

Л. Б. Бондаренко

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА D НА СОЕДИНИТЕЛЬНУЮ ТКАНЬ

*Рассмотрены особенности влияния веществ D-витаминной природы на соединительную ткань, ее клетки и коллаген как *in vivo*, так и *in vitro*.*

С момента открытия в 20-х годах вещества D-витаминной природы рассматривались в основном как регуляторы гомеостаза кальция в организме и в связи с этим исследования их биологической активности ограничивались в основном областью минерального обмена. Лишь в последнее десятилетие после обнаружения многочисленных метаболитов и синтетических фторпроизводных витамина D выяснилось, что они действуют в организме не только на обмен кальция, но влияют также на регуляцию роста и развитие клеток.

Изучая действие витамина D на минеральный обмен и минерализацию, нельзя оставить без внимания его эффект на соединительную ткань и непосредственно на коллагеновые структуры, являющиеся кристаллы оксиапатита [1—4].

Изменение структуры коллагена оказывает непосредственное влияние на течение процессов минерализации в организме [2, 3]. На кальцификацию ткани влияет также и степень сшитости коллагеновых молекул, тип образуемых ими сшивок [3].

Исследования, посвященные воздействию витамина D на соединительную ткань и коллаген, были начаты на рубеже 80-х годов и в основном проводились в системах *in vitro* на различных линиях клеток костной и хрящевой ткани. Изучение эффекта витамина D *in vivo* ограничивалось в основном количественными показателями процесса биосинтеза коллагена.

Настоящий обзор представляет собой первую попытку обобщить разрозненные и неоднозначные экспериментальные данные.

Влияние витамина D₃ на соединительную ткань и коллаген *in vitro*. Витамин D, являясь одним из основных регуляторов процессов формирования скелета, минерализации тканей, действует как на щелочную фосфатазу, кальций, фосфор, так и на органическую матрицу (представленную коллагеновыми структурами), являющуюся минеральным компонентом. Данные о влиянии витамина D₃ и его производных на соединительную ткань и коллаген немногочисленны и противоречивы.

В опытах *in vitro* получены множественные доказательства разнонаправленного воздействия витамина D₃ и его метаболитов на обмен коллагенов различных типов, на рост и развитие клеток соединительной ткани в культуре.

Показано, что в костной ткани 16-дневных куриных эмбрионов и 4-дневных мышей, различающейся по содержанию костеобразующих и резорбирующих клеток, 1 α ,25-дигидроксивитамин D₃ ингибировал синтез коллагена, не влияя на неколлагеновые белки [5, 6].

В культуре медулярной кости птиц [7] введение 1 α ,25-(OH)₂D₃ вызывало дозозависимое включение ³H-пролина в коллагеновый белок. Другие метаболиты витамина D₃ с гидроксильной группой в C-1 также подавляли синтез коллагена в культуре костной ткани [8].

У крысиного эмбриона синтез коллагена тормозился при содержании в среде 10⁻⁸ M 1 α ,25-(OH)₂D₃ или 10⁻⁷ M 1 α -OHD₃ [9]. Включение ³H-пролина в коллаген в культуре среза черепа новорожденных мышей свидетельствует об ингибирующем эффекте на синтез белка метаболитов витамина D₃: 1 α ,25-(OH)₂D₃; 1 α -OHD₃; 25-OHD₃; 24R, 25-(OH)₂D₃; 24S, 25-(OH)₂D₃ [10]. Способность 1 α ,25-(OH)₂D₃ в дозе 8,1 нМ снижать синтез коллагена в 2 раза отмечена и авторами работы [11] в первичной культуре остеобластоподобных клеток черепной

кости 19—20-дневного крысиного эмбриона. В опытах на линии UMR 201 преостеобластных клеток свода черепа крысы показано, что $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ в концентрации 10^{-14} — 10^{-10} снижал содержание мРНК для коллагена I типа, параллельно уменьшая и количество мРНК остеоонектина [12].

Приведенные данные подтверждают ингибирующий эффект метаболитов витамина D_3 на биосинтез коллагена у различных линий клеток соединительной ткани, преимущественно остеобластоподобных. Однако данные ряда авторов указывают на наличие стимулирующего эффекта витамина D и его метаболитов на синтез коллагена.

При сравнительном изучении содержания коллагенов X-типа в минерализованном нормальном и неминерализованном рахитическом хряще эпифиза большой берцовой кости цыплят отмечено снижение содержания коллагена типа X в рахитическом эпифизарном хряще [13] и, следовательно, более высокое его содержание при нормальной обеспеченности витамином D . Гибридизационный анализ мРНК и изучение биосинтеза коллагена X-типа в культуре органа доказали более высокую скорость синтеза коллагена X-типа при рахите. При гипокальциемическом рахите содержание мРНК коллагена X-типа снижалось на 80 %, тогда как при нормокальциемическом рахите — только на 50 %. Это наблюдение является дополнительным доказательством участия коллагена X-типа в процессах минерализации хряща. Менее выраженное уменьшение синтеза коллагена X-типа при нормокальциемическом рахите может быть вызвано более высоким содержанием кальция в плазме. Возможно, что концентрация ионов кальция в плазме крови играет важную роль в регуляции синтеза коллагена X-типа.

