

# ГЛАВА 1

## ЗНАЧЕНИЕ ВИТАМИНА D

### ДЛЯ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

### И ЕГО МЕТАБОЛИЗМ

Витамин D (кальциферол) — это группа биологически активных жирорастворимых соединений, включающая свыше 50 метаболитов, которые образуются из стерина под воздействием ультрафиолетового облучения в тканях животных и растений [Zerwekh J.E., 2008]. Считается, что витамин D продуцировался фитопланктоном, ранней формой жизни на Земле, еще свыше 750 млн лет назад для обеспечения защиты различных макромолекул (белки, ДНК, РНК) живых организмов от ультрафиолетового излучения [Holick M., 2008]. У млекопитающих витамин D стал выполнять функцию гормона с разнообразными биологическими механизмами действия, одним из основных является его участие в обеспечении кальцием процессов костеобразования и развития скелета [Holick M., 2011]. С точки зрения эволюции витамин D в настоящее время является наиболее древним из известных гормонов, а его важное значение для организма человека обусловлено многочисленными эффектами на разные органы и системы организма с помощью регуляции около 2000 генов [Wacker M., 2013].

Кальциферол традиционно относят к группе жирорастворимых витаминов. В отличие от всех других витаминов сам по себе он является биологически неактивным, но в результате двухступенчатой метаболизации в организме превращается в активную гормональную форму. Последняя взаимодействует с рецепторами гена витамина D (VDR), которые локализуются в ядрах клеток многих тканей и органов. Хотя вышеприведенный способ реализации биологической активности характерен для гормонов, придержи-

ваясь исторической традиции в научной литературе, кальциферол продолжают называть именно витамином D [Шварц Г.Я., 2005; Thacher T.D., 2011].

Эргокальциферол является наиболее распространенной естественной формой витамина D, которая образуется в растениях из эргостерола под воздействием солнечного света. В организм человека эргокальциферол поступает в относительно небольших количествах — не больше 20–30 % от потребностей. Основными источниками его пополнения являются продукты из злаковых растений. Витамин D<sub>2</sub> превращается с образованием производных, которые обладают действием, подобным эффектам метаболитов витамина D<sub>3</sub> [Holick M.F., 1992; Tangpricha V., 2003].

Витамин D<sub>3</sub> (холекальциферол) образуется в организме позвоночных животных, в том числе амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих. В связи с этим он играет более весомую роль в процессах жизнедеятельности человека, чем витамин D<sub>2</sub>, который поступает с пищей. Витамин D<sub>3</sub> образуется в дермальном слое кожи из провитамина D<sub>3</sub>, 7-дегидрохолестерола, под воздействием коротковолнового ультрафиолетового облучения спектра В (УФ-В) (длина волны 290–315 нм) в результате фотохимической реакции раскрытия кольца стероидного ядра и термоизомеризации, характерной для секостероидов. Именно холекальциферол рассматривают как настоящий, или истинный, витамин D, тогда как другие представители этой группы считаются модифицированными производными витамина D [Holick M.F., 2006; Holick M.F., 2004; Bikle D.D., 2005].

Витамин D, который поступает с пищей или образуется в организме в процессе эндогенного синтеза в результате двух последовательных реакций гидроксирования биологически малоактивных прегормональных форм, подвергается превращению в активные гормональные виды: наиболее важный, качественно и количественно значимый — 1,25-дигидроксивитамин D (1,25(OH)<sub>2</sub>D), так называемый D-гормон (кальцитриол), и минорный — 24,25(OH)<sub>2</sub>D [Holick M. F., 2006; Bikle D.D., 2012]. Уровень синтеза D-гормона в организме взрослого здорового человека составляет около 0,3–1,0 мкг/сутки. Первая реакция гидроксирования осуществляется преимущественно в печени (до 90 %) при участии микросомального фермента 25-гидроксилазы с образованием промежуточной биологически малоактивной транспортной формы — 25(OH) витамина D, или кальцидиола [Prosser D.E., 2004; Gascon-Barre M., 2005].

