

Л. Б. Бондаренко, Р. И. Яхимович

## ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ КОЛЛАГЕНОВ II ТИПА ХРЯЩА ЦЫПЛЯТ С РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТЬЮ РАЦИОНА Са И ВЕЩЕСТВАМИ D-ВИТАМИННОЙ ПРИРОДЫ

*В опытах на цыплятах изучали влияние рахита, Са-диеты и различных доз веществ D-витаминной природы на поверхностный заряд молекулы коллагена II типа хряща.*

*Установлены значения  $pI$  коллагенов хряща цыплят и показано, что при рахите молекула коллагена II типа несет более отрицательный заряд, чем в норме. Этот эффект не компенсируется избытком Са в рационе при отсутствии витамина D<sub>3</sub>. Действие оксипроизводных витаминов D<sub>3</sub> и максимальной дозы 3β-фторвитамина D<sub>3</sub> было аналогично эффекту самого витамина D<sub>3</sub>.*

**Введение.** Хрящевой ткани принадлежит уникальная роль в формировании скелета растущего организма. Замещение коллагена II типа хряща коллагеном I типа формирующейся кости с последующей минерализацией — сложный, многоступенчатый процесс, тесно связанный с метаболизмом витамина D и обменом Са в организме [1]. В эпифизах трубчатых костей при рахите отмечено сильное расширение хрящевой зоны, не подверженной кальцификации [1]. Замещение хряща костным коллагеном при этом подавлено. Таким образом, при данной патологии значительная часть скелета в отличие от нормы представлена хрящем, содержащим коллаген II типа в комплексе с гликопротеинами и гликозаминогликанами.

Количество и качественный состав коллагена II типа, очевидно, оказывают заметное влияние на течение процессов минерализации скелета, основными регуляторами которых выступают витамин D<sub>3</sub> и его метаболиты. Кроме того, такие соединения способны оказывать как прямое, так и опосредованное Са действие на состояние коллагена хряща [1, 2].

В связи с тем, что поверхностный заряд коллагеновых молекул может изменять первичную аккумуляцию ионов Са на начальных этапах формирования кристаллов оксиапатита, представляло интерес выяснение эффектов различных D-витаминных соединений на изоэлектрические точки коллагенов II типа хряща цыплят при различной обеспеченности их рациона кальцием и соединениями D-витаминного ряда.

**Материалы и методы.** Исследования вели на цыплятах породы Хайсекс белый кросс в первый месяц жизни. Первая группа птиц получала лишь основной рацион, сбалансированный по питательным веществам, но лишенный витамина D<sub>3</sub> (рахит) [1]. Содержание Са в нем составляло 0,8 %, P<sub>n</sub> — 0,6 %. Цыплята второй группы получали такой же рацион, но уже с 2 % Са и 1 % P<sub>n</sub>, избытком кальция и фосфата. Третья (условная норма) и четвертая группы получали по 10 МЕ витамина D<sub>3</sub> в день на птицу на фоне основного рациона с нормальным и избыточным содержанием Са и P<sub>n</sub> соответственно.

Цыплятам остальных семи групп препараты веществ D-витаминного ряда вводили на фоне основного рациона с нормальным содержанием Са и P<sub>n</sub>. Птицы пятой группы получали избыток витамина D<sub>3</sub> (по 5000 МЕ/день на цыпленка). Цыплятам шестой группы вводили 1,25-

диоксивитамин D<sub>3</sub> (по 2 МЕ/день), седьмой — 1 $\alpha$ -оксивитамин D<sub>3</sub> (по 2,5 МЕ в день), восьмой — 24,25-диоксивитамин D<sub>3</sub> (по 100 МЕ в день). Девятая, десятая и одиннадцатая группы птиц получали 3 $\beta$ -фторвитамин D<sub>3</sub> по 10, 100 и 500 МЕ/день соответственно.

