

Міністерство освіти і науки, молоді та спорту України  
Сумський державний університет

*О. В. АТАМАН*

***Механізми розвитку  
D-гіпервітамінозних  
уражень кровоносних  
судин***

Монографія

Суми  
Сумський державний університет  
2011

УДК 616.13/.16:615.356.092:577.161.2  
ББК 72(4Укр)д  
А 92

Рецензенти:

*І.Ю.Висоцький* – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри біохімії та фармакології Сумського державного університету  
*А.М.Романюк* – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри патоморфології Сумського державного університету

*Рекомендовано вченою радою Сумського державного університету  
(протокол №10 від 10.03.2011 р.)*

**Атаман О.В.**

А 92      **Механізми розвитку D-гіпервітамінозних уражень кровоносних судин / О.В. Атаман.**– Суми: Сумський державний університет, 2011.– 150с.  
ISBN 978-966-657-353-0

Монографію присвячено патогенезу уражень кровоносних судин, що виникають під впливом токсичних доз вітаміну D. Проаналізовано сучасний стан проблеми, наведено власні матеріали автора та його учнів, одержані при вивченні експериментального гіпервітамінозу D.

Для науковців, викладачів, аспірантів та студентів вищих медичних навчальних закладів.

**УДК 616.13/.16:615.356.092:577.161.2**  
**ББК 72(4Укр)д**

© Атаман О.В., 2011

ISBN 978-966-657-353-0

© Сумський державний університет, 2011

## ПЕРЕДМОВА

В останні десятиліття увагу дослідників і практичних лікарів все більше привертає проблема кальцифікації судинної стінки – основного прояву артеріосклерозу Менкеберга. Ця хвороба разом з атеросклерозом є найпоширенішою формою склеротичних уражень артерій, що зумовлюють через свої тяжкі наслідки найвищий рівень смертності в економічно розвинених країнах.

Менкебергівський тип артеріосклерозу, на відміну від атеросклерозу, характеризується ураженням середньої оболонки (медії) артерій, відкладанням у ній солей кальцію (медіакальцинозом), переважанням дегенеративно-склеротичних змін в судинній стінці, втратою еластичних її властивостей, унаслідок чого можуть розвиватися аневризми артерій з відповідними фатальними наслідками.

Незважаючи на те що зазначений варіант уражень описано півтора століття тому (*Virchow*, 1858; *Mönckeberg*, 1903), інтенсивне вивчення його патогенезу розпочалося відносно недавно – наприкінці минулого століття. Це, мабуть, пов'язано з тим, що менкебергівський склероз, стрімкий розвиток якого починається на четвертому-п'ятому десятилітті життя, виявляють на секції у кожного другого померлого у віці після 60 років і практично у всіх хворих на цукровий діабет II типу та людей з хронічною нирковою недостатністю, особливо тих, що перебувають на гемодіалізі.

Успіхи у вивченні патогенезу артеріосклерозу Менкеберга нерозривно пов'язані з пошуком адекватної експериментальної моделі цього патологічного процесу. Одним з надійних методів його відтворення є застосування високих доз вітаміну D, токсична дія якого спричиняється до ектопічної кальцифікації артеріальної стінки. Вітамін D став тим інструментом, за допомогою якого можна досліджувати на клітинному і молекулярному рівнях механізми, що лежать в основі кальцифікації судин. Саме з огляду на ці обставини нами було обрано як об'єкт вивчення D-гіпервітамінозну модель артеріосклерозу Менкеберга з надією підійти якомога ближче до розкриття тих патогенетичних механізмів, що лежать в його основі.

Крім цього, і сама проблема гіпервітамінозу D як такого не позбавлена інтересу, оскільки цей стан не так уже й рідко трапляється в токсикологічній, педіатричній і терапевтичній клініці. Розкриття механізмів впливу високих доз вітаміну D на кровоносні судини, безумовно, має розширити наші уявлення про загальні закономірності D-вітамінної інтоксикації.

В основу цієї монографії покладено результати багаторічних досліджень самого автора, проведених ним в Київському медичному інституті ім. О.О.Богомольця, і роботи його учнів, виконані на кафедрі фізіології і патофізіології Сумського державного університету. Співробітники цієї кафедри В.Ю.Гарбузова і Я.В.Хижня стали моїми співавторами при написанні відповідних глав монографії.

Автор має сподівання, що представлена до уваги читачів робота долучиться до внеску український патофізіологів в розбудову загальної теорії склеротичних уражень судин.

## ГЛАВА 1

### СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО МЕХАНІЗМИ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ВІТАМІНУ D НА СУДИННУ СТІНКУ

Ще наприкінці 20-х – на початку 30-х років минулого століття, коли було виявлено протирахітний ефект опроміненого ергостерину, з'явилися повідомлення про токсичний вплив великих доз вітаміну D і зокрема його здатність викликати масивну кальцифікацію артеріальних судин (*Duguid, 1930; Nicole, 1930*). Патологічні стани, що виникають при цьому, отримали назву гіпервітамінозу D.

Гіпервітаміноз D може розвиватися (1) у дорослих і дітей через надмірне його споживання як харчової добавки; (2) у дітей як наслідок проведення профілактики рахіту за певними "ударними" схемами; (3) при попередженні і лікуванні препаратами вітаміну D остеопорозу і уражень кісток, зокрема у хворих з хронічною нирковою недостатністю; (4) при гострих отруєннях спиртовими і олійними розчинами вітаміну D.

Дані щодо поширеності гіпервітамінозу D у наш час є досить суперечливими. Після того, як у 1919 році встановили, що жир печінки тріски (риб'ячий жир) попереджає розвиток рахіту, загальне споживання вітаміну D в Європі і Північній Америці було надмірним упродовж першої половини XX століття (*Holmes and Kummerow, 1983*). Досить часто немовлятам призначали вітамін D по 100 мкг на день. У 1940-х роках стали відзначати зв'язок між "епідемічною" гіперкальціємією та суправальвулярним стенозом аорти, з одного боку, і збагаченням молока вітаміном D, з другого. Такий стан речей тривав аж до 1963 року, коли в США добавки вітаміну D до продуктів харчування малюків почали істотно зменшувати. Нині жир печінки тріски зник з харчових добавок для немовлят, проте, велика частка дорослого населення в країнах Заходу продовжує вживати рибацький жир. Останні дослідження показали, що в південно-західній Англії близько 20% здорових дорослих людей додає до свого раціону рибацький жир (*Darby, 2001*).

Рекомендації щодо безпечного вживання вітаміну D дорослими не вирізняються однотайністю. На думку деяких авторів, щоденне споживання вітаміну D може коливатися від нуля у тих, що мають низький ризик розвитку остеопорозу, до 15 мкг/день для дорослих з високою його ймовірністю (вік понад 65 років, темна шкіра, обмежене перебування на сонці) (*Prentice, 2002*).

Спеціально створена експертна група вчених США рекомендує до щоденного вживання тільки 200 МО вітаміну D особам, вік яких не перевищує 50 років (*Institute of Medicine, 1997*). Натомість є роботи, у яких рекомендовані дози вітаміну сягають 4000 МО/день (*Vieth, 2005; Heaney, 2005*). Дехто з авторитетів вважає, що страх перед токсичністю вітаміну D зумовлює те, що рекомендовані щоденні дози вітаміну є "вкрай неадекватно низькими" (*Vieth, 1999*).

У популяційних дослідженнях показано, що такі ознаки D-вітамінної інтоксикації як гіперкальціємія не виникають аж поки пероральне надходження вітаміну D і концентрація 25(OH)D в сироватці крові не перейдуть межю 250 мкг/день (приблизно 3-5 мкг/кг маси тіла) і 500 нмоль/л відповідно (*Hathcock et al., 2007*). На думку *Zittermann* (2003), за винятком деяких випадків отруєнь, ризик розвитку такої інтоксикації вітаміном D у здорових людей є вкрай низьким.

У деяких країнах Центральної Європи, зокрема на теренах колишньої НДР, для профілактики рахіту використовували схеми ударного переривчатого введення високих доз вітаміну D<sub>2</sub> протягом перших 18 місяців життя (на один ударний курс – 6 введень по 15 мкг ергокальциферолу) (*Zittermann and Koerfer, 2008*). У новонароджених така кількість препарату є еквівалентною 25-50 мкг вітаміну D<sub>2</sub> на кг маси тіла в день. Безпечність подібних схем профілактики рахіту є під великим знаком запитання. За такої схеми концентрація 25(OH)D у сироватці крові перевищує 500 нмоль/л, а отже, у деяких випадках розвивається гіперкальціємія і гіперфосфатемія (*Markestad et al., 1987*). За деякими даними, у таких дітей має місце кальцифікація судин (*Kobylnski et al., 1984; Jahreis and Hesse, 1990*). Сьогодні в більшості країн для профілактики рахіту рекомендують вживати 5-10 мг вітаміну D на день, що є еквівалентним його

дозі <1,0 – 2,5 мкг/кг маси тіла (*Zittermann and Koerfer, 2008*).

Однією з причин гіпервітамінозу D може бути застосування високих доз препаратів вітаміну D з метою профілактики і лікування остеопорозу та уражень кісток, зокрема у хворих з хронічними недугами нирок. Таких осіб в одних лише США налічують 19 млн., і ще 20 млн. мають фактори ризику ниркових хвороб. У більш ніж 6 млн. американців істотно порушені функції нирок (хронічна ниркова недостатність) і приблизно 400 тис. пацієнтів потребують гемодіалізу для продовження життя (*Joy et al., 2007*). Для попередження і лікування кісткових ускладнень використовують кальцитріол ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ ),  $1\alpha$ -вітамін D<sub>3</sub>,  $1\alpha$ -вітамін D<sub>2</sub> (доксеркальциферол).

Отруєння препаратами вітаміну D бувають відносно рідко, але можуть мати масовий характер. Так, в колишньому СРСР непоодинокі отруєння спиртовими розчинами ергокальциферолу серед робочих траплялися на фармацевтичних заводах, що виготовляли цей препарат. У 1980-х роках описано масове отруєння олійним розчином вітаміну D<sub>2</sub> мешканців сіл Одеської області, розташованих на автомобільній трасі Київ-Одеса. Причиною отруєння став продаж водіями автоцистерн "олії", яку вони перевозили з Уманського фармацевтичного заводу в Одеський порт, а звідти на Кубу.

Клінічними ознаками інтоксикації вітаміном D є (а) анорексія; (б) втрата маси тіла; (в) затримка росту (якщо організм розвивається); (г) летаргія; (ґ) гіперкальціємія, що супроводжується гіперкальціурією; (д) гіперфосфатемія; (е) резорбція і демінералізація кісток; (є) ектопічна кальцифікація м'яких тканин, зокрема аорти та інших артерій; (ж) нефрокальциноз і розвиток проявів недостатності нирок (*Masterjohn, 2007; Zittermann and Koerfer, 2008*). Урешті-решт настає смерть.

У численних дослідженнях було показано, що розвиток гіпервітамінозу D супроводжується ушкодженням багатьох органів і тканин організму, у тому числі і судинної стінки. Ураження судин при D-вітамінній інтоксикації описано у мишей, щурів, кролів, кішок, собак, мавп і в людини (*Ю.В.Быць с соавт., 1999*). Найчастіше індуковані вітаміном D дистрофічні зміни розвиваються в аортальній стінці. Потім чутливість судин до D-гіпервітамінозних уражень зменшу-

ється в такій послідовності: аорта > сонні артерії > ниркові артерії > стегнові артерії = вінцеві артерії серця = легенева артерія > гілки легеневої артерії > артерії шлунково-кишкового тракту. Дуже стійкими до розвитку цього типу уражень є артерії головного мозку, селезінки і печінки (*Hass et al.*, 1960). Привертає до себе увагу практично абсолютна резистентність вен великого кола кровообігу до впливу високих доз вітаміну D (*Gillman and Gilbert*, 1956; *Hass et al.*, 1958).

Патоморфологічна картина уражень судинної стінки при гіпервітамінозі D є типовою для артеріосклерозу Менкеберга. Вона характеризується ушкодженням середньої оболонки артерій (медіанекроз), її кальцифікацією (медіакальциноз) і розвитком елементів сполучної тканини (медіасклероз) (*Быць Ю.В. с соавт.*, 1999).

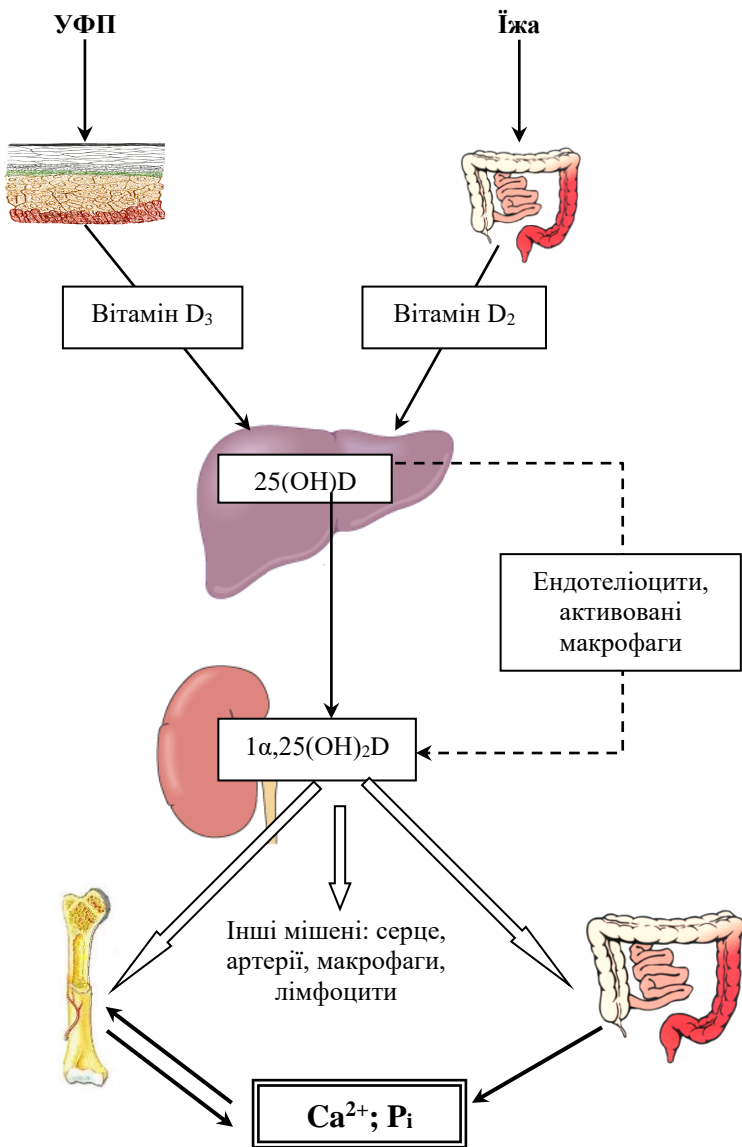
Розумінню механізмів токсичної дії вітаміну D мають сприяти досягнення у вивченні фізіологічної ролі цієї сполуки.

Організм отримує вітамін D з двох джерел. Основним – є синтез вітаміну D<sub>3</sub> (холекальциферолу) з 7-дегідрохолестеролу в шкірі під впливом ультрафіолетових променів (УФП). 50-75% цієї сполуки утворюється глибше пігментного шару, а тому меланін, який не пропускає УФП, істотно зменшує синтез вітаміну D<sub>3</sub> і в такий спосіб, як вважають, запобігає розвитку гіпервітамінозу D. Є думка, що пігментація шкіри – це пристосувальна, захисна реакція, спрямована на обмеження синтезу холекальциферолу в умовах надмірної інсоляції. За найнесприятливіших умов 90% вітаміну D утворюється в шкірі.

Друге джерело – харчові продукти, що містять вітамін D<sub>2</sub> (ергокальциферол). За рахунок цієї сполуки може покриватися не більше 10% потреби організму у вітаміні D.

Холекальциферол і ергокальциферол (далі обидві ці форми будемо називати просто вітаміном D) потрапляють з кров'ю в печінку, де під впливом ферменту 25-гідроксилази утворюється транспортна форма вітаміну – 25-оксивітамін D, або 25(OH)D (рис. 1). Ця форма спочатку в складі жовчі виділяється у дванадцятипалу кишку, а потім разом з жовчаними кислотами знову всмоктується в кров у тонкому кишковику.





**Рис. 1. Біологічні мішені гормонально активної форми вітаміну D.**  
*УФП – ультрафіолетові промені*

У нирках під дією ферменту 1 $\alpha$ -гідроксилази 25-оксивітамін D перетворюється в гормонально активну форму – 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D (кальцитріол). Цей процес стимулюється паратгормоном, який підвищує активність 1 $\alpha$ -гідроксилази. Крім того, у нирках існує й альтернативний шлях, завдяки якому 25-оксивітамін D перетворюється в неактивну форму – 24,25(OH) $_2$ D. Яка з двох форм вітаміну D – гормонально активна чи неактивна – буде утворюватися в нирках, залежить від концентрації іонів кальцію в плазмі крові. При гіпокальціємії перетворення йде в напрямі 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D, а утворення 24,25(OH) $_2$ D гальмується; при гіперкальціємії – навпаки (Norman and Powell, 2005).

Слід зазначити, що 24,25(OH) $_2$ D хоча й називають неактивною формою, проте вона має все ж таки біологічну дію: (1) гальмує секрецію паратгормону і (2) посилює інактивацію стероїдів, у тому числі вітаміну D у печінці.

Серед основних біологічних ефектів гормонально активної форми – 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D – найбільше значення мають два.

1. Збільшення всмоктування кальцію й фосфатів у тонкій кишці.

Діючи на епітеліальні клітини слизової кишки, кальцитріол, як і інші стероїдні гормони, проникає через плазматичну мембрану в цитоплазму ентероцита, а потім у комплексі з внутрішньоклітинним білком-рецептором у його ядро. У ядрі активується транскрипція генів, що кодують структуру функціонально важливих білків: (1) кальбідину (білка, що зв'язує кальцій) і (2) білків кальцієвих насосів, зокрема, Ca-АТФази.

Молекули кальбідину вмонтовуються в плазматичну мембрану мікрворсинок ентероцитів і забезпечують полегшену дифузю іонів кальцію з просвіту кишок у цитоплазму клітин кишкового епітелію. Без цього білка мембрана епітеліальних клітин тонкої кишки погано проникна для кальцію.

Структури кальцієвих насосів здійснюють активний транспорт іонів кальцію з цитоплазми ентероцитів через плазматичну мембрану базальної частини клітин в інтерстицій і кров. Оскільки такий транспорт іде проти градієнту концентрації, то він потребує витрат енергії, яку постачають молекули АТФ. Вивільнення і використання цієї енергії здійснює Ca-АТФаза – невід'ємний компонент Ca-насоса.

Посилене всмоктування  $\text{Ca}^{2+}$  у кишковику є основним механізмом, завдяки якому вітамін D зумовлює збільшення концентрації іонізованого кальцію в плазмі крові.

Що стосується всмоктування фосфатів, то, на думку одних учених, цей процес є спряженим зі всмоктуванням кальцію, а отже, має спільні механізми. Інші – припускають існування спеціалізованих структур і засобів абсорбції фосфатів, на які і впливає гормонально активна форма вітаміну D (Атаман О.В., 2010).

## 2. Вплив на кісткову тканину.

Дія вітаміну D на кістки залежить від його дози. Невеликі кількості гормону посилюють процеси мінералізації, тобто відкладання солей кальцію в хрящовій і кістковій тканинах. В основі цього ефекту, як вважають, є збільшення концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  і фосфатних аніонів у плазмі крові, завдяки посиленому їх всмоктуванню в кишковику. Зростання вмісту зазначених іонів веде до збільшення добутку їхніх концентрацій –  $[\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{P}_i]$ , - що, у свою чергу, стає причиною переходу кальцію і фосфатів з крові у кісткову тканину і відкладання там аморфних солей кальцію з наступним поступовим перетворенням їх в кристали гідроксіапатиту.

Великі концентрації вітаміну D, навпаки, зумовлюють демінералізацію і резорбцію кісткової тканини (Masterjohn, 2007). Механізм такого ефекту досі невідомий. Припускають, що під впливом високих доз вітаміну D посилюються процеси диференціювання кісткових стовбурових клітин в остеокласти та їхня функціональна активність. Завдяки останній і відбувається резорбція кісткової тканини. Крім того, наявність достатньої кількості вітаміну D необхідна для того, щоб у повній мірі могли виявити себе впливи іншого гормону – паратиреоїдного – на кістки і зокрема на остеокласти.

Крім кишкового і кісток, гормонально активна форма вітаміну D чинить вплив і на кровоносні судини (Norman and Powell, 2005; Zittermann and Koerfer, 2008). В артеріальній стінці мішенями для вітаміну D можуть бути гладкі м'язові клітини (ГМК), ендотеліоцити, а також клітини, що надходять сюди з крові – макрофаги і моноцити (Norman and Powell, 2005).

У 1987 році Merke et al. продемонстрували наявність специфічних внутрішньоклітинних рецепторів до

1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  (*vitamin D receptor* – VDR) в ГМК судин. З активацією VDR вони пов'язували появу в цитоплазмі ГМК округлених, електроннощільних, покритих мембраною лізосомних частинок, що містять кальцій і фосфати. На думку авторів, цей ефект може мати стосунок до здатності вітаміну D індукувати розвиток артеріосклерозу.

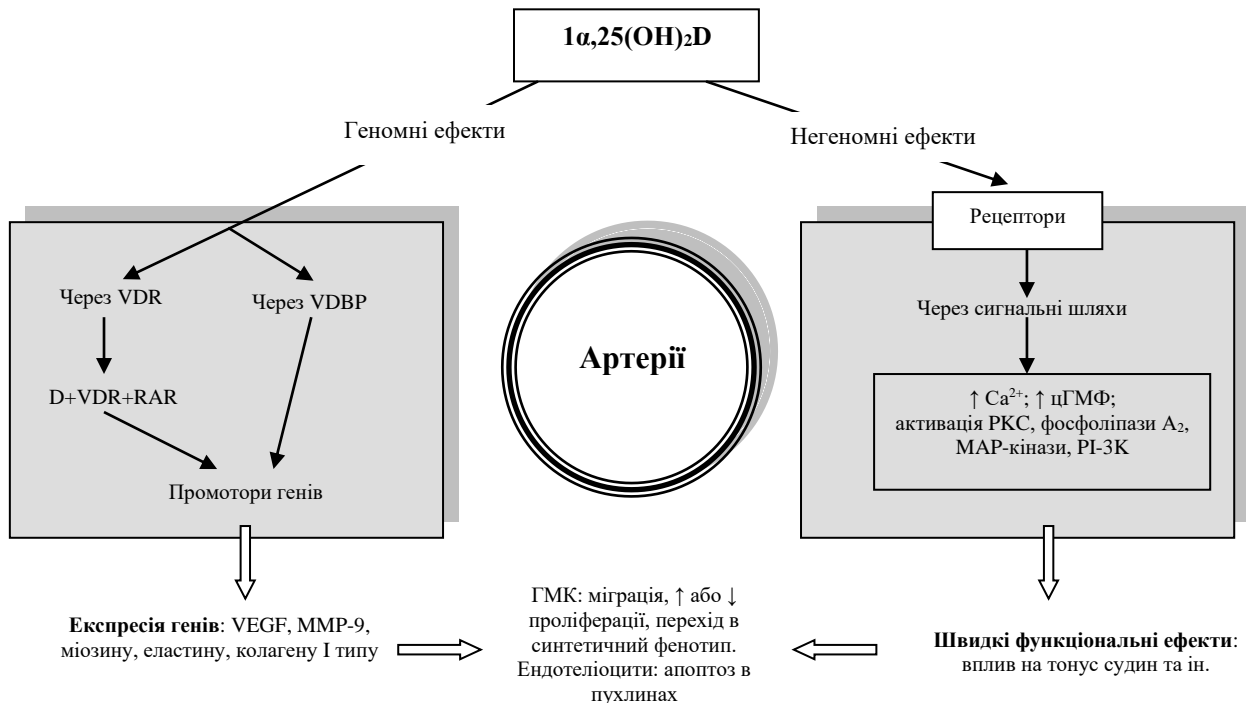
Невдовзі було виявлено й інші опосередковані рецепторами ефекти 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  при взаємодії його з ГМК в культурі клітин. Так, *Koh et al.* (1988) виявили стимулятивний вплив кальцитріолу на проліферацію культивованих ГМК, а *Kawashima* (1988) і *Inoue and Kawashima* (1988) встановили, що цей метаболіт вітаміну D $_3$  активує Ca-АТФазу і стимулює захоплення радіоактивно значених іонів  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  ГМК, виділеними з аорти щурів.

Проте, є й інші дані. Так, *Carthy et al.* (1989) показали, що 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  у низьких концентраціях (0,1 нмоль) пригнічує проліферацію судинних ГМК і цей ефект пов'язаний з інгібуванням епідермального фактору росту.

Так чи інакше, додавання 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  до культур судинних ГМК щурів чи кролів веде до вираженого посилення експресії VDR, що свідчить про важливу роль осі вітамін D – кальцитріол – VDR у здійсненні багатьох функцій цих клітин (*Rajasree et al.*, 2002; *Cardus et al.*, 2003; *Wu-Wong et al.*, 2006, 2007).

Рівень теперішніх знань дає підстави виділити дві групи ефектів 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ , коли йдеться про дію цієї гормонально активної форми вітаміну D на клітини судинної стінки. Такими є (1) геномні довготривалі і (2) негеномні швидкоплинні ефекти (*Norman and Powell*, 2005; *Zittermann and Koerfer*, 2008) (рис. 2).

**Геномні ефекти.** 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  є стероїдним гормоном, який регулює експресію понад 60 генів (*Omdahl et al.*, 2002; *Rachez et al.*, 2000). Кальцитріол проникає всередину клітин, де зв'язується в цитозолі з VDR, що є представником суперсімейства ядерних рецепторів. Після цього настає гетеродимеризація VDR з ретиноїдним X рецептором (RAR). Комплекс, що утворився, взаємодіє зі специфічними ділянками промоторів генів-мішеней, що отримали назву *vitamin D response elements*. Через ці елементи вітамін D змінює швидкість експресії багатьох генів (*Barsony and Pruner*, 2002; *Brancaccio et al.*, 2007).



**Рис.2. Механізми впливу гормонально активної форми вітаміну D на артеріальні судини.**

*D – вітамін D; VDR – vitamin D receptor; RAR – retinoic acid receptor; VDBP – vitamin D binding protein; VEGF – vascular endothelial growth factor; MMP- matrix metalloproteinase; PKC – protein kinase C; PI-3K – phosphoinositide 3-kinase*

В артеріальній стінці  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  у такий спосіб впливає на експресію низки генів, зокрема (а) судинно-ендотеліального фактору росту (VEGF), (б) матриксної металопротеїнази дев'ятого типу (MMP-9); (в) міозину, (г) еластину, (ґ) колагену I типу (*Rachez et al.*, 2000; *Barsony and Prufer*, 2002; *Pierce et al.*, 1992; *Kuroki et al.*, 1995; *Lin et al.*, 2002).

Існує й альтернативний шлях впливу кальцитріолу на геном клітин – трансактивація генів через внутрішньоклітинні білки, що зв'язують вітамін D (*intracellular vitamin D-binding proteins*) (*Wu et al.*, 2000).

**Негеномні ефекти.** Як і інші стероїдні гормони,  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  викликає ряд ефектів, що розвиваються надто швидко, аби бути реалізованими через експресію генів. Такими, зокрема, є: (а) збільшення рівня внутрішньоклітинного кальцію, (б) зростання вмісту в цитоплазмі цГМФ, (в) активація протеїнкінази C, (г) зміни в метаболізмі фосфоінозитидів та ін. (*Falkenstein et al.*, 2000). Негеномні ефекти є швидкими і опосередковуються зв'язаними з мембранами VDR (*Montero-Oddasso and Duque*, 2005). При цьому відбувається активація специфічних внутрішньоклітинних метаболічних шляхів протягом кількох хвилин. Що стосується артеріальної стінки, то у такий спосіб стимулюється міграція судинних ГМК через активацію фосфоінозитид-3-кінази (PI3K) (*Rebsamen et al.*, 2002).

Наведені вище геномні і негеномні ефекти кальцитріолу виявляють себе функціональними змінами як в "класичних" мішенях, якими є клітини кишковика і кісткова тканина, так і в клітинах судинної стінки, зокрема в ГМК.

Стосовно впливу  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  на ГМК артеріальної стінки дані літератури суперечливі. Уже згадувалася робота *Koh et al.* (1988), у якій показано стимулятивну дію цього гормону на проліферацію ГМК в культурі клітин. Однак, в інших дослідженнях було встановлено, що кальцитріол, навпаки, інгібує проліферацію ГМК і перетворення фенотипу цих клітин з контрактильного в синтетичний (*Carthy et al.*, 1989; *MacCarthy et al.*, 1989; *Tukaj et al.*, 1986). Є дані про те, що  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  може посилювати міграцію клітин і перетворення ГМК судин у подібні до остеобластів клітини (*Tukaj et al.*, 2000; *Rebsamen et al.*, 2002). Очевидно, напрям, у якому діє гормон на судинні ГМК, залежить від умов їхнього ку-

льтивування, дози кальцитріолу, виду тварин та інших ще не з'ясованих чинників. Що стосується умов *in vivo*, то функціональні ефекти вітаміну D залишаються неясними (*Mitsuhashi et al.*, 1991).

Щодо ендотеліальних клітин артеріальної стінки, то показано, що вони, так само як і ГМК, експресують *in vitro* 1 $\alpha$ -гідроксилазу (*Somjen et al.*, 2005). Це дало підстави вести мову про існування в судинах власної мікроендокринної системи, що перетворює 25(OH)D<sub>3</sub> у гормонально активну форму 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (*Merke et al.*, 1989). Крім того, встановлено, що кальцитріол зумовлює апоптоз в ендотеліальних клітинах пухлин, перешкоджаючи дії VEGF і пригнічуючи ангиогенез (*Mantell et al.*, 2000).

Сьогодні є всі підстави вважати, що токсичні впливи високих доз вітаміну D можуть бути пов'язані щонайменше з двома чинниками: (1) зі збільшенням утворення гормонально активної форми вітаміну – 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, яка викликає зміни в організмі через наведені вище геномні і негеномні ефекти, і (2) з накопиченням у тканинах власне вітаміну D та його метаболітів – 25(OH)D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25,26(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub>-26,23-лактону, – великі кількості яких можуть спричинитися до ушкодження клітин та компонентів сполучнотканинного матриксу (*Jones et al.*, 2008). Стосовно першого з двох наведених чинників можна вести мову про специфічні механізми D-вітамінної інтоксикації, щодо другого – то тут ідеться про неспецифічну ушкоджувальну дію (рис. 3).

**Специфічна токсична дія 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.** Вона пов'язана перш за все із впливом цієї сполуки на основні мішені – кишковик і кістки. Дія на ентероцити спричиняється до значного посилення всмоктування кальцію і фосфатів, а взаємодія з клітинами кісткової тканини веде до резорбції і демінералізації останньої. Як наслідок специфічного впливу на кишковик і кістки розвиваються **гіперкальціємія** і **гіперфосфатемія**.

В експериментальних дослідженнях показано, що при моделюванні гіпервітамінозу D (вітамін D – 7,5 mg/kg з додаванням нікотинової кислоти) швидко розвивається кальцієве і фосфатне перевантаження у молодих щурів (*Niederhoffer et al.*, 1997; *Jegger et al.*, 2007). Це, зокрема, виявляє себе збільшенням у 10-40 разів вмісту кальцію і зростанням

у 80 разів вмісту неорганічних фосфатів у тканинах аорти (Price et al., 2001).

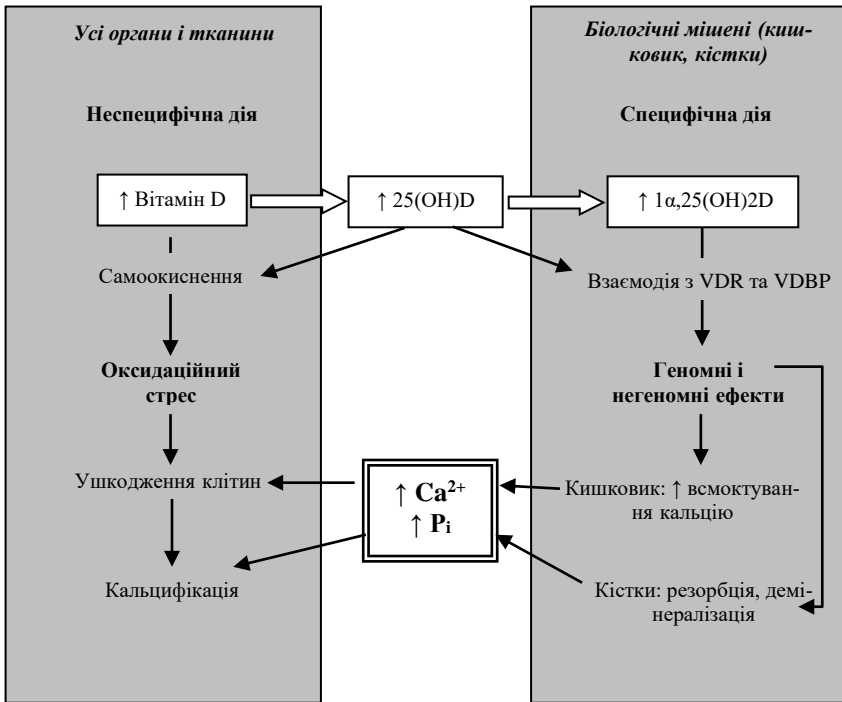


Рис. 3. Механізми токсичної дії вітаміну D

Гіперкальціємія і гіперфосфатемія є чинниками, що індукують і посилюють кальцифікацію кровоносних судин, міокарда і серцевих клапанів (Joy et al., 2007; Ketteler, 2008). Збільшення кальцій-фосфатного добутку понад 72 і висока концентрація фосфатів в сироватці крові (> 6,5 мг/мл) корелюють зі збільшенням ускладнень від серцево-судинних хвороб і смертністю (Block et al., 1998). У дослідженнях Wu-Wong et al. (2006) показано, що сама по собі гіперфосфатемія у субтотально нефректомованих щурів (видаляється 5/6 ниркової тканини) не веде до кальцифікації судин, якщо тваринам не водити препарати вітаміну D. Водночас у дос-



лідах *in vitro* ці ж автори виявили пряму, залежну від дози, стимулятивну дію фосфату на мінералізацію судинних ГМК. Очевидно, при одній лише гіперфосфатемії запуску процесів кальцифікації *in vivo* перешкоджають природні антикальциногенні механізми, діяльність яких порушується при додаванні кальцитріолу чи його аналогів.

За умов гіперкальціємії виникають усі передумови для реалізації так званих "кальцієвих" механізмів ушкодження клітин, що започатковуються підвищенням внутрішньоцитоплазматичної концентрації іонів кальцію (Меерсон Ф.З., 1984). Накопиченню цих іонів у клітинах сприяє надмірне їх надходження з позаклітинного середовища в цитоплазму за збільшеним градієнтом концентрації і підвищення навантаження на кальційтранспортні системи, що працюють проти цього градієнту. Слід, однак, зазначити, що в тих випадках, коли гіпервітаміноз D не супроводжується вираженою гіперкальціємією, а також у досліджах *in vitro* з нормальним вмістом іонів кальцію в інкубаційному середовищі ушкоджувальна дія вітаміну D на клітини зберігається. Це свідчить про існування й інших, не пов'язаних з гіперкальціємічним ефектом, механізмів ушкодження клітин в умовах D-вітамінної інтоксикації (Быць Ю.В. *с соавт.*, 1999).

Проте і сьогодні незмінним залишається фундаментальне твердження, що токсичний ефект високих доз вітаміну D опосередковується збільшенням рівня кальцію у крові. Однак, на думку багатьох авторів, гіперкальціємія має все ж таки другорядне значення. Це впливає хоча б з того, що вітамін А, так само як і інгібітори резорбції кісток бісфосфонати, зменшують або повністю усувають такі прояви гіпервітамінозу D, як кальцифікація м'яких тканин, анорексія, втрата маси тіла, летаргія і смерть, без зменшення супутньої гіперкальціємії (Clark *et al.*, 1963; Callari *et al.*, 1986; Price *et al.*, 2001). Антикоагулянт варфарин викликає дуже схожі на інтоксикацію вітаміном D прояви, але без збільшення вмісту кальцію у крові (Price *et al.*, 2000). Вітамін D може індукувати кальцифікацію нирок у курчат і резорбцію кісток у людей у дозах, які не викликають гіперкальціємію (Morrisey *et al.*, 1977; Adams and Lee, 1997). Усі ці дані свідчать про те, що гіперкальціємія, зумовлена вітаміном D, нерідко розвивається за відсутності токсичних ефектів, і навпаки, токсична дія вітаміну D може виявляти себе без супутньої гіперкальціємії.

Це дає підстави шукати інші, ніж гіперкальціємія, механізми токсичних D-гіпервітамінозних впливів.

Зазначена обставина спонукала багатьох дослідників вивчати безпосередню дію високих доз  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  на організм у цілому і на окремі види його клітин. Так, було показано, що внутрішньовенне введення кальцитріолу (1 мкг/кг) викликає залежну від часу кальцифікацію медії аорти щурів з інтактною функцією нирок (*Bas et al.*, 2006). Цей препарат зумовлює істотне збільшення інкорпорації  $^{45}\text{Ca}$  в культивовані ГМК судин (*Inoue and Kawashima*, 1988; *Andress*, 2007). Додавання кальцитріолу тричі на тиждень (1 мкг/кг) до культури клітин посилює кальцифікацію ГМК у середовищі, сприятливому для кальцифікації (*Cardus et al.*, 2007). Після припинення додавання  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  до культури клітин кальцифікація судин швидко регресує, а вміст кальцію і фосфатів зменшується на 75% упродовж 9 тижнів (*Bas et al.*, 2006).

У генетично нокаутованих мишей з відсутнім геном FGF-23 значне збільшення концентрації  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  не веде до кальцифікації судин, якщо тварини перебувають на фосфатдефіцитній дієті (*Stubbs et al.*, 2007). Це свідчить про те, що в даних умовах вирішальне значення для кальцифікації артеріальної стінки має високий рівень фосфатів у сироватці крові, а не збільшення кальцитріолу. Проте, у цих дослідженнях рівень  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  корелював з поганим виживанням тварин. Переведення їх на дефіцитну за вітаміном D дієту зменшувало рівень кальцитріолу і вело до збільшення тривалості життя (*Stubbs et al.*, 2007). Таким чином, було показано, що загальні токсичні ефекти прямо не пов'язані з кальцифікацією судин.

Введення низьких доз кальцитріолу (0,25 мкг/кг) щурам з уремією веде до дифузної кальцифікації стінки аорти, що охоплює медію та інтиму, а також розвивається гіпертрофія лівого шлуночка (*Haffner et al.*, 2005). Схожі дані було отримано *Henley et al.* (2005) у щурів з вторинним гіперпаратироїдизмом, яким вводили кальцитріол (0,25-0,28 мкг/кг). При цьому розвивалася кальцифікація аорти, яка не виникала у тварин, яким препарат не вводили. У цих дослідках кальцитріол зменшував рівень паратгормону, і збільшував концентрацію в сироватці крові кальцію і фосфатів, а також кальцій-фосфатний добуток.

Поглиблене вивчення клітинних і молекулярних механізмів кальцифікації судин та відкриття місцевих про- і антикальциногенних чинників поставило питання щодо впливу  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  на процеси, що індукують мінералізацію артеріальної стінки, з одного боку, і перешкоджають її розвитку, з другого.

Так, було показано, що кальцитріол здатен через різні прокальциногенні механізми сам започатковувати мінералізацію кровоносних судин. Водночас великі його кількості спричиняються і до пригнічення цілого ряду природних систем, що запобігають кальцифікації м'яких тканин. Розглянемо докладніше ці впливи.

#### 1. Вплив на прокальциногенні механізми.

Показано, що  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  здатен індукувати кальцифікацію культивованих ГМК артерій через взаємодію з VDR (Jono et al., 1998). Цей опосередкований рецепторами вплив може запускати три основні механізми, що започатковують кальцифікацію: (1) активний генетично запрограмований; (2) залежний від апоптозу і (3) пов'язаний з порушеннями структури і обміну еластину.

Стосовно першого з них є дані про те, що під впливом  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ГМК судин здатні змінювати свій фенотип і перетворюватися в подібні до остеобластів клітини (Tukaj et al., 2000; Rebsamen et al., 2002). Це може свідчити про реальну можливість запуску генетичної програми, реалізація якої у судинній стінці вестиме до активної її кальцифікації.