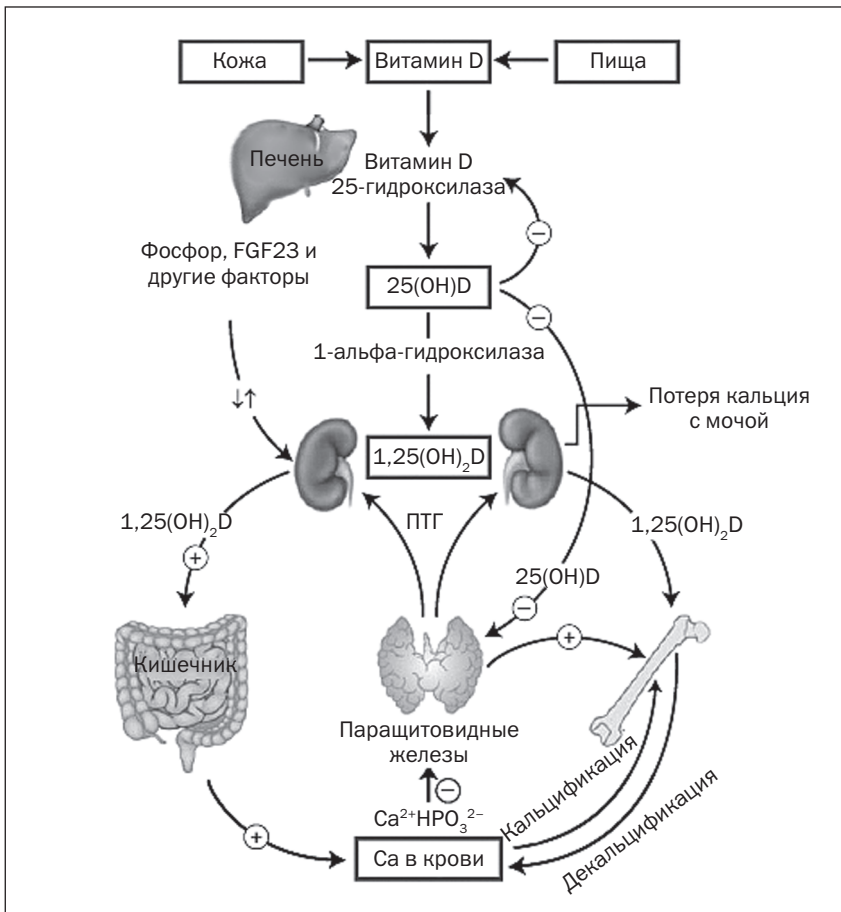
Гидроксилирование витамина D в печени осуществляется без каких-либо внепеченочных регуляторных влияний и является полностью субстрат-зависимым процессом. Реакция 25-гидроксилирования протекает достаточно быстро и ведет к повышению уровня 25(OH) витамина D (25(OH)D) в сыворотке крови. Его уровень отображает как образование витамина D в коже, так и поступление с пищей, в связи с чем он используется как маркер содержания витамина D в сыворотке крови [Hewison M., 2007; Holick M.F., 2011]. Частично транспортная форма 25(OH)D, поступающая в жировую и мышечную ткань, может создавать тканевые депо с неопределенным сроком существования (рис. 1.1).

Дальнейшая реакция 1 $\alpha$ -гидроксилирования 25(OH)D протекает преимущественно в клетках проксимальных отделов канальцев коры почек при участии фермента 1 $\alpha$ -гидроксилазы (25-гидроксивитамин-D-1 $\alpha$ -гидроксилаза, CYP27B1). В значительно меньшем, чем в почках, объеме 1 $\alpha$ -гидроксилирование осуществляется и клетками системы лимфогемопозеза, в костной ткани и, как установлено в последнее время, клетками некоторых других тканей, которые содержат как 25(OH)D, так и 1 $\alpha$ -гидроксилазу. CYP27B1 и ее другие изоформы, а также 1 $\alpha$ -гидроксилаза являются классическими митохондриальными и микросомальными оксидазами со смешанными функциями, которые участвуют в переносе электронов от НАДФ через флавопротеины и ферредоксин в цитохром P450 [Wimalawansa S.J., 2012] (рис. 1.1).

