УДК 577.16+577.15:577.121

М. М. Великий, Л. І. Апуховська, А. В. Хоменко, І. О. Шиманський, В. М. Василевська, О. Ю. Лотоцька, А. І. Безусяк, О. О. Макарова
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМЕНІ О. В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ, КИЇВ

ОСОБЛИВОСТІ ГІПОКАЛЬЦІЄМІЧНОЇ ДІЇ ПРЕДНІЗОЛОНУ ЗА РІЗНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ ОРГАНІЗМУ ЩУРІВ ВІТАМІНОМ D_3

Досліджено гіпокальціємічну дію преднізолону залежно від забезпеченості організму вітаміном D_3. Показано, що введення преднізолону контрольним та D-гіпервітамінозним щурам знижує вміст кальцію, фосфору в сироватці крові та регулює активність лужної фосфатази в основному за рахунок її кісткової ізоформи. Механізм дії преднізолону на мінеральний обмін полягає у гальмуванні метаболізму вітаміну D_3.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **преднізолон, вітамін D_3, 25OHD_3, вітамін D_3 25-гідроксилазна активність, мінеральний обмін.**

ВСТУП. Глюкокортикоїди, завдяки яскраво вираженим протизапальним та імунодепресивним властивостям, широко використовують у сучасній медицині, зокрема в лікуванні хронічних запальних процесів, таких, як ревматоїдні артрити (запальні патології суглобів), бронхіальна астма, алергії, колагенози. Для більшості автоімунних захворювань глюкокортикоїди є базовими терапевтичними засобами. Однак довготривале застосування глюкокортикоїдів має ряд побічних ефектів, серед яких найбільш вираженим є розвиток остеопорозу – патології кісткової тканини, що призводить до втрати маси та щільності кісткової тканини, порушень архітектоніки скелета, вірогідного збільшення ризику переломів кісток [7, 16, 19]. Одним із важливих факторів, що сприяють розвитку остеопорозу, є недостатність кальцію в організмі внаслідок хронічного D-гіповітамінозу, зумовленого або недостатнім надходженням холекальциферолу в організм, або порушенням його обміну, зокрема процесів гідроксилювання з утворенням активних форм – 25OHD_3 та 1,25$(OH)_2D_3$ [13, 20]. Особливо виражена недостатність вітаміну D_3 спостерігається у людей похилого віку, жінок постклімактеричного періоду, при довготривалому призначенні кортикостероїдів та онкологічних захворюваннях кісткової тканини [1, 21].

© М. М. Великий, Л. І. Апуховська, А. В. Хоменко, І. О. Шиманський, В. М. Василевська, О. Ю. Лотоцька, А. І. Безусяк, О. О. Макарова, 2011.

Адекватним та найбільш інформативним показником забезпеченості організму вітаміном D_3 вважають вміст його гідроксильованої форми 25OHD_3 у сироватці крові. В нормі вміст 25OHD_3 повинен перебувати в межах 100–150 нмоль·л$^{-1}$ (40–60 нг·мл$^{-1}$), що досягається завдяки щоденному прийманню щонайменше 2000 МО вітаміну D_3. Зниження вмісту 25OHD_3 у сироватці крові менше 75 нмоль·л$^{-1}$ свідчить про недостатність вітаміну D_3, яка посилює ризик загострення хронічних захворювань, а вміст, менший 50 нмоль·л$^{-1}$, є показником глибокого D-гіповітамінозного стану (D-вітамінний дефіцит), що призводить до розвитку рахіту в дітей та остеомаляції у дорослих [14, 24]. Гіперкальціємія та гіпервітаміноз мають місце за концентрації 25OHD_3 – 375–500 нмоль·л$^{-1}$, а токсичні прояви гіпервітамінозу D спостерігаються при рівні 25OHD_3 у сироватці крові понад 750 нмоль·л$^{-1}$ (300 нг·мл$^{-1}$), що можливо при прийманні щодоби понад 40 000 МО вітаміну D_3 протягом тривалого часу [15].

Біологічні ефекти вітаміну D_3 реалізуються завдяки наявності специфічних ядерних рецепторів для активних метаболітів вітаміну D_3 (1,25 $(OH)_2D_3$ і 24,25$(OH)_2D_3$) та через зміни експресії ряду генів. Зокрема, 1,25$(OH)_2D_3$ регулює метаболізм кальцію шляхом підвищення абсорбції кальцію та фосфату в тонкій кишці, мобілізації кальцію з кісткової тканини й посилення реабсорбції кальцію в нирках [12]. Некальціємічна дія 1,25$(OH)_2D_3$ полягає в його здатності прямо чи опосередковано вплива-

ти на експресію генів, залучених у регуляцію процесів проліферації, диференціації клітин, апоптозу та ангіогенезу. Основні ефекти $1,25(OH)_2D_3$ полягають у гальмуванні проліферації нормальних і трансформованих клітин та активації диференціації клітин різних типів [11, 22]. Тому за недостатності вітаміну D_3 порушується не лише мінеральний обмін, але й перш за все процеси проліферації та диференціації клітин, синтез специфічних протеїнів та ензимів, що забезпечують нормальне функціонування клітин і тканин організму [5].