Действие, аналогичное эффекту витамина D , обнаружено и для его производных. Так, показано [14], что $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ в физиологических дозах стимулирует образование соединительной ткани *in vitro*. Способны активировать синтез коллагена в остеобластах диастереоизомеры $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ -26,23-лактона [15]. $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ в концентрации 5 нг/мл вызывает увеличение синтеза коллагена в большей степени, чем неколлагеновых белков в культуре клеток остеобластного клона MC3T3-E1 в бессывороточной среде [16, 17]. Известно [18], что этот метаболит витамина D требуется остеобластам для синтеза и кальцификации остеоида. Выяснилось также, что у крыс при дефиците витамина D хондроцитам ростовой пластинки необходимо наличие в культуральной среде и $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ для поддержания максимального уровня кальцификации и синтеза С-пропептида коллагена II типа, непосредственно связанного с процессами формирования вторичных центров оссификации. Для крыс с нормальной обеспеченностью витамином D_3 требуется комбинация $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ для максимального уровня синтеза С-пропептида коллагена II типа и кальцификации хряща [18].

Недавно установлено, что местное введение $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ рахитичным цыплятам может индуцировать излечение рахитических нарушений в ростовой пластинке, что указывает, возможно, на прямой местный эффект этого метаболита на хрящ и кость.

In vivo показано, что ежедневное внутрибрюшинное введение мышам 45 или 225 пмоль 23S, 25R- $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ -26,23-лактона, являющегося природным метаболитом $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$, дозозависимо стимулирует эктопическое образование костной ткани, вызываемое имплантацией индуцирующего кость полипептида из мышьяной остеосаркомы [19]. Лактон усиливает поглощение ^3H -пролина вновь образуемой костью на стадии формирования матрицы (10 дней после имплантации) и ^{85}Sr на стадии минерализации (3 недели), что сопровождается умеренным снижением концентрации Ca в плазме крови и двукратным увеличением концентрации $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$. Конкурентные ингибиторы рецепторов стероидных гормонов полностью подавляют стимулирующий эффект 26,23-лактона на эктопическое образование кости. Это свидетельствует о том, что его влияние на формирование и минерали-

зацию костной ткани реализуется, вероятно, путем взаимодействия его со специфическим рецептором [19].

Исследование эффекта $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -26,23-лактона [20] в условиях *in vitro* показало, что этот стероид дозозависимо повышает активность щелочной фосфатазы, синтез коллагена, снижает мобилизацию ^{45}Ca из кости.

Помимо влияния на процессы синтеза отмечено и воздействие производных витамина D_3 на резорбцию коллагена. $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ стимулирует деградацию пленок коллагена I типа мышинными остеобластами [21]. Кроме этого, показано, что $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, $1\alpha\text{-OHD}_3$ усиливают резорбцию кости в 1,5—2,5 раза [9]. $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ в фармакологических дозах также может повышать резорбцию [14]. При инкубации срезов растущего хряща эпифизарной пластинки большой берцовой кости 4-недельных цыплят, лишенных витамина D в течение 24—72 ч, с $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ в концентрации 10^{-8} — 10^{-6} M этот метаболит усиливает резорбцию [22]. *In vitro* 23S , $25\text{R-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -26,23-лактон тормозит резорбцию костной ткани [20].

Есть свидетельства того, что агенты, вызывающие резорбцию кости, влияют на продукцию и распределение проколлагеназы и активность коллагеназы в костной ткани [23]. Измеряли экстрагируемую проколлагеназную активность в культуре фетальной костной ткани мыши. Культивирование ткани с $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ индуцировало резорбцию кости, повышало высвобождение лизосомных ферментов и активность проколлагеназы. Распределение проколлагеназной активности совпадало с таковым неминерализованного коллагена. Кальцитонин полностью подавлял потерю Ca^{2+} и высвобождение лизосомных ферментов, но лишь частично — деградацию коллагена. Ингибиторы коллагеназы тормозили распад коллагена и незначительно ингибировали потерю Ca^{2+} .

