{OH}\text{D}_3$  і  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , в молекулах яких наявна  $1\alpha\text{OH}$  група, найсильніше впливали на дані показники. При цьому  $1\alpha\text{OH}\text{D}_3$  сильніше за  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  підвищував вміст незамінних амінокислот. Наявність 24-OH групи у молекулі  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  вела до незначних змін характеру ефекту даної сполуки у порівнянні з вітаміном  $\text{D}_3$ . Відсутність 3 $\beta$ -OH групи не тільки не послаблювала здатності 3 $\beta$ - $\text{D}_3$

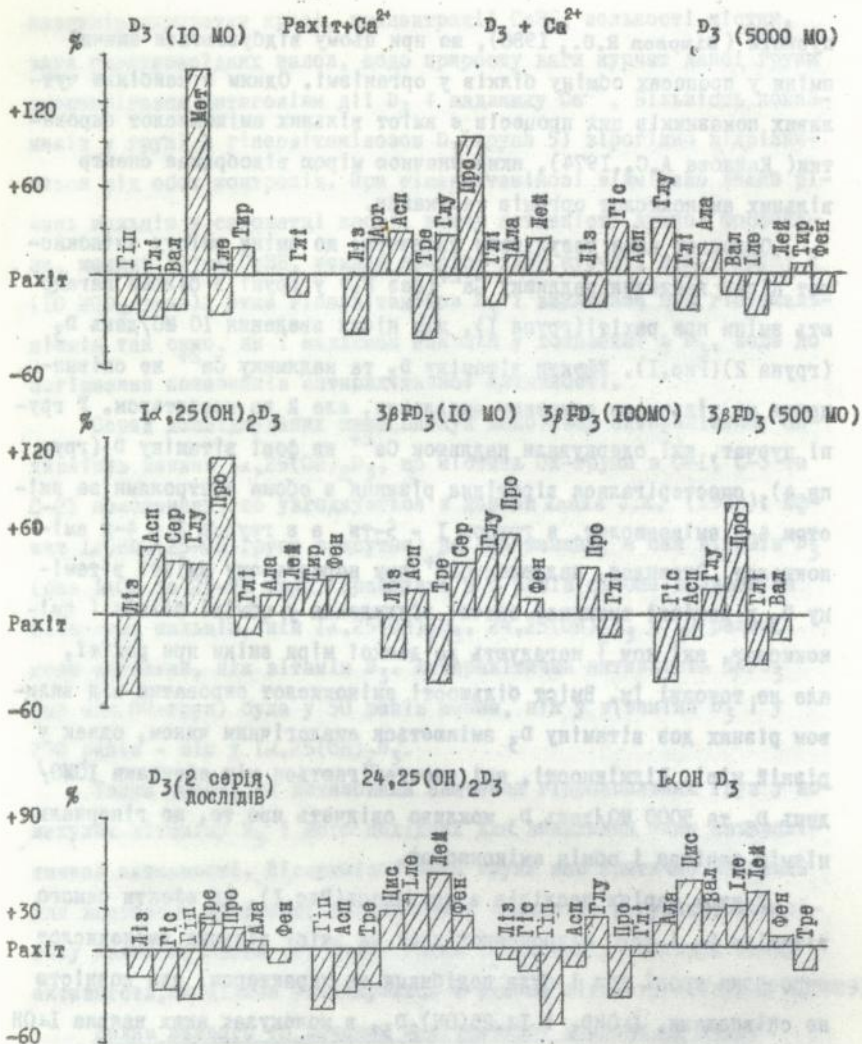


Рисунок I. Вміст вільних амінокислот у сироватці крові курчат при рахіті та введенні надлижку Ca<sup>2+</sup> і D-вітамінних сполук (p < 0,05, n = 5, різниця у % від рівня рахіту)

Гіп - гідроксипролін

впливати на вміст амінокислот, але й більше того, вплив 10 МО/день  $3\alpha\text{FD}_3$  був подібним до дії  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Із збільшенням дози такий ефект поступово послаблювався. При впливі на вміст вільних амінокислот відмічена більша подібність ефектів даних сполук у малих дозах (2-10 МО) незалежно від їх структури, ніж у ефектах різних доз однієї і тієї ж сполуки. Можливо, впливи D-вітамінних сполук на обмін амінокислот і білків реалізуються за різними механізмами в залежності від дози стероїда та його хімічної будови. Це припущення підтверджується і даними експериментів, проведених *in vitro* (Schwartz Z., 1988), в яких було показано, що відмінності в ефектах різних доз метаболітів вітаміну  $\text{D}_3$  можуть бути пов'язані з різним ступенем зайнятості специфічних рецепторів. Не виключена й можливість впливу D-вітамінних сполук на обмін амінокислот без зв'язування з рецепторами  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Boland A.R., 1992, Fawell F.N., 1989)

#### Вплив кальцію та D-вітамінних сполук на вміст холестерину у сироватці крові курчат

Проведені експерименти показали здатність досліджуваних речовин знижувати у сироватці крові вміст холестерину. Не лише вітамін  $\text{D}_3$ , але й надлишок кальцію у раціоні забезпечують вірогідне зниження вмісту вільного, етерифікованого та загального холестерину у сироватці крові курчат порівняно з їх вмістом при рахіті (Рис.2). Це може свідчити про певний вплив на обмін холестерину рівня  $\text{Ca}^{2+}$  в організмі, не залежно від шляхів його транспорту. Відзначено антагонізм дії вітаміну  $\text{D}_3$  і  $\text{Ca}^{2+}$  при одночасному їх введенні (група 4) - за вмістом етерифікованого холестерину. Введення 5000 МО/день вітаміну  $\text{D}_3$ , яке супроводжується гіперкальцемією, викликає підвищення вмісту холестерину у порівнянні з групою 2 (10 МО  $\text{D}_3$ ). Введення курчатам гіпердози вітаміну  $\text{D}_3$  викликає зниження лише вмісту вільного холестерину у порівнянні з групою I (рахіт).

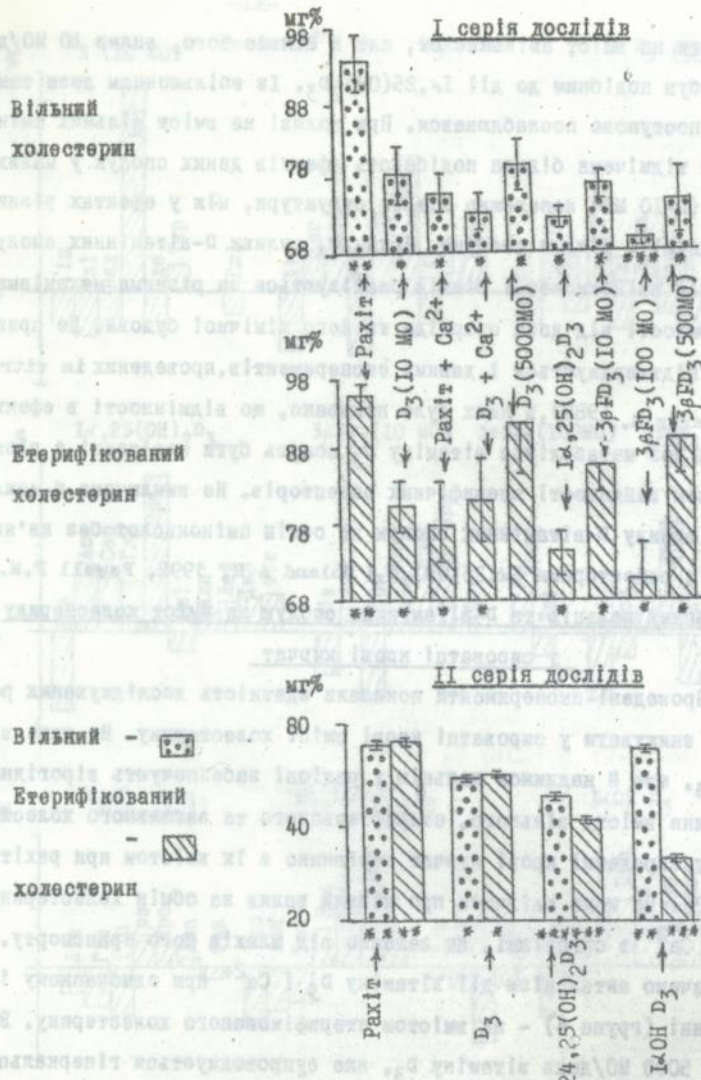


Рисунок 2. Вміст холестерину у сироватці крові курчат при рахіті та введенні надлишку Ca<sup>2+</sup> і D-вітамінних сполук (мг%, M±m, n=5)

\* - p<0,05 по відношенню до групи I(рахіт)

\*\* - p<0,05 по відношенню до групи 2(10 МО/день D<sub>3</sub>)

Усі похідні вітаміну  $D_3$  викликали зниження вмісту різних фракцій холестерину у сироватці крові порівняно з рахітом. При цьому  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  викликав вірогідне зниження вмісту загального холестерину не тільки у порівнянні з групою I, але й з групою 2. Відсутність 25-OH групи у молекулі  $1\alpha OH D_3$  вела до підвищення здатності даної сполуки зменшувати вміст етерифікованого холестерину при одночасному послабленні його впливу на концентрацію вільного холестерину. Наявність OH-груп в C-24 та C-25 положеннях  $24,25(OH)_2 = D_3$  приводила до посилення ефекту даного похідного вітаміну  $D_3$  приблизно однаково на вміст усіх фракцій холестерину у порівнянні з вітаміном  $D_3$  та  $1\alpha,25(OH)_2D_3$ . Заміна  $3\beta OH$  групи на атом фтору в  $3\beta FD_3$  не послаблює здатності даної сполуки знижувати вміст вільного та загального холестерину. Такий незначний вплив відсутності  $3\beta OH$  групи на виявлення ефекту  $3\beta FD_3$  на вміст холестерину (як і на вміст вільних амінокислот сироватки), може свідчити про здатність похідних вітаміну  $D_3$  впливати на дані показники шляхом, відмінним від механізму їх дії на гомеостаз кальцію. У протилежному випадку ефекти  $3\beta FD_3$  (особливо у мінімальній дозі) та  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  навряд чи були б співставимі. Цей висновок узгоджується з результатами експериментів *in vitro* (Gupta A., 1989), які виявили здатність похідних вітаміну  $D_3$  впливати на біосинтез холестерину за ліпономним шляхом, не опосередкованим синтезом білків.

