

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie



**VÝVOJ HPLC METODY STANOVENÍ VITAMÍNU D
V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU**

Diplomová práce

Hradec Králové 2008

Bc. Alena Vlčková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně a uvedla v ní veškerou použitou literaturu a informační zdroje, ze kterých jsem čerpala.“

V Hradci Králové 7.5.2008

.....

Podpis

Děkuji RNDr. Dagmar Solichové, PhD, Mgr. Markétě Kašparové a Mgr. Lence Krčmové za odborné vedení, cenné rady, pomoc a milý přístup při vypracování této diplomové práce. Dík patří i vedení Gerontologické a metabolické kliniky FNHK, které mi poskytlo laboratoře k experimentální části.

Abstrakt

V diplomové práci byla vyvinuta nová HPLC metoda pro stanovení vitamínů D (vitamín D₂, D₃) a jeho metabolitů (1,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃) v jednom vzorku s využitím vnitřního standardu.

Při navrhovaném stanovení byla použita monolitní kolona Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm. Detekce byla prováděna pomocí diode array detektoru při vlnové délce 265 nm pro vitamíny D a jeho metabolity, 295 nm pro vnitřní standard tokol. Jako mobilní fáze byla použita směs methanol : acetonitril : voda v procentuelním zastoupení 12,5 : 85 : 2,5. Průtok mobilní fáze byl 1,5 ml/min a nástřik vzorku na kolonu 20 µl. Celková doba analýzy byla 3,5 minuty včetně ekvilibrace kolony.

Metoda byla vypracována a částečně optimalizována se standardy vitamínu D a bude dále validována pro biologický materiál.

Abstract

In this diploma work the new HPLC method for simultaneous determination of vitamins D₂, D₃ and their metabolites (1,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃) using the internal standard was developed.

During the suggested assessment the monolith column Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm was used. The detection was carried out with the help of a diode array detector at wavelength 265 nm for vitamins D and its metabolites, 295 nm for the internal standard tocol. The mixture of methanol : acetonitrile : water in percentual representation 12,5 : 85 : 2,5 was used as the mobile phase. The flow rate of the mobile phase was 1,5 ml.min⁻¹ and the injection volume of the sample was 20 µl. The total time of the analysis was 3,5 minutes including the equilibration of the column.

This method was developed and partially optimised with the standards of vitamins D and will be validated for biological material.

Obsah

1	ÚVOD A CÍL PRÁCE	7
2	SEZNAM ZKRATEK.....	8
3	HISTORIE VITAMÍNU D	9
4	CHEMICKÁ PODSTATA A OBECNÁ ČÁST	11
4.1	FORMY	12
4.2	METABOLITY	13
4.2.1	<i>Význam 25(OH)D.....</i>	<i>13</i>
4.2.1.1	Faktory ovlivňující koncentraci 25(OH)D	13
4.2.2	<i>1,25(OH)₂D₃.....</i>	<i>14</i>
4.2.3	<i>24,25(OH)₂D a 25,26(OH)₂D</i>	<i>14</i>
5	ZDROJE (VÝŽIVA, POTRAVA).....	15
6	BIOLOGICKÉ PŮSOBENÍ.....	16
7	METABOLISMUS.....	18
7.1	A) SYNTÉZA VITAMÍNU D V KŮŽI	18
7.2	B) SUPLEMENTACE.....	20
7.3	SYSTÉMOVÁ REGULACE.....	22
7.3.1	<i>Kontrolní (regulační) mechanismy vitamínu D.....</i>	<i>24</i>
7.4	ABSORPCE, TRANSPORT A VYLUČOVÁNÍ.....	25
7.5	MECHANISMUS PŮSOBENÍ (VDR).....	26
8	HYPOVITAMINÓZA A HYPERVITAMINÓZA	29
8.1	HYPOVITAMINÓZA (HODNOCENÍ NEDOSTATKU VITAMÍNU D V ORGANISMU)	29
8.1.1	<i>Klasifikace a diagnostika vitamín D deficitních stavů</i>	<i>30</i>
8.1.2	<i>Nemoci způsobené deficitem</i>	<i>31</i>
8.1.2.1	Skupiny s větším rizikem deficitu	32
8.1.3	<i>Vitamín D u pacientů s onemocněním ledvin.....</i>	<i>33</i>
8.1.3.1	Deficit vitamínu D u pacientů s chronickým onemocněním ledvin	34
8.2	HYPERVITAMINÓZA.....	35
9	FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ A FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI.....	37
9.1	PORUCHA KALCIOFOSFÁTOVÉHO METABOLISMU.....	37
9.2	VITAMÍN D A HORMONÁLNÍ SYSTÉM	39
9.3	ROLE V IMUNOMODULACI	41
9.4	ROLE V PREVENCI RAKOVINY	42
9.5	VITAMÍN D A KARDIOVASKULÁRNÍ SYSTÉM.....	42
9.6	VITAMÍN D A KOSTNÍ METABOLISMUS.....	43
9.6.1	<i>Kalcitriol stimuluje střevní resorpci vápníku a fosfátu</i>	<i>43</i>
9.6.2	<i>Vitamín D při léčbě kostních onemocnění.....</i>	<i>43</i>
10	MOŽNOSTI STANOVENÍ VITAMÍNU D	45
10.1	IMUNOCHEMICKÉ TECHNIKY	45
10.1.1	<i>RIA</i>	<i>46</i>
10.2	ENZYMOVÉ METODY	47
10.3	CHEMICKÉ METODY.....	47
10.4	CHROMATOGRAFICKÉ METODY	47
10.4.1	<i>TLC.....</i>	<i>47</i>
10.4.2	<i>GC.....</i>	<i>48</i>
10.4.3	<i>LC, HPLC.....</i>	<i>48</i>
11	KLINICKÉ VYUŽITÍ ANALÝZY VITAMÍNU D A JEHO METABOLITŮ	50
11.1	25(OH)D.....	50
11.2	1,25(OH) ₂ D.....	51
11.3	OSTATNÍ METABOLITY.....	53
12	INSTRUMENTÁLNÍ ČÁST	54

12.1	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	54
12.2	CHEMIKÁLIE	55
12.3	STANDARDS	55
12.4	PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH A PRACOVNÍCH ROZTOKŮ.....	56
12.5	VÝVOJ METODY A OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK	57
12.6	VÝSLEDKY A DISKUZE	59
12.7	OPAKOVATELNOST	70
12.8	TYPY MONOLITICKÝCH KOLON	72
12.9	TEPLOTA.....	74
12.10	CHROMSYSTEMS.....	77
13	SHRNUTÍ.....	80
14	ZÁVĚR.....	81
15	LITERATURA:.....	82

1 Úvod a cíl práce

Úvod

Monitorování hladin metabolitů vitamínu D (kalcitriolu a kalcidiolu) představuje u pacientů se sníženou funkcí ledvin významný přínos pro včasnou úpravu parametrů kostního metabolismu. Tato vyšetření mohou přispět k prevenci pozdních pokročilých forem renální osteopatie.

Na Gerontologické a metabolické klinice ve Fakultní nemocnici Hradec Králové je v současné době řešeno několik projektů, jejichž součástí je i sledování hladin vitamínu D. V klinické praxi je nyní stanovován relativně drahou metodou – radioimunoanalýzou. Další možnost stanovení vitamínu D a jeho metabolitů představuje kapalinová chromatografie.

Cíl práce

Vývoj HPLC metodiky stanovení derivátů vitamínů D (D_2 , D_3 , $1,25(OH)_2D_3$ a $25(OH)D_3$) v lidském séru pro klinické využití u pacientů s poruchami ledvinných funkcí. Cílem bylo zlepšit diagnostické možnosti a najít vhodnou, rychlou, dostupnou metodu s použitím moderní instrumentace.

2 Seznam zkratek

ACN	acetonitril
CaR	receptor pro vápník
CKD	chronické onemocnění ledvin
DBP	vitamín D vázající protein
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECT	extracelulární tekutina
GC	plynová chromatografie
GFR	glomerulární filtrace
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
IL	interleukin
iPTH	intaktní PTH
LC	kapalinová chromatografie
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometr
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
p.o.	per os, přijatý ústy
PTH	parathormon
RIA	radioimunoanalýza
RXR	receptor X pro kyselinu retinovou
SPE	extrakce na pevné fázi
T _H lymfocyty	pomocné T lymfocyty
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
VDR	receptor vitamínu D
VDRE	elementy pro receptor vitamínu D

3 Historie vitamínu D

Vitamín D byl objeven na začátku minulého století. Omylem byl klasifikován jako nutrient a kostní choroby, rachitida a osteomalácie se považovaly za onemocnění, která jsou zapříčiněna nedostatečným příjmem vitamínu D potravou. Tvrzení, že vitamín D je nutrient, vycházelo z poznatku, že se v malém množství nachází v potravě a jeho objevení spadalo do období objevu dalších vitamínových mikronutrientů. Proto byl zařazen do skupiny vitamínů rozpustných v tucích spolu s vitamínem A, E a K. Později se však přišlo na to, že potrava obsahuje jen velmi malé množství vitamínu D, a to především vitamín D₃. Vitamín D₂ je v přírodě vzácný, vzniká ozářením UV ergosterolu v houbách za vzniku ergokalciferolu. U lidí se však stále využívá i farmaceutická forma ergokalciferolu (vitamín D₂) na fortifikaci (obohacení) potravin, ale i v prevenci a terapii jeho deficitu [2].

Stručný přehled:

- 1) konec 17. století: děti žijící v oblastech s nízkým slunečním osvitom (industrializovaná evropská města severní Evropy) trpí retardací růstu a deformací skeletu („rachitis“)
- 2) 18. a 19. století: výskyt až u 90% dětí v Leidenu a Glasgow a u 80% dětí v Bostonu
- 3) 1822 Sniadecki: děti z hlavního města (Varšava) mají rachitis, děti žijící na venkově postiženy nejsou. Za onemocnění odpovídá nedostatek sluneční expozice ve městě.
- 4) 1890 Palm: děti ve městech Velké Británie jsou postiženy, děti na venkově Indie postiženy nejsou. Doporučení „slunečních lázní“.
- 5) 1919-1921 rachitis u dětí lze léčit slunečním osvitom/UV zářením
- 6) strukturální identifikace vitamínu D₂ a D₃ (ergo- a cholekalciferol)
- 7) 30. léta 20. století – obohacování potravin vitamínem D (později ukončeno)
- 8) 1963 – Norman a DeLuca – syntéza D₃
- 9) 1969 – Haussler – objev 1,25-dihydroxyvitamínu D₃ a receptoru pro vitamín D (VDR)
- 10) 1974 – Fraser a Kodicek: kalcitriol per os (Rocaltrol)
- 11) 1984 – Slatopolski: kalcitriol i.v. (Calcijex)

- 12) 1987 – monoklonální protilátky proti VDR
- 13) 1997 – „VDR-knockout mice“ = umožněny studie (pato)fyziologie vitamínu D
- 14) 1998 – FDA registruje parikalцитol (syntetický analog vitamínu D, Zemplar)
- 15) V současnosti intenzivně zkoumány „netradiční“ účinky vitamínu D [3]

4 Chemická podstata a obecná část

D₃ (cholecalciferol)

Sumární vzorec: C₂₇H₄₄O

Mr: 384,6

Absorpční maximum: 264 nm (v ethanolu) a 254 nm

Je velmi stabilní v redukcujících agens, v zásadách má omezenou stabilitu a naopak velmi labilní je v přítomnosti kyselin, iontů kovů, oxidačních agens a při 100°C nebo na světle.

Vitamíny D jsou mírně citlivé na teplo a vzduch, kdy dochází ke katalýze vedoucí k izomerizaci a zároveň k oxidaci molekuly.

Fyziologické hodnoty

Orientační referenční intervaly jsou uvedeny v tabulce 1. Koncentrace vitamínu D a jeho metabolitů v séru výrazně kolísají v závislosti na ročním období, vystavení organismu slunečnímu záření i na příjmu potravy. Vyšší hladiny nacházíme v létě ve srovnání se zimou. U žen prudce stoupá koncentrace v ovulační fázi. Interferující faktory zvyšující koncentrace: léky (estrogeny, oktreoidy, prednison) [11].

Tab. 1: Orientační referenční meze v séru [11]

Děti: 1,25(OH) ₂ D ₃	0,075 – 0,175 nmol/l
Dospělí: 1,25(OH) ₂ D ₃	0,050 – 0,200 nmol/l
Léto – dospělí: 25(OH)D ₃	50 – 300 nmol/l
Zima – dospělí: 25(OH)D ₃	25 – 125 nmol/l
Léto – zdravé osoby (95% interval, léto): 25(OH)D ₃	41,6 – 192,4 nmol/l

Název „vitamín D“ je generický název pro dvě molekuly. Ergocalciferol neboli vitamín D₂ vzniká ozářením rostlinného sterolu ergosterolu. Cholecalciferol neboli vitamín D₃ je hlavní formou vitamínu D v přírodě [10]. Vitamín D₃ je syntetizován v pokožce po aktivaci slunečním zářením [6].

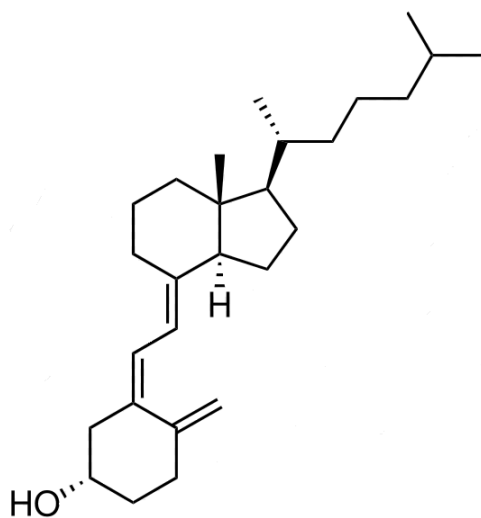
Zdrojem vitamínu D₂ jsou houby a rostliny, člověk ho nedokáže vytvořit [1]. Vitamín D₂ vzniká v kvasinkách a rostlinách (ergosterol). Jako 7-dehydrocholesterol, kdy

je ergosterol vystaven UVB, je fotolyzován na provitamin D₂, který se okamžitě izomeruje teplem na vitamín D₂. Je obecně přijatelné, že vitamín D₂ a vitamín D₃ využívá lidský organismus stejně, jsou stejně účinné [6].

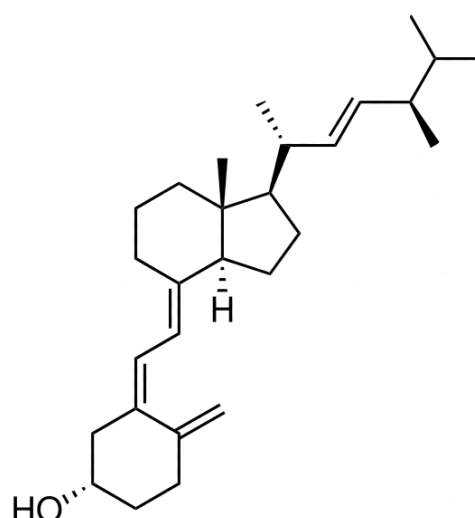
4.1 Formy

Hlavní formy vitamínu D byly popsány. Dva nejdůležitější jsou vitamín D₃ (cholecalciferol) a vitamín D₂ (ergocalciferol).

Obr. 1: cholecalciferol (D₃) [1]



Obr. 2: ergocalciferol (D₂) [1]



Vitamín D je steroidní prohormon. Je představován steroidy vyskytujícími se u živočichů, rostlin a kvasinek. Z nich různými metabolickými pochody vzniká v těle hormon známý jako kalcitriol [17]. Chemicky, variantami vitamínu D jsou sekosteroidy; otevřené steroidy. Rozdíl ve struktuře mezi vitamínem D₂ a D₃ je v jejich postranním řetězci [1]. Zatímco vitamín D₃ má postranní řetězec jako cholesterol, vitamín D₂ se odlišuje methylovou skupinou na uhlíku C₂₄ a dvojnou vazbou mezi C₂₂ a C₂₃ [6].

Vitamín D₁: molekulárně složený z ergocalciferolu s lumisterolem 1:1

Vitamín D₂: ergocalciferol nebo calciferol (z ergosterolu)

Vitamín D₃: cholecalciferol (pochází z 7-dehydrocholesterolu v kůži)

Vitamín D₄: dihydrotachysterol

Vitamín D₅: sitocalciferol (ze 7-dehydrositosterolu) [1]

4.2 Metabolity

4.2.1 Význam 25(OH)D

V minulosti převládal názor, že koncentrace 25(OH)D z pohledu vitamín D hormonálního systému není významná, protože biologicky aktivní metabolit 1,25(OH)₂D syntetizovaný v ledvinách je víc než 100x účinnější. Jsou však doklady o tom, že i 25(OH)D se váže na VDR (receptor vitamínu D), i když s nízkou afinitou. Koncentrace 25(OH)D v plazmě je však přibližně 1000x vyšší než koncentrace 1,25(OH)₂D, proto je pravděpodobné, že 25(OH)D se podílí na celkovém účinku vitamínu D. Orgány, které se přímo nepodílejí na udržení kalcium-fosfátové homeostázy také obsahují VDR [2].

4.2.1.1 Faktory ovlivňující koncentraci 25(OH)D

Hlavní zdroj vitamínu D u lidí je jeho syntéza v kůži vlivem slunečního záření. Existuje celá řada faktorů, které syntézu limitují:

a) UV záření

Produkce vitamínu D₃ závisí na zeměpisné šířce, denní době a ročním období. V severozápadní Evropě v zimních měsících (od října do května) syntéza prakticky neprobíhá a organismus spotřebovává svoje zásoby. Na druhé straně k saturaci organismu vitamínem D na několik měsíců stačí několikahodinové ozáření. Staří lidé, kteří nevycházejí z domu nebo jsou institucionalizovaní, mají vysoké riziko hypovitaminózy D. Nedostatek slunečního záření mají i chronicky nemocní pacienti.

b) Věk

Stárnutí též snižuje kapacitu kůže syntetizovat vitamín D₃. Ve věku nad 65 let je 4-násobně snížená kapacita kůže produkovat vitamín D₃ v porovnání s mladými jedinci.

c) Resorpce ve střevě

Druhým přirozeným zdrojem vitamínu D je jeho příjem potravou, hlavně v rybách a rybím tuku. Kapacita resorpce obou vitamínů ve střevě se věkem snižuje až na 40% v porovnání s mladými jedinci. Potraviny obohacené vitamínem D se v USA a Kanadě používají už dlouhodobě, u nás zatím krátce. Všeobecně lze říct, že příjem vitamínu D v potravě je oproti syntéze v kůži velmi malý [2].

4.2.2 1,25(OH)₂D₃

Kalcitriol stimuluje ve sliznici tenkého střeva syntézu specifického proteinu, nutného pro vazbu a absorpci vápníku [9]. Ukázalo se, že 1,25(OH)₂D potlačuje ve více tkáních růst buněk a stimuluje jejich diferenciaci, což se potvrdilo při léčbě některých nádorů a lymfomů. Systémové a topické podávání 1,25(OH)₂D se efektivně využívá k léčbě psoriázy [2].

4.2.3 24,25(OH)₂D a 25,26(OH)₂D

Základní sterolová molekula může být modifikována alternativními metabolickými cestami, tj. hydroxylacemi na pozicích 1, 23, 24, 25 a 26. Existuje více než 20 metabolitů, ale u žádného nebyla jasně prokázána biologická aktivita [17]. 24,25(OH)₂D a 25,26(OH)₂D jsou považovány za degradační („neaktivní“) produkty hydroxylačního procesu. Funkce těchto dvou metabolitů však není zcela jasná.

Metabolit 24,25(OH)₂D₃ byl experimentálně používán k tlumení hyperkalcemického účinku při vysoké suplementaci pacientů s deficitem vitamínu D. Tato kombinovaná léčba dostatečně tlumila hyperparatyreózu, zvyšovala proliferaci osteoblastů a mineralizační aktivitu 1,25(OH)₂D₃. Ukazuje se tedy, že i minimálně aktivních degradačních produktů metabolismu vitamínu D by bylo možno klinicky využít ve vhodné kombinaci s 1,25(OH)₂D₃ [11].

5 Zdroje (výživa, potrava)

Roční období, zeměpisná šířka, denní doba, oblačnost, opalovací krémy ovlivňují expozici kůže UV paprskům, a tím i syntézu vitamínu D, proto je důležité, aby lidé se sníženou expozicí slunci měli dostatek vitamínu D v potravě [1]. Je-li vystavení slunečnímu záření nedostatečné pro zásobování organismu vitamínem D, je možné ho individuálně získat z potravy či vitamínových doplňků [6].

Obsah vitamínu D v potravinách je velmi variabilní. Poměrně nízký je ve vegetariánské stravě, naopak ve významnějších koncentracích je obsažen v některých druzích ryb (makrela, tuňák, sled'), ve vaječném žloutku, játrech, mléku a másle [11]. Jedním z mála přírodních zdrojů vitamínu D pro vegany jsou shiitake houby [1]. Významnými zdroji jsou též vitamínem D obohacené margaríny a pomazánky [10]. Většinu vitamínu D z potravy přijímáme ve formě fortifikovaných potravin především mléka, sójového mléka a cereálií (obilné lupínky) [1]. Je-li organismus přiměřeně dlouho a pravidelně vystavován slunečnímu záření, není zevní přívod vitamínu nezbytný. **Každodenní expozice slunečnímu záření v délce 15 minut stačí pro dosažení dostatečných plazmatických hladin [11].**

U.S. Dietary Reference určuje adekvátní příjem (AI) pro kojence, děti i dospělé ve věku 19-50 množství 5 µg/den (200 UI/den). Adekvátní příjem se zvyšuje na 10 µg/den (400 UI/den) pro dospělé ve věku 51-70 let a na 15 µg/den (600 UI/den) pro lidi starší 70ti let [1].

Tab. 2 : Doporučená denní dávka vitamínu D₃ [11]

	Muži	Ženy
< 50 let	0,005 mg	0,005 mg (i v těhotenství)
> 50 let	0,015 mg	0,010 mg
Parenterální potřeba/24hod	0,005 mg	

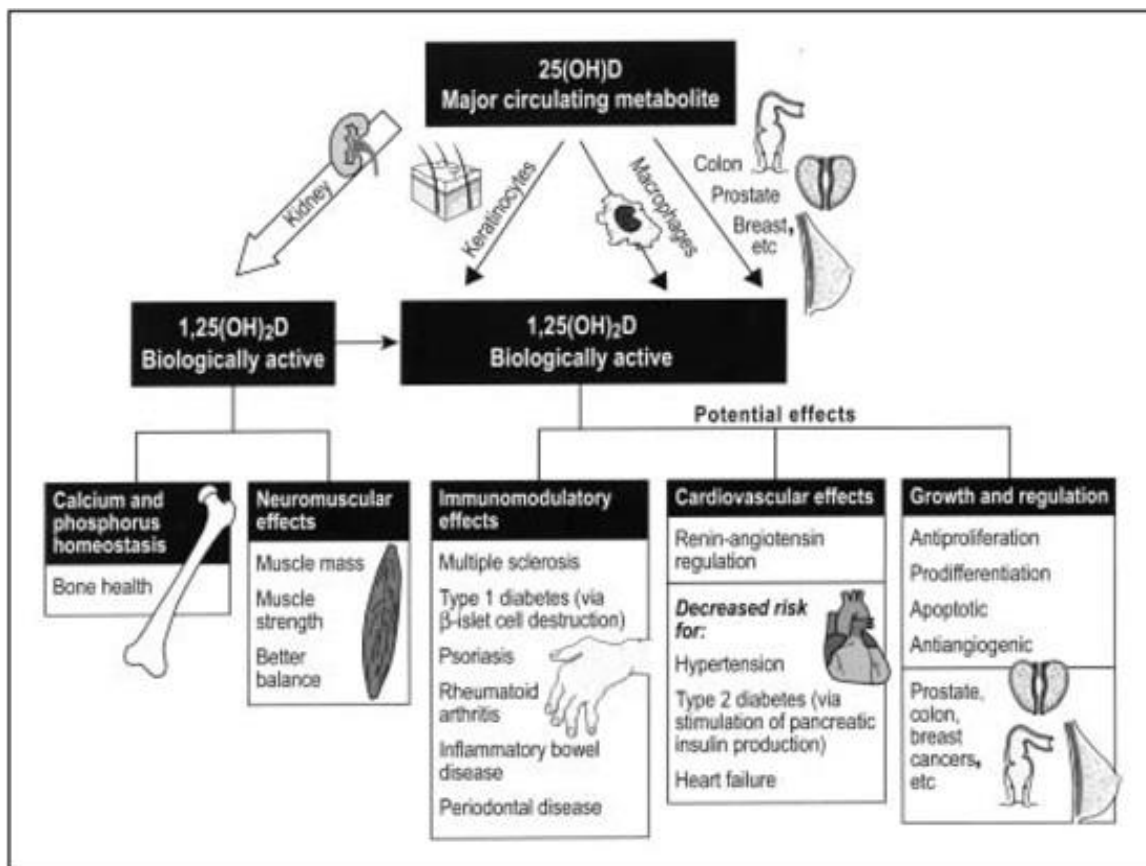
V některých zemích obohacují potraviny jako mléko, jogurty, margaríny, oleje, ranní cereálie, těstoviny a chleba vitamínem D₂ a/nebo D₃, pro minimalizaci rizika deficitu vitamínu D. Ve Spojených státech a Kanadě například fortifikované mléko poskytne 100 UI ve sklenice nebo jednu čtvrtinu odhadovaného adekvátního příjmu pro dospělé nad 50 let [1].

