

ЖЕКАЙТЕ ЕЛЕНА КЯСТУТИСОВНА

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ЭКЗОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА
РАЗВИТИЕ ДЕФИЦИТА ВИТАМИНА D
У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ
В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ. ВОПРОСЫ ПРОФИЛАКТИКИ**

14.01.08 – педиатрия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Пермь – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования "Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Кондратьева Елена Ивановна, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Белоусова Тамара Владимировна, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой педиатрии и неонатологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Новосибирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Мещеряков Виталий Витальевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой детских болезней Бюджетного учреждения высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа – Югры «Сургутский государственный университет»

Ведущая организация: Обособленное структурное подразделение Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации Научно-исследовательский клинический институт педиатрии имени академика Ю. Е. Вельтищева.

Защита диссертации состоится « » 2020 года в часов на заседании диссертационного совета Д 208.067.02 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования "Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера" Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера" Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26 и на сайте: <http://www.pdma.ru/>. С авторефератом можно ознакомиться на сайтах: <http://www.pdma.ru/> и <http://www.vak.minobrnauki.gov.ru/>

Автореферат разослан «_____» _____ 2020 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, доцент

Карпунина Наталья Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации

Дефицит и недостаточность витамина D в настоящее время рассматривается как мировая проблема в связи с участием витамина D в регуляции экспрессии генов, ассоциированных с многочисленными процессами в организме человека, таких как воспаление, иммунитет и репарация органов и тканей (Zheng Z.H., 2016, Cairncross C., 2016, Manson J.E., 2018). Пациенты с муковисцидозом относятся к группе риска по развитию дефицита и недостаточности витамина D (Norton L., 2015; Rovner A.J., 2007; Holick, M.F., 2017; Ашерова И.К., 2012; Chesdachai S., 2016). Низкий уровень витамина D у пациентов с муковисцидозом подтвержден в большом количестве исследований, выполненных в различных странах мира, находящихся на разных географических широтах (Norton L., 2015; Rovner A.J., 2007; Holick, M.F., 2017; Ашерова И.К., 2012; Chesdachai S., 2016; Sexauer W.P., 2015; Timmers N., 2019; Abu-Fraih Y., 2019). Влияние сезона года на уровень 25(OH)D в РФ изучалось у здоровых детей раннего возраста и в единичных исследованиях у детей старшего возраста (Захарова И.Н., 2015, Климов Л.Я., 2015). Аналогичных исследований у пациентов с муковисцидозом, как и влияния профилактической дозы холекальциферола на уровень 25(OH)D не проводилось.

На сегодняшний день нет исследований, подтверждающих влияние генетических факторов на дефицит витамина D при муковисцидозе. Важнейшим ферментом первого этапа биотрансформации холекальциферола в 25-гидроксихолекальциферол (25(OH)D) и далее в гормонально активные формы витамина D₃ в организме является витамин D₃ 25-гидроксилаза печени (изоформы цитохрома P450). Активность P450, его генетическая регуляция и влияние на деградацию сывороточного 25(OH)D изучены недостаточно (Угай Л.Г., 2012). Все эффекты витамина проявляются через рецепторы (VDR) (Габрусская Т.В., 2017; Jolliffe D.A., 2016), развитие резистентности к 1,25(OH)₂D может быть обусловлено снижением количества VDR рецепторов в тканях-мишенях, в том числе и при муковисцидозе.

Таким образом, всестороннее изучение молекулярно-генетических механизмов и экзогенных факторов является необходимым условием понимания механизмов развития дефицита витамина D и подбора профилактических доз холекальциферола у пациентов с муковисцидозом.

Степень разработанности темы

Российское педиатрическое сообщество на основании проведенных в различных регионах страны масштабных мультицентровых исследований к настоящему времени создало Национальную программу «Недостаточность витамина D у детей и подростков Российской Федерации: современные подходы к коррекции» (2018). Однако исследований влияния совокупности экзогенных и генетических факторов на показатели здоровых детей не проводились.

Распространение гиповитаминоза D у пациентов с МВ в мире описано в многочисленных работах (Norton L., 2015; Rovner A.J., 2007; Holick M.F., 2017; Chesdachai S., 2016; Sexauer W.P., 2015; Timmers N., 2019; Abu-Fraih Y., 2019), однако исследования в Российской Федерации единичны (Ашерова И.К., 2012; Пашкевич А.А., 2018) и проведены на небольших группах пациентов. Также не проводилось ранее исследований, в ко-

торых бы сравнивался статус витамина D у детей с муковисцидозом в регионах, расположенных на разных широтах, а также в различные сезоны года. Традиционно используемые в России схемы профилактики гиповитаминоза D, как правило, не подкреплялись лабораторными данными, поэтому судить об их эффективности не представлялось возможным (Ашерова И.К., 2012).

За последние 10–15 лет различными научными сообществами созданы национальные (европейские, североамериканские) согласительные документы, посвящённые критериям диагностики, а также тактике профилактики и коррекции недостаточности витамина D у пациентов с муковисцидозом (Chesdachai S., 2016; Tangpricha V., 2012). Рекомендации для РФ, основанных на изучении особенностей распространения дефицита витамина D в разных регионах, возрастных группах и сезонах, не разработаны.

Обнаружение и всестороннее изучение роли холекальциферола и его метаболитов в формировании и сохранении здоровья детей и подростков с муковисцидозом, высокая частота гиповитаминоза D во всем мире, увеличение возможностей мониторинга уровня 25(OH)D и внедрение этого показателя в протоколы обследования при муковисцидозе, являются предпосылками проведения настоящей работы.

Цель исследования – изучить молекулярно-генетические механизмы и экзогенные факторы развития дефицита витамина D у пациентов с муковисцидозом в разные возрастные периоды и сезоны года из различных географических регионов страны, и на основании полученных данных разработать алгоритм диагностики и профилактики.

Задачи исследования

1. Провести исследование уровня витамина D у здоровых детей различного возраста в регионах РФ (Московская область, Красноярский и Ставропольский края) с разным уровнем инсоляции в течение года и в зависимости от организации профилактики гиповитаминоза D.

2. Исследовать обеспеченность витамином D пациентов с муковисцидозом в трех регионах РФ (Московская область, Красноярский и Ставропольский края) с разным уровнем инсоляции в течение года и влияние различных экзогенных факторов на развитие его дефицита.

3. Определить влияние обеспеченности витамином D больных муковисцидозом на синтез эндогенных антимикробных пептидов (кателицидина LL-37, α -1-3-дефензина HNP1-3), функцию легких, развитие хронической граммотрицательной инфекции и осложнений заболевания.

4. Изучить содержание 25 (OH) D при различных генотипах полиморфизмов генов *CYP2C9*3* (1075A > C; I359L, rs1057910), *CYP3A4*3* (c.1334T > C; M445T, rs4986910), *CYP2C9*2* (c.430C > T; R144C, rs1799853), *CYP2D6*4* (c.1846G > A, rs3892097), *CYP3A4*1B* (c.-392C > T, rs2740574) у здоровых детей и пациентов с муковисцидозом.

5. Исследовать взаимосвязь полиморфных вариантов гена *VDR* (c.1206T > C(A > G), (c.152T > C), (c.1174+283G > A) с содержанием витамина D у здоровых детей и пациентов с муковисцидозом.

6. Предложить модель развития дефицита витамина D при муковисцидозе на основе изученных молекулярных механизмов, экологических и внутренних факторов и алгоритм диагностики и профилактики на основе комплекса полученных данных.

Научная новизна

В рамках многоцентрового исследования впервые изучена частота дефицита витамина D здоровых детей и пациентов с муковисцидозом в различные возрастные периоды в трех регионах РФ (Московская область, Красноярский и Ставропольский края) с разным уровнем инсоляции, в 4 сезонах года. Нормальное содержание 25(OH)D отмечено у 48,5% здоровых детей, недостаточность – у 30,1%, дефицит – у 19,8%, выраженный дефицит зарегистрирован у 1,6% детей. Уровень 25(OH)D снижается с возрастом и достигает минимальных значений у подростков. Установлено влияние сезона года (весна) и профилактической дозы холекальциферола (1000МЕ и более) на содержание 25(OH)D у здоровых детей.

Среди пациентов с муковисцидозом, проживающих в трех регионах РФ, дефицит витамина D выявлен в 24,4%, недостаточность – в 26,3%, нормальное содержание в 49,3%. Основными факторами, влияющими на уровень витамина D являются возраст, сезон года (зима, весна, осень), организация профилактики гиповитаминоза D (доза холекальциферола). Зависимость уровня 25(OH)D от поступления витамина D с пищей, продолжительности солнечного сияния (ПСС) получена только при отсутствии профилактики, зависимость от региона проживания не установлена.

Впервые в рамках настоящего исследования показано, что уровень АМП (HNP1-3, LL-37) повышен у детей с МВ по сравнению со здоровыми детьми, у которых они снижаются с возрастом, а при муковисцидозе – повышаются, что обусловлено прогрессированием заболевания. Получена обратная корреляция уровня 25(OH)D с содержанием дефензинового антимикробного пептида (HNP1-3) и кателицидинового антимикробного пептида (LL-37) с функцией легких.

