

Fenomén vitamin D

tentokráte u nejmladší populace

Problematika vitaminu D, jeho analytických a klinických souvislostí, byla již poměrně široce rozebrána v minulých číslech časopisu Labor Aktuell a je v současné době jedním z nejčastěji publikovaných témat různých prací po celém světě. Tyto práce se ale v drtivé většině zaměřují na dospělou populaci, a tak jsme se rozhodli, že podrobíme důkladnějšímu zkoumání skupinu těch nejmladších. Naším cílem bylo jednak provést srovnání dvou zcela odlišných metod pro stanovení vitaminu D a jeho forem (Elecsys Vitamin D total a HPLC MS/MS dle Baecherové), jednak kvantifikovat a zjistit vývoj zastoupení nejčastějších forem vitaminu D objevujících se specificky právě u této nejmladší věkové kategorie.

Teoretická část

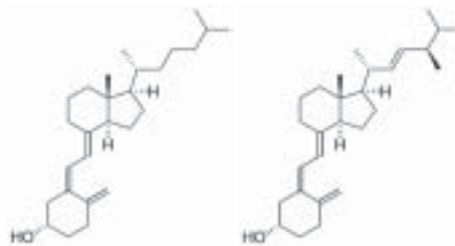
Formy vitaminu D

Vitaminem D, který patří do skupiny vitaminů rozpustných v tucích, se označuje souhrnně několik forem steroidních hormonálních prekurzorů. Často jsou označovány jako kalciferoly. Nejznámějšími formami kalciferolů jsou ergokalciferol označovaný jako D₂ a cholekalciferol neboli D₃. Ergokalciferol je znám také pod obchodním názvem calcidiol, deltalin, drisdol. Původ ergokalciferolu je z rostlin a hub. Prekurzory pro jeho biosyntézu jsou morfin a ergosterol. Ergokalciferol byl shledán stejně účinným jako cholekalciferol, a proto se dnes využívá jako vitaminový doplněk, případně k fortifikaci jídla. Je získáván z kvasinkového ergosterolu pomocí UV záření.³

Cholekalciferol je živočišného původu. Dalším názvem, pod kterým je znám, je calcidiol. Prekurzorem pro biosyntézu calcidiolu

v lidském organismu za přítomnosti UVB záření je 7-dehydrocholesterol. Samotný cholekalciferol je neaktivní formou vitaminu D₃.¹⁶ Jde však o hlavní zdroj, který by měl příjem vitaminu D pokrýt přibližně z 80%.^{1,2}

Mezi další formy vitaminu D₃ patří kalcifediol a calcitriol. Kalcifediol je také nazýván kalcidolem, hydroxycholecalciferolem a nebo 25(OH)D₃. Aktivní formou vitaminu D₃ je calcitriol, známý též jako 1,25(OH)₂D₃.



Obr. 1: Cholekalciferol

Obr. 2: Ergokalciferol

Cholekalciferol i ergokalciferol mohou být převedeny nevratně na různé formy vitaminu D. Jako u většiny látek jde o oxidační a hydroxylační reakce, které mají za cíl usnadnit vyloučení látky, respektive její degradaci. Při hydroxylačních reakcích mohou také vznikat různé epimery. Transport krevním řečištěm pro tělem syntetizovaný vitamin D je zajištěn proteiny - vitamin D binding proteins (VDBP). Prekurzory vitaminu D₃ přijímané potravou jsou absorbovány v tenkém střevě a následně transportovány pomocí chylomikronů a VDBP do cílových tkání, ve kterých je vitamin D uvolněn. Úroveň vyvázání aktivní formy vitaminu D z vazby s VDBP je důležitým faktorem pro správnost stanovení jeho koncentrace.^{1,2}