6 Biologické působení

Vitamín D (resp. kalcitriol) hraje důležitou roli v udržování orgánových systémů.

- 1) Vitamín D reguluje hladinu vápníku a fosforu v krvi, podporuje jejich absorpci z potravy ve střevě a zvyšuje reabsorpci vápníku v ledvinách.
- 2) Podporuje formování kostí a mineralizaci, je základem pro vývoj zdravých a silných kostí.
- 3) Inhibuje produkci hormonů z příštítných tělísek (snižuje tvorbu parathormonu, zvyšuje expresi receptoru pro vitamín D, zvyšuje expresi CaR).
- 4) Vitamín D ovlivňuje imunitní systém podporou imunoprese, fagocytózy a protirakovinnými účinky.
- 5) Působí na inzulínovou sekreci v pankreatu.
- 6) Ovlivňuje kardiovaskulární systém inhibicí sekrece reninu/stimulací myocytů.
- 7) Obecně má antiproliferativní a prodiferenční účinek (zprostředkovan VDR) [1,3].

Obr. 3: Biologické působení vitamínu D na organismus [20]



Vitamín D reguluje plazmatickou koncentraci kalcia stimulací jeho absorpce ve střevě a modulací vylučování fosfátů ledvinami [10]. Přispívá tak k regulaci a optimalizaci hladiny vápníku a fosforu v krvi. Fosfor i vápník jsou důležité pro stavbu kostí [1]. Udržování kalcémie v normě je základem novotvorby kostí. Hypokalcémie vede naopak k resorpci [10]. Vitamín D je proto významný pro uchování kostí silných a nepoškozených [1].

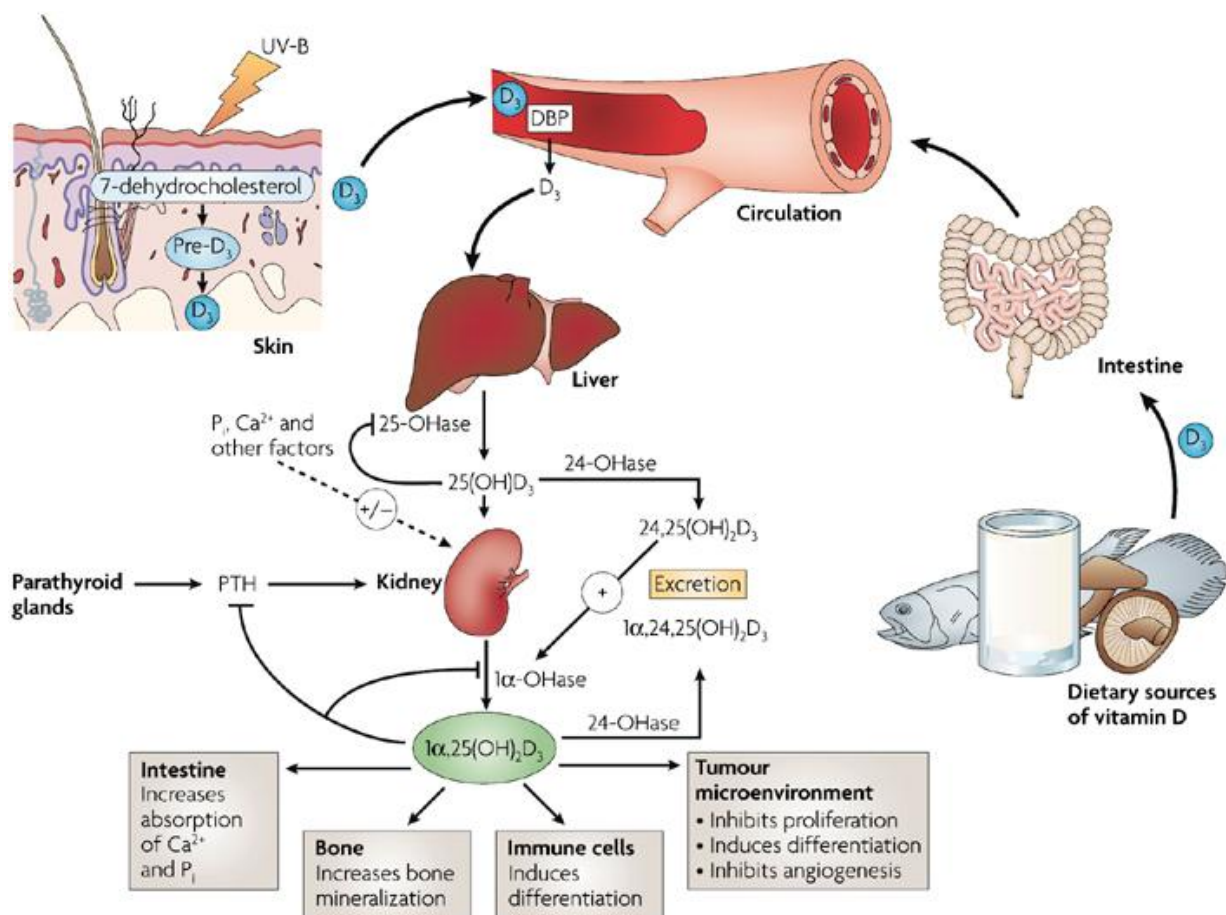
Epidemiologické studie poukázaly na souvislost mezi deficitem vitamínu D a rakovinou tlustého střeva a prsu.

Stav vitamínu D v organizmu ovlivňuje imunologické funkce, doložila se porucha funkcí makrofágů [2]. Vitamín D totiž umožňuje jejich diferenciaci [10]. Deficit vitamínu D ovlivňuje sekreci inzulínu. Léčba vitamín D deficitních pacientů zlepšuje glukózovou toleranci a funkci beta-buněk pankreatu. Deficit vitamínu D patří mezi faktory, které se podílejí na rozvoji metabolického syndromu X. Deficit vitamínu D ovlivňuje i jiné endokrinní orgány jako např. hypofýzu, testes atd. Ve Framinghamské studii se zjistil vztah mezi deficitem vitamínu D a progresí osteoartritidy, stejně jako s neobvyklým bolestivým syndromem charakterizovaným těžkou hyperestezí, která ustoupila po léčbě vitamínem D [2].

7 Metabolismus

Vitamín D je buď syntetizován v kůži, nebo přijímán potravou a do oběhu vstupuje částečně navázan na vitamín D-vázací protein (DBP) [6].

Obr. 4: Osud vitamínu D v organismu [19]

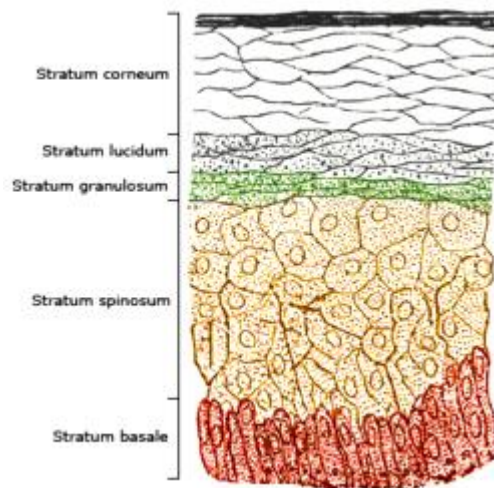


Nature Reviews | Cancer

7.1 A) Syntéza vitamínu D v kůži

Kůže se skládá ze dvou hlavních vrstev: vnitřní vrstva nazývaná škára (dermis), složená převážně z pojivové tkáně a vnější tenčí se nazývá pokožka (epidermis). Epidermis je složena z pěti vrstev: stratum corneum, stratum lucidum, stratum granulosum, stratum spinosum a nejnvnitřnější stratum basale [1].

Vitamin D₃ vzniká v kůži fotochemickou reakcí ze 7-dehydrocholesterolu. Nejvyšší koncentrace 7-dehydrocholesterolu se nalézá v epidermální vrstvě kůže ve stratum spinosum a nejnižší stratum basale. Produkce provitaminu D₃ je proto největší v těchto dvou vrstvách, kdežto v ostatních je snížena.



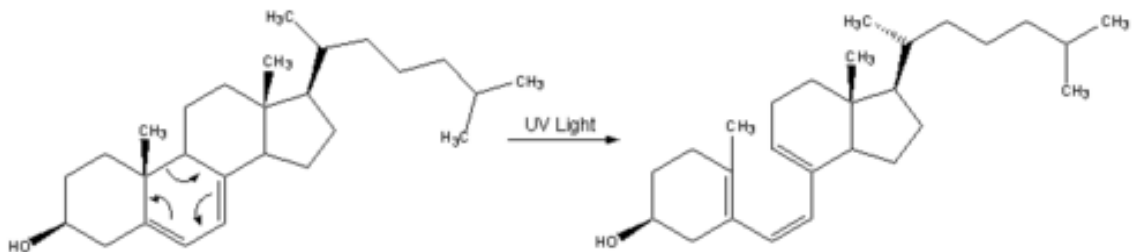
Syntéza v kůži nastává díky UVB záření, které efektivně prostupuje pouze epidermální vrstvou kůže. 7-dehydrocholesterol absorbuje UV světlo nejefektivněji ve vlnových délkách 270-290 nm, proto produkce vitamínu D₃ nastane pouze v těchto vlnových délkách. Dva nejdůležitější faktory, které řídí tvorbu provitaminu D₃ jsou intenzita a kvalita (vhodné vlnové délky) UVB ozáření, které zasáhne 7-dehydrocholesterol hluboko ve stratum basale a

stratum spinosum.

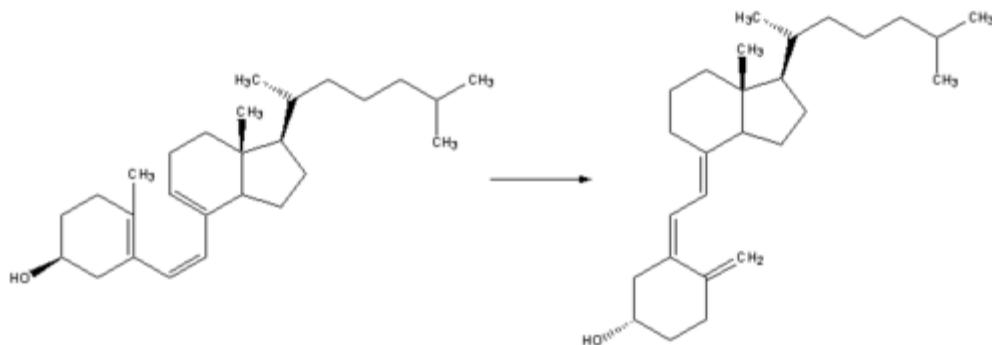
Kritický determinující člen při produkci vitamínu D₃ v kůži je přítomnost a koncentrace melaninu. Melanin funguje jako sluneční filtr v kůži, a proto koncentrace melaninu souvisí se schopností UVB světla proniknout epidermálními vrstvami, a tak dosáhnout na 7-dehydrocholesterol obsažený ve stratum basale a stratum spinosum. Množství 7-dehydrocholesterolu (kolem 25-50 mg/cm² kůže) dostupné ve stratum spinosum a stratum basale, postačuje za normálních okolností pokrýt potřebu tělním vitamínem D, a tudíž obsah melaninu nezmění množství vitamínu D, které může být vyprodukováno. Jedinci s vysokým obsahem melaninu v kůži jednoduše potřebují delší pobyt na slunci k produkci stejného množství vitamínu D než jedinci s nízkým obsahem melaninu [1].

Syntéza kalcitriolu

1. Prekurzor cholesterolu, 7-dehydrocholesterol, absorbuje v kůži ultrafialové záření B ($\lambda = 290-315 \text{ nm}$; redukce o 6 elektronů) a přechází fotolytickým rozkladem na formu provitaminu D3 [1,6,17].



2. Provitamin D3 je termodynamicky nestabilní a přesmykuje se svou dvojnou vazbou na svůj izomer - více stabilní vitamin D3 (cholecalciferol) [6].



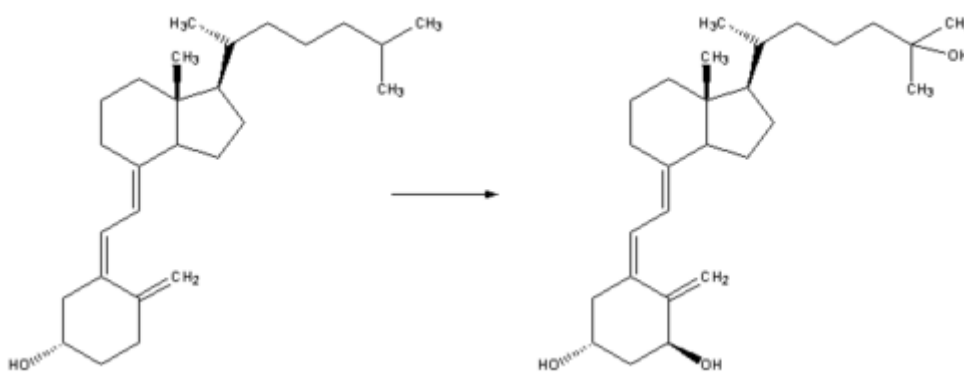
7.2 B) Suplementace

Vitamin D₃ je tvořen v kůži (viz. výše) nebo přijat potravou.

3. Cholecalciferol je vychytáván játry, kde je v endoplasmatickém retikulu hepatocytů hydroxylován enzymem 25-hydrolázou [1]. Reakce vyžaduje hořčík, NADPH, molekulární kyslík a dosud necharakterizovaný cytoplazmatický faktor [17]. Vzniklý produkt, 25-hydroxycholecalciferol je převažující formou vitamínu D v oběhu a také tvoří většinu jaterních zásob vitamínu [1]. Jeho plazmatická hladina je považována za ukazatel dostupnosti vitamínu D v organismu [6].

Poté co je 25(OH)D tvořen v játrech, vstupuje do oběhu a navázán na DBP putuje do ledvin, kde ho ledvinová 25(OH)D-1 α -hydroxyláza v renálních tubulech metabolizuje na dva dihydroxy-metabolity, hlavní biologicky aktivní hormon 1,25-

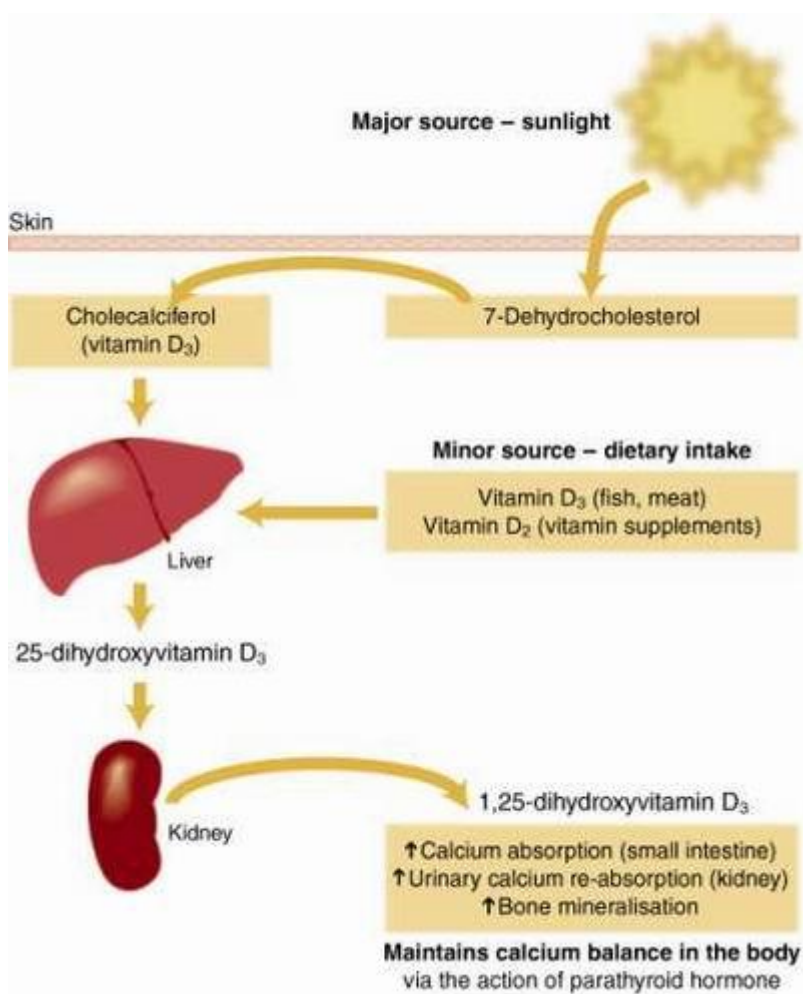
dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)₂D neboli kalcitriol) a 24R,25(OH)₂D₃. Tato konverze je přísně regulovaná [1,6]. Samozřejmě, že závažné onemocnění jater nebo ledvin povede k poklesu tvorby aktivního vitamínu D s následnou hypokalcémií [10]. 1,25(OH)₂D jako aktivní forma vitamínu D je odpovědná za většinu reakcí; působí na metabolismus vápníku a kostí, mobilizuje kmenové buňky z kostní dřeně a indukuje jejich vyzrání v osteoklasty [6]. Významná část 25-hydroxycholecalciferolu vstupuje do enterohepatálního oběhu, a proto narušení tohoto procesu může způsobit nedostatek vitamínu D [17].



(1)

Vitamín D → játra → 25(OH)D₃ → ledviny $\xrightarrow{\uparrow \text{PTH}}$ 1,25(OH)₂D₃ → cílové orgány

Obr. 5: Metabolismus vitamínu D [18]



7.3 Systémová regulace

Podobně je aktivován i vitamín D₂. Zatímco dominantním aktivátorem enzymu 1 α -hydroxylázy je parathormon (PTH), nejvýraznějšími inhibitory (do značné míry prostřednictvím PTH) jsou kalcium, fosfát a 1,25(OH)₂D₃. Poslední ze jmenovaných faktorů inhibuje 1 α -hydroxylázu natolik, že potlačí i trans-aktivaci parathormonem [11].

Syntetizovaný 1,25(OH)₂D vstupuje do cirkulace a putuje do různých tkání. Ve střevě interaguje se specifickými jadernými proteiny známé jako „vitamín D receptory“, které se postupně kombinují s receptorem X pro kyselinu retinovou (RXR) na formu heterodimerního komplexu. Tento komplex interaguje se specifickými segmenty na DNA známými jako „vitamín D-responsivní (citlivé) elementy“ (VDRE), které iniciují transkripci nových produktů genů [6].

Aktivní metabolit vitamínu D je především produkován ledvinami, ale může být syntetizován i v dalších normálních tkáních (lymfatické, v kůži, v placentě) i ve tkáních

patologických (tuberkulózní granulomy a sarkoidóza). Významným mechanismem modulujícím homeostázu vitamínu D je aktivace 24-hydroxylázy 1,25(OH)₂D₃. Tento enzym zvyšuje produkci 24,25(OH)₂D, jenž je spolu s 25,26(OH)₂D považován za degradační („neaktivní“) produkt hydroxylačního procesu. Funkce těchto dvou metabolitů není zcela jasná.

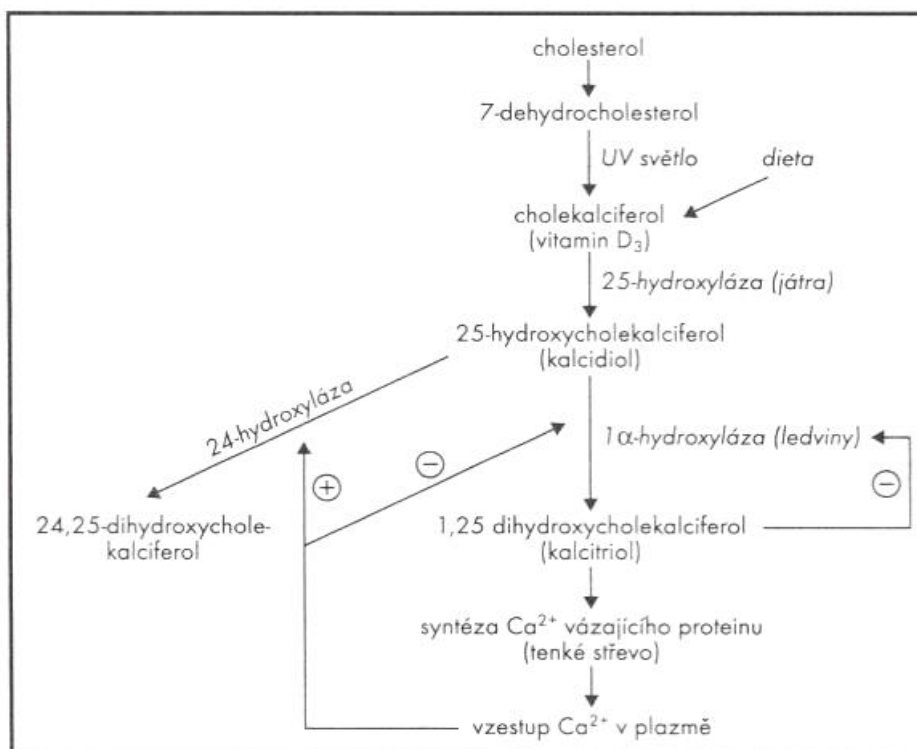
Metabolismus 25(OH)D₃ je poměrně pomalý a zpětnovazebná regulace jeho produkce méně těsná. Z těchto důvodů se hladina 25(OH)D₃ v séru zvyšuje úměrně s příjmem vitamínu D; je tak dobrým ukazatelem nutričního stavu organismu nezávisle na hladinách 1,25(OH)₂D₃.

Systémová regulace homeostázy vitamínu D je komplexní děj, kontrolovaný hlavními a vedlejšími mechanismy. Jedním z hlavních mechanismů, kromě autoregulace 1,25(OH)₂D₃, jsou sérové hladiny PTH, který zvyšuje koncentraci sekosteroidu v séru i tím, že zpomaluje jeho biodegradaci. Současně snižuje aktivitu 24-hydroxylázy, takže klesá podíl neaktivního metabolitu. Neméně významným mechanismem je i nepřímý stimulační vliv PTH zprostředkovaný poklesem koncentrace anorganického fosfátu.

Další z hlavních regulátorů hladin 1,25(OH)₂D₃ – kalcium – tlumí aktivitu 1 α -hydroxylázy přímo, ale i nepřímo prostřednictvím PTH (hypokalcémie zvyšuje sekreci PTH). Vzestup kalcémie produkci 1,25(OH)₂D₃ snižuje [11]. Hydroxylace v poloze 1 nastává při hypokalcémii, která aktivuje enzym 1 α -hydroxylázu. Je-li plazmatická koncentrace Ca²⁺ normální nebo dokonce zvýšená, probíhá v ledvinách alternativní metabolický pochod – hydroxylace na 24. uhlíku; vzniklý 24,25-dihydroxyderivát vitamínu D má výrazně menší biologickou účinnost. Vitamín D₂ je aktivován obdobným způsobem [9].

Mechanismus regulačního účinku fosfátu je nejasný. Je však známo, že pokles sérové hladiny fosfátu zvyšuje aktivitu 1 α -hydroxylázy. I když vliv fosfátu není závislý na PTH, je podstatně slabší v porovnání s účinkem PTH. Aktivita 1 α -hydroxylázy je mimo to modulována stavem acidobazické rovnováhy a koncentracemi některých hormonů (inzulín, somatotropin-IGF-I, prolaktin, kalcitonin a sexuální hormony) [11].