По результатам данной работы влияние полиморфизмов генов 1 фазы биотрансформации ксенобиотиков *CYP2C9*3* (1075A > C), *CYP3A4*3* (с.1334T > C), *CYP2C9*2* (с.430C > T), *CYP2D6*4* (с.1846G > A), *CYP3A4*1B* (с.-392C > T) и гена *VDR* (с.1206T > C(A > G), (с.152T > C), (с.1174+283G > A) на содержание 25(OH)D в группе здоровых детей и пациентов с муковисцидозом не установлено. Доказано влияние полиморфизмов гена *VDR* на уровень витамина D при муковисцидозе. Низкое содержание витамина D зарегистрировано при CC генотипе полиморфизма *VDR* с.1206T > C(A > G) – TaqI. Изучение совместного влияния трех полиморфизмов гена *VDR* позволило выявить гаплотипы, угрожаемые по дефициту витамина D.

Создана база данных пациентов с различными генотипами генов 1 фазы биотрансформации ксенобиотиков – *CYP2C9*3*, *CYP3A4*3*, *CYP2C9*2*, *CYP2D6*4*, *CYP3A4*1B* и *VDR* (с.1206T > C (A > G)), (с.152T > C), (с.1174+283G > A) и ответом на терапию по коррекции дефицита витамина D, которая может использоваться в дальнейших исследованиях.

Теоретическая и практическая значимость

На основании полученных в рамках многоцентрового исследования результатов представлены сведения о распространённости дефицита и недостаточности витамина D у здоровых детей и подростков и пациентов с муковисцидозом в трех регионах Российской Федерации (центральный, южный, сибирский), что может использоваться для создания программ профилактики дефицита витамина D в данных регионах и стране.

Решение вопроса прогнозирования риска развития дефицита витамина D у пациентов с МВ позволит своевременно организовывать профилактические и терапевтиче-

ские мероприятия по коррекции дефицита витамина D, что повысит эффективность комплексной терапии заболевания. Ранее подобные исследования не проводились как в группе пациентов с МВ, так и в здоровой популяции.

На значительном клиническом материале (616 детей и подростков, из них МВ – 283, здоровых – 333) обосновано создание модели развития дефицита витамина D при МВ и алгоритма диагностики и профилактики с учетом возраста, сезона года, профилактической дозы холекальциферола, гаплотипов полиморфизмов гена *VDR* (с.1206T > C(A > G)), (с.152T > C), (с.1174+283G > A). Доказана необходимость круглогодичной профилактики гиповитаминоза D для пациентов с МВ с первых недель жизни с учетом возраста, сезона года и показана ее эффективность на примере московского региона, что легло в основу методических рекомендаций «Диагностика, профилактика и терапия недостаточности витамина D при муковисцидозе», которые утверждены решением Ученого совета ФГБНУ «МГНЦ» – протокол № 11 от 23.12.2019.

Положения, выносимые на защиту

1. Изучение распространенности гиповитаминоза D у здоровых детей показало, что только 48,5% детей имеют адекватный уровень витамина D, недостаточность – 30,1%, дефицит – 19,8%, выраженный дефицит – 1,6%. Получена зависимость от возраста, сезона года, профилактической дозы холекальциферола и отсутствия влияния изучаемых генетических факторов.

2. Зарегистрирована высокая распространённость гиповитаминоза D (выраженный дефицит 7,7%, дефицит 16,7%, недостаточность 26,3%) у детей с муковисцидозом трех регионов РФ. Факторами, оказывающими существенное влияние на обеспеченность витамином D детей с муковисцидозом, являются: возраст, сезон года, профилактическая доза холекальциферола. Уровень антимикробных пептидов (HNP 1-3 и LL-37) достоверно повышен у детей с муковисцидозом в отличие от здоровых детей и увеличивается с возрастом. Установлена обратная корреляция уровня 25(OH)D с уровнем дефензинового антимикробного пептида (HNP1-3) и кателицидинового антимикробного пептида (LL-37) с функцией легких.

3. Полиморфные варианты генов ферментов 1-й фазы биотрансформации ксенобиотиков *CYP2C9*3* (1075A > C; I359L, rs1057910), *CYP3A4*3* (с.1334T > C; M445T, rs4986910), *CYP2C9*2* (с.430C > T; R144C, rs1799853), *CYP2D6*4* (с.1846G > A, rs3892097), *CYP3A4*1B* (с.-392C > T, rs2740574) при муковисцидозе не влияют на уровень 25(OH)D. Изучение совместного влияния трех полиморфизмов гена *VDR* (с.1206T > C(A > G)), (с.152T > C), (с.1174+283G > A) позволило выявить гаплотипы, являющиеся факторами риска по дефициту витамина D.

4. На основе изученных молекулярных механизмов, экзогенных и внутренних факторов предложена модель развития дефицита витамина D при муковисцидозе и алгоритм диагностики и персонализированного подбора профилактических доз витамина D. Показана эффективность профилактических мероприятий в виде увеличения уровня витамина D на 34% у пациентов 4–10 лет и в подростковой группе на 50%, а также доли пациентов с нормальным содержанием витамина D – в 2,1 раза в зимний период.

Внедрение результатов работы в практику. Результаты диссертационного исследования по профилактике недостаточности и дефицита витамина D у пациентов с му-

ковисцидозом внедрены в практику работы в центрах муковисцидоза Московской области (ГБУЗ МО «ДКМЦМО»), Красноярского края (КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 20 им. И.С. Берзона»), Ставропольского края (Краевая детская клиническая больница г. Ставрополя), Томской области (ОГАУЗ «Детская Больница № 12»), Пермского края (ГБУЗ Пермского края «Краевая детская клиническая больница»).

Связь с научными программами

Тема диссертации утверждена на заседании научно-координационного совета по педиатрии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера», протокол №6 от 11.07.2019г.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России - Разработка методов профилактики, диагностики и лечения инфекционных и соматических заболеваний у детей и подростков, номер государственной регистрации 115030310057. И темой ФГБНУ "Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова"- Разработка технологий персонализированной диагностики и терапии при муковисцидозе, номер государственной регистрации АААА-А18-118081390036-6.

Апробация результатов исследования

Материалы диссертации доложены и обсуждены на XIV Национальном конгрессе «Актуальные проблемы муковисцидоза» (Красноярск, 25–26 апреля 2019 г.); XVII, XVIII Национальных конгрессах «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» (Москва, 24–26 октября 2018 г.; 22–24 октября 2019 г.; 41-й конференции Европейского общества по муковисцидозу (European Cystic Fibrosis Society, ECFS; Белград (Сербия); 06–10 июня 2018 г.); 42-й конференции Европейского общества по муковисцидозу (European Cystic Fibrosis Society, ECFS; Ливерпуль, Великобритания, 5–8 июня 2019 г.), Международном конгрессе Европейского респираторного общества (ERS International Congress 2019; Мадрид (Испания); 28 сентября – 2 октября 2019 г.); 52-й конференции Европейского общества генетики человека (European Society of Human Genetics, ESHG, г. Стокгольм (Швеция), 15–18 июня 2019 г.); на Международном конгрессе Европейского респираторного общества (ERS International Congress 2020; Вена (Австрия); 5 сентября – 9 сентября 2020 г.). Работа выполнена при частичном финансировании гранта РФФИ «Изучение влияния генетических и экологических факторов на развитие дефицита витамина D у здоровых детей и детей с муковисцидозом в возрастном аспекте» № А 18-015-00482 (2018–2019).

Публикации по теме работы. По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, из них 6 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК.

Соответствие диссертации Паспорту специальности. Диссертационное исследование соответствует формуле специальности 14.01.08 – Педиатрия и областям исследования п. 2 «Вскармливание и питание здоровых и больных детей. Рахит, расстройство пищеварения и питания» и п. 5 «Клиника, диагностика и лечение врождённых и наследственных болезней».

Личный вклад автора. Клинико-анамнестическое обследование детей, сбор материала для проведения биохимического и генетического исследования, динамический контроль; создание базы данных больных с различными генотипами; базы пациентов московского региона, которым проводилась профилактика гиповитаминоза D в 2016–2018 году; статистический анализ; разработка диагностического алгоритма, подготовка основных публикаций по теме исследования.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждений, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 253 источника, из них 60 отечественных и 193 – зарубежных авторов, приложения. Работа иллюстрирована 46 таблицами и 22 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа выполнялась с 2016 по 2020 гг. в ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» (директор – д. м. н., профессор, член-корреспондент РАН Куцев С. И.), в научно-клиническом отделе муковисцидоза (руководитель – д. м. н., профессор Кондратьева Е. И.). Клинические базы: ГБУЗ МО «Детский клинический многопрофильный центр Московской области» для детей (ДКМЦМО), г. Мытищи; КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 20 им. И.С. Берзона», г. Красноярск; Краевая детская клиническая больница г. Ставрополя.

