

ОСОБЛИВОСТІ ГІДРОКСИЛЮВАННЯ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛУ В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ В УМОВАХ D-ГІПЕРВІТАМІНОЗУ ТА ЗА ДІЇ α -ТОКОФЕРОЛУ

М. М. ВЕЛИКИЙ, Л. І. АПУХОВСЬКА, В. М. ВАСИЛЕВСЬКА,
О. Ю. ЛОТОЦЬКА, А. І. БЕЗУСЯК, А. В. ХОМЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: veliky@biochem.kiev.ua

Продемонстровано, що гепатоцити містять дві вітамін D_3 25-гідроксилазні системи — мікросомну та мітохондріальну, які відрізняються за активністю та функціонують з максимальною швидкістю за різних концентрацій субстрату, а саме при 15 мкМ та 100 мкМ вітаміну D_3 відповідно.

Активність вітамін D_3 25-гідроксилазних систем гепатоцитів регулюється холекальциферолом та α -токоферолом. В умовах D-гіпервітамінозу на тлі гальмування загальної вітамін D_3 25-гідроксилазної активності гепатоцитів істотно знижується активність мікросомної та зростає активність мітохондріальної ізоформ ензиму. Вітамін E підвищує активність мікросомної вітамін D_3 25-гідроксилази і знижує активність мітохондріальної ізоформи ензиму в D-гіпервітамінозних щурів.

Встановлено, що D-гіпервітаміноз супроводжується вираженою гіперкальціємією, гіперфосфатемією, зниженням вмісту мінеральних компонентів у кістковій тканині та зростанням активності лужної фосфатази у сироватці крові. Фізіологічні дози вітаміну E нормалізують вміст мінеральних компонентів, обмін кальцію, фосфатів та активність ізоформ лужної фосфатази у крові щурів за D-гіпервітамінозу.

Ключові слова: 25ОНD₃, вітамін D₃ 25-гідроксилазна активність, вітаміни D₃, E, D-гіпервітаміноз, мінеральний обмін.

Метаболізм вітаміну D_3 в організмі забезпечується функціонуванням низки спеціалізованих ензимів, зокрема цитохромів P-450 (CYP2R1, CYP27A1, CYP27B1), які забезпечують утворення активних метаболітів та катаболітного цитохрому P-450 CYP24A1. Останній відіграє вирішальну роль у деградації 25-гідроксिवітаміну D_3 (25ОНD₃) та $1\alpha,25(\text{OH})_2D_3$, оскільки гідроксильє бічний ланцюг цих гідроксилохідних та ініціює шлях розщеплення, відомий як C-24-шлях окислення [1, 2]. Активне функціонування C-24-шляху окислення захищає організм від надлишкового утворення активних форм вітаміну D_3 . Життєво важлива роль CYP24A1 була продемонстрована на CYP24A1 нокаутних мишах. Втрата здатності до розщеплення метаболітів вітаміну D_3 по шляху C-24 окислення або утворення 26,36-лактону, веде до розвитку гіперкальціємії, нефрокальцинозу та смертності 50% тварин [3]. D-Гіпервітаміноз, спричинений надлишковим надходженням вітаміну D_3 в організм, також супроводжується гіперкальціємією, гіперфосфатемією та гіперкальційурією. Механізм неконтрольованої активації систем сигнальної трансдукції за участю вітаміну D_3 може бути обумовлений

нездатністю катаболітних ензимів ефективно знижувати рівень активних гідроксильованих метаболітів вітаміну D_3 [1].

Вважається, що коректним показником ступеня забезпеченості організму вітаміном D_3 є вміст гідроксильованої форми вітаміну — 25ОНD₃ у сироватці крові. За нормального забезпечення організму вітаміном D_3 вміст 25ОНD₃ у сироватці крові знаходиться в межах 100–225 нмоль·л⁻¹ (40–90 нг·мл⁻¹). Для досягнення такого рівня забезпеченості добове надходження вітаміну D_3 має складати як мінімум 1000 МО (25 мкг) для дітей і 2000 МО (50 мкг) для дорослих [4]. Зниження вмісту 25ОНD₃ у сироватці крові нижче 75 нмоль·л⁻¹ свідчить про недостатню забезпеченість організму вітаміном D_3 [5, 6]. При концентрації 25ОНD₃ у сироватці крові 375–500 нмоль·л⁻¹ спостерігаються прояви гіперкальціємії та гіпервітамінозу [7]. Токсичні прояви гіпервітамінозу D спостерігаються при рівні 25ОНD₃ у сироватці крові вище 750 нмоль·л⁻¹ (300 нг·мл⁻¹), що має місце у разі вживання щодоби більше 40000 МО вітаміну D_3 протягом тривалого часу [1, 8].

Метою роботи було дослідити активність мікросомної та мітохондріальної ізоформ вітаміну D_3 25-гідроксилази за умови D-гіпер-

вітамінозу в щурів та вплив вітаміну Е на швидкість утворення гідроксильованої форми вітаміну D₃ – 25ОНD₃.

