

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**POROVNÁNÍ IMUNOANALYTICKÝCH METOD
A CHROMATOGRFICKÉHO STANOVENÍ
25-HYDROXYVITAMINU D V PRIVÁTNÍ LABORATOŘI**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Autor práce:	Mgr. Kateřina Andelová
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí rigorózní práce:	doc. RNDr. David Jirovský, Ph.D.

Olomouc 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že předložená rigorózní práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele doc. RNDr. Davida Jirovského, Ph.D. Veškerou literaturu a další zdroje, ze kterých jsem při zpracování čerpala, řádně cituji a jsou uvedené v seznamu použité literatury.

Ostrava, březen 2016

.....

Mgr. Kateřina Andelová

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. RNDr. Davidu Jirovskému, Ph.D. za vstřícný přístup, odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi věnoval při zpracovávání rigorózní práce.

Mgr. Kateřina Andelová

ABSTRAKT (CZ)

Práce se zabývá problematikou klinického významu a kvantitativního stanovení vitamínu D v krvi. Význam testování vitamínu D v krevní cirkulaci se zvyšuje celosvětově a koreluje s nedávnými výzkumy prokazujícími pozitivní korelaci mezi deficitem vitamínu D a metabolickými chorobami, imunodeficiencí a dalšími nemocemi. Stávající testy pro stanovení 25-OH vitamínu D postrádají srovnatelnost s kandidátní referenční metodou, což způsobuje obtíže při diagnostice a monitorování vitamínu D. Předkládaná práce srovnávala výkonnost 2 automatizovaných imunoanalytických metod a 1 kapalinové chromatografie s UV detekcí.

Práce je členěna na teoretickou a praktickou část. V teoretické části jsou zpracovány základy metabolismu vitamínu D a interpretace základních pojmů souvisejících s daným tématem. Praktická část kombinuje popis použitých diagnostických souprav a analytických systémů. Získaná data byla zpracována pomocí statistického programu MedCalc.

Klíčová slova: 25-OH vitamin D, HPLC, imunochemické metody, standardizace, srovnatelnost

ABSTRACT (EN)

The present work deals clinical significance and determination of vitamin D in the blood. The importance of vitamin D in the blood circulation is increasing worldwide and correlates with the recent studies showing positive correlation between vitamin D insufficiency and metabolic diseases, immunodeficiency and other diseases. Current assays for the determination of 25-hydroxyvitamin D lack comparability with a candidate reference method, causing difficulties in diagnosis and monitoring of vitamin D deficiency. The study compared the performance of 2 automated immunoassays and 1 liquid chromatographic method with UV detection.

The work is divided into theoretical and practical part. The theoretical part presents the basics of vitamin D metabolism and interpretation of the basic concepts related to the topic. The practical part includes a description of laboratory tests and used analyzers. The obtained laboratory data were processed by statistical programme MedCalc.

Keywords: 25-OH vitamin D, HPLC, immunochemistry, standardization, comparability

OBSAH

ÚVOD	9
1 VITAMINY	11
1.1 Klasifikace a biomedicínský význam vitamínů	11
1.2 Historické aspekty metabolismu vitamínu D	13
1.2 Syntéza a metabolismus vitamínu D	13
1.2.1 Počáteční strukturální přestavby prekurzorů vitamínu D	14
1.2.2 Hepatální syntéza kalcidiolu (25-OH vitamínu D)	14
1.2.3 Renální syntéza kalcitriolu	14
1.2.4 Mechanismus účinku hormonálně aktivního vitamínu D	16
1.2.5 Extrarenální produkce kalcitriolu (1,25 – (OH) ₂ vitamínu D)	16
1.2.6 Katabolismus kalcitriolu	16
1.3 Vitamin D u současné populace	16
2 KLINICKÝ VÝZNAM VITAMINU D	19
2.1 Dysbalance plazmatických hladin vitamínu D	19
2.1.1 Deficit vitamínu D	19
2.1.2 Nadbytek vitamínu D	20
2.2 Vitamin D a renální onemocnění	20
2.2.1 Chronické onemocnění ledvin a metabolismus vitamínu D	21
2.3 Onemocnění skeletu a vitamin D	22
2.3.1 Osteoporóza	23
2.3.2 Osteomalacie	25
2.4 Úloha vitamínu D v kardiologii	27
2.4.1 Vaskulární kalcifikace	27
2.4.2 Hypertrofie levé komory srdeční	28
2.5 Vitamin D a neurologická onemocnění	28
2.5.1 Deficit vitamínu D u cerebrovaskulárních onemocnění	29
2.5.2 Deficit vitamínu D u roztroušené sklerózy	29
2.5.3 Deficit vitamínu D u kognitivních poruch	29

3 METODY STANOVENÍ VITAMINU D V HUMÁNNÍ MEDICÍNĚ	31
3.1 Imunoanalytické metody stanovení vitamínu D	31
3.1.1 Obecné základy imunoanalytických metod	31
3.1.2 Limitace imunoanalytických metod	31
3.2 Separační metody stanovení vitamínu D	32
3.2.1 Referenční metoda LC – MS/MS	33
3.2.2 Ostatní chromatografické techniky	34
3.2.3 Limitace chromatografických metod stanovení	34
4 EXTERNÍ HODNOCENÍ KVALITY SE ZAMĚŘENÍM NA STANOVENÍ 25-OH VITAMINU D	35
4.1 Externí hodnocení kvality v České republice, společnost SEKK s r. o.	35
4.1.1 Hodnotící ukazatele EHK SEKK spol. s r. o.	35
4.1.2 Kontrolní cyklus kostní markery	36
4.1.3 Interpretace výsledků externího hodnocení kvality analytu 25-OH vitamínu D v České republice	38
4.2 Zahraniční kontrolní cykly EHK	38
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	42
5.1 Cíl experimentálního výzkumu	42
5.2 Charakteristika testovaného souboru.....	42
5.3 Pracovní postup.....	42
5.3.1 Zpracování vzorku biologického materiálu	42
5.3.2 Přístroje, výpočetní technika a pomůcky	43
5.3.3 Použité reagensie	43
5.3.4 Elecsys Vitamin D total (Roche)	44
5.3.5 25-OH Vitamin D (Abbott).....	46
5.3.6 25-OH Vitamin D ₂ /D ₃ (Recipe)	47
6 VÝSLEDKY VÝZKUMNÉHO ŠETŘENÍ	50
6.1 ELECSYS vitamin D TOTAL (Roche Diagnostics, ECLIA)	51
6.2 25-OH Vitamin D ₂ /D ₃ (Recipe, HPLC)	52
6.3 25-OH Vitamin D (Abbott, cmia)	52
6.4 Korelace metod stanovení 25-OH vitamínu D.....	53

6.4.1 Korelace imunochemické metody stanovení 25-OH vitamínu D (Roche, ECLIA) a chromatografické metody (Recipe, HPLC)	53
6.4.2 Korelace imunochemické metody stanovení 25-OH vitamínu D (Abbott, CMIA) a chromatografické metody (Recipe, HPLC)	55
6.4.3 Korelace imunochemických metod stanovení 25-OH vitamínu D Abbott, CMIA a Roche, ECLIA.....	56
7 DISKUSE.....	58
8 ZÁVĚR.....	61
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63
SEZNAM OBRÁZKŮ	71
SEZNAM TABULEK	71
SEZNAM GRAFŮ	72
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	73
PŘÍLOHY	75

Úvod

Vitamin D představuje důležitou komponentu pro regulaci homeostázy kalcia a fosfátů v lidském organismu. V současné době se enormně zvyšuje počet klinických indikací pro kvantitativní stanovení vitamínu D v biologickém materiálu, který souvisí s narůstajícím významem tohoto analytu. Uvažujeme-li o vitamínu D, je nutné blíže specifikovat analyt, který stanovujeme. Rozlišují se dvě hlavní formy vitamínu D, vitamin D₃ (cholecalciferol) živočišného původu a vitamin D₂ (ergocalciferol) rostlinného původu, přičemž ergocalciferol ve stravě představuje jen omezený zdroj příjmu a majoritním zdrojem pro člověka představuje vlastní produkce pod vlivem ultrafialového (dále jen UV) záření. Endogenně a exogenně přijatý vitamin D podléhá identické metabolické přeměně na aktivní formu vitamínu D, přičemž majoritním počátečním bodem strukturální přestavby na biologicky aktivní vitamin D je 25-OH vitamin D (kalcidiol), jehož hydroxylace v poloze 25 probíhá v hepatocytech a následující hydroxylace na uhlíku 1 probíhá v ledvinách. Vzniklý 1,25-(OH)₂ vitamin D (kalcitriol) představuje biologicky aktivní formu vitamínu D. Pro potřeby předkládané rigorózní práce bude experimentální část a převážná část teoretické části zaměřena na 25-OH vitamin D (kalcidiol), který je nejvhodnějším ukazatelem stavu metabolismu vitamínu D v lidském organismu a zohledňuje endogenní i exogenní přívod neaktivních prekurzorů (Kulda, 2012), a proto bude v textu prezentovat význam slova vitamin D.

V kontextu nárůstu počtu požadavků na vyšetření vitamínu D se na laboratorním trhu objevují diagnostické soupravy pro kvantitativní stanovení v séru a/nebo plazmě odlišných výrobců. Tato poměrně široká nabídka diagnostických souprav, převážně na principu imunochemického stanovení, však vykazuje řadu analytických nedostatků z důvodu absence standardizace měření, která spočívá v definování referenční metody s využitím certifikovaného referenčního materiálu NIST SRM 972a a NIST SRM 2972 (Friedecký a Vávrová, 2014; Friedecký a Vávrová, 2016) a návazností pracovních kalibrátorů výrobců diagnostických souprav (Friedecký a Vávrová, 2014; 2012a). Systematické diference mezi diagnostickými soupravami pro kvantitativní stanovení vitamínu D jsou patrné z výsledků externího hodnocení kvality (dále jen EHK) tuzemských, popř. zahraničních organizátorů. Tyto diference mohou vyústit v mylnou klinickou interpretaci výsledků stanovení s přímým dopadem na zdraví jednotlivce.

Předkládaná rigorózní práce si klade za cíl prezentovat současný stav úrovně analytické kvality měření vitamínu D v biologickém materiálu použitím tří diagnostických souprav různých výrobců a tyto závěry konfrontovat s výsledky EHK.

Rigorózní práce je členěna do dvou částí, teoretické a experimentální. Teoretická část přináší ucelený přehled základních poznatků o metabolismu vitamínu D, jeho klinickém využití, přehledem metod stanovení v humánní medicíně a výčtem EHK se zaměřením na tento analyt, v celkem 4 kapitolách.

Stěžejní úsek rigorózní práce představuje experimentální část, členěná do 4 kapitol se stručným popisem jednotlivých metod stanovení, charakteristikou výzkumného šetření i testovaného souboru a rovněž vlastním statistickým zpracováním výsledků šetření. Výstupy z výzkumného šetření jsou konfrontovány s literárními údaji v diskuzní části a konečné výstupy práce prezentuje závěrečná část.

Výběr tématu rigorózní práce reflektuje aktuálnost problematiky stanovení vitamínu D v biologickém materiálu s ohledem na akceleraci požadavků na toto stanovení. Použité literární zdroje vycházejí z recentních publikací s ohledem na aktuálnost dané problematiky.

1 VITAMINY

První empirické poznatky o vitamínech se datují již od starověku. První experimentální práce zabývající se problematikou vitaminů se objevují v 90. letech 19. století, kdy lze evidovat zvýšený nárůst poznatků o etiologii karencí. Přičemž objev vitaminů nelze přisuzovat pouze jedné osobě, ale je reflexí dlouhodobého vývoje analytických metod, který umožnil ověření experimentálních předpokladů o těchto sloučeninách (Hlúbik a Opltová, 2004). Kapitola 1 sumarizuje základní poznatky a klasifikaci vitaminů, přičemž v navazujících podkapitolách jsou shrnuty poznatky o syntéze, metabolismu a katabolismu vitamínu D v lidském organismu.

1.1 KLASIFIKACE A BIOMEDICÍNSKÝ VÝZNAM VITAMÍNŮ

Vitamíny představují skupinu organických látek, které v malém množství cirkulují v krevním oběhu a ovlivňují celou řadu biochemických funkcí. Všeobecně však platí, že je nelze syntetizovat v organismu, a proto se předpokládá jejich přísun potravou (Hlúbik a Opltová, 2004; Murray et al., 2012). Z této definice lze poukázat na postavení vitamínu D a částečně niacinu, kteréžto lze syntetizovat endogenně (Murray et al., 2012).

Pro jednotlivé sloučeniny nesoucí název vitaminy neexistuje přímý strukturální vztah, který by umožnil jejich klasifikaci, důležitým aspektem pro rozlišení je jejich rozpustnost, podle níž se vitaminy diferencují na dvě skupiny (Hlúbik a Opltová, 2004; Vávrová et al., 2007):

- *vitaminy rozpustné v tucích (lipofilní):* vitamin A, vitamin D, vitamin E, vitamin K,
- *vitaminy rozpustné ve vodě:* skupina vitamínů B-komplexu (B₁, B₂, B₆, B₁₂, niacin, kyselina listová, kyselina pantothenová, biotin), vitamin C.

Nedostatečný příjem vitamínu potravou vyvolává v organismu rozličné poruchy z jeho nedostatku, lehčí formy nedostatku se označují jako hypovitaminózy, těžší formy karence se označují jako avitaminózy, které mohou mít i fatální následky při chronickém nedostatku vitaminů v potravě. Jak uvádí Hlúbik a Opltová (2004) nevznikají tyto stavy pouze při exogenním nedostatku, ale mohou se na nich podílet i jiné faktory (špatná resorpce vitaminů v gastrointestinálním traktu, zvýšená potřeba vitaminů při změnách v organismu apod.). Souhrn poznatků o vitamínech, včetně biomedicínského významu ilustruje Tab. 1.

Tab. 1 Klasifikace, biomedicínský význam a symptomy deficitu vitaminů

Vitamin	Funkce	Onemocnění z deficitu
<ul style="list-style-type: none"> <u>Vitaminy rozpustné v tucích</u> 		
A, retinol, β -karoten	zrakové pigmenty v sítnici, regulace genové exprese a buněčné diferenciaci	šeroslepost, xeroftalmie, keratinizace kůže
D, kalciferol	udržování rovnováhy Ca, posiluje jeho vstřebávání ve střevě a mobilizuje kostní minerály, regulace genové exprese a buněčné diferenciaci	rachitis (slabá mineralizace kostí), osteomalacie
E, tokoferoly	antioxidant v buněčných membránách, úloha v signalizaci buněk	velmi vzácné, neurologické potíže
K, fylochinon	koenzym při tvorbě γ -karboxyglutamátu v enzymech krevního srážení a kostní matrix	poruchy srážení krve, hemoragické onemocnění
<ul style="list-style-type: none"> <u>Vitaminy rozpustné ve vodě</u> 		
B ₁ , thiamin	koenzym pyruvát a α -ketoglutarát dehydrogenáz a transketolázy, reguluje Cl ⁻ kanály v nervových spojkách	porušení periferních nervů, léze v CNS (sy. Wernickeho a Korsakovův)
B ₂ , riboflavin	koenzym oxidačních a redukčních reakcí, prostetická skupina flavoproteinů	léze v koutečích úst, na rtech a jazyku, seboroická dermatitida
niacin	koenzym v oxidačních a redukčních reakcí, funkční skupina NAD a NADP, úloha v intracelulární regulaci vápníku a buněčné signalizaci	pelagra (fotosenzitivní dermatitida, depresivní psychóza)
B ₆ , pyridoxin	koenzym v transaminaci a dekarboxylaci aminokyselin a glykogenfosforylázy, modulace působení steroidních hormonů	poruchy metabolismu aminokyselin, křeče
kyselina listová	koenzym při přenosu jedouhlíkových zbytků	megaloblastová anémie
B ₁₂ , kobalamin	koenzym při přenosu jedouhlíkových zbytků a metabolismu kyseliny listové	perniciózní anémie (anémie megaloblastová s degradací míchy)
k. pantothenová	funkční skupina CoA a proteinů přenášející acylové zbytky, syntéza mastných kyselin a metabolismus	poškození periferních nervů (nutriční meralgie)
H, biotin	koenzym v karbonylačních reakcích v glukoneogenezi a syntéza mastných kyselin, úloha v regulaci buněčného cyklu	poruchy metabolismu tuků a sacharidů, dermatitida
C, k. askorbová	koenzym při hydroxylaci prolinu a lysinu při syntéze kolagenu, antioxidant, zvyšuje vstřebávání železa	kurděje – špatné hojení ran, ztráta zubního cementu, podkožní krvácení

Zdroj: převzato z Murray et al., 2012, s. 509.

Terminologie pro skupinu vitamínů není jednotná, v literatuře lze nalézt jak triviální název, tak skupinové označení látek s podobnou biologickou aktivitou. Převážně se vitamíny označují písmeny velké abecedy, případně číselným indexem (Vávrová et al., 2007).

1.2 HISTORICKÉ ASPEKTY METABOLISMU VITAMINU D

Vitamin D je historicky řazen k vitamínům rozpustných v tucích (liposolubilních), fyzikálně-chemické vlastnosti vitamínu D a jeho chování v lidském těle jsou reflexí struktury odvozené od cholestanu (Kulda, 2012). Vitamin D je přirozeně přítomen v úzkém spektru běžně používaných součástí stravy, přičemž nejvyšší obsah vitamínu D je uváděn v rybích pokrmech, vejci, taveném sýru nebo sušeném hříbu (Matějovská – Kubešová et al., 2012).

V roce 1906 byl vysloven předpoklad, že rachitis¹ je onemocnění způsobené nedostatkem blíže nespecifikované substance vitamínového charakteru v potravě. První zmínka o vitamínu D pochází z roku 1918, kdy britský biochemik Edward Mellanby prokázal antirachitický účinek oleje izolovaného z tresčích jater. Označení vitamínu D následovalo po objevení vitamínů A, B a C (Bayer et al., 2002). Experimentální práce z let 1919 doporučují příkrm rachitických zvířat rybím tukem s pozitivním vlivem na kalcifikaci kostí (Hlúbik a Opltová, 2004). Izolace vitamínu D₂ byla provedena v roce 1931 a izolaci vitamínu D₃ literární zdroje uvádí až v roce 1936 (Hlúbik a Opltová, 2004).