Метою роботи було дослідити вплив преднізолону – синтетичної похідної гідрокортизону на метаболізм вітаміну D_3 і мінеральний обмін у щурів за нормального та надмірного надходження вітаміну D_3 (D-гіпервітаміноз).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою (100±5) г, яким щодобово вводили 0,5 та 1,0 мг преднізолону у вигляді водного розчину протягом 14 діб. D-гіпервітаміноз викликали шляхом щодобового введення тваринам по 30 000 МО (750 мкг) вітаміну D_3 у вигляді масляного розчину впродовж 5 діб. Препарати вводили внутрішньошлунково за допомогою зонда. Тварин з D-гіпервітамінозом поділили на дві групи: одну використовували в дослідженнях на 2-гу добу після закінчення введення вітаміну D_3, іншу – на 9-ту. D-гіпервітамінозним щурам через 2 доби після закінчення введення холекальциферолу вводили протягом 5 діб по 9,0 мг преднізолону. Контрольну та дослідні групи тварин утримували на раціоні віварію.

Вміст активного метаболіту вітаміну D_3 – $25OHD_3$ у сироватці крові визначали після екстракції 0,5 мл сироватки сумішшю хлороформ–метанол (2:1), послідовного хроматографічного розділення на колонках з окисом алюмінію та LH-20 із наступним кількісним визначенням методом радіоконкурентного зв'язування [^{3}H] холекальциферолу згідно з описаним [3, 9]. Вітамін D_3 25-гідроксилазну активність визначали після інкубації гепатоцитів при 37 °С протягом 2 год у середовищі, що містило: 0,146 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,8 мМ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,0 мМ $CaCl_2$, 0,7 мМ $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$, 0,7 мМ KH_2PO_4, 20 мМ HEPES, 1 % альбуміну та 100 мкМ неміченого вітаміну D_3 (вносили в 20 мкл абсолютного етанолу). Вітамін D_3 попередньо преінкубували протягом 30 хв у буфері з альбуміном для зв'язування холекальциферолу з транспортним протеїном-альбуміном [9]. pH середовища складало 7,4. Реакцію зупиняли шляхом внесення у проби суміші розчинників хлороформ–метанол (2:1). Екстракцію, колонкову хроматографію та кількісне визначення утвореного в процесі реакції $25OHD_3$ проводили згідно з описаним для сироватки крові. Вітамін D_3 25-гідроксилазну активність виражали в пмолях утвореного $25OHD_3$ за 2 год інкубації на 10^6 гепатоцитів.

Гепатоцити отримували після інкубації тканини печінки у фосфатному буфері, що містив 0,05 % колагенази, при 37 °С протягом 0,5 год з подальшим диференційним центрифугуванням [23]. Чистоту фракції гепатоцитів контролювали гістохімічним методом після їх фарбування гематоксиліном Бомера. Кількість клітин підраховували у камері Горяєва.

Вміст кальцію та активність загальної лужної фосфатази (ЛФ) у сироватці крові визначали за допомогою біотест-наборів (ЛАХЕМА, Чехія), активність ізоензимів лужної фосфатази – з використанням інгібіторів відповідно до описаного [4]. Вміст неорганічного фосфору в сироватці крові визначали після осадження білків 12 % розчином ТХО кислоти методом Dyce [10].

Усі маніпуляції зі щурами проводили під легким ефірним наркозом та без порушень норм гуманного поводження з лабораторними тваринами, що не суперечить загальноприйнятим біоетичним нормам з дотриманням відповідних міжнародних положень стосовно проведення експериментальних робіт. Статистичну достовірність результатів оцінювали в програмі SigmaPlot2000 з використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Оскільки глюкокортикоїди залучені в регуляцію мінерального обміну, зокрема обміну кальцію, шляхом зниження його абсорбції у кишечнику й реабсорбції у нирках, було проведено дослідження впливу преднізолону на мінеральний обмін в організмі щурів. Наведені в таблиці 1 результати досліджень вказують на те, що введення 0,5 і 1,0 мг преднізолону щодоби протягом 14 діб викликало дозозалежне зменшення вмісту загального кальцію в сироватці крові на 15 та 25 % відповідно. При цьому зниження загального кальцію відбувалось за рахунок його фізіологічно активної (ультрафільтрувальної) фракції, оскільки кальцій у сироватці крові представлений декількома функціональними формами. Зокрема, невелика його частина зв'язана з протеїнами (альбуміном та глобулінами), тоді як переважна більшість кальцію перебуває в ультрафільтрувальній формі, що об'єднує іонізований (85 %) та хелатований (до 15 %) з

цитратом, фосфатами та бікарбонатом кальцій. За дії преднізолону в дозі 1,0 мг знижувався вміст як протеїнзв'язаної (на 48,2 %), так і ультрафільтрувальної (на 27,3 %) фракцій кальцію.