Недавно изучено влияние $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ на промотор коллагена $\alpha_1(\text{I})$ крыс [24]. Сначала было показано, что угнетение синтеза коллагена I типа $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ в клетках остеосаркомы крыс сопровождалось эквивалентным снижением уровней мРНК $\alpha_1(\text{I})$ - и $\alpha_2(\text{I})$ -цепей коллагена. Для выяснения механизма данного явления выделен участок ДНК, содержащий промотор крысиного гена $\alpha_1(\text{I})$ -цепи коллагена. Полученный фрагмент был встроен в геном клеток линии ROS17/2.8, служивших *in vitro* моделью для анализа регуляторного воздействия $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ на коллагеновый промотор. В результате выяснено, что $\alpha_1(\text{I})$ -промотор содержит элементы, регулируемые рецептором $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ в клетках ROS17/2.8.

Помимо непосредственного влияния на обмен коллагена витамин D_3 в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ M стимулирует синтез гликозаминагликанов матрикса хряща, выявляемый по включению радиоактивно меченого сульфата [25]. Для синтеза гликопептидов хряща важен и $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ [26].

Витамин D_3 и его производные оказывают также разнообразное влияние непосредственно на клетки соединительной ткани. Установлено, что $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (10^{-9} — 10^{-7} M) в культуре костной ткани 3-недельных крыс-самцов Вистар значительно повышает активность щелочной фосфатазы, не изменяя при этом активности кислой фосфатазы, и увеличивает содержание в них ДНК и кальция. В концентрации 10^{-8} — 10^{-7} M $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ повышал включение ^3H -лейцина в культивируемые клетки.

Отмечено [27] влияние $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ и $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ на пролиферацию и дифференциацию клеток в культуре хондроцитов кролика. Добавление в среду $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ первичной культуры остеобластов из кости ребенка в первые 2 ч несколько стимулировало пролиферацию изучаемых клеток; затем рост культур приостанавливался [28]. При этом часть клеточной популяции тормозилась на стадиях G_0 — G_1 . Замедление пролиферации коррелировало с увеличением активности щелочной фосфатазы, что дает основание предположить влияние гормона на дифференциацию остеобластов. Некоторыми авторами [29] пока-

зано, что $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ в концентрации $5 \cdot (10^{-11}—10^{-8})$ М тормозит пролиферацию костных клеток, а в концентрации $10^{-11}—10^{-7}$ М — увеличивает активность щелочной фосфатазы. Полученные данные дают основание полагать, что $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ является регулятором роста и дифференцировки костных клеток человека *in vitro*. Установлено [30], что $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ дозозависимо ингибирует развитие растущих хрящевых клеток. В концентрации $10^{-11}—10^{-8}$ М в этой культуре он вызывает снижение количества клеток, достигающее статистической значимости при 10^{-8} М. $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ в концентрации 10^{-9} М не влияет на количество клеток в культуре хондроцитов растущей зоны, но увеличивает их число в культуре покоящейся зоны [31]. Выявлена специфическая роль $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ в развитии соединительной ткани. Этот метаболит способен оказывать стимулирующее действие на хондрогенез [14], опосредованное взаимодействием со специфическим рецепторным белком, связывающим $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ в хондроцитах [32]. Под влиянием данного метаболита стимулируется образование хряща, его дальнейшее созревание и минерализация.

Исследование пролиферации в культуре полученной биопсией кожи фибробластов трех взрослых больных псориазом и трех здоровых людей в присутствии $10^{-6}—10^{-11}$ М $1\alpha,25$ -диокси-; 20 -окса- $1\alpha,25$ -диокси-; 22 -окса- 1α -окси-; 22 -окса- $1\alpha,22$ -диоксипроизводных витамина D_3 показало, что клетки больных отличаются пониженной чувствительностью к угнетению пролиферации в течение 7 сут культивирования со всеми производными, кроме 22 -окса- $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$, эффективного при лечении псориаза [33].

Показано также, что $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ увеличивает число дифференцированных слущивающихся кератиноцитов в коже человека [34].

О том, насколько сильное влияние оказывают производные витамина D_3 на соединительную ткань, свидетельствуют данные о скорости проявления этого эффекта. Уже после 3 ч инкубации костной ткани с $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ отмечалось снижение образования проколлагеновой РНК [35]. Но возможно и обратное действие этого метаболита. На другой линии клеток через 6—12 ч после введения в среду $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ селективно стимулирует синтез $\alpha_1(\text{I})$ - и $\alpha_2(\text{I})$ -компонентов коллагена типа I. Максимум этот процесс достигает через 24 ч [36]. При действии $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ на остеобласты клона MC3T3-E1 максимальный эффект наблюдается через 12 ч для повышения активности щелочной фосфатазы и через 24 ч для повышения скорости синтеза коллагена [16]. В культуре остеобластов человека $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ уже в первые 3 ч проявляет стимулирующее действие на пролиферацию клеток [28].