Відомо, що апоптоз, який активується в судинах при атеросклерозі і після ушкодження артеріальної стінки, може ставати первинним стимулом для кальцифікації кровоносних судин (Bennett et al., 1995; Gadeau et al., 2001). Є дані про те, що кальцитріол здатен індукувати затримку клітинного циклу, а отже, і апоптоз в деяких типах нормальних та малігнізованих клітин (Mantell et al., 2000; Ylikomi et al., 2002). Хоча й показано, що  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  інгібує ангиогенез шляхом індукування апоптозу, немає прямих доказів, які би пов'язували вітамін D з кальцифікацією периферичних артерій саме через цей механізм (Norman et al., 2005).

Martyn і Greenwald (1997) висунули були гіпотезу, згідно з якою порушення синтезу еластину в стінках аорти та інших артерій еластичного типу під час розвитку плода є фактором, що ініціює патогенез уражень судин, зокрема артері-

альної гіпертензії. Відомо, що вітамін D пригнічує утворення тропоеластину через посттранскрипційний механізм (*Pierce et al.*, 1992), а тому його надлишок під час розвитку плода може спричинитися до порушення утворення еластину (*Norman et al.*, 2005). Оскільки брак еластину в медії артерій є основним чинником розвитку аневризми черевної аорти (АЧА), то це стало основою ще однієї гіпотези, відповідно до якої надмірне надходження в організм вітаміну D у ранні періоди життя веде до розвитку АЧА у дорослих (*Norman et al.*, 1995). Якщо мати вживає більшу кількість вітаміну D, ніж цього потребує організм плода чи новонародженого, то надмірний вплив даного вітаміну буде виявляти себе і в потомстві. Хоча й немає клінічних досліджень, які б підтверджували зв'язок між вживанням матерями вітаміну D і порушенням еластогенезу в аорті їхніх дітей, є експериментальні дані, які показують, що дія високих доз вітаміну D на ранніх етапах життя корелює зі зменшенням вмісту еластину і кількості еластичних мембран в черевній аорті (*Norman et al.*, 2002). Проте, ці дослідження не було продовжено, щоб вивчити можливість утворення аневризми у дорослих щурів та тварин, що старіють.

Крім впливу на ініціювання процесів кальцифікації, кальцитріол може посилювати мінералізацію судинної стінки, яка вже розпочалася. Цю дію вітаміну D пов'язують зі збільшенням продукування і активацією деяких "прокальциногенних" ферментів, а також з впливом на процес запалення, що може розгортатися в судинній стінці.

Так, при введенні тваринам сублетальних доз вітаміну D<sub>3</sub> (7,5 мг/кг) значно зростає рівень матричної металопротеїнази 9-го типу (MMP-9) в артеріальній стінці (*Qin et al.*, 2006). Інгібування цього ферменту на тлі гіпервітамінозу D запобігає розвитку кальцифікації артерій.

Є дані про те, що кальцитріол опосередковано через активацію макрофагів збільшує продукування лужної фосфатази культивованими ГМК артерій, посилюючи їх кальцифікацію (*Shioi et al.*, 2002).

Важливу роль у розвитку АЧА і хвороб периферичних артерій відіграє запалення (*Shah*, 1997). З огляду на це привертають до себе увагу дані про важливу роль вітаміну D та його аналогів у діяльності імунної системи, зокрема макрофагів і Т-лімфоцитів, що експресують VDR. Найвищу

експресію VDR виявляють в CD8-лімфоцитах, значно меншу – в CD4-лімфоцитах і макрофагах. У В-лімфоцитах VDR взагалі нема.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  збільшує експресію VDR в CD8-клітинах (*Veldman et al.*, 2000), завдяки чому може регулювати утворення цитокінів в уражених артеріях. Експериментальні дані показують, що кальцитріол впливає на продукцію цитокінів як CD4+, так і CD8+ клітинами, переважно інгібуючи утворення IL-2 та інтерферону- $\gamma$  Th1-клітинами. Через цей механізм  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  сприяє відповідям Th2-клітин, які продукують IL-4, IL-5, IL-10, а також IL-6 (*Boonstra et al.*, 2001; *Willheim et al.*, 1999). Вважають, що це якраз і є тим чинником, який пов'язує високі дози вітаміну D з АЧА, у процесі розвитку якої важливе місце посідають реакції саме Th2-клітин (*Schonbeck et al.*, 2002).

В осередках запалення активовані макрофаги експресують  $1\alpha$ -гідроксилазу і продукують  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (*Gyetko et al.*, 1993). Це може впливати на ступінь локального запалення і бути чинником, що змінює міграцію і проліферацію ГМК у судинній стінці (*Vattikuti and Towler*, 2004; *Parhami et al.*, 1997). Ці дані разом зі спостереженнями, що вітамін D збільшує рівень TGF- $\beta$  у сироватці крові, вказують на інші можливості впливу вітаміну D на стінку кровоносних судин (*Norman et al.*, 2005).

Крім зазначених вище чинників, що мають стосунок до запалення, певну роль у розвитку D-гіпервітамінозних уражень судин може мати система комплементу. Про її роль у кальцифікації артерій непрямим чином свідчать роботи *Geertinger* і *Sorensen* (1970) та *Pang* і *Minta* (1980). Цим дослідникам вдалося показати, що попередня інактивація деяких компонентів комплементу за допомогою введення в організм зимозану чи високо очищеного фактору (CoF) отрути кобри повністю попереджає розвиток кальцинозу та інших дистрофічних змін в медії артеріальної стінки тварин, що отримували високі дози вітаміну D. Виявлений авторами феномен дає підстави для припущень про участь комплементу в реалізації ушкоджувальної дії вітаміну D на судинну стінку.

## 2. Вплив на антикальциногенні механізми.

Ще один механізм, через який  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  може спричинятися до кальцифікації судин, пов'язаний з пригніченням функції сполук, що в нормі перешкоджають відкладанню

солей кальцію в м'яких тканинах, тобто мають антикальциногенні властивості.

В експериментах *in vitro* показано, що судинні ГМК зазнають кальцифікації під впливом  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  через механізм, залежний від супресії ендogenous інгібітора кальцифікації (*PTH-related peptide*) і сигнального шляху, що йде від PTH-рецепторів (*Jono et al.*, 1998; *Inoue and Kawashima*, 1988). Припинення утворення зазначеного інгібітора веде до посиленої експресії гена лужної фосфатази і, як наслідок, до зменшення в тканинах пірофосфату ( $\text{PPi}$ ) і зростання локальної концентрації неорганічного фосфату ( $\text{Pi}$ ) – тобто створюються умови, сприятливі для ектопічної кальцифікації (*Towler*, 2007).

З наведених даних випливає, що вітамін D може пригнічувати паракринні механізми, які за нормальних умов захищають судинну стінку від кальцифікації. Така можливість лягла в основу гіпотези про те, що запалення в адвентиції судинної стінки може вести до розвитку медіакальцинозу через локальне утворення макрофагами  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (*Vattikuti and Towler*, 2004).

Кілька років тому *Masterjohn* (2007) висунув гіпотезу, яка пояснює розвиток D-гіпервітамінозної інтоксикації взагалі і кальцифікації судин зокрема порушенням карбоксилювання вітамін K-залежних білків, до яких належить такий важливий антикальциногенний фактор, як матриксний Gla-протеїн (MGP). Суть гіпотези зводиться до того, що вітамін D чинить свою токсичну дію, викликаючи спочатку недостатність вітаміну K.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  посилює експресію генів цілого ряду протеїнів, які потребують активації шляхом залежного від вітаміну K карбоксилювання. Коли рівень цих білків стає настільки високим, що перевищує пул доступного для карбоксилювання вітаміну K, то цей пул виснажується. У результаті починають страждати вітамін K-залежні процеси, що підтримують функціональну активність нервової системи, забезпечують затримку мінералів у кістковому матриксі і попереджають кальцифікацію м'яких тканин. Більше того, надлишок неактивних недокарбоксильованих білків пригнічує і так обмежену доставку активних, карбоксильованих протеїнів. Водночас неактивні протеїни самі собою можуть полегшувати вивільнення кальцію з кісткового матриксу і відкладання його в м'яких тканинах.

В основі наведеної гіпотези лежали спостереження того, що у тварин з експериментальним гіпервітамінозом D виникають зміни, дуже схожі на ті, які розвиваються у тварин з дефіцитом вітаміну K і вітаміні K-залежних білків.

Так, для MGP-дефіцитних мишей характерними є (а) демінералізація кісток; (б) затримка росту; (в) виражена кальцифікація аорти та її гілок; (г) кальцифікація трахеї та легенів – тобто зміни, аналогічні тим, що виникають у щурів, яким вводили токсичні дози вітаміну D (*Luo et al.*, 1996). MGP-дефіцитні миші, як і D-гіпервітамінозні щури, гинуть від ускладнень, зумовлених ектопічною кальцифікацією тканин.

При введенні щурам варфарину – препарату, що порушує відновлення вітаміну K, також виникають зміни (кальцифікація м'яких тканин), схожі на тих, що зумовлюються високими дозами вітаміну D (*Price et al.*, 1998). Крім того, варфарин посилює D-гіпервітамінозні ураження судин при поєднаному введенні тваринам цього препарату з вітаміном D (*Price et al.*, 2000). Бісфосфонати (ібандронат) повністю захищають організм як від токсичної дії вітаміну D (*Price et al.*, 2001a), так і дії варфарину (*Price et al.*, 2001b).

*Price et al.* (2001a) показали, що під впливом високих доз вітаміну D експресія MGP збільшується від 6 (у хрящах) до 100 разів (у легенях). Вона залежить також від ступеню кальцифікації тканин. У культурі судинних ГМК вітаміну D безпосередньо посилює експресію MGP, тимчасом як ретиноева кислота, що є дериватом вітаміну A, її зменшує (*Farzaneh-Far et al.*, 2001).

Якщо в організм надходять дуже високі дози вітаміну D, то це викликає надмірну стимуляцію експресії MGP та інших вітаміні K-залежних протеїнів, що може бути одним із чинників токсичних ефектів, які розвиваються при гіпервітамінозі D. Підвищена експресія MGP може бути причетна до токсичних ефектів вітаміну D двома шляхами:

1) якщо потреба в карбоксилюванні білків перевищує здатність забезпечувати ці процеси вітаміном K, відносна недостатність останнього може стати причиною недокарбоксилювання більшості вітаміні K-залежних білків;

2) великий надлишок MGP може швидко виснажувати резерви вітаміну K і в такий спосіб спричинитися до абсолютної недостатності цього вітаміну.

У першому випадку велика кількість недокарбоксілюваного MGP може полегшувати кальцифікацію м'яких тканин, заважаючи функціонувати карбоксілюваному MGP через конкурентні взаємостосунки між ними. Функціонально неповноцінний MGP може навіть безпосередньо зв'язуватися з солями кальцію та осаджувати їх у матриці м'яких тканин.

У другому випадку посилена експресія MGP може індукувати один з двох різних типів абсолютної недостатності вітаміну К: (1) збільшення швидкості його екскреції і деградації – процесів, інтенсивність яких прямо залежить від активної участі вітаміну К в реакціях карбоксілювання білків (при цьому абсолютний вміст вітаміну К в тканинах зменшується); (2) зменшення відношення відновленого вітаміну К до невідновленого внаслідок відставання реакцій ферментативного відновлення вітаміну К від процесів його окиснення (при цьому загальна кількість вітаміну К в тканинах залишається незмінною).

Крім порушення карбоксілювання MGP, у розвитку токсичних ефектів вітаміну D важливе значення може мати недокарбоксілювання ще одного Gla-протеїну – остеокальцину. Випадіння його функцій може бути причетним до резорбції і демінералізації кісток у тварин з гіпервітамінозом D. Припускають, що вивільнення в кров неповноцінного остеокальцину та інших, пов'язаних з ним, кальциногенних факторів сприяє відкладанню солей кальцію в судинах на тлі "вимивання" кальцію і фосфатів з кісткової тканини (*Masterjohn, 2007*).

**Неспецифічна токсична дія вітаміну D.** Більшість наведених вище токсичних ефектів вітаміну D пов'язують зі специфічною дією гормонально активної його форми  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Проте, в ушкодженні судин та їх кальцифікації важливе значення мають зміни, що виникають під впливом великих кількостей самого вітаміну D (ергокальциферолу чи холекальциферолу) та їхніх метаболітів.

Про це свідчить ціла низка як експериментальних, так і клінічних фактів, серед яких дані про те, що за умов D-гіпервітамінозу в плазмі крові тварин (корів, свиней) і людей істотно зростає концентрація  $25(\text{OH})\text{D}$  та інших метаболітів ( $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ ,  $25,26(\text{OH})_2\text{D}$ ,  $25(\text{OH})\text{D}$ - $26,23$ -лактону), натомість рівень  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  залишається незмінним (*Liittledike and Horst, 1982ab; Pettifor et al., 1995; Jones, 2008*).



При цьому вважається, що найголовнішим маркером D-вітамінної інтоксикації є концентрація 25(OH)D у плазмі крові. Виражені клінічні прояви гіпервітамінозу D, серед яких гіперкальціємія і гіперфосфатемія, з'являються тоді, коли рівень цього метаболіту перевищує 750 нмоль/л (Jones, 2008).

Сьогодні є намагання пояснити механізми токсичної дії метаболітів вітаміну D тим, що при істотному зростанні (вище певних порогових концентрацій) їхнього вмісту в крові наявного пулу вітамін D-зв'язувального білка (*vitamin D binding protein* – DBP) недостатньо, щоб приєднати до себе надто велику кількість цих сполук. Це, на думку прихильників даної гіпотези, має щонайменше два важливі наслідки. По-перше, у крові з'являються вільні, не зв'язані з DBP форми метаболітів, зокрема 25(OH)D, які здатні проникати, так само як і кальцитріол, у клітини, зв'язуватися там з VDR, а отже викликати ті ж самі специфічні ефекти, що й  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Uchida et al., 1994). По-друге, оскільки DBP значно легше зв'язує 25(OH)D, ніж  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ , то через існуючу конкуренцію менша кількість кальцитріолу може утворювати комплекси з цим білком, а отже в крові зростає вміст "вільної" форми  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  – навіть за умови, що загальна концентрація кальцитріолу (зв'язаний + вільний) залишається незмінною. А саме вільна форма  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  виявляє гормональну активність і саме вона викликає специфічні ефекти вітаміну D (Jones, 2008).

Викладена вище гіпотеза токсичної дії метаболітів вітаміну D, безумовно, заслуговує на увагу і потребує нових доказів. Вона, власне, доповнює новими штрихами вже обговорені специфічні механізми D-вітамінної інтоксикації, що ґрунтуються на взаємодії кальцитріолу з VDR, унаслідок чого змінюється робота генетичного апарату клітин.

Проте, і сам вітамін D, і його метаболіти при значному збільшенні їх кількості в організмі можуть спричинятися до токсичних ефектів та уражень судин і через інші – неспецифічні механізми. Серед таких: (1) оксидаційний стрес і (2) порушення процесів енергетичного обміну в судинній стінці.

#### 1. Оксидаційний стрес.

Давно відомо, що вітамін D має виражені прооксидантні властивості. Будучи сполукою стероїдного походження, він

легко проникає в ліпідні структури клітинних мембран і там, зазнаючи автоокиснення, стає джерелом вільних радикалів (Сергеев П.В. с соавт., 1974; Спиричев В.Б., 1971). Надлишок останніх активує пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) – один з універсальних механізмів ушкодження клітин (Меєрсон Ф.З., 1984). Як доказ ролі пероксидних механізмів у патогенезі D-вітамінної інтоксикації наводять дані про накопичення в органах і тканинах D-гіпервітамінозних тварин кінцевих і проміжних продуктів пероксидного окиснення ліпідів (малонового діальдегіду, дієнових кон'югатів та ін.) (Спиричев В.Б., 1971; Абрамова Ж.И. и Оксенгендлер Г.И., 1985; Kobylinski, 1971).

Вивчення ПОЛ в стінках кровоносних судин кролів, що отримували високі дози вітаміну D<sub>2</sub>, показало значну активацію цього процесу як в артеріальних, так і у венозних судинах (Атаман О.В., 2001; Гарбузова В.Ю., 2004; Хижня Я.В., 2010). Докладно мова про це піде в наступних главах монографії.

Оксидаційний стрес, що розвивається в судинній стінці під впливом токсичних доз вітаміну D, може як безпосередньо, так і опосередковано через інші молекулярні механізми, запускати процес ушкодження клітин, спричинятися до їх загибелі та наслідків, пов'язаних з нею. Крім того, показано, що оксидаційний стрес здатен започатковувати механізми, які ведуть до запуску активної генетично запрограмованої кальцифікації судинної стінки.

Так, нині відомо, що оксидаційний стрес, є одним з основних чинників остеогенної стимуляції клітин адвентиції. Він активує механізми кальцифікації через вплив, що його здійснюють активні форми кисню, продукти ПОЛ (пероксиди) та слабко окиснені ЛПНГ (O'Brien, 2006).

Процес кальцифікації судинної стінки власне розпочинається з того, що продукти вільнорадикального окиснення, діючи на ендотеліальні клітини і перицити мікросудин адвентиції, стимулюють утворення і секрецію ними BMP-2 і, за деякими даними, BMP-4 (Abedin et al., 2004; Demer and Tintut, 2003; Shao et al., 2006).

BMP-2 – один з представників сімейства кісткових морфогенетичних протеїнів – належить до групи факторів росту і цитокінів (Chen and Mundy, 2004). Утворений у зовнішній оболонці судинної стінки, він діє на мезенхімні клітини ад-

вентиції, що експресують *Msx2*, і започатковує в такий спосіб програму активної регульованої кальцифікації медії через так звану BMP-2 – *Msx2* – Wnt-сигнальну систему.

Під впливом BMP-2 в мезенхімних клітинах адвентиції через рецептор-опосередкований механізм утворюється фактор транскрипції *Msx2*, який посилює експресію генів, що кодують так звані Wnt-продукти (*Wnt3a* і *Wnt7a*). Зазначені білки після секреції надходять в мережу *vasa vasorum* і чинять паракринний ефект на клітини, розташовані в середній оболонці артерій (*Shao et al., 2006; Vattikuti and Towler, 2004*).

Сформований у наведений вище спосіб *Msx2*-Wnt остеогенний сигнал приймають клітини – остеопрогенітори медії. На сьогодні існують різні думки щодо походження цих клітин. За даними літератури, клітинами-остеопрогеніторами середньої оболонки стінки судин можуть бути: (а) мультипотентні мезенхімні клітини-прогенітори медії; (б) адвентиціальні мезенхімні *Sca1+* *CD34+* клітини-прогенітори; (в) перицити мікросудин системи *vasa vasorum*, що проросли в медію; (г) ГМК, здатні зазнавати остео/хондрогенного трансдиференціювання; (д) клітини-прогенітори кров'яного походження (*Tintut et al., 2003; Collett and Canfield, 2005; Hu et al., 2004*).

Вплив Wnt-продуктів на клітини-остеопрогенітори медії здійснюється через мембранні структури: пов'язаний з рецепторами до ЛПНГ білок (*LDLR-related protein – LRP*) і рецептори сімейства Frizzled (*frizzled heterodimers*) (*Shao et al., 2005; Rajamannan et al., 2005; Brivanlou and Darnell, 2002*). Після взаємодії Wnt-білків з цими структурами у цитоплазмі клітин активуються дві групи сигналів: (1) LRP5 та LRP6-сигнальні каскади і (2) так званий "канонічний", або  $\beta$ -катеніновий, шлях. У здійсненні останнього бере участь цитоплазматичний білок Dsh (*Disheveled*) (*Brivanlou and Darnell, 2002*). При взаємодії Wnt з Frizzled-рецепторами активується трансмембранний комплекс GCRP (*G-coupled cell surface receptor protein*), який через один з відомих вторинних месенджерів (цАМФ, фосфоінозитиди, діацилгліцерол,  $Ca^{2+}$ ) зумовлює активацію серинової протеїнкінази, яка у свою чергу фосфорує Dsh. Фосфорований Dsh інгібує GSK-3 (*glycogen synthesis kinase-3*). За відсутності Wnt і фосфорованого Dsh GSK-3 фосфорує в цитоплазмі білок  $\beta$ -катенін і

зв'язаний з ним протеїн, що кодується геном APC (*adenomatous polyposis coli*). Фосфорування цих білків спричиняється до їхнього протеолізу, що відбувається в протеосомах. За умов активації Dsh блокується зумовлене GSK-3 фосфорування і протеоліз  $\beta$ -катеніну, його рівень в цитоплазмі зростає і він надходить у ядро. Будучи фактором транскрипції,  $\beta$ -катенін через TCF/LEF-білки зв'язується з ДНК і активує експресію генів, що відповідають за диференціювання клітин-остеопрогеніторів в так звані кальцифікуючі судинні клітини – CVCs (*calcifying vascular cells*) (Shao et al., 2006). Маркерами останніх є протеїни 3G5,  $\alpha$ -актин гладких м'язів, Stro1 (Collett and Canfield, 2005).

Відкладення солей кальцію в середній оболонці артерій здійснюється за участю CVCs. Ці клітини генерують високу активність лужної фосфатази і утворюють велику кількість так званих мінералізуючих матриксних везикул (*mineralizing matrix vesicles* – MMVs) (Kim, 1976; Tanimura et al., 1983; Tanimura et al., 1986; Anderson, 2003; Reynolds et al., 2004; Hsu et al., 2004). MMVs, діаметр яких дорівнює приблизно 100 нм, утворюються в CVCs і активно виштовхуються цими клітинами в позаклітинне середовище, де розташовуються уздовж еластичних волокон і мембран. Усередині MMVs відбувається нуклеація, тобто утворюються перші кристали оксіапатиту. Далі кальцифікація продовжується за фізико-хімічними законами. За умов високої концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{PO}_4^{3-}$  відбувається ріст кристалів, формуються спочатку дрібні розпорошені кальцифікати, а потім, шляхом злиття менших, великі масивні ділянки обвапнення судин.

## 2. Порушення енергетичного обміну.

Порушення обміну речовин, зокрема енергетичного обміну, в стінках кровоносних судин є важливим патогенетичним механізмом розвитку артеріосклерозу Менкеберга (Быць с соавт., 1999).

В експериментальних дослідженнях було показано, що введення кролям високих доз вітаміну D<sub>2</sub> супроводжується значним пригніченням споживання кисню стрічками артеріальних і венозних судин кролів (Атаман А.В., 1986). На цьому тлі зменшується поглинання глюкози і продукування молочної кислоти препаратами судин, пригнічується ресинтез АТФ, що виявляє себе зменшенням у тканинах вмісту макроергічних сполук – АТФ і фосфокреатину. Через значне

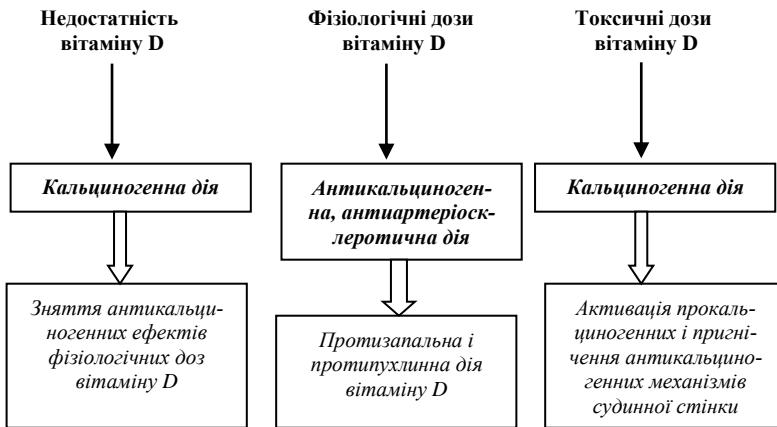
пригнічення АТФазної активності порушується утилізація і тих незначних кількостей АТФ, що ще утворюються (Атаман А.В., 1990). Докладно про всі ці порушення йтиметься в наступній главі.

Важко сказати, чим зумовлюється розвиток енергодефіцитного стану судинної стінки в D-гіпервітамінозних тварин: прямою інгібіторною дією токсичних доз вітаміну D чи опосередкованими впливами, серед яких оксидаційний стрес і перевантаження клітин кальцієм в умовах гіперкальціємії, що супроводжує гіпервітаміноз D (див. вище). Як би там не було, а всі три чинники – порушення енергетичного обміну, оксидаційний стрес і перевантаження клітин кальцієм – пов'язані між собою таким чином, що кожен з них здатен вмикати "зачаровані кола" (*circuli vitiosi*), важливими елементами яких виступає решта з наведених вище механізмів (Атаман О.В., 2010). І не має значення, який конкретно чинник, спричинився до цього – у кінцевому підсумку розвивається ушкодження клітин та їх загибель.

Слід зазначити, що в розвитку уражень судин в умовах D-вітамінної інтоксикації певне значення можуть мати й непрямі механізми ушкодження судинної стінки, зумовлені ураженням інших органів та тканин. Відомо, що гіпервітаміноз D супроводжується патологічними змінами в нирках, печінці, легенях, крові (Спиричев В.Б., 1971; Gillman and Gilbert, 1956; Hass et al., 1958; Scarpelli et al., 1960). Цілком природно, що наслідки цих змін – гіпоксія, інтоксикація та ін. – будуть робити свій внесок у розвиток ушкодження судинної стінки, посилюючи його. Безсумнівно, існування таких непрямих механізмів, яких важко враховувати і оцінювати, завжди слід мати на увазі, розглядаючи патогенез D-гіпервітамінозних уражень.

Завершуючи висвітлення механізмів токсичної дії вітаміну D на судинну стінку, не можна не зупинитися на останніх даних про вплив його фізіологічних доз і D-вітамінної недостатності на кровоносні судини. Річ у тім, що сьогодні є підстави вести мову про так званий двофазний (U-подібний) характер кальциногенної дії вітаміну D, яка визначається дозою цієї сполуки (Holick, 2002; Feldman et al., 2005; Haffner et al., 2005; Zittermann et al., 2007; Zittermann and Koerfer, 2008; Shroff et al., 2008; Mizobuchi et al., 2009) (рис. 4). Виявляється, кальцифікація судинної стінки розвивається не

тільки під впливом високих доз вітаміну – їй сприяє також D-вітамінна недостатність і порушення утворення  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  внаслідок пригнічення  $1\alpha$ -гідроксилази в нирках. Так, добре відомо, що інтенсивна мінералізація артерій у хворих з хронічною нирковою недостатністю відбувається на тлі значного зменшення концентрації кальцитріолу в крові. Введення останнього або його аналогів дає можливість значно загальмувати цей процес (*Zittermann et al.*, 2007).



**Рис. 4. Залежність впливу вітаміну D на судинну стінку від його дози**

Дані деяких популяційних досліджень дають підстави для висновку про обернено-пропорційний зв'язок між рівнем кальцитріолу в сироватці крові людей та кальцифікацією їхніх артерій (*Watson et al.*, 1997). У пацієнтів з ішемічною хворобою серця виявлено кореляцію між зменшенням забезпеченості організму вітаміном D, з одного боку, і розвитком кальцифікованого стенозу аортальних клапанів – з другого (*Linhartova et al.*, 2008). Призначення препаратів вітаміну D хворим на цукровий діабет II типу і пацієнтам з

недостатнім рівнем в організмі цього вітаміну значно покращувало функцію ендотелію кровоносних судин, що виявляли реакцією останніх на дію вазодилататорів (*Sugden et al.*, 2008). За даними Фремінгемського дослідження, особи з недостатністю вітаміну D (рівень 25(OH)D в сироватці крові < 37,5 нмоль/л) мають більший ризик розвитку серцево-судинних недуг, ніж ті, у кого вміст 25(OH)D перевищує 37,5 нмоль/л (*Wang et al.*, 2008). Додавання до раціону вітаміну D зменшує на 7% смертність у групах людей середнього і похилого віку (*Aurtier and Gandini*, 2007). Такий цілющий його ефект пов'язують зі зменшенням фатальних наслідків серцево-судинних хвороб.

Таким чином, наведені вище дані можуть свідчити про захисну, антикальциногенну дію фізіологічних доз вітаміну D. В її основі, як вважають, лежить низка механізмів, серед яких (1) зменшення вивільнення клітинами прозапальних цитокінів; (2) зниження кількості молекул адгезії на поверхні ендотелію судин; (3) пригнічення міграції і проліферації ГМК судинної стінки (*Zitterman et al.*, 2007). Зазначені ефекти, очевидно, є віддзеркаленням загальнобіологічних властивостей вітаміну D гальмувати запалення і пухлинний ріст (протизапальна і протипухлинна дія) (*Krishnan and Feldman*, 2011).

З огляду на важливу роль, яку відводять сьогодні запаленню в розвитку артеріосклерозу, слід виділити такі нещодавно виявлені механізми протизапальної дії вітаміну D: (1) інгібування синтезу простагландинів та їхньої дії на клітинні мішені; (2) пригнічення р38-стрескіназного сигнального шляху, який веде до посиленої продукції прозапальних цитокінів (зокрема IL-6, TNF $\alpha$ ); (3) інгібування сигнальних шляхів, що опосередковуються NF- $\kappa$ B і мають своїм наслідком посилення ангиогенезу (*Krishnan and Feldman*, 2011).

Крім зазначених протизапальних ефектів, кальцитріол виявляє і протипухлинну дію, з якою частково може бути пов'язаний гальмівний вплив фізіологічних доз вітаміну D на розвиток артеріосклерозу. Так, кальцитріол (а) пригнічує поділ малігнізованих клітин; (б) посилює механізми апоптозу; (в) стимулює диференціювання клітин; (г) модулює дію багатьох факторів росту, онкогенів, супресорів пухлин, транскрипційних факторів (*Krishnan and Feldman*, 2011).

Таким чином, наведені тут дані про механізми токсичної дії вітаміну D взагалі і на кровоносні судини зокрема свідчать про дуже складний характер цього процесу. Серед питань, що ще не знайшли свого розв'язання, можна віднести такі:

1. Які механізми токсичного впливу вітаміну D – загальні чи місцеві – відіграють вирішальну роль у розвитку кальцифікації кровоносних судин? Як пов'язані між собою ці механізми?

2. Яке значення для уражень судинної стінки мають специфічні ефекти, зумовлені  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , і неспецифічна ушкоджувальна дія високих доз власне вітаміну D та його метаболітів? Як співвідносяться ці ефекти у тканинах судин D-гіпервітамінозних тварин?

3. Що має вирішальне значення для розвитку кальцифікації судин в умовах гіпервітамінозу D: посилення прокальциногенних механізмів чи пригнічення природних систем, що запобігають розвитку кальцифікації м'яких тканин?

4. Чому венозні судини, на відміну від артеріальних, є дуже стійкими до D-гіпервітамінозних уражень? Якими природними чинниками зумовлюється така стійкість?

Пошук відповідей на зазначені вище питання і став метою наших власних досліджень, результатам яких присвячені наступні глави.



## ГЛАВА 2

### РОЛЬ ПОРУШЕНЬ ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ СУДИННОЇ СТІНКИ У РОЗВИТКУ ЇЇ УРАЖЕНЬ, ЗУМОВЛЕНИХ ГІПЕРВІТАМІНОЗОМ D

Серед патогенетичних механізмів розвитку дистрофічно-склеротичних уражень кровоносних судин, що виявляють себе ознаками артеріосклерозу Менкеберга, важливе місце посідають порушення енергозабезпечення судинної стінки.

Відповідно до енергодефіцитної теорії артеріосклерозу (Быць Ю.В., 1973; Быць с соавт., 1999; Атаман О.В., 2010) первинні розлади метаболізму судинної стінки і зокрема її енергопостачання ведуть до розвитку в ній дистрофічних змін, створюють умови до подальшої кальцифікації.

D-гіпервітамінозні ураження артерій за всіма своїми ознаками схожі на картину менкебергівської хвороби, а тому їх можна розглядати як експериментальну модель даного типу артеріосклерозу. З огляду на це постає питання про значення розладів енергетичного обміну в патогенезі цих уражень. Який механізм кальцифікації артерій – метастатичний чи дистрофічний – є провідним у її розвитку? Чи впливають безпосередньо високі дози вітаміну D на процеси енергетичного обміну, що відбуваються в клітинах кровоносних судин? Якщо впливають, то який характер вони носять – первинний чи вторинний?

Аби відповісти на ці питання, нами проведено власні дослідження, оскільки літературних даних про метаболізм судинної стінки в умовах гіпервітамінозу D вкрай мало. Ті, що є, представлено лише результатами вивчення активності деяких ферментів в аортальній стінці щурів. Так, встановлено, що введення тваринам великих доз вітаміну D супроводжується пригніченням активності окисно-відновних ферментів (лактат-, малат- і сукцинатдегідрогенази), аденілпірофосфатази і неспецифічних естераз. Водночас відзначали підвищення активності 5-нуклеотидази, кислої і лужної фосфатази (Lojda, 1962; Zemlenyi, 1968, 1974; Mrhova et al., 1972). Churi (1971) повідомив про зменшення вмісту "аеробних" фракцій лактатдегідрогенази (ЛДГ<sub>1</sub> і ЛДГ<sub>2</sub>) і збіль-

шення концентрації "анаеробних" ізоферментів (ЛДГ<sub>4</sub> і ЛДГ<sub>5</sub>) в аортальній стінці щурів з гіпервітамінозом D.

Недостатня вивченість енергетичного обміну судинної стінки в умовах D-вітамінної інтоксикації і стала підставою для власних експериментів.

В одній із серій дослідів було досліджено інтенсивність тканинного дихання артерій і вен кролів залежно від кількості вітаміну D, що його вводили тваринам. Усіх тварин було поділено на чотири групи. Перша – інтактні кролі (контроль). Кролям решти трьох груп щоденно з інтервалами в 24 години вводили через зонд у шлунок олійний розчин ергокальциферолу (вітаміну D<sub>2</sub>) в таких дозах: 1000 МО/кг протягом 7 днів (друга група), 10000 МО/кг упродовж 7 днів (третья група), 100000 МО/кг протягом 3-4 днів (четверта група). Використані в досліді дози ергокальциферолу перевищували добову потребу кролів у вітаміні D відповідно в 100, 1000 і 10000 разів.

Зміни інтенсивності споживання кисню артеріальною і венозною стінками (субстрат – глюкоза, 10 ммоль/л) в умовах інтоксикації вітаміном D представлено в табл. 1.

При введенні тваринам вітаміну D<sub>2</sub> в кількості 1000 МО/кг протягом 7 днів інтенсивність тканинного дихання (Q<sub>O2</sub>) грудної аорти не змінювалася, тимчасом як в черевній аорті відзначали тенденцію до підвищення Q<sub>O2</sub> (0,1 > p > 0,05), а окисна активність загальної сонної і легеневої артерій статистично достовірно зростала відповідно на 26% і 42%. Рівень тканинного дихання венозних судин у тварин цієї групи не змінювався, якщо порівнювати з контролем.

Введення тваринам вітаміну D<sub>2</sub> в дозі 10000 МО/кг упродовж 7 днів супроводжувалося зменшенням інтенсивності тканинного дихання грудної і черевної аорти на 34% (p < 0,01), загальної сонної артерії – на 46% (p < 0,01), легеневої артерії – на 26% (0,1 > p > 0,05). На протилежність артеріальним судинам у стінках вен реєстрували збільшення інтенсивності окисних процесів: у ворітній вені – на 18%, а в задній порожнистій – на 23%. Однак, через великий розкид індивідуальних показників відмінності між Q<sub>O2</sub> вен контрольних і дослідних тварин виявилися статистично недостовірними (p > 0,05).

Застосування вітаміну D<sub>2</sub> в дозі 100000 МО/кг протягом 3-4 днів спричинилося до вираженого зменшення інтенсив-

Таблиця 1

**Споживання кисню артеріальною і венозною стінкою кролів за умов введення тваринам вітаміну D<sub>2</sub> (мкл O<sub>2</sub> · мг сухої тканини<sup>-1</sup> · год<sup>-1</sup>, M±m)**

Кровоносні судини	Контроль n = 11	Вітамін D <sub>2</sub>		
		1000 МО/кг протягом 7 днів n = 6	10000 МО/кг протягом 7 днів n = 6	100000 МО/кг протягом 3-4 днів n = 6
Грудна аорта	1,12±0,08	0,91±0,1	0,74±0,08**	0,54±0,06**
Черевна аорта	1,8±0,13	2,1±0,08*	1,2±0,08**	0,48±0,06**
Загальна сонна артерія	3,34±0,28	4,2±0,21**	1,83±0,2**	0,69±0,1**
Легенева артерія	2,8±0,28	3,98±0,12**	2,09±0,24*	0,78±0,19**
Задня порожниста вена	5,48±0,57	5,6±0,38	6,78±0,6	1,36±0,41**
Ворітна вена	6,23±0,57	6,11±0,29	7,37±0,53	1,02±0,3**

Примітка: n – кількість тварин. \* – 0,1 > p > 0,05; \*\* – p < 0,05. Субстрат – глюкоза (10 ммоль/л).

ності тканинного дихання у всіх вивчених судинах: грудній аорті – на 52%, черевній аорті – на 73%, загальній сонній артерії – на 79%, легеневій артерії – на 72%, ворітній і задній порожнистій венах – на 84% і 75% відповідно.

Наведені тут дані свідчать про те, що характер змін тканинного дихання судинної стінки у відповідь на дію вітаміну D залежить від вихідного рівня окисної активності судинної тканини, з одного боку, і від дози препарату – з другого. Так, у судинах, що мають від початку низьку окисну здатність (грудна і черевна аорта), активація тканинного дихання не відбувається на відміну від судин з більш високими рівнями споживання кисню. У загальній сонній і легеневій артеріях, вихідний  $Q_{O_2}$  яких вищий, ніж в аорті, реєструється підвищення інтенсивності тканинного дихання при використанні вітаміну D<sub>2</sub> у дозі 1000 МО/кг і пригнічення цього процесу при введенні тваринам препарату в дозах 10000 і 100000 МО/кг. І нарешті, у стінках вен доза вітаміну D<sub>2</sub> 1000 МО/кг не викликає будь-яких змін  $Q_{O_2}$ . При збільшенні дози препарату до 10000 МО/кг у венах спостерігається тенденція до збільшення цього показника, тимчасом як у всіх артеріях виявляють його зменшення. І тільки максимальні дози ергокальциферолу (100000 МО/кг) спричиняються до пригнічення тканинного дихання венозної стінки.

Таким чином, введення кролям вітаміну D<sub>2</sub> у максимальній ушкоджувальній дозі (100000 МО/кг протягом 3-4 днів) супроводжується істотним зменшенням споживання кисню стінками всіх вивчених судин незалежно від їх вихідної окисної активності.

Подібні ж зміни показника  $Q_{O_2}$  (пригнічення) спостерігали і в стінці грудної аорти щурів при введенні їм ергокальциферолу в дозі 100000 МО/кг протягом 8 днів. Споживання кисню аортальною стінкою D-гіпервітамінозних тварин становило  $1,96 \pm 0,25$  проти  $3,2 \pm 0,27$  мкл  $O_2$ ·мг сухої тканини<sup>-1</sup>·год<sup>-1</sup> ( $p < 0,001$ ) у контрольних щурів.

Більш повну характеристику порушень енергетичного обміну кровоносних судин в умовах D-вітамінної інтоксикації наведено в табл. 2. Одержані нами результати свідчать про те, що введення тваринам ергокальциферолу (100000 МО/кг на добу) протягом 3-4 днів супроводжується глибокими розладами енергозабезпечення всіх вивчених судин.

