

## ГІДРОКСИЛЮВАННЯ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛУ В ГЕПАТОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА ДІЇ ПРЕДНІЗОЛОНУ

А. В. ХОМЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: annavic@ukr.net

*Глюкокортикоїдна терапія супроводжується розвитком процесів, характерних для стероїдного остеопорозу. Опосередковані ефекти глюкокортикоїдів на кісткову тканину виявляються через порушення мінерального обміну, який регулюється вітаміном D<sub>3</sub>. У зв'язку з цим ми вивчали метаболізм холекальциферолу за дії преднізолону. Показано, що преднізолон спричинює порушення метаболізму холекальциферолу в гепатоцитах, а саме пригнічує вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилазну активність. Мікросомний (CYP2R1) та мітохондріальний (CYP27A1) ізоензими вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилази гепатоцитів функціонують за різних концентрацій субстрату й відрізняються за вмістом у тканині печінки: відносний вміст CYP27A1 є вищим, ніж CYP2R1. За введення преднізолону зменшується вміст як мітохондріального, так й мікросомного ізоензимів вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилази. Гальмування вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилюючої системи гепатоцитів обумовлює значне зниження вмісту 25ОНD<sub>3</sub> в сироватці крові.*

*Ключові слова: вітамін D<sub>3</sub>, 25ОНD<sub>3</sub>, вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилазна активність, CYP2R1, CYP27A1, гепатоцит, глюкокортикоїди, преднізолон.*

Незважаючи на більш ніж півстолітній строк від впровадження у терапевтичну практику, глюкокортикоїди до цього часу займають одне із провідних місць у протизапальній терапії. Однак їх використання має обмеження, обумовлені розвитком побічних ефектів. Одним із найхарактерніших і потенційно тяжких наслідків глюкокортикоїдної терапії є розвиток глюкокортикоїдного остеопорозу [1, 2]. До переліку причин його розвитку включають зниження абсорбції кальцію в кишечнику, підвищення ниркової екскреції й послаблення каналцевої реабсорбції фосфору і кальцію [2].

Відомо, що основним регулятором кальцій-фосфорного метаболізму в організмі є вітамін D<sub>3</sub>, який забезпечує необхідний рівень мінеральних елементів для адекватного проходження остеогенезу [3, 4]. Згідно з цим, порушення мінерального обміну може бути обумовлене пригніченням метаболізму вітаміну D<sub>3</sub>, зокрема процесів його гідроксилювання з утворенням активних форм – 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> та 24,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Дані про виявлення експресії 1α-гідроксилази й рецепторів до її субстрату – 25ОНD<sub>3</sub> у більшості клітин організму пояснюють багатогранну роль 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в регуляції внутрішньоклітинного метаболізму кальцію, росту і диференціації клітин, ангиогенезу та ін. [3, 5]. Тому в разі недостатності вітаміну D<sub>3</sub> порушується не лише мінеральний обмін,

але й процеси проліферації та диференціації клітин, синтез специфічних регуляторних протеїнів та ензимів, що забезпечують нормальне функціонування клітин і тканин організму.

Біомаркером забезпеченості організму вітаміном D<sub>3</sub> вважається вміст 25ОНD<sub>3</sub> у сироватці крові, який в нормі знаходиться в межах 100–150 нмоль/л (40–60 нг/мл) [6]. Процес гідроксилювання вітаміну D<sub>3</sub> в С25-положенні з утворенням 25-гідроксिवітаміну D<sub>3</sub> забезпечується двома ізоформами вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилази, які локалізовані в ендоплазматичному ретикулумі (CYP2R1) і мітохондріях (CYP27A1) гепатоцитів [7]. Зниження інтенсивності процесів гідроксилювання в гепатоцитах є передумовою недостатньої забезпеченості організму біологічно активними формами холекальциферолу, що асоціюється з низкою захворювань дітей і дорослих [7, 8]. Однією з можливих причин розвитку D<sub>3</sub>-дефіцитного стану організму може бути вплив глюкокортикоїдних препаратів на метаболізм холекальциферолу.

Метою роботи було дослідити вплив синтетичного глюкокортикоїду – преднізолону – на метаболізм вітаміну D<sub>3</sub>, а саме на процеси його гідроксилювання з утворенням попередника біологічно активних форм – 25ОНD<sub>3</sub>.

