

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ ВАРНА
Факултет по обществено здравеопазване
Катедра „Обща медицина и клинична лаборатория”**

д-р Даниела Иванова Герова

**ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВИТАМИН D СТАТУС И ЗНАЧЕНИЕ
НА СУБОПТИМАЛНИТЕ НИВА НА ВИТАМИН D
ЗА ХОДА НА НЯКОИ ХРОНИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Научна специалност „Клинична лаборатория”

Научни ръководители:
Доц. Бистра Галунска, дф
Доц. д-р Маргаритка Бончева, дм

Варна, 2015

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ ВАРНА
Факултет по обществено здравеопазване
Катедра „Обща медицина и клинична лаборатория“**

д-р Даниела Иванова Герова

**ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВИТАМИН D СТАТУС И ЗНАЧЕНИЕ
НА СУБОПТИМАЛНИТЕ НИВА НА ВИТАМИН D
ЗА ХОДА НА НЯКОИ ХРОНИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Научна специалност „Клинична лаборатория“

Научни ръководители:

Доц. Бистра Галунска, дф
Доц. д-р Маргаритка Бончева, дм

Официални рецензенти:

Проф. д-р Красимира Икономова, дм
Доц. Тагяна Янкова, дб

Варна, 2015

Дисертационният труд съдържа 160 страници и е онагледен с 23 таблици и 28 фигури. Библиографията включва 304 литературни източника, от които 1 на кирилица и 303 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден от Катедрен съвет на Катедра „Обща медицина и клинична лаборатория” към Медицински Университет „Проф. д-р П. Стоянов” - Варна и е насочен за публична защита пред Научно жури в състав:

Проф.д-р Красимира Икономова, дм

Доц. д-р Аделаида Русева, дм

Доц. Татяна Янкова, дб

Доц. Бистра Галунска, дф

Доц. д-р Маргаритка Бончева, дм

Публичната защитата на дисертационния труд ще се състои на 2015 г. от часа в аудитория „Проф. Владимир Иванов“ на МУ-Варна на открито заседание на Научното жури. Материалите по защитата са на разположение в отдел „Научна дейност и кариерно развитие“ и на сайта на Медицински Университет Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ.....	7
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	9
ЦЕЛ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО	9
ЗАДАЧИ.....	9
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	11
ПАЦИЕНТИ.....	11
МЕТОДИ.....	12
СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	20
I. АПРОБИРАНЕ И ВЕРИФИЦИРАНЕ НА СЕЛЕКТИВЕН ТЕЧНО-ХРОМАТОГРАФСКИ МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЕРУМНИ НИВА НА 25(OH)D:	20
II. ВИТАМИН D СТАТУС ПРИ ПАЦИЕНТИ С НСУ-ИНФЕКЦИЯ.....	36
III. ВИТАМИН D СТАТУС ПРИ ПАЦИЕНТИ С ПРОСТАТЕН КАРЦИНОМ.....	63
IV. ЗАКЛЮЧИТЕЛНО ОБСЪЖДАНЕ.....	82
ИЗВОДИ.....	85
ПРИНОСИ	88
СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	90

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

1,25(OH)2D	– 1,25-dihydroxyvitamin D
1,25(OH)2D2	– 1,25-dihydroxyvitamin D2
1,25(OH)2D3	– 1,25-dihydroxyvitamin D3 (калцитриол)
25(OH)D2	– 25-hydroxyvitamin D2
25(OH)D3	– 25-hydroxyvitamin D3
25(OH)D	– 25-hydroxyvitamin D
BMI	– Body mass index
BPH	– Benign prostatic hyperplasia
CLIA	– Chemiluminescent Immunoassay
DBP	– Vitamin D Binding Protein
DEQAS	– Vitamin D External Quality Assessment Scheme
HPLC-UV	– High Performance Liquid Chromatography - Ultraviolet Detection
ID-LC-MS/MS	– Isotope Dilution-Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry
IL	– Interleukin
INF	– Interferon
IOM	– Institute of Medicine of National Academies
LOD	– limit of detection
LOQ	– limit of quantitation
NIST	– National Institute of Standards and Technology
PCa	– Prostate Cancer
PSA	– Prostate Specific Antigen
RNA	– Ribonucleic acid
SRM	– Standard Reference Material
VDR	– Vitamin D Receptor

ВЪВЕДЕНИЕ

Освен добре известната класическа роля на витамин D в регулацията на калциевата хомеостаза, в последните едно-две десетилетия лавинообразно нарастват публикациите, за така наречените „некласически“ негови функции. Обсъжда се значението на витамин D дефицит и недостатъчност за редица хронични възпалителни, автоимунни, неопластични, имунодефицитни, метаболитни заболявания и др.

Важен аспект на некласическата роля на витамин D е неговото имуномодулаторно действие чрез повлияване на растежа и диференциацията на макрофаги, дендритни клетки, T- и B-лимфоцити. В редица изследвания се посочва ролята на активната форма на витамин D (калцитриол) за индуциране експресията на пептиди с антимикробно и противовирусно действие в неутрофили, моноцити, T-лимфоцити, както и епителни клетки, тапициращи респираторния тракт. Много клинични проучвания показват превантивната роля на витамин D при разнообразие възпалителни заболявания – от банални вирусни инфекции на горни дихателни пътища до пневмония и туберкулоза.

Калцитриолът е един от най-мощните хормони, които регулират клетъчния растеж. Множество данни доказват, че калцитриолът регулира ареста на клетъчния цикъл във фаза G1, апоптозата, туморната клетъчна диференциация, прекъсването на сигнални пътища, стимулирани от растежни фактори, инхибирането на ангиогенезата и клетъчната адхезия. В тази връзка се провеждат и многобройни проучвания, целящи да установят ролята на витамин D за патогенезата и клиничния ход на различни неопластични заболявания.

Проведени са мащабни кампании за проучване на витамин D статуса всред населението на повечето страни в света. Установяването на повсе-

местно разпространен витамин D дефицит доведе до рedefиниране на потребността от витамин D и актуализиране на нормите за препоръчителен дневен прием. В България такова актуализиране все още не е осъществено, най-вероятно поради спорадичния характер на проучванията, отнасящи се до витамин D и недостатъчно популяризиране на резултатите от тях.

Натрупаните до момента знания за плейотропните ефекти на витамин D обосновават необходимостта от неговото мониториране с цел подобряване на витамин D статуса на населението и преодоляване на неблагоприятните ефекти на витамин D дефицита в дългосрочен план. В САЩ и повечето европейски страни определянето на 25(OH)D е задължително при някои рискови групи, което се регламентира от официални нормативни документи и ръководства. За България този показател не е залегнал все още като задължителен елемент при оценка състоянието на тези рискови групи.

В България към момента липсват систематизирани изследвания за връзката на витамин D недостатъчност и дефицит с някои широко разпространени и социално-значими хронични заболявания.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Да се определи витамин D статуса чрез селективен хроматографски метод и да се оцени ролята на витамин D дефицита или недостатъчност при хронична хепатит С инфекция и простатен карцином като примери за социално значими хронични заболявания.

ЗАДАЧИ

- Апробиране и верифициране на селективен течнохроматографски метод за определяне на серумни нива на 25-хидрокси витамин D3 /25(OH)D3/ и 25-хидрокси витамин D2 /25(OH)D2/:*
 - определяне на аналитичната надеждност на метода – линеен обхват и определяем минимум, точност и възпроизводимост.
 - оценка на аналитичната надеждност чрез включване в програма за външна оценка на качеството на резултата от определяне на 25(OH)D.
 - сравнение на резултатите за серумни нива на 25(OH)D на представителна извадка от проби, получени с разработения метод с тези, получени с референтния LC-MS/MS метод.
 - сравнение на резултатите за серумни нива на 25(OH)D на представителна извадка от проби, получени с разработения метод с тези, получени с рутинен имунохимичен метод
- Оценка на витамин D статуса при пациенти с HCV-инфекция:*
 - определяне на честота на витамин D дефицит /недостатъчност сред изследваната група болни.
 - оценка на взаимовръзката между серумни нива на 25(OH)D и степента на вирусен товар.

- оценка на взаимовръзката между серумни нива на 25(OH)D и степента на засягане на чернодробните функции и тежестта на чернодробното увреждане, установени с утвърдени морфологични и биохимични изследвания.
 - оценка на взаимовръзката между серумни нива на 25(OH)D и отговора към стандартната антивирусна терапия.
3. *Оценка на витамин D статуса при пациенти с доброкачествена простатна хиперплазия и карцином на простатната жлеза:*
- определяне на витамин D статуса на изследваната група болни.
 - установяване на корелационни връзки между серумни нива на 25(OH)D3 и някои патоморфологични и прогностични показатели като:
 - √ наличие/отсъствие на малигнен процес
 - √ стойност на PSA
 - √ скор по Глисон

Извършените изследвания и дейности във връзка с представения дисертационен труд са стартирали след получаване на разрешение от Комисията по етика на научните изследвания при МУ-Варна, удостоверени с протокол №22(2)/28.06.2012г. и протокол №28(2)/28.03.2013г.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

ПАЦИЕНТИ

ВИТАМИН D И HCV-ИНФЕКЦИЯ

Проучването е ретроспективно, в което се включват 296 болни с хронична хепатит С вирусна инфекция на възраст над 18 години, пролежали в Клиниката по гастроентерология към УМБАЛ „Св. Марина” през периода януари 2010 – декември 2012 година във връзка с диагностиката и лечението на заболяването.

Включващ критерий – позитивна серология за HCV. От съществуващата болнична документация в кодиран вид за всеки пациент са взети данни за рутинните клинично лабораторни показатели, вирусни маркери (HCV RNA, генотип на HCV, HBsAg), проведените хистологични изследвания и антивирусно лечение – схема, продължителност, отговор на лечението след 6-месечно свободно от медикаменти проследяване.

Критерии за изключване от изследването: коинфекция с HBV или HIV; витамин D суплементиране; придружаващи бъбречно заболяване, малабсорбиционен синдром или неоплазия.

ВИТАМИН D И ЗАБОЛЯВАНИЯ НА ПРОСТАТНАТА ЖЛЕЗА

Проспективно проучване, обхващащо 53 мъже със заболявания на простатната жлеза (доброкачествена простатна хиперплазия (ВРН) и рак на простатната жлеза (РСa)) на възраст между 53 и 86 години, като се спазват следните критерии за включване: патологично завишени стойности на простатния специфичния антиген ($PSA > 4 \text{ ng/ml}$); абнормна физикална находка при дигитално изследване на простатата; наличие на хипоехогенна зона при трансректална ехография на простатата;

Критерии за изключване: наличие на остър възпалителен процес на простатната жлеза и/или системна инфекция (сепсис); придружаващо бъбречно заболяване; витамин D суплементиране; наличие на придружаващи заболявания, явяващи се контраиндикация за извършването на простатна биопсия, както и употреба на антикоагуланти и антиагреганти.

МЕТОДИ

МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА 25(OH)D:

I. Високоефективна течна хроматография с детекция в ултравиолетовата област

1. Преданалитичен етап

1.1. Събиране и съхранение на пробите

Нивата на 25(OH)D₂ и 25(OH)D₃ са анализирани в кръвен серум. За целта 5 ml венозна кръв е вземана във вакутейнери тип Z (Greiner Bio One International GmbH). За отделяне на серума кръвта е центрофугирана при 3000 об/мин за 10 минути. Отделеният кръвен серум е сепариран и алиquotите са съхранявани при -20°C до извършване на анализа.

1.2. Пробоподготовка

Реактиви: абсолютен етанол, n-хексан и метанол с чистота за течна хроматография (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Апаратура: вортекс-миксер (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Germany); система за концентриране на проби под азот (Reacti-Vap™, Thermo Scientific™, USA).

Извличането на анализите от кръвния серум е осъществено с теч-но-течна екстракция след преципитация на серумните белтъци и освобождение на 25(OH)D₂ и 25(OH)D₃ от DBP. Към 0,5 ml кръвен серум се

прибавя 1 ml абсолютен етанол, съдържимото се размесва и центрофу-гира при 5500 об/мин. Супернатантът, съдържащ анализите, се отделя и обработва с течно-течна екстракция с n-хексан. Екстракцията се извършва двукратно с двукратно по-голям обем на екстрагента. Обединените хекса-нови извлеци се изпаряват под азот до получаване на сух остатък, който се разтваря в 100 µl метанол и полученият концентрат се анализира хро-матографски.

2. Аналитичен етап

2.1. Високоэффективна течна хроматография с детекция в ултравиоле-товата област на спектъра за определяне на 25(OH)D.

Реактиви: ацетонитрил, вода и метанол с чистота за течна хроматогра-фия (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Апаратура: система за високоэффективна течна хроматография (Spectra System) и UV детектор (UV 2000) на Thermo Scientific, USA); аналитич-на хроматографска колона C18 Synergy hydro-RP 4,6×250 mm, 4.0 µm (Phenomenex Inc., USA).

Разделянето на анализите е извършено в изократен режим при тем-пература на колоната 29°C със следната подвижна фаза: 70 % ацетони-трил, 25 % метанол и 5 % вода. Скоростта на потока на подвижната фаза е 1.2 ml/min. Инжектирането на пробите и стандартите е извършвано ма-нуално с инжекторен порт тип Rheodyne 7125 с обем 20 µl. Детекцията на 25(OH)D₂ и 25(OH)D₃ е извършвана при 265 nm. Данните от хромото-графския анализ са анализирани с помощта на хроматографски софтуер ChromQuest 4.2.34.

2.2. Калибрация и количествен анализ

Реактиви: 25OH-холекалциферол, 25OH-ергокалциферол, 1-алфа-хо-лекалциферол, всички с чистота за хроматография (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Стандартни разтвори на 25(OH)-холекалциферол и 25(OH)-ергокалциферол с концентрация 2 mg/ml са приготвени в абсолютен етанол и съхранявани при -20°C. От тях чрез разреждане с метанол са приготвени серии стандартни разтвори на 25(OH)-холекалциферол и 25(OH)-ергокалциферол за построяване на стандартни криви на двата анализа.

Количественият анализ е извършван по метода на вътрешния стандарт. Като вътрешен стандарт е използван разтвор на 1-алфа-холекалциферол в метанол с концентрация 5 µg/ml, от който са добавяни 20 µl към серумните проби в началото на пробоподготовката.

3. Контрол на качеството на анализа

Реактиви: серумен калибратор за 25(OH)D2 и 25(OH)D3; серумна контрола за 25(OH)D2 и 25(OH)D3 в две нива (Chromsystems Instruments and Chemicals GmbH, Germany)

Лиофилизираните калибратор и контроли са реконституирани според инструкциите на производителя, порционирани и съхранявани при -20°C. Те са анализирани паралелно с всяка серия проби. За построяването на калибрационните криви са използвани 6 нива на сертифицирани търговски серум-базирани калибратори.

4. Оценка на аналитичната надеждност на метода:

Осигурен е вътрелабораторен качествен контрол с помощта на *in-house* приготвени контролни материали, както и с търговски контролни серуми.

Външният контрол на качеството на анализа се гарантира чрез участие в международна система за външна оценка на качеството при определяне на витамин D (DEQAS, UK) и чрез сравнителни междулабораторни анализи за 25(OH)D с кандидат-референтния за България метод, разработен в лабораторията за лекарствен мониторинг към Александровска болница.

II. Високоэффективна течна хроматография с маспектроскопска детекция

За сравнителния анализ е използван валидиран според изискванията на FDA метод за определяне на 25(OH)D, основан на хроматографско разделяне с маспектроскопска детекция. Накратко той включва следните етапи и процедури:

1. Преданалитичен етап:

100 μ l плазма/серум се преципитират със 150 μ l ацетонитрил, съдържащ вътрешния стандарт d3-25-хидроксивитамин D (d325OHD3). Екстракцията на 25(OH)D2, 25(OH)D3 и вътрешния стандарт се осъществява с помощта на 1 ml n-хексан.

2. Аналитичен етап:

Хроматографското разделяне се извършва в изократен режим с помощта на C18 аналитична колона и подвижна фаза със състав 85 % метанол/буфер (амониевацетат 0.005M; мравчена киселина 0.1%) и скорост 0.1 ml/min. Йонизацията е извършвана с електроспрей в позитивен режим при 25 KV, колизионна енергия = 10. Идентификацията е извършена при отношения маса/заряд (m/z): 401-383 за 25(OH)D3, 413-395 за 25(OH)D2 и 404-386 за d325OHD3.

III. Имунохимичен метод за определяне на 25OHD

За сравнителния анализ е използван имунохимичен метод, разработен от DiaSorin за платформата на LIAISON и тестов кит LIAISON 25 OH Vitamin D TOTAL (Cat. No. 310600). За калибрация и контрол на метода са използвани предложените от производителя калибрационни и контролни материали.

Методът се базира на директна конкуритивна хемилуминисцентна имунотехника (CLIA) за количествено определяне на 25(OH)D и други

хидроксилirани метаболити на витамин D в човешки серум. В готовия кит се използва анти тяло, което според производителя свързва с еднакъв афинитет двете основни форми на 25(OH)D /25(OH)D₂ и 25(OH)D₃/. Минималният изискуем обем проба (включващ и мъртвия обем) е 250 µL. Аналитичният етап включва дисоциация на 25(OH)D от свързващия го белтък и свързване със специфичното анти тяло. След добавяне на маркирания с луминофор 25(OH)D се измерва светлинният сигнал, интензитетът на който е обратно пропорционален на концентрацията на 25(OH)D в калибратори, контроли и пациентски проби.

РУТИННИ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНИ МЕТОДИ

Биохимични показатели

Всички рутинни биохимични показатели са изработени в Централна клинична лаборатория към УМБАЛ „Света Марина” Варна. Използвани са оригинални китове на производителите Beckman Coulter, Inc. и Siemens Healthcare Global респективно за автоматичните биохимични анализатори Olympus AU400 и ADVIA®1800 Clinical Chemistry System при стриктно спазване на инструкциите на производителя. Изследвани са следните лабораторни параметри: аланинаминотрансфераза, аспартат-аминотрансфераза, гамаглутамилтрансфераза, общ холестерол.

Молекулярно-биологични методи

В имунологична лаборатория на УМБАЛ „Света Марина” Варна е определено нивото на HCV RNA (т.нар вирусен товар) в серума на пациентите от групата с хронична HCV-инфекция. Осъществен е количествен анализ чрез полимеразна верижна реакция в реално време (quantitative real-time reverse transcription PCR) с помощта на AmpliSens HCV-Monitor-

FRT PCR тестов набор, производство на Централния институт по Епидемиология, Русия при стриктно спазване на изискванията на производителя, отразени в инструкцията на кита.