Таблиця 2

**Показники інтенсивності енергетичного обміну в стінках кровоносних судин кролів за умов гіпервітамінозу D (100000 МО/кг протягом 3-4 днів) ( $M \pm m$ )**

	<i>n</i>	<i>Поглинання глюкози</i>	<i>Продукування лактату</i>	<i>Споживання кисню</i>	<i>Інтенсивність ресинтезу АТФ</i>
Грудна аорта					
Контроль	6	9,6±0,14	8,5±0,27	9,67±1,11	56,3±5,65
Вітамін D	5	4,48±0,4*	5,9±0,73*	2,92±0,35*	20,4±1,88*
Черевна аорта					
Контроль	6	7,0±0,25	5,1±0,25	14,0±1,38	74,2±7,02
Вітамін D	5	2,9±0,31*	3,15±0,43*	3,64±0,31*	21,8±1,89*
Загальна сонна артерія					
Контроль	6	6,1±0,14	6,2±0,23	21,2±2,16	125,4±10,9
Вітамін D	5	3,26±0,56*	4,73±0,4*	7,26±0,46*	40,6±2,49*
Легенева артерія					
Контроль	6	9,3±0,3	10,1±0,3	23,3±2,11	125,0±10,7
Вітамін D	5	4,68±0,35*	6,95±0,53*	6,21±0,47*	37,6±2,43*
Задня порожниста вена					
Контроль	6	10,6±0,32	3,0±0,33	53,0±3,16	264,2±15,8
Вітамін D	5	4,1±0,42*	2,58±0,31	16,4±1,68*	83,5±8,37*
Ворітна вена					
Контроль	6	8,3±0,17	4,74±0,24	43,5±3,47	219,2±17,3
Вітамін D	5	4,2±0,3*	3,3±0,36*	13,0±1,1*	67,4±5,41*

Примітка: n – кількість тварин. \* –  $p < 0,05$ . Усі показники в мкл  $O_2 \cdot$  мг сухої тканини<sup>-1</sup> · год<sup>-1</sup>

Так, поглинання глюкози судинами кролів з гіпервітамінозом D склало по відношенню до контролю: грудна аорта – 47%, черевна аорта – 41%, загальна сонна артерія – 53%, легенева артерія – 50%, задня порожниста вена – 39%, ворітна вена – 51%. Утворення молочної кислоти в аеробних умовах інкубації зменшувалося в грудній аорті на 31%, черевній аорті – на 38%, загальній сонній артерії – на 24%, легеневій артерії – на 31%, ворітній вені – на 30%. В одній лише задній порожнистій вені зменшення продукування лактату виявилось статистично недостовірним. Як і в наведених вище дослідженнях показано різке зменшення інтенсивності споживання кисню стінками артерій і вен D-гіпервітамінозних тварин.

Через пригнічення гліколізу і окисних процесів спостерігається істотне зменшення інтенсивності утворення АТФ у стінках всіх вивчених судин дослідних тварин. Так, показник  $J_{\text{АТФ}}$  склав (при порівнянні з контролем) у грудній аорті 36%, черевній аорті – 29%, загальній сонній артерії – 32%, легеневій артерії – 30%, задній порожнистій вені – 32%, ворітній вені – 31%.

В умовах D-вітамінної інтоксикації збільшується питома вага гліколізу і відповідно зменшується внесок повного окиснення в утилізацію глюкози смужками як артеріальних, так і венозних судин кролів.

Визначення вмісту вільних аденінових нуклеотидів і креатинфосфату в стінках кровоносних судин кролів показало, що в умовах гіпервітамінозу D зменшується концентрація основних макроергічних сполук в тканинах вивчених артерій і вен (табл. 3). Так, вміст креатинфосфату склав (при порівнянні з контролем) у грудній аорті 16%, черевній аорті – 20%, загальній сонній артерії – 30%, легеневій артерії – 21%, задній порожнистій вені – 36%, ворітній вені – 10%. Абсолютний вміст АТФ зменшився в грудній аорті на 69%, черевній аорті – на 70%, загальній сонній артерії – на 51%, легеневій артерії – на 54%, ворітній вені – на 48%. Зменшення абсолютної концентрації АТФ у задній порожнистій вені (на 28%) виявилось статистично недостовірним ( $p > 0,05$ ).

У всіх вивчених артеріях падіння абсолютної концентрації АТФ відбувається на тлі зменшення сумарного вмісту вільних аденінових нуклеотидів. Про розвиток дефіциту енер-

Таблиця 3

**Вміст вільних аденинових нуклеотидів і креатинфосфату в стінках кровоносних судин кролів за умов гіпервітамінозу D (100000 МО/кг протягом 3-4 днів) ( $M \pm m$ )**

	<i>АМФ</i>	<i>АДФ</i>	<i>АТФ</i>	<i>Креатинфосфат</i>
Грудна аорта				
Контроль	0,25±0,028 (10)	0,35±0,036	0,35±0,035	0,49±0,061 (10)
Вітамін D	0,2±0,015 (10)	0,39±0,026	0,11±0,018*	0,078±0,016* (10)
Черевна аорта				
Контроль	0,35±0,042	0,45±0,053	0,4±0,039	0,64±0,057
Вітамін D	0,35±0,029	0,43±0,052	0,12±0,014*	0,13±0,024*
Загальна сонна артерія				
Контроль	0,2±0,035	0,4±0,028	0,7±0,036	0,81±0,065
Вітамін D	0,2±0,032	0,5±0,036	0,34±0,026*	0,27±0,03*
Легенева артерія				
Контроль	0,4±0,041	0,7±0,043	0,7±0,047	0,92±0,115
Вітамін D	0,47±0,03	0,64±0,03	0,32±0,024*	0,19±0,025*
Задня порожниста вена				
Контроль	0,3±0,057	0,5±0,038	0,5±0,023	0,74±0,04
Вітамін D	0,36±0,027	0,48±0,02	0,36±0,03	0,27±0,052*
Ворітна вена				
Контроль	0,4±0,035	0,6±0,039	1,2±0,131	1,12±0,072
Вітамін D	0,48±0,026	0,7±0,037	0,62±0,035*	0,11±0,023*

Примітка: У дужках – кількість тварин. \* –  $p < 0,05$ . Усі показники в мкмоль · г<sup>-1</sup>.

гії у цьому випадку свідчить зменшення питомої ваги АТФ у системі аденіннуклеотидів, що ми його спостерігаємо за умов гіпервітамінозу D.

Загальна концентрація вільних аденінових нуклеотидів у венозних судинах або не змінюється (задня порожниста вена), або зменшується в незначній мірі (ворітна вена). На цьому тлі, як ознака порушень енергозабезпечення, привертає до себе увагу зменшення процентного вмісту АТФ у системі аденіннуклеотидів, яке ми виявляємо у стінці як ворітної, так і задньої порожнистої вени.

При вивченні екто-АТФазної активності артеріальних і венозних смужок було продемонстровано зменшення здатності судин гідролізувати екзогенний АТФ (табл. 4). Так, при здійсненні розрахунку на одиницю маси тканини екто-АТФазна активність склала в грудній аорті 20%, черевній аорті – 26%, загальній сонній артерії – 37%, легеневої артерії – 25%, задній порожнистій вені – 62%, ворітній вені – 54% від контрольних величин. Різко виражене зменшення екто-АТФазної активності всіх вивчених судин виявляється і тоді, коли показник розраховували на одиницю площі поверхні судинних смужок.

Таким чином, наведений фактичний матеріал дозволяє зробити висновок про глибокі порушення енергетичного обміну в стінках кровоносних судин за умов гіпервітамінозу D. Такий висновок підтверджується і низкою цитованих раніше робіт (*Lojda, 1962; Zemplenyi, 1968, 1974; Mrhova et al., 1972*), у яких показано, що D-вітамінна інтоксикація виявляє себе зменшенням активності деяких ферментів, які мають стосунок до обміну енергії в стінках артеріальних судин. У зв'язку з тим, що розлади енергозабезпечення біологічних структур завжди є чинником, що сприяє їх ушкодженню, виявлені нами порушення метаболізму артеріальної стінки можна трактувати як один з механізмів патогенезу D-гіпервітамінозних уражень судин. Питання про значення цього механізму – яким він є: первинним, що ініціює ушкодження, чи вторинним, що його поглиблює, – потребує дальшого вивчення.

Тут, однак, слід зазначити, що порушення енергетичного обміну виникають як у судинах, чутливих до D-гіпервітамінозних уражень (артерії), так і у відносно стійких – венах. Проте, привертає до себе увагу той факт, що в сті-



Таблиця 4

**Екто-АТФазна активність смужок артерій і вен кролів за умов гіпервітамінозу D**  
(100000 МО/кг протягом 3-4 днів) ( $M \pm m$ )

<i>Кровоносні судини</i>	<i>мкмоль <math>P_i \cdot (g \cdot год)^{-1}</math></i>		<i>мкмоль <math>P_i \cdot (cm^2 \cdot год)^{-1}</math></i>	
	<i>Контроль (6)</i>	<i>Вітамін D (6)</i>	<i>Контроль (6)</i>	<i>Вітамін D (6)</i>
Грудна аорта	96,2±10,76	19,0±3,51*	3,09±0,87	0,63±0,11*
Черевна аорта	87,9±9,01	23,1±4,1*	2,51±0,27	0,87±0,15*
Загальна сонна артерія	109,7±12,1	37,3±4,57*	3,7±0,35	1,12±0,14*
Легенева артерія	100,2±15,1	25,0±4,43*	3,32±0,6	0,86±0,14*
Задня порожниста вена	240,1±25,7	148,7±12,7*	4,44±0,47	2,37±0,24*
Ворітна вена	130,4±13,4	70,0±9,6*	2,31±0,23	1,13±0,11*

Примітка: У дужках – кількість тварин. \* –  $p < 0,05$ .

нках вен, на відміну від артерій, такі порушення виявляються лише в умовах застосування максимальних ушкоджувальних доз (100000 МО/кг) і вираженість їх (особливо у задній порожнистій вені) менша, ніж в артеріальних судинах. Зазначені відмінності обов'язково слід враховувати, аналізуючи фактори, що визначають різну резистентність артерій і вен до D-гіпервітамінозних уражень.

Про те, що венозні судини, на відміну від артерій, є вкрай стійкими до розвитку кальцинозу, відомо ще з перших публікацій, присвячених проблемі гіпервітамінозу D (*Gillman and Gilbert, 1956; Hass et al., 1958*). Однак, механізми такої стійкості були незрозумілими. Зокрема, не було відповіді на питання, який характер – пасивний чи активний – має висока резистентність вен до D-гіпервітамінозного ушкодження.

У проведених нами наступних дослідженнях це питання стало центральним і ми намагалися його розв'язати з урахуванням виявлених особливостей енергетичного обміну у венозній і артеріальній стінках.

Передовсім ми мали переконатися в тому, що введення високих доз вітаміну D дійсно зумовлює розвиток дистрофічних змін в артеріальній стінці і в тому числі її кальцифікацію. Водночас вени, як це впливало з літературних джерел, мали залишатися неушкодженими.

З цією метою було проведено гістологічне вивчення артеріальних (грудна і черевна аорта, загальна сонна і легенева артерії) і венозних (задня порожниста і ворітна вени) судин кролів за умов введення кролям вітаміну D<sub>2</sub> (100000 МО/кг на добу) протягом 5-6 днів.

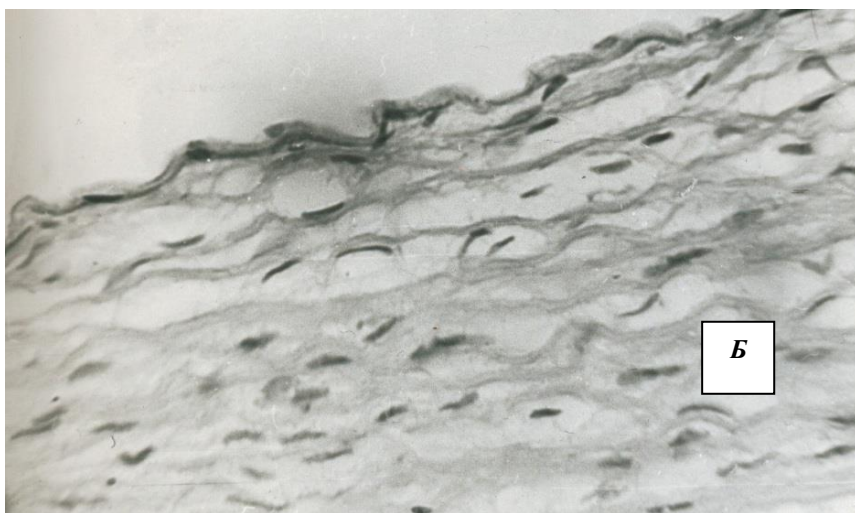
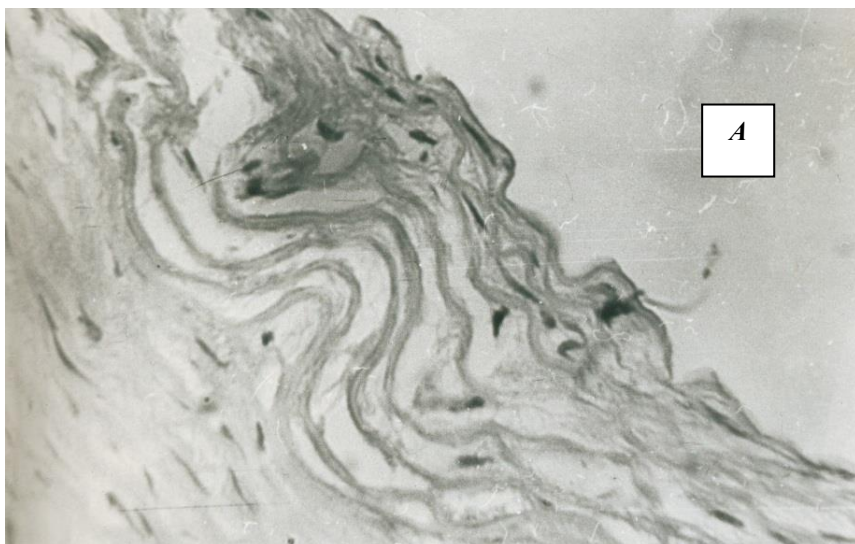
Дані про найхарактерніші морфологічні зміни судинної стінки і про частоту їх виникнення в експериментальних тварин наведено в табл. 5. Як впливає з одержаних результатів, гостра D-вітамінна інтоксикація супроводжується розвитком різко виражених ознак ушкодження стінок артеріальних судин. Найбільш відтворюваними виявилися набряк інтимі і медії (рис. 5), дегенеративні зміни ГМК та їх некроз (рис. 6), дистрофічні зміни еластичних структур медії (рис. 7), явище кальцинозу середньої оболонки (рис. 8 і 9). Частота виникнення зазначених змін у грудній і черевній аорті була вищою, ніж у легеневій і загальній сонній артеріях. Крім того, дистрофічні зміни, що розвиваються в аорта-

Таблиця 5

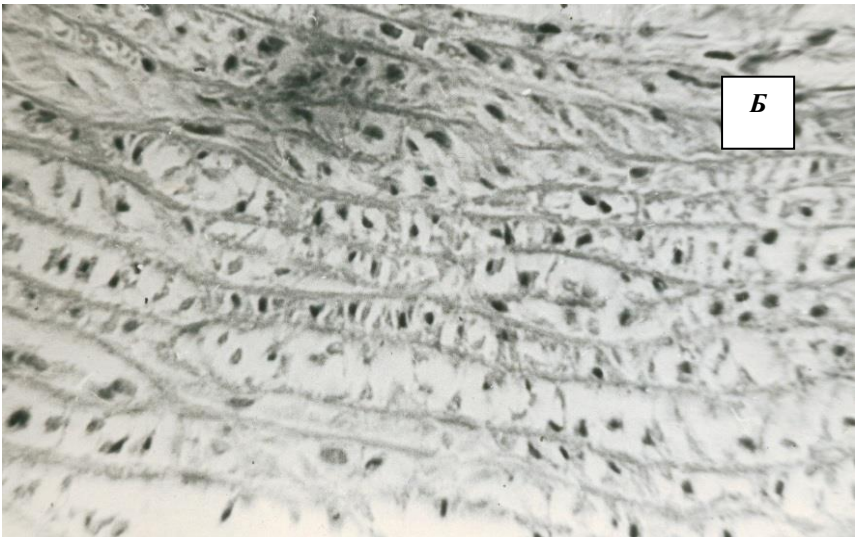
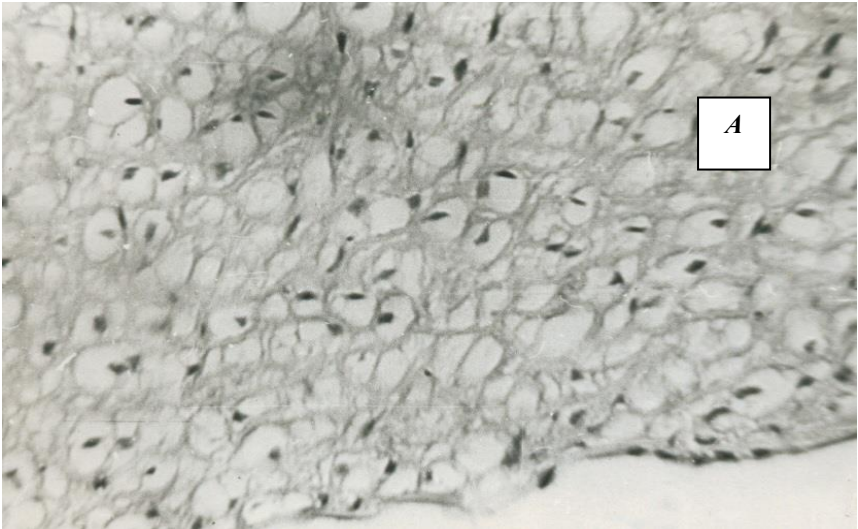
**Частота розвитку гістологічних змін у стінках кровоносних судин кролів за умов D-вітамінної інтоксикації (100000 МО/кг протягом 5-6 днів)**

<i>Характер гістологічних змін</i>	<i>Грудна аорта</i>	<i>Черевна аорта</i>	<i>Загальна сонна артерія</i>	<i>Легенева артерія</i>	<i>Задня порожниста вена</i>	<i>Ворітна вена</i>
Кальцифікація медії	10/10	9/10	6/10	4/10	0/10	1/10
Набряк інтими і медії	8/10	8/10	6/10	5/10	0/10	0/10
Дегенеративні зміни гладких м'язових клітин та їх некроз	8/10	8/10	4/10	3/10	0/10	0/10
Дистрофічні зміни еластичних структур медії	10/10	8/10	3/10	4/10	0/10	0/10

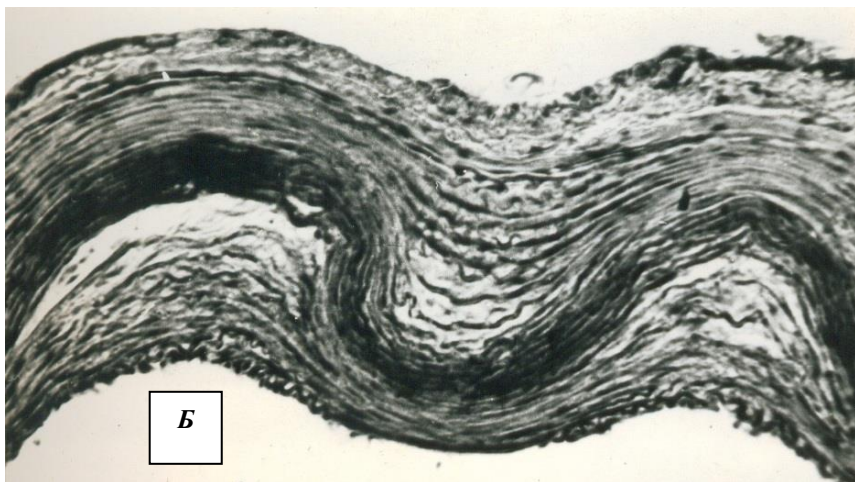
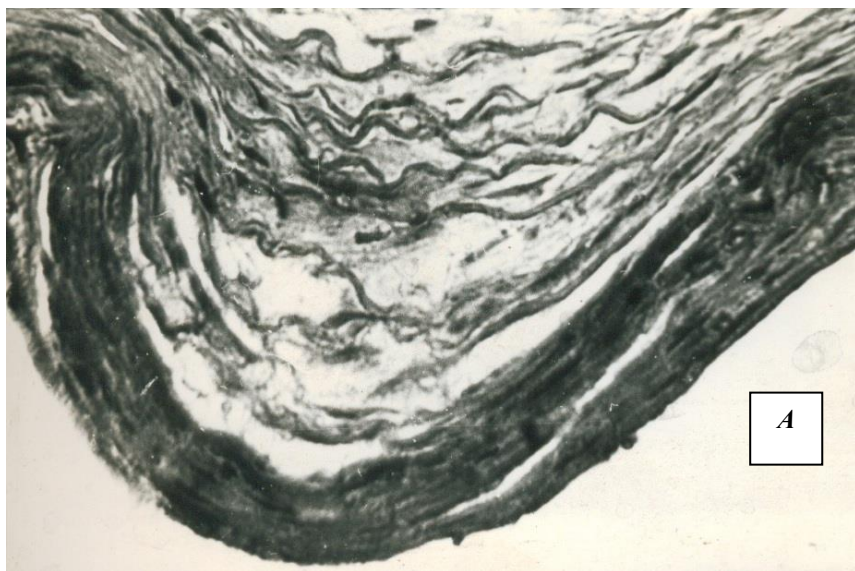
Примітка: Цифра в чисельнику позначає кількість тварин зі змінами в судинній стінці; цифра у знаменнику – загальну кількість тварин.



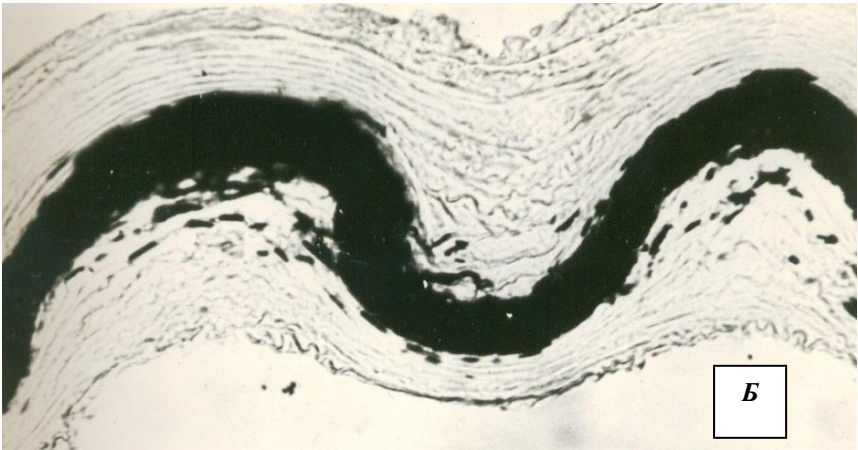
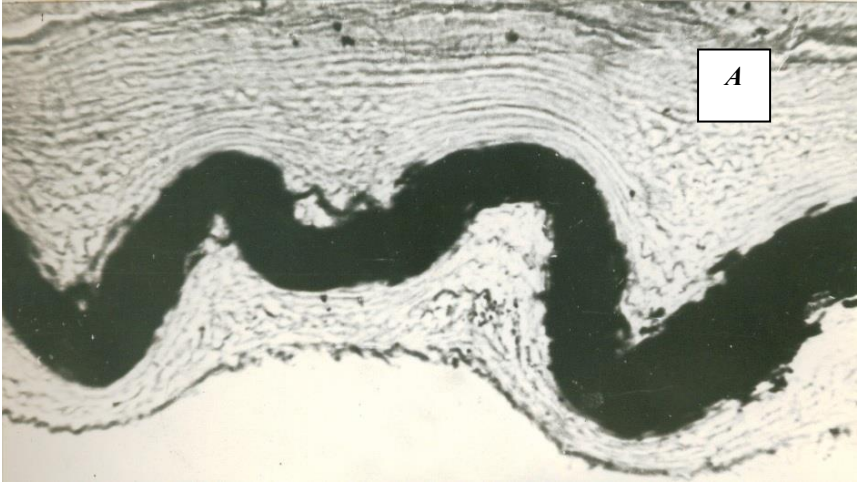
**Рис. 5.** Грудна (А) і черевна (Б) аорта кроля на 5-й день від початку введення вітаміну D<sub>2</sub> (100000 МО/кг). Виражений набряк основної проміжної речовини і гідропічна дегенерація гладких м'язових клітин у внутрішній 1/3 медії. Фарбування гематоксилін-еозином. Об. 20, ок. 12,5.



*Рис. 6. Грудна (А) і черевна (Б) аорта кроля на 5-й день від початку введення вітаміну D<sub>2</sub> (100000 МО/кг). Явище гідронічної дегенерація гладких м'язових клітин та їх некроз у середній оболонці. Фарбування гематоксилін-еозином. Об. 20, ок. 12,5.*



*Рис. 7. Грудна (А) і черевна (Б) аорта кроля на 5-й день від початку введення вітаміну D<sub>2</sub> (100000 МО/кг). У ділянках відкладання вапна у внутрішній і середній третинах медії випрямлення ходу, набухання, розволокнення, розпад еластичних мембран. Фарбування гематоксилін-еозином. А - об. 20, ок. 12,5; Б - об. 9, ок. 12,5.*



**Рис. 8.** Грудна (А) і черевна (Б) аорта кроля на 6-й день від початку введення вітаміну D<sub>2</sub> (100000 МО/кг). Різко виражений кальциноз середньої третини медії. Фарбування методом Косса. Об. 9, ок. 12,5.

льній стінці, були більш вираженими, якщо їх порівнювати з такими в стінках решти двох артерій (табл. 6). Привертала до себе увагу переважна локалізація уражень у середній третині медії аортальних судин й у внутрішній третині медії легеневої та загальної сонної артерій.

Незважаючи на глибокі дистрофічні зміни в артеріях, венозні судини кролів виявляли практично абсолютну резистентність до дії вітаміну D<sub>2</sub>. У кожному разі лише в однієї тварини з десяти вдалося виявити відкладання вапна у вигляді окремих дрібних зерен у стінці ворітної вени.

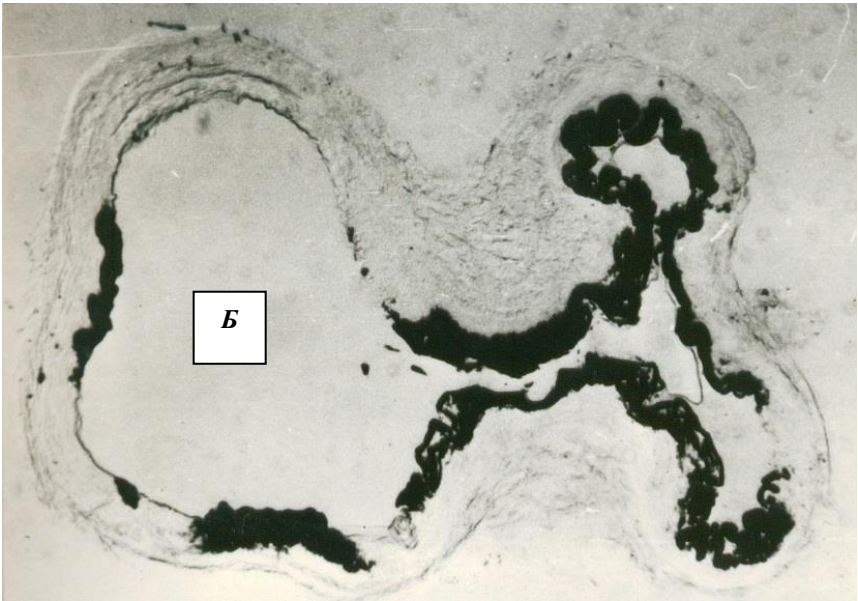
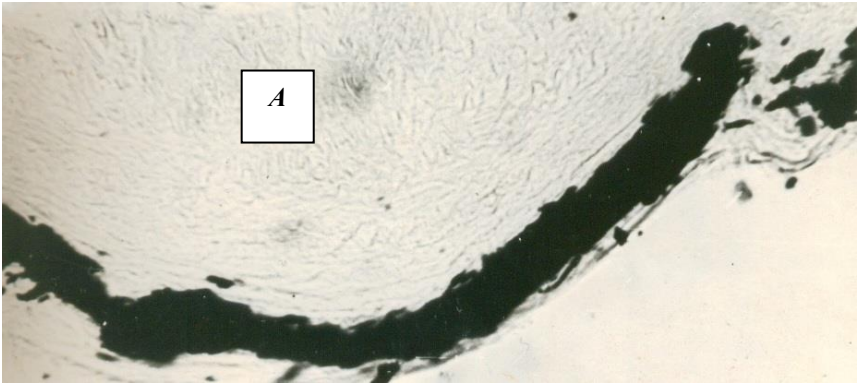
Таким чином, наведені тут власні дані морфологічних досліджень підтверджують відому з літератури тезу про те, що венозні судини, на відміну від артерій, мають дуже високу, якщо не абсолютну, стійкість до дії токсичних доз вітаміну D.

Ще однією ознакою ушкодження судин у умовах гострої D-вітамінної інтоксикації є збільшення об'єму інулінового простору (ОІП) судинної стінки. Про це свідчать дані, представлені в табл. 7. Легко бачити, що під впливом високих доз ергокальциферолу зростання ОІП відбувалося у всіх вивчених артеріях. Так, збільшення цього показника склало в грудній аорті 26,8%, черевній аорті – 24,3%, загальній сонній артерії – 29,7%, легеневій артерії – 28,7%. Водночас у стінках вен зміни ОІП виявилися статистично недостовірними.

Крім ОІП, у вивчених артеріальних судинах зростав і процентний вміст води, що було ще одним доказом розвитку набряку судинної стінки у D-гіпервітамінозних тварин (табл. 8). Натомість у венозних судинах дослідних кролів вміст води істотно не змінювався.

Таким чином, дані літератури і результати власних досліджень переконливо свідчать про високу стійкість венозних судин до D-гіпервітамінозних уражень, легко відтворюваних в артеріальній стінці. Нез'ясованим, однак, залишалося одне дуже важливе питання – про характер стійкості вен до цього типу уражень. Чим зумовлено відсутність D-вітамінного ушкодження у венозній стінці – нездатністю чи неможливістю вітаміну D взаємодіяти зі структурами венозної тканини (пасивна резистентність) чи активними гомеостатичними захисними компенсаторними реакціями самих





**Рис. 9.** *Лененева (А) і загальна сонна (Б) артерії кроля на 6-й день від початку введення вітаміну D<sub>2</sub> (100000 МО/кг). Різко виражений кальциноз внутрішньої третини медії. Фарбування методом Косса. А – об. 9, ок. 12,5; Б – об. 3,5, ок. 12,5.*

**Вираженість кальцинозу в стінках кровоносних судин кролів за умов щоденного введення тваринам вітаміну D<sub>2</sub> (100000 МО/кг) протягом 5-6 днів**

<i>Кровоносні судини</i>	-	+	++	+++	++++
Грудна аорта	0/10	0/10	2/10	2/10	6/10
Черевна аорта	0/10	1/10	2/10	2/10	5/10
Загальна сонна артерія	4/10	2/10	1/10	1/10	2/10
Легенева артерія	6/10	0/10	1/10	1/10	2/10
Задня порожниста вена	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Ворітна вена	9/10	1/10	0/10	0/10	0/10

Примітка: "-" – кальцинозу нема; "+" – поодинокі відкладання вапна у вигляді дрібних преципітатів; "++" – дрібні осередки кальцинозу; "+++ – великі осередки кальцинозу у вигляді безструктурних ізольованих конгломератів; "++++" – суцільний кальциноз медії. Інші пояснення – див. табл. 5.

вен, спрямованими проти ушкоджувальних ефектів вітаміну D (активна резистентність)?

Таблиця 7

**Об'єм інулінового простору в стінках кровоносних судин кролів за умов щоденного введення тваринам вітаміну D<sub>2</sub> (100000 МО/кг) протягом 4 днів (мл · 100 г вологої тканини<sup>-1</sup>, M±m)**

<i>Кровоносна судина</i>	<i>Контроль (5)</i>	<i>Вітамін D (5)</i>
Грудна аорта	49,2±4,6	62,4±3,4**
Черевна аорта	48,5±4,2	60,3±2,2**
Загальна сонна артерія	40,7±5,2	52,8±2,85*
Легенева артерія	45,6±4,3	58,7±2,55**
Задня порожниста вена	39,8±3,65	45,7±2,3
Ворітна вена	43,7±3,8	49,2±2,8

Примітка: У дужках – кількість тварин; \* – 0,1>p>0,05; \*\* – p < 0,05.

Аби спростувати або підтвердити пасивний характер стійкості вен до зазначеного виду ушкодження треба було відповісти на питання, чи реалізують себе у венозній стінці, а якщо так, то в якій мірі, механізми ушкоджувальної дії ергокальциферолу. Оскільки одним з провідних механізмів ушкодження клітин за умов D-вітамінної інтоксикації є активація пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), то для відповіді на поставлене питання треба було вивчити інтенсивність ПОЛ у венозній стінці в динаміці розвитку гіпервітамінозу D, при цьому порівнявши її з показниками ПОЛ артерій – судин, чутливих до D-вітамінних уражень.

Було проведено експерименти, у яких визначали вміст проміжних (гідропероксиди ліпідів) та кінцевих (основи Шиффа) продуктів ПОЛ у стінці задньої порожнистої вени і грудної аорти кролів через 2, 24 і 72 год після одноразового

введення тваринам високої дози ергокальциферолу (100 000 МО/кг).

Таблиця 8

**Вміст води (у %) у стінках кровоносних судин кролів за умов щоденного введення тваринам вітаміну D<sub>2</sub> (100000 МО/кг) протягом 4 днів (M±m)**

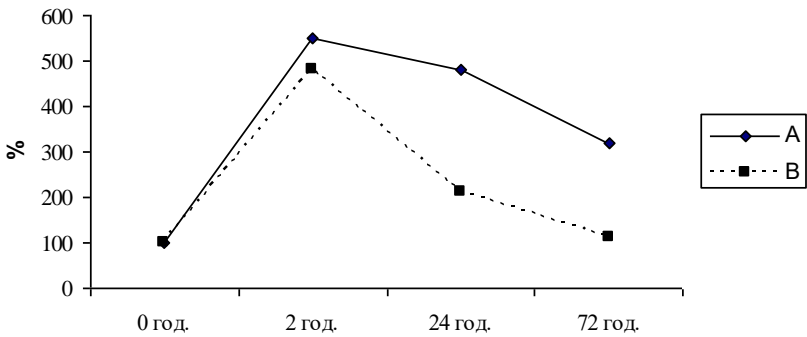
<i>Кровоносна судина</i>	<i>Контроль (6)</i>	<i>Вітамін D (6)</i>
Грудна аорта	75,7±1,02	79,3±0,75*
Черевна аорта	76,4±0,9	79,0±0,68*
Загальна сонна артерія	76,9±0,57	78,0±0,47
Легенева артерія	76,1±0,56	78,3±0,62*
Задня порожниста вена	77,3±0,72	77,8±0,47
Ворітна вена	77,1±0,59	78,2±0,52

Примітка: У дужках – кількість тварин; \* –  $p < 0,05$ .

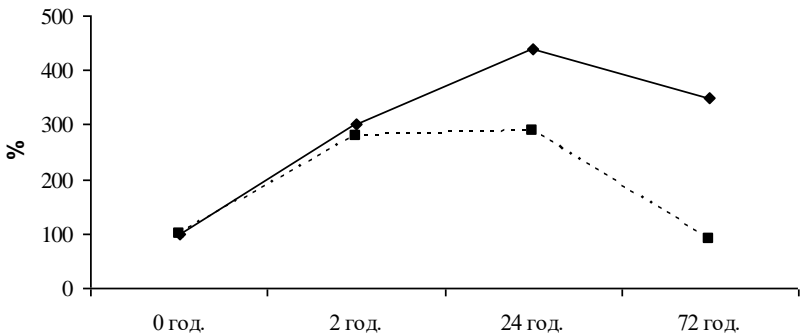
Порівняльну динаміку змін показників ПОЛ у венозній та артеріальній стінці за цих умов представлено на рис. 10. Здобуті результати свідчать про те, що вже через 2 год після введення тваринам ергокальциферолу має місце виражена активація ПОЛ як в артеріальній, так і у венозній тканині. Такий висновок ґрунтується на істотному збільшенні вмісту гідропероксидів ліпідів та шиффових основ у стінці вивчених судин. Так, у стінці грудної аорти концентрація ліпопероксидів через 2 год після введення препарату збільшувалася в 5,5 раза, а в тканині задньої порожнистої вени – у 4,8 раза. Флюоресценція шиффових основ в аортальній стінці зростала в 3,1 раза, а у венозній тканині – у 2,8 раза, як порівняти з контролем.

Різно збільшений і майже однаковий за величиною рівень накопичення проміжних та кінцевих продуктів ПОЛ у стінці вивчених судин уже в перші години після введення ергокальциферолу можна вважати за доказ ініціювання "пе-

### Гідропероксиди ліпідів



### Основи Шиффа



**Рис. 10.** Динаміка накопичення продуктів ПОЛ в аортальній (A) і венозній (B) стінці кролів після одноразового введення тваринам вітаміну D<sub>2</sub> (100000 МО/кг).

роксидних" механізмів ушкодження як в артеріальній, так і у венозній тканині. Це означає, що венозна стінка майже так само "чутлива" до D-вітамінного "удару", як і аортальна.

Отже, вітамін D і поєднані з ним чинники ушкодження взаємодіють не тільки із чутливими до D-гіпервітамінозних

уражень артеріями, а й з резистентними судинами – венами. Це може означати, що стійкість вен до обговорюваного типу уражень не є пасивна.

Підтвердженням цього положення можна вважати і результати проведених нами електронномікроскопічних досліджень. Було показано, що вже через 2 год після одноразового введення кролям ергокальциферолу (100 000 МО/кг) виявляються патологічні зміни як в артеріальній, так і венозній стінці. Основна суть таких змін полягає в підвищенні проникності ендотеліального шару, деструкції основної проміжної речовини, ушкодженні структур глікокаліксу гладких міоцитів, підвищенні лізосомної й піноцитозної активності клітин, ушкодженні мітохондрій.

Той факт, що виявлені ранні зміни в артеріях і венах схожі за своїм змістом і вираженістю, може свідчити про здатність вітаміну D взаємодіяти як зі структурами артерій, так і вен, ініціюючи при цьому процес їхнього ушкодження. Це, у свою чергу, дає підстави думати, що основу високої, у кінцевому підсумку, резистентності венозних судин до D-вітамінних уражень складають механізми, які здійснюють обмеження та ліквідацію первинних проявів ушкодження, що виникає. Якщо це насправді так, то висока стійкість вен до дії ергокальциферолу має не пасивний, а активний характер.

Таким чином, низка наведених вище фактів свідчить про здатність високих доз вітаміну D ініціювати ушкодження не тільки артеріальних, а й венозних судин. Це ставить під сумнів пасивний характер стійкості вен до дистрофічних і склеротичних уражень та передбачає існування активних механізмів такої резистентності.

В основі активної резистентності судинної стінки (як і інших органів та тканин) до ушкодження лежить її здатність відповідати на дію патогенних агентів комплексом захисних, компенсаторних по суті, реакцій, що забезпечують збереження внутрішньоклітинного і внутрішньотканинного гомеостазу. Для досягнення такого типу стійкості потрібна достатня потужність механізмів, що беруть участь у підтриманні сталості основних параметрів діяльності судинної стінки, а також відповідне енергопостачання цих механізмів.

Сучасний рівень знань дає можливість виділити цілу низку захисних компенсаторних механізмів, причетних до збе-

реження цілісності клітин за умов їх ушкодження. Серед них – активація антиоксидантних систем і систем транспорту іонів (напр., Са- і Na-K-насосів), посилення реакцій біосинтезу білків та небілкових компонентів клітин, важливих для підтримання їх структури і функції.

Ретельне вивчення цих механізмів у клітинах різних кровоносних судин ще попереду, але вже сьогодні можна навести деякі дані про те, що у венозній стінці їхня потужність значно вища, як порівняти з артеріями.

Так, проведене нами вивчення антиоксидантних ферментів, рівень яких віддзеркалює можливості захисту клітин від ліпідних механізмів ушкодження, показало, що в стінці задньої порожнистої вени кролів активність глутатіонпероксидази в 1,8 раза, глутатіонредуктази – у 2, а каталази – у 2,8 раза вища проти відповідних показників грудної аорти.

Певно, саме цими відмінностями в системах антиоксидантного захисту можна пояснити отримані нами дані щодо динаміки змін ПОЛ після одноразового введення кролям ергокальциферолу в дозі 100000 МО/кг (рис. 10). Якщо в стінці аорти високий уміст ліпопероксидів та шиффових основ зберігається протягом 3-х діб після введення вітаміну D<sub>2</sub>, то у венозній тканині вивчені показники в зазначений термін повертаються до вихідного рівня. Якщо в аортальній стінці уміст гідропероксидів ліпідів та основ Шиффа зростає у 7,5 і 16,5 раза через 14 днів від початку введення ергокальциферолу в дозі 10000 МО/кг, то в стінці задньої порожнистої вени таке збільшення становить відповідно 3,7 та 8,1 раза, що набагато менше, ніж в аорті (див. главу 3).

Слід звернути увагу на те, що всі механізми активної резистентності клітин до ушкодження є енергозалежні: для підтримання внутрішньоклітинного гомеостазу використовується енергія АТФ, відновлених НАДФ і НАД; енергія електрохімічного градієнту іонів натрію і безпосередньо енергія транспорту електронів по дихальному ланцюгу мітохондрій. Звідси впливає дуже важливий, на нашу думку, висновок про те, що неодмінною умовою реалізації механізмів активної резистентності є належне енергетичне забезпечення клітин. З огляду на це, має існувати залежність між стійкістю кровоносних судин до ушкодження, з одного боку, та інтенсивністю енергетичного їх обміну – з другого.