Эффект метаболитов витамина D_3 различается в зависимости от их дозы, что показано в экспериментах ряда авторов [6, 9, 22, 25, 29, 31]. При этом наблюдается как прямая, так и обратная зависимость эффекта от дозы [31].

D-гиповитаминоз приводит к определенным сдвигам в соотношении клеточных элементов костной ткани и их функции. Деятельность остеобластов при избыточных дозах витамина D_3 подавлена, тормозится синтез ДНК и коллагена [37]. Происходит увеличение числа остеобластов. Фармакологические дозы витамина D_3 , вводимые коровам для предупреждения родильной лихорадки, усиливали резорбцию скелета остеокластами [38].

Кроме того, отдельные метаболиты влияют по-разному в зависимости от дозы [9, 22, 30, 31]. $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ эффективно воздействует на культуру кости крысиного эмбриона в концентрации $10^{-11}—10^{-8}$ М [9], на культуру клеток хряща крысы — 10^{-8} М [31], на срезы растущего хряща эпифизарной пластинки большой берцовой кости 4-недельных цыплят — $10^{-8}—10^{-6}$ М [22]. $1\alpha\text{-OHD}_3$ в культуре органа крысиного эмбриона стимулирует резорбцию кости и тормозит синтез коллагена в концентрации $10^{-8}—10^{-6}$ М [9]. Для проявления эффекта $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ на хондроциты покоящейся зоны требуется концентрация

10^{-9} М (при более высоких концентрациях — 10^{-8} — 10^{-6} М — этот эффект отсутствует) [31]. В культуре эпифизарного хряща шпылят 24,25-(ОН) $_2$ D $_3$ и 1 α ,25-(ОН) $_2$ D $_3$ тормозят синтез коллагена в концентрациях 10^{-7} и 10^{-6} М соответственно. Собственная фаза развития хондроцитов является важным моментом при воздействии D-витаминных соединений (растущие и покоящиеся клетки) [22, 30, 31]. Хондроциты из растущего хряща быстро реагируют на 1 α ,25-(ОН) $_2$ D $_3$, тогда как клетки покоящейся зоны — на 24,25-(ОН) $_2$ D $_3$. Соответственно маркерные ферменты из мембран матричных везикул (Na $^+$, K $^+$ -АТФаза, щелочная фосфатаза, нуклеотидаза) по-разному реагировали на воздействие этих метаболитов витамина D $_3$ в зависимости от зон хряща и фенотипа клеток.

Рецепторы 24R, 25-(ОН) $_2$ D $_3$ локализованы в развивающихся хондробластах, тогда как рецепторы 1 α ,25-(ОН) $_2$ D $_3$ — в остеобластах [39]. Каждому из этих метаболитов присуща особая роль в формировании скелета. В частности, полагают, что 24,25-(ОН) $_2$ D $_3$ более активен в хряще на ранней стадии его развития. Это подтверждается экспериментами на клетках куриных эмбрионов, хрящевых клетках, находящихся в стадии пролиферации и дифференциации.

Показано [11], что эффекты 1 α ,25-(ОН) $_2$ D $_3$ на синтез коллагена, остеокальцина и индукцию 24-гидроксилазы 25-гидроксивитамина D $_3$ в первичной культуре остеобластоподобных клеток черепной кости 19—20-дневного крысиного эмбриона реализуются при разной степени занятости его ядерного рецептора. Экспрессия *in vitro* рецепторов 1 α ,25-(ОН) $_2$ D $_3$ в хондроцитах коленного хряща не связана с переключением синтеза коллагена типа II, характерного для данного хряща, на коллаген типа I или III [40]. Обнаружена корреляция между количеством рецепторов для 1 α ,25-(ОН) $_2$ D $_3$ и синтезом ДНК остеобластами [17].

Полученные в работе [36] результаты указывают на то, что регулируя синтез коллагена 1 α ,25-(ОН) $_2$ D $_3$ сложна и может влиять как на изменения в ходе трансляции, так и на уровень мРНК.

Влияние витамина D $_3$ на соединительную ткань и коллаген *in vivo*. В экспериментах *in vivo* в центре внимания исследователей находились такие показатели, как скорость синтеза различных фракций и типов коллагена, а также скорость их созревания.

Показано [41], что недостаток витамина D $_3$ в 3—4 раза снижает количество солерастворимого коллагена в эпифизах и диафизах крысят и на 10—20 % увеличивает количество нерастворимого коллагена. В экспериментах с использованием 14 C-меченного глицина [42] выявлено снижение в 1,7 раза содержания растворимого коллагена в костной ткани крыс, больных рахитом. Уменьшение количества растворимого коллагена сопровождается одновременным накоплением его нерастворимой фракции. Поскольку Са включается в первую очередь во фракцию незрелого солерастворимого коллагена, то снижение содержания этой фракции при недостаточности витамина D может быть одной из причин нарушения нормальной кальцификации кости.