## Матеріали і методи

Дослідження проводили на білих щурах-самках масою  $100 \pm 5$  г. Тварин було розділено на 2 групи: I – контрольна група; II – група щурів, яким вводили преднізолон (5 мг/кг) перорально за допомогою зонда один раз на день протягом 4 тижнів. Дослідні тварини утримувалися в однакових умовах на повноцінній дієті віварію.

Усі маніпуляції з лабораторними тваринами проводили без порушень загальноприйнятих біоетичних норм гуманного поводження з лабораторними тваринами згідно з відповідними національними та міжнародними положеннями стосовно проведення експериментальних робіт (Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986); Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV, 2006).

Забір крові проводили за декапітації тварин під ефірним наркозом. Сироватку крові одержували центрифугуванням цільної крові при 3000 g протягом 15 хв. Вміст протеїну визначали методом Bradford [9]. Методом імуноензимного аналізу згідно з протоколом для використання набору 25-Hydroxy Vitamin D EIA (IDS, США) визначали вміст 25ОНD<sub>3</sub> у сироватці крові.

Гепатоцити виділяли шляхом інкубації (30 хв, 120 коливань/хв, при 37 °С) тонких зрізів тканини печінки (загальною масою 0,5 г), попередньо відмиті від елементів крові перфузією фізіологічним розчином через ворітну вену, у фосфатному буфері з 0,05% колагенази (Sigma, США) з подальшим диференційним центрифугуванням [10]. Чистоту виділених гепатоцитів контролювали гістохімічним методом після фарбування їх гематоксиліном Бомера. Кількість гепатоцитів підраховували в камері Горяєва.

Для дослідження субклітинного розподілу включеного в гепатоцити холекальциферолу мічений [<sup>3</sup>H]-вітамін D<sub>3</sub> (питома радіоактивність 14 Кі/ммоль, Amersham, Велика Британія) вводили одноразово у хвостову вену щура (200 000 імп./хв у 20 мкл абсолютного етанолу). Через 1 год з тканини печінки виділяли гепатоцити, мітохондрії й мікросоми згідно з описаним методом [10, 11] та гідролізували 30%-им КОН. У гідролізатах визначали включення [<sup>3</sup>H]-холекальциферолу, яке розраховували в імп./хв·мг протеїну). Представлення мітохондріальної та мікросомної фракцій печінки, як таких, що відповідають гепатоцитам, засновано на даних літератури

про те, що 85% тканини печінки ссавців становлять саме гепатоцити [12].

Активність вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилази визначали *in vitro* в гепатоцитах після їх інкубації (2 год, 120 коливань/хв, при 37 °С) у фосфатному буфері з 20 мМ HEPES, 100 мкМ неміченого вітаміну D<sub>3</sub> (вносили в 20 мкл абсолютного етанолу) як описано в роботі [13]. Екстракцію, колоночну хроматографію та кількісне визначення утвореного в процесі реакції 25ОНD<sub>3</sub>, проводили методом радіоконкурентного зв'язування [<sup>3</sup>H]-25ОНD<sub>3</sub> (питома радіоактивність 5 мкКі/ммоль; PerkinElmer, США) згідно з [10]. Вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилазну активність гепатоцитів виражали в пмолях 25ОНD<sub>3</sub> за годину інкубації на 10<sup>6</sup> клітин.

