

Изучение влияния продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D на метаболизм костной ткани (экспериментальное исследование)

Введение

Актуальность исследования

Одной из актуальных проблем современности на сегодняшний день является развитие производства ассортимента пищевых продуктов, обогащенных нутриентами различного вида. В данный ассортимент входят специализированные продукты, предназначенные для различных функциональных задач, а также лечебных и профилактических целей. Это необходимо для сохранения и укрепления здоровья населения в целом, фокусной превентизации болезней, обусловленных неполноценным и несбалансированным питанием. Данная проблема стоит во главе угла таких научных дисциплин, как современная диетология и нутрициология. Концепция функционального питания, основанная на включении в рацион так называемых функциональных продуктов – сокращенно от термина «физиологически функциональные пищевые продукты».

В индустриальных государствах с высокой степенью инсоляции, уровень витамина D достигает наибольших значений, по сравнению с северными странами, однако дефицит данного элемента широко распространена по всей планете во всех возрастных группах и в любое время года. Так, о загрязнённости атмосферного воздуха, в том числе на Ставрополье, как об одном из неблагоприятных факторов, препятствующих синтезу холекальциферола в коже, говорил еще академик Федько Н.А. в 2014 году. Однако, в настоящее время, большинство авторы указывают на то, что именно дефицит поступления витамина D с пищей является основным этиологическим фактором, а приоритет в алиментарной профилактике гиповитаминоза D, отдается детям и подросткам.

По данным многочисленных исследований, дефицит витамина D приводит к нарушению минерального и костного обмена и повышает риск развития хронических заболеваний. Поскольку в современных условиях жизни в городе практически невозможно поддерживать статус витамина D на должном уровне за счет солнечного ультрафиолетового облучения и питания, то необходимо восполнять дефицит витамина D и поддерживать его содержание с помощью добавок витамина D к питанию не только у детей раннего возраста, но и детей старшего возраста, подростков и взрослых.

Также, хорошо известно, что формирование костной ткани начинается с первых дней внутриутробного развития, когда появляются клетки эктодермы, из которых в последствии сформируются костная ткань ребенка. Нарушение адекватного поступления кальция и витамина D именно в этот период, приводит к формированию патологических состояний и обеднению костной ткани плода, а впоследствии – новорождённого и ребёнка. В связи с этим, одной из важнейших задач, становится изучение взаимосвязи между уровнем витамина D в организме матери и уровнем витамина D в организме плода.

Из этого следует, что настоящее исследование по изучению влияния функциональных продуктов питания, обогащенных различными концентрациями витамина D, на характер и степень выраженности изменений минерального гомеостаза, является актуальным.

В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение влияния продуктов, обогащённых витамином D в различной концентрации на состояние метаболизма костной ткани у лабораторных животных в постлактационный период.

Задачи исследования:

1. Изучить морфометрические изменения самок крыс и их потомства при введении в рацион продуктов, обогащённых различными концентрациями витамина D.
2. Оценить концентрацию общего белка, активность щелочной фосфатазы, уровень кальция, фосфора в сыворотке крови, с последующим расчётом

кальций-фосфорного соотношения при введении в рацион продуктов, обогащённых различными концентрациями витамина D.

3. Изучить влияние высокобелкового, обогащенного кальцием и различными концентрациями витамина D, молочного продукта на минеральную плотность костной ткани.

Научная новизна и практическая значимость:

В ходе работы были выявлены особенности морфометрической, лабораторной и рентгенологической картины минерального обмена у лабораторных животных, развивающихся в условиях гипо- и гипервитаминоза D, в постлактационный период, при длительном применении продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D.

Впервые созданы и впервые использованы рабочие модели алиментарного гипо- и гипервитаминоза витамина D у лабораторных животных, позволившие выявить неблагоприятное воздействие как низких, так и высоких концентраций витамина D у постлактацирующих самок крыс.

Подтверждена высокая информативность ключевых звеньев минерального гомеостаза: биохимических маркеров в крови и оценка состояния минеральной плотности костной ткани, для выявления точек повреждения и обоснована возможность коррекции выявленных сдвигов алиментарным способом.

Объем и структура работы:

Научно-исследовательская работа состоит из введения, 3 глав, заключения, **результатов исследования**, выводов и 52 источников литературы.

Глава 1. Влияние витамина D на метаболизм костной ткани и коррекция его нарушений при алиментарно-зависимых заболеваниях

1.1 Значение функционального питания в профилактике заболеваний

Питание является основной биологической потребностью человека. Пища - самый мощный фактор окружающей среды. Важнейшие функции организма в значительной степени зависят от рационального питания. Особенно важен характер питания в современных условиях. Это обусловлено рядом факторов, а именно: гиподинамией, стрессами, высокими нервно-психическими нагрузками, а также загрязнением окружающей среды. В настоящее время известно, что питание необходимо для построения и непрерывного обновления клеток и тканей, поступления энергии для восполнения энергетических затрат организма, биологически активных веществ, из которых образуются в организме ферменты и гормоны - регуляторы и катализаторы биохимических процессов. Установлено, что сопротивляемость организма различным инфекциям и выработка общего иммунитета в значительной мере зависит от питания. С одной стороны, рациональное питание ослабляет влияния негативных факторов окружающей среды на здоровье человека, а с другой, - продукты питания сами становятся объектом воздействия загрязнителей. Поэтому, рациональное питание играет важную роль в сохранении и поддержании здоровья человека – особенно актуальность этой проблемы приобрела новый статус после пандемии SARS-CoV-2 [18,38].

По мнению большинства исследователей, дефицит питательных веществ, который возникает из-за неправильно подобранной диеты или физической неспособностью усваивать и метаболизировать питательные вещества, негативно сказывается не только на качестве жизни и учебе, но и может привести к болезни и смерти [19-35]

За последние 30-40 лет, т.е. в течение жизни одного поколения, существенно изменился характер питания. Произошло резкое снижение энергозатрат человека, что в первую очередь связано с механизацией и автоматизацией условий труда и быта. Однако употребление меньшего количества пищи приводит к явному дефициту витаминов, минеральных веществ и полиненасыщенных жирных кислот. Иначе говоря, обмен веществ и

энергии, структура и функция всех клеток, тканей, органов и всего организма в целом находятся в прямой зависимости от характера питания [51].

Обобщая имеющиеся литературные сведения, можно сказать, что рациональное питание базируется на трех равнозначных компонентах: финансовые возможности человека и его семьи, наличие на потребительском рынке широкого ассортимента свежих, высококачественных, безопасных для здоровья человека продуктов питания, и наконец, от уровня знаний о составе и свойствах продуктов питания, рациональных способах их приготовления и употребления. При грамотном подходе к вопросу рационального питания можно если не исключить, то значительно уменьшить роль первого компонента. Таким образом, чтобы быть здоровым, не обязательно быть богатым, и наоборот можно быть богатым, но, не обладая знаниями, оказаться больным. Бесспорно, знания о пищевых продуктах и правилах питания нужны всем. Несомненно, для нормального течения всех физиологических процессов, пища должна быть сбалансирована по пищевым веществам [20].

К сожалению, статистика последних лет показывает, что одной из актуальных проблем большинства стран мира является проблема сбалансированного питания, точнее, его отсутствие. Заболевания, связанные с питанием, называются алиментарными. Согласно классификации, предложенной в 1989 г. Смолянским Б.Л., алиментарные заболевания делятся на две большие группы. Первая группа включает в себя специфические заболевания, связанные с недостатком пищевых веществ (гиповитаминозы, микроэлементозы) и болезни избыточного питания. А вторая группа охватывает неспецифические заболевания, в патогенезе развития которых нерациональное питание выступает как фактор риска (сердечно-сосудистая патология, метаболический синдром, онкологические заболевания) [17-16].

По-прежнему, не вызывает сомнения тесная взаимосвязь, алиментарного фактора и здоровье человека. Считается, что большинство алиментарно-зависимых заболеваний относятся к управляемым патологиям. Их возникновение определено очевидными причинами, и стратегия их

профилактики имеет практическое выражение. В настоящее время существуют сложности широкого внедрения принципов профилактического питания, которые не позволяют быстро и эффективно решить эту проблему. Для решения этих проблем необходим не только общегосударственный подход и поддержка, но и наличие знаний и практических навыков здорового питания и образа жизни у каждого человека [33-46].

Эксперты Продовольственной и сельскохозяйственной ООН и ВОЗ для того, чтобы обратить внимание международных организаций, государственных деятелей на решающее влияние питания на уровень здоровья, специально проводят международные конференции по вопросам МКП.

В настоящее время, различные виды питания принято объединять в несколько основных групп: традиционное, профилактическое, лечебно-профилактическое, лечебное, специализированное, функциональное и нетрадиционное. Повышенный интерес к функциональному питанию является результатом возросшей заботы и ответственности населения за свое здоровье [41].

К функциональным продуктам относят те, которые при ежедневном употреблении помимо традиционных питательных эффектов обладают способностью специфически поддерживать и регулировать конкретные физиологические функции организма человека, биохимические и поведенческие реакции, сохранять и улучшать физическое и психическое здоровье, а также снижать риск возникновения болезней [13-12].

На сегодняшний день функциональное питание должно обязательно обеспечивать поступление в организм в полном объеме всех необходимых веществ: белков, жиров, углеводов, витаминов, минеральных компонентов и микроэлементов. При этом большое внимание уделяется витаминной обеспеченности пищевого рациона. Только достаточное поступление витаминов в организм обеспечивает оптимальные условия для обмена веществ – синтез и функционирование всех биохимических катализаторов.

В настоящее время доказано, что потребность в витаминах зависит от множества факторов: возраста, пола, физической активности человека, климатических условий, физиологического состояния организма и других факторов. Установлено, что в условиях холодного климата, недостаточной инсоляции, при усиленной умственной и нервно-психической деятельности потребность в витаминах возрастает. Также, физиологически потребность в витаминах возрастает у женщин в период беременности и грудного вскармливания. Во время беременности примерно в два раза возрастает потребность в витаминах, которые необходимы как для физиологического течения обменных процессов у матери, так и для правильного развития плода [25-26].

Исходя из изложенного, следует, что, пищевая профилактика появления и развития заболеваний скелета, связанные с метаболическими изменениями в костной системе предусматривает для лиц, подверженных риску развития этих заболеваний, употребление функциональных продуктов или БАДов. Продукты, содержащие необходимые ингредиенты, широко употребляются в пищу, но одна из проблем заключается в том, что количество нужных компонентов и их соотношение часто оказываются неадекватными задаче. Так, больше всего кальция содержится в молочных продуктах (сыр, творог, молоко), листовой зелени, шпинате, капусте, салате, моркови, рыбных костях, инжире и абрикосах. Еще одной проблемой является то, что в составе пищевых продуктов кальций находится в виде плохо растворимых или совершенно не растворимых в воде соединений и относится к трудно усвояемым элементам. Его усвояемость зависит не только от уровня содержания в продуктах, но и от соотношения с другими микро- и макронутриентами, прежде всего фосфором, магнием, белками и витаминами. Так же при этом всасывание кальция в желудочно-кишечном тракте уменьшается как при содержании в рационе большого количества жиров, так и при диете с низким содержанием жиров (молочные жиры, яичный желток, печень рыб), т.е. к сожалению, как раз тех продуктов, где содержится необходимый для усвоения кальция витамин D [22].

Известно, что легкоусвояемым является кальций, находящийся в молочных продуктах, однако его дневная норма для людей, страдающих заболеваниями скелета содержится в 2-х литрах молока или молочнокислых продуктов, что для большинства людей проблематично. Поэтому возрастает необходимость получения молочных продуктов, обогащенных кальцием. В настоящее время известен ряд биологически активных добавок и функциональных продуктов питания для лечения и профилактики заболеваний скелета, связанных с метаболическими изменениями в костной системе. Важнейшими составляющими в них являются кальций и витамин D. Однако следует учитывать, многофакторность этих компонентов в организме и не ограничиваться только костной тканью [35-14].

Таким образом, день за днем правильный или неправильный пищевой выбор формирует наше здоровье, качество и продолжительность жизни. Недооценка принципов рационального питания губительна для организма человека. Существует насущная потребность в расширении ассортимента функциональных пищевых продуктов, в том числе богатых кальцием и витамином D [28-49].

1.2 Метаболизм и пути реализации основных функций витамина D.

Изучение метаболизма витамина D продолжается уже более 100 лет, со времени открытия McCollum с соавт. в 1913 г. некоего «жирорастворимого фактора роста», который они обнаружили в рыбьем жире. Использование данного «фактора роста» при лечении рахита оказалась настолько эффективной, что сделало рыбий жир почти панацеей, а главное дало сверхмощный толчок научным исследованиям витамина D во всем мире. Затем, в 1928 г. А. Виндаус завершил цикл работ по экстракции витамина D и установлению структуры растительных стероидов или стеролов, за что был удостоен Нобелевской премии по химии. Также, значительный вклад в изучении метаболизма и роли витамина D при профилактике и лечении рахита

внесли отечественные ученые XX века – работы Н.Ф. Филатова, А.А. Киселя, Г.Н. Сперанского, Е.М. Лепского, К.А. Святкиной и др. [10].

