

РОЛЬ ВІТАМІНУ Е В РЕГУЛЯЦІЇ ГІДРОКСИЛЮВАННЯ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛУ ЗА D-ГІПОВІТАМІНОЗУ ТА D-ГІПЕРВІТАМІНОЗУ

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

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

Установлено, що додозалежний вплив вітаміну Е на обмін вітаміну D_3 опосередковується ступенем забезпечення організму холекальциферолом. За D-гіповітамінозу в сироватці крові щурів удвічі знижується вміст гідроксильованої форми вітаміну D_3 (25OHD_3), у той час як вітамін D_3 25-гідроксилазна активність у гепатоцитах зростає. Вітамін Е в дозі 0,726 МО істотно посилює у гіповітамінозних тварин ефект вітаміну D_3 , що супроводжується зростанням рівня 25OHD_3 в сироватці крові та вітамін D_3 25-гідроксилазної активності в гепатоцитах. У разі D-гіпервітамінозу вміст 25OHD_3 в сироватці крові підвищується у 3,5 рази на тлі інгібування вітамін D_3 25-гідроксилазної активності в гепатоцитах. Вітамін Е (0,726–7,260 МО) зменшує токсичну дію вітаміну D, знижуючи вміст 25OHD_3 в сироватці крові та вітамін D_3 25-гідроксилазну активність у гепатоцитах.

Вітамін Е у високих дозах (36,3 МО) за умов експерименту негативно впливає на обмін вітаміну D_3 . З огляду на різноспрямовану дію однакових доз вітаміну Е на обмін вітаміну D_3 за гіпо- і гіпервітамінозу припускається, що α -токоферол впливає на активність різних вітамін D_3 25-гідроксилазних систем гепатоцитів.

Ключові слова: вітамін D_3 , вітамін Е, 25OHD_3 , вітамін D_3 25-гідроксилазна активність, D-гіповітаміноз, D-гіпервітаміноз.

Основні біологічні ефекти активних форм вітаміну D_3 опосередковуються факторами транскрипції ядра клітини. Активні метаболіти вітаміну D_3 – $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ і $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ – зв'язуються зі специфічними рецепторами VDR, що мають класичну доменну структуру [1, 2]. Утворений комплекс $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ –VDR, проникаючи до ядра клітини, зв'язується з X-рецептором ретиноевої кислоти (RXR) і у вигляді спільного гетеродимерного комплексу $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ –VDR/RXR взаємодіє з консенсусною послідовністю ДНК промоторної ділянки гена-мішені, відомою як «елемент відповіді на вітамін D_3 » (vitamin D-responsive elements–VDRE). Каскад цих молекулярних взаємодій ініціює зміни транскрипції низки генів. Експресія понад 50 генів у клітинах організму регулюється $1,25$ -дигідроксихолекальциферолом [3]. Завдяки гормоноподібній дії $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ регулює метаболізм кальцію, підвищуючи абсорбцію його та фосфату в тонкій кишці, мобілізуючи кальцій у кістках і посилюючи реабсорбцію в нирках [4]. Некальціємічна дія $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ полягає в його здатності безпосередньо або опосередковано впливати на експресію генів, залучених до регуляції процесів проліферації, диференціації,

апоптозу та ангіогенезу [5, 6]. Основні ефекти $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ пов'язані з гальмуванням проліферації нормальних і трансформованих клітин та активацією диференціації клітин різних типів [7, 8].

Перетворення холекальциферолу на біологічно активні форми починається з його гідроксилування у 25-у положенні і утворення основної транспортувальної форми – 25-гідроксिवітаміну D_3 (25OHD_3). Процес відбувається в печінці за участю вітамін D_3 25-гідроксилаз. Швидкість утворення 25OHD_3 є показником інтенсивності перебігу процесів, пов'язаних з гідроксилуванням вітаміну D в окремих компартментах гепатоцитів, а його рівень у крові відображує забезпеченість організму вітаміном D [9].

Останнім часом значна увага приділяється вивченню взаємодії вітамінів D_3 та Е в регуляції обміну кальцію в організмі і стану кісткової тканини [10]. Вважають, що участь вітаміну Е в цих процесах обумовлено впливом на обмін вітаміну D_3 і синтезом рецепторів його активних метаболітів [11–13]. Імовірно, що нестача або надлишок вітаміну Е порушують обмін або ефект фізіологічної дії вітаміну D_3 , в т.ч. і регуляцію мінерального обміну.