Непрямим доказом такої залежності можна вважати той факт, що інтенсивність процесів енергопостачання в стійкій до ушкодження венонній стінці набагато перевищує таку артерій (див. вище), так само як і численні дані про зв'язок резистентності кровоносних судин з видовими, віковими і регіонарними особливостями енергетичного обміну їхньої стінки (Ю.В.Быць с соавт., 1999).

Таким чином, беручи до уваги наведені вище міркування, можна припустити активний характер стійкості венонних судин до ушкодження. Однак, для остаточного розв'язання цього питання необхідно було здобути конкретні експериментальні докази. Оскільки основу активної резистентності судин складають захисні гомеостатичні механізми, то таким доказом могло бути подолання високої стійкості венонних судин до ушкодження через пригнічення діяльності цих механізмів. У зв'язку з тим, що функціонування систем підтримання внутрішньоклітинного гомеостазу є енергозалежним, то універсальним і найефективнішим засобом досягнення поставленої мети, як нам видавалося, могло бути пригнічення енергетичного забезпечення венонної стінки за допомогою метаболічних отрут з добре відомими механізмами інгібіторної дії на процеси енергетичного обміну в клітинах.

З урахуванням зазначеного ми поставили за мету подолати високу стійкість венонних судин до ушкоджувальної дії вітаміну D, використовуючи поєднане введення ергокальциферолу з інгібіторами процесів енергопостачання – моноїодацетатом (МІА) та етилмеркурхлоридом (ЕМХ). Докази того, що МІА та ЕМХ пригнічують енергетичний обмін у стінці кровоносних судин, було представлено в роботах Ю.В.Быця (1973), а також у наших власних дослідженнях, присвячених впливу МІА на енергозабезпечення артеріальної і венонної стінки (О.В.Атаман, 2001).

Ми запропонували кілька варіантів постановки експерименту:

1) щоденне поєднане введення кролям ергокальциферолу (100000 МО/кг у шлунок через зонд) та МІА (10 мг/кг внутрішньовенно) протягом 5-6 днів;

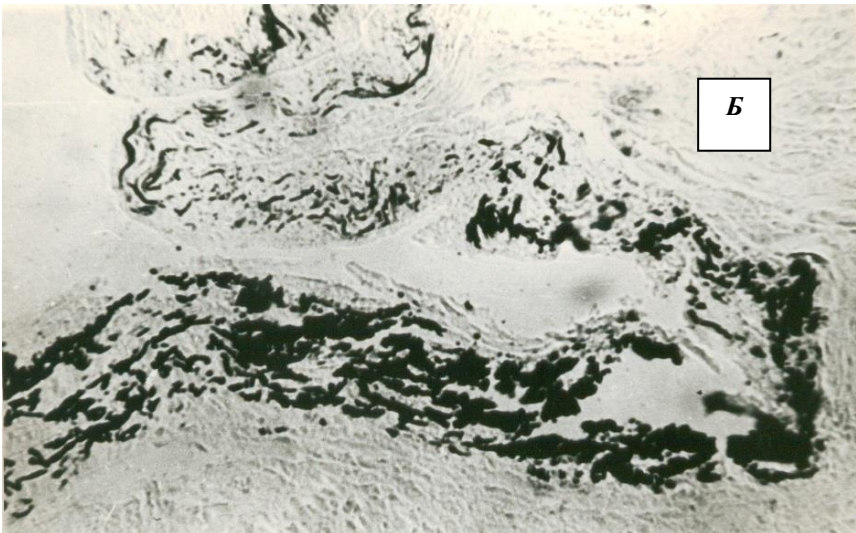
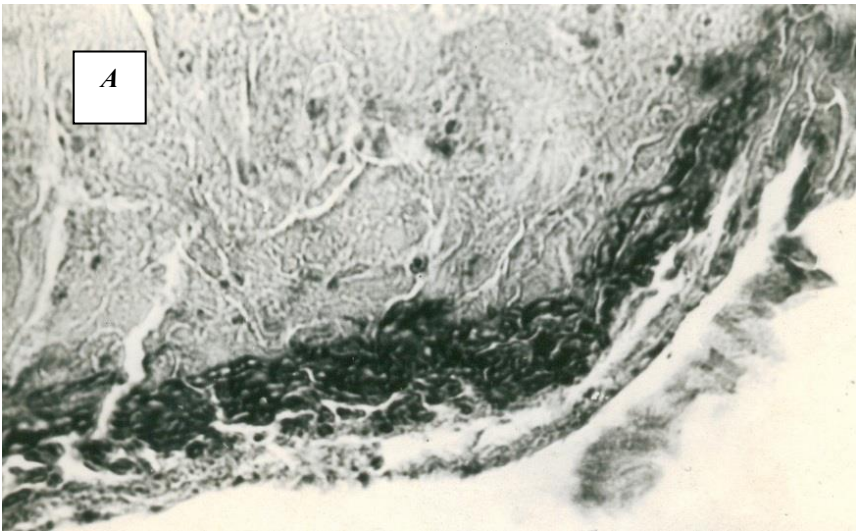
2) введення МІА (10 мг/кг) протягом 2-х тижнів з наступним уведенням ергокальциферолу (100000 МО/кг) протягом 3-х днів;



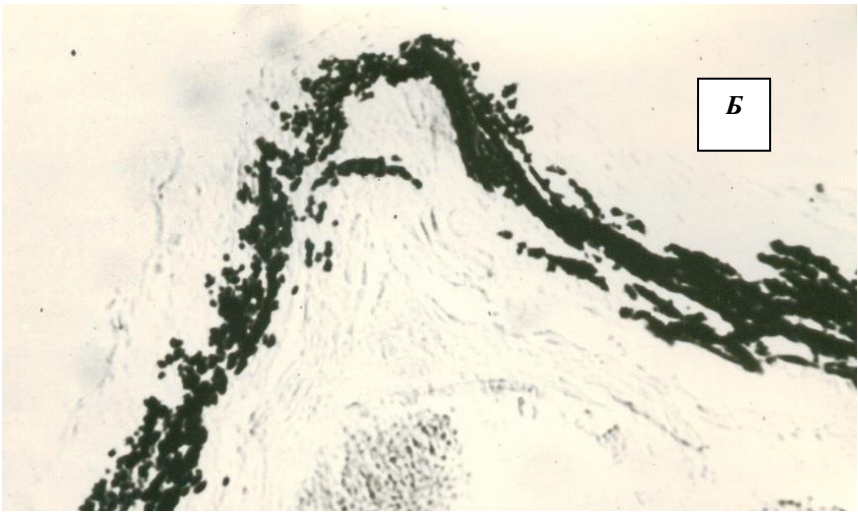
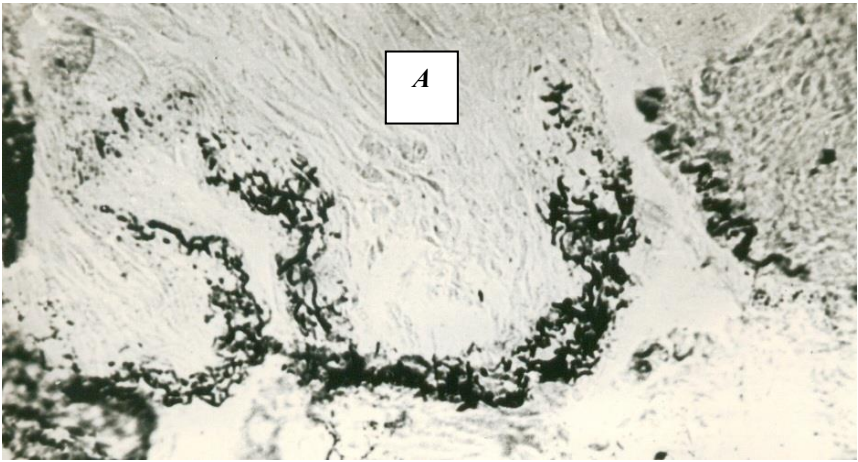
**Частота розвитку кальцифікації кровоносних судин кролів за умов введення тваринам моноіодацетату (МІА), вітаміну D<sub>2</sub> та їх поєданого введення**

<i>Кровоносні судини</i>	<i>Умови експерименту</i>			
	<i>Контроль</i>	<i>МІА – 10 мг/кг протягом 2 тижнів</i>	<i>Вітамін D<sub>2</sub> – 100000 МО/кг протягом 5-6 днів</i>	<i>МІА + вітамін D<sub>2</sub> протягом 5-6 днів</i>
Грудна аорта	0/10	4/10	8/10	10/10
Черевна аорта	0/10	3/10	8/10	10/10
Загальна сонна артерія	0/10	0/10	6/10	10/10
Легенева артерія	0/10	0/10	4/10	10/10
Задня порожниста вена	0/10	0/10	0/10	6/10
Ворітна вена	0/10	0/10	1/10	9/10

Примітка: Цифра в чисельнику позначає кількість тварин зі змінами в судинній стінці; цифра у знаменнику – загальну кількість тварин.



*Рис. 11. Ворітна вена кроля на 5-й день поєднаного введення вітаміну D<sub>2</sub> і МІА. А – дегенеративні зміни ГМК з кальцифікацією середньої оболонки. Фарбування гематоксилін-еозином. Об. 9, ок. 12,5. Б – Відкладання вапна . Фарбування методом Косса. Об. 9, ок. 12,5.*



*Рис. 12. Відкладання вапна в стінці задньої порожнистої вени. Умови експерименту: А – МІА протягом 2 тижнів з наступним введенням вітаміну D<sub>2</sub> протягом 3 днів. Б – поєднане введення вітаміну D<sub>2</sub> і етилмеркурхлориду протягом 6 днів. Фарбування методом Косса. Об. 9, ок. 12,5.*

3) поєднане введення ергокальциферолу (100000 МО/кг) та ЕМХ (2,5 мг/кг внутрішньошлунково) протягом 6 днів;

У всіх трьох варіантах дослідів спроба відтворити розвиток дистрофічних змін у стінці венозних судин виявилася вдалою (табл. 9). Так, поєднане введення вітаміну D з метаболічними отрутами (МІА, ЕМХ) спричинялося до набряку венозної стінки, дегенеративних змін гладких м'язових клітин та їх некрозу, до розвитку вираженого кальцинозу (рис. 11 і 12).

Таким чином, запропоновані нами моделі експериментальних впливів дозволили подолати "абсолютну" резистентність венозних судин до D-вітамінних уражень, що можна розглядати як прямий експериментальний доказ активного характеру резистентності вен до ушкоджувальної дії високих доз вітаміну D.

Безперечно, остаточне розв'язання проблеми високої стійкості венозної стінки до ушкодження ще попереду. Але немає сумнівів, що успіхи на цих теренах будуть важливим кроком до розуміння причин та механізмів розвитку патологічних процесів не тільки у венах, а й в артеріальних судинах. Це особливо актуально з огляду на центральне місце, яке посідає сьогодні проблема артеріосклерозу як в експериментальній, так і в практичній медицині.

## ГЛАВА 3

### РОЛЬ ОКСИДАЦІЙНОГО СТРЕСУ В ПАТОГЕНЕЗІ D-ГІПЕРВІТАМІНОЗНИХ УРАЖЕНЬ КРОВОНОСНИХ СУДИН

Окисдаційним стресом називають активацію реакцій вільнорадикального окиснення в клітинах організму та поза їх межами. Вільні радикали, як відомо, являють собою атоми й молекули, що мають непарну кількість електронів на своїй зовнішній орбіті. Завдяки енергії такої нестійкої конфігурації вільні радикали виявляють високу реакційну здатність і вступають у хімічну взаємодію між собою та з усіма навколишніми молекулами неорганічних і органічних речовин, зокрема ліпідами, білками, вуглеводами. Унаслідок цього утворюються пероксидні сполуки, які, у свою чергу, стають джерелом усе нових і нових радикалів. Таким чином, реакції вільнорадикального окиснення набувають ланцюгового і розгалуженого характеру.

В основі збільшення кількості вільних радикалів у клітинах, а отже, й окисдаційного стресу, можуть лежати два механізми: (1) посилене генерування вільних радикалів і пероксидів; (2) порушення діяльності систем антиоксидантного захисту – антиоксидантна недостатність.

Залежно від природи вільні радикали поділяють на первинні і вторинні. Серед первинних радикалів найбільше значення мають кисневі – т. зв. активні форми кисню (англ. *reactive oxygen species* – ROS) – і азотні (*reactive nitrogen species* – RNS).

Основними видами ROS є: (а)  $\cdot\text{O}_2^-$  ( $\text{HO}_2\cdot$ ) – супероксидний радикал (у формі аніон-радикалу або у зв'язаній з воднем формі); (б)  $\text{H}_2\text{O}_2$  – пероксид водню; (в)  $\text{OH}\cdot$  – гідроксильний радикал (на відміну від  $\text{OH}^-$ , не має електричного заряду);  $\cdot\text{O}_2$  – синглетний (збуджений) кисень – молекула кисню, у якій один з електронів зовнішньої орбіталі перейшов на більш високий енергетичний рівень.

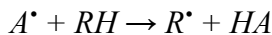
До активних форм азоту відносять: (а)  $\text{NO}\cdot$  - оксид азоту і (б)  $\text{OONO}^-$  - пероксинітрит. Останній утворюється при взаємодії оксиду азоту з супероксидним аніон-радикалом.

Вторинні вільні радикали і пероксиди утворюються при взаємодії первинних з різними молекулами (R) клітини. Їхніми різновидами є: (а) ROOH – органічні гідропероксида; (б) RO• - алкоксирадикали; (в) ROO• - пероксирадикали.

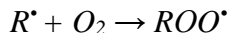
Причинами посиленого генерування вільних радикалів і пероксидів у клітинах можуть бути іонізуюча радіація – радіоліз води, екзогенні сполуки, здатні до самоокиснення (високі дози вітаміну D, катехоламінів та ін.), метали зі змінною валентністю (залізо, мідь, хром, ванадій, кобальт), окисно-відновні реакції, що каталізуються низкою ферментів. Серед останніх – ферменти клітинного дихання, НАД(Ф)Н-оксидази, NO-синтази, ксантинооксидаза, мієлопероксидаза, ліпоксигеназа.

Оксидаційний стрес виявляє себе вільнорадикальним окисненням трьох важливих типів сполук: (1) ліпідів, (2) білків і (3) нуклеїнових кислот і в такий спосіб започатковує т. зв. ліпідні, протейнові та нуклеїнові механізми клітинного ушкодження. З-поміж них провідну роль в ушкодженні клітин відіграє пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ).

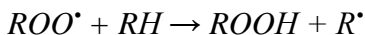
ПОЛ - це вільнорадикальне окиснення ненасичених жирних кислот, що входять до складу фосfolіпідів клітинних мембран. Ініціаторами ПОЛ є первинні вільні радикали (A•), які взаємодіють з молекулами ненасичених жирних кислот (RH), у результаті чого утворюються вільні радикали цих кислот (R•) і молекулярний продукт реакції (HA):



Вільні радикали жирних кислот, що утворилися, взаємодіють з молекулярним киснем, який завжди міститься в клітинах, у результаті чого з'являються пероксидні радикали цих кислот (ROO•):

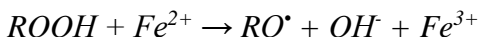


Пероксидні радикали, у свою чергу, вступають у взаємодію з новими молекулами ненасичених жирних кислот, що містяться поруч. У ході цієї реакції утворюються гідропероксида (ROOH) і нові вільні радикали:



Слід зазначити дві важливі особливості ПОЛ. Перша полягає в тому, що реакції ПОЛ мають ланцюговий характер. Це означає, що в ході реакцій ПОЛ не відбувається знищення вільних радикалів і в процес утягуються все нові й нові молекули ненасичених жирових кислот.

Друга особливість – це розгалужений характер ПОЛ. Інакше кажучи, у реакціях ПОЛ у кількості, що наростає, з'являються вільні радикали, джерелом яких є самі проміжні продукти ПОЛ. Прикладом може бути утворення вільних радикалів з гідропероксидів ліпідів при їхній взаємодії з наявними в клітині металами змінної валентності:

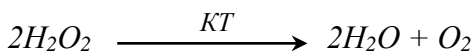
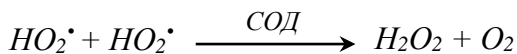


З огляду на те, що навіть в умовах норми в деяких біохімічних реакціях утворюється певна (хоч і незначна) кількість вільних радикалів, існує постійна небезпека активації ПОЛ в клітині. Однак, у природних умовах цього не відбувається, оскільки клітина має в своєму розпорядженні механізми антиоксидантного захисту.

Антиоксидантні системи – це системи, функціонування яких забезпечує інактивацію вільних радикалів і пероксидів, обмеження й гальмування ПОЛ. За механізмом дії їх поділяють на (а) ферментні антиоксидантні системи, (б) неферментні антиоксиданти і (в) т. зв. "структурний" антиоксидант (Владимиров Ю.А. и Арчаков А.И., 1972; Воскресенский О.Н. и Туманов В.А., 1982).

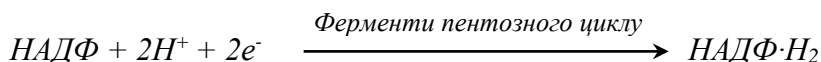
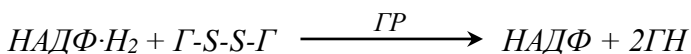
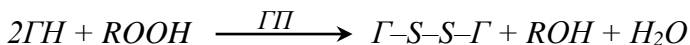
Серед ферментних систем найбільше значення мають:

1) супероксиддисмутаза. Вона складається з ферментів супероксиддисмутази (СОД) і каталази (КТ). Її призначенням є інактивація супероксидних радикалів ( $HO_2^*$ ) в реакції дисмутації з наступним розщепленням пероксиду водню:



Активність супероксиддисмутазної системи може знижуватися в умовах дефіциту деяких мікроелементів, зокрема, міді, цинку, марганцю (входять до складу різних форм СОД), а також заліза (входить до складу КТ);

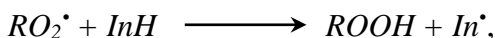
2) глутатіонпероксидазна. Її компонентами є глутатіон (Г), глутатіонпероксидаза (ГП), глутатіонредуктаза (ГР), НАДФ·Н<sub>2</sub>. Ця система здійснює інактивацію і руйнування гідропероксидів ліпідів:



В основі зменшення активності глутатіонпероксидазної системи можуть лежати (а) спадково обумовлені і набуті розлади синтезу ферментів, (б) дефіцит селену (входить до складу ГП), (в) порушення пентозного циклу (зменшення утворення НАДФ·Н<sub>2</sub>).

До неферментних антиоксидантів відносять:

1) "справжні" антиоксиданти, а саме: токофероли, убіхінони, нафтохінони, флавоноїди, стероїдні гормони, біогенні аміни. Їхнім призначення є інактивація вільних радикалів жирних кислот:



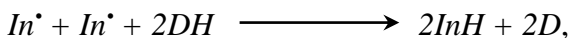
де In – антиоксидант; In\* – вільний радикал цього антиоксиданту, що має низьку реакційну здатність.

Антиоксидантна недостатність виникає при гіповітамінозі Е, порушеннях регенерації "справжніх" антиоксидантів;

2) допоміжні антиоксиданти. Ця група охоплює аскорбінову кислоту (вітамін С), а також речовини, що містять сірку – глутатіон, цистин, цистеїн.

За допомогою зазначених сполук здійснюється регенерація (відновлення) "справжніх" антиоксидантів:





де DH – відновлена, D – окиснена форма допоміжного антиоксиданту.

З огляду на ці функції розвитку антиоксидантної недостатності сприяють гіповітаміноз С, порушення пентозного циклу, дефіцит сполук, що містять сірку.

Поняттям "структурний антиоксидант" позначають явище, суть якого в тому, що за умов нормальної двошарової будови мембран "хвості" ненасичених жирових кислот – основного субстрату ПОЛ – "заховані" в товщі мембран (вони є гідрофобними), а тому недоступні для вільних радикалів, що з'являються в цитоплазмі і на внутрішній чи зовнішній поверхні мембранних утворень. У разі порушення двошарової структури ліпідів мембран ненасичені жирові кислоти стають незахищеними, вони легко вступають у взаємодію з вільними радикалами, що завжди є в мікрооточенні, і започатковують у такий спосіб ланцюгові і розгалужені реакції ПОЛ. У такому випадку ведуть мову про порушення "структурного" антиоксиданту.

Таким чином, у клітинах за умов норми підтримується певний баланс між процесами генерування вільних радикалів (фактори збурення), з одного боку, і активністю систем антиоксидантного захисту (механізми антизбурення) – з другого. Порушення цього балансу спричиняється до активації ПОЛ.

Залежно від того, у який спосіб започатковується ПОЛ, розрізняють два варіанти його активації.

I. Надмірне утворення первинних вільних радикалів. Такий механізм є провідним при ультрафіолетовому й іонізуючому випромінюванні, гіпероксії, отруєнні чотирихлористим вуглецем (CCl<sub>4</sub>), гіпервітамінозі D та дії інших прооксидантів. Якщо за цих обставин мобілізація всіх наявних у клітині механізмів антиоксидантного захисту виявиться неспроможною "загасити" вільнорадикальні реакції, то процеси ПОЛ, які швидко набувають лавиноподібного і нерегульованого характеру, стають одним з провідних механізмів ушкодження.

II. Порушення функціонування антиоксидантних систем – антиоксидантна недостатність. Вона може виникати при

порушеннях синтезу та інактивації відповідних ферментів (СОД, КТ, ГП, ГР), при дефіциті деяких мікроелементів (міді, цинку, марганцю, заліза, селену), гіповітамінозах Е, С; порушеннях пентозного циклу. За цих обставин активація ПОЛ настає під впливом навіть невеликої кількості первинних вільних радикалів, що утворюються в клітинах під час їх нормального функціонування.

Незалежно від того, у який спосіб відбувається активація ПОЛ, його ушкоджувальна дія в клітинах пов'язана з накопиченням у мембранах проміжних і кінцевих продуктів цього процесу (гідропероксидів ліпідів, дієнових кон'югатів, основ Шиффа та ін.). При цьому страждають обидві основні функції клітинних мембран – бар'єрна і матрична.

В основі порушень бар'єрної функції лежать два механізми:

1) іонофорний. Він обумовлений появою в клітині речовин, що мають властивості іонофорів, тобто сполук, здатних полегшувати дифузію іонів через мембрану завдяки утворенню комплексів, що проходять через її шари. У процесі активації ПОЛ серед проміжних продуктів його реакцій з'являються речовини-іонофори для багатьох іонів, зокрема кальцію і водню. У результаті цього підвищується проникність клітинних мембран до цих іонів;

2) механізм електричного пробоя. Він пов'язаний з існуванням на багатьох мембранах (плазматичній, внутрішній мітохондріальній) різниці потенціалів. У результаті появи гідрофільних продуктів ПОЛ порушуються електроізоляційні властивості гідрофобного шару клітинних мембран, що призводить до електричного пробоя мембрани, тобто до електромеханічного її розриву з утворенням нових трансмембранних каналів іонної провідності.

Суть матричної функції мембран полягає в тому, що їхній ліпідний подвійний шар слугує матрицею, у яку вмонтовані численні спеціалізовані білки (ферменти, іонні канали, рецептори та ін.).

Унаслідок активації ПОЛ:

1) порушуються активність мембранних ферментів та функції інших білків, оскільки змінюється їх ліпідне мікрооточення, яке багато в чому визначає властивості білкових молекул;

2) відбувається утворення "зшивок" між молекулами білків і фосфоліпідів;

3) окиснюються сульфгідрильні групи активних центрів, що призводить до необоротної інактивації ферментів.

Таким чином, активація ПОЛ, якщо вона відбувається, має своїм безпосереднім наслідком ушкодження клітинних мембран, а отже, і клітин в цілому.

З огляду на те, що вітамін D має виражені прооксидантні властивості (див. главу 1), а з другого боку, ушкодження клітин є невід'ємною складовою артеріосклеротичних уражень, цікавим було вивчити стан вільнорадикальних процесів в стінках кровоносних судин за умов розвитку гіпервітамінозу D.

Таким чином, метою наших досліджень стало з'ясування зв'язку між інтенсивністю процесів ПОЛ та кальцифікацією артеріальної і венозної стінки у тварин з експериментальним гіпервітамінозом D.

Для досягнення поставленої мети слід було:

1) визначити інтенсивність ПОЛ та антиоксидантну активність артеріальної і венозної стінки в динаміці гіпервітамінозу D;

2) з'ясувати вплив агентів з різними механізмами дії (антиоксиданти, блокатори кальцієвих каналів, комплексоутворювачі) на інтенсивність ПОЛ у судинній стінці тварин з D-вітамінною інтоксикацією;

3) вивчити вплив зазначених вище сполук на ступінь ушкодження судинної стінки та її кальцифікацію, зумовлену високими дозами вітаміну D.

Дослідження виконано на кролях обох статей, маса яких складала від 1800 до 2600 г, вік – 6-8 місяців. Тваринам вводили високі дози вітаміну D у шлунок через зонд (0,125% олійний розчин з розрахунку 10000 МО/кг) щодня протягом 1, 3, 7 і 14 діб. Використана в роботі доза перевищувала добову потребу кролів у вітаміні D у 1000 разів і спричинялася до розвитку підгострої інтоксикації.

Для з'ясування провідної ланки в механізмі ушкодження судинної стінки за умов D-вітамінної інтоксикації використовували поєднане введення препаратів протягом 14 діб:

1) вітаміну D<sub>2</sub> та вітаміну E (10% олійний розчин токоферолу ацетату з розрахунку 50мг/кг у шлунок через зонд);

2) вітаміну D<sub>2</sub> і ніфедипіну (30мг/кг у шлунок через зонд);

3) вітаміну D<sub>2</sub> та натрієвої солі етан-1-гідрокси-1,1-дифосфонової кислоти (ЕГДК) (130мг/кг у шлунок через зонд за 2 години до введення ергокальциферолу).

Через 24 години після останнього введення препаратів тварин забивали за допомогою повітряної емболії й одразу проводили забір матеріалу для досліджень. Об'єктами вивчення були: грудна аорта, черевна аорта, легенева артерія й задня порожниста вена.

У проведених дослідах визначався вміст проміжних (гідропероксиди ліпідів, ГПЛ) і кінцевих (шиффові основи, ШО) продуктів ПОЛ, а також активність антиоксидантних ферментів у тканинах артеріальних і венозних судин у динаміці D-вітамінної інтоксикації (через 1, 3, 7 і 14 діб від початку введення ергокальциферолу).

У табл. 10 і 11 представлено дані про вміст ГПЛ та ШО в артеріях і венах контрольних і D-гіпервітамінозних тварин.

Проведені дослідження виявили приблизно однаковий вміст ГПЛ та ШО в стінці артерій і вен інтактних тварин. Рівень ГПЛ в артеріальних судинах коливався в межах від  $22,1 \pm 2,36$  (легенева артерія) до  $23,9 \pm 2,35$  нмоль/мг ліпідів (черевна аорта). У вені він був меншим –  $20,1 \pm 1,93$  нмоль/мг ліпідів. Вміст ШО складав від  $5,95 \pm 0,6$  до  $6,32 \pm 0,84$  відн.од./мг ліпідів в артеріях і становив  $5,8 \pm 0,69$  відн.од./мг ліпідів у венах.

За умов уведення тваринам вітаміну D вже через 1 добу експерименту відбувається активація процесів ПОЛ як в артеріальній, так і у венозній тканині, про що свідчить зростання вмісту ГПЛ у стінці всіх вивчених судин. Так, у грудній аорті рівень ГПЛ підвищувався на 51%, у черевній аорті – на 50%, у легеневій артерії – на 40% і в задній порожнистій вені – на 43%. Вміст кінцевих продуктів ПОЛ - ШО - на цій стадії проведення досліду достовірно не змінювався якщо порівнювати з контролем.

Далі вираженість змін показників ПОЛ залежала від типу кровоносних судин. Так, в артеріях на 3-тю добу експерименту кількість ГПЛ продовжувала зростати. У грудній аорті цей показник збільшився на 82%, у черевній - на 69%, у легеневій артерії - на 50%, якщо порівнювати з 1-ю добою, тимчасом як у венозних судинах на цій стадії експерименту

**Вміст гідропероксидів ліпідів у стінках кровоносних судин кролів у динаміці гіпервітамінозу D (нмоль/мг ліпідів;  $M \pm m$ ,  $n=6$  у кожній групі)**

<i>Кровоносні судини</i>	<i>Контроль</i>	<i>Вітамін D</i>			
		<i>1 доба</i>	<i>3 доби</i>	<i>7 діб</i>	<i>14 діб</i>
Грудна аорта	23,2±2,88	35,0±4,2*	53,7±7,0*	102,7±8,5*	172,0±11,3*
Черевна аорта	23,9±2,35	36,0±3,38*	51,1±8,0*	91,4±7,42*	148,7±12,04*
Легенева артерія	22,1±2,36	30,8±2,68*	41,9±6,43*	77,67±7,42*	109,6±7,02*
Задня порожниста вена	20,1±1,93	28,8±3,0*	28,6±4,26*	49,6±7,4*	75,3±12,85*

Примітка: \* – статистично достовірні розбіжності відносно контролю ( $p < 0,05$ ).

**Інтенсивність флюоресценції основ Шиффа в стінках кровоносних судин кролів у динаміці гіпервітамінозу D (відн.од./ мг ліпідів;  $M \pm m$ ,  $n=6$  у кожній групі)**

Кровоносні судини	Контроль	Вітамін D			
		1 доба	3 доби	7 діб	14 діб
Грудна аорта	6,32±0,84	7,18±0,64	12,7±1,92*	25,7±4,07*	104,8±31,0*
Черевна аорта	6,40±0,73	7,18±0,86	12,7±1,52*	24,6±3,34*	86,8±23,7*
Легенева артерія	5,95±0,60	5,37±0,57	9,22±2,10	17,4±3,34*	62,0±15,8*
Задня порожниста вена	5,80±0,69	5,87±0,76	7,73±1,34	10,7±2,65	47,4±18,1*

Примітка: див. табл. 10.

він достовірно не змінювався. На 3-тю добу D-вітамінної інтоксикації в кровоносних судинах починалося зростання й вмісту ШО: у грудній та черевній аорті зафіксовано збільшення цього показника приблизно в 2 рази проти контролю, в інших судинах тенденцію до зростання вмісту ШО статистично не підтверджено.

На 7-му добу проведення досліду збільшення кількості ГПЛ тривало: у грудній аорті воно становило 91%, у черевній аорті - 79%, у легеневій артерії - 85%, якщо порівнювати з 3-ю добою, а в порожнистій вені - 72% проти 1-ї доби.

Інтенсивність флюоресценції ШО на 7-му добу D-гіпервітамінозу також збільшувалася: у грудній аорті - в 2 рази, у черевній аорті - в 1,9 рази, якщо порівнювати з 3-ю добою, а в легеневій артерії - в 2,9 рази, але вже в порівнянні з контрольним показником. У порожнистій вені на цій стадії досліду вміст ШО достовірно не змінювався.

На 14-ту добу експерименту кількість ГПЛ зростала в усіх артеріальних судинах: у грудній аорті - в 1,7 рази, в черевній - в 1,6 рази, в легеневій артерії - в 1,4 рази, якщо порівнювати з 7-ю добою, а в порожнистій вені - в 2,6 рази при порівнянні з 3-ю добою. Зростання кількості ГПЛ у порожнистій вені на 14-ту добу проти 7-ї статистично не підтверджено. Це свідчить про уповільнення процесів ПОЛ у венозній тканині D-гіпервітамінозних тварин на цій стадії експерименту.

Вміст ШО у грудній, черевній аорті та легеневій артерії на 14-ту добу продовжував зростати - в 4,1, 3,5, 3,6 рази відповідно, якщо порівнювати з 7-ю добою. Слід відзначити, що тенденцію до зростання інтенсивності флюоресценції ШО, яка спостерігалася у венозній стінці вже з 1-ї доби введення кролям високих доз вітаміну D, підтверджено статистично через 14 діб від початку експерименту. У ці строки вміст ШО у тканині задньої порожнистої вени був у 8,2 рази більшим проти контролю.

Таким чином, на 14-ту добу D-вітамінної інтоксикації вміст ГПЛ у грудній аорті зріс у 7,5, у черевній аорті - у 6,2, у легеневій артерії - у 5, у порожнистій вені - у 3,8 рази, якщо порівнювати з контролем, і був у грудній аорті в 2,3 рази більшим, ніж у порожнистій вені.

Вміст ШО з 1 до 14 доби експерименту збільшився в грудній аорті в 16,6 рази, у черевній аорті - 13,6, у легене-

вій артерії - в 10,4, у порожнистій вені - у 8,2 раза, якщо порівнювати з контролем, і був у 2,2 раза більшим у грудній аорті, ніж у порожнистій вені.

Варто зазначити, що в артеріальних судинах вміст ГПЛ поступово збільшувався протягом усього експерименту, у той час як у венозній тканині ці сполуки накопичувалися повільніше. Збільшившись на початку експерименту, кількість ГПЛ у задній порожнистій вені достовірно не змінювалася протягом першого тижня досліджу. І лише на 7-му добу введення ергокальциферолу зафіксовано зростання цього показника у венозній тканині, яке становило 72% проти 1-ї доби. Вміст ШО починав зростати в черевній аорті на 3-тю добу експерименту, у легеневій артерії - на 7-му, а в порожнистій вені - лише на 14-ту добу.

Отже, вже з 3-ї доби і до кінця експерименту простежувалися відмінності у вмісті продуктів ПОЛ не тільки між артеріями та венами, а й між самими артеріальними судинами. Залежно від кількості ГПЛ та ШО досліджені судини можна було поділити на 3 групи: (1) грудна та черевна аорта (вміст найбільший), (2) легенева артерія (вміст середній), (3) задня порожниста вена (вміст найменший).

Отримані нами результати узгоджуються з даними *О.В. Атамана* (1986, 1990) та *Ю.В. Биця та співавт.* (1991), які вивчали стійкість артеріальних і венозних судин до ушкодження при дії різноманітних патогенних чинників. Одержані результати дозволили цим авторам розмістити кровonosні судини за резистентністю до уражень у такій послідовності: порожниста вена > легенева артерія > черевна аорта > грудна аорта.

Паралельно з судинною стінкою в проведених дослідках було вивчено вміст ГПЛ та дієнових кон'югатів (ДК) у плазмі крові експериментальних тварин (табл. 12). Так, вже через одну добу від початку введення ергокальциферолу вміст ГПЛ та ДК у плазмі крові кролів мав тенденцію до зростання, а через три доби експерименту ці показники достовірно збільшувалися при порівнянні з контролем: ГПЛ - на 47%, ДК - на 115%. Протягом наступних періодів експерименту кількість продуктів ПОЛ у плазмі крові продовжувала зростати. На 7-му добу D-вітамінної інтоксикації вміст ГПЛ збільшувався майже в 2 рази, а ДК - майже в 3 рази, якщо порівнювати з контролем. На 14-ту добу обидва показники



Таблиця 12

**Вміст гідропероксидів ліпідів (нмоль/мг ліпідів) та дієнових кон'югатів (од.опт.щільн/мл) у плазмі крові кролів у динаміці гіпервітамінозу D ( $M \pm m$ ,  $n=6$  у кожній групі)**

<i>Вивчений показник</i>	<i>Контроль</i>	<i>Вітамін D</i>			
		<i>1 доба</i>	<i>3 доби</i>	<i>7 діб</i>	<i>14 діб</i>
Вміст ГПЛ	8,42±0,95	9,23±0,88	12,40±0,90*	16,35±0,94*	28,67±1,15*
Вміст ДК	0,52±0,07	0,73±0,05	1,12±0,08*	1,52±0,05*	1,76±0,08*

Примітка: див. табл. 10.

зростали в 3,4 раза проти показників інтактних тварин. Привертає до себе увагу той факт, що в судинній стінці достовірне зростання ГПЛ зафіксоване вже на першу добу D-гіпервітамінозу (див. табл. 10). Це свідчить на користь того, що активація пероксидних механізмів ушкодження в стінці кровоносних судин відбувається раніше, ніж у плазмі крові, а значить судинна стінка є більш уразливим об'єктом ПОЛ. Цей факт підтверджено і в дослідженнях інших авторів. Так, *Бобирєв В.Н. та співавт.* (1994), вивчаючи рівень вільнорадикального окиснення ліпідів у різних тканинах інтактних щурів і кролів (аорта, печінка, мозок, міокард, сім'яники, плазма крові), встановили, що в плазмі крові вміст продуктів ПОЛ при порівнянні з іншими тканинами найнижчий.

Відомо, що резистентність тканин до розвитку пероксидних механізмів ураження визначається потужністю систем антиоксидантного захисту (див. вище). У зв'язку з цим, нами було вивчено активність основних антиоксидантних ферментів судинної стінки, а саме: глутатіонпероксидази (ГП), супероксиддисмутази (СОД) та каталази (КТ). Дані цих досліджень, що демонструють динаміку змін їхньої активності за умов гіпервітамінозу D, представлено в табл. 13, 14 і 15.

Насамперед привертає до себе увагу той факт, що в контрольній групі тварин тканина задньої порожнистої вени виявляє більш високу, якщо порівнювати з артеріями, глутатіонпероксидазну активність. У порожнистій вені інтактних кролів цей показник в 1,8 раза більший, ніж у грудній та черевній аорті і в 1,4 раза, ніж у легеневій артерії.

Одержані результати свідчать про тенденцію до зростання активності ГП у грудній та черевній аорті вже через одну добу після введення тваринам ергокальциферолу. На 3-тю ж добу відзначається зворотна тенденція до зниження цього показника, проте статистично достовірних відмінностей при порівнянні з групою інтактних тварин ще немає. На 7-му добу проведення експерименту активність ГП у грудній аорті D-гіпервітамінозних кролів зменшувалася на 27%, а в черевній – на 32 % проти контролю. Тенденція до зниження зберігалася до кінця експерименту. На 14-ту добу D-вітамінної інтоксикації падіння активності ГП становило в цих судинах 39% та 40% відповідно, якщо порівнювати з контролем.

**Активність глутатіонпероксидази в судинній стінці кролів у динаміці гіпервітамінозу D (мкм відновл. глутатіону /хв·г білка;  $M \pm m$ ,  $n=6$  у кожній групі)**

Кровоносні судини	Контроль	Вітамін D			
		1 доба	3 доби	7 діб	14 діб
Грудна аорта	14,6±0,80	14,9±0,54	14,4±0,81	10,6±0,50*	9,78±0,48*
Черевна аорта	14,9±0,88	15,2±0,83	14,7±0,75	10,2±0,75*	8,97±0,70*
Легенева артерія	18,1±0,69	17,9±0,85	19,7±0,65	18,2±0,84	16,2±0,71*
Задня порожниста вена	26,3±1,92	26,6±1,74	29,1±0,84*	32,4±0,84*	36,8±1,45*

Примітка: див. табл. 10.

**Активність супероксиддисмутази в судинній стінці кролів у динаміці гіпервітамінозу D (ум. од./мг білка;  $M \pm m$ ,  $n=6$  у кожній групі)**

<i>Кровоносні судини</i>	<i>Контроль</i>	<i>Вітамін D</i>			
		<i>1 доба</i>	<i>3 доби</i>	<i>7 діб</i>	<i>14 діб</i>
Грудна аорта	6,22±0,25	6,38±0,24	5,95±0,33	4,20±0,23*	3,55±0,26*
Черевна аорта	5,92±0,28	6,28±0,32	6,65±0,36	4,90±0,31*	4,03±0,32*
Легенева артерія	7,43±0,37	7,22±0,42	7,83±0,39	6,40±0,34	5,78±0,44*
Задня порожниста вена	12,8±0,58	13,0±0,50	13,4±0,36	14,2±0,54	15,7±0,59*

Примітка: див. табл. 10.

**Активність каталази в судинній стінці кролів у динаміці гіпервітамінозу D**  
 (ум. од./мг білка;  $M \pm m$ ,  $n=6$  у кожній групі)

<i>Кровоносні судини</i>	<i>Контроль</i>	<i>Вітамін D</i>			
		<i>1 доба</i>	<i>3 доби</i>	<i>7 діб</i>	<i>14 діб</i>
Грудна аорта	0,20±0,01	0,22±0,03	0,19±0,02	0,12±0,01*	0,09±0,01*
Черевна аорта	0,18±0,01	0,22±0,03	0,21±0,02	0,10±0,01*	0,08±0,01*
Легенева артерія	0,28±0,01	0,26±0,03	0,29±0,02	0,18±0,02*	0,12±0,02*
Задня порожниста вена	0,57±0,06	0,58±0,06	0,69±0,05*	0,78±0,05*	0,86±0,07*

Примітка: див. табл. 10.

