

**УДК 53.083; 535-31; 53.047;
577.161.2; 543.422; 541.141**

В. С. Капинос, асп.
Т. Н. Орлова, канд. физ-мат. наук
И. П. Теренецкая, докт. физ-мат. наук
Институт физики Национальной Академии наук Украины
E-MAIL: orlovat@iop.kiev.ua

МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЯ ВИТАМИН-D-СИНТЕЗИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Введение

Ультрафиолетовая (УФ) радиация относится к классу неионизирующей, однако ввиду высокой энергии фотонов УФ излучение обладает значительной биологической активностью. Хотя УФ излучение было открыто в 1801 г. [1], воздействие УФ лучей на кожу не было понято до тех пор, пока в 1858 году не было показано, что химические лучи от электрического разряда способны вызвать покраснение (эритему) кожи [1].

Рождение фотобиологии и фотомедицины обязано работам шведского ученого Финсена, который в 1893 году успешно лечил кожные заболевания путем облучения пациентов «химическими лучами» с помощью искусственных источников [2], за что в 1903 году был удостоен Нобелевской премии. В настоящее время фототерапия, т.е. применение с лечебной целью оптического излучения инфракрасного (ИК), видимого и УФ диапазонов является одним из физиотерапевтических методов лечения широкого спектра заболеваний.

Исторически УФ спектральный диапазон разделен на три области: УФ-А (315-400 нм), УФ-Б (280-315 нм) и УФ-С (100-280 нм). Биологическое действие излучения этих диапазонов различно. УФ-С излучение обладает бактерицидным действием, основанном на мутагенном эффекте (повреждении молекул ДНК), а эритемный и антирахитный (синтез витамина D) эффекты присущи УФ-Б излучению.

Биологическое действие начинается с проникновения УФ излучения в кожу и поглощения соответствующим хромофором биомолекул [3]. Первичная фотохимическая реакция сопровождается последующими биохимическими изменениями в клетках, которые инициируют дальнейшие изменения в биологических тканях. Как следствие, УФ облучение кожи инициирует множество биологических откликов, включая воспаление (эритему), увеличение пигментации, утолщение эпидермиса, изменение иммунной системы, образование витамина D₃, и т.д.

Еще в 1890г. английский врач Пальм [4] высказал мнение, что причиной широкого распространения рахита в промышленных центрах Великобритании по сравнению с бедными странами юго-восточной Азии, такими как Индия, является недостаток солнечного света. Он рекомендовал установить измеритель химической активности солнечных лучей и продвигал концепцию солнечного облучения как средства оздоровления.

В последнее время вновь наблюдается оживление интереса к проблеме биологического действия УФ излучения вследствие обнаруженной эпидемиологами корреляции распространенности многих заболеваний и недостаточным уровнем солнечной УФ-Б радиации, обуславливающим дефицит образования витамина D¹, что приводит к развитию рахита у детей и остеопороза у пожилых людей [5].

Витамин D давно известен как основной регулятор фосфорно-кальциевого обмена, необходимый для укрепления ткани костей и зубов, и обеспечивающий нормальное развитие организма в детском возрасте [6]. В последние годы детальные исследования показали, что витамин D выполняет в организме и множество других полезных функций. Существует мнение, что он снижает смертность от рака простаты, молочных желез и прямой кишки [6,7]. Наличие активной формы витамина D в крови приостанавливает рост раковых клеток и помогает их самоуничтожению [8]. Подобный же механизм работает при лечении псориаза: витамин D тормозит излишнее образование клеток кожного покрова.

Однако природный синтез витамина D существенно зависит от содержания УФ-Б лучей в солнечном спектре, который подвержен большим изменениям (сезонные колебания, облачность и т.д.) [9]. Кроме того, в условиях города долгое пребывание человека в помещении может вызвать явления ультрафиолетовой недостаточности. А это приводит к нарушению обменных процессов в организме, изменению витаминного баланса, сдвигу в течении иммунобиологических процессов. Поэтому УФ облучение искусственными источниками света играет большую роль в профилактике и коррекции ультрафиолетовой недостаточности.

