

# BIOSENSORS

---

# БІОСЕНСОРИ

---

---

УДК 602.1:53.082.9+604.4:577.16

## ЗАСТОСУВАННЯ СУЧАСНИХ ТЕХНОЛОГІЙ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНИХ МЕТАБОЛІТІВ ВІТАМІНУ D (ОГЛЯД)

*О. С. Гойстер<sup>1</sup>, В. Є. Кривенчук<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Національний університет харчових технологій  
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601;

<sup>2</sup>ДП «Науковий токсикологічний центр ім. Л. І. Медведя МОЗ України»  
вул. Героїв Оборони, 6, м. Київ, Україна, 03680  
E-mail: gojstero@ukr.net

## ЗАСТОСУВАННЯ СУЧАСНИХ ТЕХНОЛОГІЙ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНИХ МЕТАБОЛІТІВ ВІТАМІНУ D (ОГЛЯД)

*О. С. Гойстер, В. Є. Кривенчук*

**Анотація.** В огляді здійснено критичний аналіз існуючих методів ідентифікації активних метаболітів вітаміну D, серед яких рідинна хроматографія, мас-спектрометрія та імунохімічні методи, в тому числі ELISA. Значну увагу приділено розвитку нових методів, основаних на біосенсорних технологіях. Здійснено стислий аналіз сучасного стану досліджень спрямованих на вивчення ефективності використання вітаміну D та його метаболітів для повноцінного забезпечення ними організму.

**Ключові слова:** метаболіти вітаміну D, 25OHD<sub>3</sub>, аналітичні методи, біосенсори, автоматизація, DEQAS

## APPLICATION OF NEW TECHNOLOGIES FOR IDENTIFYING OF ACTIVE METABOLITES OF VITAMIN D (REVIEW)

*Oksana S. Goister, Vladimir Kriwenchuk*

**Abstract.** In the review the critical analysis of existing methods of identification active metabolites vitamin D, among which liquid chromatography, mass spectrometry, and also immunochemical methods, including ELISA is made. The considerable attention is given development of new methods, on basis biosensors technologies. The short analysis of a current state of researches directed on studying of efficiency of use of vitamin D and it metabolites for high-grade maintenance of an organism is carried out with them.

**Keywords:** metabolites vitamin D, 25OHD<sub>3</sub>, analytical methods, biosensor controls, automation, DEQAS

## ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ВИТАМИНА D (ОБЗОР)

*О. С. Гойстер, В. Е. Кривенчук*

**Аннотация.** В обзоре сделан критический анализ существующих методов идентификации активных метаболитов витамина D, среди которых жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, а также иммунохимические методы, в том числе ELISA. Значительное внимание уделено развитию новых методов, основанных на биосенсорных технологиях. Осуществлен краткий анализ современного состояния исследований направленных на изучение эффективности использования витамина D и его метаболитов для полноценного обеспечения ими организма.

**Ключевые слова:** метаболиты витамина D, 25OHD<sub>3</sub>, аналитические методы, биосенсоры, автоматизация, DEQAS

### Вступ

Широкий спектр сучасних дослідницьких робіт демонструє вплив активних метаболітів вітаміну D в організмі людини на численні фізіологічні процеси. У зв'язку з цим у всьому світі зростає увага до питань забезпеченості ними організму на протязі життя. Традиційна характеристика вітаміну D як гормона регулятора мінерального обміну в останні роки була доповнена новими даними. Так відомо, що рівень забезпеченості вітаміном D високо-асоційований з ризиком розвитку інфекційних, алергічних, хронічних запальних, серцево-судинних, та аутоімунних захворювань. Відношення між раком та вітаміном D залишаються дискусійними. Багато з механізмів, запропо-

нованих для вітаміну D і профілактики раку, вивчалися лише в контексті однієї тканини або одного типу раку і, таким чином, наступні дослідження необхідно провести, для того, щоб визначити, чи можуть ці механізми бути узагальненими.

Відкриття метаболічних шляхів, якими вітамін D перетворюється в біологічно активні форми і з'ясування механізму їх дії також дозволило суттєво переглянути погляди на фізіологічне значення цього вітаміну. Активні метаболіти вітаміну D проявляють свою дію на рівні органів-мішеней через специфічні рецептори вітаміну D, які, взаємодіючи у ядрі з відповідною послідовністю ДНК, контролюють транскрипцію відповідних генів. Так 25OHD<sub>3</sub>

(25-гідроксिवітамін D<sub>3</sub>, 25-гідроксиколекальциферол) являє собою основну форму вітаміну, що циркулює в крові людини і зв'язаний з транспортним білком та є критерієм оцінки D-вітамінного статусу організму. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (1,25-дигідроксиколекальциферол) через різні механізми регулює специфічний та неспецифічний імунітет, проявляє антипухлинні ефекти.

На основі клінічних досліджень, на сьогоднішній день встановлено, що дефіцит вітаміну D – це стан, при якому рівень концентрації 25OHD<sub>3</sub> в сироватці крові складає 50-80 нмоль/л (20-32 нг/мл) [1]. І поширеність його нестачі досягає епідемічного рівня. Зокрема, відомо, що за останні десять років середній рівень концентрації 25OHD<sub>3</sub> в сироватці крові у людей знизився більше, як на 20 % [2]. Так, у мігрантів-матерів та їх новонароджених дітей дефіцит вітаміну D складає 48,4% і 76,2 %, порівняно з етнічним населенням Італії – 18 % і 38%, відповідно [3]. Стосовно мігрантів-підлітків, то дефіцит вітаміну D був вищим у африканських, азійських і марокканських дітей (54,5 %), ніж у нідерландського або іншого Західного етносу (17,6%) [4]. Причинами встановлених фактів були, в основному, низький дохід сім'ї та невідповідні умови проживання. Проведені в Україні дослідження також встановили високу частоту дефіциту вітаміну D. Зокрема, показано, що лише 4,6 % жителів України мають рівень 25OHD<sub>3</sub> у межах норми, у 13,6 % відзначено недостатність, а в 81,8 % – дефіцит вітаміну D. Факторами ризику розвитку дефіциту вітаміну D серед населення України, на думку Поворознюк В. В. [5], є жіноча стать, ожиріння (ІМТ понад 35 кг/м<sup>2</sup>), дефіцит маси тіла (ІМТ менше ніж 18,5 кг/м<sup>2</sup>), зимова пора року та проживання не в Південному регіоні країни.

Для визначення вітаміну D в сучасних лабораторіях найчастіше використовують такі методи, як рідинна хроматографія, у поєднанні з тандемною мас-спектрометрією, високоефективна рідинна хроматографія, радіоімунологічне обстеження, хемілюмінесцентне імунологічне визначення та твердофазний імуоферментний аналіз. І ці методи постійно вдосконалюються, щоб відповідати вимогам системи зовнішньої якісної оцінки вітаміну D (DEQAS, vitamin D External Quality Assurance

Scheme), яка гарантує аналітичну надійність його визначення.

Слід відмітити, що метод який оптимально відповідає клінічним потребам сьогодення ще не розроблений. Тому великі перспективи має розвиток методів визначення біологічно активних форм вітаміну D на основі сенсорних технологій. Скринінг, оснований на біосенсорних технологіях, має багато переваг. Біосенсори дозволяють швидко, без застосування мітки, створити кількісну та якісну інформацію проаналізованих зразків. Вони забезпечують можливість повторного використання поверхні перетворювача сенсора для багатьох аналітичних циклів і дозволяють мультикомплексний показ десятків різних біовзаємодій [6,7].