Матеріали і методи

D-Гіпервітаміноз (експериментальна модель) спричинювали шляхом введення щурам по 30 000 МО (750 мкг) вітаміну D₃ щодобово протягом 5 діб. Починаючи з третьої доби після закінчення введення холекальциферолу щурам, щодобово протягом 6 діб вводили вітамін Е в дозі 7,26 МО (6,0 мг). Тварин з D-гіпервітамінозом, яким не вводили вітамін Е, поділили на дві групи: тварин першої забивали на другу добу після закінчення введення вітаміну D₃, а другої – через 9 діб, одночасно з тваринами груп, які отримували вітамін Е. Тварин контрольної та дослідної груп утримували на дієті віварію.

Вміст 25ОНD₃ у сироватці крові визначали методом радіо-конкурентного зв'язування [³H] холекальциферолу згідно з описаним у статтях [9, 10]. Печінку відмивали від крові фізіологічним розчином через ворітну вену. Гепатоцити одержували після інкубації тканини у фосфатному буфері з колагеназою при 37 °С протягом 2 годин із подальшим диференційним центрифугуванням [11]. Чистоту фракції гепатоцитів контролювали гістохімічним методом після фарбування їх гематоксиліном Бомера. Кількість клітин підраховували в камері Горяєва.

Активність вітамін D₃ 25-гідроксилазних ензимів визначали в досліді *in vitro* шляхом інкубації гепатоцитів у буфері, що містив 5–200 мкМ неміченого вітаміну D₃, який вносили в 20 мкл абсолютного етанолу [10]. Вітамін D₃ попередньо інкубували у буфері з альбуміном протягом 30 хв для зв'язування холекальциферолу із транспортним протеїном-альбуміном. Потім в інкубаційне середовище вносили гепатоцити та інкубували їх, струшуючи зі швидкістю 120 коливань/хв при 37 °С протягом 2 годин. Реакцію зупиняли шляхом внесення у проби суміші розчинників хлороформ–метанол (2 : 1). Екстракцію, колоночну хроматографію та кількісне визначення 25ОНD₃ проводили згідно з описаними в роботах [9, 10]. Вітамін D₃ 25-гідроксилазну активність виражали в пмолях утвореного 25ОНD₃ за 2 год інкубації 10⁶ клітин гепатоцитів.

Рівень кальцію у сироватці крові та активність загальної лужної фосфатази визначали за допомогою біо-тест наборів (ЛАХЕМА, Чехія). Вміст неорганічного фосфату в сироватці крові визначали після осадження протеїнів 12%-м розчином ТХО кислоти методом Дусе [12]. Ак-

тивність її ізоензимів визначали з використанням інгібіторів згідно з описаним [13, 14].

Усі маніпуляції з тваринами проводили під легким ефірним наркозом, без порушень норм гуманного поводження з лабораторними тваринами, що не суперечить загальноприйнятим біоетичним нормам із дотримання відповідних міжнародних положень стосовно проведення експериментальних робіт. Статистичну вірогідність результатів оцінювали у програмі SigmaPlot2000 з використанням *t*-критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

Першим етапом перетворення холекальциферолу на біологічно активні форми є його гідроксильовання в 25-му положенні з утворенням основної транспортної та кумулятивної форми – 25-гідроксивітаміну D₃ (25ОНD₃). Процес перебігає у тканині печінки з участю вітамін D₃ 25-гідроксилазних систем. Швидкість утворення 25ОНD₃ є показником інтенсивності перебігу процесів гідроксильовання вітаміну D₃ в окремих компартментах гепатоцитів, а його рівень у крові відображає забезпеченість організму вітаміном D₃ [5, 6]. Швидкість гідроксильовання вітаміну D₃ у гепатоцитах значною мірою обумовлюється інтенсивністю його надходження у клітини. Згідно з нашими попередніми дослідженнями та даними літератури, печінкою із кровотоку поглинається біля 60–70% холекальциферолу, який розподіляється по клітинах органу: гепатоцитах (паренхімальних клітинах) та «купферовських» клітинах ретикулоендотеліальної системи, які формують синусоїдні стінки. Однак гідроксильовання вітаміну D₃ відбувається тільки у гепатоцитах, а купферовські клітини відіграють роль депо щодо вітаміну D₃ [9, 10, 15].

Проведені нами дослідження субклітинного розподілу включеного у гепатоцити [³H]-холекальциферолу продемонстрували, що поглинута мітка акумулюється у приблизно однаковій кількості в двох клітинних фракціях – 20,4% у фракції мікросом та 19,3% у фракції мітохондрій. Ці результати узгоджуються із внутрішньоклітинною локалізацією ензимів, які гідроксильовують вітамін D₃ у 25 положенні [2, 16].