1.2 SYNTÉZA A METABOLISMUS VITAMINU D

Syntéza a metabolismus vitamínu D představuje složitý mechanismus reakcí probíhajících v lidském organismu od neaktivních prekurzorů, až k účinné formě vitamínu D. Organismus získává vitamin D jednak potravou (exogenní příjem), jednak z vlastní produkce pod vlivem UV záření v kůži (endogenní syntéza); (Racek et al., 2006). Exogenní příjem vitamínu D potravou představuje alternativní zdroj prekurzorů vitamínu D trávicím traktem, kde se absorbují v duodenu a následně se přeměňují na aktivní formy. Endogenní syntéza vitamínu D představuje majoritní zdroj dostatečného množství pro organismus za určitých předpokladů (Tesař, Schüick et al., 2006; Hulejová, Mařík, Maříková, 2005). Ze strukturálních forem se rozlišují dvě hlavní formy vitamínu D: vitamin D₂ (ergokalciferol) a vitamin D₃ (cholecalciferol) lišící se v postranním řetězci přibližně se stejnou biologickou aktivitou a metabolismem (Kulda, 2012). Výskyt ergokalciferolu (D₂) je zaznamenán v potravinách

¹ Slabá mineralizace skeletu.

rostlinného původu, cholekalciferol (D₃) je přítomen v surovinách živočišného původu (Vávrová et al., 2007).

1.2.1 Počáteční strukturální přestavby prekurzorů vitamínu D

Počátečním bodem endogenní strukturální přestavby vitamínu D je tzv. provitamin D₃ (7-dehydrocholesterol), resp. provitamin D₂ (ergosterol), který v epidermis² účinkem ultrafialového záření konvertuje na vitamin D₃ (cholekalciferol), resp. vitamin D₂ (ergokalciferol). Účinnost endogenní syntézy vitamínu D je závislá na době expozice slunečnímu záření, geografické poloze, ročním období, denní době, pigmentaci kůže a použití protektivních krémů povrchu těla (Kulda, 2012). Jak zmiňuje Kulda, důležitým faktorem je autoregulační systém endogenní syntézy. Při déletrvajícím sluneční expozici nedochází k elevaci vitamínu D, ale k přeměně provitaminu na biologicky neaktivní izomery (Hlúbik a Opltová, 2004; Vávrová et al., 2007).

1.2.2 Hepatální syntéza kalcidiolu (25-OH vitamínu D)

Obě vzniklé formy vitamínu D (cholekalciferol i ergokalciferol) jsou biologicky inaktivní a pro potřeby organismu vyžadují dvoukrokovou aktivaci v játrech a ledvinách. Predominantně vzniklý vitamin D₃ (cholekalciferol), vytvořený v pokožce a/nebo přijatý potravou, je transportován do jater pomocí vitamin D-vázacího proteinu (dále jen VDBP), minoritně vázán na transportní nosič albumin, popř. lipoproteiny. V hepatocytech³ nastává primární hydroxylace v poloze 25 účinkem 25-hydroxylázy (Tesař et al., 2006). Reakcí vzniklý 25-OH vitamin D (25-monohydroxykalciferol, též kalcidiol) je považován za nejvhodnější ukazatel stavu metabolismu vitamínu D v lidském organismu, který současně zohledňuje endogenní produkci v epidermis i exogenní příjem vitamínu D potravou (Kulda, 2012).

1.2.3 Renální syntéza kalcitriolu

Druhý stupeň dvoukrokové hydroxylace a aktivace vitamínu D probíhá v ledvinách, přičemž krví transportovaný komplex 25-OH vitamin D-VDBP prochází glomerulem⁴ do

² Povrchová vrstva kůže.

³ Jaterní buňka.

⁴ Nefron jako základní funkční jednotka ledvin je tvořena dvěma hlavními částmi – glomerulem a renálním tubulem (Tesař et al., 2006).

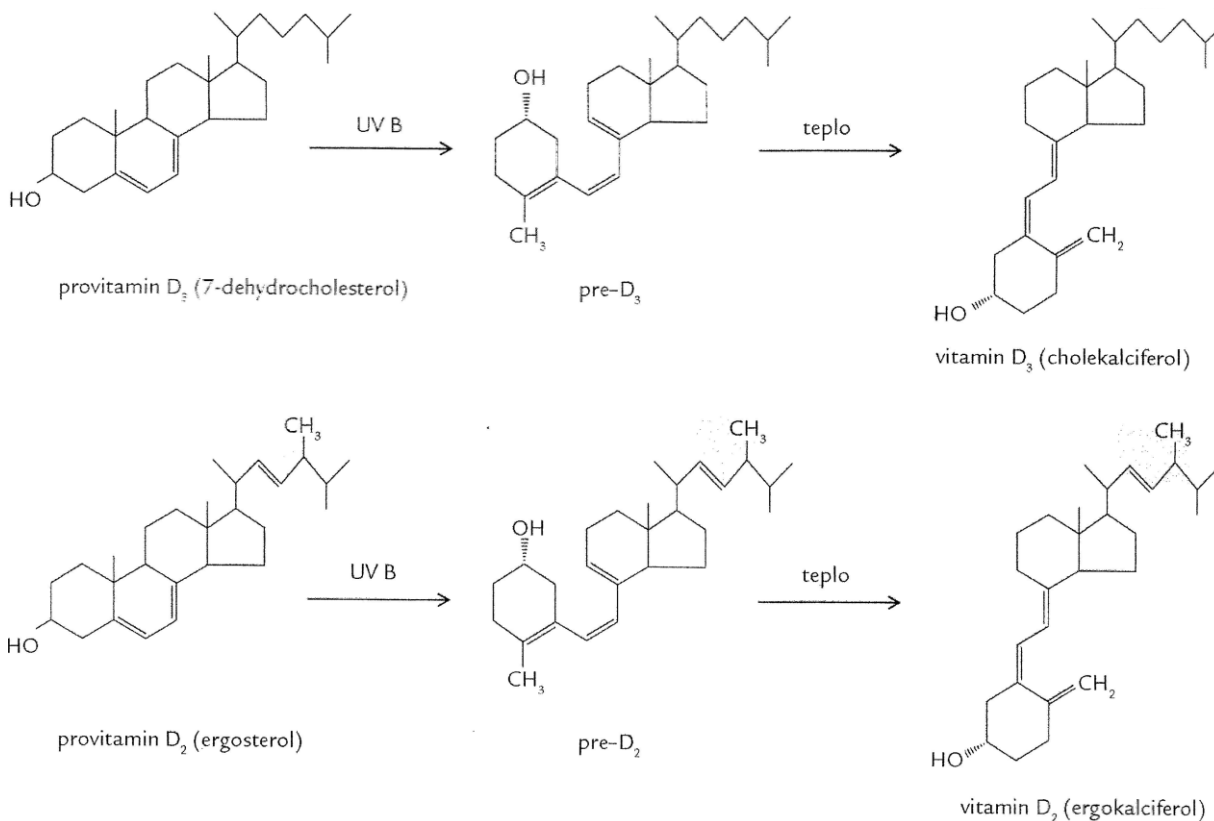
primární moči a následně dochází k absorpci buňkami proximálního tubulu endocytózou za účasti megalinu, kde po odštěpení VDBP nastává druhá hydroxylace v poloze 1 účinkem 25-OH-1- α -hydroxylázy za vzniku 1,25-(OH)₂ vitaminu D (1,25-dihydroxykalciferol, též kalcitriol).

Aktivita enzymu je přísně regulována, jak uvádí Kulda „...jedná se o klíčové místo rozhodující o vznikajícím množství aktivní hormonálně působící formy.“ (Kulda, 2012, s. 403). Hlavními regulačními prvky sekrece kalcitriolu jsou: plazmatická koncentrace ionizovaného kalcia, fosforu, parathormonu a samotného 1,25-(OH)₂ vitaminu D.

Enzym 1- α -hydroxyláza vykazuje vysokou substrátovou specifitu pro 25-OH vitamin D, přesto při zvýšených koncentracích ostatních neaktivních metabolitů (24,25-(OH)₂ D₃, 25,26-(OH)₂ D₃) vitaminu D dochází k jejich hydroxylaci (Tesař et al., 2006).

Biologický poločas hormonálně aktivní formy vitaminu D (kalcitriol) činí 6 – 8 hodin. Z celkového množství je cca 99 % vázáno na VDBP, částečně na albumin. Biologicky aktivní je pouze volná (nevázaná) frakce (Tesař et al., 2006).

Obr. 1 Počáteční strukturální přestavby prekurzorů vitaminu D



Zdroj: Kulda, 2012, s. 401.

1.2.4 Mechanismus účinku hormonálně aktivního vitamínu D

Dvoukrokovou hydroxylací vzniklý kalcitriol se intracelulárně váže na receptor vitamínu D (dále jen VDR), který je zodpovědný za biologické účinky. Aktivovaný VDR (po vazbě kalcitriolu) působí jako transkripční faktor ovlivňující expresi genů regulovaných vitamínem D (Kulda, 2012). Nehydroxylované formy vitamínu D jsou ukládány v tukové tkáni (Zdražilová - Dubská et al., 2012).

1.2.5 Extrarenální produkce kalcitriolu (1,25 – (OH)₂ vitamínu D)

Extrarenální produkce kalcitriolu představuje alternativní lokální syntézu kalcitriolu. Tato alternativní produkce nezpůsobuje elevaci plazmatické koncentrace 1,25-(OH) vitamínu D a nemá tedy i klinický význam. Přesto za určitých patologických stavů může docházet k doprovodnému patologickému jevu, hyperkalcémii (Tesař et al. 2006). Za extrarenální zdroje kalcitriolu Tesař (2006) považuje:

- placentární produkci kalcitriolu,
- makrofágy granulomatózních tkání (sarkoidóza, TBC),
- monocyty periferní krve.

1.2.6 Katabolismus kalcitriolu

Katabolismus kalcitriolu zahrnuje oxidaci postranních uhlíkatých řetězců. Tato oxidaci může probíhat odlišnými metabolickými drahami, a to:

- dle Tesaře et al. (2006) je významnější postupná přeměna kalcitriolou na kyselinu kalcitriolovou, hydrofilní sloučeninu vylučovanou z organismu žlučí,
- méně významnou degradací kalcitriolu je přeměna na lakton s mezistupněm vzniku tetrahydroxyvitamínu D.

1.3 VITAMÍN D U SOUČASNÉ POPULACE

Doporučované hodnoty denního příjmu vitamínu D představují množství dodaného vitamínu cestou per os, protože se předpokládá při dostatečné expozici slunečnímu záření, adekvátně syntetizované množství vitamínu D v kůži dospělého jedince (Hlúbik a Pltová, 2004). Na základě uvedených poznatků je zřejmý vliv sezóny, geografické lokality a charakter stravovacích návyků jedince. Což dokládá Hlúbik a Pltová (2004), stejně taktéž Vávrová et al. (2007). V letních měsících probíhá syntéza vitamínu D ve větším měřítku než

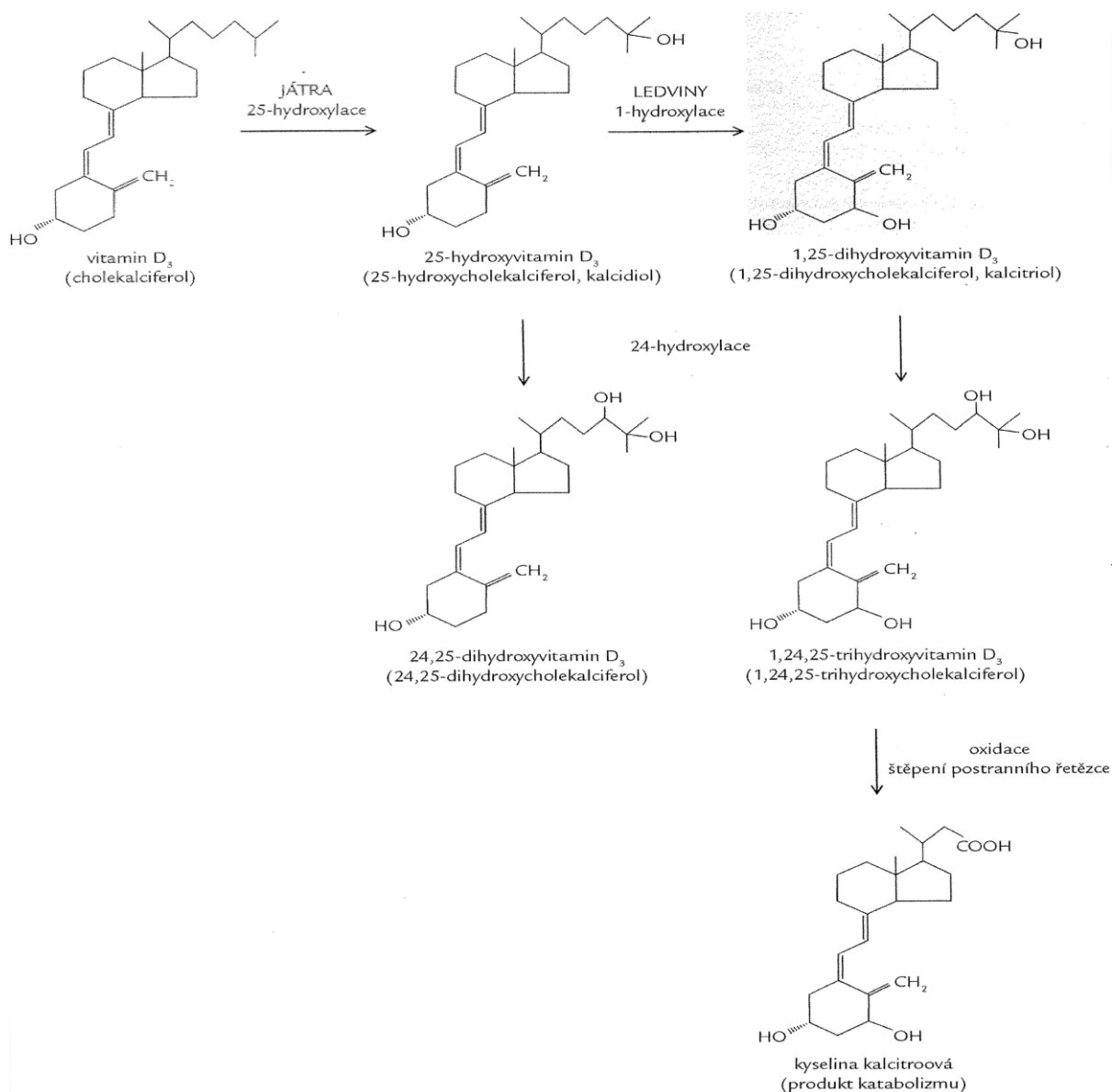
v zimním období a rovněž v severních zeměpisných šířkách a zimním období je předpokládán deficit UV záření vhodné vlnové délky. V posledních letech narůstá počet recentních publikací o výskytu deficitu vitamínu D u většiny populace středního zeměpisného pásu. Současně v zemích, kde je snížen přísun vitamínu D v potravě, je doporučováno odborníky na nutriční v rámci preventivních programů fortifikovat vybrané suroviny a předcházet nedostatečné saturaci organismu vitamínem D v populaci (Hlúbik a Opltová, 2004). Počátky fortifikace potravin v České republice (dále jen ČR) se datují rokem 1990, přičemž do procesu jsou zahrnuty margaríny, rostlinné tuky a vybrané mléčné výrobky (Čepová, 2012).

Složení stravy obvykle nedokáže plnohodnotně pokrýt dostatečný příjem zdrojů vitamínu D, majoritní postavení má fotokonverze 7 - dehydrocholesterolu v kůži účinkem UVB záření. V kontextu s výše uvedeným je nutné konstatovat, že nadměrná expozice slunečnímu záření zvyšuje riziko karcinogeneze UV záření. Naproti tomu používání ochranných kosmetických přípravků efektivně blokuje UVB složku záření a tím také fotokonverzi prekurzorů vitamínu D na kalcidiol. Podle Kazdy et al. (2012) dochází k dosažení dostatečných koncentrací kalcidiolu po každodenní expozici slunečnímu záření po dobu 15 minut. Matějovská – Kubešová (2012) dále doplňuje vystavit sluneční expozici obličej, horní a dolní končetiny. Uvedené údaje jsou použitelné v letních měsících, naopak nedostatečnou intenzitu záření pro syntézu vitamínu D pozorujeme v období od listopadu do února, kdy je intenzita záření snížena o 50 % (Matějovská – Kubešová, 2012). Nejohroženější skupinou jedinců s předpokládaným deficitem vitamínu D jsou senioři, kojenci, těhotné a kojící ženy, osoby imobilizované a/nebo osoby v dlouhodobé ústavní péči, které nepřijímají dostatek potravin fortifikovaných vitamínem D, u nichž je současně endogenní syntéza snížena na minimum. Senioři vzhledem k řadě mechanismů podmíněných stářím jedince jsou taktéž ohroženi poklesem aktivity 1α - hydroxylázy v ledvinách a hormonální dysbalancí a s ní souvisejícím úbytkem kostní hmoty (Vávrová et al., 2007).

Jako nejvhodnější analyt k monitorování hladiny vitamínu D v organismu je považován 25-OH vitamín D (kalcidiol), který současně reflektuje endogenní a exogenní přísun prekurzorů a má odpovídající biologický poločas (2 – 3 týdny). Naproti tomu hladina kalcitriolu není vhodným indikátorem, protože pokles koncentrace kalcitriolu je zaznamenán při výrazném deficitu v organismu (Matějovská – Kubešová, 2012).

National Institute of Health (dále jen NIH) v USA doporučuje dolní hranici normy pro deficit 30 nmol/l, pod touto koncentrací je udáván suspektní výskyt patologické kostní remodelace. Hodnota s dostatečnou suplementací organismu vitaminem D je považována koncentrace kalcidiolu 50 nmol/l, resp. 75 nmol/l. Současná česká populace však podle Matějovské – Kubešové (2012) vykazuje průměrné hodnoty kalcidiolu v rozmezí 30 - 50 nmol/l, převážně u populace starší 50 – ti let. Tato koncentrace je naprosto nedostatečná k dosažení kvalitní kostní remodelace. Snížené koncentrace vitaminu D jsou však pozorovány i v nižších věkových kategoriích.

Obr. 2 Metabolismus vitaminu D



Zdroj: Kulda, 2012, s. 402.

2 KLINICKÝ VÝZNAM VITAMINU D

V současné době je v mnoha medicínských oborech věnována pozornost důsledkům převážně deficitu vitamínu D v populaci na základě řady epidemiologických studií napříč různými klinickými obory. Kapitola 2 Klinický význam vitamínu D sumarizuje význam účinku vitamínu D na lidský organismus, podpořený řadou intenzivních klinických studií.

2.1 DYSBALANCE PLAZMATICKÝCH HLADIN VITAMINU D

Na základě hodnot plazmatických koncentrací vitamínu D v krevní cirkulaci lze diferencovat klinické stavy do dvou skupin: deficit vitamínu D a nadbytek vitamínu D. Obě skupiny mají charakteristické klinické projevy a prokazatelné laboratorní nálezy v biologickém materiálu.

2.1.1 Deficit vitamínu D

Ukazatelem deficitu vitamínu D je pokles plazmatické koncentrace 25 - hydroxyvitamínu D pod 15 - 20 nmol/l. Podle recentních studií lze za optimální plazmatickou koncentraci vitamínu D považovat hodnotu 30 - 50 nmol/l, přičemž nedostatečná saturace organismu vitamínem D vede v rozvoji sekundární hyperparathyreózy a porušené mineralizaci skeletu s následným rozvojem křivice a/nebo osteomalacie (Sotorník, Kutílek et al., 2011).