Метою даного огляду було здійснити аналіз сучасних методик визначення активних метаболітів вітаміну D та створити теоретичне підґрунтя для розробки дієвої вітчизняної системи їхнього моніторингу шляхом вдосконалення існуючих імуоензимних методик та використовуючи сучасні біосенсорні технології. Також сконцентрувати увагу дослідників на більш глибокому і різнобічному вивченні такої глобальної практичної проблеми як залежність розвитку багатьох хворіб від рівня забезпеченості організму вітаміном D.

### **Короткий аналіз сучасного стану досліджень по вивченню ефективності вітаміну D при різних клінічних ситуаціях**

Порушення D-вітамінного статусу вважають важливим елементом в патогенезі багатьох хворіб. За останні роки були опубліковані результати близько 500 звітів про змішані (рандомізовані) дослідження і проведено біля сотні узагальнюючих аналізів (метааналізів), присвячених вивченню ефективності вітаміну D при різних клінічних ситуаціях.

Перш за все вітамін D є надзвичайно важливим для здоров'я скелетно-м'язової системи організму. Avenel A. et.al. [8] на основі проведених рандомізованих досліджень показали, що додаткове вживання вітаміну D і кальцію попереджують переломи бедра, або інші типи переломів, зумовлені остеопорозом, у людей похилого віку. Аналіз сучасних даних про вплив статусу цього вітаміну на постхірургічні результати, дозволив Iglar P. J. et.al. [9]

зробити висновок про те, що гіповітаміноз D пов'язаний з несприятливими результатами після різноманітних операцій.

Епідеміологічні дослідження свідчать, що дефіцит вітаміну D збільшує ризик захворювання грипом і гострими інфекціями дихальних шляхів. Експериментальні дані свідчать, що вітамін D приймає участь у противірусній відповіді. Припускають, що противірусна (віруліцидна) активність вітаміну D опосередкована його здатністю індукувати експресію антимікробних пептидів – HBD-2 і кателіцидину (LL-37) [10]. Ginde A.A. et.al. [11] встановили виражений обернено пропорційний зв'язок між рівнем концентрації 25OHD<sub>3</sub> в сироватці крові і захворюваністю гострими респіраторними та кишковими захворюваннями.

В результаті багатоцентрового рандомізованого дослідження, призначення високих доз вітаміну D хворим з туберкульозом легень суттєво не впливає на клінічний перебіг захворювання, але сприяє зменшенню тривалості бациловиділення у пацієнтів з поліморфізмом TaqI гену VDR [12]. Високий ризик захворювання туберкульозом, пов'язаний з недостатньою індуцибельною експресією мРНК кателіцидину (LL37), спостерігається у афроамериканців з низькою концентрацією 25OHD<sub>3</sub> [13].

За минулі три десятиліття накопичено величезну кількість фактів, що свідчать про важливе значення вітаміну D для імунної відповіді. Підтвердженням його значимості в імунній регуляції є дані про кореляцію низьких рівнів вітаміну D з підвищеною сприйнятливістю до різних інфекцій, а також з розвитком аутоімунної і алергічної патології. Так, призначення вітаміну D хворим з бронхіальною астмою знижує ризик розвитку приступів і підвищує чутливість до терапії глюкокортикостероїдними препаратами у випадку важкого перебігу захворювання [14 ; 15].

У більшості хворих з хронічними запальними захворюваннями кишківника спостерігається дефіцит 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Так, дефіцит вітаміну D<sub>3</sub> реєструється у 70 % пацієнтів із **хворобою Крона**. У пацієнтів з нокаутним геном *Vdr* помічено надлишковий ріст бактеріальних колоній в просвіті кишківника. Вплив коменсальної і патогенної мікрофлори кишківника стимулює експресію VDR. У дослідженнях було показа-

но, що ректальне застосування 1,25(OH)<sub>2</sub>-20-циклопропіл-вітаміну D<sub>3</sub> (BXL-62) супроводжувалося швидким виздоровленням пацієнтів з експериментальним колітом, викликаним декстраном сульфату натрію [16; 17].

Накопичені до теперішнього часу дані свідчать про важливі ефекти вітаміну D на функціонування серцево-судинної системи. Доведено, що низька концентрація 25OHD є незалежним чинником ризику розвитку таких серцево-судинних порушень, як ішемічна хвороба серця, інфаркт міокарда, серцева недостатність, інсульт, гіпертензія [18; 19; 20; 21]. Важливе значення має оцінка статусу вітаміну D у дітей, із вродженими вадами серця. Подвійне рабдомізоване дослідження, здійснене McNally J.D. et.al. [22], підкреслює необхідність щоденного доопераційного доповнення вітаміну D у більших дозах, порівняно з тими, хто отримує звичайне споживання цього вітаміну.

Нестачу 25OHD відмічено під час хронічної хвороби нирок у дітей (CKD, chronic kidney disease). Із 506 дітей Kumar J. et.al. [23] у 28% спостерігали нестачу вітаміну D. На їхню думку, дефіцит 25OHD пов'язаний з факторами ризику, які потенційно піддаються змінам. Зокрема такими як, вживання молочних продуктів, харчове використання доповнення вітаміну D, і протеїнурія. Відмічено також, що дефіцит 25OHD є фактором ризику для вторинного гіперпаратироїдизму і низького вмісту 1,25(OH)<sub>2</sub>D в сироватці крові дітей з СКД [24].

Як відомо, вітамін D<sub>3</sub> впливає практично на всі механізми неспецифічного захисту, а також на імунну систему організму в цілому. Враховуючи високу імуномодулюючу ефективність вітаміну D<sub>3</sub>, вважають, що його статус є головним фактором, який шляхом стимуляції імунної системи може ефективно знижувати інтенсивність протікання аутоімунних захворювань, таких як склероз, артрит, діабет, склеродермія, а також виявляти позитивний ефект при трансплантації органів [25; 26; 27]. Так, в роботі К. Hosoda, et al.[28] було показано значне зниження рівня 25OHD<sub>3</sub> у сироватці крові пацієнтів з хронічним аутоімунним і хронічним *Helicobacter pylori*-асоційованим гастритом. Labudzynskyi D.O. et.al. [29] було показано зниження у 2,5 рази вмісту 25OHD<sub>3</sub> у сироватці крові гепатоцитів за цукрового діабету.

Дослідження позаскелетних ефектів вітаміну D дозволило виявити його здатність впливати на генному та молекулярному рівні на синтез ряду факторів, що беруть участь у проліферації та диференціюванні різних клітин і в регуляції їх апоптозу. Порушення регуляції вітаміном D експресії вищевказаних чинників збільшує ймовірність злоякісного росту різної локалізації [30]. Bikle D. [31] на основі рандомізованих клінічних досліджень показав обернено пропорційну кореляцію вмісту 25ОНD в сироватці крові з розвитком раку. При цьому більшість досліджень були зосереджені на розвитку раку прямої кишки, грудей та раку простати. Було показано також, що вітамін D потенціює антипроліферативну активність у складі комбінованої протипухлинної терапії цитостатиками раку шкіри, меланоми, раку легень і товстого кишківника. [32].

Поза аспектом погіршення фізичного стану здоров'я, дефіцит вітаміну D, на думку вчених [33], відіграє важливу роль в порушеннях, пов'язаних з психічним здоров'ям, особливо, депресією. Нещодавні дослідження підтвердили асоціацію між погіршенням пізнавальних здібностей, недоумством (слабоумием), та дефіцитом вітаміну D у людей похилого віку [34; 35].