На синтез коллагена хряща витамин D оказывает тормозящий эффект [43]. Подкожное введение 7-дневным мышам в течение недели 1 α ,25-(ОН) $_2$ D $_3$ вызывает значительное сокращение зоны хряща мышелка, количества прогениторных хрящевых клеток, хондробластов и гипертрофированных хондроцитов с одновременным увеличением беспорядочных участков минерализованной костной ткани. Эти морфологические и гистохимические изменения хряща сопровождаются заметным уменьшением содержания и синтеза в нем коллагена и изменением структуры экстраклеточных коллагеновых волокон, что обусловлено тормозящим эффектом 1 α ,25-(ОН) $_2$ D $_3$ на пролиферативную активность хрящевых прогениторных клеток и на метаболическую активность самих хондроцитов.

У рахитичных крыс в коллагене кости в 3—4 раза увеличивается активность лизилоксидазы, катализирующей окисление ϵ -аминогрупп лизильных и оксизлизильных остатков с образованием альдегидных групп, принимающих участие в формировании поперечных сшивок [41].

Изучалось состояние структурных поперечных швов и в костном коллагене цыплят [44]. Исследовали соотношение между диоксизилнорлейцином и оксизилнорлейцином в восстановленном натрий-боргидридом коллагене диафизов 1-, 2-, 3- и 4-недельных цыплят с различной обеспеченностью витамином D. У цыплят, получавших рацион с нормальным содержанием витамина D, отношение между диоксизилнорлейцином и оксизилнорлейцином максимально в течение первой недели жизни и прогрессивно уменьшается с возрастом. Это снижение ускорено у цыплят, получавших дополнительно по 70 МЕ витамина на 1 г диеты, что существенно превышает их физиологическую потребность в этом витамине. У цыплят, лишенных витамина D, отношение между диоксизилнорлейцином и оксизилнорлейцином остается в течение всех четырех недель на уровне, соответствующем первой неделе жизни, что может свидетельствовать о нарушении созревания коллагена. Недостаточность витамина D не влияет на отношение диоксизилнорлейцина к оксизилнорлейцину в коллагене кожи цыплят.

Изучено распределение стабильных поперечных швов, образованных пиридинолином в триптических пептидах, полученных в результате протеолиза трех видов костного коллагена: I — выделенного от нормальных, II — больных остеобластомой и III — лишенных витамина D цыплят [45]. Анализ характера флуоресценции фракций пептидов, выделенных с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50, показал наличие пиридинолина во всех данных видах костного коллагена. Содержание пиридинолина в коллагене при остеобластоме и дефиците витамина D₃ было выше, чем в костном коллагене в норме. Для костного коллагена при остеобластоме и отсутствии витамина D характерна более слабая минерализация и более высокое содержание оксизина.

Увеличение количества оксизина при рахите в коллагене кости цыплят отмечали и другие авторы [46]. Показано, что степень гидроксилирования лизина при рахите увеличилась на 50 % в $\alpha_1(I)$ - и $\alpha_2(I)$ -цепях коллагена кости. Параллельно с содержанием оксизина изменялось и количество углеводов.

Пребывание цыплят с первого дня жизни в течение 3—6 недель на рационе, лишенном витамина D₃, с 1,2 % Са и 0,7 % Р приводит к гипокальцемии и увеличению степени гидроксилирования лизина, а также величине отношения диоксизилнорлейцин/оксизилнорлейцин в восстановленном боргидридом натрия коллагене диафизов бедра. Сходные изменения наблюдаются у цыплят с гипокальцемией, обусловленной снижением потребления Са (0,07 % в рационе) при нормальной обеспеченности витамином D. С другой стороны, увеличение потребления Са (2 % в рационе) предотвращает существенное увеличение степени гидроксилирования лизина и отношения диоксизилнорлейцин/оксизилнорлейцин. Это указывает на опосредованный кальцием механизм влияния витамина на степень созревания и количество швов коллагена кости цыплят. Ускорение созревания коллагена при недостаточности витамина D может быть и компенсаторной реакцией в ответ на нарушение минерализации, направленной на поддержание прочности костной ткани путем усиления фибриллогенеза.

Опосредованное Са воздействие витамина D на синтез коллагенового матрикса остеобластами и хондроцитами эпифизарной ростовой пластинки подтверждается и авторами [47].