Proces biosyntézy aktivní formy vitaminu D₃ a následné inaktivace

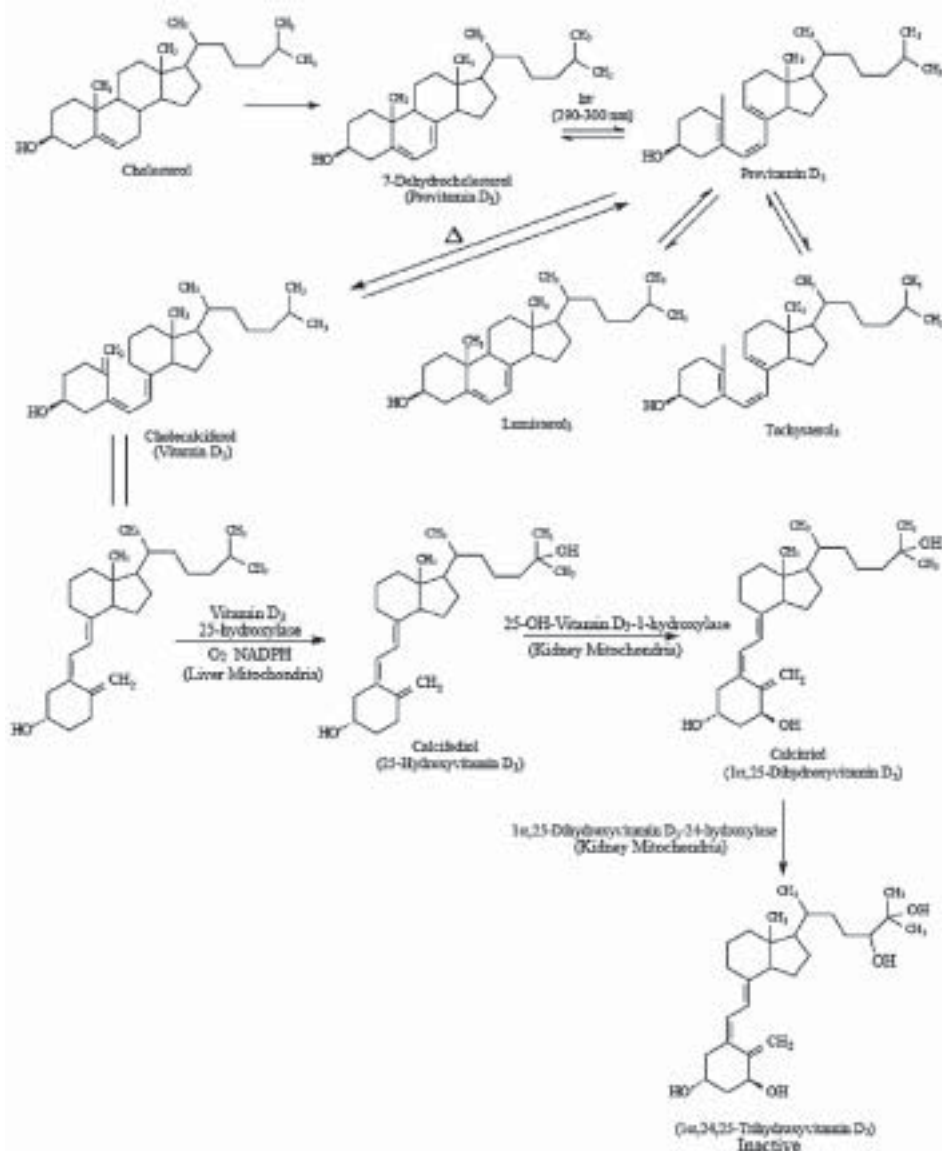
Proces biosyntézy aktivní formy vitaminu D₃ a následné inaktivace

Metabolická dráha vitaminu D₃ startuje v kůži, kde ze 7-dehydrocholesterolu vzniká nejprve provitamin D₃ a poté izomerační reakcí cholekalciferol. Cholekalciferol

vzniklý v epidermis a dermis vstupuje do cirkulace a je transportován pomocí VDBP do jater. V hepatocytech je cholekalciferol hydroxylován na kalcidiol - 25(OH)D₃, který se prostřednictvím 1 α -hydroxylasy hydroxyluje na aktivní metabolit kalcitriol - 1,25(OH)₂D₃. Původní teorie hlásala, že tato aktivní forma vzniká zejména v ledvinách, nicméně recentní práce dokazují, že ledviny přispívají pouze z 15 % k celkovému množství kalcitriolu a až 85 % kalcitriolu je syntetizováno v ostatních tkáních jako svaly, prs, prostata, makrofágy, B lymfocyty aj. Jelikož funkce kalcitriolu není pouze endokrinní, ale i autokrinní, je schopen sám řídit v těchto buňkách vlastní biosyntézu. Proces biosyntézy je znázorněn na obr. 3.^{3, 4, 5, 6}

Deaktivace a exkrece vitamínu D

Proces vyloučení vitamínu D₃ iniciují en-

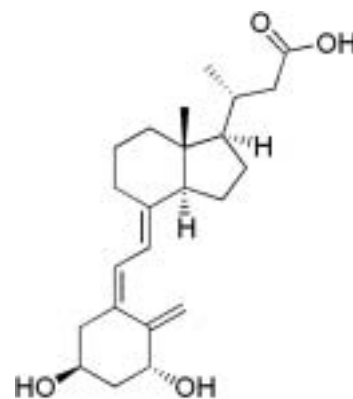


Obr. 3: Biosyntéza aktivní formy vitamínu D₃ a následná inaktivace

zymy C-24 hydroxylasa a C-1 α hydroxylasa. Formy vzniklé reakcí s enzymem C-1 α hydroxylasou mohou být hydroxylovány C-24 hydroxylasou a následně dále metabolitovány za vzniku finálního metabolitu kalcitriové kyseliny, která je vyloučena močí. Většina forem vitamínu D je však exkretována do žluče.^{7, 8} (Obr. 4)

Vznik epimerů

Během již popsaného hlavního procesu, kdy vytvořený cholekalciferol pomocí UVB z 7-dehydrocholesterolu je hydroxylován sérií enzymů z rodiny cytochromu P450, existuje alternativní dráha, při které vznikají epimery jednotlivých forem. Enzym 25-hydroxylasa (CYP2R1) převádí cholekalciferol na 25(OH)D₃ neboli kalcidiol. Stejnou enzymatickou reakcí může vzniknout i jiná forma z cholekalciferolu, a to C3-epi-25(OH)D₃. Obě formy vitamínu D se mohou účastnit dalších reakcí.



