

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
Katedra organické chemie

Václav Šojdr

*Srovnání dvou metod stanovení vitamínu D v krevním séru*

Diplomová práce

Studijní obor: Bioorganická chemie N1407

Vedoucí práce: RNDr. Martin Novák

Olomouc 2014

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Martina Nováka. Využil jsem pramenů uvedených v seznamu použité literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci .....

.....

Václav Šojdr

Diplomová práce byla vypracována v Laboratoři klinické biochemie a hematologie v Kroměříži.

Děkuji RNDr. Martinu Novákovi, MUDr. RNDr. Pavlu Neshybovi, Csc., Ing. Šárce Žákové za informace, rady a čas, který mi poskytli při mé práci.

**Bibliografická identifikace:****Jméno a příjmení autora:** Václav Šojdr**Název práce:** Srovnání dvou metod stanovení vitamínu D v krevním séru**Typ práce:** Diplomová**Pracoviště:** Laboratoř klinické biochemie a hematologie v Kroměříži**Školitel:** RNDr. Martin Novák**Školitel-konzultant:** MUDr. RNDr. Pavel Neshyba, Csc.**Rok obhajoby práce:** 2014**Abstrakt:**

Vitamín D se stal v posledních letech velmi sledovaným markerem v klinické biochemii z důvodu jeho vlivu na lidský organismus. Doposud nejsou stanoveny obecně platné referenční hodnoty hladiny vitamínu D. Existuje několik doporučení, které se méně nebo více liší. I z těchto důvodů vznikla práce, která byla zaměřena na nejmladší populaci převážně do 1 roku věku. V první části práce je zpracována rešerše o vitamínu D a jeho formách. V praktické části jsou uvedeny výsledky srovnání měření vitamínu D. Bylo provedeno srovnání výsledků mezi analyzátozem Cobas e411 od firmy ROCHE, který měří celkovou koncentraci vitamínu D na principu imunochemické reakce metodou elecsys vit. D total, a metodou HPLC-MS/MS, která měří vitamín D3, vitamín D2, C3-epi(OH)D3, 24,25(OH)<sub>2</sub>D3.

**Klíčová slova:** Vitamín D3, C3-epi(OH)D3**Počet stran:** 71**Počet příloh:** 0**Jazyk:** Český

**Bibliographical identification:****Author's first name and surname:** Václav Šojdr**Title:** Comparison of two methods for the determination of vitamin D in the blood serum**Type of thesis:** Masters**Department:** Laboratoř klinické biochemie a hematologie v Kroměříži**Advisor:** RNDr. Martin Novák**Advisor-consultant:** MUDr. RNDr. Pavel Neshyba**The year of presentation:** 2014**Abstract:**

Vitamin D has become a closely followed marker the clinical biochemistry in recent years. It's because of effect vitamin D on the human body. Generally valid reference levels of vitamin D are not established yet. There are several recommendations that are more or less different. For these reasons I created the work, which focused mainly on the youngest population under 1 year of age. In the first part of the thesis is research on vitamin D and its other forms. In the practical part the results are compared to measurements of vitamin D. Results were compared between the method of elecsys vit. D total which measured vitamin D total on analyzer COBAS E411 from Roche, and the HPLC-MS/MS, which measured vitamin D3, vitamin D2, C3-epi(OH)D3, 24,25(OH)<sub>2</sub>D3.

**Keywords:** vitamin D3, C3-epi(OH)D3**Number of pages:** 71**Number of appendixes:** 0**Language:** czech

## 1. Seznam zkratk

VDBP – vitamín D vážící protein

NHANES – Nation Healthy and Nutrition Examination Surveys

EDCF – endotel-odvozený konstriční faktor

TBC – tuberkulóza

Vit.D – vitamín D

HPLC MS/MS – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

UVB – ultrafialové záření B

IU – mezinárodní jednotka

UV – ultrafialové záření

DNA – deoxyribonukleová kyselina

nm – nanometr

ml – mililitr

ug – mikrogram

Obr. – obrázek

PTH – parathormon

PTH1/2R – receptor 1/2 pro parathormon

CYP – cytochromy P450

GPCR – receptor spřažený s G-proteinem

VDR – receptor pro vitamín D

DM1 – diabetes mellitus 1: stupně

MHC-2 – hlavní histokompatibilní komplex 2

Th1/2 – T pomocná buňka 1/2

IL – interleukin

US army – armáda spojených států

nmol – nanomol

dl – decilitr

kg – kilogram

i.m. – intramuskulárně

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

C – celsium

CG/MS – plynová chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem

Oasis HLB – hydrofilní – lipofilní rovnováha

min. - minuta

RP – obrácené fáze

kV – kilovolt

RP – ADS – obrácené fáze – alkyl-diol silica

mM – milimol

MRM – multiple reaction monitoring

Tab. – tabulka

uA – mikroampér

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

CV<sub>a</sub> – chyba analytická

VK - variační koeficient

CV<sub>i</sub> – chyba intra-individuální

Rt – retenční čas

## Obsah

1. Seznam zkratek .....	6
2. Úvod .....	9
3. Teoretická část.....	11
3.1. Vitamíny .....	11
3.2. Charakteristika vitamínu D.....	12
3.3. Formy vitamínu D .....	12
3.3.1. Zdroje vitamínu D .....	14
3.3.2. Biosyntéza a metabolismus vitamínu D .....	15
3.3.3. Regulace vitamínu D.....	20
3.3.4. Biologická aktivita .....	21
3.4. Měření vitamínu D .....	29
3.4.1. Analyt.....	29
3.4.2. Instrumentace .....	29
3.5. Vyhodnocovací metody .....	35
3.5.1. Normální hodnoty .....	35
3.5.2. Normální hodnoty vitamínu D.....	36
3.5.3. Statistické metody vyhodnocení.....	39
4. Praktická část.....	42
4.1. Pacienti .....	42
4.2. Výsledky.....	43
4.2.1. Výsledky celkového souboru vzorků pro metodu elecsys vit. D total.....	43
4.2.2. Srovnání metod.....	48
4.2.3. Vývoj množství forem vitamínu D .....	64
5. Diskuze .....	66
6. Závěr .....	68
7. Literatura.....	69



## 2. Úvod

Trendem zkoumání posledních let v klinické biochemii se stal bezpochyby vitamín D. Zájem o toto téma každým rokem roste, proto vzniká mnoho prací, které propojují zejména molekulární biologii a klinickou biochemii. Vitamín D je látka velmi komplexní. I díky velkému množství forem, které vytváří, je popsání jeho účinků velmi složitým tématem, které zasahuje do řady metabolických drah.

Proč se soustředit právě na dokonalé porozumění vitamínu D? Pokud se podíváme na jeho význam z historického hlediska, jaké jsou jeho projevy, dostaneme se do 19. století, kde první zjištění, že existuje něco jako vitamín D, přinesla křivice. Půjdeme-li po časové přímce blíže k 21. století, dostaneme se k tuberkulóze (TBC). Aniž by si to lidé uvědomovali, právě díky vitamínu D vzniklého sluněním se v sanatoriích, se částečně dařilo bojovat proti TBC. V druhé polovině 20. století již byl vitamín D, alespoň některé jeho formy, a částečné jeho syntéza známa. V dnešní době víme, že má vliv na 500 a více lidských genů. Zapojuje se do kalcium-fosfátového systému. Jeho biologická aktivita souvisí se správnou funkcí srdeční soustavy, brání vzniku nádorových bujení a stejně zvyšuje odolnost proti dalším onemocněním, které dnes sužují lidstvo.<sup>4, 5, 9, 19</sup>

Pro vznik nejrůznějších studií je potřeba vitamín D analyzovat. V dnešní době je možné díky technice analyzovat jak geny a proteiny, které nějak interagují s vitamínem D a jeho formami, tak koncentraci celkového vitamínu D nebo jeho jednotlivých forem, které jsou přítomné v lidském séru. S rostoucím množstvím studií vzniká mnoho odpovědí, ale tyto odpovědi často odhalí další otázky. Příkladem je snaha vytvořit referenční rozmezí pro vitamín D. Je mnoho studií, které poskytly závěry s navrženým referenčním rozmezím. Avšak tyto závěry se částečně rozcházejí u hodnot určujících deficitní stav a stav avitaminózy a hypervitaminózy. I proto se dnes spíše mluví o hodnotě odpovídající normálnímu všeobecnému zdraví, která činí 75 nmol/l.<sup>9, 24, 25, 26, 27, 29, 31</sup>

Aby data získaná ze studií byla porovnatelná, musí se ověřovat spolehlivost jednotlivých metod měřících stejný analyt mezi sebou. Za tímto účelem vznikla tato práce, která porovnává výsledky vitamínu D total (vit. D total) měřené metodou elecsys vit. D total na přístroji cobas E411 ROCHE s metodou kapalinové chromatografie sloužící spíše pro výzkumné účely. Použitá metoda kapalinové chromatografie poskytla

výhodu důkladnější analýzy vzorků. Jedná se o systém HPLC MS/MS, který je schopen analyzovat množství jednotlivých forem vitamínu D ve vzorku.

Aby práce byla přínosem, byla zaměřena na oblasti, které nejsou dokonale zmapované. Detailní detekce jednotlivých forem vitamínu D není jediný faktor specifičnosti práce, ale i výběr vzorku byl volen tak, aby navýšil množství dat, kde jich není doposud mnoho. Výsledky tedy poskytnou detailní náhled na množství jednotlivých forem vitamínu D u nejmladší populace ve věku od 0 - 15 let.

Naměřená data jsou v praktické části zpracována do grafů a vyhodnocena. Teoretický podklad k pochopení důležitosti vitamínu D je sepsán v rešeršní části. Měl by poskytnout přehled jednotlivých forem vitamínu D, který se běžně vyskytuje v lidském organismu. Dále pak základní metabolismus a jeho rozšíření o vedlejší dráhy, při kterých vznikají epimery základních metabolitů. Právě důležitost epimerních forem je v posledních letech intenzivně zkoumána. I v této jsou zmíněny jedny z prvních zjištěných specifických biologických účinků tohoto vitamínu. Mimo specifické vlastnosti epimerických forem vitamínu D je i přiblížena důležitá role, kterou hraje při kalcium-fosfátovém metabolismu, srdeční funkci aj. Obecně se dá říci, že díky jeho biologickým účinkům je nesporně esenciální látkou pro lidský organismus. V závěrečné části rešerše jsou vysvětleny vyhodnocovací metody, které byly použity ke zpracování výsledků, a metody použité k měření.<sup>31</sup>

### 3. Teoretická část

#### 3.1. Vitamíny

V historii umírali lidé za různých okolností. Pravděpodobně by tehdy málokoho napadlo, že některá onemocnění mohou souviset s pestrostí stravy. Učebnicovým příkladem jsou námořníci trpící různými problémy z důvodů jednotvárné stravy. Ve snaze vysvětlit tuto skutečnost, vznikaly pokusy, kdy byla upravena strava pro myši, aby odpovídala stravě lidí izolovaných na lodi. Myši krmené bílkovinami, tuky, cukry, solí a vodou onemocněly a uhynuly. Poté bylo zjištěno, že je tuto směs nutno obohatit o mléko, případně o extraktivní látky přítomné v běžné potravě. Látky přidávané do směsi byly nazvány přídatnými činiteli potravin. Funk je v roce 1912 nazval vitamíny neboli životní aminy ač ne všechny vitamíny obsahují aminoskupinu.<sup>16</sup>

Dnes již známou obecnou vlastností vitamínů je, že si je lidský organismus nedokáže sám vytvořit. Proto je nutné zajistit jejich příjem z potravy. Pokud není zajištěn, může dojít k avitaminóze. Pravděpodobně nejznámější nemocí spojenou s avitaminózou jsou kurděje. Konkrétněji se jedná o nedostatek vitamínu C, který se negativně projevil právě u zmiňovaných námořníků. Další známou nemocí je křivice. Křivice může být způsobena jak nedostatkem vitamínu D, tak nedostatkem vápníku. Dříve se křivice projevila v oblastech, kde lidé trpěli hladem nebo kde byl tak hustý smog, že sluneční záření neprocházelo v dostatečné míře. Příkladem jsou města v Anglii během průmyslové revoluce.<sup>16</sup>

Opakem avitaminózy je hypervitaminóza. K tomuto stavu, přispívá fakt, že některé vitamíny jsou rozpustné v tucích. U vitamínů rozpustných ve vodě je riziko velmi nízké, protože mohou být z těla snadno vyloučeny močí. Naopak u vitamínů rozpustných v tucích hrozí riziko hypervitaminózy, protože tělo je může snadno zadržovat díky lipofilní povaze.<sup>16</sup>

### 3.2. Charakteristika vitamínu D

Vitamínem D, který patří do skupiny vitamínů rozpustných v tucích, se označuje souhrnně několik forem steroidních hormonálních prekurzorů. Často jsou označovány jako kalciferoly. Nejznámějšími formami kalciferolů jsou ergokalciferol označovaný jako D<sub>2</sub> a cholekalciferol neboli D<sub>3</sub>. Základní funkční vlastností je příspěvek k procesu vápenatění kostí. Při avitaminóze vzniká u rostoucího organismu již zmiňovaná křivice – rachitis, u dospělého osteoporóza a osteomalacie, jejímž projevem je řídnutí kostí. Z těchto i jiných později zmíněných důvodů, se stal vitamín D sledovaným biochemickým markerem.<sup>5, 15, 16</sup>

Jednou z důležitých vlastností biochemických markerů je stabilita. Bylo zjištěno, že vitamín D je v krevním séru „odolný jako skála“. Vzorokly i po několika dnech za pokojové teploty měly stejnou hodnotu koncentrace. Při zmrazení na teplotu -20°C byl vzorek stabilní přes půl roku. K degradaci nedocházelo ani při několikanásobném rozmrazování.<sup>1</sup>

### 3.3. Formy vitamínu D

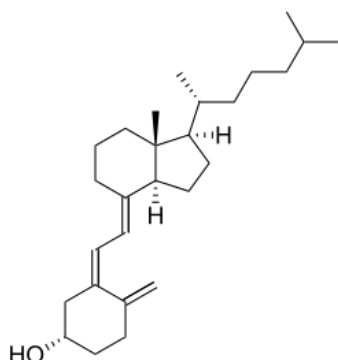
Ergokalciferol je znám také pod obchodním názvem calcidiol, deltalín, drisdol. Původ ergokalciferolu je z rostlin a hub. Prekurzory pro jeho biosyntézu jsou morfin a ergosterol. Ergokalciferol byl shledán stejně účinný jako cholekalciferol, a proto se dnes využívá jako vitamínový doplněk, případně k fortifikaci jídla. Je získáván z kvasinkového ergosterolu pomocí UV záření.<sup>2</sup>

Cholekalciferol je živočišného původu. Dalším názvem, pod kterým je znám je kalciol. Prekurzorem pro biosyntézu kalciolu je 7-dehydrocholesterol. Pro biosyntézu je opět potřeba přítomnost UV záření. Samotný cholekalciferol je neaktivní formou vitamínu D<sub>3</sub>.<sup>16</sup>

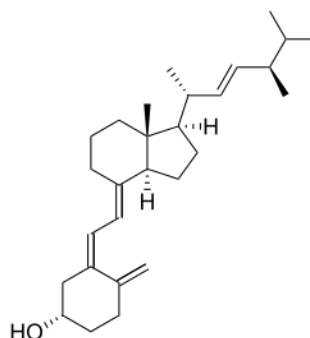
Mezi další formy vitamínu D<sub>3</sub> patří kalcifediol a kalcitriol. Kalcifediol je také nazýván kalcidiolem, hydroxycholekalcirolelem a nebo 25(OH)D<sub>3</sub>. Aktivní formou vitamínu D<sub>3</sub> je kalcitriol známý též jako 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Jednotlivé struktury vitamínu D

mohou také vytvářet odlišné isomery pomocí hydroxy skupin. Jednotlivé epimery budou přiblíženy později v části metabolismu vitamínu D.<sup>3, 16</sup>

Obr. 1. Cholekalciferol<sup>42</sup>



Obr. 2. Ergokalciferol<sup>41</sup>



Tab.1. Nomenklatura sloučenin vitamínu D<sup>3</sup>

Aktuální triviální název	Doporučený triviální název	Systematicky steroidní název
Cholekalciferol	kalciol nebo cholekalciferol	(5 <i>Z</i> , 7 <i>E</i> ) - (3 <i>S</i> ) -9,10-seco-5, 7,10 (19)-cholestatrien-3-ol
25-hydroxycholekalciferol	kalcidiol	(5 <i>Z</i> , 7 <i>E</i> ) - (3 <i>S</i> ) -9,10-seco-5, 7,10 (19)-cholestatriene-3 ,25-diol
1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholekalciferol	kalcitriol	(5 <i>Z</i> , 7 <i>E</i> ) - (1 <i>S</i> , 3 <i>R</i> ) -9,10-seco-5, 7,10 (19)-cholestatriene-1 ,3,25-triol
Ergokalciferol	erkalciol nebo ergokalciferol	(5 <i>Z</i> , 7 <i>E</i> , 22 <i>E</i> ) - (3 <i>S</i> ) -9,10-seco-5, 7,10 (19) ,22-ergostatetraen-3-ol <sup>b</sup>
1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyergokalciferol	erkalcitriol	(5 <i>Z</i> , 7 <i>E</i> , 22 <i>E</i> ) - (1 <i>S</i> , 3 <i>R</i> ) -9,10-seco-5, 7,10 (19) ,22-ergostatetraen-1 ,3,25-triol <sup>c</sup>
22,23 Dihydroergokalciferol	(24 <i>S</i> )-methylkalciol nebo 22,23 dihydroerkalciol	(5 <i>Z</i> , 7 <i>E</i> ) - (3 <i>S</i> ) -9,10-seco-5, 7,10 (19)-ergostatrien-3-ol <sup>c</sup>
1 $\alpha$ , 24 <i>R</i> , 25-Trihydroxycholekalciferol	kalcitetrol	(5 <i>Z</i> , 7 <i>E</i> ) - (1 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 24 <i>R</i> ) -9,10-seco-5, 7,10 (19)-cholestatriene-1 ,3,24,25-tetrol
Previtamin D <sub>3</sub>	(6 <i>Z</i> )-takalciol	(6 <i>Z</i> ) - (3 <i>S</i> ) -9,10-seco-5 (10) ,6,8-cholestatrien-3-ol
Tachysterol <sub>3</sub>	takalciol	(6 <i>E</i> ) - (3 <i>S</i> ) -9,10-seco-5 (10) ,6,8-cholestatrien-3-ol
Isovitamin D <sub>3</sub>	(5 <i>E</i> )-isokalciol	(5 <i>E</i> , 7 <i>E</i> ) - (3 <i>S</i> ) -9,10-seco-1 (10) ,5,7-cholestatrien-3-ol
Dihydratachysterol <sub>3</sub>	dihydroerkalciol	(5 <i>E</i> , 7 <i>E</i> ) - (3 <i>S</i> , 10 <i>S</i> ) -9,10-seco-5 ,7-cholestadien-3-ol

### 3.3.1. Zdroje vitamínu D

Nejefektivnějším zdrojem vitamínu D je naše vlastní tělo. Pokud je pokožka vystavena UV záření (290-315 nm), dochází ke vzniku provitamínu D3 z 7-dehydrocholesterolu. Ten je teplotou převeden na cholekalciferol. Pokud je velký nadbytek slunečního záření, je cholekalciferol převeden do inaktivních substancí na lumisterol a tachysterol, takže nehrozí toxifikace. Během 30 minut, kdy dopadá na naše ruce, tvář a tělo sluneční záření, se vytvoří osobě se světlejší kůží přibližně 10000IU vitamínu D3. Schopnost vytvářet si vlastní vitamín D3 je ovlivněna řadou faktorů. U slunečního záření je proměnným faktorem přítomnost UVB zářením a úhel dopadu záření na zemský povrch. Starší lidé a lidé s tmavší pleť musejí být vystaveni záření delší dobu. Stárnutí kůže může snížit schopnost vytvářet cholekalciferol až o 75%. UVB záření je označováno za škodlivou složku slunečního záření, která může vytvářet chyby na DNA. Proto se doporučuje chránit opalovacími krémy s ochranou proti UV záření, přičemž dochází opět ke snížení schopnosti vytvářet vitamín D až o 80% při použití ochranného faktoru 8 a více.<sup>4,5</sup>

Potravinovým zdrojem vitamínu D3 mohou být játra, vaječný žloutek nebo mléko. Nejlepším mimotělním zdrojem vitamínu D jsou ryby a rybí tuk. Hladina vitamínu D v rybách je závislá na prostředí, ve kterém ryba žila. Ryby získávají vitamín D z fytoplanktonu. Nejvyšší obsah vitamínu D je v mořských divoce žijících rybách. Nejen prostředí, ale i úprava jídla může ovlivnit negativně množství vitamínu D v potravě. Při smažení v rostlinném oleji může dojít k poklesu až o 50% množství vitamínu D. Protože jídelníčky většiny států nejsou bohaté na mořské ryby, dochází k fortifikaci jídla vitamínem D. Příkladem je Francie, kde se 100g potraviny obohatí o 1,25 ug vitamínu D. Fortifikované potraviny jsou například: Flora, Flora pro activ, Rama olovio, sýr Apetito aj.<sup>4,5</sup>

Obr. 3. Zdroje vitamínu D<sup>4</sup>

<b>potravina 100 g</b>	<b>obsah vit. D3</b>
Tresčí olej (100 ml)	500 ug (20 000 IU)
Losos, hering nebo tuňák	15-25 ug (600-1000 IU)
Sardinky v konzervě v oleji	7.5 ug (300 IU)
Ústřice	10 ug (400 IU)
Pstruh	5 ug (200 IU)
Štika	2 ug (80 IU)
Vaječný žloutek	2-3 ug (80-120 IU)

### 3.3.2. Biosyntéza a metabolismus vitamínu D

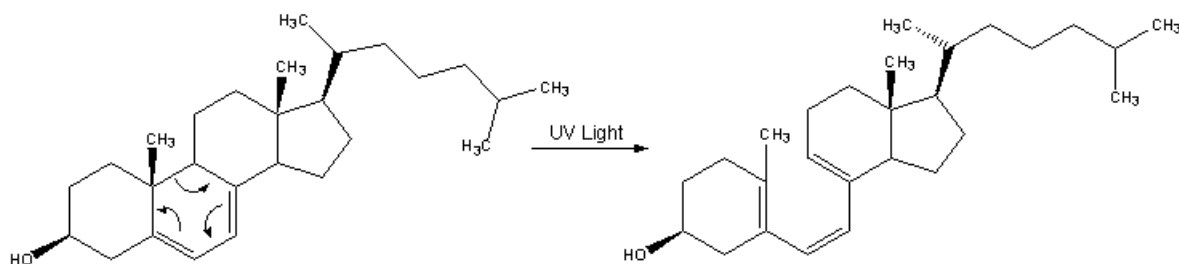
Biosyntéza vitamínu D<sub>3</sub> v lidském organismu vzniká z prekursoru 7-dehydrocholesterolu za účinků UVB záření. Jedná se o hlavní zdroj, který by měl příjem vitamínu D pokrýt přibližně z 80%.<sup>15, 16</sup>