Deficitní stavy spojené s nedostatečnou saturací organismu vitamínem D lze pozorovat u stavů se sníženou absorpcí vitamínu D v tenkém střevě, které doprovázejí patologické stavy spojené s malabsorpcí lipidů (celiakie, chronická zánětlivá střevní onemocnění, stavy těžkých hepatopatií). Naopak urychlení katabolismu vitamínu D, vedoucí k deficitu vitamínu D, prezentují Sotorník et al. (2011) jako důsledek nežádoucích účinků některých medikamentů (glukokortikoidy, antikonvulziva). Při zavedené a dlouhodobé terapii těmito léčivy je nutná dostatečná suplementace zvýšenou dávkou vitamínu D (Sotorník, Kutílek et al., 2011).

Samostatnou skupinou patologických stavů vedoucích k deficitu plazmatické koncentrace vitamínu D jsou renální onemocnění s těžkou proteinurií. Při stavem s chronickým renálním selháním a poklesem glomerulární filtrace pod 30 % fyziologických hodnot, dochází u nemocných jedinců ke snížené tvorbě 1α - hydroxylázy, kterou blokuje současně se rozvíjející hyperfosfatémie (retence fosfátů při snížené renální eliminaci); (Sotorník, Kutílek et al., 2011).

2.1.2 Nadbytek vitamínu D

Příjem vysokých dávek vitamínu D (hypervitaminóza) může vést k intoxikaci organismu, tato je provázena elevací plazmatické koncentrace vitamínu D₃ nad 150 nmol/l. Hypervitaminóza je obvykle způsobena nevhodným terapeutickým nadužíváním vitamínu D, nadměrná expozice slunečnímu záření a/nebo nadměrný přísun vitamínu D v potravě nezpůsobí intoxikaci organismu (Bučková et al., 2013). Doprovodnými laboratorními nálezy intoxikace jsou: hyperkalcémie, hyperfosfatémie, přičemž koncentrace kalcitriolu bývá v referenčním rozmezí (Sotorník, Kutílek et al., 2011). Klinické příznaky nadbytku vitamínu D v organismu spočívají zejména v manifestaci hyperkalcémie, kdy postižený jedinec vykazuje spavost, pobledlost, nechutenství, nauzeu, zmatenost, kardiální obtíže a znaky hypotonie. Hyperkalcémie obvykle způsobuje polyurii a polydipsii, které mohou vyústit celkovou dehydratací (Bučková et al., 2013). Podle Sotorníka, Kutílka et al. (2011) překročení kalcémie nad 3,0 mmol/l je důvodem k zahájení adekvátní symptomatické léčby (rehydratace, diuretika, kortikoterapie).

Stavy spojené s nadbytkem plazmatické koncentrace vitamínu D jsou v klinické praxi vzácností, přesto k intoxikacím vitamínem D s rozvojem hyperkalcémie a následné vazokonstrikci, elevaci krevního tlaku a kalcinóze dochází (kazuistiku s intoxikací vitamínu D ilustruje Příloha č. 1).

2.2 VITAMIN D A RENÁLNÍ ONEMOCNĚNÍ

V posledních letech došlo k velkému rozvoji informací o patofyziologii nemocí ledvin, proběhl výrazný rozvoj dialyzačních technik a v praxi byla zavedena nová imunosupresiva. Z hlediska incidencí představují glomerulopatie nejčastěji diagnostikované onemocnění ledvin, z nichž některá mohou progredovat do chronického onemocnění ledvin (dále jen CKD) s rizikem rozvoje terminálního selhání ledvin (dále jen ESRD) s nutností náhrady funkce ledvin (Tesař et al., 2006). Pacienti s CKD vykazují řadu odchylek v metabolických drahách, včetně metabolismu vitamínu D. Jak prezentuje Dusilová – Sulková (2012) je výskyt deficitu vitamínu D u pacientů s ESRD uváděn u 80 – 90 % dialyzovaných.

Příčinou patofyziologických pochodů je nejen snížení či dokonce chybějící renální eliminace řady látek a s ní spojená retence těchto působků v organismu, ale také deficit endogenní renální produkce (např. kalcitriolu a/nebo erythropoetinu) a abnormální intrarenální metabolismus (Dusilová - Sulková, 2012).

2.2.1 Chronické onemocnění ledvin a metabolismus vitamínu D

Při chronickém poškození ledvin je hlavní patofyziologickou abnormalitou nedostatečná až zcela chybějící renální produkce 1,25-(OH)₂ vitamínu D (kalcitriolu). Abnormality v metabolismu vitamínu D jsou však pozorovány na všech mezistupních metabolické přeměny, zahrnující nedostatečný transport 25-OH vitamínu D (kalcidiolu), jeho dostupnost pro fotokonverzi a/nebo katabolismus vitamínu D (Dusilová – Sulková, 2012; Tesař et al., 2006).

Abnormality na úrovni metabolismu kalcidiolu (25-OH vitamínu D) jsou podle Dusilová – Sulkové (2011, 2012) dány jednak sníženou dostupností substrátu pro fotokonverzi v epidermis, kterou obecně zvažuje pro nesprávné nutriční návyky nemocných a nízký přívod prekurzorů v potravě, ale také krátkodobou expozicí slunečnímu záření. Tato však může být zapříčiněna i nutností minimalizace expozici UV záření při zavedené intenzivní imunosupresivní léčbě (Marek et al., 2010). Kalcidiol vzhledem k hydrofobním vlastnostem cirkuluje v krvi vázán na transportní nosič VDBP, částečně vázán na albumin a minoritně na lipoproteiny. CKD doprovází vždy proteinurie, čímž se močí ztrácí účinné látky, včetně látek bílkovinné povahy, tedy i VDBP, který je zodpovědný za transport komplexu vitamín D – VDBP přes glomerulus⁵ do buněk renálních tubulů (Dusilová – Sulková, 2012).

Z důvodu absence VDBP při proteinurii a snížené dostupnosti kalcidiolu pro hydroxylaci v poloze 1 dochází k deficitu aktivní formy vitamínu D, tedy 1,25-(OH)₂ vitamínu D (kalcitriolu) pro buněčné struktury a abnormality v kalcium - fosfátovém metabolismu (Žofková, 2012). Nedostatek kalcia v organismu (hypokalcémie) vede k manifestaci sekundární hyperparathyreózy vzniklé jako reakce na dlouhotrvající hypokalcémii, projevující se hyperplazií všech parathyreoidních tělísek. U takto rozvinuté sekundární hyperparathyreózy⁶ pozorujeme celkovou demineralizaci skeletu, úbytek kostní tkáně a další abnormality ve skeletu i v měkkých tkáních (Brunová a Bruna, 2009; Zamrazil et al., 2007).

Na úrovni katabolismu vitamínu D při chronickém onemocnění ledvin Bosworth et al. (Bosworth in Dusilová – Sulková, 2012) uvádí, že aktivita enzymu 24-hydroxylázy

⁵ Nefron jako základní funkční jednotka ledvin je tvořena dvěma hlavními částmi – glomerulem a renálním tubulem (Tesař et al., 2006).

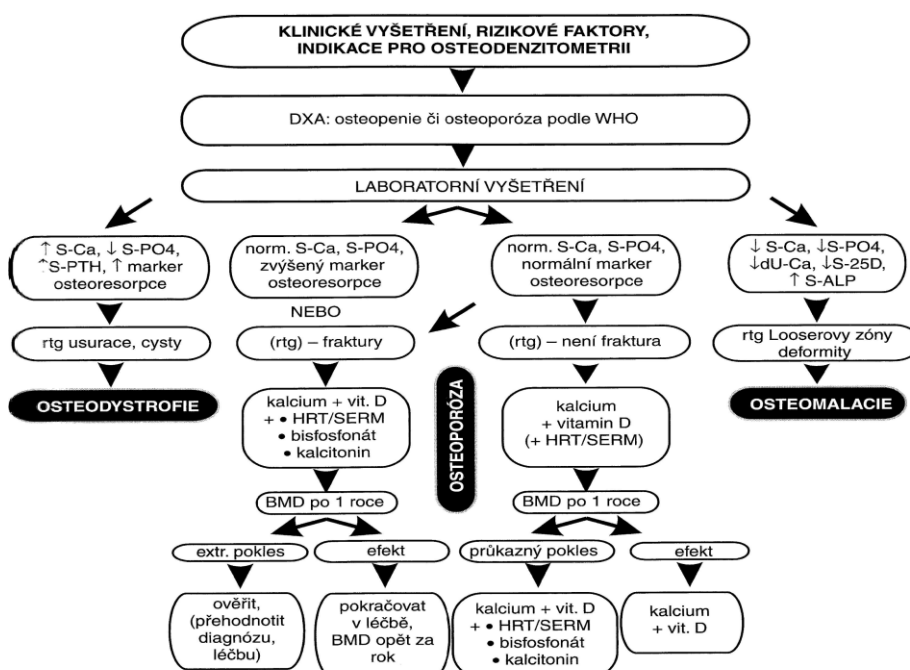
⁶ Zvýšená činnost příštítných tělísek.

degradující vitamin D je u renálního postižení a/nebo CKD značně snižena, což koreluje i se zpomalenou tvorbou aktivního vitaminu D, kterou autoři označují jako stav se stagnujícím metabolismem vitaminu D. Zvýšený katabolismus vitaminu D (kalcidiolu i kalcitriolu) způsobuje také glukokortikoidní terapie, která představuje základní součást léčebné terapie glomerulopatií a protokolární součást imunosupresivních režimů po transplantacích životně důležitých orgánů, a proto je vhodná souběžná a dostatečná suplementace vitaminu D a jeho analogů, které upravují sníženou absorpci kalcia v trávicích ústrojí, regulují sklon k hyperparathyreóze a podporují diferenciaci a vyzrání osteoblastů (Marek et al., 2010, Dusilová – Sulková, 2012; Sotorník et al., 2011).

2.3 ONEMOCNĚNÍ SKELETU A VITAMIN D

V souvislosti s klinickým významem vitaminu D a onemocněním skeletu je nutné uvést metabolická kostní onemocnění, která jsou charakterizována dysbalancí mezi odbouráváním a novotvorbou kostní hmoty. Základním projevem metabolického kostního onemocnění je zvýšená náchylnost k frakturám (Žofková, 2012). Nejčastěji diagnostikované metabolické kostní onemocnění, doprovázené sníženou koncentrací vitaminu D v organismu jsou osteoporóza a osteomalacie (Souček et al., 2011). Doporučený algoritmus v rámci diferenciální diagnostiky osteopatie uvádí Obr. 3.

Obr. 3 Doporučený algoritmus vyšetření u nemocných s podezřením na osteopatii



Zdroj: Zima, 2012, s. 227.

2.3.1 Osteoporóza

Diagnóza osteoporózy je uváděna jako nejčastější metabolické onemocnění kostní tkáně. Souček et al. (2011) definují osteoporózu jako rychle progredující systémové onemocnění skeletu, které lze charakterizovat určitým stupněm úbytku kostní tkáně a poruchami mikrostruktury kostí, čímž dochází k jejich zvýšené křehkosti a v důsledku toho k častým a opakujícím se frakturám, přičemž převážná většina nemocných tak zůstává určitým způsobem zdravotně a sociálně handicapována (Souček et al., 2011; Žofková, 2012).

Osteoporóza je podle klasifikace Světové zdravotnické organizace (dále jen SZO) řazena k nemocem svalové a kosterní soustavy a pojivové tkáně (SZO, 2013). Podle následného třídění a lokalizaci postižení se osteoporóza řadí k postižením poruchy hustoty a struktury kostí M80 - M85 (SZO, 2013). Přehled diagnóz podle *Mezinárodní klasifikace nemocí, desátá revize* (dále jen MKN-10) shrnuje Příloha č. 2.

Výskyt tohoto onemocnění má podle literárních zdrojů prevalenci 7 - 8 % u žen nad 65 let, nejvíce postiženy jsou ženy po menopauze. Ženské pohlaví je jednoznačně rizikovým faktorem, přičemž osteoporóza u mužů v posledních letech kopíruje prevalenci výskytu osteoporózy u žen. Jenšovský (2013) ve své práci uvádí, že morbidita i mortalita mužů s frakturou krčku femoru je podstatně vyšší než u žen (roční mortalita 31 - 35 % u mužů a 17 - 22 % u žen). Taktéž byl zaznamenán výskyt osteoporózy u dětí a mladistvých, zvláštní typem nozologické jednotky je přechodná porucha vývoje skeletu – idiopatická juvenilní osteoporóza (Bayer, Kutílek et al., 2002).

Patofyziologie osteoporózy není jednotná (Žofková, 2013; Jenšovský, 2013; Vyskočil, 2010), podle klasifikace lze diferencovat onemocnění na:

Primární osteoporózu: rozvíjející se často bez zřetelné příčiny, má závažnější průběh a její výskyt je častější. Někteří autoři primární osteoporózu dále dělí:

- Typ I: postmenopauzální osteoporóza (Příloha č. 5).
- Typ II: senilní osteoporóza.

Sekundární osteoporóza: její příčinou je určité definované onemocnění. Nejčastější jednotkou bývá léky indukovaná osteoporóza. Řada léků běžně užívaných v interní medicíně a neurologii ireverzibilně poškozují skelet – závažná poškození skeletu jsou pozorována u pacientů dlouhodobě léčených glukokortikoidy aktuálně i v minulosti (Příloha č. 6), přičemž poškození mikrostruktur skeletu způsobují i nízké dávky glukokortikoidů (2,5 mg prednisonu

denně), (Žofková, 2013). Osteotropní účinek vykazují také některá imunosupresiva (cyklosporin A), hormony štítné žlázy, antidiabetika (metformin, tiazolidindion), psychotropní látky (SSRI), antiepileptika (fenytoin, primidon, fenobarbital, karbamazepin) a některá další léčiva používané v kardiologii, pneumologii a gastroenterologii (Žofková, 2013).

Diagnostika osteoporózy zahrnuje anamnestické údaje (životní styl, nutriční, pohybová aktivita), fyzikální klinické vyšetření (deformity páteře, zjištění tvarových odchylek kostí, výška jedince), přístrojové vyšetření (měření hustoty kostního minerálu, RTG), hodnocení plazmatických koncentrací biochemických markerů (Tab. 2) a posouzení již prodělaných zlomenin postiženého jedince (Souček et al., 2011).

Laboratorní vyšetření osteoporózy zahrnuje stanovení kostních markerů v séru a/nebo moči. Z výsledků analýz lze odhadnout úbytek kostní hmoty a monitorovat průběh již započaté léčebné terapie. K základnímu vyšetření slouží ukazatele kalcium - fosfátového metabolismu (S_Ca, S_P, dU_Ca) doplněné vyšetřením vitamínu D v séru a u rizikových pacientů do 50 let také vyšetření pohlavních hormonů. Ostatní využívané kostní parametry lze rozdělit na ukazatele kostní novotvorby a resorpce (Zima, 2007; Souček et al., 2011), shrnutí uvádí Tab. 2.

Tab. 2 Hlavní biochemické markery v laboratorní diagnostice osteopatie

Ukazatele novotvorby kostní tkáně	Ukazatele kostní resorpce
S_kostní alkalická fosfatáza (S_ALPk)	U_Vápník (dU-Ca)
S_Osteokalcin	U_Hydroxyprolin
S_Karboxyterminální propeptid kolagenu I (PICP)	U_Deoxypyridinolin, U_Pyridinolin
S_Aminoterminální propeptid kolagenu I (PINP)	S_Karboxyterminální telopeptid kolagenu I (ICTP)
	S_Tartarát-rezistentní kyselá fosfatáza (TRACP)
	S_Aminoterminální telopeptid kolagenu I (NTx)

Zdroj: vlastní zpracování podle Zimy et al., 2012.

Cílem léčebné terapie u osteoporózy je stabilizace množství a kvality kostní hmoty, minimalizace fraktur a deformit skeletu a tím také zvýšení kvality života nemocného. Léčebný algoritmus je závislý na stupni závažnosti onemocnění a/nebo prognóze. V současné době se léčba osteoporózy diferencuje na nefarmakologickou (režimová opatření, vhodná fyzioterapie) a farmakologickou terapii (Souček et al., 2011). Farmakologická terapie je podle Marka et al. (2010) jen nepatrně závislá na pohlaví. Většina běžně užívaných a doporučených preparátů vykazuje podobný efekt jak u mužů, tak u žen. Přesto autoři doporučují vždy preferovat individuální rozvahu při volbě terapeutických postupů a léčebných preparátů. Pakliže je objasněna příčina primární osteoporózy, je vyžadována kauzální léčba (Jenšovský, 2013). Základní léčebné preparáty užívané k léčbě osteoporózy jsou (Marek et al., 2010; Jenšovský, 2013):

- saturace kalcíem,
- suplementace vitamínem D,
- hormonální terapie,
- bisfosfonáty,
- stroncium ranelát,
- osteoanabolická léčba,
- kalcitonin,
- fluoridové soli,
- teriparatid,
- denosumab.

2.3.2 Osteomalacie

Souček et al. (2011) definují osteomalacii jako „...*metabolické kostní onemocnění charakterizované nedostatečnou mineralizací nově tvořeného osteoidu. Kostní tkáň je měkčí a kosti jsou náchylné k deformacím...*“ (Souček et al., 2011, s. 844). Dětská forma onemocnění se nazývá rachitida, křivice (Bayer, Kutílek et al., 2002). Porucha mineralizace je však dlouhodobým procesem souvisejícím s hypokalcémií a hypofosfatémií (Svačina et al., 2010). Na vzniku onemocnění se podílejí rizikové faktory, hlavní rizikové faktory sumarizuje Tab. 3.

Osteomalacie u dospělých se manifestuje po ukončení růstu, čímž dochází k mnohočetným deformitám skeletu s nedostatečnou mineralizací a s následným rozšířením

konců dlouhých kostí. Klinická symptomatologie zahrnuje difúzní bolesti vycházející z kostí, svalovou slabost, celkové neprospívání a časté fraktury v oblasti páteře a žeber (Souček et al., 2011). Naproti tomu osteomalacie v dětském věku (rachitida, křivice) je generalizované onemocnění skeletu, pro které je typická nedostatečná mineralizace skeletu, vedoucí k nahromadění osteoidní tkáně, s prvotními klinickými příznaky do 1 roku věku života. Rachitidu lze diferencovat na geneticky podmíněné onemocnění nebo získané (nedostatečná saturace matky v období gravidity, předčasně narození apod.), (Bayer, Kutílek et al., 2002; Svačina et al., 2010). Přehled klasifikace osteomalacie a/nebo jiné osteopatie podle MKN-10 uvádí Příloha č. 3 a 4.