Вплив кальцію та сполук D-вітамінної природи на сполучну тканину

Для нормального проходження процесів мінералізації в організмі визначальними є і концентрація кальцію та фосфору у плазмі крові, і стан органічного матриксу, який несе на собі кристали гідроксиапатиту. Основу його складають колагени у комплексі з глікопротеїдами. До недавнього часу увага дослідників була спрямована на здатність D-вітамінних сполук впливати на кількісні показники біо-

синтезу колагенів в організмі (Волков Г.Л., 1977). Проте якісні зміни у структурі цих білків адатні не тільки змінювати хід мінералізації скелету, але й впливати на процеси ембріогенезу, морфогенезу, цитодиференціювання (Лебедев Д.О., 1979, Green J., 1995). Цим зумовлений особливий інтерес до вивчення ефектів екзогенного кальцію та D-вітамінних сполук на якісні зміни у колагенах кістки, шкіри та хряща курчат.

Спочатку нами було досліджено вплив даних речовин на амінокислотний склад колагенів I та II типів і кислоторозчинних колагенових комплексів з глікопротеїдами. Показано, що саме колагени найбільш чутливі до їх дії. Зміни у кислоторозчинних колагенах I колагенах I типу кістки та шкіри були подібними за характером.

При аналізі характеру змін у амінокислотному складі колагенів I типу кісток видно, що під впливом всіх досліджуваних D-вітамінних сполук, крім  $1\alpha\text{OH}\text{D}_3$ , синтезується колаген, який менш жорстко зшитий (зменшення вмісту Гіл, Діа, Гіс) та має більш правильну спіраль молекули (збільшення вмісту Гіп, Про, Глі), ніж колаген за умов рахіту.

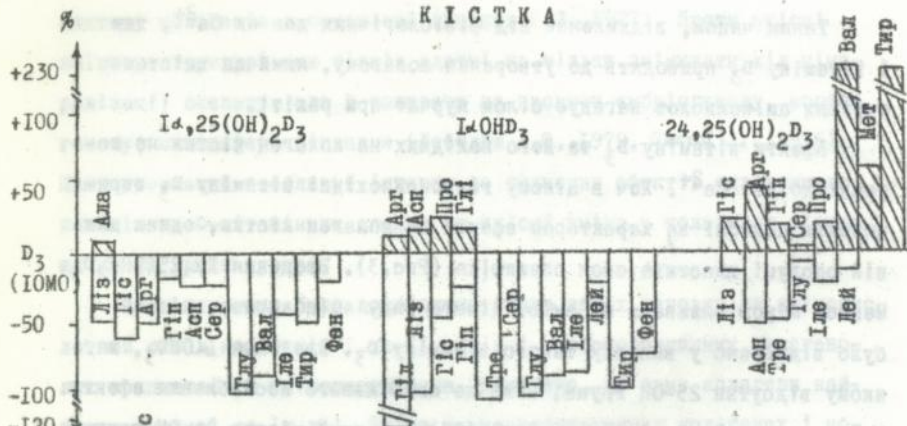
До певної міри подібний ефект на колаген I типу спричинявало і введення надлишку  $\text{Ca}^{2+}$  у присутності вітаміну  $\text{D}_3$ . Однак синергізм їх дії на вміст ряду амінокислот при цьому відсутній. При введенні навантаження  $\text{Ca}^{2+}$  без вітаміну  $\text{D}_3$  у амінокислотному складі колагену I типу кістки курчат відбуваються зміни, що можуть привести до підвищення ступеню жорсткості спіралі молекули (що відмічено і при рахіті), кількості міжмолекулярних зшивок. Подібні зміни мають місце і при  $\text{D}_3$ -гіпервітамінозі (група 5), на що вказує зростання у порівнянні з групою 2 (10 МО/день  $\text{D}_3$ ) у амінокислотному складі колагену даної групи вмісту Гіл, Про, Ала та Гле. При впливі на вміст окремих амінокислот відмічена не лише пряма, але й зворотня залежність ефекту вітаміну  $\text{D}_3$  від його дози.

Таким чином, відхилення від фізіологічних доз як  $\text{Ca}^{2+}$ , так і вітаміну  $\text{D}_3$  приводять до утворення колагену, який за вмістом окремих амінокислот нагадує білок курчат при рахіті.

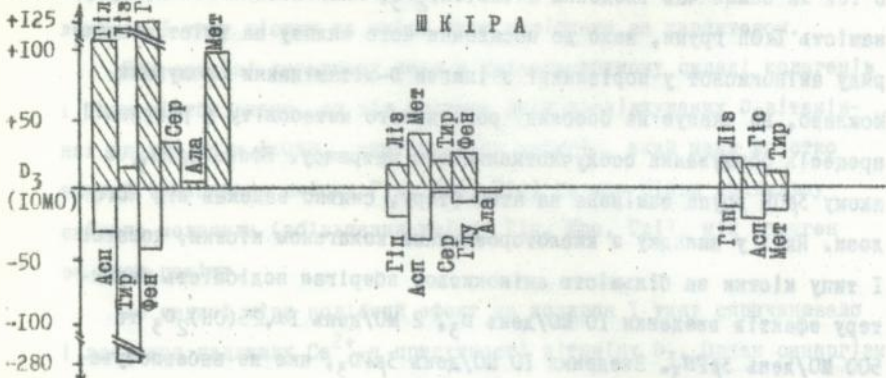
Ефекти вітаміну  $\text{D}_3$  та його похідних на колаген кістки не тождісні до дії  $\text{Ca}^{2+}$ . Хоч в цілому гідроксипохідні вітаміну  $\text{D}_3$  спричиняють подібні за характером ефекти на колаген кістки, однак кожній ополуці властива своя специфіка (Рис.3). Введення  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  меншою мірою впливало на вміст цілого ряду амінокислот, ніж це було відмічено у випадку самого вітаміну  $\text{D}_3$ . Введення  $1\alpha\text{OHD}_3$ , в якому відсутня 25-OH група, вело до ще більшого послаблення ефекту. В той же самий час введення  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , який містив 24-OH групу замість  $1\alpha\text{OH}$  групи, вело до посилення його впливу на вміст цілого ряду амінокислот у порівнянні з іншими D-вітамінними ополуками. Можливо, це вказує на особливу роль даного метаболіту у регуляції процесів формування сполучнотканинного матриксу. Ефект  $3\beta\text{FD}_3$ , в якому  $3\beta\text{OH}$  група замінена на атом фтору, сильно відрізнявся від його дози. Як і у випадку з кислоторозчинним колагеном кістки, колаген I типу кістки за більшістю амінокислот зберігає подібність характеру ефектів введення 10 МО/день  $\text{D}_3$ , 2 МО/день  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  та 500 МО/день  $3\beta\text{FD}_3$ . Введення 10 МО/день  $3\beta\text{FD}_3$ , яке не забезпечувало вилікування рахіту, вело до утворення колагену з підвищенням у порівнянні з групою 2 (10 МО  $\text{D}_3$ ) вмістом Ліз, Гіс, Ала, Іле, зниженням вмістом Про. Такі зміни можуть привести до збільшення ступеню жорсткості колагенових структур та підвищення жорсткості спіралі молекули (Ramachandran G., 1976). Їх можна розглядати, як компенсаторну реакцію організму на недостатню мінералізацію кісток та зниження, внаслідок цього, їх механічної міцності. Зі збільшенням дози  $3\beta\text{FD}_3$  такий ефект стає менш вираженим.

Амінокислотний склад колагену хряща курчат з нормальним забезпеченням вітаміном  $\text{D}_3$  (група 2) вірогідно відрізняється від

КІСТКА



ШКІРА



ХРЯЩ



Рисунок 3. Амінокислотний склад колагенів при введенні D-вітамінних ополук ( $p < 0,05, n = 5$ ; різниця у % від рівня у групі з введенням 10 МО вітаміну D<sub>3</sub>/день)

Гіс - гідроксилізин, Гіп - гідроксипролін

складу колагену хряща при рахиті (група I) у першій серії дослідів лише за меншим вмістом Іле. Відмічена також тенденція до зниження вмісту Ліз, Гіс, Гіп, Про та зростання - Глі. У другій серії дослідів ці зміни досягали вірогідного рівня.