За определяне на генотипа/субтипа на HCV е използван търговският кит за диагностика – INNO-LiPa HCV II Assay (Innogenetics, Gent, Belgium) и Versant ® HCV Genotype 2.0 (LiPa). Изследванията са извършени в СМЛД „Вирутест“, гр. София, а резултатите от тях са вземани от медицинската документация на пациентите.

Серологични изследвания

От медицинската документация на пациентите е вземана информация за следните вирусни маркери: серологични маркери за HCV – anti HCV Ab; серологични маркери за HBV – HbsAg; anti HBc IgG, anti HBs Ab, antiHBe Ab; серологични маркери за HIV1/2 – anti HIV1/2 Ab, изследвани с помощта на диагностични, търговски китове базирани на ELISA технология, III – IV поколение.

Имунохимичен метод за определяне на PSA

За определяне на серумните нива на туморния маркер PSA е използван автоматизиран имунохимичен анализатор IMMULITE 2000 (Siemens Healthcare Global), извършващ анализа на принципа на директната хемилуминисценция (CLIA) при стриктно спазване инструкциите на производителя. Анализите са осъществени в Централна клинична лаборатория към УМБАЛ „Света Марина“ Варна.

ХИСТОМОРФОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Хистоморфологично изследване на биопсичен материал от чернодробна тъкан

В клиниката по гастроентерология на УМБАЛ „Света Марина” Варна чрез сляпа чернодробна биопсия по Menghini с игла 14-18 gauge (Herafix, Braun) е осъществено вземането на биопсичен материал, под ехографски контрол и локална анестезия. Хистологичното изследване на стандартни срезове от 3-5 μm е извършено в Катедрата по патология към МУ-Варна. Използвани оцветявания – H&E, трихромно оцветяване по Азан, по преценка допълнително оцветяване за желязо по Pearl. Хистологичната оценка е направена по модифицираната система за оценка на хистологична активност и фиброза (МИХА) и по системата METAVIR. Фиброзата е стадирана в 5 категории по системата METAVIR. При тази система се разграничават пет отделни стадия: стадий F0 – липсва фиброза; стадий F1 – звездовидно разширение на порталните зони без септи; стадий F2 – звездовидно разширение на порталните зони с няколко септи (най-малко една в пробата); стадий F3 – септална фиброза без цироза (повече септи, отколкото портални зони без септи) и стадий F4 – цироза.

Хистоморфологично изследване на биопсичен материал от простатна жлеза

В клиниката по урология на УМБАЛ „Света Марина” Варна на група пациенти с простатна хиперплазия и суспектни за простатен карцином се извърши системна трансректална пункционна (тру-кът) биопсия под ехографски контрол и локална анестезия. Биопсичен материал е взет от 10 до 12 различни зони. Хистологичното изследване на поне три стандартни последователни микротомни срезове от 3-5 μm е извършено в Катедрата

по патоанатомия към МУ-Варна. Извършвано е основно Н&Е оцветяване на хистологичните препарати, като в някои случаи са използвани и имунохистохимични изследвания /PSA, pancytokeratine (CK) и high molecular weight CK (HMW CK)/. При откриване на карцином за всеки индивидуален биопсичен цилиндър се извършва оценка по Gleason по модифицираната схема от 2006 година.

СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Данните бяха обработени със статистическия пакет GraphPad Prism, version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA. Бяха приложени следните методи:

1. Дескриптивен анализ – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване.
2. Вариационен анализ – за оценка на характеристиките на централната тенденция и разсейване на данните.
3. Корелационен и еднофакторен нелинеен регресионен анализ – за търсене на зависимост между два количествени признака.
4. Графичен анализ – за визуализация на получените резултати.
5. Непараметричен тест на Крускал – Уолис за сравняване на средните на три или повече независими извадки.
6. Непараметричен тест на Ман Уитни за сравняване на медианите на две независими извадки с негаусово разпределение.

За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза, бе избрано $p < 0.05$.

СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

I. АПРОБИРАНЕ И ВЕРИФИЦИРАНЕ НА СЕЛЕКТИВЕН ТЕЧНО-ХРОМАТОГРАФСКИ МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЕРУМНИ НИВА НА 25(OH)D:

Анализът на 25(OH)D е аналитично предизвикателство. Липофилният 25(OH)D се транспортира в циркулацията здраво свързан с витамин DBP. За ефективното отделяне на анализа от свързващия го протеин е необходима предварителна преципитация на белтъка и последваща течно-течна екстракция.

1. ОПТИМИЗИРАНЕ УСЛОВИЯТА НА ПРЕДАНАЛИТИЧНИЯ ЕТАП (ПРОБОПОДГОТОВКА)

1.1. Избор на преципитиращ агент

Критерий за избор на подходящ преципитиращ агент е аналитичният добив, получен за три различни концентрации на 25(OH)D₃ и 25(OH)D₂, добавени към проби от сборен серум, съдържащи минимално количество от метаболита, така че да се получат концентрации от 25 ng/ml, 50 ng/ml и 100 ng/ml. За определяне на оптималния преципитиращ агент са тествани три органични разтворителя (ацетонитрил, абсолютен етанол и смес от абсолютен етанол и ацетонитрил), като се добавят към пробата в различни обеми. Избрани са две съотношения проба/преципитиращ агент – еквивалентни обемни части (1:1), както и 1:2 обемни части. Най-добра преципитация на серумните белтъци, респективно най-бистър супернатант е получен при екстрагент абсолютен етанол в двукратно по-голям обем спрямо пробата.

1.2. Екстракционна процедура

Извличането на 25(ОН)D3 от супернатанта, получен след преципитацията на серумните белтъци, се извърши чрез двукратна течно-течна екстракция. Изследвана е екстракционната ефективност на три екстрагента (Е), прибавяни в различни обеми към супернатанта, съдържащ интересувания ни анализатор: дихлорметан (ДХМ), нормален хексан (п-хексан), и смес от ДХМ и п-хексан (таблица 1).

Табл. 1. Екстракционна ефективност на различните екстрагенти.

Таргетна с% 25(ОН)D3 [ng/ml]	Измерена концентрация 25(ОН)D3					
	ДХМ		п-хексан		ДХМ:п-хексан=1:1	
	Е/проба 1:1	Е/проба 1:2	Е/проба 1:1	Е/проба 1:2	Е/проба 1:1	Е/проба 1:2
25	18.92	19.40	21.05	22.55	17.20	17.56
50	35.36	43.58	48.35	51.00	37.73	39.55
100	75.58	84.25	90.51	96.30	75.84	87.76

От таблицата е видно, че най-добри резултати се получават при двукратна екстракция с п-хексан в обем на екстрагента двукратно по-голям от обема на супернатанта, съдържащ 25(ОН)D3 при време на екстракция 5 минути. Аналитичният добив за трите посочени концентрации е съответно 90.2 %, 102.2 %, 96.3 %.

За проверка на надеждността на екстракционната процедура са анализирани десет проби сборен серум с добавка на стандартни количества 25(ОН)D3 в широк концентрационен диапазон (таблица 2).

Табл. 2. Надеждност на екстракционната процедура.

№ проба	Таргетна с% 25(OH)D3 [ng/ml]	Измерена с% 25(OH)D3 [ng/ml]	Аналитичен добив (%)
1.	10	8.22	82.2
2.	20	17.85	89.3
3.	25	23.68	94.7
4.	35	32.85	93.9
5.	50	48.92	97.8
6.	65	65.92	101.4
7.	70	71.23	101.8
8.	75	73.98	98.6
9.	80	84.56	105.7
10.	100	102.10	102.1

При избраната екстракционна процедура степента на извличане варира между 82 % и 106 %, което доказва нейната високата ефективност и надеждност.

1.3. Концентриране на анализа

Концентрирането на анализа в хексановия извлек се извършва чрез изпаряване под лека струя азот до получаване на сух остатък. Сухият остатък се разтваря в 100 µl метанол за течна хроматография. Полученият концентрат се използва за хроматографския анализ.

2. ОПТИМИЗИРАНЕ НА УСЛОВИЯТА НА АНАЛИТИЧНИЯ ЕТАП (ХРОМАТОГРАФСКИ АНАЛИЗ)

Трудността при подбора на оптимални условия на хроматографския анализ се поражда от факта, че наред с интересуващите ни метаболити, при екстракцията от серума се извличат множество пречещи липофилни съединения, някои от тях с полярност много близка до тази на 25(OH)D3 и 25(OH)D2. От друга страна, пикът на 25(OH)D3 и пикът на 25(OH)D2 се

детектират при 265 nm – дължина на вълната, при която поглъщат много голям брой органични молекули. За да се преодолеят тези трудности е необходимо да се подбере подходяща неподвижна фаза за разделяне на интересуващите ни анализи, състав на подвижната фаза и температурен режим.

2.1. Хроматографска колона

Разделянето е извършено на обратнофазова хроматографска колона тип Synergy™ C18 (250 mm × 4.60 mm, 4 μm), снабдена със съответната предколона. Не са тествани други хроматографски колони, тъй като посочената по-горе колона се препоръчва от производителя като най-подходяща за анализ на липофилни съединения

2.2. Състав на подвижната фаза

При оптимизирането на параметрите на хроматографския анализ варирахме състава на подвижната фаза с цел подбор на оптимални условия за постигане на относително кратко време на анализ и добро разделяне на 25(OH)D3, 25(OH)D2 и на вътрешния стандарт от компонентите на комплексната матрица.

Тествани са единадесет различаващи се по състав подвижни фази. В процеса на работа се установи, че при нашите условия количеството на метанола е критично за оптималното разделяне на 25(OH)D3, 25(OH)D2 и на вътрешния стандарт от останалите липофилни съединения, екстрахирани от кръвния серум. Като най-подходяща избрахме подвижна фаза със състав вода, метанол, ацетонитрил в обемни съотношения 5:25:70 при скорост на потока 1,2 ml/min.

2.3. Температурен режим

Промяната в температурата е другият фактор, влияещ върху разделянето на 25(OH)D3, 25(OH)D2 и вътрешния стандарт от липофилните съединения, екстрахирани от серума. Оптимална за провеждане на хроматографското разделяне е температура на колоната $29^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.4. Детекция на анализите

Оптималната дължина на вълната, посочена в литературата за детектиране на 25(OH)D3, 25(OH)D2 и на вътрешния стандарт е 265 nm. Тази дължина на вълната е избрана за отчитане на пиковите на анализите при оптимизираните от нас условия на разделяне.

2.5. Идентификация и количествен анализ

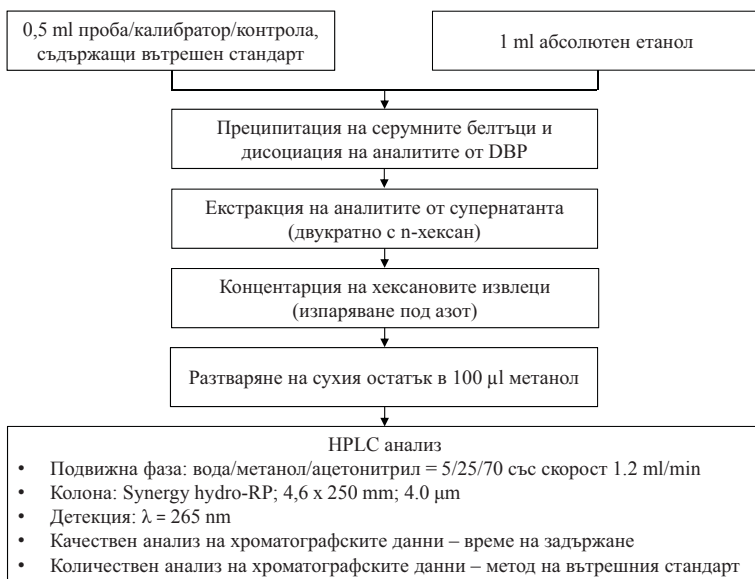
Идентификацията на 25(OH)D3, 25(OH)D2 и на вътрешния стандарт се извършва според времената им на задържане. При така опимизираните условия на хроматографския анализ те са: 8.37 min за 25(OH)D3, 9.27 min за 25(OH)D2 и 14.74 min за вътрешния стандарт. Общото време за анализ на една проба бе 22 min.

Количественият анализ е извършван по метода на вътрешната стандартизация, като за вътрешен стандарт е използван 1-алфа-хидроксивитамин-D3. Този вътрешен стандарт е подходящ, защото отговаря максимално на критериите: да не се съдържа в биологичните проби, да бъде структурно подобен на интересуващите ни анализи, да се разделя добре от тях и от матрикса на пробата в условията на анализа, да има време на задържане близко до това на 25(OH)D3 и 25(OH)D2. За да се отрази максимално добре загубата на анализите по време на преданалитичната подготовка, вътрешният стандарт в обем 20 μl и концентрация 5 $\mu\text{g/ml}$ е прибавян в началото на пробоподготовката към всяка една проба (паци-

ентска, контролна, стандартна).

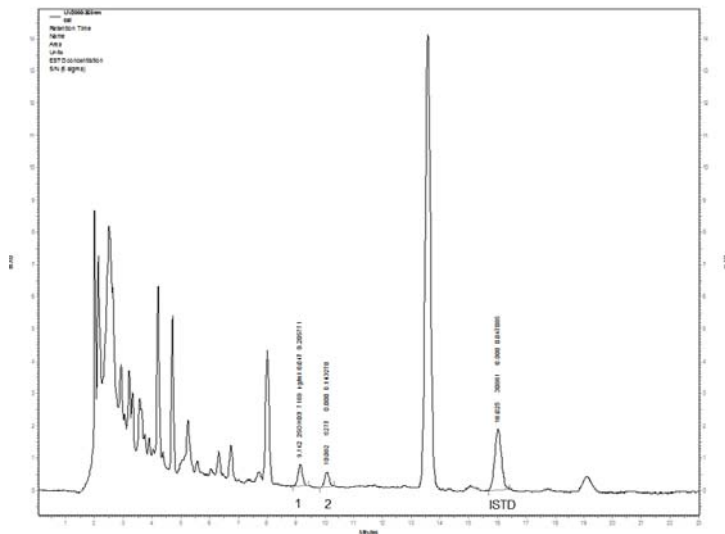
2.6. Дефинитивна аналитична процедура

В резултат на така описаната предварителна експериментална работа аналитичната процедура бе оптимизирана за нашите условия и апарат и накратко се представя на фигура 1.



Фиг. 1. Аналитична процедура за определяне на 25(OH)D3 и 25(OH)D2

С помощта на новоразработената аналитична процедура на фигура 2 е представена хроматограма на контролен серум, съдържащ 25(OH)D3 и 25(OH)D2.



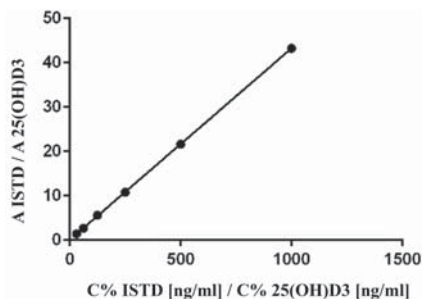
Фиг. 2. Хроматограма, получена с помощта на оптимизираната аналитична процедура. (Пик 1 – 25(OH)D3; пик 2 – 25(OH)D2; ISTD – вътрешен стандарт).

3. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АНАЛИТИЧНАТА НАДЕЖДНОСТ НА МЕТОДА

3.1. Определяне линейността на метода

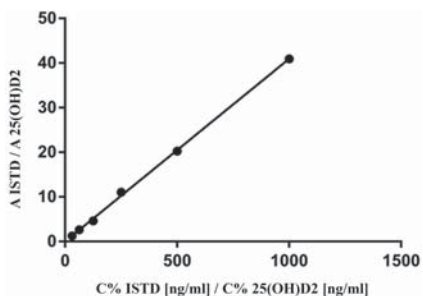
Построени са стандартни криви за 25(OH)D3 и 25(OH)D2 с използване на шест стандартни разтвора за двата анализа в диапазона от 5 ng/ml до 160 ng/ml. Концентрационният диапазон на стандартните разтвори е избран така, че да съответства на клинично значимите стойности на 25(OH)D3 и 25(OH)D2, цитирани в литературата. В деня на анализа са приготвяни биологични стандарти като определени количества от работните стандартни разтвори и от вътрешния стандарт са добавяни към 0,5 ml 6 % разтвор на човешки серумен албумин. За всяка точка от калибровъч-

ната крива са извършвани по три паралелни измервания, включващи цялата описана по-горе аналитична процедура. Графичната зависимост (фигура 3) между концентрация на 25(OH)D3 и аналитичен сигнал се описва със следното регресионно уравнение: $y = 0,04318 * x + 0,08295$, където x е добавената концентрация към избраната от нас матрица (6 % разтвор на човешки серумен албумин), а y е аналитичният сигнал. Коефициентът на корелация (r^2) е 0.9996.



Фиг. 3. Калибрационна графика на 25(OH)D3.

За същия диапазон от концентрации за 25(OH)D2 регресионното уравнение е $y = 0,04464 * x + 0,1430$, с коефициент на корелация $r^2 = 0.9988$ (фигура 4).



Фиг. 4. Калибрационна графика на 25(OH)D2.

Границата на количествено определяне (LOQ) и откриваемия мини-

мум (LOD) за 25(OH)D3 и 25(OH)D2 са определени чрез серийни разреждания на биологичния стандарт с най-ниска концентрация, използван за построяване на калибрационната крива. За двата анализа се установиха стойности на LOQ = 10 ng/ml, а на LOD = 4 ng/ml.

3.2. Възпроизводимост и аналитичен добив

За оценка на възпроизводимостта са използвани приготвени от нас биологични стандарти с концентрации, покриващи нормалната и патологична област. За да се определи възпроизводимостта на резултата бе изследвана невъзпроизводимостта на 10 паралелни проби за всяка концентрация. Резултатите са представени на таблица 3.

Табл. 3. Оценка на възпроизводимостта в серия.

ИЗСЛЕДВАН АНАЛИТ	НЕВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ
25(OH)D3 [ng/ml]	RSD (%)
12.7	8.52
25.4	6.67
50.8	4.33
100	3.52
25(OH)D2 [ng/ml]	RSD (%)
11.4	8.45
22.8	6.79
45.7	5.28
100	2.38

Възпроизводимостта от ден в ден е определена със същите биологични стандарти в рамките на 21 последователни дни. Резултатите са представени на таблица 4.

Табл. 4. Оценка на възпроизводимостта от ден в ден.

ИЗСЛЕДВАН АНАЛИТ	НЕВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ
25(OH)D3 [ng/ml]	RSD (%)
12.7	8.92
25.4	8.02
50.8	5.20
100	4.66
25(OH)D2 [ng/ml]	RSD (%)
11.4	8.72
22.8	8.01
45.7	7.53
100	4.53

Аналитичният добив за изследваните концентрации варира между 82 % и 110 % за 25(OH)D3 и 87 % и 101 % за 25(OH)D2.