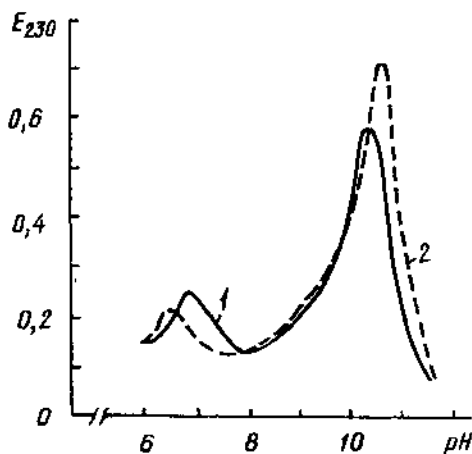
На 30-й день эксперимента цыплят декапитировали. Из хрящей большой берцовой кости выделяли коллаген II типа по методу [3].

Для изофокусирования использовали борат-полиольный градиент [4]. Эксперимент проводили в следующем режиме:  $V=1200$  В;  $I=4$  мА/см<sup>2</sup>;  $t=4$  °С; 24 ч.

**Результаты и обсуждение.** Полученные результаты представлены на рисунке и в таблице. Из приведенных данных видно, что коллаген II типа хряща цыплят в данном борат-полиольном градиенте фокусируется двумя пиками, из которых основной находится в зоне рН 10,3—

Влияние различной обеспеченности рациона Са и веществами D-витаминной природы на рI коллагенов II типа хряща цыплят

№ группы	pI <sub>1</sub>	pI <sub>2</sub>
1	10,5	6,9
2	10,6	6,5
3	10,7	6,5
4	10,8	6,4
5	10,8	6,5
6	10,8	6,5
7	10,7	6,5
8	10,65	6,8
9	10,3	7,1
10	10,5	6,6
11	10,8	6,6



Изоэлектрические спектры коллагенов II типа хряща цыплят: 1 — рахит; 2 — витамин D<sub>3</sub> (норма)

10,8 и второй (небольшой) пик — в зоне рН 6,4—7,1. Возникновение последнего может быть обусловлено конформационными переходами коллагеновой спирали в ходе изофокусирования (в том числе и изменением числа внутримолекулярных сшивок) [4].

При рахите рI основного пика коллагена II типа несколько сдвинута в более кислую область, чем в норме. Более отрицательный заряд молекулы белка может способствовать первичной аккумуляции ионов Са. В этом случае результаты аминокислотного анализа состава коллагена [2] свидетельствуют о том, что из трех положительно заряженных ионогенных радикалов (Гис, Лиз, Арг) только количество аргинина несколько снижено при рахите. Вероятно, на поверхностный заряд молекулы заметное влияние оказывает не абсолютное число положительно заряженных радикалов лизина и гистидина, а та их часть, которая не принимает участия в образовании внутримолекулярных сшивок в коллагене. Таким образом, наши данные о сдвиге рI коллагена хряща при рахите в более кислую зону могут свидетельствовать о его большей степени сшитости по сравнению с нормой и рассматриваться как компенсаторный ответ организма на слабую минерализацию и, следовательно, прочность скелета при этой патологии.

Изменение характера сшитости коллагена II типа при введении D-витаминных соединений и рахите может подтверждаться и сдвигом рI<sub>2</sub> групп №№ 3—7 и 10, 11 в более кислую область по сравнению с рI<sub>2</sub> коллагена рахитичных цыплят.