Наиболее значимыми событиями 60-80-х годов XX века следует считать открытие и изучение действия метаболитов витамина D, а также оценка обеспеченности различных групп населения витамином D. Так, в 1966-1967 гг. было установлено наличие полярных метаболитов витамина D₃ в организме, который обладали более высокой биологической активностью, чем исходный витамин. В 1973 г. синтезирован высокоактивный аналог витамина D – альфакальцидол. Под руководством Holick M.F. в 1997 г. выделен активный метаболит витамина D₃ – 1,25-дигидроксивитамин D₃ (рис. 1) [10].

На сегодняшний день известно так называемое классическое действие витамина D. Витамин D образуется в коже под влиянием УФО или поступает с пищей, затем запускается каскад метаболических процессов, приводящих к образованию активных метаболитов витамина D, которые в свою очередь, совместно с паратиреоидным гормоном и кальцитонином обеспечивают регуляцию обмена кальция и фосфатов. Факторами риска снижения синтеза витамина D являются жизнь в высоких широтах (ближе к полярным регионам), особенно в зимние месяцы, высокий уровень загрязнения атмосферы, плотное покрытие земли облаками, закрытая одеждой кожа, использование солнцезащитного крема и смуглый тип кожи [10].

Сегодня наблюдается значительная эволюция знаний о витамине D. Уточнены метаболические пути и новые рецепторно-опосредованные механизмы действия витамина D (антиканцерогенное, иммуномодулирующее, противовоспалительное и др.). Благодаря исследованиям за последние десятилетия существенно изменились представления о роли витамина D в организме [24]. Многочисленными исследованиями установлено, что активные метаболиты витамина D оказывают воздействие на многочисленные физиологические процессы. Так, установлено, что низкий уровень обеспеченности витамином D высоко ассоциирован с риском развития сердечно-сосудистых (артериальная гипертензия, сердечная недостаточность),

инфекционных (острые респираторные вирусные инфекции, туберкулез), аллергических (бронхиальная астма), хронических воспалительных (болезнь Крона, целиакия), аутоиммунных (рассеянный склероз, сахарный диабет 1-го типа, псориаз) и различных неопластических заболеваний (рак молочной железы, рак прямой кишки, рак простаты) [12-13].

Достигнуты значительные успехи в изучении метаболизма витамина D в организме, механизмов и путей реализации его биологических эффектов. Известно, что к группе витамина D относятся шесть стероидов - витамины D₁, D₂, D₃, D₄, D₅ и D₆. Витамин D₂ - эргокальциферол (рис. 2) и D₃ - холекальциферол (рис. 1) играют ключевую роль в организме человека.

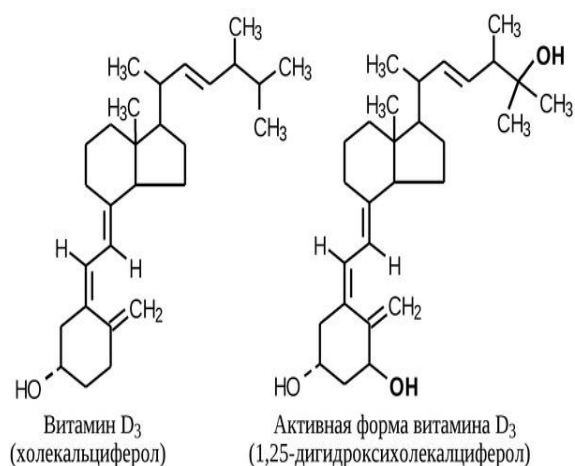


Рисунок 1

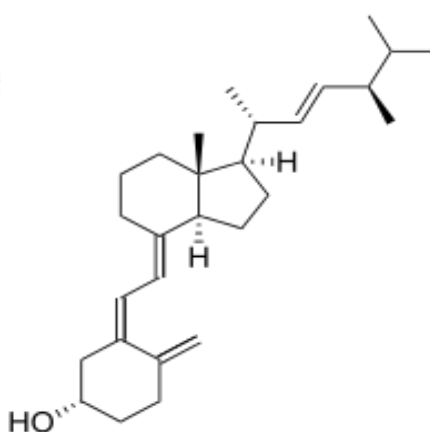


Рисунок 2 – Эргокальциферол

Витамин D₂ (эргокальциферол) - образуется в клетках растений из эргостерола. Основные источники эргокальциферола - рыба, молоко, а также хлеб и грибы. Поступающий в организм с пищей, витамин D₂, всасывается в тонком кишечнике, обязательно в присутствии желчи, далее в составе хиломикронов он транспортируется лимфатической системой в венозный кровоток, проходя затем аналогичные с холекальциферолом этапы метаболизма. Для его нормального всасывания необходимо присутствие в пище достаточного количества жира. Нарушение секреции желчи при заболеваниях

печени и желчевыводящих путей существенно затрудняет всасывание витамина в кишечнике [52].

Витамин D₃ (холекальциферол) - образуется в мальпигиевом и базальном слое эпидермиса кожи из 7 - дегидрохолестерола (провитамин D) в результате неферментативной, зависимой от УФ света, с длиной волны 290 - 315 нм, реакция фотолиза. Установлено, что активность процесса находится в прямой зависимости от интенсивности облучения и в обратной - от степени пигментации кожи. Затем, в эпидермисе холекальциферол связывается с витамин D-связывающим белком и 70% его из кровотока поступает в печень, а другая часть поступает в жировые клетки, где и формируется депо витамина D. Показано, что при воздействии одной эритемной дозы солнечных лучей на кожу человека, содержание витамина D₃ в крови увеличивается так же, как после приема внутрь 10000 МЕ витамина D₃ [9-47].

Несмотря на то, что форма D₃ обладает большей метаболической активностью, а потому более значима для человека, все же корректнее говорить об обмене витамина D в целом. Известно, что сам по себе витамин D биологически неактивен, его активация происходит лишь после метаболических преобразований в печени до 25-гидроксивитамина D (25(OH)D, или кальцидола) и в почках до 1,25-дигидроксивитамина D (1,25(OH)₂D, или кальцитриола), который является конечным и самым активным метаболитом витамина D, а по специфике своего действия приравнивается к гормонам (D-гормон). D-гормон обладает эндокринным, паракринным и аутокринным эффектами [10].

Таким образом, основные процессы биотрансформации витамина D происходят в коже, печени и почках (рис. 3).

В многочисленных исследованиях было показано, что около 95% витамина D₃ (холекальциферола) синтезируется под воздействием ультрафиолетового излучения. Взаимодействуя с сывороточным витамин D-связывающим белком, через двухступенчатый ферментативный путь с участием 25-гидроксилазы печени и 1 α -гидроксилазы (CYP27B1)

экстраренальных тканей и тканей почек, холекальциферол преобразуется в биологически активный гормон кальцитриол - $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Ряд исследований показали действие витамина D, на разные органы и ткани. Это действие витамина D осуществляется за счет связывания со специфическим рецептором витамина D (VDR). Регуляция экспрессии VDR является одним из основных механизмов, посредством которых клетки-мишени реагируют на кальцитриол и меняют режим функционирования [44].

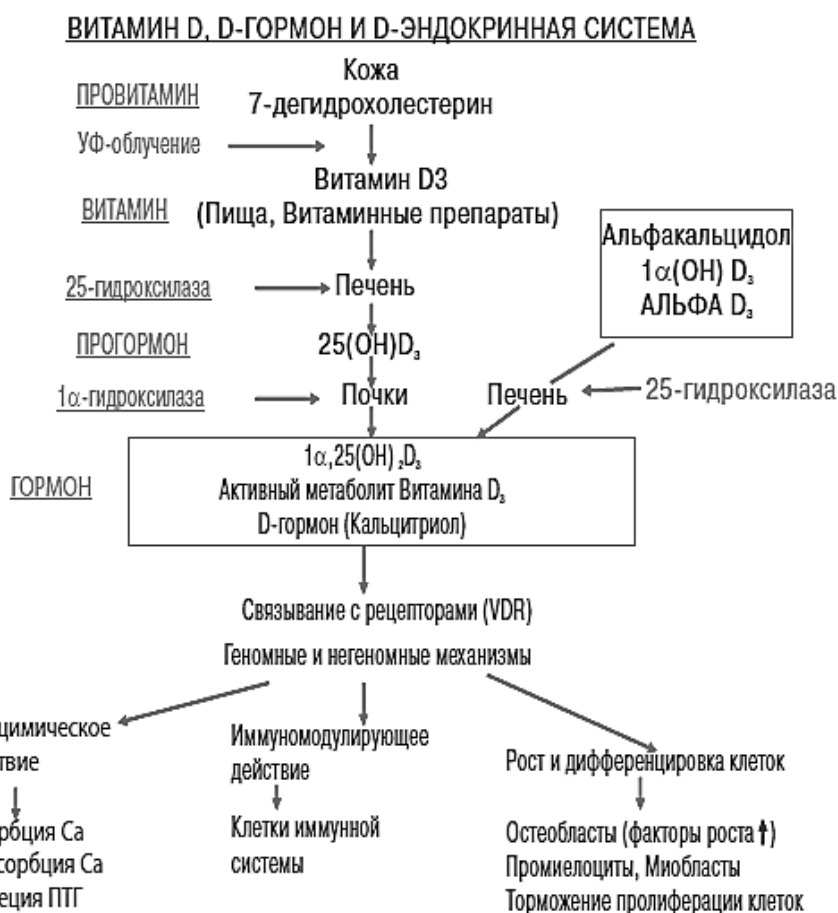


Рисунок 3 – Образование витамина D, его метаболизм и основные биологические эффекты (Шварц Г.Я., 2009 год)

Ранее было доказано, что витамин D играет ключевую роль в метаболизме костной ткани и минерального гомеостаза. Также, активным формам витамина D - $25(\text{OH})\text{D}_3$ и $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ принадлежит огромная роль в

таких биологических процессах как: регуляция клеточного роста, дифференцировка и модуляция метаболических процессов [37].

По результатам исследований, полученных к настоящему времени доказана роль витамина D на репродуктивное здоровье, так как VDR и 1 α -гидроксилаза обнаружены в тканях репродуктивных органов. Так же витамин D регулирую более 3000 генов, многие из которых играют значимую роль в развитии плода, в том числе ингибирование клеточной пролиферации и индукции конечной дифференцировки, ангиогенеза и продукцию ренина, стимуляцию выработки инсулина и производстве макрофагов, индукции апоптоза [11].

Таким образом, в условиях целостного организма влияние метаболитов витамина D многократно и обусловлено сложным взаимодействием большой группы факторов, биологические функции витамина D в организме многообразны, а геномные и не геномные эффекты витамина многочисленны.

1.3 Изменения биохимических и функциональных показателей при гипо- и гипервитаминозе D.

По-прежнему, не вызывает сомнения тот факт, что основной точкой приложения витамина D является фосфорно-кальциевый обмен и остеогенез. Костная ткань - это динамичная система, обладающая высокой метаболической активностью, в которой постоянно происходят процессы синтеза и резорбции. Во-первых, эти процессы обеспечивают обновление структуры кости, а во-вторых - способствуют выполнению метаболической функции скелета по контролю минерального гомеостаза [29].

Общепризнано, что уровень кальция в крови зависит не только от поступления кальция с пищей, но и от всасывания его в кишечнике, резорбции костной ткани, выведения кальция из организма через почки и ЖКТ [34]. Более того, в организме происходит непрерывный обмен минералами между костью и внеклеточной жидкостью с целью поддержания минерального гомеостаза, т.к.

доказано, что уровень кальция в крови служит одной из наиболее постоянных констант в человеческом организме [30].

Как правило, обмен кальция тесно взаимосвязан с обменом фосфора. В ходе ряда научных исследований, было установлено, что в организме взрослого человека содержится около 670 г фосфора, 90% из которого, аналогично кальцию, находится в скелете. Существует также доказательства того, что фосфор и кальций депонируются в виде гидроксиапатита. Подобно кальцию, 99% фосфора содержится в костной ткани и внутри клеток и только лишь 1% во внеклеточной жидкости. В сыворотке крови фосфор циркулирует в составе органических соединений и неорганического фосфора [4].

Современные многочисленные исследования убедительно доказано, что судить об обменных процессах, происходящих в кости, возможно определяя в сыворотке крови и моче, так называемые биохимические маркеры костного обмена [5]. Как правило, это ферменты или другие вещества, поступающие в кровоток, а в последующем в мочу во время синтеза или резорбции кости. Однако, концентрация этих веществ в биологических жидкостях отражает усредненную скорость ремоделирования скелета в целом, а не отдельных его областей [6].

По-прежнему, не вызывает сомнения, что одними из основных маркеров костеобразования являются остеокальцин и костная фракция щелочной фосфатазы, которые высвобождаются на различных этапах пролиферации и дифференцировки остеобластов. Как правило, именно остеокальцин является специфическим и чувствительным биохимическим маркером формирования кости, потому что является основным продуцируемым в результате работы остеобластов неколлагеновым витамин К- и витамин D-зависимым белком костного матрикса. Доказано, что ген, отвечающий за выработку остеокальцина у человека, расположен на хромосоме 1 (1q25-q31) и его транскрипция регулируется с помощью 1,25-дигидроксивитамином D [2]

Известно, что кальцитриол стимулирует выработку остеокальцина, тем самым влияя на его концентрацию в крови. В исследованиях, проведенных в

90-х, *in vitro*, показано, что 1,25-дигидроксивитамин D₃ оказывает стимулирующее действие на синтез неколлагеновых белков, в частности, остеокальцина и щелочной фосфатазы, тем самым способствуя активизации функции зрелых остеобластов [9].