В проведенных нами экспериментах [48—54] изучалось влияние витамина D₃ и его производных $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ и 3β -фторвитамина D₃ на коллагены кости, кожи и хряща цыплят. Показана способность витамина D₃ менять аминокислотный состав и содержание углеводного компонента коллагенов кости, кожи и хряща. Также было установлено, что метаболиты витамина D₃ — $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ и 3β -FD₃ влияют на данные показатели, не всегда при этом аналогично самому витамину.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что D-витаминные соединения способны воздействовать на процессы биосинтеза коллаген-

нов различных типов и формирования соединительной ткани. Их эффекты могут быть как прямыми, так и опосредованными кальцием. При этом одно и то же D-витаминное соединение как *in vivo*, так и *in vitro*, как правило, вызывает разнонаправленные изменения в коллагенах и других компонентах соединительных тканей в зависимости от дозы, условий введения, типа коллагена и соединительной ткани, вида экспериментальных животных.

Метаболиты и синтетические производные витамина D отличаются более сильным эффектом, чем сам витамин. При этом достаточно четко выражено своеобразие эффектов 1,25-(OH)₂D₃ и 24,25-(OH)₂D₃ на кость и хрящ, коллагены I и II типов, позволяющее по-новому взглянуть на роль каждого из этих основных метаболитов витамина в процессах формирования и минерализации скелета.

Широкий спектр биологической активности, возможно, обусловлен наличием нескольких механизмов влияния D-витаминных веществ на обмен коллагенов (в том числе на уровне транскрипции и трансляции).

Резюме. Розглянуто особливості впливу речовин D-вітамінної природи на сполучну тканину, її клітини та колаген як *in vivo*, так і *in vitro*.

Summary. Peculiarities of vitamin D and its derivatives effects on connective tissue, its cells and collagen *in vivo* and *in vitro* are discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лебедев Д. А. Коллагеновые структуры — одна из информационных систем организма // Успехи соврем. биологии.— 1979.— 88, № 1.— С. 36—49.
2. Glimcher M. J. Mechanism of calcification. Role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complex *in vitro* and *in vivo* // Anatomical Record.— 1989.— 224.— P. 139—153.
3. Veis A., Sabsay B. The collagen of mineralised matrices // Bone and Mineral Research // Elsevier Sci. publ.— 1983.— В. 5.— P. 1—63.
4. Vittur F., Stagni N., Moro L., de Bernard B. Alkaline phosphatase binds to collagen: a hypothesis on the mechanism of extravascular mineralisation in epiphyseal cartilage // Experientia — 1984.— 40, N 8.— P. 836—837.
5. Dickson G. R., Walls J. Vitamin A and 1,25 (OH)₂D₃ are both able to inhibit bone collagen synthesis as well as to stimulate bone resorption // Vitamin D. Chem., biochem., and clin. update / Ed. W. de Gruyter.— Berlin ; New York, 1985.— P. 487—488.
6. Dickson D. R., Walls J., Wright J. K. Influence of retinoids on osteoblast-like cells *in vitro* // Biochem. Soc. Trans.— 1986.— 14, N 5.— P. 955—956.
7. Harrison J. R., Clark N. B. Avian medullar bone in organ culture: effects on collagen synthesis // Calcified Tissue Int.— 1986.— 39, N 1.— P. 35—43.
8. Ruiz L. G., Main D. M., Gworek S. G. et al. Hormonal control of bone collagen synthesis *in vitro* inhibitory effect of 1-hydroxylated vitamin D metabolite // Endocrinology.— 1978.— 102, N 2.— P. 731—735.
9. Ruiz L. G., Kream B. E., Smith M. D., Simmons H. A. Comparison of the effects of vitamin D metabolites on collagen synthesis and resorption of fetal rat bone in organ culture // Calcified Tissue Int.— 1980.— 32, N 2.— P. 135—138.
10. Brighurst F. R., Potts J. T. Effects of vitamin D metabolites and analogs on bone collagen synthesis *in vitro* // Ibid.— 1982.— 34, N 1.— P. 103—110.
11. Chen J. L., Hauchka P. V., Cabrales S., Feldman D. The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and dexametasonone of rat osteoblast-like primary cell cultures: receptor occupancy and functional expression patterns for three different bioresponses // Endocrinology.— 1986.— 118, N 1.— P. 250—259.
12. Thielbaum D., Firdlay D. M., No R. W., Martin T. J. Regulation of osteonectin mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D in clonal preosteoblastic calvarial cells // Calcified Tissue Int.— 1990.— 46, Suppl., N 2.— P. 27.
13. Kwan A. P. L., Dickson I. R., Freemont A. J., Grand M. E. Comparative studies of type X collagen expression in normal and rachitic chicken epiphyseal cartilage // J. Cell. Biol.— 1989.— 109, N 4.— P. 1849—1856.
14. Ornoy A., Schwarts Z., Atkin I., Soskolne W. A. The direct effects of vitamin D metabolites on bone modeling in fetal mice long growth *in vitro* // Vitamin D. Chem., biochem. and clin. update / Ed. W. de Gruyter.— Berlin ; New York, 1985.— P. 316—318.
15. Ishizuka S., Kiyoki M., Kurihara N. et al. Effects of diastereoisomers of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-26, 23-lactone on alkaline phosphatase and collagen synthesis on osteoblastic cells // Mol. and Cell. Endocrinol.— 1988.— 55, N 1.— P. 77—86.