Метою досліджень було вивчення регуляторного впливу вітаміну Е на інтенсивність синтезу $25\text{OH}\text{D}_3$ та активність вітамін D_3 25-гідроксилазних систем гепатоцитів за D-гіповітамінозного та D-гіпервітамінозного станів організму.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на білих щурах-самцях з масою тіла 100 ± 5 г. Під час однотижневої акліматизації і впродовж експерименту тварин утримували у віварії при $18\text{--}22^\circ\text{C}$, 50–60%-й вологості повітря та природному світловому режимі «день–ніч» у пластикових клітках на стандартному харчовому раціоні. Підбір тварин та формування груп здійснювали методом «випадкових чисел». Дослідні препарати вводили внутрішньошлунково зондом один раз на добу. Для моделювання D-гіповітамінозу щурів протягом 30 днів утримували на синтетичному раціоні без вітаміну D, але зі збалансованим у ньому вмістом кальцію (1,2%) та фосфору (0,7%) як рекомендовано в монографії [14]. Через 30 діб щурів розділили на групи: групу I утримували на D-гіповітамінозній дієті, тваринам групи 2 вводили 40 МО (1 мкг) вітаміну D_3 , а щурам груп 3–5 на тлі 40 МО вітаміну D_3 впродовж 20 діб вводили вітамін Е в різних дозах.

Для експериментального моделювання D-гіпервітамінозного стану щурам протягом 5 діб вводили 30 000 МО (750 мкг) вітаміну D_3 . Починаючи з третьої доби після припинення введення холекальциферолу, тваринам усіх груп окрім першої, щодобово протягом 6 діб вводили вітамін Е в дозах 0,726 (0,6 мг), 7,260 (6 мг) та 36,3 МО (30 мг) відповідно. Контрольних та дослідних тварин утримували на дієті віварію.

Після здійснення цього етапу експерименту тварин забивали під ефірним наркозом і брали зразки для визначення вмісту $25\text{OH}\text{D}_3$ в сироватці крові методом радіоконкурентного зв'язування [^3H]вітаміну D_3 згідно з методом, описаним у роботах [15, 16]. Печінку відмивали від крові фізіологічним розчином через воротну вену. Гепатоцити отримували після 2-годинної інкубації тканини у фосфатному буфері з колагеназою при 37°C та шляхом подальшого диференційного центрифугування гомогенату [17]. Чистоту фракції гепатоцитів контролювали гістохімічним методом після фарбування їх гематоксиліном Бомера. Кількість клітин визначали в камері Горяєва.

Активність вітамін D_3 25-гідроксилазних ензимів *in vitro* тестували шляхом інку-

бації гепатоцитів у буфері, до якого додавали 100 нмоль неміченого вітаміну D_3 в 20 мкл абсолютного етанолу [16]. Вітамін D_3 спочатку 30 хв інкубували в буфері із транспортувальним протеїном альбуміном для зв'язування з холекальциферолом. Потім до середовища вносили гепатоцити, які інкубували при 37°C протягом двох годин. Усі процедури здійснювали на качалці за швидкості коливань 120/хв. Реакцію зупиняли внесенням до проби суміші розчинників хлороформ–метанол (2 : 1). Екстракцію, колонкову хроматографію та кількісне визначення $25\text{OH}\text{D}_3$ здійснювали як описано у статтях [15, 16].

Усі маніпуляції із тваринами проводили під легким ефірним наркозом, не порушуючи норм гуманного поводження з лабораторними тваринами і дотримуючись відповідних міжнародних положень стосовно проведення експериментальних робіт. Статистичну вірогідність результатів оцінювали за програмою SigmaPlot2000 з використанням *t*-критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

Відповідно до сучасних рекомендацій ступінь забезпечення організму вітаміном D_3 визначали за вмістом $25\text{OH}\text{D}_3$ в сироватці крові. В разі нормального забезпечення організму вітаміном D_3 кількість $25\text{OH}\text{D}_3$ в сироватці крові має становити $100\text{--}200$ нмоль-л⁻¹ ($38,4\text{--}76,8$ нг-мл⁻¹ або близько $40\text{--}80$ нг-мл⁻¹). Зменшення його вмісту у сироватці крові нижче 30 нг-мл⁻¹ свідчить про розвиток D-гіповітамінозного стану [9, 10]. Адекватна оцінка недостатності вітаміну D в організмі ґрунтується на підвищенні рівня паратиреоїдного гормону, що спостерігається, якщо вміст $25\text{OH}\text{D}_3$ у сироватці крові менший ніж 30 нг/мл. Нормалізація кількості паратиреоїдного гормону в сироватці крові та максимальна абсорбція кальцію в тонкій кишці відбуваються тоді, коли кількість $25\text{OH}\text{D}_3$ перевищує цей рівень. Для досягнення його добове надходження вітаміну D_3 до організму має становити як мінімум 1000 МО (25 мкг), а як оптимум – 2000 МО (50 мкг) [18, 19]. Гіпервітаміноз D та гіперкальціємія спостерігаються тоді, коли рівень $25\text{OH}\text{D}_3$ в сироватці крові більше 250 нмоль-л⁻¹ (100 нг-мл⁻¹), що відбувається в разі щодобового вживання більше 40 000 МО вітаміну D_3 [18, 20]. Тому ми вважали доцільним провести порівняльне дослідження вмісту $25\text{OH}\text{D}_3$ в сироватці крові щурів при D-гіповітамінозі та D-гіпервітамінозі, а також установити можливість корекції виявлених фізіолого-біохіміч-

них порушень шляхом введення щурам вітаміну E в різних дозах.