Вторым важным маркером костеобразования является щелочная фосфатаза. Этот фермент широко распространен в тканях человека, особенно много его в слизистой оболочке кишечника, остеобластах и гепатоцитах. «Известно, что при дефиците витамина D наблюдается увеличение активности фермента», по Долгову В.В., Меньшикову В.В., 2013).

Так, например, дефицит витамина D сопровождается снижением кишечной абсорбции кальция и фосфора, в результате чего повышается уровень ПТГ, нарушается метаболизм кальция, фосфора и костного обмена. Опосредуемая ПТГ, активация остеокластов приводит к снижению минеральной плотности костной ткани. Однако развивающийся при этом вторичный гиперпаратиреоз позволяет удерживать уровень кальция в нормальном диапазоне, во-первых, за счёт мобилизации кальция из костного депо, а во-вторых, за счет увеличения выведения фосфатов почками. Увеличение экскреции фосфатов, приводит к снижению уровня сывороточного фосфора до низких или низко-нормальных цифр. В сумме все указанные изменения кальций-фосфорного обмена приводят к нарушению минерализации кости. «Известно, что у детей младшего возраста эти нарушения приводят к развитию рахита, сопровождающегося деформациями скелета, а у взрослых, может развиваться другой дефект, известный как остеомаляция, которая часто остаётся нераспознанной в клинической практике», Chowdhury, R et al., 2014.

Дефицит витамина D - это клинический синдром, развивающийся вследствие снижения уровня сывороточного 25(OH)D. Однако до сих пор спорным остается вопрос об уровне 25(OH)D, определяющем наличие дефицита витамина D. Исторически взгляды на определение дефицита витамина D претерпевали различные изменения. Так в 2011 г., в исследовании, проведенном Institute of Medicine (ИОМ) в США, были предложены к

использованию следующие формулировки: дефицитом витамина D - считать снижение уровня 25(OH)D менее 20 нг/мл, в то время как недостаточность витамина D определяется диапазоне 21-29 нг/мл. Исходя из этого определения, было установлено, что 20-100% пожилого населения США, Канады и Европейских государств имеют дефицит витамина D. В одном из недавних исследований установлено, что в группу риска по дефициту витамина D входят дети, лица среднего возраста, а также беременные и кормящие женщины, причем даже те из них кто принимают добавки, содержащие витамины и кальций [7]

Для своевременной диагностики гипо- и гипervитаминоза D широко используют определение минеральной плотности костной ткани (BMD). Для этого исследуют два показателя: плотность определенного объема костной ткани плюс межтрабекулярное пространство, так называемый трабекулярный (медуллярный) BMD и измерение плотности, ограниченной в объеме кальцифицированной костной ткани, так называемый корковый (объемный) BMD.

Известно, что витамин D является одним из наиболее токсичных витаминов. Степень токсичности зависит не только от дозы, но также от продолжительности и частоты приема витамина. У новорожденных отравление может вызвать однократный прием 15 мг витамина D, но такой же эффект будет и от ежедневного приема 1 мг витамина D в течение долгого времени. Для взрослых представляет опасность однократный прием более 50 мг витамина D, или ежедневный прием 1-2 мг в течение длительного времени. При этом длительный прием повышенных доз или использование ударных доз приводит к увеличению всасывания кальция и фосфора из кишечника (примерно в 10 раз) и повышению их мобилизации из костей, отложению кальция в мягких тканях, в том числе в почках, клапанах сердца, миокарде, сосудах, легких, слизистой желудка, связках, хрящах и т.п. Установлено, что в ответ на повышенное содержание витамина D в организме снижается синтез ПТГ, повышается секреция АКТГ и синтез кортикостероидов, а

минералкортикоиды увеличивают экскреции кальция с мочой. Гиперкальциемия стимулирует синтез тиреокальцитонина, который ингибирует процессы резорбции кальция из костной ткани. Нарушается обмен жиров. При гиповитаминозе лабораторно выявляют: гиперкальциемию и гиперкальциурию, в крови повышается концентрация эфиров холестерина, цитрата, кетоновых тел, остаточного азота, гликозамингликанов, снижается активность щелочной фосфатазы [8].

Интоксикация витамином D может быть вызвана не только прямым токсическим действием препарата на клеточные мембраны, но и повышенной концентрацией в крови солей кальция, откладывающихся в стенках сосудов внутренних органов, в первую очередь в почках и сердце. В организме человека нет эффективных механизмов инактивации и выведения из организма этого биологически активного вещества, в связи, с чем возникает риск токсического его воздействия. Факторами риска развития гипервитаминоза D является повышенная чувствительность в связи с измененными реакциями нервной системы (последствиями гипоксии, в условиях стрессовых ситуаций); на фоне несбалансированного питания с избытком кальция или фосфора в пище, дефицитом белка, витаминов А, С, группы В. Наличие дисфункции желудочно-кишечного тракта, тяжелой дистрофии, в случае назначения витамина D в летнее время, ультрафиолетовое облучение, прием рыбьего жира, препаратов кальция, употреблением большого количества коровьего молока и творога, все эти факторы приводят к повышению индивидуальная чувствительность к витамину D [1].

Избыточное поступление витамина D и его метаболитов в кровь ведет к резкому усилению всасывания кальция в кишечнике и рассасыванию костной ткани. В результате поступления большого количества кальция из кишечника и костной ткани в кровь развиваются гиперкальциемия и гиперкальциурия, метаболический ацидоз. Гиперкальциемия и непосредственное токсическое воздействие витамина D на органы и ткани ведут к образованию очагов перерождения и отложения в них солей кальция. Такие очаги и кальцификация

обнаруживаются в почках (преимущественно в канальцах), сердце, сосудах, печени, мышцах, мозге и др. Гиперкальциемия вызывает сдвиги со стороны ряда желез внутренней секреции: повышается продукция гормона щитовидной железы, тиреокальцитонина, наблюдается гипертрофия надпочечников и инволюция вилочковой железы, снижается иммунологическая реактивность организма [3,45].

Таким образом, биохимические показатели метаболизма костной ткани, а также данные рентгеновской денситометрии необходимы для ранней диагностики, профилактики и контроля терапии заболевания скелета, связанные с метаболическими изменениями в костной системе.

Глава 2. Материал и методы исследования

В настоящей главе представлены общие принципы постановки эксперимента, методы лабораторного анализа, методы исследования костной ткани, а также статической обработки результатов исследования.

2.1 Общая характеристика экспериментального материала

Для достижения поставленных в работе задач объектом исследования были выбраны белые крысы линии Вистар, полученные из Рапполово (Санкт-Петербург). Правомерность использования крыс в эксперименте обусловлена тем, что гемохориальная плацентация грызунов представляет наибольший интерес, как наиболее близкая к плацентации человека.

При проведении лабораторного эксперимента мы полностью соблюдали международные принципы Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемые для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1985); декларации о гуманном отношении к животным, используемым в научных целях, изложенные в современных рекомендациях Европейских независимых комитетов по вопросам этики (Брюссель, 1995,1997); Рекомендации Комитетом по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований (Женева, 2000); а также «Принципам надлежащей лабораторной практики» и приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. N 708н г. Москва "Об утверждении Правил лабораторной практики".

Всего использовано 36 взрослых самок крыс.

В соответствии с целью и задачами исследования крысы разделены на следующие группы:

1. Крысы, не получавшие высокобелковое молоко, обогащённое витамином D и кальцием – 12 взрослых самок крыс. Беременность наблюдалась в 50 % случаев.

2. Крысы, получавшие высокобелковое молоко, обогащённое профилактической дозой витамина D и кальцием – 12 взрослых самок крыс. Беременность наблюдалась в 83,3 % случаев.
3. Крысы, получавшие высокобелковое молоко, обогащенное терапевтической дозой витамина D и кальцием – 12 взрослых самок крыс. Беременность составила 33,3 % случаев.

Дизайн исследования представлен на рисунке 4.

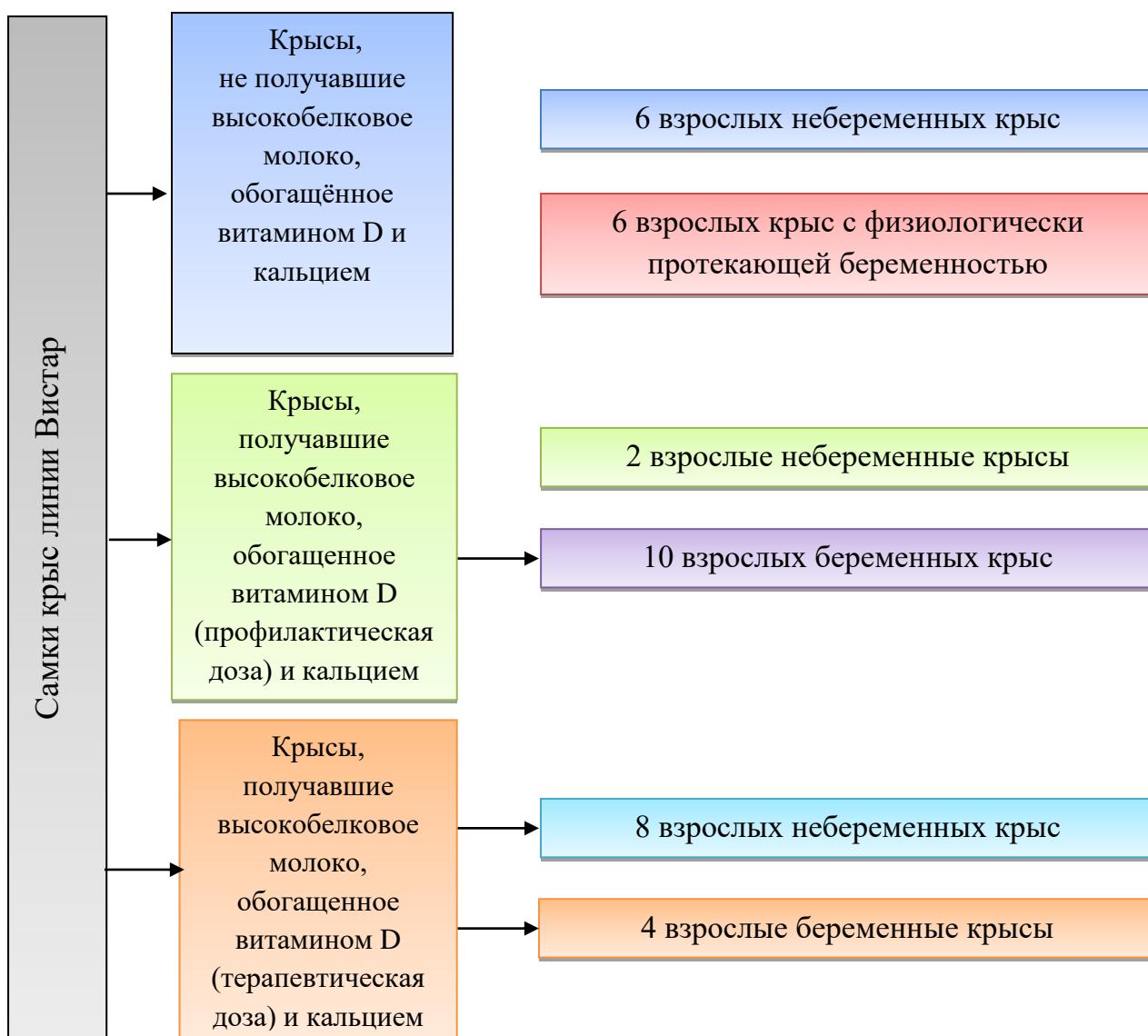


Рисунок 4. – Дизайн исследования

2.2 Организация эксперимента с использованием высокобелкового молока, обогащенного витамином D и кальцием

Для проведения эксперимента использовали молоко с повышенным содержанием белка, кальция и обогащенное премиксом витамина D (фирма DSM), вносимого в количестве 0,01г на 1кг продукта. Используемый премикс: сухой витамин D₃, тип 100 CWS: стабилизирован токоферолом; микрокапсулы диспергируемые в холодной воде. Концентрация: 100 000МЕ Витамина D₃/г. Характеристики молока: количество белка от 5,5%; количество кальция от 200 мг на 100 гр; массовая доля жира не выше 2,5%; энергетическая ценность 43,7 ккал/183 кДж. Повышение содержания белка и кальция достигалось методом ультрафильтрационного концентрирования. Этот баромембранный процесс протекает при средних значениях давления (от 1 до 10 бар), при котором полупроницаемые мембраны пропускают большую часть растворенных компонентов и некоторые нерастворимые, в то время как крупные компоненты задерживаются мембраной. В молочной промышленности ультрафильтрация используется для стандартизации состава молока для производства сыра, в технологии сухих молочных консервов и концентратов белка, таких как был использован в эксперименте.

Взрослых самок крыс рандомизированно распределяли по группам. Все крысы находились на свободном питьевом режиме.

Крысы первой группы получали обычный рацион питания, суточные кормовые нормы которого включает в себя зерновую смесь (15 гр.), белый хлеб (15 гр.), крупу (5 гр.), молоко (8 гр.), траву (6 гр.), сочные корма (3 гр.), рыбий жир (0,2 гр.), мясокостную муку (0,6 гр.), дрожжи (0,2 гр.), соль (0,2 гр.), мел (0,6 гр.), мясо (8 гр.) и сено (0,2 гр.).

