

22. *Lebkowsky J. S., Laemmli U. K.* Non-histone proteins and long-range organization of HeLa interphase DNA // *Ibid.*— P. 325—344.
23. *Shires T. K.* Iron-induced DNA damage and synthesis in isolated rat liver nuclei // *Biochem. J.*—1982.—205, N 2.— P. 321—329.
24. *Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б. и др.* Перекисное окисление липидов фракций хроматина печени крыс // Докл. АН УССР, сер. Б.—1989.— № 2.— С. 70—72.
25. *Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Примак Р. Г. и др.* Конформационные характеристики и упаковка эндогенных липидов фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина // *Укр. биохим. журн.*—1991.—63, № 2.— С. 83—89.
26. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М.: Наука, 1972.—252 с.
27. *Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б. и др.* Перекисное окисление липидов и эндогенная ДНК-полимеразная активность фракций изолированного хроматина печени крыс // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.*—1989.—57, № 3.— С. 296—298.

Ин-т фармакологии и токсикологии АМН Украины, Киев
 Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН Украины, Киев
 НИИ геронтологии АМН Украины, Киев

Получено 30.03.93

УДК 577.161.2:577.112.828

Л. Б. Бондаренко

СВОЕОБРАЗИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ОСНОВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ВИТАМИНА D₃

В обзоре обобщены экспериментальные результаты изучения своеобразия биологических эффектов основных метаболитов витамина D₃ — 1,25-диоксивитамина D₃ и 24,25-диоксивитамина D₃. Рассмотрены вопросы синергизма и антагонизма их действия в организме и в отдельных клетках-мишенях. Проанализированы данные о зависимости характера биологического эффекта каждого из производных от его дозы и физиологического состояния клетки.

Открытие и изучение метаболитов витамина D₃ коренным образом изменило научные представления о его действии на организм. Выяснилось, что 1,25-диоксивитамин D₃ (1,25(OH)₂D₃) и 24,25-диоксивитамин D₃ (24,25(OH)₂D₃) — основные активные формы витамина, в виде которых проявляется его биологический эффект [1]. Дальнейшее исследование их антирахитической активности выявило ключевую роль 1,25(OH)₂D₃ в регуляции гомеостаза Ca.

Традиционно эффект соединений D-витаминного ряда связывали исключительно с обеспечением минерального обмена и формированием скелета. В связи с этим внимание исследователей вначале было сконцентрировано на участии основных метаболитов витамина D в регуляции обмена кальция. Однако в последующем изучение данных соединений показало, что в организме они способны регулировать пролиферацию и дифференциацию самых различных клеток (в том числе клеток иммунной системы) и совершенно необходимы для нормального течения процессов эмбриогенеза, цитодифференцировки, гемопоэза, формирования иммунной системы и скелета организма, поддержания его гормонального статуса [1].

С развитием представлений о значении соединений D-витаминной природы в организме эволюционировали и взгляды исследователей на биологическую роль его основных метаболитов — 1,25(OH)₂D₃ и 24,25(OH)₂D₃. Пока изучение ограничивалось областью кальциевого обмена, преобладало мнение, что 24,25(OH)₂D₃ не присуща самостоятельная биологическая функция и он может рассматриваться как первый

© Л. Б. Бондаренко, 1993

этап катаболизма витамина D_3 в организме [2, 3]. Согласно выдвинутой гипотезе, гидроксирование по С-24 служит началом целого каскада дальнейших преобразований, приводящих к деградации D-витаминных соединений. Такая точка зрения подтверждалась результатами экспериментов, в ходе которых было показано, что $24,25(OH)_2D_3$ в 10 раз слабее, чем $1,25(OH)_2D_3$, стимулирует всасывание Ca и P в кишечнике и в 20 раз меньше влияет на синтез кальций-связывающего белка и транспорт Ca, а сродство его с гормональным рецептором на 2—3 порядка ниже, чем с $1,25(OH)_2D_3$ [1]. В силу распространенности такого мнения о биологическом значении $1,25(OH)_2D_3$ и $24,25(OH)_2D_3$ в течение довольно длительного периода исследованию биохимической и физиологической роли второго метаболита уделялось недостаточно внимания, и в полной мере она не выявлена до сих пор.

Со временем, однако, становилось очевидным, что $24,25(OH)_2D_3$ заслуживает особого внимания, так как именно этот метаболит является основным продуктом преобразования витамина D_3 в организме, и его концентрация в плазме крови в норме в 10—100 раз превышает таковую другого активного метаболита — $1,25(OH)_2D_3$ [4]. В отличие от $1,25(OH)_2D_3$, выступающего в качестве «аварийного гормона» и действующего в условиях дефицита Ca и гипокальциемии, $24,25(OH)_2D_3$ является гормоном, обеспечивающим поддержание гомеостаза Ca при физиологически нормальном уровне кальция [5].