Obr. 6: Zpětná vazba v metabolismu vitamínu D



Metabolismus (aktivace) vitamínu D₃

+ = pozitivní, - = negativní zpětná vazba

7.3.1 Kontrolní (regulační) mechanismy vitamínu D

Vitamín D patří spolu s PTH a kalcitoninem k hlavním biologickým regulátorům kalciového a fosfátového metabolismu. Po vazbě na jaderný receptor cílových tkání 1,25(OH)₂D₃ přímo ovlivňuje transkripci genomu. Zatímco existence specifických vysokoafinitních receptorů pro 1,25(OH)₂D₃ byla jednoznačně prokázána, úloha receptorů pro 25(OH)D₃ a 24,25(OH)₂D₃ zůstává více méně nejasná. Je však známo, že afinita receptorů pro **oba tyto metabolity a tedy i fyziologické účinky těchto hormonů, je téměř stokrát nižší v porovnání s 1,25(OH)₂D₃.**

Převážná většina biologických účinků 1,25(OH)₂D₃ je zprostředkována receptory jadernými, jež jsou vysoce homologními proteiny, velmi blízkými receptorům pro steroidní a tyreoidální hormony a pro kyselinu retinovou. Tvorba a funkce receptorů pro 1,25(OH)₂D₃ může být proto stimulována i glukokortikoidy nebo estrogeny. Biologická odpověď na hormonální signál prostřednictvím jaderných receptorů je podstatně pomalejší – řádově během desítek minut, v porovnání s okamžitou odpovědí

zprostředkovanou membránovými receptory (během několika minut). Rychlý vzestup nitrobuňčného kalcia je po vazbě na membránové receptory navozen aktivací kalciových kanálů a také prostřednictvím guanosin monofosfátu nebo proteinkinázy C. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tímto způsobem zajišťuje krátkodobou i dlouhodobou regulaci homeostázy kalcia.

Receptory vitamínu D se nacházejí v klasických cílových tkáních, ve střevu, kosti, v ledvinách a v příštítných těliscích. Byly prokázány i v mnoha dalších tkáních, které homeostázu kalcia přímo neovlivňují, například v kůži, ve svalech, v pankreatu, reprodukčních orgánech, v hemopoetickém, imunitním a nervovém systému a v endokrinních tkáních [11].

7.4 Absorpce, transport a vylučování

Vitamín D a jeho hydroxylované metabolity jsou lipofilní látky málo rozpustné ve vodě. 60-90% kalciferolu z potravy je vstřebáno v tenkém střevě, převážně v jeho proximálním úseku. Absorpce je pozitivně ovlivněna žlučovými kyselinami, s nimiž vitamín D tvoří komplexy. Vitamín D je zprvu včleněn do chylomikronů a lymfatickým systémem přenášen do jater. Při potravě chudé na tuky nebo při jejich zhoršeném vstřebávání dochází i ke zpomalení vstřebávání vitamínu D. $25(\text{OH})\text{D}_3$ i ostatní metabolity podléhají enterohepatálnímu oběhu. Lipofilní molekuly vitamínu v plazmě jsou přenášeny k cílovým tkáním transportními bílkoviny. Nejdůležitější z nich jsou alfa-1-globulin a specifický protein vázající vitamín D – transkalciferin (DBP-vitamín D binding protein). DBP se vyznačuje vysokou afinitou zvláště pro $25(\text{OH})\text{D}_3$ a $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Naopak poměrně slabě váže $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, čímž se tento hormon stává biologicky málo dostupným. Systém vazebných bílkovin umožňuje cirkulaci aktivních metabolitů vitamínu D v krevním oběhu, přičemž přibližně polovina $25(\text{OH})\text{D}_3$ je vázána na DBP. Metabolity vitamínu D jsou ke tkáním přenášeny i albuminem a lipoproteiny, na něž se však váží s nižší afinitou. Nehydroxylované formy vitamínu D jsou ukládány v tukové tkáni.

DBP je syntetizován v játrech. Produkce proteinu je stimulována estrogeny (hormonální antikoncepce a těhotenství) a klesá při onemocnění jater, nefrotickém syndromu a malnutrici. Za fyziologického stavu je obsazeno méně než 5% celkového DBP. Koncentrace $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ je zvýšena v těhotenství nejen v důsledku vysokých hladin vazebných bílkovin, ale i proto, že je tento metabolit syntetizován v placentě konverzí prekursoru $25(\text{OH})\text{D}_3$, který prochází placentou [11].

7.5 Mechanismus působení (VDR)

Následně po konverzi je hormonálně aktivní forma vitamínu D uvolněna do cirkulace, vázána na přenašečové proteiny v plazmě a je transportována do různých cílových orgánů.

Aktivní vitamín D zprostředkovává svůj biologický efekt vazbou na receptor vitamínu D (VDR), který je lokalizován především v jádře cílové buňky. Vazba kalcitriolu na VDR dovolí VDR receptoru působit jako transkripční faktor, který upraví genovou expresi transportních proteinů (jako TRPV6 a kalbidinu), které jsou zapojeny do vstřebávání vápníku ve střevě [1].

Receptor vitamínu D patří k jaderným receptorům z rodiny steroidních receptorů. VDR jsou exprimovány buňkami mnoha orgánů zejména mozek, srdce, kůže, gonády, prostata, prsa, cévní hladký sval a endotel [1,22]. Aktivace VDR ve střevě, kostech, ledvinách a příštítných tělískách vede k udržování hladiny vápníku a fosforu v krvi (za asistence parathyroidních hormonů a kalcitoninu) a kostech.

VDR je znám svým působením na buněčnou proliferaci a diferenciaci. Vitamín D tedy podporuje imunitní systém a VDR jsou exprimovány několika bílými krvinkami především monocyty a aktivovanými T a B lymfocyty [1].

Receptor pro vitamín D (VDR) se nachází v jádře. Po vazbě nastává indukce genové odpovědi, která je dána typem buňky resp. tkáně. VDR byl popsán cca ve 30 typech buněk (ve všech shodný). Chybění kalcitriolu vede k „down“ regulaci VDR přinejmenším v některých buňkách/tkáních (a obráceně).

Při selhání ledvin dochází ke snížení „substrátu“ pro VDR a současně k poruše VDR. Může se jednat o poruchu kvantitativní (snížení počtu VDR) nebo kvalitativní (porucha vazby VDR na receptor, aj.).

Důsledky „neaktivace VDR“ při selhání ledvin:

pankreas - zhoršení uvolňování inzulínu po podání glukózy

imunitní systém - snížená fagocytóza, snížená aktivita polymorfonukleárů a makrofágů, snížený počet lymfocytů, snížení poměru $T_H/T_{supresor}$ lymfocytů, snížená aktivita NK buněk, zhoršená odpověď lymfocytů na mitogenní podnět

svaly - svalová slabost, elektrofyziologický defekt kontrakce/relaxace [4]

VDR a selhání ledvin:

Pokles funkce ledvin

snížení počtu VDR – dáno délkou trvání stimulačních faktorů

snížení afinity vitamínu D k receptoru VDR – akumulace „uremických toxinů“

Selhání ledvin interferuje s metabolismem VDR i na nitrobuněčné úrovni

kvalitativní i kvantitativní narušení afinity VDRE ke komplexu D/VDR

Dysfunkci VDR lze řešit farmakologickou dávkou přirozeného substrátu či nabídkou substrátu s cíleně změněnými vlastnostmi (analoga vitamínu D). Rozdíly v účinku mezi analogy a metabolity vitamínu D spočívají nikoliv ve vazbě na VDR, ale v dalších intracelulárních mechanizmech. Metabolity a analoga vitamínu D se liší v prostorovém uspořádání molekuly.

Snížení funkce ledvin = snížení kalcitriolu

zánik funkčního parenchymu ledvin

chybění prekursoru (hypovitaminóza D)

další snížení aktivity 1 α -hydroxylázy (například hyperfosfatémií; acidózou; aj.)

Hyperfosfatémie snižuje tvorbu kalcitriolu významněji, než by odpovídalo poklesu funkčního parenchymu ledvin.

FGF-23 („fibroblast-growth-factor 23“ neboli fosfatonin) zvyšuje fosfaturii, hladiny exponenciálně stoupají při příjmu fosforu, avšak současně snižuje aktivitu 1- α -hydroxylázy (na rozdíl od PTH).

VDR a příštítná tělíska

- 1) aktivace receptoru pro vitamín D snižuje transkripci genu pro parathormon (snížení jeho tvorby)
- 2) aktivita příštítných tělísek je regulovaná též hladinou kalcia (hypokalcémie zvyšuje sekreci PTH, hypokalcémie zvyšuje životnost vytvořeného genového transkriptu pro PTH tzn. také přispívá ke zvýšení PTH), hladinou fosforu a dalšími faktory (stabilita transkriptu je obecně při selhání ledvin zvýšena)
- 3) při selhání ledvin nastává vlivem výše uvedených stimulů hyperplazie tělísek

VDR a příštítná tělíska při selhání ledvin

- 1) hyperplazie příštítných tělísek při selhání ledvin je spojena s větším množstvím buněk obsahujících genetickou informaci pro PTH a výrazně zhoršenou možností tyto buňky ovlivnit
- 2) podstatou poruchy regulace příštítných tělísek při selhání ledvin je dysbalance regulujících faktorů (kalcitriol, hypokalcémie, hyperfosfatémie) a dysbalance receptorů (snížený počet či kvalita)

Funkce $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ v příštítných tělískách

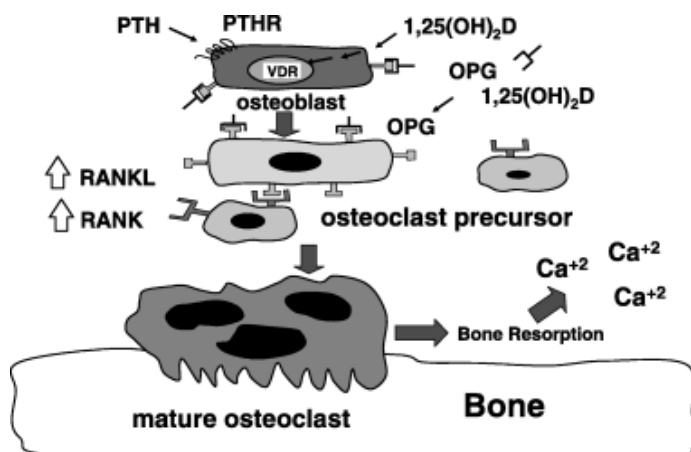
inhibuje transkripci genu pro PTH

inhibuje proliferaci (kmenových buněk)

zvyšuje počet VDR

zvyšuje počet receptorů pro vápník (CaR)

Obr. 7: VDR a kostní metabolismus



Deficit kalcitriolu narušuje souhru mezi osteoblasty a osteoklasty

Dysregulace OPG/RANK/RANKL = podíl na adynamické osteopatii

OPG (Ca^{2+} , Pi , H^+ , Al^{3+})

RANKL (IL-6, IL-11) cytokiny, membránové ligandy [4]

8 Hypovitaminóza a hypervitaminóza

8.1 Hypovitaminóza (hodnocení nedostatku vitamínu D v organismu)

Primární deficit způsobený nedostatkem kalciferolu při nevhodném životním stylu (výživa, nedostatečné vystavení slunečnímu záření, nejčastěji se vyskytuje u seniorů); *sekundární deficit* v důsledku snížené produkce $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ v ledvinách (snížená aktivita 1α -hydroxylázy a exprese megalinu v ledvinách); rezistence cílových tkání na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, částečně související s poklesem počtu receptorů (stárnutí, hypofosfatémická křivice vázaná na X-chromosom, křivice způsobená bodovou mutací genu pro vitamín D). Základním patogenetickým mechanismem při vzniku osteoporózy je druhotná hyperparatyreóza vznikající v důsledku deficitu vitamínu D a poklesu absorpce kalcia ve střevě. Deficit vitamínu D může ovlivňovat kostní metabolismus i nepřímo tím, že vede k omezení pohyblivosti v důsledku myopatie [11].

Deficit vitamínu D vede ke křivici u dětí a k osteomalacii u dospělých. Dochází přitom k defektu v mineralizaci kostní matrix. Objevují se bolesti kostí, psychické změny a deprese, neuromyopatie. Vzniká riziko kostních fraktur i po malém traumatu [10]. Změknutí kostí nastává v důsledku ztrát a nedostatečné resorpce vápníku a fosfátu [1]. Dochází k poklesu imunity. Vitamín D inhibuje proliferaci a indukuje apoptózu karcinomu prsu, prostaty a osteosarkomu. U nemocných s kolorektálním karcinomem byly zjištěny nízké hladiny $25(\text{OH})\text{D}_3$. Za nejspolehlivější marker stavu vitamínu D je považována plazmatická hladina $25(\text{OH})\text{D}_3$ za předpokladu normální funkce ledvin. Informaci o kalciovém metabolismu doplní sérové hodnoty kalcémie, alkalické fosfatázy a parathormonu [10].

Deficit vitamínu D může být způsoben nedostatečným příjmem spojeným s nedostatečnou sluneční expozicí, nedostatečná absorpce, problém v konverzi vitamínu D na aktivní metabolity, jaterní či ledvinné selhání výjimečně vrozená vada. Nedostatek vitamínu D může být spojen s mnoha formami rakoviny [1].

$25(\text{OH})\text{D}$ se běžně měří, avšak referenční meze jsou v jednotlivých laboratořích široké, protože jsou založeny na stanovení $25(\text{OH})\text{D}$ u dospělých zdravých jedinců jako jsou např. dárce krve, v různých zeměpisných šířkách bez dalších informací. Tyto referenční hodnoty lze charakterizovat jako „population based“. **Koncentrace $25(\text{OH})\text{D}$**

v séru nepodléhá homeostatické kontrole, ale závisí na životním stylu a prostředí. Je proto vhodnější definovat referenční hodnoty pro koncentraci 25(OH)D v séru na základě rozvoje negativních vlivů na zdraví tzv. „health based“ referenční hodnoty.

Je známo, že koncentrace 25(OH)D menší než 10ng/ml (25 nmol/l) je spojená s osteomalácií. Rozpětí 10-20 ng/ml (25-50 nmol/l) je spojená s rozvojem sekundární hyperparatyreózy, malabsorpcí vápníku, zvýšenou kostní remodelací, ztrátou kostní hmoty a rozvojem osteoporózy. „Health based“ referenční hodnoty jsou vyšší než „population based“ referenční hodnoty, jsou však vhodnější k definici nedostatku, resp. dostatečného množství vitamínu D. Další epidemiologické studie doložily vysokou prevalenci nízké koncentrace 25(OH)D v různých částech světa [2].

8.1.1 Klasifikace a diagnostika vitamín D deficitních stavů

Zatím neexistuje konsenzus, který by definoval optimální koncentraci 25(OH)D. Na základě vyhodnocení vícero studií, které sledovaly koncentraci 25(OH)D v součinnosti s patofyziologickými projevy nedostatku vitamínu D jako je osteomalácie, změny v koncentraci kalcitropních hormonů, snížení kostní denzity došlo k přehodnocení referenčních hodnot 25(OH)D směrem nahoru.

Mnozí autoři vyhrazují termín „deficit vitamínu D“ pro stavy těžkého nedostatku vitamínu D spojené s osteomalácií a termín „nedostatek vitamínu D“ pro stavy s mírným deficitem vitamínu D spojeným se sekundární hyperparatyreózou [2].

Tab. 3: Hodnocení podle Lipse

25(OH)D		vzestup PTH
do 5	tzn méně jak 12,5 nmol/l	víc jak 30%
5-10	12,5-25 nmol/l	15-30%
10-20	25-50 nmol/l	15%

Je obtížné určit přesné diagnostické hranice pro deficit, resp. dostatek vitamínu D. V případě, že se nastaví příliš vysoko, může docházet k neodůvodněné suplementaci, v opačném případě u mnohých pacientů dojde k nepříjemné ztrátě kostní hmoty. Jedním z včasných funkčních indikátorů může být koncentrace PTH. Hodnocení je jednoznačné, jestliže PTH vzroste nad referenční limit. Avšak vzestup koncentrace PTH v souvislosti s deficitem vitamínu D může být i v jeho referenčních rozmezech. V Bostonské studii se

zjistilo, že sezónním výkyvům v koncentraci PTH lze zabránit, je-li koncentrace 25(OH)D vyšší než 90 nmol/l, což vede k závěru, že koncentrace 25(OH)D by měla být vyšší než 90 nmol/l, aby se zabránilo rozvoji sekundární hyperparatyreózy. Podobně se zjistilo ve francouzské populaci, že k vzestupu PTH dochází, když je koncentrace 25(OH)D nižší než 78 nmol/l. V rozporu s těmito nálezy je však velká Amsterdamská studie, která našla významnou negativní korelaci mezi koncentrací PTH a 25(OH)D, pouze když koncentrace 25(OH)D poklesla pod 30 nmol/l. Na těchto rozdílech se mohou podílet různé sety na stanovení 25(OH)D. Dalším faktorem je relativně vysoký přívod vápníku v Holandsku, který může potlačovat koncentraci PTH a ovlivňovat koncentraci 25(OH)D, při které se vyvíjí sekundární hyperparatyreóza. Na podkladě mnohých studií se autoři přiklánějí k názoru, že koncentrace 25(OH)D by měla být vyšší než 70-80 nmol/l [2].

Potřebné množství vitamínu D₃ se vytvoří v kůži během 10-15 minut expozice slunečnímu záření 2x týdně (obličej, ruce, paže bez ochranného krému). Po delší expozici se dosáhne rovnováhy a vitamin se jednoduše degraduje tak rychle, jak se tvoří [1].

Neexistuje žádné doporučení pro příjem p.o. v EU, v USA je to 5-10 µg. Pro i.v. dávku formou ergokalciferolu je doporučováno 5 µg [10]. Syntéza působením slunečního záření by měla stačit na pokrytí až 80% denní potřeby, v závislosti na zeměpisné šířce a ročním období. V potravinách se cholekalciferol nachází v rybím tuku, játrech, vaječném žloutku a mléce. U rostlin je prekurzorem ergosterol, morfin a rostlinný vitamin D je pak ergokalciferol neboli vitamin D₂ [1].

8.1.2 Nemoci zapříčiněné deficitem

Nedostatek vitamínu D je známou příčinou několika kostních onemocnění zahrnujících:

Křivice neboli rachitis je porucha normální mineralizace a maturace růstových plotének epifýz v dětském věku, je pro ni charakteristický opožděný růst a deformity dlouhých kostí.

Ostomalacie, porucha kostní organické matrix a porucha ukládání minerálu do nově vytvořené kostní matrix, v jejímž důsledku nedochází k normální mineralizaci u dospělých osob, charakterizována proximální svalovou slabostí a křehkými kostmi.

Osteoporóza, stav charakterizovaný sníženou hustotou kostí vlivem nedostatečné mineralizace a zvýšenou křehkostí kostí [1,10].

Ztratí-li se podstatná část renálního parenchymu nebo je poškozena nemocí, snižuje se tvorba kalcitriolu a snižuje se resorpce vápníku. Když pak nastane hypokalcemie, zvyšuje se kompenzačně sekrece PTH, a ten působí na kost ve snaze zvýšit Ca^{2+} v extracelulární tekutině (ECT). Kombinace rozsáhlé přestavby kostí, strukturních změn a následných symptomů se označuje jako **renální osteodystrofie**. Včasná léčba vitamínem D tento proces zabrzdí [17].

Nedostatek vitamínu D může souviset se zvýšenou náchylností k některým chronickým onemocněním např. vysoký krevní tlak, tuberkulóza, rakovina, záněty periodontu (ozubice), roztroušená skleróza, chronická bolest, sezónní emocionální problémy a některé autoimunitní choroby (úloha v imunomodulaci) [1].

8.1.2.1 Skupiny s větším rizikem deficitu

Požadavky na vitamín D se zvyšují s věkem, zatímco schopnost kůže přeměnit 7-dehydrocholesterol na provitamín D_3 se snižuje. Navíc se s věkem snižuje i schopnost ledvin přeměnit kalcidiol na jeho aktivní formu, proto je nutné vyzývat starší jedince ke zvýšené suplementaci vitamínu D. Byl uzavřen konsenzus, že pro optimální prevenci osteoporotické fraktury by měla být koncentrace kalcidiolu v krvi vyšší než 30 ng/ml, která se rovná 75 nmol/l (Systém International units).

Americká asociace pediatrií radí suplementovat 200 UI/den (5 μg /den) vitamínu D od narození. Zdraví Kanady doporučuje 400 UI/den (10 μg /den). Zatímco vzorec pro kojence obecně je fortifikace vitamínem D, mateřské mléko neobsahuje dostatečné úrovně vitamínu D a rodičům se obvykle radí vyvarovat děti delší expozici slunečnímu záření. Proto děti, které jsou výhradně kojeny pravděpodobně potřebují doplnit vitamín D dále v raném dětství, obzvláště v severních zeměpisných šířkách. Vitamín D jako samotný nutrient nebo v kombinaci s dalšími vitamíny je dostupný ve vodných nebo olejových preparátech (dětské kapky). Děti mohou být bezpečně vystaveny slunci bez klobouku na krátké periody, stačí 10 minut, samozřejmě v závislosti na poloze a ročním období. Vitamín D nacházející se v doplňcích stravy a kojeneckých kapkách je hůře absorbován, než ten, který je produkován tělem přirozeně a navíc nese riziko předávkování (při slunění předávkování nehrozí).

Obézní lidé mohou snížit hodnoty forem vitamínu D v oběhu, pravděpodobně kvůli snížené bio-dostupnosti a jsou více ohroženi deficitem. Pro podporu krevní úrovně vápníku, se někdy podávají terapeutické dávky vitamínu D pacientům, kteří mají odstraněná příštítná tělíska (nejčastěji pacienti na dialýze, kteří mají terciární

hyperparathyroidismus, ale také pacienti s primárním hyperparathyroidismem) nebo s hypoparathyroidismem. Pacienti s jaterní insuficiencí nebo střevní malabsorpcí mohou také vyžadovat vyšší denní dávku (více než 40 000 UI nebo 1 mg).

Ochranné prostředky proti slunci (používané pro prevenci rakoviny) s ochranným faktorem (SPF) 8 inhibují více než 95% produkce vitamínu D v kůži. Dermatologové doporučují doplňování vitamínu D spolu s používáním opalovacích krémů, které chrání proti UV paprskům.

Snížená pigmentace lidí se světlou kůží dovoluje absorbovat více slunečního světla dokonce ve vyšší zeměpisné šířce, tím se snižuje riziko nedostatku vitamínu D. Ve vyšších zeměpisných šířkách nad 30° je v zimních měsících snížený úhel slunečních paprsků, kratší den, lidé nosí ochranný oděv během chladného počasí a tráví méně času venkovními aktivitami, tím se snižuje množství pohlceného světla a je snížena produkce vitamínu D. Protože melanin funguje jako blok pro sluneční paprsky, potřebují černoši k vytvoření vitamínu D delší expozici slunci a měli by se vyhýbat vyšším zeměpisným šířkám. V zeměpisných šířkách pod 30° nemůže být vyžadována suplementace vitamínem D [1].

8.1.3 Vitamín D u pacientů s onemocněním ledvin

Poruchy minerálního a kostního metabolismu jsou prvním projevem chronického onemocnění ledvin. Tyto poruchy vedou k bolestem v kostech, zvýšené incidenci fraktur a deformit kostí, myopatiím a svalovým bolestem a rupturám šlach. Procesy, které vyvolávají poruchy minerálního metabolismu začínají působit v časných stádiích chronického onemocnění ledvin a progredují až do chronického selhání ledvin.

U pacientů s chronickým onemocněním ledvin se téměř vždy vyvine sekundární hyperparatyreóza s postupnou hyperplázií příštítných tělísek. Tato porucha je vyvolána hypokalcémií, která se vyvíjí v průběhu onemocnění a/nebo deficitem 1,25(OH)₂D, který může přímo ovlivnit funkci příštítných tělísek. S progresivní ztrátou funkce ledvin klesá počet VDR a receptorů citlivých na vápník v příštítných tělískách, což vyvolává rezistenci příštítných tělísek na vitamín D a vápník. Navíc hyperfosfatémie přímo ovlivňuje funkci a růst příštítných tělísek, což ještě zhoršuje sekundární hyperparatyreózu. Hypokalcémií vyvolává retence fosfátů. Rezistence skeletu na kalcemický účinek PTH a porucha metabolismu vitamínu D [2].