Крысам второй и третьей групп в обычный рацион питания добавляли 1,5 мл молока с повышенным содержанием кальция, белка и обогащенное витамином D.

Крысам второй группы в молоко добавляли профилактическую дозу витамина D. В 10мл молока растворяли 1 каплю водного раствора Аквадетрима (500МЕ). Крысам средняя масса, которых равна 200 гр. в 15 гр. белого хлеба добавляли по 1,5 мл молока с повышенным содержанием кальция, белка и обогащенного витамином D, каждый день, в течение всей беременности и до прекращения кормления потомства.

Крысам третьей группы в молоко добавляли лечебную дозу витамина D. В 10мл молока растворяли 10 капель водного раствора Аквадетрима (5000МЕ). Крысам средняя масса, которых равна 200 гр. в 15 гр. белого хлеба добавляли по 1,5 мл молока с повышенным содержанием кальция, белка и обогащенного витамином D, каждый день, в течение всей беременности и до прекращения кормления потомства.

В качестве добавки использовали водный раствор колекальциферола - витамин D₃ (Аквадетрим). Витамин D₃ является естественной формой витамина D, которая образуется у человека в коже под действие УФ-лучей. По сравнению с витамином D₂ характеризуется на 25% более высокой активностью. Из кровотока 70% колекальциферола поступает в печень и почки, а другая часть поступает в жировые клетки, где формируется депо витамина D. Затем в печени после метаболических превращений колекальциферол преобразуется в 25-гидроксивитамин D, а в почках в 1,25-дигидроксивитамин D (D-гормон). Этот стероидный гормон (с эндокринным, паракринным и аутокринным эффектом) действует практически на все органы и ткани организма, но наибольший эффект он оказывает на кишечник, кости, мышцы, сердце, поджелудочную железу, опухолевые клетки и клетки иммунной системы [10].

Через 1 месяц после родов забили всех самок из каждой группы. Для биохимического исследования была взята кровь самок, а для определения минеральной плотности костной ткани - бедренная кость.

2.3 Лабораторные методы исследования

2.3.1 Преаналитический этап исследования

После прекращения кормления забили всех самок из каждой группы. Для умерщвления животных использовали эфир. Кровь для исследования забирала из бедренной вены в одноразовую пластиковую пробирку, содержащую 100 МЕ гепарина натрия. Далее пластиковые пробирки сразу же закрывали и перемешивали путем 4-6 – кратного переворачивания или вращения (без встряхивания). До центрифугирования кровь хранили при комнатной температуре (от +18 до +24°C).

Центрифугирование проводили при 1300 об/мин в течение 10 минут. Затем полученную сыворотку переносили в пластиковые пробирки и замораживали при температуре -20°C.

2.3.2 Биохимические методы

Для изучения метаболизма костной ткани использовали сыворотку крови. Исследование проводилось на автоматическом биохимическом анализаторе произвольного доступа Cobas c111, фирмы Roche Diagnostics, Швейцария. Cobas c111 предназначен для измерений концентрации параметров жидких биопроб фотометрическим методом и концентрации натрия, калия, хлора при использовании блока ионоселективных электродов (ISE) потенциометрическим методом.

Принцип действия анализатора при измерении концентрации параметров жидких биопроб основан на измерении значений оптической плотности жидкой биологической пробы в измерительной термостатируемой (37±0,1)°C в кювете при прохождении через нее светового потока от низковольтной галогеновой лампы на фотоприемное устройство и последующем пересчете, с помощью

встроенных программ, полученного значения оптической плотности в концентрацию определяемого параметра в соответствии с методикой медицинского лабораторного исследования. Измерения биопроб проводятся автоматически на 12 длинах волн в диапазоне от 340 до 660 нм.

Световой поток после прохождения через измерительную кювету и оптический блок, формирующий геометрию потока, дифракционную решетку, разделяющую его по длинам волн, попадает на фотоприемное устройство, состоящее из 12 фотодиодов. Для измерений концентрации параметров используются, определяемые программой анализатора, сигналы фотодиодов, соответствующие двум длинам волн.

Результаты измерений отображаются на дисплее в виде значений концентрации определяемых параметров.

Были исследованы следующие показатели: ионизированный кальций, фосфор, щелочная фосфатаза и общий белок. Исследования всех показателей проводили с использованием наборов реактивов: Calcium Gen2, Phosphate Gen2, ALP IFCC Gen2, Total Protein Gen2 фирмы Roche Diagnostics GmbH.

Таблица 1. Референсные пределы показателей костного метаболизма в сыворотке крови (Долгов В.В., Меньшиков В.В., 2013)

Показатель	Возраст, пол	Референтные пределы
Кальций	Женский, >12 лет	2,2-2,5 ммоль/л
	Мужской, 12–60 лет	2,1-2,55 ммоль/л
	Мужской, >60 лет	2,2-2,5 ммоль/л
Фосфор	12-60 лет	0,87-1,45 ммоль/л
	>60 лет, женский	0,90-1,32 ммоль/л
	>60 лет, мужской	0,74-1,20 ммоль/л
Щелочная фосфатаза	взрослые	<150 Ед/л
Общий белок	2-14 лет	60-80 г/л
	>14 лет	65-85 г/л

Гиперкальциемия чаще всего связана с усилением мобилизации кальция из костной ткани при гипервитаминозе D, первичном и вторичном гиперпаратиреозе, эктопическом синтезе ПТГ при раке легких, почек, пищевода и др., тиреотоксикозе, саркоидозе, туберкулезе и др. Гипокальциемия наблюдается при остром панкреатите с панкреонекрозом, гиповитаминозе D, при рахите и остеомалации, гипопаратиреозе, тяжелой гипомагниемии, печеночной недостаточности и др. Увеличение концентрации фосфора наблюдается при гипопаратиреозе, острой и хронической почечной недостаточности, остеоллизе, гипервитаминозе D и др. А уменьшение концентрации фосфора наблюдается при рахите, остеомалации, первичном гиперпаратиреозе, выраженной гиперкальциемии различной этиологии и др. В норме кальций-фосфорное соотношение равно 2:1. Но при всех вышеперечисленных состояниях, сопровождающихся изменением концентрации кальция и фосфора, это соотношение изменяется. Увеличением активности щелочной фосфатазы сопровождаются: поражения гепатобилиарной системы, болезнь Педжета, метастазы рака в кости, остеомалация, первичный и вторичный гиперпаратиреоз и др. Снижением активности фермента сопровождаются: гипотиреоз, цинга, анемия, квашиоркор и др. Гиперпротеинемией сопровождаются: хронические инфекционные заболевания, гипергаммаглобулинемия, аутоиммунная патология, моноклональные гаммапатии и др. И наконец, гипопропротеинемия наблюдается при гипоальбуминемии, снижении синтеза белков при недостаточном поступлении и\или усвоении белков пищи, потери белков, усиленном распаде белков и др. (Долгов В.В., Меньшиков В.В., 2013).

2.3.3. Количественное определение 25-гидроксивитамина D

Исследование сыворотки крови на определения 25-гидроксивитамина D проводилось с помощью анализатора LIAISON XL фирмы DiaSorin, Италия методом хемолюминесцентного иммуноанализа.

Метод количественного определения 25-ОН витамина D представляет собой прямой 2-ступенчатый конкурентный хемилюминесцентный иммуноанализ. Калибраторы, контрольные сыворотки или пробы инкубируются с магнитными частицами, покрытыми специфическими антителами к 25-ОН витамину D (твердая фаза), и с витамином D, меченным производным изолюминола. Во время первой инкубации 25-ОН витамин D диссоциирует из комплекса с витамин D-связывающим белком и связывается с твердой фазой. Через 10 минут к магнитным частицам добавляется конъюгат витамина D с изолюминолом. По окончании второй 10-минутной инкубации не связавшиеся молекулы удаляются во время цикла промывки. Затем к реакционной смеси добавляются запускающие реактивы, индуцирующие хемолюминесцентную реакцию. Интенсивность люминесценции, измеряемая с помощью фотоумножителя в относительных единицах интенсивности, отражает количество конъюгата витамина D с изолюминолом, которое в свою очередь обратно пропорционально концентрации 25-ОН витамина D в калибраторах, контролях и пробах.

Анализатор автоматически рассчитывает концентрацию 25-ОН витамин D в нг/мл. Измеряемый диапазон: 4-150 нг/мл 25-ОН витамин D. На концентрацию 25-ОН витамин D в крови влияют следующие факторы: УФ, время года, раса и поступление витамина с пищей. Широкое распространение дефицита 25-ОН витамин D без видимых клинических проявлений наблюдается во многих областях мира, особенно в зимний период. Последние литературные сведения относительно референсных значений 25-ОН витамин D следующие: дефицит – 0-10 нг/мл, недостаток – 10-30 нг/мл, норма – 30-100 нг/мл, токсичность - >100 нг/мл.

2.4. Определение минеральной плотности костной ткани

Для определения минеральной плотности костной ткани («bone mineral density» (BMD) использовали компьютерный рентгеновский микротомограф Skyscan 1176 фирмы Bruker, Бельгия .

В соответствии с официальными рекомендациями фирмы производителя бедренные кости отделяли и помещали в пробирку с 0,9% раствором хлористого натрия. Однократно сканировали по три кости вместе с двумя фантомами (0,25 и 0,75 г/см³ гидроксиапатита кальция (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) имеющими диаметр, соответствующий толщине исследуемых костей. Параметры сканирования на рентгеновском компьютерном микротомографе Skyscan 1176 (Bruker): X-ray voltage 65 kV; X-ray current 382 μA; filter 1 mm aluminium; image pixel size 9 μm; camera resolution setting high (4000 pixel field width); tomographic rotation 180°; rotation step 0,3; frame averaging 1. Сканированные объекты реконструировались при помощи программы Nrecon, параметры реконструкции: smoothing 2; beam hardening 39; ring reduction 7.

Анализ данных и определение BMD проводилось в программе CT-analyser. При этом в соответствии с официальными рекомендациями производителя, вначале проводилась калибровка программы при помощи фантомов, затем определялись два параметра: плотность определенного объема костной ткани плюс межтрабекулярное пространство, так называемый трабекулярный (медуллярный) BMD и измерение плотности, ограниченной в объеме кальцифицированной костной ткани, так называемый корковый (объемный) BMD. С возрастом BMD снижается как у мужчин, так и у женщин. Уменьшенные количества минерального содержимого кости коррелируют со снижением прочности кости и обеспечивают предрасположенность пациента к переломам. Важным также является использование микротомографии при моделировании остеопороза с целью изучения механизмов данного процесса и возможностей борьбы с этой патологией. При этом лечение остеопороза должно не только предотвратить потерю костной ткани и избежать изменений минеральной составляющей на уровне солей кальция, но также увеличить механическую прочность кости и таким образом защитить скелет от новых

переломов. При этом компьютерная микротомография имеет все возможности для наглядной оценки полученных результатов (Ржепаковский И.В., Тимченко Л.Д., Писков С.И., 2015).

2.5 Статистические методы исследования

Статистическую обработку данных в нашей работе проводили с использованием методов параметрического анализа и пакета Microsoft Excel. Определялись основные характеристики описательной статистики: среднее (\bar{X}), ошибку среднего (m) и стандартное отклонение (δ). Достоверность различия средних рассчитывали по критерию Стьюдента (t) для коэффициентов вариации, уровень значимости p выбран менее 0,05.

Глава 3. Изучение влияния продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D на метаболизм костной ткани

Морфометрические изменения позволяют дать первичную оценку состояния костной ткани. Но для выявления нарушений метаболизма костной ткани наиболее оптимальным является сочетание биохимического исследования, количественного определения 25-гидроксивитамина D сыворотки крови и денситометрия.

3.1 Морфометрические изменения самок крыс и их потомства при введении в рацион продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D

В эксперименте было использовано 36 взрослых самок крыс. В соответствии с целью и задачами исследования животные рандомизированно были разделены на три группы по 12 крыс в каждой. Первая группа - крысы, не получавшие высокобелковое молоко, обогащённое витамином D и кальцием. Беременность наблюдалась в 50,0 % случаев. Вторая группа - крысы, получавшие высокобелковое молоко, обогащённое кальцием и профилактической дозой витамина D. Беременность наблюдалась в 83,3 % случаев. Третья группа - крысы, получавшие высокобелковое молоко, обогащенное кальцием и терапевтической дозой витамина D. Беременность составила 33,3 % случаев. Общее количество потомства самок крыс первой группы равно 38 (в среднем от 2 до 10), второй группы 72 (в среднем от 4 до 9), третьей группы 34 (в среднем от 8 до 9).

На протяжении всего эксперимента проводили систематическое наблюдение за животными. Общее состояние и поведение животных во всех группах не отличалось. Крысы были активными, хорошо поедали корм, существенных изменений спонтанной двигательной активности не отмечалось. Случаев гибели животных не было отмечено. После декапитации под эфирным

наркозом установлено, что лабораторные животные имели сплошной волосяной покров, гладкую блестящую шерсть, видимые слизистые оболочки и кожные покровы нормальной окраски. А также изменения кожных покровов в виде шелушения, гиперемии, отеков не выявлено. Деформаций и отеков конечностей нет.