Основным правилом во избежание вредных последствий действия УФ излучения является соблюдение оптимальной дозы. Как известно, действие световой энергии на организм человека зависит от (1) интенсивности излучения (определяемой мощностью источника и расстоянием до облучаемой поверхности), (2) длительности облучения (дозы), и (3) спектрального состава излучения, от которого зависит глубина проникновения электромагнитных волн².

Общепринято оценивать биологическую активность УФ радиации в минимальных эритемных дозах (1 MED = 200 Дж/м²) (поскольку минимальная эритемная доза индивидуальна для каждого человека, была предложена стандартная эритемная доза (1 SED = 100 Дж/м²) [10]). Измерение эритемных доз физическими методами проводят с помощью спектрорадиометров путем "взвешивания" солнечного УФ спектра соответственно спектру действия эритемы [11], или широкополосными радиометрами, спектральная чувствительность которых отвечает спектру действия эритемы.

Для определения индивидуальных УФ доз используют так называемые пассивные дозиметры - химические и биологические, которые изменяют свои оптические свойства в зависимости от УФ экспозиции. Наиболее популярный

¹ Термин «витамин D» употребляют часто в общем смысле, хотя в природе имеется два различных химических соединения. Витамин D₂, или эргокальциферол (C₂₈H₄₄O, молекулярный вес M = 396), и витамин D₃, или холекальциферол (C₂₇H₄₄O, M = 384), принадлежат к классу стероидов, синтезируются из соответствующих провитаминов D под действием УФ-Б излучения. Витамин D₂ синтезируется из эргостерина (провитамина D₂) в растениях, витамин D₃ - в коже млекопитающих из 7-дегидрохолестерина, 7-ДГХ (провитамина D₃).

² Глубина проникновения наибольшая для инфракрасных (ИК) и видимых лучей и наименьшая — для УФ лучей.

пассивный химический дозиметр – полисульфоновая пленка, спектральная чувствительность которой близка к эритемному спектру действия [12].

Однако, такие приборы непригодны для измерения витамин-D-синтезирующей (антирахитной) биологической активности УФ излучения в связи с существенным различием между эритемным и антирахитным спектрами действия³ [13]. Очевидно, что для антирахитной УФ дозиметрии предпочтителен метод, основанный на использовании фотохимической реакции, лежащей в основе природного синтеза витамина D.

Впервые медико-биологические исследования антирахитной биологической активности солнечной УФ радиации с помощью реакции фотосинтеза превитамин D *in vitro* (раствор провитамина D₃ в этаноле) были проведены М.Holick и А.Webb [14]. Однако, концентрационный анализ образуемой многокомпонентной смеси фотоизомеров проводился хроматографическим методом, требующим значительных затрат времени, что делает невозможным применение реакции фотосинтеза витамина D для УФ дозиметрии.

Существенный прогресс был достигнут благодаря разработанному экспрессному спектральному анализу многокомпонентной фотоизомерной смеси [15,16], что обеспечило возможность проводить измерения антирахитных доз на месте (*in situ*) в реальном масштабе времени [17,18].

В настоящей работе проведены измерения антирахитной биологической активности УФ излучения ртутной лампы ДРТ-125-1, которая используется во многих аппаратах УФ облучения (Солнышко, Кварц-125, Проминь, УФО-В Электроника, ОУФК-01). Эти приборы рекомендованы для применения в лечебных учреждениях и в домашних условиях, а в списке медицинских показаний по их применению указаны профилактика рахита, нормализация фосфорно-кальциевого обмена, образование витамина D.

Отметим, что в спектре лампы ДРТ-125-1 присутствует УФ излучение трех диапазонов (УФ-А, УФ-Б и УФ-С) (Табл). Следовательно, при определенных дозах излучение может провоцировать бактерицидный, эритемный и антирахитный эффекты. Поскольку для измерения бактерицидного и эритемного действия разработан целый ряд биологических и химических дозиметров [19-23], мы представляем здесь оригинальную методику измерения антирахитного действия УФ излучения.