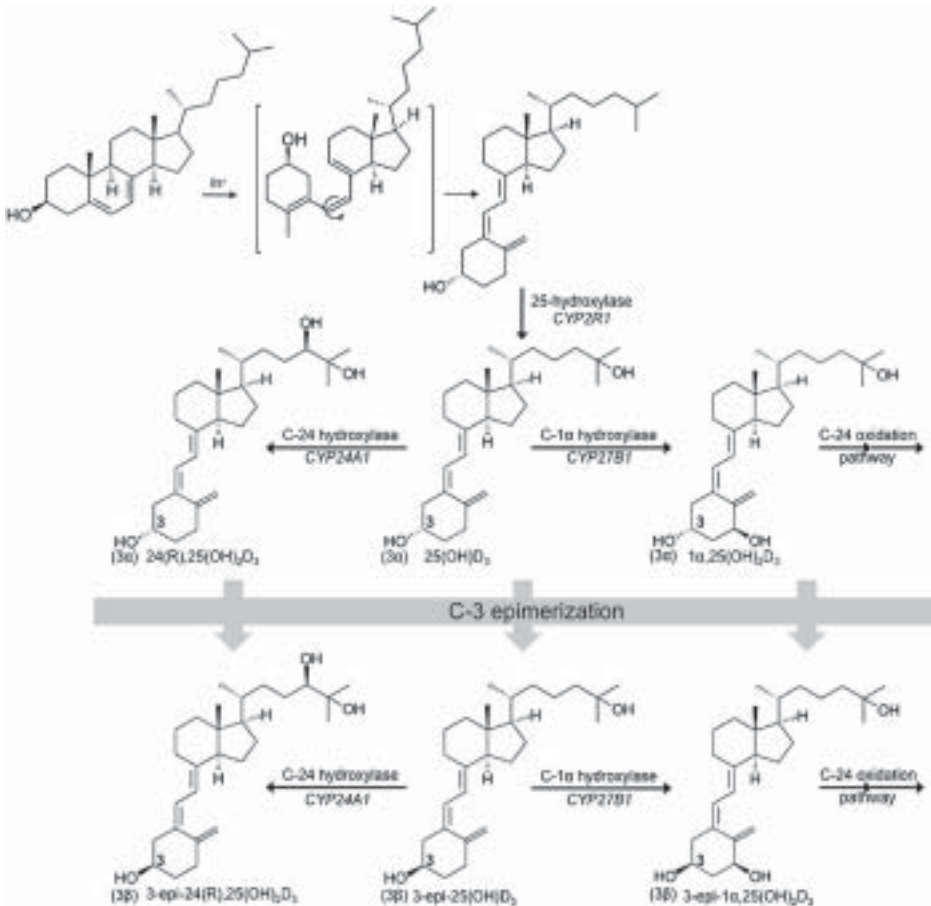
Obr. 4: Kalcitriová kyselina

Jiný enzym C-24 hydroxylasa (CYP24A1) hydroxyluje obě formy na uhlíku číslo 24. Vzniknout může tedy 24(R),25(OH)₂D₃ nebo 3-epi-24(R),25(OH)₂D₃. Další možnou variantou je převedení 25(OH)D₃ a 3-epi-25(OH)D₃ pomocí enzymu C-1 α hydroxylasy (CYP27B1) na formy 1 α ,25(OH)₂D₃ nebo 3-epi-1 α ,25(OH)₂D₃. Obě poslední formy se účastní C-24 oxidační dráhy. Výskyt epimerů byl poprvé pozorován u neonatálních lidských keratinocytů.⁹ (Obr. 5)

Vlastnosti různých forem vitamínu D a jejich biologická aktivita

Zmíněná biologická aktivita vitamínu D a jeho forem je zprostředkována díky vitamin D vázajícím receptorům (VDR), ke kterým jsou tyto metabolity dopravovány pomocí VDBP. Tyto receptory se nacházejí v celém těle a ovlivňují 500 genů, v některých publikacích se píše dokonce až o 1 000 genech. Vzhledem k celkovému počtu genů 18 000-20 000 jde o velké množství. Nicméně interakce mezi jednotlivými formami vitamínu D a proteiny je různá, což vede i k odlišné biologické aktivitě. V současné době vzniká mnoho studií, které se danou problematikou zabývají. V této práci bylo využito možnosti analyzovat jednotlivé formy a zkřížené reaktanty pomocí HPLC MS/MS a získat tak detailnější rozbor množství přítomných forem vitamínu D v séru u nejmladší populace.^{9, 10, 11}

Různé metabolity vitamínu D včetně C3-epimerů se díky vazbě na VDBP transportují do tkání, kde dochází k jejich biologické aktivaci díky interakci s VDR. C3-epimery: C3-epi-25(OH)D₃ a C3-epi-1 α ,25(OH)₂D₃ se vážou na VDBP a VDR s rozdílnou afinitou v porovnání s přísluš-