На сегодняшний день накоплено значительное количество экспериментальных данных о влиянии $1,25(OH)_2D_3$ и $24,25(OH)_2D_3$ на организм. Однако при анализе следует разграничивать их прямой эффект на клетку и действие, опосредованное образованием комплексов с цитозольным рецептором и биосинтезом белков *de novo*. $24,25(OH)_2D_3$ хуже связывается со специфическим рецептором, чем $1,25(OH)_2D_3$, и поэтому его опосредованное влияние будет выражено слабее, хотя и аналогичным по характеру. Исключение составляют клетки, содержащие специфические рецепторы к $24,25(OH)_2D_3$. Такие рецепторы обнаружены в параситовидных железах, хондроцитах, эпифизарной ростовой пластинке, мезенхимальных клетках эмбрионов [5, 6]. В этом случае, как и при прямом воздействии данных производных витамина D_3 , характер их эффектов заметно различается, и проявляются они на различных этапах развития клетки и организма в целом. Помимо этого, независимо от клеток-мишеней и химической структуры метаболитов витамина D_3 , как у $1,25(OH)_2D_3$, так и у $24,25(OH)_2D_3$ отмечены краткосрочный (*short-term*) и долгосрочный (*long-term*) эффекты, определяемые временем воздействия данных соединений на объект.

Углубленное изучение влияния производных витамина D_3 на обмен Ca показало, что $24,25(OH)_2D_3$ обладает выраженной, но не тождественной $1,25(OH)_2D_3$ антирахитической активностью [7]. Сравнительное исследование биологической активности $1,25(OH)_2D_3$ и $24,25(OH)_2D_3$ на крысах, лишенных витамина D [8], показало, что $1,25(OH)_2D_3$ стимулировал всасывание Ca в кишечнике, увеличение плотности диафизов и содержания в них кальция, но не обеспечивал нормализации его уровня в крови и содержания в эпифизах. Напротив, $24,25(OH)_2D_3$ полностью нормализовал не только всасывание Ca в кишечнике, но и его содержание в крови и эпифизах. При влиянии на кость у $1,25(OH)_2D_3$ преобладает резорбирующий эффект [9]. Этот метаболит способствует перестройке кости, формированию остеокластов как непосредственно, так и стимулируя остеобласты. У $24,25(OH)_2D_3$ такого эффекта не отмечено, однако он эффективно стимулирует минерализацию эпифизов [8].

Помимо самостоятельного влияния на обмен кальция $24,25(OH)_2D_3$ способен как ослаблять, так и усиливать кальциемический эффект $1,25(OH)_2D_3$ [1, 10]. Совместное введение этих метаболитов увеличивает их антирахитическое действие, повышая прирост массы тела, степень минерализации костной ткани и скорость синтеза Ca-связывающего белка в большей мере, чем при раздельном введении аналогичных доз стероидов [1, 11]. В экспериментах на крысах также отмечен синергизм

по влиянию на гомеостаз Ca $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ при их совместном введении [8]. При этом $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ тормозит резорбирующее действие $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [7]. Взаимодополняющий эффект обоих метаболитов, видимо, связан с их различной ролью в регуляции кальциевого обмена.

В опытах на клетках ROS 17/28 показана способность метаболитов витамина D_3 модулировать функционирование кальциевых каналов. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ может и стимулировать, и ингибировать кальциевый поток, а у $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ преобладает ингибирующее действие [12]. Оба соединения вызывают быстрое повышение содержания внутриклеточного Ca^{2+} . Эффект $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в отличие от $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ подавляется снижением внеклеточной концентрации Ca^{2+} [12].

$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ является аллостерическим эффектором специфического рецептора $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в кишечнике цыплят [13]. Показана способность $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ оказывать модулирующее воздействие на рецепторное связывание $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [7, 14].

Важнейшую роль метаболиты витамина D_3 играют не только в регуляции обмена кальция, но и в обеспечении формирования скелета и соединительной ткани в целом. При этом каждому из них присуща специфическая функция.

$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ стимулирует эндохондриальное развитие кости [15]. В пролиферативной зоне костей цыплят и крыс обнаружен специфический рецептор этого метаболита [16]. Такие же рецепторы выявлены и в хондроцитах [17]. В ходе исследования выяснилось, что на разных стадиях развития эти клетки по-разному реагируют на $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Эффекты обоих метаболитов не опосредованы синтезом белка *de novo*. $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ действует на менее дифференцированные клетки хряща. В целом хондроциты зоны роста реагировали на $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, а зоны покоя — на $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ингибировал число хондроцитов зоны роста, а $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ стимулировал увеличение числа клеток зоны покоя (в концентрации 10^{-9} М) и подавлял его при более высоких концентрациях (10^{-8} — 10^{-6} М) [18]. Было обнаружено, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в большей мере стимулирует минерализацию, а $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ — формирование органического матрикса. Это подтверждается и данными экспериментов на культуре остеобластоподобных клеток MC 3T3-E1 [20]. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в отличие от $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ тормозит биосинтез и усиливает расщепление протеогликанов, которые, маскируя коллагеновую матрицу, могут модифицировать ее минерализацию. Такой эффект данного метаболита — важное звено в механизме его прямого стимулирующего действия на минерализацию костной ткани.