3.3. Точност на метода

Точността на метода е оценявана чрез размера на относителната грешка (D %) при използване на търговски серуми за две таргетни концентрации за всеки аналит. Резултатите са сумирани в таблица 5.

Табл. 5. Относителна грешка на аналитичната процедура за определяне на 25(OH)D3 и 25(OH)D2.

25(OH)D3 [ng/ml]	D %
37	1.08
51	1.27
25(OH)D2 [ng/ml]	D (%)
28,2	1.31
45, 7	1.15

3.4. Стабилност на анализите

Стабилността на концентрираните стандартни разтвори на 25(OH)D3 и 25(OH)D2 и на вътрешния стандарт, както и на серумните проби при

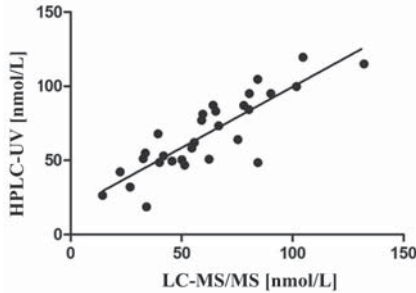
различни режими на съхранение се оцени чрез вариацията на резултата. Серумите са стабилни в рамките на 5 последователни дни при съхранение 4-8°C и 30 дни при съхранение -20°C.

4. ВЪНШНА ОЦЕНКА НА АНАЛИТИЧНАТА НАДЕЖДНОСТ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Оценяването на точността на резултатите, получени с разработения от нас метод, се осъществи и чрез включване в международна система за външна оценка на качеството на резултата от количествения анализ на 25(OH)D в кръвен серум/плазма – Vitamin D External Quality Assessment Scheme (DEQAS). От тази международна организация са ни предоставени четири серумни проби с неизвестни концентрации на 25(OH)D. За таргетните концентрации 100.1 nmol/L, 66.4 nmol/L, 47.5 nmol/L получените от нас резултати са в диапазона $\pm 1SD$ от съответната таргетна стойност. За таргетната стойност 29.2 nmol/L полученият резултат попада в интервала $+2SD$.

5. СРАВНЕНИЕ С РЕФЕРЕНТЕН LC-MS/MS МЕТОД

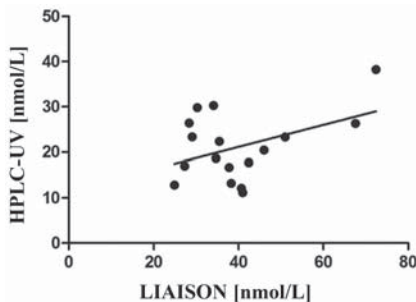
С цел оценка качеството на резултатите е проведено и междулабораторно сравнение с референтния за страната LC-MS/MS метод, използван в лабораторията по лекарствен мониторинг към Александровска болница в София. Серумни аликвоти на представителна извадка от 30 пациента се изследваха и с двата хроматографски метода за определяне на концентрацията на 25(OH)D₃, като при нито един от изследваните пациенти не се установиха детектабилни нива на 25(OH)D₂. Получените резултати се обработиха с помощта на регресионен анализ, чийто графичен израз е посочен на фигура 5. Регресионното уравнение се описва с формулата $y = 0.70 \cdot x + 5.15$, с коефициент на корелация $r^2 = 0.85$.



Фиг. 5. Сравнителен регресионен анализ на резултатите за серумни нива на 25(OH)D3, получени с HPLC-UV и ID LC-MS/MS методите.

6. СРАВНЕНИЕ С РУТИНЕН ИМУНОХИМИЧЕН МЕТОД

Общоприета практика е да се сравняват всички имунохимични методи с приетия за еталон имунохимичен метод 25OHD Liaison Total, разработен от DiaSorin. За да определим степента на съответствие на нашите резултати с тези, получени с рутинен имунохимичен метод, аликвоти от 17 пациентски серума са анализирани с HPLC-UV метода и имунохимичния метод на DiaSorin. Посредством хроматографския метод при нито един от изследваните пациенти не се установиха детектабилни нива на 25(OH)D2. Регресионното уравнение се описва с формулата $y = 0.82 \cdot x + 7.00$, с коефициент на корелация $r^2 = 0.48$ (фигура 6).



Фиг. 6. Сравнителен регресионен анализ на резултатите за серумни нива на 25(OH)D3, получени с HPLC-UV метод и имунохимичния метод на Diasorin „25(OH)D Liaison Total”.

7. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Установената в последните десетилетия „пандемия“ на витамин D дефицит, както и приложението на различни витамин D препарати при лечението му, изисква мониториране на витамин D статуса. Това налага нуждата не само от наличен, но и точен и надежден в аналитично отношение метод за определяне на 25(OH)D.

В последните 10-15 години многобройни компетитивни имунохимични методи са въведени, различаващи се помежду си по използвания свързващ агент и метода за детекция на имунния комплекс [Leino et al, 2008; de la Hunty et al, 2010]. Най-честият недостатък на тези методи е ограничената им селективност по отношение на 25(OH)D₃, 25(OH)D₂ и други полярни витамин D метаболити [Hollis, 2004]. Понастоящем имунохимичните методи са широко разпространени в рутинната лабораторна практика, поради възможността им да бъдат автоматизирани, явление осигуряващо удобство на работа и кратко време за получаване на резултатите [Wootton, 2005].

Много от недостатъците на имунохимичните методи са избегнати при директните хроматографски методи. Те измерват количествено и селективно и двата анализа 25(OH)D₂ и 25(OH)D₃, като сборът от количествата им дава представа за общото количество на 25(OH)D [Wallace et al, 2010].

Наскоро Националният институт по стандартизация и технология в САЩ (NIST) разработи LC-MS/MS метод с изотопна дилуция (ID) за определяне на серумните 25(OH)D₃ и 25(OH)D₂ нива. Използването на стабилен изотопно белязан вътрешен стандарт, идентичен с определяемия анализ, гарантира изключително висока аналитична надежност на ID LC-MS/MS метода и го определя като метод от най-висок метрологичен клас. Поради това той се предлага като референтен метод за определяне на 25(OH)D [Tai et al, 2010; Stepman et al, 2011].

В последните няколко години интересът към определяне на

25(OH)D нивата се увеличи и в България, което доведе до въвеждането на рутинните имунохимични методи в не много на брой клинични лаборатории. Хроматографски метод на базата на течна хроматография с тандем мас спектрометрия (LC-MS/MS) за определяне на 25(OH)D в България е разработен за първи път в Лабораторията по лекарствен мониторинг към Александровска болница през 2012 година под ръководството на професор Добрин Свиначков. Като вътрешен стандарт при него се използва изотопно белязан 25(OH)D. Това е и основанието той да се използва като референтен метод за нашата страна, с който да се сравняват всички останали методи.

LC-MS/MS методът изисква високотехнологично и скъпо оборудване, което не могат да си позволят много от водещите лаборатории в страната ни. За надеждното определяне на витамин D статуса се появи необходимост да се разработи и хроматографски метод, при който се използва конвенционална HPLC техника с UV детекция. В разработения от нас „in-house“ метод се използва именно такава техника. Сравнително нетрудоемката пробоподготовка, базираща се на преципитация на серумните белтъци, последвана от течна-течна екстракция на интересувания ни анализ, осигурява ефективно освобождаване 25(OH)D от свързващия го белтък и извличане от серумната проба. Единственият недостатък при тази пробоподготовка е, че са нужни 0.5 mL серум (за сравнение имунохимичните методи изискват 0.25 mL серум). Аналитичните характеристики на новоразработения метод са следните: LOQ = 10 ng/mL и за двата анализа 25(OH)D3 и 25(OH)D2, а линейността от 5 ng/mL до 160 ng/mL, покриваща клинично значимия интервал за определяне на дефицит, недостатъчност и достатъчност. Възпроизводимостта в серия и от ден в ден за клинично значимия диапазон е под 10%. Аналитичната надежност по отношение на гореизброените характеристики е в съгласие с тази на други публикувани HPLC/UV процедури [Wallace et al, 2010].

Ние сравнихме нашия HPLC с UV детекция метод с референтния за страната ID LC-MS/MS метод. Сравнението на 30 пациентски проби, съдържащи 25(OH)D в диапазона от 17.5 nmol/L до 121.25 nmol/L, показва твърде близки стойности, с много добър корелационен коефициент между двата метода ($r^2 = 0.85$).

Високата аналитична надежност на предложението от нас метод се потвърждава не само от това сравнително проучване, но и от резултатите от участието ни в международната система за оценка на аналитичното качество на количественото определяне на витамин D метаболитите (DEQAS). За всички изследвани проби нашите резултати се отклоняват от средната стойност, получена от всички методи (All-Laboratory Trimmed Mean (ALTM)), средно с $\pm 15\%$. Според DEQAS приемливото отклонение е в рамките на $\pm 25\%$. Може да се заключи, че получените от нас резултати удовлетворяват изискванията за аналитично качество, тъй като се отличават с ± 1 SD от съответните средни стойности за тестваните методи. Единствено за най-ниската таргетната стойност 29.2 nmol/L, която е близо до определяемия минимум на нашия метод, полученият резултат се отклонява с $+2$ SD. В този цикъл на DEQAS, в който участвахме ние, от общо 762 участващи лаборатории, 642 (84 %) използват различни имунохимични методи. Сред тях се откриват и такива, при които отклонението на резултатите е повече от ± 3 SD. Това е потвърждение на данните от литературата за по-високата аналитична надежност на хроматографските методи.

Удобните за рутинната лабораторна практика имунохимични методи понякога генерират резултати, различаващи се значително както при сравнението им с друг тип имунохимични методи, така и със съответните референтни хроматографски методи. Най-често имунохимичните методи за 25(OH)D се сравняват с разработения от фирмата DiaSorin метод (25(OH)D Liaison Total), приет като най-надежден [Roth et al, 2008]. Наречен е „тотал“, защото, според производителите, използваното от тях ан-

титяло свързва еднакво добре и двете форми на 25(OH)D – 25(OH)D2 и 25(OH)D3. Резултатът дава информация за общото количество 25(OH)D, без да се идентифицират двете отделни форми. Избрахме да сравним нашия метод с еталонния за имунохимичните методи 25(OH)D Liaison Total. Сравнителният анализ на резултатите от 17 пациентски серума показва приемлива корелационна зависимост ($r^2 = 0.48$). Имунохимичният метод на DiaSorin дава резултати по-високи средно със 7 %, въпреки че анализиранияте серуми съдържат само формата 25(OH)D3. Вероятно е тези различия в резултатите да се дължат на характерната за имунотехниките кръстосана реактивност и/или на матриксни ефекти.

Като обобщение нашият HPLC метод осигурява надеждно количествено определяне и на двете форми на 25(OH)D – 25(OH)D2 и 25(OH)D3. Възможността да се използват търговски серум-базирани калибратори и контроли са допълнителният гарант за намаляването на вариабилността на резултатите и осигуряването на една добра проследимост до референтния метод. Това би могло да послужи като аргумент за използването на нашия метод като арбитражен поне за случаите, когато резултатите от имунохимичните методи не съответстват на клиничните очаквания. Освен това относително краткото време за анализ дава основание да се счита, че методът може да се въведе и в рутинната лабораторна практика като алтернатива на имунохимичните методи. Високата аналитична надежност и селективност са факторите, които би трябвало да натежат при избора между традиционните имунохимични методи и хроматографските методи.

II. ВИТАМИН D СТАТУС ПРИ ПАЦИЕНТИ С HCV-ИНФЕКЦИЯ

1. ДЕМОГРАФСКИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА ПАЦИЕНТИ С HCV-ИНФЕКЦИЯ

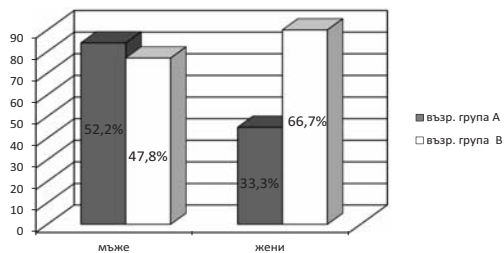
От всички пациенти с HCV-инфекция, преминали през Клиниката по Гастроентерология към УМБАЛ „Света Марина“ за периода: 01.01.2010 – 31.12.2012 година, отговаряха на критериите за включване в проучването 296 пациента. В таблица 6 са дадени основните демографски характеристики на пациентите.

Табл. 6. Разпределение на пациентите по пол.

	n (%)	Възраст в години: mean ± SD (min-max)
Общ брой	296 (100)	43.75 ± 14.72 (18–82)
Мъже	161 (54.4)	42.08 ± 14.87 (18-82)
Жени	135 (45.6)	45.72 ± 14.34 (18-71)

Разпределението по пол показва преобладаване на мъжете с около 9%. По отношение на възрастта, средната възраст на жените е по-висока с около 3.5 години в сравнение с тази на мъжете.

С цел установяване влиянието на фактора възраст, мъжете и жените се подразделиха на две допълнителни подгрупи: пациенти в млада възраст (възрастова група А: от 18 до 39 години включително) и пациенти в средна и напреднала възраст (възрастова група В: от 40 до 82 години включително). Мъжете са сравнително поравно разпределени в двете възрастови групи (52.2% за възрастова група А със средна възраст 30.54±4.77 и 47.8% за възрастова група В със средна възраст 56.04±10.17). Жените са неправилно разпределени, като само една трета от тях са във възрастова група А (33.3% със средна възраст 27.91±5.3), а две трети във възрастова група В (66.7% със средна възраст 54.58±7.14). Това разпределение е онагледено на фигура 7.



Фиг. 7. Възрастово разпределение на мъжете и жените с HCV-инфекция.

2. ГЕНОТИПНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПАЦИЕНТИТЕ С HCV-ИНФЕКЦИЯ

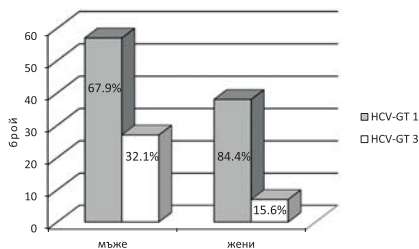
Всред изследваната извадка пациенти преобладават тези, заразени с HCV-генотип 1 – 86.5% общо за двата пола. Следващият по честота генотип е HCV-генотип 3 със средна честота за двата пола 12.1%. HCV-генотип 2 и HCV-генотип 4 са редки за българската популация. В нашето проучване само по 0.7% от изследваните пациенти са заразени с HCV-генотип 2 и HCV-генотип 4. Разпределението на генотиповете по пол е представено на таблица 7. От нея е видно, че HCV-генотип 3 е трикратно по-чест всред мъжкия пол.

Табл. 7. Генотипно разпределение на HCV-инфекция всред двата пола

Генотип	Мъже n (%)	Жени n (%)	Общо n (%)
Генотип 1	131 (81.4%)	125 (92.6%)	256 (86.5%)
Генотип 2	1 (0.6%)	1 (0.75%)	2 (0.7%)
Генотип 3	28 (17.4%)	8 (5.9%)	36 (12.1%)
Генотип 4	1 (0.6%)	1 (0.75%)	2 (0.7%)

По отношение на възрастта, във възрастова група В е представен основно HCV-генотип 1, като за всеки един от двата пола има по един пациент, заразен с: HCV-генотип 2; HCV-генотип 3 и HCV-генотип 4. Във възрастова група А освен HCV-генотип 1 е представен и HCV-генотип

3, който засяга над два пъти по-често мъжете (32,1%), отколкото жените (15,6%). HCV-генотип 3 е генотип, разпространен основно сред младите пациенти, злоупотребяващи с интравенозни наркотици. По-голямата честота на употреба на наркотици от мъжете вероятно обяснява по-високия процент на пациентите с HCV-генотип 3 в сред мъжкия пол в млада възраст (фигура 8).



Фиг. 8. Съотношение между броя на пациентите, заразени с HCV-генотип 1 и HCV-генотип 3 при мъже и жени в група А (18-39г. включително).

3. Витамин D статус при пациентите с HCV-инфекция и фактори, които го определят

На всички 296 пациенти, включени в проучването, се изследваха серумните нива на 25(OH)D с помощта на LC/MS/MS. Изследването бе извършено в лабораторията по Терапевтичен и лекарствен мониторинг към Александровска болница, МУ София. Стойността на медианата на изследваните лица е 50.40 nmol/L (25-ти перцентил: 29.6 nmol/L и 75-ти перцентил: 71.05 nmol/L). Само 18% от болните с HCV-инфекция са със стойности на 25(OH)D, показващи достатъчно насищане на организма с витамин D. За определяне на витамин D статуса сме избрали предложената от Hollis [2011] скала за степените на насищане с витамин D. Разпределението на пациентите според тази скала е посочено на таблица 8.

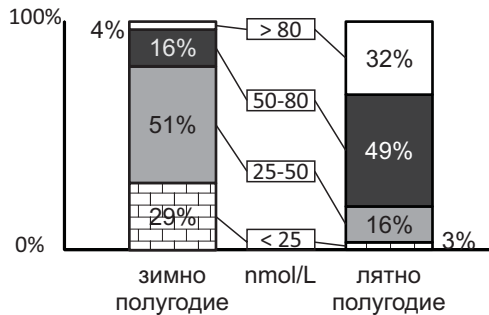
Табл. 8. Витамин D статус на пациентите с HCV-инфекция

Витамин D статус	n (%)	25(OH)D медиана (25-ти – 75-ти перцентил)
Дефицит (<25.0 nmol/L)	47 (16%)	20.40 (15.40 – 23.70) (nmol/L)
Изразена недостатъчност (25.01 – 50.0 nmol/L)	98 (33%)	35.35 (29.40 – 43.55) (nmol/L)
Недостатъчност (50.01 – 80.0 nmol/L)	98 (33%)	60.75 (55.33 – 69.80) (nmol/L)
Достатъчност (>80.01 nmol/L)	53 (18%)	93.75 (86.88 – 116.10) (nmol/L)

Болните с HCV-инфекция се характеризират с висока честота на витамин D дефицит и недостатъчност – 82 %, като 16 % от тях са с абсолютен дефицит, предопределящ и неблагоприятни процеси по отношение на костния метаболизъм (костна резорбция), а 66 % са с различна степен на недостатъчно насищане на организма с витамин D.

3.1. Сезонни вариации в нивата на 25(OH)D и честотата на витамин D недостатъчност/дефицит

Важен фактор за вариациите при определяне на серумните нива на 25(OH)D е сезонът, дължащ се на различията в интензитета и ъгъла на падане на слънчевите лъчи, достигащи до кожата, където се извършва ендегенната синтеза на витамин D.