Дані, наведені в цьому розділі дають поняття про статус вітаміну D у короткотривалій період і в хворого населення. Небагато відомостей є стосовно впливу доповнення вітаміну D на якість життя в цілому, як у хворих, так і здорових людей. Ефект такого впливу вперше вивчали Hoffman M.R. et.al. [36]. Аналіз літературних даних показав, що доповнення вітаміну D покращує якість життя у хворого населення на короткий період часу. Але доказів сприятливого впливу довготривалого його доповнення з перспективою впливу на якість життя ще недостатньо. Тому суттєвим залишається питання, яка ж оптимальна кількість вітаміну D необхідна для постійного підтримання здорового стану організму на протязі життя.

#### **Оцінка статусу вітаміну D в контексті сучасних досліджень**

Одним з найважливіших питань сучасної лабораторної і клінічної практики є необхідність визначити найкращий спосіб проаналізувати

статус вітаміну D. Але його аналіз ускладнений структурною подібністю метаболітів, гідрофобною природою та тепловою залежністю від ультрафіолетового світла [37]. Фактично, є більше ніж 40 ідентифікованих метаболітів вітаміну D ( $D_2/D_3$ ) [38]. Серед яких, метою клінічних досліджень є 25ОНD<sub>3</sub> [39].

Відомо, що близько 99 % 25ОНD, утворених в печінці з вітаміну D, транспортуються у зв'язаному стані, головним чином з вітаміном D-зв'язуючим білком (VDBP) або з альбуміном (ALB). У нирках із 25ОНD утворюється біологічно активна форма 1,25ОНD. У цієї активної форми період півжиття складає лише 4-6 годин, тоді як у 25ОНD – біля 2-3 тижнів [40]. Тому саме 25ОНD переважно використовують в якості біомаркера, який вказує на статус вітаміну D [41; 42].

Біодоступний 25ОНD визначений як циркулюючий 25ОНD не зв'язаний с VDBP. Біодоступна фракція складається з направлено альбуміном 25ОНD і вільної форми. Вільний 25ОНD визначений як циркулюючий 25ОНD незв'язаний ні з VDBP, ні ALB. 25ОНD має увійти в цільові клітини, щоб засвоїтися або проявити біологічну дію. Вільний 25ОНD може увійти в клітини пасивно - і це розповсюджений механізм. Згідно "гіпотезі вільного гормону", зв'язані фракції 25ОНD можуть бути недоступними, для того, щоб увійти в клітини [43]. Однак, зв'язані 25ОНD (і особливо VDBP-25ОНD) можуть бути ізольовані кубуліном на поверхні клітин перше, ніж бути засвоєними мегаліном. Цей мегалін-кубуліновий комплекс переважає в трубчастому епітелії нирки, а також добре виражений в інших клітинах, зокрема в остеобластах. Таким чином, активна фракція вітаміну D може бути зв'язаною, та незв'язаною і вплив кожного шляху необхідно краще зрозуміти, як з точки зору фізіології, так і наслідків для здоров'я [44]. На думку Powe C.E. et.al. [45], визначення біодоступного 25ОНD у здорових людей для оцінки статусу вітаміну D, також було б цікавим, приймаючи до уваги міжгенічну мінливість в концентраціях VDBP, який існує в трьох головних ізоформах (Gc1F, Gc2, і Gc1S). Як відзначає Braun A. et.al [46] у пацієнтів, які знаходяться в критичному стані, і в них встановлені коливання концентрацій, як альбуміну, так і VDBP, вільна

25ОНD фракція була б більш релевантною. Однак, в даний час, вимірювання в лабораторії вільного 25ОНD не являється звичайною практикою. Більше того, оптимальні рівні вільного 25ОНD для певних клінічних ефектів залишаються невідомими.

Значні труднощі для повноцінного аналізу статусу вітаміну D в сучасній лабораторній і клінічній практиці створює не стандартизованість вимірювання 25ОНD. Так як неможливо уніфікувати всі старі дані, ідентифікація та калібрування невеликої кількості попередніх досліджень, відповідно керівних принципів сучасних методів стандартизації, на думку Sempos C.T., et.al. [47], є необхідною, так як відіграє важливу роль в регуляції безпечного діапазону вживання вітаміну D від 600IU/в день. Це дозволить досягти 25ОНD<sub>3</sub> рівня від 20 нг/мл (50 нмоль/л), згідно RDA (Recommended Dietary Allowance) [48].

#### **Актуальні методи визначення активних метаболітів вітаміну D**

На сьогоднішній день вони включають: рідинну хроматографію, у поєднанні з тандемною мас-спектрометрією (LC/MS/MS, liquid chromatography-mass tandem spectrometry), рідинну хроматографію високого тиску (HPLC, include high-pressure liquid chromatography), радіоімунологічні (RIA, radioimmunoassay) та імуноензимні дослідження (EIA, enzyme immunoassays) та імунохемілюмінесценцію (CLIA, chemiluminescent immunoassays).

Всі ці методи показують низьку узгодженість міжлабораторних випробувань.

Так, Snellman et.al. [49], використовуючи комерційно доступні методи, показали, що рівні 25ОНD були (порівняно з LC/MS/MS) найвищими для HPLC-APCI-MS (high-pressure liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry; 85 нмоль/л), проміжними для RIA (70 нмоль/л) і найнижчими для CLIA (60 нмоль/л). Відповідно, найкраща кореляція була встановлена для HPLC-APCI-MS ( $r = 0,7$ ), проміжна для RIA ( $r = 0,5$ ) і найнижча для CLIA ( $r = 0,4$ ). Проведення цих досліджень було акредитовано DEQAS, організацією, яка намагається гарантувати аналітичну надійність методів визначення 25ОНD.

Як відомо, консультативна група DEQAS була організована у 1997 і включає досвідчених вчених з великим досвідом тестування вітаміну D. DEQAS контролює розробку методик по визначенню 25ОНD з 1989 і включає в себе близько 700 учасників з майже 40 країн. Для того, щоб отримати свідоцтво від DEQAS необхідно дослідити розробленим методом серію зразків сироватки крові людини, наданих цією організацією. Такі дослідження покликані усунути міжлабораторну невідповідність, що дозволить стандартизувати всі 25ОНD дослідження і запропонувати, так званий "золотий стандарт" визначення.

Для того, щоб подолати проблему міжлабораторної невідповідності вимірювань важливим кроком стала розробка програми стандартизації вітаміну D (VDSP, Vitamin D Standardization Program) у 2011 році. Виконання цієї програми забезпечується співробітництвом між американським Офісом харчових добавок (ODS, Office of Dietary Supplements) Національного Інституту здоров'я (NIH, National Institute of Health), Центром по контролю і профілактиці захворювань (CDC, Centre for Disease Control and Prevention), Національним центром екомедицини (NCEH, National Centre for Environmental Health), Національного Інституту стандартів і Технологій (NIST, National Institute of Standards and Technology), та бельгійською Лабораторією аналітичної хімії, факультетом фармацевтичних наук, Гентського Університету. NIST, у співробітництві з ODS, розробив довідкову процедуру вимірювання (RMP, Reference Method Procedure) та стандартні довідкові матеріали (SRM, Reference Method Procedure) для метаболітів вітаміну D в сироватці крові людини [50].

Сьогодні є багато комерційно доступних наборів для визначення 25ОНD, які використовуються для визначення статусу вітаміну D. Постійно зростаючі запити на вимірювання 25ОНD<sub>3</sub>, як основного критерію оцінки D-вітамінного статусу організму, пришвидшили розробку та впровадження різних автоматизованих та напівавтоматизованих методів. Зокрема, LC/MS/MS, визнаний вищезазначеними організаціями як довідковий метод, дозволяє розрізнити обидві форми 25ОНD та визначати інші метаболіти. Цей підхід широко вико-

ристовується сучасними дослідними лабораторіями, кожна з яких вдосконалює методику, починаючи з етапу типової підготовки зразків до аналітичної фази мас-спектрометричного визначення. Звичайно, кінцевим етапом є дослідження таких параметрів, як селективність, чутливість, стабільність, відтворюваність та матричні ефекти [51; 52; 53; 54]. Грунтовний огляд, представлений на широкий загал Volmer D.A. et.al. [55] концентрує увагу, зокрема на розвитку методології мас-спектрометрії за останніх 12 років. В даний час, на його думку методика LC-MS/MS є найбільш багатообіцяючою для аналізу метаболітів вітаміну D.