С целью изучения влияния продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D, провели оценку динамики веса самок крыс до и во время беременности, количества потомства, а также общего состояния, поведения, спонтанной двигательной активности и патоморфологических проявлений между крысами, не получавшими молочный продукт (группа 1, n=12), и получавшими высокобелковые, обогащенные кальцием, профилактической (группа 2, n=12) и терапевтической дозами витамина D (группа 3, n=12), молочные продукты. Полученные результаты обследования представлены в таблица 2.

Таблица 2. Морфометрические показатели крыс, при введении в рацион продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D, ($X \pm m$; $p \leq 0,05$)

	Вес до беременности и, г	Вес во время беременности, г	Набор веса, г	Вес потомства, г
Первая группа (n=12)	137,0 \pm 1,2	215,5 \pm 6,1 ²	78,5 \pm 7,2	32,3 \pm 2,2
Вторая группа (n=12)	135,3 \pm 6,6	188,0 \pm 5,1 ¹	52,7 \pm 11,7	21,8 \pm 0,8 ¹

Третья группа (n=12)	154,0±10,4	233,5±3,2 ³	79,5±13,6	26,0±0,9 ³
----------------------	------------	------------------------	-----------	-----------------------

Примечание: 1 - достоверные различия между 1 и 2 группами;

2 - достоверные различия между 1 и 3 группами;

3 - достоверные различия между 2 и 3 группами;

Как видно из таблицы 2, при анализе сравнения морфометрических показателей у крыс, не получавших молочный продукт по сравнению с данными крыс, получавшими молочные продукты с различными концентрациями витамина D, установили, что при определении веса до беременности, а также набор веса, статистически достоверно не отличались ($p>0,1$). В ходе исследования морфометрических показателей было установлено, что вес животных второй группы, во время беременности ($188,0\pm 5,1$ г) достоверно ниже показателя животных первой группы ($215,5\pm 6,1$ г, $p<0,01$). А вес, во время беременности, животных третьей группы ($233,5\pm 3,2$ г) достоверно выше данного показателя в первой ($215,5\pm 6,1$ г, $p<0,05$) и во второй ($188,0\pm 5,1$ г, $p<0,001$) группах животных соответственно. При этом вес потомства крыс первой и третьей групп статистически достоверно не различались ($p>0,1$). В тоже время вес потомства крыс, получавших высокобелковый обогащенный профилактической дозой витамина D и кальцием молочный продукт ($21,8\pm 0,8$ г) оказался достоверно ниже аналогичных показателей лабораторных животных, не получавших молочный продукт ($32,3\pm 2,2$ г, $p<0,01$) и получавших высокобелковое обогащенное терапевтической дозой витамина D и кальцием молоко ($26,0\pm 0,9$ г, $p<0,05$).

Для проведения наглядного сравнения полученных данных, результаты морфометрического анализа у животных второй группы были приняты за 100%, рассчитали относительное содержание аналогичных показателей в первой и третьей группах лабораторных животных. В результате расчета

морфометрических показателей у лабораторных животных, не получавших молочный продукт оказалось, что вес самки во время беременности больше на 14,6%, а вес потомства на 48,2%. А у крыс, получавших молочный продукт, обогащенный терапевтической дозой витамина D, кальцием и белком, вес самки во время беременности больше на 24,2%, а вес потомства на 19,3%. Данные морфометрических показателей представлены на рисунке 10.



Рисунок 10. – Сравнение морфометрических показателей в группах крыс при введении в рацион продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D, ($X \pm m$; $p \leq 0,05$)

Примечание: 1 - достоверные различия между 1 и 2 группами;

2 - достоверные различия между 1 и 3 группами;

3 - достоверные различия между 2 и 3 группами;

Таким образом, у лабораторных животных, получавших молочные продукты, обогащенные белком, кальцием, профилактической и терапевтической дозами витамина D и, не получавших молочный продукт, общее состояние и поведение не отличалось. Процент беременных и соответственно рождаемость была выше у лабораторных животных второй группы. Отмечается снижение

массы тела во время беременности и массы тела потомства, самок крыс второй группы. Патоморфологических изменений выявлено не было. Болезни, связанные с нарушением метаболизма костной ткани, протекают бессимптомно, а первым клиническим проявлением оказываются переломы костей.

3.2 Оценка концентрации общего белка, активности щелочной фосфатазы, уровня кальция, фосфора в сыворотке крови, с последующим расчетом кальций-фосфорного соотношения, при введении в рацион продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D

Известно, что наиболее точным и специфическим показателем обеспеченности организма витамином D является уровень в крови его основной циркулирующей (транспортной) формы $25(\text{OH})\text{D}_3$. Уровень $25(\text{OH})\text{D}_3$ в сыворотке ниже 20 нг/мл (дефицит) был выявлен у крыс, не получавших молочный продукт. Оптимальный уровень витамина D (более 30 нг/мл) определен у животных, получавших молочный продукт, обогащенный белком, кальцием и профилактической дозой витамина D. А после использования молочного продукта, обогащённого кальцием, белком и терапевтической дозой витамина D, установлена токсическая концентрация витамина D в сыворотке крови (более 150 нг/мл). Данные представлены на рисунке 11.

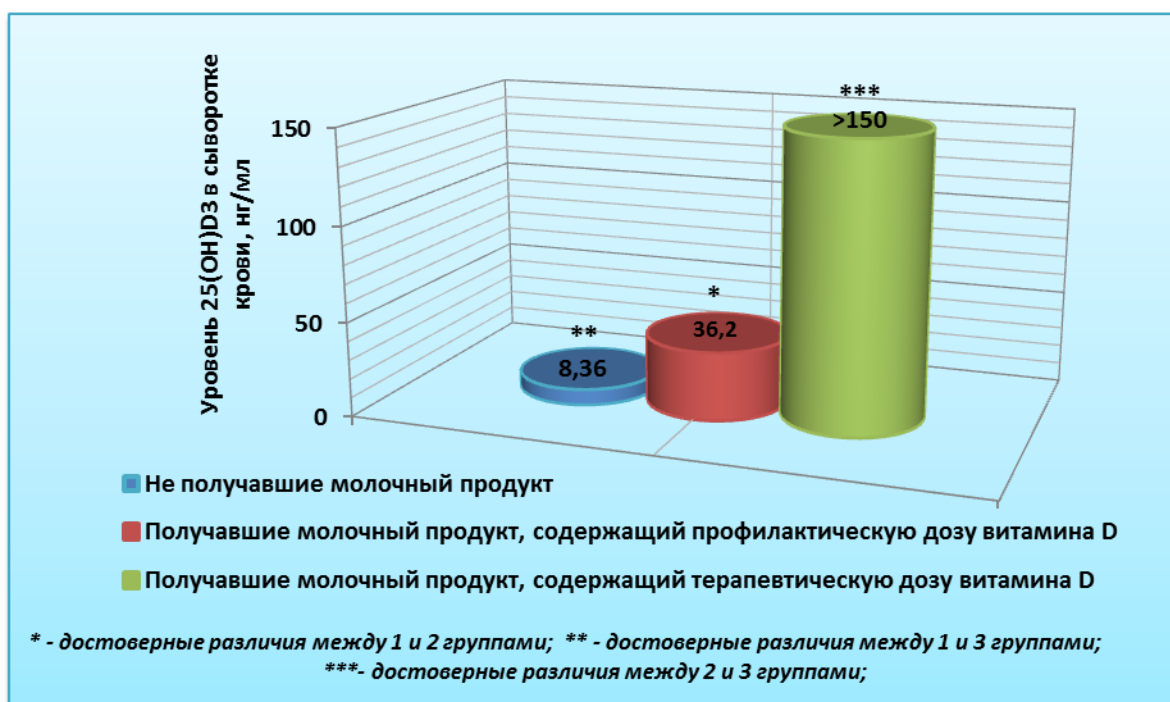


Рисунок 11. – Сравнительный анализ уровня витамина D у крыс, при введении в рацион продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D, ($X \pm m$; $p \leq 0,05$)

С целью изучения влияния продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D, провели оценку концентрации общего белка, активности щелочной фосфатазы, уровня кальция и фосфора в сыворотке крови, с последующим расчетом кальций-фосфорного соотношения между крысами, не получавшими молочный продукт (группа 1, $n=12$), и получавшими высокобелковые, обогащенные кальцием, профилактической (группа 2, $n=12$) и терапевтической дозами витамина D (группа 3, $n=12$), молочные продукты. Полученные результаты обследования представлены в таблицу 3.

Таблица 3. Биохимические показатели крыс, при введении в рацион продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D, ($X \pm m$; $p \leq 0,05$)

	Ca, ммоль/л	P, ммоль/л	Ca/P, у.е.	ЩФ, Ед/л	ОБ, г/л

Первая группа (n=12)	0,88±0,04 ²	0,46±0,02	1,85±0,02 ²	437,32±27,36 ²	42,2±0,61 ²
Вторая группа (n=12)	1,46±0,18 ¹	0,84±0,01 ¹	1,09±0,03 ¹	319,03±19,37 ¹	52,8±0,94 ¹
Третья группа (n=12)	2,25±0,04 ³	0,55±0,03 ³	4,08±0,03 ³	161,61±27,21 ³	50,1±1,33

Примечание: 1 - достоверные различия между 1 и 2 группами;

2 - достоверные различия между 1 и 3 группами;

3 - достоверные различия между 2 и 3 группами;

Как видно из таблицы 4, при анализе сравнения показателей крыс, не получавших молочный продукт, с группами крыс, получавшими молочные продукты с различными концентрациями витамина D, выявили, что уровень кальция в крови (1,46±0,18 ммоль/л) у крыс, получавших высокобелковый, обогащенный кальцием, профилактической дозой витамина D достоверно выше, по сравнению с данными крыс, не получавших молочный продукт (0,88±0,04 ммоль/л, p<0,01) и ниже, чем у крыс, получавших молочный продукт, обогащенный кальцием, белком и терапевтической дозой витамина D (2,25±0,02 ммоль/л, p<0,001). Так же установлено, что у крыс третьей группы (2,25±0,02 ммоль/л) уровень кальция в крови выше, чем у крыс первой группы (0,88±0,02 ммоль/л, p<0,001).

У крыс, получавших молочный продукт, обогащенный белком, кальцием и терапевтической дозой витамина D, отмечалась гипофосфатемия (0,55±0,03 ммоль/л), тогда как, уровень фосфора в сыворотке крови крыс первой (0,46±0,02 ммоль/л, p<0,001) и второй (0,84±0,01 ммоль/л, p<0,001) групп, был достоверно выше и находился в пределах нормы.

В связи с вышеизложенным, были выявлены изменения кальций-фосфорного соотношения. Так из-за выраженной гипофосфатемии, самый высокий показатель отмечался у крыс третьей группы ($4,08 \pm 0,03$ у.е.), по сравнению с первой ($1,85 \pm 0,02$ у.е., $p < 0,001$) и второй ($1,09 \pm 0,03$ у.е., $p < 0,001$) группами лабораторных животных. А у крыс, не получавших молочный продукт, отмечалась выраженная гипокальциемия, и в этой группе животных отмечается самый низкий показатель кальций-фосфорного соотношения.

Для проведения наглядного сравнения полученных данных результаты исследования кальций-фосфорного обмена у животных, получавших молочный продукт, обогащенный кальцием, белком и профилактической дозой витамина D были приняты за 100%, рассчитали относительное содержание аналогичных показателей в первой и третьей группах крыс. В результате расчета показателей кальций-фосфорного обмена у крыс, не получавших молочный продукт оказалось, что уровень кальция в сыворотке крови ниже на 71,2%, фосфора ниже на 3,0%, а кальций-фосфорное соотношение меньше на 71,2%. А у лабораторных животных, получавших молочный продукт, обогащенный кальцием, белком и терапевтической дозой витамина D уровень кальция в сыворотке крови выше на 74,2%, фосфора ниже на 74,3%, а кальций-фосфорное соотношение выше на 589,4%. Данные показателей кальций-фосфорного обмена представлены на рисунке 12.