Відомо, що співвідношення між різними формами кальцію може змінюватись залежно від фізіологічного стану організму. Виявлене в наших дослідженнях зростання співвідношення ультрафільтрувальної форми до протеїнзв'язаної з 7,5 в контролі до 11,0 та 10,5 за введення різних доз преднізолону свідчить про виражене порушення мінерального обміну. Гіпокальціємія, зумовлена дією преднізолону, супроводжувалась слабовираженою гіпофосфатемією: вміст фосфору в сироватці крові знижувався на 17,1 %. На тлі гіпокальціємії та гіпофосфатемії, які було охарактеризовано за змінами вмісту різних форм кальцію та фосфатів у сироватці крові, прослідковувався перерозподіл мінеральних компонентів у кістковій тканині. За відсутності змін зольності великогомілкової кістки щурів, яким вводили преднізолон, у золі, порівняно з контролем, знижувався вміст кальцію з (44,8±0,2) до (32,4±0,7) і (33,6±1,0) % та зростав вміст фосфору з (15,0±0,2) до (17,8±0,7) і (19,2±0,7) % відповідно залежно від дози преднізолону.

Порушення мінерального обміну в організмі супроводжувались збільшенням у сироватці крові активності загальної лужної фосфатази та її кишкового і кісткового ізоензимів (табл. 1). Основною ізоформою лужної фосфатази у сироватці крові є кісткова ізоформа, активність якої значно (в 4 рази) перевищує активність кишкової ізоформи ензиму. Активність загальної лужної фосфатази, порівняно з контролем, зростала на 43,3 і 64,2 % відповідно при введенні 0,5 і 1,0 мг преднізолону. Зміни активності кишкового і кісткового ізоензимів також були більш вираженими за введення великих доз преднізолону (1,0 мг), що свідчить про глибокі зміни в структурі та функції відповідних тканин. Зокрема, суттєве (в 2,2 раза) зростання активності кишкового ізоензиму лужної фосфатази у сироватці крові може бути показником посиленого виходу цього ізоензиму з ентероцитів у кров'яне русло, подібно як це має місце за умови D-гіповітамінозу [3]. Підвищення активності кісткового ізоензиму лужної фосфатази (на 65,2 %) свідчить про порушення структурно-функціонального стану цієї тканини та посилення процесу демінералізації кісток, індукованого преднізолоном.

Активність лужної фосфатази – ензиму, що забезпечує гідроліз фосфорноефірних зв'язків та перенесення фосфат-іонів на органічні компоненти перицелюлярного матриксу кісткової тканини, разом із вмістом кальцію та фосфатів, є важливим показником інтенсивності мінерального обміну в організмі. Наявність кісткової, кишкової та плацентарної ізоформ ензиму дає можливість використовувати визначення їх активності з метою діагностики захворювань відповідних органів [1]. Підвищення активності ензиму в сироватці крові виявляють при рахіті у дітей, при захворюваннях кісткової тканини, пов'язаних із збільшенням активності остеобластів чи розпадом кісткової тканини, карциномі кісткової тканини, метастазах пухлин у кістковій тканині, лімфогранулематозі з ураженням кісткової тканини. Тобто підвищення активності лужної фосфатази спостерігається не тільки у період інтенсивного росту кісткової тканини, але й при її ураженнях – остеопорозі, остеомаляції. При захворюваннях кісткової тканини підвищення активності загальної лужної фосфатази відбувається, головним чином, за рахунок кісткового ізоензиму, який вважають маркером захворювання на остеопороз.

Таблиця 1 – **Вплив преднізолону на мінеральний обмін у сироватці крові контрольних щурів (M±m, n=10)**

Досліджуваний показник	Контроль	Контроль+0,5 мг преднізолону	Контроль+1,0 мг преднізолону
Кальцій, ммоль·л$^{-1}$			
загальний,	2,26±0,09	1,92±0,02*	1,71±0,02*#
протеїнзв'язаний,	0,27±0,01	0,16±0,01	0,14±0,01*
ультрафільтрувальний	2,02±0,06	1,76±0,02*	1,47±0,04*#
Фосфор неорганічний, ммоль·л$^{-1}$	2,05±0,01	1,90±0,02*	1,70±0,02*#
ЛФ, Од·л$^{-1}$			
загальна,	249,0±0,8	356,8±1,7*	409,0±1,6*#
кишкова ізоформа,	48.2±1,2	90,7±3,0*	108,0±2,0*#
кісткова ізоформа	207,0±1,0	287,6±2,2*	342,0±3,0*#

Примітка. * – різниця, порівняно з контролем, вірогідна ($p<0,05$); # – різниця, порівняно з введенням 0,5 мг преднізолону, вірогідна ($p<0,05$).

