

Метаболиты витамина D: роль в диагностике и терапии витамин-D-зависимых патологий

Громова О.А.¹, Торшин И.Ю.², Гилельс А.В.¹, Гришина Т.Р.¹, Томилова И.К.¹

¹ – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Иваново

² – ФГБОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», г. Долгопрудный

Резюме. В большинстве исследований по изучению взаимосвязи между витамином D и заболеваниями изучаются ассоциации только одного из метаболитов витамина D-25-гидроксивитамина D₃ (25(OH)D₃). При этом потенциальные эффекты уровней других метаболитов витамина D остаются вне внимания большинства исследователей. В настоящей работе рассмотрены биотрансформации холекальциферола, возможные ошибки в оценке дефицита D (связанные со свойствами тех или иных метаболитов витамина D₃), фундаментальные биологические роли метаболитов витамина D₃ и перспективы использования оценок уровней метаболитов витамина D₃ для клинической диагностики.

Ключевые слова: метаболиты витамина D, диагностика гиповитаминоза D, аквадетрим

The metabolites of vitamin D: role in the diagnosis and in the therapy of vitamin-D-dependent pathologies

Gromova O.A.¹, Torshin I.Yu.², Gilels A.V.¹, Grishina T.R.¹, Tomilova I.K.¹

¹ – FSBEI HE IvSMA Russian, Ivanovo

² – FSBEI HE Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny

Abstract. Most studies on the relationship between vitamin D and various pathologies use only one of the metabolites of vitamin D-25-hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D₃). Hence, the potential effects associated with changes in the levels of other vitamin D metabolites remain outside of the focus of most researchers. In this paper we analyze the known biotransformations of cholecalciferol, possible errors in the assessment of D deficiency related to the properties of various metabolites of vitamin D₃, a fundamental biological role of the different metabolites of vitamin D₃, and prospects for the use of the determination of vitamin D₃ metabolite levels for clinical diagnostics.

Keywords: metabolites of vitamin D, diagnosis of hypovitaminosis D, solubilization of vitamin D

Автор, ответственный за переписку:

Громова Ольга Алексеевна – д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА МЗ России; 153012, Иваново, Шереметевский пр., 8; тел. +7 (4932) 41-65-25; e-mail: unesco.gromova@gmail.com

Введение

За последнее десятилетие было показано, что достаточная обеспеченность организма витамином D, помимо поддержания здоровья костной и мышечной ткани, также необходима и для профилактики множества других патологий [1]. В результате, отмечается резкое возрастание количества анализов крови на содержание витамина D. Как правило, для оценки статуса пациента по витамину D измеряются концентрации 25-гидроксивитамина D в сыворотке крови.

К настоящему времени установлено существование более 50 метаболитов витамина D. Однако только два метаболита витамина D₃ – а именно, 25-гидроксивитамину D₃ («25(OH)D₃» или просто «25(OH)D») и 1,25-дигидроксивитамину D₃ («1,25(OH)₂D₃» или «1,25(OH)₂D»), получили наибольшее внимание исследователей [2]. Более того, подавляющее большинство эпидемиологических и клинических исследований ограничиваются измерениями только одного метаболита – 25(OH)D. Поэтому, весьма интересные и важные ассоциации показателей здоровья с концентрациями других метаболитов витамина D упускаются [3].

Традиция исследования только одного метаболита, 25(OH)D связана с тем, что именно этот метаболит

наиболее отчётливо ассоциирован с показателями здоровья костной ткани. Например, анализ ассоциаций уровней метаболитов витамина D в сыворотке крови с минеральной плотностью кости (МПК) показал, что только 25(OH)D был ассоциирован с более высокой МПК ($p = 0,054$, $n = 1773$, 18–50 лет). Данный показатель весьма информативен: разница в МПК между подгруппами пациентов с 25(OH)D < 20 нг/мл и 25(OH)D ≥ 30 нг/мл составила – 8,1 г/см³ (95% ДИ –15–1,4) [4].

Другой причиной использования концентраций 25(OH)D как единственного биохимического маркера статуса витамина D является то, что приём препаратов витамина D в большей степени повышает именно уровни 25(OH)D. Например, дозозависимые эффекты приёма препаратов на основе различных метаболитов витамина D на метаболизм витамина D и абсорбцию кальция были исследованы в группе детей ($n = 323$). Дети были рандомизированы на группы – плацебо или приём 400, 1000, 2000 и 4000 МЕ/сут витамина D в течение 12 нед. Во всех группах, принимавших витамин D, отмечено выраженное увеличение концентрации 25(OH)D (например, +76 нмоль/л для 4000 МЕ/сут), в то время как изменения, например, концентрации 1,25(OH)₂D₃ в крови не были достоверными ($p > 0,05$) [5].

Тем не менее, информация об уровнях других метаболитов имеет и фундаментальное, и клиническое значение. В частности, такие метаболиты витамина D₃, как 1,24R,25(OH)₃D₃, 1,25S,26(OH)₃D₃, 1,25(OH)₃D₃ стимулируют адсорбцию кальция костной тканью и характеризуются синергидным противорахитическим эффектом [6]. Подчеркнём, что всасыванию кальция способствуют именно метаболиты холекальциферола, а не сам витамин D₃. Достоверный эффект на повышение всасывания кальция, например, от кальцитриола 1,25(OH)₂D₃ наблюдался даже при самой низкой дозе (0,5 мкг/сут), в то время как эффект от приёма витамина D₃ отмечен только при самой высокой дозе (50 000 МЕ/сут) и был опосредован биотрансформацией D₃ в 25(OH)D₃ [7]. Соотношение концентраций различных метаболитов витамина D является весьма перспективным диагностическим инструментом [3].

Настоящая работа представляет результаты систематического анализа фундаментальных и клинических исследований метаболитов витамина D. Последовательно рассматриваются биотрансформации холекальциферола, приводящие к образованию метаболитов витамина D, взаимосвязь уровней различных метаболитов витамина D₃ и ошибок в оценке дефицита витамина D. Также рассмотрены фундаментальные биологические роли метаболитов витамина D и предпосылки к использованию измеренных уровней метаболитов витамина D₃ как вспомогательного диагностического инструмента.

О биотрансформациях и фармакокинетике холекальциферола

Основные пути метаболизма производных витамина D₃ приведены на рис. 1. Каскад биотрансформаций метаболитов витамина D достаточно сложен. Напри-

мер, фермент CYP11A1 может гидроксилировать (т. е. присоединять -OH группу) холекальциферол к атому углерода в позициях 17, 20, 22 и 23 стероидного ядра с получением более чем 10 метаболитов, в т. ч. 20(OH)D₃, 20,23(OH)₂D₃, 20,22(OH)₂D₃, 17,20(OH)₂D₃ и др. Получаемые при этом метаболиты (в частности, 20(OH)D₃) оказывают *противовоспалительный эффект за счёт ингибирования синтеза и секреции ФНО и IL-6*, также повышая уровни противовоспалительного цитокина IL-10. В то же время, CYP11A1 не действует на 25(OH)D₃ – основную форму витамина в крови [8].

Наиболее изученным и принципиально важным маршрутом биотрансформаций поступающего с пищей холекальциферола является последовательное преобразование витамина D₃ в 25(OH)D₃ и, затем, в «биологически активный» *кальцитриол* 1,25(OH)₂D₃ (рис. 2). В этом процессе, фермент CYP2R1 в печени преобразует витамин D₃ в 25(OH)D₃, который переносится с током крови в почки, где фермент CYP27B1 трансформирует 25(OH)D₃ в 1,25(OH)₂D₃.