У легеневій артерії глутатіонпероксидазна активність спочатку (на 1-шу добу) виявляла тенденцію до зменшення, пізніше (на 3-тю добу) – до зростання, на кінець першого тижня (на 7-му добу) – знову до зменшення. Але достовірне зниження активності ферменту відбувалося лише на 14-ту добу і становило 11% проти контролю.

У венозній тканині спостерігалася протилежна тенденція. Протягом усього експерименту активність ГП у задній порожнистій вені зростала: на 3-тю добу на 10%, на 7-му – на 23%, на 14-ту – на 40% якщо порівнювати з контролем.

Відмінності в активності ГП у стінці артерій та вен можуть бути пов'язані з різною інтенсивністю енергетичного обміну в цих судинах, оскільки функціонування глутатіонпероксидазної системи є енергозалежним процесом (для регенерації окисненого глутатіону потрібна енергія НАДФН або НАДН). Як відомо, артеріальна стінка, порівняно з венозною, має низький рівень енергетичного обміну (*Атаман О.А.*, 2001). Це може негативно позначатися на функціонуванні ГП в артеріальній тканині. Важливо зазначити, що активність ГП є вищою в судинах тварин, резистентних до розвитку атеросклерозу (наприклад, щурів), ніж в артеріях тварин, схильних до нього (кролів). Водночас показники енергетичного обміну в стінках кровоносних судин першої групи тварин є значно вищими, ніж у другій.

Наступним ферментом – об'єктом наших досліджень – була СОД, яка забезпечує безпосереднє обривання ланцюгів залежних від кисню вільнорадикальних реакцій у клітинах аеробних організмів.

Дані літератури свідчать про зниження активності СОД при різних патологічних процесах, розвиток яких пов'язаний з активацією ПОЛ. Зафіксовано зниження активності СОД на тлі зростання в тканинах продуктів ПОЛ при експериментальному інфаркті міокарда, у термінальному періоді розвитку серцевої недостатності, при атеросклерозі, ішемічній хворобі серця тощо (*Ланкин В.З.*, 1979, 2000; *Поберезкина Н.Б. и Осинская Л.Ф.*, 1989).

У табл. 14 представлено результати власних досліджень активності СОД в артеріальній та венозній стінці кролів у динаміці D-вітамінної інтоксикації.

Цікавим є те, що активність СОД у венозних судинах кролів на всіх етапах експерименту була вищою за відпові-

дного показника артерій. Протягом перших 3-х діб експерименту супероксиддисмутазна активність достовірно не змінювалася ні в артеріях, ні у венах. На 7-му добу в грудній аорті активність СОД знижувалася на 33%, у черевній - на 17% при порівнянні з контролем, тимчасом як зміна цього показника в легеневій артерії та задній порожнистій вені не мала статистичного підтвердження. Тенденція до зниження супероксиддисмутасної активності в грудній та черевній аорті зберігалася до кінця експерименту і становила на 14-ту добу відповідно 43% та 32% проти групи контрольних тварин. Крім того, у грудній аорті на цій стадії дослідів активність СОД була на 15% нижчою, ніж на 7-му добу ( $p < 0,05$ ). Істотне зменшення активності СОД на 14-ту добу експерименту відбулося і в легеневій артерії – 22% проти контрольних величин.

Тенденцію до зростання супероксиддисмутасної активності, що її спостерігали в задній порожнистій вені вже з 1-ї доби експерименту, було статистично підтверджено на 14-ту добу. Збільшення активності СОД у цей період становило 23%, якщо порівнювати з контролем.

Зниження активності СОД, як і ГП, в артеріях, мабуть, пов'язане з низьким рівнем енергетичного обміну в судинній стінці. Важливе регуляторне значення щодо активності СОД має глутатіон та інші SH-містки сполуки. У дослідях *in vitro* показано, що під впливом глутатіону в клітинах печінки щурів підвищується активність СОД. Цей ефект частково пов'язаний з відновленням  $\text{Cu}^{2+}$  SH-сполуками, які прискорюють окисно-відновний цикл  $\text{Cu}^{2+} - \text{Cu}^{+}$  і підвищують ферментативну дисмутацію (Ланкин В.З. *с соавт.*, 1983).

У дослідях Ю.А.Владимирова (1998) було встановлено, що СОД досить швидко інактивується при зниженні рН внаслідок протонування гістидину, який входить до активного центру ферменту і руйнування зв'язку азоту імідазольного кільця з іонами цинку. Можливо, ацидоз, як одна із фізично-хімічних ознак ушкодження клітин і тканин, поряд з іншими факторами, викликає зниження активності СОД у стінці артерій та вен за умов гіпервітамінозу D. Крім того, продукти ПОЛ здатні порушувати структуру СОД і, як наслідок, унеможливити виконання її функцій.

Синергістом СОД у клітині є КТ, яка запобігає накопиченню продукту супероксиддисмутазної реакції – пероксиду водню ( $H_2O_2$ ).

Дані літератури щодо активності КТ при різних патологічних процесах мають неоднозначний характер. Виявлено відсутність активації КТ при стимуляції процесів ПОЛ за умов канцерогенезу (*Rao and Jamadeesan, 1996*), ознаки помірної її активації при дії гербіцидів (*Абрамова Ж.И.и Оксенгендлер Г.И., 1985*). З'ясовано, що в перші години після опромінення каталазна активність зростає, а потім знижується (*Байкова В.Н. с соавт., 1998*). Виявлено зменшення активності КТ і в судинній стінці в процесі моделювання атеросклерозу та артеріосклерозу Менкеберга у кролів (*Ларионова Н.А., 2001*).

Як впливає з табл. 15, каталазна активність тканини порожнистої вени на всіх етапах експерименту була значно вищою, ніж в артеріальних судинах.

Активність КТ артеріальних судин протягом перших 3-х діб D-вітамінної інтоксикації залишалася без змін. На 7-му добу експерименту вона достовірно зменшувалася: у грудній аорті на 40%, у черевній – на 44%, у легеневій артерії – на 36%, якщо порівнювати з інтактними кролями. На 14-ту добу досліджень падіння активності КТ було ще більшим і становило відповідно 25%, 20%, 33% при порівнянні з 7-ю добою.

У порожнистій вені каталазна активність зростала протягом всього експерименту. Її збільшення складало 21% на 3-тю добу і 51% на 14-ту добу D-вітамінної інтоксикації, якщо порівнювати з контрольними показниками.

Таким чином, вивчення антиоксидантної активності артеріальної і венозної стінки підтвердило неоднаковий характер змін у судинах різних типів.

У грудній та черевній аорті протягом перших 3-х діб активність ГП, СОД та КТ не змінювалася, а зростання вмісту ГПЛ та ШО в цей період часу було незначним. Виявлене на 7-му добу зниження активності антиоксидантних ферментів продовжувалося до 14-ї доби. Саме в цей час підвищення вмісту ГПЛ та ШО було найістотнішим. Схожі результати характеризують і легеневу артерію.

Зовсім інша картина спостерігалася в задній порожнистій вені. Активність усіх вивчених антиоксидантних фермен-



тів у ній зростала: КТ – починаючи з 3-ї доби, СОД – 7-ї доби, ГП – 14-ї доби експерименту.

Слід зазначити, що зниження антиоксидантної активності є притаманним різним патогенетичним варіантам уражень судин. Так, *Давиденкова Е.Ф. і Шафран М.Г. (1989)* встановили, що холестероловий атеросклероз супроводжується зменшення активності ГП і СОД у стінках судин, міокарді та еритроцитах. *Ланкін В.З. та співавт. (2000)* виявили різке зниження активності СОД і ГП в зонах атеросклеротичного ураження аорти. *Ларіонова Н.А. (2001)* повідомила про зниження антиоксидантної активності судинної стінки в експериментальних тварин при моделюванні різних видів дистрофічно-склеротичних уражень артерій.

Таким чином, одержані результати свідчили про те, що:

1) введення тваринам високих доз вітаміну D супроводжується зростанням вмісту проміжних та кінцевих продуктів ПОЛ в стінках кровоносних судин та плазмі крові, починаючи з 1-ї доби експерименту, що є доказом ініціації пероксидних механізмів ушкодження в тканинах організму у відповідь на дію високих доз ергокальциферолу;

2) в усіх досліджуваних судинах накопичення ГПЛ і ШО відбувається інтенсивно протягом всього періоду експерименту. Проте інтенсивність зростання рівня продуктів ПОЛ в стінці судин різна: найбільший вміст ГПЛ та ШО зафіксовано в кінці дослідження в грудній та черевній аорті, проміжні значення – у легеневої артерії, найменші – у задній порожнистій вені;

3) у відповідь на дію високих доз вітаміну D в артеріальних судинах спостерігається зниження активності антиоксидантних ферментів – ГП, СОД і КТ, тимчасом як у венозній стінці активність усіх вивчених ферментів зростає;

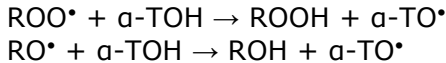
4) в артеріальній тканині антиоксидантна активність нижча, якщо порівнювати з венозною. Введення ергокальциферолу викликає в артеріях значну активацію процесів ПОЛ і зниження активності антиоксидантних ферментів. Венозна стінка, на відміну від артеріальної, має високу антиоксидантну активність. За умов гіпервітамінозу D накопичення вмісту ГПЛ та ШО відбувається в ній повільніше, а активність ГП, СОД та КТ зростає;

5) більша потужність антиоксидантних систем у венозній тканині може бути однією з причин більшої стійкості вен до патогенних впливів.

З огляду на те, що D-вітамінна інтоксикація супроводжується істотною активацією ПОЛ, наступним кроком наших досліджень стало вивчення впливу фармакологічних агентів ангіопротекторної дії на інтенсивність цього процесу. Це мало дати відповідь на питання, яку роль відіграють пероксидні механізми ушкодження у розвитку дистрофічних змін, характерних для уражень судин менкебергівського типу.

Для досягнення зазначеної мети нами використано фармакологічні агенти з різними механізмами ангіопротекторної дії: антиоксиданти (вітамін E), блокатори кальцієвих каналів (ніфедипін) і комплексоутворювачі (препарат бісфосфонатів – ЕГДК).

*Вітамін E*, або  $\alpha$ -токоферол, належить до групи жиророзчинних вітамінів і характеризується вираженими антиоксидантними властивостями, завдяки яким обриваються ланцюгові реакції ПОЛ в мембранах клітин.



При взаємодії  $\alpha$ -токоферолу ( $\alpha$ -ТОН) з вільними радикалами жирових кислот ( $\text{ROO}^\bullet$ ,  $\text{RO}^\bullet$ ) відбувається інактивація останніх з утворенням радикалів антиоксиданту ( $\alpha\text{-ТО}^\bullet$ ), що, на відміну від продуктів ПОЛ, мають дуже низьку реакційну здатність.

На думку багатьох, в основі ангіопротекторної дії вітаміну E лежать саме антиоксидантні його властивості, які виявляють себе як на рівні організму в цілому, так і місцево – у судинній стінці (*Воскресенский О.Н. и Туманов В.А., 1982*).

Серед загальних механізмів антиатерогенного впливу  $\alpha$ -токоферолу виділяють: (а) здатність зменшувати вміст холестеролу в плазмі крові; (б) запобігання процесам пероксидної модифікації ЛПНГ і нормалізацію ліпопротеїнового складу плазми крові; (в) пригнічення судинно-тромбоцитарного і коагуляційного гемостазу (агрегації тромбоцитів, зсідання крові).

Місцевий вплив вітаміну Е на судинну стінку виявляє себе гальмуванням майже всіх процесів, що складають суть атеросклерозу. Під впливом  $\alpha$ -токоферолу зменшується оксидативний стрес у тканинах артерій і зумовлені ним дисфункція ендотелію судин, окиснення ЛПНГ, активація діяльності макрофагів. Вітамін Е значно послаблює явища ліпоїдозу (гальмує утворення "пінистих" клітин), формування фіброзних і фіброатероматозних бляшок (пригнічує міграцію і проліферацію ГМК), виявляє цитопротекторну дію, запобігаючи ушкодженню клітин під впливом різних патогенних чинників (Быць Ю.В. *с соавтор.*, 1999; Diaz *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2002; Pratico, 2005; Özer *et al.*, 2006; Kaliora *et al.*, 2006; Bruno and Traber, 2006).

Незважаючи на те що вітамін Е *in vitro* виразно пригнічує майже всі процеси, індуковані оксидативним стресом у судинній стінці, його антиатерогенна дія до цього часу перебуває під великим сумнівом ("антиоксидантний парадокс"). Річ у тім, що зменшення оксидативного стресу в артеріях тварин не завжди супроводжується послабленням і уповільненням атеросклеротичного процесу (Diaz *et al.*, 1997; Jialal and Devaraj, 2003; Griendling and Fitzgerald, 2003; Yang *et al.*, 2004; Pratico, 2005; Kaliora *et al.*, 2006; Özer *et al.*, 2006; Bruno and Traber, 2006).

Ще більш суперечливими є епідеміологічні і клінічні дані щодо антиатеросклеротичної дії антиоксидантів: з 12 широкомасштабних різнотривалих досліджень, в яких використовували різні дози і різні поєднання антиоксидантних вітамінів (зокрема,  $\alpha$ -токоферолу і аскорбінової кислоти), тільки в п'яти (Cambridge Heart Antioxidant Study – CHAOS, Secondary Prevention with Antioxidants of Cardiovascular disease in End-stage renal disease – SPACE, Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention – ASAP, Nurses' Health Study, вивчення розвитку атеросклерозу в судинних трансплантах вінцевих артерій) було зареєстровано позитивний ефект лікування. В інших 7 дослідженнях не вдалося виявити такого ж впливу вітамінів-антиоксидантів на розвиток серцево-судинних хвороб (Stephens *et al.*, 1996; Boaz *et al.*, 2000; Patterson *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2002; Osganian *et al.*, 2003; Salonen *et al.*, 2003; Zureik *et al.*, 2004; Madamanchi *et al.*, 2005; Singh and Jialal, 2006).

Що стосується впливу вітаміну Е на розвиток артеріосклерозу Менкеберга взагалі і D-гіпервітамінозних уражень судин зокрема, то проблема ця донині залишається *terra incognita*. В окремих роботах показано, що  $\alpha$ -токоферол, з одного боку, зменшує інтенсивність ПОЛ в судинній стінці тварин з гіпервітамінозом D і гіперадреналінемією, а з другого – істотно не впливає на розвиток кальцифікації судин за цих умов експерименту (Гарбузова В.Ю., 2004; Наумко Р.Ф., 2005). Є докази того, що вітамін Е пригнічує розвиток індукованої ангіотензином II аневризми черевної аорти в ароЕ-дефіцитних мишей (Gavrila et al., 2005).

Ніфедипін належить до блокаторів кальцієвих каналів (БКК), тобто є сполукою, яка перешкоджає переходу іонів кальцію з позаклітинного середовища в цитоплазму клітин через повільні потенціалзалежні кальцієві канали плазматичної мембрани. Будучи похідним дигідропіридинів, ніфедипін впливає переважно на кровоносні судини і виявляє дуже специфічну дію (препарат групи А за класифікацією Флекенштейна), гальмуючи на 90-100% повільне входження  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину і не впливаючи на трансмембранну натрієву провідність (Fleckenstein et al., 1986).

Вважають, що в основі ангіопротекторної дії БКК лежить прямий вплив на судинну стінку, оскільки антиатерогенний ефект препаратів не залежить від їх гіпотензивної дії, змін ліпідного і ліпопротеїнового профілю плазми крові, антиагрегаційної дії на тромбоцити (Henry, 1987; Bond et al., 1991; Paoletti et al., 1995; Verhaar et al., 1999). Під впливом ніфедипіну і подібних йому сполук зменшується перевантаження клітин судинної стінки іонами  $\text{Ca}^{2+}$ , а отже, і їхнє ушкодження (цитопротекторна дія), послаблюються прояви ендотеліальної дисфункції (нормалізується проникність ендотелію, синтез оксиду азоту), гальмується хемотаксис макрофагів і їхнє перетворення в "піністи" клітини, уповільнюється міграція і проліферація ГМК, пригнічується синтез компонентів сполучної тканини (колагену, еластину, протеогліканів) і деструкція еластинових мембран (еластоліз), поліпшується кровообіг в мережі *vasa vasorum* (Weinstein and Heider, 1987, 1989ab; Weinstein, 1988; Kjeldsen and Stender, 1989; Sowers, 1990; Bond et al., 1991).

Крім прямої дії, пов'язаної з власне блокуванням потенціалзалежних кальцієвих каналів, БКК, і в тому числі ні-

федипін, зумовлюють низку метаболічних ефектів, а саме: змінюють в клітинах судин обмін ліпідів і ліпопротеїдів, синтез рецепторів до ЛПНГ, захоплення і деградацію останніх, гідроліз ефірів холестеролу, синтез компонентів позаклітинного матриксу; інгібують кальмодулін, цАМФ-фосфодіестеразу, захоплення нуклеотидів; блокують  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  і  $\text{Cl}^-$  - канали,  $\alpha$ - і  $\beta$ -адренорецептори, пригнічують окисне фосфорування в мітохондріях (*Weinstein and Heider, 1987; Kjeldsen and Stender, 1989*). Вважають, що наведені вище ефекти не пов'язані з дією БКК на кальцієві канали, а в своїй основі мають зовсім інші механізми (*Weinstein, 1988; Sowers, 1990; Paoletti et al., 1995*).

У багатьох експериментальних дослідженнях показано, що БКК пригнічують розвиток індукованого холестеролом атеросклерозу, зокрема зменшують явище ліпоїдозу, вміст холестеролу і кальцію в артеріальній стінці (*Henry, 1987; Weinstein and Heider, 1989ab; Bond et al., 1991; Paoletti et al., 1995*;). Слід зазначити, що серед усіх вивчених БКК найбільша антиатерогенна активність була притаманна похідним дигідропіридину, а саме ніфедипіну (*Weinstein, 1988*). Проте, є низка експериментальних досліджень, в яких не підтверджено гальмівного впливу БКК на розвиток атеросклерозу, зокрема у кролів лінії *Watanabe* (*Stender et al., 1984; Watanabe et al., 1987; Kjeldsen and Stender, 1989*). Група Джексона (*Jackson et al., 1989*), проаналізувавши велику кількість робіт, дійшла висновку, що антиатерогенна дія БКК залежить від того, за якою схемою вводять тваринам холестерол і БКК. Якщо БКК вводили до початку навантажень холестеролом або разом з ним, то в 31 роботі виявляли, а в 13-ти ні антиатеросклеротичного ефекту препаратів. Якщо ж БКК вводили тваринам з уже розвиненим холестероловим атеросклерозом, то в жодній з проаналізованих 8 робіт не знаходили ознак регресії патологічного процесу.

Ангіопротекторна дія БКК виявляє себе і за умов експериментального артеріосклерозу Менкеберга. Показано, що БКК (ніфедипін у тому числі) запобігають розвиткові кальцифікації артерій у тварин з гіпервітамінозом D, алоксановим діабетом, при інтоксикації дигідротакістеролом, нікотинном (*Fleckenstein et al., 1986; Fleckenstein et al., 1987, 1990; Parmley et al., 1985*).

Дані клінічних робіт щодо антиатеросклеротичної дії БКК суперечливі. Дослідження, проведені в рамках проекту IN-TACT (*International Nifedipine Trial on Atherosclerosis Coronary Therapy*), показали, що тривале застосування ніфедипіну зменшує швидкість розвитку атеросклеротичних уражень вінцевих артерій серця, запобігає стенозуванню судин, сприяє регресії атеросклерозу (Ram, 1990). Водночас є чимало робіт, в яких не виявили впливу БКК на перебіг атеросклеротичного процесу у людей (Weinstein and Heider, 1987). Ця обставина робить украй необхідним продовження епідеміологічних і клінічних досліджень, присвячених ангіопротекторній дії БКК.

Етан-1-гідрокси-1,1-дифосфонова кислота (ЕГДК) є одним з представників бісфосфонатів (дифосфонатів) – синтетичних сполук, що мають властивості комплексоутворювачів (хелаторів). Бісфосфонати містять у своїх молекулах хімічні структури типу Р-С-Р. Ця обставина надає бісфосфонатам властивостей, дуже близьких до характеристик природних пірофосфатів – сполук, що мають у своєму складі Р-О-Р структури. На відміну від нестійких природних пірофосфатів, синтетичні бісфосфонати виявляють високу стійкість до хімічної і ферментативної деградації, зберігаючи при цьому основні біологічні ефекти, притаманні пірофосфатам, а саме: запобігають кальцифікації м'яких тканин і зменшують надмірну резорбцію кісток (Papapoulos, 2006; Reszka and Rodan, 2003).

Серед вивчених бісфосфонатів найбільш виражена ангіопротекторна дія характерна для ЕГДК. Вона виявляє себе передовсім майже повним пригніченням розвитку кальцифікації артеріальних судин, навіть за умов такого сильного кальциногенного впливу, яким є гіпервітаміноз D (Potokar and Schmidt-Dunker, 1978; Rosenblum et al., 1975). Крім того, показано, що ЕГДК запобігає відкладанню ліпідів в інтимі артерій і формуванню фіброзних бляшок, посилює деградацію ЛПНГ, пригнічує активність макрофагів і перетворення їх в "піністи" клітини, значно зменшує деструкцію колагенових і еластинових структур судинної стінки у кролів з експериментальним холестероловим атеросклерозом (Holander et al., 1978; Kramsch, 1985; Bevilacqua, 2005). Антиартеріосклеротична дія ЕГДК виявляє себе на тлі незмінених

біохімічних показників, що характеризують ліпідний і ліпопротеїдний профіль плазми крові (*Shioi, 2003*).

Клінічні дослідження показали, що бісфосфонати, яких широко використовують для лікування остеопорозу, остеолітичних метастазів, гіперкальціємії і хвороби Педжета, пригнічують кальцифікацію артерій у хворих на цукровий діабет II типу і при хронічній нирковій недостатності (*Okada et al., 2006*).

Вважають, що ангіопротекторна дія бісфосфонатів пов'язана з двома основними механізмами. Перший з них – це прямий антикальциногенний вплив, зумовлений тим, що бісфосфонати порушують утворення фосфатних солей кальцію у судинній стінці і тим самим перешкоджають формуванню кристалів оксіапатиту як всередині клітини, так і в позаклітинному просторі (*Fleisch et al., 1970; Francis et al., 1969*). Другий механізм – опосередкований. В його основі гіпокальціємічна дія комплексоутворювачів. При зменшенні концентрації іонів  $Ca^{2+}$  у плазмі крові відбувається зменшення "інтерстиціального" пулу кальцію в судинній стінці, що робить менш вираженим кальцієве "перевантаження" клітин і запобігає реалізації кальцій-опосередкованих механізмів атерогенезу (*Fleckenstein et al., 1987*). Слід, однак, зазначити, що деякі представники бісфосфонатів (алендронат, ібандронат) не впливають на рівень кальцію і фосфатів у сироватці крові, проте зберігають виражену антикальциногенну дію на тканини кровеносних судин, запобігаючи розвиткові кальцифікації артерій під впливом варфарину і його комбінації з вітаміном D (*Price et al., 2001*).

У проведених нами дослідженнях кожен з наведених вище ангіопротекторів (вітамін Е, ніфедипін, ЕГДК) вводили тваринам разом з вітаміном D (щоденно протягом двох тижнів). Це дало змогу з'ясувати вплив зазначених препаратів на показники ПОЛ судинної стінки за умов D-вітамінної інтоксикації.

Дані, наведені в табл. 16 і 17, свідчать про те, що вітамін Е істотно зменшує вміст ГПЛ і ШО у стінках артерій і вен тварин з D-вітамінною інтоксикацією. Так, падіння вмісту ГПЛ і ШО у грудній аорті становило відповідно 55,5% і 71,7%, у черевній аорті – 64,1% і 74,2%, у легеневій артерії – 60% і 80,6%, у задній порожнистій вені – 61% і 82,6%, якщо порівнювати з тваринами, яким вводили один тільки

**Вміст ГПЛ у стінках кровоносних судин кролів за умов поєданого введення тваринам вітаміну D та одного з ангіопротекторів (вітаміну E, ніфедипіну, ЕГДК) протягом 14 діб (нмоль/мг ліпідів;  $M \pm m$ ,  $n=6$  у кожній групі)**

	Інтактні тварини	Вітамін D (контроль)	Вітамін D + ангіопротектор		
			Вітамін E	Ніфедипін	ЕГДК
Грудна аорта	11,70±1,97	51,0±6,92*	22,70±3,81*	40,40±8,00*	55,40±4,93*
% відхилення від контролю			-55,5%	-20,8%	+8,6%
Черевна аорта	14,80±3,45	55,20±7,43*	19,80±5,58 <sup>▲</sup>	34,50±6,62*	48,70±5,50*
% відхилення від контролю			-64,1%	-37,5%	-11,8%
Легенева артерія	12,80±1,96	43,70±7,91*	17,50±2,36 <sup>▲</sup>	31,30±4,01*	39,20±5,97*
% відхилення від контролю			-60,0%	-28,4%	-10,3%
Задня порожниста вена	14,60±1,75	40,80±11,46*	15,90±3,90 <sup>▲</sup>	28,30±3,46*	32,80±4,46*
% відхилення від контролю			-61,0%	-30,6%	-19,6%

Примітка: \* –  $p < 0,05$  – достовірні розбіжності відносно інтактних тварин; <sup>▲</sup> –  $p < 0,05$  – відносно контролю.



Таблиця 17

**Інтенсивність флюоресценції ШО у стінках кровноносних судин кролів за умов поєданого введення тваринам вітаміну D та одного з ангіопротекторів (вітаміну E, ніфедипіну, ЕГДК) протягом 14 діб (відн.од./ мг ліпідів;  $M \pm m$ ,  $n=6$  у кожній групі)**

	Інтактні тварини	Вітамін D (контроль)	Вітамін D + ангіопротектор		
			Вітамін E	Ніфедипін	ЕГДК
Грудна аорта	3,10±0,91	36,7±4,59*	10,4±1,69*▲	29,9±6,41*	37,6±2,38*
% відхилення від контролю			-71,7%	-18,5%	+2,5%
Черевна аорта	2,80±0,63	32,6±0,44*	8,40±1,30*▲	26,8±3,88*	31,4±2,92*
% відхилення від контролю			-72,2%	-17,8%	-3,7%
Легенева артерія	3,40±0,75	29,4±3,99*	5,70±0,77▲	21,2±3,07*	26,4±3,52*
% відхилення від контролю			-80,6%	-27,9%	-10,2%
Задня порожниста вена	2,40±0,42	23,5±4,17*	4,10±0,48▲	13,7±2,78*	15,3±1,0*
% відхилення від контролю			-82,6%	-41,7%	-34,9%

Примітка: див. табл. 16.

вітамін D. Слід, однак, зазначити, що це зменшення зовсім не означало повної нормалізації показників ПОЛ – за винятком вен (і то лише показника ГПЛ), вони й надалі залишалися далекими від рівня, характерного для судин інтактних тварин.

Що стосується двох інших ангіопротекторів – ніфедипіну і ЕГДК, то вони істотно не впливали на вміст ГПЛ і ШО в артеріальних і венозних стінках тварин з D-вітамінною інтоксикацією ( $p > 0,05$ ). Ніфедипін виявляв лише тенденцію до зниження цих показників, яка, однак, статистично не підтвердилася.

Отже, наведені вище результати дають підстави для таких висновків:

- 1) введення вітаміну E викликає істотне зменшення вмісту ГПЛ і ШО в артеріальній та венозній стінці D-гіпервітамінозних тварин;
- 2) ніфедипін та ЕГДК не впливають на інтенсивність процесів ПОЛ у кровоносних судинах тварин з гіпервітамінозом D;
- 3) за вираженістю впливу на ПОЛ у тканинах артерій і вен D-гіпервітамінозних тварин вивчені фармакологічні агенти можна розмістити в такій послідовності: вітамін E > ніфедипін > ЕГДК.

Оскільки високі дози ергокальциферолу, активуючи ПОЛ, зумовлюють розвиток значних патологічних змін, важливим було вивчити вплив ангіопротекторів з різними механізмами дії на деякі ознаки D-гіпервітамінозних уражень і ступінь кальцифікації судинної стінки.

Одними з ранніх проявів судинних змін у тварин з гіпервітамінозом D є набряк інтими та медії, ушкодження і загибель гладких м'язових клітин, деструкція еластинових структур, кальцифікація медії (Сергеев П.В. *с соавт.*, 1974; Барлыбаева Н.А. и Струков Ф.И., 1984; Давыденкова Е.Ф. и Шафран М.Г., 1989; Быць Ю.В. *с соавт.*, 1999). Дуже характерна ознака D-вітамінної інтоксикації – набряк судинної стінки (Hass *et al.*, 1958). Для оцінки цього явища визначають об'єм інулінового простору (ОІП) та вміст води в тканинах кровоносних судин. Дані про ці показники наведено в табл. 18 і 19.

Визначення процентного вмісту води в тканинах артерій і вен кролів з гіпервітамінозом D дозволило виявити явище

**Вміст води у стінках кровоносних судин кролів за умов поєданого введення тваринам вітаміну D та одного з ангіопротекторів (вітаміну E, ніфедипіну, ЕГДК) протягом 14 діб**  
 (% від маси вологої тканини;  $M \pm t$ ,  $n=6$  у кожній групі)

	Інтактні тварини	Вітамін D (контроль)	Вітамін D + ангіопротектор		
			Вітамін E	Ніфедипін	ЕГДК
Грудна аорта	75,23±0,38	78,43±0,52*	75,82±0,47*▲	76,38±0,38*▲	77,58±0,45
% відхилення від контролю			-3,3%	-2,6%	-1,1%
Черевна аорта	75,68±0,38	78,82±0,63*	76,07±0,53*▲	77,02±0,45*▲	77,98±0,54
% відхилення від контролю			-3,5%	-2,3%	-1,1%
Легенева артерія	75,60±0,36	77,87±0,40*	76,02±0,45▲	76,38±0,48*▲	77,27±0,54
% відхилення від контролю			-2,4%	-1,9%	-0,8%
Задня порожниста вена	76,40±0,27	76,98±0,58	76,18±0,46	76,80±0,51	77,37±0,44
% відхилення від контролю			-1,04%	-0,2%	-0,5%

Примітка: див. табл. 16.

**Об'єм інулінового простору у стінках кровоносних судин кролів за умов поєднаного введення тваринам вітаміну D та одного з ангіопротекторів (вітаміну E, ніфедипіну, ЕГДК) протягом 14 діб** (мл · 100 г вологої тканини<sup>-1</sup>;  $M \pm m$ ,  $n=6$  у кожній групі)

	<i>Інтактні тварини</i>	<i>Вітамін D (контроль)</i>	<i>Вітамін D + ангіопротектор</i>		
			<i>Вітамін E</i>	<i>Ніфедипін</i>	<i>ЕГДК</i>
Грудна аорта	48,53±0,83	58,43±1,03*	51,27±0,64*▲	53,38±0,81*▲	56,87±1,05*
<i>% відхилення від контролю</i>			-12,3%	-8,6%	-2,7%
Черевна аорта	47,38±0,39	58,92±1,03*	52,22±0,66*▲	54,33±0,76*▲	57,17±0,53*
<i>% відхилення від контролю</i>			-11,4%	-7,8%	-3,0%
Легенева артерія	44,18±0,36	50,22±0,74*	45,30±0,68*▲	46,72±0,48*▲	49,07±0,92*
<i>% відхилення від контролю</i>			-9,8%	-6,8%	-2,3%
Задня порожниста вена	42,83±0,33	47,57±0,55*	43,17±0,58▲	43,80±0,70▲	45,58±0,49*▲
<i>% відхилення від контролю</i>			-9,2%	-7,9%	-4,2%

Примітка: див. табл. 16.

набряку в артеріальних судинах. Так, у грудній і черевній аортах вміст води збільшився на 4%, у легеневій артерії – на 3% проти контролю. Водночас у стінці задньої порожнистої вени цей показник достовірно не відрізнявся від контрольних величин.

Дія ергокальциферолу на кровеносні судини супроводжується також зростанням ОІП в усіх вивчених артеріях і порожнистій вені. Підвищення цього показника склало: у грудній аорті – 17%, у черевній – 20%, у легеневій артерії – 16%, у порожнистій вені – 10%, якщо порівнювати з контролем. Збільшення інулінового простору може бути пов'язане з двома обставинами. Перша з них – інтерстиціальний набряк, який виникає в інтимі та медії судин при їх ушкодженні. Набряк за цих умов розвивається переважно за онкотичним механізмом, який пов'язаний з надходженням у судинну стінку компонентів плазми крові внаслідок підвищення проникності ендотелію та виходом в інтерстицій компонентів ушкоджених ГМК. Розвитку набряку сприяє внутрішньоклітинний ацидоз та підвищення гідрофільних властивостей тканинних колоїдів. Друга обставина пов'язана з проникненням інуліну в ушкоджені клітини внаслідок того, що їхні плазматичні мембрани в результаті ушкодження втрачають свої бар'єрні властивості.

Слід зазначити, що у вивчених венозних судинах зростання ОІП було найменшим при порівнянні з артеріями, а вміст води залишався на рівні контролю. Ці дані узгоджуються з фактами про те, що зазначений тип судин є більш резистентним до ушкоджувального впливу вітаміну D.

Вивчення впливу ангіопротекторів на показники, що характеризують набряк судинної стінки, дало такі результати. Введення D-гіпервітамінозним тваринам вітаміну E сприяло нормалізації ОІП в усіх типах вивчених судин. Зменшення цього показника склало: у грудній аорті – 14%, у черевній – 13%, у легеневій артерії – 11%. У задній порожнистій вені він повертався до рівня контрольних величин. Вміст води в артеріальній стінці під впливом вітаміну E також знижувався: у грудній і черевній аорті – на 3%, у легеневій артерії – на 2% проти групи D-гіпервітамінозних кролів.

Введення ніфедипіну також спричинялося до зниження ОІП та процентного вмісту води в судинній стінці D-гіпервітамінозних тварин. Зменшення ОІП становило в груд-

ній аорті – 9%, у черевній аорті – 8%, у легеневій артерії – 7%. У порожнистій вені цей показник знижувався до рівня контрольних величин. Крім того, ніфедипін зумовлював зменшення вмісту води в усіх досліджуваних артеріях приблизно на 2%.

Поєднане введення тваринам вітаміну D і ЕГДК не впливало на ОІП та вміст води в артеріях. У венах під впливом ЕГДК інуліновий простір зменшувався на 4%, якщо порівнювати з групою D-гіпервітамінозних тварин.

Отже, серед використаних в експерименті ангіопротекторів, вітамін E найбільш ефективно запобігав зростанню ОІП та вмісту води в стінці кровоносних судин. Ніфедипін мав менший, але виражений вплив на зазначені показники. ЕГДК не впливав на інуліновий простір та процентний вміст води в артеріях, але сприяв зниженню ОІП у задній порожнистій вені.

Гіпервітаміноз D закономірно супроводжується кальцифікацією кровоносних судин (артерій, а не вен!), одним з проявів якої є збільшення вмісту кальцію в судинній стінці. З огляду на це нами було проведено вивчення даного показника в тканинах артеріальних і венозних судин у тварин з D-вітамінною інтоксикацією.

Наведені в табл. 20 результати свідчать про те, що високі дози ергокальциферолу спричиняються до значного зростання вмісту загального кальцію у всіх вивчених судинах. Так, цей показник у грудній аорті зростав у 13 разів, у черевній аорті – у 9 разів, у легеневій артерії – у 7 разів, у задній порожнистій вені – у 3 рази.

Використання ангіопротекторів показало, що вітамін E, який в умовах гіпервітамінозу D ефективно зменшував у судинній стінці вміст продуктів ПОЛ, ОІП та вміст води достовірно не впливав на вміст у ній кальцію (тенденцію до зниження цього показника статистично не підтверджено). Ніфедипін, який мав менший вплив на ці всі показники, зумовлював зменшення вмісту кальцію в стінці артерій (у грудній аорті – у 3 рази, у черевній аорті – у 2,3 раза, в легеневій артерії – у 2,1 раза при порівнянні з групою D-гіпервітамінозних тварин) і не впливав на рівень кальцію в задній порожнистій вені. І нарешті, дія ЕГДК, що за умов D-вітамінної інтоксикації не позначалася на інтенсивності процесів ПОЛ, інуліновому просторі та вмісту води, викликала

**Вміст кальцію у стінках кровоносних судин кролів за умов поєданого введення тваринам вітаміну D та одного з ангіопротекторів (вітаміну E, ніфедипіну, ЕГДК) протягом 14 діб (ммоль · г сухої тканини<sup>-1</sup>; M±m, n=6 у кожній групі)**

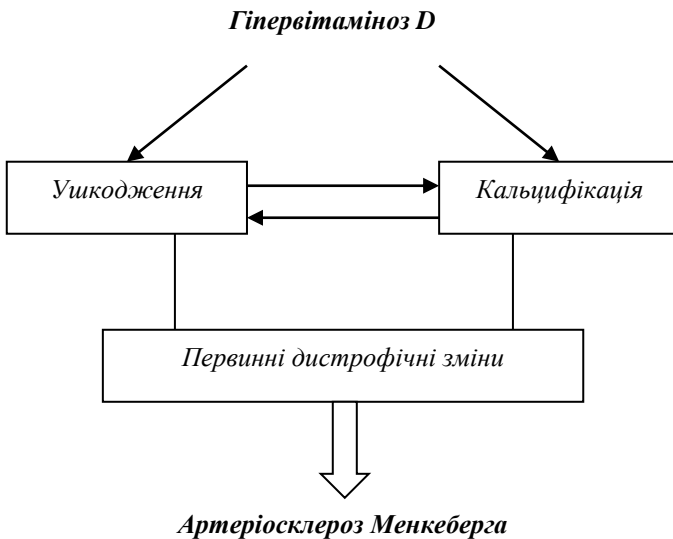
	Інтактні тварини	Вітамін D (контроль)	Вітамін D + ангіопротектор		
			Вітамін E	Ніфедипін	ЕГДК
Грудна аорта	0,35±0,05	4,52±0,64*	3,25±0,53*	1,51±0,30*▲	0,86±0,15*▲
% відхилення від контролю			-28,1%	-66,6%	-80%
Черевна аорта	0,45±0,10	4,11±0,81*	2,72±0,18*	1,77±0,23*▲	1,12±0,16*▲
% відхилення від контролю			-33,8%	-56,9%	-72,8%
Легенева артерія	0,25±0,05	2,16±0,18*	1,83±0,20*	1,05±0,15*▲	0,66±0,12*▲
% відхилення від контролю			-15,3%	-51,4%	-69,4%
Задня порожниста вена	0,15±0,03	0,45±0,10*	0,32±0,08*	0,36±0,05*	0,22±0,03▲
% відхилення від контролю			-28,9%	-20%	-51,1%

Примітка: див. табл. 16.

значне зниження вмісту кальцію в усіх типах вивчених судин: у грудній аорті – у 5,3 раза, у черевній аорті – у 3,7 раза, у легеневій артерії – у 3,3 раза, у порожнистій вені – у 2,1 раза проти групи D-гіпервітамінозних тварин.

Отже, за впливом на інтенсивність кальцифікації судинної стінки вивчені фармакологічні агенти можна розмістити в такій послідовності : ЕГДК > ніфедипін > вітамін Е.

Таким чином, за умов D-вітамінної інтоксикації чинники, які сприяють зниженню вмісту продуктів ПОЛ, ОІП та вмісту води в тканинах кровеносних судин, не впливають на рівень кальцію в них (вітамін Е). Разом з тим, застосування ангіопротекторів, які суттєво не впливають на показники, що характеризують ушкодження, призводить до значного зниження вмісту кальцію в судинних стінках (ЕГДК).



*Рис. 13. Схема зв'язку між ушкодженням і кальцифікацією судинної стінки в процесі розвитку артеріосклерозу Менкеберга*



Аналіз результатів дослідів по вивченню впливу агентів з різними механізмами ангіопротекторної дії на інтенсивність ПОЛ та кальцифікацію стінок кровоносних судин дозволяє прийти до важливого висновку про те, що за умов гіпервітамінозу D між процесами ушкодження судинної стінки та її кальцифікацією нема прямих причиново-наслідкових зв'язків. Водночас зміни, які виникають в стінках кровоносних судин при ушкодженні високими дозами ергокальциферолу, створюють умови для їх кальцифікації, а сама кальцифікація може посилювати ушкодження.

Таким чином, одержані нами дані свідчать про те, що процеси ушкодження і кальцифікації судинної стінки відбуваються паралельно, посилюють один одного і їх наслідком є важкі ураження судин, відомі як артеріосклероз Менкеберга (рис. 13).