Наявність двох вітамін D₃ 25-гідроксилазних систем в мікросомах і мітохондріях гепатоцитів передбачає відмінності в регуляції їхньої активності та кінетичних характеристиках. Результати дослідження залежності загальної вітамін D₃ 25-гідроксилазної актив-

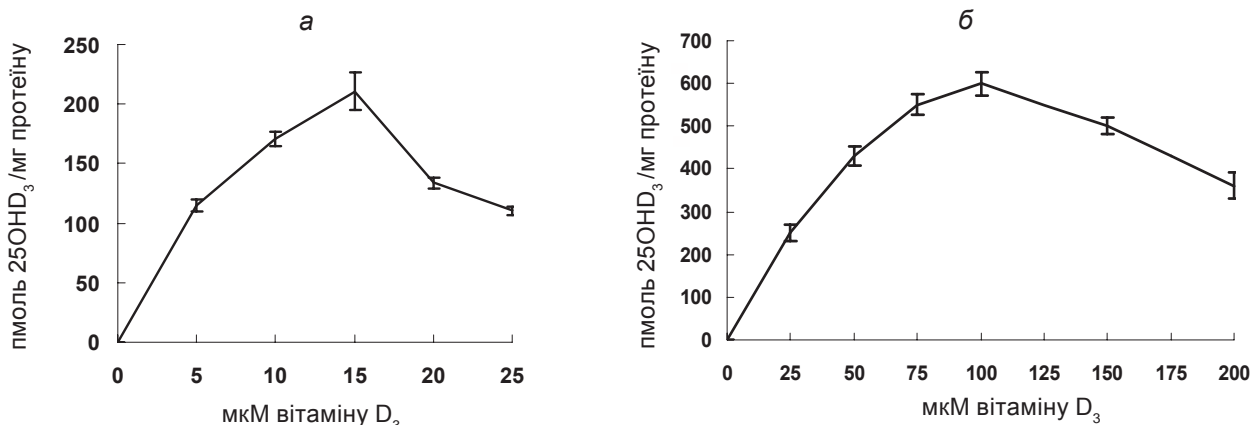


Рис. 1. Концентраційна залежність вітамін D₃ 25-гідроксилазної активності фракції мікросом (а) та мітохондрій (б) печінки контрольних тварин ($M \pm m$, $n = 6$)

ності ізольованих гепатоцитів від концентрації субстрату – вітаміну D₃, в межах від 5 мкМ до 150 мкМ, демонструють наявність двох піків активності (табл. 1), що відповідає наявності в гепатоцитах двох ізоформ ензиму [2]. При дослідженні їхнього субклітинного розподілу максимум активності у фракції мікросом гепатоцитів виявлено при концентрації 15 мкМ вітаміну D₃ в середовищі, та у фракції мітохондрій при концентрації 100 мкМ (рис. 1). Ці концентрації були використані в подальших дослідженнях активності мікросомної та мітохондріальної ізоформ вітамін D₃ 25-гідроксилази за D-гіпервітамінозу та за дії вітаміну E.

Вітамін D₃ 25-гідроксилазні ензими гепатоцитів належать до родини цитохромів P-450. Мікросомна форма вітамін D₃ 25-гідроксилази (CYP2R1, CYP2J2/3) вважається регуляторним ензимом, який активно функціонує при фізіологічних концентраціях вітаміну. Цей ензим характеризується високою спорідненістю (K_m в межах 28 нМ – 0,4 мкМ) та низькою ємністю зв'язування по відношенню до субстрату [15, 17]. Його активність інгібується як субстратом, так і продуктом реакції – 25OH D₃. Найбільшу активність ензиму виявлено при D-гіповітамінозі та продемонстровано інгібування до 61% від загальної активності ензиму за дії високих доз холекальциферолу. Мітохондріальна вітамін D₃ 25-гідроксилаза (CYP27A1), яка локалізована на внутрішній поверхні мембрани, має низьку спорідненість (K_m від 0,4 мкМ до 20 мкМ), але високу ємність зв'язування, а тому активно функціонує при високих концентраціях субстрату. Вважають, що активність цього ензиму не регулюється ані вмістом холекальциферолу, ані продуктом реакції – 25OH D₃, хоча єдиної точки зору щодо цього питання не існує [2, 6].

Виходячи з викладеного, ми дослідили швидкість утворення 25OH D₃ та активність вітамін D₃ 25-гідроксилазної системи в умовах D-гіпервітамінозу, тобто за високого вмісту 25OH D₃ в сироватці крові та гепатоцитах. Незаперечним доказом розвитку гіпервітамінозу D у піддослідних щурів є виявлене в наших дослідах значне зростання вмісту гідроксильованої форми вітаміну – 25OH D₃ в сироватці крові. Введення щурам протягом 5 діб по 30 000 МО вітаміну D₃ щодобово зумовлює зростання вмісту 25OH D₃ в 10 разів на другу добу та в 3,5 раза на 9-у добу після припинення вітамінного навантаження. Зростання вмісту 25OH D₃ у сироватці крові D-гіпервітамінозних щурів супроводжується зниженням загальної 25-гідроксилазної активності ізольо-

Таблиця 1. Вітамін D₃ 25-гідроксилазна активність ізольованих гепатоцитів контрольних тварин при різних концентраціях субстрату – вітаміну D₃ ($M \pm m$, $n = 6$)

Концентрація вітаміну D ₃ в середовищі інкубації, мкМ	Вітамін D ₃ 25-гідроксилазна активність, пмоль 25OH D ₃ · 10 ⁻⁶ клітин
5	8,1 ± 0,3
10	12,0 ± 0,4
15	13,1 ± 0,6
20	10,8 ± 0,5
25	8,0 ± 0,4
50	18,5 ± 0,7
100	19,7 ± 0,8
150	15,1 ± 0,7

ваних гепатоцитів порівняно з контролем як на 2-у добу (на 44,9%), так і особливо на 9-у добу (на 55,6%) після припинення введення щурам високих доз вітаміну D₃ (рис. 2).