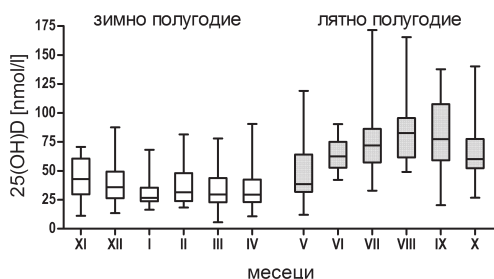


Фиг. 9. Честота на различните степени на недостатъчност и дефицит на витамин D през двете полугодия на годината.

Тъй като пациентите, включени в настоящето проучване, са събрани за тригодишен период (от януари месец 2010 година до декември 2012 година), имахме възможността да определим каква е честотата на витамин D недостатъчност и дефицит при пациентите с HCV инфекция през двете полугодия на годината (фигура 9).

През зимния период 96 % от изследваните 143-ма пациента са с нива на 25(OH)D под 80 nmol/L, като делът на тези от тях с абсолютен дефицит е 29 % (близо една трета). Те, заедно с пациентите със серумни нива на 25(OH)D между 25 nmol/L и 50 nmol/L, формират един твърде съществен дял от тази група – 80 %.

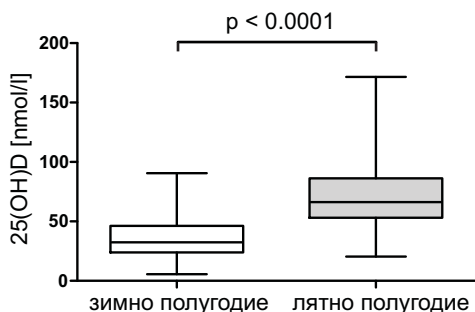
През летния период витамин D статусът на пациентите с HCV инфекция е значително по-добър. Тези с нива под оптималната стойност (80 nmol/L) представляват 68 % от всички 153-ма изследвани пациента. Само 3 % са с абсолютен дефицит, които заедно с пациентите със серумни нива на 25(OH)D между 25 nmol/L и 50 nmol/L представляват едва една пета от всички изследвани през лятното полугодие индивиди. Около половината (49 %) от тази група пациенти са със субоптимални нива между 50 nmol/L и 80 nmol/L.



Фиг. 10. Серумни нива на 25(OH)D (представени като медиана и съответния интерквартилен размах) на пациентите, групирани според месеца, през който е вземана кръвта за изследване.

На фигура 10 са представени получените резултати за серумните нива на 25(OH)D на пациентите, групирани според месеца, в който е вземана кръвта за изследване.

Очевидно е, че и при болните с HCV инфекция годишното време играе значима роля за серумните нива на 25(OH)D, като най-ниски стойности се наблюдават през месеците януари до април включително, а най-високи нива – през месеците юли до септември включително. С цел изследване на статистическата значимост на тези различия, разделихме пациентите на две групи: първа група, съставена от 143 пациенти и чиято кръв за изследване е вземана през зимното полугодие (от ноември до април включително) и втора група, съставена от 153 пациенти и чиято кръв за изследване е вземана през лятното полугодие (от май до октомври включително). Значимо по-ниски серумни нива на 25(OH)D се установиха през зимния период в сравнение с тези, определени през летния период. Стойността на медианата при първата група пациенти е 32.20 nmol/L (25-75-ти перцентил: 23.90 – 46.00 nmol/L), vs медианата, измерена при втората група пациенти: 66.40 nmol/L (25-75-ти перцентил: 53.00–86.65), $p < 0.0001$ (фигура 11).



Фиг. 11. Влияние на годишното време (зима-лято) върху стойностите на серумните нива на 25(OH)D, изразени като медиана и интерквартилен обхват.

3.2. Сезонни вариации в нивата на 25(OH)D и зависимост от пола и възрастта

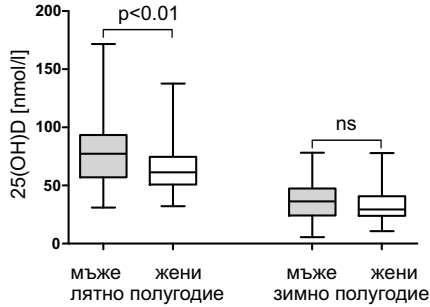
Като допълнителен фактор, който би могъл да има значение за вариациите на серумните нива на 25(OH)D, решихме да проучим влиянието и на фактора пол. Оказва се, че сред пациентите с HCV инфекция съществува статистически значима разлика между мъжете и жените ($p < 0.001$). Стойността на медианата и интерквартилният обхват при мъжете е 55.60 nmol/l (34.05 – 80.20 nmol/l), а за жените медианата 43.50 nmol/l с интерквартилен обхват от 28.10 до 63.40 nmol/l.

Проверихме дали това различие се запазва и през различните годишни полугодия. Получените резултати са сумирани в таблица 9.

Табл. 9. Влияние на сезона и пола върху серумните нива на 25(OH)D.

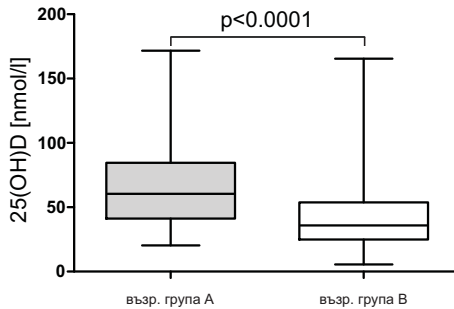
Група	n (% от 296)	25(OH)D медиана (25-ти – 75-ти перцентил)
Мъже (лятно полугодие)	88 (29.7%)	77.35 (56.98 – 93.425) (nmol/L)
Мъже (зимно полугодие)	73 (24.7%)	34.55 (23.83 – 47.30) (nmol/L)
Жени (лятно полугодие)	65 (21.9%)	61.25 (50.83 – 74.70) (nmol/L)
Жени (зимно полугодие)	70 (23.7%)	29.50 (23.95 – 44.05) (nmol/L)

И през двата годишни периода половите различия в серумните нива на 25(OH)D се запазват, като при жените стойностите за летния период са с около 21 % по-ниски в сравнение с тези при мъжете. През зимния период тази разлика намалява до около 15 %. При изследване на статистическата значимост на тези различия се установява, че през летния период разликите са значими ($p = 0.0013$), докато през зимата различията не са така значими ($p = 0.0678$). Тези тенденции се онагледяват на фигура 12.



Фиг. 12. Полови различия в серумните нива на 25(OH)D през зимното и лятно полугодие (данните са представени чрез медианата и интерквартилния размах).

При изследване на зависимостта на серумните нива на 25(OH)D от възрастта се установи, че при HCV пациентите от младата възрастова група (до 39 години) медианата е 60.50 nmol/l с интерквартилен обхват от 41.15 до 84.48 nmol/l, а при пациентите в средна и напреднала възраст (40 – 82 години) тези стойности са съответно 35.90 nmol/l и обхват от 24.90 до 53.80 nmol/l при изключително висок уroveň на значимост (фигура 13).



Фиг. 13. Серумни нива на 25(OH)D според възрастта (данните са представени чрез медианата и интерквартилния размах).

Може да заключим, че при пациенти с HCV инфекция основни фактори, определящи серумните нива на 25(OH)D, са сезонът, възрастта и пола.

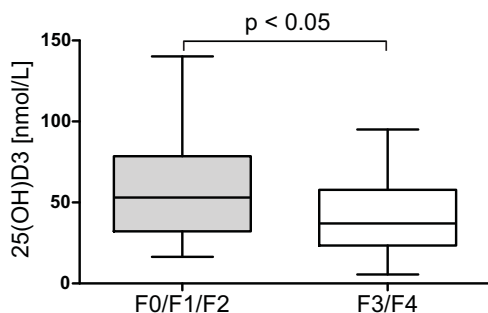
4. СЕРУМНИ НИВА НА 25(OH)D И ЧЕРНОДРОБНА ФИБРОЗА

Хистологично изследване е проведено при 155 от цялата група изследвани пациенти. Стадирането на чернодробната фиброза е направено според METAVIR системата, а разпределението на пациентите според тази класификация е дадено в таблица 10.

Табл. 10. Разпределение на HCV-пациентите с проведено хистологично изследване според стадия на чернодробна фиброза.

Общ брой – n (%)	155 (100.0%)
F0 – n (%)	17 (10.9%)
F1 – n (%)	25 (15.9%)
F2 – n (%)	40 (26.1%)
F3 – n (%)	47 (29.9%)
F4 – n (%)	26 (17.2%)

Пациентите с данни от хистологично изследване разделихме на две групи. Първата група включва всички пациенти с липсваща до умерено изразена фиброза (F0/F1/F2: n=82; 52.9%), а втората – пациентите с напреднал фибротичен процес и тези с цироза (F3/F4: n=73; 47.1%).



Фиг. 14. Стадии на фиброзния процес в черен дроб и стойности на серумните нива на 25(OH)D (F0/F1/F2 – група пациенти без и лека до умерена фиброза; F3/F4 – група пациенти с изразена фиброза и цироза; данните са представени чрез медианата и интерквартилния размах)

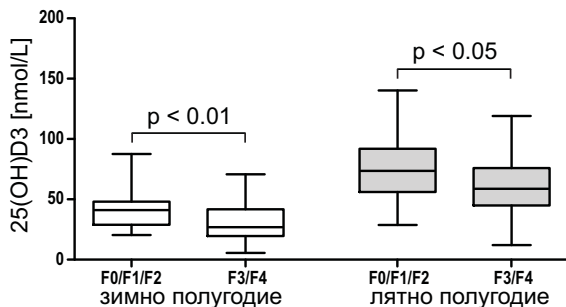
Медианата на стойностите на 25(OH)D, получени за пациентите от първа група е 53.00nmol/L (25-75 перцентил: 32.20 – 78.50nmol/L), докато медианата на стойностите на 25(OH)D за пациентите от втора група е 37.10nmol/L (25-75 перцентил: 23.40 – 57.85nmol/L). Чрез Mann-Whitney теста се установява статистически значима разлика между двете групи при уroveň на значимост $p < 0.05$ (фигура 14).

За да проверим дали тази разлика се запазва и през различните сезони, ние подразделихме тези две основни групи на две според годишното време, през което е взета кръвта за изследване. Разпределението на пациентите е посочено на таблица 11.

Табл. 11. Разпределение на пациентите според стадия на фибрознa процес и годишното време, в което е вземана кръвта за изследване.

Група	Лятно полугодие n (% от 155)	Зимно полугодие n (% от 155)
F0/F1/F2	41 (26.5%)	41 (26.5%)
F3/F4	41 (26.5%)	32 (20.5%)

Медианата на стойностите на 25(OH)D за групата F0/F1/F2 през лятното полугодие е 73.50nmol/L (25-ти – 75-ти перцентил: 56.10 – 91.90nmol/L), а през зимното полугодие е 41.10nmol/L (интерквартилен обхват: 28.90 – 48.10nmol/L). Медианата на стойностите на 25(OH)D за групата F3/F4 през лятното полугодие е 58.70nmol/L (25-ти – 75-ти перцентил: 44.90 – 75.88nmol/L), а през зимното полугодие е 26.90nmol/L (25-ти – 75-ти перцентил: 19.53 – 41.73nmol/L) (фигура 15). Чрез Kruskal-Wallis теста се установява статистически значима разлика между групите и през двете полугодия, като уroveňт на значимост е по-голям през зимното полугодие ($p < 0.01$), а през лятното е $p < 0.05$.



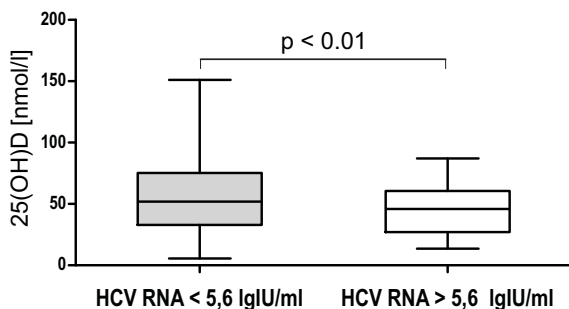
Фиг. 15. Серумни нива на 25(OH)D през лятно и зимно полугодие в двете основни групи, според стадия на фиброзния процес (данните са представени чрез медианата и интерквартилния размах).

5. СЕРУМНИ НИВА НА 25(OH)D И ВИРУСЕН ТОВАР ПРИ HCV ИНФЕКЦИЯ

Вирусният товар заема важно място измежду множеството фактори, които могат да се използват като предиктори за успешно лечение на HCV инфекцията. Колкото по-малко количество HCV РНК се открива в серума на пациентите, толкова по-големи шансове имат те за ерадикация на хепатит С вируса. В литературата се използват различни отрязващи стойности за диференциране на пациентите с нисък вирусен товар от тези с висок вирусен товар. Ние избрахме предложената от Mangia [2008] cut-off стойност от 400000IU/mL (5.6lgIU/mL), за да определим границата между нисък и висок вирусен товар.

184 (62.2%) пациенти са с нисък вирусен товар и се характеризират със значимо по-високи стойности на серумните нива на 25(OH)D (медиана: 51.90nmol/L и 25-ти – 75-ти персентилен интервал съответно: 32.90 – 75.20nmol/L). С висок вирусен товар (HCV РНК над 5.6lgIU/mL) са 112 (37.8%) пациенти, като медианата на серумните стойности на 25(OH)D в тази група е 45.85nmol/L с 25-ти – 75-ти персентилен обхват: 27.03 – 60.53 nmol/L

(фигура 16). С помощта на Mann-Whitney теста се установява, че наблюдаваното различие е статистически значимо с уровень на значимост $p < 0.01$.



Фиг. 16. Серумни нива на 25(OH)D според вирусния товар на пациентите (данните са представени чрез медианата и интерквартилния размах).

6. СЕРУМНИ НИВА НА 25(OH)D И ОТГОВОР КЪМ КОНВЕНЦИОНАЛНАТА ТЕРАПИЯ НА HCV-ИНФЕКЦИЯ.

От изследваната от нас група от 296 пациента 122 са с напълно проведен курс на конвенционална терапия, осъществена според актуалния консенсус на Българското гастроентерологично дружество и според Програмата за лечение на хронични вирусни хепатити при възрастни. Според вирусния товар в края на лечението е прието да се дефинират следните типове вирусологичен отговор:

- траен вирусологичен отговор (ТВО) или Sustained Virological Response (SVR): недоловимо равнище на HCV RNA в края на проследяването (24 седмици след преустановяване на лечението).
- липса на отговор или Nonresponse (NR) - липса на намаляване на вирусния товар с поне два десетични логаритъма на 12-та седмица от лечението;
- Relapse (Rp) - негативна HCV RNA в хода на лечението с последващ релапс и откриваем вирусен товар в периода на проследяване.

Според отговора си спрямо проведената конвенционална антивирусна

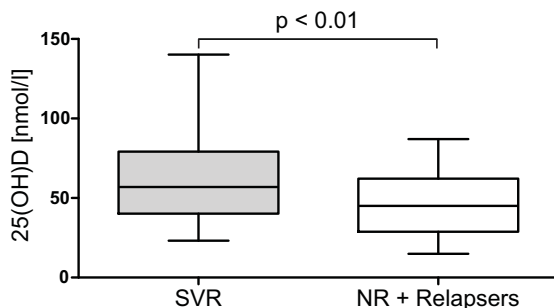
терапия изследваните от нас пациенти са разпределени както следва (таблица 12):

Табл. 12. Разпределение на лекуваните пациенти според отговора им към проведената конвенционална антивирусна терапия.

Отговор към терапията	n (%)
SVR	83 (68.0%)
NR	8 (6.6%)
Rp	31 (25.4%)
Общо	122 (100%)

Като цяло резултатът от проведеното лечение е неуспешен за 39 пациента, което представлява 32% от проследената група пациенти.

На фигура 17 се посочват серумните нива на 25(OH)D за двете групи пациенти – с постигнат траен вирусологичен отговор (SVR) и пациентите с липса на отговор или релапсери (NR + Rp). Първата група пациенти имат значимо по-високи серумни нива на 25(OH)D – медиана 56.90nmol/L с интерквартилен размах: 40.18 – 79.18nmol/L спрямо втората група пациенти – медиана 45.00nmol/L с интерквартилен размах: 28.80 – 62.15nmol/L; $p < 0.01$).



Фиг. 17. Серумни нива на 25(OH)D според отговора към конвенционалната терапия (данните са представени чрез медианата и интерквартилния размах).

7. СЕРУМНИ НИВА НА 25(OH)D И БИОХИМИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ HCV-ИНФЕКЦИЯ

От рутинните лабораторни изследвания, налични в медицинската документация на изследваните от нас пациенти, избрахме да проследим ензимите аланинаминотрансфераза (АЛАТ), аспартатаминотрансфераза (АСАТ), гамаглутамил-трансфераза (ГГТ) и основния стероид, синтезиращ се в черния дроб – холестерол. Стойностите на тези биохимични параметри за цялата изследвана група, изразени като медиана и интерквартилен размах са дадени в таблица 13.

Табл. 13. Биохимични параметри при HCV пациентите.

Параметър (мерна единица)	Референтни граници	HCV пациенти Медиана (25-ти – 75-ти перцентил)
АЛАТ (IU/L)	0 – 45	44.0 (21.0 – 94.0)
АСАТ (IU/L)	0 – 35	41.0 (23.0 – 69.0)
ГГТ (IU/L)	0 – 55	38.5 (22.0 – 77.3)
Общ холестерол (mmol/L)	2.7 – 5.2	4.18 (3.50 – 5.00)

В таблица 14 се обвързва активността на чернодробните ензими със степента на насищане с витамин D, както и със стадия на чернодробна фиброза. Както може да се види от нея, пациентите с по-добър витамин D статус (група III и група IV, т. е. 25(OH)D > 50nmol/L) се характеризират със стойности на медианата на изследваните ензими, попадащи в референтния интервал, докато тези с изразена недостатъчност и дефицит показват завишени стойности на ензимите над съответната горна референтна граница.

За да установим дали има взаимовръзка между серумните нива на 25(OH)D и активността на рутинните серумни ензими, използвани в чернодробната диагностика, осъществихме корелационен анализ на данните. При пациентите без и с ранни стадии на фиброза (F0/F1/F2) се

установи слаба отрицателна корелационна връзка (Pearson r е: -0.232 за АЛАТ, -0.278 за АСАТ и -0.236 за ГГТ; при $p < 0.05$). Подобни статистически значими взаимовръзки между серумни нива на 25(OH)D и активност на чернодробните ензими не се наблюдават при пациентите с авансирала фиброза или цироза (F3/F4). По отношение на стадия на чернодробна фиброза стойностите на чернодробните ензими варират в широки граници. Тяхната медиана остава в референтни граници в случаите на липсваща или на ранни стадии на фиброза (F0/F1/F2), докато в случаите с напреднала фиброза и цироза медианата попада извън референтния интервал (таблица 14).