Контрольную группу детей Московского региона, Красноярского и Ставропольского края в возрасте от 0 до 18 лет составили 333 ребенка (Московская область – 145 детей, Красноярский край – 137 детей, Ставропольский край – 51 ребенок). Среди обследованных здоровых детей ($n = 333$) было 147 (44,1%) мальчиков и 186 (55,9%) девочек, средний возраст пациентов составил $7,1 \pm 4,7$ лет. Критерии включения в контрольную группу: отсутствие хронических и аутоиммунных заболеваний, отсутствие синдрома мальабсорбции, подписание информированного согласия.

В исследование включено 283 пациента с муковисцидозом (152 (53,7%) мальчика и 131 (46,3%) девочки) из трех регионов РФ (Московского региона – 211 детей, Красноярского – 34 ребенка, и Ставропольского края – 38 детей). Средний возраст пациентов составил $7,5 \pm 4,8$ лет. Диагноз устанавливался согласно критериям, утвержденным в международных и отечественном консенсусах и клинических рекомендациях (Farrell Р.М., 2017, Кондратьева Е.И., 2016). Критерии включения в группу муковисцидоза: дети, страдающие муковисцидозом, в возрасте от 0 до 18 лет, подписание информированного согласия.

Дети были разделены на группы в зависимости от возраста: 1-ю группу составили дети от 0 до 3 лет; 2-ю группу – от 3 лет до 10 лет; 3-я группу – от 11 лет до 18 лет. Исследование «Алгоритм диагностики и коррекции дефицита витамина D у детей РФ» было одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ», протокол № 9 от 8 декабря 2017 года. Проведено комплексное изучение факторов, влияющих на развитие дефицита и недостаточности витамина D у детей с муковисцидозом: возраст, пол, сезон года, фактический прием препаратов холекальциферола и поступление витамина D с пищей, продол-

жительность солнечного сияния, функция легких, генотип по гену *CFTR*, осложнения и терапия МВ, регион проживания, влияние генетических факторов. Исследование выполнено в дизайне открытого проспективного, многоцентрового когортного с соблюдением принципов доказательной медицины (отбор больных и статистическая обработка результатов). Дизайн представлен в Таблице 1.

Таблица 1 – Дизайн исследования влияния генетических и экзогенных факторов на развитие дефицита витамина D у детей и подростков с муковисцидозом

<i>Группы</i>	<i>Клинические показатели и экзогенные факторы</i>	<i>Генетические факторы</i>
Здоровые N = 333	I. Возраст II. Пол III. Антропометрические показатели: рост, см; масса тела, кг; ИМТ, кг/м ² ; ИМТ перцентиль; ИМТ Z-критерий; рост перцентиль; рост Z критерий	<u>I фазы биотрансформации ксенобиотиков:</u> <i>CYP2C9*3</i> (1075A > C; I359L, rs1057910), <i>CYP3A4*3</i> (c.1334T > C; M445T, rs4986910)
Муковисцидоз N = 283	IV. Оценка витамина D поступающего с пищей V. Оценка профилактической дозы витамина D VI. Спирометрия (ОФВ ₁ и ФЖЕЛ) VII. Осложнения VIII. Терапия IX. Сезон года X. ССП XI. Регион проживания XII. Биохимические показатели: кателицидин LL-37, α-1-3-дефензина (HNP1-3)	<i>CYP2C9*2</i> (c.430C > T; R144C, rs1799853), <i>CYP2D6*4</i> (c.1846G > A, rs3892097), <i>CYP3A4*1B</i> (c.-392C > T, rs2740574) <u>VDR: FokI</u> (rs2228570, NM_000376.2:c.2T > C) <i>TaqI</i> (rs731236, NM_000376.2: c.1056T > C) <i>BsmI</i> (rs1544410, NM_000376.2: c.1024+283G > A)

Методы

Клинико-инструментальные методы исследования

Использовался клинико-анамнестический метод. Обследование пациентов проводили согласно стандарту обследования пациентов с муковисцидозом и клиническим рекомендациям (2016, 2020).

Для оценки показателей роста и массы детей использовали стандартные показатели для оценки физического развития детей ВОЗ, такие как ИМТ по Quetelet, рассчитанному по стандартной формуле: ИМТ, кг/м² = масса (кг)/рост м², ИМТ перцентиль ИМТ Z-критерий (Antro, AntroPlus). По Z-критерию (метод сигмальных отклонений) нормы устанавливали отличные от рекомендаций ВОЗ для здоровых детей, так как при МВ определены целевые значения для ИМТ и длины/роста – 0 SD (ESPEN-ESPGHAN-ECFS, 2016). В связи с этим за норму принимали ИМТ/рост: Z-критерий от 0 SD до +1 SD – норма.

Состояние функции легких анализировали по данным форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ) и объема форсированного выдоха за одну секунду (ОФВ₁) (Polgar G. et al., 1971).

Идентификацию бактерий проводили согласно алгоритму микробиологической диагностики мокроты, разработанный сотрудниками лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекции ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (Чернуха М.Ю., 2017).

Данные о поступлении витамина D с пищей у пациентов с муковисцидозом были получены с помощью анализа 3-дневного меню анкетно-опросным методом. Дозу холекальциферола фиксировали при каждом заборе крови, при условии ее приема не менее 1 месяца.

Данные о продолжительности солнечного сияния (количество солнечных часов в месяц в изучаемые года) были получены из архива метеорологической службы для каждого региона (<http://meteoweb.ru>).

Биохимические и молекулярно-генетические исследования

Все биохимические и генетические исследования проведены в ФГБНУ «МГНЦ». Определение концентрации 25(ОН)D в сыворотке крови проводилось методом иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы EuroimmunAG (Германия).

Определение концентрации АМП (кателицидина LL-37, α -1-3-дефензина (HNP1-3) в сыворотке крови проводилось иммуноферментным методом с помощью наборов Nycultbiotech.

Молекулярно-генетические исследования гена *CFTR* проводили согласно алгоритму (Национальный консенсус. Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия, 2016). Информация о генотипе по гену *CFTR* пациентов РФ взята из базы данных ФГБНУ «МГНЦ».

Изучение полиморфных вариантов генов 1-й фазы биотрансформации ксенобиотиков проводилось с помощью амплификации соответствующих участков генома методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), анализ полиморфных вариантов гена *VDR* проводили методом рестрикционного анализа (ПДРФ).

Статистический анализ

Статистическая обработка проводилась с помощью программы IBM SPSS Statistics и программы MDR 3.0.2 (для исследования ассоциации уровня витамина D с полиморфизмом гена *VDR*). Для описания исходной выборки применялись среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD), медиана (Me) и квартили: Q1 (25%) и Q3 (75%). При сравнении средних применялся t-критерий Стьюдента, при сравнении медиан применялся критерий Манна – Уитни (Mann – Whitney U-test). Применяли параметрический однофакторный дисперсионный анализ (попарное сравнение критерием Шеффе), непараметрический дисперсионный анализ Краскала – Уоллиса (попарное сравнение критерием Манна – Уитни), тест независимости χ^2 по таблице сопряженности, анализ долей проводили с помощью z-критерия. При исследовании генетического полиморфизма в группах использовали точный критерий Фишера, учитывалось равновесие Харди – Вайнберга. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

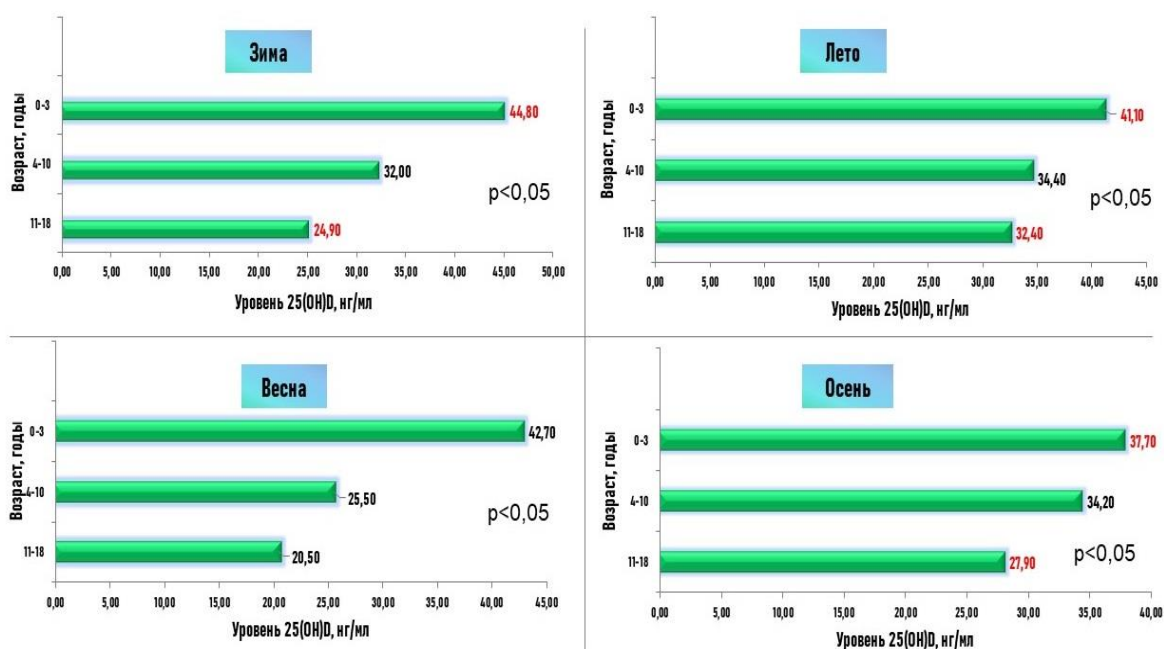
Результаты исследования в изучаемой выборке здоровых детей показали, что уровень витамина D составил $32,7 \pm 17,5$ нг/мл. Нормальное содержание 25(OH)D отмечено в 48,5% случаях, недостаточность – 30,1%, дефицит 19,8%, выраженный дефицит – 1,6% (Таблица 2).