В энтероцитах активация VDR сопровождается анаболическим эффектом — повышением синтеза кальбиндина 9k, кальций-связывающего белка, который секретируется в просвет кишки, связывает Ca<sup>2+</sup> и транспортирует его через кишечную стенку в лимфатические сосуды, а затем в сосудистую систему [Bringham T.R., 2003; Hewison M., 2007; Holick M.F., 2011]. Об эффективности данного механизма свидетельствует тот факт, что лишь 10–15 % кальция и 60 % фосфора абсорбируются в кишечнике без участия витамина D. Взаимодействие между 1,25(OH)<sub>2</sub>D и VDR повышает эффективность кишечной абсорбции Ca<sup>2+</sup> до 30–40 %, а фосфора — до 80 % [Heaney R.P., 2004; Christakos S., 2003]. Подобные механизмы действия D-гормона лежат в основе реабсорбции Ca<sup>2+</sup> в почках [Dusso A.S., 2005]. Наряду с вышеуказанными механизмами 1,25(OH)<sub>2</sub>D обладает способностью усиливать абсорбцию Ca<sup>2+</sup> в кишечнике и через негеномный механизм действия, развивающийся в течение нескольких минут и при этом, вероятно, проис-

ходящий без потенцирования транскрипции генов TRPV6 и кальбинина D9k [Fleet J.C., 2010].

Низкий уровень ионизированного кальция усиливает секрецию паратиреоидного гормона (ПТГ) паращитовидными железами. В свою очередь, ПТГ увеличивает синтез  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , стимулирует абсорбцию кальция из кишечника, а также мобилизует кальций из костного депо.



**Рисунок 1.1. Схема гидроксилирования витамина D и его влияние на кальций-фосфорный гомеостаз (адаптировано по Wimalawansa S.J., 2012)**

1,25(OH)<sub>2</sub>D взаимодействует с VDR в остеобласте, стимулируя экспрессию лиганда рецептора-активатора ядерного фактора κB, который, в свою очередь, взаимодействует с рецептором-активатором ядерного фактора κB, индуцируя трансформацию незрелых моноцитов в зрелые остеокласты, которые растворяют матрикс и мобилизуют кальций и другие минералы из костной ткани [Holick M.F., 2011].

Образование в почках 1,25(OH)<sub>2</sub>D регулируется рядом эндогенных и экзогенных факторов. В частности, регуляция синтеза 1,25(OH)<sub>2</sub>D в почках является непосредственной функцией ПТГ, на содержание которого в крови, в свою очередь, по механизму обратной связи влияют как уровень наиболее активного метаболита витамина D, так и концентрация кальция и фосфора в плазме крови. Кроме того, активирующее влияние на 1α-гидроксилазу и процесс 1α-гидроксилирования имеют и другие факторы, в частности половые гормоны (эстрогены и андрогены), кальцитонин, пролактин, гормон роста (через инсулиноподобный фактор роста 1) и другие. Ингибиторами 1α-гидроксилазы являются 1,25(OH)<sub>2</sub>D и ряд его синтетических аналогов, глюкокортикостероиды, фактор роста фибробластов (FGF23), который секретируется в клетках костной ткани и вызывает образование натрий-фосфат-котранспортера, который действует в клетках почек и тонкой кишки и оказывает тормозящее влияние на синтез 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Также на метаболизм витамина D влияют некоторые лекарственные средства, например противоэпилептические препараты, глюкокортикоиды и другие [Heaney R.P., 2004; Wimalawansa S.J., 2012].

1,25(OH)<sub>2</sub>D повышает экспрессию 25-гидроксиовитамина-D-24-гидроксилазы (CYP24R) — фермента, катализирующего его дальнейшее превращение, которое приводит к образованию водорастворимой биологически неактивной кальцитриеновой кислоты, выделяющейся с желчью.

Все перечисленные компоненты метаболизма витамина D и VDR объединяют в эндокринную систему витамина D, функции которой заключаются в способности генерировать биологические реакции больше чем в 40 тканях-мишенях за счет регуляции VDR транскрипции генов (геномный механизм) и быстрых внегеномных реакций, которые осуществляются при взаимодействии с VDR, локализованными на поверхности ряда клеток. За счет геномных и внегеномных механизмов D-эндокринная система участвует в регуляции минерального гомеостаза, в первую очередь в

рамках кальций-фосфорного обмена, концентрации электролитов и обмена энергии. Витамин D подавляет клеточную пролиферацию и индукцию конечного дифференцирования, ингибирует ангиогенез, стимулирует синтез инсулина, подавляет секрецию ренина и повышает синтез кателицидина в макрофагах [Dusso A.S., 2005; Bikle D.D., 2010].