Нами было проведено изучение эффектов $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на аминокислотный состав коллагенов I и II типов кости, кожи и хряща цыплят [21—23]. На коллаген кости витамин D_3 , $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ оказывали в целом аналогичное действие по сравнению с рахитом. При этом, однако, под влиянием $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в меньшей степени снижалось содержание в коллагене кости лизина, гистидина, валина, изолейцина, лейцина, тирозина, фенилаланина и увеличивалось содержание оксипролина и глицина, но не пролина, чем это было отмечено при введении самого витамина D_3 . В то же время эффект $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на содержание гистидина, оксипролина, пролина, валина, метионина и тирозина превосходил действие витамина D_3 , хотя и был аналогичен ему по характеру. Поскольку лизин и гистидин участвуют в образовании межмолекулярных сшивок в коллагеновой фибрилле, а валин, изолейцин, лейцин и тирозин увеличивают жесткость самой коллагеновой спирали, то, вероятно, под влиянием $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в кости цыплят образуется коллаген, сильнее сшитый и с более жесткой спиральной молекулы, чем при воздействии витамина D_3 или $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Данные результаты не только служат еще одним подтверждением ведущей роли $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в формировании органического матрикса скелета [18—20], но и могут свидетельствовать о наличии как синергизма,

так и антагонизма в действии метаболитов витамина D_3 на кость при их одновременном введении. Сходная картина была отмечена нами и при изучении влияния D-витаминных соединений на аминокислотный состав коллагена хряща цыплят. Эффект $24,25(OH)_2D_3$ на содержание оксипролина, гистидина, оксипролина, аланина, метионина, лейцина, изолейцина и тирозина, хотя и был аналогичен по характеру действию витамина D_3 , однако превосходил его по степени выраженности, тогда как $1,25(OH)_2D_3$ — уступал ему (за исключением влияния на содержание оксипролина и пролина). Избирательно стимулирующее воздействие $1,25(OH)_2D_3$ на содержание оксипролина и пролина в коллагенах I и II типов кости и хряща может изменить степень жесткости и форму коллагеновой спирали и, следовательно, в какой-то мере — механическую прочность органического матрикса, подвергающегося минерализации.

В коже, не подлежащей кальцификации, метаболиты витамина D_3 оказывают несколько иное влияние на аминокислотный состав коллагена. Эффект $24,25(OH)_2D_3$ аналогичен по характеру воздействию витамина D_3 на большинство аминокислот и превосходит его по степени выраженности только по отношению к содержанию лизина, гистидина, тирозина. Напротив, характер эффекта $1,25(OH)_2D_3$ на оксипролин, гистидин, фенилаланин в составе коллагена противоположен действию витамина, а на лизин, аланин, валин, метионин, лейцин, изолейцин, хотя и аналогичен, но выражен сильнее. Таким образом, результаты исследования коллагена кожи указывают на особую роль $24,25(OH)_2D_3$ в формировании коллагеновых структур соединительной ткани и сложное взаимодействие метаболитов витамина D_3 при одновременном поступлении в организм. Характерно, что $1,25(OH)_2D_3$ по-разному в отличие от $24,25(OH)_2D_3$ воздействует на коллагены тканей, подлежащих минерализации и неминерализованных.

Спектр биологической активности веществ D-витаминной природы не ограничивается регуляцией гомеостаза Ca, минерализации и формирования скелета. В настоящее время накоплен огромный экспериментальный материал, свидетельствующий о способности этих соединений воздействовать на процессы пролиферации и дифференциации различных клеток организма [1].

В ходе формирования скелета $1,25(OH)_2D_3$ избирательно влияет на пролиферацию клеток диафиза трубчатых костей, а $24,25(OH)_2D_3$ необходим для стимуляции развития клеток эпифизов [8]. В то же время при изучении эффектов метаболитов витамина D_3 на активность щелочной фосфатазы, рассматриваемой в качестве маркера терминальной дифференциации, в культуре хондроцитов и в ростовой пластинке было показано, что в культуре клеток $1,25(OH)_2D_3$ вызывал повышение содержания ДНК и протеогликанов и снижал активность щелочной фосфатазы [24]. С другой стороны, в ростовых пластинках хрящевой рахитичных крыс содержание протеогликанов было вдвое ниже нормы, а активность щелочной фосфатазы — повышена в 2,5 раза. Введение $1,25(OH)_2D_3$ повышало в 1,4 раза содержание протеогликанов и на 40 % снижало активность щелочной фосфатазы. $24,25(OH)_2D_3$ слабо воздействовал на эти показатели как в культуре клеток, так и в ростовой пластинке хряща.

Способность $1,25(OH)_2D_3$ регулировать дифференциацию и пролиферацию клеток подтверждается и данными, полученными на культуре остеобластоподобных клеток из трабекулярной костной ткани человека [25]. Инкубация этих клеток в течение 24—72 ч с 10^{-11} — 10^{-7} M $1,25(OH)_2D_3$ сопровождается пропорциональным времени и дозе данного секостероида увеличением активности щелочной фосфатазы. Одновременно тормозится пролиферация клеток, контролируемая по общему их числу и по включению в них ^{14}C -тимидина.

Отсутствие заметного эффекта $24,25(OH)_2D_3$ на культуру хондроцитов [24], возможно, обусловлено тем, что хондроциты, находящиеся на различных стадиях эндохондральной оссификации, по-разному реагиру-

ют на действие активных метаболитов витаминов D_3 [5]: пролиферирующие клетки чувствительны к $1,25(OH)_2D_3$, но не к $24,25(OH)_2D_3$.

Для остеобластоподобных клеток такой закономерности не выявлено. На пролиферацию остеобластоподобных клеток из костной ткани человека $24,25(OH)_2D_3$ влияет различным образом в зависимости от дозы [26]. При введении в культуральную среду высоких доз этого метаболита (10^{-8} — 10^{-6} М) пролиферация остеобластоподобных клеток подавлена, а при использовании более близких к физиологической концентрации доз (10^{-14} — 10^{-10} М) — усилена. В этом случае одновременно с подавлением пролиферации стимулируется накопление щелочной фосфатазы (маркера дифференцировки клеток) [24, 26].