Cholekalciferol i ergokalciferol mohou být převedeny nevratně na různé formy vitamínu D. Jako u většiny látek se jedná o oxidační a hydroxylační reakce, které mají za cíl usnadnit vyloučení látky respektive její degradaci. Při hydroxylačních reakcích mohou také vznikat různé epimery. Transport krevním řečištěm pro tělem syntetizovaný vitamín D je zajištěn proteiny, kterým se říká vitamín D-binding protein (VDBP). Prekurzory vitamínu D<sub>3</sub> přijímané potravou, jsou absorbovány v tenkém střevě a následně transportovány pomocí chylomikronů a VDBP do cílových tkání, ve kterých je vitamín D uvolněn. Vyvázaní aktivní formy vitamínu D z vazby s VDBP je důležitým faktem pro možnost stanovení jeho koncentrace.<sup>15, 16</sup>

#### 3.3.2.1. Proces biosyntézy

Vznik a počátek metabolismu vitamínu D<sub>3</sub> začíná v kůži, kde ze 7-dehydrocholesterolu vzniká nejprve provitamín D<sub>3</sub> a poté izomerační reakcí cholekalciferol. Cholekalciferol vzniklý v epidermis a dermis vstupuje do cirkulace a je transportován pomocí VDBP do jater. V hepatocytech je cholekalciferol hydroxylován na kalcidiol. Hlavní účinnou látkou je kalcitriol. Proto je nutná další hydroxylace pomocí 1 $\alpha$ -hydroxylasy. Původní teorie byla, že vzniká zejména v ledvinách. Avšak bylo zjištěno, že ledviny přispívají z 15% k celkovému množství kalcitriolu a až 85% kalcitriolu je syntetizováno v ostatních tkáních jako svaly, prs, prostata, makrofágy, B lymfocyty, aj. Jelikož funkce kalcitriolu není pouze endokrinní ale i autokrinní, je schopen sám řídit v těchto buňkách vlastní biosyntézu. Proces biosyntézy je znázorněn na Obr. 5.<sup>2, 12, 13, 20</sup>

Obr. 4. 7-dehydrocholesterol štěpený UVB za vzniku provitamínu D3<sup>7</sup>

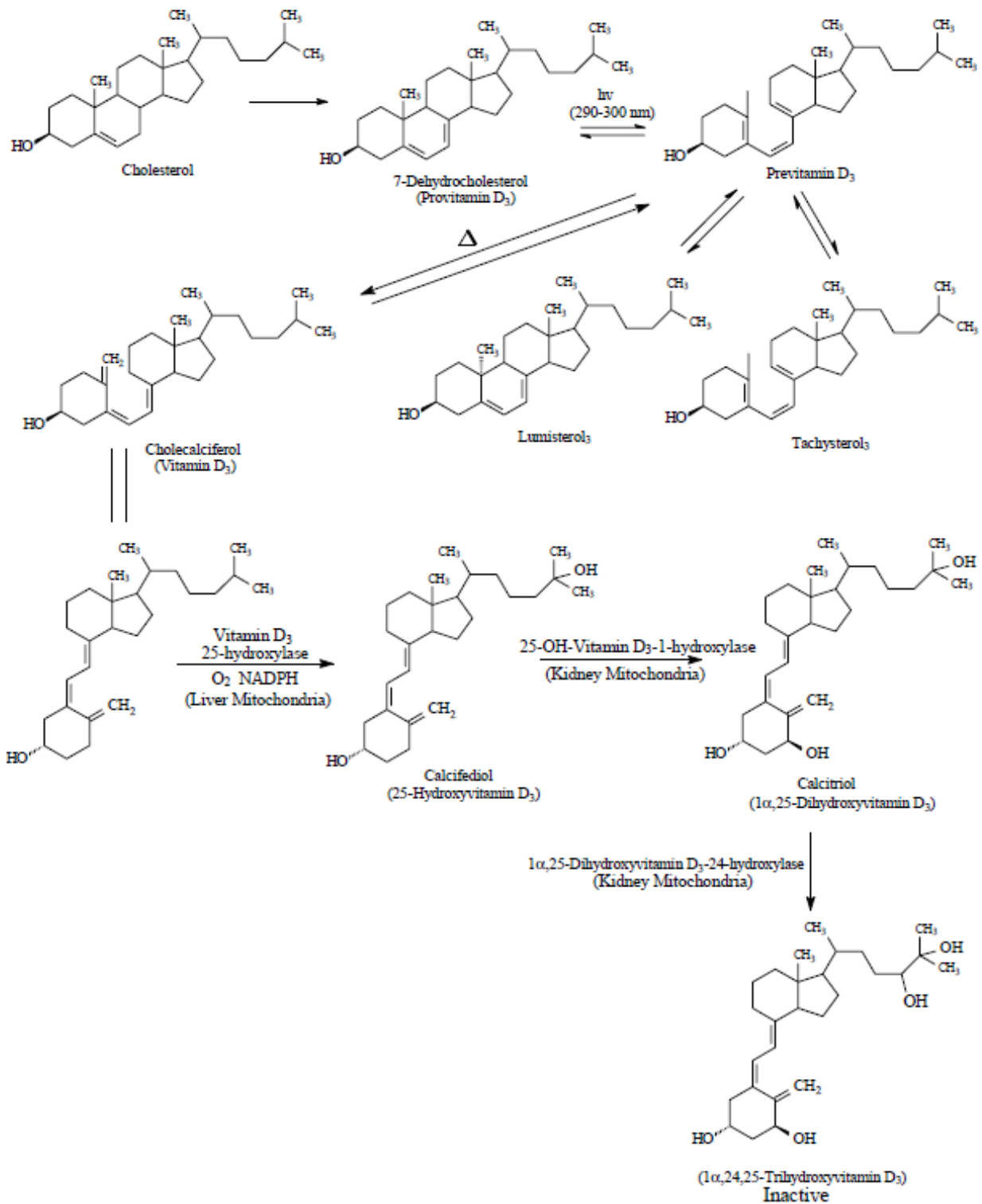


### 3.3.2.2. Vznik epimerů

Během již popsaného hlavního procesu, kdy vytvořený cholekalciferol pomocí UVB z 7-dehydrocholesterolu je hydroxylován sérií enzymů z rodiny cytochromu P450, existuje alternativní dráha, při které vznikají epimery jednotlivých forem. 25-hydroxylasa (CYP2R1) převádí cholekalciferol na 25(OH)D3 neboli kalcidiol. Stejnou enzymatickou reakcí může vzniknout i jiná forma z cholekalciferolu a to C3-epi-25(OH)D3. Obě formy vitamínu D se mohou účastnit dalších reakcí. C-24 hydroxylasa (CYP24A1) hydroxyluje obě formy na uhlíku číslo 24. Vzniknout může tedy 24(R),25(OH)<sub>2</sub>D3 nebo 3-epi-24(R),25(OH)<sub>2</sub>D3. Další možnou variantou je převedením 25(OH)D3 a 3-epi-25(OH)D3 pomocí enzymu C-1 $\alpha$  hydroxylasy (CYP27B1) na formy 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D3 nebo 3-epi-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D3. Obě poslední formy se účastní C-24 oxidační dráhy. Výskyt epimerů byl poprvé pozorován u neonatálních lidských keratinocytů.<sup>6</sup>



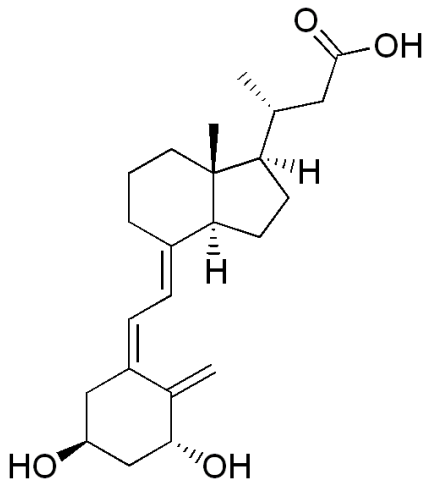
Obr. 5. Biosyntéza aktivní formy vitamínu D3 a následná inaktivace<sup>14</sup>



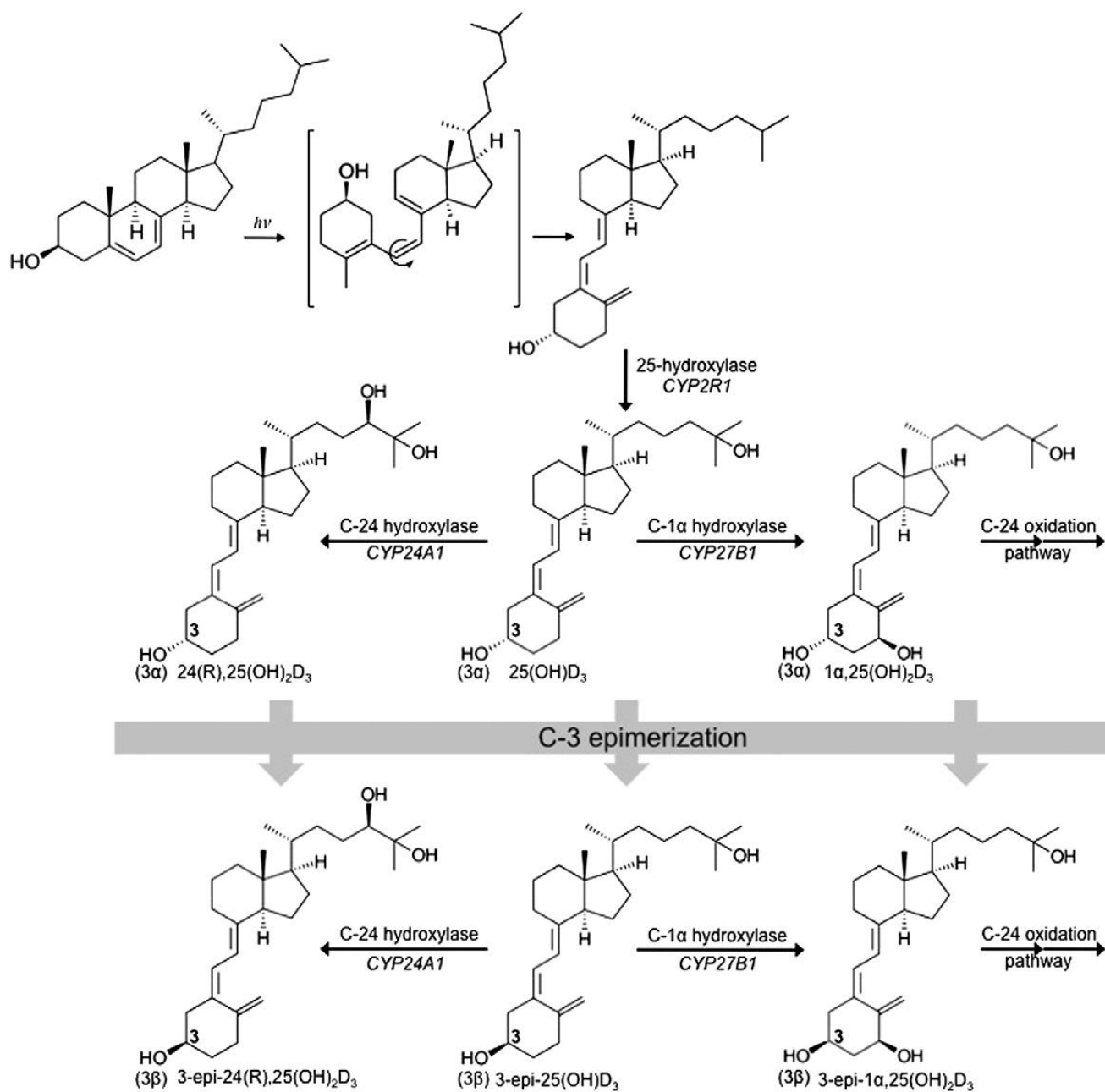
### 3.3.2.3. Deaktivace a exkrece vitamínu D

Proces vyloučení vitamínu D<sub>3</sub> začínají enzymy C-24 hydroxylasa a C-1 $\alpha$  hydroxylasa. Formy vzniklé reakcí s enzymem C-1 $\alpha$  hydroxylasou mohou být hydroxylovány C-24 hydroxylasou a následně dále metabolitovány za vzniku finálního metabolitu kalcitriové kyseliny, která je vyloučena močí. Avšak většina forem vitamínu D je exkretována do žluče.<sup>9, 10</sup>

Obr. 6. Kalcitriová kyselina<sup>11</sup>



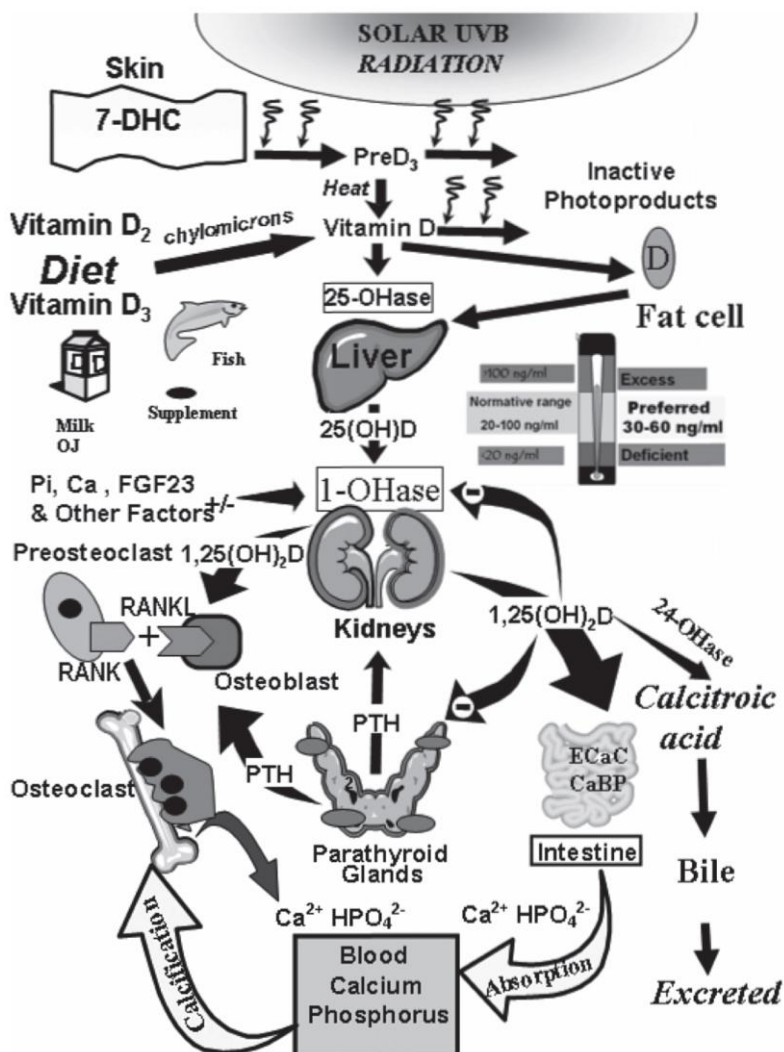
Obr. 7. Biosyntéza vitamínu D a jeho forem<sup>6</sup>



### 3.3.3. Regulace vitamínu D

Hlavními regulačním bodem syntézy aktivní formy vitamínu D je reakce zprostředkovaná enzymem C-1 $\alpha$  hydroxylasou. Jako regulační faktory zde vystupují hormon parathormon (PTH), koncentrace vápenatých iontů a fosfátu přítomného v krvi. Koncentrace vápenatých iontů a fosfátu v krvi ovlivňuje enzym přímo i nepřímo přes PTH. Aby došlo k syntéze aktivní formy vitamínu D kalcitriolu, je potřeba aktivátoru parathormonu, který aktivuje C-1 $\alpha$  hydroxylasu. Naopak enzym je inhibován vysokou koncentrací vápenatých iontů, fosfátu a 1,25(OH) $_2$ D $_3$ . Zpětná inhibice produktem - 1,25(OH) $_2$ D $_3$  C-1 $\alpha$  hydroxylasy potlačí i trans-aktivaci parathormonem. Složitý proces regulace je znázorněn na Obr. 8.<sup>18</sup>

Obr. 8. Zdroj, metabolismus vitamínu D a regulace<sup>17</sup>



Samotný parathormon je lineární peptid o 84 aminokyselinách syntetizovaný v příštítných tělískách. Jeho syntéza je aktivována nízkou hladinou vápenatých iontů v krvi. Proto jeho účinky při hypokalcémii vedou ke zvýšení koncentrace vápenatých iontů v krvi. Při hyperkalcémii dochází k inhibici syntézy. Stejně tak je sekrece snížena vysokou hladinou kalcitriolu a fosfátů. Jeho účinku podléhá kostní, ledvinová a střevní tkáň.<sup>18</sup>

Parathormon dosedá na GPCR transmembránový receptor. U savců jsou známé dva typy PTH1R a PTH2R. Přijetí signálu u kostních buněk vede k aktivaci kalciové pumpy, která z kostní tekutiny uvolňuje vápník a fosfát, tím dochází k řidnutí kosti a k zvýšení koncentrace vápenatých iontů a fosfátu v krvi. U ledvin zvyšuje PTH zpětnou absorpci vápníku a zároveň snižuje zpětnou absorpci fosfátů. Vstřebávání vápenatých iontů a fosfátů ze střeva řídí nepřímo pomocí kalcitriolu.<sup>18</sup>

#### **3.3.4. Biologická aktivita**

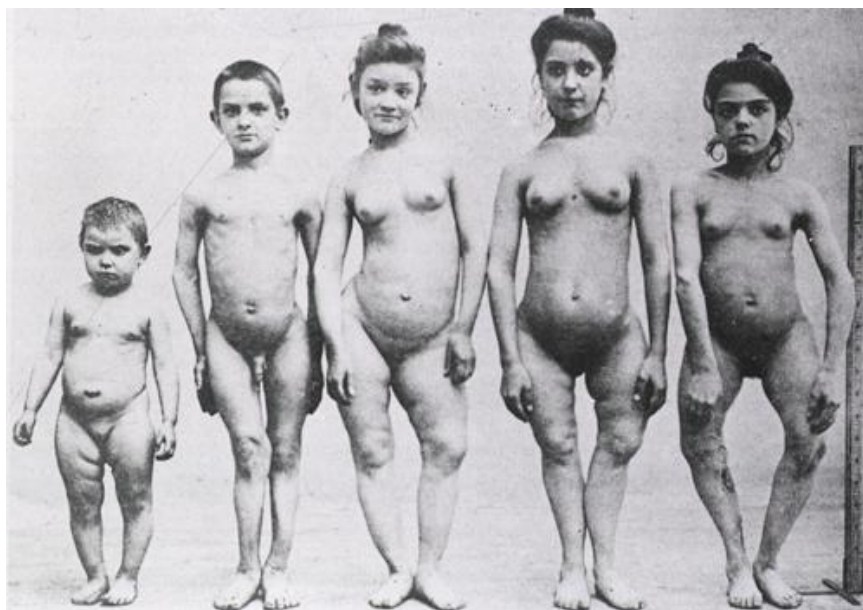
Vitamín D je díky svým mnoha funkcím esenciální látkou pro lidský organismus. Chyby, které se projeví při špatné funkci organismu z důvodu nedostatku vitamínu D, byly pozorovány již v dobách průmyslové revoluce. Stejně tak bylo možné pozorovat jeho pozitivní účinky na pacienty v sanatoriích na počátku 20. století, aniž by se vědělo, že právě vitamín D pomáhá při léčbě TBC. Mohl za to jeho pozitivní vliv na imunitní systém, kde byla stimulována syntéza antibakteriálního peptidu cathelicidinu.<sup>19</sup>

Nejdéle známou funkcí vitamínu D je jeho vliv na kostní tkáň respektive vliv na příjem substrátů pro správnou osifikaci a na děj samotný. Vitamín D má ale vliv na mnoho dalších procesů, zejména díky VDR receptorům, které ovlivňují expresi široké škály genů. Podstatné je také zjištění, že jednotlivé formy vitamínu D mohou mít různý efekt na specifickou tkáň. Právě z tohoto důvodu jsou formy vitamínu D a jejich receptory velmi aktuálním tématem. Aktuálnost tématu podpoří i fakt, že vitamín D souvisí s onemocněními, jakými jsou diabetes mellitus I. a II. typu, nádorová onemocnění, kardiovaskulární onemocnění, aj.<sup>9</sup>

### 3.3.4.1. Vliv na kalcium-fosfátový metabolismus

Deficit vitamínu D a jeho vliv na kalcium-fosfátový metabolismus je silně spjat s PTH, který zde vystupuje jako regulační prvek. Avitaminóza vitamínu D snižuje absorpci vápníku ve střevě a tím v důsledku snižuje hladinu ionizovaného vápníku v krvi. To má za následek, že receptory v příštítných tělískách posílají signál syntéze a následnému uvolnění PTH. PTH jako parakrynní hormon ovlivní řadu tkání, jak již bylo zmíněno v kapitole 4.3.3. Regulace vitamínu D. V ledvinách zapříčiní jednak tubulární reabsorpci vápníku, ale i vylučování fosfátů močí, které může způsobit nízkou hladinu fosfátů v séru. Díky jeho vlivu na kostní tkáň, může vzniknout sekundární hyperparathyreóza. PTH také interaguje s receptory na osteoblastech a tím dochází ke stimulaci tvorby osteoklastů. To vede k rozpouštění kostní matrix a minerálů. Následně se uvolní vápenaté ionty do extracelulárního prostoru. Důsledkem sekundární parathyreózy vzniká osteopenie nebo osteoporóza. Tato onemocnění, kdy dochází k řidnutí nebo úbytku kostní tkáně, zvyšují riziko zlomeniny kostí. <sup>4, 9, 16, 18, 29</sup>