Кальцитриол (1,25-дигидроксивитамин D), активная форма витамина D, является одним из высокоактивных стероидных гормонов и, по осуществлению того или иного биологического воздействия, подвергается деградации. Ген CYP24A1 индуцируется уровнями 1,25(OH)₂D₃ и синтезируемый при активации гена одноимённый фермент осуществляет цепь реакций для получения наименее активной формы витамина, кальцитроевой кислоты (рис. 3). Схожий набор реакций происходит и при биодеградации 25(OH)D₃ под контролем фермента CYP24A1 с образованием 24,25-дигидроксивитамина; 24,25(OH)₂D₃ образуется из 25(OH)D₃ под контролем фермента P450cc24 (25-гидроксивитамин-D₃-24-гидроксилазы) [9].

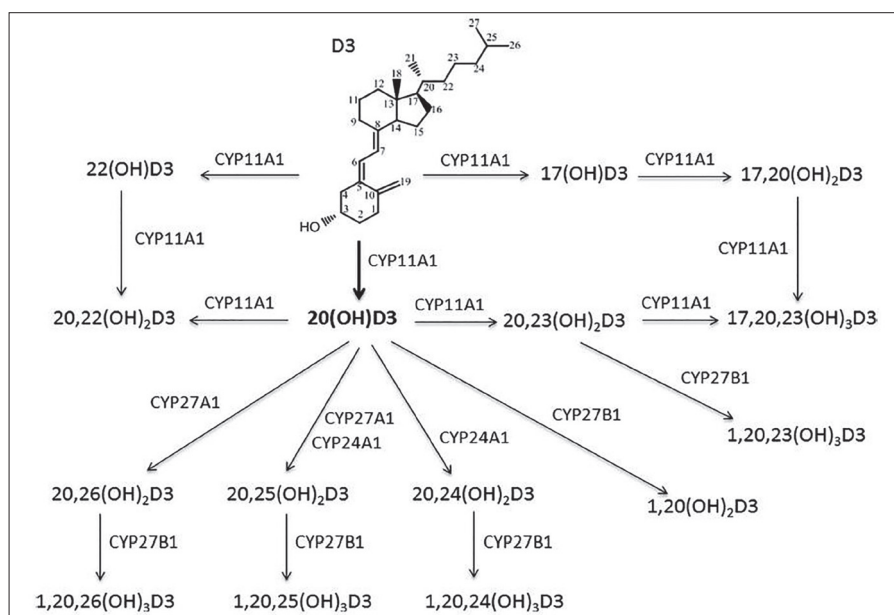


Рис. 1. Основные пути метаболизма витамина D₃ с участием ферментов-цитохромов CYP11A1, CYP27A1, CYP27B1 и CYP24A1

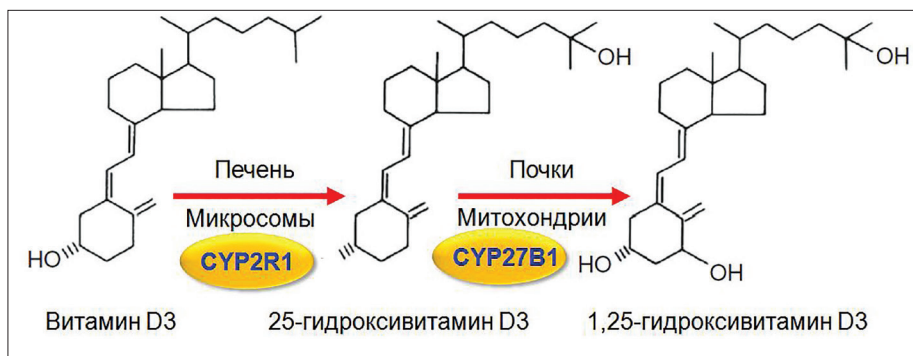


Рис. 2. Основной маршрут гомеостаза витамина D₃

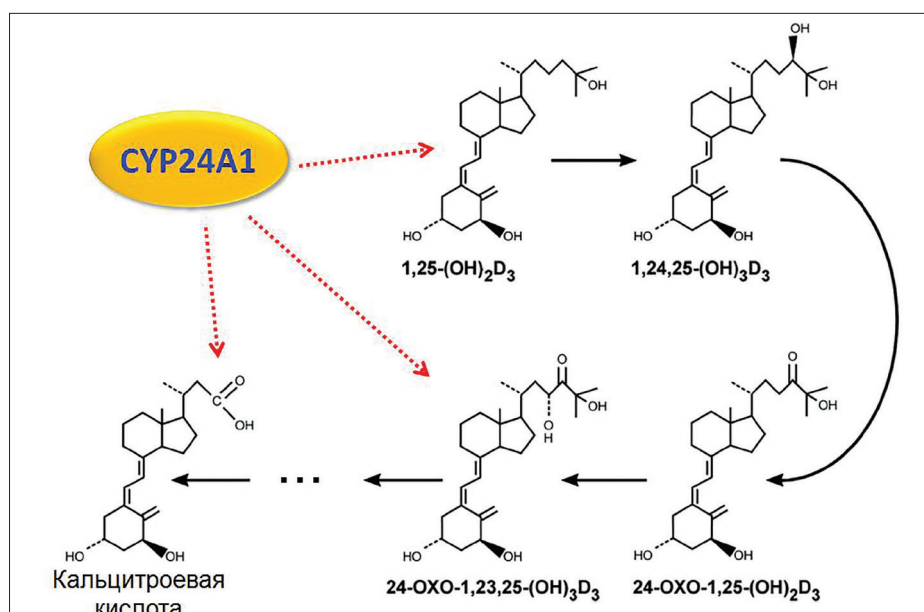


Рис. 3. Деградация 1,25(OH)₂D₃

Несмотря на то что такие метаболиты, как 25(OH)D₃, 1,24R,25(OH)₃D₃, 1,23S,25(OH)₃D₃ характеризуются сниженным (по сравнению с 1,25(OH)₂D₃) сродством к рецептору VDR, они, всё же, дозозависимо активируют рецептор VDR. Данный эффект наблюдается даже для «неактивной» кальцитроевой кислоты [10]. Кальцитроевая кислота (которая хоть и считается «неактивным» метаболитом и продуктом окончательной деградации витамина D) в достаточно высоких концентрациях (IC₅₀—2,3±0,4 мкм/л) может активировать VDR-опосредованную транскрипцию. Кроме того, кальцитроевая кислота может быть одной из молекул-посредников, обеспечивающих защитные свойства витамина D против рака толстой кишки [11].

Поэтому, в соответствии с современными научными данными, даже кальцитроевую кислоту не следует именовать «неактивным» метаболитом витамина D. Этот вывод применим ко всем метаболитам витамина D. Различные метаболиты витамина D и их химические модификации отличаются по своим фармакологическим эффектам [12]:

- холекальциферол или кальцифедиол применяются у пациентов с нормальной функцией почек для коррекции дефицита витамина D;

- кальцитриол (1,25(OH)₂D₃) обладает самым мощным гиперкальциемическим эффектом, в т. ч. у пациентов с почечной недостаточностью, и существенно ингибирует активность паращитовидных желез (секреция ПТГ);

- 3-эпи-кальцитриол (3-эпи-1,25(OH)₂D₃) — сильный ингибитор секреции ПТГ с ослабленным гиперкальциемическим эффектом;

- альфакальцидол (1-(OH)D₃) назначают для лечения остеопороза и пациентам с дисфункцией почек для лечения гиперпаратиреоза.

Заметим, что стереотип именование кальцитриола как единственной «активной» формы витамина D сложился в первой половине XX века и подразумевает под «активностью» исключительно гиперкальциемический эффект витамина D. Действительно, 1,25-дигидроксивитамин D₃, по сравнению с другими эндогенными метаболитами витамина D, наиболее полно

активирует рецепторы витамина D [13]. Тем не менее, уровни $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в крови являются в каком-то смысле «низкоинформативным» маркером дефицита витамина D_3 , т. к., по данным многочисленных клинико-эпидемиологических исследований, более низкие уровни $25(\text{OH})\text{D}_3$ не коррелируют с более низкими уровнями $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и с проявлениями дефицита витамина D ($n = 3661$) [14].

