

**Summary.** The peculiarities of active site structure and second binding site structure of thrombin is revealed. Alternative mechanisms of thrombin interaction with highmolecular or lowmolecular substrates are supposed. Also it is shown putative function of the additional center of thrombin in productive enzyme-substrate complex formation.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sonder S. A., Fenton J. W.* Proflavin binding within the fibrinopeptide groove adjacent to catalytic site of human  $\alpha$ -thrombin // *Biochemistry*.—1984.—23, N 8.— P. 1818—1823.
2. *Active-site topography of human coagulant ( $\alpha$ ) and noncoagulant ( $\gamma$ ) thrombin / L. J. Berliner, R. S. Bauer, T.-L. Chang et al. // *Ibid.*—1981.—20, N 7.— P. 1831—1837.*
3. *Кибирев В. К., Романова В. П., Серебряный С. Б.* Структурные основы специфичности тромбина. Роль вторичных взаимодействий // *Биохимия*.— 1983.— 48, № 6.— № 6.— С. 937—943.
4. *The refined 1,9 Å crystal structure of human  $\alpha$ -thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment / W. Bode, I. Mayr, U. Baumann et al. // *EMBO J.*—1989.—8, N 11.— P. 3467—3475.*
5. *Blombäck B.* Specificity of thrombin and its action on fibrinogen // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*—1986.—485.— P. 120—123.
6. *Серейская А. А., Смирнова И. В.* Действие нативного и модифицированного тромбина на N-концевые фрагменты фибриногена быка // *Биополимеры и клетка*.— 1991.—7, № 3.— С. 82—88.
7. *О взаимодействии дополнительного центра тромбина с комплементарным сайтом фибриногена / А. А. Серейская, Л. В. Карабут, И. В. Смирнова, И. Щечкин // Докл. АН Украины*.—1991.— № 11.— С. 140—143.
8. *Fenton J. W. II.* Regulation of thrombin generation and function // *Semin. Thromb. Hemost.*—1988.—14, N 3.— P. 234—240.

Ин-т биоорг. химии и нефтехимии  
АН Украины, Киев

Получено 17.03.92

УДК 577.161.2:577.112.828

**Л. Б. Бондаренко, Р. И. Яхимович, В. К. Бауман**

#### КОЛЛАГЕН ХРЯЩА ЦЫПЛЯТ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ Ca И ВИТАМИНОМ D<sub>3</sub>

*В экспериментах на цыплятах изучено влияние витамина D<sub>3</sub> и избытка Ca в рационе на аминокислотный состав и содержание углеводного компонента коллагена хряща. Установлено, что витамин D<sub>3</sub> и Ca оказывают на данные показатели сходное действие. Однако совместное введение витамина D<sub>3</sub> и избытка Ca приводит к взаимному ослаблению их эффектов.*

**Введение.** Нарушение формирования скелета в растущем организме служит одним из классических проявлений недостатка витамина D. В эпифизах трубчатых костей при рахите происходит расширение хрящевой зоны, не подверженной кальцификации, ширина которой является количественным критерием оценки степени развития рахита [1]. Характер влияния Ca и витамина D<sub>3</sub> на хрящ отличается определенным своеобразием по сравнению с их эффектами на костную и другие типы соединительной ткани. В частности, для нормального течения процессов кальцификации хондроцитам ростовой пластинки необходимо присутствие сразу двух метаболитов витамина D<sub>3</sub> — 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> и 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> [2]. При гипокальциемическом рахите содержание мРНК коллагена в хондроцитах эпифизарного хряща снижается на 80 %, тогда как при нормокальциемическом — на 50 % [3].

Помимо непосредственного влияния на обмен коллагена в культурах хондроцитов, витамин D<sub>3</sub> и его метаболит 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> влия-

© Л. Б. Бондаренко, Р. И. Яхимович, В. К. Бауман, 1992

ют *in vitro* и на синтез гликопептидов хряща, способных оказывать регуляторное воздействие на процессы минерализации [4, 5].

Регуляция кальцием и витамином D<sub>3</sub> синтеза коллагена в хрящевой ткани сложна и определяется не только дозой данных соединений, но также стадией развития и физиологическим состоянием хондроцитов, по-разному реагирующих на их воздействие в зависимости от зоны хряща и фенотипа клеток [1].