Dietmar Enko et. al. [56] провели дослідження, які полягали в тому, щоб порівняти (згідно NIST-SRM) виконання методу LC-MS/MS (ClinMass® LC-MS/MS Complete Kit (RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, Munich, Germany)) з такими методами як ELISA (ORGENTEC 25OHD<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>, Diagnostika GmbH, Mainz, Germany) та CLIA (Immunodiagnostic Systems (IDS)-iSYS, Boldon, United Kingdom). Було встановлено, що порівняно з методом, який був використаний як довідковий (LC-MS/MS), інші методи дозволяють визначати 25OHD<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> з відхиленням 16.3 % та 1.5 %, відповідно. Діпазон концентрацій становив 5-250 нг/мл. У своїх попередніх дослідженнях Dietmar Enko et. al. [57] продемонстрували високу кореляцію між HPLC та методом LC-MS/MS ( $r = 0.96$ ). На думку авторів, саме висока специфічність антитіл забезпечує високу відтворюваність аналізів. Тоді як, низька їх специфічність та поперечна реактивність з іншими метаболітами 25OHD можуть бути можливими причинами отримання суперечливих даних. Зокрема, припускають, що 3-епі-25OHD<sub>3</sub> (C3-epimer) є одним з метаболітів вітаміну D, котрий перешкоджає визначенню 25OHD<sub>3</sub> [58]. Дослідження сироватки крові грудних дітей показали, що 3-епі-25OHD<sub>3</sub> може становити 9-61.1 % всього 25OHD<sub>3</sub> [59].

Зважаючи на проблему, NIST у співробітництві з NIH-ODS, для того щоб покращити порівнюваність лабораторних вимірювань 25OHD, розробили програму гарантії якості метаболітів вітаміну D (VitDQAP, Vitamin D Metabolites Quality Assurance Program). Також NIST/NIH сумісно підтримали метрологію

VitDQAP через SRM 972 Вітаміну D в сироватці крові людини, яка була першим гарантованим довідковим матеріалом для метаболітів вітаміну D і стала доступною для продажу в 2009 році. Попит на SRM 972 був неочікувано великим, тому поставки були вичерпані вже через рік. Його заміна, а саме SRM 972a був випущений на початку 2013 року. Обидва довідкових матеріали включають в себе чотири рівні вимірювань: 25OHD, 25OHD<sub>3</sub>, 25OHD<sub>3</sub> та 3-епі-25OHD<sub>3</sub>, які відображають зіткнення аналітичними лабораторіями з характерними проблемами при вимірюванні вітаміну D [60; 61]. Про міжлабораторні результати порівняння для SRM 972, 972a та 2972 VitDQAP повідомляють, зокрема Bedner M. et.al. [62], використовуючи такі методи детекції, як CLIA, EIA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS та LC з ультрафіолетовим виявленням (LCUV, LC with ultraviolet absorbance detection).

Під час інтенсивної терапії Rousseau et.al. [63] визначали 25-OH D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> методом LC-MS/MS за допомогою стандартного набору фірми AB SCIEX QTRAP® (AB SCIEX, Framingham, MA, USA). Також рівень 25OHD в сироватці крові людей визначали за допомогою трьох різних імунологічних обстежень. Два імунологічних обстеження були основані на хемілюмінесценції (CLIA) (Liaison®, DiaSorin, Stillwater, MN, USA and iSYS®, IDS, Boldon, UK), в той час як третє було флуоресцентним імунологічним обстеженням (FIA) (Vidas®, bioMérieux, Марси-л'Етуаль, Франція). Вільний 25OHD вираховували на основі кожного з чотирьох випробувань 25OHD, використовуючи раніше розроблену формулу [64]:  $\text{free 25OH-D} = \text{total 25OH-D} / (1 + (6 \times 10^3 \times \text{ALB}) + (7 \times 10^8 \times \text{VDBP}))$ . Авторами було показано, що метод LC-MS/MS є кращим варіантом для визначення 25OHD у пацієнтів, які знаходяться в критичному стані. Це пов'язано з тим, що процедура LC-MS/MS включає фазу депротееїнізації і матричні ефекти, які супроводжували інші імунологічні обстеження та пов'язані із зміною концентрацій VDBP та ALB, – мінімізовані.

Для вирішення методологічних проблем, пов'язаних із використанням сироватки крові при визначенні 25OHD Jones G. [24] пропонує відновлену оптимізовану сироватку 25-OH-

Dis, як корисний біомаркер, який має великі перспективи для моніторингу дефіциту вітаміну D імунологічними методами у хворих з хронічним захворюванням нирок (СКД).

Mena-Bravo et.al. [65] розробили кількісний аналітичний метод на основі автоматизованої платформи з фазою твердої екстракції (SPE, solid phase extraction) SPE–LC–MS/MS для визначення вітаміну D і семи найважливіших метаболітів, які використовують в клінічних і харчових областях. Крім вітамінів D<sub>2</sub> і D<sub>3</sub>, метод призначений для визначення таких метаболітів, як 25ОНD<sub>2</sub>, 25ОНD<sub>3</sub>, 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 24,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в сироватці крові людей. Метаболіт 25ОНD<sub>3</sub>, зокрема, виявляли з чутливістю 1,2 пкг/мл та в діапазоні концентрацій 1,2 пкг/мл – 250 нг/мл, а 25ОНD<sub>2</sub>: 0,25 нг/мл – 250 нг/мл. Розроблений метод був ратифікований шляхом дослідження сироваток, наданих DEQAS.

Одночасне визначення вітаміна D<sub>2</sub>, вітаміна D<sub>3</sub>, 25ОНD<sub>2</sub> та 25ОНD<sub>3</sub> у біологічних зразках шляхом оптимізації методу LC-MS/MS здійснили Adames J. et.al. [66]. Детекцію здійснювали за допомогою потрійного тандемного маспектрометра (QQQ-MS/MS), оснащеного джерелом фотоіонізації атмосферного тиску. Різні форми вітаміну D розділяли використовуючи рідкий ацетон на спеціальних колонках. Чутливість визначення батьківських аналітів (D<sub>2</sub> і D<sub>3</sub>) становила 20 нг/мл, а для гідроксильованих (25ОНD<sub>2</sub> та 25ОНD<sub>3</sub>) – 10 нг/мл. У біологічних зразках діапазон визначення досягав 200 нг/мл.

Розроблений Simpson C.A. et.al. [67] автоматичний аналізатор на основі хемілюмінесценції (IDS-iSYS, Immunodiagnostic Systems Ltd.) для визначення 25ОНD був недавно узгоджений до RMP. Були проаналізовані 119 сироваток крові різних типів захворювань. Із восьми типів лише два, а саме гіпокальцемія і рак молочної залози, показали відсутність асоціації між стандартизованими даними та нестандартизованими. На думку авторів, це пов'язано з невеликим розміром вибірки для кожної з цих хворіб.

Сучасні українські випробувальні лабораторії залежать від поставок тест-систем із-за кордону. Так, лабораторія “Синево” (Україна) для визначення концентрації 25ОНD<sub>3</sub> використовує імунохемілюмінесцентний метод (CLIA). Ціна одного аналізу з використанням тест-системи Architect i2000, ABBOT Diagnostics (США) становить 830 грн. [68].