Отсутствие корреляции обусловлено фундаментальными физиологическими причинами. Во-первых, концентрации $25(\text{OH})\text{D}_3$ на несколько порядков выше, чем концентрации $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Поэтому, даже при очень низких уровнях $25(\text{OH})\text{D}_3$ в крови, имеющееся количество $25(\text{OH})\text{D}_3$ позволяет поддерживать концентрации $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на требуемом уровне.

Во-вторых, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ является высокоактивным стероидным гормоном и его уровни жёстко регулируются посредством физиологических систем организма. В частности, как было отмечено выше, при избытке $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ активируется экспрессия гена 24-гидроксилазы CYP24A1, что приводит к деградации молекулы $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Жёсткая регуляция уровней $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ является характерной физиологической особенностью данного метаболита как у человека, так и у животных, проживающих в весьма различных географических зонах, вне зависимости от инсоляции. Например, концентрации более 10 различных молекул метаболома в сыворотке крови (в т. ч. метаболитов витамина D) были измерены у 12 диких видов кошачьих, включая степную рысь (*Felis caracal*), гепарда (*Acinonyx Jubatus*), пуму (*Felis Конколор*), кота-рыболова (*Felis viverrinus*), леопарда (*Panthera Pardus*), льва (*Panthera leo*), оцелота (*Felis Pardalis*), манула (*Felis manul*), барханного кота (*Felis Margarita*), сервала (*Felis serval*), снежного барса (*Panthera Uncia*) и тигра (*Panthera tigris*). Анализ проб крови на содержание общего холестерина, триацилглицеридов, ЛПВП- и ЛПНП-холестерина, $25(\text{OH})\text{D}$ и $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, ретиноидов, токоферолов и каротиноидов указал на достоверные межвидовые различия в уровнях всех метаболитов, кроме $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ [15]. Заметим, что установленные в данном исследовании уровни кальцитриола у кошачьих (30–130 пмоль/л) вполне соответствуют нормам кальцитриола для человека (42–169 пмоль/л).

Хроническая почечная недостаточность характеризуется существенным снижением биосинтеза кальцитриола $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ из $25(\text{OH})\text{D}_3$. С другой стороны, известно, что биологическая активность кальцитриола снижается при уремии как за счёт снижения экспрессии рецепторов витамина D, так и вследствие нарушения взаимодействия рецепторов витамина D с ДНК из-за избытка мочевины и мочевой кислоты при уремии [16]. Поэтому, состояние здоровья почек у конкретного пациента является одним из важнейших факторов, определяющих отклик пациентов на терапию препаратами холекальциферола.

У разных пациентов, приём витамина D приводит к разной величине отклика уровнями $25(\text{OH})\text{D}$ в сыворотке крови. Эта изменчивость отражает, помимо состояния почек, различия в интенсивности процессов всасывания витамина D (уровни холекальциферола) и деградации витамина D (уровни $24,25(\text{OH})_2\text{D}$, кальцитроевой кислоты и др.). Несмотря на эти очевидные различия в фармакокинетическом отклике на препараты витамина D, практически все клинические исследования и рекомендации экспертов подразумевают назначение фиксированных доз витамина D для всех пациентов [17].

Также важно отметить, что определение уровней различных метаболитов витамина D позволяет выяснить различные аспекты фармакокинетического отклика организма на приём витамина. Например, в группе женщин с маргинальным дефицитом витамина D ($n = 91$, $25(\text{OH})\text{D} < 30$ нг/мл) участницы получали витамин D_3 (2500 МЕ/сут) в течение 6 мес [17]. Отмечено достоверное увеличение концентраций всех метаболитов витамина D (рис. 4).

Тем не менее, значимость этих изменений *уровней метаболитов* была различной. Так, динамика уровней холекальциферола показывает, что пациентки, обследованные в работе [17], не принимали препаратов витамина D до начала исследования, а содержание холекальциферола в их рационе было минимальным.

Возрастание *уровней $25(\text{OH})\text{D}$* в динамике обсуждаемого исследования указывает на то, что нижняя граница нормы $25(\text{OH})\text{D}$ (30 нг/мл) у значительной части пациенток была достигнута только через 6 мес терапии. У пациенток с $25(\text{OH})\text{D} < 30$ нг/мл даже после 6-месячного курса терапии можно предположить наличие нарушений функции печени, в которой, собственно, и происходит биосинтез $25(\text{OH})\text{D}$.

Возрастание *уровней $24,25(\text{OH})_2\text{D}$* в динамике исследования указывает на возрастание общей интенсивности гомеостаза витамина D. Оценка уровней $24,25(\text{OH})_2\text{D}$, наряду с уровнями холекальциферола и $25(\text{OH})\text{D}$, может являться эффективным способом подбора дозы витамина D у индивидуальных пациенток.

Достаточно интересной подгруппой метаболитов витамина D, возникающих в результате биотрансформаций, являются т. н. «эпимеры витамина D». Эпимерами называются стереоизомеры – т. е. молекулы с одинаковой структурой химических связей, но с различной стереохимической конфигурацией (левовращающей, правовращающей). Например, С3-эпимеры витамина D отличаются от известных метаболитов витамина D только конфигурацией гидроксильной группы у 3-го атома углерода стероидного ядра. Так, метаболиту $25(\text{OH})\text{D}_3$ соответствует С-3-эпимер $25(\text{OH})\text{D}_3$ (3-эпи- $25-(\text{OH})\text{D}_3$). Молекула 3-эпи- $25-(\text{OH})\text{D}_3$ также может подвергаться 1-гидроксилированию с образованием 3-эпи- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, который, в свою очередь, связывается с рецептором ви-

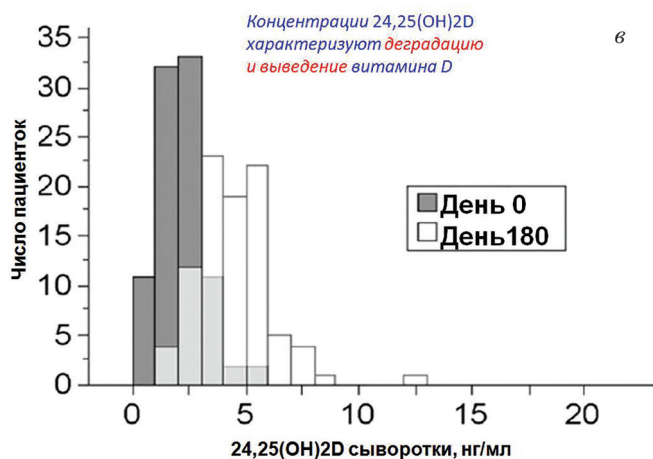
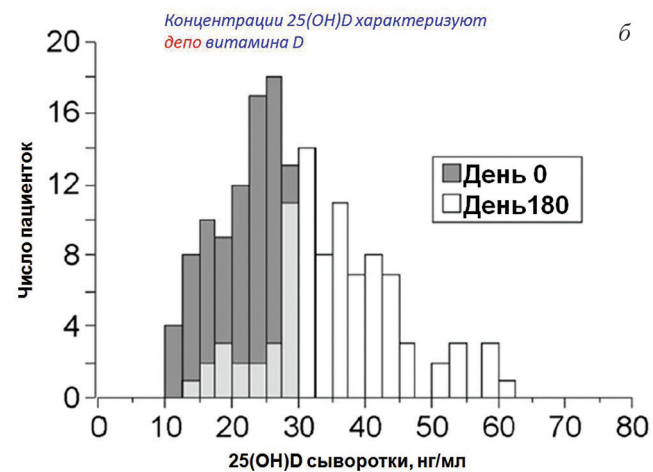
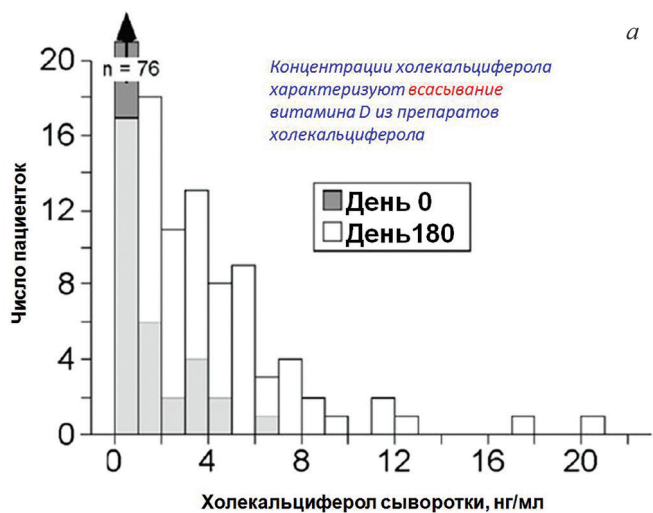