Табл. 14. Връзка между активността на чернодробните ензими с витамин D статуса и стадия на чернодробна цироза.

Биохимичен параметър	Активност на ензима според витамин D статуса*	Активност на ензима според стадия на фиброза**
АЛАТ (IU/L) медиана (25-ти – 75-ти перцентил)	I: 56.00 (21.50–88.50) II: 50.50 (25.00–95.75) III: 42.00 (20.00–94.00) IV: 39.00 (17.50–93.75)	F0/F1/F2: 44.50 (18.00–94.15) F3/F4: 57.00 (25.38–119.0)
АСАТ (IU/L) медиана (25-ти – 75-ти перцентил)	I: 43.00 (27.05–88.00) II: 44.50 (25.00–71.00) III: 39.55 (22.00–57.08) IV: 31.00 (23.25–55.98)	F0/F1/F2: 37.00 (22.30–54.60) F3/F4: 54.50 (32.00–82.50)
ГГТ (IU/L) медиана (25-ти – 75-ти перцентил)	I: 64.00 (26.00–129.3) II: 44.00 (26.00–91.00) III: 35.00 (19.00–58.00) IV: 31.50 (21.00–60.25)	F0/F1/F2: 39.00 (22.00–81.00) F3/F4: 46.50 (25.50–100.0)

*: гр. I – пациенти с нива на 25(OH)D под 25.00 nmol/L; гр. II – пациенти с нива на 25(OH)D между 25.01 и 50.00 nmol/L; гр. III – пациенти с нива на 25(OH)D между 50.01 и 80.00 nmol/L и гр. IV – пациенти с нива на 25(OH)D над 80.01 nmol/L;

** : F0/F1/F2 – липсваща и ранни стадии на фиброза; F3/F4 – напреднал стадий на фиброза и цироза.

8. ОБСЪЖДАНЕ

HCV инфекцията е водеща причина за хроничните чернодробни заболявания и се очертава като съществен проблем за общественото здравеопазване, засягайки до 3% (170 милиона) от човешката популация [Shepard, 2005]. Тази вирусна инфекция е най-честото живото-застрашаващо хронично инфекциозно заболяване в САЩ. Според доклад на ИОМ от 2010 година между 2.7×10^6 и 3.9×10^6 човека са инфектирани с HCV, като 75% от тях не знаят, че са вирусноносителите [ИОМ, National Academics Press, 2010]. Поради тази причина HCV-инфекция се определя съвсем удачно като „тихата епидемия“ [Turkington, 1998]. За България честотата на HCV инфекцията възлиза на 1.1% (0.3 – 2.4%) [Gower et al, 2014]. Счита се, че без лечение, почти половината от инфектираните болни ще достигнат до цироза в следващите 20 години, а около 14000 случая на хепатоцелуларен карцином, дължащ се на HCV-инфекция, ще се наблюдават през 2019 година – годината, която се смята за пикова по отношение на усложненията от HCV-инфекция [Davis G, 2010]. Възможността болестта да прогресира до цироза значително се намалява, ако при лечение на заболяването се достигне до успешен край, т.е. не се детектира HCV-RNA за период по-дълъг от 6 месеца след приключването на терапията [Pradat, 2007]. Прилаганата стандартна терапия на HCV инфекцията с пегилиран интерферон и рибавирин води до ерадикация на вируса до около 40 %. Нова група медикаменти (директни протеазни инхибитори на HCV като боцепревир и телапревир) са въведени напоследък [Jacobson, 2011; Poordad, 2011]. При пациенти с генотип 1, които се подават по-трудно на лечение, тройната антивирусна терапия води до постигане на траен вирусологичен отговор в по-голям процент. Но често наблюдаваните ниска толерантност и неблагоприятни междулекарствени взаимодействия вероятно ще ограничат използването на тази комбинация до избрани групи

от пациенти [Tungol, 2011].

През последното десетилетие в множество публикации се установява, че витамин D недостатъчност и дефицит се срещат с висока честота сред пациентите с хронични чернодробни заболявания, независимо от тяхната етиология [Fisher and Fisher, 2007; Malham 2011; Rode, 2010], като през последните години вниманието се насочи конкретно към HCV инфекцията. Лансира се идеята, че подобряването на витамин D статуса може да повлияе благоприятно клиничния изход и отговора към терапията на пациентите с хронична хепатит С инфекция.

8.1. Честота на Витамин D дефицит и недостатъчност при пациентите с HCV инфекция

Епидемиологичните изследвания показват, че повечето пациенти с хронична хепатит С вирусна инфекция са с лош витамин D статус [Bitetto, 2011], като в различните проучвания се установява твърде различна честота на витамин D недостатъчност/дефицит при пациенти с хронична HCV инфекция, варираща между 51% и 92% [Cholongitas, 2012]. Освен традиционните фактори, определящи различията в честота на витамин D дефицит като сезон, географска ширина, расова принадлежност, друга възможна причина за флукутиращата в толкова широки граници честота е, че за дефиниране на достатъчното насищане на организма с витамин D се приемат различни долни граници на серумните нива на 25(OH)D, простиращи се в диапазона между 50 – 80nmol/L [Fisher and Fisher, 2007; Arteh et al, 2010; George et al, 2009; Miroliaee et al, 2010]. Друг определящ фактор за значимите различия в наблюдаваната честота на витамин D дефицит/недостатъчност би могла да се дължи и на метода, с който се определя 25(OH)D. В нашето проучване нивата на 25(OH)D са определени с метод с много висока аналитична надежност, а за cut-off стойност ние приемаме предложената през 2011-та година от Hollis стойност от 80nmol/L,

над която се счита, че индивидите са в състояние на добро насищане с витамин D, гарантиращо оптимално здраве. При така избраната отрязваща стойност ние установихме, че 82% от изследваните 296 пациента с хронична хепатит С инфекция са с различна степен на недостатъчност или дефицит на витамин D. При това този процент нараства през зимния период и почти доближава стоте процента (96%). Поради ретроспективния характер на проучването ние нямахме възможност да съотнесем тези резултати към контролна група здрави индивиди. Въпреки това можем да направим едно косвено сравнение с резултатите, получени през зимата на 2012-та година, от първото за България мащабно проучване за витамин D статуса на здрави индивиди. Основание за това ни дава и фактът, че нивата на 25(OH)D в серумите на индивидите от тази популационна извадка са определени със същия метод и в същата лаборатория, където са получени и нашите резултати. Установената от колектива на проф. Ана-Мария Борисова честота на витамин D дефицит и недостатъчност всред българската популация за зимния период е твърде висока – 75,8% от изследваните лица имат нива на 25(OH)D по-ниски от 50nmol/l (това е приетата от тях отрязваща стойност), а 21,3% от тях са в състояние на витамин D дефицит (т.е. нивата на 25(OH)D са под 25nmol/L). За сравнение с тези резултати ние можем да използваме част от нашите данни, а именно тези, получени през зимното полугодие. Резултатите са обобщени на таблица 15.

Таблица 15. Честота на витамин D дефицит и недостатъчност през зимното полугодие при здрави индивиди и пациенти с HCV инфекция.

25(OH)D	Здрава популация	HCV пациенти
< 25 nmol/L	21,3 %	29 %
< 50 nmol/L	75,8 %	80 %

Въпреки изключително високата честота на дефицит и изразена недостатъчност на витамин D всред здравото българско население (през зимния период), все пак се вижда тенденцията тези състояния да са с по-голяма

честота всред пациентите с HCV инфекция. Възможни причини за това биха могли да бъдат директни или индиректни ефекти на HCV върху метаболизма на витамин D. В някои проучвания например се изказва хипотезата, че индуцираните от HCV разнообразие от цитокини и оксидативен стрес биха могли да повлияят негативно на хидроксилирането на 25-та позиция в черен дроб [Ramos-Lopez et al, 2008; Bellecave et al, 2010] или пък чрез промени в липидния метаболизъм вирусът да доведе до намалена продукция на 7-дехидрохолестерол, който е непосредствения прекурсор при ендогенната синтеза на витамин D [Clark et al, 2012].

Интересно е обаче да се подчертае, че честотата на витамин D дефицит и недостатъчност всред пациентите с HCV инфекция е коренно различна през лятното полугодие – 68% от болните са с нива на 25(OH)D под 80nmol/L, вместо наблюдаваните 96% през зимното. Процентът на пациентите с абсолютен дефицит (нива на 25(OH)D под 25nmol/L) спада почти десетократно – от 29% на 3% през летния период. Тези, попадащи в групата на тежка недостатъчност (нива на 25(OH)D между 25nmol/L и 50nmol/L) пък спадат от 51% на 16% (3,5 пъти). Изследваните две групи пациенти през двете различни полугодия на годината са хетерогенни по отношение на пол, възраст, тежест и стадий на чернодробното заболяване, но те не се различават значимо помежду си според тези фактори. Единственото различие е сезонът, в който е взета кръвта за определяне на 25(OH)D. Така би могло да се изкаже и друга хипотеза, а именно че болните с HCV инфекция не са с намалена възможност за ендогенна синтеза на витамин D. Такава хипотеза обаче може категорично да се приеме или отхвърли единствено, когато се изследват серумните нива на 25(OH)D в динамика при всеки един отделен индивид през различните сезони в рамките на едно проспективно проучване, нещо което не беше възможно за осъществяване при условията на представеното от нас ретроспективно проучване.

В проучванията за витамин D статуса на пациентите с хронична хе-

патит С инфекция обикновено не се разглежда въпросът за влиянието на пола върху стойностите на серумните нива на 25(OH)D. В нашето проучване се доказаха статистически значими различия между серумните нива на 25(OH)D при мъжете и жените, независимо от сезона и възрастта им ($p < 0.05$). Тези наши резултати са в унисон с единственото за страната ни изследване на витамин D статуса на здрава популация, в сред която също се установява статистическо значимо различие в нивата на 25(OH)D между двата пола [Borissova et al, 2013]. В своето проучване, макар и отнасящо се до туберкулозна инфекция, Wingfield и съавтори [2014] също откриват статистически значими различия по отношение на витамин D статуса между двата пола, $p < 0.001$. Тези различия авторите се опитват да обяснят с генетични предиспозиции, хранителни навици и време, прекарано навън със съответната увеличена възможност за ендогенна синтеза на витамин D под действие на слънчевата радиация. Установеното полово различие е важен факт, защото в международните ръководства, даващи указания за суплементиране с витамин D по принцип не се прави разлика между половете, с изключение на периодите по време на бременност или кърмене.

8.2. Взаимовръзка между витамин D статуса на пациенти с HCV инфекция и различните характеристики на заболяването.

8.2.1. Фиброза

HCV инфекцията предизвиква широк спектър от заболявания: от остра (спонтанно ограничаваща се инфекция) до хроничен хепатит, развитие на цироза и усложнения на цирозата – чернодробна недостатъчност и хепатоцелуларен карцином. При 50% до 85% (средно 70%) от заразените се наблюдава хронифициране на HCV инфекцията, като средно в 25% от тях ще се формира цироза в рамките на до 20 години след началото на инфекцията. Самоподдържащият се с помощта на разнообразие от цитокини и

особен профил на Т лимфоцити некроинфламаторен процес би могъл да стои в основата на често наблюдаваната и прогресираща фиброгенеза при болните с HCV инфекция.

Поради тези факти задълбочено се проучват различни фактори, които предопределят хода на фиброзния процес. Едни от тях са конститутивни (напр. полиморфизма в гените за IL-10, IL28B, IFN-g, TNF-a, VDR, ESR-1, IFN-стимулиращите гени – MxA, PKR и OAS1) и могат да се използват като предиктори за отговора към терапията, развитието на усложненията и смъртността от HCV инфекцията.

Важно е обаче да се открият онези фактори, които биха могли да се променят и с чиято помощ да се насочи в благоприятна посока естественият ход на инфекцията. В последните години започнаха интензивни проучвания за витамин D като един от възможните такива „модифициращи фактори“. Често се обсъжда връзката между влошения витамин D статус и фиброзния процес при пациенти с хронична хепатит С инфекция. Способността на витамин D да модулира адаптивната имунна система може да обясни връзката между витамин D дефицит или недостатъчност и риска от фиброзни промени при хроничната хепатит С инфекция. Счита се за доказано, че активирането на наивни Т клетки е витамин D зависим процес [Hayes et al, 2015]. Освен това, витамин D инхибира развитието на Th-1 субтипове, отговорни за секрецията на проинфламаторните цитокини IL-2 и INFg и Th-9 и увеличава броя на Th-2 клетки, отговорни за секрецията на антиинфламаторните цитокини IL-4, 5 и 10. В допълнение витамин D потиска синтезата и секрецията на IL-6 и IL-23 от дендритни клетки, което предотвратява развитието на клетки от субклас Th-17 и се предизвиква диференциация и увеличаване броя на регулаторните Т-клетки, секретирани антиинфламаторните цитокини IL-10 и TGF- β [Sundaram and Coleman, 2012].

Като много важен запускащ фактор за акумулирането на екстрацелуларен матрикс, фиброгенеза и в крайна сметка цироза се посочва и процесът на апоптоза на хепатоцитите. Съществуват изследвания, които демонстрират ролята на витамин D като антиапоптотичен фактор за хепатоцити при миши модел на NAFLD – неалкохолна стеатозна болест на черния дроб [Nakano, 2011]. Така би могло да се заключи, че ниски серумни нива на витамин D представляват „профиброгенен“ фактор и могат да допринесат за прогресията на хистологичните промени при HCV инфекция, поради по-слабата възможност за осъществяване на хепатоцитна апоптоза.

Освен в *in vitro* изследвания и животински модели съществуват и клинични проучвания, изследващи ролята на витамин D за фиброзния процес при хроничната хепатит С инфекция. При ретроспективно проучена кохорта от 197 пациенти, заразени с генотип 1 на HCV, Petta и съв. [2010] установяват значителна тенденция за намаляване на серумните нива на 25(OH)D с прогресиране на болестта. Според тях ниските серумни нива на 25(OH)D са независимо свързани с напредналите стадии на фиброза. Други автори посочват не само ниските нива на 25(OH)D, но и полиморфизма на гена за VDR (като фактор, определящ генетичната предразположеност), водещи до различна скорост на прогресия на фиброзния процес при различните пациенти с хронична хепатит С инфекция. Твърди се, че ниски серумни нива на 25(OH)D определят значително по-голяма скорост на прогресия на фиброзата [Baur et al, 2012]. В противовес съществуват и публикации, при които не се откриват подобни взаимовръзки. Така например Kastens и сътрудници не откриват връзка между степента на чернодробна фиброза и серумните нива на 25(OH)D при 157 пациенти, инфектирани с различни генотипове на HCV [Kastens et al, 2011], а Stauber и съв. [2011] съобщават незначима разлика в нивата на 25(OH)D при 179 пациенти, заразени с генотип 1/4 на HCV и с етап на фиброзния процес

F0/F1/F2 в сравнение с тези, намиращи се в стадий F3/F4.

Резултатите от нашето проучване по отношение на взаимовръзката между фиброзата и витамин D статуса са в съгласие с първата група автори [Petta et al, 2010; Baur et al, 2012]. В групата с напреднала фиброза открихме статистически значимо по-ниски серумни нива на 25(OH)D в сравнение с тези, които се намират в началните фази на фиброзния процес. Доколкото ни е известно има няколко проучвания в литературата, при които се отчитат и обсъждат сезонните вариации в статуса на витамин D и ефекта им при пациентите с HCV инфекция. В изследването си Vitetto и съавт. [2011] идентифицират възрастта над 50 години, по-напредналия хистологичен стадий на фиброза, както и сезона (зима или лято), през който е взета кръвната проба на пациенти с HCV инфекция, като независими предиктори за ниски серумни нива на 25(OH)D. Нашите резултати също доказват значими сезонни вариации в серумни нива на 25(OH)D както за цялата изследвана група, така и за подгрупите, характеризиращи се с различни стадии на чернодробната фиброза. Нашата предварителна нагласа беше, че при случаите с напреднала фиброза ще открием много ниски серумни нива на 25(OH)D не само през зимата, но и през лятото, заради дълбоко увредената функция на черен дроб и силно намалената възможност за специфични биосинтезни процеси, включително и хидроксилирането на витамин D на 25-та позиция. Изненадващото за нас наблюдение беше, че обратно на нашите очаквания, медианата на стойностите за 25(OH)D, получени в групата с напреднала фиброза и цироза през лятното полугодие, е повишена двукратно. Разликата в стойностите за 25(OH)D в тази група, получени през различните полугодия, е статистически значима. Вследствие на тези резултати е много изкушаващо да се заключи, че възможността за синтез на 25(OH)D в черен дроб, дори когато той е дълбоко засегнат от фиброзния процес, е все още запазена,

стига да има достатъчно субстрат за това (например ендогенно синтезиран витамин D под въздействие на слънчевата радиация). Разбира се, че трябва да се отчете фактът, че поради ретроспективния характер на нашето изследване серумните нива на 25(OH)D са измерени еднократно. Липсваше възможност да проследим конкретно за всеки един пациент в каква степен варират стойностите през различните сезони. Това ни пречка да направим категоричното заключение, че всички пациенти с напреднал стадий на фиброзния процес запазват способността си да синтезират 25(OH)D. И все пак това е една крачка напред при изясняването на въпроса кой е обуславящият фактор – дали тежестта на дефицита стои в основата на по-тежкия ход и ускорена фиброза при хроничната хепатит С инфекция (доказателства, за което се откриват в *in vitro* изследванията и тези с експериментални животни) или хроничното чернодробно заболяване е предопределящият фактор за наблюдавания витамин D дефицит или недостатъчност.

8.2.2. Вирусен товар

По отношение на противовъзпалителните и антивирусни ефекти на витамин D може да се предположи, че витамин D дефицит или недостатъчност могат да влошат отговора на организма срещу HCV инвазия. Така например в условията на клетъчна култура от Huh-7.5 клетки (получени от хепатоцелуларен карцином) Yano и съавтори [2007] доказват ролята на екзогенен витамин D2 срещу HCV и го посочват като потенциален кандидат за засилване ефекта от лечението с интерферон. Gutierrez и съавтори [2010] установяват също в клетъчна култура, че витамин D3 усилва експресията на VDR протеина и инхибира вирусната репликация. След тези публикации се появяват още няколко *in vitro* проучвания, при които също се демонстрира ролята на витамин D за потискането на HCV репликацията и то по дозозависим начин [Gal-Tanamy et al, 2011; Matsumura et al, 2012].