Введення надлишку  $\text{Ca}^{2+}$  (без  $\text{D}_3$ ) викликає у амінокислотному складі колагену хряща зміни, що можуть привести до утворення менш зшитого колагену, але з більш жорсткою спіраллю молекули, ніж у групі 2 (зростання вмісту Ала і зниження - Гіп, Гіс). Одночасна дія вітаміну  $\text{D}_3$  і надлишку  $\text{Ca}^{2+}$  не веде до простого сумування їх впливу на амінокислотний склад колагену хряща курчат. Більше того, є підстави припустити наявність взаємного пригнічення їх ефектів на вміст Ліз, Гіп, Глу, Глі, Ала, Вал, Іле, Тир.

Амінокислотний склад колагену хряща при  $\text{D}_3$ -гіпервітамінозі менш відрізняється від складу даного білку в групі 2 (вірогідна різниця за вмістом 2-х амінокислот), ніж у групі I (вірогідна різниця за вмістом 10-ти амінокислот). Білок, що синтезується при введенні надлишку вітаміну  $\text{D}_3$  утворює менше зшивок (зниження вмісту Гіп, Ліз), але відрізняється більшою жорсткістю колагенової спіралі (підвищення вмісту Ала, Гіп, Тир), ніж білок у групі 2, що відмічалось і у колагені кістки.

Вітамін  $\text{D}_3$  та його похідні спричиняють подібні за характером впливи на колаген хряща і кістки (Рис.3). Однак у колагені хряща введення  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  сильніше, ніж введення вітаміну  $\text{D}_3$ , впливало на вміст Гіп, який бере участь в утворенні міжмолекулярних зшивок, Про, який впливає на форму колагенової спіралі, та Сер. На відміну від нього введення  $1\alpha\text{OHD}_3$  слабше, ніж введення вітаміну  $\text{D}_3$ , діє на вміст амінокислот, що беруть участь в утворенні міжмолекулярних зшивок, а введення  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  не відрізняється вірогідно від дії вітаміну  $\text{D}_3$ . Вплив  $3\alpha\text{FD}_3$  у колагені хряща, як і у колагені кістки, залежав від дози фторованого похідного. Введення птахам

500 МО/день  $3\alpha\text{FD}_3$  викликає ефект подібний за характером до дії вітаміну  $\text{D}_3$  та його гідроксипохідних. Введення 10 МО/день  $3\alpha\text{FD}_3$  викликало у колагені хряща, як і у колагені кістки, збільшення вмісту Гіл, Ліз, Гіс порівняно з групою 2.

Встановлена своєрідність ефектів D-вітамінних сполук, можливо, обумовлена їх дією на біосинтез колагенів за різними механізмами, що передбачають зв'язування стероїдів зі специфічними рецепторами  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  або  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Наявність таких рецепторів у клітинах кістки і хряща встановлена рядом дослідників (Бауман В., 1989). Наші припущення підтверджуються і більш пізніми дослідженнями Lichtler A. (1990), який в експериментах *in vitro* показав наявність в складі генів колагенів промоторних ділянок, з якими зв'язуються рецептори D-вітамінних сполук. Ефект  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , який є найбільш виявленим, можливо, вказує на провідну роль даного метаболіту при формуванні сполучної тканини. Це підтверджується даними, отриманими *in vitro* Boyan B. (1988), де було встановлено важливу роль цієї сполуки у регуляції диференціації хондроцитів у культурі клітин. Дію самого вітаміну D на колагени можна розглядати, як суму ефектів усіх його метаболітів. При цьому не можна виключити також наявності певних особливостей при сумісному і роздільному їх надходженні до організму. В цілому менша участь колагену хряща, ніж колагену кістки, в формуванні та мінералізації скелету супроводжується меншою подібністю характерів впливу D-вітамінних сполук на амінокислотний склад білків.

Введення надлишку  $\text{Ca}^{2+}$  і речовин D-вітамінної природи на колаген шкіри впливає інакше, ніж на колагени, що беруть участь у формуванні скелету. У птахів, які одержували 10 МО/день вітаміну  $\text{D}_3$  колаген I типу шкіри відрізняється від цього білку курчат при рахті за співвідношенням зшивок різних типів і за меншою жорсткістю колагенової спіралі у обох серіях дослідів.

Своєрідність впливу введення надлишку  $\text{Ca}^{2+}$  без вітаміну  $\text{D}_3$  на колаген I типу шкіри більш виявлена. В цілому за своїм амінокислотним складом колаген даної групи є більш подібним до білку рахітичних курчат. Ефекти  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{D}_3$  далеко не тотожні за характером. Сумісне введення надлишку  $\text{Ca}^{2+}$  та вітаміну  $\text{D}_3$  веде до утворення колагену, можливо, менш шитого (вірогідне зниження Гіл), а менш жорсткою спіраллю молекули (зниження Ала, Мет, Лей, Тир), ніж при рахіті. Не лише в колагені кісток, але й в колагені шкіри дія надлишку  $\text{Ca}^{2+}$  і вітаміну  $\text{D}_3$  не є простою сумою їх ефектів. За впливом на вміст Гіс, Арг, Асп, Глу, Мет, Тир, Фен відмічається антагонізм при сумісному введенні  $\text{Ca}^{2+}$  і вітаміну  $\text{D}_3$ .

Характер впливу надлишку вітаміну  $\text{D}_3$  на колаген I типу шкіри (як і кістки) подібний до ефекту 10 МО/день вітаміну  $\text{D}_3$ . Синтезований при  $\text{D}_3$ -гіпервітамінозі колаген I типу шкіри відрізняється від білку курчат групи 2, можливо, меншим ступенем шитості колагенових молекул (зниження вмісту Гіл, Ліз, Гіс) і більшою жорсткістю самої спіралі молекули (збільшення вмісту Гіп, Ала, Іле).

Характери ефектів вітаміну та його гідроксипохідних на вміст амінокислот у колагені I типу шкіри були подібні для більшості амінокислот. Але введення  $1\alpha\text{OH}\text{D}_3$ , у якому відсутня 25-OH група, викликало найменш виражений серед D-вітамінних сполук вплив на вміст амінокислот у шкірі. Наявність трьох OH-груп у молекулі  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  позначається на сильнішому впливі цієї сполуки на колаген шкіри. Ефект  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , що також містив три OH-групи в положеннях C-24, C-25 і C-3, менше, ніж ефект  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , відрізнявся від дії самого вітаміну. Щодо  $3\beta\text{D}_3$ , позбавленого OH-груп, то нами був відмічений парадоксальний ефект його максимальної дози (500 МО/день) у колагені шкіри. У цьому випадку колаген більше нагадував цей білок птахів при рахіті, тоді як вплив 100 МО/день  $3\beta\text{D}_3$  менше відрізнявся від дії 10 МО/день вітаміну  $\text{D}_3$ .

Аналіз цих змін у амінокислотному складі колагену шкіри дозволяє припустити наявність кількох механізмів дії досліджуваних речовин. Розбіжність характерів дії надлишку  $\text{Ca}^{2+}$  і вітаміну  $\text{D}_3$  і, навіть, антагонізм їх дії у окремих випадках, вказує на те, що вплив D-вітамінних речовин на колагени, напевно, не повністю опосередкований лише змінами в обміні  $\text{Ca}^{2+}$  у організмі. Більш сильний вплив  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  на колаген шкіри у порівнянні з вітаміном  $\text{D}_3$  і деякі особливості його ефекту, можливо, пояснюються наявністю у фібробластах специфічного рецептору  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Речовини D-вітамінної природи, відмінні від цієї сполуки за структурою, зв'язуються з цим рецептором значно слабше. Їх ефекти менш виражені, хоч і подібні за характером. Не можна також виключити і дії  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  за механізмом, що передбачає зв'язування цієї сполуки з її специфічним рецептором, як це, ймовірно, відбувається у випадку колагенів кістки і хряща. Парадоксальний ефект  $3\beta\text{FD}_3$  може бути результатом сумування його впливів на колаген з використанням різних механізмів.

Фібрили колагену, які в комплексі з глікопротеїнами і глікозаміногліканами складають основу органічного матриксу, здатні відігравати роль каталізаторів в утворенні кісткового мінералу. При цьому поверхневий заряд фібрили, напевно, впливає на первинне акумулювання йонів кальцію на початкових стадіях кальцифікації кістки. До того ж встановлено, що колагенові структури служать орієнтиром для клітин і своєрідним "тригерним механізмом", який можливо, безпосередньо впливає на обмінні процеси в організмі, в тому числі на обмін кальцію та вітаміну  $\text{D}_3$ . Важливе значення при цьому має поверхневий заряд, який несуть колагенові структури.

