

28.072
Б-811

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ І БІОХІМІЇ ТВАРИН

На правах рукопису

БОНДАРЕНКО Лариса Борисівна

**БІОЛОГІЧНІ ФУНКЦІЇ
ВІТАМІНУ D₃
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

Робота виконана у Інституті біоорганічної хімії та
нафтохімії НАН України

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор В.К.Кібірев
доктор біологічних наук, професор Р.С.Стойла
доктор біологічних наук, професор В.Г.Янович.

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

Захмет відбудеться " 11 " вересня 1996 р. о " 10 " 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.

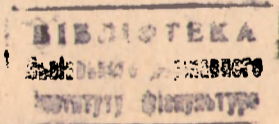
З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
фізіології і біохімії тварин УАН.

Автореферат розісланий " 8 " червня 1996р.

Учений секретар
Спеціалізованої ради
доктор сільськогосподарських
наук



Я.І.Кирилів



3477

28.072

ЧИТАЛЬНА ЗАЛА
ЛДУФК

-1-

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

Актуальність проблеми. Внаслідок багаторічного вивчення біологічної ролі вітаміну D_2 у організмі було встановлено, що він є головним регулятором гомеостазу кальцію, діючи за механізмом, характерним для стероїдних гормонів (Бауман В.К., 1989).

Послідовне ферментативна гідроксилювання вітаміну D_2 в організмі проводить до утворення ряду його метаболітів, серед яких найбільший біологічний ефект спричиняють 1 α ,25-дигідроксивітамін D_3 та 24,24-дигідроксивітамін D_2 . Антирахітична активність гідроксипохідних суттєво відрізняється від дії самого вітаміну. 1 α ,25-дигідроксивітамін D_3 є гормонально активною формою вітаміну D_2 , найбільш ефективною при дії на гомеостаз кальцію. Протягом значного періоду фізіологічна роль гідроксильних груп у молекулі вітаміну D_2 та його похідних залишалась нез'ясованою. Частково її вдалося виявити лише після синтезу та вивчення гідрокси- та фторованих аналогів вітаміну D_2 (Яхимович Р.І., 1978). Ці дослідження привели до перегляду традиційних уявлень про роль вітаміну D_2 та його похідних в організмі, оскільки з'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, противірусними, протипсоріазними, імуномодулюючими препаратами (Koeffler H., 1984).

Незважаючи на велику кількість робіт, що ведуться різними групами дослідників з метою синтезу нових аналогів вітаміну D_2 і вивчення їх біологічної активності в експериментах з різними культурами клітин, залишається нез'ясованим питання про залежність характеру і ступеню вираження ефектів похідних вітаміну D_2 від їх хімічної будови (Окелліга М.Н., 1992). До того ж проведення досліджень біологічної активності синтетичних гідрокси- та фтораналогів віта-

ВІСНИК АКАДЕМІЇ НАУК
УРСЬКОЇ РАДЯНСЬКОЇ РАСПУБЛІКИ

вітаміну D₃. Крім виключно на різноманітних культурах клітин не дає можливості вірогідно передбачати їх вплив на цілісний організм. Нез'ясовано також і питання про ступінь взаємозалежності між змінами у гомеостазі кальцію та іншими проявами біологічної активності вітаміну D₃ 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 D₃ та його метаболітів, що досі розглядалися і досліджувалися майже виключно як антирахітичні препарати.

Особливий інтерес становить з'ясування характеру впливу вітаміну D₃ 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 (Лебедєв Д.О., 1979). Наявні дані про вплив вітаміну D₃ та його похідних на сполучну тканину в організмі нечисленні та протиречиві.

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 немолярних концентраціях, можуть бути ефективними при лікуванні лейкозів, псоріазу, колагеноза, 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 сполучнотканяний 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, поверхневому 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. В'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 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 D_3 стимулювати біосинтез білків у безклітинній системі *in vitro*.

Вперше показано, що введення в молекулу вітаміну 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, структурувальні - кристаліти 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 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 є основою 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 D₂ 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 D₃, що значно звужує сферу їх застосування у медичній практиці.

Результати дослідження сумісної дії різних доз кальцію і вітаміну D₃ дають можливість розробити більш ефективні способи лікування рахіту та інших патологій мінерального обміну, а також створити нові препарати вітаміну D₂ 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'язувачого білку, радіобіологічні дослідження та вивчення впливу D-вітамінних сполук на структуру α LS-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), Всесовній нараді "Нові аспекти участі біологічно активних речовин у регуляції метаболізму і продуктивності сільськогосподарських тварин" (Боровськ, 1991), 6-му Українському біохімічному з'їзді (премія на конкурс 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 Міжвузівських науково-методичних конференціях (Полтава, 1992, 1993, 1994), I Міжнародному конгресі міжнародного товариства в вивчення жирних кислот і ліпідів (Дугано, 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 217 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 , 1α -гідроксивітаміну D_3 , $24,25$ -дигідроксивітаміну D_3 та 3β -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): λ_{max} 265 нм, ϵ 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). $[\alpha]_D^{20} +54^\circ$ (хлороформ), УФ-спектр (етанол): λ_{max} 265 нм, ϵ 17 850.

Активність препаратів вітаміну D_2 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_2 . На 10-й день поголів'я курчат (I 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_2 , 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 II-й серії дослідів вивчали біологічну активність $24,25(OH)_2D_3$ та $1\alpha OH D_3$. Раціони курчат груп I і 2 були такі самі як і в I-й серії дослі-

дів. Третя група курчат перорально отримувала 24,25(ОН)₂D₃ з раціону по 100 МО на птаха на день, четверта - ІОНD₃ по 2,5 МО на птаха на день. Препарати вводили на протязі 20 діб. Дослідженні використовували сироватку крові, велику голізову кістку та ІІ епіфізарні хрящі, слизову дванадцятипалої кишки, шкіру та паратиреоїдні залози курчат.