Результати, наведені в таблиці, свідчать, що за D-гіповітамінозу вміст $25\text{OH}\text{D}_3$ в сироватці крові порівняно з контрольними тваринами знижується на 51,9%, відображуючи недостатню загальну забезпеченість ним організму та зниження рівня його біологічно активних гідроксильованих форм. Одержання щурами фізіологічної дози вітаміну D_3 ($40 \text{ MO } \text{D}_3$) супроводжується зростанням вмісту $25\text{OH}\text{D}_3$ на 40,9% порівняно з його рівнем у тварин під час D-гіповітамінозу, однак залишається ще на 32,2% нижчим, ніж у контролі. Одночасне введення щурам вітаміну D_3 та фізіологічної дози α -токоферолу ($0,726 \text{ MO } \text{E}$) зумовлює подальше зростання вмісту $25\text{OH}\text{D}_3$ в сироватці крові, рівень якого наближається до значень у контрольних тварин. Проте вітамін E в дозах, вищих за фізіологічні (зокрема $36,3 \text{ MO}$), істотно і дозозалежно інгібує утворення $25\text{OH}\text{D}_3$. Можна припустити, що α -токоферол у фізіологічних дозах активує, а в 10 разів вищих і більше інгібує синтез $25\text{OH}\text{D}_3$ під час D-гіповітамінозного стану організму.

Відомо, що дефіцит вітаміну D спостерігається як у дитячому, так і в дорослому віці. За внутрішньоутробного розвитку плода та в дитячому віці за нестачі його в організмі затримується ріст, деформується скелет і підвищується ризик переломів стегна упродовж подальшого життя. В дорослому віці порушення мінерального обміну, пов'язані з дефіцитом вітаміну D, є причиною загострення остеопенії та остеопорозу, а також виникнення остеомаляції, м'язової слабкості та підвищення ризику переломів [4, 10, 14]. Вітаміну D належить важлива роль у забезпеченні організму кальцієм завдяки його безпосередній участі у трьох фундаментальних процесах: збільшення кишкової абсорбції кальцію з харчових продуктів (за відсутності його поглинається лише 10–15% кальцію та близько 60% фосфору); активації реабсорбції кальцію у процесі ниркової фільтрації та мобілізації з кісткової тканини для нормалізації його рівня в сироватці крові в разі недостатнього надходження до організму із харчовими продуктами [10].

У регуляції двох останніх процесів поряд з $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ та $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ активну участь бере паратиреоїдний гормон, секреція якого підвищується у відповідь за зниження вмісту кальцію в сироватці крові. Функція паратиреоїдного гормону полягає в посиленні ниркової реабсорбції катіона та активації $25(\text{OH})\text{D}_3$ - 1α -гідроксилази нирок. З іншого боку, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ інгібує синтез і секрецію паратиреоїдного

гормону, взаємодіючи з негативним елементом відповіді на вітамін D_3 VDRE-гена цього гормону та спричинюючи його супресію [21]. Крім того, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ підвищує чутливість кальційчутливих рецепторів клітин паратиреоїдної залози до інгібування їх кальцієм, регулюючи тим самим синтез і секрецію гормону. Тому за недостатності вітаміну D високий вміст паратиреоїдного гормону активує остеобласти, які стимулюють перетворення преостеокластів на зрілі остеокласти. Останні збільшують розчинність мінералізованого матриксу кісткової тканини, спричинюють розвиток остеопенії та остеопорозу і підвищують ризик переломів [4, 9]. Оскільки більшість клітин організму (мозку, простати, кишечника), як і клітини імунної системи, містять рецептори до $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ та здатні експресувати ензим 25-гідроксивітамін D 1α -гідроксилазу, то дефіцит цього вітаміну обумовлює його некальціємічну дію: підвищення ризику хронічних захворювань, зокрема автоімунних (діабету, розсіяного склерозу, ревматоїдного артриту та остеоартриту), інфекційних, кардіоваскулярних та онкологічних [2, 22]. Водночас відомо, що рівень гормонально активних форм вітаміну D_3 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ та $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) безпосередньо залежить від вмісту $25\text{OH}\text{D}_3$, що підтверджується виявленими нами відмінностями в обміні вітаміну D_3 за його дефіциту або надлишку в організмі.

Динаміка варіабельності вмісту $25\text{OH}\text{D}_3$ в сироватці крові при D-гіпервітамінозі має певні особливості. У разі D-гіпервітамінозу вміст $25\text{OH}\text{D}_3$ утричі перевищує (на 250%) його рівень у крові контрольних тварин, що, вірогідно, пов'язано з надмірним надходженням вітаміну до організму (таблиця). Оскільки при високих (токсичних) дозах рівень гормонально активних метаболітів вітаміну D_3 , зокрема $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [18, 20], практично не змінюється, то вважають, що негативні порушення мінерального обміну у тканинах є наслідком збільшення вмісту саме гідроксиметаболіту.