Таблица

**Распределение интенсивности УФ излучения в спектре лампы ДРТ-125-1
(данные после 10 ч горения)**

Распределение интенсивности УФ излучения по областям А, Б и С (Вт/м ²)		
УФ-А (315-400 нм)	УФ-Б (280-315 нм)	УФ-С (230-280 нм)
1,57	1,85	1,45

Материалы и методы

Проведены исследования витамин-D-синтезирующей способности УФ излучения дуговой разрядной трубчатой ртутной лампы высокого давления ДРТ-125-1 в приборах «Проминь» и «Солнышко». Для прибора «Проминь», дополнительно

³ Спектр биологического действия конкретного биологического эффекта отражает относительную эффективность различных длин волн в иницировании этого эффекта.

оснащённого элементами, излучающими в инфракрасном диапазоне⁴, в инструкции по облучению рекомендовано расстояние 180 см от источника излучения, а для прибора «Солнышко» при УФ облучении рекомендуется расстояние 90 см.

Для измерения витамин-D-синтезирующей способности использовалась фотореакция синтеза витамина D *in vitro*, т.е. проводилось УФ облучение раствора 7-дегидрохолестерина в этаноле, а наблюдение за ходом фотореакции осуществлялось спектральным методом.

Как известно, синтез витамина D происходит в две стадии [24] (Рис.1). На первой, фотохимической, стадии поглощение кванта УФ излучения молекулой провитамина D (7-дегидрохолестерина или эргостерина) приводит к разрыву внутримолекулярной связи между атомами углерода C9 и C10, в результате чего образуется непосредственный предшественник витамина - превитамин D. Превитамин D – неустойчивое соединение, которое на второй стадии, уже без участия света, в результате температурной изомеризации превращается в витамин D путем внутримолекулярного переноса протона из группы CH₃ (19) к атому углерода C9.

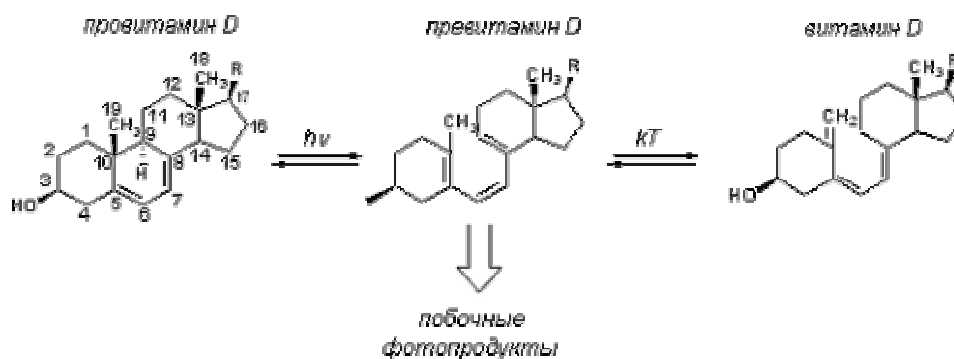


Рис.1 - Последовательность молекулярных фотопревращений в процессе синтеза витамина D.

Таким образом, количество образуемого превитамина D в процессе УФ облучения и является мерой полученной антирахитной УФ биодозы. Отметим, что, при исследовании фотореакции провитамина D в растворе, нет необходимости определения абсолютных значений концентрации превитамина D; достаточно знать его процентную долю по отношению к концентрации исходного провитамина D, которая принимается равной 100 %. На основе измерений, полученных *in vitro*, при определенных допущениях и использовании известных данных о концентрации молекул 7-дегидрохолестерина в коже человека [25] можно рассчитать количество синтезированного витамина D в зависимости от времени облучения и площади облучаемой поверхности тела.

Задача измерения относительной концентрации превитамина D осложняется тем, что в процессе УФ облучения превитамин D поглощает УФ излучение в том же спектральном диапазоне, что и провитамин D, и претерпевает ряд побочных фотопревращений, приводящих к образованию многокомпонентной смеси фотоизомеров. Для определения их концентраций был разработан оригинальный спектральный анализ, позволяющий путем компьютерной обработки спектров

⁴ Прибор работает в импульсном режиме; время горения лампы 2 минуты 10 секунд, за это время ИК элементы нагреваются, и лампа выключается, остывание длится 2 минуты 10 секунд.