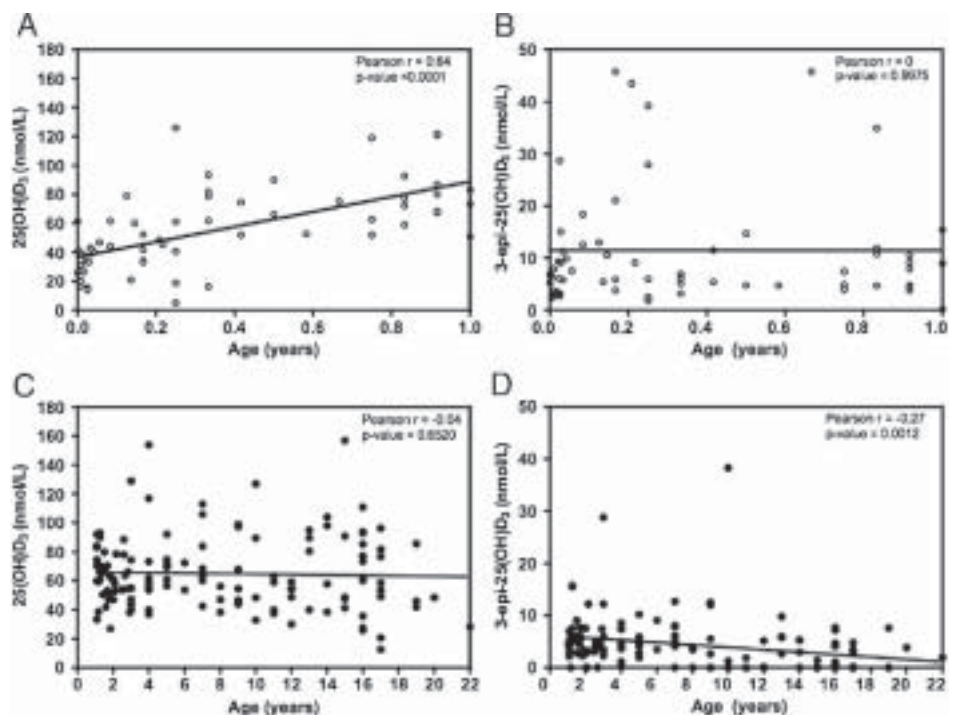
Obr. 5: Biosyntéza vitamínu D a jeho forem

nou 25(OH) formou D₃ a 1 α ,25(OH)₂D₃. Vazbou C3-epi-1 α ,25(OH)₂D₃ na VDR se indukují genová exprese osteokalcinu a CYP24, ale ve srovnání s 1 α ,25(OH)₂D₃ je méně aktivována. Podobně u formy C3-epi-1 α ,25(OH)₂D₃ bylo prokázáno, že má určitou antiproliferační a diferenační aktivitu přibližně 30% a 10% ve srovnání s neepimerickými formami. Vlastností formy C3-epi-1 α ,25(OH)₂D₃ je schopnost potlačit sekreci parathormonu a vyvolat povrchově aktivní syntézu fosfolipidů v plicních buňkách alveolárního typu II. Další vlastností C3-epi-1 α ,25(OH)₂D₃ je pravděpodobně vyšší metabolická stabilita ve srovnání s jeho neepimerickou formou. Další výzkumy a studie jsou nutné pro přesnější objasnění a potvrzení jeho biologické role v organismu.^{9, 10, 11}

Dynamika hodnot koncentrací C3-epimeru a 25(OH)D₃ během prvních měsíců a let života

Lidský organismus se s věkem neustále mění, proto se při hledání hladiny dostatečnosti vitamínu D porovnávají a testují jednotlivé věkové kategorie. Z hlediska

dynamiky hodnot byl u 25(OH)D₃ pozorován nárůst během prvního roku života a následná stabilizace jeho koncentrací v dalších letech. Na druhou stranu je podle uvedené literatury C3-epi-25(OH)D₃ konstantní v prvním roce a poté začíná jeho hladina klesat, viz obr. 7. Výrazný po-

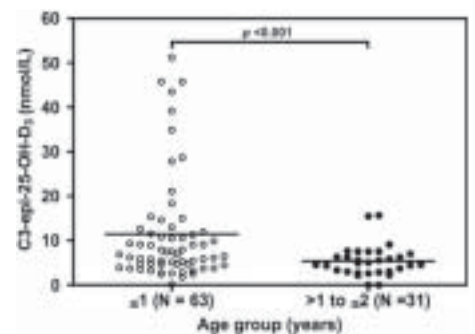


Obr. 7: Vývoj hladiny 25(OH)D₃ a C3-epi-25(OH)D₃

kles C3-epi-25(OH)D₃ je pozorován mezi prvním a druhým rokem života, viz obr. 6. Z těchto důvodů se terčem zájmu mnoha odborníků stalo odhalení příčiny vedoucí k podstatně vyšší hladině C3-epi-25(OH)D₃ v kojeneckém období. Zkoumaly se tekuté doplňky s obsahem vitamínu D, které jsou předepisovány kojencům. Bylo však zjištěno, že obsahují výlučně cholekalciferol. Vnější činitel tak doposud nebyl odhalen.¹⁰