Колаген I типу кісток виявляється під час ізофокусування у вигляді двох піків, основний з яких локалізований у межах pH

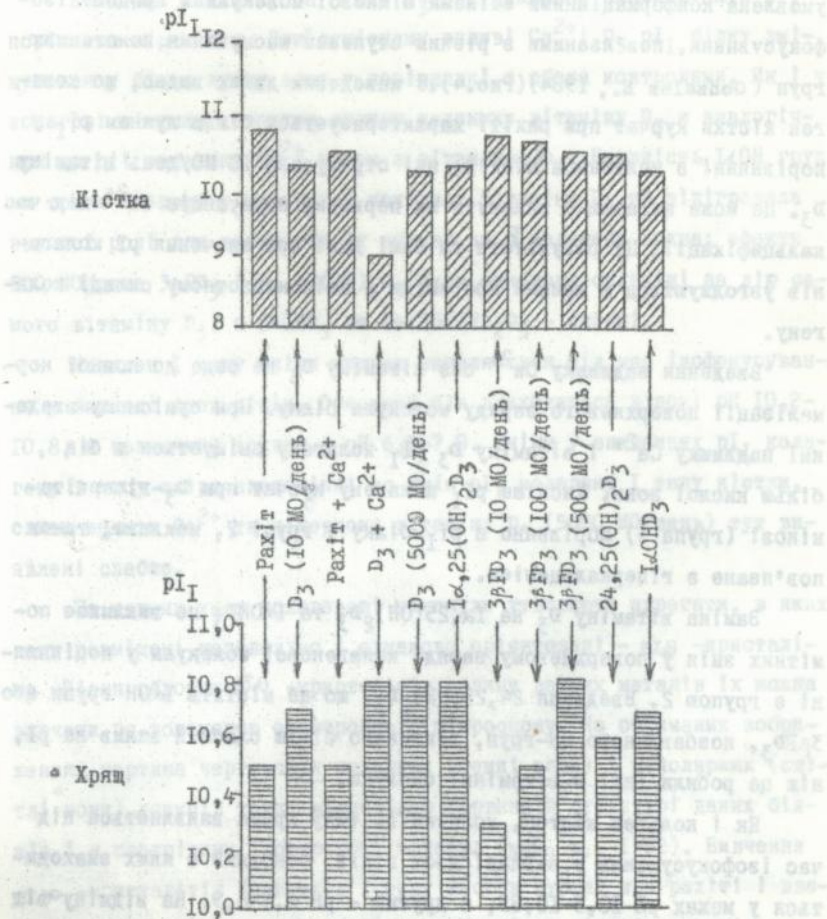


Рисунок 4. Ізоелектричні точки колагенів I та II типів при рахіті та введенні надлишку Ca<sup>2+</sup> і D-вітамінних сполук

9,0-10,8, а другий - рН 6,4-6,9. Поява другого піку, можливо, обумовлена конформаційними змінами білкової молекули в процесі ізофокусування, пов'язаними з різним ступенем маскування йоногенних груп (Gonzalez E., 1984) (Рис.4). З наведених даних видно, що колаген кістки курчат при рахіті характеризується більш лужним рІ<sub>I</sub> у порівнянні з колагеном птахів, які отримували 10 МО/день вітаміну D<sub>3</sub>. Це може негативно вплинути на первинну акумуляцію Ca<sup>2+</sup> під час кальцифікації. Ці результати та інші дані про значення рІ колагенів узгоджуються з даними про зміни в амінокислотному складі колагену.

Введення надлишку Ca<sup>2+</sup> без вітаміну D<sub>3</sub> не веде до повної нормалізації поверхневого заряду молекули білку. При сумісному введенні надлишку Ca<sup>2+</sup> і вітаміну D<sub>3</sub> рІ<sub>I</sub> колагену зміщується в бік більш кислої зони. Кисліше рІ<sub>I</sub> колагену курчат при D<sub>3</sub>-гіпервітамініозі (група 5) порівняно з рІ<sub>I</sub> білку у групі 2, можливо, також пов'язане з гіперкальцемією.

Заміна вітаміну D<sub>3</sub> на Iα,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> та IαOND<sub>3</sub> не викликає помітних змін у поверхневому заряді колагенової молекули у порівнянні з групою 2. Введення 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, що не містить IαОН групи або 3βFD<sub>3</sub>, позбавленого ОН-груп, викликало більш слабкий вплив на рІ, ніж це робили інші D-вітамінні сполуки.

Як і колаген кісток, колаген II типу хряща виявляється під час ізофокусування у вигляді двох піків, основний з яких знаходиться у межах рН 10,3-10,85, а другий - рН 6,4-6,9. На відміну від колагену кісток, тут рІ<sub>I</sub> білку курчат при рахіті дещо зміщений в бік більш кислої зони, що може розглядатись як компенсаторна реакція організму на нестачу Ca<sup>2+</sup>. Більш кислий заряд молекули може сприяти первинній акумуляції Ca<sup>2+</sup> на фібрилі колагену. Враховуючи, що при рахіті спостерігається сповільнений розвиток скелету і порушене формування нормальної кісткової тканини, став зро -

зумілов наявність таких змін саме у колагені II типу хряща.

Введення надлишку  $\text{Ca}^{2+}$  (без  $\text{D}_3$ ) не викликає значних змін  $\text{pI}_I$  порівняно з рахітом. При сумісному впливі  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{D}_3$   $\text{pI}_I$  білку зміщується у більш лужну зону у порівнянні з обома контролями. Як і у колагені кістки, характер впливу надлишку вітаміну  $\text{D}_3$  є аналогічним до дії надлишку  $\text{Ca}^{2+}$  разом з вітаміном  $\text{D}_3$ . Наявність  $\text{L}\alpha\text{OH}$  груп чи трьох  $\text{OH}$ -груп у молекулах похідних вітаміну  $\text{D}_3$  не відіграла значної ролі для виявлення їх впливу на  $\text{pI}$  колагену хряща: ефекти  $500 \text{ MO/день } 3\beta\text{D}_3$  і  $\text{I}\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  були однаково сильніші за дію самого вітаміну  $\text{D}_3$ , а  $\text{I}\alpha\text{OHD}_3$  та  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  - слабші.

Колаген I типу шкіри курчат виявляється під час ізофокусування у вигляді двох піків. Основний пік знаходиться в зоні  $\text{pH } 10,2-10,8$ , а незначний другий -  $\text{pH } 6,2-7,0$ . Зміни у значеннях  $\text{pI}_I$  колагену I типу шкіри аналогічні до змін  $\text{pI}_I$  колагену I типу кістки, однак ефекти  $\text{Ca}^{2+}$  та гіпердози вітаміну  $\text{D}_3$  (5000  $\text{MO/день}$ ) тут виявлені слабше.

За певних умов колагенові молекули утворюють агрегати, в яких вони розміщені паралельно і однаково орієнтовані - SLS -кристали-ти. Після обробки SLS -кристалітів солями важких металів їх можна вивчати за допомогою електронного мікроскопу. На отриманих зображеннях картина чергування полярних (темні зони) і неполярних (світлі зони) локусів точно відповідає первинній структурі даних білків і є своєрідним "портретом" молекул (Kuhn K., 1982). Вивчення SLS -кристалітів колагенів I типу кістки курчат при рахіті і введенні D-вітамінних сполук показало наявність вірогідних змін у розміщенні полярних і неполярних зон вздовж молекул білків усіх груп. При цьому слід зазначити, що кількість зон і довжина молекул залишались незмінними. У колагені кістки курчат при рахіті (порівняно із білком курчат, яким вводили по 10  $\text{MO}$  вітаміну  $\text{D}_3$  на день) спостерігається віддалення від N-кінця молекули і розши-

Відстань від N-кінця,

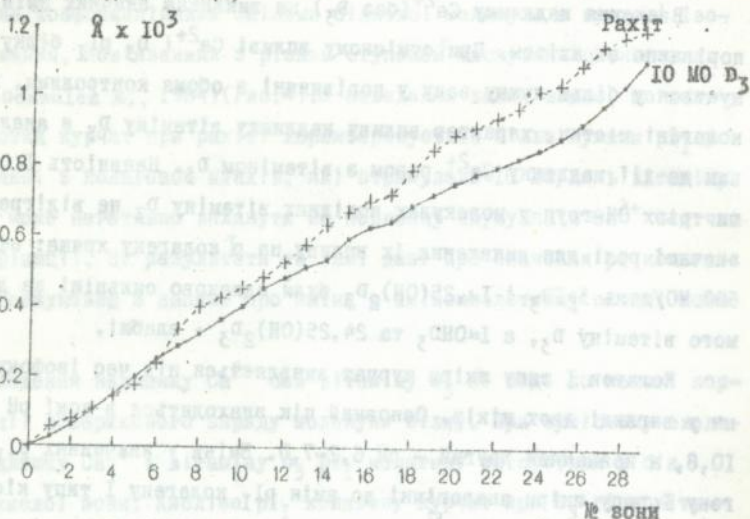


Рисунок 5. Локалізація полярних зон у молекулі колагену

I типу кістки при рахіті і введенні 10 МО/день вітаміну  $D_3$  (вірогідні зміни,  $n=3$ )

рення неполярних зон № 7,8,12-14,16-28,37-38 та 8,9,13-14,16-28, 37-38 полярних зон (Рис.5). Більшість змін виявлені ближче до N-кінця молекули, при цьому вони згруповані у новні локуси. Це може бути обумовлене змінами у характері розміщення полярних і неполярних амінокислот вздовж колагенової молекули при рахіті, а також змінами у геометрії самої спіралі молекули, адже на смугастість SLS-кристалітів впливає не тільки порядок розміщення певних амінокислот у поліпептидному ланцюгу, але й наявність взаємодії між сусідніми амінокислотними залишками (з протилежними зарядами) або те, чи спрямовані їх бічні ланцюги до центральної осі спіралі, чи назовні. Отримані результати узгоджуються з даними амінокислотного аналізу, які свідчать про збільшення вмісту Ліз, Арг, Вал, Лей, Іле, Мет, Фен та Тир, і слугують це одним

Підтвердженням змін у геометрії самої колагенової спіралі при рахиті. Як і при вивченні амінокислотного складу, дослідження SDS-кристалітів колагену кістки курчат, що отримували 500 МО/день  $3\alpha\text{F}_2\text{D}_3$ , виявило вірогідні відмінності Іх від обох контролів. Встановлені зміни групуються у трьох локусах: I - у I-5 неполярних та I-6 полярних зонах; II - у 2I-27 неполярних та 22-28 полярних; III - у 36-38 неполярних та 36-38 полярних зонах. При цьому вірогідні відмінності від групи 2 спостерігаються у I - III, а від групи I - тільки у I локусі.