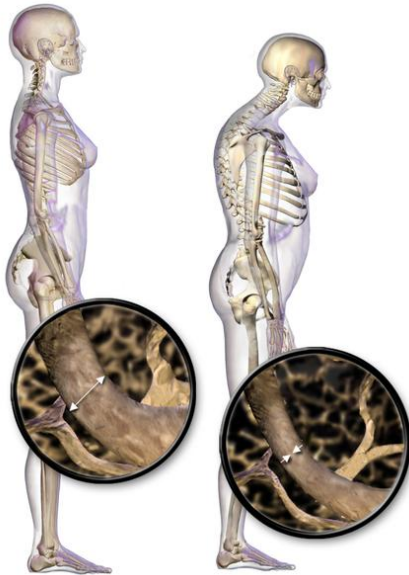
Obr. 9. Rachitis<sup>21</sup>



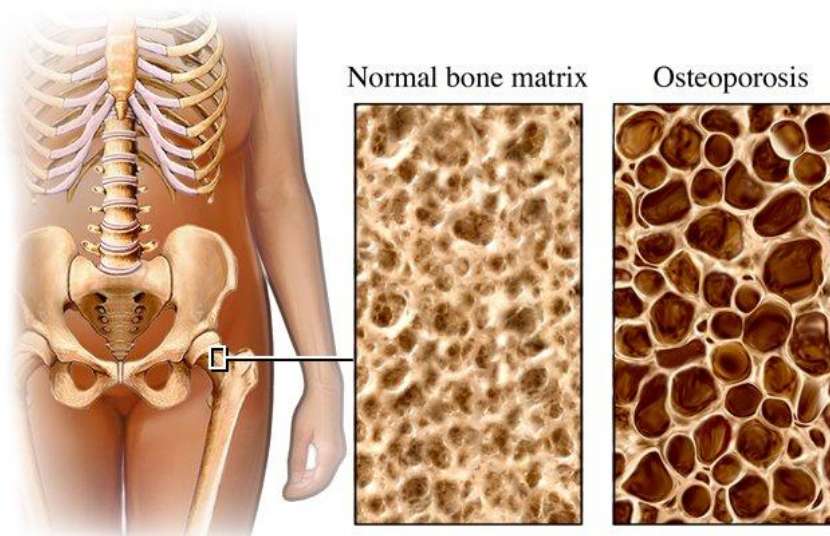
Narušení kalcium-fosfátového metabolismu způsobuje jak již zmíněnou osteomalacii a osteoporózu u dospělých, tak u rostoucích dětí deformaci kostí zvané rachitis neboli křivici. Tato deformace kostry je nevratná. Kost dítěte může být vykloněná směrem dovnitř nebo ven. Dalšími projevy, které se mohou vyskytnout, jsou deformace pánve jako oploštělost, tvar třírohého klobouku, deformace obratlů, deformace hrudníku, aj. Osteoporóza se může projevit držením těla, ale především

silně přispívá k nepříjemným zraněním starší populace, jakými jsou zlomenina krčku a jiné zlomeniny.<sup>4, 9, 16, 18, 29</sup>

Obr. 10. Osteoporóza<sup>22</sup>



Obr. 11. Osteoporóza 2<sup>23</sup>



### 3.3.4.2. Vliv na diabetes mellitus I.

Vitamín D má široké spektrum účinků na lidský organismus. Mimo již zmíněnou kalcemickou funkci obsahuje i funkce nekalcemické. Mezi jeho nekalcemické funkce patří vliv na imunitní systém, který při selhání může napadnout buňky vlastního těla. Díky autoimunitní reakci na  $\beta$  buňky pankreatu dochází k onemocnění známé pod názvem diabetes mellitus prvního typu (DM1). Autoimunitní reakce způsobí snížení jak syntézy, tak exkrece inzulínu. Výsledkem je blokáda transportu glukózy do buněk.<sup>30, 31</sup>

Vliv vitamínu D na autoimunitní reakci je zprostředkován VDR receptory přítomné v jádrech buněk. Ty ovlivňují množství genů, mezi které patří i geny imunitního systému jak vrozeného tak získaného. Mezi další geny ovlivňované VDR receptory se řadí geny pro buněčný růst, diferenciaci a s anti-proliferacním a antiflogistickým účinkem. Imunomodulační účinek  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  spočívá v ovlivnění T-lymfocytů a antigen-prezentujících buněk tak, že stimuluje fagocytózu, ale zároveň dochází k potlačení aktivity makrofágů a dendritických buněk. To vede ke zvýšené přítomnosti auto-antigenů. Stejně tak dochází ke snížení exprese MHC 2 a adhezivních molekul, které jsou nutné pro stimulaci T-lymfocytů Th1, a sekrece cytokinů, které mají prozánětlivý a T-lymfocity aktivující účinek. Výsledkem je pokles tvorby cytokinů IL-12, IL-2, tím nevzniká Th1, a naopak dochází ke zvýšené tvorbě Th2 díky IL-4.<sup>30, 31</sup>

Následky nízké hladiny vitamínu D mohou přispět ke vzniku DM1 a nejsou důsledkem tohoto nepříjemného onemocnění. Toto tvrzení potvrzuje studie US Army. Studie byla provedena u zdravých, mladých rekrutů, jejichž zamražená séra získaná při nástupu se zpětně analyzovala. Zpětná analýza byla provedena do 10 let. U později trpících na DM1 byla průměrná hladina  $25(\text{OH})\text{D}_3$  25 ng/ml, zatím co u zdravé populace byla 29 ng/ml. Při hodnotě nižší jak 17 ng/ml  $25(\text{OH})\text{D}_3$  je riziko vzniku DM1 3,5x vyšší. Stejný vliv na riziko vzniku DM1 existuje i u malých dětí. Mnoho studií potvrzuje, že pokud je zajištěn dostatečný příjem vitamínu D během gravidity a v časném dětství, riziko vzniku DM1 klesá.<sup>30, 31</sup>



### **3.3.4.3. Vliv na kardiovaskulární systém**

Dalším nekalcemickým účinkem je ovlivnění kardiovaskulárního systému. Vznik srdečních onemocnění je způsoben komplexním vlivem mnoha faktorů. Jedním z těchto faktorů je nízká hladina vitamínu D, což negativně přispívá ke vzniku onemocnění periferních arterií, ischemické chorobě srdeční, městnavého srdečního selhání, chlopenních vad, kardiomyopatií, mozkových cévních příhod a hypertenze. Vitamín D působí přímo v myokardu, ovlivňuje metabolismus v cévní stěně a systém renin-angiotenzin, kde blokuje biosyntézu reninu. Dále brání vstupu vápníku do buněk a stejně tak dochází ke snížení produkce EDCF. To má za důsledek snížení krevního tlaku. Vitamín D dále zasahuje proti kalcifikaci cévní stěny, inhibuje proliferaci endotelu a indukuje apoptosu.<sup>30, 31</sup>

Klinicky se projevuje nízká hladina vitamínu D zvýšenými vaskulárními kalcifikacemi, zvýšenou arteriální rigiditou a výrazným růstem endoteliálních buněk. Bylo vytvořeno mnoho klinických studií, které potvrdily rizikovost nízké hladiny vitamínu D. Jednou z nich je studie, které se účastnilo 1739 lidí bez kardiovaskulárních potíží. V časovém měřítku 5 let bylo zjištěno 80% zvýšení rizika výskytu kardiovaskulárních potíží u osob s hladinou vitamínu D nižší než 25 nmol/ml. V experimentech na zvířatech byl prokázán léčebný vliv vitamínu D, kdy se koncentrace sérového fosforu a vápníku znormalizovaly, ale došlo také ke zlepšení struktury a funkce srdce a tím se snížil krevní tlak.<sup>30, 31, 32, 33</sup>

#### **3.3.4.3.1. Vlastnosti různých forem vitamínu D a jejich biologická aktivita**

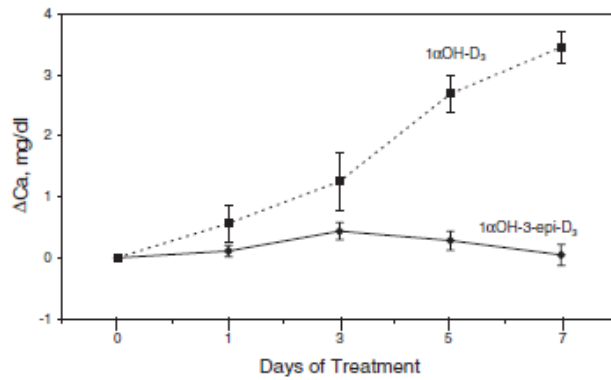
Zmíněná biologická aktivita vitamínu D a jeho forem je zprostředkována díky vitamín D vázícím receptorům, ke kterým jsou dopravovány pomocí VDBP. Tyto receptory se nachází v celém těle a ovlivňují 500 genů. Některé články uvádějí dokonce až 1000 genů. Vzhledem k celkovému počtu genů 18000-20000 se jedná o velké množství. Avšak interakce mezi jednotlivými formami vitamínu D a proteiny je různá. To vede i k odlišné biologické aktivitě. V současné době vzniká mnoho studií, které se danou problematikou zabývají. V této práci bylo využito možnosti analyzovat jednotlivé formy a cross-reaktanty viz. Kapitola 4.4.2.2. HPLC MS/MS a analýza tak

poskytla detailní rozbor množství přítomných forem vitamínu D v séru u nejmladší populace.<sup>6, 34, 43</sup>

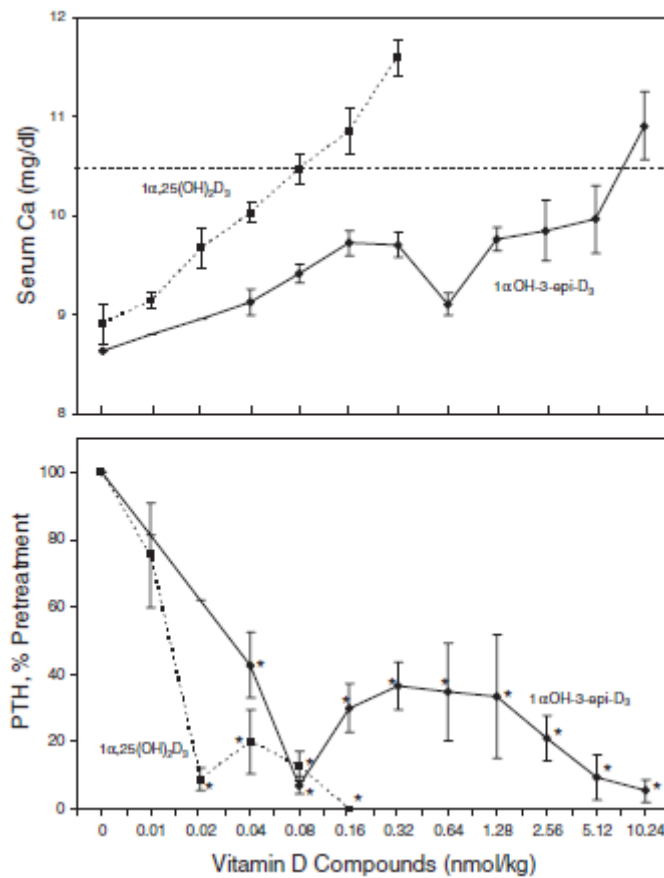
Transfer v krvi vitamínu D zajišťují VDBP, proto schopnost vytvářet vazbu s VDBP je nutná, aby mohl být přemístěn do tkáně, kde bude biologicky aktivní díky vazbě s VDR. C-3 epimery C3-epi-25(OH)D3 a C3-epi-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D3 se váží na VDBP a VDR s rozdílnou afinitou v porovnání s příslušnou 25(OH) formou D3 a 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D3. Vazbou C3-epi-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D3 na VDR se indukuje genová exprese osteokalcinu a CYP24, ale ve srovnání s 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D3 je méně aktivována. Podobně u formy C3-epi-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D3 bylo prokázáno, že má určitou antiproliferační a diferenciací aktivitu přibližně 30% a 10% ve srovnání s neepimerickými formami. Vlastností formy C3-epi-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D3 je schopnost potlačit sekreci parathormonu a vyvolat povrchově aktivní syntézu fosfolipidů v plicních buňkách alveolárního typu II. Další vlastností C3-epi-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D3 je pravděpodobně vyšší metabolická stabilita, než kterou má jeho neepimerická forma. Výzkum již přinesl řadu zjištění, avšak stále je potřeba jednotlivé formy zkoumat, protože mohou přinést řadu pozitivních nálezů, jako je účinek zmíněný v následujícím odstavci.<sup>6, 34, 43</sup>

Praktickému využití C3-epi-vitamínu D3 napomáhá schopnost potlačení exprese PTH, zatímco ostatní účinky vyvolané vitamínem D jsou téměř standardně aktivovány. Při porovnání kalcemické aktivity in vivo na krysách u 1 $\alpha$ (OH)D3 a C3-epi-1 $\alpha$ (OH)D3 bylo zjištěno, že u 1 $\alpha$ (OH)D3 byl průměrný nárůst vápníku 3.39  $\pm$  0.52 mg/dl a u epimeru se jednalo o pokles průměrně -0.05  $\pm$  0.32 mg/dl. Krysám bylo denně injekčně podáno 2.5 nmol/kg jednotlivých forem vitamínu D po 7 dní. Měření probíhala 24 hodin po podání viz. Obr. 12. Poté byl proveden podobný test u uremických krys viz. Obr. 13., při kterém bylo zjištěno, že je možné snížit hladinu PTH pomocí epimerické formy, aniž by byla vyvolána hyperkalcémie, která nastává při vyšší koncentraci vápníku v plasmě jak 10,5 mg/dl, díky nižší kalcemické aktivitě. Těmito vlastnostmi C3-epi-1 $\alpha$ (OH)D3 se teoreticky otvírá možnost pro použití při sekundární hyperparatyreóze s chronickým selháním ledvin.<sup>44</sup>

Obr. 12. Kalcemické účinky 1 $\alpha$ (OH)D<sub>3</sub> a C3-epi-1 $\alpha$ (OH)D<sub>3</sub> <sup>44</sup>



Obr. 13. Test na uremických krysách <sup>44</sup>



#### 3.3.4.4. Hypervitaminóza u vitamínu D

Popsané patologické procesy byly spojeny především s deficitem vitamínu D., avšak jak bylo dříve zmíněno, vitamín D je rozpustný v tucích a častým rizikem spojeným s touto vlastností je hypervitaminóza. U vitamínu D je velice složité dosáhnout tohoto stavu, ne-li nemožné. Výjimkou potvrzující pravidlo je případ z roku 2012. Mladý muž si během 3 měsíců zavedl i.m. 14 milionů IU vitamínu D3. Denní dávka tedy odpovídala cca 140 tisíc IU. Doporučená denní dávka přitom odpovídá 600-1200 IU a maximální denní dávka je 10000 IU. Pacient však pomocí léčby přežil a žije bez viditelných následků. Hladina kalcidiolu v jeho séru byla i po 3 měsících v toxickém pásmu, ale jak ostatní biochemické markery, tak klinické projevy se znormalizovaly.<sup>37</sup>

### **3.4. Měření vitamínu D**

#### **3.4.1. Analyt**

Vitamín D byl oběma metodami stanovován v krevním séru. Sérum je odstředěná sražená krev. Krev se srazí po 15-30 minutách po odběru při pokojové teplotě.

Stanovení je možné provést i v krevní plazmě. Pokud do odebraného vzorku krve byly přidány antikoagulační činidla, ke sražení krve nedojde a je možné ji ihned stočit. Tímto procesem se získává plazma. Jako antikoagulační činidla je možné použít například heparin nebo EDTA.<sup>45</sup>

Stabilita analytu v séru, jak již bylo zmíněno, je vysoká. Při pokojové teplotě je to několik hodin. Některé studie dokonce uvádí i několik dní. Při zmrazení na - 20°C a více je možné vzorek uchovávat i půl roku aniž by došlo k degradaci. Degradaci nezpůsobí ani opakované rozmrazování séra. Před samotným měřením je nutno zajistit, aby vzorek byl vytemperován na pokojovou teplotu.<sup>1, 45</sup>

Vitamín D má mnoho forem. Analytem při měření na analyzátoru cobas e411 ROCHE metodou elecsys vit. D total je koncentrace všech forem vitamínu D, které se váží na VDBP. Avšak u kapalinové chromatografie jsou analytem jednotlivé složky, u kterých je stanovena přesná koncentrace. Složky vitamínu D měřené kapalinovou chromatografií jsou zmíněny u jednotlivých metod.

#### **3.4.2. Instrumentace**

Vitamín D a jeho formy je možné měřit odlišnými metodami. Metody se liší především principem analýzy. Dalšími faktory, které odlišují jednotlivé metody, jsou rychlost analýzy, přesnost a náročnost obsluhy přístroje. Faktorem sjednocujícím všechny metody je nutnost uvolnit vitamín D z vazby se sérovým VDBP.

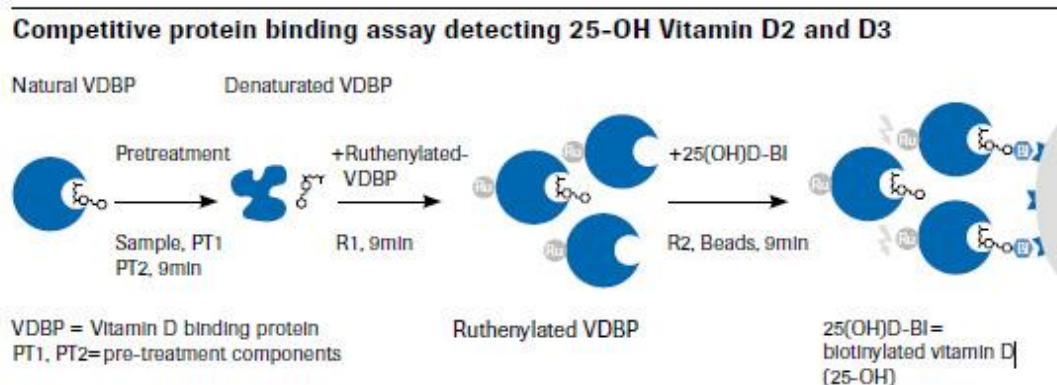
Výsledky, které vyhodnotí jednotlivé analytické systémy, mohou udávat souhrnné nebo velmi podrobné informace o vzorku. Metoda HPLC – MS/MS poskytuje podrobné výsledky, zatímco druhá použitá metoda v této práci, kterou je stanovení na základě vitamín D vážícího proteinu metodou elecsys vit. D total, je suma všech forem vitamínu D.<sup>45</sup>

#### **3.4.2.1. Cobas e411 ROCHE**

Systém od firmy ROCHE je plně automatizovaný, proto jeho obsluha není náročná. Jedná se o přístroj cobas e411 a použitou metodou je elecsys vit D. total. Samotný test trvá přibližně 30 minut. V testu se využívá vitamín D vážícího proteinu, který je značený rutheniovým chelátem.<sup>45</sup>

V prvním kroku testu, se musí vitamín D uvolnit z vazby s VDBP, který pochází z původního séra a není značený. Následně se přidá rutheniem značený VDBP. Po inkubaci, kdy vitamín D interagoval se značeným VDBP, se přidá vitamín D, na kterém je navázaný biotin. Přidaný vitamín D s navázaným biotinem se naváže na volné značené VDBP. Poslední přidanou složkou jsou mikročástice potažené streptavidinem. Streptavidin vytvoří vazbu s biotinem, a tak dojde k uchycení komplexu biotinylovaného vitamínu D se značeným VDBP na mikročástice. Reakční směs je poté nasáta do měřicí cely, kde mikročástice s komplexem jsou magnetickým polem zadrženy na povrchu elektrody. Po promytí se přivede napětí na elektrody, které vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů. Jako detektor zde slouží fotonásobič. Vyhodnocení výsledků probíhá na základě kalibrační křivky, která je vytvářena dvoubodovou kalibrací.<sup>45</sup>

Obr. 14. Princip testu Elecsys cobas E411 ROCHE<sup>24</sup>



V testu používaný VDBP váže veškeré formy vitamínu D. Jednotlivé formy, ale vykazují rozdílnou afinitu, proto pravděpodobně dochází k určitému ovlivnění výsledné hodnoty. 25(OH)D3 reaguje na 100% a 25(OH)D2 na 92%. C3-epi(OH)D3 interaguje z 91%. 24,25(OH)<sub>2</sub>D3 vykazuje zkříženou reakci 149%. Jak již bylo zmíněno, jednotlivé formy je možné stanovit pomocí podrobné analýzy metodou HPLC MS/MS. Právě rozsah vlivu na výslednou hodnotu metody elecsys vit. D total ale i ostatní „imunoeseje“ je diskutovaným tématem, který doposud není vyřešen.<sup>39</sup>

### 3.4.2.2. HPLC MS/MS

Metoda stanovení vitamínu D pomocí kapalinové chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem LC-TMS je stanovena jako referenční metoda. Referenční metoda neboli metoda podle Vogesera se využívá ke standardizaci metody elecsys vit. D total. Metodou dle Vogesera se stanovuje pouze forma vitamínu D 25(OH)D3. Proto za účelem zjištění jak cross-reaktanty ovlivňují výsledky systému elecsys vit. D total, byla použita metoda dle Baecherové, která využívá systému vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou detekcí hmotnostním spektrometrem. Metoda dle Baecherové stanovuje nejen 25(OH)D3, ale i další formy vitamínu D jako C3-epi-25(OH)D3, 24R,25(OH)<sub>2</sub>D3 a 25(OH)D2.<sup>46, 47</sup>

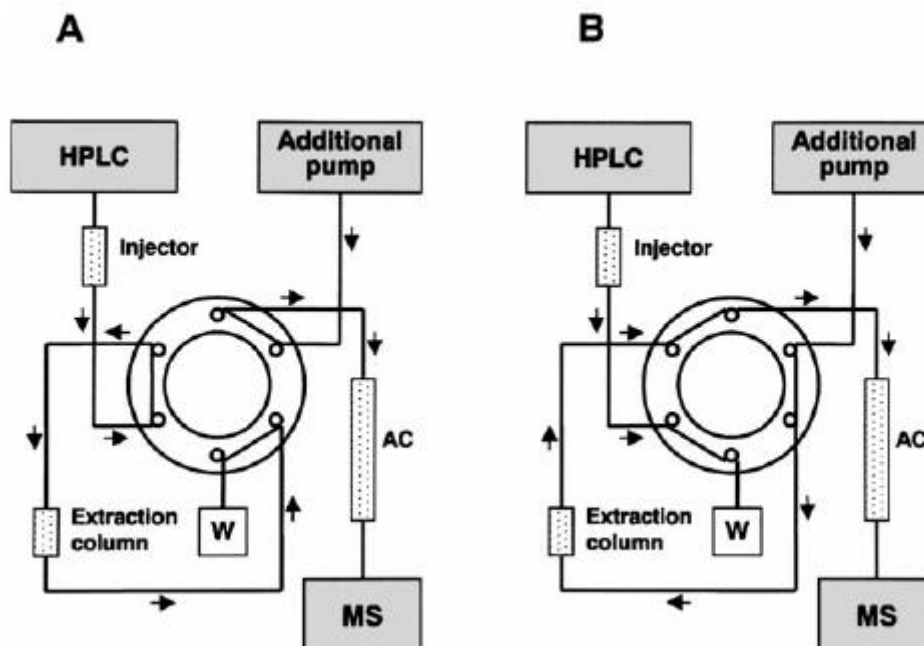
### 3.4.2.2.1. Metoda dle Vogesera

Pro přípravu vzorku pro metodu dle Vogesera je potřeba 200 ul séra, do kterého se přidá 30 ul vnitřního standardu (570 nmol/l), kterým je izotopově značený 25(OH)D<sub>3</sub>. Vzorek se intenzivně promíchá a poté se ponechá 2 hodiny při 37°C. Ke vzorku se přidá 20 ul 1 mol/l roztoku hydroxidu sodného, aby došlo k uvolnění vazby mezi formami vitamínu D a VDBP během 20 minutové inkubace. K vysrážení proteinů se přidává 250 ul acetonitrilu. Po 1 hodinové inkubaci při 4°C je ze vzorku gel, který se centrifuguje 20 minut při 16000g. Čirý supernatant se použije v následné analýze.<sup>47</sup>