В подкрепа на всички тези *in vitro* проучвания са и резултатите от нашето проучване. При изследване на нивата на HCV RNA ние установяваме обратна взаимозависимост между вирусния товар и степента на наситеност с витамин D. Благоприятното антивирусно въздействие на витамин D би могло да се обясни с неговите имуномодулиращи ефекти в резултат на прякото му действие върху антиген-представящите клетки и Т-лимфоцитните субпопулации. Витамин D дефицитът или недостатъчност водят до активиране на Th-1 клетки, намаляване на броя на Th-2 клетки, с което се благоприятства автоимунния Th-1 отговор. Този по същество противовъзпалителен отговор нарушава интерфероновата сигнализация и потиска отговора на хазяина срещу HCV инвазия [van Etten and Mathieu, 2005; Parravicini and Caserta, 2010].

8.2.3. Отговор към конвенционалната терапия на HCV инфекция.

Различни изследвания се провеждат с цел да се установят фактори от страна на HCV и/или от страна на гостоприемника, които биха могли да се използват като предиктори за постигане на траен вирусологичен отговор (SVR). Имунологичният статус на пациентите е един от тези фактори и е важен по отношение на техния отговор спрямо антивирусната терапия. Така например в няколко публикации се установява, че при пациенти с доминиращ Th-2 профил лечението с интерферон е по-ефективно. При проучване със 120 пациента с хронична HCV инфекция (генотип 1) се установява че отношение Th-1/Th-2 \leq 15.5 може да се използва като предиктор за достигане на SVR (odds ratio = 9.6) [Shirakawa, 2008]. Имуномодулаторната роля на витамин D е широко дискутирана, като в немалък брой публикации се доказва, че витамин D суплементирането води до потискане на Th-1 и стимулиране на Th-2 клетки, с което би могло да се повлияе в положителен аспект на конвенционалната антивирусна терапия.

В литературата съществуват противоречиви данни за връзката между изходните нива 25(OH)D и постигането на SVR. В няколко проучвания

не са доказва връзка между витамин D дефицит и постигането на ефект от терапията [Stauber et al, 2011; Jazwinski et al, 2011]. Повечето от проучванията обаче подкрепят тезата за благоприятния ефект на витамин D върху терапевтичните резултати при пациентите с хронична хепатит С инфекция. Petta и сътр. [2010] установяват, че ниските серумни нива на 25(OH)D представляват независим отрицателен предиктор за постигане на SVR. Bitetto и съавт. [2011] съобщават, че инфекцията с HCV и генотип, различни от генотип 1, и серумни нива на 25(OH)D > 50 nmol/L са независими положителни предиктори за постигане на SVR, като при това изходът от лечението е тясно свързан и със степента на витамин D дефицит или недостатъчност. Тежният дефицит на 25(OH)D (< 25 nmol/L) води до почти нулев SVR, а при базални стойности (преди започване на анти-вирусна терапия) на 25(OH)D > 50 nmol/L, SVR се постига в почти половината от случаите [Bitetto et al, 2011]. В съответствие с последно посочените данни от литературата ние установихме, че пациентите, постигнали SVR, са със значимо по-високи серумни нива на 25(OH)D, докато всички неотговорили на терапията или „релапсери“ се характеризират с по-лош витамин D статус. Може да се предположи, че витамин D усилва ефектите на интерферона, благодарение на имуномодулаторните си ефекти. Липсата на данни за променливите, участващи в метаболизма на витамин D и неговия сигнален път (например полиморфизми на витамин D хидроксилиращите ензими и VDR), както и други параметри, като IL-28B предотврати възможността за по-прецизно тълкуване на нашите резултати.

8.2.4. Рутинни лабораторни параметри при HCV инфекция

Малко съобщения има, в които се обсъждат възможните взаимоотношения между ниските серумни нива на 25(OH)D и рутинните лабораторни параметри, използвани при изследване на чернодробна функция при пациенти с HCV инфекция. Petta и съавтори [2010] показват, че ниските серумни нива на 25(OH)D заедно с високи изходни стойности на ALT,

GGT и феритин, нисък холестерол, нисък брой на тромбоцитите, стеатоза, висока некроинфламационна активност, напреднала възраст и мъжкият пол са значимо свързани с тежка фиброза. Ваг и съавт. [2012] установяват, че ниските нива на 25(OH)D и високите нива на АЛАТ в серума са значимо свързани с неблагоприятния VDR Bat [CCA]-хаплотип, като дори само ниските серумни нива на 25(OH)D в съчетание с VDR Bat [CCA]-хаплотипа, определят значим допълнителен ефект върху скоростта на прогресия на фиброзата в черния дроб при пациенти с хроничен хепатит С. В контекста на тези изследвания нашите данни показват, че при случаите с ранен стадий на чернодробна фиброза и с по-добър витамин D статус се наблюдават по-ниски серумни нива на AST, ALT и GGT, което вероятно се дължи на протективните ефекти на витамин D върху чернодробните клетки и подобрения имунен отговор на гостоприемника. При напреднала чернодробна фиброза такава взаимовръзка не се наблюдава.

9. ОБОБЩЕНИЕ НА ОБСЪЖДАНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

Основното предимство на настоящото проучване е, че за количественото определяне на нивата на 25(OH)D се използва сертифициран от DEQAS LC-MS/MS метод. Поради високото им ниво на специфичност, чувствителност, надеждност, ниска вътрелабораторна вариация, нисък праг на откриваемост, LC-MS/MS методите би трябвало да са предпочитаните методи за анализ на нивата на 25(OH)D в кръвна плазма или серум. Точността и верността на нашите резултати са гарантирани от участието ни във външна система за оценка на качеството (DEQAS).

Това е първото системно проучване за витамин D статуса на пациенти с хронична хепатит С инфекция в България. То доказва, че витамин D дефицитът и недостатъчността се наблюдават с изключително висока честота сред тази група пациенти. Нашите резултати разкриват и значимата

обратна връзка между серумните нива на 25(OH)D и вирусния товар, стадия на чернодробна фиброза, както и отговора към лечението. Би могло да се заключи, че витамин D има потенциал да подобри защитата на организма срещу HCV инфекцията, да подпомогне стандартната антивирусна терапия за постигане на ерадикация на вируса, както и да забави или ограничи фиброзния процес в чернодробната тъкан като едно от тежките усложнения на тази хронична инфекция.

Следователно мониторирането на витамин D статуса на пациенти с хронична хепатит С инфекция, както и възможността за вземане на решение за суплементиране с витамин D на тези от тях, които се оказват с ниски изходни стойности на 25(OH)D в началото на тяхното проследяване, биха били едно допълнително средство в рамките на усилията за подобряване на грижите за тези болни и резултатите от прилаганата конвенционална терапия.

III. ВИТАМИН D СТАТУС ПРИ ПАЦИЕНТИ С ПРОСТАТЕН КАРЦИНОМ.

1. ОСНОВНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА ПАЦИЕНТИ

На критериите за включване в настоящето проучване отговарят общо 53-ма мъже на възраст между 53 и 86 години, преминали през Клиниката по Урология към УМБАЛ „Света Марина“ през периода Март – Октомври (2012 година) със съмнение за наличен простатен карцином (PCa), поради повишени нива на простатспецифичен антиген (PSA) и/или абнормни резултати от дигиталното ректално изследване (ДРИ). На всеки един пациент е проведена систематична „tru-cut“ биопсия на простатата с вземане най-малко на 10 биопсични цилиндъра от различни зони на прос-

татната жлеза по предварително определен протокол и под трансректален ехографски контрол. В зависимост от резултата от хистологичното и/или цитологично изследване е поставена окончателната диагноза, според която пациентите са разпределени в две групи. Двадесет и осем пациента (52.83 %) съставят групата на пациентите с доброкачествена простатна хиперплазия (ВРН), а двадесет и пет (47.17 %) – групата на пациенти с рак на простатната жлеза. В таблица 16 са представени възрастовите характеристики на пациентите, включени в изследването.

Табл. 16. Разпределение на пациентите по възраст и заболяване, засягащо простатната жлеза.

	PCa	ВРН	Общо
Възрастов обхват (мин. – макс. в години)	57 – 86	53 – 84	53 – 86
Средна възраст ± SD (в години)	68.04 ± 7.07	66.00 ± 7.18	67.00 ± 7.10
Възrastова група, n (%):			
≤ 69 години	14 (56.00%)	17 (60.71%)	31 (58.49%)
> 69 години	11 (44.00%)	11 (39.29%)	22 (41.51%)

По фактора възраст двете изследвани групи не се различават статистически помежду си ($p = 0,49$).

Общозвестен факт е, че сезонът, през който се взема кръвта за определяне на серумни нива на 25(OH)D, е съществен фактор, повлияващ крайния резултат [Wacker and Holick, 2013]. Тъй като осеммесечният период, през който са събирани пациентите за включване в изследването, обхваща три сезона, в два от които (лято и ранна есен) се осъществява доказано по-усилена ендогенна синтеза на витамин D, ние подразделихме пациентите в две подгрупи – първата подгрупа пациенти са изследвани за определяне на витамин D статуса им през пролетта (месеците март – юни), а втората подгрупа пациенти са изследвани през лятно-есения период, обхващащ месеците юли – октомври, и обозначен от нас като лято.

Поради липофилния характер на 25(OH)D, съществува възможност той да се поема от мастната тъкан особено при индивиди с повишен ВМІ. Поради тази причина се счита, че степента на затлъстяване е фактор, водещ до вариации в серумните нива на 25(OH)D. Пациентите от двете групи (РСа и ВРН) бяха сравнени помежду си и в зависимост от тези два допълнителни фактора. (таблица 17).

Табл. 17. Разпределение на пациентите според индекса им на телесна маса (ВМІ) и сезона на вземане на биологичната проба.

	РСа	ВРН	Общо
ВМІ, n (%):			
≤ 25	12 (48.00%)	13 (46.43%)	25 (47.17%)
> 25	13 (52.00%)	15 (53.57%)	28 (52.83%)
Сезон, n (%):			
Пролет (Март – Юни)	13 (52.00%)	14 (50.00%)	27 (50.94%)
Лято (Юли – Октомври)	12 (48.00%)	14 (50.00%)	26 (49.06%)

Резултатите от статистическия анализ показват, че изследваните групи не се различават помежду според ВМІ ($p = 0.74$), а от таблица 17 се вижда, че пациентите от двете групи са равномерно разпределени според сезона, през който са изследвани.

Липсата на статистически значими различия по възраст и ВМІ, както и равномерното разпределение на пациентите според сезона, през който е вземана кръвта за изследване, ни даде основание да разгледаме групата с доброкачествено засягане на простатната жлеза като контролна, спрямо която да сравняваме резултатите, получени за групата със злокачествено засягане на простатната жлеза.

2. ОСНОВНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА РСА ПАЦИЕНТИТЕ

След хистологичното установяване на простатен карцином, всеки един пациент беше стадиран според Седмата ревизия на TNM-класификацията на малигнените тумори от 2010 година. Установи се, че повечето от паци-

ентите (21 на брой или 84 % от тази група) са с локализиран карцином, а само 4 пациента (16 %) са в напреднал стадий на заболяването.

Всеки един установен хистологично карцином беше оценен и посредством скалата на Gleason, даваща цифрова оценка на степента на диференциация на простатния карцином: високодиференциран (сбор по Gleason: 2 - 6), умеренодиференциран (сбор по Gleason: 7) и нискодиференциран (сбор по Gleason: 8 - 10). Разпределението на пациентите според оценката им по Gleason е посочено в таблица 18.

Табл. 18. Категорийно разпределение на пациентите според оценката по Gleason.

Оценка по Gleason	n (%)
2 - 6	13 (52 %)
7	7 (28 %)
8 - 10	5 (20 %)

За целите на сравнителния анализ групирахме пациентите в две подгрупи, като в първата подгрупа (Gleason grade < 7) се включиха тринадесетте пациента с високодиференциран карцином (представляващи 52 % от цялата РСa групата), а във втората подгрупа обединихме пациентите с умеренодиференциран карцином и тези с ниска степен на диференциация (Gleason grade ≥ 7) – общо дванадесет пациента, представляващи 48 % от РСa групата.

3. ВИТАМИН D СТАТУС ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С ХРОНИЧНО ЗАБОЛЯВАНЕ НА ПРОСТАТНАТА ЖЛЕЗА

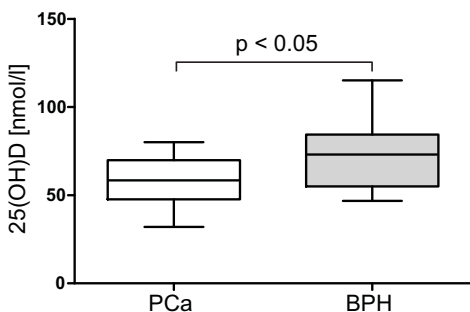
3.1. Честота на витамин D дефицит/недостатъчност

На всички 53-ма пациенти, включени в проучването, са изследвани серумните нива на 25(OH)D с помощта на разработения от нас HPLC метод. При анализа на индивидуалните стойности на изследваните паци-

ентите от цялата изследвана кохорта не се откриха такива с абсолютен витамин D дефицит (т.е. със серумни нива на 25(OH)D < 25.00 nmol/L). Тридесет и осем от тях (71.7 %) са със субоптимални нива на 25(OH)D < 80.00 nmol/L. В групата с простатен карцином тази честота е по-голяма (80 %) в сравнение с честотата на витамин D недостатъчност всред групата с доброкачествено засягане на простатната жлеза (64.3 %).

3.2. Степени на витамин D недостатъчност

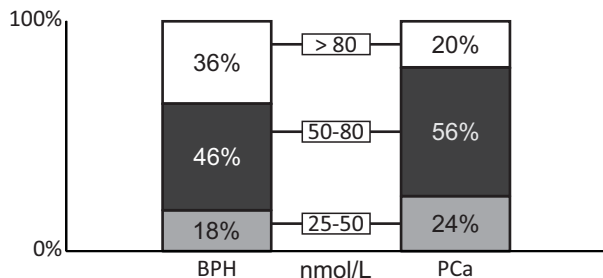
Медианата на серумните нива на 25(OH)D и съответният ѝ интерквартилен обхват за цялата кохорта за целия изследван период е 63.65 nmol/L (50.94 nmol/L – 76.66 nmol/L), като се наблюдава статистически значимо различие между РСa пациентите и тези с ВРН (фигура 18).



Фиг. 18. Сравнение на серумните нива на 25(OH)D за пациентите с простатен карцином (PCa) и с доброкачествена хиперплазия на простатата (BPH). Медианата, както и интерквартилният ѝ обхват за първата група е 58.36 nmol/L (47.65 nmol/L – 69.88 nmol/L), а за втората – 73.01 nmol/L (54.94 nmol/L – 84.34 nmol/L).

Разпределението на всички изследвани пациенти според степента на витамин D недостатъчност е както следва: 20.8 % от тях са с тежка степен на недостатъчност (т.е. със серумни нива на 25(OH)D между 25.01 nmol/L и 50.00 nmol/L); 50.9 % са с умерена степен на недостатъчност (т.е. със

серумни нива на 25(OH)D между 50.01 nmol/L и 80.00 nmol/L), а 28.3 % са с оптимални серумни нива на 25(OH)D (> 80.01 nmol/L). Това дялово разпределение обаче е различно за двете наблюдавани групи, съставлящи изследваната кохорта (фигура 19).



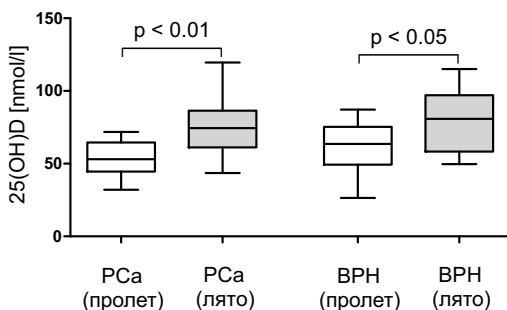
Фиг. 19. Честота на различните степени на витамин D недостатъчност при двете групи заболявания – пациенти с простатен карцином (PCa) и пациенти с доброкачествена хиперплазия на простатата (BPH).

От фигурата е видно, че над 1/3 от пациентите с доброкачествена хиперплазия на простатата са с оптимални серумни нива на 25(OH)D, докато в групата с карцином едва 1/5 от пациентите са със серумни нива на 25(OH)D > 80 nmol/L. Обратно пациентите с тежка степен на недостатъчност на витамин D са представени в по-голям процент при групата с простатен карцином, отколкото при групата с простатна хипертрофия (24 % спрямо 18 %).

3.3. Сезонна вариация на серумните нива на 25(OH)D

Поради сравнително равномерното разпределение на пациентите както в двете групи заболявания, засягащи простатната жлеза, така и според сезона, през който са изследвани, решихме да изследваме влиянието на сезона, като един от факторите предопределящи серумните вариации на 25(OH)D. Установи се, че през сезона с по-слабо слънцеогряване (про-

летта) медианата на серумния 25(OH)D за цялата изследвана кохорта е 57.79 nmol/L (интерквартилен обхват: 48.24 – 68.94 nmol/L) и се различава статистически значимо ($p < 0.05$) от получената за лятото медиана – 75.65 nmol/L (интерквартилен обхват 58.36 – 95.00 nmol/L). Подобна сезонна вариация се регистрира и в двете отделни групи заболявания, засягащи простатната жлеза (фигура 20).



Фиг. 20. Сравнение на стойностите на серумните нива на 25(OH) D за двете групи заболявания, разпределени по сезон. Медианата (интерквартилен диапазон) за PCa пациентите през пролетта е 53.07 nmol/L (44.57 nmol/L – 64.60 nmol/L), докато през лятото е 74.49 nmol/L (61.22 nmol/L – 86.46 nmol/L). Медианата (интерквартилен диапазон) за BPH пациентите през пролетта е 63.58 nmol/L (49.31 nmol/L – 75.30 nmol/L), докато през лятото е 80.85 nmol/L (58.33 nmol/L – 97.06 nmol/L).