Вивчення антирадітичної активності вітаміну D₃ та його похідних здійснювали використовувачи 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 сироватки крові при різних температурах. Вміст вітальних мікроелементів у сироватці крові визначали за методом Бенсон Д.В. (1974) на амінокислотному аналізаторі ААА-881(Чехія). Вміст оксиглобіну визначали за методом Зайдес А.Я. (1964). Кислоторозчинний колаген шкіри курчат одержували за методом Ореховича В.К. (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 Тріклому Б до повного видалення кальцію, екстракцією 15% оцтовою кислотою з наступним діалізом та перекристалізацією за модифікованим методом Міллер Е. (1967). Колаген І типу шкіри та кісток одержували за модифікованим методом Тейлстад В. (1976) обробкою пептоном з наступним диференціальним висолюванням різних фракцій колагену. Колаген ІІ типу хряща одержували за методом Тейлстад В. (1976) з використанням пепсину та висолування. 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-поліолінійній системі. Електронномікрокопічні препарати, одержані за методом Кінн К. (1966), досліджували за допомогою електронного мікроскопа JEOL JEM 100 В (Японія) та аналізатора зображення ІМВВ-2000 (Австрія) з наступною статистичною обробкою даних на комп'ютері. Біосинтез білку вивчався у системі *in vitro*, запропонованій Берман А.Б. (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 D₃ та його метаболіти розглядаються, як одні з основних регуляторів гомеостазу кальцію і фосфору в організмі, їх надходження і підтримання сталі концентрації цих іонів у сироватці крові, що необхідно для нормального функціонування всіх органів і тканин. У похідних вітаміну D₃ ця здатність виявляється у різній мірі.

Проведені дослідження свідчать, що вітамін D₃ та його похідні викликають вірогідні зміни показів антірадітичної активності у порівнянні з рахітом. Якщо при рахиті (група І) порушується обмін кальцію та фосфору, формування скелету, гіпертрофуються паратиреоїдні залози, відсутній кальційзв'язувачий білок (CaBP), сповільнюється ріст, то введення вітаміну D₃ забезпечує нормалізацію стану організму. Введення у раціон курчат надлишку кальцію і фосфору без вітаміну D₃ не дозволяє досягти нормалізації їх стану, тоді як навантаження кальцієм та фосфором в присутності вітаміну D₃ дає неоднозначні результати: при нормалізації біохімічних по-

казників сироватки крові, концентрації СаЗБ, 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 СаЗБ, менший приріст ваги курчат, ніж у групі 2 (10 МОД₃/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 ОН-групи в С-1, С-3 та С-25 положеннях, що узгоджується з даними Kanis J.A. (1982). Ефект $1\alpha OH D_3$ (25-ОН група відсутня) на 20% менший, а сам вітамін D_3 (без $1\alpha OH$ та 25-ОН 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 ОН-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 вітаміна 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-ОН 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.P., 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 Ca^{2+} (без D_3) у групі 3 більше нагадують зміни при рахіті (група 1), ніж після введення 10 МО/день D_3 (група 2) (Рис. I). Ефекти вітаміну D_3 та надлишку Ca^{2+} не співпадають не тільки за ступенем виявлення, але й за характером. У групі курчат, які одержували надлишок Ca^{2+} на фоні вітаміну D_3 (група 4), спостерігалася вірогідна різниця в обома контролями за вмістом 4-х амінокислот, в групу 1 - 5-ти, а в групу 2 - 4-х амінокислот. Очевидно, надлишок Ca^{2+} при нормальному вмісті вітаміну D_3 у раціоні 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 D_3 змінюється аналогічним чином, однак у різній мірі. Відмінності, які спостерігаються між ефектами 10 МО/день D_3 та 5000 МО/день D_3 можливо свідчать про те, що гіперкальціємія зачіпає і обмін амінокислот.

У двох серіях дослідів з'ясувалось (Рис. I), що ефекти самого вітаміну D_3 і його гідроксиформ (Рис. I), на вміст вільних амінокислот сироватки крові хоч і були подібними за характером, але повністю не співпадали. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ та $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, в молекулах яких наявна $1\alpha\text{OH}$ група, найсильніше впливали на дані показники. При цьому $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ сильніше за $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ підвищував вміст незамінних амінокислот. Наявність 24-ОН групи у молекулі $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ вела до незначних змін характеру ефекту даної сполуки у порівнянні з вітаміном D_3 . Відсутність 3 β -ОН групи не тільки не послаблювала здатності $3\beta,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

впливати на вміст амінокислот, але й більше того, вплив 10 МО/день $3\beta\text{PD}_3$ 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 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.M., 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 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 Ca^{2+} в організмі, не залежно від шляхів його транспорту. Відзначено антагонізм дії вітаміну D_3 і Ca^{2+} при одночасному їх введенні (група 4) - за вмістом етерифікованого холестерину. Введення 5000 МО/день вітаміну D_3 , яке супроводжується гіперкальцемією, викликає підвищення вмісту холестерину у порівнянні з групою 2 (10 МО D_3). Введення курчатам гіпердози вітаміну D_3 викликає зниження лише вмісту вільного холестерину у порівнянні з групою 1 (рахіт),