В результате дефицита витамина D (ДВД) снижается всасывание кальция и фосфора в кишечнике, вследствие чего повышается уровень ПТГ, возникает вторичный гиперпаратиреоз, при котором общий уровень кальция в сыворотке крови находится в пределах нормы за счет мобилизации последнего из костной ткани и повышенного выведения фосфора почками [Holick M.F., 2005; Holick M.F., 2007]. Опосредованное ПТГ повышение активности остеокластов вызывает снижение общей минеральной плотности костной ткани (МПКТ), в результате чего развиваются остеопения и остеопороз [Lips P., 2006]. Фосфатурия, обусловленная вторичным гиперпаратиреозом, приводит к снижению уровня фосфора в сыворотке крови, который находится на нижней границе нормы или даже ниже. Следствием этого является нарушение соотношения кальция и фосфора, вызывающее дефекты минерализации скелета [Aaron J.E., 1974]. У детей грудного и дошкольного возраста в результате ДВД развивается рахит, который характеризуется множественными деформациями костей. У взрослых зоны роста костей уже закрыты, поэтому в костях скелета содержится достаточно микроэлементов для предотвращения деформаций, вследствие чего дефект минерализации, известный как остеомалация, часто не диагностируется [Holick M.F., 2011].

ДВД также приводит к мышечной слабости. У детей мышечная гипотония вызывает трудности при стоянии и ходьбе, у людей пожилого возраста ухудшается функция равновесия тела и возникают падения, повышающие риск переломов, особенно на фоне сниженной МПКТ в этой популяции [Gordon C.M., 2008].

Остеомалация сопровождается локализованными или генерализованными болями в костях и мышцах. При остеомалации сначала возникает боль в костях между суставами. Это отличает их от артралгий (при артрите боль возникает внутри сустава) и фибромиалгий (боль диффузная и ассоциируется с болью в мышцах и сухожилиях) [Thacher T.D., 2011].

Очень часто у пациентов с остеомалацией возникает слабость в проксимальных мышцах конечностей и нарушения ходьбы. Так

как зоны роста у взрослых закрыты, то рентгенологические изменения при остеомалации имеют характер псевдопереломов (так называемые зоны Лоозера, линейные или нитевидные участки просветления) тазовых и метатарзальных костей, шейки бедренной кости, латерального угла лопатки [Родионова С.С., 1994; Wolff А.Е., 2008].

Биохимические маркеры остеомалации являются такими же, как и при рахите: повышение уровня щелочной фосфатазы, иПТГ, снижение уровня кальция, фосфора и 25(ОН)D в сыворотке крови. При этом необходимо отметить, что гистологически подтвержденный диагноз остеомалации чаще регистрируется при уровне 25(ОН)D ниже 25 нг/мл. Однако Priemel M. и соавт. [Priemel M. et al., 2010] указывают, что не у всех пациентов с ДВД гистологически регистрируется остеомалация.

Таким образом, к настоящему времени знания о роли витамина D в организме человека значительно расширились. Уже хорошо исследованы основные пути влияния витамина D на метаболизм костной ткани как через механизмы стимулирования абсорбции кальция из кишечника, так и непосредственно на остеокласт и остеобласт. Установлено, что интенсивность синтеза гормональной формы витамина D зависит от ряда факторов, к которым относятся транспортные белки (DBP, альбумин), ферменты (25-гидроксилаза, 24-гидроксилаза, 1 $\alpha$ -гидроксилаза), VDR, FGF23, некоторые гормоны (половые гормоны, кальцитонин, пролактин, гормон роста) и некоторые медикаменты.

В последние годы интенсивно изучаются плейотропные механизмы действия витамина D, функции которого заключаются в способности за счет геномных и внегеномных механизмов участвовать в регуляции минерального гомеостаза и энергетического обмена, подавлять клеточную пролиферацию и индукцию конечного дифференцирования, ингибировать ангиогенез, стимулировать синтез инсулина, подавлять секрецию ренина и повышать синтез кателицидина в макрофагах. Плейотропное действие витамина D более детально описано в главе 5 «Внескелетные эффекты витамина D».

