

ВЛИЯНИЕ МИКОТОКСИНОВ — АФЛАТОКСИНА В₁ И Т-2-ТОКСИНА — НА ОБМЕН ВИТАМИНА D₃ И РЕЦЕПЦИЮ ЕГО ГОРМОНАЛЬНОЙ ФОРМЫ — 1,25-ДИОКСИВИТАМИНА D₃ — У КРЫС

Институт питания АМН СССР, Москва

Микотоксины — естественные загрязнители пищевых продуктов — являются соединениями с широким спектром токсического действия [5, 6]. Имеются сведения, что афлатоксины нарушают обмен кальция. У цыплят с маргинальной обеспеченностью витамином D₃ наблюдается усиление проявлений рахита в результате их интоксикации афлатоксинами [9]. Афлатоксины угнетают рост костей, снижают их прочность и эластичность [12]. Афлатоксин В₁ уменьшает скорость миграции ⁴⁵Са из плазмы крови в лабильный пул этого минерала в костной ткани и снижает содержание Са в золе целой кости [16].

В то же время следует отметить, что данных о влиянии афлатоксинов на обмен витамина D, которому принадлежит ключевая роль в регуляции и поддержании гомеостаза Са, в литературе нет. Необходимым условием выполнения этим витамином своих функций являются его последовательные превращения в печени и почках с образованием 25-оксивитамина D₃ (25-OHD₃ и 1,25-диоксивитамина D₃ [1,25(OH)₂D₃] или 24,25-диоксивитамина D₃ [24,25(OH)₂D₃] [11]. 25-OHD₃ является транспортным метаболитом D₃, а 1,25(OH)₂D₃ — его гормональной формой, механизм действия которой аналогичен таковому других стероидных гормонов [10]. Тканями-мишенями 1,25(OH)₂D₃ являются слизистая оболочка тонкой кишки, где этот гормон стимулирует всасывание Са, и костная ткань, резорбция и remodelирование которой усиливаются при его действии. 24,25(OH)₂D₃ обладает стимулирующей активностью в отношении образования и минерализации костной ткани [4].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния афлатоксина В₁ на обмен витамина D₃ и рецепцию его гормональной формы у крыс. Наряду с афлатоксином В₁ изучали влияние микотоксина Т-2, токсическое действие которого сопровождается подавлением процессов гидроксилирования в печени [6].

Методика

В опытах использовали самцов крысят-отъемышей Вистар с исходной массой 50±0,05 г. Животные получали полусинтетический рацион, содержащий 0,6 % Са и 0,6 % Р [3]. Подопытные животные были разделены на 6 групп по 10—11 крыс в каждой: 2 контрольные (1-я и 2-я) и по 2 группы, животные которых получали Т-2-токсин (3-я и 4-я [2]) или афлатоксин В₁ ("Sigma", США; 5-я и 6-я). Крысы одной из каждой пары групп находились на рационе, содержащем 1000 МЕ (0,025 мг) витамина D₃ ("Serva", ФРГ) на 1 кг массы тела, что обеспечивало физиологическую потребность крыс в этом витамине, животные другой — 10 000 МЕ/кг (0,25 мг).

Микотоксины вводили животным перорально в пропиленгликоле из расчета 0,5 мл растворителя на 100 г массы тела. Растворы токсинов готовили непосредственно перед введением, нагревая на водяной бане при 50—60 °С. Т-2-токсин вводили в дозе 0,54 мг на 1 кг массы тела в течение 7 дней, афлатоксин В₁ — 0,7 мг/кг в течение 5 дней, что составило 1/7 LD₅₀ каждого токсина для взрослых крыс [5].

Метаболизм витамина D₃ и 25-OHD₃ изучали *in vitro* с использованием срезов печени и почек соответственно. Часть печени и почку тщательно промывали холодным физиологическим раствором на 0,01 М фосфатном буфере и приготавливали по 2 среза коры почек (во фронтальном плане) или левой боковой доли печени (в сагитальном плане) толщиной около 0,5 мм и общей массой 100—130 мг. Срезы помещали в 1 мл инкубационной среды следующего состава (в ммоль/л): NaCl — 100, NaHCO₃ — 25, KCl — 3,5, KH₂PO₄ — 1,2, CaCl₂ — 2,5, MgSO₄ — 1,2, ацетат Na — 2, малат Na — 2, глюкоза — 10, HEPES — 10, pH 7,4 [14].