Дані літератури свідчать, що вітамін D_3 дозозалежно регулює активність вітамін D_3 25-гідроксилазних ензимів гепатоцитів, які належать до сімейства цитохромів P-450 [24]. Мікросомна ізоформа вітамін D_3 25-гідроксилази (CYP2R1, CYP2J2/3) характеризується високою спорідненістю та низькою ємністю зв'язування із субстратом, у той час як мітохондріальній – CYP27A1 – притаманна висока ємність зв'язування і низька спорідненість до вітаміну D_3 [9, 25]. За високих доз холекальциферолу інгібується активність мікросомної гідроксилази, яка функціонує за фізіологічно-

Вплив вітаміну Е в різних дозах на вміст 25ОНD₃ (нмоль·л⁻¹) в сироватці крові та вітамін D₃ 25-гідроксилазну активність (нмоль 25ОНD₃ · 10⁻⁶ клітин) у гепатоцитах щурів при D-гіповітамінозі та D-гіпервітамінозі (M ± m, n = 9)

Варіанти дослідів	Вміст 25ОНD ₃	Вітамін D ₃ 25-гідроксилазна активність
Контроль (інтактні тварини)	110,65 ± 2,25	18,6 ± 0,9
D-гіповітаміноз	53,25 ± 1,20*	25,7 ± 0,2*
D-гіповітаміноз + 40 МО D ₃	75,0 ± 2,1*#	17,9 ± 0,8
D-гіповітаміноз + 40 МО D ₃ + 0,726 МО Е	90,0 ± 1,9#	32,3 ± 0,9#
D-гіповітаміноз + 40 МО D ₃ + 7,26 МО Е	60,0 ± 1,4#	21,5 ± 1,0
D-гіповітаміноз + 40 МО D ₃ + 36,3 МО Е	35,30 ± 2,42#	17,6 ± 0,4
D-гіпервітаміноз (9-а доба)	387,5 ± 9,0*	9,52 ± 0,2*
D-гіпервітаміноз + 0,726 МО Е	251,3 ± 5,0§	5,74 ± 0,4§
D-гіпервітаміноз + 7,26 МО Е	207,5 ± 6,5§	5,32 ± 0,1§
D-гіпервітаміноз + 36,3 МО Е	242,0 ± 8,0§	5,0 ± 0,2§

Примітка. * Дані порівняно з контрольними щурами вірогідні, $P < 0,05$; # дані відносно D-гіповітамінозних тварин вірогідні, $P < 0,05$; § дані щодо D-гіпервітамінозних щурів вірогідні, $P < 0,05$

го рівня концентрації 25ОНD₃, на тлі незмінної активності мітохондріальної 25-гідроксилази, що функціонує за високих концентрацій холестеролю [24]. На сьогодні дані літератури щодо наявності клітинних регуляторів активності мітохондріального ізоензиму відсутні.

Введення при D-гіпервітамінозі фізіологічної дози вітаміну Е, на відміну від стану D-гіповітамінозу, супроводжується істотним зниженням вмісту 25ОНD₃ (на 35,2%) порівняно з його рівнем під час D-гіпервітамінозу. Той факт, що при введенні щурам фізіологічної дози вітаміну Е кількість 25ОНD₃ все-таки перевищує його вміст у контрольних тварин може бути наслідком короткотривалості введення щурам α-токоферолу. Збільшення дози у 10 разів порівняно з фізіологічною зумовлює подальше зниження на 46,5% вмісту 25ОНD₃ в сироватці крові. Однак в разі 50-кратного підвищення дози вітаміну Е вміст 25ОНD₃ зростає порівняно зі щурами, яким вводили 7,26 МО α-токоферолу.

Характерними ознаками D-гіпервітамінозу є гіперкальціємія, гіперкальціурія та гіперфосфатемія, за яких величина відношення кальцій/креатинін у сечі збільшується у понад 1 ммоль/ммоль (> 0,37 мг/мг). Класичні симптоми токсичності вітаміну D подібні до таких при гіперкальціємії – нудота, зневоднення та летаргічний стан. Тому досить часто в разі відсутності лабораторних тестів зазначені симптоми помилково сприймають як ознаки гастроентериту [18, 23].

Одержані нами результати свідчать, що вітамін Е за D-гіповітамінозу та D-гіпервітамінозу дозозалежно регулює в сироватці крові вміст 25ОНD₃, однак при цьому не з'ясовано, як саме α-токоферол впливає на активність вітаміну D₃ 25-гідроксилазних ензимів. Для вивчення цього питання ми дослідили вплив різних доз вітаміну Е на обмін вітаміну D₃ in vivo за крайніх умов забезпечення щурів вітаміном D: при гіповітамінозі, за якого активність мікросомної гідроксилази найвища, та D-гіпервітамінозі, за якого ензим інгібується.