Таблица 2 – Частота здоровых детей и подростков с различным уровнем обеспеченности витамином D (n, %) в различных регионах

Регион	Количество детей (n, %)				
	Нормальное содержание	Недостаточность	Дефицит	Выраженный дефицит	p
Москва (1)	76 (50,3%)	46 (30,5%)	27 (17,9%)	2 (1,3%)	p ₁₋₂ < 0,05
Красноярск (2)	51 (37,2%)	48 (35,1%)	33 (24,1%)	5 (3,6%)	
Ставрополь (3)	89 (56,7%)	40 (25,5%)	28 (17,8%)	0	p ₂₋₃ < 0,05
Всего в РФ	216 (48,5%)	134 (30,1%)	88 (19,8%)	7 (1,6%)	
Примечание. Применялся Z критерий сравнения долей					

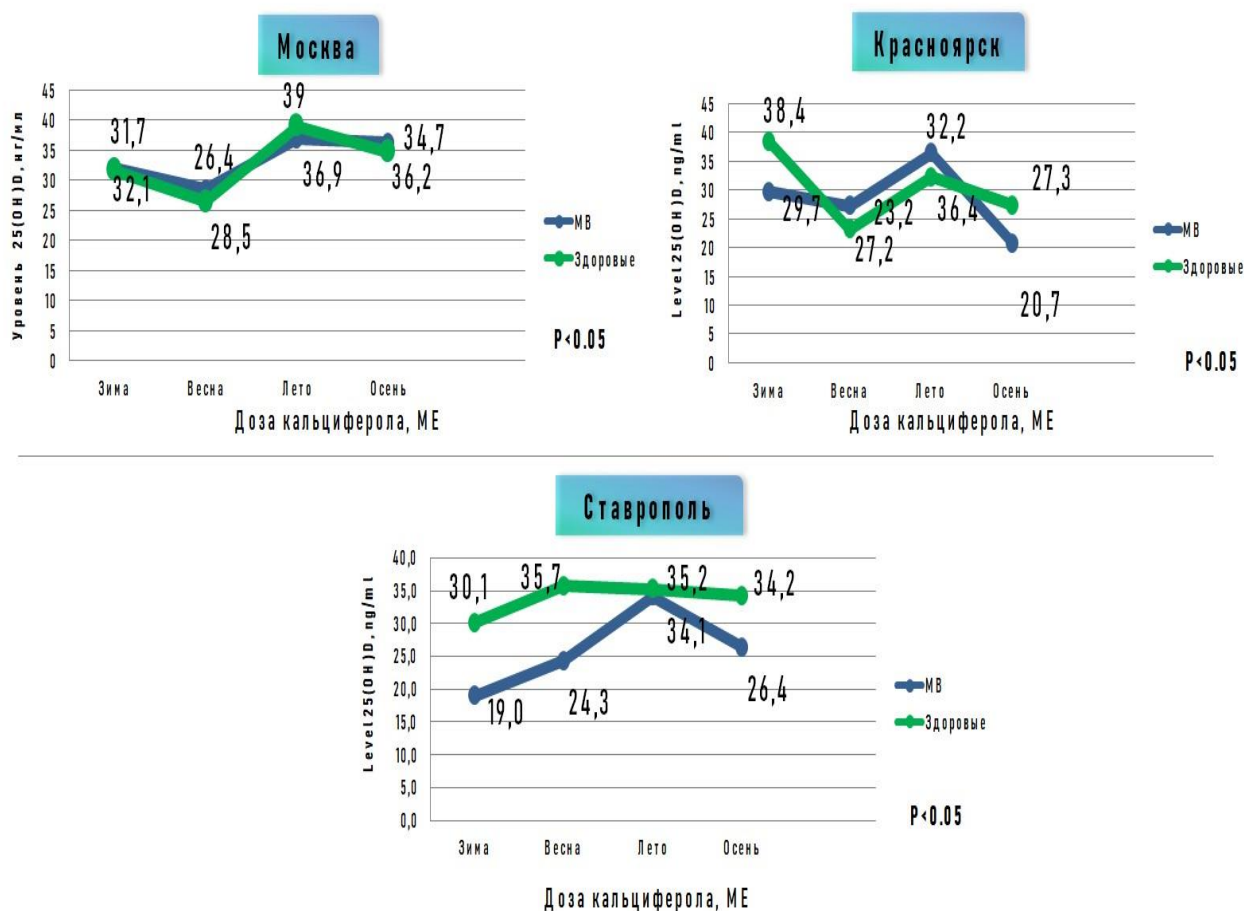
Установлено, что с возрастом уровень кальцидиола у здоровых детей снижается с 41,4 нг/мл (Me) в раннем возрасте до 32,3 нг/мл у детей 4–10 лет ($p = 0,002$), достигая минимума в подростковом возрасте – 26,9 нг/мл (Me) ($p < 0,001$), при этом мальчики-подростки имели достоверно более низкий показатель 25(OH)D по сравнению с девочками этой возрастной группы ($p < 0,05$).

У здоровых детей от 0–3 лет средний уровень витамина D соответствовал норме во всех сезонах. В группе детей от 4–10 лет достоверно низкий уровень витамина D наблюдался весной по сравнению с летом. У подростков средний уровень 25(OH)D был ниже нормы во всех сезонах (Рисунок 1). Самый низкий уровень отмечен весной и зимой у подростков. Количество детей с нормальным содержанием 25(OH)D было достоверно выше в Московском регионе и Ставропольском крае по сравнению с Красноярским краем (Рисунок 2) ($p < 0,05$).



Примечание. Применялся критерий Манна – Уитни, p – уровень значимости различий

Рисунок 1 – Средний уровень 25(OH)D (нг/мл) у детей в зависимости от возраста и сезона года



Примечание. Применялся критерий Манна – Уитни

Рисунок 2 – Уровень 25(OH)D (нг/мл) у здоровых детей и пациентов с МВ трех регионов РФ в разные сезоны года

В Московском регионе высокий показатель 25(OH)D наблюдался в летнее время года, а низкий – весной. В Красноярском регионе зимой у детей регистрировался самый высокий средний уровень витамина D, в то время как низкий был выявлен весной. Что, возможно, обусловлено большей приверженностью к профилактике дефицита витамина D у пациентов Сибири в зимний период. Высокие показатели 25(OH)D в Ставропольском крае связаны с высокой комплаентностью в группе обследованных детей, часть из которых принимала участие в исследованиях Родничок, Родничок 2 (Захарова И.Н., 2014, 2016).

Важнейшим этапом анализа явилось сравнение уровней кальцидиола у здоровых детей (Рисунок 5, стр. 17). Показано, что уровень 25(OH)D достоверно увеличивается в зависимости от профилактической дозы холекальциферола в зимнее время года. Весной и осенью получен низкий уровень 25(OH)D у детей, принимавших 500 МЕ холекальциферола и менее. Летом концентрация 25(OH)D в сыворотке крови детей достигает большего значения при приеме дозы 500–1000 МЕ холекальциферола. Однако только при дозе более 1000 МЕ в зимнее время достигаются нормальные показатели 25(OH)D с учетом квартильного размаха (44,60–69,30).

В данном исследовании не было обнаружено значимых различий по содержанию 25(OH)D у пациентов с генотипами полиморфных вариантов генов цитохрома P450: CYP2C9*3, CYP3A4*3, CYP2C9*2, CYP2D6*4, CYP3A4*1B и TaqI, FokI, BsmI гена VDR и уровнем 25(OH)D.

Обеспеченность витамином D детей с муковисцидозом

Впервые в РФ, по результатам исследования содержания витамина D у больных муковисцидозом в 3 регионах, получены данные о высокой частоте недостаточности и дефиците 25(OH)D. Уровень витамина D у пациентов с муковисцидозом составил $30,2 \pm 15,7$ $28,7 (19,6–39,2)$ нг/мл. Нормальное содержание 25(OH)D отмечено в 49,3% случаях, недостаточность – 26,3%, дефицит 16,7%, выраженный дефицит – 7,7%.