Таким образом, и $1,25(OH)_2D_3$, и $24,25(OH)_2D_3$ способны регулировать дифференциацию и пролиферацию клеток костной и хрящевой ткани. При этом характер эффекта $1,25(OH)_2D_3$ остается неизменным вне зависимости от его дозы, тогда как у $24,25(OH)_2D_3$ — изменяется.

Не только остеобласты и хондроциты подвержены воздействию соединений D-витаминного ряда. Особое значение имеет способность $1,25(OH)_2D_3$ и других метаболитов витамина D_3 выступать модуляторами пролиферации и дифференциации клеток иммунной системы. Специфический рецептор $1,25(OH)_2D_3$ выявлен в моноцитах, макрофагах, Т- и В-лимфоцитах [1, 5]. В клинических исследованиях на детях показано, что $1,25(OH)_2D_3$ и $24,25(OH)_2D_3$ полностью нормализовали иммунологический статус больных хронической почечной недостаточностью, повышая количество Т-лимфоцитов и снижая — О-клеток до контрольных значений [7].

$1,25(OH)_2D_3$ индуцирует дифференциацию клеток HL-60 (лейкозных клеток) в макрофаги (моноциты по стероидному пути) [27]. $24,25(OH)_2D_3$ может обуславливать индукцию дифференциации HL-60 клеток в моноциты-макрофаги при концентрациях, в 50 раз более высоких, чем $1,25(OH)_2D_3$, и по пути, отличному от $1,25(OH)_2D_3$.

Обработка клеток моноцитарных линий $1,25(OH)_2D_3$ приводит к активации экспрессии гена СДПВ — маркера созревания моноцитов линии 937 [28]. В то же время такой эффект $1,25(OH)_2D_3$ на лимфоциты, трансформированные вирусом Эпштейн — Барра, и активированные В-клетки отсутствует. Исследование лимфоцитов периферической крови человека показало, что $1,25(OH)_2D_3$ в концентрации 10^{-9} М угнетает их пролиферацию, так же как и стимуляцию интерлейкином-2 Т-клеток. Другой метаболит витамина D_3 — $24,25(OH)_2D_3$ не ингибирует эффекта интерлейкина в дозе 10^{-7} М [29]. Действие $1,25(OH)_2D_3$ на пролиферацию активированных лимфоцитов четко выражено и носит дозозависимый характер [5]. $24,25(OH)_2D_3$ (0,16—1,3 нмоль/сут) у цыплят тормозит пролиферацию лимфоцитов, снижая их количество, и увеличивает число малых лимфоцитов [30].

Метаболиты витамина D_3 способны воздействовать и на гемопоэтические клетки, $1,25(OH)_2D_3$ является модулятором пролиферации, дифференцировки, активации и слияния этих клеток [31], индуцирует дифференцировку бластных клеток костного мозга и миеломоноцитов [32], угнетает пролиферацию клеток аденокарциномы [33].

Механизмы осуществления метаболитами витамина D_3 их модулирующих эффектов на пролиферацию и дифференциацию клеток изучены слабо. Различными исследователями высказано несколько гипотез. В частности, в работе [34] предполагается, что антипролиферативное действие $1,25(OH)_2D_3$ может объясняться стимуляцией этим метаболитом аденилатциклазы. В сообщении [35] приведены данные о том, что при исследовании эффекта $1,25(OH)_2D_3$ на уровне транскрипции выявлено наличие витамина- D_3 -зависимых участков в генах белков, ответственных за дифференцировку клеток (лейкоцитов, остеобластов, кератиноцитов). $1,25(OH)_2D_3$, возможно, регулирует уровни этих белков и таким образом может воздействовать на дифференцировку клеток.

Наибольшее распространение в последнее время получила «липидная» гипотеза влияния $1,25(OH)_2D_3$ [36]. Ее возможная схема: вита-

мин $D_3 \rightarrow$ состав фосфолипидов в мембранах \rightarrow повышение текучести мембраны \rightarrow активность мембраносвязанных ферментов.

Метаболиты витамина D_3 могут регулировать активность мембраносвязанных ферментов, транспорт Ca через мембраны, индуцируя изменение в содержании фосфолипидов, ведущие к повышению текучести мембраны.

Одновременно с торможением дифференцировки стромальных клеток в адипоциты $1\alpha,25(OH)_2D_3$ (10^{-9} М) полностью ингибировал синтез нейтральных липидов [37]. При этом другие производные витамина D_3 были менее эффективны, располагаясь в ряду: $1\alpha(OH)D_3 > 25(OH)D_3 > 24R,25(OH)_2D_3$.

Кроме того, $1,25(OH)_2D_3$ подавлял включение ^{14}C -уксусной кислоты в триацилглицерин стромальных клеток и усиливал — в фосфатидилхолин и фосфатидилэтанолламин.

Воздействие $1,25(OH)_2D_3$ на дифференциацию клеток HL-60, возможно, опосредовано керамидом как липидным медиатором [38]. Обработка метаболитом витамина D_3 культуры клеток сопровождается увеличением количества керамидов. Экзогенные керамиды с укороченными N-ацильными цепями индуцируют дифференцировку клеток HL-60 при подпороговых дозах $1,25(OH)_2D_3$, а при более высоких концентрациях — и в отсутствие витамина. Клетки HL-60, дифференцировавшиеся под влиянием $1,25(OH)_2D_3$ и N-ацетилсфингозина, морфологически сходны.