8.1.3.1 Deficit vitamínu D u pacientů s chronickým onemocněním ledvin

Nedostatek vitamínu D se velmi často vyskytuje i u pacientů s onemocněním ledvin jak v období před dialýzou, tak i v průběhu dialyzační terapie. Renální onemocnění ovlivňuje stav vitamínu D vícero mechanismy:

nedostatek UV záření

rezistence kůže na sluneční záření a tím snížená syntéza vitamínu D

nízký přívod vitamínu D potravou

při výrazné proteinurii ztráta 25(OH)D a jiných metabolitů vitamínu D vázaných na DBP do moči

Při chronickém onemocnění ledvin neprobíhá v ledvinách dostatečná biotransformace 25(OH)D na 1,25(OH)₂D, proto se předpokládalo, že nezáleží na koncentraci 25(OH)D. Při urémii je však renální i extrarenální 1 α -hydroxyláza substrát dependentní a při dostatečné koncentraci 25(OH)D se může syntetizovat 1,25(OH)₂D přinejmenším lokálně, např. v kostech. Význam 25(OH)D dokládají i některá klinická pozorování. Dialyzovaní pacienti s nízkou koncentrací 25(OH)D měli závažnější kostní chorobu a koncentrace 25(OH)D korelovala s vysokou koncentrací intaktního PTH (iPTH). 25(OH)D má další účinky, které nejsou známé pro 1,25(OH)₂D jako např. vliv na obsah fosfátů ve svale a vliv na funkci svalů.

U pacientů s chronickým onemocněním ledvin se snižuje účinek metabolitů vitamínu D v důsledku více faktorů. Snižuje se exprese vitamín D receptorů hlavně v příštítných tělískách, když dojde k jejich nodulární transformaci a vyvíjí se rezistence na 1,25(OH)₂D na post-receptorové úrovni v důsledku čehož dochází k poruše genomických účinků kalcitriolu. Faktory, které se podílejí na vzniku rezistence nejsou zcela objasněné, předpokládá se účinek nízkomolekulárních látek, které se hromadí při urémii („uremické toxiny“). Vliv geneticky podmíněného polymorfizmu vitamín D receptorů při urémii není objasněný vůbec [2].

8.2 Hypervitaminóza

Zvýšené hodnoty 25(OH)D s hyperkalcémií jsou nacházeny při iatrogenní intoxikaci vitamínem D.

Vitamín D uložený v lidském těle jako kalcidiol (25(OH)D) má velké množství distribuce a dlouhý poločas rozpadu (kolem 20-29 dnů). Syntéza bioaktivního vitamínu D (hormonu) je přísně regulovaná a toxicita vitamínu D obvykle nastává pouze při nadměrných dávkách. Ačkoli běžné jídlo i pilulka obsahují příliš nízkou koncentraci vitamínu D, aby vyvolaly toxicitu dospělých, kvůli vysokému obsahu vitamínu A v rybím tuku je možné dosáhnout škodlivých hodnot vitamínu A, jestliže je přijat v několikanásobném množství normální dávky.

Většina případů předávkování vitamínem D se staly v důsledku výrobních či průmyslových nehod [11].

Dlouhodobé vystavování se slunci nezpůsobuje toxicitu vitamínu D. Po přibližně dvacetiminutové expozici ultrafialovému záření (v černošské populace je to 3-6x delší čas) dosáhne koncentrace prekurzorů vitamínu D produkovaných v kůži rovnováhy a jakýkoli další vyprodukovaný vitamín D je degradován.

Přesný časový interval bezpečné dávky není úplně znám, ale dávky do 60 µg/den (2 400 UI) jsou pro zdravého dospělého bezpečné. U dospělých může denní dávka 2 500 µg vyvolat toxicitu během několika málo měsíců. Pro kojence (do 12 měsíců) je nejvyšší tolerovaná dávka 25 µg/den (1 000 UI/den) a koncentrace vitamínu D 1 000 µg/den (4 000 UI/den), u dětí se toxicita ukázala během 1 až 4 měsíců. Ve Spojených státech byla nadměrná dávka hlášena u 284 jedinců v roce 2004, u jednoho vedla k úmrtí.

Sérová hladina kalcidiolu (25(OH)D) se využívá k diagnostice předávkování vitamínem D. U zdravých jedinců je normální hladina kalcidiolu mezi 25-40 ng/ml (60-100 nmol/l), ale tyto úrovně mohou být 15x vyšší v případě toxicity vitamínu D. Sérové hladiny bioaktivního D hormonu (1,25(OH)₂D) jsou obvykle normální i v případě nadměrné dávky.

Symptomy D toxicity (nebo hypervitaminózy D) jsou výsledkem hyperkalcémie (zvýšená hladina vápníku v krvi) způsobené zvýšenou absorpcí vápníku ve stěvě. Gastrointestinální symptomy toxicity vitamínu D se mohou vyvinout do anorexie, nucení na zvracení a zvracení. Tyto příznaky jsou často následované polyurií (nadměrná produkce moči), polydipsií (zvýšená žíznivost), slabostí, nervozitou, svěděním případně

selháním ledvin [1]. Jako další příznak se může vyskytnout dehydratace, někdy i hyperkalciurie s rizikem urolitiázy [10]. Další signály choroby ledvin zahrnující zvýšenou bílkovinu v moči a zvýšené odpadní látky v krevním řečišti.

Toxicita vitamínu D je ošetřena přerušáním jeho suplementace a omezením příjmu vápníku. Jedná-li se o akutní toxicitu, může se hladina krevního vápníku dále snižovat kortikosteroidy a difosforečnany. V některých případech ale může být poškození ledvin nevratné.

Ve vysokých dávkách vitamín D naopak metabolismus vápníku a fosforu narušuje, vede k hyperkalcémii a může skončit i smrtí. Samotné sluneční záření kvůli regulačním mechanismům syntézy nikdy nevede k hypervitaminose [1].

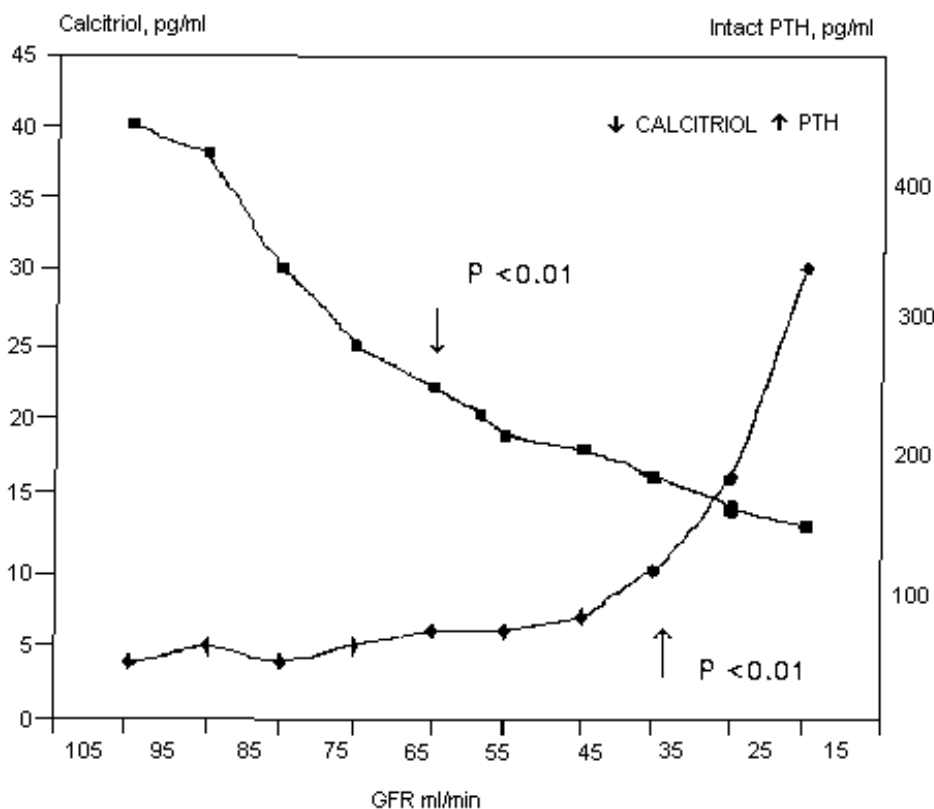
9 Fyzikálně-chemické a farmakologické vlastnosti

9.1 Porucha kalciofosfátového metabolismu

Porucha kalciofosfátového metabolismu se vyskytuje u všech pacientů se sníženou funkcí ledvin. Její klinický obraz je různý – od zcela asymptomatického až po těžké poškození skeletu a dalších orgánů. Klasickou formou renální osteopatie představuje sekundární hyperparatyreóza, avšak stále se setkáváme s tzv. adynamickou osteopatií, kdy je sekrece příštítných tělísek potlačena až utlumena. Obě formy (hyperparatyreóza i hypoparatyreóza) jsou predispozicí pro mimokostní kalcifikace, včetně cévních a chlopenních a mohou přispívat k vysoké kardiovaskulární mortalitě dialyzovaných pacientů. Nově se tedy přístup k úpravě kalciofosfátového metabolismu nehodnotí jen ve vztahu k metabolismu skeletu, ale k celému organismu, zejména kardiovaskulárnímu systému. S patogenezí osteopatie je úzce spojen metabolismus vitamínu D.

Již při poklesu ledvinné clearance pod 1 ml/sek. se významně snižuje aktivita 1α -hydroxylázy a klesá sérová koncentrace kalcitriolu ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$). Je to především důsledkem úbytku vlastního funkčního renálního parenchymu a inhibičního vlivu fosfátů na tento enzym (retence fosfátů při snížené funkci ledvin). Aktivitu 1α -hydroxylázy dále snižuje hyperkalcémie, samotný kalcitriol mechanismem negativní zpětné vazby, metabolická acidóza a naopak ji zvyšuje parathormon (PTH), inzulín, růstový hormon, estrogeny, prolaktin, hypofosfatémie a hypokalcémie. Tyto vlivy jsou však kvantitativně méně významné [5].

Obr. 8: Martinez 1996, Llach 1998: Vztah koncentrací kalcitriolu a PTH ke stupni snížení funkce ledvin [7]



Ke snížení hladin kalcitriolu u pacientů s renální insuficiencí může přispívat také nedostatek jeho prekurzorů.

Nedostatek kalcitriolu stimuluje přímo i nepřímo sekreci parathormonu. Abychom zabránili rozvoji sekundární hyperparatyreózy, je třeba udržet nejen normokalcémii a normofosfatémii, ale i fyziologickou koncentraci kalcitriolu v séru.

Kalcitriol má v organismu řadu dalších účinků. Jeho deficit negativně ovlivňuje například imunitní funkce (spolupodílí se na poruše fagocytózy u dialyzovaných pacientů), dále pankreas, reprodukční orgány, kosterní a srdeční sval a jiné včetně krvetvorby.

Přesto, že je kalcitriol iniciačním faktorem v patogenezi renální osteopatie a významně ovlivňuje stupeň hyperparatyreózy, hladiny kalcia a fosfátu, navíc je potenciální přímou součástí terapie, není jeho hladina běžně u pacientů s renálním postižením stanovována a o tom, zda a jak podávat kalcitriol (nebo jiné metabolity vitamínu D), se orientujeme jen nepřímo (podle koncentrací kalcia, fosfátu a PTH) [5].

Kalcitriol per os zvyšuje fagocytární a kandidacidní aktivitu polymorfonukleárních buněk [4].

Nedostatek nativního metabolitu vitamínu D stav kalciofosfátového metabolismu při poruše ledvin nadále zhoršuje [5].

Vyšetření koncentrací metabolitů vitamínu D (kalcitriolu a kalcidiolu) představuje u pacientů se sníženou funkcí ledvin významný přínos pro včasnou úpravu hladin parametrů kostního metabolismu. Tato vyšetření tedy mohou přispět k prevenci pozdních pokročilých forem renální osteopatie [7].

9.2 Vitamín D a hormonální systém

Syntéza vitamínu D v kůži je u lidí jeho hlavním zdrojem. Cholekalciferol (vitamín D₃) je forma vitamínu D, která vzniká z prekursoru 7-dehydrocholesterolu nacházejícího se v kůži. Protože organismus je schopný produkovat cholesterol, nesplní klasická kritéria pro vitamín, tedy látku, kterou organismus potřebuje, ale neumí ji sám syntetizovat. Přesnější je tedy zařazení vitamínu D mezi prohormony.

Koncentrace 25(OH)D v plazmě podhodnocuje celkové množství vytvořeného 25(OH)D, nakolik se v různém množství ukládá do tkání. Koncentrace v kosterním svalstvu může být vyšší než v plazmě. Hlavní tkání, kde se 25(OH)D ukládá je tuk. Tkáně, ve kterých se 25(OH)D uskládá, představují kvantitativně významnější mechanismus ochrany před toxicitou vitamínu D než kterákoli regulace aktivity 25-hydroxylázy.

Všeobecně se akceptovalo, že vitamín D za fyziologických koncentrací nepůsobí přímo na cílové tkáně, ale musí se dále metabolizovat. V ledvinách se proto 25(OH)D hydroxyluje v pozici 1,24 nebo 26 za vzniku 1,25(OH)₂D, 24,25(OH)₂D nebo 25,26(OH)₂D. Není známo, kolik 25(OH)D se přemění na hydroxylované deriváty, ale nepřímá sledování ukazují, že je to méně než 30%. Nejvýznamnějším metabolitem je 1,25(OH)₂D (kalcitriol), který se pro svoje účinky na metabolismus minerálů považuje za hormon. V ledvinách se neukládá, ale uvolňuje se hned do krevního řečiště. Množství vytvořeného 1,25(OH)₂D je výsledkem úzké metabolické regulace 1 α -hydroxylázy. Syntéza se zvyšuje při nízké koncentraci vápníku, fosforu, vlastního 1,25(OH)₂D a vysoké koncentraci PTH. Syntézu 1,25(OH)₂D však mohou stimulovat i jiné hormony jako např. prolaktin, estrogeny, inzulin a růstový hormon zejména v období růstu,

gravidity, laktace. Produkce $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ klesá s věkem, při nadměrném přívodu fosfátů, zvýšené koncentraci kyseliny močové, xantinu a teofylinu.

U lidí je koncentrace $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ v plazmě 1000x nižší než koncentrace $25(\text{OH})\text{D}$. $25(\text{OH})\text{D}$ i $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ cirkulují v plazmě vázané na ten samý vitamín D vázající protein (DBP), vazba $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ je však slabší. Po uvolnění z vazby se $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ váže s vysokou afinitou intracelulárně na specifický vitamín D receptor (VDR). Komplex VDR- $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ přechází konformační změnou a tvoří heterodimer s druhým proteinem, retinoid X receptorem. Tento se váže na část DNA cílového genu – vitamín D response elements (VDRE). Vazba na VDRE má za následek indukci nebo represi specifické mRNA a následné zvýšení syntézy (up regulace) nebo snížení syntézy (down regulace) bílkovin zodpovědných za biologický účinek. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ stimuluje expresi genů kódujících lidský osteoponin, lidský osteokalcin a inhibuje expresi genu PTH.

Všeobecně se předpokládalo, že nejvýznamnější účinky $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ jsou zprostředkované vazbou na nukleární receptor. Studie však ukázaly, že $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ vyvolává účinky i na celulární a subcelulární úrovni. Tyto účinky jsou vyvolané vazbou $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ na membránový vitamín D receptor (mVDR), přičemž nedochází k transkripci genů ale syntéze proteinů. Vazbou na mVDR dochází k vzestupu intracelulárního Ca^{2+} . Kromě aktivace Ca^{2+} kanálů dochází také k hydrolýze membránových lipidů, tvoří se „second messengery“, které vyvolávají další uvolnění Ca^{2+} z intracelulárních zásob, především z endoplazmatického retikula. Dochází též k aktivaci některých membránových a cytoplazmatických enzymů, např. proteinkinázy C. Mimo $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se na některých negenomických účincích podílí také $24,25(\text{OH})_2\text{D}$.

Další experimenty ukázaly, že je potřebná souhra obou metabolitů stejně jako jejich dostatečné množství, aby se udržela normální rychlost novotvorby kostí a dostatečná mineralizace. Děje probíhající mezi rychlým membránovým účinkem představují významný aspekt účinku $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Podobné membránové účinky byly pozorované i u jiných steroidních hormonů [2].

9.3 Role v imunomodulaci

Hormonálně aktivní forma vitamínu D zprostředkovává imunologické efekty vazbou na jaderné (VDR) receptory, které jsou přítomné ve většině imunitních buněk. VDR je exprimován monocyty a aktivovanými makrofágy, dendritickými buňkami, T a B lymfocyty a NK buňkami. Ve shodě s tímto poznatkem má aktivace VDR silný antiproliferativní a imunomodulační účinek (zvýšení i imunosuprese).

Účinky VDR-ligandů jako hormonu D na T-lymfocytech zahrnuje potlačení aktivace T buněk a přerušení jejich regulační aktivity stejně jako účinky na sekreci cytokinů. Ukázalo se také, že VDR ligandy působí na zrání, diferenciaci a migraci dendritických buněk a inhibují DC-dependentní T buněčnou aktivaci, což má za následek celkový stav imunosuprese.

VDR-ligandy zvyšují aktivitu NK buněk a zvyšují fagocytární aktivitu makrofágů. Aktivní vitamín D (hormon) rovněž zvyšuje produkci cathelicidinu, antimikrobiálního peptidu, který je produkován makrofágy po aktivaci bakteriemi, viry či houbami. Deficit vitamínu D inklinuje k vyššímu riziku infekce např. chřipkou, tuberkulózou. Ve studii z roku 1997 se ukázalo, že etiopské děti s křivicí byly 13x více ohroženy zápallem plic než děti bez rachitis.

Tyto imunoregulační vlastnosti ukazují, že ligandy s potenciálem aktivace VDR včetně suplementace kalcitriolem (tak jako řada syntetických modulátorů) mohou mít terapeutické využití v ošetrovatelství; zánětlivé nemoci (revmatoidní artritida, psoriatická artritida), kožních poměrech (psoriáza, radiační keratózy), osteoporóze, rakovině (prostata, tlustého střeva, prsu, myelodysplázie, leukémie, spinocelulární karcinomy hlavy a krku a bazocelulární karcinom) a autoimunitních chorob (systémový lupus erythematoses, diabetes I. Typu, sklerosis multiplex) a v prevenci rejekce transplantovaného orgánu. Efekt doplňování vitamínu D zůstává dosud nejasný, suplementaci nelze doporučit jedincům s benigním lymfogranulomem (sarkoidózou) a jinými nemocemi včetně přecitlivělosti na vitamín D.

2006 studie publikovaná v Časopise americké lékařské asociace ohlásila důkaz o souvislosti mezi deficitem vitamínu D a začínající multiplex sklerosis, autoři předpokládají, že to je kvůli vlastnosti vitamínu D potlačit imunitní odpověď [1].

9.4 Role v prevenci rakoviny

Hormon D (kalcitriol) byl nalezen u navození smrti rakovinných buněk *in vitro* a *in vivo*. Ačkoli není protirakovinná aktivita vitamínu D plně vysvětlena, zvažují se efekty zprostředkované receptory vitamínu D exprimované rakovinnými buňkami, to může souviset s jeho imunomodulační schopností. Protirakovinná aktivita vitamínu D se pozorovala v laboratoři na výzvu některých návrhů, že suplementace vitamínem D by mohla být prospěšná v léčbě nebo prevenci některých typů rakoviny.

V roce 2005 zveřejnili vědci studii, která ukázala na prospěšnou korelaci mezi příjmem vitamínu D a prevencí rakoviny. Výsledky z meta-analýzy 63. publikací informují, že příjem dalších 1 000 UI (mezinárodní jednotky odpovídající 25 µg) vitamínu D denně redukuje riziko rakoviny tlustého střeva o 50% a riziko rakoviny prsu a vaječníků o 30%. Průzkum také ukázal pozitivní účinek vysokých hodnot kalcitriolu u pacientů s pokročilou rakovinou prostaty. Studie (publikovaná v dubnu 2007) zahrnující 1 200 žen podává zprávu, že suplementace vitamínem D měla za následek 60% snížení výskytu rakoviny během čtyřletého klinického pokusu.

Výzkum také navrhl, že pacienti s rakovinou, kteří absolvují operaci nebo léčbu v létě - a proto tedy získají více vitamínu D- mají větší šanci na přežití než ti, kteří podstoupí léčbu v zimě, kdy jsou méně vystaveni slunečnímu světlu [1].

9.5 Vitamín D a kardiovaskulární systém

Pacienti s chronickým onemocněním ledvin (CKD) mají vysoké riziko vzniku kardiovaskulárních chorob. Deficit vitamínu D je přítomen dokonce v raných stádiích CKD. Vzhledem k nedávným výzkumným studiím se ukazuje asociace terapie vitamínu D a přežití u hemodialyzovaných pacientů.

Následující tři potenciální mechanismy mohou být důležité pro ochranné efekty vitamínu D proti úmrtnosti na kardiovaskulární choroby:

- 1) vitamin D může inhibovat různé působky zánětu (zánět je klíčem v patogenním mechanismu u aterosklerózy);
- 2) vitamin D má antiproliferativní efekt na hypertrofovanou buňku myokardu, která tvoří základ patogeneze způsobující městnavé selhání srdce;
- 3) vitamin D vystupuje jako záporný endokrinní regulátor pro renin-angiotenzinový systém, který hraje důležitou nezávislou roli v hypertenzi.

Článek podporuje možnou ochrannou funkci vitamínu D mimo jeho účinek na metabolismus minerálů. Při velmi vysoké hladině vitamínu D totiž může docházet ke kalcifikaci cév [21]. Nedostatek vitamínu D je spojen s incidencí kardiovaskulární choroby. Další klinické a experimentální studie by mohly určit, zda úprava deficitu vitamínu D může přispět k jejich prevenci [22].

9.6 Vitamín D a kostní metabolismus

9.6.1 Kalcitriol stimuluje střevní resorpci vápníku a fosfátu

Kalcitriol je jediným hormonem, který je schopen zesilovat translokaci vápníku proti koncentračnímu spádu, existujícímu napříč membránou střevních buněk. Jelikož je produkce kalcitriolu přísně regulována, je tím dán jemný mechanismus kontroly Ca^{2+} v ECT i při velkých výkyvech v obsahu vápníku v potravě. Tím se zajišťuje vhodná koncentrace vápníku a fosfátu v potravě pro deposici – jako hydroxyapatitové krystaly – na kolagenních fibrilách kosti. Při deficitu vitamínu D se novotvorba kosti zpomaluje a je též porušena kostní remodelace. Tyto procesy jsou primárně regulovány účinkem PTH na kostní buňky, je však zapotřebí také malých kvant kalcitriolu. Kalcitriol též zvyšuje účinek PTH na renální reabsorpci vápníku [17].

9.6.2 Vitamín D při léčbě kostních onemocnění

Při substituční léčbě deficitu vitamínu D je třeba vycházet ze znalosti patogeneze poruchy u daného jedince. Primární deficit většinou dobře odpovídá na podávání kalciferolu. Obvyklý fyziologický denní příjem tohoto prehormonu je 500 j. Při prokázaném deficitu vitamínu se substituční dávka pohybuje kolem 1 000 j. (ekvivalentní dávka $25(\text{OH})\text{D}_3$ je 15 mg). Předpokladem biologické odpovědi na kalciferol je intaktní osa paratyreoidea-ledvina, normální funkce jater a nižší věk. Jednoznačnou indikací substituce je křivice a osteomalacie, kde se doporučují dávky kolem 5 000 j. kalciferolu denně. Tento prehormon však může mít pozitivní vliv na pozdější vývoj kostní masy i u dětí bez průkazného deficitu vitamínu D. Bylo zjištěno, že kostní masa prepubertálních dívek, jimž byl v raném dětství podáván cholekalciferol v denní dávce 400 j., byla významně vyšší v porovnání s dívkami nesubstituovanými.

V případech porušeného metabolismu nebo při rezistenci na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, k nimž dochází u involuční osteoporózy, lze deficit korigovat pouze velmi vysokými dávkami kalciferolu (20-50 000 j. denně). Tento postup je však vzhledem ke kumulaci vitamínu

spojen s vysokým rizikem toxicity. Na druhé straně je známo, že substituce kalciferolem zvyšuje hladiny $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pouze při velmi nízkých hladinách $25(\text{OH})\text{D}_3$. Vitamín D a zvláště jeho metabolity mohou příznivě ovlivnit i některé myopatie, zlepšit toleranci glukózy a stav imunity.

