



Резюме на проект по Фонд „Наука“ № 11002 – Конкурсна сесия 2011:

„Оценка на витамин Д статуса при таргетни групи чрез селективен хроматографски метод за определяне на 25-хидроксид витамин Д“

Ръководител: Проф. Бистра Цанева Галунска-Калчева, дх

Напоследък се натрупаха много данни за ролята на витамин Д не само и единствено във връзка с костно-минералната обмяна, а и с възможността му да намали риска от възникване на редица хронични заболявания като хронична бъбречна недостатъчност, диабет, сърдечносъдови заболявания, злокачествени заболявания, мултипла склероза, заболявания с нарушения в когнитивните функции. Две основни форми на витамин Д се откриват в човешкия организъм: витамин Д₃ (холекалциферол) и неговият растителен аналог витамин Д₂ (ергокалциферол). Попаднал в организма, той се метаболизира до 25-хидроксид витамин Д₃, (25-ОН Д₃) и до 1,25-дихидроксид витамин Д₃ (1,25-(ОН)₂ Д₃ или калцитриол). Метаболитно активната форма е калцитриолът, осъществяващ ендокринна и автокринна функция. Барометър за витамин Д статуса в организма е неговият предшественик 25-ОН Д₃ – главна циркулираща форма на витамин Д в кръвта.

Увеличаването на броя на случаите с витамин Д дефицит през последните години в световен мащаб придоби застрашаваща тенденция. Това налага мониторинг на нивата на витамин Д както при здрави индивиди в различни възрастови групи (деца, бременни и хора в напреднала възраст), така и при определени рискови групи пациенти – с остеопороза, с хронични бъбречни заболявания, трансплантирани, диабет, хипертония, с автоимунни и онкологични заболявания и индивиди със затлъстяване. Особено важна е групата на децата, поради възможности за профилактика и предотвратяване на възникване на хронични заболявания в по-късна възраст. Всичко това прави особено наложително въвеждането на надежден аналитичен метод за определяне на витамин Д-статуса и установяване на плазмени cut-off стойности за различни физиологични и патологични състояния, възрастови групи и сезонните им вариации.

Понастоящем съществуват два основни аналитични подхода за количествено определяне на 25-ОН Д₃: имунохимичен и хроматографски. Имунохимичните методи са по-разпространени, поради по-лесната им изпълнимост, но техни основни недостатъци са невъзможността им да определят селективно 25-ОН Д₃ и 25-ОН Д₂, откриващ се при суплементиране с витамин Д₂, и недотам добрата им възпроизводимост и точност. Хроматографските методи са с по-висока аналитична надеждност, могат да определят селективно 25-ОН Д₃ и 25-ОН Д₂, както и С3-епимера, важен при оценка на витамин Д-статуса в кърмаческа възраст. Недостатъците им са: по-висока трудоемкост, по-скъпа

апаратура, както и необходимост от високо квалифициран персонал. В последните години в Европа и САЩ усилено се работи по стандартизиране на методи за количествен анализ на 25-ОН Д. Експертни комисии достигнаха до консенсусното мнение, че именно хроматографските методи трябва да се използват като референтни. В България все още няма разработен надежден хроматографски метод, а определянето на нива на 25-хидрокси витамин Д₃ се извършва с имунохимични методи в ограничен брой лаборатории в страната. Тези факти обосноваха идеята на настоящото пилотно проучване да се разработи хроматографски метод с висока аналитична надеждност за оценка на витамин Д статус.

Като логичен завършек на работата по въвеждането на метода ще бъде неговото приложение за оценка на витамин Д статуса при определени таргетни групи индивиди: болни с хронична бъбречна недостатъчност и здрави деца в предпубертетна възраст с нормално и с наднормено тегло.