# ГЛАВА 2

## ДИАГНОСТИКА ДЕФИЦИТА И НЕДОСТАТОЧНОСТИ ВИТАМИНА D

25(OH)D является основной циркулирующей формой витамина D с периодом полувыведения из кровотока 2–3 недели и считается самым лучшим индикатором для мониторинга статуса витамина D [Thacher T.D., 2011; De Luca H., 2004; Holick M.F., 2009; Bischoff-Ferrari H.A. et al., 2010]. Период полувыведения 1,25(OH)<sub>2</sub>D из кровотока составляет приблизительно 4 часа, а его концентрация в 1000 раз ниже уровня 25(OH)D. Кроме этого, содержание 1,25(OH)<sub>2</sub>D в сыворотке крови четко регулируется уровнями ПТГ, кальция и фосфора, поэтому у пациентов, имеющих вторичный гиперпаратиреоз, уровень 1,25(OH)<sub>2</sub>D часто находится в пределах нормы или даже повышен.

Следовательно, показатель 1,25(OH)<sub>2</sub>D не отображает уровень витамина D в организме человека и поэтому не является эффективным для мониторинга пациентов с дефицитом витамина D [Dusso A.S., 2005; Holick M.F., 2011; Gordon C.M. et al., 2008]. **Определение 1,25(OH)<sub>2</sub>D полезно лишь при врожденных и приобретенных нарушениях метаболизма фосфора и 25(OH)D, в том числе при хронической болезни почек, наследственных заболеваниях, которые сопровождаются повышенным выведением фосфора, онкогенной остеомалации, витамин-D-резистентном рахите, а также при хронических заболеваниях, сопровождающихся образованием гранулем, таких как саркоидоз и некоторые лимфомы** [Holick M.F., 2005; Drezner M.K., 2005].

Для исследования оптимального уровня 25(OH)D в сыворотке крови было проведено несколько широкомасштабных исследований.

Так, Pietras S.M. и соавт. установили, что лишь у пациентов с исходным уровнем 25(OH)D ниже 20 нг/мл наблюдалось статистически значимое снижение содержания ПТГ на фоне терапии вита-



мином D [Pietras S.M. et al., 2009]. Участники исследования принимали 50 000 МЕ эргокальциферола один раз в неделю в течение двух месяцев при одновременном приеме препаратов кальция.

Chapuy M.C. и соавт. [Chapuy M.C. et al., 1996], Holick M.F. [Holick M.F., 2005], Thomas M.K. и соавт. [Thomas M.K. et al., 1998] сообщили о существовании достоверной обратной связи между уровнями ПТГ и 25(ОН)D. Также они доказали, что уровень ПТГ начинает снижаться и достигает плато у пациентов с содержанием 25(ОН)D в сыворотке крови между 30 и 40 нг/мл. Эти результаты согласуются с пороговым уровнем 25(ОН)D для профилактики неverteбральных переломов и переломов бедренной кости, полученным при проведении недавнего метаанализа двойных слепых рандомизированных контролируемых исследований витамина D для перорального приема [Bischoff-Ferrari H.A. et al., 2010]. Heaney R.P. и соавт. [Heaney R.P. et al., 2003] доказали, что у женщин в постменопаузальном периоде при повышении среднего уровня 25(ОН)D в сыворотке крови с 20 до 32 нг/мл увеличивалась абсорбция кальция в кишечнике на 45–65 %.

Дискуссии по вопросу оптимального уровня 25(ОН)D в сыворотке крови продолжались несколько лет, а референтные величины этого метаболита изменялись едва ли не ежегодно. Lips P. предлагал в качестве оптимального уровня 25(ОН)D в сыворотке крови значения в пределах 50–75 нмоль/л, так как при таком показателе подавляется синтез ПТГ [Lips P., 2004]. В свою очередь, Heaney R.P. [Heaney R.P., 2003] для оптимизации абсорбции кальция в кишечнике обосновывал более высокие уровни — 85 нмоль/л. Bischoff-Ferrari H.A. [Bischoff-Ferrari H.A., 2004] подчеркивала, что нервно-мышечная активность у людей пожилого возраста становится выше с ростом уровня 25(ОН)D в сыворотке крови и достигает своего пика при его концентрации около 95 нмоль/л. Garland C.F. [Garland C.F., 2007] для достижения максимального протективного действия относительно возникновения определенных раковых заболеваний обосновывал уровень 25(ОН)D выше 100 нмоль/л как надлежащий.

В 2003 году были утверждены первые методические рекомендации «Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in Chronic Kidney Disease», которые указывали на три степени недостаточности и дефицита витамина D:

— тяжелый дефицит: уровень 25(ОН)D в сыворотке крови ниже 5 нг/мл (12 нмоль/л);

— умеренный дефицит витамина D — уровень 25(OH)D в сыворотке крови в пределах 5–15 нг/мл (12–37 нмоль/л);

— недостаточность витамина D — уровень 25(OH)D в сыворотке крови в пределах 16–30 нг/мл (40–75 нмоль/л).