З огляду на визначальну роль вітаміну D_3 у регуляції мінерального обміну організму та підтриманні структурно-функціонального стану кісткової тканини, ми дослідили вплив преднізолону на інтенсивність метаболізму вітаміну D_3, а саме вітамін D_3 25-гідроксилазну активність гепатоцитів та вміст його біологічно активної форми – 25-гідроксихолекальциферолу в сироватці крові як найбільш оптимального показника забезпеченості організму вітаміном D_3.

Введення преднізолону контрольним щурам викликало дозозалежне зниження вітамін D_3 25-гідроксилазної активності (сумарна активність CYP27A1 – ізоензиму мітохондрій та CYP2R1 – ізоензиму ендоплазматичного ретикулума) гепатоцитів. Так, при введенні 0,5 мг преднізолону щодоби протягом 14 діб (загальна кількість введеного препарату складала 7 мг) активність знижувалась на 41,0 %. При збільшенні дози гормону у 2 рази (1 мг щодобово, загальна кількість введеного препарату дорівнювала 14 мг) активність зменшувалась на 72,3 % порівняно з контролем і на 53,1 % порівняно з групою, якій вводили 0,5 мг преднізолону (рис. 1). Тобто отримані результати свідчать про те, що преднізолон негативно впливає на функціональну активність гепатоцитів, знижуючи вітамін D_3 25-гідроксилазну активність.

Інгібування вітамін D_3 25-гідроксилазної активності супроводжувалось зниженням рівня $25OHD_3$ у сироватці крові. Так, при введенні 0,5 мг преднізолону вміст $25OHD_3$ зменшувався у 3 рази порівняно з контрольними показниками (рис. 1). За таких умов діагностували D-вітамінний дефіцит, тобто найглибший стан порушення забезпеченості організму холекальциферолом. При збільшенні дози преднізолону в 2 рази (1 мг щодоби) вміст $25OHD_3$ зменшувався в 2,3 раза порівняно з контролем, але був дещо вищим, ніж у групі, яка отримувала 0,5 мг препарату. Відсутність кореляції змін вмісту $25OHD_3$ та вітамін D_3 25-гідроксилазної активності за введення високих доз преднізолону можна пояснити інгібувальним впливом кортикостероїдів на активність $25OHD_3$-1α-гідроксилази (CYP27B1) та поліфункціонального ензиму – $25OHD_3$-24-гідроксилази (CYP24A1), які використовують $25OHD_3$ як субстрат [20, 21]. Як наслідок вміст $25OHD_3$ в сироватці крові може підтримуватись на високому рівні за зниження вітамін D_3 25-гідроксилазної активності в гепатоцитах. Це припущення підтверджується даними літератури щодо зменшення рівня гормональних форм вітаміну D_3 у крові осіб, які отримували тривалу глюкокортикоїдну терапію [12]. Отже, в основі гіпокальціємічної дії преднізолону лежать гальмування вітамін D_3 25-гідроксилазної активності та зниження забезпеченості організму гідроксильованою формою вітаміну D_3 – $25OHD_3$.

Враховуючи виражений гіпокальціємічний ефект глюкокортикоїдів, ці гормональні препарати використовують з метою запобігання появі гіперкальціємічних станів у пацієнтів [6]. Відомо, що рівень кальцію в сироватці крові є однією з найбільш сталих біохімічних величин організму і складає 2,0–2,65 ммоль/л (8,0–10,6 мг/дл), причому переважає іонізований кальцій. Регулюють рівень кальцію та кальцієво-фосфорний обмін чотири основні фактори: паратиреоїдний гормон (ПТГ), вітамін D_3, кальцитонін та паратгормоноподібний поліпептид (ПТГпП). Підвищення кальцію в крові може відбуватись за рахунок виходу кальцію з депо (мінерали кісткової тканини), посиленого всмоктування кальцію в кишечнику та зниження ниркового кліренсу [1]. Гіперкальціємічний стан відміча-