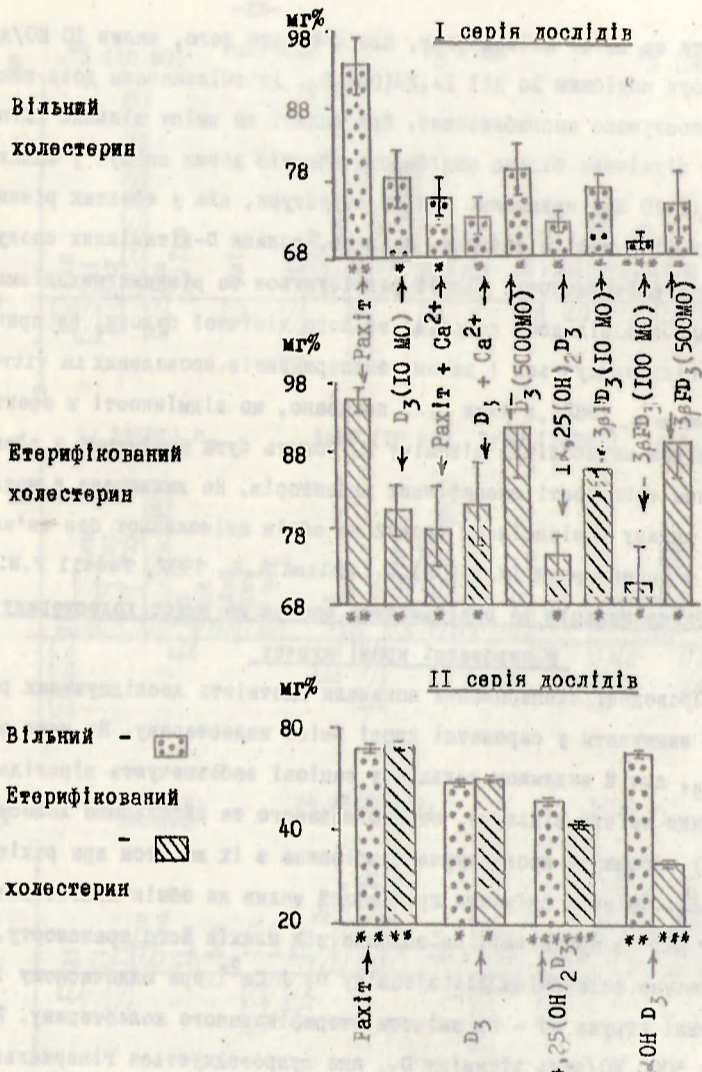


Рисунок 2. Вміст холестерину у сироватці крові курчат при рахіті та введенні надлишку Ca²⁺ і D-вітамінних сполук (mg%, M±m, n=5)

* - p<0,05 по відношенню до групи I(рахіт)
 ** - p<0,05 по відношенню до групи 2(10 МО/день D₃)

Усі похідні вітаміну D₂ викликали зниження вмісту різних фракцій холестерину у сироватці крові порівняно з рахітом. При цьому 1 α ,25(OH)₂D₂ викликав вірогідне зниження вмісту загального холестерину не тільки у порівнянні з групою 1, але й з групою 2. Відсутність 25-OH групи у молекулі 1 α OH D₃ 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)₂D₃ приводила до посилення ефекту даного похідного вітаміну D₃ приблизно однаково на вміст усіх фракцій холестерину у порівнянні з вітаміном D₃ та 1 α ,25(OH)₂D₃. Заміна 3 β OH групи на атом фтору в 3 β FD₂ не послаблює здатності даної сполуки знижувати вміст вільного та загального холестерину. Такий незначний вплив відсутності 3 β OH групи на виявлення ефекту 3 β FD₂ на вміст холестерину (як і на вміст вільних амінокислот сироватки), може свідчити про здатність похідних вітаміну D₃ впливати на дані показники шляхом, відмінним від механізму їх дії на гомеостаз кальцію. У протилежному випадку ефекти 3 β FD₂ (особливо у мінімальній дозі) та 1 α ,25(OH)₂D₃ навряд чи були б співставимі. Цей висновок узгоджується з результатами експериментів *in vitro* (Gupta A., 1989), які виявили здатність похідних вітаміну D₂ 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 здатні 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 $\text{LiOH}\cdot\text{D}_3$, синтезується колаген, який менш жорстко амфотерний (зменшення вмісту Гіл, Ліа, Гіс) та має більш правильну опірність молекули (збільшення вмісту Гіп, Про, Глі), ніж колаген за умов рахіту.

До певної міри подібний ефект на колаген I типу спричинювало і введення надлишку Ca^{2+} у присутності вітаміну D_3 . Однак синергізм їх дії на вміст ряду амінокислот при цьому відсутній. При введенні навантаження Ca^{2+} без вітаміну D_3 у амінокислотному складі колагену I типу кістки курчат відбуваються зміни, що можуть привести до підвищення ступеня жорсткості спіралі молекули (що відмічено і при рахіті), кількості міжмолекулярних зшивок. Подібні зміни мають місце і при D_3 -гіпервітамінозі (група 5), на що вказує зростання у порівнянні з групою 2 (10 МО/день D_3) у амінокислотному складі колагену даної групи вмісту Гіл, Про, Ала та Іле. При впливі на вміст окремих амінокислот відмічена не лише пряма, але й зворотня залежність ефекту вітаміну D_3 від його дози.

Таким чином, відхилення від фізіологічних доз як Ca^{2+} , так і вітаміну D_3 приводять до утворення колагену, який за вмістом окремих амінокислот нагадує білок курчат при рахіті.

Ефекти вітаміну D_3 та його похідних на колаген кістки не тожні до дії Ca^{2+} . Хоч в цілому гідроксипохідні вітаміну D_3 спричиняють подібні за характером ефекти на колаген кістки, однак кожній сполуці 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 D_3 . Введення $1\alpha\text{OHD}_3$, в якому відсутня 25-ОН група, вело до ще більшого послаблення ефекту. В той же самий час введення $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, який містив 24-ОН групу замість $1\alpha\text{OH}$ групи, вело до посилення його впливу на вміст цілого ряду амінокислот у порівнянні з іншими D-вітамінними сполуками. 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 відхиляється 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 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 підвищеним у порівнянні з групою 2 (10 МО D_3) вмістом Ліз, Гіс, Ала, Іле, зниженим вмістом Про. Такі зміни можуть привести до збільшення ступеня жорсткості колагенових структур та підвищення жорсткості спіралі молекули (Ramachandran et al., 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 D_3 (група 2) вірогідно відрізняється від

ІНСТИТУТ
Львівського державного
університету

7744

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 Ca^{+} (без 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 D_3 і надлишку 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 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 D_3 утворює менше зшивок (зниження вмісту Гіл, Ліз), але відрізняється більшою жорсткістю колагенової спіралі (підвищення вмісту Ала, Гіп, Тир), ніж білок у групі 2, що відмічалось і у колагені кістки.

Вітамін D_3 та його похідні спричиняють подібні за характером впливи на колаген хряща і кістки (Рис.3). Однак у колагені хряща введення $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ сильніше, ніж введення вітаміну D_3 , впливало на вміст Гіл, який бере участь в утворенні міжмолекулярних зшивок, Про, який впливає на форму колагенової спіралі, та Сер. На відміну від нього введення $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ слабше, ніж введення вітаміну 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 D_3 . Вплив $3\alpha\text{PD}_3$ у колагені хряща, як і у колагені кістки, залежав від дози фторованого похідного. Введення птахам

500 МО/день $3\beta\text{FD}_3$ викликає ефект подібний за характером до дії вітаміну D_3 та його гідроксипохідних. Введення 10 МО/день $3\beta\text{FD}_3$ викликало у колагені хряща, як і у колагені кістки, збільшення вмісту ГІІ, ІІІ, 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 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 D_3 колаген І типу шкіри відрізняється від цього білку курчат при рахіті за співвідношенням зшивок різних типів і за меншою жорсткістю колагенової спіралі у обох серіях дослідів.