Для імуноферментного визначення 25ОНD<sub>3</sub> також використовують розроблені та запатентовані за кордоном стандарти та тест-системи (наприклад Immunodiagnostic Systems Ltd.), які без проблем можна замовити через Інтернет у фірм постачальників. Діапазон концентрацій, що може бути виявлений такими системами (Vitamin D3 (human) ELISA kit), становить 20 – 800 мкг/л. При цьому, для визначення концентрації специфічних антитіл найчастіше використовується широко відома біотин-авідинова система. Згідно принципу методу під час інкубації в комірках плати невідома кількість 25ОНD<sub>3</sub> зразка конкурує з відомою кількістю кон'югату біотину з 25ОНD<sub>3</sub> за місця зв'язування на моноклональних антитілах. Для виявлення зв'язування, використовують кон'югований з пероксидазою авідин, який забезпечує кольорову реакцію завдяки внесенню в комірки тетраметилбензидину (ТМВ, tetramethylbenzidine). При цьому інтенсивність забарвлення є обернено пропорційною концентрації досліджуваного зразка. Межа виявлення складає 1,6 нг/мл.

Для розробки вітчизняної імунохімічної тест-системи визначення вмісту 25ОНD<sub>3</sub> на сьогоднішній день отримані поліклональні антитіла [69]. Для імунізації використовували кон'югат 25ОНD<sub>3</sub> з гемоціаніном, для імобілізації в комірках плати - кон'югат 25ОНD<sub>3</sub> з овальбуміном. В результаті проведення непрямого імуноензимного аналізу ELISA було встановлено, що 50%-й рівень інтенсивності забарвлення досягається за розведення антисироваток 1:5000. Отримані дані дозволяють зробити висновок про перспективність їхнього використання для визначення вмісту 25ОНD<sub>3</sub> у сироватці крові шляхом поставлення конкурентного імуноензимного аналізу ELISA і конкурентного імунобіосенсорного визначення.

### **Новітні перспективні розробки на основі біосенсорних технологій для визначення вітаміну D**

Визнання плейотропної ролі вітаміну D та висока поширеність його гіповітамінозу стимулюють розробку швидких і якісних методів визначення. На сьогоднішній день найбільш вдалою спробою високочутливого біосенсорного визначення активного метаболіту вітаміну D є запропонований Carlucci et.al. [70] електрохімічний сенсор. Для виконання електро-



хімічного аналізу використовували potentiostat  $\mu$ -Autolab type III Metrohm (Herisau, Швейцарія). Вкрита шаром золота поверхня друкованих електродів (SPE, screen printed electrodes), була функціоналізована за допомогою самоасоційованого моношару (SAM) меркаптопропіонової кислоти (МПК). Карбоксильні групи МПК активували сумішшю EDC/NHS (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide/N-hydroxysuccinimide; 1:1), депонованій на поверхні електрода. Вольтаметрична детекція вітаміну D забезпечувалася властивостями молекули ферроціану у складі 25OHD<sub>3</sub>-FMTAD (4-ferrocenylmethyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione). Електрохімічні вимірювання виконували у 0,01 М ЗФР рН 7,4, використовуючи VDBP, що забезпечувало реакцію молекулярного комплексу (аддукту) 25OHD<sub>3</sub>-FMTAD на протязі 30 хвилин з моноклональними антитілами (mono-AT та VDBP куплені в Gentaur, Brussels, Belgium). Відповідним чином були перевірені такі важливі характеристики біосенсора, як стабільність зв'язування (утворення комплексу 25OHD<sub>3</sub> з mono-AT) та можливість регенерації змінного електрода (0.5 М. NaCl рН 2,5). Була показана добра відтворюваність аналізів, принаймні для 10 циклів регенерації. 25OHD<sub>3</sub> був визначений в діапазоні концентрацій 20-200 нг/мл з межею виявлення 10 нг/мл, що цілком задовільняє потреби клінічної практики в розробці високочутливих методів детекції метаболіту.

Також Carlucci et.al. здійснена спроба розробки імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) (SPR, Surface Plasmon Resonance) для визначення 25OHD<sub>3</sub> з використанням різних підходів. ППР вимірювання проводили за допомогою Autolab Springle SPR of EcoChemie (Utrecht, Нідерланди). Були здійснені: 1) пряме визначення 25OHD<sub>3</sub>; 2) модифікація поверхні сенсора золотими наночастинками (AuNPs) у випадку прямого визначення метаболіту; 3) непряме (конкурентне) визначення вітаміну D з використанням вітамін D зв'язуючого білка (VDBP). Імобілізація на поверхні чіпа моноклональних антитіл в концентрації 50 мкг/мл дозволила зареєструвати 25OHD<sub>3</sub> з межею виявлення 2 мкг/мл. Таким чином була підтверджена сама можливість прямого визначення 25OHD<sub>3</sub> методом ППР. Наступне закріплення золотих дисків на поверхні

трансдуктора (чіпа) збільшує чутливість визначення до 1 мкг/мл. Але значна зміна сигналу під час фази асоціації 25OHD<sub>3</sub> та швидке зменшення при його дисоціації, свідчать про відсутність стійкого сигналу сенсора на зв'язування метаболіту з поверхнею. На думку авторів, це пов'язано зі стеричними обмеженнями: дуже великий розмір AuNPs порівняно з невеликим розміром 25OHD<sub>3</sub> заважає зв'язуванню вітаміну D з антитілом. Конкурентний імуносенсорний аналіз, як альтернатива прямому визначенню, дозволяє реєструвати 25OHD<sub>3</sub> з межею виявлення 45 нг/мл.

На жаль, жоден з використаних для розробки ППР імуносенсора підходів не дає можливості задовільнити потреби клінічної практики (від 20 нг/мл), внаслідок недостатньої чутливості визначення метаболіту. У зв'язку з цим, Carlucci et.al. надалі для аналізу вмісту 25OHD<sub>3</sub> в реальних зразках сироватки крові пропонують застосовувати електрохімічний імуносенсор.

На нашу думку, складнощі, пов'язані з розробкою біосенсорів напряму пов'язані з видом аналіту (антитіла, ферменти, нуклеїнові кислоти, клітини, окремі організми та їх тканини; штучні полімери) та методами їх імобілізації на поверхні трансдуктора (електродах, поверхнях оптичних, пьезоелектричних, магнітних та ін.). Розвиток нових підходів для вирішення проблеми вдосконалення біосенсорних систем дозволить прискорити їхню розробку для високочутливого визначення вітаміну D.

### Заключення

Вітамін D відіграє важливі ролі по всьому тілу і зв'язаний з багатьма хронічними хворобами і психічним здоров'ям. Дефіцит або недостатність вітаміну D набуває значимості предиктора розвитку широкого спектру патологічних станів, а також сприяє збільшенню показників як загальної смертності, так і летальності від серцево-судинної патології, онкопатології та захворювань органів дихання. Володіння точною інформацією про дефіцит вітаміну D і, пов'язаних з ним факторів ризику, дозволить підвищити ефективність заходів по охороні здоров'я населення, як в Україні, так і в цілому світі.

Високоякісну оцінку вмісту 25OHD<sub>3</sub>, як основного індикатора вмісту вітаміну D в орга-

нізмі людини, можна виконати, використовуючи універсальний і стандартизований аналітичний метод, доступний клінічним лабораторіям, який забезпечить надійні та точні кількісні результати з достатньо високою пропускну здатністю. Це висуває на перший план відсутність шкідливого впливу біологічної матриці та джерела іонізації, спрощення очищення (дериватизації), відсутність впливу  $C_3$ -епімеру та інших перехресно реагуючих метаболітів і точність міжлабораторного порівняння.