## ГЛАВА 4

### ЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНИХ І МІСЦЕВИХ ЧИННИКІВ У РОЗВИТКУ КАЛЬЦИФІКАЦІЇ АРТЕРІАЛЬНОЇ СТІНКИ, ЗУМОВЛЕНОЇ ГІПЕРВІТАМІНОЗОМ D

До загальних чинників кальцифікації кровоносних судин, зумовлених токсичною дією вітаміну D, відносять перш за все порушення, що виникають у результаті розладів фосфорно-кальцієвого обміну в організмі. Останні, як відомо, є наслідком впливу гормонально активної форми вітаміну D на дві основні біологічні мішені – кишковик і кісткову тканину. Дія на клітини тонкої кишки спричиняється до значного посилення всмоктування кальцію і фосфатів, а взаємодія з клітинами кісток веде до резорбції і демінералізації останніх.

З огляду на це характеристиками, що відображають стан фосфорно-кальцієвого обміну в організмі, можуть бути дві групи показників. З одного боку, це – показники сироватки крові, а з другого – властивості кісток, які залежать від складу і структури їх мінеральних компонентів.

Саме ці дві групи показників і стали об'єктом наших досліджень при з'ясуванні ролі загальних чинників у розвитку кальцифікації судин за умов гіпервітамінозу D.

До найбільш загальних показників, що характеризують фосфорно-кальцієвий обмін в організмі, відносять вміст у сироватці кальцію (загального та іонізованого), концентрацію неорганічного фосфору ( $P_i$ ) і так званий кальцій-фосфатний добуток, що являє собою добуток концентрацій кальцію і неорганічних фосфатів у сироватці крові –  $[Ca] \times [P_i]$ .

Результати проведеного нами визначення цих трьох показників у щурів, що отримували токсичні дози вітаміну D (300000 МО/кг) протягом 3 і 7 днів, представлено в табл. 21.

**Вміст кальцію і неорганічного фосфору в сироватці щурів за умов гіпервітамінозу D**  
(ммоль/л,  $M \pm m$ ,  $n=6$  у кожній групі)

Показник	Контроль (I група)	Вітамін D	
		3 доби (II група)	7 діб (III група)
Вміст кальцію	2,44 ± 0,04	2,71 ± 0,05*	3,41 ± 0,12**▲
Вміст неорганічного фосфору	3,11 ± 0,11	5,18 ± 0,31*	10,1 ± 0,43**▲
[Ca] x [P <sub>i</sub> ]	7,59 ± 1,34	14,04 ± 1,43**	34,5 ± 2,27**▲

Примітка: \* ( $p < 0,01$ ), \*\* ( $p < 0,001$ ) – статистично достовірні розбіжності відносно контролю; ▲ – між II і III групами тварин ( $p < 0,001$ )

Як впливає з наведених результатів, токсична дія вітаміну D супроводжується значним зростанням концентрації кальцію і неорганічного фосфору в сироватці крові. Так, вміст загального кальцію в сироватці щурів зростав на 11% через 3 доби і майже на 40% через 7 діб від початку введення тваринам ергокальциферолу. Враховуючи те, що рівень кальцію крові є важливим гомеостатичним параметром, який підтримується щонайменше трьома гормонами (паратгормоном, кальцитоніном і гормонально активною формою вітаміну D), виявлене істотне збільшення цього показника було свідченням значних порушень гомеостазу, які виявляють себе розвитком гіперкальціємії.

Паралельно зі зростанням вмісту кальцію збільшувалася і концентрація неорганічного фосфору у сироватці крові щурів, що отримували високі дози вітаміну D. Так, рівень цього показника при порівнянні з контрольними значеннями був вищим на 67% через 3 доби і більш ніж у 3 рази через 7 діб від початку експерименту. Це дало підстави стверджувати, що D-вітамінна інтоксикація супроводжується розвитком значної гіперфосфатемії.

Аналіз можливих механізмів гіперкальціємії і гіперфосфатемії у тварин з гіпервітамінозом D дозволяє виділити ни-

зку чинників, що можуть мати стосунок до розвитку цих змін.

Очевидно, що збільшення рівня кальцію крові за умов D-вітамінної інтоксикації у своїй основі має два механізми:

1) збільшене надходження кальцію з тонкої кишки в кров, що зумовлюється дією високих концентрацій  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  на ентероцити;

2) посилене надходження кальцію в кров з кісток унаслідок резорбції і демінералізації кісткової тканини.

Що стосується першого механізму, то в нашій роботі він не досліджувався, оскільки в літературі є багато даних про його реалізацію в умовах гіпервітамінозу D (*Norman and Powell, 2005; Zittermann and Koerfer, 2008*) (див. також главу 1). Вважають, що посилене всмоктування  $\text{Ca}^{2+}$  у кишковому є основним механізмом, завдяки якому вітамін D зумовлює збільшення концентрації іонізованого кальцію в плазмі крові.

Другий з наведених вище механізмів гіперкальціємії – надходження кальцію з кісток – був об'єктом нашого вивчення, а тому мова про нього піде далі.

Тут слід зазначити, що розвитку гіперкальціємії як такої сприяє недостатність захисних компенсаторних механізмів, що мали би нормалізувати рівень кальцію крові. Такими, як відомо, є (а) зменшення секреції паратгормону, (б) пригнічення перетворення в нирках  $25(\text{OH})\text{D}$  в  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  з одночасним збільшення утворення  $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ , (в) посилення секреції кальцитоніну.

До цього часу залишається без відповіді питання, чому в умовах гіпервітамінозу D не реалізуються зазначені вище захисні реакції. Адже, за цих умов підвищення рівня кальцію в крові має вести до зменшення утворення  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  в нирках і не тільки тому, що спрацьовують генетично запрограмовані механізми, а й через розвиток спричиненої токсичними дозами вітаміну D ниркової недостатності. Остання, як відомо, характеризується недостатністю гормонально активної форми вітаміну D, що зумовлює необхідність введення таким хворим кальцитріолу (*Mizobuchi M. et al., 2009*).

Натомість надлишок вітаміну D мав би перетворюватися в нирках у  $24,25(\text{OH})_2\text{D}$  – сполуку, яка гальмує секрецію паратгормону і посилює інактивацію стероїдів, у тому числі

вітаміну D у печінці. Але цього, мабуть, не відбувається через ту ж таки ниркову недостатність.

З огляду на вище зазначене нами висунуто гіпотезу про те, що високий рівень  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  в умовах D-вітамінної інтоксикації може бути пов'язаний з утворенням цієї сполуки в інших, ніж нирки, органах і тканинах, зокрема в стінках кровоносних судин. Так, у дослідях *in vitro* в ендотеліальних клітинах артерій виявлено експресію  $1\alpha$ -гідроксилази – ферменту, що перетворює  $25(\text{OH})\text{D}_3$  в  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Merke et al., 1987). Це дало підстави обговорювати існування в судинах власної мікроендокринної системи, що продукує гормонально активну форму вітаміну D (Norman and Powell, 2005). Крім ендотеліоцитів,  $1\alpha$ -гідроксилазу експресують і активовані макрофаги (Gyetko et al., 1993), кількість яких у тканинах збільшується під впливом того ж таки  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Shioi et al., 2002).

Надходженню великих кількостей вітаміну D саме в судинну стінку може сприяти той факт, що екзогенний вітамін, на відміну від ендогенного, переноситься в організмі не циркулюючим вітамін D-зв'язувальним білком (*vitamin D-binding protein*), а ліпопротеїнами (Haddad et al., 1993). Це може полегшувати акумулювання вітаміну D в тканинах судин і змінювати експресію генів макрофагів (Shioi et al., 2002; Hirsch et al., 1993; Demer, 1995).

Розвиток гіперкальціємії в експериментальних тварин є чинником не тільки ектопічної кальцифікації кровоносних судин, а й ушкодження клітин, яке лежить в основі ранніх дистрофічних змін судинної стінки. Так, при підвищенні позаклітинної концентрації іонів кальцію виникають усі передумови для реалізації так званих "кальцієвих" механізмів ушкодження, до яких відносять (а) контрактуру скорочувальних елементів клітин, зокрема гладких м'язів судин; (б) активацію фосфоліпази  $A_2$  з наступним вмиканням "ліпідних" механізмів ушкодження; (в) роз'єднання окиснення і фосфорилування, що веде до розвитку енергодефіцитного стану в клітинах (Меерсон Ф.З., 1984). Накопиченню іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у клітинах сприяє надмірне їх надходження з позаклітинного середовища в цитоплазму за збільшеним градієнтом концентрації і підвищення навантаження на кальційтранспортні системи, що працюють проти цього градієнту.

Причинами виявленого нами збільшення вмісту неорганічних фосфатів у сироватці крові можуть бути:

1) посилене їх всмоктування, зумовлене дією  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  на епітеліальні клітини тонкої кишки, та вихід їх з кісткової тканини як наслідок резорбції і демінералізації останньої – тобто ті самі чинники, що спричиняють розвиток гіперкальціємії;

2) порушення виведення фосфатів нирками, що має місце за умов розвитку ниркової недостатності, при якій істотно зменшується швидкість клубочкової фільтрації.

Що стосується першої причини, то відомо, що гормонально активна форма вітаміну D посилює всмоктування фосфатних аніонів у кишковоки. Цей процес, як вважають, є спряженим зі всмоктуванням іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Про це зокрема свідчить той факт, що оптимальною для всмоктування обох типів іонів є співвідношення між кальцієм і фосфором неорганічних фосфатів 1,5:1. Можливо, під впливом вітаміну D посилюється діяльність генів, що кодують структуру білків-транспортних мембран ентероцитів. Тут слід мати на увазі, що концентрація аніонів фосфатів, на відміну від іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , є вищою всередині клітин епітелію тонкої кишки, ніж поза ними (відповідно 74 і 4 мекв/л). Це означає, що транспорт фосфатів у клітини є процесом активним (здійснюється механізмом натрій-фосфатного симпорту), а їх вихід з клітин в інтерстицій відбувається пасивно механізмом полегшеної дифузії.

Основним чинником, що зумовлює порушення виведення фосфатів нирками, є недостатність функції цих органів. Істотне зменшення швидкості клубочкової фільтрації, як відомо, є характерним для гіпервітамінозу D, а тому може розглядатися як один з провідних факторів гіперфосфатемії.

Розвиток гіперкальціємії і гіперфосфатемії закономірно веде до збільшення добутку  $[\text{Ca}^{2+}] \times [\text{P}_i]$ . Цей показник має важливе значення для обміну іонів кальцію та неорганічних фосфатів між кістковою тканиною і кров'ю. Річ у тім, що кальцій і фосфатні аніони аморфних солей легко обмінюються з відповідними іонами позаклітинної рідини і таким чином беруть участь у здійсненні постійного обміну між кістками і плазмою крові. Спрямованість такого обміну залежить від величини добутку концентрацій іонізованого кальцію та фо-

сфатних аніонів у плазмі крові –  $[Ca^{2+}] \times [P_i]$ . Якщо кальцій-фосфатний добуток є більшим за величину, при якій зберігається рівновага між кількістю  $Ca^{2+}$  та аніонів фосфату, що перейшли з позаклітинної рідини в кістки, та їхньою кількістю, що перейшла у зворотному напрямку – з кісток у плазму крові, то зазначені іони загалом мали би переміщуватися з позаклітинної рідини в кістки і осаджуватися там у вигляді фосфатних солей кальцію. Однак, при гіпервітамінозі D цього чомусь не відбувається, про що свідчить факт демінералізації кісткової тканини (див. далі).

Таким чином, одержані нами дані свідчать про те, що експериментальне відтворення у щурів гіпервітамінозу D супроводжується розвитком гіперкальціємії і гіперфосфатемії – порушень, що є віддзеркаленням значних розладів фосфорно-кальцієвого обміну в організмі. У розвитку останніх важливе значення можуть мати процеси, що відбуваються в кістковій тканині. З огляду на це саме кістки стали наступним об'єктом наших досліджень.

Кісткова тканина, як відомо, складається з органічного і мінерального компонентів, на частку яких припадає відповідно 30% і 70% (Ньюман У. и Ньюман М., 1961). Органічний матрикс утворено колагеновими волокнами і проміжною основною речовиною, до складу якої входить велика кількість протеогліканів та гіалуронової кислоти. Компоненти органічного матриксу продукуються остеобластами. Основним мінералом кісткової тканини є гідроксіапатит  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ . Його кристали утворюються шляхом тривалого (протягом тижнів і місяців) перетворення аморфних солей кальцію, таких як  $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$  та  $Ca_3(PO_4)_2 \cdot 3H_2O$ . Останні утворюються в результаті осадження (преципітації) кальцію і неорганічних фосфатів за умов достатньо високої їх концентрації в позаклітинній рідині.

Важливо зазначити, що в нормі вміст  $Ca^{2+}$  та фосфатних аніонів у позаклітинній рідині є вищим за концентрацію, при якій відбувається преципітація. Проте відкладання солей в тканинах перешкоджають неорганічні й білкові інгібітори кальцифікації, мова про які йшла в главі 1. Що стосується кісткової тканини, то вважають, що пригнічення утворення і вивільнення таких інгібіторів остеобластами і є головною передумовою мінералізації кісток.

Хоча на частку аморфних солей кальцію припадає всього лише 0,5-1% від загального вмісту кальцію в кістках, вони мають велике значення у підтриманні сталості концентрації іонів кальцію та фосфатів у позаклітинній рідині, відіграючи роль своєрідного буферу. Це пов'язано з тим, що кальцій і фосфатні аніони аморфних солей легко обмінюються з відповідними іонами позаклітинної рідини і таким чином беруть участь у здійсненні постійного обміну між кістками і плазмою крові. Спрямованість такого обміну залежить від величини кальцій-фосфатного добутку (див. вище).

Крім гідроксіапатиту і фосфатів кальцію, мінерали кісток містять магній, натрій, калій та карбонатні аніони. Проте, вони не утворюють власних солей і кристалів, а зв'язуються з молекулами гідроксіапатиту. Така здатність взаємодіяти з кристалами гідроксіапатиту притаманна не тільки наведеним вище іонам, а й деяким іншим, зокрема, тим, що можуть за несприятливих умов надходити в організм ззовні. Серед них – стронцій, уран, плутоній та інші трансуранові елементи; свинець, золото та інші важкі метали.

Дія вітаміну D на кістки залежить від його дози. Невеликі кількості гормону посилюють процеси мінералізації, тобто відкладання солей кальцію в хрящовій і кістковій тканинах. В основі цього ефекту, як вважають, є збільшення концентрації іонів  $Ca^{2+}$  і фосфатних аніонів у плазмі крові, завдяки посиленому їх всмоктуванню в кишковому. Зростання вмісту зазначених іонів веде до збільшення добутку їхніх концентрацій, що у свою чергу стає причиною переходу кальцію і фосфатів з крові у кісткову тканину і відкладання там аморфних солей кальцію з наступним поступовим перетворенням їх в кристали гідроксіапатиту.

Великі концентрації вітаміну D, навпаки, зумовлюють демінералізацію і резорбцію кісткової тканини (*Masterjohn, 2007*). Механізм такого ефекту досі невідомий. Припускають, що під впливом високих доз вітаміну D посилюються процеси диференціювання кісткових стовбурових клітин в остеокласти та їхня функціональна активність. Завдяки останній і відбувається резорбція кісткової тканини.

У виконаних нами дослідженнях було вивчено вміст кальцію, магнію і мікроелементів у стегових кістках щурів, що отримували токсичні дози вітаміну D (300000 МО/кг) протягом 7 днів. Як впливає з табл. 22, вміст кальцію у кіс-



тканині експериментальних тварин зменшувався на 19% проти контролю. У тому ж напрямі змінювався вміст магнію (на 11%), міді (у 3,5 рази) і марганцю (більш ніж у 4 рази). Що стосується двох інших мікроелементів – заліза та цинку, – то їхній вміст у кістках D-гіпервітамінозних тварин залишався без змін.

Виявлене нами зменшення вмісту кальцію у кістковій тканині щурів з гіпервітамінозом D є свідченням процесів демінералізації, що відбуваються в умовах D-вітамінної інтоксикації. Механізми цього явища, як зазначалося вище, ще не відомі, але не викликає сумніву той факт, що в результаті втрати кальцію кістковою тканиною вміст цього елементу в крові має зростати. Наведені вище дані про концентрацію кальцію в сироватці крові можна вважати підтвердженням цього факту.

Таблиця 22

**Вміст кальцію, магнію і деяких мікроелементів у стгенових кістках щурів з гіпервітамінозом D**

(мг/0,1 г сухої речовини,  $M \pm m$ ,  $n=6$  у кожній групі)

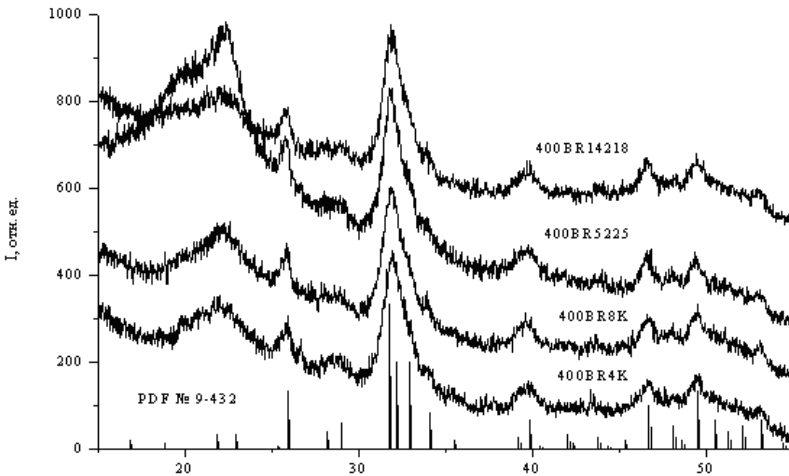
<i>Хімічний елемент</i>	<i>Контроль</i>	<i>Гіпервітаміноз D</i>
Кальцій	444,3 ± 3,7	360,5 ± 12,3**
Магній	14,4 ± 0,14	12,8 ± 0,36**
Залізо	0,65 ± 0,03	0,68 ± 0,03
Цинк	1,07 ± 0,018	1,78 ± 0,52
Мідь	0,31 ± 0,018	0,089 ± 0,0004**
Марганець	0,28 ± 0,009	0,068 ± 0,008**

Примітка: \* ( $p < 0,01$ ), \*\* ( $p < 0,001$ ) – статистично достовірні розбіжності відносно контролю.

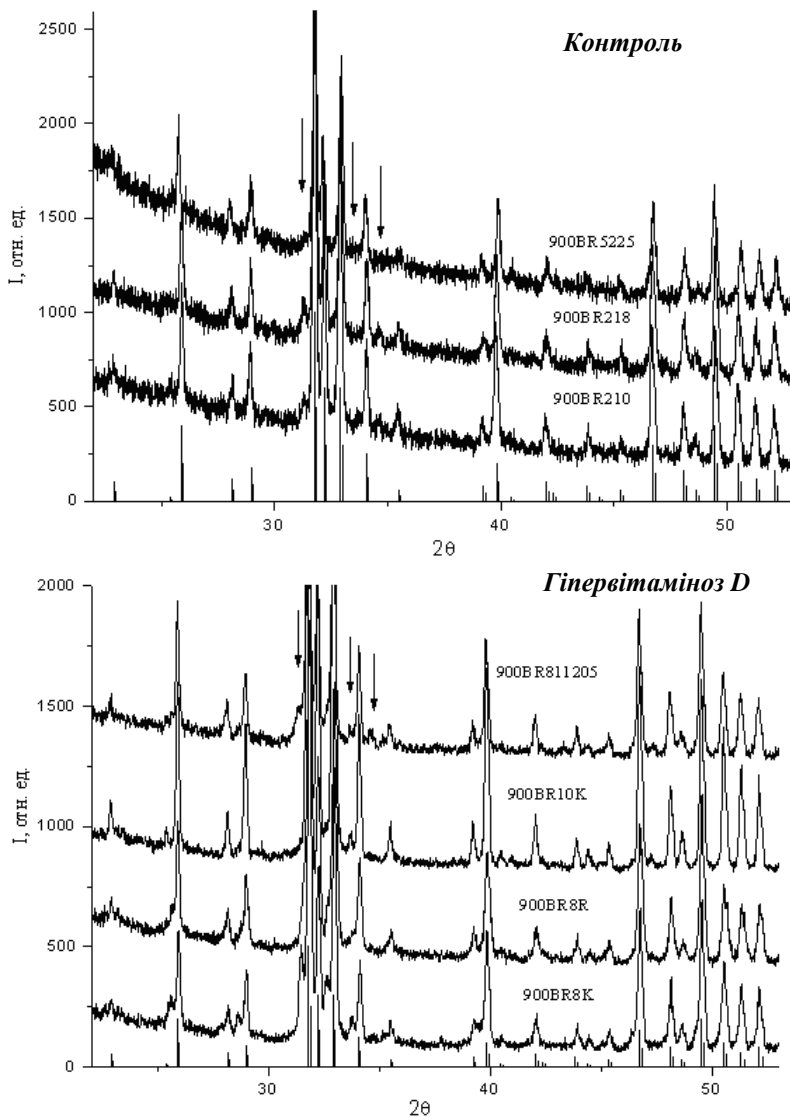
Магній та вивчені нами мікроелементи також є мінеральними компонентами кісткової тканини. Не маючи самостійного значення, вони можуть зв'язуватися з кристалами гідроксіапатиту і змінювати його властивості (Ньюман У. и Ньюман М., 1961). Той факт, що у досліджених кістках вміст магнію, марганцю і міді істотно зменшується нашою думку про можливі зміни структури кристалів кісткового мінералу (біоапатиту) в умовах D-вітамінної інтоксикації.

Для перевірки такої можливості нами проведено рентгенодифракційне вивчення зразків нанодисперсного біоапатиту стегнової кістки після спалювання її при температурах 400 і 900 °С.

Природні кристали біологічного апатиту мають дуже малі розміри (20-30 нм) і дефектну структуру (мікрODEформації, вакансії, заміщення в ґратці). Відпал дефектів з рекристалізацією і утворенням інших (не апатитних) кристалічних фаз дозволяє виявити деякі особливості структури вихідного апатиту (Danilchenko et al., 2006; Danilchenko et al., 2009). У наших дослідженнях зразки біоапатиту кісток відпалювалися при 400 °С і 900 °С. Рентгенівські дифрактограми зразків наведено на рис. 14 і 15.



**Рис. 14.** Дифрактограми зразків нанодисперсного біоапатиту. Відпал – 400 °С; внизу – теоретична штрих-дифрактограма стандартного гідроксіапатиту; 1,2 – зразки від контрольних тварин, 3,4 – від тварин з гіпервітамінозом D



**Рис. 15.** Дифрактограми зразків нанодисперсного біоапатиту. Відпал – 900 °С; вертикальними стрілками позначено положення ліній  $\beta$ -ТКМФ; внизу – теоретична штрих-дифрактограма стандартного гідроксіапатиту

У зразках, що відпалювалися при температурі 400 °С виявлено одну єдину фазу – нанокристалічний апатит. Зразки, відпалені при 900 °С, являють собою двофазну систему гідроксіапатит (ГОА) + β-трикальціймагнійфосфат (β-ТКМФ,  $(Ca,Mg)_3(PO_4)_2$ ) зі змінним ступенем заміщення кальцію магнієм (*Selected Powder Diffraction Data*, 1988).

Для кількісного визначення співвідношення фаз ГОА і β-ТКМФ використовували попередньо побудовану експериментальну залежність між інтенсивністю основних дифракційних ліній і вмістом ГОА та β-ТКМФ у калібровочних сумішах. Застосований метод дозволяє визначити концентрацію обох фаз у двофазовій речовині (*Raynaud et al.*, 2001). Спочатку було створено серію зразків двокомпонентних сумішей з різним співвідношенням фаз. Для кожної суміші був розрахований параметр  $p$ :

$$p = \frac{I_1}{I_1 + I_2},$$

де  $I_1$  – інтенсивність основного піку першої фази,  $I_2$  – інтенсивність основного піку другої фази.

Далі було побудовано калібровочну залежність концентрації першої фази від  $p$ , після чого отримано рівняння прямої апроксимації:

$$C_1 = a \cdot p + b,$$

де  $a$  і  $b$  – константи.

На підставі отриманого емпіричного рівняння було виконано розрахунок концентрації обох фаз у досліджених зразках. Ступінь заміщення кальцію магнієм в  $Ca_{3-x}Mg_x(PO_4)_2$  визначали з довідкових стандартних карток, якщо експериментальні лінії β-ТКМФ строго відповідали довідковій фазі, або ж керувалися раніше описаним методом (*Daniilchenko et al.*, 2009). Узагальнені дані проведених досліджень представлено в табл. 23.

Як видно з наведених результатів, відпал біоапатиту при 900 °С виявляє дефіцит кальцію у вихідних зразках (відношення  $Ca/P$  є меншим, ніж у стехіометричному ГОА), унаслідок чого і утворюється двофазова система ГОА + β-ТКМФ (співвідношення  $Ca/P$  може бути визначено із співвід-

ношення фаз ГОА /  $\beta$ -ТКМФ). Крім того, у вихідних зразках відсутній магній, який у процесі відпалу спочатку займає в ґратці апатиту вакансійні позиції, а потім переходить у новоутворену фазу  $\beta$ -ТКМФ. Відомо, що при відпалі високомінералізованої кісткової тканини здорових тварин, як і при відпалі синтетичного стехіометричного гідроксіапатиту, інших фаз (не апатитних), як правило, не утворюється (Danilchenko et al., 2006).

Таблиця 23

**Концентрація двох фаз біоапатиту у досліджуваних зразках**

№ n/n	Зразок	Концентрація ГОА $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , ваг. %	Концентрація $\beta$ -ТКМФ, $Ca_{3-x}Mg_x(PO_4)_2$ , ваг. %	Ступінь замі- щення $Ca \rightarrow Mg$ в $\beta$ -ТКМФ, ат. %
1	900BR5225	93,4	6,6	7,35
2	900BR218	95,1	4,9	6,36
3	900BR210	98,35	1,65	6,29
4	900BR8K	87,0	13,0	7,0
5	900BR8R	91,0	9,0	7,26
6	900BR10K	98,1	1,9	7,35
7	900BR811205	98,5	1,5	6,62

Примітка:

- 1-3 – зразки від контрольних тварин; 4-7 – від тварин з D-гіпервітамінозом
- у зразках після відпалу при 400 °C нема інших фаз, крім нанокристалічного ГОА;
- у крайньому правому стовпчику вказано відсоток заміщення кальцію магнієм в  $Ca_{3-x}Mg_x(PO_4)_2$ , визначений за зміщенням дифракційних ліній від стандартних позицій.

Таким чином, у наших дослідженнях методами рентгендифракційного аналізу (у комбінації з термічним відпалом структурних дефектів) ніяких істотних кристалохімічних

особливостей в біоapatиті кісток D-гіпервітамінозних тварин не виявлено. Очевидно, при інтоксикації вітаміном D структура і склад нанокристалів біогенного апатиту не змінюється, а порушення кісток, що виникають, зумовлені зменшенням кількості мінеральних складових кісткової тканини, а не змінами її якісних характеристик.

Демінералізація кісток, ознаками якої є зменшення вмісту в них кальцію, магнію і деяких мікроелементів, а також резорбція кісткової тканини, якщо вона відбувається у D-гіпервітамінозних тварин, мають вести до змін біомеханічних властивостей кісток. Аби з'ясувати, чи це так, ми провели вивчення кількох показників, що відображають ці властивості, а саме: мікротвердості і сили розриву.

У табл. 24 представлено результати цих досліджень. Як впливає з наведених даних, показник мікротвердості стегнових кісток у щурів з D-вітамінною інтоксикацією зменшувався вдвічі через 7 діб від початку експерименту. Одночасно з цим відзначали зменшення зовнішньої сили, яку треба докласти, щоб розірвати кістку. Про це свідчило зменшення відповідного показника на 34%, якщо порівнювати з контролем.

Таблиця 24

**Показники біомеханічних властивостей стегнових кісток у щурів в умовах D-вітамінної інтоксикації**  
( $M \pm t$ ,  $n=6$  у кожній групі)

<i>Показник</i>	<i>Контроль</i>	<i>Гіпервітаміноз D</i>
Мікротвердість (кгс/мм <sup>2</sup> )	154,8 ± 0,68	76,5 ± 2,45*
Сила розриву (ум.од.)	133 ± 1,46	88 ± 5,2*

Примітка: \* –  $p < 0,001$  при порівнянні з контролем.

Таким чином, маємо підстави стверджувати, що токсична дія вітаміну D через 7 днів від початку введення щурам ергокальциферолу виявляє себе значними порушеннями кісткової тканини. Такими, зокрема, є зменшення вмісту у

кістках кальцію, магнію, марганцю і міді, зменшення мікротвердості кісток і сили їх розриву. При цьому рентгендіфракційні властивості кристалів біоapatиту залишаються незмінними.

Виявлені зміни кісткової тканини слід розглядати як прояви безпосереднього впливу токсичних доз вітаміну D на кістки. Водночас ці зміни самі виступають причиною загальних порушень фосфорно-кальцієвого обміну в організмі, оскільки ведуть до гіперкальціємії і гіперфосфатемії. З огляду на це їх можна вважати загальними по відношенню до судинної стінки чинниками кальцифікації судин.

По суті виникає парадоксальна картина: у кістках відбувається руйнування мінеральних їх компонентів, вимивання кальцію і фосфатів у кров, а в кровоносних судинах, навпаки, надлишок цих іонів осаджується з утворенням аморфних солей з наступним їх перетворенням у гідроксіapatит – іншими словами, проходить зворотний процес мінералізації. Такий зв'язок кісткових чинників із судинною стінкою є дуже цікавим аспектом кальцифікації судин, а тому він став ще одним об'єктом наших досліджень.

Відомо, що відкладання солей кальцію в м'яких тканинах – кальцифікація, або обапнення, – є процесом, який залежить як від загальних (стан фосфорно-кальцієвого обміну), так і місцевих факторів. Залежно від співвідношення між ними розрізняють такі варіанти кальцифікації (*Струков А.И. и Серов В.В., 1995*):

1) метастатичний. Розвивається внаслідок загальних розладів фосфорно-кальцієвого обміну, що виявляють себе гіперкальціємією і гіперфосфатемією;

2) дистрофічний. Являє собою відкладання солей кальцію в змертвілі тканини або в такі, що перебувають у стані глибоких дистрофічних змін. При цьому чинник гіперкальціємії і гіперфосфатемії відсутній.

Крім цих двох варіантів, існують і такі, що розвиваються на тлі нормальних показників фосфорно-кальцієвого обміну і за відсутності дистрофічних змін у тканинах. Дехто пропонує об'єднати такі випадки поняттям метаболічна кальцифікація (*Струков А.И. и Серов В.В., 1995*). Цей термін, однак, зовсім не відображає сутності подій, що відбуваються.

Стосовно D-гіпервітамінозних уражень судин до цього часу немає одностайної думки про провідний механізм пато-

генезу кальцифікації судинної стінки. З одного боку, інтоксикація вітаміном D супроводжується розвитком гіперкальціємії і гіперфосфатемії, тобто чинників, що зумовлюють метастатичний варіант мінералізації м'яких тканин. З другого боку, у багатьох роботах показано, що D-гіпервітаміноз спричиняється до ушкодження клітин і позаклітинного матриксу артеріальних судин, що само по собі може бути основою дистрофічної кальцифікації (Спиричев В.Б., 1971; Hass et al., 1958).

Серед універсальних механізмів ушкодження клітин цільне місце посідає пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) – процес вільнорадикального окиснення ненасичених жирних кислот, що входять до складу фосфоліпідів клітинних мембран. Відомо, що в основі активації ПОЛ можуть лежати два механізми: посилене генерування первинних вільних радикалів (здебільшого кисневих) і недостатність антиоксидантних систем (див. главу 3). Різні патогенні чинники, що мають здатність активувати ПОЛ, можуть ініціювати цей процес через один з цих двох механізмів.

У проведених нами дослідженнях було вивчено вміст проміжних (гідропероксиди ліпідів) і кінцевих (шиффові основи) продуктів ПОЛ в тканинах аорти щурів у динаміці гострої інтоксикації вітаміном D (300000 МО/кг протягом 3 і 7 днів).

Як впливає з наведених в табл. 25 даних, гіпервітаміноз D супроводжується значним збільшенням вмісту гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) в аортальній стінці експериментальних тварин. Так, вже через 3 доби від початку введення ергокальциферолу вміст ГПЛ у тканинах артерій був у 3,3 рази більший, ніж у контрольній групі, а через 7 діб він перевищував контрольні величини більш ніж у 7 разів.

Схожа картина характерна і для іншого показника ПОЛ. Зростання вмісту шиффових основ в тканинах аорти D-гіпервітамінозних щурів становило 2,6 рази через 3 доби експерименту і 6,4 разів – через 7 діб.

Таким чином, є всі підстави констатувати, що гостра інтоксикація вітаміном D супроводжується активацією ПОЛ в артеріальних судинах, про що свідчить значне зростання в їх тканинах вмісту проміжних (гідропероксиди ліпідів) і кінцевих (шиффові основи) продуктів цього процесу.



**Вміст продуктів ПОЛ в аортальній стінці щурів за умов введення високих доз вітаміну D (300000 МО/кг) ( $M \pm m$ ,  $n=6$  у кожній групі)**

Показник	Контроль (I група)	Вітамін D	
		3 доби (II група)	7 діб (III група)
Гідропероксиди ліпідів (нмоль/мг ліпідів)	1,63 ± 0,3	5,42 ± 0,9*	12,1 ± 0,9*▲
Шиффові основи (відн. од./мг ліпідів)	8,8 ± 0,11	22,6 ± 1,98*	56,4 ± 4,62*▲

Примітка: \* – статистично достовірні розбіжності відносно контролю ( $p < 0,001$ ); ▲ – між II і III групами тварин ( $p < 0,001$ )

Виявлена активація ПОЛ може бути пов'язана не тільки з посиленням первинним генеруванням вільних радикалів і пероксидних сполук, а й з недостатністю систем антиоксидантного захисту. У судинній стінці такими є антиоксидантні ферменти, серед яких глутатіонпероксидаза (ГП), супероксиддисмутаза (СОД) і каталаза (КТ).

У табл. 26 наведено результати досліджень активності цих ферментів у тканинах аорти щурів, що отримували високі дози вітаміну D. Привертає до себе увагу те, що активність усіх трьох вивчених ферментів істотно падала упродовж семи днів експерименту.

Так, найбільш стрімким було падіння активності ГП: через 3 доби від початку введення ергокальциферолу активність цього ферменту складала 44%, а через 7 діб – 32% від контрольних величин.

Схожі зміни відбувалися з іншим антиоксидантним ферментом – СОД. Його активність через 3 доби експерименту падала більш ніж удвічі, а через 7 діб складала 31,5%, якщо порівнювати з відповідним показником у контролі.

Менш вираженим було зменшення активності КТ. Через 3 доби D-вітамінної інтоксикації цей показник зменшувався на 33%, а через 7 діб – у 2,7 рази.

Таблиця 26

**Активність антиоксидантних ферментів в аортальній стінці щурів за умов уведення високих доз вітаміну D (300000 МО/кг) ( $M \pm m$ ,  $n=6$  у кожній групі)**

Фермент	Контроль (I група)	Вітамін D	
		3 доби (II група)	7 діб (III група)
Глютатіонпероксидаза (мкмоль відн. глютатіону / хв · г білка)	27,8 ± 1,62	12,2 ± 0,85*	8,85 ± 1,13*▲
Супероксиддисмутаза (ум.од. / мг білка)	15,4 ± 1,65	7,55 ± 0,7*	4,87 ± 0,73*▲
Каталаза (ум.од. / мг білка)	0,85 ± 0,09	0,57 ± 0,05*	0,32 ± 0,05*▲

Примітка: \* – статистично достовірні розбіжності відносно контролю ( $p < 0,001$ ); ▲ – між II і III групами тварин ( $p < 0,001$ )

Таким чином, наведені тут результати свідчать про розвиток недостатності антиоксидантних ферментів у кровоносних судинах тварин з гіпервітамінозом D, що само собою є чинником, якщо не ініціювання, то посилення ПОЛ.

Питання про те, який саме варіант активації ПОЛ – посилене утворення вільних радикалів чи недостатність антиоксидантних систем – виникає при інтоксикації вітаміном D, має, наш погляд, другорядне значення.

Якщо ПОЛ активується за першим сценарієм (посилене утворення вільних радикалів), то клітини, як правило, відповідають захисною компенсаторною реакцією – збільшенням активності систем антиоксидантного захисту. Щоправда, ця реакція має певні обмеження, зумовлені рівнем забезпеченості клітин неферментними речовинами-

антиоксидантами, а також потужністю антиоксидантних ферментів, яка, у свою чергу, визначається кількістю молекул кожного ферменту та їхньою активністю. У разі, коли навіть максимально можлива активація антиоксидантних систем не в змозі "загасити" ПОЛ, настає декомпенсація, яка виявляє себе зменшенням активності цих систем. В її основі лежать розлади експресії і синтезу відповідних ферментів (СОД, КТ, ГП), порушення відновлення (регенерування) неферментних антиоксидантних сполук (глутатіону,  $\alpha$ -токоферолу, аскорбінової кислоти та ін.), зменшення активності пентозного циклу, конче необхідного для названого вище процесу. Іншими словами, з часом постають зміни, характерні для ушкодження клітин, а розвиток антиоксидантної недостатності є наслідком цих змін.

Якщо ж в основі активації ПОЛ лежить другий механізм – первинна недостатність систем антиоксидантного захисту, то джерелом вільних радикалів стають звичайні окисно-відновні реакції, що відбуваються в клітинах. Неможливість вчасно та ефективно інактивувати радикали і пероксиди, що утворюються в цих реакціях, спричиняється до швидкого розгортання ПОЛ. Оскільки цей процес має ланцюговий і розгалужений характер, то відбувається стрімке, у геометричній прогресії, новоутворення і зростання кількості первинних і вторинних радикалів та продуктів їхньої рекомбінації – "безпечні" для клітин з нормальним антиоксидантним захистом біохімічні процеси стають генераторами "пожежі", яка настає за умов антиоксидантної недостатності.

Таким чином, можна стверджувати, що незалежно від початкового механізму ініціювання ПОЛ, генерування вільних радикалів та пероксидів, з одного боку, і розвиток антиоксидантної недостатності, з другого, пов'язані між собою типом патогенетичного зв'язку, що його позначають як "зачароване коло", або *circulus vitiosus*. Первинне посилене утворення радикалів веде через початкове збільшення активності антиоксидантних систем (фазу компенсації) до вторинної антиоксидантної недостатності (фаза декомпенсації), а та, у свою чергу, у ще більшій мірі посилює генерування вільних радикалів та пероксидів – коло замкнулося. Водночас первинна антиоксидантна недостатність зумовлює перехід у нормі контрольованих антиоксидантами окисно-відновних реакцій у неконтрольовані, тобто такі, що стають

ініціаторами ПОЛ. Під час розгортання ПОЛ у клітинах настають порушення, які збільшують антиоксидантну недостатність – коло замкнулося.

Свідченням того, що активація ПОЛ в артеріях D-гіпервітамінозних тварин супроводжується ушкодженням клітинних структур і розвитком унаслідок цього ранніх дистрофічних порушень, є зміни показників вмісту води та об'єму інулінового простору у вивчених нами судинах.

Дуже простий для визначення, але інформативний показник вмісту води в тканинах закономірно зростає за умов набряку. Його збільшення свідчить про накопичення води в досліджуваних структурах, незалежно від того який варіант набряку – внутрішньоклітинний чи інтерстиціальний – розвивається.

У табл. 27 представлено дані щодо вмісту води у стінках аорт контрольних і D-гіпервітамінозних тварин. Вони свідчать про те, що через 7 діб від початку експерименту вміст води у судинній стінці достовірно збільшується, якщо порівнювати з контрольними показниками ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 27

**Вміст води та об'єм інулінового простору в аортальній стінці щурів через 7 днів від початку введення високих доз вітаміну D (300000 МО/кг) ( $M \pm m$ )**

<i>Показник</i>	<i>Контроль</i>	<i>Гіпервітаміноз D</i>
Вміст води (%)	74,45 ± 0,56 (6)	77,9 ± 0,68* (6)
Об'єм інулінового простору (мл/100 г вогкої тканини)	41,84 ± 0,43 (6)	48,67 ± 0,83** (6)

Примітка: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,001$ ; у дужках – кількість тварин

Ще один показник, що був об'єктом нашого дослідження, – об'єм інулінового простору (ОІП) – характеризує величину позаклітинного простору судинної стінки (Voth and Lell, 1973). В основі методу визначення ОІП лежить властивість інуліну рівномірно розподілятися тільки в позаклітинному

просторі тканини і не проникати всередину клітин. Це зумовлено тим, що неушкоджені плазматичні мембрани клітин у нормі непроникні для інуліну.