*Вестерн-блот аналіз протеїнів CYP27A1, CYP2R1.* Заморожені зразки тканини печінки гомогенізували у буфері для екстракції протеїнів (20 мМ трис-НСl, рН 7,5; 1% три-тону Х-100, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЕДТА, 1% дезоксихолату натрію та суміш інгібіторів протеїнази і фосфатази: 1 мкМ апротиніну, 23 мкМ леупептину, 1,5 мкМ пепстатину, 1 мМ фенілметансульфонілфториду, 5 мМ бензамідину, 1 мМ ортованадату натрію) у співвідношенні 1 : 10 (вага/об'єм) на льодяній бані. Гомогенат додатково обробляли на ультразвуковому дезінтеграторі (Labsonic M, Sartorius, Німеччина) та залишали для екстрагування на льоду протягом 20 хв. Нерозчинну в детергенті фракцію осаджували центрифугуванням при 14 000 g протягом 20 хв при 4 °С. Електрофоретично розділені протеїни (50–100 мкг/лунку) в поліакриламідному гелі в буферній системі Леммлі [14], переносили на нітроцелюлозну мембрану (Sigma, США) протягом 1 год при 350 mA у буфері, що містив: 25 мМ трису, 192 мМ гліцину, рН 8,3; 0,1% SDS, 20% метанолу. Вільні центри зв'язування блокували протягом 1 год 5%-им знежиреним сухим молоком (AppliChem, Німеччина) у фосфатному буфері з 0,05% твіну-20. Після кожного етапу інкубації мембрану тричі по 5 хв відмивали фосфатним буфером з 0,1%-им твіном-20. Мембрану інкубували ніч при 4 °С з поліклональними антиСYP2R1 (1 : 200), антиСYP27A1 (1 : 200) антитілами (Santa Cruz Biotechnology, США) та протягом 1 год при кімнатній температурі із вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому (1 : 5000) (Santa Cruz Biotechnology, США). Для контролю однакового вмісту протеїнів у пробах мембрану інкубували з моноклональними анти-β-актин антитілами (1 : 10 000) (Sigma, США). Імунореактивні

сигнали на мембрані виявляли за допомогою інкубації мембрани з реактивами для посиленої хемілюмінесценції (Sigma, США). Інтенсивність сигналів на рентгенівських плівках обраховували за допомогою програми GELPRO32.

Опрацювання і статистичну обробку результатів проводили за програмами Microsoft Excel 2003, GELPRO32. Для визначення вірогідності відмінностей між одержаними величинами використовували *t*-критерій Стьюдента. Вірогідними вважали відмінності при  $P < 0,05$ .

### Результати та обговорення

Глюкокортикоїди – лікарські засоби, що поєднують у собі виражені протизапальні й імуносупресорні властивості. Це поставило їх у ряд сильнодіючих препаратів, незамінних у ревматології, алергології, онкології, гематології, гастроентерології та інших галузях медицини. Однак під час глюкокортикоїдної терапії у 30–50% пацієнтів внаслідок порушення балансу кальцію, обміну вітаміну  $D_3$ , секреції гормону паращитовидних залоз розвивається глюкокортикоїдіндукований остеопороз [2].

Виходячи з визначальної ролі вітаміну  $D_3$  в регуляції мінерального обміну в організмі та підтриманні структурно-функціонального стану кісткової тканини, ми дослідили вплив преднізолону на метаболізм вітаміну  $D_3$ , а саме вітаміну  $D_3$  25-гідроксилазну активність гепатоцитів та вміст його першої біологічно активної форми – 25-гідроксиколекальциферолу в сироватці крові, як оптимального показника забезпеченості організму вітаміном  $D_3$ .

Наведені в табл. 1 результати показують, що за введення преднізолону вміст  $25OHD_3$  в сироватці крові зменшується у 3 рази порівняно з контролем. За такого рівня  $25OHD_3$  (31,2 нмоль/л), діагностується глибока D-вітамінна недостатність, що обумовлюється пригніченням загальної вітаміну  $D_3$  25-гідроксилазної активності гепатоцитів (сумарна активність CYP27A1 – ізоензиму мітохондрій та CYP2R1 – ізоензиму ендоплазматичного ретикулума). Так, за дії преднізолону загальна активність вітаміну  $D_3$  25-гідроксилази знижується більш ніж у 2 рази порівняно з контролем (рис. 1). Таким чином, одержані результати свідчать, що преднізолон негативно впливає на обмін вітаміну  $D_3$  в гепатоцитах, що супроводжується розвитком D-гіповітамінного стану.

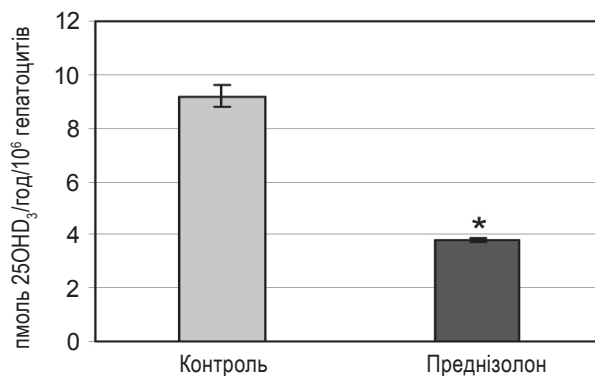


Рис. 1. Активність вітаміну  $D_3$  25-гідроксилази гепатоцитів за дії преднізолону ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ ). \* Різниця порівняно з контролем вірогідна ( $P < 0,05$ )