Tab. 3 Hlavní rizikové faktory vzniku osteomalacie (rachitidy)

Rizikový faktor	Příčiny
Nedostatek sluneční expozice	UV paprsky jsou nutné pro fotokonverzi v epidermis. Tato konverze výrazně klesá u imobilních a dlouhodobě hospitalizovaných jedinců.
Nedostatečný příjem vit. D	majoritní příčina vzniku rachitidy v dětském věku
Nedostatečné vstřebávání vit. D	následek onemocnění žaludku, tenkého střeva, jater a slinivky břišní
Poruchy endog. metabolismu vit. D	hydroxylace na aktivní metabolity vit. D v játrech a/nebo ledvinách je výrazně omezena při koincidenci onemocnění těchto orgánů
Působky uvolňované urč. typy nádorů	v patogenezi se uplatňují renální ztráty fosfátů
Působení farmak	převážně antikonvulziva (ovlivňují metabolismus vit. D na úrovni konverze na aktivní metabolity v játrech) a glukokortikoidy (snižují vstřebávání kalcia).

Zdroj: zpracování vlastní podle Součka et al., 2011, s. 845.

Diagnostika zahrnuje anamnestické údaje, fyzikální a přístrojové vyšetření (převážně RTG) a podrobné laboratorní vyšetření kostních markerů. U osteomalacie a/nebo rachitidy nalézáme laboratorně zvýšené hodnoty kostního enzymu alkalické fosfatázy, deficientní hladinu vitamínu D, nižší plazmatické koncentrace kalcia a fosforu s následným rozvojem

sekundární hyperparathyreózy, elevace hladiny osteokalcinu a parathormonu (Souček et al., 2011; Svačina et al., 2010).

Základem úspěšné léčebné terapie je podávání vitamínu D (p. o. nebo intramuskulárně), vedoucí ke korekci abnormálního kostního metabolismu a normalizaci kostních markerů (Souček et al., 2011). Denní přívod vitamínu D má být podle Svačiny et al. (2010) v rozmezí 600 – 800 IU, iniciální dávky jsou však podstatně vyšší (až 50 000 IU/týden) s nutností monitorace kalcémie a fosfatémie. Úspěšnost terapie signalizují stoupající plazmatické koncentrace kalcia a fosforu za současného poklesu hladiny alkalické fosfatázy.

2.4 ÚLOHA VITAMINU D V KARDIOLOGII

Pro současnou kardiologickou praxi je důležitá plazmatická koncentrace vitamínu D z důvodu znalosti empirické závislosti vitamínu D a rizika kardiovaskulárních chorob, které vzhledem k incidenci řadíme mezi nejfrekventovanější (ÚZIS, 2013).

Úloha vitamínu D v patofyziologii kardiovaskulárních chorob byla objasněna na základě řady epidemiologických studií s více než 1000 probandy a vykazující deficitní hladinu vitamínu D a/nebo dostatečnou hladinu v incidenci kardiovaskulárních příhod, především v manifestaci akutního infarktu myokardu (dále jen AIM) a nejfrekventovanější chlopenní vadou (aortální stenóza); (Linhartová et al., 2012; Kalvachová, 2012). Patofyziologické působení vitamínu D na kardiovaskulární systém lze tedy diferencovat podle klinicky se manifestující vaskulární kalcifikaci a hypertrofii levé komory srdeční.

2.4.1 Vaskulární kalcifikace

Proces vaskulární kalcifikace je definován jako lokální proces koncentrického ukládání kalcia v buňkách hladké svaloviny tepenné médie a je výsledkem dysbalance prokalcifikačních a protikalcifikačních faktorů v metabolismu cévní stěny (Mayer, 2012). Na vaskulární kalcifikaci lze nahlížet jako na proces dynamický a do jistého stadia kalcifikace i reverzibilní. Vitamin D se podílí na kalciové homeostáze v klíčové roli, neboť ovlivňuje aktivitu prokalcifikačních (zejména skupinu enzymů pojivové tkáně, tzv. matrixové metaloproteinázy, MMP) i protikalcifikačních působků (proliferace buněk hladké svaloviny i redukce produktů pokročilé glykace) na cévní stěně. Mayer (2012) sumarizuje výsledky experimentálních i klinických studií, z nichž bylo jednoznačně prokázáno, že snížené hladiny

vitaminu D jsou spojeny s elevací cirkulujících plazmatických MMP, zatímco dostatečná suplementace vitaminem D vedla k jejich poklesu (Timms et al. in Mayer, 2012).

Z tuzemských autorů je možné zmínit práci Linhartové et al. (2012, 2008). Na základě prospektivní průřezové studie 223 pacientů průměrného věku 70 let s diagnózou aortální stenózy nebo sklerózou aortální chlopně (vznikající na podkladě progresivní kalcifikace chlopních cípů s významnou obstrukcí transaortálního průtoku krve) zjistili autoři studie asociaci nižší hladiny vitaminu D a vyšší koncentrace plazmatické iPTH. Deficit vitaminu D (< 25 nmol/l) vykazovalo 59 % probandů s dg. aortální stenóza a 46 % probandů s dg. aortální skleróza, přičemž v obou skupinách korelovaly hladiny vitaminu D negativně s hladinou iPTH (Linhartová et al., 2012)

2.4.2 Hypertrofie levé komory srdeční

Druhou kardiologickou jednotkou, kde deficiencie vitaminu D, vzhledem k patofyziologickým mechanismům, působí závažné zdravotní komplikace je v oblasti srdce a myokardu, manifestující se klinicky hypertrofií levé komory srdeční, mající vliv na její funkci a v širším kontextu může přispívat k rozvoji srdečního selhání (Mayer, 2012).

Podle Mayera ovlivňuje vitamin D proliferaci, morfologii i funkci kardiomyocytu řadou mechanismů, přičemž zvýšená exprese MMP je spojena s remodelací a dilatací levé komory srdeční, která je asociována také s její hypertrofií vedoucí k postupnému srdečnímu selhání. Mayer (2012) sumarizuje výsledky klinických studií, v nichž deficitní koncentrace vitaminu D jsou pozorovány u pacientů s těžkým srdečním selháním, pakliže je dostatečně saturována hladina plazmatického vitaminu D u těchto pacientů, vykazovali tito jedinci až o 49 % nižší riziko úmrtí či nutnost srdeční náhrady transplantací (Zittermann et al. in Mayer, 2012).

I přes určité pochybnosti lze konstatovat, že dostatečná suplementace vitaminem D se jeví jako standardní léčebné opatření vedoucí k redukci rizika rozvoje kardiovaskulárních chorob.

2.5 VITAMIN D A NEUROLOGICKÁ ONEMOCNĚNÍ

Jak již bylo uvedeno v části pojednávající o metabolismu vitaminu D, je velká pozornost soustředěna na hypovitaminózu D v lidské populaci. Deficit vitaminu D je studován také u řady neurologických onemocnění, převážně u dospělé populace.

2.5.1 Deficit vitamínu D u cerebrovaskulárních onemocnění

Cerebrovaskulární onemocnění (vznikající na podkladě funkčních poruch mozkových cév) představují jednu z nečastějších příčin mortality a dlouhodobé funkční neschopnosti postižených jedinců v České republice (dále jen v ČR). Podle statistických údajů cerebrovaskulární postižení patří k třetí nejčastější příčině nemocnosti s nutností hospitalizace ve zdravotnickém zařízení. Současně existují ukazatele poukazující na zvýšení úmrtnosti pro cévní onemocnění mozku s nadprůměrnou ošetrovací dobou ve zdravotnickém zařízení (ÚZIS, 2013).

Cévní mozková příhoda (dále jen CMP, též apoplexie, ictus) zaujímá s nejvyšší prevalencí výskytu nejčastěji diagnostikované postižení mozku na vaskulárním podkladě, z nichž 80 % jde o akutní mozkové ischemie, jejichž nejčastější příčina je aterosklerotická a z 20 % iktů je hemoragických (Seidl a Obenberger, 2004; ÚZIS, 2013).

Podle Polívky et al. (2012) se hypovitaminóza D podílí na rozvoji iktu z několika příčin a to: arteriální hypertenze představuje limitující rizikový faktor ischemických i hemoragických CMP, přičemž podle Polívky existuje „...*inverzní vztah mezi hladinou 25(OH)D a hodnotami krevního tlaku...*“ (Polívka et al., 2012, s. 393). Svá tvrzení odkazuje na experimentální analýze u zvířat i lidí, přičemž etiologický zánětlivý podklad v manifestaci aterosklerotického procesu rozvoje CMP je dostatečně znám. S výše uvedeným bylo prokázáno, že dostatečná suplementace vitamínem D zvyšuje hladinu protizánětlivého cytokinu IL-10 a současně snižuje hladiny prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-12 a TNF- α (Polívka et al., 2012). Protektivní vliv vitamínu D na manifestaci aterosklerotického procesu je tedy vázán na dostatečnou plazmatickou koncentraci vitamínu D v organismu a deficit vitamínu D je považován za nezávislý rizikový faktor ve vztahu k ateroskleróze a následnému rehabilitačnímu období po prodělané CMP.

2.5.2 Deficit vitamínu D u roztroušené sklerózy

Roztroušená skleróza (RS) je chronické autoimunitní demyelinizační onemocnění na podkladě destrukce myelinových pochev nervových vláken, u které se uplatňují komplexní interakce genetického vlivu a vlivu faktorů zevního prostředí (Seidl a Obenberger, 2004).

Pilotní studie v problematice RS velmi často využívají stanovení plazmatické koncentrace vitamínu D, výstupem jsou data prezentující hypovitaminózy D u pacientů s často se opakujícími ataky RS i u pacientů s primárně progresivním průběhem onemocnění

(Polívka et al., 2012). Úskalí prezentovaných dat spatřuje Polívka ve skutečnosti, kdy pacienti s těžším průběhem onemocnění jsou imobilní a s nedostatečnou expozicí slunečnímu záření, což může být výsledkem vzniklého stavu hypovitaminózy D.

Přestože je role vitamínu D v ovlivnění imunitního systému neoddiskutovatelnou, vitamin D inhibuje proliferaci T-lymfocytů a indukuje jejich apoptózu, čímž působí imunopresivním účinkem v etiologii rozvoje autoimunitní odpovědi organismu, je nutné předložit dostatečně validní data pro potvrzení vlivu vitamínu D na vznik a průběh RS.

2.5.3 Deficit vitamínu D u kognitivních poruch

Kognitivní poruchy představují heterogenní nozologické jednotky, většinou neznámé etiologie se společnými rysy, které se souhrnně označují jako degenerativní onemocnění nervového systému, charakterizované postupným poklesem intelektu, poruchou chování a/nebo změny osobnosti, čímž je velmi výrazně narušena sociální i ekonomická aktivita postižených jedinců. Nejčastěji se jedná o různé typy demencí, převážně u Alzheimerovy choroby (Seidl a Obenberger, 2004). Současná strategie u kognitivních poruch představuje včasnou diagnostiku neurodegenerativního onemocnění a ovlivnění možné progresse onemocnění vedoucí k ireverzibilní ztrátě neuronů.

Receptory vitamínu D jsou často zastoupeny i v oblastech postižených neurodegenerativním procesem (hippocampus a přilehlé struktury mozku), čímž je popisován protektivní účinek vitamínu D na kognitivní funkce, kde inhibuje syntézu oxidů dusíku, reguluje enzymatické pochody v metabolismu glutathionu a neurotrofinu a/nebo v metabolismu buněčného kalcia (Polívka et al., 2012). Opětovně Polívka odkazuje na výsledky studií, kde u pacientů s poruchou kognitivní funkce byly zaznamenány nižší hladiny plazmatického vitamínu D ve srovnání s běžnou populací. Tento fakt může být i důsledkem, již zmíněné, nesoběstačnosti jedince a poklesem kvality nutriční u pacientů s demencí, přesto dostatečná suplementace vitamínem D může napomoci pozitivně ovlivnit koincidenci ostatních onemocnění u polymorbidních pacientů s demencí.

3 METODY STANOVENÍ VITAMINU D V HUMÁNNÍ MEDICÍNĚ

Problematika stanovení vitamínu D v biologickém materiálu reflektuje mnohá úskalí, převážně analytické fáze, neboť analytické aspekty jeho stanovení mají přímý dopad na interpretaci výsledků. Základní přehled metod stanovení vitamínu D pro klinické účely shrnuje kapitola 3 Metody stanovení vitamínu D v humánní medicíně, se zaměřením na limitace jednotlivých principů měření.

3.1 IMUNOANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ VITAMINU D

Pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů v krevní cirkulaci je publikována a komerčně dodávaná řada kompetitivních imunoanalytických metod. Vzhledem k dostupnosti imunoanalytických metod představují majoritní podíl metod stanovení vitamínu D pro humánní účely (Ong et al., 2012), pracující na principu luminiscenční analýzy, radioimunoanalýzy a enzymoimunoanalýzy.

3.1.1 Obecné základy imunoanalytických metod

Mezi imunoanalytické metody řadíme všechny metodiky založené na principu interakce antigenu a protilátky s tvorbou specifického imunokomplexu a následné vizualizace a kvantifikace vzniklého produktu (Cibiček et al., 2014). Předností imunoanalytických metod je citlivost stanovení pohybující se v řádu nmol/l, zpravidla bez nutnosti předchozí úpravy vzorku. Rozvoj automatizovaných imunoanalytických metod reflektuje požadavky laboratorní medicíny a dovoluje stanovit široké spektrum analyzovaných látek v jednotlivých odbornostech zdravotní péče (Cibiček et al., 2014, Vávrová et al., 2007). Frekventované imunoanalytické metody jsou převážně v kompetitivním uspořádání, přičemž stanovení vykazují uspokojivou specificitu pro 25-OH vitamín D₃ i 25-OH vitamín D₂. Interferující substance se liší dle výrobce diagnostické soupravy (Farrell et al., 2012).

3.1.2 Limitace imunoanalytických metod

Limitujícím faktorem imunoanalytických metod jsou fyzikálně-chemické vlastnosti 25-OH vitamínu D – hydrofobní analyt je v krvi vázán na VDBP a generování protilátek proti malé antigenní molekule, je značně složité (Farrell et al., 2012). Afinity vitamínu D k vazebnému proteinu (VDBP) je značná, také koncentrace vazebného proteinu je vyšší než substrátu a dosahuje plazmatických koncentrací v $\mu\text{mol/l}$ (Stepman et al., 2011). Před

vlastním stanovením vitamínu D v biologickém materiálu je vyžadováno uvolnění vitamínu D z vazby s transportním proteinem (inaktivace VDBP) nastavením na potřebnou hodnotu pH reakční směsi. Přičemž koncentrace transportního proteinu se může velmi lišit v určitých skupinách pacientů (zdraví jedinci, gravidní ženy, pacienti v terminálním stadiu selhání ledvin apod.) – účinnost uvolnění vitamínu D z transportního proteinu se tedy liší v závislosti na koncentraci VDBP a použitím způsobu nastavení pH reakční směsi. Uvedené limity imunoanalytických metod vedou k diferencím mezi diagnostickými soupravami různých výrobců (Friedecký, 2012a). Automatizované analýzy mohou využívat monoklonálních nebo polyklonálních protilátek proti 25-OH vitamínu D₂ a D₃ formám s rozdílnou imunoreaktivitou, a proto imunoanalytické metody tedy musí specifikovat měřenou veličinu, tedy sumární koncentraci D₂ a D₃, případně zkříženou reaktivitu 3-epi-25-OH vitamínu D₃ (Ong et al., 2012).

Ostatní interferující substance imunoanalytických metod lze shrnout do často se vyskytujících bez přímé návaznosti na stanovení vitamínu D. Moderní automatické imunoanalýzy jsou často zatíženy zkříženou reaktivitou, tedy interakcí protilátek a antigenu, který její tvorbu nevyvolal. Primárním zdrojem interference mohou být autoprotiilátky (namířené proti vlastním strukturám) a/nebo přítomnost heterofilních protilátek vznikajících po expozici imunogenům z jiných živočišných druhů (nejfrekventovanější tzv. HAMA, myší protiilátky), (Cibiček et al., 2014; Friedecký, 2012a). Výsledky stanovení v případech interferencí poskytují zcela odlišné laboratorní nálezy od aktuálního klinického stavu pacienta.

Druhým typem obecně se vyskytující interference imunoanalytických metod je přítomnost tzv. Hook efektu, tedy interference samotného stanovovaného analytu pozorovaného u silně pozitivních vzorků sér pacientů (tedy s patologicky zvýšenou koncentrací stanovovaného analytu). Při tomto jevu dochází v reakční směsi k maximálnímu vyvázání protilátek na antigen a falešně negativnímu výsledku testu (Cibiček et al., 2014).

3.2 SEPERAČNÍ METODY STANOVENÍ VITAMINU D

Separační techniky stanovení vitamínu D v biologickém materiálu (zejména kapalinová chromatografie, dále jen LC) dominují schopností kvantifikovat 25-OH vitamín D₃ a 25-OH vitamín D₂ a realizovat stanovení v různém uspořádání (složení mobilní fáze, typ použitých analytických kolon, způsob detekce a jiné volitelné parametry). Pro laboratorní

účely v humánnej medicíne lze využít širokou nabídku komerčně dodávaných diagnostických kitů pro LC - chromatografická stanovení v různém provedení (predominance uspořádání s UV detekcí a ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem).

3.2.1 Referenční metoda LC – MS/MS

Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (dále jen LC – MS/MS) představuje specifickou možnost stanovení vitamínu D a jeho metabolitů v biologickém materiálu. Způsob detekce umožňuje vysoce specifické stanovení cílových sloučenin na základě individuálních molekulárních struktur. Rozvoj technologií a jejich implementace do lékařských věd významně přispěl k pokroku v medicíne (Kobold, 2012).

Pro referenční metodiku stanovení vitamínu D v biologickém materiálu byly navrženy dvě metody na podkladě LC-MS/MS, které paralelně stanovují 25-OH vitamín D₂ a 25-OH vitamín D₃. Certifikovanými referenčními materiály, na kterých jsou kalibrace metod založeny: SRM 972a NIST a SRM 2972 NIST (Friedecký a Vávrová, 2016). Metoda NIST publikována autory Tai et al. (2012), druhá GHENT kolektivem autorů Stepmana et al. (2011). Kandidátní referenční metody využívají isotopicky značené vnitřní standardy 25-OH vitamínu D₃ a 25-OH vitamín D₂ s následnou extrakcí kapalina–kapalina. Vlastní LC-MS/MS separace probíhá na reverzní fázi C₁₈, resp. užitím Zorbax SB-CN kolony v gradientovém uspořádání (metodika GHENT) s hmotnostně spektrometrickou detekcí v pozitivním módu v režimu sledování vícenásobných přechodů (MRM), iontový zdroj: elektrosprej. Sledované MS/MS přechody m/z 401,3 → 159,3 (25-OH vitamín D₃ a 3-epi-25-OH vitamín D₃); m/z 407,3 → 159,3 (d6-25-OH vitamín D₃); m/z 413,4 → 159,4 (25-OH vitamín D₂) a m/z 419,4 → 159,4 (d6-25-OH vitamín D₂), (Stepman et al., 2011).