В 2008 г. Stroud M.L. и соавт. [Stroud M.L. et al., 2008] предложили другую классификацию ДВД:

— недостаточность витамина D: уровень 25(OH)D в сыворотке крови в пределах 50–100 нмоль/л;

— нерезко выраженный ДВД: уровень 25(OH)D в сыворотке крови в пределах 25–50 нмоль/л;

— умеренный ДВД: уровень 25(OH)D в сыворотке крови в пределах 12,5–25 нмоль/л;

— тяжелый ДВД: уровень 25(OH)D в сыворотке крови ниже 12,5 нмоль/л.

Таким образом, учитывая вышеприведенные результаты исследований и дискуссии, Институт медицины (Institute of Medicine) и Комитет эндокринологов по созданию рекомендаций по клинической практике (Endocrine Practice Guidelines Committee) в 2011 году постановили, что **дефицит витамина D у детей и взрослых — это клинический синдром, обусловленный низким уровнем 25(OH)D в сыворотке крови (ниже 20 нг/мл или 50 нмоль/л). Уровень 25(OH)D в сыворотке крови от 21 до 29 нг/мл (т.е. от 50,1 до 74,9 нмоль/л) следует рассматривать как недостаточность витамина D. Достаточным уровнем витамина D считается показатель 25(OH)D в сыворотке крови выше 30 нг/мл (75 нмоль/л).** Интоксикация витамином D наблюдается при уровне 25(OH)D в сыворотке крови выше 150 нг/мл (375 нмоль/л) [Holick M.F., 2011].

В Варшаве в октябре 2012 г. состоялось заседание экспертов из стран Центральной Европы, которые в 2013 году создали методические рекомендации «Practical guidelines for supplementation of vitamin D and treatment of deficits in Central Europe: Recommended vitamin D intakes in general population and groups being at risk of vitamin D deficiency» и утвердили следующие предельные диагностические величины содержания 25(OH)D в сыворотке крови:

— уровень 25(OH)D в сыворотке крови ниже 20 нг/мл (50 нмоль/л) указывает на дефицит витамина D и требует медикаментозной терапии;

— уровень от 20 нг/мл (50 нмоль/л) до 30 нг/мл (75 нмоль/л) свидетельствует о субоптимальном статусе витамина D, требующем умеренного увеличения суточной дозы витамина D;

— уровень от 30 нг/мл (75 нмоль/л) до 50 нг/мл (125 нмоль/л) отображает оптимальный (целевой) статус витамина D; схемы назначения и дозы препаратов витамина D следует сохранить неизменными;

— уровень выше 50 нг/мл (125 нмоль/л) и до 100 нг/мл (250 нмоль/л) указывает на высокое содержание витамина D; дозу препаратов можно не изменять при нижнем уровне и умеренно снизить при верхней указанной границе;

— уровень выше 100 нг/мл (250 нмоль/л) является опасным для общего состояния здоровья и требует снижения/прекращения дополнительного приема витамина D до тех пор, пока 25(ОН)D в сыворотке крови не снизится до целевого уровня;

— уровень выше 200 нг/мл (500 нмоль/л) считается токсичным и требует прекращения приема препаратов витамина D до достижения целевого уровня 25(ОН)D в сыворотке крови. Пациенты могут нуждаться в медицинском вмешательстве, коррекции токсического эффекта.

## **Группы риска по развитию дефицита витамина D, причины его возникновения**

Основным источником пополнения витамином D организма детей и взрослых является инсоляция. Немного пищевых продуктов содержат витамин D или обогащены им [Heaney R.P. et al., 2003; Maeda S.S., 2007; Brot C., 2001]. Поэтому основной причиной дефицита витамина D является недостаточное нахождение человека на солнце.

Угол, под которым солнечные лучи падают на поверхность Земли, определяет количество фотонов УФ-В, которые может получить определенная территориальная единица нашей планеты. Этот факт предопределяет низкий или невозможный синтез витамина D в коже зимой, в утреннее или вечернее время суток [Thacher T.D., 2006; Holick M.F., 2003].