Таблиця 1. Вміст  $25OHD_3$  в сироватці крові щурів за дії преднізолону ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )

Досліджувані групи	$25OHD_3$ , нмоль/л
Контроль	$100,6 \pm 4,3$
Преднізолон	$31,2 \pm 0,9^*$

\*Різниця порівняно з контролем вірогідна ( $P < 0,05$ )

Механізм зниження активності вітаміну  $D_3$  25-гідроксилази в гепатоцитах може бути зумовлений низкою чинників: порушенням транспортування холекальциферолу в гепатоцити; зниженням кількості протеїнів-рецепторів до вітаміну  $D_3$ ; інгібуванням преднізолоном активності вітаміну  $D_3$  25-гідроксилази або синтезу її ізоформ CYP2R1 й CYP27A1 тощо.

Швидкість гідроксилювання вітаміну  $D_3$  в гепатоцитах значною мірою залежить від інтенсивності його надходження в клітини. Згідно з даними літератури, печінкою із кровотоку поглинається 60–70% холекальциферолу, який розподіляється по клітинах органу, однак гідроксилювання вітаміну  $D_3$  відбувається тільки в гепатоцитах [10]. Результати дослідження субклітинного розподілу включеного в гепатоцити [<sup>3</sup>H]-холекальциферолу, які наведено в табл. 2, показали, що більша частина мітки акумулюється мікросомами (20,5%) та мітохондріями (40%). Ці результати узгоджуються з даними літератури щодо внутрішньоклітинної локалізації ензимів, які гідроксилюють вітаміну  $D_3$  [7, 15].

Вітаміну  $D_3$  25-гідроксилаза гепатоцитів належить до родини цитохромів P-450 (CYP). Мікросомна форма вітаміну  $D_3$  25-гідроксилази (CYP2R1) вважається регуляторним ензимом,

Таблиця 2. Розподіл [<sup>3</sup>H]-холекальциферолу за субклітинними фракціями гепатоцитів ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Субклітинна фракція	Імп./хв·мг протеїну
Мікросоми	1797 ± 120
Мітохондрії	3492 ± 183
Не фракціоновані гепатоцити	8772 ± 502

який активно функціонує при фізіологічних концентраціях вітаміну. Цей ензим характеризується високою спорідненістю та низькою ємністю зв'язування по відношенню до субстрату. Найбільша активність ензиму виявлена за D-гіповітамінозу. Його дія може інгібуватися як субстратом, так і продуктом реакції – 25ОНD<sub>3</sub> [16, 17]. Мітохондріальна вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилаза (CYP27A1), яка локалізована на внутрішній поверхні мембрани, має низьку специфічність, але високу ємність зв'язування субстрату. Цей ензим функціонує при концентраціях субстрату, вищих за фізіологічні. Вважають, що його активність не регулюється ані вмістом холекальциферолу, ані 25ОНD<sub>3</sub>, хоча єдиної точки зору щодо цього питання не існує [15, 18]. Проведені нами дослідження активності вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилази залежно від концентрації субстрату в межах від 5 мкМ до 150 мкМ продемонстрували наявність двох піків (рис. 2): при концентрації субстрату 15 мкМ і 100 мкМ, що відповідає наявності в гепатоцитах двох ізоформ ензиму. Отже, вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилазна система гепатоцитів включає ензими мікросом та мітохондрій, які відрізняються активністю та

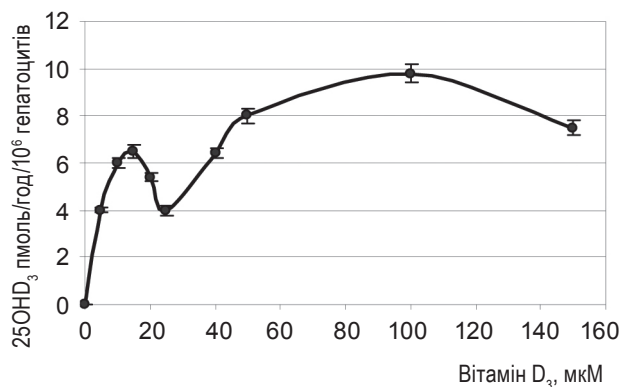


Рис. 2. Концентраційна залежність вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилазної активності ізольованих гепатоцитів контрольних тварин ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

функціонують за різних концентрацій субстрату – вітаміну D<sub>3</sub>.