Metodika NIST probíhá za izokratických podmínek separace na reverzní fázi (použitá analytická kolona Zorbax SB-CN), opět v pozitivním módu v režimu sledování vícenásobných přechodů (MRM), iontový zdroj: chemická ionizace za atmosférického tlaku. Sledované MS/MS přechody: m/z 401 → 383 (25-OH vitamín D₃); m/z 404 → 386 (d3-25OH vitamín D₃); m/z 413 → 395 (25-OH vitamín D₂) a m/z 416 → 398 (d3-25-OH vitamín D₂); (Tai et al., 2012).

Obě metody dosahují velmi dobrých analytických charakteristik, včetně výpočtu hodnoty bias a dle odlišných literárních zdrojů vykazují imunoanalytické metody významné diference vůči navrženým referenčním LC-MS/MS metodám. Majoritní podíl na diferencích

je dle Friedeckého a Vávrové (2016) přisuzován vazebnému proteinu (VDBP), jeho koncentraci a efektivnímu způsobu uvolňování vitamínu D z této vazby, která může být u pacientů s patologickým procesem velmi rozdílná.

3.2.2 Ostatní chromatografické techniky

Ostatní chromatografické metody pracující na principu vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále jen HPLC) s odlišným způsobem detekce lze rovněž využít pro rutinní měření vitamínu D v krevní cirkulaci. Techniky současně stanovují 25-OH vitamín D₃ a 25-OH vitamín D₂, příp. jeho další metabolity. V iniciální fázi je kladen důraz na předpřípravu vzorku, která zahrnuje deproteinaci, extrakci a purifikaci vzorku s následným dělením separovaných frakcí na normálních, resp. reverzních fázích. Detekce produktů separace je většinou fotometrická při 255 – 265 nm, příp. elektrochemická (Farrell et al., 2012).

3.2.3 Limitace chromatografických metod stanovení

Chromatografické metody stanovení se řadí k sofistikovaným instrumentálním analytickým technikám, jejichž rychlost, vysoká specifita a citlivost umožňují kvalitativní a především kvantitativní analýzu řady biologicky významných látek v tělních tekutinách. Limitace, způsobující výrazné difference ve stanovení vitamínu D užitím imunochemických metod, nejsou u chromatografických technik pozorovány. Určitým omezením je delší čas analýzy a nutná předpříprava vzorku před vlastním stanovením. Využití tandemové hmotnostní spektrometrie, vzhledem k pořizovacím i provozním nákladům a nutnosti erudice interpretačního pracovníka, je t.č. v rutinních laboratořích zcela minimální (Cibiček et al., 2014; Farrell et al., 2012).

4 EXTERNÍ HODNOCENÍ KVALITY SE ZAMĚŘENÍM NA STANOVENÍ 25-OH VITAMINU D

Rozvoj technologie a používání imunochemických systémů v klinických laboratořích zaznamenal v posledních letech výrazný vzestup. Důvodem byla potřeba provádět laboratorní analýzy v oblasti klinické biochemie pro široké spektrum nabízených parametrů s dostatečnou dobou odezvy a nutností diagnostikovat a/nebo monitorovat stav nemocného. Zároveň s vývojem nových instrumentálních systémů bylo potřeba monitorovat kvalitu měření tak, aby nedošlo k výrazným rozdílům mezi analytickými systémy rozdílných výrobců a k poškození pacienta. Kapitola 4 přináší ucelený přehled nabízených tuzemských i zahraničních cyklů externího hodnocení kvality se zaměřením na stanovení vitamínu D v biologickém materiálu a současně ilustruje úroveň analytické kvality stanovení 25-OH vitamínu D v národních zdravotnických laboratořích.

4.1 EXTERNÍ HODNOCENÍ KVALITY V ČESKÉ REPUBLICE, SPOLEČNOST SEKK s r. o.

V zahraničí má systém externího hodnocení kvality (dále jen EHK) dlouholetou tradici. Účast v programech EHK (tuzemských a/nebo zahraničních) je v současné době vyžadována zdravotními pojišťovnami, odbornými posuzovateli certifikačních orgánů i samotnými indikujícími lékaři, proto implementace programů EHK do laboratorní medicíny je již rutinním způsobem sledování kvality práce jednotlivých laboratoří.

V České republice vznikla v roce 1995 společnost SEKK spol. s r. o. se sídlem v Pardubicích se základním cílem „... *poskytovat klinickým laboratořím komplexní služby v oblasti externího hodnocení kvality, zajištění správné laboratorní praxe (SLP) a vzdělávání v laboratorní medicíně...*“ (SEKK, 2013a, s. 1). Společnost SEKK s r. o. v současné době nabízí širokou nabídku kontrolních cyklů EHK dostatečně pokrývající nabídku rutinně prováděných vyšetření v laboratořích ČR.

4.1.1 Hodnotící ukazatele EHK SEKK spol. s r. o.

Společnost SEKK s r. o. rozesílá účastníkům kontrolních cyklů lyofilizované vzorky v počtu 2 (obvykle 2 odlišné koncentrační úrovně), povinností zúčastněných laboratoří je proměřit vzorky EHK v rutinním provozu. Výsledky stanovení jsou elektronicky a/nebo

písemně odeslány na adresu organizátora, který po ukončení daného kontrolního cyklu provede vyhodnocení všech účastníků. Všem účastníkům je zaslána tištěná výsledková zpráva, certifikát a osvědčení o účasti. Současně jsou výsledky zveřejněny na webu společnosti SEKK s r.o. a to bez uvedení konkrétních identifikačních údajů.

Souhrnné statistické výsledky jsou uvedeny pro všechny kvantitativní výsledky i pro jednotlivé skupiny. Přičemž skupinu je možné definovat podle totožného principu měření, výrobce použitých reagensů a/nebo použitím stejného měřicího přístroje. Pro takto definovanou skupinu (četnost minimálně 5) je vypočtena cílová hodnota daného analytu na základě výpočtu robustního průměru, směrodatná odchylka, variační koeficient a výpočet dolní a horní meze na základě tolerančního rozpětí pro jednotlivé analyty (revidovány odbornými společnostmi vždy na konci kalendářního roku). Na základě získaných dat je účastník vyhodnocen v rámci své skupiny a provedeno celkové hodnocení (úspěšné/neúspěšné), (SEKK, 2014a).

4.1.2 Kontrolní cyklus kostní markery

Kontrolní cyklus Kostní markery (dále jen BM – bone markers) byl zařazen do programu EHK firmy SEKK spol. s r. o. v roce 2008, kdy proběhla pilotní studie a od roku 2009 byl cyklus zařazen do pravidelného programu EHK s nabízenou frekvencí 2 x ročně (SEKK, 2009). Do prvního hodnotícího cyklu bylo zařazeno 5 parametrů kostního metabolismu, včetně 25-OH vitamínu D. Cyklu se zúčastnilo 75 účastníků (62 z ČR a 13 ze Slovenska), přičemž stanovení 25-OH vitamínu D provedlo pouze 33 účastníků, z nichž pouhých 21 bylo úspěšných v obou koncentračních hladinách sledovaného analytu, což vyjádřeno ukazatelem relativní úspěšnosti odpovídalo 64 % (SEKK, 2009). Sumarizaci kontrolních cyklů BM v následujících letech shrnují Tab. 4 a Tab. 5. Z nich je patrné, že v průběhu let přibývá účastníků provádějících kvantitativní stanovení 25-OH vitamínu D, současně však reflektuje neuspokojivou analytickou kvalitu stanovení vitamínu D. V roce 2011 byl zaznamenán pokles relativní úspěšnosti účastníků kontrolního cyklu BM a zhoršení reprodukovatelnosti na základě variačního koeficientu všech účastníků (SEKK, 2011a; 2011b), tento nepříznivý trend je pozorován i v následujících letech (SEKK, 2016).

Od roku 2010 byl zaznamenán zvyšující se počet výrobců diagnostických souprav pro imunochemické stanovení 25-OH vitamínu D (SEKK, 2010a; 2010b) s převažujícím výrobcem Roche Diagnostics, který v současné době zcela dominuje v souhrnných

statistikách EKH SEKK spol. s r. o. V cyklu BM1/14 se zúčastnilo stanovení 25-OH vitamínu D celkem 103 laboratoří, z nichž 57 účastníků využívá imunochemickou soupravu Roche Diagnostics, 17 imunochemickou soupravu Abbott Laboratories, 12 imunochemickou soupravu Siemens, 10 imunochemickou soupravu Diasorin, pouze 1 účastník uvedl využití separační techniky pro stanovení vitamínu D (SEKK, 2014b). Obdobná situace je pozorována v následujícím kontrolním cyklu (SEKK, 2014c), přesto v cyklu BM1/15 se diferencuje nová skupina účastníků, využívající imunochemický princip firmy Beckman Coulter a poskytující zcela odlišné výsledky stanovení 25-OH vitamínu D (SEKK, 2015a). Tato skupina účastníků poskytovala v následujících kontrolních cyklech zcela odlišné hodnoty stanoveného vitamínu D (SEKK, 2015b; SEKK, 2016). Výsledky prezentuje Tab. 6.

Tab. 4 Sumarizace výsledků EKH SEKK spol. s r. o. pro analyt 25-OH vitamín D

Kontrol. cyklus	Počet účastníků (n)	Počet úspěšných účastníků (n)	Relativní úspěšnost (%)	Relativní úspěšnost bez sk. ostatní (%)
BM1/09	33	21	64	81
BM1/10	46	32	70	91
BM2/10	48	41	85	98
BM1/11	56	39	70	76
BM2/11	61	50	82	88
BM1/12	71	60	85	92
BM2/12	75	65	87	93
BM1/13	84	78	93	96
BM3/13	87	80	92	96
BM1/14	103	92	89	96
BM2/14	105	95	90	99
BM1/15	101	97	96	nehodnoceno
BM2/15	104	96	92	nehodnoceno
BM1/16	106	106	100	nehodnoceno

Zdroj: zpracování vlastní podle SEKK spol. s r. o.

4.1.3 Interpretace výsledků externího hodnocení kvality analytu 25-OH vitamínu D v České republice

Z výsledků EHK SEKK spol. s r. o. jsou zřejmé systematické rozdíly průměrů metod a neexistence harmonizace mezi kalibracemi různých výrobců (Tab. 6). Za zcela důležité z pohledu standardizace měření 25-OH vitamínu D je podle Friedeckého (2012b) návaznost pracovních kalibrátorů rutinních měření na certifikovaný referenční materiál NIST SRM 972. Někteří z výrobců diagnostik uvádějí ve svých pracovních dokumentacích jejich používání, navzdory tomuto tvrzení je diference mezi výrobcí diagnostik patrná na výsledcích EHK. Naprosto zarážející se jeví skutečnost, že většina výrobců diagnostických souprav pro kvantitativní stanovení vitamínu D (imunochemických i separačních) využívá obdobnou definici referenčního rozmezí pro definování saturace organismu vitamínem D vycházející z publikace National Institutes of Health (Tab. 7); (Friedecký, 2012b, NIH, 2011).

Pro ilustraci lze uvést příklad kontrolního cyklu BM1/12, vzorek A (Tab. 6). Průměrná koncentrace ve skupině Roche vykazovala hodnotu 34,1 nmol/l, tato hodnota je podle NIH (2011) asociována s rozvojem sekundární hyperparathyreózy na podkladě insuficience vitamínu D. Totožný vzorek ve všech ostatních skupinách imunochemických metod a/nebo ostatních vykazoval průměrné koncentrace vyšší než 50,0 nmol/l, což podle NIH svědčí pro dostatečnou saturaci organismu vitamínem D (SEKK, 2012a; NIH, 2011).

4.2 ZAHRANIČNÍ KONTROLNÍ CYKLY EHK

Z evropských kontrolních cyklů zaměřených na stanovení koncentrace 25 - OH vitamínu D je možné jmenovat Instand e.V. (Düsseldorf, Německo), DGKL_RfB (Bonn, Německo) a DEQAS (Londýn, Velká Británie). Zahraniční organizátoři EHK nabízejí stanovení 25-OH vitamínu D a taktéž 1,25-(OH)₂ vitamínu D. Instand i DGKL_RfB nabízejí zpracování kontrolních vzorků s frekvencí 2 x ročně, firma DEQAS nabízí vzorky s frekvencí 5 x ročně s možností testování 5 lyofilizovaných vzorků a současného stanovení 25-OH vitamínu D a 1,25(OH)₂ vitamínu D. Jako jediná získala ocenění společnosti CAP (College of American Pathologists) k provádění testů způsobilosti a k ověření analytické kvality pro diagnostické soupravy stanovení 25-OH vitamínu D a/nebo 1,25-(OH)₂ vitamínu D s návazností na NIST.

Zastoupení analytických měřících systémů v zahraničních kontrolních cyklech je obdobná jako v tuzemských laboratořích (Tab. 8). Dominují imunochemické metody

stanovení 25-OH vitamínu D, mezilaboratorní reprodukovatelnost se pohybuje okolo 20 % a vykazuje setrvalý stav (SEKK, 2013c). Sumarizací výše uvedeného vedla Friedeckého (2012b) k hypotéze, že účinná standardizace vyžaduje vytvoření referenčního měřicího systému, sestávající ho z mezinárodně akceptované referenční metody na bázi tandemové hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS) a z certifikovaného referenčního materiálu NIST-SRM 972.

Tab. 5 Souhrnná statistika výsledků EHK SEKK spol. s r. o. pro analyt 25-OH vitamín D a kvantitativní výsledky

Kontrol. cyklus	Toleranční rozpětí (%)	Reprodukovatelnost (průměr vz. A, B; %)
BM1/09	27	17
BM1/10	35	23
BM2/10	41	27
BM1/11	33	36
BM2/11	33	32
BM1/12	33	30
BM2/12	33	24
BM1/13	33	19
BM3/13	33	22
BM1/14	33	17
BM2/14	33	23
BM1/15	33	19
BM2/15	33	25
BM1/16	33	21

Zdroj: zpracování vlastní podle SEKK spol. s r. o.

Tab. 6 Sumarizace výsledků EHK SEKK spol. s r. o. pro různé výrobce diagnostických souprav a analyt 25-OH vitamin D v nmol/l

Výrobce _Cyklus	Roche	Abbott	Diasorin	Siemens	IMD	Ostatní	Beckman Coulter
BM1/11 A = B =	39,0 65,0	63,1 104,0	109,0 161,0	34,2 66,7	53,3 86,5	54,5 112,0	-
BM2/11 A = B =	81,3 135,0	92,2 146,0	167,0 243,0	136,0 219,0	112,0 157,0	140,0 215,0	-
BM1/12 A = B =	34,1 83,5	56,5 106,0	54,7 118,0	56,8 144,0	66,5 112,0	58,3 144,0	-
BM2/12 A = B =	139,0 37,4	170,0 59,4	199,0 67,5	201,0 48,8	160,0 70,2	200,0 60,8	-
BM1/13 A = B =	55,0 106,0	48,1 82,9	82,5 129,0	71,2 142,0	79,9 121,0	69,0 122,0	-
BM2/13 A = B =	108,0 55,8	81,9 49,5	144,0 86,9	142,0 74,2	104,0 81,0	111,0 67,2	-
BM1/14 A = B =	80,8 47,0	60,2 37,6	90,4 57,5	79,5 46,5	- -	148,0 123,0	-
BM2/14 A = B =	53,0 103,0	33,1 64,1	56,3 98,1	41,5 84,1	- -	129,0 191,0	-
BM1/15 A = B =	39,9 78,9	41,8 71,6	54,8 92,3	47,7 90,2	- -	- ⁷ -	140 203
BM2/15 A = B =	92,3 43,2	78,4 44,7	104 67,8	92,1 46,9	- -	- -	213 144
BM1/16 A = B =	90,8 47,4	104 56,8	127 74,6	94,9 54,8	- -	- -	247 164

Zdroj: zpracování vlastní podle SEKK spol. s r. o.

⁷ Skupina nehodnocena, počet účastníků n=4 (pro hodnocení nutno splnit podmínku n=5). Nově vytvořená skupina pro uživatele imunochemické soupravy Beckman Coulter, n=6.

Tab. 7 Hodnocení stavu saturace organismu podle koncentrace 25-OH vitamínu D

Koncentrace 25-OH vitamínu D (nmol/l)	Stav organismu
< 30,0	deficit vitamínu D
30 – 50	insuficience (nedostatečný přívod), rozvoj sekundární hyperparathyreózy
≥ 50,0 (někteří autoři uvádějí hodnotu 75,0)	dostatečná saturace
≥ 125,0 (někteří autoři uvádějí hodnotu 250)	potenciálně toxické koncentrace

Zdroj: zpracování vlastní podle NIH, 2011.

Tab. 8 Zahraniční kontrolní cyklus DEQAS pro analyt 25-OH vitamín D, přehled celkových mezilaboratorních reprodukovatelností

Čas/označení	No. 451	No. 452	No. 453	No. 454	No. 455	Počet n/LC
04/2014	16,4 %	15,5 %	13,0 %	15,6 %	15,8 %	998/181
07/2014	15,3 %	18,4 %	14,3 %	11,1 %	19,8 %	989/179
10/2014	12,2 %	12,3 %	11,4 %	13,8 %	31,4 %	977/180
01/2015	12,4 %	16,6 %	16,4 %	12,8 %	14,4 %	976/185

Zdroj: zpracování vlastní podle DEQAS

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Kapitola 5 sumarizuje stručný popis použitých metod stanovení i diagnostických souprav, charakteristiku výzkumného šetření a testovaného souboru, včetně přístrojového vybavení.

5.1 CÍL EXPERIMENTÁLNÍHO VÝZKUMU

Cílem předkládané práce bylo zjištění současného stavu úrovně analytické kvality tří rozdílných metod stanovení 25-OH vitamínu D v séru a/nebo plazmě pomocí dvou imunochemických metod stanovení využitím inovované diagnostické soupravy firmy Roche (Německo), Abbott (Německo) a kvantitativní stanovení 25-OH Vitamínu D₂/D₃ pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí a použitím diagnostického kitu firmy Recipe (Německo).

5.2 CHARAKTERISTIKA TESTOVANÉHO SOUBORU

Do studie bylo celkem zařazeno 60 rutinních vzorků pacientů Diagnostické laboratoře Spadia Lab, Ostrava bez bližší specifikace, u kterých bylo lékařem indikováno stanovení 25-OH vitamínu D. Příjem biologického materiálu proveden ve stejném ročním období (listopad, prosinec). Průměrný věk vyšetřované skupiny 56 let, s extrémy 15 a 85 let. Z testovaného souboru bylo 5 probandů vyloučeno pro nedostatek biologického materiálu. Vstupním kritériem pro zařazení do souboru bylo splnění podmínky suspektní insuficience vitamínu D nebo dostatečné saturace vitamínem D.