Тому сьогодні різними лабораторіями у всьому світі продовжується стандартизація різних методів визначення вітаміну D. В останні роки LC–MS/MS розглядають як метод «золотого стандарту» для детекції його активних метаболітів, завдяки високій чутливості і специфічності. Оптимізація методу шляхом автоматизації типової підготовки відіграє важливу роль в посиленні чутливості, скороченні матричних ефектів та мінімізації помилок оператора. Незважаючи на «моду», у невеликих лабораторіях застосування LC–MS/MS є економічно не вигідним, що пов'язано, знову ж таки, з порівняно великою типовою підготовкою зразків, достатньо складною технікою вимірювань та високою вартістю аналізів. Тому клінічні лабораторії, особливо на базі лікарень, мають фінансові та логістичні причини для того, щоб використовувати менш чутливі методи імунологічних досліджень, такі як CLIA та ELISA. Хоча різниця між антитілами у комплексах від різних постачальників, також створює певні труднощі для їхньої стандартизації. Роботи по вдосконаленню та стандартизації імунологічних методів, зокрема отримання високоселективних антитіл, продовжуються у сучасних дослідних лабораторіях.

Контроль над розробкою нових методик здійснює з 1989 року DEQAS, яка на сьогодні стала найбільш якісною програмою оцінки вітаміну D у всьому світі. В свою чергу, ратифікація протоколів VDSP дозволяє стандартизувати вимірювання  $25OHD_3$  попередніх досліджень та полегшує міжнародне порівняння сироваток  $25OHD_3$ , і таким чином, допомагає розвитку керівних принципів аналізу дефіциту вітаміну D.

Актуальною проблемою сучасної медицини є розробка аналітичних приладів для експрес-

ного визначення вітаміну D. Вперше запропонований електрохімічний біосенсор дозволяє проводити виявлення  $25OHD_3$  в діапазоні концентрацій 20–200 нг/мл з межею виявлення 10 нг/мл і може бути використаний в клінічній практиці.

В цілому, перспективи, які показує сьогоднішній біосенсорна технологія, дуже реальні. Для того, щоб проектувати нові біосенсорні пристрої, доступний широкий діапазон перетворювачів та аналітів. Вони здатні забезпечити швидкість, низьку ціну, високу чутливість, невеликі розміри і достатню специфіку досліджень.

### Список використаної літератури

- [1]. H. A. Bischoff-Ferrari. Optimal serum 25-hydroxyvitamin D levels for multiple health outcomes // *Adv. Exp. Med. Biol.*, 810, pp. 500–525 (2014).
- [2]. C. C. Braegger, C. Campoy, V. Colomb et al. Vitamin D in the healthy European Pediatric population // *JPGN.*, 56(6), pp. 692700 (2013).
- [3]. F. Cadario, S. Savastio, T. Cena. High Prevalence of Vitamin D Deficiency in Native versus Migrant Mothers and Newborns in the North of Italy: A Call to Act with a Stronger Prevention // *Program PLoS One.*, 10(6): e0129586 (2015) Doi: 10.1371/journal.pone.0129586
- [4]. T. Voortman, E. H. Hooven, A. C. Heijboer et al. Vitamin D Deficiency in School-Age Children Is Associated with Sociodemographic and Lifestyle Factors // *J. Nutr.*, 145 (4), pp. 791–798 (2015).
- [5]. V. V. Povorozniuk, V. Ya. Muts. Defitsyt ta nedostatnist vitaminu D u zhyteliv Ukrainy: vplyv sezonnoho faktora // *Bol. Sustavy. Pozvonochnik*, 1-2 (13-14), pp. 15-20 (2014) (in Ukrainian).
- [6]. O. S. Hoister, S. V. Dziadevych, O. H. Minchenko. Zastosuvannia suchasnykh biosensornykh tekhnolohii v ekotoksykologichnomu monitorynhu deiakykh toksykantiv pryrodnoho (mikotoksyny) ta antropohennoho (pestytsydy) pokhodzhennia. *Chastyna 2. Pestytsydy* // *Sens. elektron. mikrosist. tehnol.*, 10 (4), pp. 41–59 (2013) (in Ukrainian).
- [7]. O. S. Hoister, S. V. Dziadevych, O. H. Minchenko. Zastosuvannia suchasnykh

- biosensornykh tekhnolohii v ekotoksykologichnomu monitorynhu deiakykh toksykantiv pryrodnoho (miktoksyny) ta antropohennoho (pestytsydy) pokhodzhennia. Chastyna 1. Mikotoksyny // Sens. elektron. mikrosist. tehnol., 10 (3), pp. 55-75 (2013) (*in Ukrainian*).
- [8]. A. Avenel, J. C. Mak, D. O'Connel. Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures in post-menopausal women and older men // Cocrane database syst rev., 4, CD000227. Doi: 10. 1002/14651858 (2014).
- [9]. P. J. Iglar, K. J. Hogan. Vitamin D status and surgical outcomes: A systematic review // patient safety in surgery, 9:14, DOI 10. 1186/s13037-015-0060-y (2015).
- [10]. A. F. Gombart. The vitamin D antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection // Future Microbiol., 4 (9), pp. 1151-1165 (2009).
- [11]. A. A. Ginde, J. M. Mansbach, C. A. Camargo. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey // Arch. Intern. Med., 169 (4), pp. 384-390 (2009).
- [12]. P. D. Davies, A. R. Martineau. Vitamin D and tuberculosis: more effective in prevention than treatment? // International journal of tuberculosis and lung disease., 19 (8), pp. 876-886 (2015).
- [13]. A. R. Martineau, A. K. Coussens, V. Nikolayevskyy et al. Ethnic variation in inflammatory profile in tuberculosis // Thorax., 67 (5), pp. 345-350 (2012).
- [14]. K. J. Allen, J. J. Koplin, A. L. Ponsonby et al. Vitamin D insufficiency is associated with challenge-proven food allergy in infants // J. Allergy Clin. Immunol., 131 (4), pp. 1109-1116 (2013).
- [15]. B. Muehleisen, R. L. Gallo. Vitamin D in allergic disease: shedding light on a complex problem // J. Allergy clin. immunol., 131 (2), pp. 324-329 (2013).
- [16]. T. Raftery, A. R. Martineau, C. L. Greiller et al. Effects of vitamin D supplementation on intestinal permeability, cathelicidin and disease markers in Crohn's disease: Results from a randomised double-blind placebo-controlled study // United european gastroenterology journal, 3 (3), pp. 294-302 (2015).
- [17]. V. V. Povoroznyuk, N. A. Reznichenko, E. A. Maylyan. Vneskeletnye efekty vitamina D // Bol. Sustavy. Pozvonochnik, 1–2, pp. 19-25 (2014) (*in Russian*).
- [18]. M. E. Miettinen, L. Kinnunen, J. Leiviskä et al. Association of Serum 25-Hydroxyvitamin D with Lifestyle Factors and Metabolic and Cardiovascular Disease Markers: Population-Based Cross-Sectional Study (FIN-D2D) // PLoS One, 9 (7), e100235. (2014).
- [19]. M. Verdoia, A. Schaffer, C. Sartori et al. Vitamin D deficiency is independently associated with the extent of coronary artery disease // Eur. J. Clin. Invest., 44 (7), pp. 634-642 (2014).
- [20]. S. Pilz, K. Kienreich, A. Tomaschitz et al. Vitamin D and cardiovascular disease: update and outlook // Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl., 243, pp. 83-91 (2012).
- [21]. B. Schöttker, U. Haug, L. Schomburg et al. Strong associations of 25-hydroxyvitamin D concentrations with all-cause, cardiovascular, cancer, and respiratory disease mortality in a large cohort study // Am. J. Clin. Nutr., 97 (4), pp. 782-793 (2013).
- [22]. J. D. McNally, K. O'Hearn, M. L. Balawson. Prevention of vitamin D deficiency in children following cardiac surgery: study protocol for a randomized controlled trial (Article) // Trials., 16 (1), pp. 676-825 (2015).
- [23]. J. Kumar, K. McDermott, G. Alison. Prevalence and correlates of 25-hydroxyvitamin D deficiency in the Chronic Kidney Disease in Children (CKiD) cohort // Pediatric nephrology, 1, pp. 1-9 (2015).
- [24]. G. Jones. Interpreting vitamin D assay results: Proceed with caution (Article) // Clinical journal of the american society of nephrology, 10 (2), pp. 331-334 (2015).
- [25]. M. A. Bayani, R. Akbari, B. Banasaz, F. Saedi. Status of Vitamin-D in diabetic patients // Caspian. J. Intern. Med, 5 (1), pp. 40-42 (2014).
- [26]. S. H. Abd-Allah, H. F. Pasha, H. A. Hagrass, A. A. Alghobashy. Vitamin D status and vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Egyptian children // Gene, 536 (2), pp. 430-434 (2014).
- [27]. I. Kostoglou-Athanassiou, P. Athanassiou, A. Gkountouvas, P. Kaldrymides. Vitamin D and glycemic control in diabetes mellitus