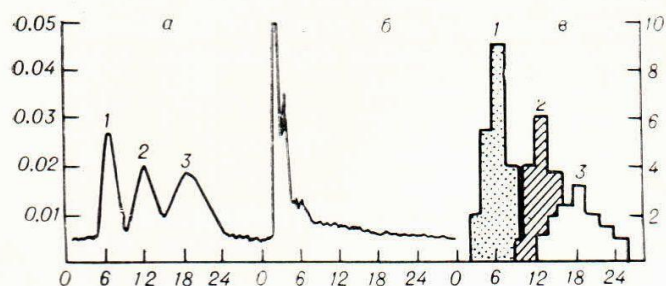


Рис. 1. Предварительная хроматографическая очистка и разделение метаболитов витамина D_3 .

а — хроматограмма смеси стандартов: 1 — 25-OH D_3 (1 мкг), 2 — 24,25(OH) $_2D_3$ (1,5 мкг), 3 — 1,25(OH) $_2D_3$ (2 мкг); б — хроматограмма липидного экстракта почек; в — хроматограмма меченых метаболитов D_3 : 1 — 3H -25-OH D_3 , 2 — 3H -24,25(OH) $_2D_3$, 3 — 3H -1,25(OH) $_2D_3$. Условия хроматографирования: колонка (0,46×25 см), заполненная силикагелем 25—40 мкм («Rsil Prep silica, Alltech Ass.», США), элюирующая система — гексан — изопропанол (4:1), скорость потока 1 мл/мин, чувствительность 0,05 АЕ полной шкалы, $\lambda=265$ нм, скорость движения ленты самописца 20 см/ч. По оси абсцисс — количество элюента (в мл); по оси ординат: слева — поглощение (ΔA), справа — радиоактивность (расп/мин×10 3).

Субстраты гидроксирования, витамина D_3 (холекальциферол, «Serva», ФРГ) и 0,1 мкКи [1 α , 2(p)- 3H] витамина D_3 (удельная радиоактивность 18,3 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) или 25-OH D_3 («Upjohn Co», США) и 0,05 мкКи 25-окси(26,27-метил- 3H) холекальциферола (удельная радиоактивность 20,6 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) вносили в 10 мкл 95 % этанола. Конечная концентрация витамина D_3 и 25-OH D_3 в пробах состав-

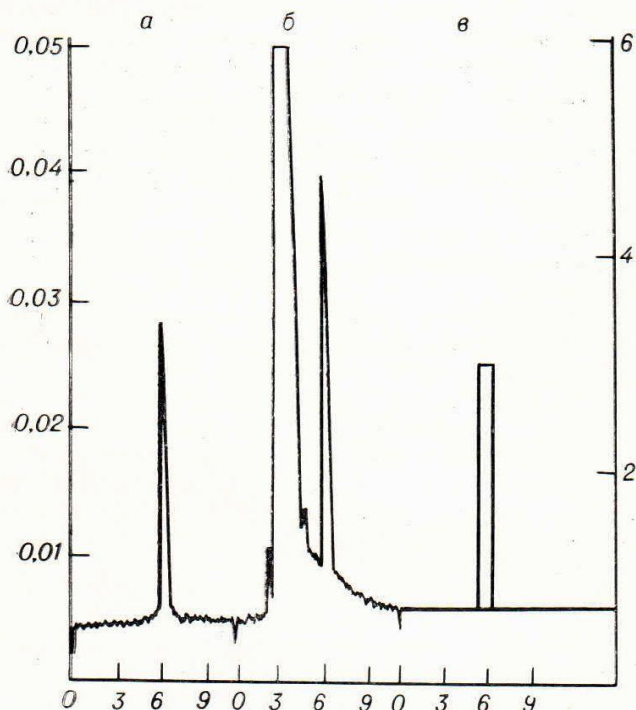


Рис. 2. Очистка и выделение 25-OH D_3 методом ВЭЖХ.

а — хроматограмма стандартного раствора 25-OH D_3 (100 нг); б — хроматограмма предварительно очищенной фракции печени, содержащей 25-OH D_3 ; в — радиоактивность фракции 3H -25-OH D_3 . Условия хроматографии: колонка «Ultrasphere-Si-5 мкм» (0,46×25 см), элюирующая система — гексан — изопропанол (88:12), остальные условия и обозначения те же, что на рис. 1.