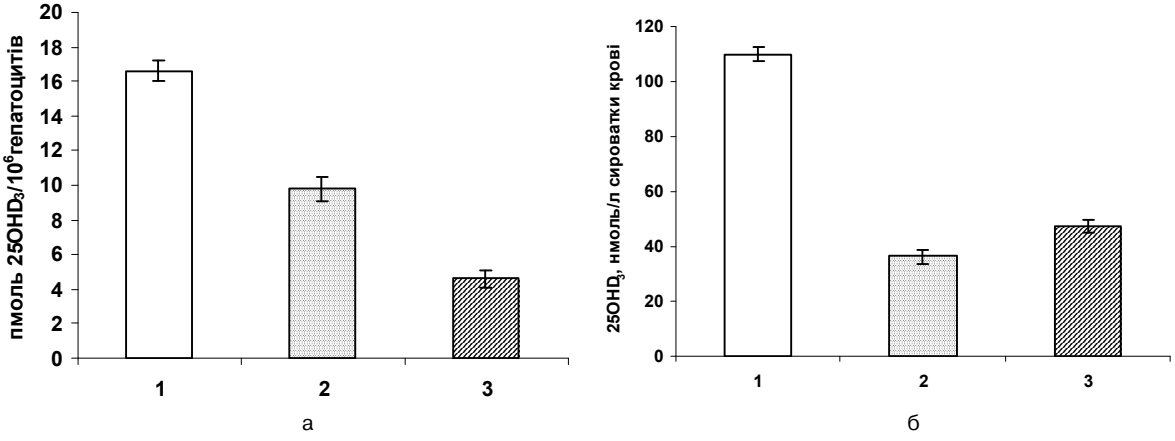

Рис. 1. Вітамін D_3 25-гідроксилазна активність гепатоцитів (а) та вміст $25OHD_3$ в сироватці крові щурів (б) за введення преднізолону: 1 – контроль; 2 – 0,5 мг преднізолону; 3 – 1,0 мг преднізолону.

ють при зростанні вмісту кальцію в крові понад 3,5 ммоль/л (>14,0 мг/дл).

Найбільш частими причинами виникнення гіперкальціємії є первинний гіперпаратиреоз, зумовлений надлишковим утворенням ПТГ, та паранеопластичні процеси, які сумарно дають до 90 % всіх випадків захворювань. У нормі підвищення синтезу ПТГ відбувається у відповідь на зниження вмісту іонізованого кальцію в крові. ПТГ посилює кісткову резорбцію, підвищує реабсорбцію кальцію в ниркових канальцях та стимулює утворення біологічно активної форми вітаміну D_3 – $1,25(OH)_2D_3$, що сукупно нормалізує вміст кальцію. Однак неконтрольоване зростання синтезу ПТГ призводить до надмірного підвищення рівня кальцію в крові. Безпосередніми причинами паранеопластичної гіперкальціємії є руйнування кісткової тканини під дією росту метастазів солідних пухлин у кістці (рак молочної залози, рак легень тощо) та патологічно висока секреція ПТГ-подібних пептидів, зумовлена злоякісними новоутвореннями поза паращитоподібною залозою [6, 17].

Менш поширеними, але так само небезпечними причинами виникнення гіперкальціємії є порушення обміну або передозування вітаміну D_3, посилення метаболізму кісткової тканини за тиреотоксикозу чи при довготривалій іммобілізації, ниркова недостатність. З метою зниження вмісту кальцію в крові застосовують як загальнотерапевтичні заходи (поповнення об'єму циркулюючої крові, форсований діурез тощо), так і медикаментозне лікування (препарати бісфосфонатів, кальцитонін, глюкокортикоїди, деякі протипухлинні препарати) [8, 17].

Глюкокортикоїди найбільш часто застосовують при гіперкальціємії, викликаній порушеннями обміну або передозуванням вітаміну D_3 та його аналогів за лікування постменопаузального остеопорозу та вторинного гіперпаратиреозу [12]. За ряду патологічних станів (гемобластози, мієломна хвороба, кісткові метастази раку молочних залоз) спостерігається посилення синтезу $1,25(OH)_2D_3$ за рахунок активації позаникової $25OHD_3$-1α-гідроксилази, що значно прискорює обмінні процеси в трансформованих клітинах [2, 18].

Як модель гіперкальціємічного стану нами було обрано D-гіпервітаміноз. Токсичні прояви за введення високих доз вітаміну D_3 (по 30 000 МО протягом 5 діб) характеризувались вираженою гіперкальціємією та гіперфосфатемією. В сироватці крові щурів як на 2-й, так і на 9-й дні після припинення введення вітаміну D_3 зростали вміст кальцію, фосфору та активність лужної фосфатази (табл. 2). Зокрема, на 9-й день вміст кальцію підвищувався на 41,6 % (переважно за рахунок збільшення на 50,1 % фракції ультрафільтрувального кальцію), фосфору – на 10,7 %, активність лужної фосфатази зростала на 34,1 %. Преднізолон виявляв чітко виражений гіпокальціємічний ефект за його введення D-гіпервітамінозним щурам: зменшувався вміст кальцію (на 31,6 %), фосфору (на 13,2 %) та гальмувалась активність лужної фосфатази (на 30,0 %).