Незважаючи на те, що реакції метаболізму вітаміну D<sub>3</sub> відомі вже досить давно, ензим, що каталізує етап 25-гідроксилювання в печінці довго не було ідентифіковано. Щонайменше шість CYPs можуть каталізувати цю реакцію *in vitro*, в тому числі CYP2C11, CYP2D25, CYP2J1, CYP2R1, CYP3A4 і CYP27A1 [19]. З цих CYPs виділяють два основних кандидати на роль вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилази: CYP27A1 і CYP2R1. CYP2R1 був вперше ідентифікований як мікросомна вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилаза в миші й людини в 2003 році. Було показано, що CYP2R1 мРНК експресується в різних тканинах, але переважно в печінці та сім'яниках, і локалізована в ендоплазматичному ретикулумі [17]. У низці досліджень встановлено, що в осіб, які мали мутації в гені CYP2R1 діагностувався аномально низький рівень циркулюючого 25ОНD<sub>3</sub>, порушення кальцієвого гомеостазу і класичні пошкодження кісткової тканини [17, 20, 21]. Існують дані, що аномалія гену CYP27A1 або порушення його експресії в людей спричинює розвиток церебрально-сухожильного ксантоматозу, рідкісні вроджені порушення синтезу жовчних кислот і метаболізму холестеролу, характеризується неврологічною дисфункцією, ризиком розвитку атеросклерозу та супроводжується нижчим, ніж зазвичай, рівнем 25ОНD<sub>3</sub> у сироватці крові й характерними ознаками остеопорозу, підвищенням переломів кісток [22].

Не дивлячись на те, що концентрація 25ОНD<sub>3</sub> в сироватці крові розглядається як найнадійніший індикатор статусу вітаміну D<sub>3</sub> в організмі та чітко встановлено, що у гепатоцитах наявні дві ізоформи вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилази, ще залишаються відкритими питання регуляції активності цих ензимів залежно від функціонального стану організму. Тому ми дослідили зміни вмісту протеїнів CYP2R1 й CYP27A1 у тканині печінки щурів за дії преднізолону.

Одержані за допомогою вестерн-блот аналізу дані, які наведено на рис. 3, демонструють різницю вмісту мітохондріального (CYP27A1) й мікросомного (CYP2R1) ізоензимів вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилази гепатоцитів у контрольних тварин, а саме низький вміст CYP2R1 порівняно з CYP27A1. За введення преднізолону відбувається зниження вмісту обох гідроксилюючих протеїнів. Встановлено чітко виражене зниження вмісту мітохондріального ізоензиму на 77,7% порівняно з контролем. Вміст мікросомного