Цель наших исследований состояла в изучении влияния различных концентраций кальция и фосфора в рационе при рахите и нормальной обеспеченности витамином D<sub>3</sub> на аминокислотный состав и содержание углеводного компонента коллагена II типа хряща цыплят.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводили на цыплятах породы Хайсеке белый кросс в первый месяц их жизни. Цыплята 1-й группы получали рацион, лишенный витамина D<sub>3</sub>, но полноценный по содержанию других питательных веществ, содержащий Ca — 0,8 % и P<sub>n</sub> — 0,6 %; птицы 2-й группы — данный рацион плюс 10 МЕ витамина D<sub>3</sub> в день каждая. Рацион 3-й группы не содержал витамина D<sub>3</sub> и отличался повышенным количеством Ca (2,1 %) и P<sub>n</sub> (1,05 %). Цыплята 4-й группы с пищей, кроме избытка кальция и фосфора, получали по 10 МЕ витамина D<sub>3</sub> в день.

На 30-й день эксперимента птиц декапитировали и для исследований отбирали эпифизарные хрящи большой берцовой кости. Коллаген II типа получали по методу [6]. Чистоту фракций контролировали электрофоретически [7]. Аминокислотный состав определяли на анализаторе ААА-881, содержание углеводного компонента — антроновым методом [8].

**Результаты и обсуждение.** Результаты определения влияния избытка Ca и витамина D<sub>3</sub> на аминокислотный состав коллагена II типа хряща цыплят представлены в таблице. Полученные данные свидетельствуют о том, что при нормальном содержании витамина D<sub>3</sub>, Ca и P<sub>n</sub> в рационе синтезируется коллаген II типа, отличающийся от рахитического (с тем же количеством Ca и P<sub>n</sub> в рационе) меньшим содержанием изолейцина. Это может привести к снижению жесткости спирали коллагеновой молекулы в норме по сравнению с рахитом [9].

Увеличение содержания Ca и P<sub>n</sub> в рационе рахитических цыплят вызывает заметно большее, чем в предыдущей группе, количество измс-

*Влияние витамина D<sub>3</sub> и избытка Ca на аминокислотный состав коллагена II типа хряща цыплят (остаток/1000 остатков, M±m, n=5)*

| Аминокислота          | Рахит (1)  | Витамин D <sub>3</sub> (2) | Рахит+Ca (3) | Витамин D <sub>3</sub> +Ca (4) |
|-----------------------|------------|----------------------------|--------------|--------------------------------|
| Окслизин              | 21,46±0,4  | 21,00±0,3                  | 20,50±0,1*   | 20,42±0,3*                     |
| Лизин                 | 14,54±0,4  | 14,36±0,4                  | 13,72±0,3    | 15,90±0,4*.*                   |
| Гистидин              | 3,02±0,1   | 2,70±0,6                   | 2,66±0,1*    | 3,08±0,3                       |
| Аргинин               | 49,78±1,6  | 50,84±3,9                  | 49,22±1,8    | 48,76±0,9                      |
| Оксипролин            | 113,18±0,1 | 111,56±1,8                 | 114,80±1,0   | 115,10±1,9                     |
| Аспарагиновая кислота | 42,34±0,8  | 43,00±0,5                  | 42,42±0,4    | 42,72±0,7                      |
| Треонин               | 25,42±0,3  | 26,00±0,1                  | 25,82±0,3    | 25,76±0,1                      |
| Серин                 | 23,36±0,3  | 23,60±0,1                  | 23,44±0,2    | 23,70±0,3                      |
| Глутаминовая кислота  | 104,70±0,3 | 104,42±1,2                 | 105,00±0,4   | 103,46±0,7                     |
| Пролин                | 108,88±0,5 | 106,26±1,9                 | 108,78±1,6   | 108,10±1,8                     |
| Глицин                | 310,76±2,3 | 315,34±2,6                 | 312,60±0,7   | 309,90±1,8                     |
| Аланин                | 95,90±0,8  | 98,16±1,1                  | 99,08±0,6*   | 96,80±0,9                      |
| Валин                 | 20,14±0,3  | 19,34±0,7                  | 19,06±0,5    | 21,54±0,3*.*                   |
| Метионин              | 8,10±0,1   | 7,76±0,2                   | 8,20±0,2     | 8,34±0,2                       |
| Изолейцин             | 9,78±0,1** | 8,86±0,2*                  | 9,26±0,3     | 9,64±0,1**                     |
| Лейцин                | 28,80±0,1  | 28,14±0,8                  | 29,22±0,7    | 28,48±0,2                      |
| Тирозин               | 3,10±0,1   | 2,86±0,4                   | 2,60±0,1*    | 3,10±0,2                       |
| Фенилаланин           | 13,68±0,4  | 12,86±0,4                  | 12,90±0,1    | 12,74±0,9                      |

\* p<0,05 по отношению к группе с рахитом; \*\* p<0,05 по отношению к группе с введением витамина D<sub>3</sub>.