В изолированных ядрах гепатоцитов крыс $1,25(OH)_2D_3$ усиливает в 2 раза продукцию ^{32}P -лизофосфатидилинозита и в 32 раза — ^{32}P -фосфатидилинозита вследствие активации фосфолипазы A [39]. Возможно, этот эффект опосредует влияние метаболита витамина D_3 на рост клеток и экспрессию онкогена. Воздействовать на фосфолипазу A_2 способны и $24,25(OH)_2D_3$ [19, 40]. При этом отмечается избирательность действия метаболитов витамина D_3 в зависимости от физиологического состояния клеток-мишеней: $1,25(OH)_2D_3$ (10^{-9} — 10^{-8} М) увеличивает в 2—4 раза активность мембраносвязанной фосфолипазы плазматических мембран и матричных везикул пролиферирующих, но не покоящихся хондроцитов. $24,25(OH)_2D_3$ в концентрации 10^{-7} — 10^{-8} М тормозит активность фосфолипазы A_2 матричных везикул и плазматических мембран покоящихся клеток.

Метаболиты D_3 регулируют функционирование мембран, меняя состав ее фосфолипидов за счет изменения состава их жирнокислотных «хвостов» и включения ненасыщенных жирных кислот [17]. Однако остается неизученным вопрос о том, насколько специфичен подобный эффект $1,25(OH)_2D_3$ и $24,25(OH)_2D_3$ на обмен фосфолипидов и арахидоновой кислоты для данного вида клеток.

Исследования на культуре гладкомышечных клеток аорты кролика показали, что продукция простагличина возрастала в присутствии 10^{-10} — 10^{-8} М $1,25(OH)_2D_3$ и в меньшей степени — в присутствии $1\alpha(OH)D_3$. Минимальный период инкубации для выявления эффекта обоих соединений — 48 ч. $1,25(OH)_2D_3$ не вызывал высвобождения из клеток предварительно включенной в них ^{14}C -арахидоновой кислоты, что свидетельствует об отсутствии его влияния на активность фосфолипазы A_2 . Добавление Ca -ионофора A23187 или высокая концентрация Ca вместе с $1,25(OH)_2D_3$ способствовали высвобождению арахидоновой кислоты. Активность липоксигеназы и циклооксигеназы при этом возрастала. $24,25(OH)_2D_3$ (в отличие от культуры хондроцитов) не влиял на данные показатели гладкомышечных клеток аорты.

Характер воздействия метаболитов витамина D_3 , очевидно, зависит от наличия в среде ионов Ca^{2+} . Опосредованный и непосредственный Ca эффекты данных соединений могут заметно различаться. В частности, опосредованное Ca^{2+} влияние $1,25(OH)_2D_3$ на липоксигеназу — ключевой фермент биосинтеза лейкотриенов — приводило к стимуляции ее активности. При использовании же безкальциевой системы *in vitro*

нами был показан ингибирующий эффект самого витамина D_3 и $1,25(OH)_2D_3$ на 5-липоксигеназу [42].

Воздействие производных витамина D_3 на метаболизм липидов мембран не ограничивается их влиянием на фосфолипиды. Холестерин также подвержен действию $1,25(OH)_2D_3$ и $24,25(OH)_2D_3$ [43, 44]. В наших экспериментах эти метаболиты вызвали достоверное снижение содержания свободного, общего и этерифицированного холестерина в сыворотке крови цыплят по сравнению с рахитом. При этом эффект $24,25(OH)_2D_3$ в отличие от $1,25(OH)_2D_3$ на все три фракции холестерина достоверно превосходил действие самого витамина D_3 . Поскольку эфиры холестерина наряду с фосфолипидами являются обязательными компонентами и клеточных мембран, такой эффект $24,25(OH)_2D_3$ на этерифицированный холестерин может привести к изменению их физико-химических свойств.

Углеводам наряду с липидами и белками принадлежит важная роль в процессах формирования и минерализации скелета, межклеточных контактов, адгезии клеток, осуществлении иммунного ответа. Наличие взаимосвязи между обменом углеводов и эффектом витамина D_3 подтверждено многочисленными исследованиями [1, 5]. $1,25(OH)_2D_3$ тормозит деградацию протеогликанов в культуре клеток MC 3T3-E1, а $24,25(OH)_2D_3$ — не влияет на этот показатель [45]. В наших экспериментах [21—23] и $1,25(OH)_2D_3$, и $24,25(OH)_2D_3$ вызывали достоверное повышение содержания углеводного компонента в кости и снижение — в хряще по сравнению с рахитом. Эффекты метаболитов витамина D_3 на углеводный компонент в коже диаметрально противоположны: $1,25(OH)_2D_3$ приводит к увеличению содержания углеводов, а $24,25(OH)_2D_3$ — к снижению. Подобное различие эффектов двух метаболитов отмечалось и при исследовании аминокислотного состава коллагенов кожи, кости и хряща.