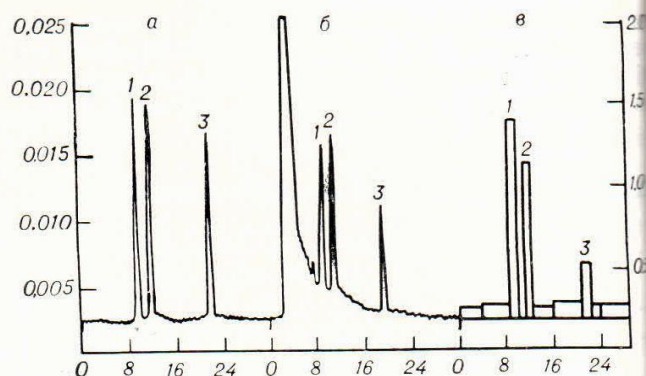


Рис. 3. Очистка и выделение 1,25(OH) $_2D_3$ и 24,25(OH) $_2D_3$ методом ВЭЖХ.

а — хроматограмма смеси стандартов: 1 — 24,25(OH) $_2D_3$ (100 нг), 2 — 1,25(OH) $_2D_3$ (100 нг), 3 — 25-OH D_3 (100 нг); б — хроматограмма предварительно очищенной фракции почек, содержащей 24,25(OH) $_2D_3$ и 1,25(OH) $_2D_3$; 1 — 24,25(OH) $_2D_3$, 2 — 1,25(OH) $_2D_3$, внесенные в экстракт перед предварительной хроматографической очисткой в качестве внутренних стандартов, 3 — остаточные количества неметаболизированного 25-OH D_3 ; в — радиоактивность предварительно очищенной фракции, содержащей 3H -24,25(OH) $_2D_3$ и 3H -1,25(OH) $_2D_3$: 1 — 3H -24,25(OH) $_2D_3$, 2 — 3H -1,25(OH) $_2D_3$, 3 — остаточная радиоактивность неметаболизированного 3H -25-OH D_3 . Условия хроматографии: колонка «Ultrasphere-ODS-5 мкм» (0,46×25 см), элюирующая система — метанол — вода (90:10), скорость движения ленты самописца 15 см/ч; остальные условия и обозначения те же, что на рис. 1.

ляла 100 и 25 мкмоль/л соответственно. Эти концентрации являются насыщающими как для митохондриальной и микросомальной гидроксильных витаминов D_3 печени (25-OHаз), так и для 1- и 24-гидроксильных 25-OH D_3 почек (1- и 24-OHаз) [7, 19]. Перед добавлением субстратов через раствор в течение 1 мин пропускали карбоген (96 % O_2 , 4 % CO_2), после чего пробы закрывали и инкубировали при встряхивании 30 мин.

Экстракцию метаболитов D_3 проводили как описано ранее [3]. Разделение 25-OH D_3 , 1,25(OH) $_2D_3$ и 24,25(OH) $_2D_3$ осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием системы «Вексман», как описано в работах [1, 3] со следующими модификациями. Предварительную хроматографическую очистку экстрактов и частичное разделение метаболитов D_3 проводили на колонке, заполненной силикагелем с размером частиц 25—40 мкм (рис. 1). Фракции, содержащие 25-OH D_3 и 1,25(OH) $_2D_3$ и 24,25(OH) $_2D_3$, затем дополнительно очищали и разделяли на колонке «Ultrasphere-Si-5 мкм» и «Ultrasphere-ODS-5 мкм» (рис. 2 и 3). Выход 25-OH D_3 , 1,25(OH) $_2D_3$ и 24,25(OH) $_2D_3$ после экстракции предварительной хроматографической очистки и ВЭЖХ составил $67,2 \pm 2,6$, $54,5 \pm 1,7$ и $49,1 \pm 2,3$ % соответственно.

Концентрацию рецепторов 1,25(OH) $_2D_3$ в грубых хроматиновой и цитоплазматической фракциях слизистой оболочки тонкой кишки определяли с использованием ранее описанных методов [13, 23] с модификациями. Аликвоты суспензии хроматина (100 мкл, 0,5 мг белка) или цитозоля (100 мкл, 0,9 мг белка) в ТЭД-буфере (трис-HCl — 10 мМ, ЭДТА — 1,5 мМ, дитиотреитол — 1 мМ, фенилметилсульфонил-фторид — 0,3 мМ, pH 7,4) инкубировали 18 при 0—4 °C с 1,25-диокси [23, 24 (n)- 3H] холекальциферолом (удельная радиоактивность 100 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) в насы-

Влияние Т-2-токсина и афлатоксина В₁ на массу тела животных, концентрацию Са, Ф_н, белка и активность ЩФ в сыворотке крови