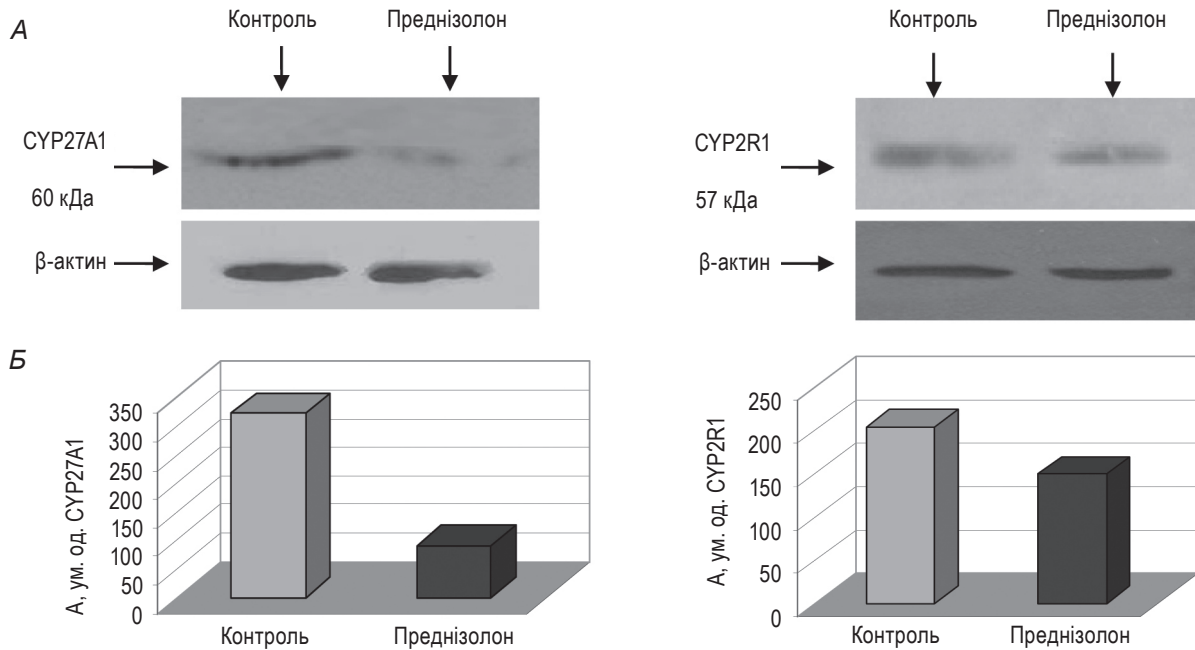


Рис. 3 Вестерн-блот аналіз вмісту CYP27A1 і CYP2R1 у тканині печінки: А – блотограми; Б – діаграми

ізоензиму за цих умов зазнає незначного зниження порівняно з контролем – на 26,5%.

Із даних літератури відомо, що CYP2R1 виявляє більшу спорідненість до вітаміну D<sub>3</sub> і вищу гідроксилазну активність, ніж CYP27A1. CYP2R1 здатен перетворювати вітамін D<sub>3</sub> в наномолярних концентраціях, що є доказом його переважного функціонування за фізіологічних концентрацій холекальциферолу [23]. Можна припустити, що саме CYP2R1 є основним вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилюючим ферментом гепатоцитів за дії преднізолону і виконує компенсаторну роль, яка спрямована на підтримання достатнього рівня 25ОНD<sub>3</sub> в сироватці крові для виявлення фізіологічних функцій вітаміну D<sub>3</sub> в організмі.

Таким чином, одержані результати дослідження процесу гідроксилювання холекальциферолу за дії преднізолону дають можливість дійти висновку:

1. Вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилазна система гепатоцитів включає ізоензими мітохондрій (CYP27A1) і мікосом (CYP2R1), які відрізняються активністю, вмістом та функціонують за різних концентрацій субстрату – вітаміну D<sub>3</sub>.

2. Преднізолон негативно впливає на функціональну активність гепатоцитів, що супроводжується зниженням вмісту як протеїну CYP27A1, так й CYP2R1, пригніченням загальної вітамін D<sub>3</sub> 25-гідроксилазної

активності й значним зменшенням вмісту 25ОНD<sub>3</sub> в сироватці крові.

### ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА В ГЕПАТОЦИТАХ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ПРЕДНИЗОЛОНА

А. В. Хоменко

Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев;  
e-mail: annavic@ukr.net

Глюкокортикоидная терапия сопровождается развитием процессов, характерных для стероидного остеопороза. Опосредованные эффекты глюкокортикоидов на костную ткань проявляются в нарушении минерального обмена, который регулируется витамином D<sub>3</sub>. В связи с этим мы изучали метаболизм холекальциферола при действии преднизолонa. Показано, что преднизолон вызывает нарушение метаболизма холекальциферола в гепатоцитах, а именно подавляет витамин D<sub>3</sub> 25-гидроксилазную активность. Микросомный (CYP2R1) и митохондриальный (CYP27A1) изоэнзимы витамин D<sub>3</sub> 25-гидроксилазы гепатоцитов функционируют при разных концентрациях субстрата и отличаются содержанием в ткани печени: относительное содержание CYP27A1 выше, чем CYP2R1. При введении преднизо-

лона уменьшается содержание как митохондриального, так и микросомного изоэнзимов витамин D<sub>3</sub> 25-гидроксилазы. Торможение витамин D<sub>3</sub> 25-гидроксилирующей системы гепатоцитов обуславливает значительное снижение содержания 25OHD<sub>3</sub> в сыворотке крови.