При модификации соединениями D-витаминного ряда процессов пролиферации и дифференциации клеток помимо липидного и углеводного обменов, несомненно, затрагиваются биосинтез и катаболизм белков в организме [46, 47], что, в свою очередь, отражается на составе пула свободных аминокислот сыворотки крови. Проведенные нами исследования показали, что $1,25(OH)_2D_3$ и $24,25(OH)_2D_3$ способны вызывать заметные изменения в составе пула свободных аминокислот сыворотки крови цыплят по сравнению с рахитом [43, 44]. При этом характер их влияния на содержание большинства аминокислот в пуле аналогичен эффекту самого витамина и различия только по лизину, аспарагиновой кислоте, аланину и лейцину — для $1,25(OH)_2D_3$ и по треонину, глутаминовой кислоте и фенилаланину — для $24,25(OH)_2D_3$. Введение $24,25(OH)_2D_3$ приводит к заметному снижению содержания оксипролина, служащего маркером процессов расщепления белков соединительной ткани, не только относительно уровня рахита, но и нормы. Вероятно, $24,25(OH)_2D_3$ способен замедлять процессы расщепления белков по сравнению с рахитом более эффективно, чем сам витамин D_3 и $1,25(OH)_2D_3$. $1,25(OH)_2D_3$ заметно слабее воздействует на уровень этой аминокислоты в сыворотке крови, одновременно увеличивая включение пролина в коллагены кости и хряща, а также последующее его гидроксилирование в коллагенах хряща и кожи цыплят [21, 22]. Этот метаболит в отличие от $24,25(OH)_2D_3$ стимулирует процессы образования оксипролина за счет гидроксилирования пролина в коллагенах и слабо воздействует на высвобождение этой аминокислоты из расщепляющихся белков в плазму крови.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии специфических биологических эффектов у каждого из основных метаболитов витамина D_3 . $1,25(OH)_2D_3$ и $24,25(OH)_2D_3$ совершенно необходимы для нормального развития организма. Эффект витамина D_3 определяется только их совместным влиянием, а не действием одного из соединений, пусть даже и очень высокоактивного. Характер взаимовлияния обоих метаболитов сложен. В зависимости от условий эксперимен-

та и клеток-мишеней наблюдается как синергизм, так и антагонизм их действия. Однако при воздействии на процессы, связанные с минерализацией скелета, преобладает эффект $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Действие $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, вероятно, в большей мере обуславливает характер влияния витамина D_3 на формирование органического матрикса скелета и белки соединительных тканей в целом. Недостаточная изученность эффектов различных метаболитов витамина D_3 на модуляцию дифференцировки клеток и связанные с этим процессы обмена липидов, углеводов и белков не позволяет четко разграничить специфику эффектов $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Несомненно, однако, что оба метаболита способны по-разному воздействовать на процессы роста и развития клеток-мишеней соединительных тканей, иммунной и гемopoэтических систем, обмена липидов, углеводов и белков в зависимости от своей химической структуры, применяемой дозы и физиологического состояния клетки. При этом действие $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ может отличаться от влияния $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ не только по степени выраженности, но и по характеру, если D-витаминные производные оказывают прямое влияние на клетку (не опосредованное синтезом белков *de novo* и изменением уровня Ca^{2+}) или же при наличии в клетке специфических рецепторов к $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. В противном случае при воздействии, осуществляемом с образованием комплекса стероида с рецептором, специфичным для $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, эффект других метаболитов витамина D_3 прямо пропорционален их способности связываться с рецепторным белком.

Резюме. В огляді узагальнено експериментальні результати вивчення своєрідності біологічних ефектів основних метаболітів вітаміну D_3 — 1,25-діоксिवітаміну D_3 і 24,25-діоксивітаміну D_3 . Розглянуто питання синергізму та антагонізму їх дії в організмі і в окремих клітинах. Проаналізовано дані про залежність характеру біологічного ефекту кожного з похідних від його дози і фізіологічного стану клітини.

Summary. The experimental results on peculiarity of biological effects of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and 24,25-dihydroxyvitamin D_3 — main metabolites of vitamin D_3 are summarized in present review. Problems of antagonism and synergism of their action in whole organism and in separate target cells are discussed. The data on dependence of biological effects characters of each derivative on their doses and cells' physiological state are analysed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бауман В. К. Биохимия и физиология витамина D — Рига : Зинатне, 1989.—480 с.
2. Brommage R., De Luca H. F. Evidence that 1,25-dihydroxyvitamin D_3 is the physiologically active metabolite of vitamin D_3 // *Endocrinol. Rev.*—1985.—6, N 4.— P. 491—511.
3. Haussler M. R. Vitamin D receptors: nature and functions // *Annu. Rev. Nutrition.*—1986.—6.— P. 525—562.
4. Yamada S., Ino E., Takayama H., Suda T. Metabolism of 24R,25-dihydroxyvitamin D_3 : an approach from synthetic study // *Vitamin D: chem, biochem. and clin. update* // Eds. A. W. Norman et al.—Berlin : New York : W. de Gruyter, 1985.— P. 13—22.
5. Спиричев В. Б., Конь И. Я. Биологическая роль жирорастворимых витаминов // *Итоги науки и техники.*—1989.— Т. 37.— С. 77—159.
6. Sömjén D., Weisman Y., Borger E. et al. A comparison of the responses to 24R,25(OH) $_2\text{D}_3$ and 1,25(OH) $_2\text{D}_3$ by developing skeletal tissue / *Vitamin D: chem., biochem. and clin. update* / Eds A. W. Norman et al.—Berlin; New York : W. de Gruyter, 1989.— P. 284—293.
7. Сергеев И. Н., Плещитный К. Д., Руснак Ф. И., Спиричев В. Б. Влияние 24,25-дигидроксивитамина D_3 (диоксивита) на обмен Ca и иммунный статус организма при хронической почечной недостаточности // *Вопр. мед. химии.*—1990.—36, № 4.— С. 17—20.
8. Алексеева И. А., Спиричев В. Б., Блажеевич Н. В. и др. Сравнительное изучение биологической активности 1 α ,25-диоксихолекальциферола и 24,25-диоксихолекальциферола у крыс // Там же.—1982.—28, № 5.— С. 71—77.
9. Suda T., Takahashi N., Abe E. Role of vitamin D in bone resorption // *J. Cell. Biochem.*—1992.—49, N 1.— P. 53—58.