Збільшення ОІП, що виникає за умов дії на тканину ушкоджувальних агентів, може бути пов'язане з двома обставинами. Перша з них – інтерстиціальний набряк, що закономірно виникає в інтимі і медії судин при їх ушкодженні. Друга – це проникнення інуліну всередину ушкоджених клітин, унаслідок того що їхні плазматичні мембрани втрачають бар'єрні властивості. Незалежно від конкретних причин, що ведуть до збільшення ОІП, цей показник є однією з характеристик ушкодження судинної стінки, зумовленого різними патогенними агентами.

З даних, наведених у табл. 27, випливає, що токсична дія вітаміну D супроводжується істотним зростанням ОІП в аортальній стінці дослідних тварин. Так, через 7 діб від початку експерименту цей показник був на 16% вищим, якщо порівнювати з контролем ( $p < 0,001$ ).

Паралельно з розвитком набряку судинної стінки змінюється вміст кальцію, магнію і мікроелементів у тканинах аорти D-гіпервітамінозних тварин. Про це свідчать дані, представлені в табл. 28.

Таблиця 28

**Вміст кальцію, магнію і мікроелементів в аортальній стінці щурів через 7 днів від початку введення високих доз вітаміну D (300000 МО/кг)**  
( мг/0,1 г сухої речовини;  $M \pm m$ ;  $n=6$  у кожній групі)

<i>Хімічний елемент</i>	<i>Контроль</i>	<i>Гіпервітаміноз D</i>
Кальцій	5,07 ± 0,56	44,9 ± 2,58**
Магній	0,9 ± 0,22	2,19 ± 0,2**
Залізо	0,35 ± 0,011	0,32 ± 0,032
Цинк	0,19 ± 0,013	0,16 ± 0,012
Мідь	0,21 ± 0,009	0,43 ± 0,007*
Марганець	0,29 ± 0,01	0,16 ± 0,004**

Примітка: \* ( $p < 0,01$ ), \*\* ( $p < 0,001$ ) – статистично достовірні розбіжності відносно контролю.

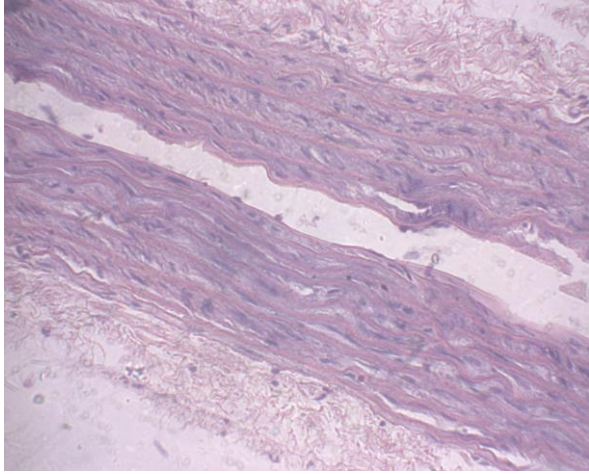
Так, вміст кальцію в аортальній стінці дослідних тварин зростав майже в 9 разів, а магнію – у 2,5 рази, якщо порівнювати з контролем. Слід зазначити, що таке значне збільшення вмісту цих елементів у тканинах судин відбувається на тлі демінералізації кісток, про що свідчить зменшення вмісту в їхніх тканинах тих самих кальцію і магнію (див. вище). При гіпервітамінозі D відбувається по суті переміщення значних кількостей мінеральних компонентів з кісток у судинну стінку. З одного боку, розвивається демінералізація кісткової тканини, а з другого – ектопічна кальцифікація артерій.

Що стосується кількісного складу мікроелементів судинної стінки, то він також зазнає певних змін у тварин з D-гіпервітамінозом. Так само, як і в кістках, у тканинах аорти змінюється вміст марганцю і міді, а рівень заліза і цинку залишається без змін. Відмінності полягають лише в тому, що в кістках D-гіпервітамінозних щурів вміст міді істотно зменшується, тимчасом як в аортальній стінці він, навпаки, зростає. Щодо марганцю, то спрямованість його змін в обох тканинах була однаковою: і в кістках, і в судинах вміст цього елемента зменшувався.

Ушкодження судинної стінки і значне накопичення в ній кальцію знайшли своє віддзеркалення в морфологічних змінах, що їх виявили за допомогою гістологічних методів дослідження.

Через 7 діб від початку введення тваринам ергокальциферолу у стінці аорти щурів можна було бачити ознаки ранніх дистрофічних змін, а саме: випрямлення ходу еластичних волокон з елементами їх фрагментації, збільшення проміжків між сусідніми еластичними мембранами, що є свідченням розвитку набряку судинної стінки (рис. 16).

Водночас в аортах дослідних щурів виявляли осередки кальцифікації різної величини: від дрібних зерноподібних кальцифікатів до відносно великих масивів обвапнення (рис. 17). Часто ці осередки розташовані поблизу еластичних структур, що дає підстави думати про певний зв'язок між дистрофічними змінами останніх і процесами відкладання солей кальцію.



**Рис. 16.** Грудна аорта щура через 7 днів від початку введення вітаміну D (300000 МО/кг). Зміни еластичних структур судинної стінки. Фарбування гематоксилін-еозином.



**Рис. 17.** Грудна аорта щура через 7 днів від початку введення вітаміну D (300000 МО/кг). Різної величини кальцифікати (чорний колір). Фарбування алізарином червоним.

Таким чином, виявлене нами значне збільшення вмісту кальцію в артеріях супроводжувалося розвитком кальцифікації структур судинної стінки і насамперед еластичних її елементів.

Наведені тут дані про ушкодження артеріальної стінки і розвиток у ній ранніх дистрофічних змін за умов гіпервітамінозу D цілком узгоджуються з викладеними в попередніх главах результатами наших власних досліджень і даними літератури про вплив D-вітамінної інтоксикації на кровоносні судини кролів. Що стосується щурів, то ці тварини, як відомо, є стійкими до ушкодження судин. І той факт, що високі дози вітаміну D (щоправда набагато вищі, ніж у кролів) усе ж таки спричиняються до змін, аналогічних тим, що розвиваються у представників трав'яїдних, свідчить про універсальність порушень, які виникають за умов індукованого гіпервітамінозу D.

У нормі концентрація іонів  $Ca^{2+}$  та фосфатів у позаклітинній рідині є вищою за ту, при якій починає відбуватися осадження фосфатних солей у розчині. Таке осадження в м'яких тканинах не відбувається тільки тому, що існує система природних інгібіторів кальцифікації – антикальциногенні фактори (див. главу 1).

З урахуванням цього можна виділити два патогенетичні варіанти розвитку кальцифікації м'яких тканин: (1) посилення дії чинників, що ініціюють і сприяють мінералізації, – прокальциногенних факторів, і (2) недостатність інгібіторів кальцифікації.

До групи факторів, що сприяють ініціюванню та росту кристалів гідроксіапатиту в м'яких тканинах, відносять (а) збільшену локальну концентрацію іонів кальцію і фосфатів у міжклітинній рідині; (б) появу в тканинах клітин з властивостями остеобластів; (в) підвищення активності лужної фосфатази; (г) слабколужне середовище.

До чинників, що захищають судинну стінку від кальцифікації, відносять (а) неорганічний пірофосфат; (б) білкові інгібітори, серед яких матриксний білок, що містить  $\gamma$ -карбоксіглютамінову кислоту (MGP); остеопонтин, остеопротегерин, фетуїн та інші.

Неорганічний пірофосфат ( $PP_i$ ) є простою сполукою, що складається з двох фосфатних груп.  $PP_i$ , з одного боку, інгібує утворення і ріст кристалів гідроксіапатиту (завдяки



своїм фізично-хімічним властивостям), а з другого – слугує субстратом для тканинної лужної фосфатази – ферменту, локалізованого в мембранах подібних до остеобластів (кальцифікуючих) клітин і матриксних везикул мінералізації. Цей фермент, гідролізуючи  $PP_i$ , створює довкола високу концентрацію неорганічного фосфату і переводить таким чином інгібітор кальцифікації у прокальциногенний чинник.

Провідним шляхом генерування  $PP_i$  у тканинах кровоносних судин є реакції, що здійснюються ектоферментами (ектонуклеотидазами), здатними розщеплювати позаклітинні нуклеозидтрифосфати, зокрема АТФ, з утворенням  $PP_i$  (Towler, 2005; Johnson et al., 2005).

Загальна концентрація  $PP_i$  в тканині, а отже, і його інгібіторна дія залежить, таким чином, від співвідношення процесів генерування  $PP_i$  і активності лужної фосфатази. Пригнічення утворення  $PP_i$ , так само як і підвищення активності лужної фосфатази, спричиняється до ініціювання кальцифікації м'яких тканин.

З огляду на це ми обрали для вивчення ролі про- і антикальциногенних чинників у розвитку кальцифікації судин два ферменти – лужну фосфатазу і екто-АТФазу, від активності яких залежить, головним чином, концентрація  $PP_i$  в тканинах судин і його антикальциногенні властивості.

Результати досліджень активності зазначених ферментів представлено в табл. 29.

Як впливає з наведених даних, активність лужної фосфатази артеріальної стінки стрімко зростає одразу від початку експерименту. Так, вже після трьох введень ергокальциферолу активність цього ензиму стає у 4,5 рази вищою за аналогічний показник у контролі, а через 7 днів зазначені відмінності сягають 7,6 разів.

Звичайно, постає питання, чим зумовлено таке значне збільшення активності лужної фосфатази: надходженням цього ферменту в артеріальну стінку з крові чи безпосереднім впливом вітаміну D на його експресію в клітинах судин.

Проведене нами вивчення активності лужної фосфатази в сироватці крові (табл. 30) показало, що рівень цього ферменту істотно не змінюється ні через 3, ні через 7 діб від початку введення тваринам високих доз вітаміну D ( $p > 0,05$ ). Отже, можна стверджувати, що перший з наведених вище механізмів не має великого значення, коли йдеться

про підвищення активності лужної фосфатази в стінках кровоносних судин. Це дає підстави думати, що високі дози вітаміну D впливають на зазначений фермент артеріальної стінки або безпосередньо, або опосередковано через певні місцеві механізми.

Таблиця 29

**Активність лужної фосфатази та екто-АТФази в аортальній стінці щурів за умов уведення високих доз вітаміну D (300000 МО/кг)( $M \pm m$ ,  $n=6$  у кожній групі)**

Фермент	Контроль (I група)	Вітамін D	
		3 доби (II група)	7 діб (III група)
Лужна фосфатаза (мкмоль р-нітрофенолу · г <sup>-1</sup> · год <sup>-1</sup> )	0,8 ± 0,14	3,58 ± 0,52*	6,08 ± 0,53*▲
Екто-АТФаза (мкмоль Р <sub>i</sub> · см <sup>2</sup> · год <sup>-1</sup> )	12,0 ± 0,85	9,87 ± 0,85	5,75 ± 0,75*▲

Примітка: \* - статистично достовірні розбіжності відносно контролю ( $p < 0,001$ ); ▲ – між II та III групами тварин ( $p < 0,01$ ).

Протилежну спрямованість змін, якщо порівнювати з лужною фосфатазою, було виявлено при вивченні екто-АТФазної активності ізольованих поздовжніх смужок аортальних судин у щурів з D-гіпервітамінозом.

Так, здатність гідролізувати екзогенний АТФ препаратами аортальної стінки зменшувалася майже на 18% через 3 доби і більш ніж у 2 рази – через 7 діб від початку D-вітамінної інтоксикації.

Таким чином, як впливає з наведених вище даних, високі дози вітаміну D спричиняються до істотного зростання активності одного з ключових прокальциногенних ферментів – лужної фосфатази з одночасним пригніченням ектону-

клеотидазної активності – чинника, що перешкоджає кальцифікації м'яких тканин.

Таблиця 30

**Активність лужної фосфатази в сироватці крові щурів з гіпервітамінозом D ( $M \pm m$ ,  $n=6$  у кожній групі)**

Показник	Контроль (I група)	Вітамін D	
		3 доби (II група)	7 діб (III група)
Лужна фосфатаза (ум. од. / мг білка)	42,0 ± 6,11	52,0 ± 8,0	54,7 ± 7,3

З огляду на це є підстави стверджувати, що в умовах гіпервітамінозу D порушується баланс між прокальциногенними і антикальциногенними властивостями судинної стінки, що створює умови для відкладання солей кальцію в її структурах.

У процесі кальцифікації судин виділяють дві фази: (1) ініціацію мінералізації і (2) ріст кристалів гідроксіапатиту.

Сутність початкової фази полягає в утворенні перших кристалів гідроксіапатиту, які стають "затравкою" для дальшого росту кристалів. Появі таких кристалів завжди передує утворення аморфних фосфатних солей кальцію, які поступово "дозрівають" у гідроксіапатит.

Існують два основні фізично-хімічні механізми ініціації: (а) осадження та (б) епітаксис.

Осадження є механізмом, який здійснюється завдяки локальному збільшенню концентрації іонів кальцію та фосфатних аніонів до концентрацій, що перевищують критичні значення, необхідні для випадіння фосфатних солей в осад. Таке локальне збільшення концентрацій кальцію і фосфатів може бути зумовлено (а) загальними механізмами, такими як гіперкальціємія і гіперфосфатемія, і (б) місцевими чинниками, пов'язаними з діяльністю ферментів фосфатаз: лужної фосфатази та ектонуклеотидаз. При активації цих ферментів, активні центри яких містяться на зовнішній поверхні плазматичних мембран клітин, відбувається гідроліз фосфа-

тних ефірів органічних сполук (напр., АТФ, АДФ, АМФ, α-гліцерофосфату та ін.) з вивільненням неорганічного фосфату.

У виконаних нами дослідженнях, з одного боку, було показано, що гіпервітаміноз D супроводжується значним підвищенням концентрації кальцію і неорганічних фосфатів у сироватці крові (гіперкальціємією і гіперфосфатемією), а з другого – збільшенням активності лужної фосфатази з одночасним зменшенням екто-АТФазної активності у судинній стінці. Такі зміни, разом узяті, – загальні і місцеві – мають спричинитися до локального збільшення концентрації іонів кальцію та фосфатних аніонів до рівня, що перевищує критичні значення, іншими словами, створюються умови, необхідні для осадження фосфатних солей.

Епітаксія, або нуклеація, є механізмом утворення кристалів гідроксіапатиту на органічній матриці, кристалічна структура якої близька до кристалічної структури гідроксіапатиту. Така органічна сполука чи структура, здатна об'єднувати іони  $\text{Ca}^{2+}$  і фосфатів у ядра кристалізації, отримала назву нуклеатора, або ініціатора кристалізації.

Роль ініціаторів кристалізації у м'яких тканинах можуть виконувати (а) волокнисті компоненти сполучної тканини: колаген та еластин; (б) спеціальні позаклітинні структури – матриксні везикули мінералізації, що їх продукують подібні до остеобластів клітини; (в) апоптичні тільця.

З наведених вище результатів наших досліджень випливає, що інтоксикація вітаміном D веде до ушкодження судинної стінки і розвитку в ній ранніх дистрофічних змін. Цілком імовірно, що результатом такого ушкодження якраз і є поява ініціаторів кристалізації. Першим претендентом на це є змінені під впливом вітаміну D еластичні структури артеріальної стінки. Саме з ними просторово пов'язана більшість кальцифікатів, що їх виявлено в аортальній стінці D-гіпервітамінозних щурів.

Крім того, активація ПОЛ і зменшення активності основних антиоксидантних ферментів в артеріальній стінці є чинниками ушкодження клітин. Одним з результатів цього процесу може бути запуск апоптозу і утворення апоптичних тілець, що мають здатність ставати ініціаторами кристалізації.

Ріст кристалів гідроксіапатиту має в своїй основі фізико-хімічні закономірності. Перші кристали гідроксіапатиту,

що з'явилися в м'якій тканині, стають "ядрами", навколо яких відкладаються кальцій і фосфати з рідини, що оточує ці ядра. Навіть нормальних концентрацій іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та фосфатних аніонів у позаклітинній рідині достатньо для того, аби відбувалося їх осадження на кристалах уже утвореного гідроксіапатиту. Ріст кристалів відбувається доти, доки не настане динамічна рівновага між кальцієм і фосфатами твердої (гідроксіапатит) і рідкої (позаклітинна рідина) фаз. Звісна річ, що при збільшенні концентрації кальцію і фосфатів у позаклітинній рідині така рівновага настає пізніше, а тому кристали стають більшими, часто зливаються між собою, утворюючи великі маси кальцифікатів, часто подібні до мінералізованих структур кісток.

На ініціацію та ріст кристалів гідроксіапатиту істотний вплив чинить рН середовища. Кисле середовище перешкоджає відкладанню солей кальцію в м'яких тканинах, слабколужне – навпаки, сприяє цьому процесу. Добре відомо, що в осередках гострого запалення не відбувається кальцифікації тканин, незважаючи на масову загибель клітин. Це пояснюють тим, що при такому запаленні розвивається місцевий ацидоз, який перешкоджає кальцифікації.

З другого боку, відомо, що відкладання солей кальцію відбувається переважно в таких органах і тканинах, як легені, слизова шлунка, нирки, міокард, артеріальна стінка. Вважають, що перші три названі структури мають слабколужне середовище через те, що вивільнюють назовні кислі продукти; а міокард та артерії виявляють слабколужні властивості, бо омиваються кров'ю, бідною на вуглекислоту.

Таким чином, з урахуванням наведених вище сутності і динаміки кальцифікації судинної стінки можна виділити дві групи чинників, що впливають на цей процес: загальні і місцеві.

Деякі з них були об'єктом нашого дослідження у тварин з гіпервітамінозом D. Як впливає з наведених у цій главі даних, інтоксикація вітаміном D супроводжується, з одного боку, загальними порушеннями фосфорно-кальцієвого обміну в організмі (гіперкальціємія, гіперфосфатемія, демінералізація кісток), а з другого – змінами аортальної стінки, що сприяють її кальцифікації (оксидативний стрес, ушкодження клітин і еластичних структур, збільшення локальної концен-

трації кальцію, порушення балансу між прокальциногенними і антикальциногенними ферментами).

Яку роль відіграють ці дві групи змін у розвитку кальцифікації? Який механізм – метастатичний чи дистрофічний – є провідним у цьому процесі?

Аби ближче підійти до розв'язання даного питання, ми провели дослідження з використанням одного з представників бісфосфонатів (дифосфонатів) – етан-1-гідрокси-1,1-дифосфонової кислоти (ЕГДК), яку вводили щурам разом з високими дозами вітаміну D (300000 МО/кг) протягом 7 діб.

Бісфосфонати є синтетичними сполуками, що мають властивості комплексоутворювачів (хелаторів) і містять у своїх молекулах хімічні структури типу Р-С-Р (див. главу 3). Серед вивчених бісфосфонатів найбільш виражена ангіопротекторна дія характерна для ЕГДК. Вона виявляє себе передовсім майже повним пригніченням розвитку кальцифікації артеріальних судин, навіть за умов такого сильного кальциногенного впливу, яким є гіпервітаміноз D (*Potokar and Schmidt-Dunker, 1978; Rosenblum et al., 1975*).

На рис. 18 представлено дані власних досліджень щодо впливу ЕГДК на вміст кальцію у трьох пов'язаних фосфорно-кальцієвим обміном тканинах (кістках, крові, аортальній стінці) щурів через 7 діб від початку поєднаного введення тваринам ЕГДК і вітаміну D.

Одержані результати свідчать про те, що ЕГДК при поєднаному введенні з вітаміном D істотно збільшує вміст кальцію в кістковій тканині і зменшує його в аортальній стінці, якщо порівнювати з відповідними показниками тварин з одним лише гіпервітамінозом D. Іншими словами, ЕГДК у значній мірі перешкоджає, з одного боку, демінералізації кісток, а з другого – відкладанню солей кальцію в судинах. Проте, повної нормалізації вмісту кальцію у зазначених тканинах під впливом ЕГДК усе ж таки не відбувається.

Ефект ЕГДК стосовно аортальної стінки вражаючий: під його впливом вміст кальцію в артеріальній тканині тварин з гіпервітамінозом D зменшувався у 2,2 рази, що свідчить про виражені ангіопротекторні властивості цієї сполуки. Одним з механізмів антикальциногенної дії ЕГДК, як зазначалося вище, може бути зменшення концентрації кальцію в крові через пригнічення виходу останнього з кісткової тканини.

	<i>Кістки</i>	<i>Кров</i>	<i>Аорта</i>
	<i>мг/0,1 мг сухої тк.</i>	<i>ммоль/л</i>	<i>мг/0,1 мг сухої тк.</i>
Контроль	545 ± 7.4	2.59 ± 0.1	6.38 ± 0.47
Вітамін D	423 ± 13.6	3.27 ± 0.08	41.8 ± 4.66
Вітамін D + ЕГДК	499 ± 12.4	3.05 ± 0.11	18,7 ± 1,83
	$p < 0,01$	$p > 0,05$	$p < 0,001$

**Рис. 18.** Вміст кальцію в тканинах кісток та аорти і в сироватці крові щурів, яким одночасно вводили вітамін D (300000 МО/кг) і ЕГДК (150 мг/кг) протягом 7 діб ( $M \pm m$ ,  $n=6$  у кожній групі)

Проте, одержані нами дані спростовують даний механізм, оскільки під впливом ЕГДК вміст кальцію у сироватці крові D-гіпервітамінозних тварин не змінювався ( $p > 0,05$ ): іншими словами, фактор гіперкальціємії не зникав і навіть не зменшувався.

З огляду на це можна припускати, що в основі антикальциногенної дії ЕГДК лежать місцеві його впливи на судинну стінку.

Аналіз літературних даних, наведений у табл. 31, показує, що ЕГДК не впливає на показники ушкодження судинної стінки, що виникає у кролів за умов гіпервітамінозу D, гіперадреналінемії та інтоксикації моноіодацетатом. Так, при поєднаному введенні ЕГДК з високими дозами вітаміну D, адреналіну, а також з моноіодацетатом не відбувається нормалізації показників ПОЛ, активності антиоксидантних ферментів, вмісту води і об'єму інулінового простору. Натомість вміст кальцію в судинній стінці істотно зменшується, наближаючись до рівня, характерного для контрольних тварин.

**Вплив ЕГДК на деякі показники уражень артерій при їх експериментальному відтворенні у кролів за допомогою вітаміну D, адреналіну і моноіодацетату (МІА)**

	<i>Показники уражень кровоносних судин</i>				
	<i>Продукти ПОЛ (ГПЛ, ШО)</i>	<i>Активність АОФ (ГП, СОД, КТ)</i>	<i>Вміст води</i>	<i>ОПП</i>	<i>Вміст загального кальцію</i>
Гіпервітаміноз D	=	=	=	=	↓
Гіперадреналінемія	=	=	=	=	↓
МІА-інтоксикація	=	=	=	=	↓

Примітка: АОФ – антиоксидантні ферменти. Стрілкою ↓ позначено зменшення показника, = означає незмінність параметру. Дані про вплив гіпервітамінозу D, гіперадреналінемії і МІА-інтоксикації взято відповідно з робіт В.Ю.Гарбузової (2004), Р.Ф.Наумка (2005), Ю.О.Атамана (2008).

Отже, сьогодні нема підстав вважати, що антикальциногенна дія ЕГДК якимось чином пов'язана з попередженням чи зменшенням процесу ушкодження судинної стінки. Цілком можливо, що в основі ангіопротекторного ефекту бісфосфонатів лежать порушення утворення фосфатних солей кальцію у судинній стінці і перешкоджання формуванню кристалів оксіапатиту як всередині клітини, так і в позаклітинному просторі.

Проте, тут маємо парадоксальну ситуацію: важко пояснити, чому завдяки своїм фізично-хімічним властивостям бісфосфонати у кістковій тканині D-гіпервітамінозних тварин запобігають резорбції і демінералізації (збільшується вміст кальцію), а в судинній стінці, навпаки, перешкоджають кальцифікації (зменшується рівень кальцієвих солей).

Одне з пояснень може полягати в тому, що порушення мінерального обміну в кістковій тканині і кровоносних судинах тісно пов'язані між собою. Є численні клінічні спостереження того, що розвиток остеопорозу у людей закономірно супроводжується кальцифікацією артерій (*Boukhris and*



Becker, 1972; Fujita et al., 1984; Frye et al., 1992; Banks et al., 1994; Jie et al., 1996; Nishizawa and Morii, 1997). Особливо це характерно для жінок після менопаузи (Elkeles, 1957; Melton et al., 1989).

В умовах токсичної дії вітаміну D, з одного боку, відбувається резорбція і демінералізація кісток, а з другого – солі кальцію відкладаються в артеріальну стінку (див. вище).

Пояснення цим фактам, очевидно, слід шукати в тому, що при дегенеративних змінах у кістках у кров з кісткової тканини вивільнюються якісь прокальциногенні фактори, які, осідаючи в м'яких тканинах, стають центрами кристалізації і започатковують процес ектопічної кальцифікації. Бісфосфонати, перешкоджаючи резорбції і демінералізації кісток, запобігають надходженню у кров цих факторів і в такий спосіб чинять антикальциногенну дію стосовно кровоносних судин.

Наведена вище гіпотеза знаходить розвиток в роботах Price та його співробітників (Price et al., 2001b, 2006). У ряді його досліджень було показано, що ціла низка сполук (амінобісфосфонати, остеопротегерин, інгібітор V-H<sup>+</sup>-АТФази), які через різні механізми здатні пригнічувати діяльність остеокластів і в такий спосіб запобігати резорбції кісток, одночасно перешкоджають розвитку кальцифікації артерій (Price et al., 2001abc, 2002ab). Щодо прямого впливу цих сполук на клітини судинної стінки, то він не відомий.

Пошуки прокальциногенних чинників кісткового походження дали перші результати: було повідомлено про виділення т. зв. сироваткового фактору кальцифікації (*serum calcification factor* – SCF) (Price et al., 2006). Він має молекулярну масу від 50 до 150 кДа, інактивується трипсином і хемотрипсином. На думку авторів гіпотези, при посиленій активності остеокластів, що супроводжується резорбцією і демінералізацією кісток, SCF виходить з кісткової тканини у кров, а звідти потрапляє в м'які тканини, у тому числі і в судинну стінку. Частинки SCF, що осіли в тканинах, стають нуклеаторами і започатковують процес утворення кристалів гідроксіапатиту. Цьому сприяє підвищення локальної концентрації кальцію і неорганічного фосфату, що спостерігається при гіперкальціємії і гіперфосфатемії, а також при підвищенні активності лужної фосфатази.

Ініціюванню ектопічної кальцифікації перешкоджають природні антикальциногенні чинники, серед яких пірофосфат, MGP, остеопонтин, остеопротегерин та ін. Зменшення вмісту і (чи) активності цих факторів у судинах є важливою умовою для ініціювання мінералізації та росту кристалів гідроксіапатиту.

Одержані нами дані щодо змін у кістках, аорті і сироватці крові тварин з гіпервітамінозом D цілком узгоджуються з наведеною вище гіпотезою.

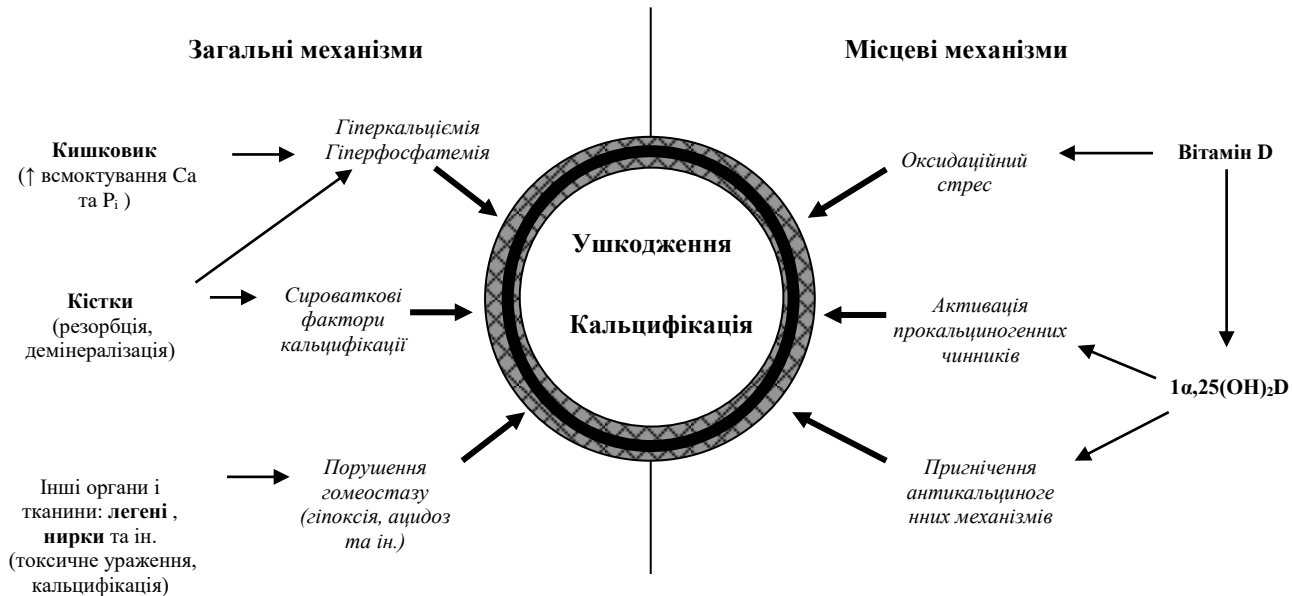
Так, у проведених дослідженнях було здобуто результати, що їх можна розділити на три групи:

1. В умовах гіпервітамінозу D виникають зміни фосфорно-кальцієвого обміну в організмі, які виявляють себе збільшенням вмісту в сироватці крові кальцію, неорганічного фосфату, а також порушеннями з боку кісток: зменшенням вмісту в кістковій тканині кальцію і магнію, порушенням біомеханічних властивостей (зменшенням мікротвердості і сили розриву). Ці зміни можуть виступати по відношенню до кровоносних судин загальними чинниками їх кальцифікації.

2. Токсична дія вітаміну D супроводжується збільшенням вмісту в тканинах аорти проміжних (ГПЛ) і кінцевих (ШО) продуктів ПОЛ з одночасним зменшенням активності антиоксидантних ферментів – ГП, СОД, КТ. Вплив високих доз вітаміну D характеризується також значним зростанням активності лужної фосфатази і пригніченням екто-АТФазної активності аортальної стінки. Зазначені зміни слід вважати такими, що відображають місцеві механізми ураження кровоносних судин.

3. D-вітамінна інтоксикація виявляє себе проявами набряку аортальної стінки (збільшення вмісту води та ОІП), морфологічними змінами еластичних структур, значним збільшенням вмісту кальцію і відкладанням його солей у товщі судинної стінки. Наведені зміни віддзеркалюють розвиток ушкодження і кальцифікації кровоносних судин.

На підставі узагальнених вище власних результатів і даних літератури роль загальних і місцевих механізмів у розвитку кальцифікації артерій, зумовленої гіпервітамінозом D, може бути представлено у вигляді поданої нижче схеми (рис. 19).



*Рис. 19. Загальні і місцеві механізми ураження артеріальної стінки за умов гіпервітамінозу D*

З одного боку, в організмі виникають загальні по відношенню до судинної стінки зміни, які сприяють її кальцифікації. Такими є:

1) гіперкальціємія і гіперфосфатемія, що зумовлюють збільшення кальцій-фосфатного добутку до рівнів, при яких починають осаджуватися в м'яких тканинах солі кальцію (метастатичний механізм кальцифікації). Причинами зростання вмісту кальцію і неорганічного фосфату в крові є посилене їх всмоктування в кишковик (результат дії  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ ) і резорбція та демінералізація кісткової тканини, що настає під впливом високих доз вітаміну D;

2) чинники, що вивільнюються в кров із кісткової тканини внаслідок резорбції і демінералізації останньої. Одним з таких може бути виявлений нещодавно сироватковий фактор кальцифікації (SCF), який, осідаючи в м'яких тканинах, здатен ініціювати утворення кристалів гідроксіапатиту в артеріальній стінці;

3) порушення гомеостазу (гіпоксія, ацидоз, інтоксикація та ін.), що настають у результаті D-гіпервітамінозних уражень інших органів і тканин (легень, нирок та ін.). Хоча роль зазначених змін в ушкодженні і кальцифікації кровеносних судин важко оцінити, проте поза сумнівом вони впливають на судинну стінку і можуть сприяти її ураженням.

З другого боку, під впливом токсичних доз вітаміну D в артеріальних судинах виникають зміни, що їх можна розцінювати як місцеві чинники ушкодження і кальцифікації судинної стінки. До таких слід віднести:

1) оксидативний стрес, в ініціюванні якого провідну роль відіграють прооксидантні властивості самого вітаміну D. Активізація пероксидного окиснення ліпідів, що закономірно настає в умовах гіпервітамінозу D, може бути причетною до (а) запрограмованої загибелі клітин судинної стінки (апоптозу); (б) перетворення гладких м'язових клітин медії в клітини, подібні до остеобластів; (в) порушення структури еластину і змін властивостей еластичних волокон та мембран. Іншими словами, оксидативний стрес може запускати всі три відомі на цей час варіанти кальцифікації судинної стінки;

2) активацію прокальциногенних чинників судинної стінки. Одним з таких є лужна фосфатаза – фермент, який, з одного боку, розщеплює пірофосфат ( $\text{PPi}$ ) і зменшує концентрацію в тканинах цього важливого антикальциногенного

фактора, а з другого – збільшує внаслідок такого розщеплення локальну концентрацію неорганічного фосфату (Pi) до рівнів, необхідних для осадження солей кальцію;

3) пригнічення антикальциногенних механізмів, що в нормі запобігають мінералізації м'яких тканин. Серед таких важливе місце посідають ектоферменти, здатні гідролізувати аденінові нуклеотиди з вивільненням пірофосфату (ектонуклеотидази), і матриксний Gla-протеїн (MGP). Очевидно, що вплив високих доз вітаміну D на про- і антикальциногенні ферменти судинної стінки здійснюється через надмірне утворення його гормонально активної форми –  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ .

Оцінити відносне значення загальних і місцевих механізмів у розвитку D-гіпервітамінозних уражень судин не просто. Одним з інструментів вивчення цього питання стали бісфосфонати – сполуки, що є синтетичними аналогами пірофосфату. Будучи ефективними засобами, що запобігають резорбції і демінералізації кісток, бісфосфонати одночасно виявляють ангіопротекторну дію, яка не залежить від їх впливу на рівень кальцію та фосфатів крові і на процеси, що зумовлюють ушкодження клітин. Досліди з ЕГДК дають підстави патогенетично розділити між собою дві групи змін, характерних для D-гіпервітамінозних уражень артеріальної стінки: (1) ушкодження клітин та позаклітинного матриксу і (2) власне кальцифікацію.

Якщо мова йде про першу з них, то вирішальне значення у розвитку ушкодження судинної стінки мають місцеві чинники, зокрема оксидативний стрес, перевантаження кальційтранспортних систем клітин, порушення енергозабезпечення судинної стінки.

Щодо власне кальцифікації, то в розвитку цієї складової D-гіпервітамінозних уражень судин, очевидно, провідну роль відіграють загальні чинники, зокрема надходження у кров з кісткової тканини факторів, які після осадження в тканинах започатковують процеси утворення кристалів гідроксіапатиту. Росту останніх і утворенню масивних кальцифікатів сприяють як загальні чинники (гіперкальціємія, гіперфосфатемія), так і місцеві фактори, зокрема порушення балансу між природними антикальциногенними і прокальциногенними механізмами у бік переважання останніх.

На завершення слід відзначити, що проблема співвідношення загальних і місцевих чинників у розвитку уражень

артерій взагалі і за умов гіпервітамінозу D зокрема ще далека до свого розв'язання. Дальші дослідження у цьому напрямі мають поглибити наші знання з цього фундаментального питання. Вони є важливими, оскільки можуть стати теоретичним підґрунтям для пошуку практичних підходів до запобігання і лікування склеротичних уражень артерій взагалі і такої їх поширеної форми, як артеріосклероз Менкеберга, зокрема.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Абрамова Ж.И., Оксенгендлер Г.И. Человек и противокислительные вещества.- М.: Наука, 1985.- 230с.
2. Атаман А.В. Интенсивность тканевого дыхания стенки артерий и вен в условиях гипервитаминоза D // Пат. физиол. и эксперим. тер.- 1986.- №1.- С. 61-63.
3. Атаман А.В. Энергообеспечение артерий и вен в связи с их разной устойчивостью к действию повреждающих факторов: Дис... доктор мед. наук: 14.00.16.- К., 1990.- 434с.
4. Атаман О.В. Венозна стінка: загальнотеоретичні й експериментальні аспекти.- Суми: Ангю, 2001.- 248с.
5. Атаман О.В. Патологічна фізіологія в запитаннях і відповідях. – Вінниця: Нова книга, 2010.- 512с.
6. Атаман Ю.О. Роль пероксидного окиснення ліпідів у розвитку уражень артерій і вен, зумовлених первинними порушеннями енергетичного обміну: : Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Харків, 2008. – 19с.
7. Байкова В.Н., Казанова Г.В., Думрай К.О. Показатели системы перекисного окисления у детей проживающих на территории загрязненной радионуклидами после аварии на Чернобыльской АЭС // Рос. онкол. журнал. - 1998. - №2. С. 53-55.
8. Барлыбаева Н.А., Струков Ф.И. Специфическая профилактика рахита и побочное действие витамина D. – Алма-Ата: Казахстан, 1984. – 136с.
9. Бобырев В.Н., Почерняева В.Ф., Стародубцев С.Г. и др. Специфичность систем антиоксидантной защиты органов и тканей - основа дифференциальной фармакотерапии антиоксидантами // Эксперим. и клин. фармакология. - 1994. - Т. 57, №1. – С. 47-54.
10. Быць Ю.В. Роль нарушений метаболизма сосудистой стенки в процессе ее склерозирования: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. – К., 1973. – 44с.
11. Быць Ю.В., Пишак В.П., Атаман А.В. Сравнительно-патофизиологические аспекты энергообеспечения сосудистой стенки. – Киев-Черновцы: Прут, 1999. – 330с.
12. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестник Рос. АМН. - 1998. - №7. - С. 43-51.
13. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252с.
14. Воскресенский О.Н., Туманов В.А. Ангиопротекторы.- К.: Здоров'я, 1982.- 119с.
15. Гарбузова В.Ю. Експериментальні дані про роль пероксидного окиснення ліпідів у розвитку кальцинозу кровоносних судин, зумовленого гіпервитамінозом D: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2004. – 20с.
16. Давыденкова Е.Ф., Шафран М.Г. Атеросклероз и процесс перекисного окисления липидов // Вестник Акад. мед. наук СССР. - 1989. - №3. - С. 10-18.
17. Ланкин В.З., Закирова А.Н., Касаткина Л.В. Перекиси липидов и атеросклероз. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в

- крови больных ишемической болезнью сердца. // Кардиология. - 1979. - № 10. - С.69-72.
18. Ланкин В.З., Тихадзе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы // Кардиология.- 2000.- №7.- С. 48-61.
  19. Ланкин В.З., Тихадзе А.К., Ракица Д.Р. Влияние  $\alpha$ -токоферола на супероксиддисмутазную и глутатионпероксидазную активность цитозоля и митохондрий печени мышей // Биохимия. - 1983. - Т. 48, №9. - С. 1565-1569.
  20. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца.- М.: Медицина, 1984.- 269с.
  21. Наумко Р.Ф. Патологічні зміни в артеріях і венах як чинники розвитку їх адреналінових уражень: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - К., 2005. - 24с.
  22. Ньюман У., Ньюман М. Минеральный обмен кости.- М.: Изд-во иностр. л-ры, 1961.- 270с.
  23. Поберезкина Н.Б., Осинская Л.Ф. Биологическая роль супероксиддисмутазы // Укр. биохимич. журнал. - 1989. - Т. 61, №2. - С. 14-27.
  24. Сергеев П.В., Тажибаев Ш.С., Сейфулла Р.Д., Витамин D.- Алма-Ата: Наука, 1974.- 234с.
  25. Спиричев В.Б. Изучение метаболизма токсического действия витамина D<sub>2</sub> // Витамины. Вып. VI.- К.: Наукова думка, 1971.- С. 64-92.
  26. Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия.- М.: Медицина, 1995.- 649с.
  27. Хижня Я. В. Інтенсивність перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантна ферментативна активність у стінці аорти щурів за умов гіпервітамінозу D // Вісник Української медичної стоматологічної академії: Актуальні проблеми сучасної медицини. - 2010. - Т.10, вип.4.- С. 162-164.
  28. Abedin M., Tintut Y., Demer L.L. Vascular calcification. Mechanisms and clinical ramifications // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.- 2004.- V.24.- P. 1161-1170.
  29. Adams J.S., Lee G. Gains in bone mineral density with resolution of itamin D intoxicification // Ann. Int. Med.- 1997.- V.127.- P. 203-206.
  30. Anderson H.C. Matrix vesicles and calcification // Curr. Rheumatol. Rep.- 2003.- V.5.- P. 222-226.
  31. Andress D.L. Nonclassical aspects of differential vitamin D receptor activation // Drugs.- 2007.- V.67.- P. 1999-2012.
  32. Atkinson J., Poitevin P., Chillon J.M., Lartaud I., Levy B. Vascular Ca overload produced by vitamin D3 plus nicotine diminishes arterial distensibility in rats // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.- 1994.- V.266.- P. H540-H547.
  33. Banks L.M., Lees B., Macsweeney J.E., Stevenson J.C. Effect of degenerative spinal and aortic calcification on bone density measurements in post-menopausal women: links between osteoporosis and cardiovascular disease? // Eur. J. Clin. Invest.- 1994.- V.24.- P. 813-817.
  34. Bas A., Lopez I., Perez J., Rodriguez M., Aguilera-Tejero E. Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function // J. Bone Miner. Res.- 2006.- V.21.- P. 484-490.