У кристалітах колагенів I типу шкіри, як і в кістці, більшість змін при рахиті порівняно з групою 2 (10 МО/день  $\text{D}_3$ ) розміщена ближче до N-кінця молекули. Однак у даному випадку спостерігається звуження і наближення до N-кінця молекули неполярних зон №2-29 та полярних - №I-30. Ближче до N-кінця молекули виявляються і зміни у кристалітах колагенів шкіри курчат, що отримували 500 МО/день  $3\alpha\text{F}_2\text{D}_3$ . Як і у кістці, кількість вірогідних відмін від групи 2 переважає. Однак за характером розміщення смуг дані кристаліти займають проміжне положення між обома контролями. Отримані дані поряд з даними амінокислотного аналізу свідчать про зміни у структурі молекули і характері згортання спіралі колагену.

Кристаліти колагенів II типу хряща у порівнянні з кристалітами колагенів I типу характеризуються більшою довжиною молекули. На відміну від кристалітів колагенів кістки та шкіри, тут у кристалітах білку птахів при рахиті більшість відмінностей від групи 2 виявляється ближче до C-кінця молекули, за винятком змін у розташуванні неполярних і полярних зон №2-9. Як і у випадку колагенів шкіри, при цьому спостерігається звуження зон і деяке вкорочення самої молекули, що, можливо, є наслідком підвищення ступеню згортання колагенової спіралі і зміни орієнтації бічних радикалів амінокислотних залишків. Характер розміщення смуг у кристалі-

тах колагенів хряща курчат, що отримували 500 МО/день  $3\beta\text{FD}_3$ , значно менше відрізняється від групи 2, ніж це було відзначено у цих білках кістки та шкіри.

Таким чином, у ході проведених експериментів виявлена здатність ополук D-вітамінної природи впливати на розміщення полярних і неполярних локусів у молекулах колагенів, що може позначитись на здатності даних молекул до агрегації і формування фібрил, а також на ході їх транспорту з клітин до міжклітинного простору.

Механізми впливу речовин D-вітамінної природи на обмін білків в організмі постійно знаходяться у центрі уваги дослідників. Вже не викликає сумніву, що  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  та  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  виступають як регулятори транскрипції цілого ряду білків, у тому числі і сполучнотканинних, шляхом, опосередкованим утворенням комплексів зі специфічними рецепторами. Крім того, дані літератури (Yamaguchi M., 1989) та проведені нами дослідження впливу  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  на біосинтез білку у безклітинній системі *in vitro* свідчать, що дана сполука здатна впливати на цей процес не тільки на рівні транскрипції, а й на рівні трансляції. Одержані дані вказують на те, що цей метаболіт вітаміну  $\text{D}_3$  стимулює на 60% включення  $^{14}\text{C}$ -валіну до складу білків, що синтезуються. Ці дані узгоджуються з результатами Yamaguchi M. (1989), який показав здатність  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  стимулювати включення  $^3\text{H}$ -лейцину до білків, що синтезувалися у культурі клітин кісткової тканини.

Речовини D-вітамінної природи впливають також на посттрансляційну модифікацію молекул білків, зокрема, на ферментативне приєднання до них молекул вуглеводів. Проведене нами дослідження впливу надлишку кальцію та речовин D-вітамінної природи на вміст вуглеводного компоненту колагенів кісток, шкіри та хряща курчат показало, що при рахіті вірогідно знижується вміст вугле-

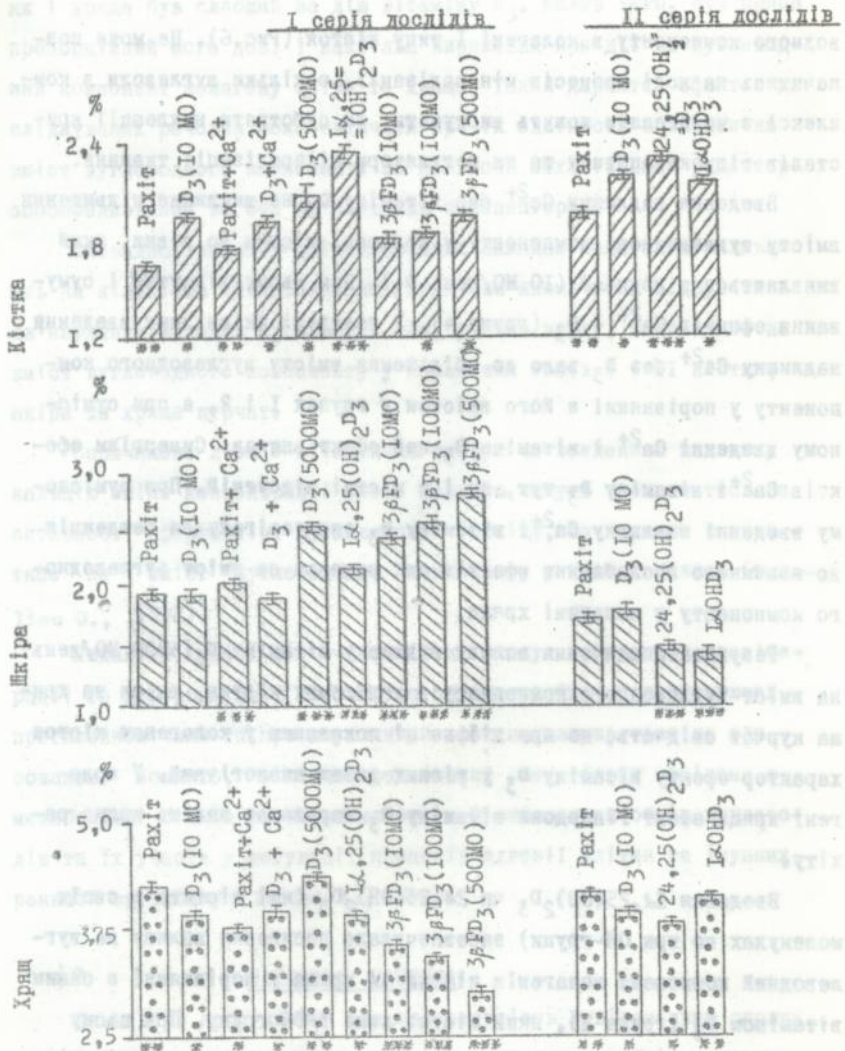


Рисунок 6. Вміст (%) вуглеводного компоненту у collagenі при рахіті та введенні надлишку Ca<sup>2+</sup> і D-вітамінних сполук ( M ± m, n = 5 ).

\* - p < 0,05 по відношенню до групи I (рахіт)

\*\* - p < 0,05 по відношенню до групи 2 (10 MO/день D<sub>3</sub>)

водного компоненту в колагені I типу кісток (Рис.6). Це може позначитись на ході процесів мінералізації, оскільки вуглеводи в комплексі з колагенами можуть виступати, як субстрати нуклеації кристалів гідроксиапатиту та як регулятори мінералізації тканини.

Введення надлишку  $\text{Ca}^{2+}$  без вітаміну  $\text{D}_3$  не викликає підвищення вмісту вуглеводного компоненту у колагені кістки до рівня, який виявляється в групі 2 (10 МО/день  $\text{D}_3$ ). При цьому відсутнє і сумування ефектів  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{D}_3$  (група 4). У колагені шкіри лише введення надлишку  $\text{Ca}^{2+}$  без  $\text{D}_3$  вело до збільшення вмісту вуглеводного компоненту у порівнянні з його вмістом у групах 1 і 2, а при сумісному введенні  $\text{Ca}^{2+}$  і вітаміну  $\text{D}_3$  цей ефект зникав. Синергізм ефектів  $\text{Ca}^{2+}$  і вітаміну  $\text{D}_3$  тут, як і в кістці відсутній. При сумісному введенні надлишку  $\text{Ca}^{2+}$  і вітаміну  $\text{D}_3$  спостерігається тенденція до взаємного послаблення ефектів цих речовин на вміст вуглеводного компоненту у колагені хряща.

Результати вивчення впливу надлишку вітаміну  $\text{D}_3$  (5000 МО/день) на вміст вуглеводного компоненту в колагенах кістки, шкіри та хряща курчат свідчать, що при дії на ці показники у колагенах кістки характер ефекту вітаміну  $\text{D}_3$  у різних дозах аналогічний. У колагені хряща ефект гіпердозы вітаміну  $\text{D}_3$  переважає навіть вплив рахіту.