Як впливає з результатів, наведених на рис. 1, під час D-гіповітамінозу на тлі зменшення вмісту 25ОНD₃ вітамін D-гідроксилазна активність гепатоцитів щурів зростає на 38%. Введення щурам у стані гіповітамінозу вітаміну D₃ знижує вітамін D₃ 25-гідроксилазну активність до контрольного рівня. Введення тваринам на тлі D-гіповітамінозу фізіологічної дози вітаміну Е (0,726 МО) приводить до зростання ензиматичної активності на 25% порівняно з такою при D-гіповітамінозі та на 73% порівняно з контролем. Однак вітамін Е в дозі, яка в 50 разів перевищує фізіологічну, супроводжується зниженням активності цих ензимів, що повністю узгоджується з результатами, отриманими нами раніше [26]. Тобто на тлі D-гіповітамінозу фізіологічна доза α-токоферолу активує вітамін D₃ 25-гідроксилазні ензими, у той час як вищі дози інгібують їх.

Під час D-гіпервітамінозного стану щурів спостерігається інгібувальна дія високих доз

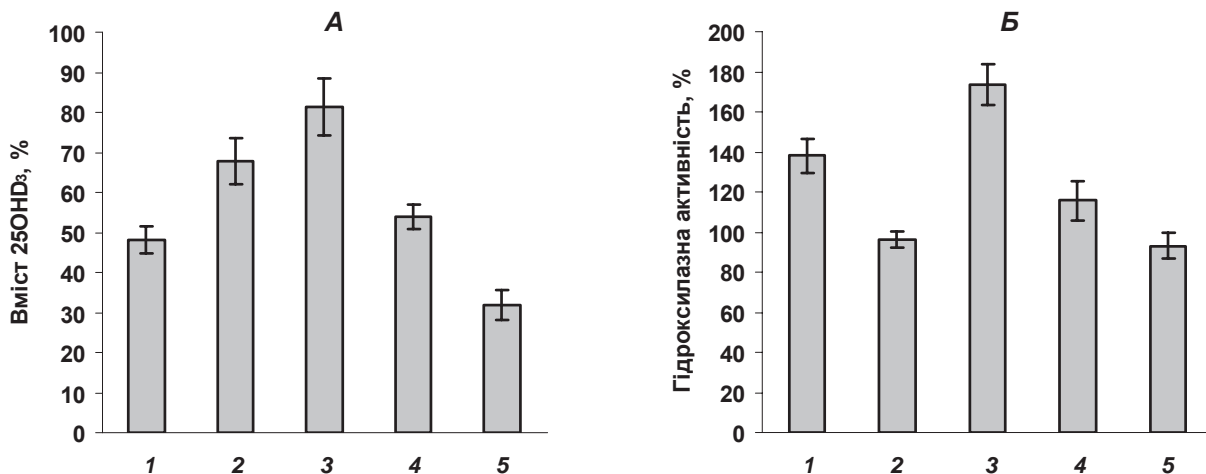


Рис. 1. Вплив вітаміну E на відносні зміни порівняно з контролем вмісту 25OH_D₃ у сироватці крові (A) та вітамін D₃ 25-гідроксилазної активності (Б) у гепатоцитах при D-гіповітамінозі: 1 – D-гіповітаміноз, 2 – гіповітаміноз + 40 МО D₃, 3 – гіповітаміноз + 40 МО D₃ + 0,726 МО E, 4 – гіповітаміноз + 40 МО D₃ + 7,26 МО E, 5 – гіповітаміноз + 40 МО D₃ + 36,3 МО E

холекальциферолу на активність вітамін D₃ 25-гідроксилазних ензимів (рис. 2). Після введення тваринам токсичних доз вітаміну D₃ вітамін D₃-25-гідроксилазна активність порівняно з контролем на 9-у добу знижується майже на 50%. Це збігається зі зростанням вмісту 25OH_D₃ в сироватці крові (від 110,65 ± 2,25 у контролі до 387,5 ± 9,0 нмоль·л⁻¹ під час D-гіпервітамінозу). Отже, можна припустити, що зниження активності гідроксилаз є захисним механізмом, який спрямовано на зниження синтезу та вмісту у тканинах 25OH_D₃ в разі надмірного надходження D₃ до організму. Ме-

ханізм такого впливу реалізується, імовірно, шляхом інгібування гідроксилазних ензимів продуктом реакції – гідроксильованим похідним вітаміну D₃ – 25OH_D₃ [24].

Для зниження токсичного ефекту 25OH_D₃ як антиоксидант використовують вітамін E, оскільки гіпервітаміноз D характеризується підвищенням кількості продуктів пероксидного окислення ліпідів та окисної модифікації протеїнів [27]. Токоферолі, що належать до основних мембранних антиоксидантів, стабілізують ліпідний бішар мембран, забезпечуючи оптимальні умови функціонування мембран-