35. Bennett M., Evan G., Schwartz S. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques // *J. Clin. Invest.*– 1995.– V.95.– P. 2266-2274.
36. Bevilacqua M. Bisphosphonates and atherosclerosis: why? // *Lupus.*– 2005.– V.14.– P. 773-779.
37. Block G.A., Hulbert-Shearon T.E., Levin N.W., Port F.K. Association of serum phosphorus and calcium-phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study // *Am. J. Kidney Dis.*– 1998.– V.31.– P. 607-617.
38. Boaz M., Smetana S., Weinstein T., Matas Z., Gafter U., Iaina A., Knecht A., Weissgarten Y., Green M.S. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial // *Lancet.*– 2000.– V.356.– P. 1213-1218.
39. Bond M.G., Purvis C., Mercuri M. Antiatherogenic properties of calcium antagonists // *J. Cardiovasc. Pharmacol.*– 1991.– V.17, Suppl. 4.– P. S87-S92.
40. Boonstra A., Barrat F., Crain C., Heath V., Savelkoul H., O'Garra A. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> has a direct effect on naive CD4<sup>+</sup> T cells to enhance the development of Th2 cells // *J. Immunol.*– 2001.– V.167.– P. 4974-4980.
41. Boukhris R., Becker K. Calcification of the aorta and osteoporosis: a roentgenographic study // *JAMA.*– 1972.– V.219.– P. 1307-1311.
42. Brancaccio D., Bommer J., Coyne D. D receptor activator selectivity in the treatment of secondary hyperparathyroidism: understanding the differences among therapies // *Drugs.*– 2007.– V.67.– P. 1981-1998.
43. Brivanlou A.H., Darnell J.E. Signal transduction and the control of gene expression // *Science.*– 2002.– V.295.– P. 813-818.
44. Brown B.G., Cheung M.C., Lee A.C., Zhao X.Q., Chait A. Antioxidant vitamins and lipid therapy end of a long romance? // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*– 2002.– V.22.– P. 1535-1546.
45. Bruno R.S., Traber M.G. Vitamin E biokinetics, oxidative stress and cigarette smoking // *Pathophysiology.*– 2006.– V.13.– P. 143-149.
46. Callari D., Garra M.L., Billitteri A. Retinoic acid action on D<sub>3</sub> hypervitaminosis // *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*– 1986.– V.LXII.– P. 835-841.
47. Cardus A., Gallego C., Muray S. et al. Differential effect of vitamin D analogues on the proliferation of vascular smooth muscle cells // *Nefrologia.*– 2003.– V.23, Suppl. 2.– P. 117-121.
48. Cardus A., Panizo S., Parisi E., Fernandez E., Valdivielso J.M. Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification // *J. Bone Miner. Res.*– 2007.– V.22.– P. 860-866.
49. Carthy E.P., Yamashita W., Hsu A., Ooi B.S. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and rat vascular smooth muscle cell growth // *Hypertension.*– 1989.– V.13.– P. 954-959.
50. Chen D.Z.M., Mundy G.R. Bone morphogenetic proteins // *Growth Fact.*– 2004.– V.22.– P. 233-241.
51. Chury Z. Changes in the activity of lactate dehydrogenase isoenzymes in the calcified aorta and myocardium in certain experimental states // *Scripta medica.*– 1971.– V.44.– P. 205-213.
52. Clark I., Smith M.R. Effects of hypervitaminosis A and D on skeletal metabolism // *J. Biol. Chem.*– 1963.– V.239.– P. 1266-1271.

53. Collett G.D.M., Canfield A.E. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification // *Circ. Res.*- 2005.- V.96.- P. 930-938.
54. Danilchenko S.N., Koropov A.V., Protsenko I.Yu., Sulkio-Cllef B., Sukhodub L.F. Thermal behavior of biogenic apatite crystals in bone: an X-ray diffraction study // *Cryst. Res. Technol.*- 2006.- V.41.- P. 263-275.
55. Danilchenko S.N., Protsenko I.Yu., Sukhodub L.F. Some features of thermo-activated structural transformation of biogenic and synthetic Mg-containing apatite with  $\beta$ -tricalcium-magnesium phosphate formation // *Cryst. Res. Technol.*- 2009.- V.44.- P. 553-560.
56. Darby S., Whitley E., Doll R., Key T., Silcocks P. Diet, smoking and lung cancer: a case-control study of 1000 cases and 1500 controls in South-West England // *Br. J. Cancer.*- 2001.- V.84.- P. 728-735.
57. Demer L.L. A skeleton in the atherosclerosis closet // *Circulation.*- 1995.- V.92.- P. 2029-2032.
58. Demer L.L., Tintut Y. Mineral exploration: search for the mechanism of vascular calcification and beyond. The 2003 Jeffrey M. Hoeg Award Lecture // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2003.- V.23.- P. 1739-1743.
59. Diaz M.N., Frei B., Vita J.A., Keaney J.F. Antioxidants and atherosclerotic heart disease // *N. Engl. J. Med.*- 1997.- V.337.- P. 408-416.
60. Duguid J.B. Vitamai D sclerosis in the rat's aorta // *J. Path. Bact.*- 1930.- V.33.- P. 697-711.
61. Elkeles A. A comparative radiological study of calcified atheroma in males and females over 50 years of age // *Lancet.*- 1957.- V.2.- P. 714-715.
62. Falkenstein E., Tillmann H.-C., Christ M., Feuring M., Wehling M. Multiple actions of steroid hormones - a focus on rapid, nongenomic effects // *Pharmacol. Rev.*- 2000.- V.52.- P. 513-555.
63. Fang J.C., Kinlay S., Beltrame J., Hikiti H., Wainstein M., Behrendt D., Suh J., Frei B., Ganz P. Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomized trial // *Lancet.*- 2002.- V.359.- P. 1108-1113.
64. Farzaneh-Far A., Weissberg P.L., Proudfoot D., Shanahan C.M. Transcriptional regulation of matrix gla protein // *Z. Kardiol.*- 2001.- V. 90, Suppl. 3.- P. 38-42.
65. Feldman D., Glorieux F.H., Pike J.W. Vitamin D, 2nd Ed.- Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.
66. Fleckenstein A., Fleckenstein-Grün G., Frey M., Thimm F. Experimental antiarteriosclerotic effects of calcium antagonists // *J. Clin. Pharmacol.*- 1990.- V.30.- P. 151-154.
67. Fleckenstein A., Frey M., Fleckenstein-Grün G. Antihypertensive and arterial anticalcinotic effects of calcium antagonists // *Am. J. Cardiol.*- 1986.- V.57.- P. 1D-10D.
68. Fleckenstein A., Frey M., Zorn J., Fleckenstein-Grün G. The role of calcium in the pathogenesis of experimental arteriosclerosis // *Trends Pharmacol. Sci.*- 1987.- V.8.- P. 496-501.
69. Fleisch H., Russell R.G.G., Bisaz S., Mühlbauer R, Williams D.A. The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo // *Europ. J. Clin. Invest.*- 1970.- V.1- P. 12-18.

70. Francis M.D., Russell R.G.G., Fleisch H. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo // *Science*.- 1969.- V.165.- P. 1264-1266.
71. Frye M.A., Melton L.J., Bryant S.C., Fitzpatrick L.A., Wahner H.W., Schwartz R.S., Riggs B.L. Osteoporosis and calcification of the aorta // *Bone Miner*.- 1992.- V.19.- P. 185-194.
72. Fujita T., Okamoto Y., Sakagami Y., Ota K., Ohata M. Bone changes and aortic calcification in aging inhabitants of mountain versus seacoast communities in the Kii peninsula // *J. Am. Geriat. Soc*.- 1984.- V.32.- P. 124-128.
73. Gadeau A., Chaulet H., Daret D., Kock M., Daniel-Lamaziere J.-M., Desgranges C. Time course of osteopontin, osteocalcin and osteonec tin accumulation and calcification after acute vessel wall injury // *J. Histochem. Cytochem*.- 2001.- V.49.- P. 79-86.
74. Gavrilu D., Li W.G., McCormick M.L., Thomas M., Daugherty A., Cassis L.A., Miller F.J., Oberley L.W., Dellsperger K.C., Weintraub N.L. Vitamin E inhibits abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-infused apolipoprotein E-deficient mice // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*.- 2005.- V.25.- P. 1671-1677.
75. Geertinger P., Sorensen H. Complement as a factor in arteriosclerosis // *Acta Pathol. Microbiol*.- 1970.- V. 78A.- P. 284-288.
76. Gillman J., Gilbert C. Calcium, phosphorus and vitamin D as factors regulating the integrity of the cardiovascular system // *Exp. Med. Surg*. - 1956.- V.14.- P. 136-168.
77. Griendling K.K., Fitzgerald G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury. Animal and human studies // *Circulation*.- 2003.- V.108.- P. 2034 - 2040.
78. Gyetko M., Hsu C., Wilkinson C., Patel S., Young E. Monocyte  $\alpha$ -hydroxylase regulation: induction by inflammatory cytokines and suppression by dexamethasone and uremia toxin // *J. Leukoc. Biol*.- 1993.- V.54.- P. 17-22.
79. Haddad J., Matsuoka L., Hollis B., Hu Y., Wortsman J. Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis // *J. Clin. Invest*.- 1993.- V.91.- P. 2552-2555.
80. Haffner D., Hocher B., Müller D., Simon K., König K., Richter C.M., Eggert B., Schwarz J., Godes M., Nissel R., Querfeld U. Systemic cardiovascular disease in uremic rats induced by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> // *J. Hypertens*.- 2005.- V.23.- P. 1067-1075.
81. Hass G.M., Trueheart R.E., Hemmens A. Experimental arteriosclerosis due to hypervitaminosis D // *Amer. J. Pathol*.- 1960.- V. 37.- P. 521-549.
82. Hass G.M., Trueheart R.E., Taylor C.B., Stumpe M. An experimental histologic study of hypervitaminosis D // *Amer. J. Pathol*.- 1958.- V. 34.- P. 395-431.
83. Hathcock J.N., Shao A., Vieth R., Heaney R. 2007. Risk assessment for vitamin D // *Am. J. Clin. Nutr*.- 2007.- V.85.- P. 6-18.
84. Heaney R.P. The vitamin D requirement in health and disease // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*.- 2005.- V.97.- P. 13-19.
85. Henley C., Colloton M., Cattley R.C., Shatzen E., Towler D.A., Lacey D., Martin D. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> but not cinacalcet HCl (Sensipar/Mimpara) treatment mediates aortic calcification in a rat model of

- secondary hyperparathyroidism // *Nephrol. Dial. Transplant.*- 2005.- V.20.- P. 1370-1377.
86. Henry P.D. Anti-atherosclerotic effects of calcium antagonists: a brief review // *Clin. Invest. Med.*- 1987.- V.10.- P. 601-605.
87. Hirsch D., Axzoury R., Sarig S., Kruth H. Colocalisation of cholesterol and hydroxyapatite in human atherosclerotic lesions // *Calcif. Tiss. Int.*- 1993.- V.52.- P. 94-98.
88. Holick M.F. Sunlight and vitamin D: Both good for cardiovascular health // *J. Gen. Intern. Med.*- 2002.- V.17.- P. 733-735.
89. Hollander W., Prusty S., Nagraj S., Kirkpatrick B., Paddock J. Colombo M. Comparative effects of cetaben and dichlormethylene diphosphonate on the development of atherosclerosis in the cynomolgus monkey // *Atherosclerosis.*- 1978.- V.31.- P. 307-325.
90. Holmes R, Kummerow F. The relationship of adequate and excessive intake of vitamin D to health and disease // *J. Am. Coll. Nutr.*-1983.- V.2.- P. 173-199.
91. Hsu H.H., Tawfik O., Sun F. Mechanism of dystrophic calcification in rabbit aortas: temporal and spatial distributions of calcifying vesicles and calcification-related structural proteins // *Cardiovasc. Pathol.*- 2004.- V.13.- P. 3-10.
92. Hu Y., Zhang Z., Torsney E., Afzal A.R., Davison F., Metzler B., Xu Q. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice // *J. Clin. Invest.*- 2004.- V.113.- P. 1258-1265.
93. Inoue T., Kawashima H. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> stimulates <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-uptake by cultured vascular smooth muscle cells derived from rat aorta // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*- 1988.- V.152.- P. 1388-1394.
94. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Vitamin D // In: *Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride*, Washington (DC): National Academy Press.- 1997.- P. 250-287.
95. Jackson C.L., Bush R.C., Bowyer D.E. Mechanism of antiatherogenic action of calcium antagonists // *Atherosclerosis.*- 1989.- V.80.- P. 17-26.
96. Jahreis G., Hesse V. Vitamin D-induced tissue calcinosis and arteriosclerosis changes. I: a contribution to the 60 year history of vitamin D research with special reference to childhood // *Padiatr. Grenzgeb.*- 1990.- V.29.- P. 203-211.
97. Jegger D., da Silva R.F., Lartaud I., Gaillard V., Jeanrenaud X., Nasratullah M., von Segesser L.K., Atkinson J., Segers P., Tevaearai H., Stergiopoulos N. Effects of an aging vascular model on healthy and diseased hearts // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*- 2007.- V.293.- P. H1334-H1343.
98. Jialal I., Devaraj S. Antioxidants and atherosclerosis: Don't throw out the baby with the bath water (Editorial) // *Circulation.*- 2003.- V.107.- P. 926-928.
99. Jie K.S., Bots M.L., Vermeer C., Witteman J.C.M., Grobbee D.E. Vitamin K status and bone mass in women with and without aortic atherosclerosis: a population based study // *Calcif. Tissue Int.*- 1996.- V.59.- P. 352-356.

100. Johnson K., Polewski M., van Etten D., Terkeltaub R. Chondrogenesis mediated by PPI depletion promotes spontaneous aortic calcification in NPP1<sup>-/-</sup> mice // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2005.- V.25.- P. 686-691.
101. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity // *Am. J. Clin. Nutr.*- 2008.- V.88, Suppl.- P. 582S-586S.
102. Jono S., Nishizawa Y., Shioi A., Morii H. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide // *Circulation.*- 1998.- V.98.- P. 1302-1306.
103. Joy M.S., Karagiannis P.C., Peyerl F.W. Outcomes of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease and direct costs of treatment // *J. Manage. Care Pharm.*- 2007.- V.13.- P. 397-411.
104. Kaliora A.C., Dedoussis G.V.Z., Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis // *Atherosclerosis.*- 2006.- V.187.- P. 1-17.
105. Kawashima H. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> stimulates Ca-ATPase in a vascular smooth cell line // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*- 1988.- V.150.- P. 1138-1143.
106. Ketteler M. Phosphatbinder, vitamin D, cinacalcet // *Nephrologe.*- 2008.- V. 3.- P. 96-107.
107. Kim K.M. Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media // *Fed. Proc.*- 1976.- V.35.- P. 156 -162.
108. Kjeldsen K., Stender S. Calcium antagonists and experimental atherosclerosis // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*- 1989.- V.190.- P. 219-228.
109. Kobylinski S. Zur Pathogenese der Gewebsverkalkungen bei Vitamin-D-Intoxikation // *Exp. Pathol.*- 1971.- B.5.- S. 174-181.
110. Kobylinski S., Hofer B., Kohde G. 1984. Correlative pathologic studies on the role of vitamin D in vascular calcinosis in childhood // *Zentralbl. Allg. Pathol.*- 1984.- V.129.- P. 137-147.
111. Koh E., Morimoto S., Fukuo K. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> binds specifically to rat vascular smooth muscle cells and stimulates their proliferation in vitro // *Life Sci.*- 1988.- V.42.- P. 215-223.
112. Krams D.M. Calcium antagonists and atherosclerosis // *Adv. Exp. Med. Biol.*- 1985.- V.183.- P. 323-348.
113. Krishnan A.V., Feldman D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of Vitamin D // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*- 2011.- V.51. P. 311-336.
114. Kuroki Y., Shiozawa S., Kano J., Chihara K. Competition between c-fos and 1,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub> in the transcriptional control of type1 collagen synthesis in MC3T3-E1 osteoblastic cells // *J. Cell. Physiol.*- 1995.- V.164.- P. 459-464.
115. Lin R., Amizuka N., Sasaki T., Aarts M., Ozawa H., Goltzman D., Henderson J., White J. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> promotes vascularization of the chondro-osseous junction by stimulating expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9 // *J. Bone Min. Res.*- 2002.- V.17.- P. 1604-1612.
116. Linhartova K., Veselka J., Sterbakova G., Racek J., Topolcan O., Cerbak R. Parathyroid hormone and vitamin D levels are independently associated with calcific aortic stenosis // *Circ. J.*- 2008.- V.72.- P. 245-250.

117. Liittledike E.T., Horst R.L. Vitamin D<sub>3</sub> toxicity in dairy cows // *J. Dairy Sci.*- 1982a.- V.65.- P. 749-759.
118. Liittledike E.T., Horst R.L. Metabolism of vitamin D<sub>3</sub> in nephrectomized pigs given pharmacological amounts of vitamin D<sub>3</sub> // *Endocrinology.*- 1982b.- V.111.- P.2008-2013.
119. Lajda Z. Topochemistry of enzymes in the vascular wall // *Metabolismus Parietis Vasorum.*- Praha, 1962.- P. 232-242.
120. Luo G., Ducey P., McKee M.D., Pinero G.J., Loyer E., Behringer R.R., Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein // *Nature.*- 1997.- V.386.- P. 78-81.
121. MacCarthy E., Yamashita W., Hsu A., Ooi B. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and rat vascular smooth muscle // *Hypertension.*-1989.- V.13.- P. 954-959.
122. Madamanchi N.R., Vendrov A., Runge M.S. Oxidative stress and vascular disease // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2005.- V.25.- P. 29 - 38.
123. Mantell D., Owens P., Bundred N., Mawer E., Canfield A. 1 $\alpha$ ,25- dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits angiogenesis in vitro and in vivo // *Circ. Res.*- 2000.- V.87.- P. 214-220.
124. Markestad T., Hesse V., Siebenhuner M., Jahreis G., Aksnes L., Plenert W., Aarskog D. Intermittent high-dose vitamin D prophylaxis during infancy: effect on vitamin D metabolites, calcium, and phosphorus // *Am. J. Clin. Nutr.*- 1987.- V.46.- P. 652-658.
125. Martyn C., Greenwald S. Impaired synthesis of elastin in walls of aorta and large conduit arteries during development as an initiating event in pathogenesis of hypertension // *Lancet.*- 1997.- V.350.- P. 953-955.
126. Masterjohn C. Vitamin D toxicity redefined: vitamin K and the molecular mechanism // *Med. Hypoth.*- 2007.- V. 68.- P. 1026-1034.
127. Melton L.J., Kan S.H., Frye M.A., Wahner H.W., O'Fallon W.M., Riggs B.L. Epidemiology of vertebral fractures in women // *Am. J. Epidemiol.*- 1989.- V.129.- P. 1000-1011.
128. Merke J., Hofmann W., Goldschmidt D. Demonstration of 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> receptors and actions in vascular smooth cells in vitro // *Calcified Tissue Int.*- 1987.- V.41.- P. 112-114.
129. Mendez J.I., Nicholson W.J, Taylor W.R. SOD Isoforms and signaling in blood vessels. Evidence for the importance of ROS compartmentalization // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2005.- V.25.- P. 887-888.
130. Mendlowitz M. Arterial calcium metabolism, hypertension and arteriosclerosis // *Cardiology.*- 1981.- V. 67.- P. 81-89.
131. Mizobuchi M., Towler D., Slatopolsky E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease // *J. Am. Soc. Nephrol.*- 2009.- V.20.- P. 1453-1464.
132. Mitsuhashi T., Morris R., Ives H. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> modulated growth of vascular smooth muscle cells // *J. Clin. Invest.*- 1991.- V.87.- P. 1889-1895.
133. Mönckeberg J.G. Über die reine Mediaverkalkung der Extremitätenarterien und ihr Verhalten zur Arteriosclerose // *Virch. Arch.*- 1903.- B.171.- S. 141-167.

134. Montero-Oddasso M., Duque G. Vitamin D in the aging musculoskeletal system: an authentic strength preservino hormone // *Mol. Aspects Med.*- 2005.- V.26.- P. 203-219.
135. Morrissey R.L., Cohn R.M., Empson R.N., Greene H.L., Taunton O.D., Ziporin Z.Z. Relative toxicity and metabolic effects of cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol in chicks // *J. Nutr.*- 1977.- V.107.- P. 1027-1034.
136. Mrhova O., Shimamoto T., Numano F. Metabolic effect of pyridinol-carbamate on the vascular wall of rats with hypervitaminosis D // *Atherosclerosis.*- 1972.- V.16.- P. 1-8.
137. Nicole R. Über die Vitamin-D-Sklerose der Aorta, besonders ihre Anfänge // *Z. f. d. g. exp. Med.*- 1930.- B. 70. . 193-212.
138. Niederhoffer N., Lartaud-Idjouadiene I., Giummelly P., Giummelly P., Atkinson J. Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity // *Hypertension.*- 1997.- V.29.- P. 999-1006.
139. Nishizawa Y., Morii H. Osteoporosis and atherosclerosis in chronic renal failure // *Osteoporos Int.*- 1997.- V.7.- P. S188-S192.
140. Norman P., Moss I., Sian M., Gosling M., Powell J. Maternal and postnatal vitamin D ingestion influences rat aortic structure, function and elastin content // *Cardiovasc Res.*- 2002.- V.55.- P. 169-174.
141. Norman P.E., Powell J.T. Vitamin D, shedding light on the development of disease in peripheral arteries // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2005.- V.25.- P. 39-46.
142. Norman P., Wysocki S., Lamawansa M. The role of vitamin D<sub>3</sub> in the aetiology of abdominal aortic aneurysms // *Medical Hypotheses.*- 1995.-V.45.- P. 17-20.
143. O'Brien K.D. Pathogenesis of calcific aortic valve disease. A disease process comes of age (and a good deal more) // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2006.- V.26.- P. 1721-1728.
144. Okada Y., Nishida K., Tanikawa T., Hashimoto O., Tanaka Y. Diabetic vascular calcification and abnormal bone metabolism: the relation between bone and vascular // *Clin. Calcium.*- 2006.- V.16.- P. 1316-1320.
145. Osganian S.K., Stampfer M.J., Rimm E., Spiegelman D., Hu F.B., Manson J.E., Willett W.C. Vitamin C and risk of coronary heart disease in women // *J. Am. Coll. Cardiol.*- 2003.- V.42.- P. 246-252.
146. Özer N.K., Negis Y., Aytan N., Villacorta L., Ricciarelli R., Zingg J.M., Azzi A. Vitamin E inhibits CD36 scavenger receptor expression in hypercholesterolemic rabbits // *Atherosclerosis.*- 2006.- V.184.- P. 15-20.
147. Pang A.S. Minta J.O. Inhibition of vitamin D<sub>2</sub>-induced arteriosclerosis in rats by depletion of complement with cobra venom factor // *Artery.*- 1980.- V. 7.- P. 109-122.
148. Paoletti R., Bernini F., Corsins A., Soma M.R. The antiatherosclerotic effects of calcium antagonists // *J. Cardiovasc. Pharmacol.*- 1995.- V.25, Suppl. 3.- P. S6-S10.
149. Papapoulos S.E. Bisphosphonate actions: physical chemistry revisited // *Bone.*- 2006.- V.38.- P. 613-616.
150. Parhami F., Morrow A., Balucan J., Leitinger N., Watson A.D., Tintut Y., Berliner J.A., Demer L.L. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possi-

- ble explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 1997.- V.17.- P. 680-687.
151. Parmley W.W., Blumlein S., Sievers R. Modification of experimental atherosclerosis by calcium-channel blockers // *Am. J. Cardiol.*- 1985.- V.55.- P. 165B-171B.
  152. Patterson C., Madamanchi N.R., Runge M.S. The oxidative paradox: another piece in the puzzle // *Circ. Res.*- 2000.- V.87.- P. 1074-1076.
  153. Pettifor J.M., Bikle D.D., Cavaleros M., Zachen D., Kamdar M.C., Ross F.P. Serum levels of free 1,25-dihydroxyvitamin D in vitamin D toxicity // *Ann. Intern. Med.*- 1995.- V.122.- P. 511-513.
  154. Pierce R., Kolodzie M., Parks W. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> represses tropoelastin expression by a post-transcriptional mechanism // *J. Biol. Chem.*- 1992.- V.267.- P. 11593-11599.
  155. Potokar M., Schmidt-Dunker M. The inhibitory effect of new diphosphonic acids on aortic and kidney calcification in vivo // *Atherosclerosis.*- 1978.- V.30.- P. 313-320.
  156. Pratico D. Antioxidants and endothelium protection // *Atherosclerosis.*- 2005.- V.181.- P. 215-224.
  157. Prentice A. What are the dietary requirements for calcium and vitamin D? // *Calcif. Tiss. Int.*- 2002.- V.70.- P. 83-88.
  158. Price P.A., Buckley J.R., Matthew K. Williamson M.K. The amino bisphosphonate ibandronate prevents vitamin D toxicity and inhibits vitamin D-induced calcification of arteries, cartilage, lungs and kidneys in rats // *J. Nutr.*- 2001a.- V.131.- P. 2910-2915.
  159. Price P.A., Faus S.A., Williamson M.K. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 1998.- V.18.- P. 1400 -1407.
  160. Price P.A., Faus S.A., Williamson M.K. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2000.- V.20.- P. 317-327.
  161. Price P.A., Faus S.A., Williamson M.K. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2001b.- V.21.- P. 817 -824.
  162. Price P.A., June H.H., Buckley J.R., Williamson M.K. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2001c.- V.21.- P. 1610-1616.
  163. Price P.A., June H.H., Buckley J.R., Williamson M.K. SB 242784, a selective inhibitor of the osteoclastic V-H+ATPase, inhibits arterial calcification in the rat // *Circ. Res.*- 2002a.- V.91.- P. 547-552.
  164. Price P.A., Chan W.S., Jolson D.M., Williamson M.K. The elastic lamellae of devitalized arteries calcify when incubated in serum. Evidence for a serum calcification factor // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2006.- V.26.- P. 1079-1085.
  165. Price P.A., Omid N., Than T.N., Williamson M.K. The amino bisphosphonate ibandronate prevents calciphylaxis in the rat at doses that inhibit bone resorption // *Calcif. Tissue Int.*- 2002b.- V.71.- P. 356-363.
  166. Qin X., Corriere M.A., Matrisian L.M., Guzman R.J. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2006.- V.26.- P. 1510-1516.



167. Rachez C., Freedman L. Mechanisms of gene regulation by vitamin D<sub>3</sub> receptor: a network of coactivator interactions // *Gene.*- 2000.- V.246.- P. 9-21.
168. Rajamannan N.M., Subramaniam M., Caira F., Stock S.R., Spelsberg T.C. Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced calcification in the aortic valves via the Lrp5 receptor pathway // *Circulation.*- 2005.- V.112.- P. 1229 -234.
169. Rajasree S., Umashankar P.R., Lal A.V., Sarma P.S., Kartha C.C. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor is upregulated in aortic smooth muscle cells during hypervitaminosis D // *Life Sci.*- 2002.- V.70.- P. 1777-1788.
170. Ram C.V. Anti-atherosclerotic and vasculoprotective actions of calcium antagonists // *Am. J. Cardiol.*- 1990.- V.66.- P. 29I-32I.
171. Rao J., Jamadeesan V. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in iron deficiency and effect of carcinogen feeding. // *Free Radic. Biol. Med.* - 1996. - Vol.21, № 1. - P. 103-108.
172. Rebsamen M., Sun J., Norman A., Liao J. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase // *Circ. Res.*- 2002.- V.91.- P. 17-24.
173. Reszka A.A., Rodan G.A. Bisphosphonate mechanism of action // *Curr.Rheumatol. Rep.*- 2003.- V.5.- P. 65-74.
174. Reynolds J.L., Joannides A.J., Skepper J.N., McNair R., Schurgers L.J., Proudfoot D., Jahnen-Dechent W., Weissberg P.L., Shanahan C.M. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD // *J. Am. Soc. Nephrol.*- 2004.- V.15.- P. 2857-2867.
175. Rosenblum I.Y., Flora L., Eisenstein R. The effect of disodium ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) on a rabbit model of atherosclerosis // *Atherosclerosis.*- 1975.- V.22.- P. 411-424.
176. Salonen R.M., Nyssönen K., Kaikkonen J., Voutilainen S., Rissanen T.H., Vanharanta M., Salonen J.T., Poulsen H.E. Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: the Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) study // *Circulation.*- 2003.- V.107.- P. 947-953.
177. Scarpelli D.G., Tremblay G., Pearse A.G. A comparative cytochemical and cytologic study of vitamin D induced nephrocalcinosis // *Amer. J. Pathol.*- 1960.- V. 36.- P. 331-353.
178. Schonbeck U., Sukhova G.K., Gerdes N., Libby P. T(H)2 predominant immune responses prevail in human abdominal aortic aneurysm // *Am. J. Pathol.*- 2002.- V.161.- P. 499-506.
179. Selected Powder Diffraction Data for Education and Training (Search Manual and Data Cards), Published by the International Centre for Diffraction Data. - U.S.A., 1988.- 432p.
180. Shah P. Inflammation, metalloproteinases, and increased proteolysis. An emerging pathophysiological paradigm in aortic aneurysm // *Circulation.*- 1997.- V.96.- P. 2115-2117.
181. Shao J.S., Cai J., Towler D.A. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2006.- V.26, N7.- P. 1423-1430.

182. Shioi A. Atherosclerosis and bisphosphonate // *Clin. Calcium.*- 2003.- V.13.- P. 169-172.
183. Shioi A., Katagi M., Okuno Y., Mori K., Juno S., Koyama H., Nishazawa Y. Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor- $\alpha$  and oncostatin M derived from macrophages // *Circ. Res.*- 2002.- V.91.- P. 9-16.
184. Shroff R., Egerton M., Bridel M., et al. A bimodal association of vitamin D levels and vascular disease in children on dialysis // *J. Am. Soc. Nephrol.*- 2008.- V.19.- P. 1239-1246.
185. Singh U., Jialal J. Oxidative stress and atherosclerosis // *Pathophysiology.*- 2006.- V. 13.- P. 129-142.
186. Somjen D., Weisman Y., Kohen F., et al. 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds // *Circulation.*- 2005.- V.111.- P. 1666-1671.
187. Sowers J.R. Calcium channel blockers and atherosclerosis // *Am. J. Kidney Dis.*- 1990.- V.16, N.4, Suppl 1.- P. 3-9.
188. Stender S., Stender I., Nordestgaard B., Kjeldsen K. No effect of nifedipine on atherogenesis in cholesterol-fed rabbits // *Arteriosclerosis.*- 1984.- V.4.- P. 389-394.
189. Stephens N.G., Parsons A., Schofield P.M., Kelly F., Cheeseman K., Mitchinson M.J. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS) // *Lancet.*- 1996.- V.347.- P. 781-786.
190. Stubbs J.R., Liu S., Tang W., Zhou J., Wang Y., Yao X., Quarles L.D. Role of hyperphosphatemia and 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice // *J. Am. Soc. Nephrol.*- 2007.- V.18.- P. 2116-2124.
191. Sugden J.A., Davies J.I., Witham M.D., Morris A.D., Struthers A.D. Vitamin D improves endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels // *Diabet. Med.*- 2008.- V.25.- P. 320-325.
192. Tanimura A., McGregor D.H., Anderson H.C. Matrix vesicles in atherosclerotic calcification // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*- 1983.- V.172.- P. 173-177.
193. Tanimura A., McGregor D.H., Anderson H.C. Calcification in atherosclerosis. I. Human studies // *J. Exp. Pathol.*- 1986.- V.2.- P. 261-273.
194. Tintut Y., Alfonso Z., Saini T., Radcliff K., Watson K., Bostrom K., Demer L.L. Multilineage potential of cells from the artery wall // *Circulation.*- 2003.- V.108.- P. 2505-2510.
195. Towler D.A. Inorganic pyrophosphate. A paracrine regulator of vascular calcification and smooth muscle phenotype // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2005.- V.25 - P. 651-654.
196. Tukaj C., Wrzolkowa T. Effects of vitamin D on aortic smooth muscle cells in culture // *Toxicology In Vitro.*- 1996.- V.10.- P. 701-711.
197. Tukaj C., Kubasik-Juraniec J., Kraszpulski M. Morphological changes of aortal smooth muscle cells exposed to calcitriol in culture // *Med. Sci. Monit.*- 2000.- V.6.- P. 668-674.
198. Uchida M., Ozono K., Pike J.W. Activation of the human osteocalcin gene by 24R,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> occurs through the vitamin D receptor

- and the vitamin D-responsive element // *J. Bone Miner. Res.*- 1994.- V.9.- P. 1981-1987.
199. Vattikuti R., Towler D. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective // *Am. J. Physiol.*- 2004.- V.286.- P. E686-E696.
  200. Veldman C., Cantorna M., DeLuca H. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in the immune system // *Arch. Biochem. Biophys.*- 2000.- V.374.- P. 334-338.
  201. Verhaar M.C., Honing M.L.H., van Dam T., Zwart M., Koomans H.A., Kastelein J.J.P., Rabelink T.J. Nifedipine improves endothelial function in hypercholesterolemia, independently of an effect on blood pressure or plasma lipids // *Cardiovasc. Res.*- 1999.- V.42.- P. 752-760.
  202. Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety// *Am. J. Clin. Nutr.*- 1999.- V.69.- P. 842-856.
  203. Vieth R. The pharmacology of vitamin D, including fortification strategies // In: Feldman D, Pike J.W., Glorieux F.H., editors. *Vitamin D.*- Burlington: Elsevier Academic Press, 2005.- P. 995-1015.
  204. Virchow R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI: A more precise account of fatty metamorphosis. April 14, 1858. - Philadelphia: J.B.Lippincott and Co.- 1863. - P. 383-408.
  205. Watanabe N., Ishikawa Y., Okamoto R., Watanabe Y., Fukuzaki H. Nifedipine suppressed atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits but not in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits // *Artery.*- 1987.- V.14.- P. 283-294.
  206. Wang T.J., Pencina M.J., Booth S.L., Jacques P.F., Ingelsson E., Lanier K., Benjamin E.J., D'Agostino R.B., Wolf M., Vasan R.S. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease // *Circulation.*- 2008. - V.117.- P. 503-511.
  207. Weinstein D.B. The antiatherogenic potential of calcium antagonists // *J. Cardiovasc. Pharmacol.*- 1988.- V.12, Suppl.6.- P. S29-S35.
  208. Weinstein D.B., Heider J.G. Antiatherogenic properties of calcium antagonists // *Am. J. Cardiol.*- 1987.- V.59.- P. B163-B172.
  209. Weinstein D.B., Heider J.G. Protective action of calcium channel antagonists in atherogenesis and experimental vascular injury // *Am. J. Hypertens.*- 1989a.- V.2, N.3, Pt.1.- P. 205-212.
  210. Weinstein D.B., Heider J.G. Antiatherogenic properties of calcium antagonists. State of the art // *Am. J. Med.*- 1989b.- V.86.- P. 27-32.
  211. Willheim M., Thien R., Schratlbauer K., Bajna E., Holub M., Gruber R., Baier K., Pietschmann P., Reinisch W., Scheiner O., Peterlik M. Regulatory effects of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on the cytokine production of human peripheral blood lymphocytes // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*- 1999.- P. 84-89.
  212. Wu S., Ren S., Chen H., Chun R., Gacad M., Adams J. Intracellular vitamin D binding proteins: novel facilitators of vitamin D-directed transactivation // *Mol. Endocrinol.*- 2000.- V.14.- P. 1387-1397.
  213. Wu-Wong J.R., Nakane M., Ma J., Ruan X., Kroeger P.E. Effects of Vitamin D analogs on gene expression profiling in human coronary artery smooth muscle cells // *Atherosclerosis.*- 2006.- V.186.- P. 20-28.

214. Wu-Wong J.R., Nakane M., Ma J., Ruan X., Kroeger P.E. VDR-mediated gene expression patterns in resting human coronary artery smooth muscle cells // *J. Cell. Biochem.*- 2007.- V.100.- P. 1395-1405.
215. Wu-Wong J.R., Noonan W., Ma J., Dixon D., Nakane M., Bolin A.L., Koch K.A., Postl S., Morgan S.J., Reinhart G.A. Role of phosphorus and vitamin D analogs in the pathogenesis of vascular calcification // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*- 2006.- V.318.- P. 90-98.
216. Yang H., Roberts L.J., Shi M.-J., Zhou L.-C., Ballard B.R., Richardson A., Guo Z.-M. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/ZnSOD dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E // *Circ. Res.*- 2004.- V.95.- P. 1075-1081.
217. Ylikomi T., Laaksi I., Lou Y.-R., Martikainen P., Miettinen S., Pennanen P., Purmonen S., Syvala H., Vienonen A., Tuohimaa P. Antiproliferative actions of vitamin D // *Vitam. Horm.*- 2002.- V.64.- P. 357-406.
218. Zemlenyi T. *Enzyme biochemistry of the arterial wall.*- London: Lloyd-Luce, 1968.- 273p.
219. Zemlenyi T. Vascular enzymes and the relevance of their study to problems of atherogenesis // *Med. Clin. North. Amer.*- 1974.- V.58.- P. 293-321.
220. Zhao J., Warburton D. Matrix Gla protein gene expression is induced by transforming growth factor-beta in embryonic lung culture // *Am. J. Physiol.*- 1997.- V. 273, Pt.1.- P. L282-L287.
221. Zittermann A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? // *Brit. J. Nutr.*- 2003.- V.89.- P. 552-572.
222. Zittermann A., Koerfer R. Protective and toxic effects of vitamin D on vascular calcification: clinical implications // *Mol. Aspects Med.*- 2008.- V.29.- P. 423-432.
223. Zittermann A., Schleithoff S.S., Koerfer R. Vitamin D and vascular calcification // *Curr. Opin. Lipidol.*- 2007.- V.18.- P. 41-46.
224. Zureik M., Galan P., Bertrais S., Mennen L., Czernichow S., Blacher J., Ducimetiere P., Hercberg S. Effects of long-term daily low-dose supplementation with antioxidant vitamins and minerals on structure and function of large arteries // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2004.- V.24.- P. 1485-1491.

## ЗМІСТ

Передмова	<b>3</b>
<b>Глава 1</b> Сучасні уявлення про механізми токсичної дії вітаміну D на судинну стінку	<b>5</b>
<b>Глава 2</b> Роль порушень енергетичного обміну судинної стінки у розвитку її уражень, зумовлених вітаміном D	<b>33</b>
<b>Глава 3</b> Роль оксидативного стресу в патогенезі D-гіпервітамінозних уражень кровноносних судин (О.В.Атаман, В.Ю.Гарбузова)	<b>61</b>
<b>Глава 4</b> Значення загальних і місцевих чинників у розвитку кальцифікації артеріальної стінки, зумовленої гіпервітамінозом D (О.В.Атаман, Я.В.Хижня)	<b>98</b>
Література	<b>135</b>

Наукове видання

**Атаман** Олександр Васильович

**Механізми розвитку D-гіпервітамінозних  
уражень кровоносних судин**

Монографія

Відповідальний за випуск О.В.Атаман  
Редактор О.В.Атаман  
Художнє оформлення обкладинки О.В.Атамана  
Комп'ютерне верстання О.В.Атамана

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 8,83. Обл.-вид. арк. 8,40. Тираж 300 пр.  
Зам. №

Видавець і виготовлювач  
Сумський державний університет,  
вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК №3062 від 17.12. 2007