Избыток Са в рационе при отсутствии витамина D<sub>3</sub> не приводит к полной нормализации рI<sub>1</sub> (в отличие от рI<sub>2</sub>) коллагена хряща, что, возможно, служит еще одним косвенным доказательством существования как прямого, так и опосредованного Са пути воздействия витамина D<sub>3</sub>

на коллаген II типа. Совместное введение избытка Са и витамина D<sub>3</sub> вызывает суммирование их эффектов, и pI белка сдвигается в еще более щелочную область до таких же значений, какие были показаны нами для гипервитаминоза D<sub>3</sub>, сопровождаемого гиперкальциемией (группа № 5) [1], и для гормонально активной формы этого витамина — 1,25-дигидрокси-1,25-дигидроксивитамина D<sub>3</sub> (группа № 6). Поскольку при этом не отмечено заметных изменений в содержании лизина, гистидина и аргинина в составе коллагена II типа хряща цыплят, то наблюдаемые колебания pI в данных группах, вероятно, обусловлены снижением числа внутримолекулярных сшивок, образуемых лизином, оксипролином и гистидином, как по сравнению с рахитом, так и с условной нормой.

Замена витамина D<sub>3</sub> другими его оксипроизводными (группы №№ 7 и 8) существенно не отражалась на поверхностном заряде коллагеновой спирали.

Влияние 3β-фторпроизводного витамина D<sub>3</sub> на заряд молекулы коллагена II типа зависело от его дозы. При использовании минимального количества 3βFD<sub>3</sub>, не обеспечивающего излечения от рахита [2], молекула коллагена несет более отрицательный заряд, чем в норме. Это, видимо, связано с возрастанием степени сшитости коллагеновых молекул. С увеличением дозы фторпроизводного такой эффект постепенно сглаживается, и при максимальном количестве 3βFD<sub>3</sub> значения pI<sub>1</sub> и pI<sub>2</sub> коллагена достигают уровня условной нормы.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов установлены значения pI коллагенов II типа хряща цыплят при рахите и введении различных количеств кальция и соединений D-витаминного ряда. Показано, что при рахите молекула коллагена II типа несет более отрицательный заряд, чем в норме. Это, вероятно, обусловлено большим числом внутримолекулярных сшивок, способствующих возрастанию степени жесткости коллагеновых структур. Кроме того, более отрицательный заряд белка может способствовать удержанию ионов Са, что немаловажно для скелета рахитичного организма, формирующегося в условиях замедленного замещения коллагена хряща коллагеном кости и сниженной концентрации кальция в плазме. Избыток Са в рационе не компенсирует отсутствия D-витаминных соединений.

*Л. В. Бондаренко, Р. І. Яхимович*

#### ИЗОЭЛЕКТРИЧНЕ ФОКУСУВАННЯ КОЛАГЕНІВ ІІ ТИПУ ХРЯЩА КУРЧАТ ЗА РІЗНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ РАЦІОНУ Са І РЕЧОВИНАМИ D-ВІТАМІННОЇ ПРИРОДИ

##### Резюме

У досліджах на курчатах вивчали вплив рахіту, Са-дієти і різних доз речовин D-вітамінної природи на поверхневий заряд молекули колагену II типу хряща.

Встановлено значення pI колагенів хряща і показано, що при рахіті молекула колагену II типу несе негативніший заряд, ніж у нормі. Цей ефект не компенсується надлишком Са у раціоні при відсутності вітаміну D<sub>3</sub>. Дія оксипохідних вітаміну D<sub>3</sub> і максимальної дози 3β-фторпохідного була аналогічна впливові самого вітаміну.

*L. V. Bondarenko, R. I. Yachimovich*

#### CHICKENS CARTILAGE TYPE II COLLAGENS ISOELECTRICAL FOCUSING WITH DIFFERENT RATION'S PROVIDING WITH Ca AND VITAMIN D ANALOGS

##### Summary

Influence of rickets, Ca from diet and different doses of vitamin D analogs on cartilage type II collagen surface charge was studied in experiments on chickens.

Chicken cartilage collagen pI were established. It was shown that rachitic type II collagen molecule had more negative charge then normal one. This effect wasn't compensated with Ca load at the absence of vitamin D<sub>3</sub>. Influences of vitamin D<sub>3</sub> hydroxy-analogs and maximal dose of 3β-fluorovitamin D<sub>3</sub> were analogous to its effect.