Рис. 4. Распределения уровней нескольких метаболитов витамина D в начале и в конце исследования. Представлены распределения частот встречаемости значений концентраций метаболитов на день «0» и на день «180» для (а) холекальциферола, (б) 25(OH)D и (в) 24,25(OH)₂D

Примечание: светло-серый цвет указывает на перекрытие данных на день «0» и «180»

а

тамина D (VDR). Хотя связывание 3-эпи-1,25(OH)₂D₃ VDR рецептором происходит с меньшим сродством по сравнению с 1,25(OH)₂D₃, данный С3-эпимер кальцитриола всё равно активирует транскрипцию витамин-D-зависимых генов [18].

Многие из эпимеров витамина D, во-первых, являются эндогенными (т. е. синтезируются в организме), и, во-вторых, могут характеризоваться существенно различными биологическими свойствами. Например, 3-эпи-1,25(OH)₂D₃, обнаруживаемый в концентрации более 2,0 нг/мл у 41% здоровых добровольцев, характеризуется столь же сильным эффектом в подавлении секреции ПТГ, как и 1,25(OH)₂D₃. Однако 3-эпи-1,25(OH)₂D₃ характеризуется гораздо более слабыми кальциемическими эффектами, чем сам кальцитриол [19] (рис. 5). Поэтому, существование эпимеров несколько усложняет точное измерение концентраций метаболитов витамина D и приводит к завышенным оценкам уровней метаболитов.

Такие метаболиты витамина D, как холекальциферол, 25(OH)D₃ и 1,25(OH)₂D₃ характеризуются существенно различными фармакокинетическими

б

в

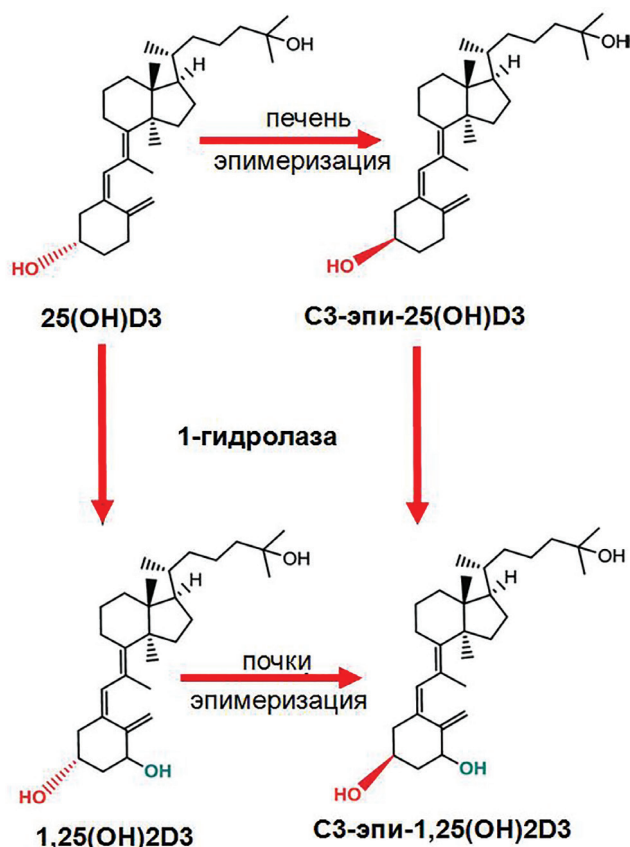


Рис. 5. Реакции эпимеризации метаболитов витамина D с образованием соответствующих стереоизомеров. Пунктирный треугольник к группе «ОН» обозначает химическую связь, находящуюся за плоскостью рисунка. Сплошной треугольник к группе «ОН» обозначает химическую связь, находящуюся перед плоскостью рисунка

свойствами. Воздействие приёма препаратов холекальциферола, $25(\text{OH})\text{D}_3$ и $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на уровни метаболитов витамина D в крови было изучено у здоровых добровольцев ($n = 116$, 28 ± 4 лет, потребление молока < 500 мл/сут, $25(\text{OH})\text{D} 67 \pm 25$ нмоль/л). Участники были рандомизированы на получение D_3 (25, 250 или 1 250 мкг/сут, 8 нед.), $25(\text{OH})\text{D}_3$ (10, 20 или 50 мкг/сут, 4 нед.) и $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,5, 1,0 или 1,0 мкг/сут, 2 нед.).

При приёме холекальциферола, у пациентов повышались уровни холекальциферола и $25(\text{OH})\text{D}$, но не уровни кальцитриола ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). При приёме $25(\text{OH})\text{D}_3$ повышались только уровни $25(\text{OH})\text{D}_3$, а при приёме $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ — только уровни $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ [20]. Были получены следующие оценки средних эффектов лечения здоровых взрослых (70 кг) для типично используемых дозировок этих метаболитов витамина D:

- 8-недельный курс витамина D_3 10 мкг/день (400 МЕ/сут) поднимает концентрацию холекальциферола в сыворотке крови на 4 нг/мл, а концентрацию $25(\text{OH})\text{D}$ на +4,4 нг/мл;
- 4-недельный курс $25(\text{OH})\text{D}_3$ (20 мкг/сут) поднимает уровни $25(\text{OH})\text{D}$ на +38 нг/мл;
- 2-недельный курс $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,5 мкг/сут) поднимает уровни $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ на +17 пмоль/л [20].

Метаболиты витамина D_3 и возможные ошибки в оценке дефицита D

Для определения уровней витамина D чаще всего используется хемилюминесцентный иммуноанализ, в котором для распознавания молекул используются моноклональные антитела. Поэтому на точность измерения уровней $25(\text{OH})\text{D}_3$ могут существенно влиять и другие метаболиты витамина D, весьма схожие с $25(\text{OH})\text{D}_3$ по химической структуре и ошибочно распознаваемые «моноклональным» антителом как $25(\text{OH})\text{D}_3$.

Например, при обследовании группы пациентов установлены следующие диапазоны значений концентраций различных метаболитов: $25(\text{OH})\text{D}_3$ — 7–60 нг/мл, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ — 10–100 пг/мл; 3-эпи- $25(\text{OH})\text{D}_3$ — 0,1–4,5 нг/мл [21]. Заметим, что при использовании стандартных тестов невозможно отличить молекулы $25(\text{OH})\text{D}_3$ и 3-эпи- $25(\text{OH})\text{D}_3$ в крови. Поэтому, получаемые значения $25(\text{OH})\text{D}_3$ могут быть завышены на 0,1–4,5 нг/мл за счёт 3-эпи- $25(\text{OH})\text{D}_3$.