Léčba aktivními metabolity vitamínu D nese v porovnání s kalciferolem podstatně nižší riziko hyperkalcémie a hyperkalciurie. Hyperkalcemický účinek $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ byl experimentálně tlumen současným podáváním $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Tato kombinovaná léčba dostatečně tlumila hyperparatyreózu, zvyšovala proliferaci osteoblastů a mineralizační aktivitu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [11].

Tab. 4: Snížené hodnoty $25(\text{OH})\text{D}$ [11]

Mechanismus deplece	Příčina (indikace k měření $25(\text{OH})\text{D}$)
Nízká nabídka	Dietní karence, nedostatek UV záření
Nízká absorpce	Malabsorpce, cholestáza
Snížená hydroxylace	Chronické hepatocelulární léze
Renální ztráty	Nefrotický syndrom – ztráta komplexu vitamínu D a vazebného proteinu
Iatrogenní	Antikonvulziva

10 Možnosti stanovení vitamínu D

Hladina vitamínu D v krvi v jakémkoli čase je závislá na posledním příjmu v potravě, stejně jako na kumulativní expozici slunečnímu záření. Následkem toho má stanovení vitamínu D₂ nebo D₃ malý význam v hodnocení postavení vitamínu D u jednotlivce. Nicméně, vzorky séra s vitamínem D jsou použitelné pro určení kapacity lidské kůže, producenta vitamínu D, jako odpověď na sluneční záření nebo umělé UV záření. Tyto vzorky jsou také významné pro stanovení biologické dostupnosti vitamínu D přijatého ústy. Po jednoduché orální dávce 50 000 UI vitamínu D₂, zvýší se značně koncentrace vitamínu D₂ v cirkulaci během prvních 12-24 hodin ze základní hladiny 0-5 ng/ml na 50-100 ng/ml. Tento vitamín D absorpční test je velmi cenný klinický nástroj pro určení, zda pacient trpící střevním malabsorpčním syndromem může vstřebávat vitamín D.

Hlavní strategie pro stanovení koncentrace vitamínu D v séru je purifikace vitamínu D₂ a vitamínu D₃ ze séra na stupeň, který dovolí jeho přímé stanovení na UV detektoru na HPLC nebo využití vitamín D-vázající proteiny. Protože je vitamín D rozpustný v tucích, musí být ze séra extrahován organickým rozpouštědlem jako je hexan, ethylether, methylenchlorid nebo ethylacetát. Detekuje se při vlnových délkách 254 nebo 265 nm, což dovolí kvantifikovat obsah vitamínu D₂ a vitamínu D₃ [6].

10.1 Imunochemické techniky

Pro stanovení metabolitů vitamínu D v biologických vzorcích je popisována řada kompetitivních imunochemických radioligandových metod. Klíčovou roli v těchto postupech sehrává vitamín D vázající protein z krve nebo specifický receptor tkáně. Jsou používány ovčí nebo králičí protilátky. Tradiční TLC postupy čištění vzorku před analýzou jsou nahrazovány SPE čištěním na kolonkách. Postupy stanovení 25(OH)D (kalcidiolu) a 1,25(OH)₂D₃ (kalcitriolu) v lidských vzorcích plazmy jsou v současnosti prováděny diagnostickými soupravami na principu kompetitivních protein-vázajících imunostanovení s nebo bez předchozího SPE čištění. Aplikace imunoanalytického postupu směřuje k využití na automatických imunoanalyzátoch (v současné době dostupný analyt 25(OH)D). Třebaže jsou trvale diskutovány otázky přesnosti stanovení a možných interferencí, jsou tyto soupravy klinicky použitelné a dostatečně citlivé [11]. Ke

komplexnímu posouzení klinického stavu pacienta se metody radioimunoanalýzy doplňují vyšetřením Ca, P a alkalické fosfatázy v séru [10].

10.1.1 RIA

Používá se značení ^{125}I , což je γ -zářič, tedy zdroj tvrdého záření. Při radioimunoanalýze se značí antigen, který se přidává do reakce a soutěží se stanovovaným antigenem o omezený počet míst na protilátce. Pro měření γ -záření se používají vícekanálové γ -měřiče, schopné analyzovat současně více vzorků. Radioaktivita se měří jako počet impulsů za minutu. Detektor je umístěn v olověném stínítku [10].

Princip metodiky

DiaSorin 25(OH)D stanovení je založeno na dvoukrokové metodě. První krok se skládá z rychlé extrakce 25(OH)D a dalších hydroxylovaných metabolitů ze séra nebo plasmy acetonitrem. Následující extrakce, je poté provedena za použití rovnovážného RIA postupu. RIA metoda je založena na protilátce se specifitou k 25(OH)D. Vzorek, protilátka a tracer (značkovač) jsou inkubovány 90 minut při 20-25°C. Separace fází je dosažena po 20 minutách inkubace v 20-25°C s druhým precipitačním komplexem. NSB/přídavný pufr je přidán po této inkubaci před centrifugací k podpoře redukce nespecifické vazby. Citlivost je $\leq 1,5$ pg/ml.

Referenční rozmezí

Je důležité, aby si každá laboratoř stanovila vlastní referenční rozmezí normálních hodnot. Faktory jako UV záření, sezóna, rasa a vliv výživy jsou známé faktory ovlivňující hladinu 25(OH)D v lidském organismu. Pokles hladiny vitamínu D s věkem byl prezentován v literatuře, i když výzkum spojený s těmito vyšetřeními byl provázen z velké většiny v zemích severní Evropy, kde je méně slunečního záření a méně bohaté stravy. Tento fakt spolu s vysoce variabilními rozdíly ve zdravotních kritériích a statutu léčby ztěžuje možnost generalizovat pouhý efekt věku na hladinu D vitamínu.

Bylo zjištěno, že antikonvulsiva způsobují pokles hladiny 25(OH)D při dlouhodobém použití z důvodu použití látek s obsahem p-aminobenzoové kyseliny. Pediatrické rozmezí hodnot nebylo při použití kitu DiaSorin stanoveno [8].

10.2 Enzymové metody

Enzymové metody se uplatňují hlavně při stanovení aktuálního stavu saturace organismu vitamíny, tyto postupy využívají funkce koenzymů. Aktivita vitamín-dependentního enzymu je interpretována jako stav vitamínu v organismu. Obvykle se stanovuje aktivita enzymu s a bez aktivace přidavkem koenzymu. Aktivita je sledována měřením změn koncentrace substrátů nebo produktů reakcí. Řada těchto metod se provádí z plné krve nebo v erythrocytech, mohou být aplikovány na automatických analyzátoch. Nevýhodou je komplikovaná standardizace, nestabilita enzymů během skladování a interferencí [11].

10.3 Chemické metody

Přímé UV-VIS spektrofotometrické stanovení vitamínu D je limitováno koncentrací a čistotou vzorku, který nesmí obsahovat další vitamíny rozpustné v tucích. V jedné ze starších fotometrických metod je hodnocena absorbance (500 nm) barevného produktu reakce mezi vitamínem D a chloridem antimonitým. Při této reakci interferuje především přítomnost vitamínu A. Alternativní fotometrické postupy využívaly trifluoroctovou nebo trichloroctovou kyselinu jako dehydratační činidlo.

Fotometrické a fluorimetrické (barevné reakce s chloridem antimonitým nebo s trifluoroctovou kyselinou) nejsou dostatečně citlivé a specifické [11].

10.4 Chromatografické metody

10.4.1 TLC

TLC nebo její vysokoúčinná varianta HPTLC, mohou být použity jako levnější alternativa kapalinové chromatografie zejména pro fázi čištění a předseparaci extraktů vzorků před další chromatografickou nebo ligandovou analýzou metabolitů vitamínu D v biologických materiálech. Použití TLC pro přípravu vzorků je postupně nahrazováno LC s použitím SPE kolonek [11].

10.4.2 GC

Stanovení vitamínu D a jeho metabolitů je provázeno řadou nepříjemných fenoménů (adsorpce kolonou, dehydratace 25-hydroxy derivátů, tepelná degradace apod.), preventivním řešením bývá derivatizace využívající acylchloridy nebo acylanhydridy. Úspěšné je zejména spojení GC s hmotnostní detekcí [11].

10.4.3 LC, HPLC

Separace metabolitů vitamínu D podle počtu a pozic hydroxylových skupin v molekule je prováděna kapalinovou chromatografií na normálních nebo polárně vázaných fázích (nitro-, kyano-) obvykle s binárními mobilními fázemi směsi hexanu a 2-propanolu, v dokonalejších aplikacích se objevují ternární systémy mobilních fází s dichlormethanem jako třetí složkou. Reverzní stacionární fáze s mobilními fázemi obsahujícími vodu-methanol nebo vodu-acetonitril jsou pro separaci obou vitamínu a jejich 25-hydroxyvitamínu úspěšnější, ale za cenu nižší selektivity pro separaci dihydroxylovaných metabolitů. Detekce je obvykle UV v oblasti absorpčního maxima 265 nm. Některé metabolity v plazmě jsou v poslední době úspěšně kvantifikovány prostřednictvím LC-termospray MS.

Tab. 5: Příklady separačních podmínek pro stanovení vitamínu [11]

Analyt – vitamín D	Metoda, materiál	Příprava vzorku, kolona, MF	Detekce
D ₂ , D ₃ , 25(OH)D ₂ , 25(OH)D ₃	GC Plasma	Deproteinace acetonitrilem, SPE: C ₁₈ silica; 2% OV-1; He	MS
1,25(OH) ₂ D ₃	GC Plazma	Deproteinace chloroform- metanol, Sephadex LH-20; 1,5% SE-30; He	MS
25(OH)D ₂ , 25(OH)D ₃	LC Sérum	Deproteinace ACN, SPE: C ₁₈ silica; Zorbax Sil, 10 µm; hexan-2-propanol (98:2)	UV 254 nm
D ₂ , D ₃	LC Sérum	Deproteinace metanolem, extrakce hexanem; ultrasil ODS, 10 µm; metanol	UV 264 nm
25(OH)D ₃	RIA Plazma	Deproteinace acetonitrilem; Nucleosil-10-NO ₂ , 10 µm; gradient hexan: hexan-2- propanol-voda (28:12:0,42)	Kompetitivní reakce
1,25(OH) ₂ D ₃	RIA Plazma	Extrakce benzenem; RSIL- silica, 5 µm; hexan-2-propanol (9:1)	Kompetitivní reakce nebo RIA
25(OH)D ₃ , 1,25(OH) ₂ D ₃ , 24,25(OH) ₂ D ₃	RIA Plazma	Deproteinace metanol-HCl, SPE C ₁₈	Kompetitivní reakce
1,25(OH) ₂ D ₃	RIA Sérum	Saponifikace, extrakce dichlormetanem	Kompetitivní reakce

11 Klinické využití analýzy vitamínu D a jeho metabolitů

Ačkoli je velmi obtížné měřit vitamín D₂ a vitamín D₃ v oběhu, přímé měření těchto vitamínů má velký význam pro klinický výzkum, zvláště týkající se role slunečního světla a umělého osvětlení v produkci vitamínu D₃ kůží. Měření vitamínu D v cirkulaci má malý význam pro určení celkového stavu vitamínu D u jednotlivce. Důvodem toho je, že jednou přijatý nebo kůží vyprodukovaný vitamín D je buď rychle uložen v tukové tkáni nebo se metabolizuje na 25(OH)D. Následkem toho koncentrace vitamínu D v cirkulaci u zdravého jedince může znamenat nedetekovatelnou hladinu dosahující 100 ng/ml. Stanovení vitamínu D bylo také hodnoceno pro určení dostupnosti, zvláště u pacientů se střevním malabsorpčním syndromem [6].

U většiny savců, včetně člověka, zvyšuje účinněji hladinu vitamínu D v cirkulaci D₃ než D₂. Ovšem u některých druhů, jako jsou např. krysy je účinnější formou D₂. Oba vitamíny D₂ i D₃ se používají k suplementaci potravy a k farmaceutickým účelům včetně kalcitriolu (1,25(OH)₂D), doxerkalciferolu a kalcipotrienu [1].

11.1 25(OH)D

Schopnost změřit 25(OH)D nabídla poprvé klinikům možnost určit stav vitamínu D u jejich pacientů. Měřený 25(OH)D je součet dietního příjmu vitamínu D a vystavení slunečnímu světlu. Má také výhodu dlouhého poločasu v oběhu, přibližně 2 až 3 týdny. Analýza 25(OH)D je důležitá ve vyhodnocení nedostatku resp. dostatečného množství vitamínu D jak ukazuje tabulka 6. Normální koncentrace 25(OH)D v krevním oběhu se může lišit podle laboratoře, kde je měřen, ale obvykle 10-55 ng/ml. Intoxikace vitamínem D jsou pozorované nad úrovní 125-150 ng/ml [6].

Sledování obsahu 25(OH)D je důležité především při plánování léčby pacientů s nemocemi spojenými s různými poruchami metabolismu vápníku, které jsou spojené s křivicí, neonatální hypokalcémií, těhotenstvím, nutriční a renální osteodystrofií, hypoparathyroidismem a postmenopausální osteoporózou [8].

Tab. 6: Sérová koncentrace 25(OH)D při nemocech spojených s hladinou Ca, P a kostním metabolismem [6]

Patologický stav	Koncentrace 25(OH)D v séru
Deficience vitamínu D	Snížena
Střevní malabsorpční syndrom	Snížena
Onemocnění jater (chronické nebo akutní)	Snížena
Ledvinový syndrom	Snížena
Osteopenie ve stáří	V normě nebo snížena
Intoxikace vitamínem D	Zvýšena

Sérum obsahující 25(OH)D je suma sérové koncentrace 25(OH)D₂ a 25(OH)D₃. Původně se myslelo, že měření 25(OH)D₃ je cenný marker pro slunečním světlem zprostředkovanou syntézu vitamínu D₃ a že měřený 25(OH)D₂ byl získáván z jídla nebo suplementací. Nicméně, jelikož mléko je obohaceno buď vitamínem D₂ nebo D₃, není možné rozlišit přínos z těchto zdrojů u lidí, kteří žijí v zemích, které obohacují jejich mléko nebo jiné potraviny vitamínem D₃ [6].

11.2 1,25(OH)₂D

1,25(OH)₂D je považován za biologicky aktivní formu vitamínu D, která je odpovědná za regulaci metabolismu vápníku a správnou funkci kostí. Proto je tedy specifická zkouška na stanovení koncentrace 1,25(OH)₂D v oběhu velice žádoucí. Nicméně, bylo několik technických obtíží v přípravné fázi vývoje metody. Hlavní úskalí bylo to, že koncentrace 1,25(OH)₂D v krvi je přibližně 1000 krát nižší (fyziologické rozmezí 15-65 pg/ml) než koncentrace 25(OH)D (fyziologické rozmezí 10-55 ng/ml). Proto je před vývojem analýzy 1,25(OH)₂D nutné, najít buď nějakou protilátku nebo vazající protein, které by měly vysokou specifitu pro 1,25(OH)₂D₂ a 1,25(OH)₂D₃. Mimoto, lipidová extrakce následovaná důkladnou chromatografickou separací byla nezbytná k oddělení okamžitého (minutového) množství 1,25(OH)₂ z dalších metabolitů vitamínu D, které by mohly potenciálně interferovat.

Stanovení 1,25(OH)₂D bylo vyvinuto s využitím jaderného receptoru pro 1,25(OH)₂D známého jako „receptor vitamínu D (VDR)“. Protilátky proti 1,25(OH)₂D₃, ale nedokázaly příliš rozlišit mezi 1,25(OH)₂D₃ a 1,25(OH)₂D₂. Nyní se používá

radioimunoanalýza pro stanovení 1,25(OH)₂D používající ¹²⁵I značený analog 1,25(OH)₂D₃.

První analýzy 1,25(OH)₂D vyžadovaly 2 až 3 ml séra pro extrakci organickým rozpouštědlem a vzorky byly čištěny lipidovou extrakcí na přípravném chromatografickém systému, který používal buď reverzní nebo přímou fázi silica nebo Sephadex LH-20. Frakce 1,25(OH)₂D byla měřena na přímé fázi HPLC. Nakonec 1,25(OH)₂D frakce podléhá kompetitivní protein vázající analýze používající VDR.

Vysoce účinná a časově úsporná přípravná chromatografie dokáže rozdělit 1,25(OH)₂D z 1 ml séra lipidovou extrakcí a využívá rovnou VDR kompetitivní protein vázající vzorek.

Analýza 1,25(OH)₂D je výhodná v diferenciatní diagnostice hyperkalcémie spojenou s rakovinou a chronickým granulomatózním onemocněním jako je např. sarkoidóza (benigní lymfogranulom). Normální koncentrace v krevním oběhu (podle měřící laboratoře) je obvykle v rozsahu 15-65 pg/ml. Při intoxikaci vitamínem D je hladina 1,25(OH)₂D nízká, normální nebo zvýšená [6].

Tab.7: Sérové koncentrace 1,25(OH)₂D v souvislosti s kostním metabolismem [6]

Patologický stav	Koncentrace 1,25(OH)₂D v séru
Deficience vitamínu D	Snížená (u některých pacientů s osteomalácií může být v normě i zvýšená)
Selhání ledvin GF > (30 ml/min)/1,7m ² GF < (30 ml/min)/1,7m ²	Snížená nebo v normě Snížená
Hypoparathyroidismus	Snížená nebo v normě
Pseudohypoparathyroidismus	Snížená nebo v normě
Na vitamínu D závislá křivice Typu I Typu II	Snížená Zvýšená
Křivice na vitamínu D nezávislá	Snížená nebo v normě
Tumorem indukovaná osteomalacie	Snížená
Onkogenní hyperkalcemie	Snížená
Některé lymfomy	Zvýšená

Hyperparathyroidismus,	Zvýšená
Williamsův syndrom	Zvýšená
Sarkoidóza, tuberkulóza, silikóza	Zvýšená
Idiopatická hyperkalcie	V normě nebo zvýšená
Intoxikace vitamínem D	V normě nebo zvýšená

11.3 Ostatní metabolity

Různé další metabolity vitamínu D jsou stanovovány pro účely klinického výzkumu, ale nepoužívají se běžně pro klinické hodnocení nemocí související s vápníkovým a kostním metabolismem. Tato analýza zahrnuje 24,25(OH)₂D, 25,26(OH)₂D a 25(OH)D₃-23,26-lakton. Úroveň těchto metabolitů v krvi jsou úměrné sérové koncentraci 25(OH)D [6].

12 Instrumentální část

12.1 Přístrojové vybavení

HPLC systém 2D-HPLC SHIMADZU LC-20A Prominence (Kyoto, Japonsko)

LC-20AB HPLC pumpa

Rack changer (pracovní teplota 4-40°C)

CTO-20AC termostat kolon

SPD-M20A diode array detector

DGU-20A3 trojkanálový on-line degaser

Spektrofluorimetrický detektor RF-10Ax1

Autosampler SIL-20AC

CBM-20A systém controller neboli komunikační jednotka

monolitní kolona Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm, MERCK (Darmstadt, Německo)

software (s operační pamětí) LC Solution multi with PDA control



HPLC systém PERKIN ELMER (Norwalk, USA)

diode array detektor LC 235C

LC Column oven 101 thermostat

LC 200 pump

LC 200 autosampler

monolitní kolona Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm, MERCK (Darmstadt, Německo)

software Turbochrom verze 4.1 PERKIN ELMER



12.2 Chemikálie

Methanol, gradient HPLC grade (SCHARLAU CHEMIE S.A., Sentmenat, Španělsko)

Acetonitril, gradient HPLC grade (SCHARLAU CHEMIE S.A., Sentmenat, Španělsko)

2-propanol, gradient HPLC grade, SCHARLAU CHEMIE a.s. (Sentmenat, Španělsko)

Destilovaná voda, ultrafiltrace (Goro s.r.o., Praha, Česká republika)

12.3 Standardy

1,25(OH)₂D₃ – CALBIOCHEM, distributor Merck s.r.o (Říčany, Česká republika)

25(OH)D₃ – CALBIOCHEM, distributor Merck s.r.o (Říčany, Česká republika)

D₂ - FLUKA, SIGMA ALDRICH (Praha, Česká republika)

D₃ - FLUKA, SIGMA ALDRICH (Praha, Česká republika)

Tokol – MATREYA (Pleasant Gap, USA)

12.4 Příprava zásobních a pracovních roztoků

Příprava zásobních roztoků standardů:

Zásobní roztok 25-hydroxycholekalCIFerolu $c = 49,92 \cdot 10^{-6}$ mol/l byl připraven analytickým rozpuštěním 1 mg 25-hydroxycholekalCIFerolu v methanolu a doplněn do 50 ml.

Zásobní roztok cholekalCIFerolu (D_3) $c = 2000$ μ mol/l byl připraven navážením 38,46 mg cholekalCIFerolu, rozpuštěn v methanolu a doplněn do 50 ml.

Zásobní roztok 1,25-dihydroxycholekalCIFerolu ($1,25(OH)_2D_3$) $c = 4,799$ μ mol/l byl připraven rozpuštěním 0,05 mg 1,25-dihydroxycholekalCIFerolu v methanolu a doplněn do 25 ml.

Zásobní roztok ergokalCIFerolu (D_2) $c = 2000$ μ mol/l byl připraven rozpuštěním 1 mg ergokalCIFerolu v methanolu a doplněn do 50 ml.

Zásobní roztok tokolu (vnitřní standard – IS) $c = 1000$ μ mol/l byl připraven rozpuštěním 19,432 mg tokolu v hexanu a doplněn do 50 ml.

Příprava pracovních roztoků:

Pracovní roztoky byly připraveny naředěním roztoků zásobních methanolem a to na koncentrace:

$1,25(OH)_2D_3$ $c = 95,98$ nmol/l (25ml), $c = 47,99$ nmol/l (25ml)

$25(OH)D_3$ $c = 24,955$ nmol/l (10ml), $c = 100$ nmol/l (25ml), $c = 50$ nmol/l (25ml)

D_2 $c = 50$ a 25 μ mol/l (50 a 10ml), $c = 100$ a 50 nmol/l (50 a 25ml)

D_3 $c = 50$ a 25 μ mol/l (50 a 10ml), $c = 100$ a 50 nmol/l (50 a 25 nmol/l)

Tokol $c = 25$ μ mol/l

Nejčastěji používaná směs byla připravena smícháním $1,25(OH)_2D_3$ o $c = 4,799$ μ mol/l, $25(OH)D_3$ o $c = 49,98$ μ mol/l, D_2 o $c = 50$ μ mol/l, D_3 o $c = 50$ μ mol/l a tokolu o $c = 50$ μ mol/l v poměru 1:1:1:1:1.

12.5 Vývoj metody a optimalizace chromatografických podmínek

Separace látek v HPLC systému může být ovlivněna mnoha činiteli, o to je těžší optimalizovat podmínky pro novou metodu. Při hledání vhodných podmínek pro vývoj metody na stanovení vitamínu D a jeho metabolitů jsme vyzkoušeli různé složení mobilní fáze v různých poměrech složek (MeOH, MeOH:H₂O, MeOH:ACN, MeOH:ACN:H₂O, MeOH:ACN: 2-propanol, MeOH:ACN:THF), různé průtoky mobilní fáze (0,7; 1; 1,5 a 2 ml/min), nástřik vzorku do systému (20, 25 a 50 µl), teplotu kolony (15, 20 a 25°C) i vliv různých typů monolitních kolon (průměr, délka).

Pro detekci vitamínu D a jeho metabolitů je nejčastěji využívána UV detekce při vlnových délkách 265 nm a 254 nm. Při vývoji HPLC metodiky se ukázala výhodnější detekce při vlnové délce 265 nm.

Jako stacionární fáze byla použita monolitní kolona Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm s náplní tvořenou silikagelovou monolitní stacionární fází vzhledem k tomu, že vyvíjená metoda bude sloužit pro klinické hodnocení a měla by splnit požadavek rychlé a jednoduché analýzy z důvodu velkého množství biologických vzorků.

Důležitým krokem při vývoji metody byla volba vhodné mobilní fáze a optimalizace jejího průtoku. Při hledání optimálního složení mobilní fáze bylo využito poznatků z literatury viz. tabulka 8.