поглощения провитамина D, претерпевающих изменения в процессе УФ облучения, извлекать данные об индивидуальных концентрациях фотоизомеров. Подробное описание метода дано в работах [15,16].

Измерения витамин-D-синтезирующей способности УФ ламп проводилось при облучении раствора 7-дегидрохолестерина (провитамина D₃) в этаноле при концентрации $C = 3 \cdot 10^{-3}$ вес.% в кварцевой кювете толщиной 1 см. Кювета располагалась на расстоянии 180 см от поверхности лампы в приборе «Проминь» и 90 см – в приборе «Солнышко». Облучение проводилось при комнатной температуре (20⁰C), исключающей образование витамина D в процессе облучения.

Перед началом УФ облучения и после фиксированных экспозиций спектр поглощения раствора регистрировался спектрофотометром Perkin&Elmer Lambda-25 в диапазоне 230-330 нм с шагом 1 нм, а затем подлежал компьютерной обработке с целью проведения концентрационного анализа.

Результаты и обсуждение

Трансформации спектра поглощения раствора 7-ДГХ при УФ облучении аппаратами «Солнышко» и «Проминь» показаны на рис.2(а,б). Как можно судить из спектральной картины, при одинаковой экспозиции облучение на меньшем расстоянии существенно увеличивает скорость изменений спектра, что свидетельствует о повышении скорости фотореакции, т.е. скорости фотосинтеза превитамина D.

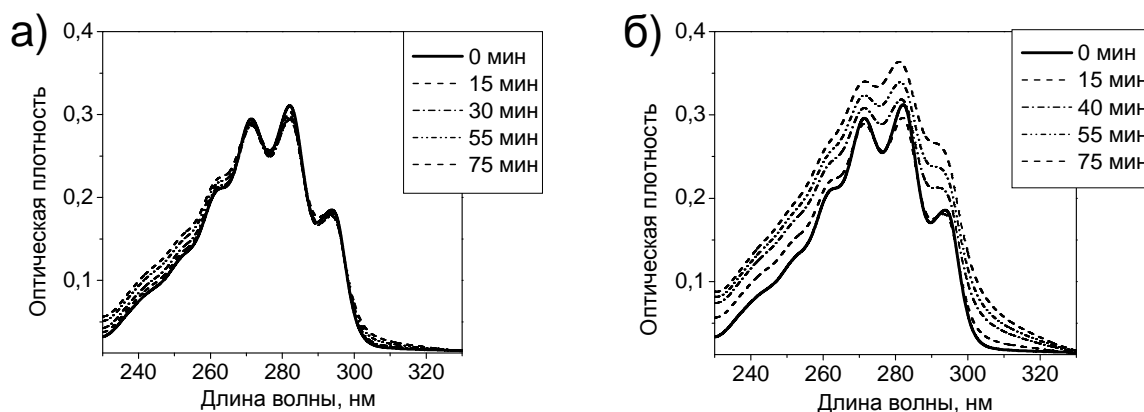


Рис.2 - Трансформация спектра поглощения раствора 7-ДГХ при облучении лампой ДРТ-125-1 на расстоянии 180 см (а) и 90 см (б)

Этот вывод подтверждают результаты концентрационного анализа, проведенного для обоих случаев с помощью компьютерной обработки спектров поглощения по специально разработанной программе. Соответствующие концентрационные зависимости приведены на рис.3(а,б).

Как видно из рис.3б, накопление превитамина D можно аппроксимировать линейной зависимостью лишь при коротких экспозициях (до 10 мин). При дальнейшем облучении кривая концентрационной зависимости превитамина D выходит на насыщение, в основном вследствие побочного фотопревращения превитамина D в тахистерин.

Полученные результаты показывают, что за время экспозиции (от 2 до 10 мин), рекомендованное в инструкции по использованию аппарата «Проминь», из 100% 7-ДГХ образуется не более 1% превитамина D *in vitro*.