Jako pevná fáze je v extrakci použita kolona Oasis HLB® (20x2,1 mm; 25 µm) v kombinaci s šesti-portým vysokotlakým spínacím ventilem, který je v pozici A na Obr. 15. 70 ul vzorku zbaveného proteinů se nainjektuje do systému. Jako mobilní fáze slouží voda-methanol (95:5, (v/v)) při průtoku 3 ml/min. Potencionální interferující sloučeniny jsou unášeny do odpadu. Současně analytická kolona (LiCrospher® 100 RP-18end-capped; 125x4 mm; 5 µm) je ekvilibrována roztokem methanolu 0,5 mmol/l a octanu amonného (90:10) při průtoku 0,85 ml/min. Po 3 minutách je ventil přepnut do polohy B viz. Obr. 15. Analyt navázaný na extrakční kolonu se eluuje do analytické kolony v režimu se zpětným proplachem. Po 2 minutách se ventil vrátí do polohy A. V tu chvíli je analytická kolona promývána acetonitrilem a methanolem (50:50) při průtoku 3 ml/min po dobu 3,5 minuty. Následně je reekvilibrována roztokem voda-methanol (95:5). Jak extrakční tak analytická kolona jsou temperovány na 30°C. K ionizaci se používá elektrospreje za atmosférického tlaku. Další podmínky jsou: kapilární napětí 3,0 kV; kuželové napětí 20 V; teplota zdroje 90°C; desolvatační teplota 280°C; průtok dusíku přibližně 550 l/h; kolizní energie 25 V. Retenční čas 25(OH)D<sub>3</sub> (401 m/z) a izotopově značeného interního standardu (405 m/z) činí 8,1 min po injektování vzorku do systému.<sup>47</sup>



Obr. 15. Schéma LC – TMS podle Vogesera<sup>47</sup>



#### 3.4.2.2.2. Metoda dle Baecherové

Příprava vzorku pro metodu dle Baecherové je totožná výsledkem, kterým je vitamín D zbavený VDBP, ale liší se procesem přípravy. K 200 ul séra vzorku se přidává 25 ul interního standardu. Vzorek se 5 minut míchá při pokojové teplotě a následně je inkubován po dobu 2 hodin při 37°C. Přidáním 300 ul acetonitrilu dojde k uvolnění vitamínu D z VDBP a sérové proteiny se vysráží. Směs se nejprve vortexuje po 10 minut při pokojové teplotě a pak je zchlazena na 8°C po 1 hodinu. K získání finálního vzorku je potřeba směs centrifugovat při 14000rpm po 30 minut. Supernatant se následně využije pro analýzu.<sup>46</sup>

Analýza se provádí na dvoudimenzionálním HPLC systému UltiMate 3000. 62,5 ul připraveného supernatantu je injektováno do systému. Vzorek prochází předkolumnou LiChroCART® 25-4 LiChrospher® RP-4 ADS (25 µm) a je rozdělován na frakce 5% methanolem po 3 minutách při průtoku 2,5ml/min. Analytická frakce přechází k separaci druhého rozměru do analytické kolony Kinetex® PFP (150x4,6 mm, 2,6 µm), která je temperována na 50°C. Proces trvá 3 až 3,5 minuty za přidávání 0,5 mM octanu amonného a methanolu (25/75, (v/v)) při průtoku 0,8 ml/min a užití kontroly „black flush

mode“. Separace je dosaženo lineárním gradientem 0,5 mM octanu amonného a methanolu: t= 3 min: 75% methanol; t= 11 min: 80% methanol. Po separaci jsou předkolona a kolona promyty a ekvilibrovány. Celý proces trvá 21 min.<sup>46</sup>

Obr. 16. Výsledky měření MRM dle Baecherové<sup>46</sup>

Analyte	Parent-ion [m/z]	Product-ion [m/z]	Collision energy [eV]	Rt [min]
24R,25-(OH) <sub>2</sub> -D <sub>3</sub> (Quantifier ion)	417.3	381.3	12	6.7
24R,25-(OH) <sub>2</sub> -D <sub>3</sub> (Qualifier ion)	417.3	159.2	33	6.7
25-OH-D <sub>3</sub>	401.3	159.2	33	8.4
	401.3	257.2	15	
3-epi-25OH-D <sub>3</sub>	401.3	159.2	33	8.7
	401.3	257.2	15	
26,27-D <sub>6</sub> -25OH-D <sub>3</sub>	407.3	159.2	33	8.4
	407.3	263.2	15	
25-OH-D <sub>2</sub>	413.4	159.2	33	8.7

Separovaný analyt v eluátu pokračuje z kolony do detektoru, kterým je Quantum Ultra II trojitý kvadrupólový hmotnostní detektor. Tento hmotnostní detektor pracuje v módu chemické ionizace při pozitivním atmosférickém tlaku (APCI). Nastavení zdroje iontů: corona vybíjejší proud, 8,0 uA; odpařovací teplota 322°C; dusík jako nosný a pomocný plyn (tlak 60 arbitrárních jednotek a 7 arbitrárních jednotek, v tomto pořadí); teplota kapilár 220°C; argon jako kolizní plyn (tlak 1,5 mTorr). Analyzační technikou je multi-reakční sledování MRM. Data z MRM jsou následně zpracována vhodným softwarem jako XCALIBUR aj. Výsledky měření dle Baecherové jsou na Obr. 16.<sup>46</sup>

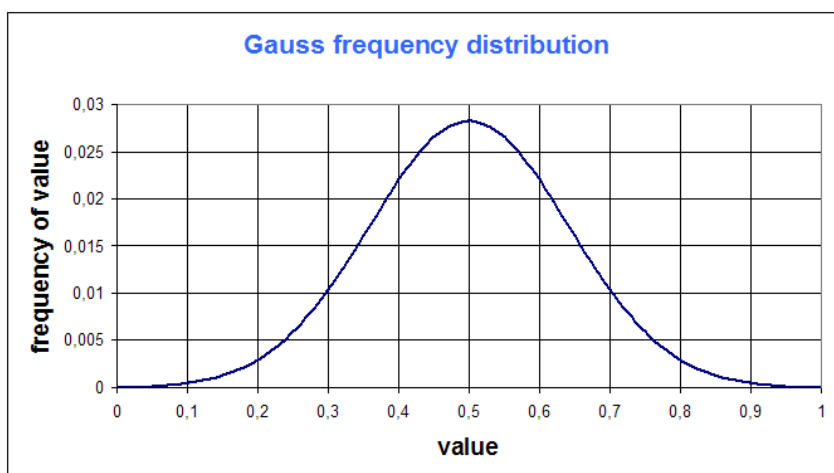
### 3.5. Vyhodnocovací metody

#### 3.5.1. Normální hodnoty

Biochemické markery jsou velice dobrou pomocnou metodou při diagnostikování stavu organismu případně určité nemoci. Každý biochemický marker nám může ukázat, zda v pořádku probíhá určitý metabolický proces, případně zda nedochází v některé tkáni k patologickému jevu, jakým může být nekróza určitých buněk nebo narušení některých signálních drah a následné rakovinné bujení. Hodnoty získané při biochemické analýze však nelze brát dogmaticky. Živý organismus je velice komplexní systém, takže jakékoliv vychýlení biochemických markerů od normálních hodnot, nemusí vždy znamenat patologický proces. Hodnoty mohou být zkresleny řadou faktorů, které určuje zejména aktuální stav pacienta. Nachází-li se ve stresové situaci, nebo prodělal-li onemocnění, může jeho organismus reagovat změnou, která vede i ke změně hladiny určitého markeru. Vždy to nemusí být pouze aktuální stav. Každý organismus má jedinečný genotyp, který vlivem prostředí vytvoří unikátní fenotyp, a proto normální hodnoty vytvořené na základě určité skupiny obyvatelstva, nemusí vždy odpovídat jednotlivci. I přes tento fakt, je stanovení normálních hodnot nutnou pomůckou k diagnostikování pacienta.<sup>48</sup>

Normální hodnoty se tedy stanovují tak, že se vybere vhodný vzorek zdravého obyvatelstva o dostatečné velikosti a změří se určitý marker. Výsledek by se měl pro některé parametry, mezi které patří vitamín D, přiblížit Gaussově křivce viz Obr. 17. Gaussova křivka nám ukazuje četnost výskytu určité hladiny ve vzorku. Nejvyšší četnost se obvykle nachází blízko středu. Na okrajích se obvykle nachází nejméně vzorků. Právě tyto okraje Gaussovi křivky jsou pravděpodobně nejspornějším místem. Dochází zde k průniku populace falešně pozitivní a pozitivní. Proto je vždy snaha citlivě zvolit hodnotu, od které se bude rozlišovat pozitivní nález od negativního. Tato hodnota se nazývá cut off nebo referenční mez. Hodnoty nacházející se uvnitř Gaussovy křivky je možné nazvat normálními hodnotami.<sup>48</sup>

Obr. 17. Gaussova křivka<sup>36</sup>



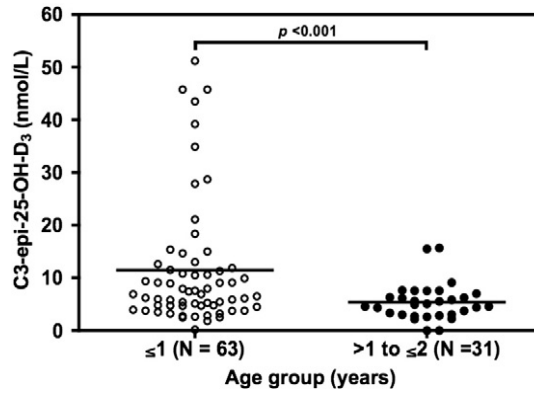
### 3.5.2. Normální hodnoty vitamínu D

Stanovení normálních hodnot pro široké spektrum obyvatelstva není nijak jednoduchý proces. Zvláště pro marker jakým je vitamín D. Jeho hladina v těle je ovlivněna řadou faktorů, které nemají patofyziologický původ. Příkladem asi nejpodstatnějšího faktoru je množství slunečního záření, které dopadne na lidskou kůži. Nicméně lze namítnout, že existuje limitní hodnota množství vitamínu D v lidském organismu, která je nezbytná pro správnou funkci jak kalcemických, tak nekalcemických procesů. Pravděpodobně z těchto důvodů vzniklo hned několik doporučení, které navrhují tabulku normálních hodnot rozdělenou do několika referenčních intervalů, viz Tab. 2. Ustálenou doporučovanou hodnotou se stala hodnota odpovídající normálnímu všeobecnému zdraví 75 nmol/l, která se nachází na rozhraní dostatečného a deficitního množství vitamínu D.

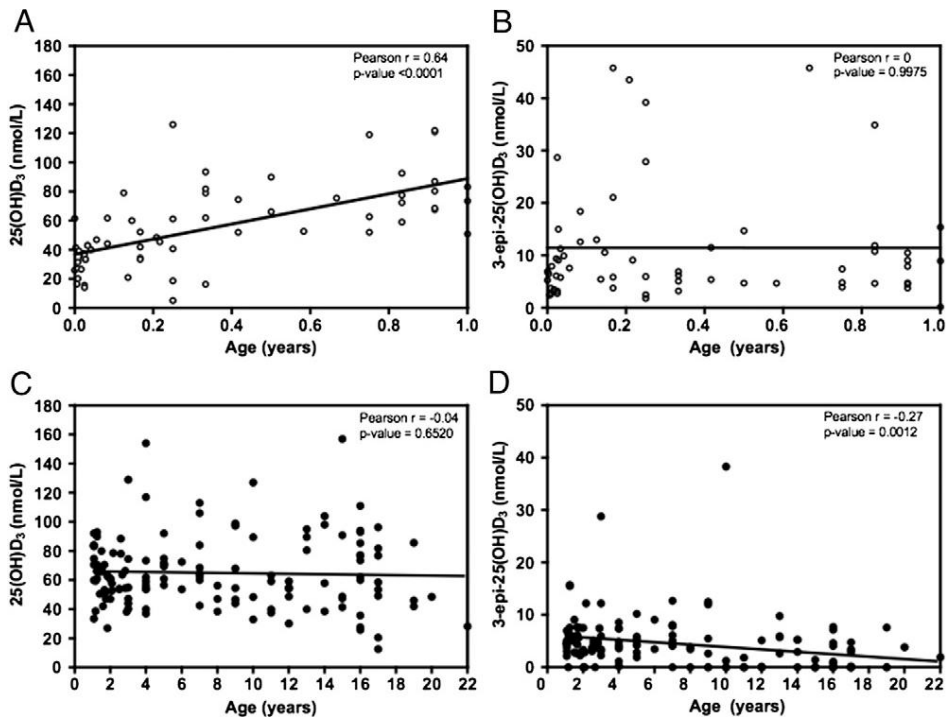
Lidský organismus se s věkem neustále mění, proto při vytváření referenčního rozmezí se proměřují jednotlivé věkové kategorie. Hladina normálních hodnot může být rozdílná pro nejmladší populaci a stejně tak pro nejstarší. U vitamínu D byl pozorován nárůst 25(OH)D<sub>3</sub> během prvního roku života a následně se stabilizuje. C3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> je konstantní v prvním roce a poté začíná jeho hladina klesat, viz Obr. 19. Výrazný pokles C3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> je pozorován mezi prvním a druhým rokem života viz Obr. 18. Byla snaha najít vnější vliv, který by stál za vyšší hladinou C3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> v

kojeneckém období. Zkoumaly se tekuté vitamin D doplňky, které jsou předepisovány kojencům. Bylo však zjištěno, že obsahují výlučně cholecalciferol. Vnější činitel doposud nebyl odhalen.<sup>35</sup>

Obr. 18. Porovnání sérové koncentrace C3-epi-25(OH)D3 ve věku <1 a 1<2 roku.<sup>35</sup>



Obr. 19. Vývoj hladiny 25(OH)D3 a C3-epi-25(OH)D3<sup>35</sup>



Tab. 2. Referenční intervaly<sup>25, 26, 27, 28, 29</sup>

Zdroj hodnot	nmol/l			
NHANES	Nedostatek < 30	Neadekvátní 30-50	Dostačující 50-125	Riziko hypervitaminosy >125
Ústav klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové	Deficit <50		Preferováno >75	
Vitamin D total ROCHE (příbalový leták)	Deficiency <25	Insufficiency 25-75	Sufficiency 75-250	Toxicity >250
DiaSorin 2012	Těžký deficit <10	Střední deficit 10-25 Lehký deficit 25-50	Optimální 50-300 (léto) 25-125 (zima)	Zvýšené >300
MUDr. Richard Pikner, Ph.D.	Těžká nedostatečnost <25	Nedostatečnost 25-49 Mírný nedostatek 50-74	Dostatečná hladina 75-150	Riziko intoxikace > 500
Lab Tests Online	Pro vyšetření vitamínu D není k dispozici žádné standardní referenční rozmezí. Referenční hodnoty jsou závislé na mnoha faktorech, jako jsou věk pacienta, pohlaví, vzorek populace nebo použitá metoda. Číselné hodnoty vyšetření pak mohou mít odlišný význam v různých laboratořích. K výsledku laboratorního vyšetření by mělo být uvedeno referenční rozmezí. Lab Tests Online důrazně doporučuje konzultaci výsledků s lékařem.			

### 3.5.2.1. Hladina vitamínu D v těhotenství

Kritéria výběru vzorků, byla zvolena tak, abych majoritní zastoupení měla nejmladší populace čítající i novorozence. Z kapitoly 4.3.4. lze usuzovat velký vliv vitamínu D na správnou funkci organismu. Kdy jindy než v době těhotenství a růstu je potřeba, aby funkčnost organismu byla zajištěna na 100%. Proto jsou i doporučení začít se suplementací před, případně po potvrzení těhotenství. Doporučené dávky se pohybují v rozmezí 1500-2000 IU/den. Žádoucí by mělo být opakované monitorování

hladiny vitamínu D v krvi těhotných žen. Avšak organizace zabývající se danou problematikou nejsou v tomto ohledu ani v doporučení suplementace jednotné. Cílem je dosažení hladiny 75-125 nmol/l, která pro většinu zmíněných doporučení znamená oblast dostatečného množství. Je potvrzeno, že hladina vitamínu D v krvi matky koreluje s hladinou nemluvněte.<sup>40</sup>

### 3.5.3. Statistické metody vyhodnocení

Ke stanovení závěrů vycházejících z analytických měření je potřeba statistických metod. Pomocí statistického zpracování dat se vytvoří již zmiňované referenční rozmezí, případně hladina cut off a následně je pak možné zařadit výsledek měření do určité kategorie. Vyhodnocené výsledky zpravidla nejsou na 100% správné. U jednotlivých analytických metod se proto vypočítávají chyby specifické pro danou metodu. Vypočtená veličina je známá pod názvem nejistota měření případně variační koeficient ( $CV_a$ , VK). Chyba měření je ovlivněna řadou faktorů, jakými jsou například: kvalita vzorku, množství měřeného analytu aj. K nejistotě měření je také přidávána hodnota chyby intra-individuální ( $CV_i$ ). Tato chyba, již zmíněná v kapitole Normálních hodnot, se snaží zahrnout aktuální stav pacienta, případně jedinečnost jeho organismu.

Normální hodnoty zobrazené Gaussovou křivkou zahrnují několik statistických veličin, jakými jsou četnost, průměr, medián a směrodatná odchylka. Tyto veličiny budou popsány v následujících podkapitolách.

Stanovení referenčního rozmezí není jedinou komplikovanou záležitostí. Jednotlivé analytické přístroje pracují s určitou chybou. Proto je nutné porovnávat jednotlivé přístroje – metody mezi sebou. Pro srovnání velkého souboru dat, které poskytly dva analytické přístroje, se nabízí různé metody. V této práci bylo použito srovnávacích metod Bland-Altman a Passing-Bablok.<sup>38, 35</sup>

### 3.5.4. Četnost

Četnost je funkcí, která vyjadřuje množství výskytu prvku se stejnou hodnotou. Následné seřazení prvků podle četnosti výskytu může v grafickém vyjádření zobrazit Gaussovu křivku. Pak lze říci, že nejčastěji vyskytující se hodnotou je hodnota ve středu křivky a čím dále se hodnota od středu křivky nachází, tím je její četnost nižší.

Při vytváření souboru normálních hodnot, dojde k proměření zdravé populace. Nejčetnější výsledky tvoří střed křivky a vlivem intra-individuálním vzniká zvonovitý tvar, kdy nejodlišnější hodnoty se vyskytují s nejnižší četností.

### 3.5.5. Průměr a medián

Střední hodnotu lze vyjádřit jak aritmetickým průměrem, tak mediánem. Záleží, jaké požadavky na střední hodnotu máme. Pro Gaussovu křivku jsou medián a aritmetický průměr stejnými nebo blízkými hodnotami. Výsledná střední hodnota, bereme-li v potaz aritmetický průměr, je doplněna o rozptyl, respektive o směrodatnou odchylku.

Aritmetický průměr se získá sumou hodnot prvků v souboru, která je podělena počtem prvků v dané sumě. S použitím této statistické funkce jsme se seznámili již na základní škole při zjišťování výsledné známky na vysvědčení. Avšak po dokončení studia a nástupu do práce, se člověk mohl setkat například s pojmem průměrný plat. Ve škole perfektně fungující aritmetický průměr přestal ukazovat „správnou“ střední hodnotu.

Aby střední hodnota respektive průměrný plat byl objektivní, lze ho vypočítat pomocí mediánu. Při seřazení prvků podle jejich hodnoty, se vybere hodnota uprostřed číselné řady a ta je pak označena jako medián. Tím se zabrání, aby jednotlivé odchýlené hodnoty způsobily zkreslenost výsledků.

Doplňkem střední hodnoty je směrodatná odchylka. Směrodatnou odchylku lze vyjádřit i jako variační koeficient. Směrodatná odchylka udává, do jaké míry jsou hodnoty rozptýleny od aritmetického průměru. Vztah tvaru Gaussovy křivky a velikosti



směrodatné odchytky je takový, že čím nižší je hodnota směrodatné odchytky, tím je tvar zvonovité křivky užší a naopak.

### 3.5.6. Bland-Altman

Blandův-Altmanův diferenční diagram je jedna z vyhodnocovacích statistických metod vhodná ke srovnání dvou měřících postupů. Na osu x se nanáší aritmetický průměr hodnot, které byly naměřeny ze stejného vzorku různými měřícími postupy, a na osu y rozdíl naměřených hodnot. V grafu je vyznačen 95% interval spolehlivosti.<sup>35</sup>

Z výsledného diagramu lze vyčíst systematickou diferenciaci mezi výsledky a jejich závislost na koncentracích.<sup>35</sup>

### 3.5.7. Passing-Bablok

Passing-Bablok je specifickou metodou lineární regrese. Lineární regresi se popisuje vztah dvou hodnot x a y, kde data x jsou data fixní a data y jsou proměnná. Lineární regrese se používá například při odhadu proměnných y na základě znalosti fixních dat x. Vztah vyjadřující lineární regresi je dán rovnicí přímky:

$$y = a + bx$$

parametr **a** vyjadřuje část osy y a **b** je směrnici přímky. Doplňkem této rovnice je korelační koeficient, který udává linearitu vztahu mezi oběma proměnnými.<sup>38</sup>

Passing-Bablok oproti klasické lineární regresi nepředpokládá předem danou fixnost proměnných ani jejich určité rozdělení. U metody se počítá s výskytem náhodných chyb vzniklých jak u referenční tak u srovnávané metody. Je založena na myšlence spojit každý bod  $x_i, y_i$  s každým bodem  $x_j, y_j$  přímkou a vypočítat všechny směrnice takto vzniklých přímek.<sup>38</sup>

## 4. Praktická část

### 4.1. Pacienti

V období od února do srpna v roce 2013 proběhl sběr vzorků na oddělení klinické biochemie Kroměřížské nemocnice a v soukromé laboratoři RNDr. Nováka klinické biochemie a hematologie v Kroměříži. Podmínky pro výběr vzorků byly:

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

Výsledný počet sesbíraných vzorků byl 418. Všechny tyto vzorky byly změřeny metodou electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS/MS). Pro analýzu metodou HPLC MS/MS byla provedená další selekce, která vyřadila většinu vzorků nespĺňujících podmínku objemu. Ve finální selekci tedy zůstalo 263 vzorků, které byly použity pro srovnání obou metod. Zastoupení pohlaví se dá považovat za vyrovnané, kde 112 vzorků patří ženskému a 151 mužskému pohlaví, viz Tab. 3.