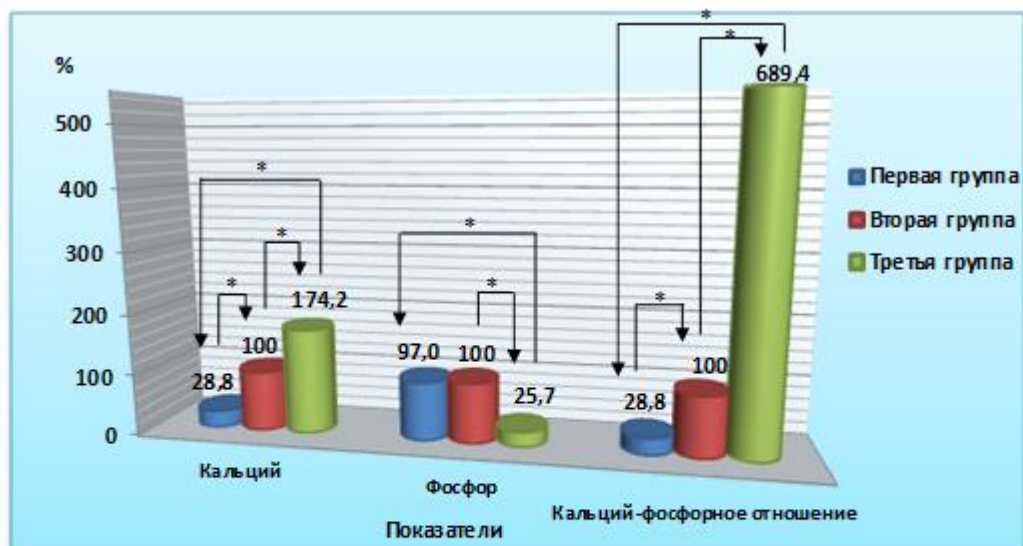


Рисунок 3. – Сравнение показателей кальций-фосфорного обмена в группах крыс при введении в рацион продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D, ($X \pm m$; $p \leq 0,05$)

Примечание: * - достоверные различия между группами;

Рисунок 12. – Сравнение показателей кальций-фосфорного обмена в группах крыс при введении в рацион продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D, ($X \pm m$; $p \leq 0,05$)

Примечание: 1 - достоверные различия между 1 и 2 группами;

2 - достоверные различия между 1 и 3 группами;

3 - достоверные различия между 2 и 3 группами;

В обследуемых группах также проводили биохимическое исследование сыворотки крови с определением концентрации общего белка (рис 14) и активности щелочной фосфатазы (рис 13). Активность щелочной фосфатазы у крыс, не получавших молочный продукт ($437,32 \pm 27,36^2$ Ед/л) больше, чем у крыс, получавших высокобелковые, обогащенные кальцием, профилактической ($319,03 \pm 19,37^1$ Ед/л, $p < 0,001$) и терапевтической ($161,61 \pm 27,21^3$ Ед/л, $p < 0,001$) дозами витамина D, молочные продукты. Причем, у крыс третьей группы, данный показатель статистически достоверно выше, чем у крыс второй группы ($p < 0,001$).

Так же выявлено, что концентрация общего белка, у крыс второй ($52,8 \pm 0,94$ г/л) и третьей групп ($50,1 \pm 1,33$ г/л), статистически достоверно больше ($p < 0,01$) чем, концентрации общего белка у крыс первой группы ($42,2 \pm 0,61$ г/л). Однако, статистически достоверных отличий между показателем второй и третьей групп лабораторных животных, выявлено не было.

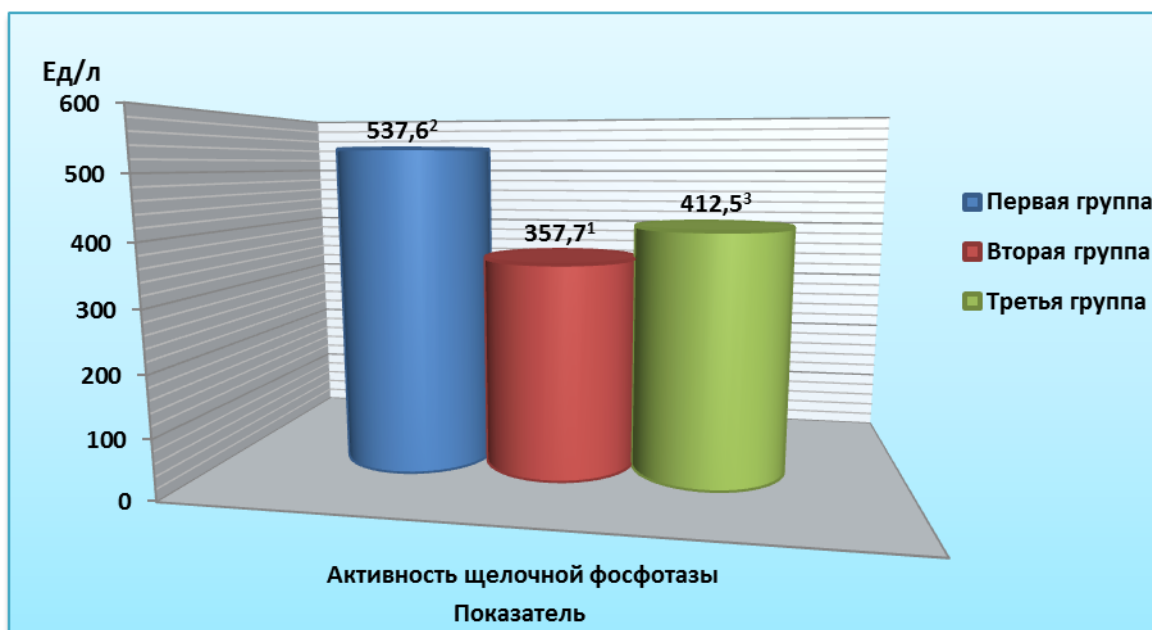


Рисунок 13. – Сравнение активности щелочной фосфатазы в группах крыс при введении в рацион продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D, ($X \pm m$; $p \leq 0,05$)

Примечание: 1 - достоверные различия между 1 и 2 группами;

2 - достоверные различия между 1 и 3 группами;

3 - достоверные различия между 2 и 3 группами;

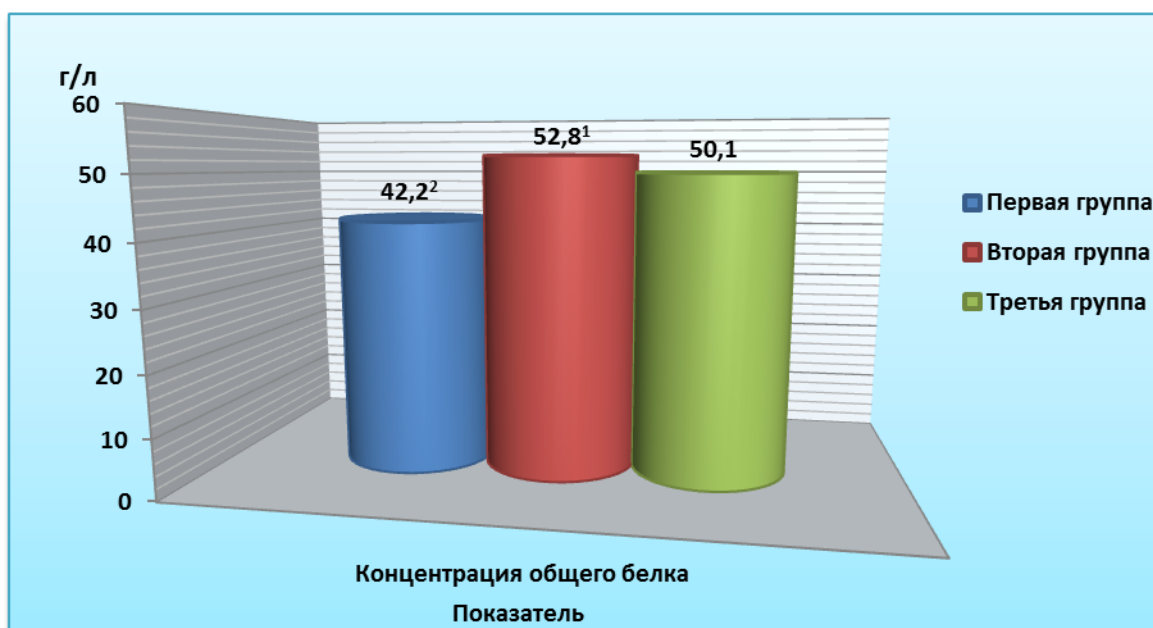


Рисунок 14. – Сравнение концентрации общего белка, в сыворотке крови крыс, при введении в рацион продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D, ($X \pm m$; $p \leq 0,05$)

Примечание: 1 - достоверные различия между 1 и 2 группами;

2 - достоверные различия между 1 и 3 группами;

Таким образом, у крыс, получавших высокобелковый, обогащенный кальцием и профилактической дозой витамина D, молочный продукт, биохимические показатели находятся в пределах нормы. У лабораторных животных, не получавших молочный продукт, наблюдается затяжной биохимический синдром характерный для остеомаляции. Было установлено достоверное снижение уровня $25(\text{OH})\text{D}_3$, гипокальциемия, уменьшение кальций-фосфорного соотношения и концентрации общего белка. При этом активность ЩФ резко увеличена, что также указывает на недостаточность минерализации костной ткани и остеомаляцию. А у крыс, получавших высокобелковый, обогащенный кальцием и терапевтической дозой витамина D, молочный продукт, отмечается интоксикация витамином D. При этом выявленная гиперкальциемия, свидетельствует об усиленной резорбции

костной ткани, а резко выраженная гипофосфатемия и повышение активности ЩФ, свидетельствуют о развитии остеопороза.

3.3 Влияние высокобелкового обогащенного кальцием и различными концентрациями витамина D молочного продукта на минеральную плотность костной ткани

Для решения поставленной задачи, оценить влияние высокобелкового обогащенного кальцием и различными концентрациями витамина D молочного продукта на минеральную плотность костной ткани, провели оценку минеральной плотности костной ткани между крысами, не получавшими молочный продукт (группа 1, n=12), и получавшими высокобелковые, обогащенные кальцием, профилактической (группа 2, n=12) и терапевтической дозами витамина D (группа 3, n=12), молочные продукты. Рентгеновские изображения, сечения бедренной кости крыс, представлены на рисунках 15-17.

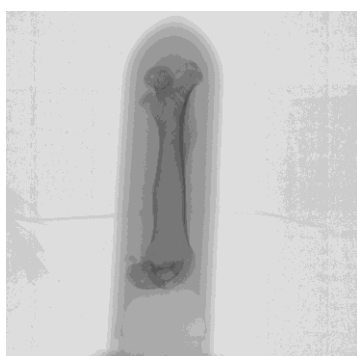


Рисунок 15. –
Рентгеновское
изображение сечения
бедренной кости
крысы, не получавшей
молочный продукт



Рисунок 16. –
Рентгеновское
изображение сечения
бедренной кости
крысы, получавшей
молочный продукт,
содержащий
профилактическую



Рисунок 17. –
Рентгеновское
изображение сечения
бедренной кости
крысы, получавшей
молочный продукт,
содержащий
терапевтическую дозу

Результаты обследования представлены в таблице 4.

Таблица 4. Показатели минеральной плотности костной ткани у крыс, при введении в рацион продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D, ($X \pm m$; $p \leq 0,05$)

	кортикальный BMD, г/см³	трабекулярный BMD, г/см³
Первая группа (n=12)	1,132±0,003 ²	0,052±0,005 ²
Вторая группа (n=12)	1,172±0,004 ¹	0,195±0,005 ¹
Третья группа (n=12)	1,065±0,004 ³	0,018±0,003 ³

Примечание: 1 - достоверные различия между 1 и 2 группами;

2 - достоверные различия между 1 и 3 группами;

3 - достоверные различия между 2 и 3 группами;

Как видно из таблицы, при анализе сравнения показателей крыс, не получавших молочный продукт, с группами крыс, получавшими молочные продукты с различными концентрациями витамина D, выявили, что кортикальный BMD (1,172 г/см³) у крыс, получавших высокобелковый, обогащенный кальцием, профилактической дозой витамина D достоверно выше, по сравнению с данными крыс, не получавших молочный продукт (1,132 г/см³) и, чем у крыс, получавших молочный продукт, обогащенный кальцием, белком и терапевтической дозой витамина D (1,065 г/см³). Так же установлено, что у крыс третьей группы (1,065 г/см³) кортикальный BMD ниже, чем у крыс первой группы (1,132 г/см³). То же самое наблюдалось при исследовании трабекулярного BMD. У крыс первой группы (0,052 г/см³) данный показатель

оказался ниже, чем у крыс второй группы (0,195 г/см³) и выше, чем у крыс третьей группы (0,018 г/см³).

Для проведения наглядного сравнения полученных данных, результаты компьютерного рентгеновского исследования у животных, получавших молочный продукт, обогащенный кальцием, белком и профилактической дозой витамина D были приняты за 100%, рассчитали относительное содержание аналогичных показателей в первой и третьей группах крыс. В результате расчета показателей минеральной плотности костной ткани у крыс, не получавших молочный продукт оказалось, что кортикальный BMD ниже на 3,3%, а трабекулярный BMD ниже на 73,4%. А у лабораторных животных, получавших молочный продукт, обогащенный кальцием, белком и терапевтической дозой витамина D кортикальный BMD ниже на 8,9%, а трабекулярный BMD ниже на 90,9%. Данные показателей минеральной плотности костной ткани представлены на рисунке 18.