Своєрідність впливу введення надлишку Ca^{2+} без вітаміну 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 Ca^{2+} та D_3 далеко не тотожні за характером. Сумісне введення надлишку Ca^{2+} та вітаміну D_3 веде до утворення колагену, можливо, менш шитого (вірогідне зниження Гіл), з менш жорсткою спіраллю молекули (зниження Ала, Мет, Лей, Тир), ніж при рахиті. Не лише в колагені кісток, але й в колагені шкіри дія надлишку Ca^{2+} і вітаміну D_3 не є простою сумою їх ефектів. За впливом на вміст Гіо, Арг, Асп, Глу, Мет, Тир, Фен відмічається антагонізм при сумісному введенні Ca^{2+} і вітаміну D_3 .

Характер впливу надлишку вітаміну D_3 на колаген I типу шкіри (як і кістки) подібний до ефекту 10 МО/день вітаміну D_3 . Синтезований при D_3 -гіпервітамінозі колаген I типу шкіри відрізняється від білку курчат групи 2, можливо, меншим ступенем шитості колагенових молекул (зниження вмісту Гіл, Ліз, Гіо) 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-ОН група, викликало найменш виражений серед D-вітамінних сполук вплив на вміст амінокислот у шкірі. Наявність трьох ОН-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 ОН-групи в положеннях С-24, С-25 і С-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 ОН-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 рахиті, тоді як вплив 100 МО/день $3\beta\text{D}_3$ менше відрізнявся від дії 10 МО/день вітаміну D_3 .

Аналіз цих змін у амінокислотному складі колагену шкіри дозволяє припустити наявність кількох механізмів дії досліджуваних речовин. Розбіжність характерів дії надлишку Ca^{2+} і вітаміну 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 Ca^{2+} у організмі. Більш сильний вплив $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на колаген шкіри у порівнянні з вітаміном D_3 і деякі особливості його ефекту, можливо, пояснюються наявністю у фібробластах специфічного рецептору $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. 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 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 рН

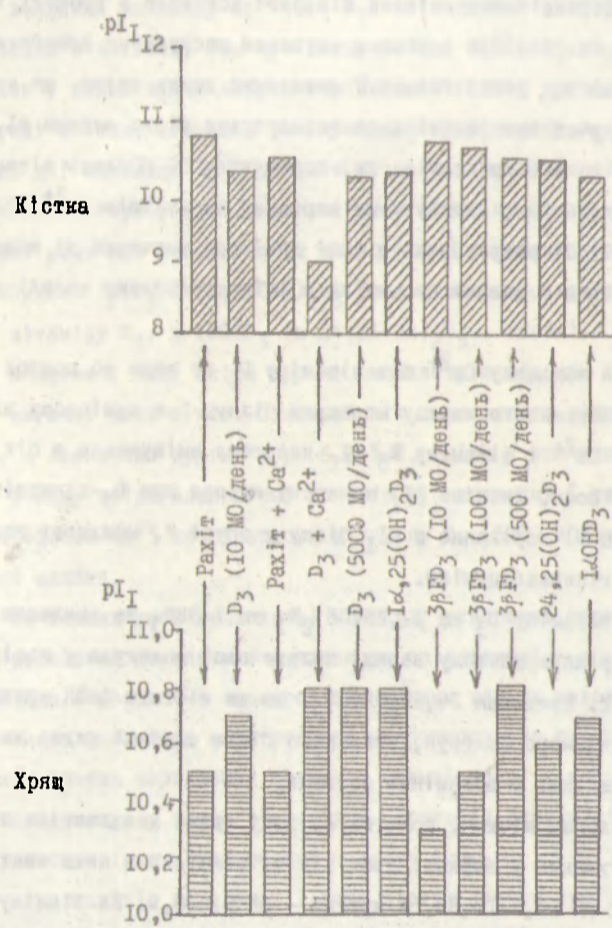


Рисунок 4. Ізоелектричні точки колагенів I та II типів при рахіті та введенні надлишку Са²⁺ і D-вітамінних сполук

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_I у порівнянні з колагеном птахів, які отримували 10 МО/день вітаміну D₃. Це може негативно вплинути на первинну акумуляцію Ca²⁺ під час кальцифікації. Ці результати та інші дані про значення рІ колагенів узгоджуються з даними про зміни в амінокислотному складі колагену.

Введення надлишку Ca²⁺ без вітаміну D₃ не веде до повної нормалізації поверхневого заряду молекули білку. При сумісному введенні надлишку Ca²⁺ і вітаміну D₃ рІ_I колагену зміщується в бік більш кислої зони. Кисліше рІ_I колагену курчат при D₃-гіпервітамінізові (група 5) порівняно з рІ_I білку у групі 2, можливо, також пов'язане з гіперкальціємією.

Заміна вітаміну D₃ на 1 α ,25(OH)₂D₃ та 1 α ОНD₃ не викликає помітних змін у поверхневому заряді колагенової молекули у порівнянні з групою 2. Введення 24,25(OH)₂D₃, що не містить 1 α ОН групи або 3 β FD₃, позбавленого ОН-груп, викликало більш слабкий вплив на рІ, ніж це робили інші D-вітамінні сполуки.

Як і колаген кісток, колаген ІІ 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_I білку курчат при рахіті, дещо зміщений в бік більш кислої зони, що може розглядатись як компенсаторна реакція організму на нестачу Ca²⁺. Більш кислий заряд молекули може сприяти первинній акумуляції Ca²⁺ на фібрилі колагену. Враховуючи, що при рахіті спостерігається сповільнений розвиток скелету і порушене формування нормальної кісткової тканини, стає про -

зумілою наявністю таких змін саме у колагені II типу хряща.