Zkřížená reaktivita metody Elecsys Vitamin D total

Pokud se podíváme blíže na sekci Analytická specifčnost aktuálního příbalového letáku Elecsys, je zřejmé, že kromě dvou složek, které má daná metoda stanovovat - 25(OH)D₃ a 25(OH)D₂ -, se zde objevují i zkříženě reagující formy, a sice C3-epimer 25(OH)D₃ a 24,25-dihydroxyvitamin D₃, což je patrné v tabulce 1.¹²



Obr. 6: Porovnání sérové koncentrace C3-epi-25(OH)D₃ ve věku ≤ 1 a 1–2 let

Křížový reaktant	Křížová reaktivita (%)
25-Hydroxyvitamin D ₃	100
25-Hydroxyvitamin D ₂	92
24,25-dihydroxyvitamin D ₃	149
C3-epimer 25-hydroxyvitaminu D ₃	91
1,25-dihydroxyvitamin D ₃	nedetekovatelné
1,25-dihydroxyvitamin D ₂	nedetekovatelné
Vitamin D ₃	nedetekovatelné
Vitamin D ₂	nedetekovatelné

Tab. 1: Analytická specifčnost metody Elecsys Vitamin 25(OH)D total

Právě z oněch důvodů byla druhá porovnávaná metoda HPLC-MS/MS zaměřena na kvantifikaci těchto čtyř forem vitamínu D.

Při rešerši publikací zabývajících se touto problematikou jsme narazili na recentní práci holandských autorů, publikovanou v *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* v roce 2013, kteří prověřovali zkříženou reaktivitu C3-epimeru 25(OH)D₃, uvedenou v příbalovém letáku. Zaměřili se na novorozence, kde podíl tohoto C3-epimeru dosahoval až 58 % celkového 25(OH) vitamínu D. Autoři této publikace zjistili, že zatímco exogenně přidaný C3-epimer vykazoval při různých koncentracích 25(OH)D průměrné recovery 50 %, u vzorků novorozenců s vyšším endogenním C3-epimerem byla zkřížená reaktivita minimální - viz obr. č. 8.¹³

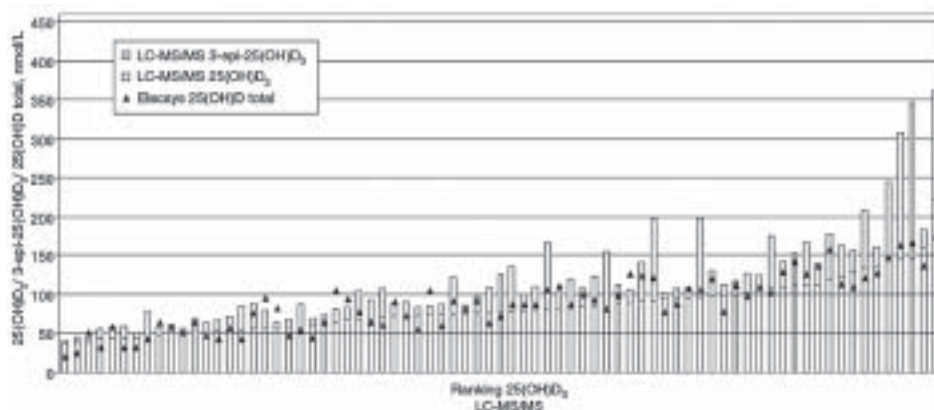
Zkřížená reaktivita exogenně přidané-

ho C3-epimeru je považována za in vitro anomálii, která nemá fyziologickou relevanci. Tento faktor je ale potřeba mít na zřeteli při cyklech externího hodnocení kvality, které obsahují vzorky s exogenně přidaným (spiked) C3-epimerem-25(OH)D₃. Stejně tak testování analytické specifčnosti pro charakteristiku této vlastnosti v příbalovém letáku využívá exogenně přidaný C3-epimer, což však neodráží reálné chování testu Elecsys Vitamin D total při analýze klinických rutinních vzorků.