На тлі зниження загальної вітамін D₃ 25-гідроксилазної активності в ізольованих гепатоцитах за D-гіпервітамінозу, представляло інтерес з'ясувати, як змінюється активність мікросомної та мітохондріальної вітамін D₃ 25-гідроксилази за цих умов. Ми дослідили активність ензимів у разі внесення в середовище інкубації 30 нмоль (15 мкМ) та 200 нмоль (100 мкМ) вітаміну D₃, тобто тих концентрацій, за яких активність мікросомної та мітохондріальної ізоформ є самою високою. З даних, наведених на рис. 3, видно, що за D-гіпервітамінозу активність мікросомальної вітамін D₃ 25-гідроксилази істотно, майже в 2 рази (на 49,1%) знижується, що підтверджує те, що ця ізоформа ензиму регулюється як вітамінним статусом організму, так і вмістом продукту реакції – 25ОНD₃. Активність мітохондріальної ізоформи вітамін D₃ 25-гідроксилази, навпаки, зростає при D-гіпервітамінозі на 27,5%.

Отже, одержані дані підтверджують припущення, що залежно від D₃ вітамінного статусу організму у процесі гідроксилування вітаміну D₃ відбувається розподіл функцій між двома типами гідроксилаз: при низьких концентраціях вітаміну D₃ більше функціональне навантаження несе вітамін D₃ 25-гідроксилаза мікросом, активність якої регулюється продуктом реакції, а при високій концентрації субстрату – мітохондріальна ізоформа гідроксилази [2, 15, 17].

Аналізуючи механізм токсичної дії вітаміну D₃ в умовах D-гіпервітамінозу, необхідно враховувати, що ліпофільна природа вітаміну D₃ обумовлює його повільний обмін в організмі з періодом піврозпаду вітаміну близько двох–трьох місяців. Основний метаболіт вітаміну та його транспортна форма – 25ОНD₃ має період півжиття 15 діб, а гормональна форма вітаміну 1α,25(ОН)₂D₃ лише 15 годин [1]. Виходячи з цього в літературі обговорюються три можливих механізми токсичної дії вітаміну D₃, які реалізуються через зв'язування активних метаболітів зі специфічним рецептором вітаміну D₃ в ядрах клітин-мішеней та через зміни в експресії певних генів. Зокрема: 1) Надлишкове надходження вітаміну D₃ підвищує концентрацію 1α,25(ОН)₂D₃ у плазмі крові, що зумовлює зростання концентрації 1α,25(ОН)₂D₃ в клітинах-мішенях. Однак експериментальні дані свідчать, що D-гіпервітаміноз не супроводжується істотним підвищенням вмісту гормональної форми вітаміну – 1α,25(ОН)₂D₃. 2) Надлишкове надходження вітаміну D₃ підвищує концентрацію 25ОНD₃ у плазмі крові до мілімолярної, що веде до повного насичення ним вітамін D₃-зв'язувального протеїну. Надлишок «вільного» 25ОНD₃ надходить у клітини та безпосередньо впливає на експресію генів. 3) Посилене надходження вітаміну D₃ підвищує концентрацію всіх його метаболітів, і особливо 25ОНD₃ у плазмі крові. Надлишок 25ОНD₃ насичує вітамін D₃-зв'язувальний протеїн і тим самим витісняє з комплексу «вільний» 1α,25(ОН)₂D₃, який надходить у клітини-мішені і діє на геном.