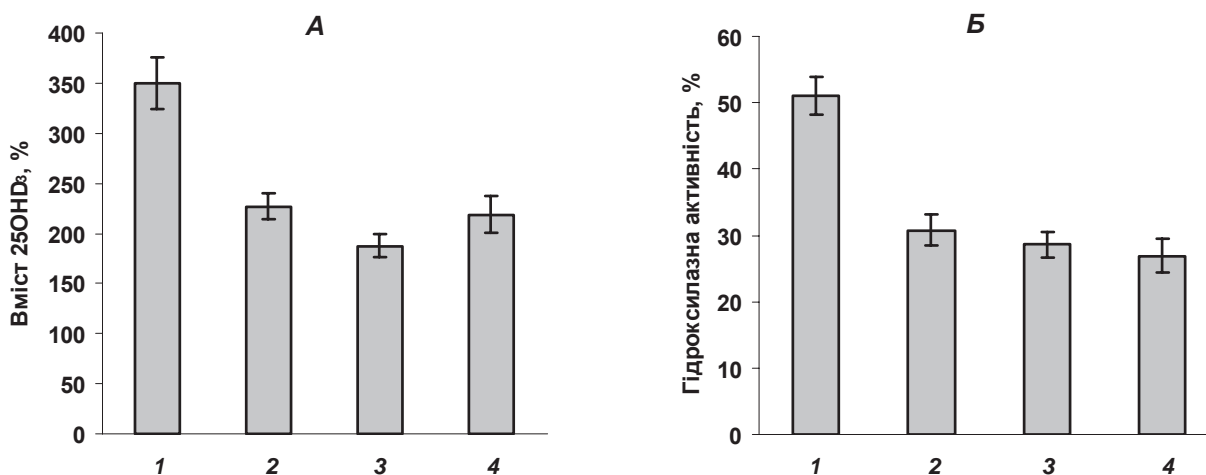


Рис. 2. Вплив вітаміну E на відносні зміни вмісту 25OH_D₃ у сироватці крові (A) та вітамін D₃ 25-гідроксилазної активності (Б) у гепатоцитах при D-гіпервітамінозі порівняно з цими показниками у контрольних тварин (100%): 1 – D-гіпервітаміноз, 2 – гіпервітаміноз + 0,726 МО E, 3 – гіпервітаміноз + 7,26 МО E, 4 – гіпервітаміноз + 36,3 МО E

них рецепторів, ензимів та систем мембранного транспортування [28]. Таким чином, вітамін Е здатен регулювати обмін вітаміну D₃, змінюючи активність вітаміну D₃ 25-гідроксилазних ензимів, діючи за фізіологічних доз, як антиоксидант, а за високих – як прооксидант [13].

Дії вітаміну Е на гідроксилазну активність під час D-гіпервітамінозу також притаманні певні особливості. Як випливає з наведених результатів (рис. 2), після введення щурам 0,726 МО α -токоферолу вітамін D₃ 25-гідроксилазна активність знижується на 39,7% порівняно з D-гіпервітамінозним станом організму, що практично корелює з відсотком зниження кількості 25ОНD₃. При введенні тваринам на тлі D-гіпервітамінозу вітаміну Е в дозах 7,26 МО та в 50 разів вищій за фізіологічну (36,3 МО) вітамін D₃ 25-гідроксилазна активність має тенденцію до подальшого зниження, хоча вміст 25ОНD₃ на 17% зростає після введення щурам α -токоферолу у високій дозі. Можливо це є наслідком впливу вітаміну Е на транспортування субстрату або впливу інших внутрішньоклітинних регуляторів. Отже, вітамін Е на тлі D-гіпервітамінозу загалом дозозалежно інгібує активність вітаміну D₃ 25-гідроксилазних систем гепатоцитів.

Результати проведених досліджень свідчать, що дія α -токоферолу на характер взаємозв'язку між активністю вітаміну D₃ 25-гідроксилазних ензимів і синтезом 25ОНD₃ на тлі D-гіпо- та D-гіпервітамінозу суттєво відмінна і залежить від дози. Під час D-гіповітамінозу спостерігається безпосередній дозозалежний ефект вітаміну Е на активність вітаміну D₃ 25-гідроксилаз у гепатоцитах і на вміст 25ОНD₃ в сироватці крові. За D-гіпервітамінозу α -токоферол інгібує вітамін D₃ 25-гідроксилазну активність і знижує вміст 25ОНD₃. Водночас, відсутність дозозалежного ефекту вітаміну Е на вітамін D₃ 25-гідроксилазну активність у разі D-гіпервітамінозного стану щурів, імовірно, пов'язана з меншою чутливістю мітохондріального ензиму до дії цього вітаміну. Високі дози вітаміну Е, що у 50 разів перевищують фізіологічну, за обох станів організму виявляють негативну дію на рівень 25ОНD₃ в сироватці крові щурів.