Оскільки механізм гіпокальціємічної дії глюкокортикоїдів має поліфакторний характер, ми висловили припущення, що в основі здатності преднізолону знижувати рівень кальцію в сироватці крові за гіперкальціємічних станів може лежати гальмування метаболізму вітаміну D_3 в тканинах. Тому провели дослідження впливу преднізолону на обмін вітаміну D_3 за D-гіпервітамінозу, тобто за умови посиленого синтезу біологічно активних форм вітаміну D_3. Продемонстровано, що введення щурам високих доз вітаміну D_3 супроводжувалось значним зростанням вмісту $25OHD_3$ в сироватці крові. Так, на 2-гу добу після припинення введення вітаміну D_3 рівень $25OHD_3$ в сироватці крові більш ніж у 10 разів перевищував зна-

Таблиця 2 – **Вплив преднізолону на мінеральний обмін у сироватці крові при D-гіпервітамінозі (M±m, n=9)**

Досліджуваний показник	D-гіпервітаміноз, 2-га доба	D-гіпервітаміноз, 9-та доба	D-гіпервітаміноз+ преднізолон
Кальцій, ммоль·л$^{-1}$			
загальний,	3,07±0,04	3,20±0,01	2,19±0,06*
протеїнзв'язний,	0,30±0,01	0,27±0,02	0,18±0,02*
ультрафільтрувальний	2,78±0,01	3,03±0,02	2,01±0,02*
Фосфор неорганічний, ммоль·л$^{-1}$	2,47±0,04	2,27±0,01	1,97±0,03*
ЛФ, Од·л$^{-1}$			
загальна,	298,±3,0	334,0±4,0	234,0±3,0*
кишкова ізоформа,	68,6±3,0	73,0±2,0	70,6±1,4
кісткова ізоформа	278,0±6,0	315,0±2,0	219,0±3,0*

Примітка. * – різниця, порівняно з групою тварин із D-гіпервітамінозом (9-та доба), вірогідна ($p<0,05$).

чення контрольних тварин (рис. 2). В подальшому вміст вітаміну D_3 поступово знижувався і на 9-ту добу складав 29,8 % від вмісту на 2-гу добу, хоча все ще перевищував контрольні значення, тобто у контрольних тварин спостерігалось швидке використання $25OHD_3$ в реакціях подальшого його перетворення на $1,25(OH)_2D_3$.

Інша закономірність спостерігалась за введення преднізолону D-гіпервітамінозним щурам. Вміст $25OHD_3$ в сироватці крові під дією преднізолону знижувався, порівняно з 2-ю добою, лише на 21,1 % і був вищим на 164,5 % від його вмісту в контрольних тварин на 9-ту добу після припинення введення холекальциферолу. Тобто при введенні преднізолону на тлі D-гіпервітамінозу спостерігався чітко виражений ефект гальмування використання $25OHD_3$ як субстрату в його подальшому перетворенні на гормонально активні метаболіти – $1,25(OH)_2D_3$ та $24,25(OH)_2D_3$. Фізіологічний сенс інгібування преднізолоном метаболізму вітаміну D_3 може полягати у зниженні рівня $1,25(OH)_2D_3$ та, відповідно, проявів токсичності високих доз холекальциферолу, оскільки $25OHD_3$ (транспортна та запасальна форма вітаміну) є значно менш функціонально активним порівняно з гормональними його формами. У свою чергу, інгібування синтезу $1,25(OH)_2D_3$ зумовлює гіпокальціємічну дію преднізолону за рахунок зниження всмоктування та реабсорбції кальцію.

Гальмування обміну холекальциферолу під дією преднізолону підтверджується змінами вітамін D_3 25-гідроксилазної активності гепатоцитів. Як у контролі, так і за D-гіпервітамінозу преднізолон суттєво (щонайменше у 2 рази) гальмував вітамін D_3 25-гідроксилазну активність. Однак, якщо в контролі гальмування вітамін D_3 25-гідроксилазної активності призводило до значного зменшення вмісту $25OHD_3$ в сироватці крові, то за D-гіпервітамінозу не спостерігалось прямої залежності між активністю вітамін D_3 гідроксилюючої системи та вмістом $25OHD_3$ (рис. 2). Зокрема, при введенні преднізолону вміст $25OHD_3$ залишався у 2,6 раза вищим порівняно з групою тварин на 9-ту добу після припинення введення вітаміну D_3, але за цих умов щонайменше у 2 рази гальмувалась вітамін D_3 25-гідроксилазна активність у гепатоцитах. Тобто спостерігалось гальмування подальшого гідроксилювання $25OHD_3$ з утворенням дигідроксипохідних холекальциферолу. Аналогічний, хоча і менш виражений, ефект відмічали при збільшенні введеної дози преднізолону в контрольних тварин. Зокрема, за введення 1,0 мг, порівняно з 0,5 мг, преднізолону виявлено, що на тлі зниження практично у 2 рази вітамін D_3 25-гідроксилазної активності вміст $25OHD_3$ в сироватці крові зростав у 1,3 раза.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що гіпокальціємічний та гіпофосфатемічний ефекти преднізолону залежать від дози його введення і стану забезпеченості організму вітаміном D_3. Виявлене інгібування вітамін D_3 25-гідроксилазної активності та зниження швидкості перетворення $25OHD_3$ на дигідроксипохідні холекальциферолу під дією преднізолону роблять небажаним використання глюкокортикоїдів як гіпокальціємічних засобів.