Tab. 8: Stručný přehled metod uváděných v literatuře [12, 13, 14, 15, 16]

Rok	Autoři	Mobilní fáze	Kolona	Poznámky
2004	Mata-Granados at al.	ACN:H ₂ O:MeOH MeOH:isopropanol	Předkolona: ultrazásaditá C18 15 x 4,6 mm, částice 5 μm, Scharlau Science; Kolona: Ultrazásaditá C18, 250 x 4,6 mm, částice 5 μm, Scharlau Science, Barcelona, Španělsko	Složité gradient se změnou poměru MF a změnou průtoku během analýzy, analýza trvá 35 minut
2005	Granado-Lorencio at al.	ACN:MeOH (85:15), ACN:CH ₃ Cl:MeOH (70:20:10)	Spheri-5-ODS, Applied Biosystems, San Jose, Kalifornie (USA)	Pouze změna MF během analýzy, ale pík 25(OH)D ₃ se ztrácí
2004	Brunetto at al.	ACN:fosfátový pufr (20:80), a poté MeOH:ACN:THF (65:20:15)	Extrakční předkolona: BioTrap 500 C18, 20 x 4 mm i.d., Chromtech Ltd., Velká Británie Kolona: C18 250 x 4,6 mm i.d., 5 μm, Jones Chromatography	Gradientová eluce, filtrace MF, column switching HPLC systém
1995	Benmoussa	ACN:H ₂ O (95:5)	LiChrospher 100 RP-18, 5 μm (Merck 50734) 125x 4mm I.D.	Vliv teploty na transformaci metabolitů D ₃
1999	Ortiz-Boyer at al.	ACN:fosfátový pufr (20:80), isopropanol:MeOH (10:90)	Skleněná minikolona 50 x 0,5 mm, Omnifit, analytická kolona: ultrabasic C18 25 x 4,6 mm; 5 μm, Scharlau Science	Post-column derivatizace, kvalita záznamu neodpovídá složitosti analýzy

12.6 Výsledky a diskuze

Ve většině prací v odborné literatuře byly pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů použity jako mobilní fáze různé směsi organických rozpouštědel. Ve většině těchto směsí převažoval methanol. Proto jsme ho zvolili pro vývoj metody jako první, stejně tak jsme methanol použili pro roztoky standardů, jelikož byl i součástí mobilní fáze a v literatuře byl též uváděn.

2D-HPLC SHIMADZU LC-20A Prominence

Analýza hydroxyderivátů vitamínu D, později i vitamínů D2 a D3:

1) MF MeOH

100% MeOH

- průtok: 1,5 ml/min

- nástřik: 20 μ l

→ **1,25(OH)D3** retenční čas v mrtvém objemu

- snížení průtoku prodloužilo retenční čas hydroxyderivátu i mrtvého objemu

Přidání vody zvýší polaritu a na záznamu posune píky z mrtvého objemu →

2) MF MeOH : H₂O

MeOH : H₂O (90 : 10)

- průtok: 1,5 ml/min

- velký nárůst tlaku, nekvalitní záznam baseline

MeOH : H₂O (95 : 5)

- průtok: 1,5 ml/min

- opět nekvalitní záznam baseline

V literatuře využíván často acetonitril, proto další volbou mobilní fáze →

3) MF MeOH : ACN

MeOH : ACN (50 : 50)

- průtok 1,5 ml/min

- 25(OH)D3 t_r = 1,46 min

- 1,25(OH)D3 t_r = 1,26 min (v mrtvém objemu)

MeOH : ACN (40 : 60)

- průtok 1,5 ml/min
- 25(OH)D3 $t_r = 1,49$ min
- 1,25(OH)D3 $t_r = 1,25$ min (v mrtvém objemu)

MeOH : ACN (30 : 70)

- průtok 1,5 ml/min
- 25(OH)D3 $t_r = 1,55$ min
- 1,25(OH)D3 $t_r = 1,28$ min
- D2 $t_r = 3,5$ min
- D3 $t_r = 3,74$ min

MeOH : ACN (20 : 80)

- průtok 1,5 ml/min
- 25(OH)D3 $t_r = 1,64$ min
- 1,25(OH)D3 $t_r = 1,31$ min
- 1,25(OH)D3 měřeno s větší šterbinou detektoru → odezva stejná jako při menší šterbině (větší šterbina nezvýší citlivost)
- D2 $t_r = 3,79$ min
- D3 $t_r = 4,05$ min

MeOH : ACN (10 : 90)

- průtok 1,5 ml/min
- D2 $t_r = 4,15$ min
- D3 $t_r = 4,42$ min

MeOH : ACN (15 : 85)

- průtok 1,5 ml/min
- průtok 1,3 ml/min

MeOH : ACN (13 : 87)

MeOH : ACN (12 : 88)

Souhrn výsledků s mobilní fází MeOH : ACN [Tab. 6]

- 10 : 90 → nekvalitní záznam baseline
- 20 : 80 → použitelná baseline
- 15 : 85 → D₂ a D₃ mají lépe rozdělené píky
- snížení průtoku D2 a D3 nerozdělí

Tab. 9: Shrnutí měření s mobilní fází methanol : acetonitril

MF [%]		retenční časy [min]				Rozlišení píků D2/D3 R _{ij}
		1,25(OH)D3	25(OH)D3	D2	D3	
MeOH	ACN					
50	50	1,26	1,46	-	-	-
40	60	1,25	1,49	-	-	-
30	70	1,28	1,55	3,5	3,74	-
20	80	1,31	1,64	3,79	4,05	-
15	85	1,33	1,66	3,92	4,2	0,79
13	87	-	-	3,98	4,26	< 0,79
12	88	-	-	4,03	4,31	< 0,79
10	90	-	-	4,15	4,42	-

Rozlišení chromatografických píků bylo vypočítáno pomocí vzorce:

$$R_{i,j} = 2 \cdot (t_{Ri} - t_{Rj}) / (W_i + W_j)$$

t_R = retenční čas látek (min)

W = šířka píku na základně (min)

Požadavek R_{i,j} > 1,5.

HPLC sestava PERKIN ELMER

4) MF MeOH : ACN : 2-propanol

MeOH : ACN : 2-propanol (10 : 85 : 5) [chrom. 1]

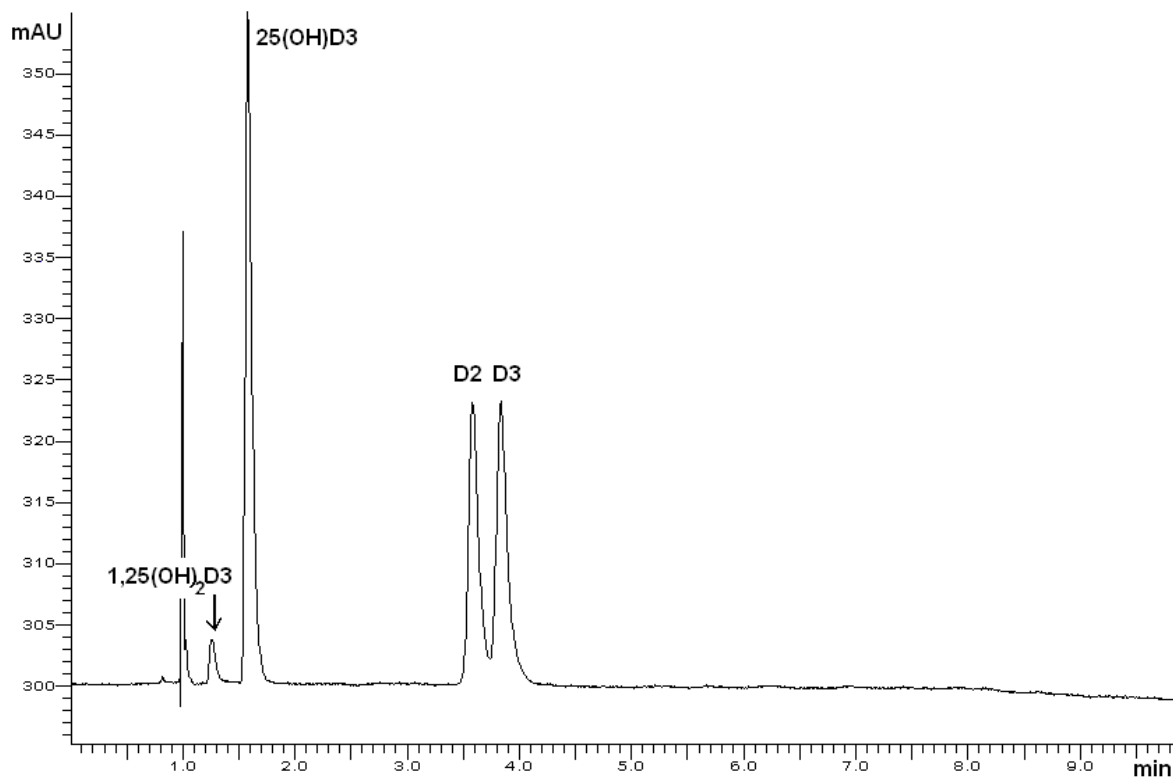
- D2+D3 → píky rozděleny lépe než jen s MeOH
- hydroxyderiváty → mimo mrtvý objem

MeOH : ACN : 2-propanol (10 : 80 : 10)

- D2+D3 → píky rozděleny hůře, rozmyté
- hydroxyderiváty → rozmyté

MeOH : ACN : 2-propanol (5 : 85 : 10)

Chromatogram 1: 1,25(OH)₂D₃ c = 1,2 μmol/l, 25(OH)D₃ c = 12,5 μmol/l, D₂ c = 12,5 μmol/l, D₃ c = 12,5 μmol/l v mobilní fázi MeOH : ACN : 2-propanol (10 : 85 : 5)



Tab. 10: Shrnutí výsledků s mobilní fází methanol : acetonitril : 2-propanol

MF [%]			Retenční časy [min]				rozlišení píků D2/D3 R _{ij}
			1,25(OH)D ₃	25(OH)D ₃	D ₂	D ₃	
MeOH	ACN	2-propanol					
10	85	5	1,26	1,58	3,58	3,84	0,64
10	80	10	1,23	1,48	3,09	3,29	< 0,64
5	85	10	1,22	1,48	3,15	3,36	< 0,64

5) MF MeOH : ACN : H₂O

MeOH : ACN : H₂O (12 : 87 : 1)

- píky nedostatečně rozděleny

MeOH : ACN : H₂O (12,5 : 85 : 2,5)

0.-2.min vlnová délka 265 nm, 2.-3,5. min 295 nm , dále 265 nm

- nástřik 20 μ l,

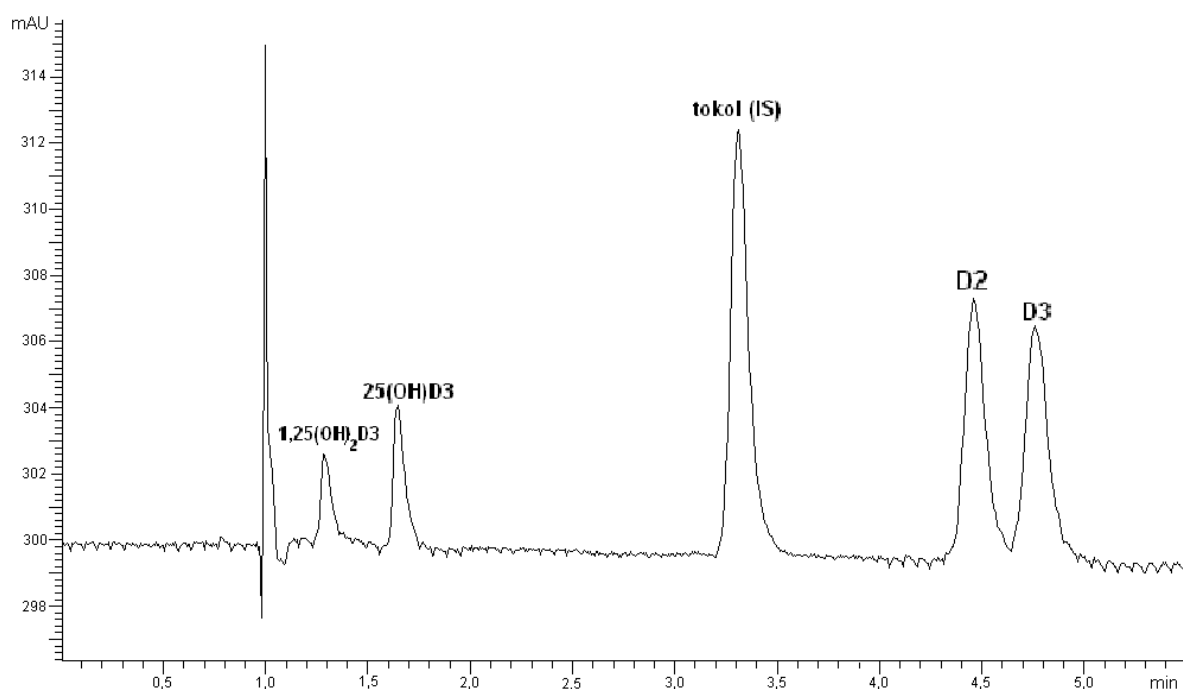
- průtok 1,5 ml/min

- **D₂ a D₃ píky rozděleny nejlépe** [chrom. 2]

Chromatogram 2: 1,25(OH)₂D₃ c = 0,96 μ mol/l, 25(OH)D₃ c = 9,98 μ mol/l,

D₂ c = 10 μ mol/l, D₃ c = 10 μ mol/l v mobilní fázi MeOH : ACN : H₂O (12,5 : 85 : 2,5),

průtok 1,5 ml/min



Tab. 11: Shrnutí výsledků s mobilní fází methanol : acetonitril : voda

MF [%]			Retenční časy [min]				rozlišení píků D ₂ /D ₃
			1,25(OH)D ₃	25(OH)D ₃	D ₂	D ₃	R _{ij}
MeOH	ACN	H ₂ O					
12,5	85	2,5	1,28	1,68	4,72	5,07	0,71
12	87	1	1,28	1,66	4,19	4,48	< 0,71

Rozdělení standardů vitamínu D a standardů jeho metabolitů v mobilní fázi methanol : acetonitril : voda (12,5 : 85 : 2,5) byly znovu ověřeny na HPLC systému LC-20A Prominence.

2D-HPLC SHIMADZU LC-20A Prominence

MeOH : ACN : H₂O (12,5 : 85 : 2,5)

- standardy 1,25(OH)₂D₃ c = 1,2 μmol/l, 25(OH)D₃ c = 12,5 μmol/l, D₂ c = 12,5 μmol/l,

D₃ c = 12,5 μmol/l, nástřik 20 μl, průtok 1,5 ml/min [chrom. 3]

- 25(OH)D₃ c = 50 nmol/l; nástřik 50 μl [chrom. 5]

- 1,25(OH)D₃ c = 95,98 nmol/l; nástřik 50 μl

- 0.-2,5. min průtok 1,5 ml/min, od 2,5 minuty průtok zvýšen na 2 ml/min → t_r D₂/D₃ zkrácen [chrom. 4]

MeOH : ACN : H₂O (12,5 : 85 : 2,5)

Zásobní roztoky standardů D₂ a D₃ rozředěny na koncentraci 50 nmol/l v MF

MeOH : ACN : H₂O (12,5 : 85 : 2,5) → horší odezva MF – 1,25(OH)D₃ pod mezí detekce

- 0.-2,5. min průtok 1,5 ml/min

- od 2,5 minuty průtok zvýšen na 2 ml/min

MeOH : ACN : H₂O (16,6 : 80 : 3,4)

- od 2 minuty průtok zvýšen na 2 ml/min → t_r D₂ a D₃ posunut k hydroxyderivátům

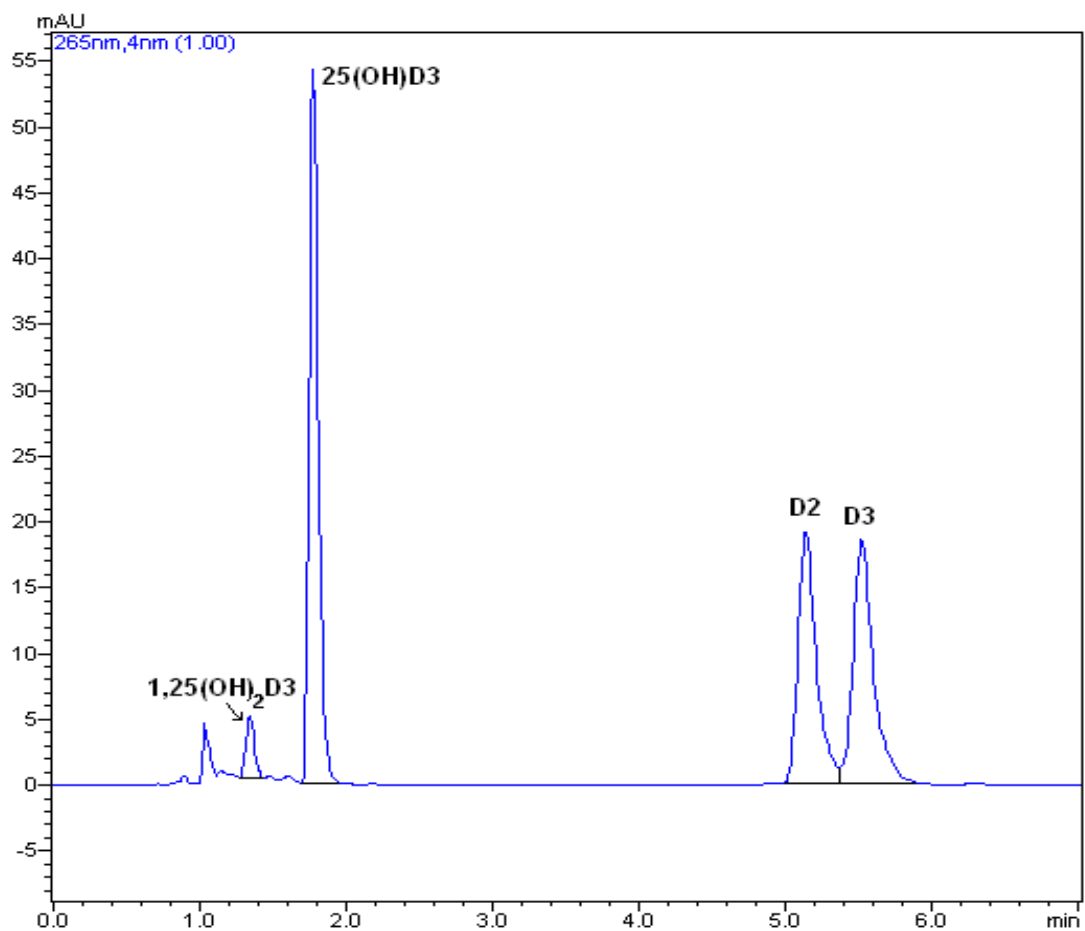
MeOH : ACN : H₂O (25 : 70 : 5)

MeOH : ACN : H₂O (33,3 : 60 : 6,7)

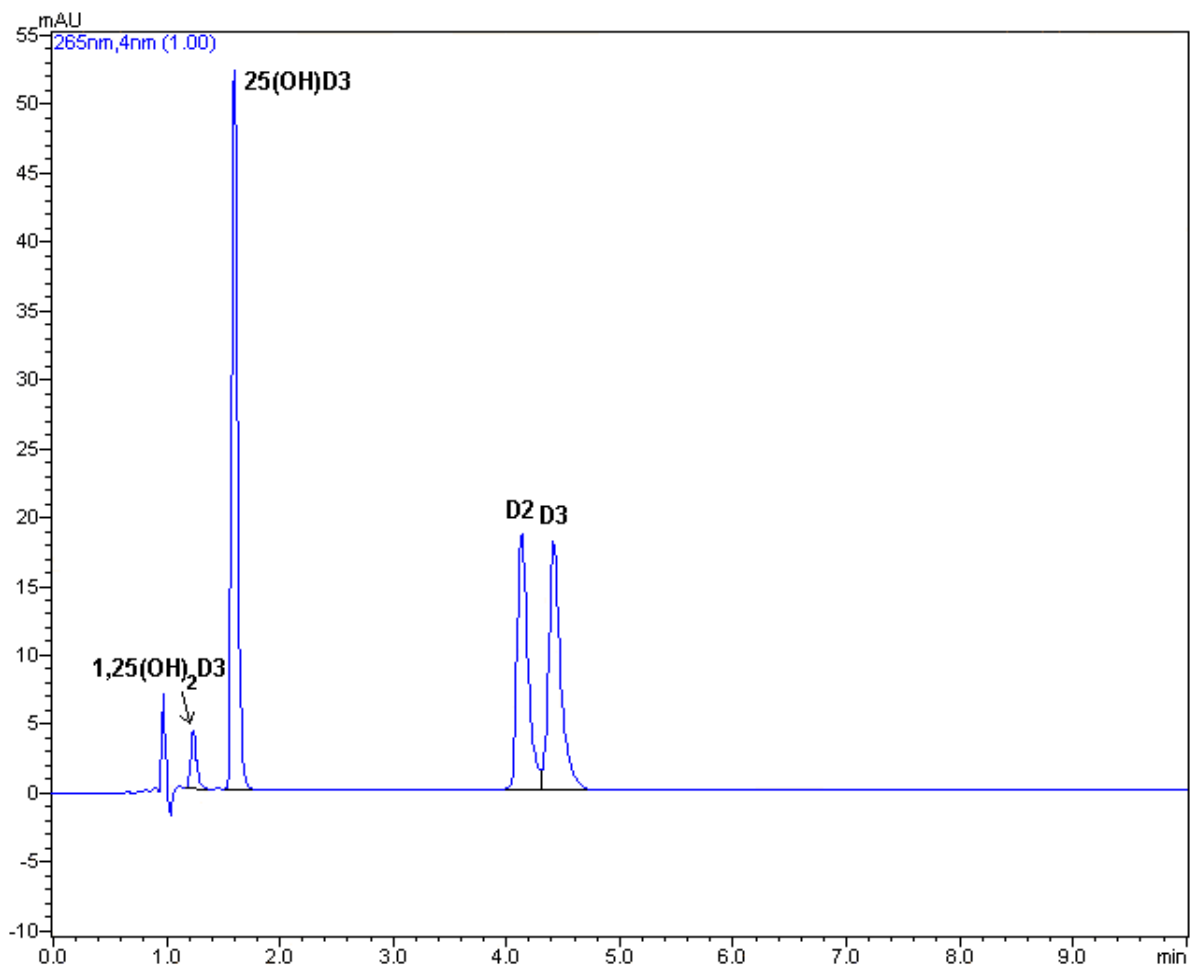
Tab. 12: Souhrn analýz s mobilní fází methanol : acetonitril : voda

MF [%]			retenční časy [min]			
MeOH	ACN	voda	1,25(OH)D ₃	25(OH)D ₃	D ₂	D ₃
12,5	85	2,5	1,34	1,78	5,13	5,51
33,3	60	6,7	1,29	1,7	-	-
25	70	5	1,24	1,63	-	-
16,6	80	3,4	1,21	1,57	-	-