нений. Достоверно снижено количество оксипролина и гистидина, участвующих в образовании сшивок как внутри, так и между молекулами коллагена, а также тирозина. Содержание аланина повышено. Такие изменения могут привести к образованию менее сшитого коллагена, однако с более жесткой спиралью самой молекулы белка [9]. Достоверные отличия по сравнению с коллагеном птиц, получавших нормальное содержание в рационе Са, Р<sub>н</sub> и витамина D<sub>3</sub>, отсутствуют. Интересно, что характер изменений оксипролина, гистидина, аланина и тирозина аналогичен во 2-й и 3-й группах по сравнению с рахитом.

Аминокислотный состав коллагена цыплят 4-й группы, получавших физиологическую норму витамина D<sub>3</sub> на фоне избытка Са и Р<sub>н</sub> достоверно отличается от коллагенов 1-й и 2-й групп. При этом содержание лизина и валина повышено по сравнению с обеими группами, а изолейцина — только со второй. В целом по характеру изменений и составу коллаген данной группы птиц более напоминает коллаген птиц при рахите и нормальном содержании Са и Р<sub>н</sub> в рационе. Совместное действие витамина D<sub>3</sub> и избытка Са и Р<sub>н</sub> не приводит к простому суммированию их воздействий на аминокислотный состав коллагена хряща цыплят. Более того, есть основания предположить наличие взаимного подавления их эффектов (на содержание лизина, оксипролина, глутаминовой кислоты, глицина, аланина, валина, изолейцина, тирозина).

Результаты определения содержания углеводного компонента в коллагене хряща при действии витамина D<sub>3</sub> и избытка Са (в %,  $M \pm m$ ,  $n=5$ ) приведены ниже:

| Рахит (1)   | Витамин D <sub>3</sub> (2) | Рахит+Са (3) | Витамин D <sub>3</sub> +Са (4) |
|-------------|----------------------------|--------------|--------------------------------|
| 4,39±0,04** | 4,00±0,03*                 | 3,91±0,1*    | 4,08±0,05*                     |

(\*  $p < 0,05$  по отношению к группе с рахитом; \*\*  $p < 0,05$  по отношению к группе с введением витамина D<sub>3</sub>).

Полученные данные указывают на некоторое снижение содержания углеводного компонента в группах птиц 2—4 по сравнению с рахитом, что согласуется с ранее полученными результатами [10]. Так же, как и в случае аминокислотного состава коллагена II типа, совместное влияние витамина D<sub>3</sub> и нагрузки рациона кальцием и фосфором приводит не к суммированию, а к некоторому ослаблению эффектов данных веществ, проявляемых ими по отдельности.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что Са, как и витамин D<sub>3</sub>, способен непосредственно оказывать заметное влияние на аминокислотный состав и содержание углеводного компонента коллагена II типа хряща цыплят. Характер оказываемых данными веществами эффектов сходен, однако совместное введение витамина D<sub>3</sub> и избытка Са приводит не к их суммированию, а к взаимному ослаблению, возможно, в результате конкуренции.

Summary. Influence of vitamin D<sub>3</sub> and Ca load in diet on cartilage collagen aminoacid composition and hydrocarbon contents was studied.

It was established that vitamin D<sub>3</sub> and Ca influenced similary on these indices. But reciprocal weakening of their effects was a result of vitamin D<sub>3</sub> and Ca load joint introduction.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бауман В. К. Биохимия и физиология витамина D.— Рига: Зинатне, 1989.—480 с.
2. *Cartilage macromolecules and calcification of cartilage matrix* / A. R. Polle, I. Matsui, A. Hinek, S. S. Lee // *Anat. Record.*—1989.—224.— P. 167—179.
3. *Comparative studies of type X collagen expression in normal and rachitic chicken epiphyseal cartilage* / A. P. L. Kwan, I. R. Dickson, A. J. Freemont, M. E. Grand // *J. Cell. Biol.*—1989.—109, N 4.— P. 1849—1856.
4. Földes G., Hadhazy Cs., Modis L. Effect of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> on glucosaminoglycans in micro high density culture // *Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung.*—1988.—23, N 1.— P. 49—61.