Более детальное исследование взаимосвязей концентраций различных метаболитов D_3 подтверждает этот вывод. Оценка точности определения 25-гидроксивитамина D в крупномасштабном клинико-эпидемиологическом исследовании ($n = 1100$) показала, что концентрации 3-эпи- $25(\text{OH})\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в высокой степени коррелируют с концентрацией $25(\text{OH})\text{D}_3$ в крови ($r = +0,95$). При этом концентрации каждого из этих метаболитов составляют 8–11% от концентрации $25(\text{OH})\text{D}_3$ [22]. Таким образом, измеряемые концентрации $25(\text{OH})\text{D}_3$ могут быть завышены на 16–22% (что составляет, в среднем, 5–8 нг/мл).

Биологические роли метаболитов витамина D_3 и данные фундаментальных исследований

Даже в случае наиболее исследованного эффекта витамина D (а именно, воздействие на гомеостаз костной ткани) биологически активным оказывается не только кальцитриол. Например, метаболиты витамина D_3 стимулируют остеогенную дифференцировку клеток пульпы зуба человека и клеток зубного фолликула. Установлено, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (в концентрациях 10–100 нМ) и $25(\text{OH})\text{D}_3$ (500 нМ) могут быть использованы в качестве индукторов остеогенеза зубов [23]. Применение метаболитов витамина D_3 способствовало активации процесса биоминерализации (рис. 6).

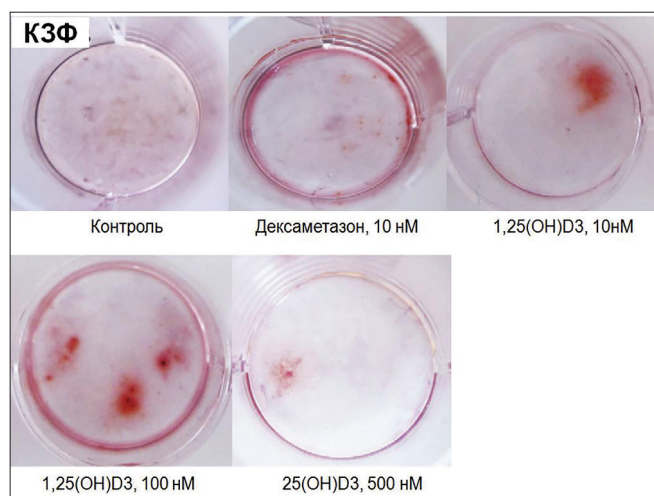


Рис. 6. Биоминерализация клеток зубного фолликула (КЗФ) при воздействии метаболитов витамина D_3 . Окрашивание клеток, в которых был стимулирован остеогенез, производилось ализариновым красным. Проведено сравнение с дексаметазоном (глюкокортикостероид, наиболее часто используемый для индукции остеогенеза)

Метаболиты витамина D, гидроксированные по 24-му атому углерода стероидного ядра (такие как $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) играют важную роль в заживлении переломов. В эксперименте дефицит активности цитохрома Cyp24a1, гидрокселирующего метаболиты витамина D по атому C-24, задерживает заживление перелома. Делеция гена CYP24A1 приводит к существенной задержке минерализации хрящевой матрицы и сопровождается снижением экспрессии генов-маркеров хондроцитов [24].

В росте хряща принимают участие различные метаболиты витамина D_3 . Уровни интерлейкина-1 в ростовой пластине хряща регулируются $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [25]. Эпифизарные хондробласты содержат специфические рецепторы для $24R,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, в то время как диафизарные остеобласты содержат специфические рецепторы для $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Во время эмбриогенеза и на ранних этапах постнатального развития, почки реагируют сначала на $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, а затем на $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и на $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Почки взрослого человека реагируют только на $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Эпифизарные и диафизарные хондробласты на любой

стадии развития реагируют на $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, тогда как остеобласты реагируют только на $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Таким образом, например, метаболит $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ является одним из центральных факторов созревания хряща, особенно в период раннего постнатального развития [26].

В эксперименте, метаболиты витамина D ингибируют вирус гепатита C – холекальциферол (D_3), $25(\text{OH})\text{D}_3$ и $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ проявляли антивирусную активность в микромолярном диапазоне концентраций. Сниженные концентрации $25(\text{OH})\text{D}_3$ ассоциированы с уменьшением ответной реакции организма на терапию интерфероном и рибавирином [27].

Тучные клетки преобразуют $25(\text{OH})\text{D}_3$ в $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ посредством цитохрома CYP27B1, и оба этих метаболита витамина D подавляют индуцируемые IgE провоспалительные реакции тучных клеток [28].

Метаболиты D_3 , $25(\text{OH})\text{D}_3$ и $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ стабилизируют структуру эндотелия сосудов при физиологически значимых концентрациях. При этом эти эффекты метаболитов не зависят от «канонической» экспрессии генов, происходящей при активации рецептора витамина D (VDR) [29]. Холекальциферол (D_3) усиливал целостность межклеточных соединений, измеренных с помощью иммуноцитохимического окрашивания белка межклеточного взаимодействия кадгерина на фоне деструктивного воздействия провоспалительных цитокинов ИЛ-1бета и ФНО-альфа. Таким образом, D_3 ингибирует дестабилизирующее воздействие провоспалительных цитокинов на межклеточные соединения в эндотелии (рис. 7).

Витамин D и его метаболиты ингибируют пролиферацию раковых клеток ($p < 0,001$) [30], чему имеются и клинические подтверждения. Так, низкие уровни $25(\text{OH})\text{D}$ (< 25 нг/мл), наряду с ожирением, низкой физической активностью и курением, являются независимыми факторами риска смертельного исхода у пациентов со злокачественной аденомой простаты ($n = 1822$, ОР – 1,6, 95% ДИ – 1,1–2,4, $p = 0,006$) [31], в то время как не было установлено ассоциаций с уровнями $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

Уровни метаболитов витамина D_3 и клиническая диагностика различных патологий

Как было отмечено ранее, более правильной процедурой исследования клинических эффектов витамина D было бы одновременное определение уровней всех известных метаболитов витамина D [21]. Обоснованием этого положения являются результаты клинических исследований, которые указывают уровни тех или иных метаболитов витамина D как независимых факторов риска патологий.

Например, в когорте пациентов, направленных на коронарную ангиографию ($n = 3299$), установлены независимые достоверные ассоциации различных метаболитов витамина D с субклинической анемией (гемоглобин – < 125 г/л, 16% участников). Пациенты