Analytická část

Metodika práce

V období od února do srpna v roce 2013 proběhl sběr vzorků na Oddělení klinické biochemie Kroměřížské nemocnice a v soukromé laboratoři - RNDr. Martin



Obr. 8: Zkřížená reaktivita C3-epi-25(OH)D₃ v metodě Elecsys Vitamin D total u nativních vzorků novorozenců s endogenním obsahem této složky

	Počet vzorků mužského pohlaví	Počet vzorků ženského pohlaví	Celkový počet vzorků
Celkový soubor	238	180	418
Selektovaný soubor pro srovnání dvou metod	151	112	263

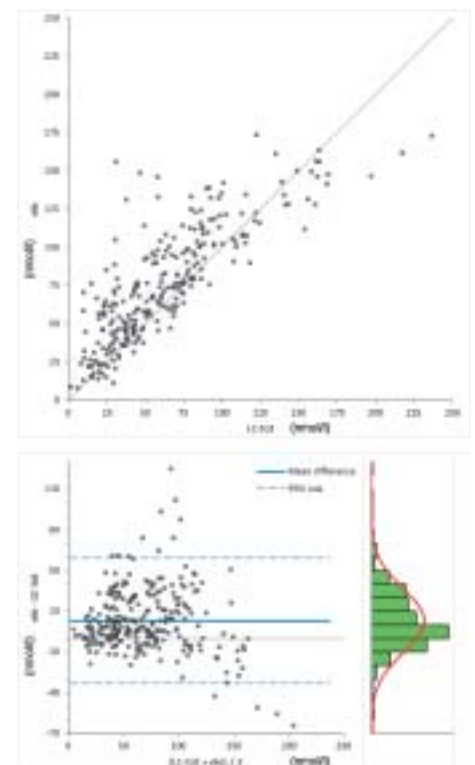
Tab. 2: Počty použitých vzorků

Novák klinické biochemie a hematologie v Kroměříži. Podmínky pro výběr vzorků byly:

- Objem vzorku větší než 0,5 ml nutný pro metodu HPLC MS/MS.
- Pacient mladší 15 let.
- Vzorky nesmí být hemolytické.

Výsledný počet sesbíraných vzorků byl 418. Všechny tyto vzorky byly změřeny metodou Elecsys Vit. D total. Pro analýzu metodou HPLC MS/MS byla provedena další selekce, která vyřadila většinu vzorků nespňujících podmínku objemu. Ve finální selekci tedy zůstalo 263 vzorků, které byly použity pro srovnání obou metod. Zastoupení pohlaví se dá považovat za vyrovnané, neboť 112 vzorků patří ženskému a 151 mužskému pohlaví, viz tab. 2. Dále je potřeba doplnit, že ve věkové skupině nad 5 let byla analyzována séra pouze dvou dívek a dvou chlapců, tudíž je vzhledem k celkovému vysokému počtu probandů možné hovořit o srovnání dvou metod ve věkové škále 0–5 let.

Měření vzorků probíhalo ve dvou fázích. Během první fáze byly vzorky měřeny metodou Elecsys Vitamin D total, která probíhala na začátku srpna. Denně bylo změřeno přibližně 40 a více vzorků. Každý den před i po analýze se prováděla dvoubodová kontrola kvality. Po změření byly



Graf 1: Srovnávací analýza metodou Passing-Bablok a Bland-Altman pro dětskou populaci

vzorky opět zamrazeny a následně odeslány do laboratoře v Penzbergu ve speciálním balení, aby nedošlo k rozmražení, a zde byly analyzovány metodou HPLC MS/MS dle Baecherové.

Porovnání metod

Srovnání výsledků dvou metod byla provedena na základě Passing-Bablokovy regrese a Bland-Altmanovy analýzy. Stanovovaným analytem je vitamin D total (metodou Elecsys Vitamin D total), respektive suma všech jeho analyzovaných forem (LC-tot) zjištěná pomocí HPLC MS/MS dle Baecherové. (Graf 1)

Vývoj množství některých forem vitaminu D během prvních měsíců a let života

Díky podrobným výsledkům metody HPLC MS/MS můžeme porovnat získané hodnoty vývoje koncentrací C3-epi-25(OH)D₃ a 25(OH)D₃ s hodnotami z literatury. Výsledky vývoje nemohou být brány dogmaticky, protože nejde o sériové měření jednotlivých pacientů. Také jsou ovlivněny vysokým počtem vzorků odebraných novorozencům již v prvním týdnu po narození. (Graf 2, tab. 5)

Z důvodu razantního ovlivnění celkových vývojových trendů sledovaných forem byly dále vyřazeny odběry provedené v prvním týdnu po narození a sledován vývoj hodnot od 1. do 12. měsíce života. (Graf 3, tab. 6)