Вітамін Е широко відомий як один з найпотужніших природних антиоксидантів, що здатен попереджувати низку захворювань, опосередкованих розвитком оксидативного

стресу, зокрема запальних процесів, атеросклерозу і навіть ракових захворювань. [27, 28]. Водночас, здатність вітаміну Е інгібувати клітинну проліферацію, активність протеїнкінази С і NADPH-оксидази, а також участь у позитивній регуляції рецепторів-пасток CD36 та негативній регуляції адгезивних молекул свідчить про його важливу роль у процесах клітинної сигналізації та регуляції експресії генів [2, 29]. Установлено, що вітамін Е здатен активувати експресію генів, відповідальних за синтез цитохромів Р-450, шляхом безпосереднього впливу на прегнановий Х-рецептор (PXR) – ядерний рецептор гепатоцитів, механізм активації якого подібний до активації рецептора вітаміну D (VDR) у клітинах тонкого кишечника [11, 30, 31]. У щурів, яких утримували на дефіцитній за вітаміном Е дієті, значно знижується гідроксилазна активність мікросом печінки, а введення таким тваринам α -токоферолу повністю відновлює її. Оскільки відновлювальний ефект нівелюється актиноміцином D, автори дійшли висновку, що дія α -токоферолу реалізується на рівні транскрипції [32]. Як свідчать результати ЛПП у реальному часі експресія *Cyp3a11* мРНК (аналога *CYP3A4* людини) в гепатоцитах мишей безпосередньо залежить від забезпечення організму вітаміном Е, тобто спостерігається його позитивна регуляція [33, 34.]. Імовірно, що вітамін Е як ліганд PXR регулює PXR-опосередковані процеси: індукуює синтез цитохромів Р-450, посилює оксидативну фазу (фазу I) метаболізму як ліпофільних ксенобіотиків, так і процеси гідроксилювання вітаміну D₃ за участю CYP27A1, CYP2R1, CYP27B1, а можливо і інших цитохромів Р-450.

Таким чином, наведені результати щодо дозозалежного впливу вітаміну Е на тлі D-гіповітамінозу та D-гіпервітамінозу дають підставу вважати, що:

- по-перше, вітамін Е здійснює регуляторний дозозалежний вплив на активність вітаміну D₃ 25-гідроксилазних ензимів;

-по-друге, неоднаковий характер впливу вітаміну Е в однакових дозах, але залежно від забезпечення організму вітаміном D₃, свідчить, що при D-гіпо- та D-гіпервітамінозному станах організму до синтезу 25ОНD₃ залучаються різні вітамін D₃ 25-гідроксилазні системи гепатоцитів. Отже, вітамін Е бере участь у регуляції активності різних ізоформ ензимів.

**РОЛЬ ВИТАМИНА Е В РЕГУЛЯЦИИ
ПРОЦЕССА ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ
ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА
ПРИ D-ГИПОВИТАМИНОЗЕ
И D-ГИПЕРВИТАМИНОЗЕ**

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

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

Показано, что дозозависимое влияние витамина Е на обмен витамина D₃ опосредуется степенью обеспеченности организма холекальциферолом. При D-гиповитаминозе в 2 раза снижается содержание гидроксилированной формы витамина D₃ – 25OHD₃ – в сыворотке крови крыс и увеличивается витамин D₃ 25-гидроксилазная активность в гепатоцитах. Витамин Е в дозах 0,726–7,26 МЕ существенно усиливает эффект витамина D₃ (до 40 МЕ) у гиповитаминозных крыс, что проявляется в увеличении содержания 25OHD₃ в сыворотке крови и витамин D₃ 25-гидроксилазной активности гепатоцитов. При D-гипервитаминозе содержание 25OHD₃ в сыворотке крови возрастает в 3,5 раза при одновременном ингибировании витамин D₃ 25-гидроксилазной активности в гепатоцитах. Витамин Е в дозах 0,726–7,26 МЕ ослабляет токсичное действие витамина D, снижая содержание 25OHD₃ в сыворотке крови и витамин 25-гидроксилазную активность гепатоцитов.

Высокие дозы витамина Е (36,3 МЕ) в этих условиях оказывают негативное действие на обмен витамина D₃. Разнонаправленное влияние витамина Е в одинаковых дозах на обмен витамина D₃ в организме при гипо- и гипервитаминозе D₃ свидетельствует о возможности его влияния на активность различных витамин D₃ 25-гидроксилазных систем гепатоцитов.

Ключевые слова: витамин D₃, витамин Е, содержание 25OHD₃, витамин D₃ 25-гидроксилазная активность, D-гиповитаминоз, D-гипервитаминоз.

**ROLE OF VITAMIN E IN
REGULATION OF CHOLECALCIFEROL
HYDROXYLATION PROCESS
UNDER D-HYPOVITAMINOSIS AND
D-HYPERVITAMINOSIS CONDITIONS**

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

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

S u m m a r y

It is established, that dose-dependent influence of vitamin E on vitamin D₃ metabolism, is conditioned by degree of cholecalciferol sufficiency. Under a condition of D-hypovitaminosis, contents of 25OHD₃ in blood serum is 2-fold reduced and vitamin D₃ 25-hydroxylase enzymes activity increased in rat hepatocytes. Vitamin E (0.726–7.26 IU) significantly stimulated the effect of vitamin D₃ (40 IU) in animals with D-hypovitaminosis and led to further increase of 25OHD₃ content in the blood serum and activity of vitamin D₃ 25-hydroxylase enzymes in hepatocytes. In D-hypervitaminosis the contents of 25OHD₃ in blood serum was more than 3-fold increased and vitamin D₃ 25-hydroxylase enzymes activity was inhibited. Vitamin E (0.726–7.26 IU) lowered the vitamin D toxicity, decreased contents of 25OHD₃ in blood serum and activity of vitamin D₃ 25-hydroxylase enzymes in hepatocytes.