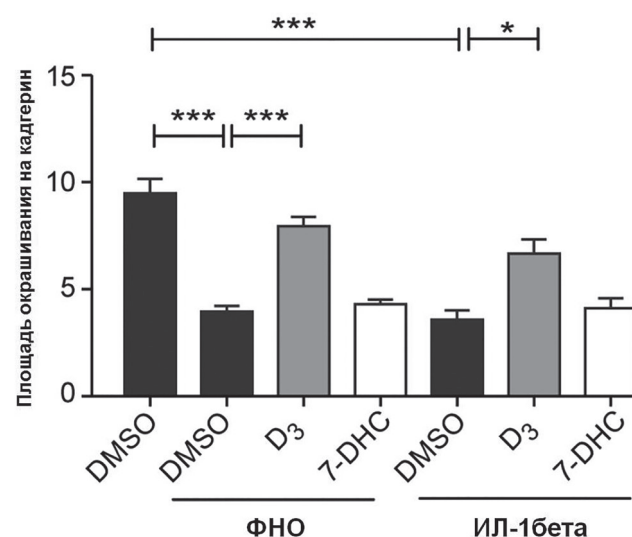
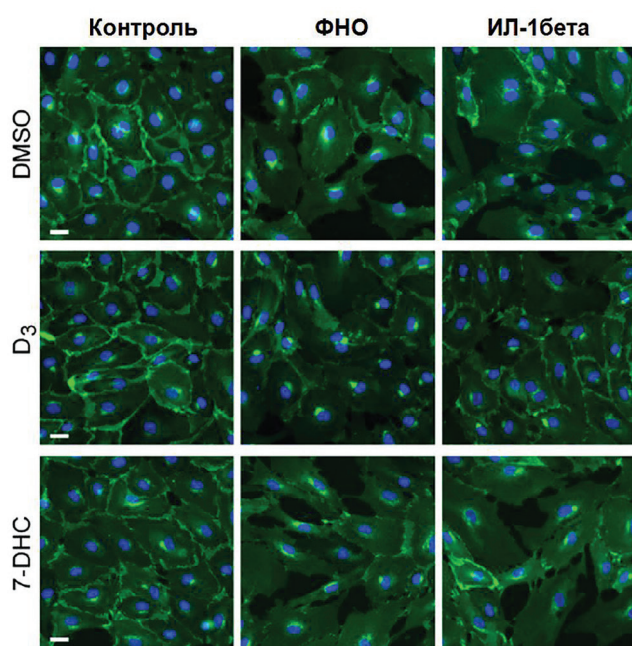


Рис. 7. Стабилизация холекальциферолом (D_3) межклеточных контактов. Эндотелиальные монослои клеток были подвержены действию провоспалительных ИЛ-1бета и ФНО-альфа в присутствии контроля (DMSO, диметилсульфоксид; 7-ДНХ, 7-дигидрохолестерин) или D_3 . Клетки фиксировали и VE-кадгерин визуализировали с помощью иммунофлуоресцентной маркировки с последующим автоматизированным сбором и количественным анализом получаемых изображений. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

с $25(\text{OH})\text{D} < 12$ нг/мл (34% пациентов) имели на 6 г/л более низкие уровни гемоглобина (ОР – 1,5, 95% ДИ – 1,2–2,0) (рис. 8) [21].

В подгруппе пациентов с уровнями $1,25(\text{OH})_2\text{D} < 40$ пмоль/л (5,4%), по сравнению с подгруппой пациентов с $1,25(\text{OH})_2\text{D} > 70$ пмоль/л, гемоглобин был на 13 г/л ниже (ОР – 3,6, 95% ДИ – 2,3–5,5). Риск анемии был выше у пациентов с сочетанным дефицитом метаболитов $25(\text{OH})\text{D}$ и $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (ОР – 5,1, 95% ДИ – 2,7–9,8).

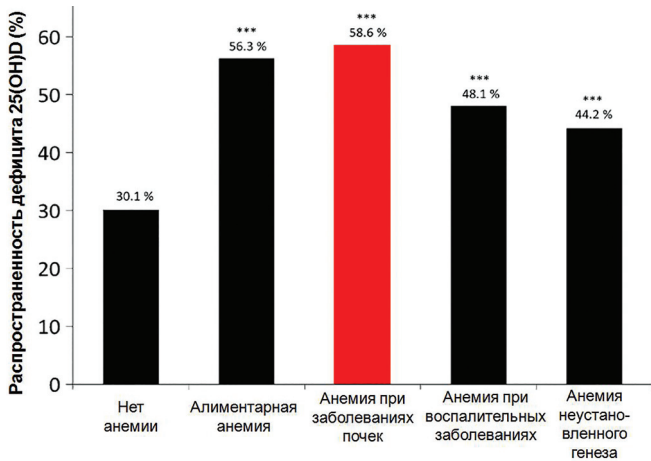


Рис. 8. Распространённость уровней 25(OH)D < 30 нмоль/л у пациентов с различными подтипами анемии. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ в сравнении с участниками без анемии

У пациентов с анемией на фоне хронической патологии почек отмечены самые высокие показатели распространённости дефицита метаболитов 25(OH)D и 1,25(OH)₂D [21] (рис. 9).

Уровни метаболитов витамина D ассоциированы с риском анемии также и у пациентов, готовящихся к аорто-коронарному шунтированию ($n = 3\ 615$). Как известно, даже субклиническая форма предоперационной анемии (гемоглобин – < 125 г/л, встречалась у 27% пациентов) является независимым фактором риска послеоперационных осложнений. У пациентов с 25(OH)D < 12 нг/мл средние концентрации гемоглобина были на 0,5 г/дл ниже, чем у пациентов с 25(OH)D > 20 нг/мл ($p < 0,001$). Средние концентрации гемоглобина были на 12 г/л ниже у пациентов с 1,25(OH)₂D < 40 пмоль/л, чем у пациентов с 1,25(OH)₂D > 70 пмоль/л ($p < 0,001$). Риск анемии был наибольшим у пациентов с дефицитом как 25(OH)D, так и 1,25(OH)₂D (OR – 3,6, 95% ДИ – 2,4–5,4) [32].

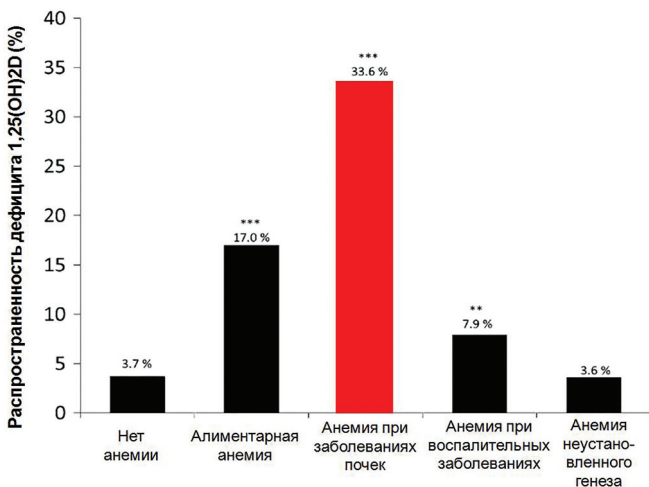


Рис. 9. Распространённость уровней 1,25(OH)₂D < 40 пмоль/л у пациентов с различными подтипами анемии. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ в сравнении с участниками без анемии

Концентрации 1,25(OH)₂D ассоциированы с риском метаболического синдрома ($n = 2\ 096$). Участники с уровнями 25(OH)D более 30 нг/мл и 1,25(OH)₂D более 38 пг/мл продемонстрировали значительно более низкие шансы метаболического синдрома (OR – 0,4, 95% ДИ – 0,2–0,7) по сравнению со всеми другими участниками [33].

Уровни метаболитов витамина D в сыворотке крови ассоциированы с частотой рецидивов и инвалидностью у пациентов с рассеянным склерозом ($n = 267$). Уровни 25(OH)D₃ были достоверно ниже у пациентов с прогрессирующим фенотипом заболевания по сравнению с рецидивирующим-ремитирующим фенотипом (–12 нг/мл, $p = 0,04$). Ассоциация была достоверна и для уровней 1,25(OH)₂D₃ (–40 пмоль/л, $p = 0,018$). В то же время, низкие уровни 25(OH)D₃ были ассоциированы с высоким баллом по шкале EDSS (расширенная шкала Куртцке для оценки степени инвалидизации), в то время как уровни 1,25(OH)₂D₃ не были достоверно ассоциированы с баллом по шкале EDSS [34] (рис. 10).

Гипотония мышц ассоциирована с низким уровнем в сыворотке крови метаболитов витамина D. Так, уровни 25-гидроксивитамина D ($r = 0,24$; $p = 0,0004$) и 1,25-дигидроксивитамина D ($r = 0,14$; $p = 0,045$) коррелировали с показателями мышечной силы у мужчин. У женщин только 1,25-гидроксивитамина D был достоверно ассоциирован с силой мышц ($r = 0,22$; $p = 0,03$) [35].