3.4. Връзка между витамин D недостатъчност и основни характеристики на простатния карцином

3.4.1. Витамин D недостатъчност и PSA

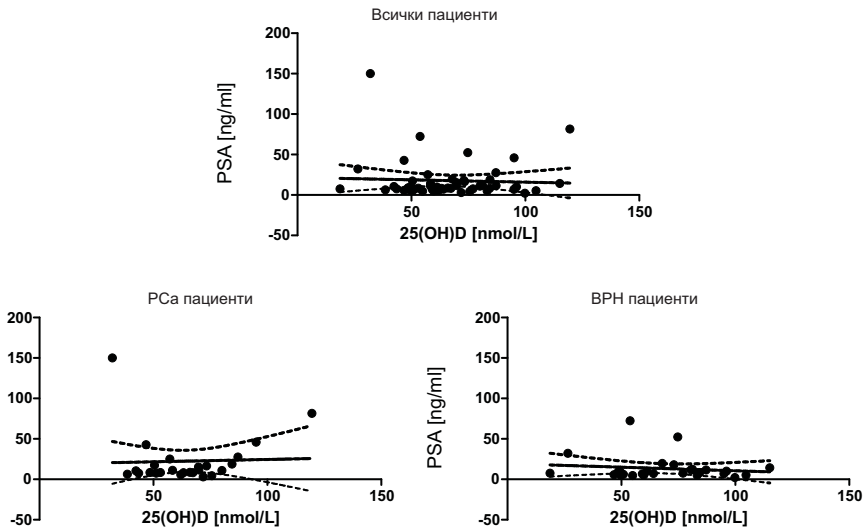
Най-широко използваният туморен маркер в простатната патология е простат-специфичният антиген (PSA) – общоприет маркер, служещ както за скрининг, така и за мониториране терапията на простатния карцином. На всички пациенти, включени в проучването, бяха изследвани нивата на

този маркер, обобщените резултатите от които са сумирани в таблица 19. Стойностите на PSA варираха в един широк диапазон: за РСa групата – от 2.98 ng/mL до 150 ng/mL, а за ВРН групата – от 2.2 ng/mL до 72.38 ng/mL. Не се установява статистически значима разлика в стойностите на PSA между двете групи ($p = 0.15$). От таблица 19 е видно, че нито границата от 4 ng/mL, нито тази от 10 ng/mL дискриминират отчетливо двете хронични заболявания. Ако разгледаме централната тенденция, изразена чрез медианата от тези стойности, се установява, че и при двете групи пациенти тя е над общоприетата за този параметър cut-off стойност от 4 ng/mL. Все пак при пациентите с доброкачествена хиперплазия медианата попада в така наречената „сива зона“ (интервалът от 4 ng/mL до 10 ng/mL), докато при пациентите с простатен карцином тя е над приетата за по-категорична в диагностично отношение стойност от 10 ng/mL.

Табл. 19. Серумни нива на PSA.

PSA	РСА	ВРН	Общо
< 4 ng/mL, n (%)	1 (1.89%)	1 (1.89%)	2 (3.78%)
4 ÷ 10 ng/mL, n (%)	11 (20.75%)	15 (28.30%)	26 (49.05%)
> 10 ng/mL, n (%)	13 (24.53%)	12 (22.64%)	25 (47.17%)
Медиана (ng/mL) (интерквартилен обхват)	11.00 (7.92 – 21.91)	8.40 (5.98 – 13.66)	9.11 (6.73 – 17.00)

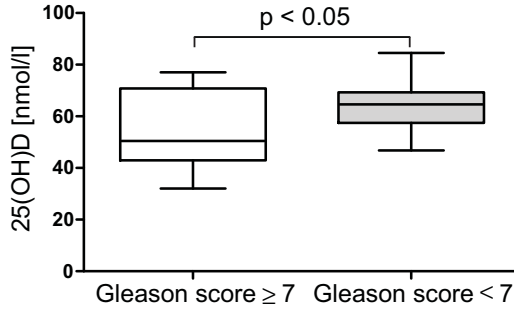
С оглед установяване на евентуална взаимовръзка между серумни нива на 25(OH)D и PSA, осъществихме непараметричен корелационен анализ. Не се откри корелационна връзка между тези два параметъра нито за цялата изследвана група (Spearman $r = 0.053$, $p = 0.71$), нито за двете отделни групи (Spearman $r = 0.20$, $p = 0.33$ за групата с простатен карцином и Spearman $r = -0.11$, $p = 0.61$ за групата с доброкачествена хиперплазия) (фигура 21).



Фиг. 21. Корелационна зависимост между серумни нива на 25(OH)D и PSA.

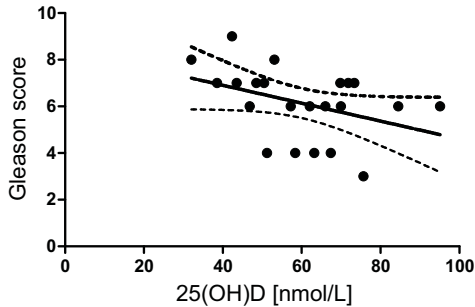
3.4.2. Витамин D недостатъчност и Gleason score

При хистологичното изследване е определена степента на диференцираност на туморните клетки посредством т.нар. скала на Gleason. PCa пациентите се подразделиха на две допълнителни групи. В едната се включиха 13 пациента с висока до умерена степен на диференцираност (оценка по Gleason ≥ 7), а в другата – 12 пациента с ниска степен на диференцираност (оценка по Gleason < 7). Пациентите от първата посочена подгрупа се характеризират със значимо по-ниски стойности на серумните нива на 25(OH)D, отколкото пациентите от втората подгрупа (50.49 nmol/L vs. 63.17 nmol/L съответно, $p < 0.05$) (фигура 22).



Фиг. 22. Серумните нива на 25(OH)D според степента на диференцираност на карцинома на простатата (данните са представени като медиана и съответния интерквартилен размах).

При изследване на корелационната зависимост между серумните нива на 25(OH)D и оценката по Gleason посредством непараметричен корелационен анализ се установи умерено изразена обратна корелационна връзка (Spearman $r = -0.46$, $p < 0.05$) – т.е. колкото по-висока степен на недиференцираност на тумора при карциномно болните е установена, толкова по-ниски са серумните нива на 25(OH)D (фигура 23).



Фиг. 23. Корелационна зависимост между серумните нива на 25(OH)D и оценката по Gleason.

3.4.3. Витамин D недостатъчност и брой биопсични цилиндри

Групата на пациентите с простатен карцином бе подразделена и по друг принцип – според броя на т.нар. позитивни биопсични цилиндри

при хистологичното изследване (т.е. тези от тях, при които се установява неоплазия). В първата подгрупа се разпределят 9 пациента с брой установени позитивни биопсични цилиндри < 6 , а във втората подгрупа попадат останалите 16 пациента с брой позитивни биопсични цилиндри ≥ 6 . По-ниски серумни нива на 25(OH)D се откриват при пациентите с < 6 позитивни биопсични ядра (цилиндри) в сравнение с тези от другата група (58.36 nmol/L спрямо 68.39 nmol/L, респективно), но тази разлика се оказва статистически незначима, $p = 0.3$. Не се установи корелационна зависимост (Spearman $r = 0.19$, $p = 0.36$) между броя на позитивните биопсични цилиндри и серумните нива на 25(OH)D.

3.4.4. Витамин D недостатъчност и BMI

В групата на пациентите с простатен карцином се наблюдава тенденция за обратна зависимост между серумните нива на 25(OH)D и степента на затлъстяване. Пациентите с BMI > 25 се характеризират с медиана на стойностите за 25(OH)D 57.79 nmol/L, т.е. в долната трета от интервала от стойности, характеризиращи витамин D недостатъчността. Пациентите с BMI ≤ 25 се характеризират с медиана на стойностите за 25(OH)D 66.59 nmol/L, което ги поставя в срединната част на посочения интервал. Наблюдаваната разликата обаче не се оказва статистически значима ($p > 0.05$).

По отношение на пациентите с доброкачествена хиперплазия подобна тенденция на обратна зависимост между телесна маса и серумни нива на 25(OH)D не се наблюдава.

4. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

В България ракът на простатата е втори по честота сред новодиагностицираните злокачествени заболявания при мъжете и втората най-честа причина за смърт сред тях. По данни на Националния раков регистър аденокарциномът на простатата съставлява приблизително 10 % от всички

малигнени заболявания в нашата страна, което е поредното доказателство за социалната му значимост. Този факт става още по-значим, ако се вземе под внимание и констатацията на Световната здравна организация, че се наблюдава тенденция за увеличаване на смъртността от заболяването в България и Румъния, за разлика от повечето страни в Западна Европа и САЩ, където смъртността намалява.

За развитие на неопластичните процеси роля играят не само определени генетични предиспозиции, но и някои фактори на околната среда. Затова и множество изследвания, визиращи различни неопластични заболявания, се фокусират върху специфичния начин на живот и разнообразните хранителни режими, които могат да повлияят както появата, така естествения ход на туморното заболяване. Натрупаните данни за молекулярните ефекти на витамин D на клетъчно ниво доведе до разбирането, че витамин D е един от тези фактори на околната среда и/или от хранителните режими, който би могъл да се обвърже с туморните процеси. В тази връзка през последните едно-две десетилетия започна да се отделя голямо внимание на витамин D дефицита и недостатъчността като рисков фактор за по-честото възникване и/или по-бърза прогресия на различни видове неопластични процеси [Fleet et al, 2012].

Насочи се вниманието към изучаване на взаимовръзките между витамин D и простатния карцином, тъй като е установено, че простатните неопластични клетки експресират както рецептора за витамин D (VDR), така и ензимите, участващи в метаболизма му (активиране и инактивиране) [Deeb et al, 2011; Marshall et al, 2012]. От друга страна се доказва и ролята на витамин D за експресията на андрогенния рецептор и ензимите, участващи в метаболизма на андрогените, също в простатни неопластични клетки [Hendrickson et al, 2011]. В подкрепа на всичко това се явяват и множеството *in vitro* проучвания, които демонстрират антипролиферативните ефекти на витамин D, както и ролята му за ир-регулацията на гени,

участващи в клетъчната диференциация на простатните епителни клетки.

Липсват данни за витамин D статуса на определени рискови групи, при които влошеният статус би могъл да повлияе в негативна посока клиничния ход на едно или друго хронично заболяване. Фактът, че смъртността от простатен карцином в България продължава да се увеличава, провокира интереса ни да установим витамин D статуса сред популация от пациенти със заболявания на простатната жлеза, и да проучим ролята на витамин D дефицита и/или недостатъчността като евентуален рисков и в същото време „модифициращ“ фактор за възникване и/или прогресия на простатния карцином първоначално в рамките на едно предварително пилотно и проспективно по дизайн проучване.

4.1. Честота на витамин D недостатъчност при пациенти с хронични заболявания на простатната жлеза

В нашето проучване се установи, че 71.7 % от изследваната популация е със субоптимални серумни нива на 25(OH)D, т.е. под 80 nmol/L. В групата пациенти с простатен карцином процентът на индивидите със субоптимални нива е по-голям в сравнение с този във групата с доброкачествена хиперплазия на простатната жлеза (80.0 % vs 64.3 %, съответно). Това различие се запазва и при стратифициране на недостатъчността: при тежката степен на недостатъчност /25(OH)D между 25.01 nmol/L и 50.00 nmol/L/ съотношението е 24.0 % vs 18 % респективно за РСa и ВРН пациентите, а при умерената степен на недостатъчност /25(OH)D между 50.01 nmol/L и 80.00 nmol/L/ то е 56.0 % vs 46.0 %. Ограниченият брой пациенти ни възпрепятства да изследваме честотата на витамин D недостатъчността сред двете групи пациенти и според сезона. В литературата по-често се откриват данни за серумните нива на 25(OH)D (средни стойности и медиани), отколкото за честотата на витамин D дефицит и недостатъчност сред различните заболявания, засягащи простатата. Освен оскъдността на данни в литературата,

там където ги има, се откриват и доста противоречия по отношение на честотата на витамин D дефицит/недостатъчност и риска за поява, прогресия и повишена смъртност от простатен карцином. Така например, за разлика от нас, Trump и съавтори [2009] намират приблизително еднакво честотно разпределение на витамин D дефицит/недостатъчност, както и несъществено различие в средните стойности на серумните нива на 25(OH)D, при пациенти с простатен карцином (новодиагностицирани и с рекурентна форма на заболяването) и видимо здрави контроли всред населението от областта на Западен Ню Йорк. Причина за липсата на такова различие, обаче, би могла да се дължи и на не доброто съответствие по отношение както на подбора на индивидите, така и по отношение на сезона, през който е взета кръвната проба за изследване на 25(OH)D. В групата с рекурентен простатен карцином 50 % от случаите са изследвани през летния сезон, в групата с новодиагностициран простатен карцином – 80 %, докато в контролната група само 25 % са изследвани през лятото – този факт би могъл да приближи средните стойности на 25(OH)D за различните групи и да доведе до липсата на различие между тях. Освен това 29 % от индивидите в контролната група са жени (по твърдение на авторите полът няма значение за серумните нива на 25(OH)D), както и 10 % са афро-американци, докато при групата с рекурентен простатен карцином само 5 % са от тази по-застрашена раса по отношение на възникване витамин D дефицит/недостатъчност, т.е. отново ситуация, която може да сближи стойностите на 25(OH)D между изследваната група и съответната им контролна група и да прикрие различията между тях. В нашето изследване, макар и обхващашо неголям брой пациенти, съществува много добро съответствие на пациентите по отношение на факторите, които определят вариациите в серумните нива на 25(OH)D – възраст, BMI и сезон, през който е вземана кръвта. По тази причина считаме, че наблюдаваните различия по отношение на честота на витамин D недостатъчност в групата с простатен карцином и нейната „своеобразна“

контролна група (пациенти с доброкачествена простатна хиперплазия) е достоверна.

4.2. Степени на витамин D недостатъчност при пациенти с хронични заболявания на простатната жлеза

В нашето проучване се установи, че медианата от стойностите на серумните нива на 25(OH)D на пациентите и от двете изследвани групи за целия изследван период ги определя като индивиди с витамин D недостатъчност. За да се проявят напълно протективните ефекти на витамин D като антипролиферативен фактор би трябвало да се целят по-високи стойности и за двете групи, още повече, че има литературни доказателства за благоприятните ефекти на витамин D и при ВРН пациенти [Espinosa et al, 2013]. Въпреки наблюдаваната витамин D недостатъчност и при двете изследвани групи, се установи статистическо значимо различие между тях, като в РСa групата медианата е близо до граничната стойност, разделяща лекостепенната недостатъчност от тежката витамин D недостатъчност, докато медианата при пациентите с ВРН осезаемо се приближава до долната граница на нормата. Този факт причислява нашето изследване към тези, които подкрепят хипотезата за протективната роля на витамин D по отношение на хроничните простатни заболявания.

Освен описаното различие в степента на наситеност с витамин D между двете групи, се установи и неизненадваща сезонна вариация в нивата на 25(OH)D, както за цялата изследвана кохорта ($p < 0.05$), така и за двете съставляващи тази кохорта групи. През лятно-есенния период се наблюдава значимо нарастване на серумните нива на 25(OH)D – с 40% за РСa групата ($p < 0.01$) и с 27% за ВРН групата ($p < 0.05$). Това наблюдение налага хипотезата, че ендогенната синтеза на витамин D не е засегната при болните с хронични заболявания на простатната жлеза. Разбира се тази идея не може да се изказва с абсолютна категоричност, защото е подкрепена само от сравнението между цифри, определящи централната тен-

денция на еднократно изследвани стойности за 25(OH)D, получени от различни пациенти в различните сезони, а не от реално изследвани индивидуални сезонни вариации, получени от поне двукратни изследвания на едни и същи пациенти през различните сезони. Интересният факт, който се установи при изследване на сезона като фактор, повлияващ съществено резултатите за 25(OH)D, е че серумните нива на 25(OH)D, наблюдавани в групата на ВРН пациентите, остават винаги по-високи в сравнение с тези, наблюдавани в групата на РСa пациенти, независимо от сезона.

За разлика от нашите наблюдения и други подобни, публикувани в литературата, се срещат и изследвания, които не доказват статистически значими различия по отношение на витамин D статуса между пациентите с простатен карцином и съответните им здрави контроли [Faupel-Badger et al, 2007; Trump et al, 2009, Yaturu et al, 2012]. Възможно обяснение за това е, че понякога се сравняват данни без да се съобразяват сезонните вариации или възрастовите и расови различия между пациентите [Trump et al, 2009].

Обратно, други изследвания са в подкрепа на факта, че по-ниски серумни концентрации на 25(OH)D се обвързват с по-агресивни форми на простатен карцином [Gilbert et al, 2012]. Би могло да се твърди, че ниските циркулиращи нива на 25(OH)D не могат да осигурят достатъчно субстрат за простатната 1-алфа-хидроксилаза, с което да се подсигури локалната (в самата простатна жлеза) и адекватна в количествено отношение биосинтеза на активната форма на витамин D. В подкрепа на тази идея е и наблюдението, че неопластични простатни клетки се характеризират с намалена активност на 1-алфа-хидроксилазата в сравнение с нормални епителни клетки от простатна жлеза [Chen et al, 2003]. Комбинацията от тези два фактора води до драматично понижена възможност за синтеза на активната форма на витамин D в простатните карциномни клетки, което предопределя и невъзможността за проява на протективните функции на витамин D, като диференциращ и антипролиферативен агент.

Любопитен е и фактът, че съществуват и проучвания, които посочват позитивна корелационна връзка както между ниски, така и между високи нива на 25(OH)D с риска от възникване на простатен карцином [Tuohimaa et al, 2004]. Едно възможно обяснение, което дават авторите на този така наречен U-образен риск би могъл да се обясни с приблизително еднакво ниското количество на 1,25(OH)2D в простатните клетки както при ниските, така и при много високите серумни нива на 25(OH)D. В първия случай, това се дължи на ниска тъканна концентрация, поради ниската серумна концентрация на 25(OH)D, а във втория случай – на възможността високите серумни нива на 25(OH)D да водят до тъканна резистентност, чрез авторегулационни процеси на повишена експресия на 24-хидроксилазата, водеща до получаване на инактивния в метаболитно отношение 1,24(OH)2D.

Потвърждаването или отхвърлянето на всички тези хипотези се нуждае от допълнителни *in vitro* и *in vivo* изследвания, в които да се избегнат всички онези фактори, които предопределят вариации в резултатите и водят до противоречивите изводи в публикуваните до момента изследвания.

4.3. Връзка между витамин D недостатъчност и основни характеристики на хроничните простатни заболявания.

4.3.1. Витамин D недостатъчност и PSA.