Введення надлишку Ca^{2+} (без D_3) не викликає значних змін pI_I порівняно з рахітом. При сумісному впливі Ca^{2+} і D_3 pI_I білку зміщується у більш лужну зону у порівнянні з обома контролями. Як і у колагені кістки, характер впливу надлишку вітаміну D_3 є аналогічним до дії надлишку Ca^{2+} разом з вітаміном D_3 . Наявність $\text{L}\alpha\text{OH}$ груп чи трьох OH -груп у молекулах похідних вітаміну D_3 не відіграла значної ролі для виявлення їх впливу на pI колагену хряща: ефекти $500 \text{ МО/день } 3\beta\text{FD}_3$ і $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ були однаково сильніші за дію самого вітаміну D_3 , а $1\alpha\text{OHD}_3$ 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 pI_I колагену I типу шкіри аналогічні до змін pI_I колагену I типу кістки, однак ефекти Ca^{2+} та гіпердози вітаміну D_3 (5000 МО/день) тут виявлені слабше.

За певних умов колагенові молекули утворюють агрегати, в яких вони розміщені паралельно і однаково орієнтовані - SLS -кристаліти. 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 (Кіпп К., 1982). Вивчення SLS -кристалітів колагенів I типу кістки курчат при рахиті 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 рахиті (порівняно із білком курчат, яким вводили по 10 МО вітаміну D_3 на день) спостерігається віддалення від N -кінця молекули і розши-

Відотань від N-кінця,

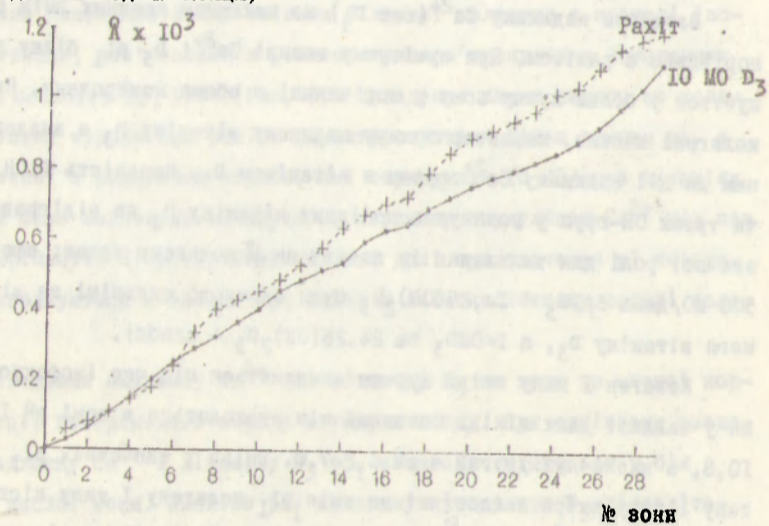


Рисунок 5. Локалізація полярних зон у молекулі колагену

I типу кістки при рахіті і введенні 10 МО/день

вітаміну D₃ (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 повні 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 навзовні. Отримані результати узгоджуються з даними амінокислотного аналізу, які свідчать про збільшення вмісту Ліз, Арг, Вал, Лей, Іле, Мет, Фен та Тир, і однією з яких є

Підтвердженням змін у геометрії самої колагенової спіралі при рахиті. Як і при вивченні амінокислотного складу, дослідження SLS-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 21-27 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 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 - №1-30. 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 $3\alpha\text{FD}_3$, значно менше відрізняється від групи 2, ніж це було відзначено у цих білках кістки та шкіри.

Таким чином, у ході проведених експериментів виявлена здатність сполук 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 сполучотканинних, шляхом, опосередкованим утворенням комплексів зі специфічними рецепторами. Крім того, дані літератури (Yamauchi *et al.* 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 D_3 стимулює на 60% включення ^{14}C -валіну до складу білків, що синтезуються. Ці дані узгоджуються з результатами Yamauchi M. (1989), який показав здатність $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ стимулювати включення ^3H -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-

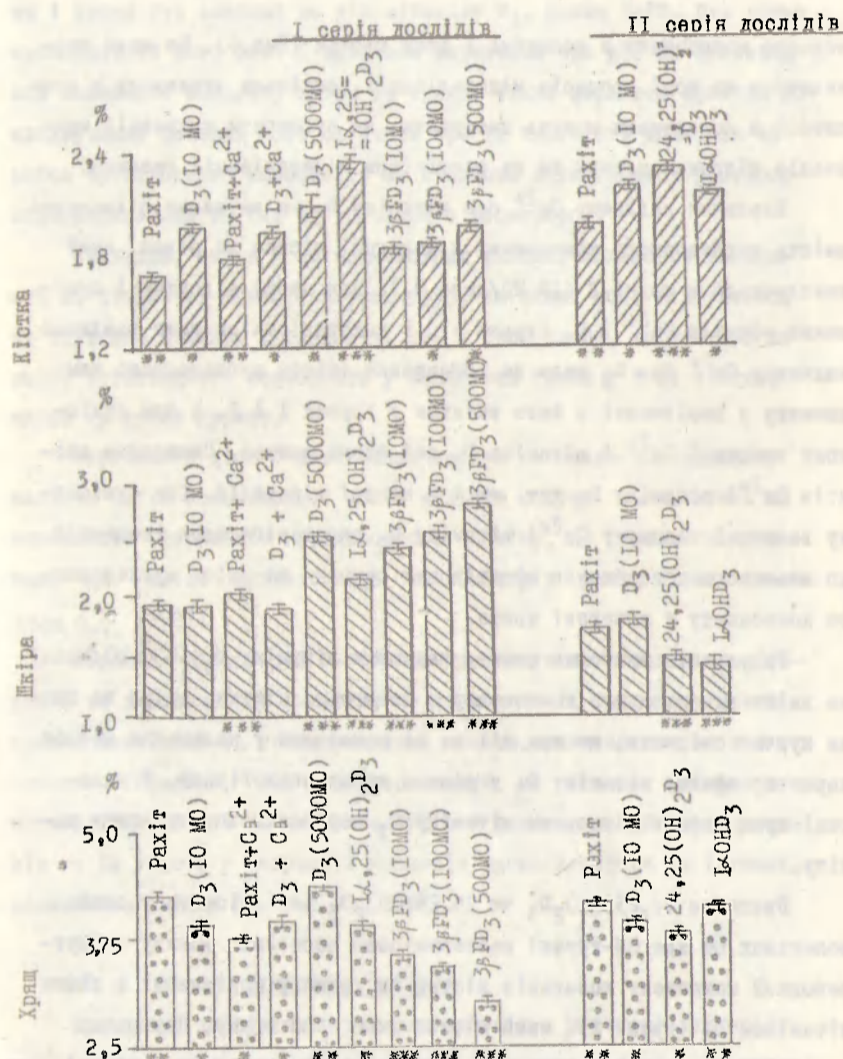


Рисунок 6. Вміст (%) вуглеводного компоненту у коллагені при рахіті та введенні надлишку Ca²⁺ і D-вітамінних сполук (M+n, n=5).