Меланин особенно эффективен в абсорбции ультрафиолета, поэтому пигментация кожи существенно подавляет синтез витамина D [Holick M.F., 2007]. Аналогичный результат достигается применением солнцезащитных средств с фактором защиты SPF 15, которые уменьшают синтез витамина D в коже более чем на 95 % [Holick M.F., 2003]. Люди, которые проживают около эква-

тора (наиболее солнечная часть Земли), имеют ДВД, поскольку способность их кожи синтезировать холекальциферол является очень низкой. Темнокожие обеспечены естественной защитой от солнечной инсоляции и для синтеза определенного количества витамина D должны находиться на солнце по крайней мере в 3–5 раз дольше, чем люди со светлой кожей [Hintzpeter B., 2008].

С возрастом уменьшается количество 7-дегидрохолестерола в дермальном слое кожи. Люди старше 70 лет имеют приблизительно 25 % 7-дегидрохолестерола от общего количества у молодых, поэтому у лиц пожилого возраста наблюдается снижение синтеза холекальциферола на 75 % [Holik M.F., 1989].

Существует обратная связь между уровнем 25(ОН)D в сыворотке крови и индексом массы тела выше 30 кг/м<sup>2</sup>, таким образом, ожирение ассоциируется с ДВД [Wortsman J. et al., 2000].

У пациентов с синдромом мальабсорбции жиров и больных, перенесших бариатрические операции (хирургическая коррекция ожирения), организм часто не способен всасывать жирорастворимый витамин D [Looker A.C. et al., 2008].

Также группой риска, с учетом возможности развития ДВД, являются лица с нефротическим синдромом (у них 25(ОН)D выводится с мочой в комплексе с витамин-D-связывающим белком [Holick M.F., 2007]) и пациенты, которые принимают некоторые лекарственные средства, в частности противосудорожные, глюкокортикоиды, препараты для лечения ВИЧ/СПИДа, так как последние усиливают катаболизм 25(ОН)D и 1,25(ОН)<sub>2</sub>D [Zhou C. et al., 2008].

Лица с хроническими заболеваниями, которые сопровождаются образованием гранулем, пациенты с некоторыми лимфомами и больные первичным гиперпаратиреозом также принадлежат к группе повышенного риска дефицита витамина D, поскольку у них отмечается повышенный уровень метаболизма 25(ОН)D до 1,25(ОН)<sub>2</sub>D [Adams J.S., 2006; Grey A., 2005].

Детальный перечень состояний, заболеваний и категорий пациентов, у которых повышается риск развития ДВД, приведен ниже.

**Состояния, заболевания и некоторые категории пациентов, которым следует проводить исследование уровня 25(ОН)D в сыворотке крови [Holik M.F. et al., 2011]**

Рахит.

Остеомаляция.

Остеопороз.

Хронические заболевания почек.

Печеночная недостаточность.

Синдром мальабсорбции:

- муковисцидоз;
- воспалительные заболевания кишечника;
- болезнь Крона;
- перенесенная бариатрическая операция;
- радиационный энтерит.

Гиперпаратиреоз.

Употребление медикаментов:

- противосудорожных препаратов;
- глюкокортикоидов;
- лекарств для лечения СПИДа;
- противогрибковых, например кетоконазола;
- холестирамина.

Хронические заболевания, сопровождающиеся образованием гранулем:

- саркоидоз;
- туберкулез;
- гистоплазмоз;
- кокцидиомикоз;
- бериллиоз.

Некоторые лимфомы.

**Группы риска по развитию ДВД:**

- люди со смуглой кожей;
- чернокожие;
- беременные и кормящие женщины;
- пожилые люди, которые часто падают;
- пожилые люди с низкоэнергетическими переломами;
- дети и взрослые с ожирением ( $ИМТ > 30 \text{ кг/м}^2$ ).

## **СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ 25(OH)D В СЫВОРОТКЕ КРОВИ**

Определение уровня 25(OH)D в сыворотке крови является сложным процессом вследствие нескольких причин:

— во-первых, высокая гидрофобность 25(OH)D может привести к его взаимодействию с компонентами сыворотки крови (так называемый эффект матрицы);

— во-вторых, наличие в кровеносном русле обоих производных витамина D — как  $25(\text{OH})\text{D}_2$ , так и  $25(\text{OH})\text{D}_3$ ;

— в-третьих, присутствие в сыворотке крови новорожденных детей стереоизомеров 3-эпи- $25(\text{OH})\text{D}_3$ , которые могут связываться с белками или антителами и обуславливать ошибочные результаты.