Tab. 3. Množství vzorků

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

## 4.2. Výsledky

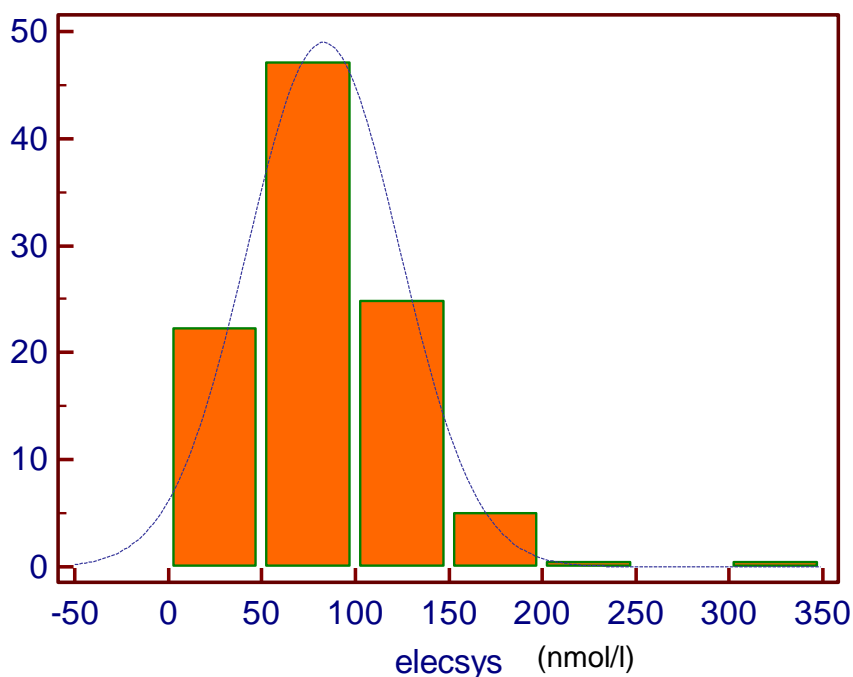
Měření vzorků probíhalo ve dvou fázích. Během první fáze byly vzorky měřeny metodou elecsys vit. D total, která probíhala na začátku srpna. Denně bylo změřeno přibližně 40 a více vzorků. Každý den před i po analýze se prováděla dvoubodová kontrola. Její výsledky budou v následující podkapitole. Po změření byly vzorky opět zamrazeny a následně odeslány do laboratoře v Penzbergu ve speciálním balení, aby nedošlo k rozmražení, kde byly analyzovány metodou HPLC MS/MS.

### 4.2.1. Výsledky celkového souboru vzorků pro metodu elecsys vit. D total

Výsledky celkového souboru byly zpracovány jak celkově, tak rozděleny dle pohlaví. Účelem bylo zobrazit referenční rozmezí u nejmladší populace. Z tabulek 4. a 5. lze vyčíst, že mediány na rozdíl od průměrů jsou si velmi blízké a nachází se v oblasti na rozhraní dostatečné hladiny pro vitamín D. Mělo by být zohledněno, že vzorky byly odebírány v období jara, viz Kapitola 4.5.2. Normální hodnoty vitamínu D. Maximální naměřené koncentrace se pohybovaly mezi hodnotami 300 - 450 nmol/l, které jsou některými doporučeními považovány za toxické. Avšak výsledky potvrzují, že riziko spočívá spíše v deficitu vitamínu D. Graf 4. ukazuje, že hladina cca 75 nmol/l rozděluje naměřené vzorky na poloviny, kde v toxických hladinách se vyskytují vzorky ojediněle, naopak u mírně deficitních se nachází velké množství. U pacientů jak s deficitem, tak s nadprůměrnými hodnotami je důležité sledovat vývoj i ostatních biochemických markerů, se kterými je vitamín D spojený. Grafy pro obě pohlaví, zároveň i pro celek, ne zcela dokonale korelují s Gaussovským rozložením.

Výsledky jsou doplněny o tabulku shrnující prováděné kontroly metody elecsys vit. D total. Průměrné hodnoty kontrol se nachází v blízkosti středu nastaveného rozmezí s relativně malou směrodatnou odchylkou, jak ukazuje tab. 7.

Graf 1. Rozložení četnosti pro dětskou populaci mužského pohlaví



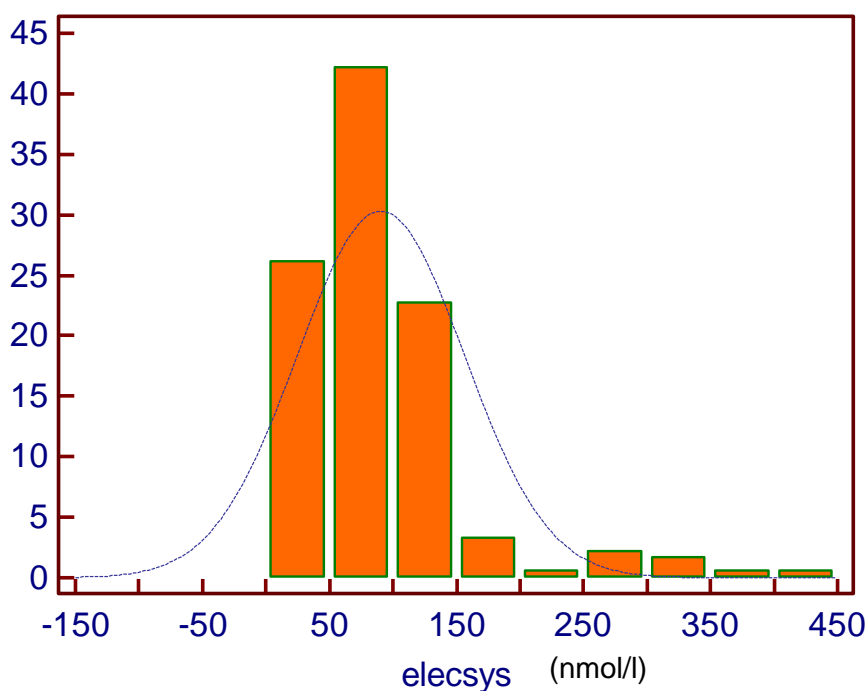
Tab. 4. Výsledky elecsys vit. D total pro dětskou populaci mužského pohlaví

Variable	Elecsys-M
Sample size	238
Lowest value	8,2500
Highest value	302,0000
Arithmetic mean	82,9914
95% CI for the mean	77,7916 to 88,1912
Median	75,9500
95% CI for the median	71,7759 to 84,6884
Variance	1658,1030
Standard deviation	40,7198
Relative standard deviation	0,4907 (49,07%)
Standard error of the mean	2,6395
Coefficient of Skewness	0,9538 (P<0,0001)
Coefficient of Kurtosis	2,6030 (P<0,0001)
D'Agostino-Pearson test for Normal distribution	reject Normality (P<0,0001)

Percentiles		95% Confidence Interval
2,5	20,6295	11,6939 to 22,8473
5	23,8960	20,4164 to 30,6650
10	35,7830	26,8400 to 40,6263
25	56,5100	47,3652 to 59,2230
75	107,1000	100,0536 to 113,9673
90	142,6100	132,5508 to 149,4792
95	153,6800	147,5743 to 157,3414
97,5	157,1950	155,2868 to 193,0784

Graf 2. Rozložení četnosti pro populaci dětskou ženského pohlaví



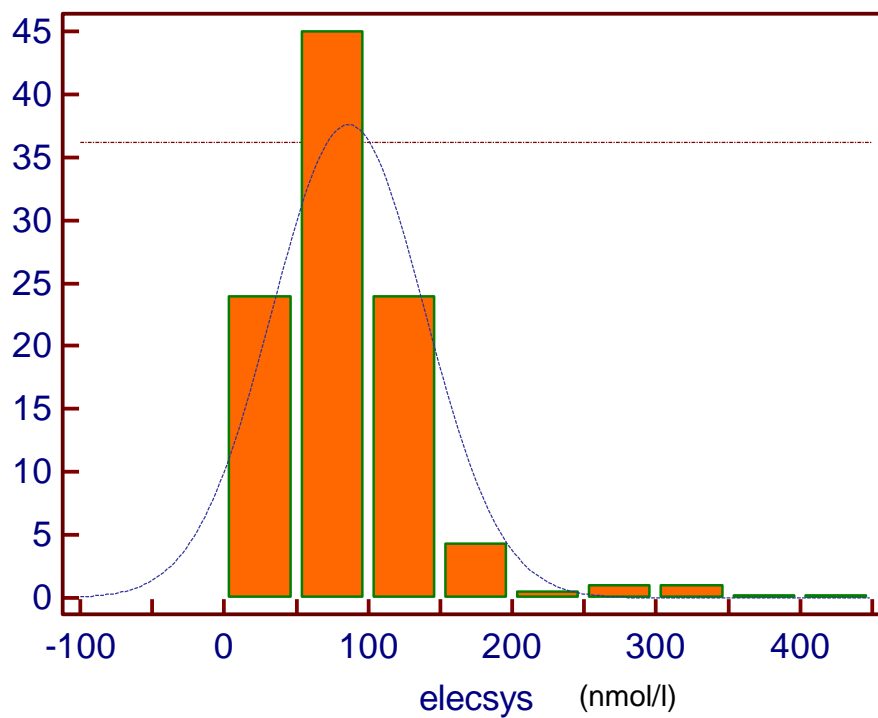
Tab. 5. Výsledky elecsys vit. D total pro dětskou populaci ženského pohlaví

Variable	Elecsys-F
Sample size	180
Lowest value	7,7100
Highest value	418,8000
Arithmetic mean	90,4573
95% CI for the mean	80,7728 to 100,1419
Median	76,4950
95% CI for the median	67,6550 to 85,9167
Variance	4335,5059
Standard deviation	65,8446
Relative standard deviation	0,7279 (72,79%)
Standard error of the mean	4,9078
Coefficient of Skewness	2,3283 (P<0,0001)
Coefficient of Kurtosis	7,1314 (P<0,0001)
D'Agostino-Pearson test for Normal distribution	reject Normality (P<0,0001)

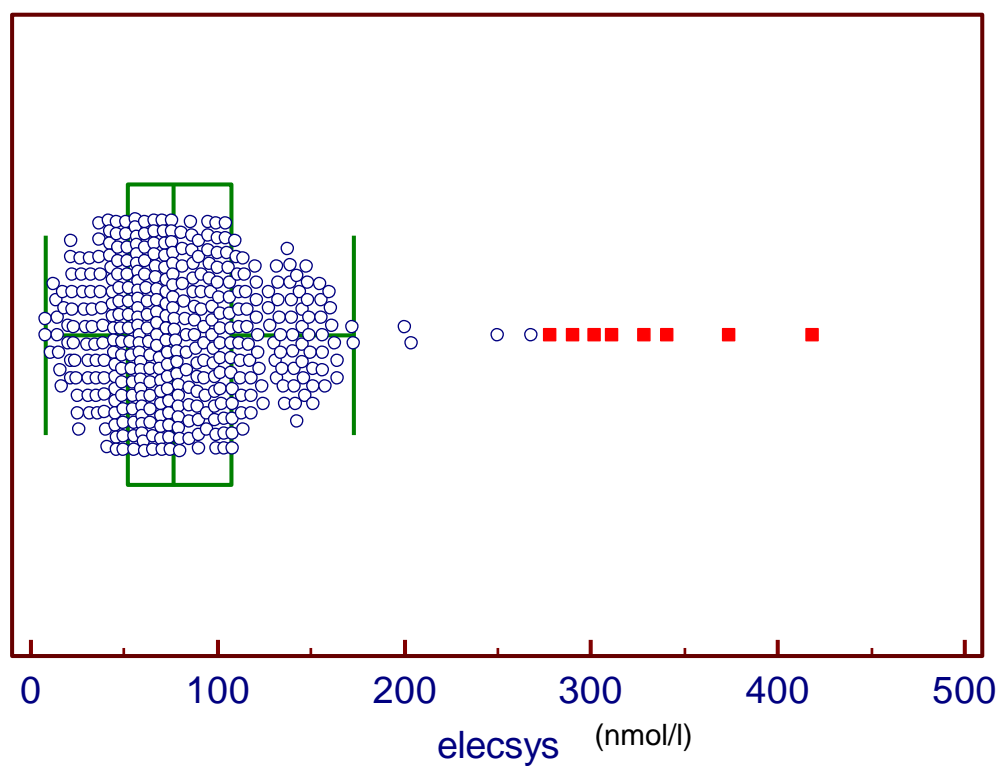
  

Percentiles		95% Confidence Interval
2,5	14,7100	9,7184 to 22,1706
5	22,1750	14,6057 to 29,8913
10	31,6300	22,8878 to 37,9858
25	49,7200	45,1824 to 55,1005
75	108,8500	100,5253 to 124,3760
90	145,4300	136,5921 to 172,7331
95	226,9000	154,6695 to 323,8641
97,5	311,2000	227,1946 to 399,2199

Graf 3. Rozložení četnosti pro celkovou dětskou populaci



Graf 4. Zobrazení rozložení jednotlivých výsledků v celkové dětské populaci



Tab. 6. Výsledky elecsys vit. D total pro celkovou dětskou populaci

Variable	Elecsys F+M
Sample size	418
Lowest value	7,7100
Highest value	418,8000
Arithmetic mean	86,2064
Median	76,1100
Standard deviation	53,0765
Coefficient of Skewness	2,2384 (P<0,0001)
Coefficient of Kurtosis	8,8199 (P<0,0001)
D'Agostino-Pearson test for Normal distribution	reject Normality (P<0,0001)

95% Reference interval, Double-sided

A. Method based on Normal distribution	
Lower limit	-17,8217
90% CI	-25,2237 to -10,4197
Upper limit	190,2345
90% CI	182,8325 to 197,6365

B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Lower limit	16,9940
90% CI	14,5700 to 21,8000
Upper limit	228,0550
90% CI	163,0000 to 302,0000

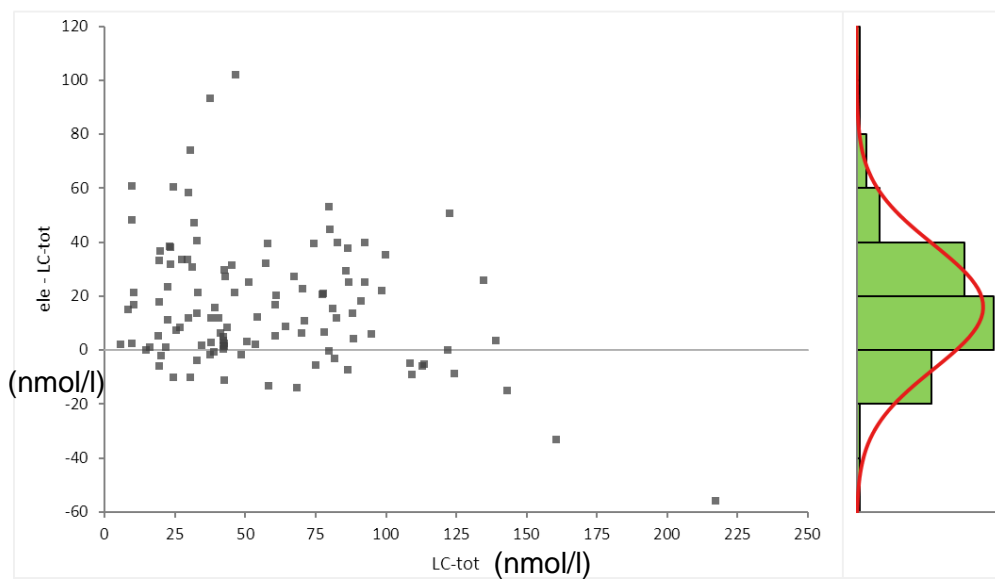
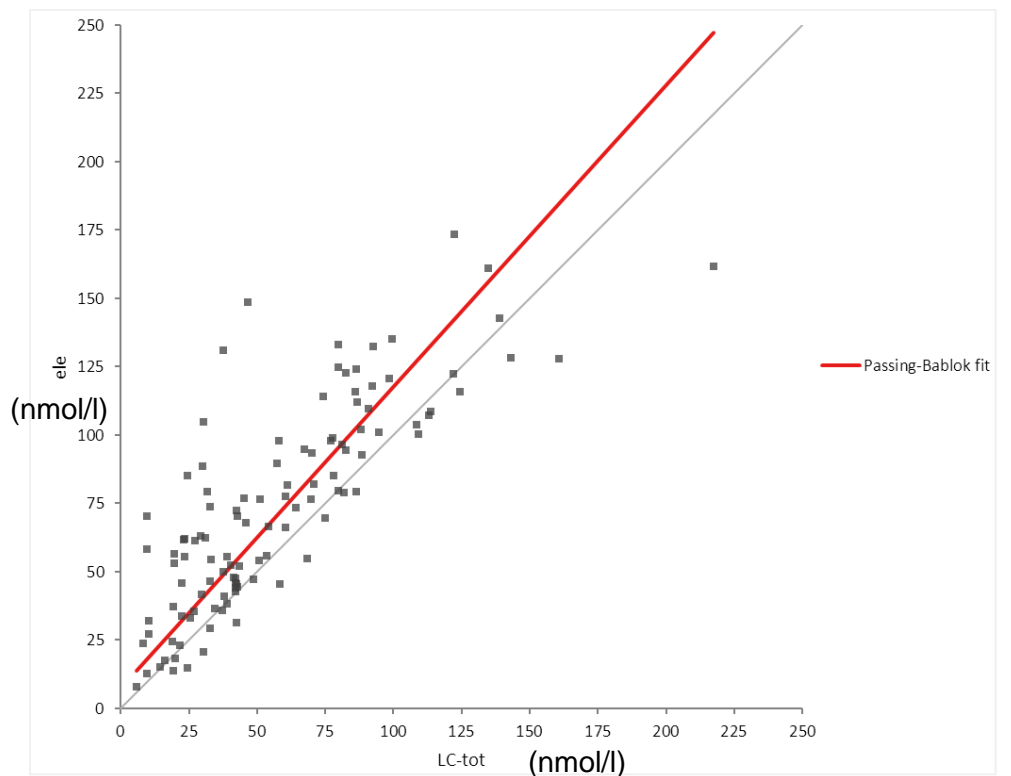
Tab. 7. Kontroly pro metodu elecsys vit. D total

	Průměrná koncentrace (nmol/l)	Směrodatná odchylka	Variační koeficient %
Kontrola 1 (35,68 - 70,82 nmol/l)	58,41	3,23	5,53
Kontrola 2 (64,75 - 120,2 nmol/l)	93,78	3,85	4,11

#### 4.2.2. Srovnání metod

Srovnání výsledků dvou měření byla provedena na základě srovnání pomocí metod Passing-Bablok a Bland-Altman. Výsledky zahrnují opět rozdělení podle pohlaví a celkovou statistiku. Obě metody jsou doplněny grafy znázorňujícími četnost, protože se jedná o selektovaný soubor vzorků. Měřeným analytem je vitamín D total respektive suma všech jeho forem.

Graf 5. Srovnání metodou Passing-Bablok pro dětskou populaci ženského pohlaví





Tab. 8. Parametry k vyhodnocení dle metody Passing-Bablok pro dětskou populaci ženského pohlaví

n		112
Method		Measuring interval
LC-tot		5,87 to 217,46
ele		7,71 to 173,00
Correlation - r		0,811

#### Fit Y on X

Passing-Bablok fit

Equation |  $ele = 7,093 + 1,104 LC-tot$

Parameter	Estimate	Bootstrap 95% CI
Intercept	7,093	-1,346 to 14,86
Slope	1,104	0,9663 to 1,271

Tab. 9. Parametry k vyhodnocení dle metody Bland-Altman pro dětskou populaci ženského pohlaví

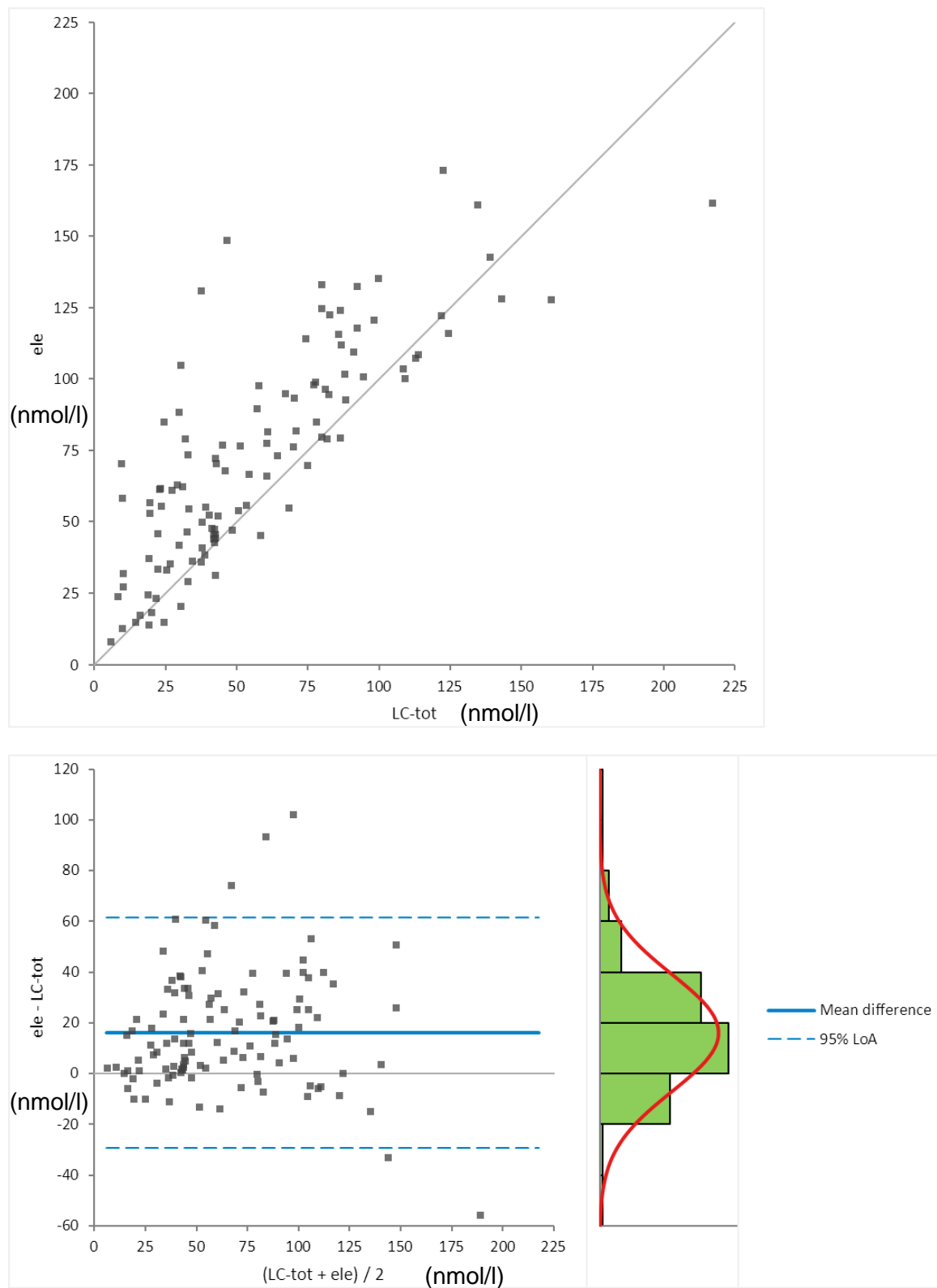
n		112
Method		Measuring interval
LC-tot		5,87 to 217,46
ele		7,71 to 173,00
Correlation - r		0,811