10. *Rubinder D., Cojocarn T., Popovtzer M. M.* 24,25-(OH)₂D₃ attenuates the calcemic effect of 1,25(OH)₂D₃ in rats with reduced renal mass // *Vitamin D: chem., biochem. and clin. update* / Eds. A. W. Norman et al.—Berlin; New York: W. de Gruyter, 1989.—P. 282—283.
11. *Rambeck W. A., Zuker H.* Synergistic effects of 1,25 (OH)₂D₃ and 24,25(OH)₂D₃ on the duodenal CaBP in rachitic and on egg shell weight in Japanese quail / *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1985.—126, N 2.—P. 799—804.
12. *Cafferey J. M., Farach-Carson M. C.* Vitamin D₃ metabolites modulate dihydropyridine-sensitive calcium currents in clonal rat osteosarcoma cells // *J. Biol. Chem.*—1989.—264, N 34.—P. 20265—20274.
13. *Wilhelm F., Ross F. P., Norman A. W.* 24R,25(OH)₂D₃: An allosteric effector of 1,25(OH)₂D₃ binding to its chick intestinal receptor // *Vitamin D: chem., biochem. and clin. update* / Eds. A. W. Norman et al.—Berlin; New York: W. de Gruyter, 1989.—P. 129—130.
14. *Costa E. M., Hirst M. A., Feldman D.* Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors by vitamin D analogs in cultured mammalian cells / *Endocrinology.*—1985.—115, N 5.—P. 2203—2210.
15. *Ornoy A., Lidor C., Atkin I. et al.* Effect of intraepiphysial injection of vitamin D metabolite on healing of rickets in chicks // *Vitamin D: chem., biochem., and clin. update* / Eds. A. W. Norman et al.—Berlin; New York: W. de Gruyter, 1989.—P. 314—315.
16. *Sömjen D., Sömjen A., Harel A. et al.* Partial characterization of specific high affinity binding macromolecule for 24,25-dihydroxyvitamin D₃ in differentiation skeletal mesenchyme // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1982.—106, N 2.—P. 644—651.
17. *Schwartz Z., Swain L. D. et al.* Regulation of arachidonic acid turnover by 1,25(OH)₂D₃ and 24,25(OH)₂D₃ in growth zone and resting zone chondrocyte cultures // *Biochim. et biophys. acta.*—1990.—1027, N 3.—P. 278—286.
18. *Boyan B. D., Schwartz Z., Carnes D. L., Ramirez V.* The effects of vitamin D metabolites on the plasma and matrix vesicle membranes of growth and resting cartilage cells in vitro // *Endocrinology.*—1988.—122, N 6.—P. 2851—2860.
19. *Schwartz Z., Boyan B.* The effects of vitamin D metabolites on phospholipase A₂ activity of growth zone and resting zone cartilage cells in vitro // *Ibid.*—N 5.—P. 2191—2198.
20. *Takeuchi Y., Matsumoto T. et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits synthesis and enhances degradation of proteoglycans in osteoblastic cells // *J. Biol. Chem.*—1989.—264, N 31.—P. 18407—18413.
21. *Бондаренко Л. Б., Яхимович Р. И., Гогоман И. В. и др.* Влияние 3β-фторвитамина D₃ и 1α,25-дигидроксивитамина D₃ на коллагены кости и хряща цыплят // *Докл. АН УССР.*—1991.—№ 7.—С. 138—143.
22. *Бондаренко Л. Б., Яхимович Р. И., Гогоман И. В., Бауман В. К.* Влияние 3β-фторвитамина D₃ и 1α,25-дигидроксивитамина D₃ на аминокислотный состав коллагена кожи цыплят // *Там же.*—1992.—№ 3.—С. 120—124.
23. *Бондаренко Л. Б., Яхимович Р. И., Бауман В. К.* Влияние 1α-оксивитамина D₃ и 24,25-дигидроксивитамина D₃ на коллагены кости, кожи и хряща цыплят // *Биополимеры и клетка.*—1992.—8, № 5.—С. 38—44.
24. *Kato Y., Shimazu A., Iwamoto M. et al.* Role of 1,25-dihydroxycholecalciferol in growth-plate cartilage: inhibition of terminal differentiation of chondrocytes *in vitro* and *in vivo* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87, N 17.—P. 6522—6526.
25. *Beresford J. N., Gallagher J. A., Russell R. G. G.* 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and human bone-derived *in vitro*: effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation // *Endocrinology.*—1986.—119, N 4.—P. 1776—1785.
26. *Evans D. V., Thavarajah M., Kanis J. A.* The effects of 24,25(OH)₂D₃ and 25(OH)₂D₃ on the cellular proliferation and synthesis of osteocalcin and alkaline phosphatase by human osteoblast-like cells in vitro // *Calcified Tissue Int.*—1990.—46, Suppl. N 2.—P. 18.
27. *Inaba M., Burgos-Trinidad M., De Luca H. F.* Characteristics of the 25-hydroxyvitamin D₃-and 1,25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylases from IHL-60 cells // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1991.—284, N 2.—P. 257—263.
28. *Morgan J. W., Maizel A. L., Clark J., Sharma S.* 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ selectively inhibits FC R11/CD23 b isoform gene expression // *J. Cell. Biochem.*—1992.—Suppl. 16b.—P. 290.
29. *Koren R., Liberman U. A., Maron L. et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ acts directly on human lymphocytes and interferes with the cellular response to interleukin-2 // *Immunopharmacol.*—1989.—18, N 3.—P. 187—194.
30. *Бабарыкин Д. А., Смитниекс Э. Х., Валиниче М. Ю., Бауман В. К.* 24,25-Дигидроксивитамина D₃ моделирует действие 1α-гидроксивитамина D₃ на созревание В-лимфоцитов у цыплят // *Вопр. мед. химии.*—1988.—34, № 6.—С. 82—86.
31. *Suda T., Abe E., Miyaura C., Tanaka H.* Modulation of proliferation, differentiation, activation and fusion of hematopoietic cells by 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ // *Myelodysplast. syndromes: Pathophysiol. and treat.: Proc. symp. myelodysplast. syndromes* (Kyoto, 28 Aug., 1987).—Amsterdam etc., 1988.—P. 95—121.
32. *Billecoco A., Emanuel I. R., Levenson R., Baron R.* 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates the expression of carbonic anhydrase II in nonerythroid avian bone marrow cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87, N 16.—P. 6470—6474.