Группа животных	Масса тела, г	Са, мг на 100 мл	Ф _н , мг на 100 мл	ЩФ, Е/л	Белок, г на 100 мл
1-я	59,9±0,2	10,4±0,15	13,4±0,9	204±23	6,45±0,2
2-я	59,8±0,2	10,7±0,2	12,9±0,5	297±39 ^б	6,5±0,5
3-я	52,8±0,1	8,8±0,5 ^а	10,7±0,7 ^а	106±10 ^а	5,3±0,3 ^а
4-я	52,8±0,2	9,4±0,25 ^а	11,3±0,9	210±20 ^{а, б}	5,4±0,3
5-я	52,5±0,1	9,6±0,1 ^а	11,1±0,8	251±24	5,4±0,3 ^а
6-я	52,7±0,1	9,6±0,15 ^а	11,2±0,6 ^а	338±46	5,8±0,1

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: а — достоверное отличие ($P < 0,05$) от соответствующей контрольной группы (1-я или 2-я), б — то же от соответствующей группы животных с нормальным уровнем витамина D в рационе. Животные 1, 3 и 5-й групп получали 1000 МЕ витамина D₃, 2, 4 и 6-й групп — 10 000 МЕ.

ающей концентрации (3 нмоль/л) в отсутствие (общее связывание) или в присутствии (неспецифическое связывание) 500-кратного молярного избытка 1,25(ОН)₂D₃ («Hoffmann-La Roche», США). Разделение свободного и связанного лиганда осуществляли адсорбцией последнего на гидроксипатите [22].

Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в микрогенате слизистой оболочки тонкой кишки определяли кинетическим методом в среде следующего состава (в ммоль/л): п-нитрофенилфосфат — 0,63—5,84, MgCl₂ — 1, NaOH-цитриновый буфер — 100 pH 9,85, содержащий в исследуемом образце 130—180 мкг белка в 1 мл, 25 °С. Концентрацию белка определяли по методу Лоури в присутствии додецилсульфата натрия.

Концентрацию общего Са, неорганического фосфора, активность ЩФ в сыворотке крови, а также содержание кальция в костной ткани определяли методами, описанными ранее [11]. Транспорт Са в тонкой кишке оценивали по способности дисков, вырезанных из двенадцатиперстной кишки, к поглощению ⁴⁵Са [1]. Концентрацию 25-ОНD в сыворотке крови определяли методом радиоконкурентного белкового связывания с использованием наборов реактивов «Vitamin D₃ — Screening Kit» («Bühlmann Lab.» Швейцария), концентрацию белка — с использованием наборов «Instrumental Lab.» (Италия).

Результаты и обсуждение

Введение крысам-отъемышам Т-2-токсина в дозе 0,54 мг на 1 кг массы

тела в день в течение 7 сут или афлатоксина В₁ в дозе 0,7 мг/кг в течение 5 сут вызывало угнетение аппетита, снижение прироста массы тела, уменьшение двигательной активности, а также местные геморрагии и диарею в случае Т-2-токсина. В группе животных, получавших Т-2-токсин, погибло 1 животное из 11.

Исследуемые микотоксины вызывали нарушения кальций-фосфорного обмена, более выраженные при использовании Т-2-токсина. Эти нарушения заключались в гипокальциемии, тенденции к снижению концентраций Ф_н в сыворотке крови, уменьшении активного транспорта кальция и тонкой кишке (табл. 1 и 2). Такие изменения кальциевого обмена соответствовали обычно наблюдаемым при маргинальной обеспеченности витамином D и могли быть опосредованы нарушением его обмена и функций под действием указанных микотоксинов. С другой стороны, гипокальциемия могла быть обусловлена снижением концентрации белка в сыворотке крови этих животных. Однако одновременная тенденция к гипопосфатемии и

Таблица 2

Активный транспорт Са, кинетические параметры ЩФ в слизистой оболочке тонкой кишки, содержание Са в костной ткани у крыс при введении Т-2-токсина и афлатоксина В₁

Группа животных	Транспорт Са, нмоль/см ² на 15 мин	ЩФ		Содержание Са	
		K _м , мМ	V _{max} , нмоль/мин на 1 мг белка	диафизы, мг/см ³	эпифизы, мг/г
1-я	248±9	1,69±0,02	370±20	304±24	183±8
2-я	272±17	2,19±0,43	397±66	317±13	191±12
3-я	180±12 ^а	2,32±0,43	342±31 ^а	354±18	224±3 ^б
4-я	228±14 ^{а, б}	1,96±0,56	337±28	287±17 ^а	223±8 ^б
5-я	226±20	2,64±0,23 ^а	332±32 ^а	267±22	257±5 ^б
6-я	229±13 ^а	2,19±0,22	386±22	231±16 ^б	257±6 ^б