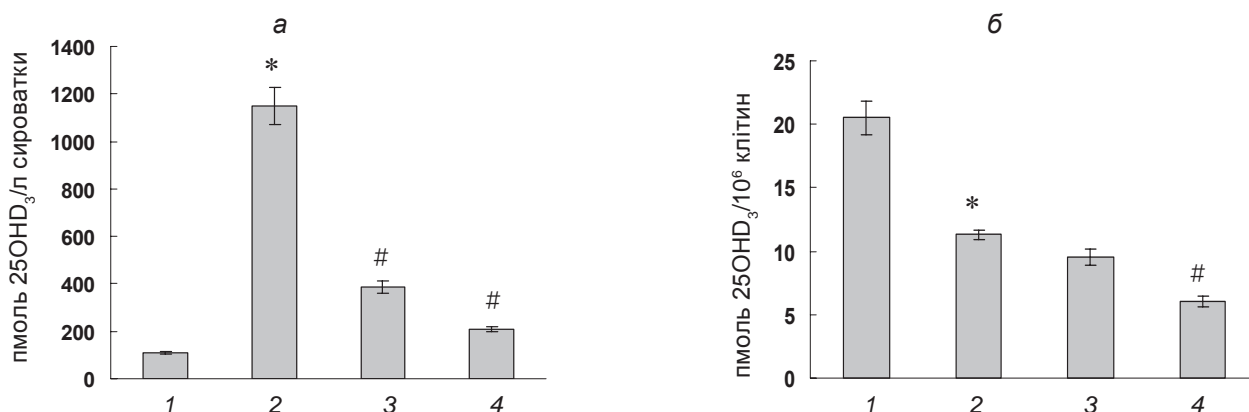


Рис. 2. Вміст 25ОНD₃ в сироватці крові щурів (а) та вітамін D₃ 25-гідроксилазна активність гепатоцитів (б) за введення вітаміну E на тлі D-гіпервітамінозу: 1 – контроль; 2 – D-гіпервітаміноз (2 доба); 3 – D-гіпервітаміноз (9 доба); 4 – D-гіпервітаміноз + 7,26 МО вітаміну E Тут і на рис. 3 * різниця порівняно з контролем вірогідна (P < 0,05); # різниця порівняно з групою D-гіпервітамінозних тварин вірогідна (P < 0,05)

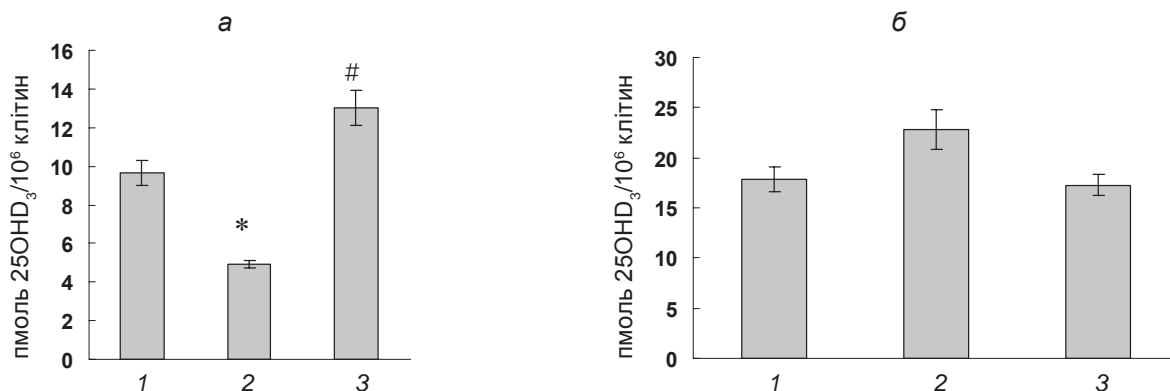


Рис. 3. Вітамін D₃ 25-гідроксилазна активність фракції мікросом (а) та мітохондрій (б) печінки за введення вітаміну Е на тлі D-гіпервітамінозу: 1 – контроль; 2 – D-гіпервітаміноз; 3 – D-гіпервітаміноз + 7,26 МО вітаміну Е

Гіпотези 2 та 3 ґрунтуються на уявленнях про низьку афінність 1 α ,25(OH)₂D₃ до транспортного вітаміну D₃-зв'язувального протеїну та високу афінність до рецептора вітаміну D₃, що робить його основним лігандом у реалізації сигналу транскрипції. Вища афінність 25OHD₃ до транспортного вітаміну D₃-зв'язувального протеїну за його високої концентрації при D-гіпервітамінозі веде до насичення вітаміну D₃-зв'язувального протеїну та вивільнення частини 1 α ,25(OH)₂D₃ зі зв'язаного стану і появи його «вільної» форми, яка безпосередньо впливає на клітини-мішені. Аналогічно може діяти і частка «вільного» 25OHD₃, вміст якого істотно зростає при D-гіпервітамінозі [1].

Показано, що вітамін Е – важливий регулятор метаболізму вітаміну D₃ та виявлення його фізіологічної функції в регуляції мінерального обміну [16, 18, 19]. Тому ми вважали необхідним провести дослідження впливу вітаміну Е на активність ензимів гідроксилювання вітаміну D₃ в умовах D-гіпервітамінозу. Встановлено, що у щурів, яким на тлі D-гіпервітамінозу протягом 5 днів щодобово вводили вітамін Е в дозі 7,26 МО, істотно (на 46,5%) знижується вміст як 25OHD₃ в сироватці крові, так і загальна вітамін D₃ 25-гідроксилазна активність (на 36,6%) гепатоцитів (рис. 2).