5.3 PRACOVNÍ POSTUP

5.3.1 Zpracování vzorku biologického materiálu

Před odběry periferní žilní krve nebylo potřeba dodržet žádné speciální dietní opatření. Biologický materiál byl odebrán do vakuových zkumavek s akcelerátorem hemokoagulace a takto transportován do laboratoře. Krev byla po příjmu biologického materiálu a doprovodné dokumentace centrifugována 10 minut při 4000 ot/min. Získané sérum bylo v den přijetí biologického materiálu a po ukončení analýz alikvotováno a uchováváno při teplotě – 20 °C pro testovací účely do ukončení výzkumného záměru. Stabilita uskladněného séra je uváděna 3 dny při 18-26 °C, 3 dny při 2-8 °C a 1 rok při – 20 °C (Vávrová et al.,

2007). Před analýzou bylo sérum temperováno na laboratorní teplotu, důkladně promícháno a centrifugováno, tepelná inaktivace séru neprovedena. Ve všech vzorcích byl vyšetřen 25-OH vitamin D s použitím nově vyvinuté diagnostické soupravy Elecsys Vitamin D total (Roche Diagnostics, Německo), 25-OH Vitamin D (Abbott Laboratories, Německo) a současně provedeno kvantitativní stanovení 25-OH Vitaminu D₂/D₃ pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí (Recipe Chemicals + Instruments, Německo). Použité postupy byly v souladu s etickými standardy a s Helsinskou deklarací z roku 1975, ve znění revize z roku 1983 (Zadák et al., 2011).

5.3.2 Přístroje, výpočetní technika a pomůcky

- kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity,
- imunochemický analyzátor ELECSYS e411 (Roche),
- imunochemický analyzátor ARCHITECT i2000 SR (Abbott),
- centrifuga Eppendorf 5702,
- dělená pipeta 2 ml,
- automatická pipeta jednobáňová 100 - 1000 µl,
- dělená pipeta 5 ml,
- dělená pipeta 10 ml,
- špičky do automatických pipet,
- hitachi mikrozkuřavky,
- latexové bezprašné rukavice,
- kontejnery na infekční odpad.

5.3.3 Použité reagensy

- Elecsys Vitamin D total (Roche Diagnostics), kat.č. 05894913, 1 x 100 testů,
- Elecsys Vitamin D total CalSet (Roche Diagnostics), kat.č. 05894921, 2 x (2 x 1,0 ml),
- Elecsys PreciControl Varia (Roche Diagnostics), kat.č. 05618860, 2 x (2 x 3,0 ml),
- ClinRep Complete Kit 25-OH Vitamin D₂/D₃ (Recipe Chemicals + Instruments), kat.č. 3500, 1 x 100 testů,
- ClinChek Controls (Recipe Chemicals + Instruments), kat.č. 35082, 2 x 5 x 2,0 ml,
- 25-OH Vitamin D (Abbott Laboratories), kat.č. 3L52, 1 x 100 testů,
- 25-OH Vitamin D Controls (Abbott Laboratories), kat.č. 3L52-10, 3 x 8,0 ml,

- 25-OH Vitamin D Calibrators (Abbott Laboratories), kat.č. 3L52-01, 6 x 4,0 ml,
- příslušenství pro analyzátoři Cobas e411, Architect 2000i SR,
- destilovaná voda.

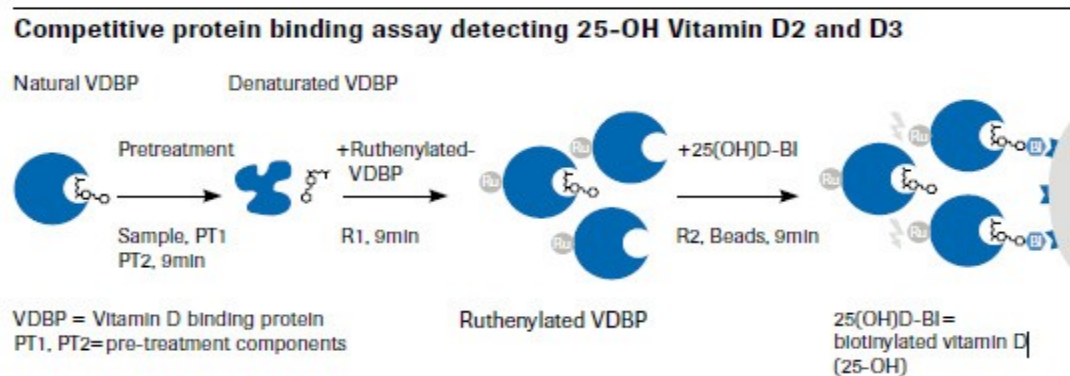
5.3.4 Elecsys Vitamin D total (Roche)

Souprava Elecsys Vitamin D total (Roche) využívá kompetitivního stanovení vitamínu D vázajícího proteinu (VDBP) a vitamínu D z patientských sér. Princip metody není založen na reakci polyklonálních nebo monoklonálních protilátek se svým antigenem, nýbrž na specifické interakci VDBP s vitamínem D. Iniciačním krokem stanovení je denaturace VDBP v krvi a následně přidavek VDBP značeného rutheniem z reakční směsi. Dochází ke specifické vazbě vitamínu D z patientských sér se značeným VDBP. K vzniklému komplexu je přidán biotinem značený vitamin D, v reakční směsi dochází ke kompetitivnímu procesu stanovovaného vitamínu D se značeným vitamínem D. Celý komplex je následně navázán na pevnou fázi magnetické mikročástice prostřednictvím vazby biotinu a streptavidinu. Detekce průběhu analytické reakce probíhá pomocí elektrochemiluminiscence (Obr. 4). Charakteristiku metody sumarizuje Tab. 9. Výrobce deklaruje standardizaci metody pomocí referenční tandemové hmotnostní spektrometrie LC-MS/MS s návazností na referenční materiál SRM 972 Vitamin D (NIST, 2014) a z firemní dokumentace je zřejmá definice stanovovaného analytu jako suma 25-OH vitamínu D₂ a 25-OH vitamínu D₃ s celkovou délkou stanovení 27 minut. Diagnostická souprava je určena pro použití na imunochemických analyzátořech Elecsys a Cobas e (obojí Roche) a dosahuje velmi uspokojivých analytických charakteristik (dle firemní dokumentace). Ke kalibraci byl využit firemně dodávaný kalibrátor Vitamin D total CalSet, kontrola kvality byla prováděna pomocí PreciControl Varia na dvou koncentračních úrovních (Roche). Podle firemní dokumentace doporučuje výrobce realizovat kalibraci metody ve frekvenci 1 x 28 dnů při používání stejné šarže reagentů, 1 x 7 dnů při používání identické soupravy v analyzátoru a/nebo dle potřeby podle vychýlení v procesu interní kontroly kvality.

Interferenci stanovení lze podle výrobce zaznamenat u vzorků vykazující hemolýzu, kdy koncentrace hemoglobinu > 1,24 mmol/l může způsobit falešnou elevaci hodnot 25-OH vitamínu D. Stanovení však nejeví znaky interference v případě vzorků ikterických, lipemických a s přidavkem biotinu. V panelu běžně dostupných léčiv nebyla zaznamenána žádná interference při terapeutických koncentracích medikamentů, pouze ve velmi vzácných

případech je možné pozorovat interferenci při stanovení způsobenou velmi vysokou koncentrací protilátek proti analyt-specifickým protilátkám, streptavidinu a rutheinu (Vitamin D total, Roche Diagnostics, 2011-10, V3, CZ).

Obr. 4 Princip stanovení Vitamin D total (Roche)



Zdroj: firemní dokumentace Roche Diagnostics Ltd.

Tab. 9 Analytické charakteristiky soupravy pro stanovení celkového vitamínu D (Roche Diagnostics)

Parametr	
Celkový čas stanovení (min)	27
Specifikace biologického materiálu	sérum, plazma
Objem vzorku (μl)	15
Limit detekce (nmol/l)	7,5
Limit kvantifikace (nmol/l)	22,5
Měřicí rozsah (nmol/l)	7,5 - 175
Standardizace	LC-MS/MS standardizované s NIST
Analytická specifičnost	vitamin D ₃ : 100 %; vitamin D ₂ : 92 %
Referenční rozmezí podle výrobce (nmol/l)	13,2 - 118

Zdroj: zpracování vlastní podle Roche Diagnostics

Veškeré reagensie, které nebyly připraveny k přímému použití, byly připraveny podle pokynů výrobce diagnostické soupravy, včetně podmínek uskladnění. Diagnostická souprava byla po vložení a načtení metodiky v analyzátoru kalibrována a úspěšnost kalibrace verifikována použitím firemního kontrolního materiálu na dvou koncentračních úrovních. Při uspokojivé

odezvě v procesu interní kontroly kvality následovalo stanovení vzorků testovaného souboru. Výsledky kvantitativního stanovení Vitamin D total jsou automaticky měřeny softwarem Elecsys e411 s porovnáním elektrochemiluminiscenčního signálu získaného ze vzorku s hodnotou získanou kalibrací metod.

5.3.5 25-OH Vitamin D (Abbott)

Diagnostická souprava 25-OH Vitamin D (Abbott Laboratories) je určena pro kvantitativní stanovení 25-OH vitamínu D v séru a/nebo plazmě na systémech Architect i1000 SR, i2000 SR a i4000 SR (Abbott). Souprava využívá kompetitivního stanovení, přičemž v iniciační fázi je ke vzorku biologického materiálu přidán ředící roztok a paramagnetické mikročástice potažené ovčími polyklonálními protilátkami (IgG) proti vitamínu D. Ke vzniklému komplexu je přidán biotinem značený vitamin D a konjugát anti-biotin značený akridiniem, který se naváže na neobsazená vazebná místa protilátek proti vitamínu D na mikročásticích. V reakční směsi dochází ke kompetitivnímu procesu stanovovaného vitamínu D se značeným vitamínem D. Po promytí se k reakční směsi doplní roztoky Pre-Trigger a Trigger (příslušenství pro analyzátoři Architect, Abbott). Detekce průběhu analytické reakce probíhá pomocí chemiluminiscence, přičemž koncentrace 25-OH vitamínu D ve vzorku je nepřímo úměrná signálu v jednotkách RLU.

Tab. 10 Analytické charakteristiky soupravy pro stanovení 25-OH vitamínu D (Abbott)

Parametr	
Celkový čas stanovení (min)	36
Specifikace biologického materiálu	sérum, plazma
Objem vzorku (μl)	20
Limit detekce (nmol/l)	7,75
Limit kvantifikace (nmol/l)	20
Měřicí rozsah (nmol/l)	20 - 400
Standardizace	LC-MS/MS standardizované s NIST
Analytická specifčnost	25-OH vitamin D ₃ : 105 %; 25-OH vitamin D ₂ : 52 %; 24,25-(OH) ₂ vitamin D ₃ : 112 %
Referenční rozmezí podle výrobce (nmol/l)	23,7 – 138,5

Zdroj: zpracování vlastní podle Abbott Laboratories

Stručnou charakteristiku metodiky Abbott Laboratories sumarizuje Tab. 10. Kalibrace metody byla provedena firemním kalibrátorem Architect 25-OH Vitamin D Calibrators (Abbott) o šesti odlišných koncentracích. Výrobce doporučuje dle své firemní dokumentace realizovat kalibraci metody ve frekvenci 1 x 7 dnů a/nebo dle potřeby podle vychýlení v procesu interní kontroly kvality. Tato byla provedena pomocí Architect 25-OH Vitamin D Controls na třech koncentračních úrovních. Po verifikaci procesu bylo provedeno stanovení vzorků z testovaného souboru. Výsledky kvantitativního stanovení 25-OH vitamínu D jsou automaticky měřeny softwarem Architect i2000 SR s porovnáním chemiluminiscenčního signálu získaného ze vzorku s hodnotou získanou kalibrací metody.

Firma Abbott uvádí z interferujících substancí heterofilní protilátky v krevní cirkulaci, taktéž biologický materiál obsahující anti-myší monoklonální protilátky (HAMA), případně vzorky silně hemolytické mohou vykazovat odchylky ve stanovení. Z panelu běžně dostupných léčiv nebyla pozorována výrazná interference při stanovení, výrobce rovněž nedoporučuje stanovovat 25-OH vitamin D od kadaverózních dárců⁸ (25-OH Vitamin D, Abbott Laboratories, 2010-10, EN).

5.3.6 25-OH Vitamin D₂/D₃ (Recipe)

HPLC analýza byla provedena na systému Agilent 1260 Infinity. Byly použity firemní mobilní fáze, reagentie a analytická kolona, které jsou součástí kitu firmy Recipe (Německo). Kolona pracovala izokraticky při teplotě 35 °C s následnou UV/VIS detekcí (vlnová délka 264 nm), průtok mobilní fáze činil 1,0 ml/min. Vzorek byl před analýzou precipitován, následně s přidavkem interního standardu důkladně promíchán, centrifugován a 50 µl supernatantu bylo použito k nástřiku do HPLC systému. Celková doba analýzy byla 10 minut. Integrace separovaných frakcí a jejich následná kvantifikace probíhala pomocí softwaru ChemStation. K vyhodnocení bylo použito součtu 25-OH vitamínu D₂ a 25-OH vitamínu D₃.

Veškeré reagentie, které nebyly připraveny k přímému použití, byly připraveny podle pokynů výrobce diagnostického kitu, včetně podmínek uskladnění. Kalibrace metody byla provedena firemním kalibrátorem s definovanou koncentrací 25-OH vitamínu D₂ a 25-OH vitamínu D₃ s každou sérií měřených vzorků. Úspěšnost kalibrace byla ověřena interní kontrolou kvality (Recipe) na dvou koncentračních hladinách. Záznamy z analýz standardu

⁸ Vzorek biologického materiálu pocházející od zemřelého člověka.

a kontrolních materiálů ilustrují Obr. 5, 6 a 7. Souhrnné údaje o HPLC metodě, včetně uvedení retenčních časů (dále jen RT) sumarizuje Tab. 11.

Základní analytické charakteristiky dle firemní dokumentace poskytují velmi uspokojivé výsledky pro opakovatelnost (3 analytické série, 8 měření; CV min. 0,9 % 25-OH vitamin D₂, CV max. 4,8 % 25-OH vitamin D₂, CV min. 0,7 % 25-OH vitamin D₃, CV max. 4,9 % 25-OH vitamin D₃) a mezilehlou preciznost (6 analytických sérií, měření v dubletu; CV 3,0 – 4,9 % 25-OH vitamin D₂, CV 3,1 – 4,7 % 25-OH vitamin D₃).

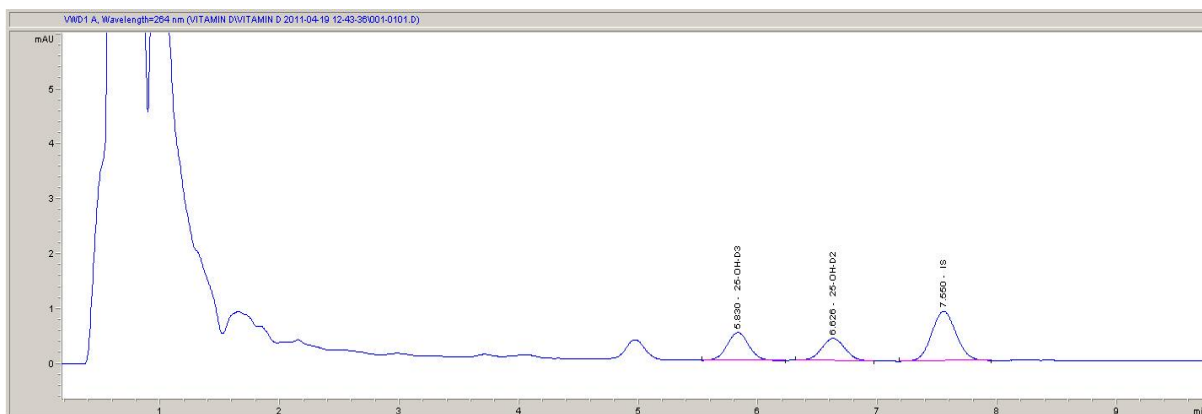
Vzhledem k chromatografickému principu stanovení lze předpokládat minimální vliv interferujících látek, což reflektuje skutečnost, že výrobce diagnostického kitu neuvádí ve své firemní dokumentaci potenciální zdroje variability a/nebo zkřížené reaktivity měření (HPLC Complete Kit 25-OH vitamin D₂/D₃ in plasma and serum, 2010-12, V3, EN).

Tab. 11 Analytické charakteristiky soupravy pro stanovení 25-OH vitaminu D₂/D₃ (Recipe)

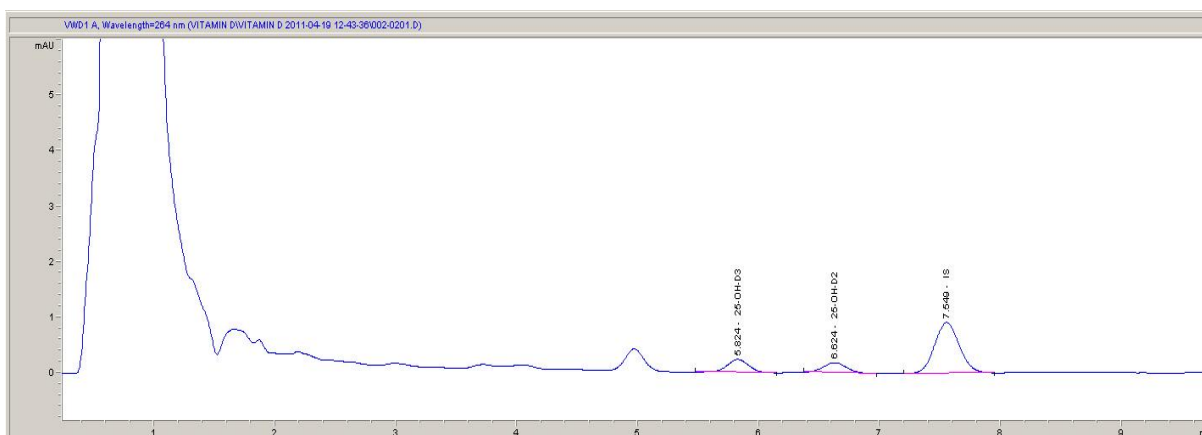
Parametr	
Celkový čas stanovení (min)	10
Specifikace biologického materiálu	sérum, plazma
Objem vzorku (μl)	400
Limit detekce (nmol/l)	2,7 (D ₂), 2,5 (D ₃)
Limit kvantifikace (nmol/l)	7,3 (D ₂); 6,5 (D ₃)
Linearita (nmol/l)	7,3 – 1210 (D ₂); 6,5 – 1250 (D ₃)
RT (min)	5,83 (D ₃), 6,64 (D ₂), 7,45 (IS)
Standardizace	není přesně specifikováno
Analytická specifčnost	vitamin D ₃ : 100 %; vitamin D ₂ : 100 %
Referenční rozmezí podle výrobce (nmol/l)	50 – 175 (platné pro 25-OH vitamin D)

Zdroj: zpracování vlastní podle Recipe

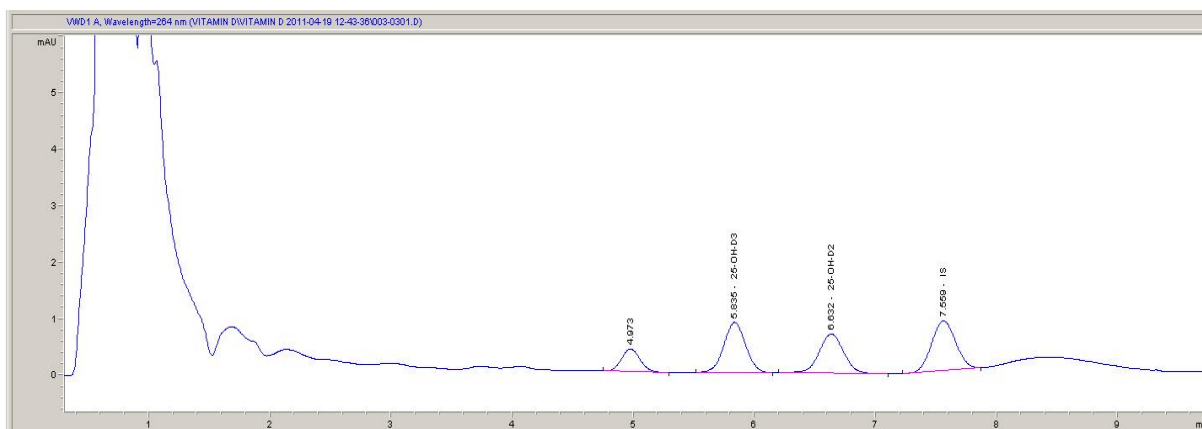
Obr. 5 Chromatogram kalibrátoru firmy Recipe



Obr. 6 Chromatogram kontrolního materiálu firmy Recipe (koncentrační hladina 1)



Obr. 7 Chromatogram kontrolního materiálu firmy Recipe (koncentrační hladina 2)



6 VÝSLEDKY VÝZKUMNÉHO ŠETŘENÍ

Kapitola 6 přináší ucelený přehled výzkumného šetření, včetně individuálních sumárních statistik jednotlivých diagnostických souprav pro kvantitativní stanovení 25-OH vitamínu D v séru a/nebo plazmě. Výsledky výzkumného šetření byly zpracovány souhrnně pro všechny testované diagnostické soupravy, jejíž výsledky sumarizuje Tab. 12 (v případě chromatografické analýzy je uvedena sumární koncentrace D₂ a D₃ 25-OH vitamínu D).