Концентрация 25-ОНД в сыворотке крови, активность 25-гидроксилазы D_3 в печени, 1- и 24-гидроксилазы 25-ОНД₃ в почках, концентрация ядерных и цитоплазматических рецепторов 1,25(ОН)₂D₃ в слизистой оболочке тонкой кишки у крыс при введении Т-2-токсина и афлатоксина В₁

Группа животных	25-ОНД, нг/мл	25-ОНаза	1-ОНаза	24-ОНаза	Рецепторы 1,25 (ОН) ₂ D ₃ , фмоль на 1 мг белка		
		нмоль на 1 г за 30 мин			ядерные	цитоплазматические	% интернализации
1-я	16,9±1,3	9,33±2,06	0,29±0,06	1,08±0,12	61,7±7,3	2,80	95,7
2-я	36,3±6,8 ^б	14,1±2,85	0,43±0,06	1,18±0,11	78,2±4,4	7,08	91,7
3-я	12,2±3,1	3,91±1,25 ^а	0,23±0,05	0,71±0,12 ^а	37,1±4,9 ^а	6,96	84,2
4-я	10,5±4,2 ^а	3,55±0,69 ^а	0,25±0,02 ^а	0,91±0,08 ^а	64,4±4,8 ^{а, б}	21,1	75,3
5-я	11,2±4,9	6,26±0,77	0,31±0,05	1,26±0,19	41,5±6,5 ^а	8,01	83,8
6-я	22,8±12,2	5,45±0,99 ^а	0,28±0,02 ^а	1,24±0,40	47,5±4,5 ^а	15,0	76,0

Примечание. При определении концентрации циторецепторов 1,25(ОН)₂D₃ в каждой группе использовали по одной объединенной цитоплазматической фракции, полученной от 2—3 животных.

возрастание концентрации Са в крови при высоком уровне витамина D в рационе, когда концентрация белка не увеличивалась, не позволяют исключить роль нарушения обмена витамина D в вызываемой микотоксинами гипокальциемии. Кроме того, корреляция между концентрацией Са и белка в сыворотке крови подопытных животных была слабой ($r=0,32$).

Активность ЩФ в сыворотке крови резко снижалась при введении Т-2-токсина и повышалась при использовании афлатоксина В₁ (см. табл. 1). Активность этого фермента в гомогенате слизистой оболочки тонкой кишки, выраженная в величинах V_{\max} , имела тенденцию к снижению, что сопровождалось некоторым увеличением кажущейся K_m (см. табл. 2). Такие изменения активности ЩФ в сыворотке крови при введении Т-2-токсина и афлатоксина В₁ отмечались ранее [2] и были обусловлены резким уменьшением активности фермента в слизистой оболочке тонкой кишки в случае Т-2-токсина и выходом печеночного изофермента ЩФ в кровь при введении афлатоксина В₁. В наших опытах не наблюдалось значительного снижения V_{\max} ЩФ в гомогенате слизистой оболочки при введении микотоксинов, хотя свойства фермента, по-видимому, изменялись (возрастание K_m). Следует отметить, что у молодых крыс большую часть циркулирующего пула ЩФ составляет костный изофермент. При замедлении роста или remodelировании костной ткани поступление этой изоформы ЩФ в кровь резко снижается [8].

Необходимо подчеркнуть, что на фоне рациона с высоким содержанием витамина D нарушения обмена Са при введении микотоксинов были выражены в меньшей степени, особенно в случае афлатоксина В₁. Это в общем соответствовало тому факту, что у контрольных животных, получавших рацион с высоким уровнем витамина D, наблюдалось некоторое увеличение всасывания Са и активности ЩФ в слизистой оболочке тонкой кишки. Как всасывание Са, так и синтез ЩФ de novo в тонкой кишке индуцируются витамином D [11].

Содержание Са в диафизах бедренной кости увеличивалось при использовании Т-2-токсина (см. табл. 2). В эпифизах содержание этого минерала возрастало при введении как афлатоксина В₁, так и Т-2-токсина. Такие изменения костной ткани могли быть обусловлены подавлением резорбции губчатой и кортикальной кости, сопровождающейся угнетением ее минерализации. Структура кости в этом случае становится более грубой, что может снижать ее прочность и эластичность. Ингибирование резорбции костной ткани при введении Т-2-токсина, по-видимому, более выражено и затрагивает не только эпифизы, но и диафизы.

Использование рациона с высоким содержанием витамина D нормализовало содержание Са в диафизах бедренной кости животных, получавших Т-2-токсин, и вызывало снижение его содержания в случае афлатоксина В₁.

3 При этом содержание Са в эпифизах
1- активалось повышенным.

3 Нарушения обмена Са и состояния
- костной ткани под действием мико-
- токсinov сопровождались выраженны-
- ми изменениями в обмене и рецепции
- витамина D (табл. 3).