Оскільки було виявлено на гепатоцитах й субклітинних фракціях, що максимальна активність двох форм вітаміну D₃ 25-гідроксилаз виявляється за різного вмісту холекальциферолу в середовищі інкубації, ми вважали доцільним дослідити активність мікросомної та мітохондріальної форм вітаміну D₃ 25-гідроксилаз за введення вітаміну Е на тлі D-гіпервітамінозу. Як видно із наведених на рис. 3 даних, знижена при D-гіпервітамінозі вітамін D₃ 25-гідроксилазна активність мікросомної фракції гепа-

тоцитів зростає за введення щурам вітаміну Е в 2,6 раза (на 165%), що навіть перевищує значення контролю. Зміни вітамін D₃ 25-гідроксилазної активності мітохондрій гепатоцитів в умовах D-гіпервітамінозу мають протилежну спрямованість, а саме виявлено зростання активності на 27,5%. Введення щурам вітаміну Е на тлі D-гіпервітамінозу знижує активність цього ізоензиму до рівня контролю. Одержані результати свідчать, що в умовах D-гіпервітамінозу активність вітаміну D₃ 25-гідроксилаз гепатоцитів регулюється вітамінами D₃ та Е.

Однією з основних причин порушення мінерального обміну та захворювань кісткової тканини (остеопороз, остеомаліція тощо) є не тільки зниження забезпеченості організму активними метаболітами вітаміну D₃, але й демінералізація кісткової тканини в умовах D-гіпервітамінозу. При цьому важливим регулятором обміну вітаміну D₃ та виявлення його біологічної функції є вітамін Е. Вітамін Е позитивно впливає на мінеральний обмін в організмі через регуляцію активності вітаміну D₃ 25-гідроксилазних ензимів та транспортування холекальциферолу в гепатоцити шляхом модифікації ліпідного складу мембран [18]. Як показано раніше, цей ефект є дозозалежним: фізіологічні дози вітаміну Е активують, а високі дози – інгібують біологічну дію вітаміну D₃ в регуляції мінерального обміну в різних тканинах. Сумісне використання вітамінів D₃ та Е виявляє синергізм їхньої дії, а ефект є дозозалежним [19].

Враховуючи виявлений факт інгібування мікросомної та активації мітохондріальної форм вітаміну D₃ 25-гідроксилаз при високих концентраціях вітаміну D₃, а також пряму дію α -токоферолу на активність досліджуваних ензимів, можна припустити, що саме зміни ак-

тивності досліджуваних ензимів можуть бути одним із можливих механізмів позитивного впливу вітаміну Е при D-гіпервітамінозі. Тому наступним завданням було дослідити взаємодію вітамінів D₃ і Е в регуляції мінерального обміну та їхній вплив на активність маркерного ензиму, що характеризує процес мінералізації кісткової тканини – лужної фосфатази і її ізоензимів.

Стан D-гіпервітамінозу характеризується чітко вираженою гіперкальціємією та гіперфосфатемією. Як на другу, так і особливо на дев'яту добу після завершення введення вітаміну D₃ у сироватці крові зростає вміст загального (на 39,3%), протеїнзв'язаного (на 20,8%) та ультрафільтрованого (на 43,4%) кальцію з паралельним незначним зростанням вмісту неорганічного фосфату (на 9,5%) (табл. 2). Причому зростає відношення ультрафільтрованого кальцію до протеїнзв'язаного з 8,16 в нормі до 9,71 при D-гіпервітамінозі. Вимивання кальцію та фосфату з кісткової тканини за D-гіпервітамінозу обумовлює також значне зниження вмісту мінеральних компонентів у цій тканині. Зокрема, у кістковій тканині на дев'яту добу знижується зольність (на 14,6%), вміст кальцію (на 24,9%) та фосфору (на 42,0%) у золі (табл. 3).

Введення D-гіпервітамінозним щурам вітаміну Е спричинювало зниження вмісту мінеральних компонентів у сироватці крові. Зокрема, знижується вміст загального (на 23,8%), протеїнзв'язаного (на 20,7%), ультрафільтрованого (на 17,5%) кальцію та неорганічного фосфату (на 11,2%) за відсутності вірогідних змін відношення ультрафільтрованого до протеїнзв'язаного кальцію. Зниження вмісту кальцію і фосфатів у сироватці крові D-гіпервітамінозних щурів під впливом введено-

го вітаміну Е обумовлює нормалізацію вмісту мінеральних компонентів у кістковій тканині. Зокрема, за введення вітаміну Е D-гіпервітамінозним тваринам зольність, вміст кальцію та фосфору у кістковій тканині практично не відрізняється від показників у контрольних щурів (табл. 3).

При D-гіпервітамінозі зростає активність лужної фосфатази в сироватці крові, яка є маркером структурно-функціонального стану кісткової тканини. Основний вклад у зростання загальної активності ензиму (на 23,2%) вносить кісткова ізоформа, яка складає 69,5% від загальної активності лужної фосфатази сироватки крові та активність якої зростає при D-гіпервітамінозі на 47,7% (табл. 4). Нормалізація обміну кальцію і фосфатів під впливом вітаміну Е супроводжується зниженням і наближенням до значень контролю активності загальної лужної фосфатази (на 14,6%) та її кісткової ізоформи (на 14,9%) у сироватці крові. Отже фізіологічні дози вітаміну Е знижують підвищений при D-гіпервітамінозі вміст мінеральних компонентів у крові щурів та нормалізують обмін кальцію і фосфатів у кістковій тканині.