Введення  $\text{1},25(\text{OH})_2\text{D}_3$  чи  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (які містять у своїх молекулах по три OH-групи) забезпечувало посилення впливу на вуглеводний компонент колагенів кістки чи хряща у порівнянні з самим вітаміном  $\text{D}_3$  (група 2), який містив лише  $3\text{OH}$  групи. При цьому  $\text{1},25(\text{OH})_2\text{D}_3$  сильніше впливав на вуглеводний компонент у кістці, а  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  - у хрящі, що цілком узгоджується з даними літератури (Возуа В., 1988) про особливу роль  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  у регуляції функціонування хондроцитів у культурі клітин. Ефект  $\text{1},25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (без  $25\text{-OH}$  групи) на вміст вуглеводного компоненту у колагенах кіст-

ки і хряща був слабший за дію вітаміну D<sub>3</sub>. Вплив 3 $\alpha$ FD<sub>3</sub> був прямо пропорційний його дозі і найбільш виражений при дії на вуглеводний компонент колагену шкіри та хряща. Такий характер ефектів досліджуваних речовин може свідчити про їх здатність впливати на вміст вуглеводного компоненту за кількома механізмами: рецепторопосередкованим та без зв'язування з рецептором.

Очевидно, зміни у амінокислотних складах колагенів впливають на кількість функціональних груп, за якими може відбуватись зв'язування молекул вуглеводів. Це, у свою чергу, впливатиме на вміст вуглеводного компоненту у колагенах типів I і II кістки, шкіри та хряща курчат.

Спричинені дією D-вітамінних сполук чи введенням надлишку кальцію зміни концентрації йонів кальцію можуть позначитись на активності ферментів вуглеводного обміну, що також впливатиме на вміст вуглеводного компоненту у даних білках (Beaulieu G., 1992).

Механізм прямої дії D-вітамінних сполук на процеси проліферації та диференціації клітин, що обумовлює їх імуномодулюючий, протилейкемічний та протипухлинний ефекти, залишається не з'ясованим. Можливо, він опосередкований не тільки змінами в метаболізмі білків та амінокислот, а й впливом на обмін вуглеводів та їх участь у регуляції процесів адгезії клітин та імунних реакцій організму (Berdal A., 1992).

#### ЗАКЛЮЧНА ЧАСТИНА

Проведені дослідження виявили здатність D-вітамінних сполук, окрім підтримання гомеостазу кальцію, регулювати обмін речовин в організмі, впливаючи на метаболізм амінокислот, білків, ліпідів та вуглеводів.

Вплив на гомеостаз кальцію D-вітамінними сполуками реалізу-

ється за допомогою рецептор-опосередкованого механізму, що передбачає біосинтез кальційзв'язуючого білку та інтенсифікацію активного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  до клітин організму. При цьому антирахітична активність досліджуваних речовин безпосередньо залежить від того, наскільки специфічно вони зв'язуються з цитозольним рецептором  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Наявність трьох гідроксильних груп в положеннях С-1, С-3 та С-25 молекули D-вітамінної сполуки забезпечує найвищу антирахітичну активність, а відсутність усіх цих груп - найнижчу.

Показано, що антирахітична активність не корелює у повній мірі з іншими біологічними ефектами даних речовин.

Відмінності у характерах ефектів  $\text{Ca}^{2+}$  і D-вітамінних сполук та подібність впливів 2 МО/день  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (з високою антирахітичною активністю) та 10 МО/день  $3\alpha\text{PD}_3$  (з низькою антирахітичною активністю) на вміст вільних амінокислот у сироватці крові вказують на можливість існування не лише рецептор-опосередкованого, але й неопосередкованого зв'язуванням з рецептором механізмів дії. Характер ефекту  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , можливо, обумовлений різною ефективністю зв'язування даної сполуки з рецептором  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  та своїм специфічним рецептором (Бауман В., 1989). Дані літератури (Boland A., 1992) і наші експерименти свідчать, що D-вітамінні сполуки можуть впливати на процеси трансляції та функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів і без зв'язування з рецептором. У свою чергу зміни концентрації йонів кальцію позначаються на перебігу процесів біосинтезу білків (Orrenius S., 1991) та активності протеїназ (Kawashima S., 1986). Очевидно, в організмі D-вітамінні сполуки виявляють свій вплив на обмін амінокислот одночасно за всіма цими механізмами, але з різною ефективністю в залежності від їх хімічної будови, дози та концентрації йонів кальцію.

Порівняння характерів впливу надлишку  $\text{Ca}^{2+}$ , вітаміну  $\text{D}_3$  та

Його похідних на вміст різних фракцій холестерину у сироватці крові курчат також свідчить про їх здатність впливати на ці показники не лише рецептор-опосередкованим шляхом, але й без зв'язування з рецептором. Можливо, на вміст холестерину впливають зміни у ліпідному складі та властивостях мембран і активності ферментів ліпідного обміну. Крім того, D-вітамінні сполуки можуть діяти на біосинтез холестерину безпосередньо (Gupta A., 1989), через зміни в обміні кальцію, через біосинтез відповідних ферментів. Як і у випадку з впливом на вміст вільних амінокислот, очевидно, ефекти вітаміну D<sub>3</sub> та його похідних на вміст холестерину реалізуються за допомогою кількох механізмів, тому у даному випадку наявність ОН-груп у їх молекулах не має того принципового значення, як для виявлення ними антирахітичної активності.

Порівняння ефектів Ca<sup>2+</sup> та D-вітамінних сполук на колаген свідчить, що в даному випадку вплив вітаміну D<sub>3</sub> і його похідних реалізується головним чином за допомогою рецептор-опосередкованого шляху. У зв'язку з цим найбільш виражений вплив спричинюють 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> та 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, чії специфічні рецептори є у клітинах, що синтезують колаген (Бауман В., 1989). Стероїд-рецепторні комплекси можуть зв'язуватись з промоторними ділянками генів колагенів (Lichtler A., 1990), а також впливати на їх біосинтез через зміни концентрації Ca<sup>2+</sup> (Бауман В., 1989), шляхом стимуляції біосинтезу кальційзв'язуючих білків і активного транспорту Ca<sup>2+</sup>. Не можна також виключити прямий вплив D-вітамінних сполук на трансляцію мРНК колагенів, на що вказують результати наших експериментів з використанням білок-синтезуючої системи *in vitro* та дані літератури (Yamaguchi M., 1989).

На стадії посттрансляційних модифікацій колагенів (введення вуглеводного компоненту) D-вітамінні сполуки, можливо, реалізують свій ефект за допомогою кількох механізмів. Вони передбачають як

зв'язування зі специфічним рецептором, так і його відсутність; як вплив, опосередкований змінами концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , так і безпосередню дію D-вітамінних сполук в клітині. Зміни амінокислотного складу колагенів позначаються на кількості функціональних груп, за якими відбувається зв'язування молекул вуглеводів. Крім того, зміни концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  можуть позначитись на активності ферментів вуглеводного обміну (Beaulieu G., 1992). Тому значний вплив на вуглеводний компонент колагенів спричинюють не тільки гідроксилохідні вітаміну  $\text{D}_3$ , що специфічно зв'язуються з відповідними рецепторами, але і  $3\beta\text{PD}_3$ , чия здатність до зв'язування з рецепторами є дуже низькою.

На підставі аналізу результатів власних експериментів та даних літератури можна запропонувати загальну схему механізмів впливу D-вітамінних сполук на організм (Рис.7).

### ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що для нормалізації гомеостазу кальцію в організмі важливе значення має доза вітаміну  $\text{D}_3$  та його похідних, кількість і локалізація OH-груп у їх молекулах, співвідношення концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  та даних сполук. При порушенні такого співвідношення, відсутності вітаміну  $\text{D}_3$ , надлишку  $\text{Ca}^{2+}$  або вітаміну  $\text{D}_3$  повна нормалізація гомеостазу кальцію не забезпечується. Введення курчатам вітаміну  $\text{D}_3$  (10 МО/день),  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (2 МО/день),  $1\alpha\text{OHD}_3$  (2,5 МО/день),  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (100 МО/день),  $3\beta\text{PD}_3$  (500 МО/день) забезпечувало нормалізацію гомеостазу кальцію в організмі.
2. У дослідях *in vivo* показано, що введення курчатам надлишку кальцію (2,1%), а також вітаміну  $\text{D}_3$  та його похідних приводило до змін вмісту вільних амінокислот у сироватці крові. Ефекти  $\text{Ca}^{2+}$  і вітаміну  $\text{D}_3$  на вміст вільних амінокислот відрізнялись