16. Kurihara N., Ikeda K., Hakeda Y. et al. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic cells clone MC 3T3-E1 // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1984.—119, N 2.—P. 767—771.
17. Kurihara N., Kumegawa M., Ikeda K. et al. 1,25-(OH)₂D₃ increases ALP activity and type I collagen production in osteoblastic clone MC 3T3-E1 cells in serum free media // *Vitamin D. Chem., biochem. and clin. update.*—Berlin; New York, 1985.—P. 477—478.
18. Poole A. R., Matsui I., Hinek A., Lee S. S. Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix // *Anatomical Record.*—1989.—224.—P. 167—179.
19. Shima M., Tanaka H., Norman A. W. et al. 23 (S), 25 (R)-1,25-Dihydroxyvitamin D₃-26,23-lactone stimulates murine bone formation *in vivo* // *Endocrinology.*—1990.—126, N 2.—P. 832—836.
20. Kiyoki M., Kurihara N., Ishizuka S. et al. The unique action for bone metabolism of 1,25(OH)₂D₃-26,23-lactone // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1985.—127, N 2.—P. 693—698.
21. Thomson B. U., Atkinson S. J., Reynolds J. I., Meikle M. C. Degradation of type I collagen films by mouse osteoblasts in stimulated by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and inhibited by human recombinant TIMP (tissue inhibitor of metalloproteins) // *Ibid.*—1987.—148, N 2.—P. 596—602.
22. Dickson G. R., Maher P. M. The influence of vitamin D₃ metabolites on collagen synthesis by chick cartilage in organ culture // *J. Endocrinol.*—1985.—105, N 1.—P. 79—85.
23. Delaisse J. M., Eeckhout J., Vals T. Bone-resorbing agents. Affect the production and distribution of procollagenase as well as the activity of collagenase in bone tissue // *Endocrinology.*—1988.—123, N 1.—P. 261—276.
24. Lichtler A., Stover M. L., Angilly J. et al. Isolation and characterization of the rat α₁(I) collagen promoter. Regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D // *J. Biol. Chem.*—1989.—264, N 6.—P. 3072—3077.
25. Föodes G., Hadhazy Cs., Modis L. Effect of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D₃ on glucosaminoglycans in micro high density culture // *Acta Biochim et Biophys. Hung.*—1988.—23, N 1.—P. 49—61.
26. Okamoto S., Tanaka Y., De Luka H. F. et al. 24,25-difluoro-25-hydroxyvitamin D₃-enhanced bone mineralization in rats comparison with 25-hydroxyvitamin D₃ and vitamin D₃ // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1981.—206, N 1.—P. 8—14.
27. Takigawa M., Enomoto M., Shirai E. et al. Differential effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and 24R,25-dihydroxycholecalciferol on the proliferation and the differentiation phenotype of rabbit costal chondrocytes in culture // *Endocrinology.*—1987.—122, N 3.—P. 831—832.
28. Harmand M. F., Bordenave L., Duphil R., Ducasson D. The effect of 1,25-(OH)₂D₃ on human osteoblastic cell differentiation «*in vitro*» // *Eur. J. Cell. Biol.*—1986.—42, Suppl., N 15.—P. 14—17.
29. Beresford J. N., Gallagher J. A., Russell R. G. G. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and human bone-derived cells *in vitro*: effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation // *Endocrinology.*—1986.—119, N 4.—P. 1776—1785.
30. 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* // *Ibid.*—1988.—122, N 6.—P. 2851—2860.
31. Schwartz Z., Boyan B. The effects of vitamin D metabolites on phospholipase A₂ activity on growth zone and resting zone cartilage cells *in vitro* // *Ibid.*—N 5.—P. 2191—2198.
32. Sömjen D., Sömjen G. R., Harel A. et al. Partial characterization of specific high affinity binding macromolecule of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ in differentiation skeletal mesenchyme // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1982.—106, N 2.—P. 644—651.
33. Спиричев В. Б., Конь И. Я. Биологическая роль жирорастворимых витаминов // *Итоги науки и техники.*—М.: ВИНТИ. 1989.—225 с.
34. Smith E. L., Wabworth N. C., Holick H. F. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the morphologic and biochemical differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free conditions // *J. Invest. Dermatol.*—1986.—86, N 6.—P. 709—714.
35. Rowe D. W., Kream B. E. Regulation of collagen synthesis in fetal rat calvaria by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ // *J. Biol. Chem.*—1982.—257, N 14.—P. 8009—8015.
36. 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.
37. Wong G. L., Luben R. A., Cohn D. W. 1,25-dihydroxycholecalciferol and parathormone: effect on isolated osteoclast-like and osteoblast-like cells // *Science.*—1977.—197, N 4304.—P. 663—665.
38. Rowland G. N., Capen C. C., Young D. M., Black H. E. Microradiographic evaluation of bone from cows with experimental hypervitaminosis diet-induced hypocalcemia and naturally occurring parturient paresis // *Calcified Tissue Int.*—1972.—9.—P. 179—193.
39. Sömjen D., Weisman J., Berger E. et al. A comparison of the responses to 24R, 25 (OH)₂D₃ and 1,25 (OH)₂D₃ by developing skeletal tissue // *Vitamin D. Chem.,*