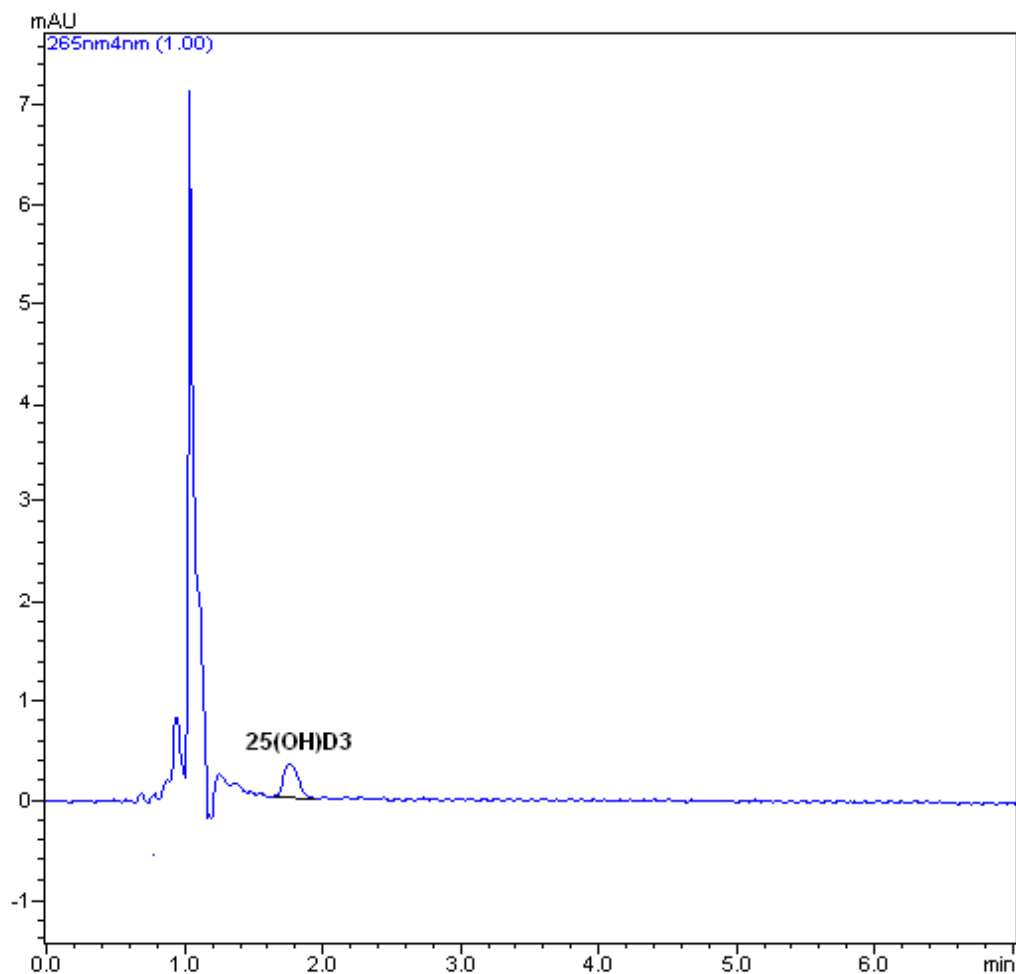
Chromatogram 3: MF MeOH : ACN : H₂O (12,5 : 85 : 2,5), nástřik 20 µl, průtok 1,5 ml/min, STD 1,25(OH)₂D3 c = 1,2 µmol/l, 25(OH)D3 c = 12,5 µmol/l, D2 c = 12,5 µmol/l, D3 c = 12,5 µmol/l



Chromatogram 4: MF MeOH : ACN : H₂O (12,5 : 85 : 2,5), nástřik 20 µl, průtok 1,5 ml/min, od 2,5 min zvýšen na 2 ml/min, STD 1,25(OH)₂D₃ c = 1,2 µmol/l, 25(OH)D₃ c = 12,5 µmol/l, D₂ c = 12,5 µmol/l, D₃ c = 12,5 µmol/l



Chromatogram 5: MF MeOH : ACN : H₂O (12,5 : 85 : 2,5), nástřik 50 μl, průtok 1,5 ml/min, 25(OH)D₃ c = 50 nmol/l (fyziologická koncentrace v lidském séru)



6) MF MeOH : ACN : THF

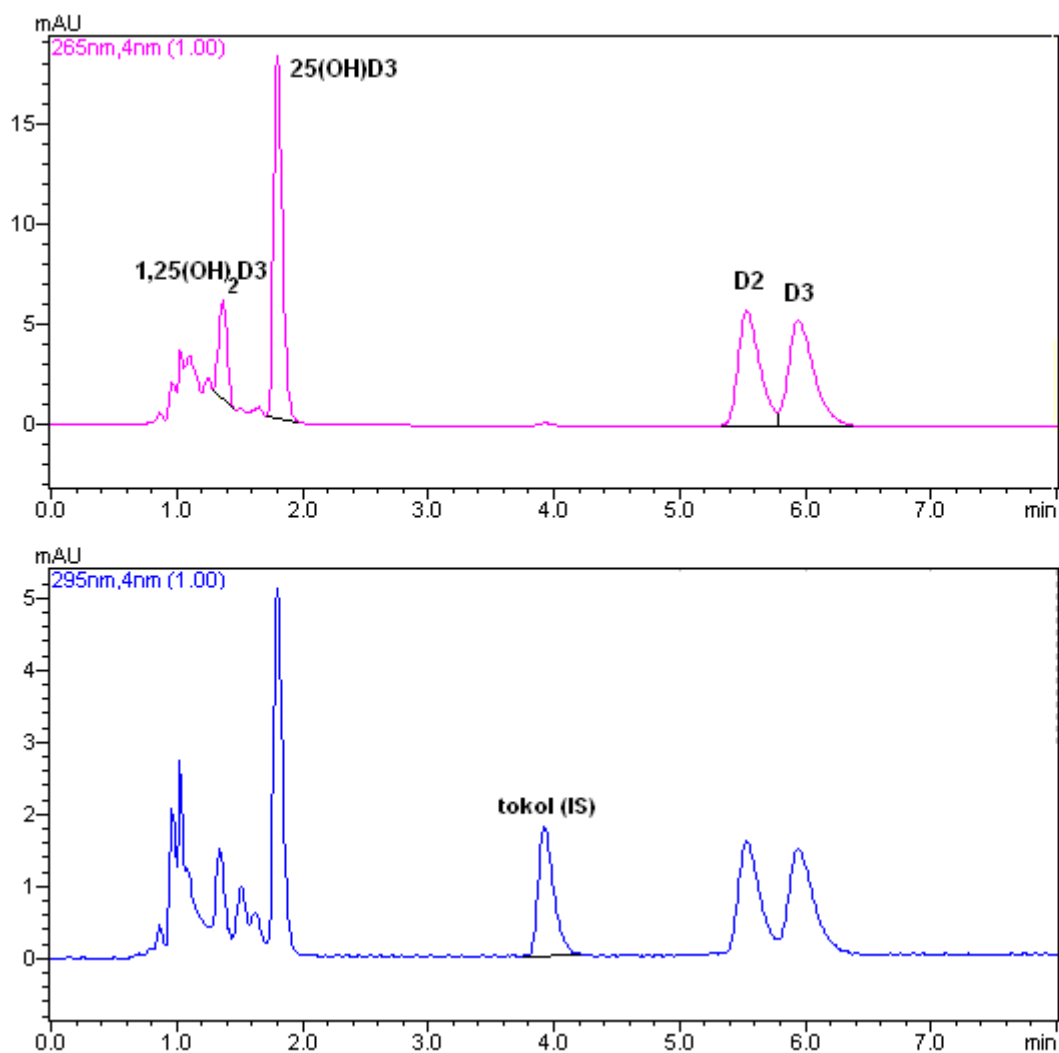
MeOH : ACN : THF (9 : 90 : 1)

- podobný záznam jako MeOH : ACN : H₂O,
- D2 a D3 celkem dobré rozlišení [chrom. 6]

MeOH : ACN : THF (19 : 80 : 1)

- α-Tokoferol (295 nm) $t_r = 4,18 (>t_r D3)$

Chromatogram 6: MF MeOH : ACN : THF (9 : 90 : 1), 1,25(OH)₂D3 c = 0,96 μmol/l, 25(OH)D3 c = 10 μmol/l, D2 c = 10 μmol/l, D3 c = 10 μmol/l, tokol c = 10 μmol/l



Tab. 13: Shrnutí měření s mobilní fází methanol : acetonitril : tetrahydrofuran

MF [%]			retenční časy [min]				rozlišení píků D2/D3 R _{ij}
			1,25(OH) ₂ D3	25(OH)D3	D2	D3	
MeOH	ACN	THF					
9	90	1	1,3	1,69	3,93	4,2	0,92
18	80	2	1,27	1,55	3,44	3,67	< 0,92
13,5	85	1,5	1,29	1,62	3,65	3,91	< 0,92
14,25	85	0,75	1,29	1,62	3,71	3,97	< 0,92
19	80	1	1,29	1,59	3,6	3,83	< 0,92
28,5	70	1,5	1,25	1,5	3,27	3,46	< 0,92

7) MF MeOH : ACN : H₂O

MeOH : ACN : H₂O (13,3 : 80 : 6,7)

- 1,25(OH)D₃ nemá stejné spektrum jako ostatní deriváty (spektrum zřejmě ovlivněno odezvou MF)
- píky D₂ a D₃ téměř rozděleny, ale na úkor retenčního času (příliš dlouhá doba analýzy)

MeOH : ACN : H₂O (26,7 : 60 : 13,3)

- hydroxyderiváty posunuty mimo odezvu mobilní fáze
- gradient (od 3,5 min zrychlen průtok na 2 ml/min, změna MF na 20 : 70 : 10)

Tab. 14: Shrnutí měření s mobilní fází methanol : acetonitril : voda

MF [%]			retenční časy [min]			
			1,25(OH)D ₃	25(OH)D ₃	D ₂	D ₃
MeOH	ACN	H ₂ O				
12,5	85	2,5	1,33	1,78	5,13	5,5
10	85	5	?	1,88	6,57	7,14
13,3	80	6,7	1,5 ?	2,02	8,6	9,21
20	70	10	1,52	2,35		
26,7	60	13,3	1,76	2,61	-	-

12.7 Opakovatelnost

Směs standardů

1,25(OH)₂D₃ c = 4,799 μmol/l (původní konc.) → c = 0,96 μmol/l (ve směsi)

25(OH)D₃ c = 25 μmol/l → c = 5 μmol/l

D₂ c = 25 μmol/l → c = 5 μmol/l

D₃ c = 25 μmol/l → c = 5 μmol/l

Tokol (IS) c = 25 μmol/l → c = 5 μmol/l

Metoda:

- MF MeOH : ACN : H₂O (12,5 : 85 : 2,5)
- průtok 1,5 ml/min
- nástřik 20 μl
- teplota kolony 25°C

Tab. 15: Opakovatelnost standardů

Opakovatelnost standardů										
	1,25(OH)D3		25(OH)D3		D2		D3		Tokol (IS)	
č. měření	t _R (min)	A	t _R (min)	A	t _R (min)	A	t _R (min)	A	t _R (min)	A
1	1,351	36189	1,773	85772	5,151	65954	5,533	68036	3,659	18224
2	1,351	37783	1,772	85795	5,149	65683	5,531	68120	3,658	17919
3	1,356	37176	1,777	85453	5,153	65143	5,535	67746	3,663	17746
4	1,352	36778	1,773	84734	5,148	64731	5,530	67496	3,657	18039
5	1,354	36585	1,775	84057	5,150	64703	5,532	66757	3,660	17841
6	1,350	36673	1,770	83531	5,144	63893	5,526	65959	3,655	17375
7	1,353	36272	1,774	83116	5,148	63276	5,530	65893	3,658	17601
8	1,345	36413	1,766	82791	5,140	63226	5,521	65535	3,650	17566
9	1,351	35600	1,771	85654	5,145	65454	5,526	67786	3,655	18272
10	1,360	37225	1,781	85365	5,154	65642	5,536	67696	3,664	18099
11	1,346	38069	1,767	85327	5,139	65532	5,520	68046	3,650	18022
12	1,355	37702	1,775	84940	5,147	65231	5,529	67746	3,658	17718
13	1,350	37386	1,770	84020	5,142	64356	5,523	66477	3,653	17867
14	1,354	36750	1,773	83176	5,144	63570	5,526	65237	3,657	17541
15	1,357	36624	1,777	82110	5,149	62670	5,530	64950	3,660	17589
16	1,355	36157	1,774	81810	5,146	62125	5,527	63914	3,657	17116
průměr	1,353	36836	1,773	84228	5,147	64449	5,528	66712	3,657	17783
SD	0,0039	673	0,0038	1340	0,0043	1188	0,0046	1321	0,0039	314
RSD (%)	0,29	1,83	0,21	1,59	0,08	1,84	0,08	1,98	0,11	1,77

12.8 Typy monolitických kolon

Vyzkoušeli jsme také vliv typu kolony na separaci daných analytů. Při vývoji metody jsme používali monolitické kolony různých délek a průměrů. Výsledky jsou zobrazeny v chromatogramech 7, 8, 9.

směs standardů

1,25(OH)₂D₃ c = 4,799 μmol/l (původní konc.) → c = 0,96 μmol/l (ve směsi)

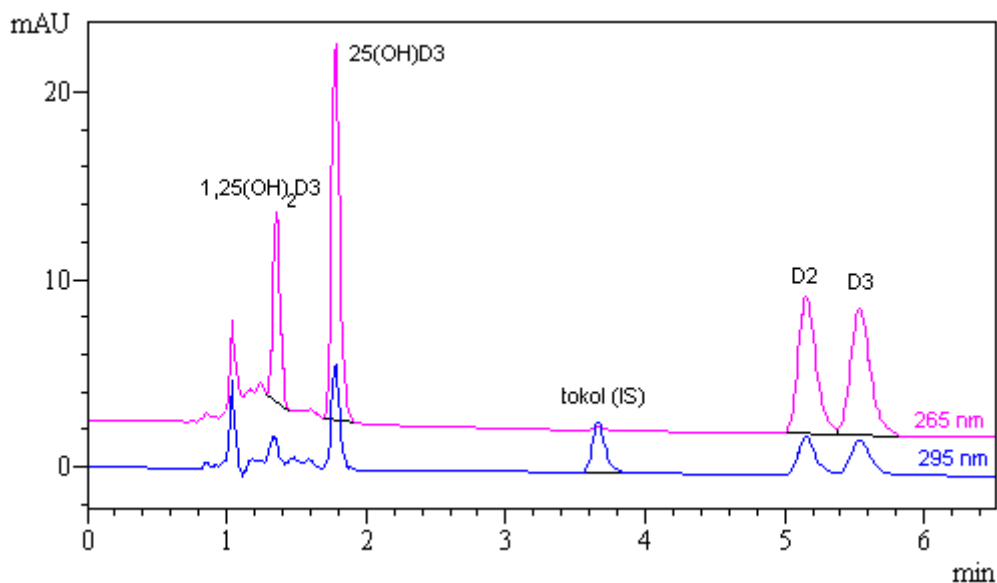
25(OH)D₃ c = 25 μmol/l → c = 5 μmol/l

D₂ c = 25 μmol/l → c = 5 μmol/l

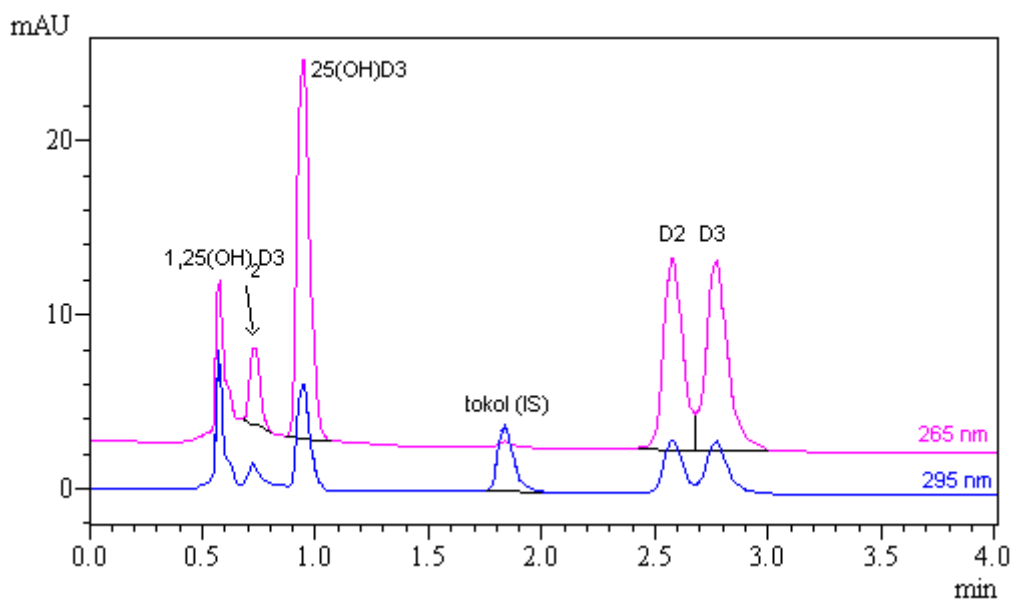
D₃ c = 25 μmol/l → c = 5 μmol/l

Tokol (IS) c = 25 μmol/l → c = 5 μmol/l

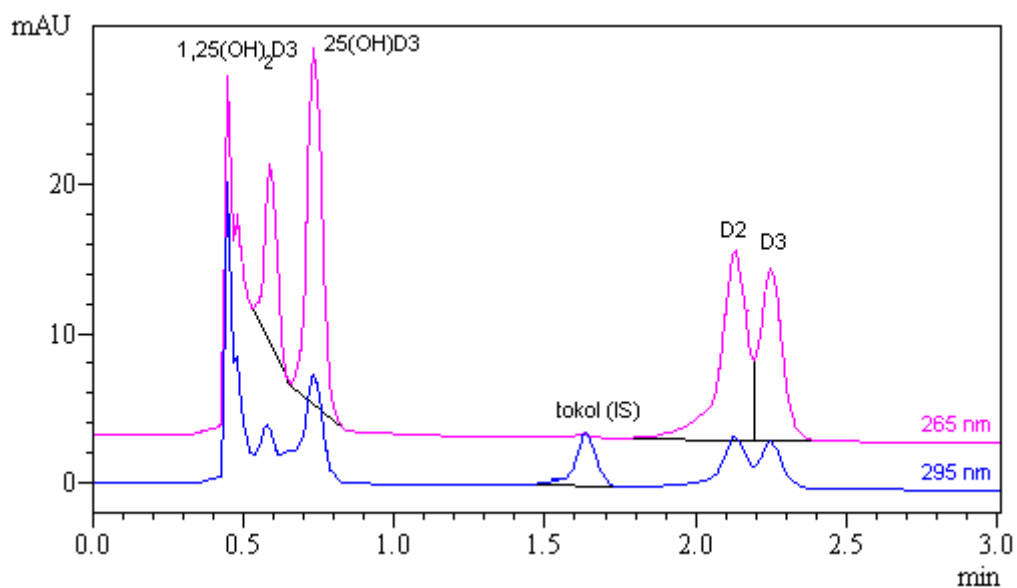
Chromatogram 7: Kolona Chromolith Performance RP-18e, 100-4,6



Chromatogram 8: Kolona Chromolith Performance RP-18e, 50-4,6



Chromatogram 9: kolona Onyx C18, 100-3,0



Na koloně Chromolith Performance RP-18e, 100-4,6 došlo za daných podmínek k dobré separaci sledovaných analytů. Na kratší koloně Chromolith Performance RP-18e, 50-4,6 byly analyty stejně dobře odděleny a navíc se doba analýzy zkrátila téměř o polovinu. Užší kolona Onyx C18, 100-3,0 se ukázala jako naprosto nevhodná.

12.9 Teplota

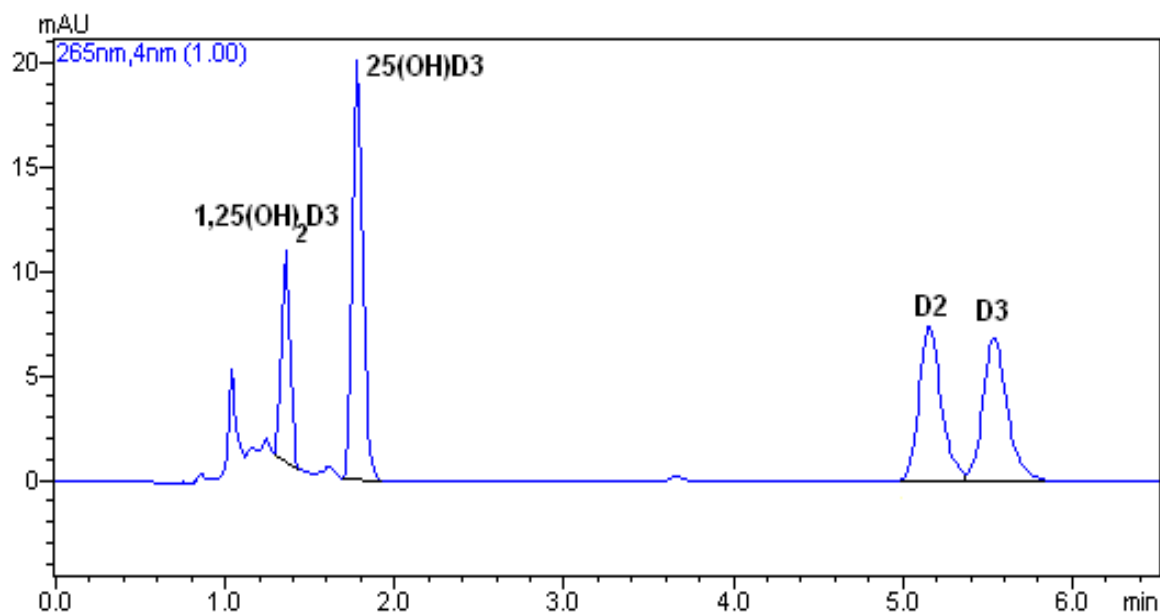
Dalším sledovým parametrem, který ovlivňuje separaci analytů, je teplota. V práci jsme vyzkoušeli separaci sledovaných analytů při teplotách 15°C, 20°C a 25°C na všech typech monolitických kolon. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce 16 a také v chromatogramech 10, 11, 12, 13.