High doses of vitamin E (36.3 IU) under these conditions demonstrated negative effect on vitamin D₃ metabolism. The mechanism of vitamin E participation in the vitamin D₃ metabolism under D-hypovitaminosis and D-hypervitaminosis may be its influence on the activity of different vitamin D₃ 25-hydroxylase systems of hepatocytes.

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

1. Sutton A. L., Mac Donald P. N. // *Mol. Endocrinol.* – 2003 – 17, N 5. – P. 777–791.
2. Chun R. F., Adams J. S., Hewison M. // *J. Endocrinol.* – 2008. – 198, N 2. – P. 261–269.

3. Guyton K. Z., Kensler T. W., Posner G. H. // *Nutr. Rev.* – 2003. – **61**, N 7. – P. 227–238.
4. Holick M. F. // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – **357**, N 3. – P. 266–281.
5. Spina C. S., Tangpricha V., Uskokovic M. et al. // *Anticancer Res.* – 2006. – **26**, N 4A. – P. 2515–2524.
6. Krishnam A. V., Peehl D. M., Feldman D. // *Recent results Cancer Res.* – 2003. – **164**. – P. 205–221.
7. Bernardi R. J., Johnson C. S., Modzelewski R. A., Trump D. L. // *Endocrinology.* – 2002. – **143**, N 7. – P. 2508–2514.
8. Nagpal S., Na S., Rathnachalam R. // *Endocrin. Rev.* – 2005. – **26**. – P. 662–687.
9. De Luca H. F. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2004. – **80**, N 6. – P. 1689S–1696S.
10. Гайко Г. В., Калашиников Ан. В., Бруско А. Т., Апуховская Л. И. Витамин D и костная система. – К.: Книга плюс, 2008. – 176 с.
11. Landes N., Pflugger P., Kluth D. et al. // *Biochem. Pharmacology.* – 2003. – **65**, N 2. – P. 269–273.
12. Sergeev I. N., Spirichev V. B. // *Vitamin D. Gene Regulation, Structure, Function Analysis and Clinical Application* / Ed. Walter de Grueter. – Berlin, New York, 1991. – P. 451–454.
13. Сергеев И. Н., Ахрапчев Ю. П., Спиричев В. Б. // *Биохимия.* – 1990. – **55**, вып. 11. – С. 1989–1994.
14. *Экспериментальная витаминология* / Под ред. Ю. М. Островского. Минск: Наука и техника, 1979. – С. 80–130.
15. Апуховська Л. І., Василевська В. М., Безусяк А. І. *и др.* // *Біотехнологія.* – 2008. – **1**, № 2. – С. 59–67.
16. Ducland S., Holmberg A., Bergs T. // *J. Biol. Chem.* – 1981. – **256**, N 20. – P. 10430–10433.
17. Weiskirchen R., Gressner H. M. // *Methods Mol. Med.* – 2005. – **117**. – P. 99–113.
18. Vieth R. // *J. Bone Mineral Res.* – 2007. – **22**, S2. – P. V64–V68.
19. Holick M. F., Siris E. S., Binkley N. et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – **90**, N 6. – P. 3215–3224.
20. Jones G. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2008. – **88**, N 2. – P. 582S–586S.
21. Bikle D. // *J. Clin. Endocrin. Metab.* – 2009. – **94**, N 1. – P. 26–34.
22. Holick M. F. // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2008. – **3**, N 5. – P. 1548–1554.
23. Heaney R. P. // *Nutr. Rev.* – 2008. – **66**, S2. – P. S178–S181
24. Prosser D. E., Jones G. // *Trends Biochem. Sci.* – 2004. – **29**, N 12. – P. 664–673.
25. Cheng J. B., Motola D. L., Mangelsdorf D. J. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, N 39. – P. 38084–38093.
26. Василевська В. М., Безусяк А. І., Романова С. О. *та ін.* // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – **79**, № 6. – С. 89–94.
27. Traber M. G., Atkinson J. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – **43**, N 1. – P. 4–15.
28. Капралов А. А., Донченко Г. В., Петрова Г. В. // *Успехи совр. биологии.* – 2003. – **123**, № 6. – С. 573–589.
29. Brigelius-Flohe R., Kelly F. G., Salonen J. et al. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2002. – **76**, N 4. – P. 703–716.
30. Azzi A. // *Free Rad. Biol. Med.* – 2007. – **43**, N 1. – P. 16–21.
31. Gonzalez R., Collado J. A., Nell S. et al. // *Ibid.* – N 10. – P. 1439–1452.
32. Carpenter M. R. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1972. – **203**, N 1. – P. 81–92.
33. Traber M. G., Siddens L. K., Leonard S. W. et al. // *Free Radical Biol. Med.* – 2005. – **38**, N 6. – P. 773–785.
34. Wu J. H., Croft K. D. // *Mol. Aspects Med.* – 2007. – **28**, N 5–6. – P. 437–452.

Отримано 12.06.2009