Таким чином, представлені результати щодо особливостей регуляції процесів гідроксилування холекальциферолу в умовах D-гіпервітамінозу та дії вітаміну Е дають можливість дійти наступних висновків:

1. Мікросомна та мітохондріальна вітамін D₃ 25-гідроксилази відрізняються за максимумом активності при різних концентраціях субстрату – вітаміну D₃.

2. В умовах D-гіпервітамінозу зростає вміст 25ОНD₃ в сироватці крові та гальмується активність мікросомної ізоформи вітамін D₃ 25-гідроксилази.

Таблиця 2. Вміст різних форм кальцію і фосфатів у сироватці крові щурів в умовах D-гіпервітамінозу та за дії вітаміну Е ($M \pm m$, $n = 6$)

Дослідні групи	Кальцій, ммоль·л ⁻¹			Фосфат неорг., ммоль·л ⁻¹
	Загальний	Протеїнзв'язаний	Ультрафільтрований	
Контроль	2,24 ± 0,05	0,24 ± 0,01	1,96 ± 0,04	1,89 ± 0,04
D-гіпервітаміноз, 2 доба	3,01 ± 0,09*	0,28 ± 0,01*	2,73 ± 0,07*	2,40 ± 0,06*
D-гіпервітаміноз, 9 доба	3,12 ± 0,07*	0,29 ± 0,02*	2,81 ± 0,08*	2,07 ± 0,05*
D-гіпервітаміноз + 7,26 МО вітаміну Е	2,38 ± 0,05 [#]	0,23 ± 0,01 [#]	2,32 ± 0,05 [#]	1,84 ± 0,04 [#]

Тут і в табл. 3–4 *різниця порівняно з контролем вірогідна ($P < 0,05$); [#] різниця порівняно з групою D-гіпервітамінозних тварин вірогідна ($P < 0,05$)

Таблиця 3. Вміст мінеральних компонентів у кістковій тканині в умовах D-гіпервітамінозу та за дії вітаміну E ($M \pm m$, $n = 6$)

Дослідні групи	Зольність, %	Вміст кальцію в золі, %	Вміст фосфору в золі, %
Контроль	59,6 ± 0,3	39,4 ± 0,2	16,2 ± 0,6
D-гіпервітаміноз, 2 доба	47,3 ± 0,2*	25,3 ± 0,2*	8,7 ± 0,3*
D-гіпервітаміноз, 9 доба	50,9 ± 0,5*	29,6 ± 0,4*	9,4 ± 0,4*
D-гіпервітаміноз + 7,26 МО вітаміну E	58,0 ± 0,4#	40,1 ± 0,4#	15,6 ± 0,7#

Таблиця 4. Активність лужної фосфатази та її ізоформ в умовах D-гіпервітамінозу та за дії вітаміну E ($M \pm m$, $n = 6$)

Дослідні групи	Активність лужної фосфатази, МОл ⁻¹		
	Загальна	Кісткова ізоформа	Кишкова ізоформа
Контроль	238,1 ± 8,0	165,7 ± 6,1	39,4 ± 2,4
D-гіпервітаміноз, 2 доба	320,0 ± 9,3*	244,8 ± 5,8*	75,6 ± 3,9*
D-гіпервітаміноз, 9 доба	293,2 ± 7,8*	203,3 ± 6,4*	68,8 ± 5,1*
D-гіпервітаміноз + 7,26 МО вітаміну E	250,4 ± 7,6#	173,1 ± 4,8#	52,0 ± 3,1#

3. Введення вітаміну E щурам на тлі D-гіпервітамінозу знижує вміст 25ОНD₃ в сироватці крові та підвищує активність мікросомної вітаміну D₃ 25-гідроксилази, що свідчить про регуляцію процесів гідроксилювання у гепатоцитах вітамінами D₃ та E.

4. Вітамін E нормалізує зміни вмісту мінеральних компонентів, обмін кальцію, фосфатів та активність ізоформ лужної фосфатази, обумовлені D-гіпервітамінозом.

ОСОБЕННОСТИ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ D-ГИПЕРВИТАМИНОЗЕ И ДЕЙСТВИИ α-ТОКОФЕРОЛА

Н. Н. Великий, Л. И. Апуховская,
В. Н. Василевская, Е. Е. Лотоцкая,
А. И. Безусяк, А. В. Хоменко

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: veliky@biochem.kiev.ua

Продемонстрировано, что гепатоциты содержат две витамин D₃ 25-гидроксилазные системы – микросомную и митохондриальную, которые отличаются по активности и функционируют с максимальной активностью

при разных концентрациях субстрата, а именно при 15 мкМ и 100 мкМ витамина D₃ соответственно.

Активность витамин D₃ 25-гидроксилазных систем гепатоцитов регулируется холекальциферолом и α-токоферолом. При D-гипервитаминозе на фоне ингибирования общей витамин D₃ 25-гидроксилазной активности гепатоцитов существенно снижается активность микросомной и увеличивается активность митохондриальной изоформ энзима. Витамин E повышает активность микросомальной витамин D₃ 25-гидроксилазы и снижает активность митохондриальной изоформы энзима у D-гипервитаминозных крыс.