Эти изменения в первую очередь за-
трагивали гидроксилирование витами-
на D₃ в печени. Активность 25-ОНазы
снижалась при введении Т-2-токсина
на 58 % и в меньшей степени — при
использовании афлатоксина В₁ (на
33 %). Такое уменьшение продукции
25-ОНD₃ в печени вызывало снижение
концентрации этого метаболита в кро-
ви на 28—34 %. Невыраженная вели-
чина этого снижения, очевидно, обус-
ловлена бóльшим периодом полужиз-
ни 25-ОНD₃ (20—30 дней) по сравне-
нию с продолжительностью опыта.

Гидроксилирование витамина D₃
не является жестко регулируемой ре-
акцией [11], поэтому у крыс, нахо-
дившихся на рационе с высоким со-
держанием витамина D, концентрация
25-ОНD в сыворотке крови и актив-
ность 25-ОНазы в печени повышались.
В то же время у животных, получа-
вших микотоксины, активность 25-
ОНазы на фоне такого рациона не
увеличивалась. Здесь уместно отме-
тить, что при определении активности
25-ОНазы была использована высокая
концентрация витамина D₃, при кото-
рой функционирует митохондриальная
монооксигеназа этого витамина, име-
ющая значительно более высокую
максимальную скорость, чем микро-
сомная [19]. Механизм снижения ак-
тивности 25-ОНазы при действии ми-
котоксинов и резистентности этого
фермента к большим дозам витамина
D₃ остается неясным. Уменьшение
уровня цитохрома Р-450 и активности
микросомальных монооксигеназ на-
блюдается при введении афлатоксина
В₁ и в еще большей степени при вве-
дении Т-2-токсина [5, 15]. Хотя све-
дения, касающиеся действия микоток-
синов на активность митохондриаль-
ной цитохром Р-450-зависимой моно-
оксигеназной системы отсутствуют,
данные, свидетельствующие о том, что
оба токсина вызывают глубокие нару-
шения структуры и функции митохон-
дрий [5, 6, 21], позволяют предполо-
жить общий механизм их действия на
активность 25-ОНазы микросом и ми-
тохондрий. В механизме действия Т-2-

токсина на активность 25-ОНазы су-
щественное значение может также
иметь его способность взаимодейство-
вать с SH-группами фермента [18].

Активность почечных монооксиге-
наз, катализирующих реакции гидрок-
силирования 25-ОНD₃ с образованием
активных метаболитов — 1,25(ОН)₂D₃
и 24,25(ОН)₂D₃, при введении мико-
токсинов существенно не изменялась.
Можно только отметить тенденцию к
снижению активности 24-ОНазы при
действии Т-2-токсина. В то же время
у животных, получавших микотоксины
на фоне рациона с высоким содержа-
нием витамина D, не наблюдалось
транзиторной стимуляции 1-ОНазы,
обусловленной подъемом циркулирую-
щей концентрации 25-ОНD. Резистент-
ность 1- и 24-ОНазы к действию ми-
котоксинов может быть объяснена в
некоторой степени очень низкой кон-
центрацией изоформы цитохрома Р-
450, гидроксилирующей 25-ОНD₃ [11].
Возможно, образование этой формы Р-
450 не нарушается при общем ингиби-
ровании микотоксинами синтеза апо-
цитохрома.

Микотоксины оказывали существен-
ное влияние на рецепторное связыва-
ние 1,25(ОН)₂D₃ в слизистой оболочке
тонкой кишки (см. табл. 3). Связы-
вающая способность ядерных рецепто-
ров 1,25(ОН)₂D₃, выраженная как
концентрация рецепторного белка,
снижалась при введении микотокси-
нов, тогда как циторекпторов —
увеличивалась. Это может указывать
на то, что микотоксины не столько
вызывают действительное снижение
концентрации рецепторов 1,25(ОН)₂D₃
в клетке, сколько нарушают интерна-
лизацию рецепторного белка из цито-
плазмы в ядро. Кроме того, в случае
Т-2-токсина у крыс на фоне нормаль-
ной обеспеченности витамином D про-
исходит снижение концентрации ре-
цепторов 1,25(ОН)₂D₃.

Следует отметить, что мы определя-
ли концентрацию минимально занятых
рецепторов 1,25(ОН)₂D₃. В этом слу-
чае увеличением количества занятых
рецепторов в ядрах может восприни-
маться как снижение концентрации
незанятых. Однако увеличение кон-
центрации незанятых циторекпторов
при сохранении приблизительно по-
стоянной концентрации рецепто-
ров 1,25(ОН)₂D₃ в клетке указы-
вает на действительное уменьшение

связывания $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ рецепторами в цитоплазме и нарушение транслокации занятых рецепторов в ядро. Этот этап может являться обязательным в реализации гормонального ответа $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [17].