Tab. 12 Výsledky kvantitativního stanovení 25-OH vitamínu D pomocí tří diagnostických souprav v nmol/l

č. vz.	CMIA	HPLC	ECLIA	č. vz.	CMIA	HPLC	ECLIA
1	71	60,2	64,7	29	106,2	115,9	111,8
2	50	74,6	61,3	30	99,3	110	94,8
3	74,9	55,1	60	31	35,3	42,3	26,8
4	40,9	73,4	69,3	32	51,5	60,4	37,1
5	42,8	43,2	47,7	33	70,5	71,8	58,9
6	60,6	67,1	54,2	34	47,6	76,9	46,4
7	135,1	138,9	121	35	70	85,6	64,3
8	30,2	31,1	29,2	36	59,1	62,1	46,1
9	84,1	91	64,5	37	77,6	68,4	49,7
10	55,2	56,9	35,3	38	45	52,7	33,8
11	47,2	43,5	47,5	39	35,6	51,8	36
12	74,1	55,1	48,8	40	61,9	77,5	59,2
13	79,8	100,2	79,7	41	56,9	60	38,8
14	34,5	33,8	30,3	42	41,9	58,7	31,1
15	52,2	77	63,5	43	58,7	75,6	41,9
16	49,4	52,2	41,1	44	74,5	89,1	64,3
17	30,4	47,7	33,1	45	31,7	49,7	26,4
18	50,6	47,1	40,7	46	67,6	82,2	53,6
19	63	90,7	70,4	47	33,2	26,2	17,9
20	68,2	65,4	64,8	48	64,6	66,5	45,5
21	140,6	151,4	102	49	62,5	68,6	34,8
22	82,3	77,8	112,5	50	43	43,9	47,6
23	101,7	135,7	131	51	22,8	27,2	14,1
24	118,1	178,5	154,6	52	55	67,2	40,3
25	83,8	117,5	105,6	53	59,2	53,5	41,5
26	80,3	94,6	93,5	54	23,9	38,5	19,5
27	84	113	99,8	55	59,6	87,6	60,8
28	43,6	93,4	102,5				

Legenda: CMIA – imunochemické stanovení, Abbott Laboratories
 ECLIA – imunochemické stanovení, Roche Diagnostics
 HPLC – separační metoda, Recipe

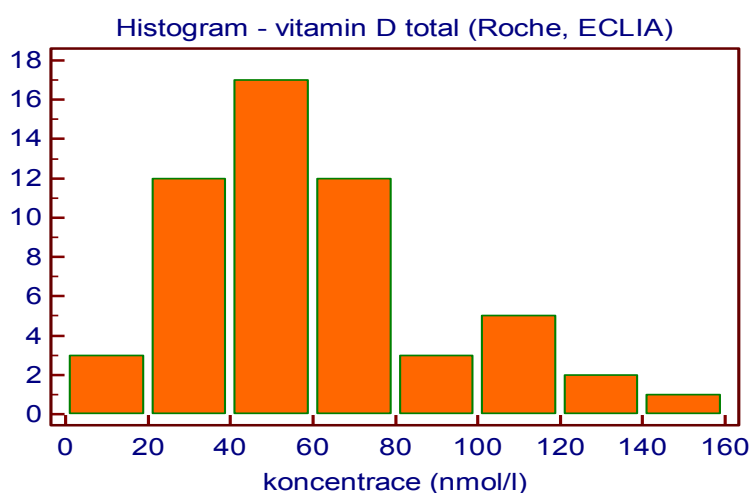
Naměřená data byla statisticky zpracována pomocí softwaru MedCalc verze 15.2.1 (Belgie). Nejprve byly hodnoceny sumární statistiky testovaného souboru pro všechny použité metodiky a reagenční soupravy. Následně byly porovnávány hodnoty 25-OH vitamínu D měřeného imunochemicky s hodnotami 25-OH vitamínu D stanoveného chromatograficky. Konečným krokem bylo porovnání obou imunochemických metod stanovení 25-OH vitamínu D. Pro zjištění statistické významnosti rozdílů průměrů naměřených hodnot v jednotlivých skupinách byl použit Bland-Altmanův rozdílový graf, neparametrická regrese dle Passing Babloka a korelační koeficient. Statistická významnost p byla hodnocena dle Wilcoxonova testu na zvolené hladině významnosti.

6.1 ELECSYS VITAMIN D TOTAL (ROCHE DIAGNOSTICS, ECLIA)

Tab. 13 Sumární statistika stanovení 25-OH vitamínu D (Roche, ECLIA)

Parametr	
Velikost souboru	55
Průměrná koncentrace (nmol/l)	59,5
Medián koncentrace (nmol/l)	49,7
Nejnižší koncentrace (nmol/l)	14,1
Nejvyšší koncentrace (nmol/l)	154,6

Graf 1 Rozložení četnosti koncentrací pro soubor Roche, ECLIA

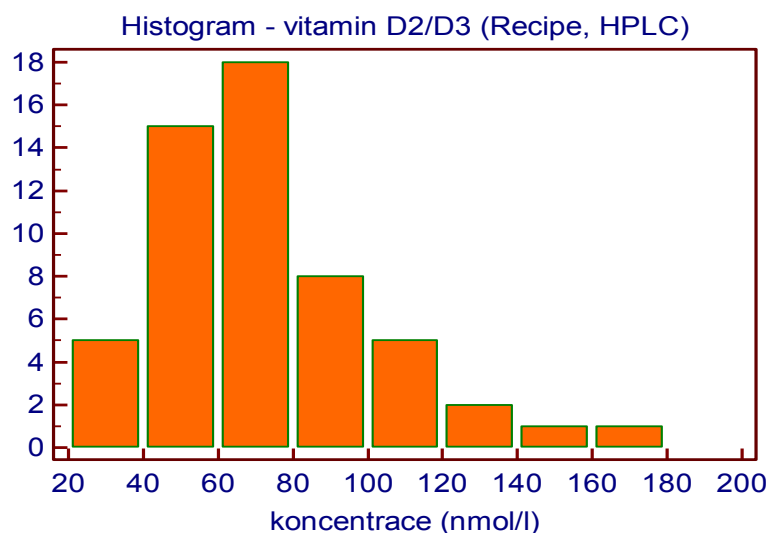


6.2 25-OH VITAMIN D₂/D₃ (RECIPE, HPLC)

Tab. 14 Sumární statistika stanovení 25-OH vitamínu D (Recipe, HPLC)

Parametr	
Velikost souboru	55
Průměrná koncentrace (nmol/l)	73,4
Medián koncentrace (nmol/l)	67,2
Nejnižší koncentrace (nmol/l)	26,2
Nejvyšší koncentrace (nmol/l)	178,5

Graf 2 Rozložení četnosti koncentrací pro soubor Recipe, HPLC

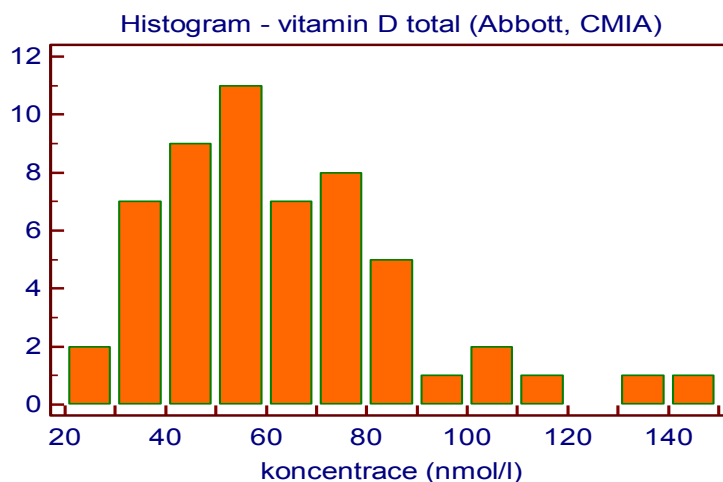


6.3 25-OH VITAMIN D (ABBOTT, CMIA)

Tab. 15 Sumární statistika stanovení 25-OH vitamínu D (Abbott, CMIA)

Parametr	
Velikost souboru	55
Průměrná koncentrace (nmol/l)	62,6
Medián koncentrace (nmol/l)	59,2
Nejnižší koncentrace (nmol/l)	22,8
Nejvyšší koncentrace (nmol/l)	140,6

Graf 3 Rozložení četnosti koncentrací pro soubor Abbott, CMIA

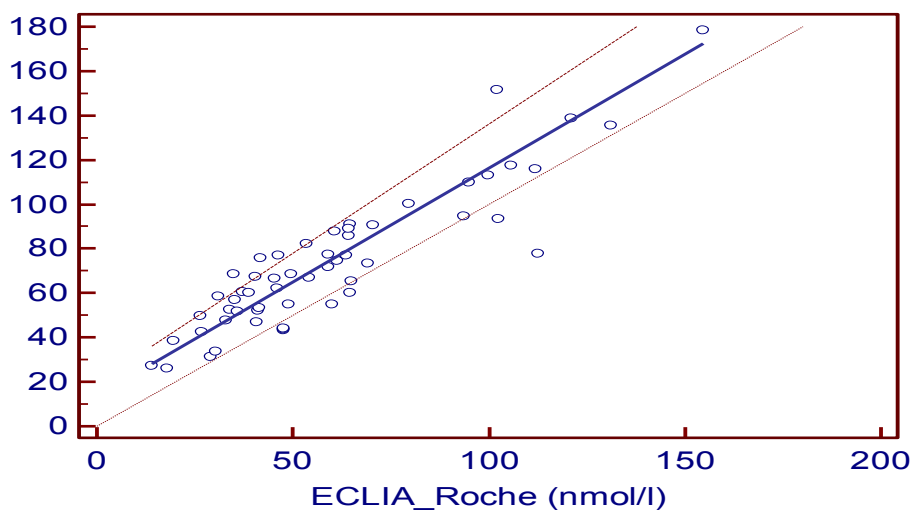


6.4 KORELACE METOD STANOVENÍ 25-OH VITAMINU D

6.4.1 Korelace imunochemické metody stanovení 25-OH vitaminu D (Roche, ECLIA) a chromatografické metody (Recipe, HPLC)

Číselné vyjádření výsledků stanovení a porovnání metod 25-OH vitaminu D použitím imunoanalytické metody Elecsys Vitamin D (Roche) a chromatografické metody (Recipe) bylo provedeno Passing Bablok lineární regresí. Výsledky Passing Bablokovy regrese ukazují významnější rozdíl převážně se vzrůstající koncentrací 25-OH vitaminu D v biologickém materiálu. Číselné vyjádření regrese prezentuje Graf 4. Interval spolehlivosti (95 % CI) směrnice (slope) zahrnoval jedničku a interval spolehlivosti (95 % CI) úseku regresní přímky (intercept) na ose y neobsahoval nulu, z toho vyplývá, že výsledky kvantitativního stanovení jsou systematicky posunuty. Závěry Passing Bablokovy regrese kopíruje rozdílový graf Bland-Altmanův, kde je patrná závislost rozdílů výsledků obou použitých metod. S rostoucí koncentrací 25-OH vitaminu D v krvi se rozdíly výsledků mezi imunoanalytickým a chromatografickým principem stanovení zvyšovaly. Průměrná diference činila + 13,9 nmol/l a v intervalu 1,96 SD je patrný rozptyl hodnot (Graf 5).

Graf 4 Srovnání metod stanovení 25-OH Vitamin D₂/D₃ HPLC (Recipe) a Elecsys Vitamin D total (Roche) pomocí Passing-Bablokovy regrese



Rovnice regresní přímky: $HPLC = 13,75 + 1,026 \cdot ECLIA$

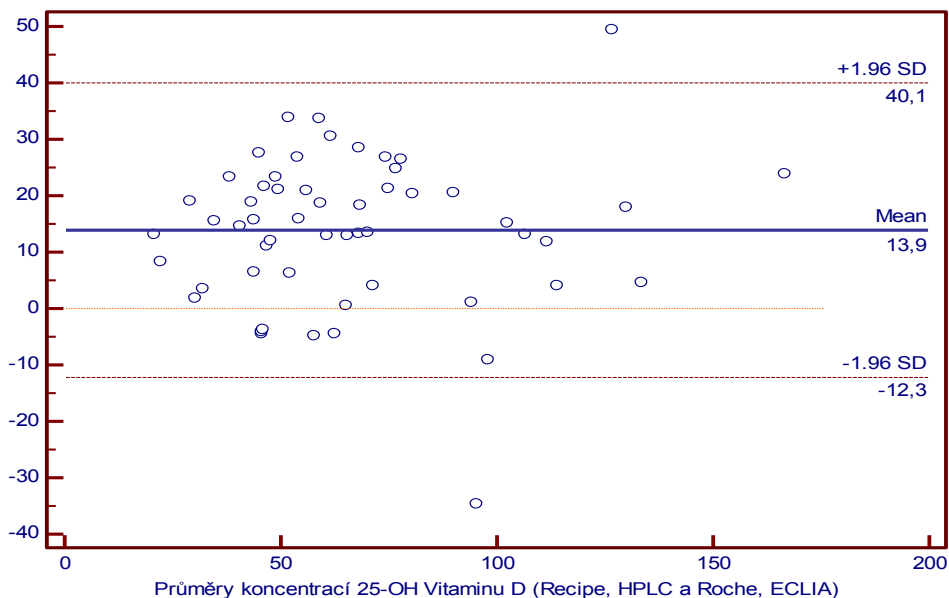
Interval spolehlivosti směrnice: (0,9161 – 1,1627)

Interval spolehlivosti interceptu: (5,3884 – 19, 8697)

Korelační koeficient: 0,908

p: < 0,001

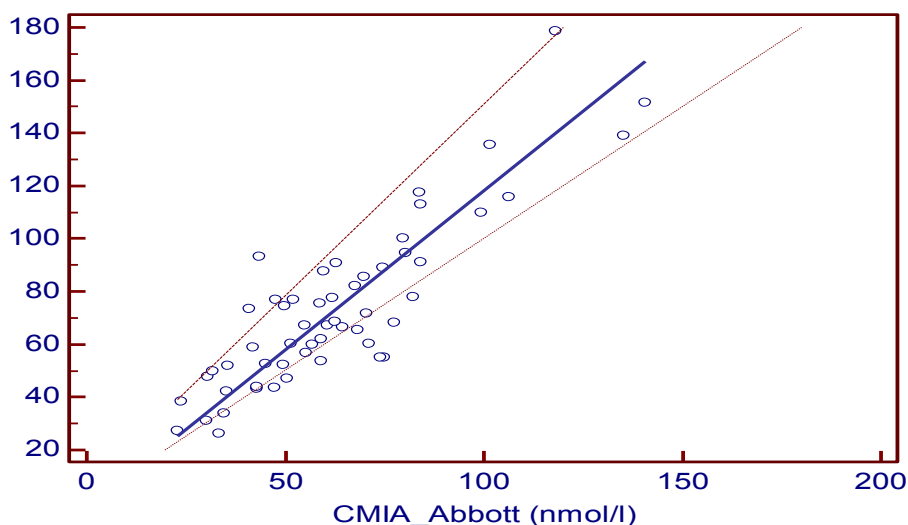
Graf 5 Srovnání metod stanovení 25-OH Vitamin D₂/D₃ HPLC (Recipe) a Elecsys Vitamin D total (Roche) pomocí Bland – Altman analýzy



6.4.2 Korelace imunochemické metody stanovení 25-OH vitamínu D (Abbott, CMIA) a chromatografické metody (Recipe, HPLC)

Korelace imunoanalytické metody stanovení 25-OH vitamínu D využitím metody CMIA (Abbott) a chromatografického stanovení (Recipe) pomocí lineární regrese dle Passing Babloka poskytla obdobné závěry jako předcházející srovnávací studie. Interval spolehlivosti (95 %) směrnice nezahrnuje jedničku a interval spolehlivosti (95 %) úseku regresní přímky na ose y obsahuje nulu (Graf 6). Závěry Passing Bablokovy regrese kopíruje rozdílový graf Bland-Altmanův, kde je patrná závislost rozdílů výsledků obou použitých metod. S rostoucí koncentrací 25-OH vitamínu D v krvi se rozdíly výsledků mezi imunoanalytickým a chromatografickým principem stanovení zvyšovaly. Jednotlivé rozdíly jsou statisticky významné dle hodnoty významnosti p korelačního koeficientu. Průměrná diference činila + 10,8 nmol/l a v intervalu 1,96 SD je patrný rozptyl hodnot (Graf 7).