#### Fit D on A

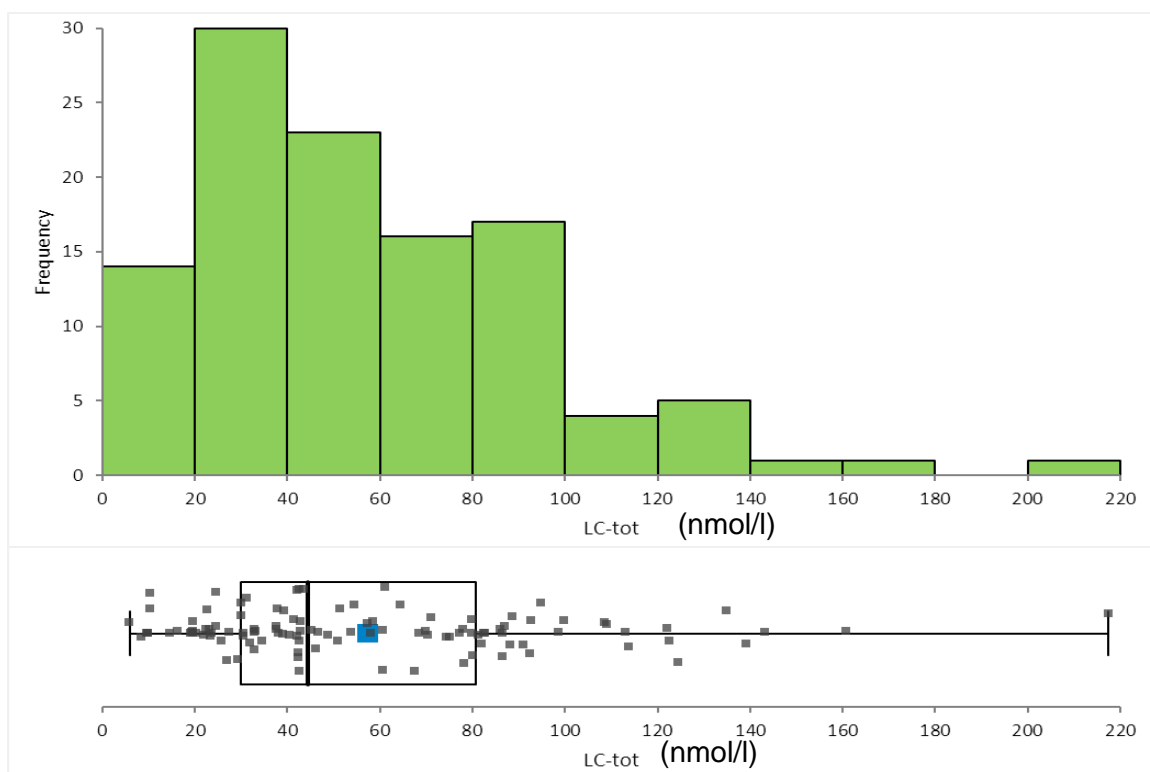
Constant difference

Parameter	Estimate	95% CI	SE
Mean difference	16,063	11,7337 to 20,3928	2,1849
95% Lower LoA	-29,257	-36,6783 to -21,8359	3,7451
95% Upper LoA	61,384	53,9624 to 68,8048	3,7451
SD	23,123		

Graf 6. Srovnání metodou Bland-Altman pro dětskou populaci ženského pohlaví



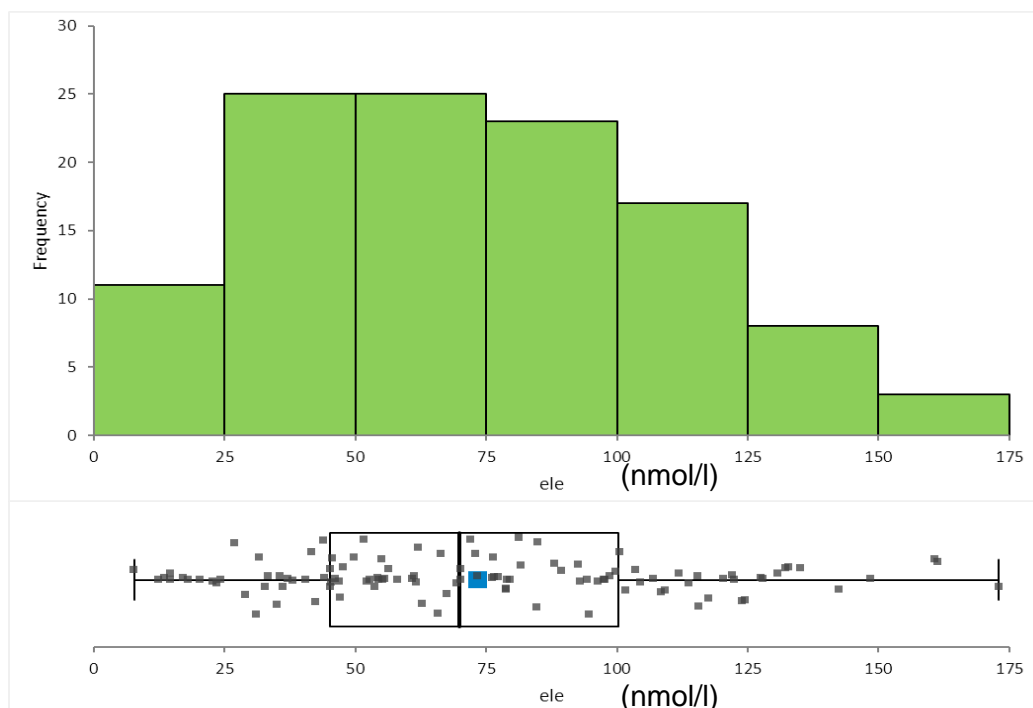
Graf 7. Zobrazení četnosti a rozložení jednotlivých vzorků naměřených metodou HPLC MS/MS na selektovaném souboru dětské populace ženského pohlaví



Tab. 10. Data k zobrazení četnosti a rozložení jednotlivých vzorků naměřených metodou HPLC MS/MS na selektovaném souboru dětské populace ženského pohlaví

N	112					
	Mean	SE	SD	Variance	Skewness	Kurtosis
LC-tot	57,303	3,5337	37,397	1398,549	1,2	2,24
	Minimum	1st quartile	Median	3rd quartile	Maximum	IQR
LC-tot	5,87	29,986	44,477	80,809	217,46	50,823
Quantile	LC-tot					
0,050	10,360					
0,950	124,987					

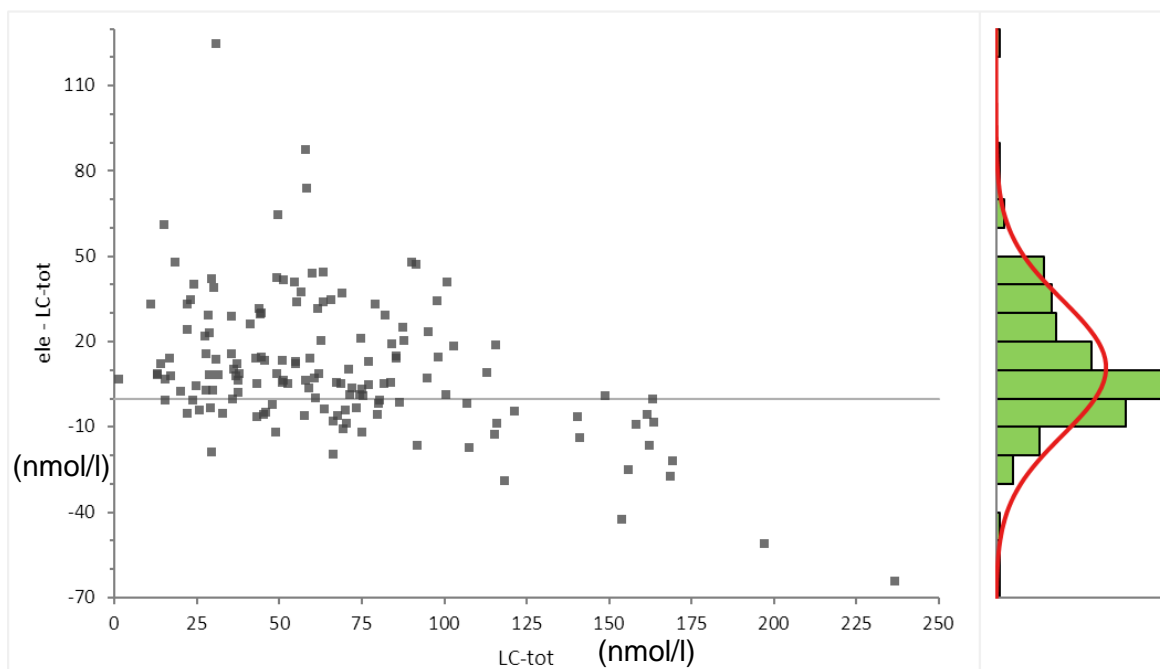
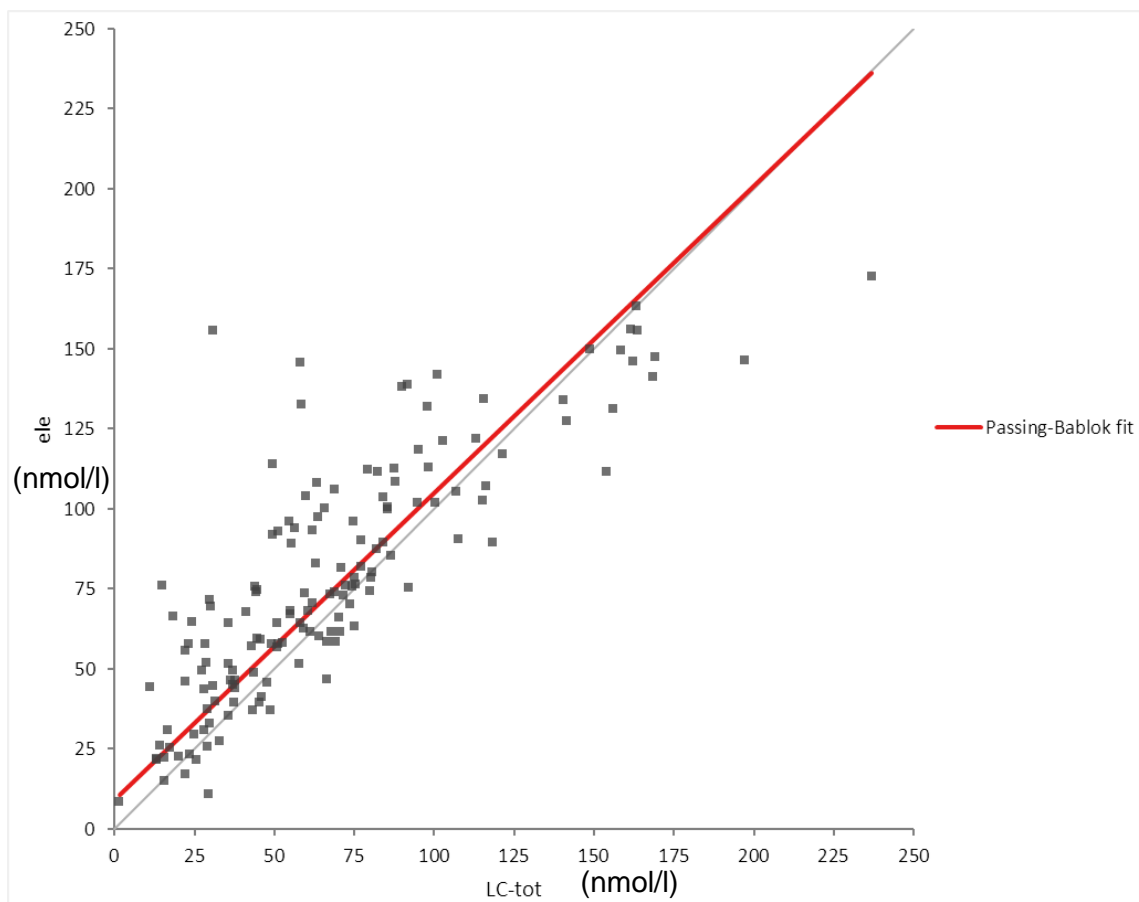
Graf 8. Zobrazení četnosti a rozložení jednotlivých vzorků naměřených metodou elecsys vit. D total na selektovaném souboru dětské populace ženského pohlaví



Tab. 11. Data k zobrazení četnosti a rozložení jednotlivých vzorků naměřených metodou elecsys vit. D total na selektovaném souboru dětské populace ženského pohlaví

N	112					
	Mean	SE	SD	Variance	Skewness	Kurtosis
ele	73,366	3,5660	37,740	1424,271	0,4	-0,51
	Minimum	1st quartile	Median	3rd quartile	Maximum	IQR
ele	7,71	45,185	69,780	100,296	173,00	55,111
Quantile	ele					
0,050	17,000					
0,950	135,370					

Graf 9. Srovnání metodou Passing-Bablok pro dětskou populaci mužského pohlaví



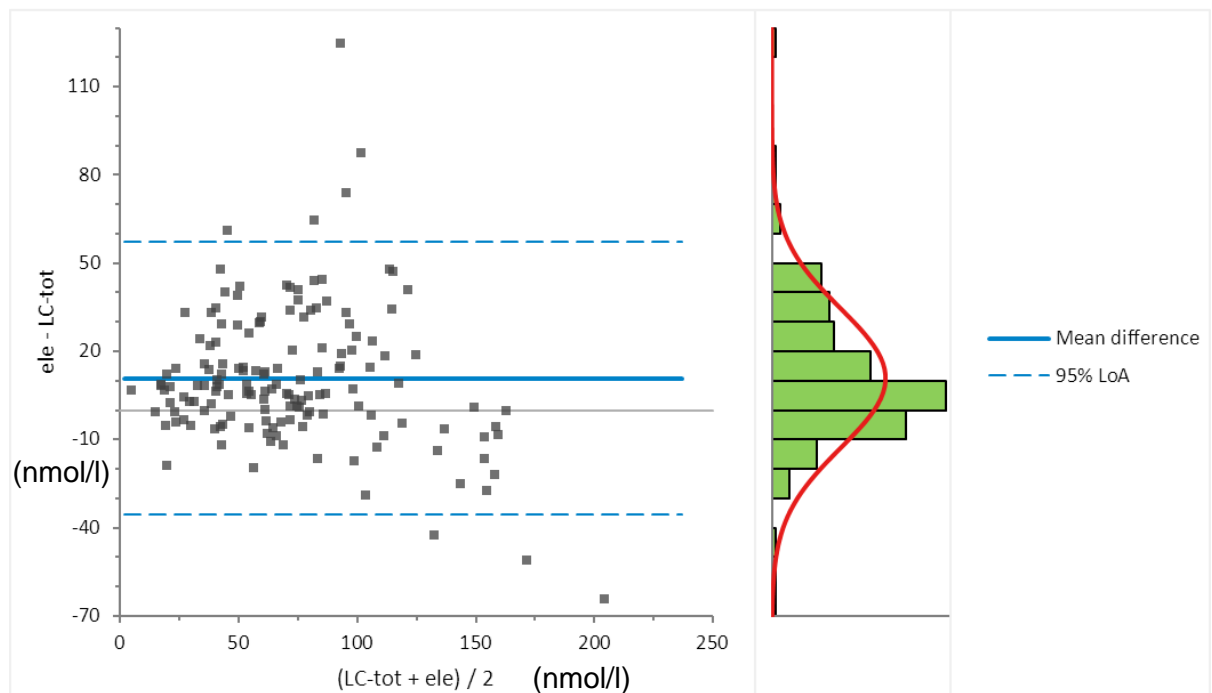
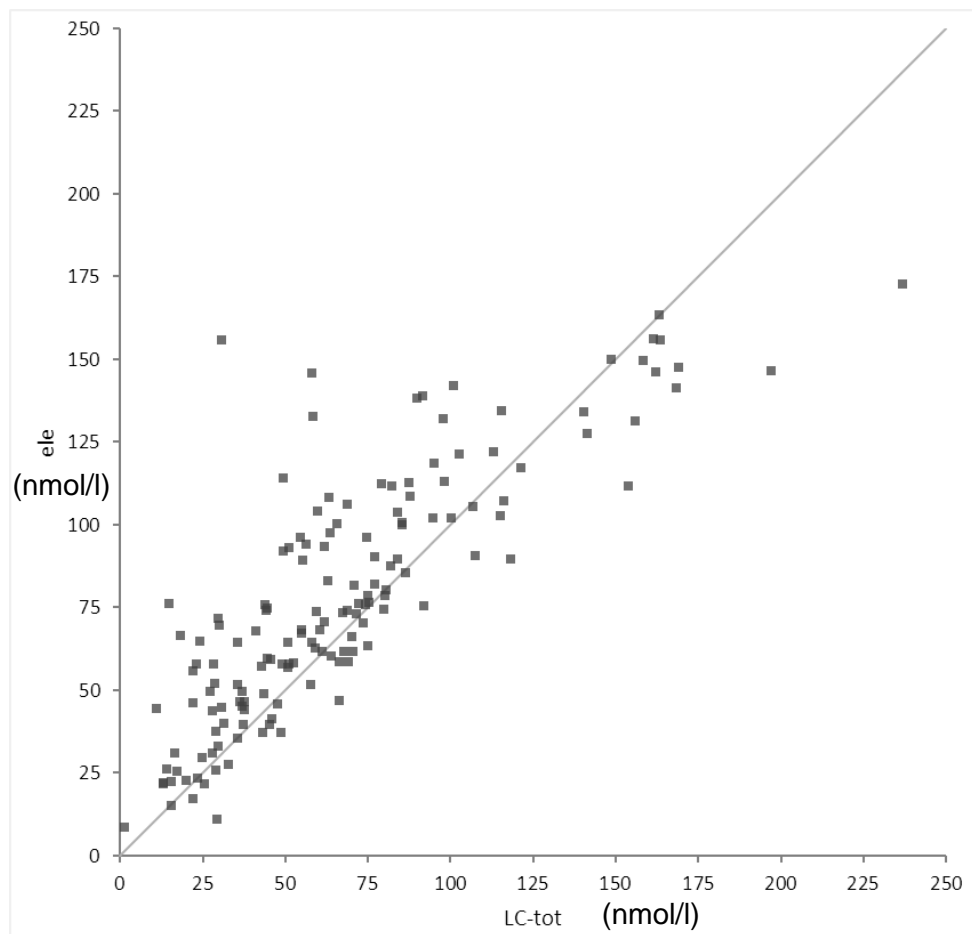
Tab. 12. Parametry k vyhodnocení dle metody Passing-Bablok pro dětskou populaci mužského pohlaví

n	151		
Method	Measuring interval		
LC-tot	1,57	to 236,90	
ele	8,25	to 172,40	
<b>Fit Y on X</b>			
Passing-Bablok fit			
Equation	ele = 8,991 + 0,9582 LC-tot		
Parameter	Estimate	Bootstrap 95% CI	
Intercept	8,991	4,363	to 14,52
Slope	0,9582	0,8744	to 1,075

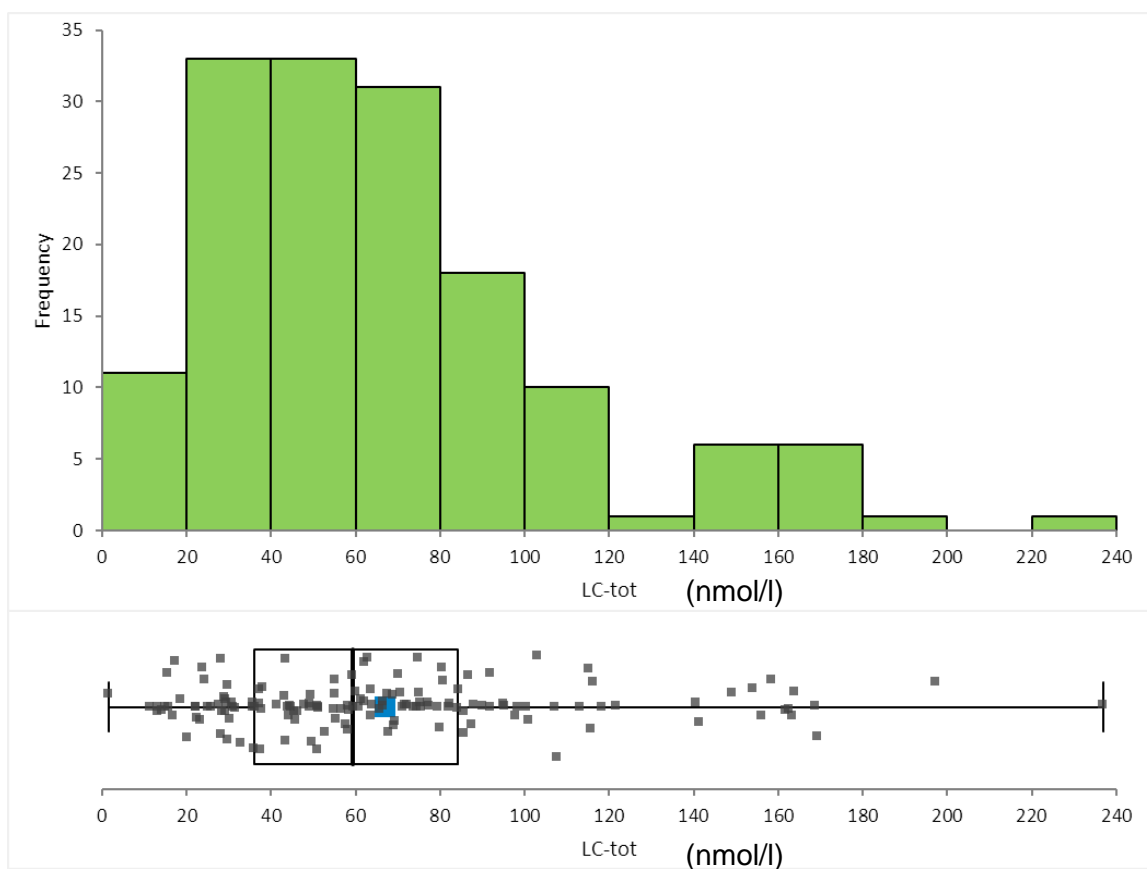
Tab. 13. Parametry k vyhodnocení dle metody Bland-Altman pro dětskou populaci mužského pohlaví

n	151			
Method	Measuring interval			
LC-tot	1,57	to 236,90		
ele	8,25	to 172,40		
Correlation - r	0,829			
<b>Fit D on A</b>				
Constant difference				
Parameter	Estimate	95% CI		SE
Mean difference	10,878	7,0745	to 14,6816	1,9250
95% Lower LoA	-35,484	-41,9981	to -28,9690	3,2970
95% Upper LoA	57,240	50,7252	to 63,7542	3,2970
SD	23,654			

Graf 10. Srovnání metodou Bland-Altman pro dětskou populaci mužského pohlaví



Graf 11. Zobrazení četnosti a rozložení jednotlivých vzorků naměřených metodou HPLC MS/MS na selektovaném souboru dětské populace mužského pohlaví