С возрастом уровень 25(OH)D становится ниже: с 35,7 нг/мл в раннем возрасте до 31,1 нг/мл у детей 4–10 лет и 24,7 нг/мл у подростков ($p < 0,05$).

Уровень витамина D оказывает влияние на функцию легких, у пациентов с МВ. Показатели ЖЕЛ и ОФВ₁ < 80% были достоверно ниже при уровне 25(OH)D < 30 нг/мл (Таблица 3).

Таблица 3 – Сравнительный анализ среднего уровня 25(OH)D (нг/мл) и ОФВ₁, ($M \pm m$, Me (Q1–Q3))

Показатель	Московский регион, n = 150	Красноярский край, n = 62	Ставропольский край, n = 62	Общая группа, n = 274
ОФВ ₁ > 80% (1)	$32,0 \pm 13,5$ 29,6 (22,7–39,2)	$28,7 \pm 13,3$ 28,3 (19,6–42,9)	$23,0 \pm 10,9$ 22,7 (14,0–29,0)	$30,0 \pm 13,5$ 28,2 (21,3–37,4)
ОФВ ₁ < 80% (2)	$26,7 \pm 17,1$ 21,3 (16,3–32,5)	$21,5 \pm 10,5$ 20,9 (12,2–29,7)	$24,3 \pm 13,8$ 23,1 (14,2–33,6)	$24,7 \pm 14,4$ 22,1 (15,1–32,8)
p	$p_{M1-2} = 0,001$	$p_{K1-2} = 0,001$	$p > 0,05$	$p_{1-2} = 0,001$

Примечание. Применялся t-критерий Стьюдента

В связи с недостаточным количеством пациентов с осложнениями (сахарный диабет, аспергиллез, пневмоторакс, цирроз печени, мекониевый илеус, остеопороз) и получавших терапию системными и ингаляционными ГКС, оценить их влияние на уровень 25(ОН)D не представлялось возможным. Влияние ферментной терапии на уровень 25(ОН)D не установлено ($p > 0,05$).

Влияние сезона года, региона проживания и ПСС на обеспеченность витамином D детей с муковисцидозом

При сравнительном анализе данных общей группы вне зависимости от возраста и места проживания в зимний период уровень 25(ОН)D у пациентов с МВ на 20,8% ниже ($M - 28,4$, $Me - 29,2(24,6-31,2)$), чем у здоровых ($M - 33,4$; $Me - 29,2 (2,9 - 39,1)$, $p = 0,003$ (Таблица 4).

Статистически достоверных различий по числу обследованных с дефицитом, недостаточностью и нормальной обеспеченностью витамином D в изучаемых регионах, не было.

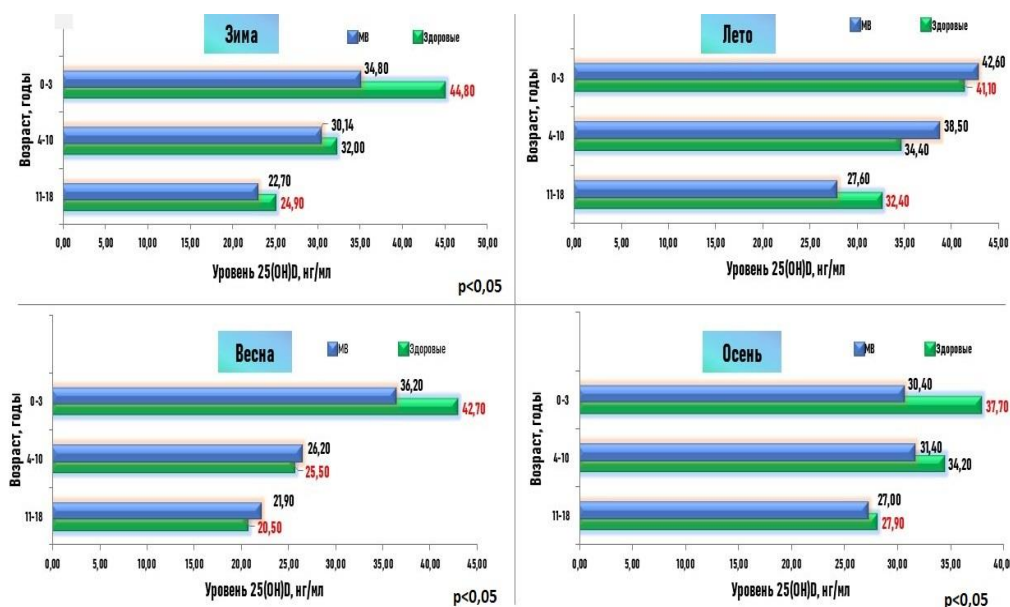
У пациентов с МВ и здоровых детей от 0–3 лет средний уровень витамина D соответствовал норме во всех сезонах. У подростков группы (пациентов с МВ и здоровых) средний уровень витамина D был ниже нормы во всех сезонах.

Таблица 4 – Уровень 25(ОН)D (нг/мл) у детей с МВ и здоровых детей в зависимости от сезона года ($M \pm m$, $Me(Q1-Q3)$)

Сезон	Пациенты с МВ	Здоровые дети	p
Зима (1)	28,4±16,8 29,2 (25,6–31,2)	33,4±19,8 29,2 (22,9–39,1)	p < 0,005
Весна (2)	27,5±13,2 28,4 (25,5–29,5)	28,7±18,2 23,5 (16,4–34,1)	p > 0,05
Лето (3)	36,0±15,9 36,8 (33,2–38,8)	35,0±14,9 30,7 (24,57–42,59)	p > 0,05
Осень (4)	29,8±16,1 30,6 (27,2–32,5)	32,9±16,3 30,3 (21,7–40,1)	p < 0,005
Р между сезонами	p1-3 = 0,001 p2-3 = 0,000 p3-4 = 0,010	p1-2 = 0,008 p2-3 = 0,000 p2-4 = 0,005	
Примечание. Применялся t-критерий Стьюдента			

Самый низкий уровень отмечен во 2-й и 3-й возрастных группах больных МВ и здоровых подростков – весной и зимой. Было получено достоверное отличие в содержании 25(ОН)D нг/мл у пациентов с МВ в зимний и летний период ($p > 0,05$), весенний и летний ($p < 0,005$), весенний и осенний период ($p < 0,05$) в средней (4–10 лет) и старшей возрастной группе (подростки) (Рисунок 3). Наибольший процент детей с нормальной обеспеченностью витамином D выявлен в московском регионе (52%). Далее, в порядке

убывания – Красноярск, в котором этот показатель был у 42% детей. Наименьший процент детей с уровнем кальцидиола более 30 нг/мл выявлен в Ставропольском крае (37%) (Рисунок 4).



Примечание. Применялся критерий Манна–Уитни.

Рисунок 3 – Средний уровень 25(OH)D (нг/мл) у пациентов с МВ в зависимости от возраста и сезона года

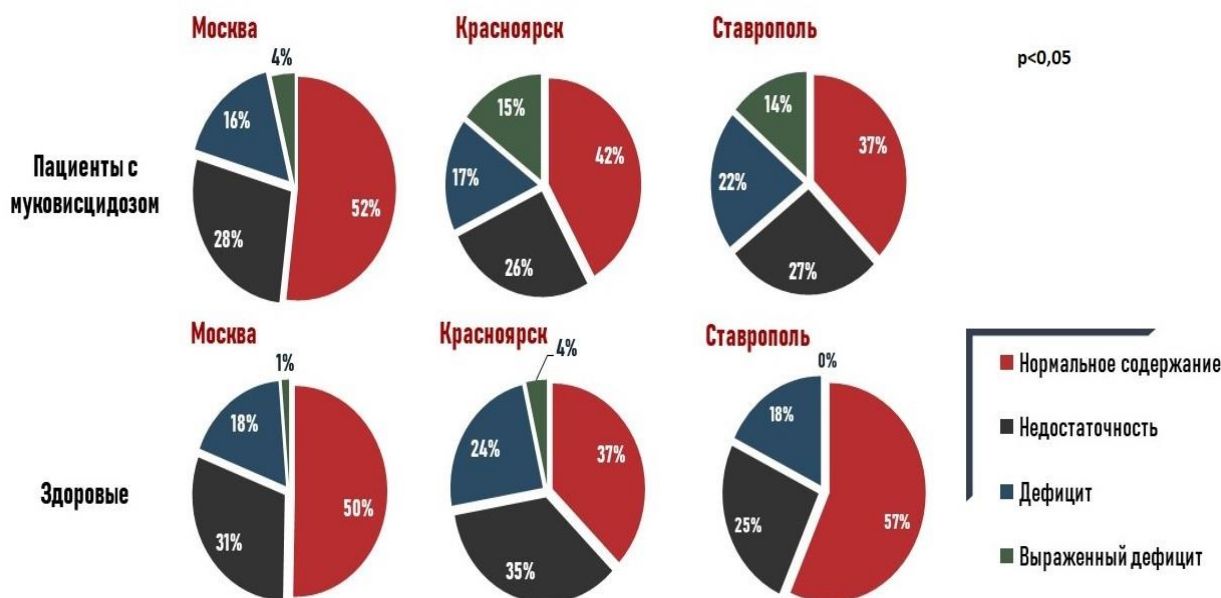


Рисунок 4 – Обеспеченность витамином D (25(OH)D нг/мл) пациентов с муковисцидозом и здоровых детей в регионах

Минимальный уровень витамина D зафиксирован у детей, проживающих в Ставрополе (43,60с.ш.), в то время как у детей, проживающих в Московском регионе и в Красноярском крае он выше (Рисунок 2).