5. 24,24-Difluoro-25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> — enhanced bone mineralisation in rats comparison with 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and vitamin D<sub>3</sub> / S. Okamoto, Y. Tanaka, H. F. de Luka et al. // Arch. Biochem. and Biophys.—1981.—206, N 1.— P. 8—14.
6. Trelstad R. L., Catanese V. M., Rubin D. T. Collagen fractionation: separation of native types I, II and III by differential precipitation // Anal. Biochem.—1976.—71, N 1.— P 114—118.
7. Маурер Г. Диск-электрофорез.— М.: Мир, 1971.— 247 с.
8. The estimation of glycogen with antrone reagent / M. Seifter, S. Dayton, B. Noreic, B. Muntwyler // Arch. Biochem. and Biophys.—1950.—25, N 1.— P. 191—200.
9. Ramachandran G. N. Biochemistry of collagen.— New York, London: Plenum press, 1976.—536 p.
10. Влияние 3β-фторвитамина D<sub>3</sub> и 1α,25-дигидроксивитамина D<sub>3</sub> на коллагены кости и хряща цыплят / Л. Б. Бондаренко, Р. И. Яхимович, И. В. Гогоман и др. // Докл. АН Украины.—1991.— № 7.— С. 132—137.

Ин-т биоорг. химии и нефтехимии  
АН Украины, Киев

Получено 13.04.92

УДК 577.161.2:577.112.828

Л. Б. Бондаренко, Р. И. Яхимович, В. К. Бауман

### ВЛИЯНИЕ 1α-ОКСИВИТАМИНА D<sub>3</sub> И 24,25-ДИОКСИВИТАМИНА D<sub>3</sub> НА КОЛЛАГЕНЫ КОСТИ, КОЖИ И ХРЯЩА ЦЫПЛЯТ

*В экспериментах на цыплятах изучено влияние 1α-OHD<sub>3</sub> и 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> на аминокислотный состав коллагенов кости, кожи и хряща, а также на содержание в них углеводного компонента.*

*Витамин D<sub>3</sub>, 1α-OHD<sub>3</sub> и 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> заметно изменяют данные показатели, а их эффекты сходны по своему характеру. Однако действие 1α-OHD<sub>3</sub> и 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> на содержание ряда аминокислот и углеводного компонента (в коже) более напоминает эффект рахита.*

**Введение.** Физиологическая значимость многих веществ D-витаминной природы до настоящего времени остается окончательно невыясненной. В первую очередь это относится к 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, естественному метаболиту витамина D<sub>3</sub>. Полагают, в частности, что этому производному витамина D<sub>3</sub> может быть присуща специфическая роль в процессах развития костной ткани [1], эпифизарного хряща [2], а также синергизм действия на минеральный обмен при совместном поступлении с 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> [3]. 1α-оксивитамин D<sub>3</sub> (синтетическое производное витамина) также влияет на процессы формирования и минерализации скелета, отличаясь высокой антирахитической активностью. Исследования биологической активности 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> и 1α-OHD<sub>3</sub> в основном ограничивались анализом их значения для минерального обмена и процессов кальцификации. Поиск нетрадиционных проявлений их влияния на организм фактически не велся [3]. В то же время изучение биологического действия витамина D<sub>3</sub> (преобразующегося в организме до целого ряда метаболитов, гидроксильированных по С-1, С-24, С-25) и его гормонально активной формы 1α, 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> свидетельствует о наличии иммуномодулирующей, антиопухольевой, антипсоразной, антивирусной активностей у веществ D-витаминной природы [3, 4]. Ранее нами показана способность витамина D<sub>3</sub>, 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> и 3β-фторвитамина D<sub>3</sub> вызывать различные изменения в аминокислотном составе и содержании углеводного компонента коллагенов кости, кожи и хряща цыплят [5, 6]. При этом эффект D-витаминных соединений на коллагены заметно отличался в зависимости от дозы и химической структуры вещества.

© Л. Б. Бондаренко, Р. И. Яхимович, В. К. Бауман, 1992