Diskuse a závěr

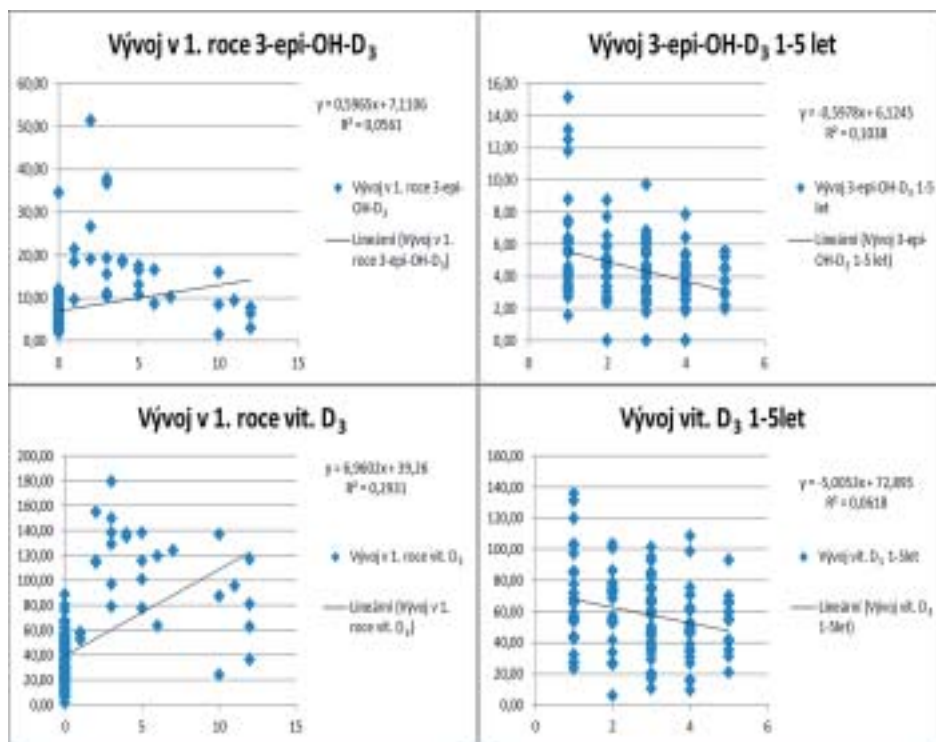
Na základě regresní analýzy dle Passinga a Babloka je možné konstatovat, že metody spolu dobře korelují. Porovnatelnost metod potvrzuje i druhá použitá metoda Bland-Altman, kde difference není výrazná, zvážíme-li variační koeficient 10 %, který se pro stanovení vit. D doporučuje. Nicméně je potřeba dále připomenout, že toto porovnání neříká nic o tom, která metoda poskytuje správnější výsledky, neboť ani jedna z těchto metod není metodou referenční. Tou byl v roce 2009 stanoven postup LC-MS/MS dle Vogesera, prostřednictvím něhož je stanovení Elecsys Vitamin D total standardizováno s návazností na standardní referenční materiál

n	263	
Method	Measuring interval	
LC-tot	1,57	to 236,90
ele	7,71	to 173,00
Correlation - r	0,820	
Fit Y on X		
Passing-Bablok fit		
Equation	ele = 8,002 + 1,007 LC-tot	
Parameter	Estimate	Bootstrap 95% CI
Intercept	8,002	4,292 to 12,95
Slope	1,007	0,9296 to 1,095

Tab. 3: Parametry hodnocení dle metody Passing-Bablok pro celkovou dětskou populaci

Fit D on A				
Constant difference				
Parameter	Estimate	95% CI		SE
Mean difference	13,086	10,2298	to 15,9426	1,4507
95% Lower LoA	-33,023	-37,9113	to -28,1356	2,4823
95% Upper LoA	59,196	54,3080	to 64,0837	2,4823
SD	23,526			

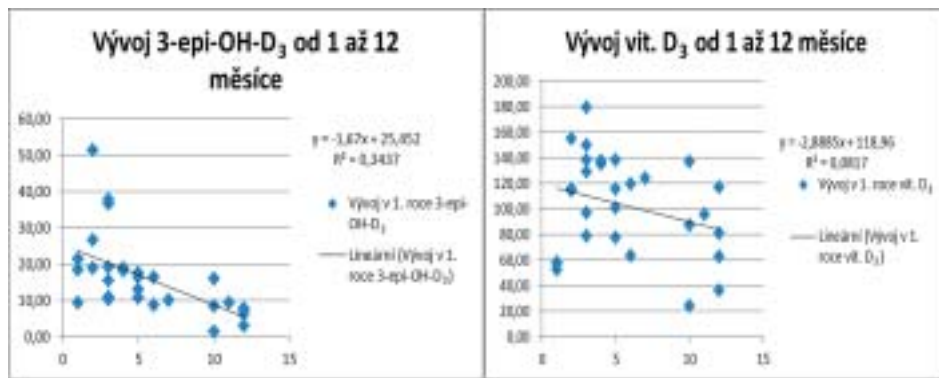
Tab. 4: Parametry hodnocení dle metody Bland-Altman pro celkovou dětskou populaci



Graf 2: Vývoj jednotlivých forem v 1. roce a během 1.-5. roku života

Metabolit v časovém období	Průměr (nmol/l)	Medián (nmol/l)
25(OH)D ₃ v 1. roce života	47,48	36,20
25(OH)D ₃ , 1-5 let	59,07	58,15
C3-epi-25(OH)D ₃ v 1. roce	7,78	5,62
C3-epi-25(OH)D ₃ , 1-5 let	4,47	4,23

Tab. 5: Střední hodnoty ke grafu 2



Graf 3: Vývoj jednotlivých forem od 1. do 12. měsíce života

Metabolit v 1.-12. měsíci života	Průměr (nmol/l)	Medián (nmol/l)
25(OH)D ₃ v 1. roce života	102,72	114,49
C3-epi-25(OH)D ₃ v 1. roce	16,07	15,47