33. *Tanaka Y., Bush K. K., Klauck T. M., Higgins P. J.* Enhancement of butyrate-induced differentiation of HT 29 human colon carcinoma cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ // *Biochem. Pharmacol.*—1989.—38, N 21.—P. 3859—3865.
34. *De Cremoux P., Calvo F., Lagier G. et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates adenylate cyclase activity of the human breast cancer cell line T 47D through increased synthesis of Gs // *Ibid.*—N 18.—P. 3111—3114.
35. *Kawaguchi N., De Luca H. F., Noda M.* Id gene expression and suppression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in rat osteoblastic osteosarcoma cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1992.—89, N 10.—P. 4569—4572.
36. *Mykkanen H. M., Wasserman R. H.* Reactivity of sulfhydryl groups in the brush-border membranes of chick duodena is increased by 1,25-dihydroxycholecalciferol // *Biochim. et biophys. acta.*—1990.—1033, N 3.—P. 282—286.
37. *Shionome M., Shinki T. et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulation in lipid metabolism in established bone marrow-derived stromal cells MC3T3-G2/PA6 // *J. Cell. Biochem.*—1992.—48, N 4.—P. 424—430.
38. *Okazaki T., Bielawska A., Bell R. M., Hannun Y. A.* Role of ceramide as a lipid mediator of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced HL-60 cell differentiation // *J. Biol. Chem.*—1990.—265, N 26.—P. 15823—15286.
39. *Baran D. T., Sorensen A. M., Honeyman T. W. et al.* Rapid actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on Ca²⁺ and phospholipids in isolated rat liver nuclei // *FEBS Lett.*—1989.—259, N 1.—P. 205—208.
40. *Schwartz Z., Schlader D. L., Swain L. D., Boyan B. D.* Direct effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 24,25-dihydroxyvitamin D₃ on growth zone and resting zone chondrocyte membrane alkaline phosphatase and phospholipase-A₂ specific activities // *Endocrinology.*—1988.—123, N 6.—P. 2878—2884.
41. *Wakasugi M., Noguchi T., Inone M. et al.* Vitamin D₃ stimulates the production of prostacyclin by vascular smooth muscle cells // *Prostaglandins.*—1991.—42, N 2.—P. 127—136.
42. *Бондаренко Л. Б., Харченко О. В., Бутович И. А.* Витамин D₃ и 1,25-диоксивитамин D₃ — ингибиторы 5-липоксигеназы // *Биополимеры и клетка.*—1992.—8, № 6.—С. 41—43.
43. *Яхимович Р. И., Бондаренко Л. Б., Гогоман И. В. и др.* Влияние 3β-фторвитамина D₃ и 1,25-дигидроксивитамина D₃ на некоторые показатели своротки крови цыплят // *Докл. АН УССР.*—1991.—№ 5.—С. 149—151.
44. *Бондаренко Л. Б., Яхимович Р. И., Бауман В. К.* Влияние 1α-оксивитамина D₃ и 24,25-диоксивитамина D₃ на пул свободных аминокислот и другие показатели своротки крови цыплят // *Биополимеры и клетка.*—1993.—9, № 1.—С. 15—18.
45. *Takeuchi Y., Matsumoto Y., Ogata E., Shishiba Y.* 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibit synthesis and enhances degradation of proteoglycans in osteoblastic cells // *J. Biol. Chem.*—1989.—264, N 31.—P. 18407—18413.
46. *Franceschi R. T., Romano P. R., Park K. J.* Regulation of type I collagen synthesis by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human osteosarcoma cells // *Ibid.*—1988.—263, N 35.—P. 18938—18945.
47. *Silbermann M., Mark K., Mirsky N. et al.* Effect of increased doses of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on matrix and DNA-synthesis in condylar cartilage of suckling mice // *Calcified Tissue Int.*—1987.—41, N 2.—P. 95—104.

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

Получено 03.06.93