Koncentrace jednotlivých standardů byly: 1,25(OH)₂D₃ c = 0,96 μmol/l, 25(OH)D₃ c = 5 μmol/l, D₂ c = 5 μmol/l, D₃ c = 5 μmol/l, tokol (IS) c = 5 μmol/l

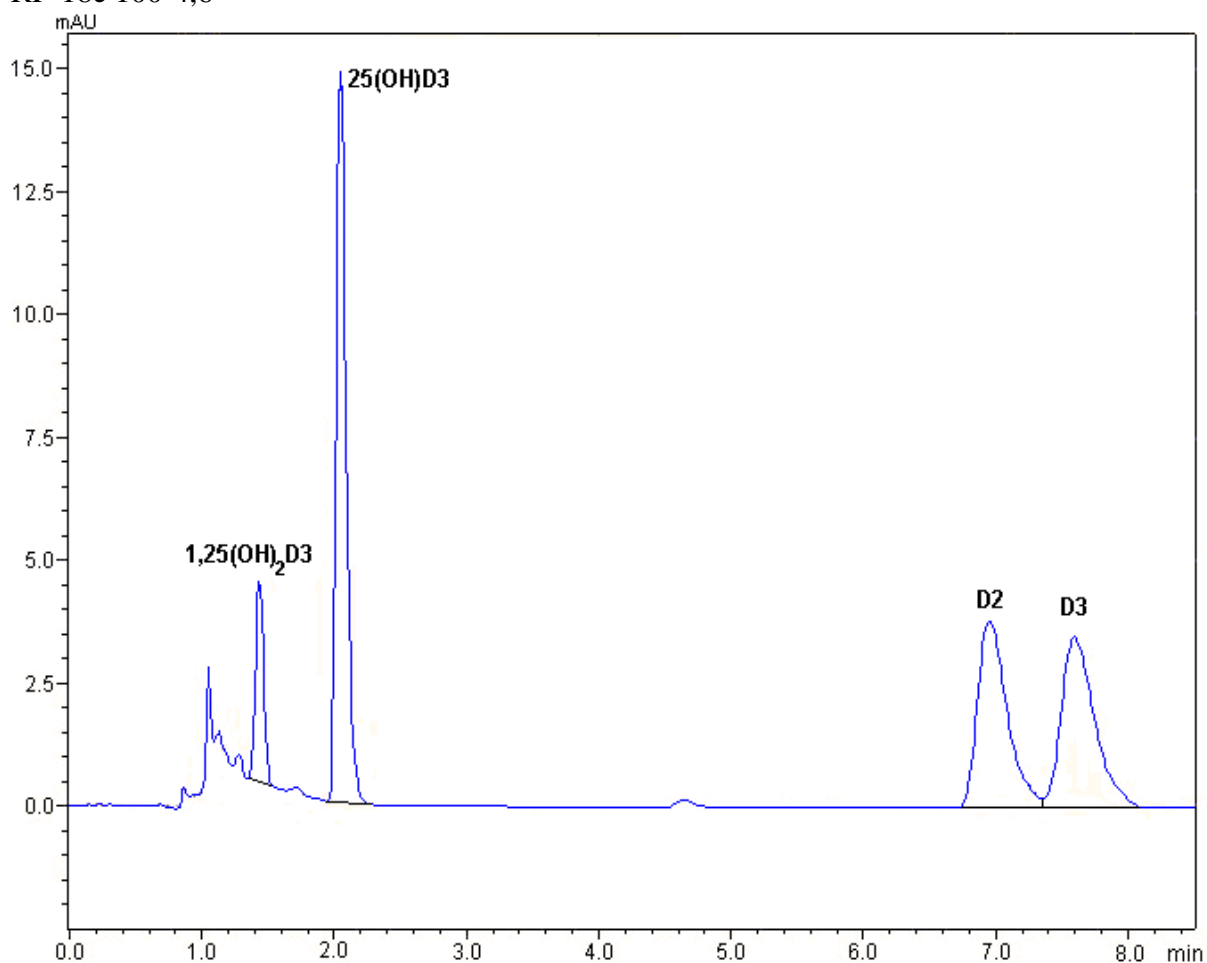
Tab. 16: Vliv kolony a teploty na separaci

MF MeOH:ACN:voda (12,5:85:2,5); 25°C; 1,5 ml/min					
Kolona	retenční čas [min]				
	1,25(OH)D₃	25(OH)D₃	D₂	D₃	Tokol
RP-18e, 100-4,6	1,343	1,790	5,331	5,728	3,779
RP-18e, 50-4,6	0,719	0,934	2,559	2,751	1,818
Onyx C18, 100-3,0	0,587	0,731	2,126	2,245	1,633
MF MeOH:ACN:voda (12,5:85:2,5); 20°C; 1,5 ml/min					
Kolona	retenční čas [min]				
	1,25(OH)D₃	25(OH)D₃	D₂	D₃	Tokol
RP-18e, 100-4,6	1,382	1,903	6,030	6,533	4,149
RP-18e, 50-4,6	0,732	0,985	2,950	3,198	2,030
Onyx C18, 100-3,0	0,587	0,731	2,126	2,245	1,633
MF MeOH:ACN:voda (12,5:85:2,5), 15°C; 1,5 ml/min					
Kolona	retenční čas [min]				
	1,25(OH)D₃	25(OH)D₃	D₂	D₃	Tokol
RP-18e, 100-4,6	1,427	2,043	6,948	7,593	4,640
RP-18e, 50-4,6	0,748	1,046	3,373	3,687	2,249
Onyx C18, 100-3,0	0,615	0,813	2,682	2,860	1,998

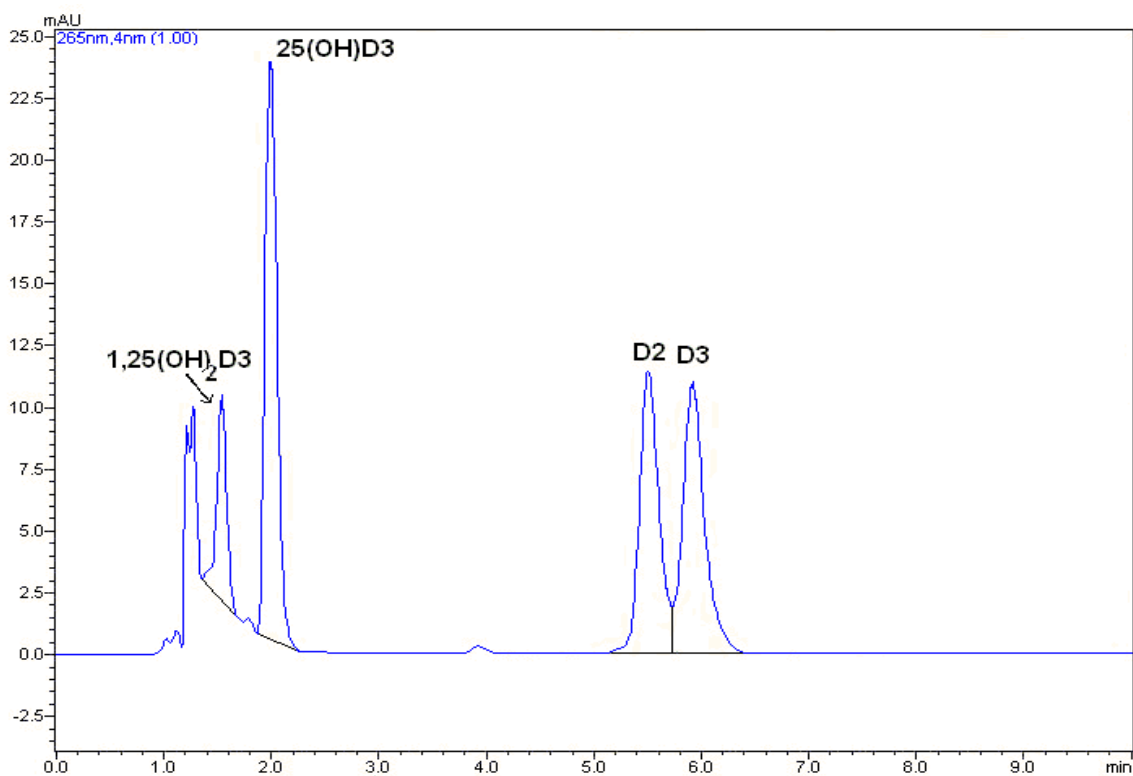
Chromatogram 10: teplota **25°C**, průtok 1,5 ml/min, kolona Chromolith Performance RP-18e 100-4,6



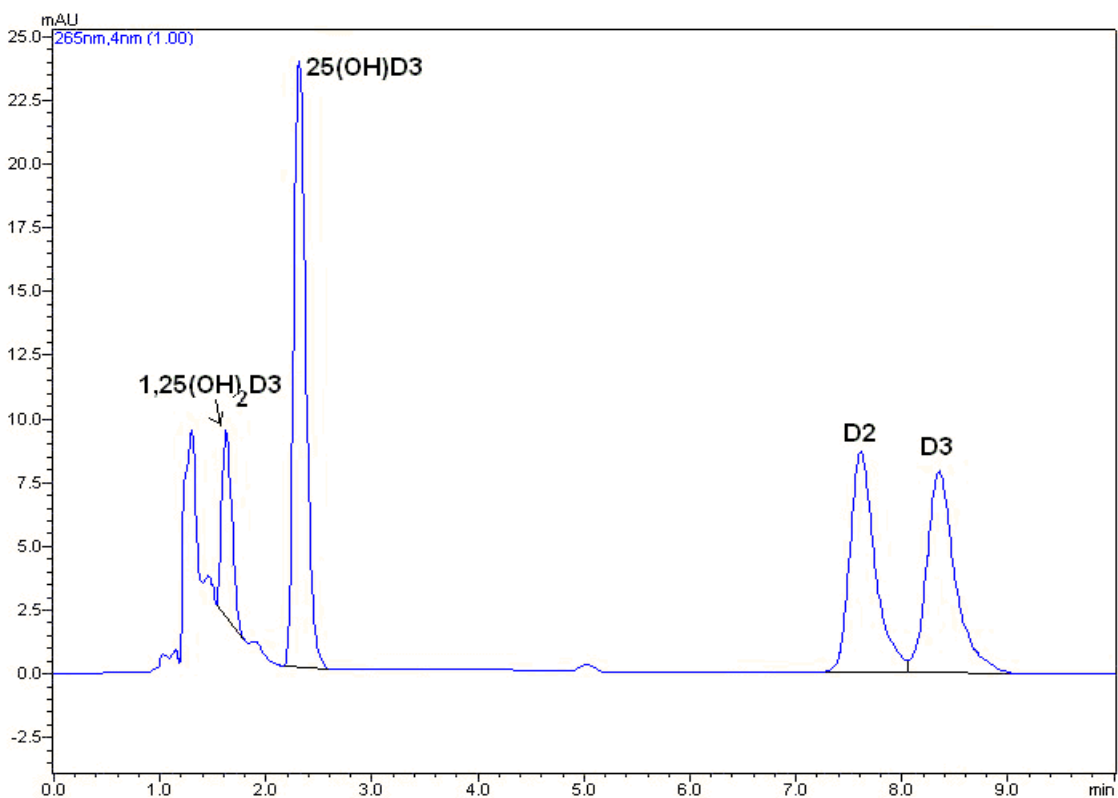
Chromatogram 11: Teplota **15°C**, průtok 1,5 ml/min, kolona Chromolith Performance RP-18e 100-4,6



Chromatogram 12: Teplota **25°C**, průtok 0,7 ml/min, kolona Chromolith Performance RP-18e 50-4,6



Chromatogram 13: Teplota **15°C**, průtok 0,7 ml/min, kolona Chromolith Performance RP-18e 50-4,6



12.10 Chromsystems

Během vývoje metody jsme měli možnost vyzkoušet HPLC set na **stanovení 25(OH)D₂ a 25(OH)D₃ v séru/plazmě** od firmy Chromsystems. Firma zapůjčila vlastní kolonu a dodala potřebné reagentie (kalibrátory, standardy, mobilní fázi).

Firma Chromsystems uvádí, že při deficitu vitamínu D (špatná funkce kostní mineralizace) se používá k monitorování hladin 25(OH)D₃. 25(OH)vitamin D₂ je pak měřen pro monitorování terapie deficitu vitamínem D používající vitamin D₂.

Pracovní postup

- ověření zavedené metody
- měření sér
- zkouška standardů z Chromsystemu na MF MeOH:ACN:voda (12,5 : 85 : 2,5 a 26,7 : 60 : 13,3) nástřik 25 µl

Paralelní příprava vzorku a kontroly:

V tmavé eppendorfce smíchat 500 ul kontrola + 50 ul IS →

V tmavé eppendorfce smíchat 500 ul séra + 50 ul IS → přidat 500 ul

precipitační reagentie → třepat (vortex) 20 s → zchlazení 10 min při +4°C →

zcentrifugovat 5 min při 13 000 rpm → veškerý supernatant přenést na extrakční kolonku

a centrifugací nebo pod tlakem odstranit odpadní vodu (SPE kolonky) → přidat 2x 1ml

promývací pufr 1 → 75 ul promývací pufr 2 → vyměnit eppendorfky → 200 ul elučního

činnidla a naředit 20 µl destilované vody →

nástřik 25 µl

Popis metody

Izokratický HPLC systém s UV detekcí

Nástřik: 25 µl (10-50 µl)

Průtok: 0.7 ml/min

Vlnová délka: 265 nm

Teplota kolony: 25 °C

Autosampler

oplachovací roztok: Voda:acetonitril (50:50)

Specifikace

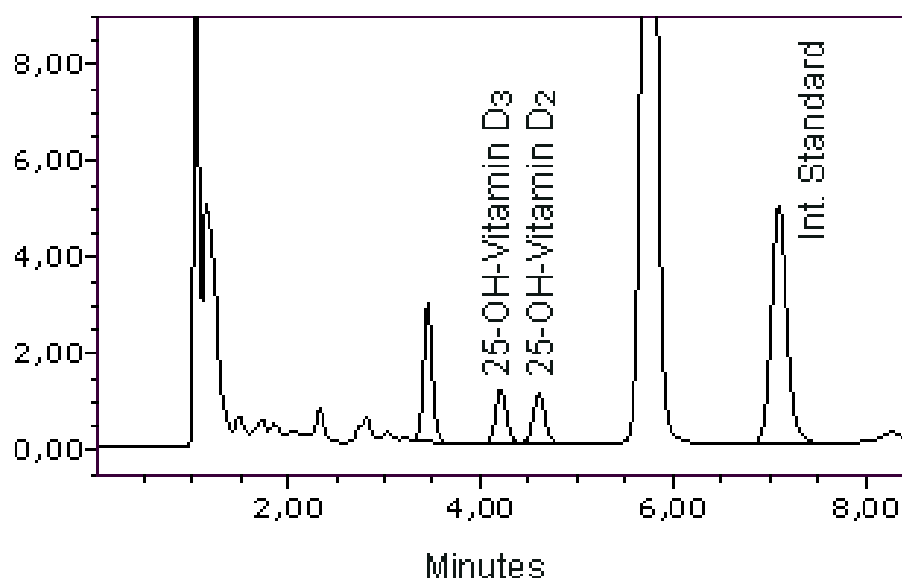
Linearita:	Až do 250 µg/l
Limit kvantifikace:	D3: 1.4 µg/l, D2: 1.1 µg/l
Recovery:	D3: 86 %, D2: 87 %
Během analýzy:	CV 0.8-3.0 %
Mezi analýzami:	CV 1.9-4.6 %
Doba analýzy	12 min

Stabilita vzoků: Při pokojové teplotě až 3 dny
při +2 až +8 °C až 1 týden

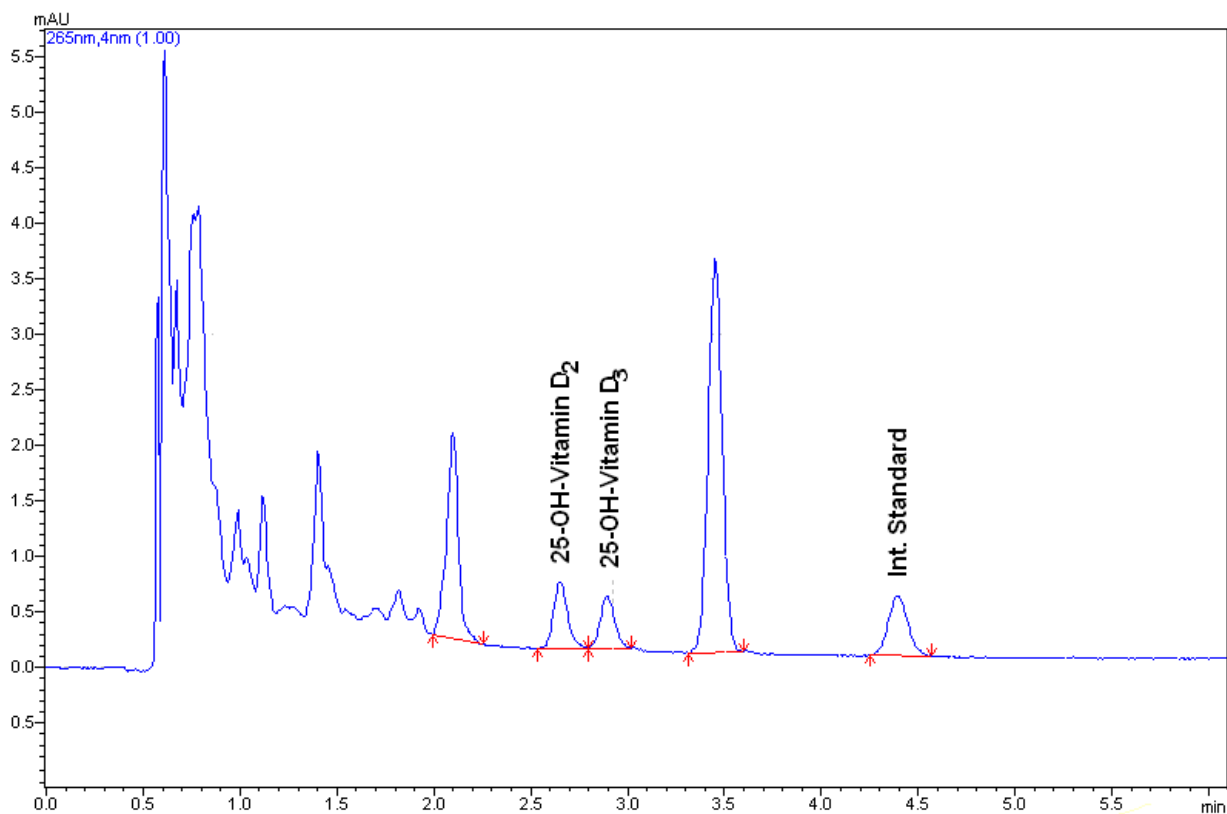
V příbalovém letáku HPLC soupravy firmy Chromsystems na stanovení 25(OH)D3, 25(OH)D2 byl přiložen také chromatogram [chrom. 14], ze kterého je patrné dobré rozdělení obou metabolitů včetně vnitřního standardu.

Na dalším chromatogramu [chrom. 15] je zachycen náš záznam analýzy reálné směsi standardů z HPLC soupravy Chromsystems, kterou jsme připravili a analyzovali přesně podle návodu v příbalovém letáku na koloně, která byla součástí této soupravy a s mobilní fází ze stejného setu. Složení mobilní fáze, ani typ HPLC kolony nám nebyl znám.

Chromatogram 14: Chromsystems - standardy 25(OH)D3, 25(OH)D2 – příbalový leták



Chromatogram 15: Chromsystems - standardy 25(OH)D3, 25(OH)D2 – vlastní analýza



V reálné analýze došlo k posunu retenčních časů všech standardů vitamínu D oproti záznamu z příbalového letáku. Souvisí to pravděpodobně s použitou instrumentací – HPLC Prominence.

Současně s analýzou standardů jsme zpracovali dle uvedeného postupu v příbalovém letáku firmy Chromsystems i vzorky lidských sér. Záznamy chromatogramů nejsou uvedeny, protože separace nebyla dostatečná, pravděpodobně špatný výsledek analýzy souvisel s preanalytickou úpravou vzorků sér pomocí SPE extrakce. K dispozici jsme měli od firmy pouze několik SPE kolonek, takže jsme SPE extrakci nemohli zopakovat.

13 Shrnutí

Ve své práci jsem začala s vývojem metody pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů. Mým úkolem bylo najít vhodný chromatografický systém, který by dovolil analyzovat v jednom vzorku 1,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃, D₂ a D₃ s využitím vnitřního standardu, protože analýza bude prováděna z biologického materiálu.

Při hledání vhodného složení mobilní fáze se ukázala jako nevhodnější kombinace organických rozpouštědel MeOH : ACN : H₂O v poměru 12,5 : 85 : 2,5.

Byla částečně provedena validace proměřením opakovatelnosti. Pro vitamíny D (D₂, D₃) a jeho metabolity (1,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃) jsou hodnoty RSD 1,59 – 1,98%, což vyhovuje podmínce opakovatelnosti, která je pro biologický materiál stanovena do 5%.

Vyzkoušeli jsme také vliv typu kolony na separaci daných analytů. Při vývoji metody jsme používali monolitické kolony. Na koloně Chromolith Performance RP-18e, 100-4,6 došlo za daných podmínek k dobré separaci sledovaných analytů. Na kratší koloně Chromolith Performance RP-18e, 50-4,6 byly analyty také dostatečně separovány a navíc se doba analýzy zkrátila téměř o polovinu. Užší kolona Onyx C18, 100-3,0 se ukázala jako naprosto nevhodná.

Ověřili jsme také robustnost metody (měření na dvou HPLC přístrojích, vliv teploty na analýzu). V tomto ohledu je metoda dostatečně robustní.

14 Závěr

Úkolem mé diplomové práce byl vývoj HPLC metody pro stanovení derivátů vitamínů D (D_2 , D_3 , $1,25(OH)_2D_3$ a $25(OH)D_3$) v lidském séru pro klinické využití u pacientů s poruchami ledvinných funkcí. Cílem bylo najít vhodnou, rychlou a dostupnou metodu s použitím moderní instrumentace, a tím zlepšit diagnostické možnosti.

Jako nejvhodnější systém pro stanovení daných látek byl vybrán: mobilní fáze methanol : acetonitril : voda v poměru složek 12,5 : 85 : 2,5, s průtokem 1,5 ml/min, teplotou 25°C, nástřikem 20 μ l, s detekcí při vlnové délce 265 nm a vnitřním standardem tokolem. Metoda byla vyzkoušena pouze na standardech a ověřena v koncentracích očekávaných v séru. Je použitelná pro stanovení $25(OH)D_3$, D_2 a D_3 . Domníváme se, že zřejmě nebude možné tuto metodu použít pro metabolit $1,25(OH)_2D_3$ vzhledem k jeho nízkým fyziologickým koncentracím v séru.

Ve vývoji a optimalizaci metody se bude dále pokračovat. Pro další postup bych doporučila ověřit mobilní fázi ve složení methanol : acetonitril : tetrahydrofuran. Při porovnání kolon se ukázala nejvhodnější vzhledem k dobré separaci a podstatnému zkrácení doby analýzy monolitická kolona Chromolith Performance RP-18e, 50-4,6, proto by byla vhodnou variantou pro další validaci.

15 Literatura:

- [1] Wikipedie - [Http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_D](http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_D) [online]. 2001 , 8 April 2008, at 17:24 [cit. 2008-04-10]. Dostupný z WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Calciferol>>
- [2] Spustová V., Dzúrik R.: Vitamín D: syntéza, metabolismus, regulácie a hodnotenie deficitu u pacientov s chronickým ochorením obličiek, *Vnitřní lékařství*, 50, (2004), 537-543
- [3] Dusilová-Sulková S.: přednáška Význam vitamínu D a jeho analog v nefrologii, Hradec Králové (2007)
- [4] Dusilová-Sulková S.: přednáška Chronické selhání ledvin a receptory pro vitamín D, Hradec Králové (2006)
- [5] Sulková S., Fořtová M., Uhrová J., Zima T.: An Importance of Vitamin D Metabolites Assessment in Patients with Impaired Renal Function, *Vnitřní lékařství*, 50, (2004), 510-518
- [6] Song W.O., Beecher G.R., Eitenmiller R.R.: Modern Analytical Methodologies in Fat- and Water- Soluble Vitamins, John Wiley & Sons, Inc. Vol. 154 in *Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications*, J.D. Winerfordner, Series Editor, New York/Chichester/Weinheim/Brisbane/Singapore/Toronto, (2000), 51-79
- [7] Sulková S., Fořtová M., Uhrová J., Zima T et al.: přednáška Prospektivní sledování koncentrací kalcitriolu a kalcidiolu v krevním séru při snížené funkci ledvin, Hradec Králové (2006)
- [8] DiaSorin, Stillwater, Minnesota 55082-0285, katalog. číslo 68100E, (2007), USA – příbalový leták
- [9] Racek J. et al.: *Klinická biochemie*, druhé, přepracované vydání, Galén, Praha, (2006), 107
- [10] Zima T.: *Laboratorní diagnostika*, druhé, doplněné a přepracované vydání; Galén, Praha, (2008), 202, 261, 263, 372, 794
- [11] Vávrová J. a spol.: *Vitaminy a stopové prvky 2007 Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi*, vydavatel Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP, SEKK spol. s.r.o., Pardubice, (2007), 18, 35-40, 61-62, 68-69

- [12] Mata-Granados J.M., Luque de Castro M.D., Quesada J.M.: Fully automated method for the determination of 24,25(OH)₂ and 25(OH)D₃ hydroxyvitamins, and Vitamins A and E in human serum by HPLC; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35, (2004), 575-582
- [13] Granado-Lorenzo F., Olmedilla-Alonso B., Herrero-Barbudo C., Blanco-Navarro I., Blázquez-García S., Pérez-Sacristán B.: Simultaneous determination of vitamins A, E and 25-OH-vitamin D: Application in clinical assessments; *Clinical Biochemistry* 39, (2006), 180-182
- [14] Brunetto M.R., Obando M.A., Galignani M., Alarcón O.M., Nieto E., Salinas R., Burguera J.L., Burguera M.: HPLC determination of Vitamin D₃ and its metabolite in human plasma with on-line sample cleanup; *Talanta* 64, (2004), 1364-1370
- [15] Ortiz Boyer F., Fernández Romero J.M., Luque de Castro M.D., Quesada J.M.: Determination of vitamin D₃ hydroxymetabolites in plasma at the sub-part per trillion levels using on-line cleanup/preconcentration and HPLC-fluorimetric post-column derivatisation; *Talanta* 50, (1999), 57-66
- [16] Benmoussa A., Delaurent C., Lacout J.-L., Loiseau P.R., Mikou M.: Determination of cholecalciferol and related substances by calcium phosphate hydroxyapatite and calcium phosphate fluoroapatite high-performance liquid chromatography; *Journal of Chromatography A*, 731, (1996), 153-160
- [17] Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: *Harperova Biochemie*, dvacáté třetí vydání (čtvrté české vydání), nakladatelství H+H, Vyšehradská, s.r.o., Jinočany, (2002), 621, 546, 622, 771, 817, 156, 158, 544, 545, 623
- [18] www.newhopeblog.com/archives/2007/06/study_vitamin_d.php stránky navštíveny dne 21.4.2008
- [19] www.nature.com/nrc/journal/v7/n9/fig_tab/nrc2196_F1.html stránky navštíveny dne 21.4.2008
- [20] www.mayoclinicproceedings.com/inside.asp?AID=1672&UID stránky navštíveny dne 21.4.2008
- [21] Levin A., Li YC.: Vitamin D and its analogues: do they protest against cardiovascular disease in patients with kidney disease?; *Kidney Int.*, 68, (2005), 1973-1981

- [22] Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Wolf M, Vasan RS.: Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease; *Circulation.*, 117, (2008), 503-511