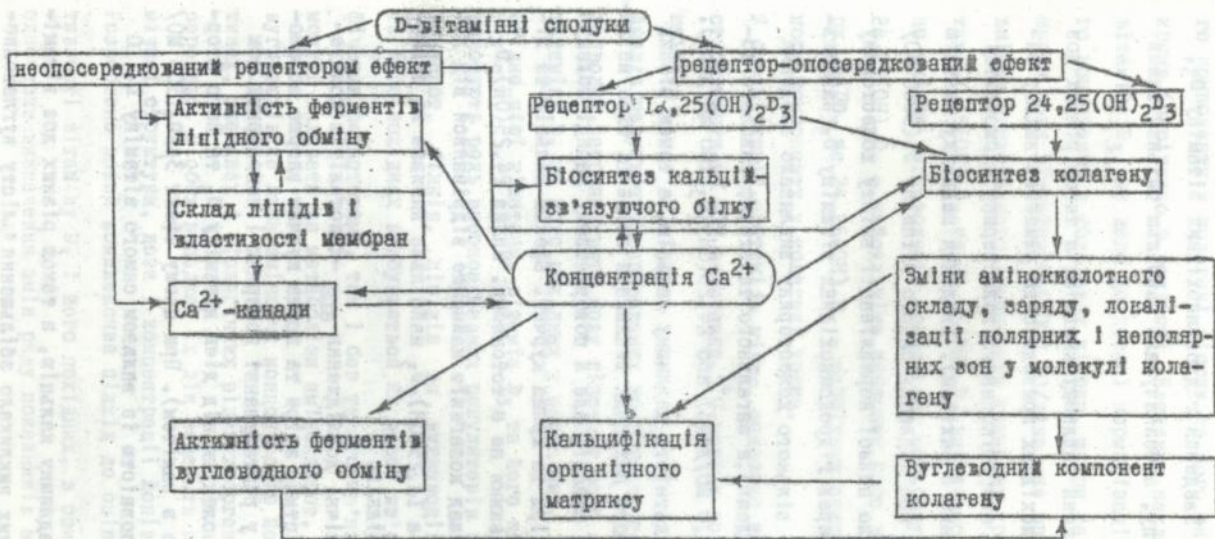


Рисунок 7. Загальна схема механізмів впливу D-вітамінних сполук на організм

за своїм характером. Введення гідроксипохідних вітаміну  $D_3$ , які містили  $I\alpha OH$  групу, забезпечувало найбільш сильний вплив на дані показники.

3. Встановлено, що введення надлишку кальцію, а також різних доз вітаміну  $D_3$  та його похідних приводило до зниження вмісту загального, вільного та етерифікованого холестерину у сироватці крові курчат (порівняно з рахітом). Введення надлишку кальцію разом з вітаміном  $D_3$  або надлишку самого вітаміну  $D_3$  (5000 МО/день) не забезпечувало повної нормалізації вмісту холестерину у сироватці крові. Серед гідроксипохідних вітаміну  $D_3$  найсильніше зниження вмісту вільного холестерину викликало введення  $24,25(OH)_2D_3$  (100 МО/день), а загального та етерифікованого холестерину -  $I\alpha OH D_3$  (2,5 МО/день) або  $24,25(OH)_2D_3$  (100 МО/день).
4. Вперше встановлена здатність надлишку кальцію, а також різних доз вітаміну  $D_3$  та його похідних викликати зміни *in vivo* не лише в амінокислотному складі, але й поверхневому заряді молекул колагенів кістки, шкіри та хряща курчат. Ефекти кальцію та вітаміну  $D_3$  на ці показники не є тотожними. Вплив  $24,25(OH)_2D_3$  на амінокислотний склад колагенів найменше відрізнявся від дії самого вітаміну  $D_3$ , а  $I\alpha,25(OH)_2D_3$  найбільше впливав на поверхневий заряд даних білків.
5. Електронно-мікроскопічні дослідження  $\alpha_1S$ -кристалітів колагенів типів I та II кістки, шкіри та хряща курчат вперше встановили наявність змін у розташуванні полярних і неполярних. Вони завдовж колагенової молекули під дією вітаміну  $D_3$  та його фторпохідного (порівняно з рахітом). При цьому ефект  $3\beta ED_3$  (500 МО/день) не співпадав повністю із впливом самого вітаміну  $D_3$  (10 МО/день).
6. Введення курчатам надлишку кальцію, а також різних доз вітаміну  $D_3$  та його похідних викликало збільшення вмісту вугневодно-

го компоненту у колагені кістки та його зниження - у колагені хряща (порівняно з рахітом). Введення надлишку кальцію (без вітаміну  $D_3$ ) не вело до повної нормалізації вмісту вуглеводного компоненту у колагенах кістки, шкіри та хряща курчат. Збільшення дози вітаміну  $D_3$  (5000 МО/день) не вело до нормалізації вмісту вуглеводного компоненту колагену хряща. Введення курчатам  $1\alpha,25(\text{OH})_2D_3$  та  $24,25(\text{OH})_2D_3$  викликало найбільше підвищення вмісту вуглеводного компоненту колагену кістки,  $1\alpha\text{OHD}_3$  та  $24,25(\text{OH})_2D_3$  - найсильніше зниження його вмісту у колагені шкіри,  $3\beta\text{PD}_3$  та  $24,25(\text{OH})_2D_3$  - найбільше зниження вмісту вуглеводного компоненту у колагені хряща.

7. У безклітинній системі *in vitro* показана здатність  $1\alpha,25(\text{OH})_2D_3$  стимулювати на 60% включення  $^{14}\text{C}$ -валіна до білків, що синтезуються.
8. Аналіз результатів проведених досліджень та даних літератури дозволяє запропонувати нову гіпотезу щодо механізмів впливу вітаміну  $D_3$  та його похідних у організмі. Згідно цієї гіпотези, вітамін  $D_3$  та його похідні в організмі виконують роль високоактивних регуляторів процесів обміну амінокислот, білків, ліпідів та вуглеводів. Дія вітаміну  $D_3$  та його похідних відбувається як через зв'язування з специфічними рецепторами, так і без такого зв'язку. Дані сполуки можуть впливати на метаболізм амінокислот, білків, ліпідів, вуглеводів не лише змінюючи концентрацію йонів кальцію в клітинах, тканинах і біологічних рідинах організму, але й безпосередньо. В обох випадках їх дія залежить від особливостей хімічної структури, дози і концентрації йонів кальцію.
9. Розроблено новий комплексний підхід до оцінки біологічної активності вітаміну  $D_3$  і його похідних, в основу якого покладено одночасне визначення змін ряду показників антирахітичної актив-

ності, а також обміну амінокислот, білків, ліпідів та вуглеводів.

### СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.І., Бауман В.К., Валинієце М.Ю. Коллаген хряща курчат при рахіті і різній забезпеченості вітаміном  $D_3$ // Доп.АН УРСР.-1990.-№4.-С.60-62.
2. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.І., Бауман В.К., Валинієце М.Ю. Влияние витамина  $D_3$  на белки соединительной ткани// Конф."Проблемы микробного синтеза витаминов и их производных"(Ташкент, 1990г.):Тез.докл.-Ташкент,1990.-С.53-54.
3. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Бауман В.К., Валинієце М.Ю. Влияние витамина  $D_3$  на белки органического матрикса кости и кожи цыплят//Докл.АН УССР.-1990.-№5.-С.67-70.
4. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Бауман В.К., Мусялковская А.А., Валинієце М.Ю. Пул свободных аминокислот и другие биохимические показатели сыворотки крови цыплят при различной обеспеченности витамином  $D_3$ //Докл.АН УССР.-1990.-№9.-С.54-57.
5. Яхимович Р.И., Гогоман И.В., Бондаренко Л.Б. К 15-летию синтеза первого фтораналога витамина  $D_3$ . Химические и биологические аспекты проблемы//Химия природ. соединений.-1990.-№6.-С.707-732.
6. Яхимович Р.И., Бондаренко Л.Б., Гогоман И.В., Бауман В.К., Валинієце М.Ю. Влияние  $3\beta$ -фторвитамина  $D_3$  и  $1\alpha,25$ -дигидроксивитамина  $D_3$  на некоторые показатели сыворотки крови цыплят//Докл.АН УССР.-1991.-№5.-С.149-151.
7. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Гогоман И.В., Бауман В.К., Валинієце М.Ю. Влияние  $3\beta$ -фторвитамина  $D_3$  и  $1\alpha,25$ -дигидроксивитамина  $D_3$  на коллагены кости и хряща цыплят//Докл.АН УССР.-1991.-№7.-С.138-143.

8. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Гогоман И.В., Валинище М.Д., Бауман В.К. Влияние витамина  $D_3$ , его метаболита и фторпроизводного на различные биохимические показатели и соединительную ткань цыплят//Всероссийское совещание "Новые аспекты участия биологически активных веществ в регуляции метаболизма и продуктивности сельскохозяйственных животных" (Боровск, 1991г.): Тез. докл.-Боровск, 1991.-С.82-83.
9. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Гогоман И.В., Бауман В.К. Влияние 3 $\alpha$ -фторвитамина  $D_3$  и 1 $\alpha$ ,25-дигидроксиэргостерола на аминокислотный состав коллагена кожи курчат//Доп.АН Украины.-1992.-№3.-С.120-124.
10. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Бауман В.К. Комплексный вплив сполук D-вітамінної природи на різні сторони обміну речовин в організмі//Тез. доп. 6 Укр. біох. з'їзду, Київ, 25-28 травня 1992 р. -Київ, 1992.-С.109.
11. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Гогоман И.В. Новые аспекты биологической активности веществ D-витаминной природы//Тез. докл. конф. "Биологически активные соединения, синтез и использование", Пенза, 28-29 сентября 1992 г.- Пенза, 1992.-С.92-93.
12. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Бауман В.К. Влияние нагрузки Ca на биохимические показатели цыплят в норме и при рахите//Докл. АН Украины.- 1992.-№5.-С.125-128.
13. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Бауман В.К. Гіпервітаміноз  $D_3$ : вплив на антирахітичні показники, вміст холестерину і пул вільних амінокислот сироватки крові курчат//Доп.АН України.-1992.-№7.-С.149-153.
14. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И. Витамин  $D_3$  и кальций рациона: новые аспекты биологической активности//Тез. докл. Респ. науч. конф. "Эколого-гигиенические проблемы питания населения", Киев, 6-8 октября 1992 г.- Киев, 1992.-С.151.