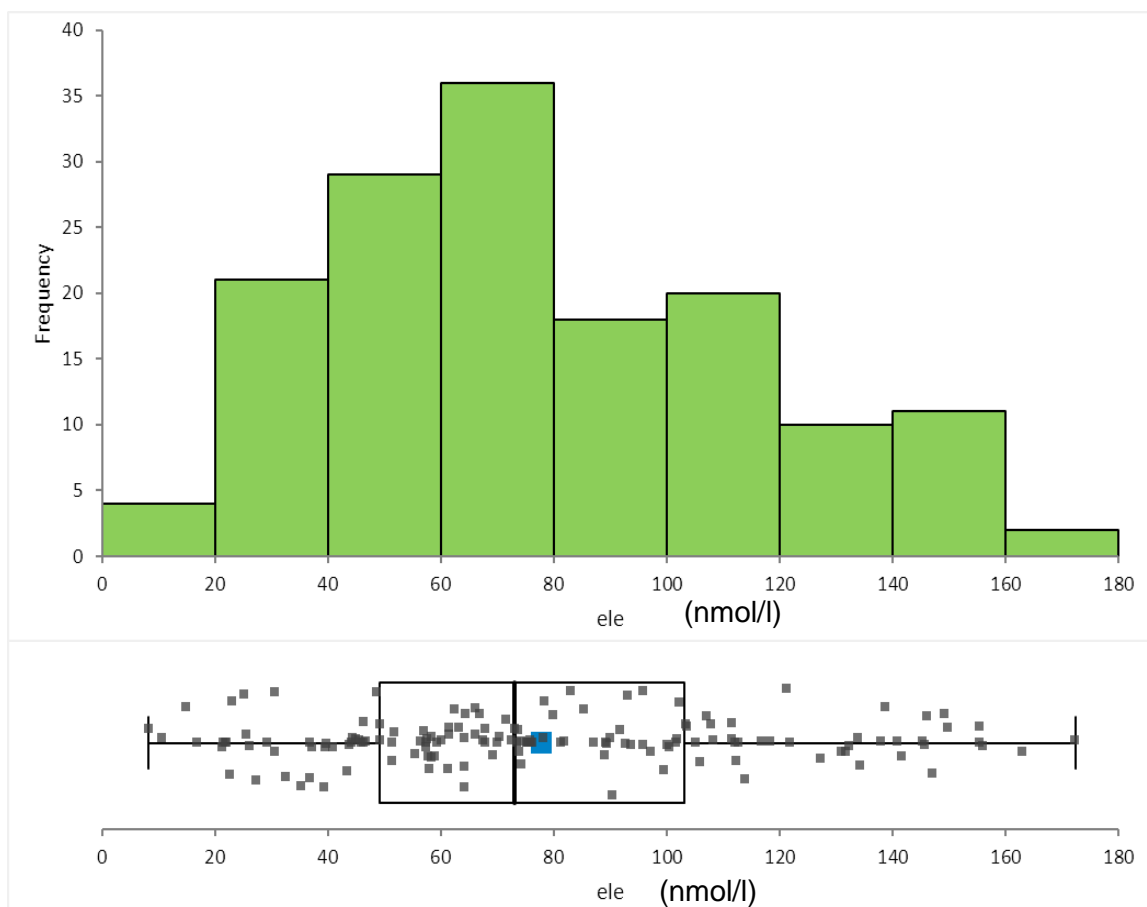


Tab. 14. Data k zobrazení četnosti a rozložení jednotlivých vzorků naměřených metodou HPLC MS/MS na selektovaném souboru dětské populace mužského pohlaví

N	151					
	Mean	SE	SD	Variance	Skewness	Kurtosis
LC-tot	66,886	3,4125	41,934	1758,432	1,3	1,86
	Minimum	1st quartile	Median	3rd quartile	Maximum	IQR
LC-tot	1,57	35,934	59,422	84,181	236,90	48,247
Quantile	LC-tot					
0,050	15,597					
0,950	161,754					



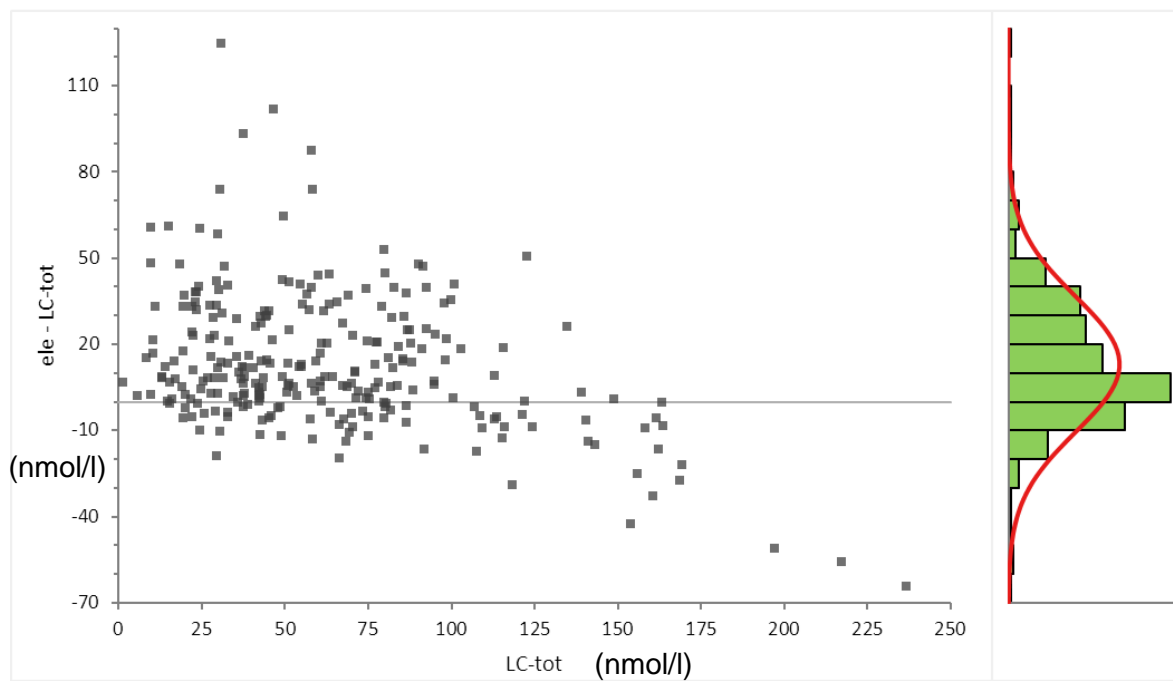
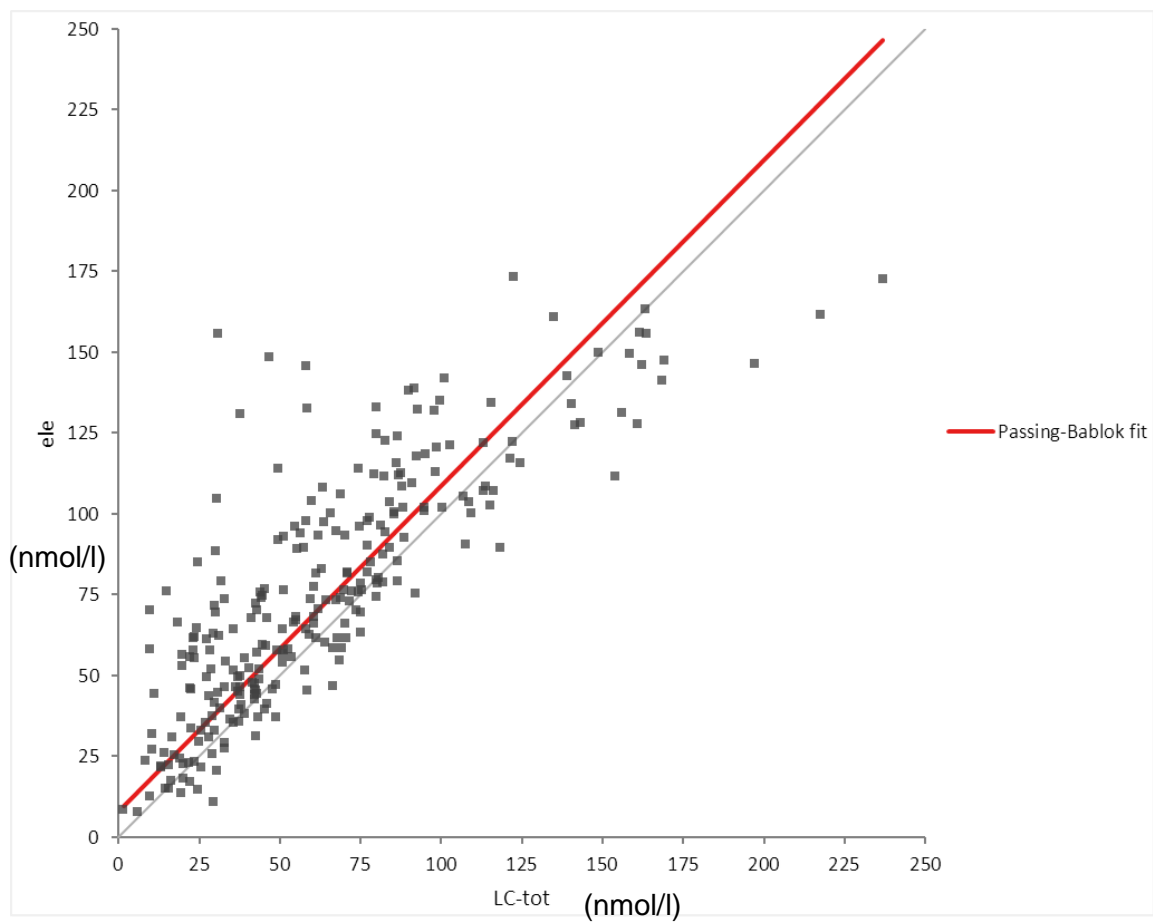
Graf 12. Zobrazení četnosti a rozložení jednotlivých vzorků naměřených metodou elecsys vit. D total na selektovaném souboru dětské populace mužského pohlaví



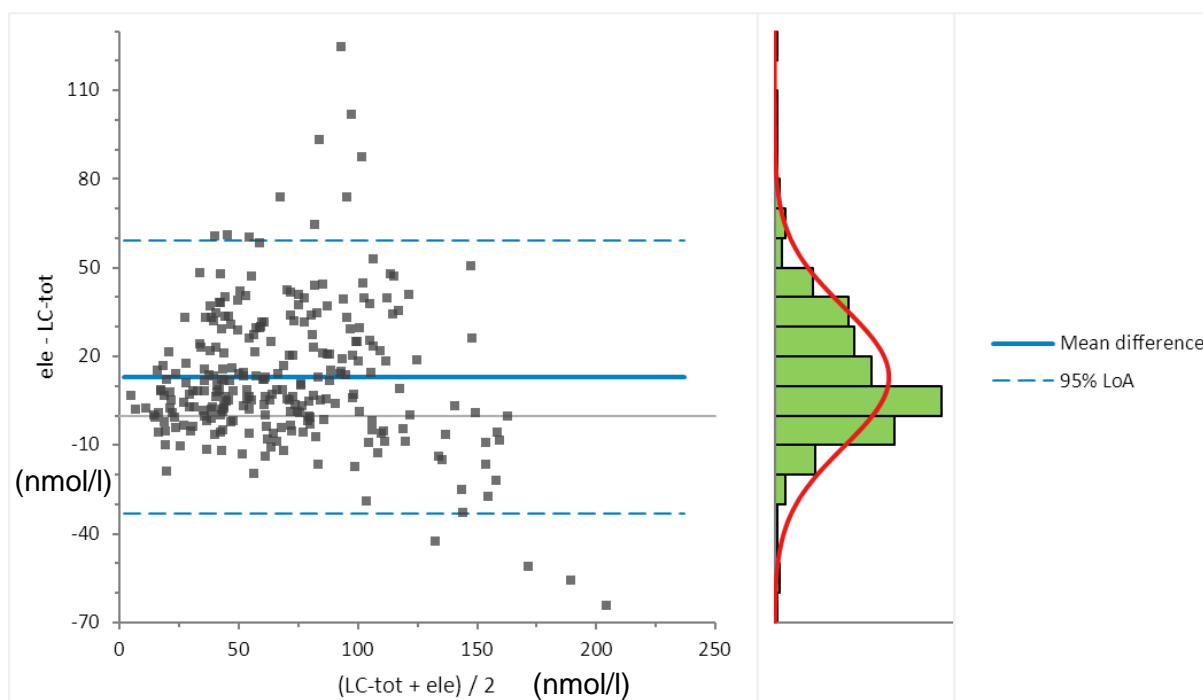
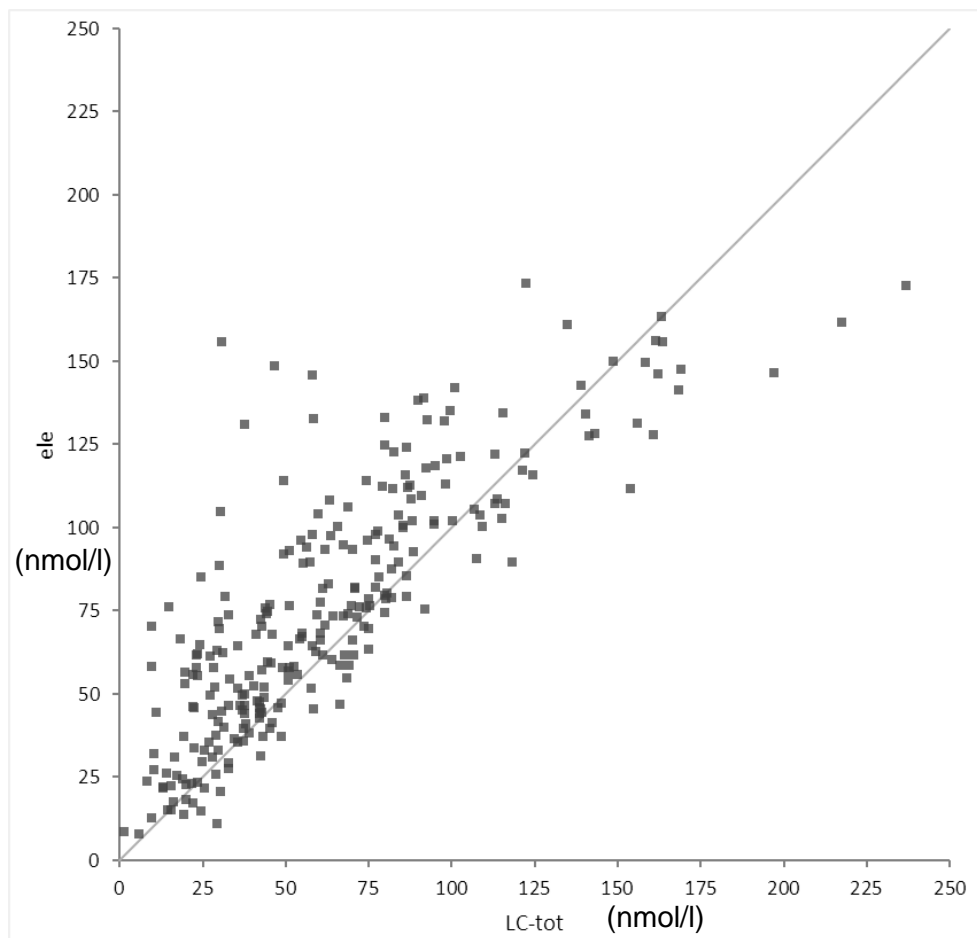
Tab. 15. Data k zobrazení četnosti a rozložení jednotlivých vzorků naměřených metodou elecsys vit. D total na selektovaném souboru dětské populace mužského pohlaví

N	151					
ele	Mean	SE	SD	Variance	Skewness	Kurtosis
ele	77,764	3,0687	37,709	1421,946	0,4	-0,52
ele	Minimum	1st quartile	Median	3rd quartile	Maximum	IQR
ele	8,25	49,225	73,110	103,217	172,40	53,992
Quantile	ele					
0,050	22,016					
0,950	147,400					

Graf 13. Srovnání metodou Passing-Bablok pro celkovou dětskou populaci



Graf 14. Srovnání metodou Bland-Altman pro celkovou dětskou populaci



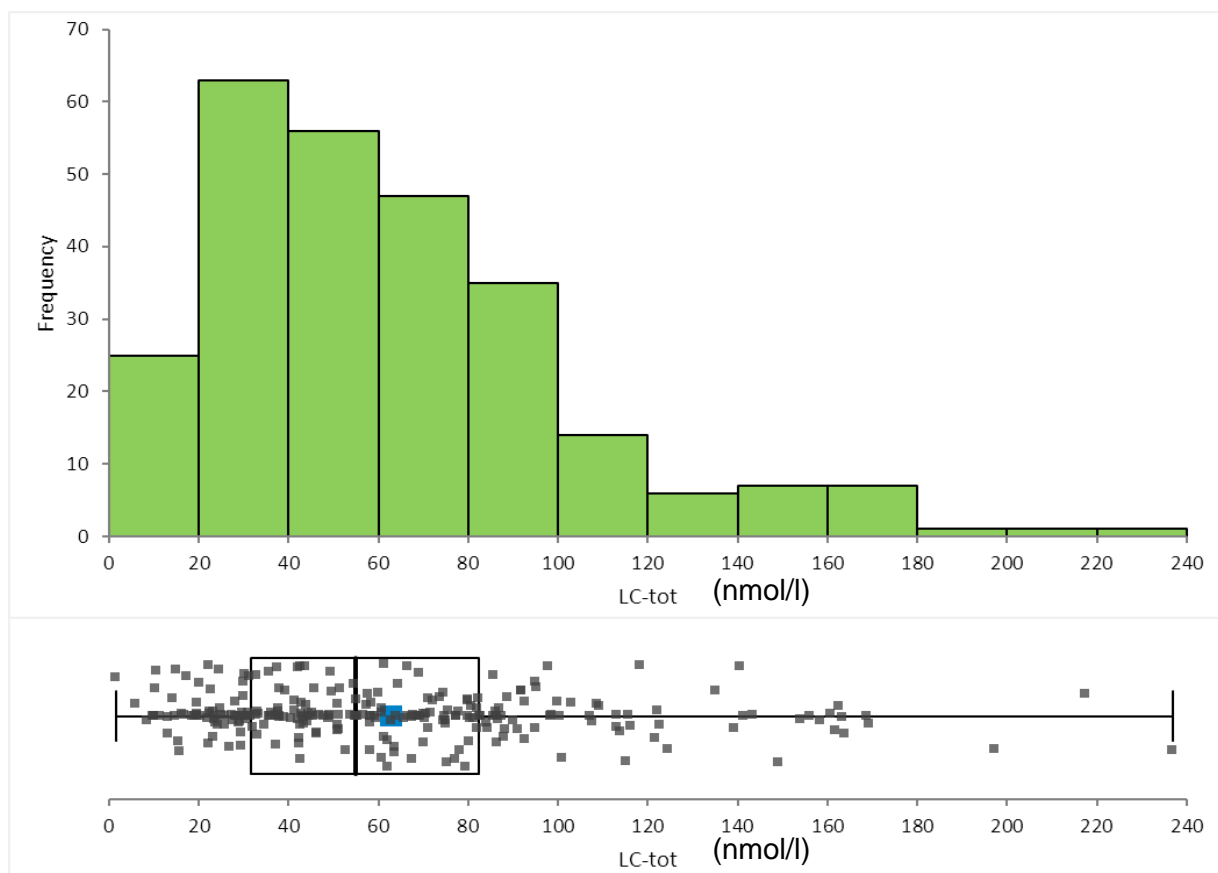
Tab. 16. Parametry k vyhodnocení dle metody Passing-Bablok pro celkovou dětskou populaci

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

Tab. 17. Parametry k vyhodnocení dle metody Bland-Altman pro celkovou dětskou populaci

n	263			
Method	Measuring interval			
LC-tot	1,57	to 236,90		
ele	7,71	to 173,00		
Correlation - r	0,820			
<b>Fit D on A</b>				
Constant difference				
Parameter	Estimate	95% CI		SE
Mean difference	13,086	10,2298	to 15,9426	1,4507
95% Lower LoA	-33,023	-37,9113	to -28,1356	2,4823
95% Upper LoA	59,196	54,3080	to 64,0837	2,4823
SD	23,526			

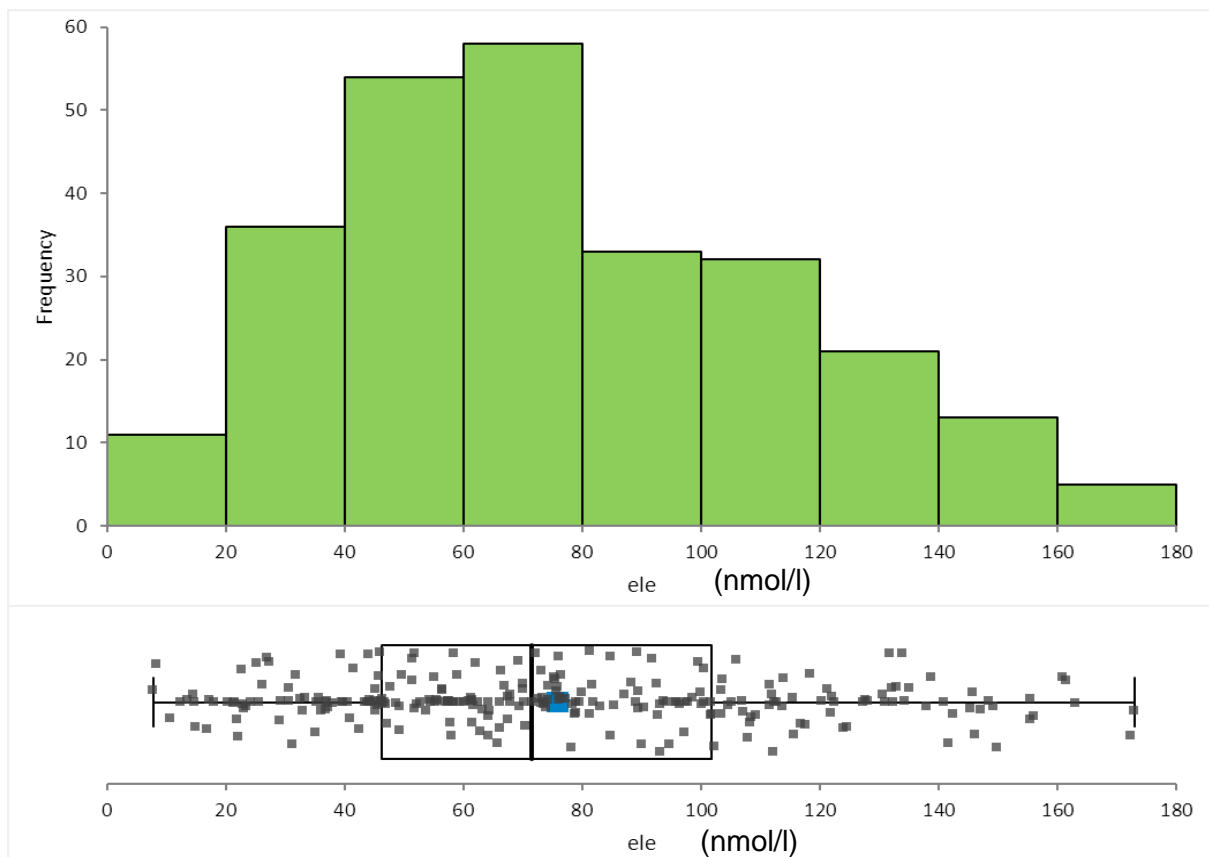
Graf 15. Zobrazení četnosti a rozložení jednotlivých vzorků naměřených metodou HPLC MS/MS na selektovaném souboru celkové dětské populace