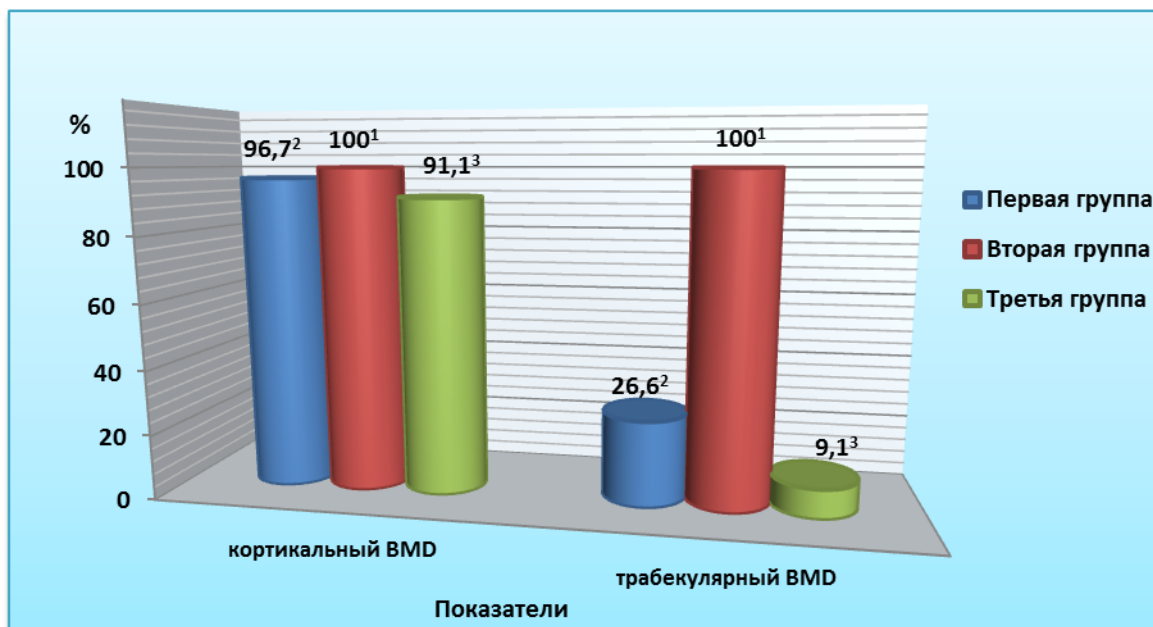


Рисунок 18. – Сравнение показателей минеральной плотности костной ткани в группах крыс при введении в рацион продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D, ($X \pm m$; $p \leq 0,05$)

Примечание: 1 - достоверные различия между 1 и 2 группами;

2 - достоверные различия между 1 и 3 группами;

3 - достоверные различия между 2 и 3 группами;

Таким образом, в первой и третьей группах животных наблюдается снижение кортикального BMD и трабекулярного BMD, с более выраженными изменениями в третьей группе животных, что свидетельствует о нарушении минеральной плотности костной ткани и вымыванию минералов из костей. Основываясь на данных полученных при биохимическом исследовании, данные денситометрии подтверждают активность и остроту остеомалации, в первой группе животных, и остеопороза, в третьей группе.

Заключение

В настоящее время, проблема дефицита витамина D приобретает особое значение, поскольку, по данным Захаровой И.Н. и соавт., гиповитаминоз D имеется почти у 1/2 населения мира. Доказано, что низкий уровень витамина D в сыворотке крови, развивающийся в результате недостаточного потребления витамина D с продуктами питания и/или недостатка солнечного ультрафиолетового излучения, связан с повышенным риском инвалидизации населения из-за развития тяжелых хронических заболеваний. Именно поэтому растет интерес к количественной оценке и пониманию механизмов обмена витамина D в организме человека.

Проблема обеспеченности витамином D различных возрастных групп населения, до настоящего времени, в России относится к разряду малоизученных, поскольку недостаточно данных, посвященных оценке статуса витамина D, его влиянию на состояние костного метаболизма, формирование патологических процессов в организме. Не разработаны принципы своевременной профилактики и оптимальные способы коррекции низкого статуса витамина D.

В связи с этим, целью нашего исследования явилось изучение влияния витамин D – обогащенных продуктов на метаболизм костной ткани.

Исходя из цели, поставили перед собой следующие задачи: изучить морфометрические изменения самок крыс и их потомства, оценить концентрацию общего белка, активность щелочной фосфатазы, уровень кальция, фосфора в сыворотке крови, с последующим расчетом кальций-фосфорного соотношения при введении в рацион продуктов, обогащенных различными концентрациями витамина D и изучить влияние высокобелкового, обогащенного кальцием и различными дозами витамина D, молочного продукта на минеральную плотность костной ткани.

Для проведения эксперимента объектом исследования были выбраны белые крысы линии Вистар. Правомерность использования крыс в эксперименте обусловлена тем, что гемохориальная плацентация грызунов представляет наибольший интерес, как наиболее близкая к плацентации человека.

Для решения поставленных в работе задач было исследовано 36 взрослых крыс. На 36 взрослых крыс поставлены основные эксперименты. В соответствии с целью и задачами взрослых крыс распределяли по группам рандомизированным методом: 1-я - крысы, не получавшие высокобелковое молоко, обогащенное витамином D и кальцием; 2-я - крысы, получавшие высокобелковое молоко, обогащенное профилактической дозой витамина D и кальцием; 3-я – крысы, получавшие высокобелковое молоко, обогащенное терапевтической дозой витамина D и кальцием. Животных выводили из эксперимента, после прекращения кормления потомства, путем декапитации под эфирным наркозом. Кровь для исследования забирали из бедренной вены в пластиковую пробирку, содержащую 100 МЕ гепарина натрия. Бедренные кости отделяли и помещали в пробирку с 0,9% раствором хлористого натрия.

Для проведения эксперимента использовали молоко с повышенным содержанием белка, кальция и обогащенное премиксом витамина D (фирма DSM, тип 100 CWS), вносимого в количестве 0,01г на 1кг продукта. Сухой

витамин D₃ в концентрации 100 000МЕ/г, стабилизирован токоферолом; микрокапсулы диспергируемые в холодной воде. Так же, молоко содержит 5,5% белка, от 200 мг на 100 г кальция, 2,5% жира и энергетическая ценность его, составляет 43,7 ккал/183 кДж.

Для изучения состояния минерального обмена у лабораторных животных, проводили биохимическое исследование на автоматическом биохимическом анализаторе «Cobas c111» фирмы «Roche Diagnostic» (Швейцария). В нашей работе оценивали активность щелочной фосфатазы, концентрацию общего белка, кальция, фосфора в сыворотке крови, с последующим расчетом кальций-фосфорного соотношения. Уровень витамина D в крови определяли на иммунохемилюминесцентном анализаторе «Liaison XL» (Италия). Для определения минеральной плотности костной ткани использовали рентгеновский компьютерный микротомограф «SkyScan 1176» фирмы «Bruker» (Бельгия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием методов параметрического анализа и пакета Microsoft Excel. Достоверность различных средних определялась по критерию Стьюдента (t), для коэффициента вариации, уровень p выбран не менее 0,05.

Морфометрические изменения позволяют дать первичную оценку состояния костной ткани. Для выявления нарушений метаболизма костной ткани наиболее оптимальным является сочетание морфометрического исследования, позволяющего заподозрить нарушения, биохимического исследования, количественного определения 25-гидроксивитамина D сыворотки крови и денситометрия, которые позволяют объективно судить о состоянии костной ткани.

На протяжении всего эксперимента проводили систематическое наблюдение за животными. Общее состояние и поведение животных во всех группах не отличалось. Крысы были активными, хорошо поедали корм, существенных изменений спонтанной двигательной активности не отмечалось. Случаев гибели животных не было отмечено. После декапитации под эфирным

наркозом установлено, что лабораторные животные имели сплошной волосяной покров, гладкую блестящую шерсть, видимые слизистые оболочки и кожные покровы нормальной окраски. А также изменения кожных покровов в виде шелушения, гиперемии, отеков не выявлено. Деформаций и отеков конечностей нет. Так же, установлено влияние на репродуктивную систему и половое поведение. Так процент беременных крыс в первой группе (50,0%) был больше, чем у животных третьей группы (33,3%), но меньше, чем у животных второй группы (83,3%). Достоверных отличий в весе до беременности, наборе веса, между группами установлено не было ($p > 0,1$). Так же, отмечается достоверно более низкие показатели массы тела во время беременности ($188,0 \pm 5,1$ г) и массы тела потомства ($21,8 \pm 0,8$ г), самок крыс второй группы, по сравнению с крысами первой и третьей групп ($p \leq 0,05$). Болезни, связанные с нарушением метаболизма костной ткани, протекают бессимптомно, а первым клиническим проявлением оказываются переломы костей.

У крыс, получавших высокобелковый, обогащенный кальцием и профилактической дозой витамина D, молочный продукт, биохимические показатели находятся в пределах нормы. У лабораторных животных, не получавших молочный продукт, наблюдается затяжной биохимический синдром. Было установлено достоверное снижение уровня $25(\text{OH})\text{D}_3$ ($8,36 \pm 0,09$ нг/мл), гипокальциемия ($0,88 \pm 0,04$ ммоль/л), уменьшение кальций-фосфорного соотношения ($1,85 \pm 0,02$ у.е.) и концентрации общего белка ($42,2 \pm 0,61$ г/л), по сравнению с данными первой группы животных ($p \leq 0,05$). При этом активность ЩФ резко увеличена ($437,32 \pm 27,36$ Ед/л), что также указывает на недостаточность минерализации костной ткани. А у крыс, получавших высокобелковый, обогащенный кальцием и терапевтической дозой витамина D, молочный продукт, отмечается интоксикация витамином D ($150,0 \pm 0,001$ нг/мл). При этом выявленная гиперкальциемия ($2,25 \pm 0,04$ ммоль/л), свидетельствует об усиленной резорбции костной ткани, а резко выраженная гипофосфатемия ($0,55 \pm 0,03$ ммоль/л) и повышение активности ЩФ ($319,03 \pm 27,21$ Ед/л), свидетельствуют о развитии остеопороза.

В первой группах животных наблюдается снижение кортикального BMD (1,132 г/см³) и трабекулярного BMD (0,052 г/см³), по сравнению с данными второй группы животных ($p \leq 0,05$). Более выраженные изменения наблюдались в третьей группе. Так кортикального BMD (1,065 г/см³) и трабекулярного BMD (0,018 г/см³) был ниже показателе второй группы животных ($p \leq 0,05$), что свидетельствует о нарушения минеральной плотности костной ткани и вымыванию минералов из костей. Основываясь на данных полученных при биохимическом исследовании, данные денситометрии подтверждают активность и остроту остеомалации, в первой группе животных, и остеопороза, в третьей группе.

Выводы

1. У лабораторных животных, получавших молочные продукт, обогащенный белком, кальцием, профилактической и терапевтической дозами витамина D и, не получавших молочный продукт, общее состояние и поведение не отличалось. Процент беременных и соответственно рождаемость была выше у лабораторных животных второй группы. Отмечается снижение массы тела во время беременности и массы тела потомства, самок крыс второй группы. Патоморфологических изменений выявлено не было. Болезни, связанные с нарушением метаболизма костной ткани, протекают бессимптомно, а первыми клиническими проявлениями оказываются переломы костей.
2. У крыс, получавших высокобелковый, обогащенный кальцием и профилактической дозой витамина D, молочный продукт, биохимические показатели находятся в пределах нормы. У лабораторных животных, не получавших молочный продукт, наблюдается затяжной биохимический синдром характерный для остеомалации. Было установлено достоверное снижение уровня 25(OH)D₃, гипокальциемия, уменьшение кальций-фосфорного соотношения и концентрации общего белка. При этом активность ЩФ резко увеличена, что также указывает на недостаточность минерализации костной

ткани и остеомалацию. А у крыс, получавших высокобелковый, обогащенный кальцием и терапевтической дозой витамина D, молочный продукт, отмечается интоксикация витамином D. При этом выявленная гиперкальциемия, свидетельствует об усиленной резорбции костной ткани, а резко выраженная гипофосфатемия и повышение активности ЩФ, свидетельствуют о развитии остеопороза.

3. В первой и третьей группах животных наблюдается снижение кортикального BMD и трабекулярного BMD, с более выраженными изменениями в третьей группе животных, что свидетельствует о нарушении минеральной плотности костной ткани и вымыванию минералов из костей. Основываясь на данных полученных при биохимическом исследовании, данные денситометрии подтверждают активность и остроту остеомалации, в первой группе животных, и остеопороза, в третьей группе.

1. Бондарь, Т.П. Оценка биохимических показателей потомства самок крыс, в различные возрастные периоды, получавших высокобелковый, обогащенный кальцием и витамином D, молочный продукт / Т.П. Бондарь, К.С. Светлицкий, Ю.С. Светлицкая, О.А. Асеева // Наука. Инновации. Технологии. – 2016. – Вып.1. – С. 157 – 167.
2. Венгржиновская О.И., Бондаренко И.З., Влияние дефицита витамина D на сердечно-сосудистую систему, 2021 г. - 45 с.
3. Киселёва, И.В. Изменение маркеров метаболизма костной ткани в сыворотке крови у больных остеопорозом / И.В. Киселёва // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 3. – С. 553.
4. Коденцова В.М., Саркисян В.А., Воробьева В.М. и др. Обогащение пищевых продуктов витамином D: международный опыт и новые тенденции. Пищевая промышленность, 2019г. – 123 с.
5. Коденцова В.М., Мендель О.И., Хотимченко С.А. и др. Физиологическая потребность и эффективные дозы витамина D для коррекции его дефицита. Современное состояние проблемы. Вопросы питания, 2017 г.
6. Коденцова В.М., Рисник Д.В. Витамин D: медицинские и социально-экономические аспекты. Вопросы диетологии, 2017 г.
7. Лавренчук А.А., Донецкий А.А. Правильное питание как залог здоровья и долголетия, 2022. – 37 с.
8. Мазур И.Н., Поворознюк В.В., Новошицкий В.И. Активность воспалительно-деструктивных процессов у пациентов с генерализованным пародонтитом в зависимости от уровня витамина D. – 2017 г.
9. Малеев Ю.В., Ульянова О.В. Основа профилактики всех заболеваний – рациональное питание, 2020 г.-С.26
10. Мальцев, С.В. Метаболизм витамина D и пути реализации его основных функций / С.В. Мальцев, Г.Ш. Мансурова // Практическая медицина. – 2014. Вып.9(85). – С. 12 – 18.