- type 2 // *Ther. adv. endocrinol. metab.*, 4 (4), pp. 122-128 (2013).
- [28]. K. Hosoda, et al. Identification and characterization of a vitamin D<sub>3</sub> decomposition product bactericidal against *Helicobacter pylori* // *Sci. Rep.*, 25(2), pp. 588-595 (2015).
- [29]. D. O. Labudzynskyi, O. V. Zaitseva, N. V. Latyshko et al. Vitamin D<sub>3</sub> contribution to the regulation of oxidative metabolism in the liver of diabetic mice // *Ukr. Biochem J.*, 87 (3), pp. 75-90 (2015).
- [30]. W. B. Grant. Ecological studies of the UVB-vitamin D-cancer hypothesis // *Anticancer. Res.*, 32 (1), pp. 223-236 (2012).
- [31]. D. D. Bikle. Vitamin D and Cancer The Promise not yet Fulfilled // *Endocrine*, 46(1), pp. 29-38. (2014).
- [32]. J. Reichrath, K. Rass. Ultraviolet damage, DNA repair and vitamin D in nonmelanoma skin cancer and in malignant melanoma: an update // *Adv. Exp. Med. Biol.*, 810, pp. 208-233. (2014).
- [33]. M. Berk, K. M. Sanders, J. A. Pasco et al. Vitamin D deficiency may play a role in depression // *Med Hypotheses*, 69, pp. 1316-1319 (2007).
- [34]. M. Schogl, M. F. Holick. Vitamin D and neurocognitive function // *Clin. Interv. Aging.*, 9, pp. 559-568 (2014).
- [35]. O. Beauchet, C. P. Launay, B. Fantino et al. Motor imagery of gait in non-demented older community-dwellers: performance depends on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations // *AGE*, [37, pp. 18-25 (2015).
- [36]. M. R. Hoffman, P. A. Senior, D. R. Mager. Vitamin D Supplementation and Health-Related Quality of Life: A Systematic Review of the Literature // *J. of the Academy of nutrition and dietetics.*, 115 (3), pp. 406-418 (2015).
- [37]. J. K. Lai, R. M. Lucas, M. S. Clements et al. Assessing vitamin D status: pitfalls for the unwary // *Mol. Nutr. Food Res.*, 54, pp. 1062-1071 (2010).
- [38]. R. Bouillon, W. H. Okamura, A. W. Norman. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system // *Endocr. Rev.*, 16, pp. 200–257 (1995).
- [39]. W. D. Fraser, A. M. Milan. Vitamin D assays: past and present debates, difficulties, and developments // *Calcif. Tissue Int.*, 92, pp. 118-127 (2013).
- [40]. M. F. Holick. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application // *Epidemiol.*, 19, pp. 73-8 (2009).
- [41]. M. D. Krasowski. Pathology consultation on vitamin D testing // *J. Clin. Pathol.*, 136, pp. 507-514 (2011).
- [42]. C. T. Sempos, H. W. Vesper, K. W. Phinney et al. Vitamin D status as an international issue: national surveys and the problem of standardization // *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, 243, pp. 32-40 (2012).
- [43]. R. F. Chun, B. E. Peercy, E. S. Orwoll et al. Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, Pt A:132-7. Doi: 10. 1016/j. jsbmb. (2014).
- [44]. P. M. Brannon. Key questions in vitamin D research // *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, 243, pp. 154-162 (2012).
- [45]. C. E. Powe, M. K. Evans, J. Wenger et al. Vitamin D-binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans // *N. Engl. J. Med.*, 369, pp. 1991–2000 (2013).
- [46]. A. Braun, D. Chang, K. Mahadevappa et al. Association of low serum 25-hydroxyvitamin D levels and mortality in the critically ill // *Crit. Care Med.*, 39, pp. 671-677 (2011).
- [47]. C. T. Sempos, R. A. Durazo-Arvizu, N. Binkley et al. Developing vitamin D dietary guidelines and the lack of 25-hydroxyvitamin D assay standardization: the ever-present past // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, [http://dx. doi. org/10. 1016/j. jsbmb. 2015. 08. 027](http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.08.027) (2015).
- [48]. S. Pilz, M. Gaksch, B. Hartaigh et al. Vitamin D in Preventive Medicine // *Anticancer Research*, 35, pp. 2 1161-1170 (2015).
- [49]. G. Snellman, H. Melhus, R. Gedeberg et al. Vitamin D status: a comparison between commercially available assays // *PloS.*, 5(7), pp. 115-150 (2010).
- [50]. C. Le Goff, E. Cavalier, J. -C. Souberbielle et al. Measurement of circulating 25-hydroxyvitamin D: A historical review (Review) // *Practical Laboratory Medicine*, 2, pp. 1-14 (2015).
- [51]. U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation- Revision 1. September 2013.
- [52]. S. A. Hsu, J. Soldo, M. Gupta. Evaluation