ВИСНОВКИ. 1. Преднізолон як у контролі, так і за D-гіпервітамінозу знижує вміст кальцію, фосфору та підвищує активність лужної фосфатази в сироватці крові в основному за рахунок її кісткової ізоформи.

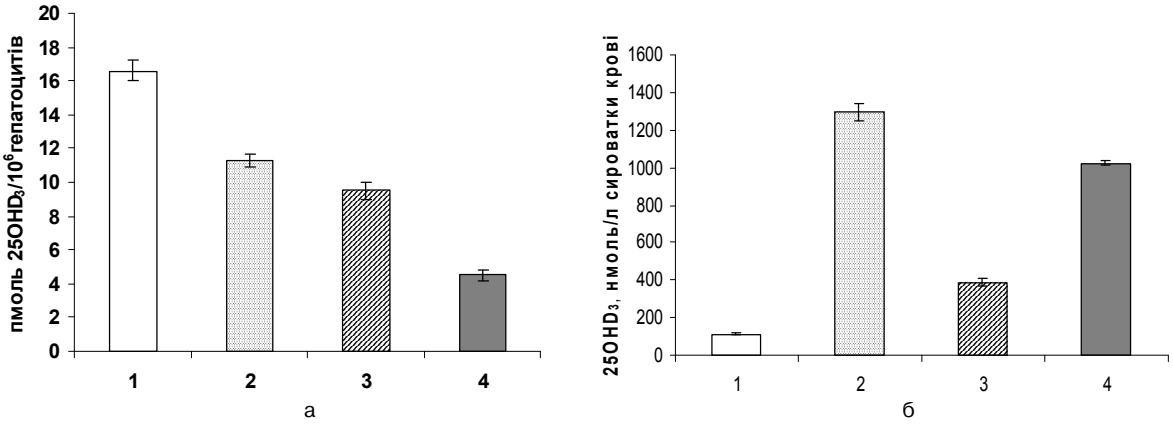

Рис. 2. Вітамін D_3 25-гідроксилазна активність гепатоцитів (а) та вміст $25OHD_3$ в сироватці крові щурів (б) за введення преднізолону на тлі D-гіпервітамінозу: 1 – контроль; 2 – D-гіпервітаміноз, 2-га доба після припинення введення вітаміну D_3; 3 – D-гіпервітаміноз, 9-та доба після припинення введення вітаміну D_3; 4 – введення преднізолону D-гіпервітамінозним щурам.

2. Прояв гіпокальціємічного та гіпофосфатемічного ефекту преднізолону залежить від дози його введення і стану забезпеченості організму вітаміном D_3.

3. Механізм дії преднізолону на мінеральний обмін реалізується шляхом гальмування обміну вітаміну D_3: введення преднізолону дозозалежно гальмує вітамін D_3 25-гідроксилазну активність гепатоцитів та знижує вміст $25OHD_3$ в сироватці крові.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гайко Г. В. Витамин D и костная система / Г. В. Гайко, Ан. В. Калашников, А. Т. Бруско. – К. : Книга плюс, 2008. – 176 с.

2. Особливості гідроксилювання холекальциферолу в печінці щурів в умовах D-гіпервітамінозу та дії α-токоферолу / М. М. Великий, Л. І. Апуховська, В. М. Василевська [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2010. – **82**, № 2. – С. 67–74.

3. 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 // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 5. – С. 50–57.

4. Щелочная фосфатаза: современное состояние вопроса / Б. Плеханов, Т. Цветкова, Т. Пиперков, М. Чиговская // Лаб. дело. – 1989. – № 11. – С. 4–7.

5. Bikle D. Nonclassic action of vitamin D / D. Bikle // J. Clin. Endocrin. Metab. – 2009. – **94**, № 1. – P. 26–34.

6. Carroll M. F. A practical approach to hypercalcemia / M. F. Carroll, D. S. Schade // Am. Family Physician. – 2003. – **67**, № 9. – P. 1959–1966.

7. De Nijs R. N. Glucocorticoid-induced osteoporosis: a review on pathophysiology and treatment options / R. N. De Nijs // Minerva Med. – 2008. – **99,** № 1. – P. 23–43.

8. Drake M. T. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice / M. T. Drake, B. L. Clarke, S. Khosla // Mayo. Clin. Proc. – 2008. – **83**, № 9. – P. 1032–1045.

9. Ducland S. Uptake and 25-hydroxylation of vitamin D_3 isolated rat liver cells / S. Ducland, A. Holmberg, T. Bergs // J. Biol. Chem. – 1981. – **256**, № 20. – P. 10430–10433.

10. Dyce B. J. A rapid nonenzymatic assay for 2,3-DPG in multiple specimens of blood / B. J. Dyce, S. P. Bessman // Arch. Environ. Health. – 1973. – **27**, № 2. – P. 112–115.