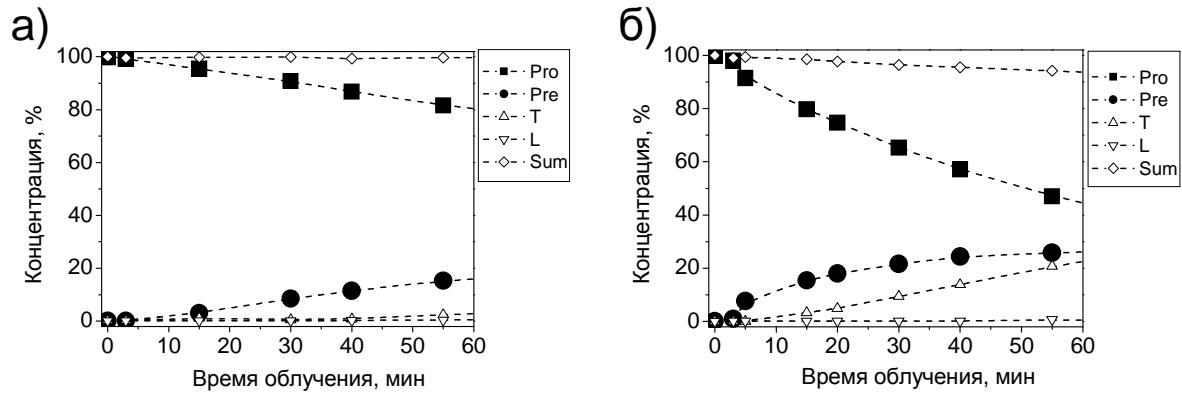


Рис.3 - Изменение концентрации исходного 7-ДГХ (черные квадраты) и образуемого превитамина D (черные кружки) от времени облучения лампой ДРТ-125-1 на расстоянии 180 см (а) и 90 см (б). Мелкими значками показаны концентрации побочных фотопродуктов тахистерина (Т) и люмистерина (L), а также сумма основных 4-х фотоизомеров (Sum).

Для расчета *in vivo* нужно принять во внимание размер облучаемой поверхности, концентрацию 7-ДГХ в коже и пропускание УФ излучения эпидермисом.

Как показано в [25], содержание 7-ДГХ в коже человека зависит от возраста и составляет ~ 1 мкг/см² у людей в возрасте 20 лет, уменьшаясь до 0,5 мкг/см² у людей в возрасте 50 лет. Согласно последним медико-биологическим исследованиям [26], рекомендованная дневная доза витамина D составляет 600 МЕ (15 мкг) при максимально допустимой дозе 4000 МЕ (100 мкг) в возрасте старше 9 лет. Если учесть, что лишь 10% УФ-Б излучения проникает в эпидермис [27], и предположить, что весь образуемый при УФ облучении лампой превитамин D полностью превращается впоследствии в витамин D, то простой расчет показывает, что облучение лампой ДРТ-125-1 поверхности тела площадью 1,5 м² в течение 10 мин могло бы обеспечить образование требуемого количества витамина D. Однако, проведенные измерения пространственного распределения силы света показали, что, ввиду небольших геометрических размеров лампы ДРТ-125-1, невозможно получить равномерную освещенность на такой площади. Поэтому облучение на расстоянии 180 см не может обеспечить даже минимальную дневную дозу витамина D, а при уменьшении расстояния следует иметь в виду, что наличие бактерицидной составляющей в спектре излучения лампы может иметь негативный (мутагенный) эффект.

Поскольку соотношение основного (превитамина D) и побочных фотопродуктов при УФ облучении провитамина D существенно зависит от спектрального состава УФ излучения [24], были проведены сравнительные исследования витамин-D-синтезирующей способности ламп Philips TL 20W/01 RS SLV и Philips TL 20W/12 RS SLV, рекомендованных для лечения псориаза. Как видно из рис.4, спектральный состав излучения этих ламп более благоприятен для синтеза превитамина D ввиду уменьшения эффективности его побочных фотопревращений, (а также ввиду отсутствия УФ-С излучения).