Установлено влияние продолжительности солнечного сияния (ПСС) на уровень витамина D при отсутствии профилактики и дозе витамина D до 500МЕ, применение

профилактических доз более 500 ЕД данное влияние нивелирует. Таким образом, климато-географическое место проживания пациентов в регионах с различным уровнем инсоляции не имеет значимого влияния на статус витамина D у пациентов с муковисцидозом при назначении адекватной профилактической дозы холекальциферола.

Влияние поступления витамина D с пищей и при использовании профилактических доз холекальциферола

Установлено, что основная часть пациентов (1/2) получала витамин D с пищей в дозе до 0,5 мкг (20МЕ) в сутки, 1/3 – 0,5– 2 мкг (20–80МЕ) в сутки, остальные – более 2 мкг в сутки. При анализе влияния поступления витамина D с пищей и различных профилактических доз холекальциферола на уровень витамина D в сыворотке крови, значимое отличие было получено у пациентов, получающих дозу витамина $D \leq 500 \text{ ME}$ ($p = 0,024$ при использовании метода Спирмена). При сапплементации более высокими дозами достоверного влияния не получено.

При оценке влияния профилактической дозы холекальциферола на уровень витамина D были получены данные о различном приросте 25(OH)D у пациентов с МВ и здоровых детей. Доза холекальциферола 500–1000МЕ/сут позволяет достичь нормального уровня 25(OH)D у здоровых детей, у части пациентов с МВ достичь целевого уровня 25(OH)D 50нг/мл удастся при назначении более 2000 МЕ/сут (Рисунок 5).

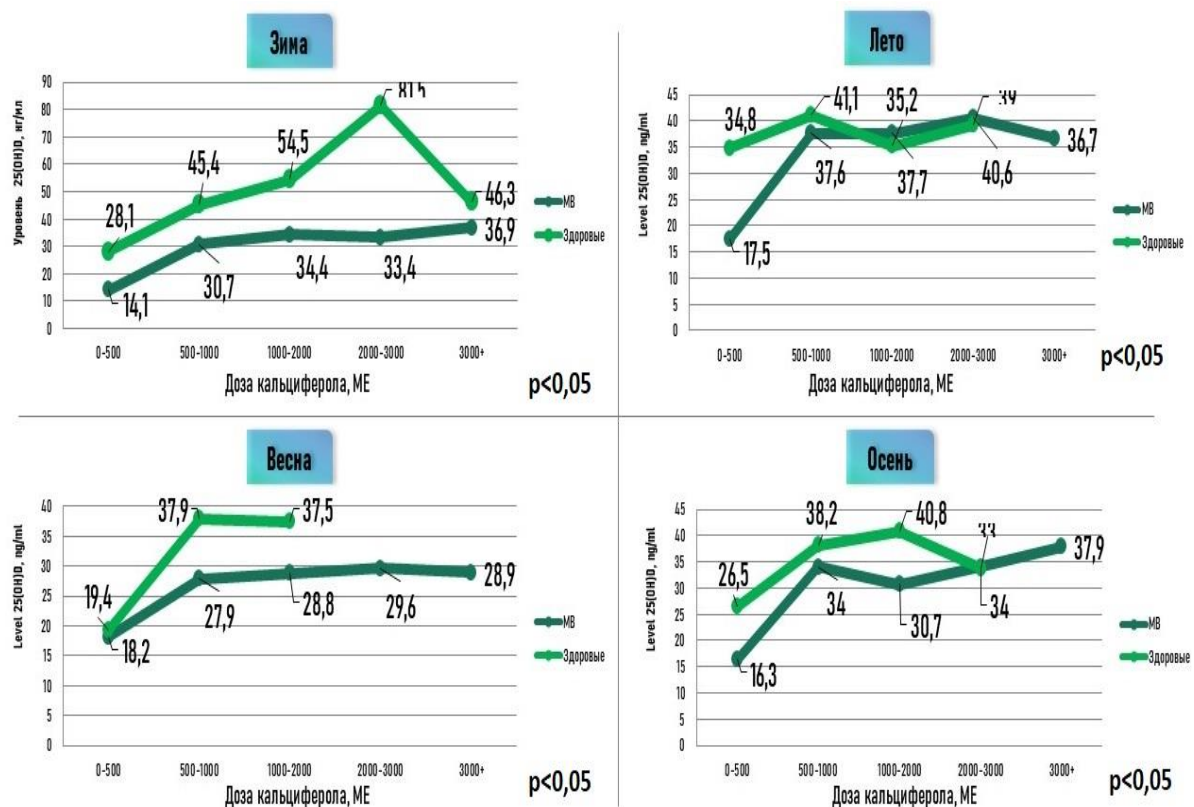


Рисунок 5 – Средний уровень 25(OH)D (нг/мл) у пациентов с муковисцидозом и здоровых детей в зависимости от принимаемой профилактической дозы холекальциферола в разные сезоны года

Витамин D и АМП

Результаты нашего исследования показали, что уровень АМП (HNP 1–3 и LL-37) достоверно повышен у детей с МВ в общей группе по сравнению со здоровыми детьми. Уровень HNP 1–3 у пациентов с МВ составляет $6453,8 \pm 6525,3$ пг/мл, у здоровых детей – $3984,6 \pm 5022,2$ пг/мл ($p < 0,001$). Уровень LL-37 у пациентов с МВ $53,7 \pm 32,9$ нг/мл, у здоровых детей $39,2 \pm 14,1$ нг/мл ($p < 0,001$). В отличие от здоровых детей, содержание HNP 1–3 и LL-37 увеличивается с возрастом у пациентов с муковисцидозом ($p < 0,001$).

В нашей работе получена связь между уровнем витамина D и средним уровнем α -дефензина, пациенты с уровнем $25(\text{OH})\text{D} > 30$ нг/мл имели достоверно более низкий уровень дефензина – $5329,7 \pm 4419,4$ ($2815,0$ – $6650,1$) пг/мл по сравнению с пациентами с недостаточностью витамина D ($25(\text{OH})\text{D} < 30$ нг/мл) – $6147,4 \pm 5300,1$ ($3005,0$ – $8000,0$) пг/мл ($p = 0,001$) (Рисунок 6).

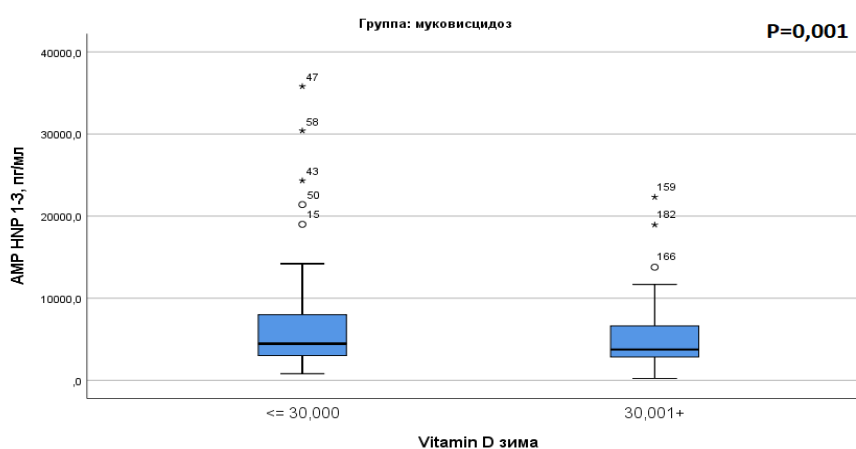


Рисунок 6 – Содержание HNP 1–3 (пг/мл) у пациентов с МВ в зависимости от наличия недостаточности и дефицита витамина D ($25(\text{OH})\text{D} < 30$ нг/мл)

При оценке показателей функции дыхания и нутритивного статуса у пациентов с муковисцидозом были получены достоверно более высокие значения кателицидина у пациентов с низкой функцией ($\text{ОФВ}_1 < 80$) (Рисунок 7) и низкими показателями физического развития (Z-score ИМТ), а также более высокие показатели дефензинов у пациентов с Z-score ИМТ менее -2δ .