Рецепторный белок для $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ является ауторегулируемым по механизму положительной обратной связи, причем увеличение его концентрации индуцирует не только $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, но и 25-OHD_3 [10].

В наших опытах рацион с высоким содержанием витамина D увеличивал концентрацию рецепторов $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в клетке, однако степень их интернализации уменьшалась. При введении микотоксинов на фоне такого рациона также наблюдалась индукция рецепторов $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, но их интернализация снижалась в большей степени, чем в контроле, что указывает на низкую аффинность рецепторного белка к хроматину.

Таким образом, микотоксины, особенно Т-2-токсин, нарушают интернализацию рецепторов $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Такой эффект, очевидно, реализуется на посттранскрипционном и(или) посттрансляционном уровне, поскольку концентрация рецепторного белка в клетке существенно не снижается. Определяющее значение, вероятно, имеет прямое взаимодействие микотоксинов с участками молекул рецепторного белка, в которых происходит связывание лиганда и(или) взаимодействие с ДНК. В механизме этих эффектов существенная роль может принадлежать известной способности Т-2-токсина блокировать SH-группы [18], абсолютно необходимые для функционирования этих участков рецептора $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [11]. Не исключено также, что микотоксины нарушают агрегацию и(или) ковалентную модификацию рецепторного белка, что, возможно, имеет место при взаимодействии $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ с рецептором [10, 23].

Функция $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ по усилению всасывания Са в кишечнике реализуется посредством рецептор-опосредованной индукции соответствующих белков, в первую очередь кальций-связывающего белка (КСБ). В этой связи интересно отметить, что ингибитор транскрипции α -аманитин и ингибитор синтеза белка циклогексимид (по этому действию аналогичные соответственно афлатоксину B_1 и Т-2-ток-

сину) оказывают разное влияние на синтез КСБ [20]. α -Аманитин не изменяет транскрипцию гена для КСБ, но снижает содержание этого белка, тогда как циклогексимид значительно ингибирует уровни как КСБ — мРНК, так и КСБ. По мнению авторов, это свидетельствует о зависимости продукции КСБ от синтеза короткоживущего белка, разрешающего процессинг стабильных транскриптов. Обнаруженный нами более выраженный ингибирующий эффект Т-2-токсина на транспорт Са в тонкой кишке позволяет предположить, что механизм действия этого токсина аналогичен таковому циклогексимида. Поскольку рецепторы $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в слизистой оболочке тонкой кишки и костной ткани идентичны [10], ведущей причиной нарушений структуры губчатой кости при введении микотоксинов может быть замедление ее ремоделирования вследствие снижения рецепторного связывания $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ хондроцитами, остеобластами и предшественниками остеокластов. Слабая нормализация состояния костной ткани эпифизов при использовании высоких доз витамина D коррелирует с низкой интернализацией рецепторов $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в этом случае.

Резюмируя, необходимо подчеркнуть, что Т-2-токсин в большей степени нарушает обмен кальция, чем афлатоксин B_1 . Такое различие опосредовано более выраженным влиянием первого на обмен витамина D_3 (резкое снижение активности 25-гидроксилазы D_3) и рецепцию гормональной формы этого витамина — $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ — в слизистой оболочке тонкой кишки (нарушение интернализации циторецепторов и снижение концентрации ядерных рецепторов гормона). Кратковременное использование в рационе высокого уровня витамина D, соответствующего 10-кратной физиологической потребности в этом витамине, позволяет в некоторой степени корректировать нарушения кальциевого обмена и состояния костной ткани, в первую очередь гипокальцемию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арханчев Ю. П., Сергеев И. Н., Спиричев В. Б. и др. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 4. — С. 122—129.