Хроничната бъбречна болест (ХББ) се характеризира с ниски нива на активната форма на витамин Д₃, още в ранните етапи на заболяването, когато все още липсват промени в серумните нива на калций, фосфор и паратхормон. Проучвания от последните години установяват положителна корелативна връзка между дефицита на 25-ОН Д₃ и появата и тежестта на анемичния синдром при болни с ХББ. Изясняването на динамиката в промените на плазмения 25-ОН Д₃ при болни с ХББ в различен стадий на заболяването, както и взаимовръзките му с параметри, оценяващи калциевата обмяна и еритропоезата, ще бъде предпоставка за адекватно терапевтично поведение в това число и суплементиране с витамин Д, негови аналози и калциеви миметици.

Чрез своите некалцитропни ефекти, витамин Д регулира функцията на много органи и системи, сред които са ендокринен панкреас, черен дроб и мастна тъкан. Предполага се, че субклиничен дефицит на витамин Д е рисков фактор за инсулинова резистентност, бета-клетъчна дисфункция, диабет тип 1 и 2 и метаболитен синдром. Като резултат недостатъчност на витамин Д води до вторичен хиперпаратиреоидизъм с последващо повишаване на интрацелуларния калций в адипоцитите, стимулиращ липогенеза и наднормено тегло. Получава се порочен кръг от метаболитни събития: увеличаването на мастната тъкан е предпоставка за секвестриране на витамин Д в мастните депа, а произтичащата от това намалена бионаличност на витамин Д и субклиничен дефицит води до усилена липогенеза и затлъстяване. От друга страна, дори сравнително малкият брой проучвания върху витамин Д-статуса при деца показват застрашаваща тенденция на нарастване случаите с витамин Д дефицит/ недостатъчност. Това е основание да проучим витамин Д-статуса при деца с нормално тегло и със затлъстяване и сезонната му вариация. Установяване на витамин Д-дефицит при деца и възможността за суплементирането им с витамин Д препарати би подпомогнало стратегическата за здравеопазването цел за намаляване риска от развитие на различни хронични заболявания в зряла възраст, в чиято патогенеза участва ендокринната ос на витамин Д.

В заключение, в България липсва информация за честотата на витамин Д дефицит и недостатъчност. Имайки предвид публикуваните данни за други Европейски страни и САЩ, показващи, че витамин Д дефицитът достига епидемични размери, става наложително да се направят усилия в тази насока и в България. Това пилотно проучване може да постави началото на бъдещи мащабни изследвания.

Цел на изследването:

Разработване и валидиране на селективен течнохроматографски метод за мониторинг на плазмени нива на 25-хидрокси витамин Д₃ и прилагането му за оценка на витамин Д-статуса при болни с хронична бъбречна болест и здрави деца в предпубертетна възраст с нормално и с наднормено тегло.

Научна идея или работна хипотеза (формулиране):

В последното десетилетие световната научна общност обръща изключително внимание на ролята на витамин Д за поддържане на оптимално здраве. Разкриването на неговите некалциемични ефекти доведе до актуализиране на нормите за среден дневен прием и съответно до необходимостта да бъде проследявано неговото ниво в кръвта. Изследването на циркулиращата форма на витамин Д е навлязло широко в клиничната практика на Европейските страни и САЩ. В това отношение България значително изостава. Изследване за витамин Д статус се извършва изключително рядко в ограничен брой лаборатории и то с по-ненадеждни в аналитично отношение методи. Това ни подтиква да разработим и въведем надежден хроматографски метод за мониторинг на витамин Д статус.

Настоящото пилотно проучване ще бъде проведено в два етапа:

1. Аналитичен етап: Разработване, валидиране и апробиране на директен и селективен течно-хроматографски метод с UV-детекция за измерване на плазмени нива на 25-хидрокси витамин Д₃ и 25-хидрокси витамин Д₂. Надеждността на разработения метод ще бъде оценена чрез сравняване с предложения от международни организации като референтен течно-хроматографски метод с мас-спектрометрична детекция, както и чрез включване в международната програма за външна оценка на качеството на резултатите от анализите на 25-ОН Д в серум (DEQAS Vitamin D External Quality Assessment Scheme). Получените резултати ще бъдат съпоставени с тези на широко използваните в момента в клиничната лаборатория имунохимични методи.
2. Клиничен етап: Мониторингът на нивата на 25-ОН Д е наложително да се извършва както при здрави индивиди с профилактична цел, така и при рискови групи болни. В настоящото проучване ще се изследва витамин Д-статуса при две таргетни групи от българската популация:

- ❖ Болни с хроничната бъбречна болест (ХББ), при които лечението включва и суплементация с витамин Д₃ препарати и негови аналози. Ще бъдат търсени взаимовръзки със стадия на заболяването и вида на терапията. Ще бъде оценен ефекта на суплементиращата терапия с витамин Д препарати и аналози;
- ❖ Деца в предпубертетна възраст с нормално тегло и със затлъстяване, при които ще бъде оценен витамин Д статуса и неговите сезонни вариации. Ще се установи честотата на витамин Д дефицит и недостатъчност с оглед превенция на хронични заболявания в зряла възраст. Ще бъдат търсени корелации между витамин Д статуса и стила на живот, диетата и антропометрични показатели.

Клиничният етап ще започне след получаване на разрешение от Комисията по етика на научните изследвания при МУ-Варна.

Използвани изследователски методи:

1. Методи:

- ❖ Високоефективна течна хроматография с детекция в ултравиолетовата и видимата област на спектъра за определяне на 25-ОН Д за оценка на витамин Д статуса;
- ❖ Рутинни клинично-лабораторни методи за оценка на костно-минералната обмяна;
- ❖ Антропометрични измервания: телесно тегло (с дигитална везна, с точност до 0,1 кг); височина (със стадиометър с точност до 1 см); обиколка на талията (с точност до 1 мм); ВМІ; оценка на предпубертетното развитие (по вторични полови белези според критериите на Tanner);
- ❖ Статистически методи за анализ на резултатите.

2. Пациенти:

- ❖ Болни с хронична бъбречна недостатъчност – без заместителна терапия на бъбречната функция и получаващи заместителна терапия на бъбречната функция (диализа и перитонеална диализа) и бъбречно трансплантирани;
- ❖ Представителна извадка от деца в предпубертетна възраст с нормално тегло и с обезитет.

Характеристика на очаквания принос (практическа или теоретична насоченост):

Очакван теоретичен принос:

1. Ще бъдат получени данни за витамин Д статуса при здрави деца от българската популация в предпубертетна възраст;
2. Ще бъдат получени допълнителни данни за бионаличността на 25-ОН Д₃ при деца с обезитет, които са оскъдни в световната литература.

Очакван практически принос:

1. Към момента в България няма разработен точен и селективен хроматографски метод за определяне на 25-хидрокси Д₃/Д₂ в биологични среди. Разработването и валидирането на такъв метод ще позволи да се извършва мониторинг на 25-хидрокси Д₃ в кръвен серум както на здрави лица, така и на рискови групи болни;
2. Наличието на работещ метод с висока степен на аналитична надеждност ще даде възможност да се оцени витамин Д статуса при рискова група болни и при здрави деца с нормално тегло и със затлъстяване. Това ще позволи в бъдеще да се дефинират референтни области за серумни нива на 25-хидрокси Д₃, каквито към момента не са определени;
3. Точната количествена оценка на витамин Д-статуса ще позволи да се оптимизират някои аспекти от терапията на основното заболяване при болните с ХББ и да се вземат решения за суплементиране с витамин Д₃/Д₂ и аналози;
4. Определяне на витамин Д статуса при здрави деца с нормално тегло и със затлъстяване ще обоснове необходимостта от суплементиране при изявен витамин Д дефицит/ недостатъчност и предотвратяване на евентуален риск от развиване на хронични заболявания в зряла възраст;
5. Въвеждане на лабораторен метод, който ще може да се използва и в рутинната клинична практика на територията на нашия регион.

Очакван принос с образователен и обучителен характер:

1. В проучването са включен и млади учени (под 35 г.), както и студенти по медицина и фармация. Като участници в изследователския екип те ще придобият практически знания и умения в хода на разработването и верифицирането на метода, при набирането на пробите, анализа на получените резултати и подготовката им за публикуване;
2. Предлагащото проучване ще послужи като база за разработване на дисертационен труд в областта на клиничната лаборатория.