Tab. 18. Data k zobrazení četnosti a rozložení jednotlivých vzorků naměřených metodou HPLC MS/MS na selektovaném souboru dětské populace mužského pohlaví

N	263					
	Mean	SE	SD	Variance	Skewness	Kurtosis
LC-tot	62,805	2,4832	40,271	1621,792	1,3	2,03
	Minimum	1st quartile	Median	3rd quartile	Maximum	IQR
LC-tot	1,57	31,581	54,985	82,275	236,90	50,693
Quantile	LC-tot					
0,050	14,888					
0,950	151,495					

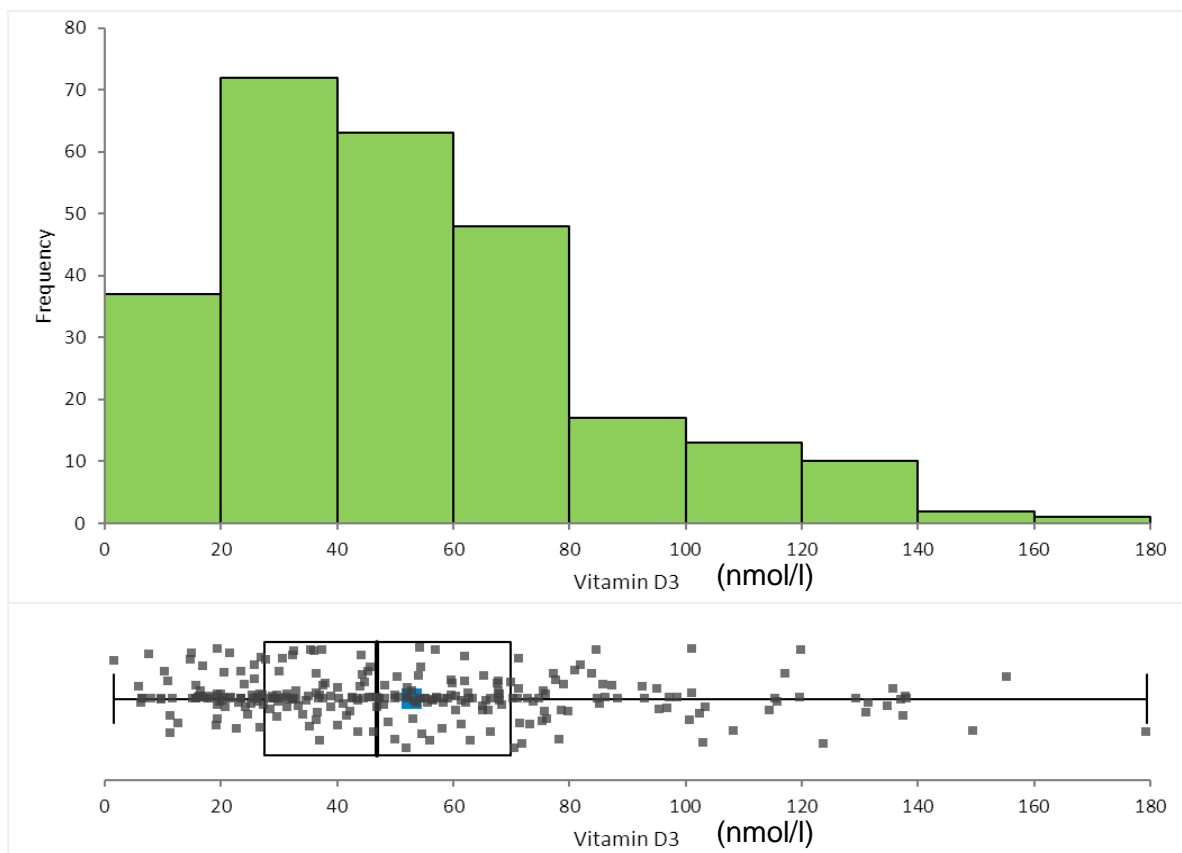
Graf 16. Zobrazení četnosti a rozložení jednotlivých vzorků naměřených metodou elecsys vit. D total na selektovaném souboru dětské populace mužského pohlaví



Tab. 19. Data k zobrazení četnosti a rozložení jednotlivých vzorků naměřených metodou elecsys vit. D total na selektovaném souboru dětské populace mužského pohlaví

N	263					
ele	Mean	SE	SD	Variance	Skewness	Kurtosis
ele	75,891	2,3255	37,713	1422,252	0,4	-0,53
ele	Minimum	1st quartile	Median	3rd quartile	Maximum	IQR
ele	7,71	46,310	71,530	101,767	173,00	55,457
Quantile	ele					
0,050	21,435					
0,950	146,000					

Graf 17. Zobrazení četnosti a rozložení jednotlivých vzorků pro vitamín D3 naměřený metodou HPLC MS/MS na selektovaném souboru celkové dětské populace



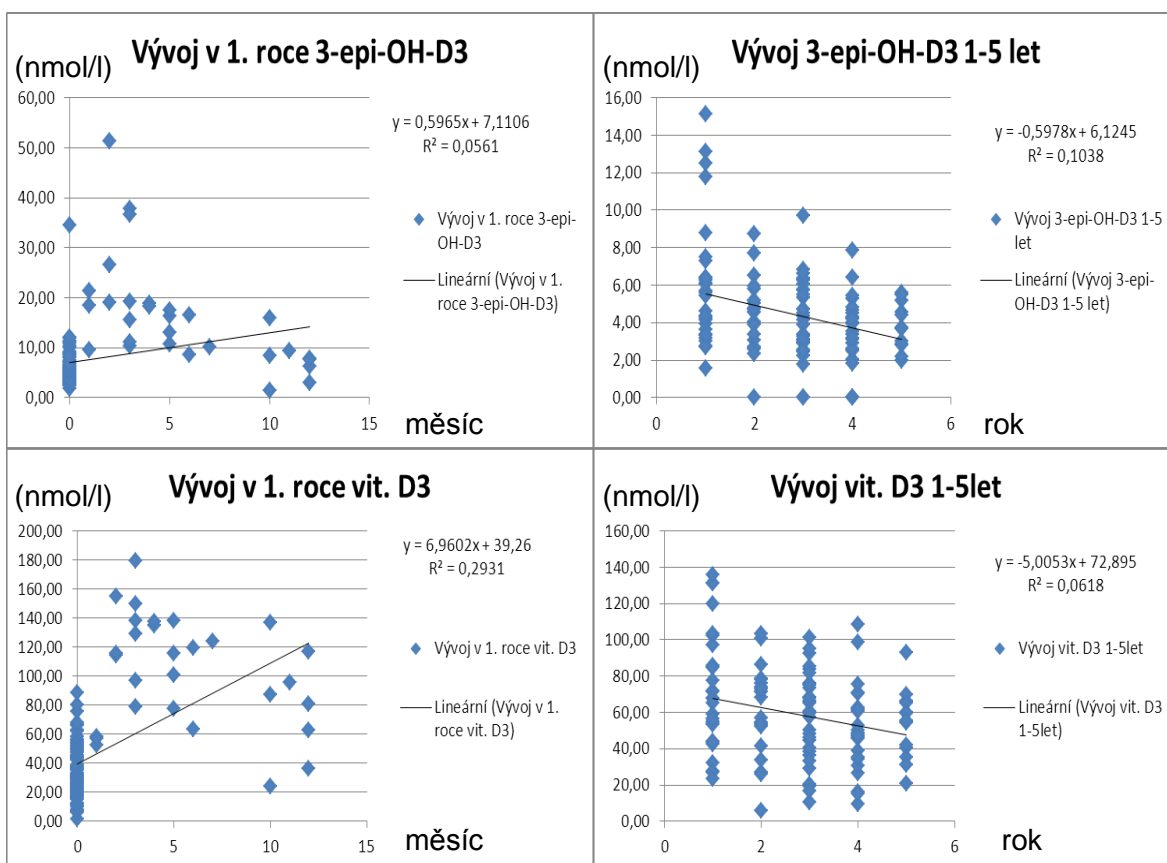
Tab. 20. Data k zobrazení četnosti a rozložení jednotlivých vzorků pro vitamín D3 naměřených metodou HPLC MS/MS na selektovaném souboru celkové dětské populace

N	263					
	Mean	SE	SD	Variance	Skewness	Kurtosis
Vitamin D3	52,854	2,023	32,807	1,076 E+03	1,0	1,01
	Minimum	1st quartile	Median	3rd quartile	Maximum	IQR
Vitamin D3	1,572	27,438	46,873	69,773	179,405	42,335
Quantile	Vitamin D3					
0,050	11,519					
0,950	1,218 E+02					

### 4.2.3. Vývoj množství forem vitamínu D

V kapitole 4.5.2. Normálních hodnot vitamínu D byla zmínka o vývoji C3-epi(OH)D3 během prvních let života. Díky podrobným výsledkům můžeme porovnat získané hodnoty s hodnotami z literatury. Výsledky vývoje nemohou být brány dogmaticky, protože se nejedná o sériové měření jednotlivých pacientů. Také jsou částečně ovlivněny velkým počtem novorozenců.

Graf 18. Vývoj jednotlivých forem v 1. a během 1-5 roku života

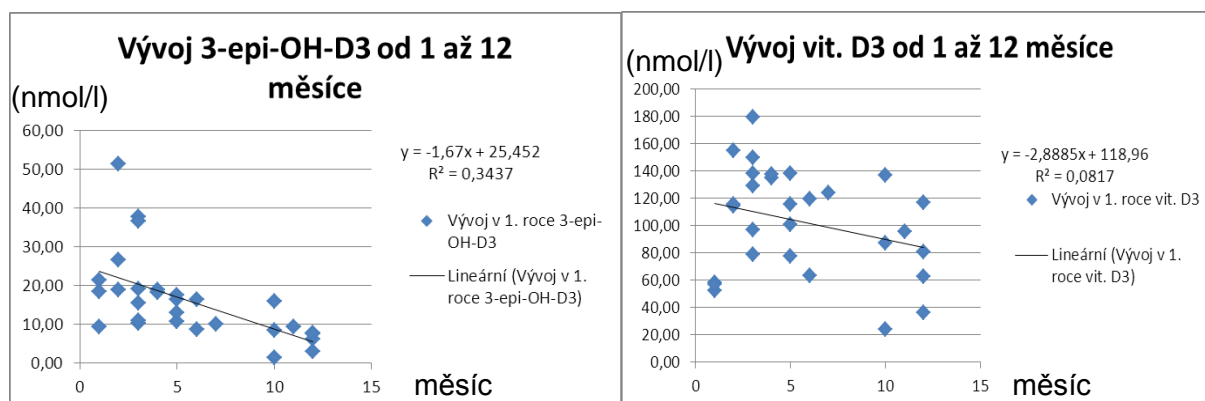




Tab. 21. Střední hodnoty ke grafu 18.

	Průměr (nmol/l)	Medián (nmol/l)
vit. D3 v 1. roce	47,48	36,20
vit. D3 1-5 let	59,07	58,15
C3-epi(OH)D3 v 1. roce	7,78	5,62
C3-epi(OH)D3 1-5 let	4,47	4,23

Graf 19. Vývoj jednotlivých forem od 1. do 12. měsíce života



Tab. 22. Střední hodnoty ke grafu 19.

	Průměr (nmol/l)	Medián (nmol/l)
vit. D3 od 1 až 12 měsíce	102,72	114,49
3-epi(OH)D3 od 1 až 12 měsíce	16,07	15,47

## 5. Diskuze

Výsledky zmíněné v kapitole 5.2.1. Výsledky celkového souboru pro metodu elecsys vit. D total korelovaly s hodnotami zmíněnými v teoretické části v kapitole 5.2.1. Normálních hodnot. Nijak však nenapomáhají k řešení problematiky rozdělení nejmladší populace do jednotlivých skupin referenčního rozmezí, případně s upřesněním hodnoty normálního všeobecného zdraví u nejmladší populace. Díky rozdělení podle pohlaví, bylo možné porovnání, které přineslo očekávaný výsledek, kdy obě skupiny jsou si velmi podobné. Dalším potvrzeným faktem je velké množství vzorků nacházející se v hodnotách mírně deficitní. Vliv na tyto hodnoty má nesporně vnější prostředí, protože vzorky byly odebírané v zejména v jarních měsících. Zmíněný fakt ovlivní množství vitamínu D, který si lidský organismus sám biosyntézou vytvoří.

K ověření správnosti stanovení slouží dvoubodová kontrola. Měření kontrol se provádí před analýzou vzorků, případně na začátku dne. Výsledky kontrol jsou uvedeny v tab. 7. Tyto kontroly byly prováděny i po ukončení měření, aby byla zajištěna maximální spolehlivost výsledků.

Hlavním cílem práce bylo srovnání dvou metod. Měření první metody elecsys vit. D total proběhlo na analyzátoru cobas e411 ROCHE. Pro srovnání byla použita metoda HPLC MS/MS.

Vyhodnocené výsledky jsou opět rozděleny dle pohlaví, ale nechybí ani vyhodnocení pro celkovou populaci. Vyhodnocovací metoda Passing-Bablok ukázala protichůdné trendy vývoje růstu a poklesu difference metod. U populace ženského pohlaví byl růst difference směrem k vyšším hodnotám a naopak u populace mužského pohlaví se ukázal opačný trend. Výsledkem u souboru s oběma pohlavími pak logicky byla téměř rovnoběžná přímka. Závěrem, který metoda Passing-Bablok přinesla je, že metody dobře korelují. Porovnatelnost metod potvrzuje i druhá použitá metoda Bland-Altman, kde difference není výrazná, zvážíme-li VK 10%, který se pro stanovení vit. D doporučuje.

Srovnání dvou metod přineslo zjištění, že metoda elecsys vit. D total je srovnatelná s metodou HPLC MS/MS. Medián změřený metodou HPLC MS/MS pro celkovou populaci má hodnotu 54,9 nmol/l. Tento fakt mění hodnocení stavu na mírný deficit. Většina populace se pak nachází v kategoriích spadajících pod nedostatečnou hladinu vitamínu D.

V kapitole 4.5.2. Normálních hodnot byly uvedeny výsledky sledování vývoje množství forem vitamínu D3 a C3-epi(OH)D3 během prvních let života. Výsledky zmíněné v grafu 18. a tab. 21. ukazují podobný trend, kdy epimerické formy je v prvním roce více. Naopak hladina vitamínu D3 během prvního roku života roste, ale vyšší hodnoty jsou stabilní až v po prvním roce. Vyřazením vzorků, které pocházely od čerstvě narozených dětí, se střední hodnoty epimeru a vit. D3 zdvojnásobily, viz tab. 22.

## 6. Závěr

Úvodní část práce patřila teoretickému základu k pochopení problematiky týkající se komplexnosti vitamínu D. Některé části biosyntézy a zejména účinků jednotlivých forem vitamínu D doposud nebyly odhaleny. Pravděpodobně i z těchto důvodů je o tento marker tak velký zájem. Doposud popsané účinky se týkají téměř všech onemocnění, která se dnes velmi často vyskytují jak v bohatém tak chudém světě.

Právě vliv na zmíněné nemoci je spojován s deficitem vitamínu D. Co se však dá považovat za deficit? Existuje mnoho doporučení referenčních mezí, doposud ale nedošlo ke sjednocení, proto je důležité nadále pracovat na dané problematice. Jednotné musejí být také výsledky poskytované analyzátoři. Za tímto účelem vznikla i tato práce.

Porovnání metody elecsys vit.D total a HPLC MS/MS přineslo zjištění, která mohou pomoci při hodnocení výsledků získané touto metodou. Zajímavá zjištění přineslo stanovení jednotlivých forem vitamínu D metodou HPLC MS/MS, kde trend vývoje hladiny C3-epi(OH)D3 v prvních měsících nejprve naroste a pak postupně klesá.

Výsledná hodnota, kterou přináší metoda elecsys vit. D total, je použitelným markerem ukazujícím na deficit případně hypervitaminózu. Podstatné je, že vliv výsledné hodnoty na diagnózu by neměl být dogmatický, ale musí být brán jako důležitý faktor, který napomáhá vyšetřujícímu lékaři určit stav pacienta.

## 7. Literatura

1. Wiendersa, J., et al.: *Preanalytical Stability of 25(OH)-Vitamin D3 in Human Blood or Serum at Room Temperature: Solid as a Rock*, Clinical chemistry, **2009**
2. Holick, M., et al.: *Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline*, The Endocrine Society, **2011**
3. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/D.html>, přečteno 15.4.2014
4. Broulík, P., Broulíková, K.: *Vitamín d v klinické praxi*, Practicus, **2013**
5. Čepová, J., Pochová, M., et al.: *Slunce, ryby a vitamin D*, Labor Aktuell, **2011**
6. Bailey, D., Veljkovic, K., et al.: *Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D3 C3-epimer*, Clinical Biochemistry, **2012**
7. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0f/Reaction-Dehydrocholesterol-PrevitaminD3.png>, přečteno 20.3.2014
8. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ec/Reaction-PrevitaminD3-VitaminD3.png>, přečteno 20.3.2014
9. Novotná, Š: *Vitamín D u onkologických pacientů*, Brno: Masarykova universita, **2012**
10. Sakaki, T., et al.: *Metabolism of vitamin D3 by cytochrom P450*, Frontiers in Bioscience, **2005**
11. [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b3/Calcitroic\\_acid.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b3/Calcitroic_acid.png), přečteno 20.3.2014
12. Sigmundsdottir, H., et al.: *DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27*, Nat Immunol., **2007**
13. Kogawa, M., et al.: *Osteoclastic metabolism of 25(OH)-vitamin D3: a potential mechanism for optimization of bone resorption*, Endocrinology, **2010**
14. [http://www.duc.auburn.edu/~deruija/endo\\_vitamind.pdf](http://www.duc.auburn.edu/~deruija/endo_vitamind.pdf), přečteno 25.3.2014
15. Forstová, Z.: *Význam nedostatku vitamínu D pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění*, Univerzita Pardubice, **2013**
16. Šantavý, F., et al.: *Biochemie pro studující medicíny*. Praha : AVICENUM, **1975**
17. <http://www.publichealthreviews.eu/show/f/35>, přečteno 3.5.2014
18. Mannstadt, M., et al.: *Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties*, American Physiological Society, **1999**
19. Luong, Kv., Nguyen, et al.: *Impact of vitamin D in the treatment of tuberculosis*, The American Journal of the Medical Science, **2011**

20. Holick, M., et al.: *The Vitamin D Deficiency Pandemic: a Forgotten Hormone Important for Health*, Public Health Reviews. **2010**
21. [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cf/Rickets\\_USNLM.gif](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cf/Rickets_USNLM.gif), přečteno 25.3.2014
22. [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/da/Blausen\\_0686\\_Osteoporosis\\_01.png/450px-Blausen\\_0686\\_Osteoporosis\\_01.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/da/Blausen_0686_Osteoporosis_01.png/450px-Blausen_0686_Osteoporosis_01.png), přečteno 25.3.2014
23. [http://trevorkaye.weebly.com/uploads/3/3/2/7/3327378/5798415\\_orig.jpg](http://trevorkaye.weebly.com/uploads/3/3/2/7/3327378/5798415_orig.jpg), přečteno 25.3.2014
24. <http://www.cobas.com/content/dam/cobas/images/product/Elecsys-Vitamin-D-total-assay/vitamin%20d%20protein%20binding.jpg>, přečteno 10.4.2014
25. Looker, A., et al.: *Vitamin D Status: United States*, Clinical Laboratory News, **2011**
26. Vávrová, J., Friedecký, B., Maláková, J.: *Současný stav stanovení vitamínu D v séru*, **2012**
27. [http://www.diasorin.com/sites/default/files/allegati\\_prodotti/Vitamin%20D%20Spin%20209.pdf](http://www.diasorin.com/sites/default/files/allegati_prodotti/Vitamin%20D%20Spin%20209.pdf), přečteno 22.4.2014
28. <http://www.ceva-edu.cz/mod/data/view.php?d=13&rid=178>, přečteno 22.4.2014
29. <http://www.labtestsonline.cz/tests/VitaminD.html?tab=7>, přečteno 22.4.2014
30. <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/vitamin-d-a-vybrane-endokrinopatie-473459>, přečteno 23.4.2014
31. Topolčan, O., Kinkorová, J. a Vondra, K.: *Vitamin D a riziko vzniku kardiiovaskulárních chorob a diabetu*, Med. praxi. **2012**
32. Wang, T.J., et al.: *Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease*, Circulatio, **2008**
33. Li, Y.C., et al.: *Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure*, Journal of steroid biochemistry and molecular biology, **2004**
34. Yazdanpanah, M., Bailey, D., et al.: *Analytical measurement of serum 25-OH-vitamin D3, 25-OH-vitamin D2 and their C3-epimers by LC-MS/MS in infant and pediatric specimens*, Clinical Biochemistry, **2012**
35. <http://www.medcalc.org/manual/blandaltman.php>, přečteno 22.4.2014
36. [http://nd04.jxs.cz/734/744/e2cdfbf081\\_69113059\\_o2.gif](http://nd04.jxs.cz/734/744/e2cdfbf081_69113059_o2.gif), přečteno 26. 4 2014
37. Bučková, et al.: *Intoxikace vitamínem D – kazuistika*, Klin. Biochem. Metab., **2013**
38. <http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/casopis/cis1-01/passing.htm>, přečteno 22.4.2014

39. Ouweland, J.M.W., Beijers, A.M., et al.: *C3-epimer cross-reactivity of automated 25-hydroxyvitamin D immunoassays*, Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk, **2013**
40. Bobba, G.: *25(OH)D testing and vitamin D supplementation during pregnancy*, ROCHE, **2014**
41. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ergocalciferol.svg>, přečteno 10.2.2014
42. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cholecalciferol.svg>, přečteno 10.2.2014
43. Molnar, F., et al.: *1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ -3-Epi-Vitamin D $_3$ , a Natural Physiological Metabolite of Vitamin D $_3$ : Its Synthesis, Biological Activity and Crystal Structure with Its Receptor*, Pone journal, **2011**
44. Brown, A.J., Ritter, C.S., et al.: *Isolation and Identification of 1 $\alpha$ -Hydroxy-3-epi-Vitamin*, Journal of Cellular Biochemistry, **2005**
45. Příbalový leták vitamin D total ROCHE, V4,2012-09
46. Beacher, S., et al.: *Simultaneous quantification of four vitamin D metabolites in human serum using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for vitamin D profiling*, Clinical Biochemistry, **2012**
47. Vogeser, M., et al.: *Candidate Reference Method for the Quantification of Circulating 25-Hydroxyvitamin D $_3$  by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*, Clinical Chemistry, **2004**
48. Neshyba, P.: *Filozofické problémy normy v klinické biochemii, disertační práce*, Praha: Lékařská fakulta UK, **1991**