* - p<0,05 по відношенню до групи 1 (рахіт)
 ** - p<0,05 по відношенню до групи 2 (10 MO/день D₃)

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 Ca^{2+} без вітаміну D_3 не викликає підвищення вмісту вуглеводного компоненту у колагені кістки до рівня, який виявляється в групі 2 (10 МО/день D_3). При цьому відсутні і сумування ефектів Ca^{2+} і D_3 (група 4). У колагені шкіри лише введення надлишку Ca^{2+} без D_3 вело до збільшення вмісту вуглеводного компоненту у порівнянні з його вмістом у групах I і 2, а при сумісному введенні Ca^{2+} і вітаміну D_3 цей ефект зникав. Синергізм ефектів Ca^{2+} і вітаміну D_3 тут, як і в кістці відсутній. При сумісному введенні надлишку Ca^{2+} і вітаміну D_3 спостерігається тенденція до взаємного послаблення ефектів цих речовин на вміст вуглеводного компоненту у колагені хряща.

Результати вивчення впливу надлишку вітаміну 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 кісток характер ефекту вітаміну D_3 у різних дозах аналогічний. У колагені хряща ефект гіпердоз вітаміну D_3 переважає навіть вплив рахіту.

Введення $1\alpha,25(OH)_2D_3$ чи $24,25(OH)_2D_3$ (які містять у своїх молекулах по три OH-групи) забезпечувало посилення впливу на вуглеводний компонент колагенів кістки чи хряща у порівнянні з самим вітаміном D_3 (група 2), який містив лише 3OH групу. При цьому $1\alpha,25(OH)_2D_3$ сильніше впливав на вуглеводний компонент у кістці, а $24,25(OH)_2D_3$ - у хрящі, що цілком узгоджується з даними літератури (Вуанг В., 1988) про особливу роль $24,25(OH)_2D_3$ у регуляції функціонування хондроцитів у культурі клітин. Ефект $1\alpha(OH)_2$ (без 25-OH групи) на вміст вуглеводного компоненту у колагенах кіст-

ки і хряща був слабший за дію вітаміну D₂. Вплив 25FD₂ 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 (Wen-liche S., 1992).

Механізм прямої дії D-вітамінних сполук на процеси проліферації та диференціації клітин, що обумовлює їх імуномодулюючий, протилежкемічний 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 (Verdal 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 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 уоїх цих груп - найнижчу.

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

Відмінності у характерах ефектів 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 $3\beta\text{PD}_3$ (з низькою антирахітичною активністю) на вміст вільних амінокислот у сироватці крові вказують на можливість існування не лише рецептор-опосередкованого, але й неопосередкованого зв'язування 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 Ca^{2+} -каналів і без зв'язування з рецептором. У свою чергу зміни концентрації йонів кальцію позначаються на перебігу процесів біосинтезу білків (Ostrowski 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 Ca^{2+} , вітаміну 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 (Gurta A., 1989), через зміни в обміні кальцію, через біосинтез відповідних ферментів. Як і у випадку з впливом на вміст вільних амінокислот, очевидно, ефекти вітаміну D₃ та його похідних на вміст холестерину реалізуються за допомогою кількох механізмів, тому у даному випадку наявність OH-груп у їх молекулах не має того принципового значення, як для виявлення ними антирахітичної активності.

Порівняння ефектів Ca²⁺ та D-вітамінних сполук на колагени свідчить, що в даному випадку вплив вітаміну D₃ і його похідних реалізується головним чином за допомогою рецептор-опосередкованого шляху. У зв'язку з цим найбільш виражений вплив спричинюють 1 α ,25(OH)₂D₃ та 24,25(OH)₂D₃, чиї 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 Ca²⁺ (Бауман В., 1989), шляхом стимуляції біосинтезу кальційзв'язуючих білків і активного транспорту Ca²⁺. 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'язання зі специфічним рецептором, так і його відсутність; вплив, опосередкований змінами концентрації Ca^{2+} , так і безпосередньо дію D-вітамінних сполук в клітині. Зміни амінокислотного складу колагену позначається на клістичній функціональних груп, за якими відбувається зв'язування молекул вуглеводів. Крім того, зміни концентрації Ca^{2+} можуть позначатись на активності ферментів вуглеводного оміну (Бевілден С., 1992). Тому значний вплив на вуглеводний компонент колагену спричиняють не тільки глюкокортикоїди вітаміну D_3 , що специфічно зв'язуються в відповідних рецепторах, але і $3\beta D_3$, чия здатність до зв'язування з рецепторами є дуже низькою.

На підставі аналізу результатів височних 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 D_3 та його похідних, кількість і локалізація OH-груп у їх молекулах, співвідношення концентрації Ca^{2+} та даних сполук. При порушенні такого співвідношення, відсутності вітаміну D_3 , надлишку Ca^{2+} або вітаміну D_3 повна нормалізація гомеостазу кальцію не забезпечується. Введення кривих вітаміну D_3 (10 МО/день, 1, 25(OH) $_2D_3$ (2 МО/день), 1, 25(OH) $_2D_3$ (100 МО/день), 3 βD_3 (500 МО/день) забезпечувало нормалізацію гомеостазу кальцію в організмі.