Показано, что D-гипервитаминоз сопровождается выраженной гиперкальциемией, гиперфосфатемией, снижением содержания минеральных компонентов в костной ткани и увеличением активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови. Физиологические дозы витамина E нормализуют содержание минеральных компонентов, обмен кальция, фосфатов и активность изоформ щелочной фосфатазы в крови крыс при D-гипервитаминозе.

Ключевые слова: витамин D₃, E, 25ОНD₃, витамин D₃ 25-гидроксилазная активность, D-гипервитаминоз, минеральный обмен.

**FEATURES OF CHOLECALCIFEROL
HYDROXYLATION PROCESS
IN THE LIVER OF RATS UNDER
D-HYPERVITAMINOSIS CONDITIONS
AND ACTIONS OF α -TOCOPHEROL**

*M. M. Veliky, L. I. Apukhovska,
V. M. Vasylevska, O. Ju. Lototska,
A. I. Bezusiak, A. V. Chomenko*

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: veliky@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

It is shown, that hepatocytes contain two (microsomal and mitochondrial) vitamin D₃ 25-hydroxylase enzymes, which differ as to their activity and function with maximal activity at different concentrations to substrate, namely at 15 μ M and 100 μ M of vitamin D₃, accordingly.

Activity of vitamin D₃ 25-hydroxylase enzymes of hepatocytes is regulated by cholecalciferol and α -tocopherol. The general and microsomal vitamin D₃ 25-hydroxylase enzymes activity of hepatocytes is lowered, but mitochondrial isoform is increased under D-hypervitaminosis conditions. Vitamin E increases microsomal vitamin D₃ 25-hydroxylase activity and decreases mitochondrial isoform activity of rats hepatocytes under D-hypervitaminosis conditions.

It is established that D-hypervitaminosis is accompanied by expressed hypercalcemia and hyperphosphatemia, by decreased contents of mineral components in the bone tissue and high activity of alkaline phosphatase in the blood serum. The physiological doses of vitamin E under these conditions normalized the mineral metabolism, contents of calcium, phosphates and activity of alkaline phosphatase isoform in the blood serum.

Key words: 25OHD₃ content, vitamin D₃ 25-hydroxylase enzymes activity, vitamin D₃, vitamin E, D-hypervitaminosis, mineral metabolism.

1. Jones G. // Am. J. Clin. Nutr. – 2008. – **88**, N 2. – P. 582S–586S.
2. Prosser D. E., Jones G. // Trends Biochem. Sci. – 2004. – **29**, N 12. – P. 664–673.
3. Masuda S., Byford V., Arabian A. et al. // Endocrinology. – 2005. – **146**, N 2. – P. 825–834.
4. Heaney R. P. // Nutr. Rev. – 2008. – **66**, S2. – P. S178–S181
5. Holick M. F. // N. Engl. J. Med. – 2007. – **357**, N 3. – P. 266–281.
6. De Luca H. F. // Am. J. Clin. Nutr. – 2004. – **80**, N 6. – P. 1689S–1696S.
7. Vieth R. // J. Bone Mineral Res. – 2007. – **22**, S2. – P. V64–V68.
8. Holick M. F., Siris E. S., Binkley N. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2005. – **90**, N 6. – P. 3215–3224.
9. Стефанов М. В., Ануховська Л. І. // Укр. біохім. журнал. – 1996. – **68**, № 1. – С. 66–72.
10. Ducland S., Holmberg A., Bergs T. // J. Biol. Chem. – 1981. – **256**, N 20. – P. 10430–10433.
11. Weiskirchen R., Gressner H. M. // Methods Mol. Med. – 2005. – **117**. – P. 99–113.
12. Dyce B. J., Bessman S. P. // Arch. Environ. Health. – 1973. – **27**, N 2. – P. 112–115.
13. Вагнер В. К., Путилин В. М., Харабуга Г. Г. // Вопр. мед. химии. – 1981. – **27**, № 6. – С. 752–754.
14. Плеханов Б., Цветкова Т., Пуперков Т., Чиговская М. // Лаб. дело. – 1989. – № 11. – С. 4–7.
15. Gaston-Barre M. / In: Vitamin D, edited by Feldman D., New York; Elsevier. 2005. – P. 47–67.
16. Ануховська Л. І., Великий М. М., Лотоцька О. Ю., Хоменко А. В. // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 5. – С. 72–79.
17. Cheng J. V., Motola D. L., Mangelsdorf D. J., Russell D. W. // J. Biol. Chem. – 2003. – **278**, N 39. – P. 38084–38093.
18. Сергеев И. Н., Ахрапчев Ю. П., Спиричев В. Б. // Биохимия. – 1990. – **55**, вып. 11. – С. 1989–1994.
19. Василевська В. М., Безусяк А. І., Романова С. О. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2007. – **79**, № 6. – С. 89–94.

Отримано 25.02.2010