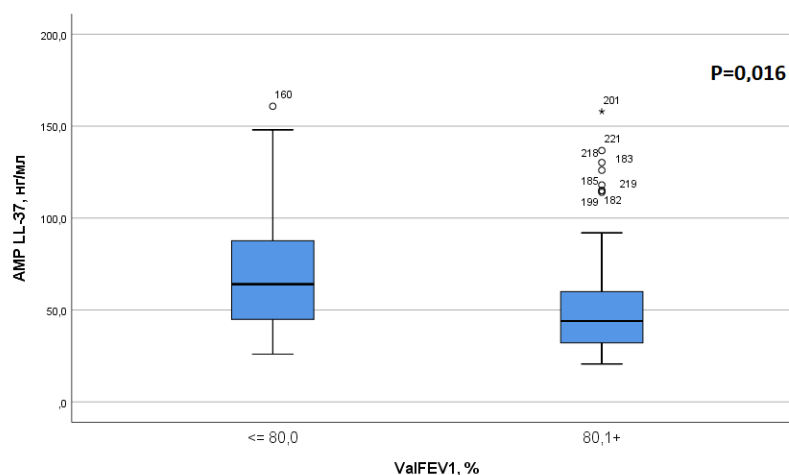


Рисунок 7 – Содержание LL-37 нг/мл у пациентов в зависимости от функции легких ($\text{ОФВ}_1 > 80\%$)

Полученные данные могут указывать на повышение уровня АМП на фоне прогрессирования заболевания, а также может быть связано с тяжестью состояния пациента. Повышение уровня АМП при МВ определяется, вероятно, влиянием ряда факторов, витамин D не играет определяющей роли.

Влияние генетических факторов на уровень 25(OH)D

При анализе влияния полиморфных вариантов генов 1-й фазы биотрансформации ксенобиотиков *CYP2C9*3* (I359L;1075A > C), *CYP2C9*2* (R144C; 430C > T), *CYP2D6*4* (1846G > A), *CYP3A4* (с.1334T > C), *CYP3A4*1B* (392C > T) на уровень 25(OH)D у здоровых и пациентов с МВ зависимости получено не было. Установлено влияние полиморфизмов гена *VDR* на уровень витамина D у пациентов с МВ. Содержание витамина D было достоверно ниже у детей с генотипом CC полиморфизма TaqI (с.1206T > C(A > G), чем у пациентов с генотипами TT, TC (Таблица 5).

Таблица 5 – Содержание витамина D (нг/мл) по группе детей с МВ в зависимости от генотипов полиморфизма *VDR* с.1206T > C (A > G) – TaqI (M±m)

Генотип	n	25(OH)D, нг/мл	Значимость различий тест Шеффе / Манна – Уитни		
			P ₁₋₂	P ₁₋₃	P ₂₋₃
TT (1)	98	30,0±16,6	0,917/0,769	0,085/0,014	0,153/0,017
TC (2)	89	29,0±15,6			
CC (3)	24	21,9±12,8			
Всего	211	28,7±15,9			

Достоверных ассоциаций полиморфизмов FokI (с.152T > C) и BsmI (с.1174+283G > A) с уровнем 25(OH)D не установлено. При совместном влиянии трех полиморфизмов гена *VDR* наибольший уровень витамина D наблюдается при сочетанном генотипе TaqI (TT) – FokI (TT) – BsmI (GG) в виде увеличения уровня 25(OH)D на 40,23 нг/мл от среднего у детей исследуемой группы с МВ, а выраженный дефицит отмечен при гаплотипах: TaqI (CC) – FokI (CC) – BsmI (AA) в виде снижения уровня 25(OH)D на 18,27 нг/мл от среднего детей исследуемой группы с МВ, TaqI (TC) – FokI (TT) – BsmI (AA) на -18,17 нг/мл и TaqI (CC) – FokI (TC) – BsmI (GA) на -14,07 нг/мл (Рисунок 8).

Изучение совместного влияния трех полиморфизмов гена *VDR* позволило выявить гаплотипы, угрожаемые по дефициту витамина D. Полученные данные могут быть полезны при подборе дозы витамина D в случае неэффективности применения профилактических доз.

Исследование эффективности профилактики дефицита витамина D при МВ в 2016–2018 годах

Исследование эффективности применения более высоких профилактических доз витамина D у пациентов с МВ московского региона в 2016–2018 годах показало, что процент детей с недостаточностью и дефицитом витамина D в средней (4–10 лет) и

старшей (11–18 лет) возрастной группе пациентов с МВ при применении повышенных доз витамина D снизился двукратно (Рисунок 9).

GG			PctIBsmI _{GA}			AA		
1			2			3		
TaqI			TaqI			TaqI		
1			1			1		
TC			TC			TC		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1			1			1		
FokIBstFI			FokIBstFI			FokIBstFI		
2			2			2		
CC			CC			CC		
3			3			3		
TT			TT			TT		
1</								

Регулярный прием индивидуально подобранных профилактических доз витамина D позволил нивелировать разницу в уровне 25(OH)D в крови между летними, весенними и зимними показателями. В зимний период 2018 г. было получено увеличение доли детей с нормальным содержанием витамина D в 2,1 раза ($p = 0,001$), в осенний период 2018 г. – в 3,0 раза ($p = 0,001$) по сравнению с исследованием 2016 г. (Рисунок 9).

Тем не менее, доля пациентов с недостаточностью и дефицитом витамина D по-прежнему достигает 42% в средней возрастной группе и 70% у подростков, что показывает необходимость использовать лечебные дозы.

В результате анализа всех выше перечисленных данных, на основе изученных молекулярных механизмов, экзогенных факторов, была создана модель развития дефицита витамина D при муковисцидозе (Рисунок 10) и алгоритм диагностики гиповитаминоза D и подбора профилактических доз холекальциферола (Рисунок 11).



Рисунок 10 – Модель развития дефицита витамина D при муковисцидозе

В модели отражены следующие факторы риска: возраст (дети старше 4 лет), сезон года (зима, весна, осень), отсутствие приема или низкая профилактическая доза холекальциферола, гаплотипы гена VDR TaqI (CC) – FokI (CC) – BsmI (AA), TaqI (TC) – FokI (TT) – BsmI (AA) и TaqI (CC) – FokI (TC) – BsmI (GA). Также указано влияние низкого уровня витамина D на содержание АМР, как маркера тяжелого течения МВ (повышение), и функцию легких (снижение).

Алгоритм диагностики и подбора профилактической дозы представлен на Рисунке 11 и учитывает наличие факторов риска в каждой возрастной группе.



Рисунок 11 – Алгоритм диагностики и подбора профилактической дозы холекальциферола для детей и подростков с муковисцидозом

Таким образом, при проведении многоцентрового исследования обеспеченности здоровых детей и пациентов с муковисцидозом в трех регионах РФ, рекомендуемый уровень 25(ОН)D был выявлен у 48,5% здоровых детей и 49,3% детей с муковисцидозом. Факторами, оказывающими существенное влияние на обеспеченность витамином D детей с муковисцидозом в Российской Федерации, являются возраст (> 4 лет), сезон года (весна, зима, осень), профилактическая доза холекальциферола менее 1000 МЕ и гаплотипы полиморфных вариантов гена *VDR*. При этом статус витамина D при МВ не зависит от пола, климато-географических особенностей региона проживания, поступления витамина D с пищей и ПСС при проведении профилактики адекватными дозами холекальциферола и полиморфизмов гена 1 фазы метаболизма ксенобиотиков (*CYP*).

На основе комплексного подхода к изучению факторов, влияющих на уровень витамина D, была создана модель развития дефицита витамина D при муковисцидозе и разработан алгоритм диагностики дефицита витамина D у детей с муковисцидозом в различные возрастные периоды с учетом факторов риска. Персонализированный подход к подбору профилактической дозы витамина D, указанный в алгоритме, может обеспечить адекватный уровень кальцидиола и профилактировать недостаточность витамина D независимо от региона проживания и питания ребенка.

Выводы

1. Результаты исследования показали, что уровень витамина D у здоровых детей составил $32,7 \pm 17,5$ нг/мл. Нормальное содержание 25(ОН)D отмечено в 48,5% случаях, недостаточность – 30,1%, дефицит 19,8%, выраженный дефицит – 1,6%. Уровень 25(ОН)D снижается с возрастом: с 41,4 нг/мл в раннем возрасте до 26,9 нг/мл у подростков.

2. Установлено, что среди пациентов с муковисцидозом, проживающих в трех регионах Российской Федерации, дефицит витамина D выявлен в 40,1%, недостаточность – в 27,1%, нормальная обеспеченность зарегистрирована лишь у 32,1%. Уровень 25(ОН)D

снижается с возрастом: с 35,7 нг/мл у детей от 0 до 3 лет, 31,1 нг/мл – у детей от 4 до 10 лет, до 24,7 нг/мл у подростков.

3. Доказано, что сезон года достоверно влиял на обеспеченность детей витамином D: в летний сезон уровень 25(OH)D составлял 36,0 нг/мл, осенью – 29,8 нг/мл, зимой – 28,4 нг/мл, весной – 27,5 нг/мл ($p < 0,05$). Взаимосвязь между обеспеченностью витамином D и географическим расположением исследовательского центра не подтверждена, а определяется организацией профилактики гиповитаминоза D и дозой холекальциферола.

4. Обеспеченность витамином D определяет функцию легких, не зависит от хронической граммотрицательной инфекции. Уровень HNP1–3 при муковисцидозе повышен 1,6 раза, а LL-37 в 1,4 раза по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$), увеличивается с возрастом ($p < 0,001$) и находится в обратной зависимости от уровня 25(OH)D.