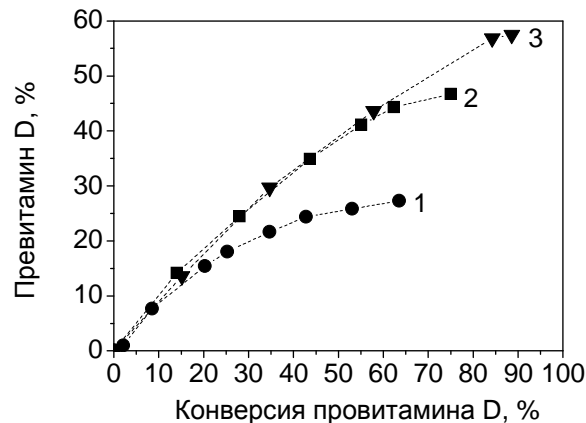


Рис.4 - Сравнительные зависимости фотосинтеза провитамина D относительно превращенного провитамина D для трех ламп: 1 – ДРТ-125-1, 2 - Philips TL 20W/01 RS SLV, 3 - Philips TL 20W/12 RS SLV.

Выводы

На основе разработанной оригинальной методики спектрального наблюдения за ходом реакции фотосинтеза провитамина D *in vitro* впервые проведены измерения витамин-D-синтезирующей способности лампы ДРТ-125-1, используемой во многих аппаратах УФ облучения. Полученные результаты показывают, что облучение лампой ДРТ-125-1 поверхности тела на расстоянии 180 см не может обеспечить дневную дозу синтезируемого в коже витамина D. Однако, уменьшение расстояния небезопасно ввиду наличия коротковолновой УФ-С составляющей в спектре излучения лампы. Поэтому в качестве источников антирахитного УФ излучения можно рекомендовать люминесцентные лампы Philips TL 20W/01 RS SLV и Philips TL 20W/12 RS SLV.

В заключение отметим, что для измерения витамин-D-синтезирующих доз недавно был запатентован и разработан персональный УФ биодозиметр [28], в основе действия которого также лежат наблюдения за ходом реакции синтеза провитамина D. Однако в этом случае молекулы 7-ДГХ внедрены в полимерную пленку, и наблюдение за ходом фотореакции осуществляется путем мониторинга изменений пропускания пленки на фиксированной длине волны, в результате чего отпадает необходимость в использовании спектрального прибора. Такой простой в использовании персональный дозиметр может найти широкое применение для повседневной оценки витамин-D-синтезирующей способности различных искусственных источников УФ излучения.

Литература

1. Urbach F. Historical aspects of phototoxicity. // Int. J. Toxicol. – 1988. – V.17. – P.537-540.
2. Finsen N.R. In: Phototherapy. Edwardnold Publishing: London, 1901. Spikes J.D. Photodynamic action: From paramecium to phototherapy // Photochem. Photobiol.-1997. – V.65S. – P. 142S-147S.
3. Галанин Н. Ф., Лучистая энергия и ее гигиеническое значение, Л., 1969.
4. Palm T.A. The geographic distribution and etiology of rickets // Practitioner. – 1890. –N45. –P.270-342.
5. Holick, M. F. Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health // Current opinion in endocrinology and diabetes. – 2001. – V.9 (1). –P.87-98.
6. Mayar, A. and Norman, A. W., Vitamin D, Encyclopedia of Human Biology, Academic Press, Inc.; - 1991.- V.7. – P.859-871.
7. Reichel, H., Koeffler, H. P., Norman A. W. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease // New Engl. J. Med. – 1989. – V.320. – P.980-991.
8. Holick, M. F., Vitamin D: Importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease and osteoporosis // Am. J. Clinical Nutrition. – 2004. – V.79. – P.362–371.