2. У дослідженні вівця показано, що введення кривих надлишку кальцію (2, 1 β) в тварок вітаміну D_3 та його похідних приводило до змін місця вільних амінокислот у сироватці крові. Ефекти Ca^{2+} і вітаміну D_3 на вистільних амінокислот в ідрі вивчилися

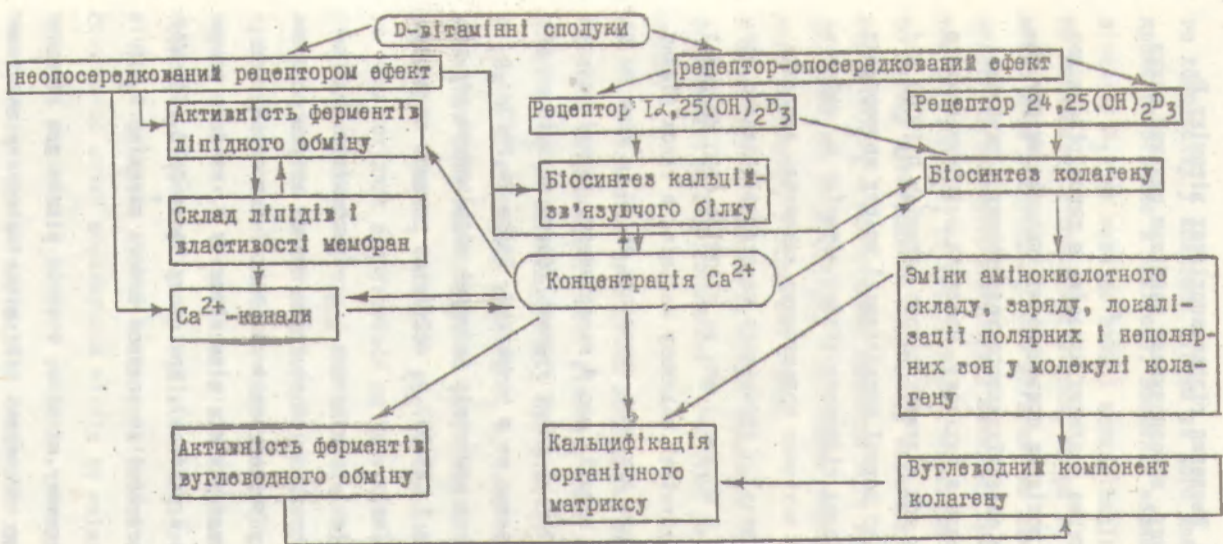


Рисунок 7. Загальна схема механізмів впливу D-вітамінних сполук на організм

за своїм характером. Введення гідроксипохідних вітаміну D_3 , які містили 1α ОН 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 $24,25(\text{OH})_2D_3$ (100 МО/день), а загального та етерифікованого холестерину - $1\alpha\text{OHD}_3$ (2,5 МО/день) або $24,25(\text{OH})_2D_3$ (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 $24,25(\text{OH})_2D_3$ на амінокислотний склад колагенів найменше відрізнявся від дії самого вітаміну D_3 , а $1\alpha,25(\text{OH})_2D_3$ найбільше впливав на поверхневий заряд даних білків.
5. Електронно-мікроскопічні дослідження EtS -кристалітів колагенів типів I та II кістки, шкіри та хряща курчат вперше встановили наявність змін у розташуванні полярних і неполярних зон вадок колагенової молекули під дією вітаміну D_3 та його фторпохідного (порівняно з рахітом). При цьому ефект $3\beta\text{FD}_3$ (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 вуглеводно-

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 $1\alpha,25(OH)_2D_3$ та $24,25(OH)_2D_3$ викликало найбільше підвищення вмісту вуглеводного компоненту колагену кістки, $1\alpha OH D_3$ та $24,25(OH)_2D_3$ - найсильніше зниження його вмісту у колагені шкіри, $3\beta FD_3$ та $24,25(OH)_2D_3$ - найбільше зниження вмісту вуглеводного компоненту у колагені хряща.

7. У безклітинній системі *in vitro* показана здатність $1\alpha,25(OH)_2D_3$ стимулювати на 60% включення ^{14}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-

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

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ЧАСОМ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Бондаренко Л.Б., Яхмозвич Р.І., Гогоман І.В., Валінінціє М.Ю., Колягін М.Ю. Вплив вітаміну D₃ на різні показники метаболізму кістки при рахіті і різній забезпеченості вітаміном D₃. // Докл. АН УРСР. - 1990. - №4. - С. 60-62.
2. Бондаренко Л.Б., Яхмозвич Р.І., Гогоман І.В., Валінінціє М.Ю. Вплив вітаміну D₃ на білки соединительной ткани // Конф. "Проблеми мікробного синтезу вітамінів і їх производних" (Ташкент, 1990г.). Тез. докл. - Ташкент, 1990. - С. 53-54.
3. Бондаренко Л.Б., Яхмозвич Р.І., Гогоман І.В., Валінінціє М.Ю. Вплив вітаміну D₃ на білки органічного матрикса кістки і шкіри цуплят // Докл. АН УССР. - 1990. - №5. - С. 67-70.
4. Бондаренко Л.Б., Яхмозвич Р.І., Гогоман І.В., Валінінціє М.Ю. Вплив вітаміну D₃ на пул свободних амінокислот і другі показники мікроциркуляції крові при різній забезпеченості кістки вітаміном D₃. // Докл. АН УССР. - 1990. - №9. - С. 54-57.
5. Яхмозвич Р.І., Гогоман І.В., Бондаренко Л.Б. К 15-летию синтеза первого фтораналога витамина D₃. Химическое и биологическое аспекты проблемы // Химия природ. соединений. - 1990. - №6. - С. 707-732.
6. Яхмозвич Р.І., Бондаренко Л.Б., Гогоман І.В., Валінінціє М.Ю. Вплив 3β-фторвітаміну D₃ і 1α,25-дигідроксивітаміну D₃ на показники метаболізму кістки цуплят // Докл. АН УССР. - 1991. - №5. - С. 149-151.
7. Бондаренко Л.Б., Яхмозвич Р.І., Гогоман І.В., Валінінціє М.Ю. Вплив 3β-фторвітаміну D₃ і 1α,25-дигідроксивітаміну D₃ на коллаген кістки і хряща цуплят // Докл. АН УССР. - 1991. - №7. - С. 138-143.