Низкие уровни метаболитов витамина D₃ в сыворотке крови ассоциированы с ревматоидным артритом. В группе пациенток ($n = 143$) у 16% отмечен глубочайший дефицит витамина D – уровни 25(OH)D менее 5 нг/мл. В зимний сезон, у 73% пациенток отмечены уровни 25(OH)D менее 20 нг/мл. При этом самые

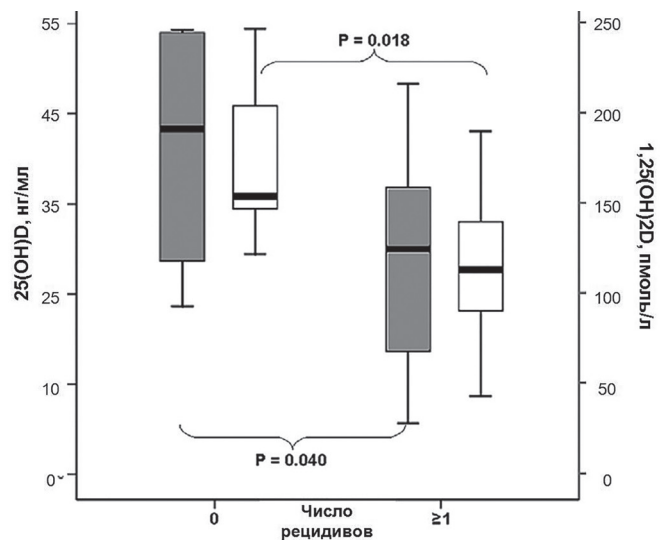


Рис. 10. Уровни метаболитов витамина D у пациентов с рассеянным склерозом ($n = 31$; длительность заболевания – ≤ 5 лет, балл EDSS ≤ 3,5). Показаны данные для 25(OH)D₃ (серый цвет) и 1,25(OH)₂D₃ (белый цвет)

низкие значения уровней метаболитов витамина D₃ были обнаружены у пациенток с высокой активностью заболевания [3]. Установлено, что у пациентов с ревматоидным артритом ($n = 102$) концентрации 25(OH)D₃ и 1,25(OH)₂D также были достоверно ниже ($p = 0,01-0,001$). Показано, что более низкие уровни 25(OH)D₃, 24,25(OH)₂D₃, 25,26(OH)₂D в сыворотке крови соответствовали большей степени тяжести артрита [36].

Достаточно интересным и важным вопросом, имеющим отношение к клинической диагностике с использованием определения уровней метаболитов витамина D, является соотношение концентраций различных метаболитов. Например, при умеренной почечной недостаточности у детей было показано, что уровни 1,25(OH)₂D и 25(OH)D₃ были нормальными, а уровни 24,25(OH)₂D₃ были достоверно ниже у пациентов, и, что интересно, не показывали сезонных изменений. Терапия с помощью 25(OH)D₃ приводила к повышению уровней 25(OH)D₃ и 24,25(OH)₂D₃, но не 1,25(OH)₂D [37]. У пациенток с беременностью на фоне диабета ($n = 150$) уровни 25(OH)D₃ и 1,25(OH)₂D достоверно ниже, чем в контроле ($p = 0,001$), в то время как значения уровней 24,25(OH)₂D не отличаются между группами [38]. Эти и другие данные указывают на целесообразность определения уровней различных метаболитов витамина D в крови для получения более объективной клинической картины состояния пациента.

Заключение

У педиатров анализ «на витамин D» десятилетиями считался своего рода экзотическим лабораторным тестом, позволяющим проводить дифференциальный диагноз тяжёлых форм наследственно-обусловленных нарушений фосфорно-кальциевого обмена, и редко назначался. У терапевтов анализ «на витамин D» назначается несколько чаще, в связи с осознанием насущности проблемы остеопороза. Эти очевидные проблемы здоровья указали на необходимость определения в сыворотке крови уровней хотя бы одного метаболита витамина D – 25(OH)D₃, который действительно позволяет оценить обеспеченность организма витамином D у большинства пациентов. Например, с использованием определения уровней 25(OH)D₃ в крови в исследовании «Родничок-1» было показано, что применение водорастворимой фармацевтической формы витамина D (препарат Аквадетрим) позволяет эффективно компенсировать дефицит витамина D у детей до 3 лет [39].

Последующие клинико-эпидемиологические исследования показали, что уровни 25(OH)D₃ позволяют оценить обеспеченность витамином D, 1,25(OH)₂D₃ – состояние биосинтеза витамина D, а уровни 24,25(OH)₂D₃ – биodeградацию витамина D. Однако даже эта трёхчастная оценка является

упрощением, т. к. известно более 50 метаболитов витамина D. При этом пренебрежение, например, существованием эпимеров витамина D (что характерно для повсеместно используемого иммуноферментного анализа на витамин D) приводит к завышению обеспеченности организма витамином D на 8–16%, в среднем. Поэтому, даже уровни метаболита 25(OH)D₃ в сыворотке крови, равные 30 нг/мл и считающиеся «нормальными», для ряда пациента могут соответствовать умеренному гиповитаминозу D. Кроме того, существенными и специфическими биологическими активностями обладают и считающиеся ранее неактивными метаболиты 1,24R,25(OH)₃D₃, 1,23S,25(OH)₃D₃, 25,26(OH)₂D и др. Взаимосвязь дефицита витамина D с широчайшим кругом хронических заболеваний – сердечно-сосудистой и цереброваскулярной патологией, артериальной гипертонией, диабетом, ожирением, опухолевыми, инфекционными заболеваниями и др. указывает на необходимость определения уровней различных метаболитов витамина D для расширения диагностических возможностей.

Литература

1. Громова О.А., Торшин И.Ю. Витамин D – смена парадигмы. М.: ГэотарМед, 2017; 750.
2. Zerwekh J.E. Blood biomarkers of vitamin D status. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87 (4): 1087S–1091S.
3. Muller M.J., Volmer D.A. Mass spectrometric profiling of vitamin D metabolites beyond 25-hydroxyvitamin D. *Clin Chem.* 2015; 61 (8): 1033–48 doi.
4. van Ballegooijen A.J., Robinson-Cohen C., Katz R., Criqui M., Budoff M., Li D., Siscovick D., Hoofnagle A., Shea S.J., Burke G., de Boer I.H., Kestenbaum B. Vitamin D metabolites and bone mineral density: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *Bone.* 2015; 78: 186–93 doi.
5. Lewis R.D., Laing E.M., Hill Gallant K.M., Hall D.B., McCabe G.P., Hausman D.B., Martin B.R., Warden S.J., Peacock M., Weaver C.M. A randomized trial of vitamin D(3) supplementation in children: dose-response effects on vitamin D metabolites and calcium absorption. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98 (12): 4816–25 doi.
6. Rambeck W.A., Weiser H., Meier W., Zucker H. Synergistic effects of vitamin D metabolites. *Ann Nutr Metab.* 1988; 32 (2): 108–111.
7. Heaney R.P., Barger-Lux M.J., Dowell M.S., Chen T.C., Holick M.F. Calcium absorptive effects of vitamin D and its major metabolites. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82 (12): 4111–4116.
8. Slominski A.T., Kim T.K., Li W., Yi A.K., Postlethwaite A., Tuckey R.C. The role of CYP11A1 in the production of vitamin D metabolites and their role in the regulation of epidermal functions. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014; 144 Pt A: 28–39 doi.
9. Sornes S., Bjoro T., Berg J.P., Torjesen P.A., Haug E. Calcitriol attenuates the basal and vasoactive intestinal peptide-stimulated cAMP production in prolactin-secreting rat pituitary (GH4C1) cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1994; 101 (1–2): 183–188.
10. Harant H., Spinner D., Reddy G.S., Lindley I.J. Natural metabolites of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3) retain biological activity mediated through the vitamin D receptor. *J Cell Biochem.* 2000; 78 (1): 112–120.
11. Teske K.A., Bogart J.W., Sanchez L.M., Yu O.B., Preston J.V., Cook J.M., Silvaggi N.R., Bikle D.D., Arnold L.A. Synthesis and evaluation of vitamin D receptor-mediated activities of cholesterol and vitamin D metabolites. *Eur J Med Chem.* 2016; 109: 238–46 doi.
12. Mazzaferro S., Goldsmith D., Larsson T.E., Massy Z.A., Cozzolino M. Vitamin D metabolites and/or analogs: which D for which patient? *Curr Vasc Pharmacol.* 2014; 12 (2): 339–349.