5. Не обнаружено влияние полиморфизмов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков (*CYP2C9*3* (1075A > C; I359L), *CYP2C9*2* (430C > T; R144C), *CYP2D6*4* (1846G > A), *CYP3A4*1B* (-392C > T), *CYP3A4* (с.1334T > C)) на уровень 25(OH)D в группе здоровых детей и при муковисцидозе.

6. Установлено низкое содержание 25(OH)D при CC генотипе (CC – 21,9 нг/мл против TT – 30,0, CT – 29,0, $p = 0,014$) полиморфизма *VDR* с.1206T > C(A > G) – TaqI. Выявлены гаплотипы, угрожаемые по дефициту витамина D, включающие три полиморфизма гена *VDR* (TaqI (CC) – FokI (CC) – BsmI (AA), TaqI (TC) – FokI (TT) – BsmI (AA), TaqI (CC) – FokI (TC) – BsmI (GA)).

7. Предложена модель развития дефицита витамина D при муковисцидозе на основе изученных молекулярных механизмов, экологических и внутренних факторов, а также алгоритм диагностики и профилактики на основе комплекса полученных данных.

8. Показана эффективность организации профилактики гиповитаминоза D при муковисцидозе с помощью разработанного алгоритма в период с 2016 по 2018 гг. в виде увеличения уровня витамина D на 34% у пациентов 4–10 лет и в подростковой группе на 50%, нивелирована разница в уровне витамина в летний, весенний и зимний сезон.

Практические рекомендации

Степень гиповитаминоза D устанавливается в соответствии с рекомендациями Международного общества эндокринологов (Holick M.F., 2011).

Группы риска и сезоны года, угрожаемые по гиповитаминозу D:

1. Пациенты старше 4 лет, особенно подростки.
2. Весенний, зимний и осенний период.
3. Генетические маркеры:
 - 3.1. Носители генотипа CC полиморфизма *VDR* с.1206T > C(A > G) – TaqI, или
 - 3.2. Носители гаплотипов гена *VDR*:
 - TaqI (CC) – FokI (CC) – BsmI (AA),
 - TaqI (TC) – FokI (TT) – BsmI (AA),
 - TaqI (CC) – FokI (TC) – BsmI (GA).

II. Динамический контроль уровня 25(OH)D:

- рекомендован 4 раза в год детям старше 3 лет,
- 1-2 раза детям до 3 лет.

III. Профилактическая доза витамина D:

- для детей 1 года жизни – 1000 МЕ/сут,
- 1–3 года – 1500 МЕ/сут,
- 3–10 лет – 2000–3000 МЕ/сут,
- 10 лет – от 3000 (лето, осень) до 4000 (зима, весна) МЕ/сут

V. При отсутствии эффекта от профилактической дозы витамина D терапевтическую дозу рекомендовано назначать после определения генотипа полиморфизма VDR с.1206T > C(A > G) – TaqI и /или гаплотипа полиморфизмов гена VDR (с.1206T > C(A > G), (с.152T > C), (с.1174+283G > A).

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

На основании полученных результатов планируется разработка алгоритма приема терапевтических доз холекальциферола для пациентов с муковисцидозом, внедрение данного алгоритма в клинические и методические рекомендации. Создание программы мониторинга уровня 25(OH)D и плотности костной ткани с целью профилактики снижения плотности костной ткани у пациентов с муковисцидозом.

СПИСОК НАУЧНЫХ ТРУДОВ АВТОРА, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ:

1. Кондратьева Е.И., Жекайте Е.К., Шмарина Г.В., Никонова В.С., Воронкова А.Ю., Шерман В.Д., Костюк С.В. Содержание витамина D в разные периоды года при муковисцидозе у пациентов Московского региона // Вопросы детской диетологии. 2017. № 4. С. 21–27. DOI 10.20953/1727-5784-2017-4-21-27.

2. Кондратьева Е.И., Жекайте Е.К., Воронкова А.Ю., Шерман В.Д. Влияние дефицита витамина D на клинические проявления муковисцидоза у детей Московского региона // Доктор.Ру. 2018. № 11 (155). С. 15–20. DOI 10.31550/1727-2378-2018-155-11-15-20.

3. Ильенкова Н.А., Климов Л.Я., Жекайте Е.К., Чикунов В.В., Мельяновская Ю.Л., Долбня С.В., Зодьбинова А.Э. Обеспеченность витамином D детей с муковисцидозом в Российской Федерации в зимнее время года // Сибирское медицинское обозрение. 2019. № 2. С. 29–36. DOI: 10.20333/ 2500136-2019-2-29-36.

4. Климов Л.Я., Долбня С.В., Кондратьева Е.И., Дятлова А.А., Енина Е.А., Курьянинова В.А., Касьянова А.Н., Жекайте Е.К., Бобрышев Д.В., Маркарова И.В., Вдовина Т.М., Шафорост А.А.. Обеспеченность витамином D детей и подростков с муковисцидозом, проживающих на юге России, в зимнее время года // Медицинский совет. 2019. № 2. С. 240–249. DOI 10.21518/2079-701X-2019-2-240-249.

5. Кондратьева Е.И., Жекайте Е.К., Одинаева Н.Д., Воронкова А.Ю., Шерман В.Д., Лошкова Е.В., Мельяновская Ю.Л., Зодьбинова А.Э., Шубина Ю.Ф., Будзинский Р.М.. Динамика показателей обеспеченности витамином D страдающих муковисцидозом детей Московского региона за 2016–2018 гг. // Вопросы питания. 2020. Том 89, № 2. С.96–105. (Scopus)

6. Жекайте Е.К., Климов Л.Я., Долбня С.В., Кондратьева Е.И., Ильенкова Н.А., Курьянинова В.А., Чикунов В. В., Енина Е.А., Шерман В.Д., Мельяновская Ю.Л.

Активность антимикробных пептидов у детей с муковисцидозом // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2020. № 15 (2). С. 195–200. DOI 10.14300/mnnc.2020.15047. (Scopus)

Публикации в других изданиях:

7. *Zhekaite E.*, Kondratyeva E., Sherman V., Voronkova A., Shabalova L., Kostyuk S. Vitamin D deficiency in children with cystic fibrosis // Gastroenterology Congress with International participation (December 9, 2017. Rīga, Latvia) // VIII Latvian Gastroenterology Congress with International participation abstract book. Rīga, Latvia, 2018. P. 20.

8. Кондратьева Е.И., *Жекайте Е.К.*, Никонова В.С., Воронкова А.Ю., Шерман В.Д. Содержание витамина D в разные периоды года при муковисцидозе у пациентов Московского региона // IV Московский городской съезд педиатров «Трудный диагноз» в педиатрии. Мультидисциплинарный подход. Сборник тезисов. Москва, 2018. С. 84.

9. *Zhekaite E.*, Kondratyeva E., Voronkova A., Sherman V., Nikonova V., Ershova E., Kostyuk S. The influence of genetic factors and phenotype on the development of vitamin D deficiency in children with Cystic fibrosis // 41th European Cystic Fibrosis Conference, Belgrad, Serbia, 6–9 June 2018 // Journal of Cystic Fibrosis. 2018. Vol. 17, supp. 3. S117–S118; 2018IF – 3,858 (Scopus). DOI 10.1016/S1569-1993(18)30502-2.

10. *Zhekaite E.*, Kondratyeva E., Ilyenkova N., Klimov L., Chikunov V., Dolbnya S., Sherman V., Voronkova A., Melyanovskaya Y. Vitamin D status in children with cystic fibrosis in the Russian Federation in the winter season // 42nd European Cystic Fibrosis Conference, Liverpool, United Kingdom, 5–8 June 2019 // Journal of Cystic Fibrosis. 2019 June 01. Vol. 18, supp.1. S48e 01; IF – 3,858 (Scopus). DOI 10.1016/S1569-1993(19)30272-3.

11. Kondratyeva E., *Zhekaite E.*, Ilyenkova N., Klimov L., Chikunov V., Dolbnya S., Sherman V., Voronkova A., Melyanovskay Y. Vitamin D deficiency in patients from three regions of the Russian Federation // 42nd European Cystic Fibrosis Conference, Liverpool, United Kingdom, 5–8 June 2019 // Journal of Cystic Fibrosis. 2018 June 01. Vol., 18, sup. 1, S48; IF – 3,858 (Scopus). DOI 10.1016/S1569-1993 (19) 30272-3.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМП – антимикробные пептиды

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГКС – глюкокортикостероиды

ЖЕЛ – жизненная емкость легких

ИМТ – индекс массы тела

МВ – муковисцидоз

ОФВ₁ – объем форсированного выдоха за 1 сек.

ПСС – продолжительность солнечного сияния

РФ – Российская Федерация

25(ОН)D – 25-гидроксикальциферол

CFTR – ген муковисцидозного трансмембранного регулятора

HNP1–3 – дефензин HNP 1–3

LL-37 – кателицидин LL-37

VDR – ген рецептора витамина D