11. Heaney R. P. Vitamin D: criteria for safety and efficacy / R. P. Heaney // Nutr. Rev. – 2008. – **66**, S2. – P. 178–181.

12. Hidalgo A. A. Clucocorticoid regulation of the vitamin D receptor / A. A. Hidalgo, D. L. Trump, C. S. Johnson // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2010. – **121**, № 1–2. – P. 372–375.

13. Holick M. F. MrOs Is D-ficient / M. F. Holick // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2009. – **94**, № 4. – P. 1092–1093.

14. Holick M. F. Vitamin D deficiency / M. F. Holick // N. Engl. J. Med. – 2007. – **357**, № 3. – P. 266–281.

15. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity / G. Jones // Am. J. Clin. Nutr. – 2008. – **88**, № 2. – P. 582–586.

16. Patschan D. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / D. Patschan, K. Loddenkemper, F. Buttgereit // Bone. – 2001. – **29**, № 6. – P. 498–505.

17. Pecherstorfer M. Current management strategies for hypercalcemia / M. Pecherstorfer, K. Brenner, N. Zojer // Treat. Endocrinol. – 2003. – **2**, № 4. – P. 273–292.

18. Phase II trial of high dose intermittent calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D_3) and dexametasone in androgen-independent prostate cancer / D. L. Trump, D. M. Potter, J. Muindi // Cancer. – 2006. – **106**, № 10. – P. 2136–2142.

19. Sambrook P. Corticosteroid osteoporosis, Balliere's best practice and research / P. Sambrook, N. E. Lane // Clin. Rheumatol. – 2001. – **15**, № 3. – P. 401–413.

20. Sambrook P. Glucocorticoids and Vitamin D / In: Vitamin D, Ed. D. Feldman. – New York: Elsevir. – 2005. – P. 1239–1251.

21. Summary of evidence-based review on vitamin D efficacy and safety in relation to bone health / A. Cranney, H. A. Weiler, S. O'Donnell, L. Puil // Am. J. Clin. Nutr. – 2008. – **88**, № 2. – P. 513–519.

22. Vieth R. Vitamin D toxicity, policy, and science / R. Vieth // J. Bone Mineral Res. – 2007. – **22**, S2. – P. 64–68.

23. Weiskirchen R. Isolation and culture of hepatic stellate cells / R. Weiskirchen, H. M. Gressner // Methods Mol. Med. – 2005. – **117**. – P. 99–113.

24. Zinser G. M. The vitamin D signaling pathway in mammary gland and breast cancer / G. M. Zinser, C. J. Narvaes, J. E. Welsh / In: Vitamin D and Cancer, Ed. D. L. Trump, C.S. Johnson. – Springer. – 2011. – P. 279–294.

Н. Н. Великий, Л. И. Апуховская, А. В. Хоменко, И. А. Шиманский, В. Н. Василевская, Е. Е. Лотоцкая, А. И. Безусяк, Е. А. Макарова
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМЕНИ О. В. ПАЛЛАДИНА НАН УКРАИНЫ, КИЕВ

ОСОБЕННОСТИ ГИПОКАЛЬЦИЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕДНИЗОЛОНА ПРИ РАЗНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ОРГАНИЗМА КРЫС ВИТАМИНОМ D_3

Резюме

Исследовано гипокальциемическое действие преднизолона в зависимости от обеспеченности организма витамином D_3. Показано, что введение преднизолона контрольным и D-гипервитаминозным крысам снижает содержание кальция, фосфора в сыворотке крови и регулирует активность щелочной фосфатазы в основном за счет ее костной изоформы. Механизм действия преднизолона на минеральный обмен состоит в ингибировании метаболизма витамина D_3.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **преднизолон, витамин D_3, 25OHD_3, витамин D_3 25-гидроксилазная активность, минеральный обмен.**

M. M. Velykyi, L. I. Apukhovska, A. V. Khomenko, I. O. Shymanskyi, V. M. Vasylevska, O. Yu. Lototska, A. I. Bezusiak, O. O. Makarova
O. V. PALLADIN INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE

FEATURES OF HYPOCALCEMIC ACTION OF PREDNISOLONE AT DIFFERENT AVAILABILITY OF RATS WITH VITAMIN D_3

Summary

It was investigated hypocalcemic effect of prednisolone in relation to body supply with vitamin D_3. Prednisolone administration to control and D-hypovitaminosis rats resulted in decreased contents of calcium and phosphorus. Serum alkaline phosphatase activity was also found to be regulated by prednisolone mainly due to its bone isoform. The mechanism of prednisolone action on mineral metabolism is associated with the inhibition of the metabolism of vitamin D_3.

KEY WORDS: **prednisolone, vitamin D_3, 25OHD_3, vitamin D_3 25-hydroxylase activity, mineral metabolism.**

Отримано 03.08.11

Адреса для листування: *М. М. Великий, Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України, вул. Леонтовича, 9, Київ, 01601, Україна.*