- biochem. and clin. update / Ed. W. de Gruyter.— Berlin ; New York, 1985.— P. 284—291.
40. *Bhalla A. K., Wojno W. C., Goldring M. S.* Human articular chondrocytes acquire 1,25(OH)₂D₃ vitamin D₃ receptors in culture // *Biochim. et biophys. acta.*—1987.— **931**, (C-21), N 1.— P. 26—32.
 41. *Исаева В. А., Спиричев В. Б.* Относительное содержание α-, β- и γ-цепей растворимых фракций коллагена костной ткани крысы при различной обеспеченности витамином D // *Вопр. мед. химии.*— 1978.— № 2.— С. 270—274.
 42. *Волков Г. Л.* Включение метки из 2-¹⁴C-глицина в коллагеновые белки костной ткани крысы, больных рахитом // *Укр. биохим. журн.*— 1977.— 49, № 2.— С. 88—90.
 43. *Silberman M., Mark K., von der 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.
 44. *Mechanic G. L., Toverud S. U., Ramp W. K., Gounerman W. A.* The effect of vitamin D on the structural crosslinks and maturation of chick bone collagen // *Biochim. et biophys. acta.*— 1975.— **393**, N 2.— P. 419—425.
 45. *Yamaguchi M., Banes A. J., Kuboki Y., Mechanic G. L.* A comparative study of the distribution of the stable cross-link, pyridinoline, in bone collagens from normal, osteoblastoma and vitamin D-deficient chicks // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*— 1988.— **102**, N 1.— P. 59—65.
 46. *Toole B. P., Kang A. H., Trelstad R. L., Gross J. G.* Collagen heterogeneity with different growth regions of long bones of rachitic and non-rachitic chicks // *Biochem. J.*— 1972.— **127**, N 7.— P. 715—720.
 47. *De Luca H. F., Schnoes H. K.* Vitamin D: metabolism and mechanism of action // *Ann. Rev. Med. Chem.*— 1984.— **19**.— P. 179—190.
 48. *Бондаренко Л. Б., Яхимович Р. И., Бауман В. К., Валинище М. Ю.* Коллаген хряща цыплят при рахите и различной обеспеченности витамином D₃ // *Докл. АН УССР.*— № 4.— С. 60—62.
 49. *Бондаренко Л. Б., Яхимович Р. И., Бауман В. К., Валинище М. Ю.* Влияние витамина D₃ на белки соединительной ткани // *Конф. «Проблемы микробного синтеза витаминов и их производных» (Ташкент, 1990): Тез. докл.*— Ташкент, 1990.— С. 52—53.
 50. *Бондаренко Л. Б., Яхимович Р. И., Бауман В. К., Валинище М. Ю.* Влияние витамина D₃ на белки органического матрикса кости и кожи цыплят // *Докл. АН УССР.*— 1990.— № 5.— С. 67—70.
 51. *Бондаренко Л. Б., Яхимович Р. И., Бауман В. К. и др.* Пул свободных аминокислот и другие биохимические показатели сыворотки крови цыплят при различной обеспеченности витамином D₃ // *Там же.*— № 9.— С. 54—57.
 52. *Яхимович Р. И., Бондаренко Л. Б., Гогоман И. В. и др.* Влияние 3β-фторвитамина D₃ и 1α,25-дигидроксивитамина D₃ на некоторые показатели сыворотки крови цыплят // *Там же.*— 1991.— № 5.— С. 149—151.
 53. *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 // *Там же.*— № 7.— С. 138—143.
 54. *Бондаренко Л. Б., Яхимович Р. И., Гогоман И. В. и др.* Влияние витамина D₃, его метаболита и фторпроизводного на различные биохимические показатели и соединительную ткань цыплят // *Всесоюз. совещ. «Новые аспекты участия биологически активных веществ в регуляции метаболизма и продуктивности сельскохозяйственных животных» (Боровск, 1991): Тез. докл.*— Боровск, 1991.— С. 82—83.

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

Получено 23.10.92