**Ключевые слова:** витамин D<sub>3</sub>, 25OHD<sub>3</sub>, витамин D<sub>3</sub> 25-гидроксилазная активность, CYP2R1, CYP27A1, гепатоцит, глюкокортикоиды, преднизолон.

### CHOLECALCIFEROL HYDROXYLATION IN RAT HEPATOCYTES UNDER THE INFLUENCE OF PREDNISOLONE

A. V. Khomenko

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: annavic@ukr.net

Glucocorticoid therapy is accompanied by development of processes typical of steroid osteoporosis. Indirect effects of glucocorticoids on the bone tissue are due to changes in mineral metabolism, which is regulated by vitamin D<sub>3</sub>. In this connection, we studied the influence of prednisolone on cholecalciferol metabolism. The study has shown that prednisolone action causes impairment of cholecalciferol metabolism in hepatocytes due to inhibiting vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase activity. Microsomal (CYP2R1) and mitochondrial (CYP27A1) isoenzymes of vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase were found to function at different concentrations of the substrate. The relative protein contents of the isoenzymes greatly differed in the liver with the prevalence of CYP27A1 over CYP2R1. Prednisolone administration resulted in the lowering of both mitochondrial and microsomal isoenzymes of vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase. The inhibition of vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylating system in hepatocytes contributed to a significant reduction in blood serum 25OHD<sub>3</sub>.

**Key words:** vitamin D<sub>3</sub>, 25OHD<sub>3</sub>, vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase activity, CYP2R1, CYP27A1, hepatocytes, glucocorticoids, prednisolone.

- Gordon M. M., Stevenson S., Hunter J. A. // *Ann. Rheum. Dis.* – 2002. – **61**, N 10. – P. 947–948.
- Gulko P. S., Mulloy A. L. // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 1996. – **14**, N 2. – P. 199–206.
- Lips P. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2006. – **92**, N 1. – P. 4–8.
- Гайко Г. В., Калашников Ан. В., Бруско А. Т. и др. / Витамин D и костная система. – К.: Книга плюс. – 2008. – 176 с.
- Bikle D. // *J. Clin. Endocrin. Metab.* – 2009. – **94**, N 1. – P. 26–34.
- Zerwekh J. E. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2008. – **87**, N 4. – P. 1087S–91S.
- Jones. G. // *Standardy Medyczne / Pediatria.* – 2012. – **9**, N 5. – P. 605–609.
- Holick M. F. // *Ibid.* – P. 590–594.
- Bradford M. M. // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
- Ануховская Л. И., Хрестовая Н. Л., Антоненко Л. В. // *Укр. биохим. журн.* – 1991. – **63**, № 5. – С. 89–94.
- Paulson S. K., Phelps M., DeLuca H. F. // *Biochemistry.* – 1986. – **25**, N 22. – P. 6821–6826.
- Quistorff B., Dich J., Grunnet N. / In: *Methods in Molecular Biology*, ed. by Prescott D. M. – 1990. – **5**. – P. 151–160.
- Великий М. М., Ануховська Л. І., Хоменко А. В. та ін. // *Мед. клін. хімія.* – 2011. – **13**, № 3. – С. 5–12.
- Laemmli U. K. // *Nature.* – 1970. – **227**, N 5259. – P. 680–685.
- Prosser D. E., Jones G. // *Trends Biochem. Sci.* – 2004. – **29**, N 12. – P. 664–673.
- Gaston-Barre M. / In: *Vitamin D*, ed. by Feldman D., Elsevir. – 2005. – P. 47–67.
- Cheng J. B., Motola D. L., Mangelsdorf D. J., Russell D. W. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, N 39. – P. 38084–38093.
- De Luca H. F. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2004. – **80**, N 6. – P. 1689S–1696S.
- Zhu J., DeLuca H. F. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2012. – **523**, N 1. – P. 30–36.
- Cheng J. B., Levine M. A., Bell N. H. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2004. – **101**, N 20. – P. 7711–7715.
- Sakaki T. // *Clin. Calcium.* – 2006. – **16**, N 7. – P. 1129–1135.
- Berginer V., Shany S., Alkalay D. et al. // *Metabolism.* – 1993. – **42**, N 1. – P. 69–74.
- Shinkyō R., Sakaki T., Kamakura M. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – **324**, N 1. – P. 451–457.

Отримано 25.12.2012