Едно от значимите събития по отношение на ранната диагностика и скрининг на рака на простатата, както и за мониторирането на терапията и прогресията му е въвеждането в ежедневната урологична практика на простатния специфичен антиген (PSA) като рутинен лабораторен параметър. PSA се произвежда от всички типове простатен епител – нормален, хиперпластичен, възпалително-променен, неопластичен. Повишаването на серумното ниво на PSA при патологичните процеси се дължи в най-голяма степен на нарушаване на архитектурата на дукталната система на простатната жлеза, която има за цел да предпазва организма от въздействието на активния PSA и да поддържа серумното му ниво в мини-

мални концентрации. Съществуват няколко основни причини за повишаване на серумното ниво на PSA, включващи доброкачествената простатна хиперплазия, простатния карцином, възпалението или инфекцията на простатата, травмата на простатата и перинеума, както и различни диагностични процедури в областта на малкия таз. Поради всичко изброено, този маркер е специфичен по отношение на тъканта, но неспецифичен по отношение на заболяването, засягащо простатата. Така например е доказано, че в 30 % от случаите с повишени серумни нива на PSA, не се открива туморен процес в биопсияния материал, както и стойности под 4 ng/ml не могат със сигурност да отхвърлят наличието на РСa. Затова понастоящем PSA не се възприема като скринингов инструмент при РСa [Velonas et al; 2013] и почти всички големи урологични асоциации заключават, че масовият PSA скрининг не е удачен.

Липсата на специфичност по отношение на простатната патология стои в основата на лошата дискриминативна способност на PSA по отношение наличието на карцином или доброкачествена хиперплазия, било в т.нар. „сива зона“, област, в която най-често се срещат диагностичните затруднения, било и при стойности над 10 ng/mL. Вероятно тази липса на специфичност обяснява, поне отчасти, липсата на корелация между изменените серумни нива на PSA и тези на 25(OH)D, както в цялата изследвана кохорта, така и при двете отделни групи пациенти с РСa и ВРН.

В подкрепа на тези наши наблюдения са и резултатите от едно скорошно проучване, в което се изследват здрави чернокожи мъже за установяване на ролята на витамин D суплементирането (приложени са различни дози – 1000 до 4000 IU/дневно) върху нивата на tPSA и fPSA. На третия месец от суплементирането, не се установяват никакви ефекти върху тези два лабораторни параметъра [Chandler et al, 2014].

4.3.2. Витамин D недостатъчност и Gleason score

За определяне степента на злокачественост на тумора, какъв е харак-

терът на туморния растеж и неговата диференциация и инвазивност при хистологичното изследване на биопсичен материал от неопластично променена простатна жлеза се използва т. нар. класификация „Gleason Score“. Туморните клетки се класифицират по скала от 2 до 10 според степента им на диференцираност. Колкото по-висока е стойността на Gleason Score толкова по-голяма е вероятността за поява и наличие на метастази.

Тъй като витамин D се характеризира с антипролиферативни свойства и антиметастатичен потенциал, то е логично да се разгледа взаимовръзката между оценката по Gleason и серумните нива на витамин D. В нашето проучване ние открихме умерена отрицателна корелационна връзка между тези два показателя. Още повече, че се откри статистически значимо различие в серумните нива на 25(OH)D в двете подгрупи на пациентите с простатен карцином, подразделени на базата на оценката по Gleason. В подгрупата с Gleason score ≥ 7 открихме значимо по-ниски нива на 25(OH)D, отколкото в подгрупата с Gleason score < 7 . В съгласие с нашите данни са и резултатите, получени от Gilbert и съавтори [2012]. Те показват, че по-високите нива на 25(OH)D се обвързват с по-неагресивните тумори и обратно. Fang и сътрудници [2011] също откриват обратна връзка между предиагностичните серумни нива на 25(OH)D и оценката по Gleason и прогресията на заболяването, като заключават, че по-високите предиагностични нива на 25(OH)D биха могли да се обвържат с по-добра прогноза на заболяването.

4.3.3. Витамин D недостатъчност и брой позитивни биопсични цилиндри

От клинична гледна точка е важно, че РСa се развива най-често в периферната зона (70 % - 80 %), в около 20 % се среща в транзиторната зона и едва по-малко от 10 % – в централната зона. ВРН най-често засяга преходната зона на жлезата. Понастоящем е прието да се извършва систематична биопсия, включваща последователно пунктиране на всички зони. По-

настоящем се прилага протокол, включващ минимум 10 биопсични точки като при всеки отделен пациент се вземат допълнителни биопсии от всички суспектни зони, установени посредством дигитално или ехографско изследване. Тази разширена систематична пункционна (тру-кът) биопсия на простатата осигурява богата морфологична и прогностична информация, което я прави биопсичният метод на избор в диагностиката на РСа.

Броят позитивни биопсични цилиндри е индиректна, но доста прецизна оценка за обема на простата, който е обхванат от неопластичния процес. Този параметър дава възможност за преценка и на мултифокалността на процеса. В нашата изследвана група от 25 РСа пациента, девет пациента са с под 6 биопсични цилиндри, засегнати от неоплазията, а шестнадесет пациента са с 6 и над 6 позитивни биопсични цилиндри. Противно на нашите очаквания в групата на по-тежко засегнатите пациенти, според този критерий, се установиха леко по-високи серумни нива на 25(ОН)D. Установената разлика между групите е статистически незначима. Вероятно това незначимо различие се дължи на случайни фактори и най-вече на малобройността на пациентите, формиращи тези подгрупи, което не ни дава възможността да установим със сигурност взаимовръзката между витамин D и този важен за клиницистите прогностичен критерий. Да не забравяме и факта, че 84 % от пациентите са в локализиран стадий на заболяването, а само 4 % са в авансирал стадий. Това неравномерно разпределение на пациентите по отношение на стадия им вероятно е също фактор, който допринася за установената от нас липса на връзка между брой на позитивните биопсични цилиндри и витамин D статуса.

IV. ЗАКЛЮЧИТЕЛНО ОБСЪЖДАНЕ

Десетилетия наред витамин D се свързва предимно с костната обмяна и свързаните с нея костни заболявания. Фактът, че витамин D осъществява ефектите си чрез витамин D рецептора, както и откриването на този

рецептор в голям брой тъкани, различни от костна тъкан, доведоха до разкриването на новите, така наречени „некалциемични“ ефекти на витамин D. Това обуслови и нарасналия интерес всред научната общност през последните две десетилетия към проблемите, свързани с витамин D статуса на населението. Особено смущаващ е фактът, че в световен мащаб се регистрира все по-нарастваща честота на витамин D дефицит и недостатъчност до степен такава, че тази тенденция се определя като пандемия. Започнаха да се трупат данни за голям брой хронични заболявания като различни видове рак, автоимунни и сърдечно-съдови заболявания, диабет и много други, чиято прогресия би могла да се обвърже с неадекватния витамин D статус.

В България сравнително отскоро съществува възможност за лабораторно мониториране на витамин D статуса и то най-често чрез имунохимичен принцип на изследване. Това е и причината у нас все още да липсват системни проучвания за честотата на витамин D дефицит и недостатъчност, както сред здравето население, така и сред отделни групи индивиди с хронични заболявания.

Разработеният от нас HPLC-UV метод за определяне на 25(OH)D, смятан за основен биомаркер и адекватно определящ витамин D статуса, се характеризира с висока аналитична надеждност. Той може да служи и като арбитражен метод в случаите на съмнение в резултатите, получени с рутинните имунохимични методи.

Доказаната от нас висока честота на витамин D дефицит и недостатъчност при две хронични и социално значими заболявания като хепатит С вирусна инфекция и простатен карцином и взаимовръзката между витамин D недостатъчност/дефицит с информативни клиничко-лабораторни параметри дава основание за включването на този показател към рутинните лабораторни изследвания.

Получените от нас данни за връзката между витамин D статуса и те-

жестта на фиброзния процес при пациенти с хронична HCV инфекция поставят въпроса кое е първично и кое е вторично в патогенезата на фиброзата (дали влошеният витамин D статус повлиява негативно хода на фиброзния процес или фиброзата е предопределящият фактор за ниските нива на 25(OH)D), който би могъл да се разреши в едно проспективно бъдещо изследване. В тази връзка фиброзата, като едно от най-тежките усложнения при това заболяване, би могла да се повлияе в благоприятна посока с подобряване на витамин D статуса.

Резултатите от първото за България проучване за витамин D статуса при РСa и ВРН пациенти поставят основите за бъдещи проучвания, проследяващи витамин D нивата в динамика и търсене на взаимовръзки с андрогенния статус на индивидите.

Доказаните неблагоприятни ефекти на субоптималните нива на витамин D върху тези заболявания са сериозно основание да се привлече вниманието на здравната общественост върху значението на витамин D статуса при различни рискови групи.

Настоящият труд създава база за изработване на ръководства и препоръки за подобряване на общия витамин D статус, като елемент от грижата на здравните власти за поддържане на общественото здраве на високо ниво. Първа стъпка в тази насока е въвеждането на мониториране на 25(OH)D нивата и оценка на витамин D статуса поне сред рискови групи в съответствие с препоръките на редица Европейски здравни комисии.

Две съществени предпоставки за подобряване на общественото здраве в тази насока има: от една страна – възможността лесно да се определя и мониторира витамин D статуса, чрез един единствен лабораторен параметър /а именно определяне на 25(OH)D/, а от друга страна – наличието на ефективни и евтини средства за предотвратяване на възникването и разпространението на витамин D дефицит и недостатъчност чрез промяна стила на живот и/или адекватно суплементиране с витамин D препарати.

ИЗВОДИ

1. HPLC метод с UV детекция за определяне на серумни нива на 25(OH)D:

- Разработеният от нас HPLC метод с UV детекция се характеризира с висока аналитична надеждност и селективност за точно количествено определяне и на двете форми на 25(OH)D – 25(OH)D₂ и 25(OH)D₃.
- Високата аналитична надеждност и много доброто съвпадение на резултатите на предложения метод с тези на единствения за страната ни референтен LC-MS/MS метод са основание за използването му като алтернативен на имунохимичните методи. Той може да се използва като арбитражен метод особено, когато резултатите от рутинните имунохимични методи са несъответстващи на клиничните очаквания.
- Относително краткото време за анализ, както и наличието на пазара на търговски серум-базирани калибратори и контроли, осигуряват също и възможността за въвеждането и използването на предложения от нас HPLC-UV метод в рутинната лабораторна практика.

2. Витамин D и хронична хепатит C вирусна инфекция:

- Първото системно за нашата страна проучване за витамин D статуса на представителна извадка пациенти (296 души) с хронична хепатит C инфекция доказва, че витамин D дефицитът и недостатъчността се срещат с много висока честота сред тази изследвана кохорта, като преобладават случаите с по-тежки степени на недостатъчност.
- Серумните нива на 25(OH)D при пациентите с хронична хепатит C вирусна инфекция са зависими от възраст, пол и сезон, през който се взема кръвта за изследване.
- Серумните нива на 25(OH)D при пациентите с хронична хепатит C вирусна инфекция са в обратна зависимост с една от основните характеристики на

заболяването – стадия на чернодробната фиброза.

- Пациентите с напреднал стадий на фиброза (F3-F4) имат възможност за синтез на 25(OH)D, доказано чрез повишените серумни нива 25(OH)D през лятното полугодие. С подобряване на витамин D статуса би могло да се повлияе в благоприятна посока на това най-тежко усложнение от хроничната инфекция с HCV.
- Серумните нива на 25(OH)D при пациентите с хронична хепатит С вирусна инфекция са в обратна зависимост с вирусния товар, установен преди антивирусното лечение. Подобряването на витамин D статуса би могло да подпомогне естествените защитни механизми на гостоприемника спрямо вирусния агент.
- Позитивната корелационна връзка между витамин D статуса и постигането на ТВО е още едно доказателство за възможността да се използва витамин D суплементирането като неoadювант към стандартното лечение с цел постигане на по-добри резултати.

3. **Витамин D и най-често срещаните хронични заболявания на простатна жлеза – доброкачествена хиперплазия и простатен карцином:**

- Първото за нашата страна проучване за витамин D статуса сред пациенти с доброкачествена простатна хиперплазия и простатен карцином показва, че витамин D недостатъчността е широко разпространена сред тези две групи пациенти, като честотата е по-голяма при пациентите с неопластично заболяване в сравнение с тези с доброкачествено заболяване.
- Установена е зависимост на серумните нива на 25(OH)D от сезона, през който се взима кръвта за изследване.
- Доказани са значимо по-ниски нива на 25(OH)D при пациентите с простатен карцином спрямо тези с доброкачествена простатна хиперплазия. При болните с простатен карцином се установяват по-тежки степени на дефицит.

- Установена е статистически значима негативна корелация между витамин D статуса и оценката по Gleason от хистологичното изследване – случаите с агресивен простатен карцином са с най-ниски нива на 25(OH)D.
- Не е установена корелация между нивата на 25(OH)D и tPSA при нито една от двете изследвани групи. Този резултат не е изненадващ, тъй като tPSA не е добър дискриминатор по отношение на наличието на карцином или доброкачествена хиперплазия.
- Получените резултати предполагат възможен благоприятен ефект при адювантна терапия с витамин D.

ПРИНОСИ

1. Приноси с оригинален научен и научно-приложен характер:

- За първи път в България е разработен и валидиран HPLC метод с UV детекция за определяне на серумните нива на 25(OH)D с висока аналитична надеждност, който може да намери приложение в рутинната лабораторна практика за определяне на витамин D статуса.
- За първи път в България е изследван витамин D статуса на болни с хронична хепатит С вирусна инфекция и неговата връзка с клинично-лабораторни и прогностични параметри за хода на заболяването.
- За първи път в България е изследван витамин D статуса на болни с простатен карцином и доброкачествена простатна хиперплазия и са установени взаимовръзки между субоптимални нива на 25(OH)D и клинично-лабораторни и прогностични параметри за хода на заболяването. За витамин D статуса на пациенти с ВРН не са открити данни в световната литература.
- Доказани са значимо по-ниски нива на 25(OH)D при пациентите с простатен карцином спрямо тези с доброкачествена простатна хиперплазия. При болните с простатен карцином се установяват по-тежки степени на дефицит.
- Поставени са основите за бъдещи изследвания, с помощта на които би могло да се промени алгоритъма на диагностика (чрез въвеждане изследването на серумните нива на 25(OH)D към други, вече утвърдени и използвани в практиката биомаркери) и лечение (чрез суплементиране с витамин D) на изследваните хронични заболявания.

2. Приноси с потвърдителен характер:

- Доказано е, че хроматографските методи за определяне на серумни нива на 25(OH)D са с по-висока аналитична надеждност от широко разпространените в рутинната клинично-лабораторна практика имунохимични методи.

- Потвърдена е сезонната зависимост на серумните нива на 25(OH)D, което трябва задължително да се взема под внимание при анализ на резултатите.
- Доказана е висока честота на витамин D дефицит сред болни с хронични заболявания.
- Доказва се, че по-високата тежест на витамин D дефицита повлиява негативно хода на изследваните хронични заболявания.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ПУБЛИКАЦИИ В НАУЧНИ СПИСАНИЯ

1. **Gerova D**, Galunska B, Ivanova I, Kotzev I, Tchervenkov T, Balev S, Svinarov D. Prevalence of vitamin D deficiency and insufficiency in Bulgarian patients with chronic Hepatitis C viral infection. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation Nov 2014, 74(8):665-672. **IF = 2.09**
2. Galunska B, **Gerova D**, Kosev P, Anakievski D, Hinev A. Serum 25-Hydroxy Vitamin D Levels in Bulgarian Patients with Prostate Cancer: a Pilot Study. Clin. Lab. 2015;61(3+44) (in press). **IF = 1.084**
3. Galunska B, **Gerova D**, Boncheva M, Svinarov D. HPLC method for measuring the circulating levels of 25-hydroxy vitamin D: Validation and comparison with ID LC/MS/MS and immunoassay. Integr Food Nutr Metab 2014,1(2):1-6.

ПУБЛИКУВАНИ РЕЗИОМЕТА НА СЪОБЩЕНИЯ, ПРЕДСТАВЕНИ НА МЕЖДУНАРОДНИ НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Gerova D.**, Galunska B., Kosev P., Anakievski D., Hinev A. Significance of serum 25-hydroxy vitamin D levels in Bulgarian patients with prostate cancer. FEBS EMBO 2014, 30.08 – 04.09 2014, Paris, France. Abstract SUN-298. FEBS Journal 281 (Suppl. 1) (2014), 167. **IF = 3.986**
2. Galunska B., **Gerova D.**, Todorov S., Svinarov D. HPLC-UV Determination of 25-Hydroxy-Vitamin D In Human Plasma: Comparison With ID-LC-MS/MS and Immunoassay. 14th International Nutrition & Diagnostics Conference INDC 2014, September 2 - 5, 2014, Prague, Czech Republic. Abstract, P40.
3. **D. Gerova**, B. Galunska, I. Ivanova, I. Kotzev, T. Tchervenkov, S. Balev, D. Svinarov. Vitamin D Status in Bulgarian Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. Clinical Chemistry, Vol. 59, No. 10, A37, Supplement, 2013 Annual Meeting & Clinical Lab Expo 2013; Houston July 28 – August 1. **IF = 7.768**

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

„Оценка на витамин D статуса при таргетни групи чрез селективен хроматографски метод за определяне на 25-хидрокси витамин D“
– съвместен научен проект (2011-2014 година) с Катедрата по обща медицина – УНС по клинична лаборатория, Катедрата по педиатрия и медицинска генетика, Катедрата по вътрешни болести – УНС по нефрология и Катедрата по химия при МУ Варна.

Ръководител: Бистра Цанева Галунска, дф.

Институционално Финансиране: „Фонд медицинска наука“ към МУ – Варна

БЛАГОДАРЯ

на всички, които допринесоха този труд да се осъществи:

- научния ми ръководител доц. Б. Галунска за изключителната и непрекъснатата подкрепа, както и високия професионализъм с които ми помогна през всички етапи от работния процес;
- научния ми ръководител доц. д-р М. Бончева за напътствията, помощта и подкрепата през всички етапи от работния процес;
- проф. Д. Свинаров за предоставената възможност за обучение и работа в ръководената от него лаборатория, както и за идейната подкрепа и професионален оптимизъм особено в трудните моменти, неотменно съпътстващи един или друг етап от цялостния труд;
- проф. М. Станчева за предоставената възможност за обучение и работа в ръководената от нея научна лаборатория по хроматографски анализ към катедрата по химия на МУ Варна;
- д-р Св. Тодоров за възможността за работа в сектор имунохимия към ръководената от него клинична лаборатория;
- д-р Тр. Червенков и доц. Св. Балев от Имунологична лаборатория за съдействието при работата, свързана с пациентите с HCV инфекция.
- д-р Ир. Иванова, проф. Ис. Коцев и колегите от Клиниката по гастроентерология за съдействието, помощта и ценните съвети по отношение на работата, свързана с пациентите HCV инфекция.
- проф. Ал. Хинев, д-р П. Косев и колегите от Клиниката по урология за съдействието, помощта и ценните съвети по отношение на работата, свързана с пациентите с хронични заболявания на простатната жлеза.
- колегите и екипа от Клинична лаборатория на МБАЛ „Св. Марина”.

както и на

МОЕТО СЕМЕЙСТВО ЗА ПОДКРЕПАТА И ОБИЧТА!