Tab. 6: Střední hodnoty ke grafu 3

NIST SRM 2972. U dospělé populace byla korelace metody Elecsys s metodou referenční prokázána na paralelním stanovení 910 vzorků pokrývajících celé měřicí rozmezí metody v rámci multicentrické evaluace metody a Passing-Bablokova regrese přinesla tyto výsledky:

$Y (\text{Elecsys}) = 1,1 * X - 0,579, r = 0,8949.$

Velmi zajímavým se stalo monitorování vývoje množství 25(OH)D₃ a C3-epi(OH)D₃ během prvních měsíců a let života a jeho porovnání s hodnotami zjištěnými z literatury v Teoretické části práce, kde bylo zjištěno, že hodnota 25(OH)D₃ od narození v prvním roce roste a pak se stabilizuje, zatímco C3-epimer by měl být v prvním roce stabilní a pak postupně klesat. Naše měření naopak ukázalo na stálý pokles hodnoty 25(OH)D₃ v 1.-5. roce života a po odečtení výsledků odběrů z prvního týdne po narození klesající trend jak 25(OH)D₃, tak C3-epimeru. Podíváme-li se dále na tabulky 5 a 6 a poměr koncentrace C3-epimeru k 25(OH)D₃, je zřejmé, že hodnoty okolo 15 % dosažené v 1. roce života jsou poměrně vzdálené hodnotám uváděným v literatuře (nejčastěji okolo 40 %). Závislost koncentrace C3-epimeru na koncentraci 25(OH)D₃ je zřejmá, a tak rozdílný vývojový trend koncentrací obou těchto forem oproti literatu-

ře ukazuje na možnou nedostatečnost suplementace vitamínem D u našich probandů.

Další zajímavým zjištěním je, že se vyřazením vzorků, které pocházely od čerstvě narozených dětí, průměrné hodnoty C3-epimeru a vit. 25(OH)D₃ zdvojnásobily a u příslušných mediánů ztrojnásobily, což zřejmě ukazuje na pozitivní vliv kojení. Právě u těchto vzorků s vyšším podílem C3-epimeru se prokázalo, že metoda Elecsys Vitamin D total vykazuje minimální zkříženou reaktivitu vůči endogennímu C3-epimeru, což ostatně demonstrovaly nižší hodnoty naměřených koncentrací Elecsys Vitamin D total oproti součtu všech čtyř forem stanovených metodou HPLC MS/MS dle Baecherové.

Pro stanovení úrovně koncentrace hodnoty Elecsys Vitamin D total nutně pro všeobecné zdraví dětské a novorozenecké populace bude zapotřebí provést komplexní studie, které budou brát v úvahu poměrně velké množství faktorů, jako např. úroveň hodnoty vitamínu D u těhotných, suplementace dětí a kojících matek vitamínem D, vliv kojení, změny v prvních týdnech po porodu apod. Pro zajímavost u dospělé populace se většina zahraničních a českých expertů shoduje na hodnotě 75 nmol/l, které ovšem nedosahují podle různých studií více než 3/4 populace.

Literatura:

- 1) Forstová, Z.: Význam nedostatku vitamínu D pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění, Univerzita Pardubice, 2013
- 2) Šantavý, F., et al.: Biochemie pro studující medicíny. Praha : AVICENUM, 1975
- 3) Holick, M., et al.: Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline, The Endocrine Society, 2011
- 4) Sigmundsdottir, H., et al.: DCs metabolize sunlight-induced vitamin D₃ to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27, Nat Immunol., 2007
- 5) Kogawa, M., et al.: Osteoclastic metabolism of 25(OH)-vitamin D₃: a potential mechanism for optimization of bone resorption, Endocrinology, 2010
- 6) Holick, M., et al.: The Vitamin D Deficiency Pandemic: a Forgotten Hormone Important for Health, Public Health Reviews, 2010
- 7) Novotná, Š.: Vitamin D u onkologických pacientů, Brno: Masarykova univerzita, 2012
- 8) Sakaki, T., et al.: Metabolism of vitamin D₃ by cytochrom P450, Frontiers in Bioscience, 2005
- 9) Bailey, D., Veljkovic, K., et al.: Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D₃ C3-epimer, Clinical Biochemistry, 2012
- 10) Yazdanpanah, M., Bailey, D., et al.: Analytical measurement of serum 25-OH-vitamin D₃, 25-OH-vitamin D₂ and their C3-epimers by LC-MS/MS in infant and pediatric specimens, Clinical Biochemistry, 2012
- 11) Molnar, F., et al.: 1 α ,25(OH)₂-3-Epi-Vitamin D₃, a Natural Physiological Metabolite of Vitamin D₃: Its Synthesis, Biological Activity and Crystal Structure with Its Receptor, Pone journal, 2011
- 12) Příbalový leták Elecsys Vitamin D total, V5, 2013-10
- 13) Van den Ouweland, JMW, et al.: Evaluation of 3-epi-25-hydroxyvitamin D₃ cross-reactivity in the Roche Elecsys Vitamin D Total protein binding assay, Clin Chem Lab Med, 2013