- of two automated immunoassays for 25-OH vitamin D: comparison against LC-MS/MS // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 136, pp. 139-145 (2013).
- [53]. S. S. Tai, M. A. Nelson. Candidate Reference Measurement Procedure for the Determination of (24R),25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in Human Serum Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry // *Anal. Chem.*, 87(15), pp. 7964-7970 (2015).
- [54]. E. M. Mineva, R. L. Schleicher, M. Chaudhary-Webb. A candidate reference measurement procedure for quantifying serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.*, 407(19), pp. 5615-5624 (2015).
- [55]. D. A. Volmer, L. R. B. C. Mendes, C. S. Stoces. Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: Current techniques, limitations of the «gold standard» method, and anticipated future directions (Article) // *Mass Spectrometry Reviews*, 34 (1), pp. 2-23 (2015).
- [56]. D. Enko, G. Kriegshausler, R. Stolba et al. Method evaluation study of a new generation of vitamin D assays // *Biochem. Med. (Zagreb)*, 25(2), pp. 203-212 (2015).
- [57]. D. Enko, L. Fridrich, E. Rezanka et al. 25-hydroxy-vitamin D status: limitations in comparison and clinical interpretation of serum-levels across different assay methods // *Clin. Lab.*, 60, pp. 1541-50 (2014).
- [58]. D. Bailey, K. Veljkovic, M. Yazdanpanah, K. Adeli. Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D<sub>3</sub> C<sub>3</sub>-epimer // *Clin. Biochem.*, 46, pp. 190-196 (2013).
- [59]. H. Ketha, H. Wadams, A. Lteif, R. J. Singh. Iatrogenic vitamin D toxicity in an infant—a case report and review of literature // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 148, pp. 14-18 (2015).
- [60]. K. W. Phinney, M. Bedner, S. S. C. Tai et al. Development and certification of a Standard Reference Material for vitamin D metabolites in human serum // *Anal. Chem.*, 84, pp. 956-962 (2012).
- [61]. M. Bedner, K. W. Phinney. Development and comparison of three liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometry methods for determining vitamin D metabolites in human serum // *J. Chromatogr. A.*, 1240, pp. 132-139 (2012).
- [62]. M. Bedner, K. A. Lipka, S. -C. Tai. An assessment of 25-hydroxyvitamin D measurements in comparability studies conducted by the Vitamin D metabolites quality assurance program // *Clin. chim. acta.*, 426, pp. 6-11 (2013).
- [63]. A. -F. Rousseau, P. Damas, M. Janssens, et al. Critical care and vitamin D status assessment: What about immunoassays and calculated free 25OH-D? // *Clinica Chimica Acta*, 437 (1), pp. 43-47 (2014).
- [64]. C. E. Powe, C. Ricciardi, A. H. Berg et al. Vitamin D-binding protein modifies the vitamin D-bone mineral density relationship // *J. Bone Miner. Res.*, 26, pp. 1609-1616. 65 (2011).
- [65]. A. Mena-Bravo, C. Ferreiri-Vera, F. Priego-Capote. Quantitative analytical method to evaluate the metabolism of vitamin D // *Clinica chimica acta*, 442, pp. 6-12 (2015).
- [66]. J. Adamec, A. Jannasch, J. Huang et al. Development and optimization of an LC-MS/MS-based method for simultaneous quantification of vitamin D<sub>2</sub>, vitamin D<sub>3</sub>, 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> // *J. of Separation Science*, 34 (1), pp. 11-20 (2011).
- [67]. C. A. Simpson, A. M. Cusano, J. Bihuniak et al. Effect of 25(OH) vitamin D reference method procedure (RMP) alignment on clinical measurements obtained with the IDS-iSYS chemiluminescent-based automated analyzer (Review) // *J. of Steroid biochemistry and molecular biology*, 148, pp. 41-46 (2015).
- [68]. Zh. O. Klimova, A. A. Zaft, V. V. Halyska, I. V. Boiko. Defitsyt vitaminu D ta yoho suchasna laboratorna diahnozyka // *Mezhdunarodnyy endokrinologicheskyy zhurnal*, 2 (66), pp. 5-12 (2015).
- [69]. A. O. Mazanova, I. O. Shymanskyi, D. M. Petukhov ta in. Syntez koniuhata 25-hidroksyvitaminu D<sub>3</sub> z hemotsianinom moliuska ta oderzhannia imunnykh syrovatok // *Biotechnologia Acta*, 8 (3), pp. 45-55 (2015) (*in Ukrainian*).
- [70]. L. Carlucci, G. Favero, C. Tortolini et al. Several approaches for vitamin D determination by surface plasmon resonance and electrochemical affinity biosensors // *Biosensors and Bioelectronics*, 40 (1), pp. 350-355 (2013).

Стаття надійшла до редакції 14.03.2016 р.

## APPLICATION OF NEW TECHNOLOGIES FOR IDENTIFYING OF ACTIVE METABOLITES OF VITAMIN D (REVIEW)

*Oksana S. Goister<sup>1</sup>, Vladimir Kriwenschuk<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>National University of Food Technologies  
68 Volodimirskaia Street, 68, Kyiv, 01601

<sup>2</sup>L. I. Medved's Research Center of preventive Toxicology and Chemical Safety,  
Ministry of Health, Ukraine (State Enterprise)  
6 Heroiv Oborony str., Kyiv, 03680, Ukraine  
E-mail: gojstero@ukr.net

### Summary

Existing methods of identification of vitamin D metabolites among which are liquid chromatography together with tandem mass spectrometry, high-yield liquid chromatography, radioimmunoassay, chemiluminescent immunological determination and solid-phase enzymoimmunoassay are analysed in the review. The considered practical application of these techniques aiming to determine the active metabolites of vitamin D, is designated to eliminate interlaboratory discrepancy for the purpose of standardization. Such control both for already existing and for the new methods must comply with the system of external quality assessment of vitamin D. Most attention is paid to the development of new methods based on biosensor technology. The electrochemical and optical sensors that are the closest to the practical implementation namely to analyze the content of 25OHD<sub>3</sub> in real samples are characterized.

Brief analysis of the current state research aimed at studying of the effectiveness of vitamin D using and its metabolites for proper full body ensuring by them is done. Based on the published data it is shown that vitamin D addition improves living standards of the invalid people for a short period of time. However in general there are no enough evidences of the beneficial effects concerning long-term impact of its addition aiming the prospect of life quality. Awareness of the accurate information as to the levels provision with vitamin D enhances the effectiveness of the measures for public health protection.

**Keywords:** metabolites of vitamin D, 25OHD<sub>3</sub>, analytical techniques, biosensors, automation, DEQAS

УДК 602.1:53.082.9+604.4:577.16

## ЗАСТОСУВАННЯ СУЧАСНИХ ТЕХНОЛОГІЙ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНИХ МЕТАБОЛІТІВ ВІТАМІНУ D (ОГЛЯД)

*О. С. Гойстер<sup>1</sup>, В. Є. Кривенчук<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Національний університет харчових технологій  
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601;

<sup>2</sup>ДП «Науковий токсикологічний центр ім. Л. І. Медведя МОЗ України»  
вул. Героїв Оборони, 6, м. Київ, Україна, 03680  
E-mail: gojstero@ukr.net

### Реферат

В огляді здійснено критичний аналіз існуючих методів ідентифікації активних метаболітів вітаміну D, серед яких рідинна хроматографія у поєднанні з тандемною мас-спектрометрією, високоефективна рідинна хроматографія, радіоімунологічне обстеження, хемілюмінесцентне імунологічне визначення та твердофазний імуоферментний аналіз. Розглянуте практичне застосування цих методів для визначення активних метаболітів вітаміну D, покликане усунути міжлабораторну невідповідність з метою їх стандартизації. Такий контроль, як уже існуючих, так і нових методик, повинен відповідати вимогам системи зовнішньої якісної оцінки вітаміну D. Найбільшу увагу приділено розвитку нових методів, основаних на біосенсорних технологіях. Охарактеризовані електрохімічний та оптичний сенсори, найбільш близькі до практичного втілення, а саме – для аналізу вмісту 25-гідроксिवітаміну D<sub>3</sub> в реальних зразках.

Здійснено стислий аналіз сучасного стану досліджень спрямованих на вивчення ефективності використання вітаміну D та його метаболітів для повноцінного забезпечення ними організму. На основі літературних даних показано, що доповнення вітаміну D покращує якість життя у хворого населення на короткий період часу. Але доказів сприятливого впливу довготривалого його доповнення з перспективою впливу на якість життя, в цілому, ще недостатньо. Володіння точною інформацією про рівні забезпеченості організму вітаміном D гарантує, надалі, підвищення ефективності заходів по охороні здоров'я населення.

**Ключові слова:** метаболіти вітаміну D, 25OHD<sub>3</sub>, аналітичні методи, біосенсори, автоматизація, DEQAS