1. Кравченко Л. В., Авреньева Л. И. // *Вопр. питания*. — 1984. — № 1. — С. 61—64.
2. Сергеев И. Н., Архипцев Ю. П., Линберг Л. Ф. и др. // *Биохимия*. — 1984. — № 4. — С. 590—598.
3. Спиричев В. Б. // *Вестн. АМН СССР*. — 1986. — № 11. — С. 84—90.
4. Тутельян В. А., Кравченко Л. В. *Микотоксины*. — М., 1985.
5. Тутельян В. А. // *Вестн. АМН СССР*. — 1986. — № 11. — С. 8—15.
6. Armbrecht H. J., Zenser T. V., Davis B. B. // *Endocrinology*. — 1981. — Vol. 109. — P. 218—222.
7. Duursma S. A., Van Kesteren R. G., Visser W. J. et al. // *Vitamin D: Biochemical, Chemical and Clinical Aspects Related to Calcium Metabolism* / Ed. A. W. Norman et al. — Berlin, 1977. — P. 167—171.
8. Hamilton P. B. // *Fed. Proc.* — 1977. — P. 1899—1902.
9. Haussler M. R. // *Ann. Rev. Nutr.* — 1986. — Vol. 6. — P. 527—562.
10. Henry H. L., Norman A. W. // *Ibid.* — 1984. — Vol. 4. — P. 493—520.
11. Huff W. E., Doerr J. A., Hamilton P. B. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1980. — Vol. 40. — P. 102—107.
12. Hunziker W., Walters M. R., Norman A. W. // *J. biol. Chem.* — 1980. — Vol. 255. — P. 9534—9537.
13. Gray R. W., Napoli J. L. // *Ibid.* — 1983. — Vol. 258. — P. 1152—1155.
14. Kamdem L., Margalou J., Siest G. // *Toxicol. appl. Pharmacol.* — 1981. — Vol. 60. — P. 570—578.
15. Nassar A. Y., Galal A. T., Mohamed M. A. et al. // *Mycopathologia*. — 1985. — Vol. 91. — P. 127—131.
16. Norman A. W., Roth J., Orci L. // *Endocr. Rev.* — 1982. — Vol. 3. — P. 331—366.
17. Reiss J. // *Mycopathologia*. — 1983. — Vol. 81. — P. 187—189.
18. Saarem K., Bergseth S., Ojtenbro H., Peder sen J. I. // *J. biol. Chem.* — 1984. — Vol. 259. — P. 10936—10940.
19. Theofan G., Norman A. W. // *Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Update* / Ed. A. W. Norman et al. — Berlin, 1985. — P. 379—380.
20. Uwaijo A. O. // *Toxicology*. — 1984. — Vol. 31. — P. 33—39.
21. Weckslar W. R., Norman A. W. // *Analyt. Biochem.* — 1979. — Vol. 92. — P. 314—323.
22. Wilhelm F., Norman A. W. // *J. biol. Chem.* — 1985. — Vol. 260. — P. 10087—10092.

Поступила 11.03.87

EFFECT OF MYCOTOXINS AFLATOXIN B₁ AND T-2 TOXIN ON VITAMIN D₃ METABOLISM AND BINDING OF THE VITAMIN HORMONAL DERIVATIVE 1,25-DIHYDROXY-VITAMIN D₃ IN RATS

I. N. Segreev, Yu. P. Arkhapchiev, L. V. Kravchenko, V. M. Kodentsova, N. M. Piliya, V. A. Tutel'yan, V. B. Spirichev

Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Effects of aflatoxin B₁ and T-2 toxin, administered daily within 7 days at the doses of 0.7 mg/kg and 0.54 mg/kg, respectively, on metabolism of Ca and on the vitamin D hormonal system were studied in young rats kept on a ration containing normal (0.025 mg/kg) and high (0.25 mg/kg) amounts of vitamin D. Administration of the mycotoxins caused hypocalcemia, a decrease in absorption of Ca as well as in activity of alkaline phosphatase in small intestine mucosa, while alterations in spongy bones (of the type of osteopetrosis) were most distinct in T-2 toxin treatment. Concentration of 25(OH)D₃ in blood serum and activity of 25-hydroxylase D₃ in liver tissue were decreased by 28 % and 58 %, respectively, after administration of T-2 toxin, and by 34 % and 33 %, respectively, after treatment with aflatoxin B₁. In kidney activity of 1-hydroxylase 25(OH)D₃ was unaltered and the activity of 24-hydroxylase tended to decrease. After treatment with the mycotoxins content of nuclear receptors of 1,25(OH)₂D₃ was decreased in small intestine mucosa, whereas cytoplasmic receptors were increased 2.5-fold, thus indicating the distinct decrease in the receptors internalization. High doses of vitamin D caused an increase of Ca content in blood serum and of its absorption in small intestine as well as normalized Ca content in cortical bone of rats treated with T-2 toxin. At the same time, activity of 1-hydroxylase 26(OH)D₃ was increased in liver tissue, while concentration of 1,25(OH)₂D₃ receptors was reduced in small intestine, but internalization of the hormone receptors was maintained at low level. T-2 toxin and aflatoxin B₁ impaired metabolism of Ca accompanied by inhibition of bone tissue restoration, which was considerably determined by alterations in metabolism and reception of vitamin D.