8. Бондаренко Л.Б., Яхмозвич Р.І., Гогоман І.В., Валінінціє М.Ю., Бауман В.К. Вплив вітаміну D₃ на метаболізм і фторпродукування кістки на різні біохімічні показники і соємительну тканину цуплят // Всесоюзное совещание "Новые аспекты участия биологически активных веществ в регуляции метаболизма и продуктивности сельскохозяйственных животных" (Боровок, 1991г.). Тез. докл. - Боровок, 1991. - С. 82-83.
9. Бондаренко Л.Б., Яхмозвич Р.І., Гогоман І.В., Бауман В.К. Вплив 3β-фторвітаміну D₃ і 1α,25-дигідроксивітаміну D₃ на амінокислотний склад коллагену шкіри курчат // Докл. АН України. - 1992. - №3. - С. 20-24.
10. Бондаренко Л.Б., Яхмозвич Р.І., Бауман В.К. Комплексний вплив ополудку D-вітаміну D₃ на різні сторони обміну речовин в організмі курчат. // Укр. біох. вісн., Київ, 25-28 травня 1992 р. - Київ, 1992. - С. 103.
11. Бондаренко Л.Б., Яхмозвич Р.І., Гогоман І.В. Нові аспекти біологічної активності речовини D-вітаміну природи // Тез. докл. конф. "Біологічні активні сполучення, синтез і використання" Пенза, 28-29 вересня 1992 г. - Пенза, 1992. - С. 92-93.
12. Бондаренко Л.Б., Яхмозвич Р.І., Гогоман І.В., Валінінціє М.Ю. Вплив вітаміну D₃ на біохімічні показники цуплят в нормі і при рахіті // Докл. АН України. - 1992. - №5. - С. 125-128.
13. Бондаренко Л.Б., Яхмозвич Р.І., Гогоман І.В., Валінінціє М.Ю. Вплив вітаміну D₃ на антирадіаційні показники, віст холестерину і ліпідів у лінійних амінокислот сироватки крові курчат // Докл. АН України. - 1992. - №7. - С. 149-153.
14. Бондаренко Л.Б., Яхмозвич Р.І., Гогоман І.В., Валінінціє М.Ю. Вплив вітаміну D₃ і кальційного раціонального аспекту біологічної активності // Тез. докл. Респ. науч. конф. "Біологічні проблеми харчування населення", Київ, 6-8 вересня 1992 г. - Київ, 1992. - С. 151.

15. Бондаренко Л.Б., Данилюк Т.П. Вплив вітаміну D₂ 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 D₃//Біополімери і клітка.-1992.-8, №5.-С.35-38.
17. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Бауман В.К. Влияние 1 α -оксивітаміна D₃ і 24,25-діоксивітаміна D₃ на коллагени кістки, шкіри і хряща щиплят//Біополімери і клітка.-1992.-8, №5.-С.38-44.
18. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Бауман В.К. Влияние навантаження Са на пул вільних амінокислот сироватки крові щиплят в нормі і при рахіті//Докл. АН України.-1992.-№9.-С.135-137.
19. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Бауман В.К. Коллаген щиплят при D-гіпервітамінозі//Докл. АН України.-1992.-№12.-С.105-110.
20. Бондаренко Л.Б., Харченко О.В., Бутович И.А. Вітаміни D₃ і 1,25-діоксивітаміни D₃ - інгібітори 5-ліпоксигенази//Біополімери і клітка.-1992.-8, №6.-С.41-43.
21. Яхимович Р.И., Бондаренко Л.Б., Серебряний С.Б. Влияние вітаміна D₂ на процеси мінералізації і склад білків з'єднаної тканини щиплят//Укр. біохім. журн.-1992.-64, №6.-С.58-64.
22. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Бауман В.К. Влияние 1 α -оксивітаміна D₃ і 24,25-діоксивітаміна D₃ на пул вільних амінокислот і інші показателі сироватки крові щиплят//Біополімери і клітка.-1993.-9, №1.-С.15-18.
23. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И., Бауман В.К. Влияние навантаження Са і вітаміна D₂ на коллагени кістки і шкіри щиплят//Докл. АН України.-1993.-№2.-С.146-151.
24. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И. Изоелектрические спектры коллагенов I типа кістки при рахіті і введенні різних речовин D-

- витаминой природы // Докл. АН Украины.- 1993.- № 4.- С.139-141
25. Bondarenko L.B., Kharchenko O.V., Butovich I.A. Vitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ are inhibitors of lipoxygenases // 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 Са та різних речовин D-вітамінної 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 - здравоохранению", Киев, 1993.- С.28.
29. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.И. Влияние избытка Са 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 D₃ // 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 D₃ on 5- and 15-lipoxygenases // Abs. 9th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds, Florence, Italy, 1994.- P.72.

32. Бондаренко Л.Б., Яхимович Р.І. 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. Изаоэлектрическое фокусирование коллагенов II типа хряща цыплят 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 D₃ - 1,25-диоксивитамин D₃ - 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-диоксивитамина D₃ 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-диоксивитаминном D₃//Хим.фарм.журнал.-1995.-№5.-С.17-19.
38. Bondarenko L.B., Kharchenko O.V., Butovich I.A. Hormonally active form of vitamin D₃ effects on bone collagen and mineral, hydrocarbon, lipid metabolism//Abs. 1st Int.Congr. of EPHAR, Milan, Italy, 1995.-Pharmacol.Res.-1995.-34.-P.88.
39. Бондаренко Л.Б. Регулирующее влияние витамина D₃ на обмен холестерина, углеводов и состояние белков соединительной ткани//Тез.докл.конф."Витамины и здоровье населения Беларуси", Гродно, 1995.-С.95.

Бондаренко Л.Б. Биологические функции витамина D₃ 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 D₃ и его производных *in vivo* и *in vitro*. Показано, что витамин D₃ 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 Ca²⁺, а также непосредственно, в зависимости от их химической структуры, дозы и концентрации ионов Ca²⁺.
Bondarenko L.B. Biological functions of vitamin D₃ 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 D₃ and its derivatives biological activity *in vivo* and *in vitro*. It has been shown that vitamin D₃ 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 Ca²⁺ concentrations and directly in dependence on their chemical structure, dose and Ca²⁺ concentrations.