15. Бондаренко Л.Б., Данилюк Т.П. Вплив вітаміну D<sub>3</sub> і навантаження кальцієм на сполучну тканину і мінеральний обмін//Тез. доп. Міжвузівськ. наук.-метод. конф. з проблем природничих наук, Полтава, 1992.-С.10.
16. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Бауман В.К. Коллаген хряща щиплят при різній забезпеченості Са і вітаміном D<sub>3</sub>//Биополимеры и клетка.-1992.-8, №5.-С.35-38.
17. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Бауман В.К. Влияние I $\alpha$ -оксивитамина D<sub>3</sub> и 24,25-диоксивитамина D<sub>3</sub> на коллагены кости, кожи и хряща щиплят//Биополимеры и клетка.-1992.-8, №5.-С.38-44.
18. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Бауман В.К. Влияние нагрузки Са на пул свободных аминокислот сыворотки крови щиплят в норме и при рахите//Докл. АН Украины.-1992.-№9.-С.135-137.
19. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Бауман В.К. Коллаген щиплят при D-гипервитаминозе//Докл. АН Украины.-1992.-№12.-С.105-110.
20. Бондаренко Л.Б., Харченко О.В., Бутович И.А. Витамин D<sub>3</sub> и I,25-диоксивитамин D<sub>3</sub> - ингибиторы 5-липоксигеназы//Биополимеры и клетка.-1992.-8, №6.-С.41-43.
21. Яхимович Р.И., Бондаренко Л.Б., Серебряний С.Б. Влияние витамина D<sub>3</sub> на процессы минерализации и состав белков соединительной ткани щиплят//Укр. биохим. журн.-1992.-64, №6.-С.58-64.
22. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Бауман В.К. Влияние I $\alpha$ -оксивитамина D<sub>3</sub> и 24,25-диоксивитамина D<sub>3</sub> на пул свободных аминокислот и другие показатели сыворотки крови щиплят//Биополимеры и клетка.-1993.-9, №1.-С.15-18.
23. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Бауман В.К. Влияние нагрузки Са и витамина D<sub>3</sub> на коллагены кости и кожи щиплят//Докл. АН Украины.-1993.-№2.-С.146-151.
24. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И. Изoeлектрические спектры коллагенов I типа кости при рахите и введении различных веществ D-

- витаминой природы // Докл. АН Украины.- 1993.- № 4.- С.139-141
25. Bondarenko L.B., Kharchenko O.V., Butovich I.A. Vitamin D<sub>3</sub> and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> are inhibitors of lipoxigenases // Abs. 1st Congr. of Int. Soc. for the Study of Fatty Acids and Lipids, Lugano, Switzerland, 1993.- P.97.
26. Бондаренко Л.Б. Влияние витамина D на соединительную ткань // Биополимеры и клетка.- 1993.- 9, №4.- С.50-59 (обзор)
27. Бондаренко Л.Б., Данилюк Т.П. Вплив Ca та різних речовин D-витаминої природи на поверхневий заряд молекули колагену // Тез. доп. Другої Міжвузівськ. наук.-метод. конф. з проблем природничих наук, Полтава, 1993.- С.13-14.
28. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И. Новые возможности в разработке лекарственных средств на основе D-витаминных соединений // Тез. докл. пятой научно-практической конференции изобретателей и предпринимателей "Наука и производство - здравоохранение", Киев, 1993.- С.28.
29. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И. Влияние избытка Ca и различных доз соединений D-витаминой природы на изоэлектрические спектры коллагенов I типа кожи цыплят // Биополимеры и клетка.- 1993.- 9, №5.- С.52-54.
30. Бондаренко Л.Б. Свообразие биологических эффектов основных метаболитов витамина D<sub>3</sub> // Биополимеры и клетка.- 1993.- 9, №6.- С.21-30. (обзор)
31. Bondarenko L.B., Kharchenko O.V., Butovich I.A. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on 5- and 15-lipoxigenases // Abs. 9th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds, Florence, Italy, 1994.- P.72.

32. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И. Вплив Са та сполук D-вітамінної природи на холестерин сироватки крові//Укр.наук.-мед.молод.журнал.-1994.-№1.-С.13-15.
33. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И. Изoeлектрическое фокусирование коллагенов II типа хряща щиплят с различной обеспеченностью рациона Са и веществами D-витаминной природы//Биополимеры и клетка.-1994.-10, №1.-С.100-103.
34. Бондаренко Л.Б., Харченко О.В., Бутович И.А. Гормонально-активная форма витамина D<sub>3</sub> - 1,25-дигидроксивитамин D<sub>3</sub> - ингибитор лейкоцитарной липоксигеназы//Вопр.мед.химии.-1994.-№5.-С.2-4.
35. Бондаренко Л.Б., Володіна Т.Т., Данилюк Т.П. Структура SLS -кристалітів колагену курчат при рахіті і в нормі//Наукові записки, серія природнича, Полтава, 1995.-С.7-14.
36. Бондаренко Л.Б., Харченко О.В., Бутович И.А. Влияние 1,25-дигидроксивитамина D<sub>3</sub> на активность 15-липоксигеназы//Вопр.мед.химии.-1995.-41, №3.-С.29-31.
37. Бондаренко Л.Б., Харченко О.В., Бутович И.А. Кинетические закономерности процесса ингибирования 5-липоксигеназы 1,25-дигидроксивитамин D<sub>3</sub>//Хим.фарм.журнал.-1995.-№5.-С.17-19.
38. Bonderenko L.B., Kharchenko O.V., Butovich I.A. Hormonally active form of vitamin D<sub>3</sub> effects on bone collagen and mineral, hydrocarbon, lipid metabolisms//Abs. 1st Int.Congr. of EPHAR, Milan, Italy, 1995.-Pharmacol.Res.-1995.-31.-P.88.
39. Бондаренко Л.Б. Регулирующее влияние витамина D<sub>3</sub> на обмен холестерина, углеводов и состояние белков соединительной ткани//Тез.докл.конф."Витамины и здоровье населения Беларуси", Гродно, 1995.-С.95.

24. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И. Изoeлектрические спектры коллагенов II типа щиплят при рахіті і в нормі//Наукові записки, серія природнича, Полтава, 1995.-С.146-151.

Бондаренко Л.Б. Биологические функции витамина D<sub>3</sub> и его производных (рукопись).

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия. Институт физиологии и биохимии животных, Львов, 1996.

Защищается 39 научных работ, которые содержат данные о новых аспектах биологической активности витамина D<sub>3</sub> и его производных *in vivo* и *in vitro*. Показано, что витамин D<sub>3</sub> и его производные выполняют в организме роль высокоактивных регуляторов процессов обмена аминокислот, белков, липидов и углеводов. Действие D-витаминных соединений осуществляется как через связывание с рецепторами, так и без связывания с ними. Данные соединения могут влиять на обмен аминокислот, белков, липидов и углеводов, вызывая изменения в концентрации Ca<sup>2+</sup>, а также непосредственно, в зависимости от их химической структуры, дозы и концентрации ионов Ca<sup>2+</sup>.  
Bondarenko L.B. Biological functions of vitamin D<sub>3</sub> and its derivatives (manuscript).

Dissertation submitted in fulfilment of requirements for a scientific degree of Doctor of Science (Biology) in the fields of 03.00.04 - Biochemistry. Institute of Physiology and Biochemistry of Animals, L'viv, 1996.

39 Scientific works are defended which contain data on new aspects of vitamin D<sub>3</sub> and its derivatives biological activity *in vivo* and *in vitro*. It has been shown that vitamin D<sub>3</sub> and its derivatives are highly effective regulators of amino acids, proteins, lipids and hydrocarbon metabolism in organism. They act via binding with receptors and without it. These compounds may influence on amino acids, proteins, lipids and hydrocarbons metabolism by changes in Ca<sup>2+</sup> concentrations and directly in dependence on their chemical structure, dose and Ca<sup>2+</sup> concentrations.

Ключові слова: вітаміни D<sub>3</sub>, похідні, обмін, амінокислоти, ліпіди, вуглеводи, колаген, біологічна роль.

*[Handwritten signature]*

---

Ніда. до друку 18.04.96. формат 60x84/16. Папір друк. Офс. друк.  
Ум. друк. арк. 2,55. Ум. фарбо-відб. 2,55. Осл.-вид. арк. 2,0.  
Сирая ІСС пр. Сам. 93. Безкоштовно.

---

Віддруковано в Інституті математики НАН України  
252601 Київ 4, МСН, вул. Терещенківська, 3

446811

AB 34.832