9. Holick, M. F., Vitamin D deficiency // *New Engl. J. Med.* – 2007. – V.357. – P.266–281.
10. Diffey B.L., Jansen C.T., Urbach F., Wulf H.C. The standard erythema dose: a new photobiological concept // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* – 1997. – V.13, N1-2. – P.64-66.
11. McKinlay A.F., Diffey B.L. A reference action spectrum for ultraviolet induced erythema in human skin // *CIE J.* – 1987. – V.6. – P.17-22.
12. Knuschke P., Barth J. Einsatz von Polysulphonfolien zum Nachweis von UV-Bestrahlungsdefiziten // *Akt. Dermatol.* – 1993. – V.19. – P.238-240.
13. Terenetskaya I., Orlova T. Variability of solar UV-B irradiance: *in situ* monitoring and model calculation of the vitamin D synthetic capacity of sunlight // *Int. J. Remote Sensing.* – 2011. – V.32, N21. – P.6205-6218.
14. Webb A.R., Kline L.W., Holick M.F. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D₃: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D₃ in human skin // *J.Clin. Endocrinol. Metabol.* – 1988. – V.67. – P.373-378.
15. Теренецька І.П., Теренецький К.О. Спосіб контролю біоактивного ультрафіолетового випромінювання // Пат.19525АУкраїни, Заявл. 08.04.94.
16. Terenetskaya I. Spectral monitoring of biologically active solar UVB radiation using an *in vitro* model of Vitamin D synthesis // *Talanta.* – 2000. – V.53. – P. 195-203.
17. Terenetskaya I.P. Provitamin D photoisomerization as possible UVB monitor: kinetic study using tunable dye laser // *Proc. SPIE.* – 1994. – V.2134B. – P.135-140.
18. Galkin O.N., Terenetskaya I.P. 'Vitamin D' biodosimeter: basic characteristics and prospect applications // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* – 1999. – V.53, N1. – P.12-19.
19. Knuschke P., Barth J. Einsatz von Polysulphonfolien zum Nachweis von UV-Bestrahlungsdefiziten // *Akt. Dermatol.* – 1993. – V.19. – P.238-240.
20. Munakata N. Killing and mutagenic action of sunlight upon *Bacillus subtilis* spores: a dosimetric system // *Mutat. Res.* – 1981. – V.35. – P.263-268.
21. Quintern I.E., Horneck G., Eschweiler U., Bucker H. A biofilm used as ultraviolet dosimeter // *Photochem. Photobiol.* – 1992. – V.55. – P.389-395.
22. Regan J.D., Yoshida H. DNA UVB dosimeters // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, – 1995. Vol.31, – P.57-61.
23. Ronto G., Gaspar P., Berces A. Phages T7 in biological UV dose measurement // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* – 1992 – V.12 – P.285-294.
24. Jacobs, H.J.C., Havinga, E. Photochemistry of vitamin D and its isomers and of simple trienes. // *Adv. Photochem.* – 1979. – V.11. – P.305–373.
25. Webb A.R., Holick M.F. The role of sunlight in the cutaneous production of vitamin D₃ // *Ann. Rev. Nutr.* – 1988. – V.8. – P.375-399.
26. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D, Washington, DC: National Academy Press, 2010.
27. Bruls W.A.G., Slaper H., Van der Leun J.C., Berrens L. Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths // *Photochem. Photobiol.* – 1984. – V.40, N4. – P.485-494.
28. Теренецька І.П., Орлова Т.М., Кириленко Є.К., Галич Г.А., Єременко А.М. Спосіб вимірювання біоактивного ультрафіолетового випромінювання та пристрій для його здійснення // Патент України на винахід № 93569. Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України 25.02.2011.

МЕТОДИКА ВИМІРЮВАННЯ ВІТАМІН-D-СИНТЕЗУЮЧОЇ ЗДАТНОСТІ УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

П. С. Капінос, Т. М. Орлова, І. П. Теренецька

Вперше проведено вимірювання антирахітної біологічної активності ультрафіолетового випромінювання ртутної лампи ДРТ-125-1, яка використовується в багатьох апаратах УФ опромінення. Оригінальна методика вимірювання базується на використанні фотохімічної реакції, яка лежить в основі природного синтезу вітаміна D₃ у шкірі людини під дією УФ опромінення.

METHOD FOR THE MEASUREMENT OF THE VITAMIN-D SYNTHETIC CAPACITY
OF UV RADIATION

P. Kapinos, T. Orlova, I. Terenetskaya

For the first time the antirachitic biological activity was measured of the UV mercury lamp DRT-125-1 which is used in many devices of UV irradiation. The original method of measurement is based on the use of the same photochemical reaction which forms the basis of natural vitamin D₃ synthesis in human skin upon UV irradiation.