Все методы исследования  $25(\text{OH})\text{D}$  в сыворотке крови можно разделить:

— на непосредственные (прямые) — методы непосредственного измерения субстанции. Золотым стандартом для определения уровня  $25(\text{OH})\text{D}$  в сыворотке крови является высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC) и масс-спектрометрия в сочетании с жидкостной хроматографией (LC-MS/MS). Эти методы позволяют оценивать уровни как  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , так и  $25(\text{OH})\text{D}_2$  в сыворотке крови;

— промежуточные (непрямые) — методы исследования промежуточных веществ (субстанций), которые образовались в результате связывания  $25(\text{OH})\text{D}$  с белками (СРВА — метод исследования конкурентного связывания с белком), с антителами (РИА — радиоиммунологический анализ; ИФА — иммуноферментный анализ; иммуноэлектрохемилуминесцентный анализ).

Большинство методов, которые сейчас используются для исследования уровня  $25(\text{OH})\text{D}$  в сыворотке крови, являются непрямыми [Hollis B.W. et al., 2007; Binkley N. et al., 2008; Binkley N. et al., 2010].

Существенным прогрессом в лабораторном деле стало внедрение полностью автоматизированных методов определения уровня  $25(\text{OH})\text{D}$  в сыворотке крови. На иммунохемилуминесцентные методы возлагают большие надежды в плане улучшения аналитической надежности исследования уровня  $25(\text{OH})\text{D}$  в сыворотке крови [Wagner D. et al., 2009]. Европейская автоматизированная система Roche Diagnostics до 2012 года была способна определять лишь уровень  $25(\text{OH})\text{D}_3$  в сыворотке крови. Благодаря проведенным исследованиям к настоящему времени специалистами разработаны тест-системы, которые определяют уровень  $25(\text{OH})\text{D}$  total, то есть  $25(\text{OH})\text{D}_2$  и  $25(\text{OH})\text{D}_3$  одновременно. Автоматизированная система Roche Diagnostics позволяет исследовать небольшой объем пробы (5–50 мкл сыворотки) за короткий период времени (18–27 мин), имеет широкий диапазон измерения (от 7,5 до 175 нмоль/л), высокую точность (CV до 10 %), чувствительность

и специфичность (99,6 и 93,7 % соответственно). Автоматизированная система LIAISON (производство США) определяет уровни каждого метаболита витамина D в отдельности — как  $25(\text{OH})\text{D}_2$ , так и  $25(\text{OH})\text{D}_3$ . Методика позволяет исследовать содержание  $25(\text{OH})\text{D}$  непосредственно, без стадии предыдущей очистки. В этом случае следует обратить внимание на возможность возникновения эффекта матрицы.

Ежедневный внутренний лабораторный контроль является важным элементом для качественного определения уровня  $25(\text{OH})\text{D}$  в сыворотке крови [Holick M.F., 2007]. Эта процедура особенно важна при пользовании открытыми (неавтоматизированными) системами с большой аналитической погрешностью.

Автоматизированные методы имеют свои собственные наборы контрольных образцов, правила использования которых регламентируются производителем. Чаще всего вышеуказанные образцы применяют для обеспечения ежедневного контроля качества. Для каждой новой тест-системы проводится еще и калибрование аппарата.

Результаты использования международной программы по контролю качества исследований метаболитов витамина D DEQAS (The International External Quality Assessment Scheme for Vitamin D Metabolites) показали, что:

- радиорецепторные методы в 2 раза превышают реальный уровень  $25(\text{OH})\text{D}$  в сыворотке крови;

- открытые ИФА-системы имеют высокую погрешность исследования, результаты зависят от компетентности лица, проводящего анализ;

- радиоиммунологические анализаторы имеют различную специфичность в исследовании производных витамина D —  $25(\text{OH})\text{D}_2$  и  $25(\text{OH})\text{D}_3$ .

Поэтому рекомендуется, чтобы все лаборатории, исследующие уровень  $25(\text{OH})\text{D}$  в сыворотке крови, участвовали в международном контроле качества DEQAS, в котором полученные результаты сравниваются с данными, полученными с помощью золотых стандартов исследования: ALTM, HPLC и LC-MS/MS [Heaney R.P., 2011; Viljoen A., 2011; Lai J.K., 2012].