11. Мальцева, Л.И. Новые подходы к оценке роли витамина D в репродуктивном здоровье женщины / Л.И. Мальцева, Э.Н. Васильева // Практическая медицина. – 2013. Вып.7(76). – С. 42–47.
12. Ackland ML, Michalczyk AA. Zinc and infant nutrition. Arch Biochem Biophys. 2016 Dec 1;611:51-57. doi: 10.1016/j.abb.2016.06.011. Epub 2016 Jun 15. PMID: 27317042.
13. Alwarith J, Kahleova H, Crosby L, Brooks A, Brandon L, Levin SM, Barnard ND. The role of nutrition in asthma prevention and treatment. Nutr Rev. 2020 Nov 1;78(11):928-938. doi: 10.1093/nutrit/nuaa005. PMID: 32167552; PMCID: PMC7550896.
14. Al Alwan I, Al Badi M, Badri M, Tamimi W, Al Dubayee M, Mughal MZ, Babiker A. Higher serum alkaline phosphatase activity in infants born to vitamin D-deficient mothers. Arch Osteoporos. 2019 Oct 25;14(1):102. doi: 10.1007/s11657-019-0651-9. PMID: 31650259.
- 15.(51) Asif A, Farooq N. Vitamin D Toxicity. 2022 Apr 28. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 32491799.
16. Bishehsari F, Voigt RM, Keshavarzian A. Circadian rhythms and the gut microbiota: from the metabolic syndrome to cancer. Nat Rev Endocrinol. 2020 Dec;16(12):731-739. doi: 10.1038/s41574-020-00427-4. Epub 2020 Oct 26. PMID: 33106657; PMCID: PMC8085809.
17. Bovolini A, Garcia J, Andrade MA, Duarte JA. Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. Int J Sports Med. 2021 Mar;42(3):199-214. doi: 10.1055/a-1263-0898. Epub 2020 Oct 19. PMID: 33075830.
18. Calder PC. Nutrition, immunity and COVID-19. BMJ Nutr Prev Health. 2020;3:e000085.. doi: 10.1136/bmjnp-2020-000085. - DOI - PMC - PubMed
19. Calder PC, Bosco N, Bourdet-Sicard R, Capuron L, Delzenne N, Doré J, et al. Health relevance of the modification of low grade inflammation in ageing

- (inflammageing) and the role of nutrition. *Ageing Res Rev.* 2017;40:95–119. doi: 10.1016/j.arr.2017.09.001. - DOI - PubMed
20. Całyniuk B, Górski M, Garbicz J, Grochowska-Niedworok E. Nutrition knowledge of people with eating disorders. *Rocz Panstw Zakł Hig.* 2019;70(1):41-48. doi: 10.32394/rpzh.2019.0053. PMID: 30837745.
21. Castro-Herrera VM, Fisk HL, Wootton M, Lown M, Owen-Jones E, Lau M, et al. Combination of the probiotics *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12 has limited effect on biomarkers of immunity and inflammation in older people resident in care homes: results from the Probiotics to Reduce Infections in Care home Residents Randomized, Controlled Trial. *Front Immunol.* 2021;12:643321.. doi: 10.3389/fimmu.2021.643321. - DOI - PMC - PubMed
22. Chang SW, Lee HC. Vitamin D and health - The missing vitamin in humans. *Pediatr Neonatol.* 2019 Jun;60(3):237-244. doi: 10.1016/j.pedneo.2019.04.007. Epub 2019 Apr 17. PMID: 31101452.
23. Chagas SCC, Moreira FSM, Barbosa ICF, Leal Júnior OS, Leal LB, Santana DP. Critical analysis on the use of cholecalciferol as a COVID-19 intervention: a narrative review. *Sao Paulo Med J.* 2021 Jan-Feb;139(1):81-87. doi: 10.1590/1516-3180.2020.0532.02112020. PMID: 33656132; PMCID: PMC9632500.
24. Cannell JJ. Vitamin D and autism, what's new? *Rev Endocr Metab Disord.* 2017 Jun;18(2):183-193. doi: 10.1007/s11154-017-9409-0. PMID: 28217829.
25. Devarshi PP, Grant RW, Ikonte CJ, Hazels Mitmesser S. Maternal Omega-3 Nutrition, Placental Transfer and Fetal Brain Development in Gestational Diabetes and Preeclampsia. *Nutrients.* 2019 May 18;11(5):1107. doi: 10.3390/nu11051107. PMID: 31109059; PMCID: PMC6567027.
26. Georgieff MK, Ramel SE, Cusick SE. Nutritional influences on brain development. *Acta Paediatr.* 2018 Aug;107(8):1310-1321. doi: 10.1111/apa.14287. Epub 2018 Mar 22. PMID: 29468731; PMCID: PMC6045434.

27. Giannini S, Passeri G, Tripepi G, Sella S, Fusaro M, Arcidiacono G, et al. Effectiveness of in-hospital cholecalciferol use on clinical outcomes in comorbid COVID-19 patients: a hypothesis-generating study. *Nutrients*. 2021;13:219.. doi: 10.3390/nu13010219. - DOI - PMC - PubMed
28. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017 Jun;18(2):153-165. doi: 10.1007/s11154-017-9424-1. PMID: 28516265.
29. Holick M. F., Garabedian M. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In: M. J. Favus (ed.). *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 6th edn. Ch. 17. American Society for Bone and Mineral Research. Washington, DC. 2006. P. 129–137.
30. Hossein-nezhad A., Spira A., Holick M.F. Influence of vitamin D status and vitamin D3 supplementation on genome wide expression of white blood cells: a randomized double-blind clinical trial // *PLoS One*. 2013. 8(3). e58725. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058725>.
31. Ichnatowicz P, Drywień M, Wątor P, Wojsiat J. The importance of nutritional factors and dietary management of Hashimoto's thyroiditis. *Ann Agric Environ Med*. 2020 Jun 19;27(2):184-193. doi: 10.26444/aaem/112331. Epub 2019 Oct 2. PMID: 32588591.
32. Karcz K, Królak-Olejniak B, Paluszyńska D. Dieta wegetariańska w ciąży i okresie laktacji – bezpieczeństwo i zasady bilansowania jadłospisu w aspekcie optymalnego rozwoju płodu i noworodka [Vegetarian diet in pregnancy and lactation - safety and rules of balancing meal plan in the aspect of optimal fetal and infant development]. *Pol Merkur Lekarski*. 2019 Jan 28;46(271):45-50. Polish. PMID: 30810116.
33. Kreider RB, Kalman DS, Antonio J, Ziegenfuss TN, Wildman R, Collins R, Candow DG, Kleiner SM, Almada AL, Lopez HL. International Society of Sports Nutrition position stand: safety and efficacy of creatine supplementation

- in exercise, sport, and medicine. *J Int Soc Sports Nutr.* 2017 Jun 13;14:18. doi: 10.1186/s12970-017-0173-z. PMID: 28615996; PMCID: PMC5469049.
34. LeFevre M.L. Clinical guideline. Screening for Vitamin D Deficiency in Adults: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement // *Ann. Intern. Med.* 2015. Vol. 162(2). P. 133–140.
35. Ling SF, Broad E, Murphy R, Pappachan JM, Pardesi-Newton S, Kong MF, et al. High-dose cholecalciferol booster therapy is associated with a reduced risk of mortality in patients with COVID-19: a cross-sectional multi-centre observational study. *Nutrients.* 2020;12:3799.. doi: 10.3390/nu12123799. - DOI - PMC - PubMed
36. Mikulska AA, Karaźniewicz-Łada M, Filipowicz D, Ruchała M, Główska FK. Metabolic Characteristics of Hashimoto's Thyroiditis Patients and the Role of Microelements and Diet in the Disease Management-An Overview. *Int J Mol Sci.* 2022 Jun 13;23(12):6580. doi: 10.3390/ijms23126580. PMID: 35743024; PMCID: PMC9223845.
37. Pellegrino L, Marangoni F, Muscogiuri G, D'Incecco P, Duval GT, Annweiler C, Colao A. Vitamin D Fortification of Consumption Cow's Milk: Health, Nutritional and Technological Aspects. A Multidisciplinary Lecture of the Recent Scientific Evidence. *Molecules.* 2021 Aug 31;26(17):5289. doi: 10.3390/molecules26175289. PMID: 34500722; PMCID: PMC8434398.
38. Pera A, Campos C, López N, Hassouneh F, Alonso C, Tarazona R, et al. Immunosenescence: implications for response to infection and vaccination in older people. *Maturitas.* 2015;82:50–5. doi: 10.1016/j.maturitas.2015.05.004. - DOI - PubMed
39. Pfothner KM, Shubrook JH. Vitamin D Deficiency, Its Role in Health and Disease, and Current Supplementation Recommendations. *J Am Osteopath Assoc.* 2017 May 1;117(5):301-305. doi: 10.7556/jaoa.2017.055. PMID: 28459478.

40. Prud'homme GJ, Kurt M, Wang Q. Pathobiology of the Klotho Antiaging Protein and Therapeutic Considerations. *Front Aging*. 2022 Jul 12;3:931331. doi: 10.3389/fragi.2022.931331. PMID: 35903083; PMCID: PMC9314780.
41. Peña-Romero AC, Navas-Carrillo D, Marín F, Orenes-Piñero E. The future of nutrition: Nutrigenomics and nutrigenetics in obesity and cardiovascular diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018;58(17):3030-3041. doi: 10.1080/10408398.2017.1349731. Epub 2017 Aug 24. PMID: 28678615.
42. Quesada-Gomez JM, Bouillon R. Is calcifediol better than cholecalciferol for vitamin D supplementation? *Osteoporos Int*. 2018 Aug;29(8):1697-1711. doi: 10.1007/s00198-018-4520-y. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29713796.
43. Roth DE, Abrams SA, Aloia J, Bergeron G, Bourassa MW, Brown KH, Calvo MS, Cashman KD, Combs G, De-Regil LM, Jefferds ME, Jones KS, Kapner H, Martineau AR, Neufeld LM, Schleicher RL, Thacher TD, Whiting SJ. Global prevalence and disease burden of vitamin D deficiency: a roadmap for action in low- and middle-income countries. *Ann N Y Acad Sci*. 2018 Oct;1430(1):44-79. doi: 10.1111/nyas.13968. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30225965; PMCID: PMC7309365.
44. Saponaro F, Saba A, Zucchi R. An Update on Vitamin D Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 8;21(18):6573. doi: 10.3390/ijms21186573. PMID: 32911795; PMCID: PMC7554947.
45. Schlingmann KP. Vitamin D-dependent Hypercalcemia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2021 Dec;50(4):729-742. doi: 10.1016/j.ecl.2021.08.005. PMID: 34774244.
46. Trexler ET, Smith-Ryan AE. Creatine and Caffeine: Considerations for Concurrent Supplementation. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2015 Dec;25(6):607-23. doi: 10.1123/ijsnem.2014-0193. PMID: 26219105.
47. Vieth R. Vitamin D supplementation: cholecalciferol, calcifediol, and calcitriol. *Eur J Clin Nutr*. 2020 Nov;74(11):1493-1497. doi: 10.1038/s41430-020-0697-1. Epub 2020 Jul 23. PMID: 32704098.

- 48.Vranić L, Mikolašević I, Milić S. Vitamin D Deficiency: Consequence or Cause of Obesity? *Medicina (Kaunas)*. 2019 Aug 28;55(9):541. doi: 10.3390/medicina55090541. PMID: 31466220; PMCID: PMC6780345.
- 49.Vranić L, Mikolašević I, Milić S. Vitamin D Deficiency: Consequence or Cause of Obesity? *Medicina (Kaunas)*. 2019 Aug 28;55(9):541. doi: 10.3390/medicina55090541. PMID: 31466220; PMCID: PMC6780345.
- 50.Wax B, Kerksick CM, Jagim AR, Mayo JJ, Lyons BC, Kreider RB. Creatine for Exercise and Sports Performance, with Recovery Considerations for Healthy Populations. *Nutrients*. 2021 Jun 2;13(6):1915. doi: 10.3390/nu13061915. PMID: 34199588; PMCID: PMC8228369.
- 51.Yeh T-L, Shih P-C, Liu S-J, Lin C-H, Liu J-M, Lei W-T, et al. The influence of prebiotic or probiotic supplementation on antibody titers after influenza vaccination: a systematic review and meta- analysis of randomized controlled trials. *Drug Des Devel Ther*. 2018;12:217–30. doi: 10.2147/DDDT.S155110. - DOI - PMC - PubMed
- 52.Zhang Y, Fang F, Tang J, Jia L, Feng Y, Xu P, Faramand A. Association between vitamin D supplementation and mortality: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2019 Aug 12;366:l4673. doi: 10.1136/bmj.l4673. Erratum in: *BMJ*. 2020 Sep 22;370:m2329. PMID: 31405892; PMCID: PMC6689821.