13. van Driel M., Pols H.A., van Leeuwen J.P. Osteoblast differentiation and control by vitamin D and vitamin D metabolites. *Curr Pharm Des.* 2004; 10 (21): 2535–2555.
14. Need A.G., O'Loughlin P.D., Morris H.A., Coates P.S., Horowitz M., Nordin B.E. Vitamin D metabolites and calcium absorption in severe vitamin D deficiency. *J Bone Miner Res.* 2008; 23 (11): 1859–63 doi.
15. Crissey S.D., Ange K.D., Jacobsen K.L., Slifka K.A., Bowen P.E., Stacewicz-Sapuntzakis M., Langman C.B., Sadler W., Kahn S., Ward A. Serum concentrations of lipids, vitamin d metabolites, retinol, retinyl esters, tocopherols and selected carotenoids in twelve captive wild felid species at four zoos. *J Nutr.* 2003; 133 (1): 160–166.
16. Schomig M., Ritz E. Management of disturbed calcium metabolism in uraemic patients: 1. Use of vitamin D metabolites. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15: Suppl 5: 18–24.
17. Binkley N., Lappe J., Singh R.J., Khosla S., Krueger D., Drezner M.K., Blank R.D. Can vitamin D metabolite measurements facilitate a «treat-to-target» paradigm to guide vitamin D supplementation? *Osteoporos Int.* 2015; 26 (5): 1655–60 doi.
18. Singh R.J., Taylor R.L., Reddy G.S., Grebe S.K. C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91 (8): 3055–61 Epub 2006 M.
19. Farrell C.J., Herrmann M. Determination of vitamin D and its metabolites. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2013; 27 (5): 675–88 doi.
20. Barger-Lux M.J., Heaney R.P., Dowell S., Chen T.C., Holick M.F. Vitamin D and its major metabolites: serum levels after graded oral dosing in healthy men. *Osteoporos Int.* 1998; 8 (3): 222–230.
21. Muller M.J., Stokes C.S., Lammert F., Volmer D.A. Chemotyping the distribution of vitamin D metabolites in human serum. *Sci Rep.* 2016; 6: 21080 doi.
22. Carter G.D., Jones J.C., Shannon J., Williams E.L., Jones G., Kaufmann M., Sempos C. 25-Hydroxyvitamin D assays: Potential interference from other circulating vitamin D metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015; *J Steroid* : S0960–0760(15)3016.
23. Khanna-Jain R., Vuorinen A., Sandor G.K., Suuronen R., Miettinen S. Vitamin D(3) metabolites induce osteogenic differentiation in human dental pulp and human dental follicle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 122 (4): 133–41 doi.
24. St-Arnaud R. CYP24A1-deficient mice as a tool to uncover a biological activity for vitamin D metabolites hydroxylated at position 24. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 121 (1–2): 254–6 doi.
25. Dean D.D., Schwartz Z., Muniz O.E., Arsenis C.H., Boyan B.D., Howell D.S. Interleukin-1alpha and beta in growth plate cartilage are regulated by vitamin D metabolites in vivo. *J Bone Miner Res.* 1997; 12 (10): 1560–1569.
26. Somjen D., Earon Y., Harell S., Shimshoni Z., Weisman Y., Harell A., Kaye A.M., Binderman I. Developmental changes in responsiveness to vitamin D metabolites. *J Steroid Biochem.* 1987; 27 (4–6): 807–813.
27. Gutierrez J.A., Jones K.A., Flores R., Singhania A., Woelk C.H., Schooley R.T., Wyles D.L. Vitamin D Metabolites Inhibit Hepatitis C Virus and Modulate Cellular Gene Expression. *J Virol Antivir Res.* 2014; 3 (3). doi: 104172/2324-104178.
28. Yip K.H., Kolesnikoff N., Yu C., Hauschild N., Taing H., Biggs L., Goltzman D., Gregory P.A., Anderson P.H., Samuel M.S., Galli S.J., Lopez A.F., Grimbaldeston M.A. Mechanisms of vitamin D(3) metabolite repression of IgE-dependent mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133 (5): 1356–64, 1364e1–14.
29. Gibson C.C., Davis C.T., Zhu W., Bowman-Kirigin J.A., Walker A.E., Tai Z., Thomas K.R., Donato A.J., Lesniewski L.A., Li D.Y. Dietary Vitamin D and Its Metabolites Non-Genomically Stabilize the Endothelium. *PLoS One.* 2015; 10 (10): e0140370 doi.
30. Thomas M.G., Tebbutt S., Williamson R.C. Vitamin D and its metabolites inhibit cell proliferation in human rectal mucosa and a colon cancer cell line. *Gut.* 1992; 33 (12): 1660–1663.
31. Fang F., Kasperzyk J.L., Shui I., Hendrickson W., Hollis B.W., Fall K., Ma J., Gaziano J.M., Stampfer M.J., Mucci L.A., Giovannucci E. Prediagnostic plasma vitamin D metabolites and mortality among patients with prostate cancer. *PLoS One.* 2011; 6 (4): e18625.
32. Ernst J.B., Becker T., Kuhn J., Gummert J.F., Zittermann A. Independent association of circulating vitamin D metabolites with anemia risk in patients scheduled for cardiac surgery. *PLoS One.* 2015; 10 (4): e0124751 doi.
33. Bea J.W., Jurutka P.W., Hibler E.A., Lance P., Martinez M.E., Roe D.J., Sardo Molmenti C.L., Thompson P.A., Jacobs E.T. Concentrations of the vitamin D metabolite 1,25(OH)2D and odds of metabolic syndrome and its components. *Metabolism.* 2015; 64 (3): 447–59 doi.
34. Smolders J., Menheere P., Kessels A., Damoiseaux J., Hupperts R. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008; 14 (9): 1220–4 doi.
35. Bischoff H.A., Stahelin H.B., Tyndall A., Theiler R. Relationship between muscle strength and vitamin D metabolites: are there therapeutic possibilities in the elderly? *Z Rheumatol.* 2000; 59: Suppl 1: 39–41.
36. Als O.S., Riis B., Christiansen C. Serum concentration of vitamin D metabolites in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 1987; 6 (2): 238–243.
37. Taylor A., Norman M.E. Vitamin D metabolite profiles in moderate renal insufficiency of childhood. *Pediatr Nephrol.* 1988; 2 (4): 453–459.
38. Kuoppala T. Alterations in vitamin D metabolites and minerals in diabetic pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 1988; 25 (2): 99–105.
39. Захарова И.Н., Мальцев С.В., Боровик Т.Э., Яцык Г.В., Малявская С.И., Вахлова И.В., Шуматова Т.А., Романцова Е.Б., Романюк Ф.П., Климов Л.Я., Пирожкова Н.И., Колесникова С.М., Курьянинова В.А., Васильева С.В., Мозжухина М.В., Евсеева Е.А. Результаты многоцентрового исследования «Родничок» по изучению недостаточности витамина D у детей раннего возраста в России. *Педиатрия.* 2015; 1: 62–67.