Graf 6 Srovnání metod stanovení 25-OH Vitamin D₂/D₃ HPLC (Recipe) a 25-OH Vitamin D (Abbott) pomocí Passing-Bablokovy regrese



Rovnice regresní přímky: $HPLC = - 2,088 + 1,204 \cdot CMIA$

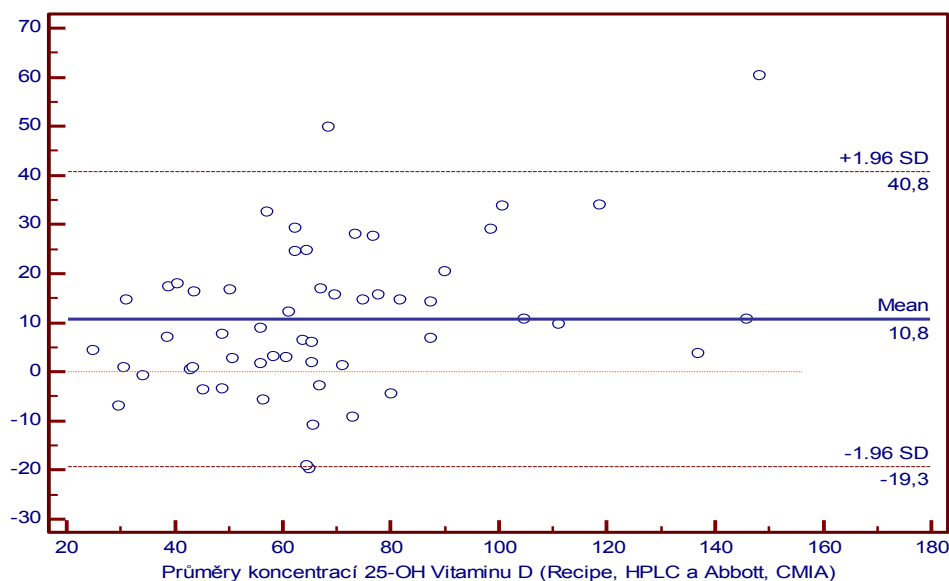
Interval spolehlivosti směrnice: (1,0325 – 1,4479)

Interval spolehlivosti interceptu: (-16,1543 – 6,2379)

Korelační koeficient: 0,874

$p: < 0,001$

Graf 7 Srovnání metod stanovení 25-OH Vitamin D₂/D₃ HPLC (Recipe) a 25-OH Vitamin D (Abbott) pomocí Bland – Altman analýzy

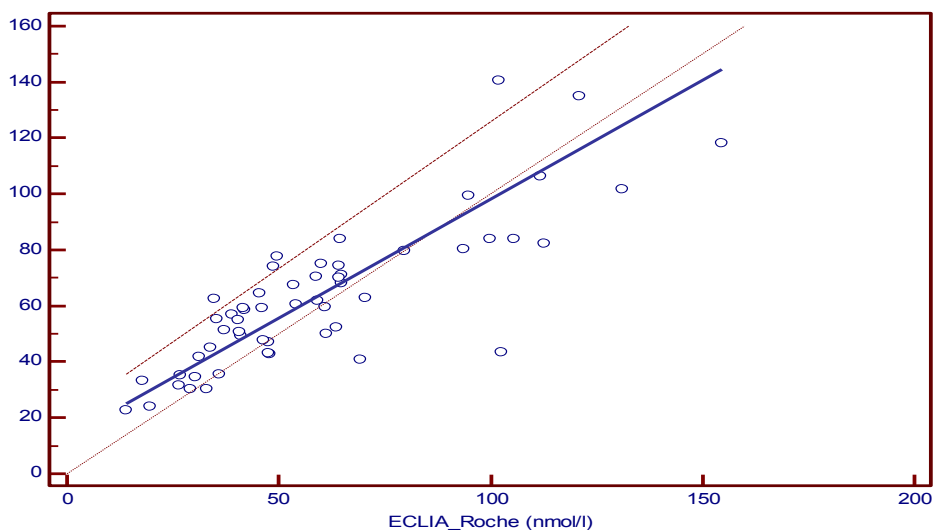


6.4.3 Korelace imunochemických metod stanovení 25-OH vitaminu D Abbott, CMIA a Roche, ECLIA

Porovnáním dvou metod stanovení 25-OH vitaminu D s využitím imunoanalytického principu byl očekáván nevýznamný rozdíl mezi metodami. Vzhledem k aspektům uvedeným v kapitole 4 Externí hodnocení kvality se zaměřením na stanovení vitaminu D, však metody poskytly uspokojivé výsledky. Závěry Passingovy Bablokovy regrese signalizují menší shodu výsledků imunoanalytického stanovení 25-OH vitaminu D z analyzátorů Elecsys a Architect, a to zejména v oblasti koncentrací > 70,0 nmol/l (Graf 8). Interval spolehlivosti (95 % CI) směrnice zahrnuje 1 a interval spolehlivosti (95 % CI) úseku na ose y neobsahuje 0, korelační koeficient byl ze všech porovnávaných nejnižší ($r = 0,825$). Přesto je patrný lineární trend, kdy modrá čára imituje regresní přímku, od níž se nepatrně odchyluje přerušovaná čára shody. Bland – Altmanův rozdílový graf nevykazuje dobrou shodu výsledků stanovení obou imunoanalytických metod při vyšších koncentracích 25-OH vitaminu D v krvi. Průměrná diference činila pouze + 3,1 nmol/l, ale v intervalu 1,96 SD je patrný rozptyl hodnot (Graf 9). Korelace imunoanalytických metod poskytuje zajímavé zjištění. Metoda 25-OH vitaminu D (Abbott) vykazuje vyšší naměřené hodnoty vitaminu D oproti Vitaminu D total (Roche) v oblasti koncentrací < 70,0 nmol/l a naopak, metodika Roche poskytuje při vyšších

koncentracích vitamínu D v krevní cirkulaci vyšší výsledky. Vzhledem k velikosti testovaného souboru, nelze výsledky šetření obecně implementovat.

Graf 8 Srovnání imunochemických metod stanovení 25-OH Vitamin D total Roche a Abbott pomocí Passing-Bablokovy regrese



Rovnice regresní přímky: $CMIA = 13,173 + 0,849 \cdot ECLIA$

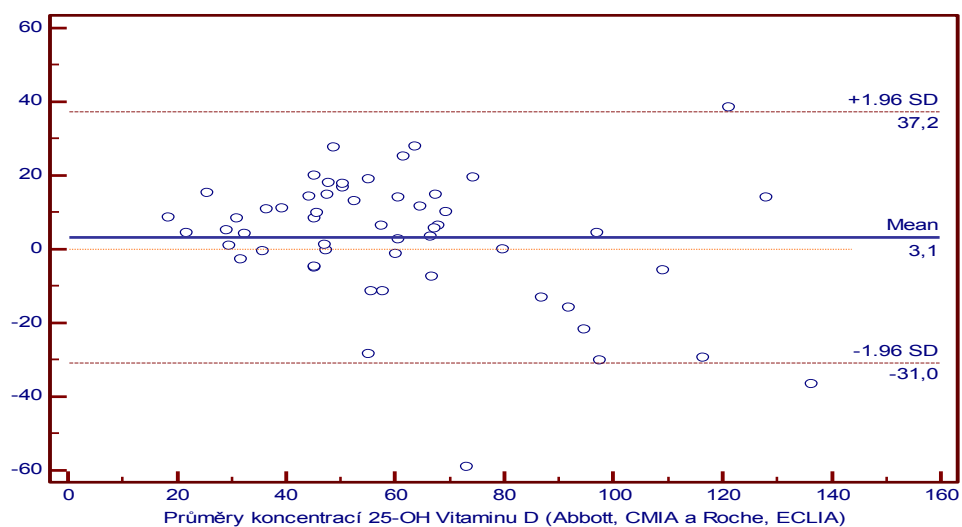
Interval spolehlivosti směrnice: (0,7036 – 1,0506)

Interval spolehlivosti interceptu: (3,4140 – 20,605)

Korelační koeficient: 0,825

$p = 0,03$

Graf 9 Srovnání imunochemických metod stanovení 25-OH Vitamin D total Roche a Abbott pomocí Bland – Altman analýzy



7 DISKUSE

Cílem práce bylo zjistit úroveň analytické kvality měření v podmínkách privátní klinické laboratoře pro kvantitativní stanovení 25-OH vitamínu D v biologickém materiálu. Ukazatelem úrovně analytické kvality stanovení sloužily tři diagnostické soupravy odlišných výrobců pro stanovení 25-OH vitamínu D v séru a/nebo plazmě, dva pracující na principu imunochemického stanovení (Roche Diagnostics, Abbott Laboratories) a jednoho pracujícího na separačním principu (Recipe).

Koncentrace vitamínu D ve všech analyzovaných vzorcích séra se pohybovaly v rozsahu kalibračních křivek. Ke kalibraci metod sloužily firemní kalibrátory a kalibrace proběhly podle doporučení výrobců diagnostických souprav. Kalibrace byla provedena vždy při změně šarže reagensů a/nebo při nevyhovující odezvě v procesu interní kontroly kvality. K ověření správnosti metody byl použit firemní kontrolní materiál na dvou, popř. třech koncentračních hladinách. Deklarované hodnoty firemních kontrol byly vyznačeny v příbalovém letáku a automaticky nebo manuálně zadané do softwaru příslušného analyzátoru. Kontrola kvality byla stanovována denně, vždy na počátku dne, při výměně reagensů a po servisním zásahu. Výsledky kvantitativního stanovení 25-OH vitamínu D byly automaticky měřeny softwarem příslušného analyzátoru porovnáním sledovaného signálu získaného ze vzorku s hodnotou získanou kalibrací metod.

Výsledky všech stanovení prezentuje Tab. 12. Tabulky 13, 14 a 15 uvádí základní statistické ukazatele pro výsledky získané rozdílnými diagnostickými soupravami pro stanovení 25-OH vitamínu D v biologickém materiálu pro klinické účely. Z nich jsou patrné rozdíly v nalezených koncentracích, daných průměrnou hodnotou a/nebo mediánem v nmol/l. Nejnížší výsledky stanovení vitamínu D poskytovala metoda ECLIA - Roche Diagnostics, imunochemický princip stanovení (Tab. 13), naopak nejvyšší výsledky poskytovala separační metoda – Recipe (Tab. 14).

Výsledky srovnání jsou prezentovány formou grafů, které poskytují vhodnější nástroj pro interpretaci statistických dat (Graf 1-9), kde jsou aplikovány párové porovnání dvou výběrů regresní analýzou a párové porovnání dvou výběrů pomocí Bland-Altmanových grafů, statistická významnost p byla hodnocena podle Wilcoxonova testu (Hendl, 2009; Zvárová, 2011). Výsledky lineární korelace (Passing Bablok) obou imunochemických metod vs. separační stanovení vykazují uspokojivou lineární závislost $r = 0,908$ (ECLIA vs. HPLC), resp. $r = 0,874$ (CMIA vs. HPLC), ale diferenční grafy dle Bland-Altman analýzy vykazovaly

výraznou průměrnou diferencí + 13,9 nmol/l (ECLIA vs. HLPC), příp. + 10,8 nmol/l (CMIA vs. HPLC). Jednotlivé rozdíly vykazují proporcionální chybu, která je statisticky významná dle hodnoty p. Korelace dvou imunochemických diagnostických souprav rozdílných výrobců neposkytla zcela uspokojivé výsledky, lineární korelace mírně uspokojivá $r = 0,825$, přesto diferenční graf dle Bland-Altman analýzy vykazoval nevýraznou průměrnou diferencí + 3,1 nmol/l a rozptyl hodnot v intervalu 1,96 SD při vyšších koncentracích 25-OH vitamínu D. Tento efekt byl také pozorován u dvou předcházejících skupin.

Interpretace naměřených dat testovaného souboru není zcela jednoduchá. Nezanedbatelným aspektem je velikost testovaného souboru a taktéž rozložení četností koncentrací 25-OH vitamínu D v měřených vzorcích. Vzhledem k ročnímu období, kdy byl proveden odběr biologického materiálu (září-listopad) je převážná vzorků v kategorii nedostatečné saturace vitamínem D.

Literární zdroje poskytují dostatek informací o průběhu srovnání běžně dostupných diagnostických souprav pro stanovení 25-OH vitamínu D v séru a/nebo plazmě v ČR, z nichž některé jsou předmětem závěrečných prací pregraduálního vzdělávání. Za významnou lze považovat práci Šojdra (2014), který prezentuje výsledky srovnání imunoanalytické metody Elecsys Vitamin D total a kandidátní referenční metody HPLC MS/MS u pediatrické populace. Přesto, že autor uvádí dobrou srovnatelnost metod, statistická data opětovně vykazují výrazné difference mezi metodami při zvyšující se koncentrace 25-OH vitamínu D v biologickém materiálu. Práce Klapkové et al. (2014) se zaměřuje na srovnání stanovení vitamínu D u postmenopauzálních žen s prokázanou osteoporózou a bez postižení skeletu. Autoři ke stanovení použili HPLC kit Recipe a 25-OH Vitamin D (Abbott, imunoanalytický princip). Klapková (2014) uvádí statisticky významný rozdíl mezi metodami stanovení, přičemž předpoklad autorky byl naměření vyšších koncentrací 25-OH vitamínu D pomocí imunoanalytické metody (Abbott, CMIA), přesto závěry tohoto šetření bylo zcela opačné. Naměřená data Klapkové zcela kopírují závěry předkládané rigorózní práce, přesto že výběr testovaného souboru byl k této práci zcela náhodný a převažující nedostatečná saturace organismu vitamínem D je rovněž pozorována. Za zmínku stojí taktéž práce Bartoše, Švagery a Šafarčíka (2011), kteří testovali srovnatelnost RIA metody (DiaSorin) pro stanovení 25-OH vitamínu D a již zmiňovaného imunochemického stanovení Elecsys Vitamin D total (Roche) na souboru 42 vzorků. Autoři prezentují uspokojivou srovnatelnost obou metod, přesto upozorňují, že „...*problematickou může být oblast vyšších koncentrací vitamínu D, při*

kterých lze ze srovnání výsledků usuzovat na možný rozdíl mezi oběma metodami s tendencí poskytování nižších výsledků metodou Elecsys Vitamin D total...“ (Bartoš, Švagera a Šafarčík, 2011, s. 29).

8 ZÁVĚR

Vitamin D je souhrnným názvem pro cholekalciferol (vitamin D₃) a ergokalciferol (vitamin D₂), což jsou biologicky inertní prekurzory hormonálně aktivní formy – kalcitriolu, 1,25-(OH)₂ vitaminu D, tato vzniklá komponenta představuje důležitou látku pro regulaci homeostázy kalcia a fosfátů v organismu.

Počtu nedostatečně saturovaných jedinců vitaminem D v populaci neustále narůstá, přičemž pravděpodobnost hypovitaminózy D se zvyšuje s věkem, u žen je výskyt častější než u mužů. S deficitem a/nebo nedostatečnou saturací organismu vitaminem D je spojena řada patologických procesů, převážně s nedostatečnou mineralizací skeletu.

Pro laboratorní diagnostiku monitorování hladiny vitaminu D v krevní cirkulaci dominují imunoanalytické a chromatografické metody stanovení. Imunoanalytické metody stanovení nabízejí časově nenáročné a dostupné vyšetření pro většinu rutinních laboratoří v České republice. Interpretace laboratorního vyšetření však vyžaduje znalost potenciálních interferencí a limitace imunoanalytického stanovení, včetně důkladné znalosti měřené veličiny, tedy stanovovaného analytu (D₂, D₃ formy vitaminu D, příp. jejich sumární koncentraci). Limitace, způsobující výrazné diference mezi výrobci diagnostických souprav pro stanovení vitaminu D u imunoanalytických metod, nejsou u chromatografických technik pozorovány. Určitým omezením je delší čas analýzy, nutná předpříprava vzorku před vlastním stanovením, vysoké pořizovací i provozní náklady a nutnost erudice interpretačního pracovníka.

Porovnání metod stanovení přineslo mnohá zjištění, která mohou být nápomocna při výběru vhodné analytické metody pro rutinní používání, a která mohou mít přímý dopad na klinickou interpretaci výsledků. Nedostatečná standardizace měření vitaminu D v biologickém materiálu je příčinou systematické diference a vysoké mezilaboratorní variability mezi použitými diagnostickými soupravami různých výrobců. Tyto diference jsou opakovaně publikovány v recentních studiích tuzemských a převážně zahraničních autorů a potvrzují je také závěry externího hodnocení kvality tuzemského organizátora a/nebo zahraničních organizátorů. Shrnutím výsledků výzkumného šetření zaměřeného na kvantitativní stanovení 25-OH vitaminu D v séru a/nebo plazmě je nutné opakovat vyjádření Friedeckého a Vávrové (2012a): „ *Na otázku, položenou na počátku konjunktury měření vitaminu D, zda jsou klinické laboratoře dostatečně připraveny na kvalitní stanovení vitaminu*

D nelze zatím odpovědět kladně.“ (Friedecký a Vávrová, 2012a, s. 175). Pro testovaný analyt a klinickou interpretaci výsledků stanovení je nutné monitorování jeho hladiny v jedné laboratoři na totožném přístroji.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BAYER, M., Š. KUTÍLEK et al. 2002. *Metabolická onemocnění skeletu u dětí*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2002. 338 s. ISBN 80-247-0235-5.

BLAHOŠ, Jaroslav. 2011. Aktuální a budoucí možnosti léčby osteoporózy. In: *Vnitřní lékařství*. 2011, č. 57 (11), s. 888-890. ISSN 0042-773X.

BRUNOVÁ, Jana a Josef BRUNA. 2009. *Klinická endokrinologie a zobrazovací diagnostika endokrinopatií*. Praha: Maxdorf, 2009. 456 s. ISBN 978-80-7345-190-5.

BUČKOVÁ, Dana et al. 2013. Intoxikace vitamínem D – kazuistika. In: *Klinická biochemie a metabolismus*. 2013, č. 3, s. 133-134. ISSN 1270-7921.

CARTER, Graham. 2012. 25-Hydroxyvitamin D: A Difficult Analyte In: *Clinical Chemistry*. 2012, n. 3 (58), p. 486 – 488. ISSN 0009-9147.

ČEPOVÁ, Jana. 2012. Vitamin D ve zdraví a v nemoci. In: *Labor Aktuell*. 2012, č. 2, s. 24-27. ISSN 1214-7672. Dostupné též z:

http://roche-diagnostics.cz/LaborAktuell/LA2012/Documents/LA0212/VitaminD_primCepova.pdf

DORČÁKOVÁ, Jana a Jaroslava LUNTEROVÁ. 2009. Osteoporóza – tichý zloděj kostí. In: *Florence*. 2009, č. 9, s. 26 - 28. ISSN 1801-464X.

DUSILOVÁ SULKOVÁ, Sylvie. 2012. Metabolismus vitamínu D a současné možnosti terapeutické aktivace receptoru pro vitamin D při chronickém onemocnění a selhání ledvin. In: *Vnitřní lékařství*. 2012, č. 58 (11), s. 839 - 849. ISSN 0042-773X.

DUSILOVÁ SULKOVÁ, Sylvie. 2011. Kostní choroba u chronického selhání ledvin a její moderní terapie. In: *Vnitřní lékařství*. 2011, č. 57 (7,8), s. 620 - 625. ISSN 0042-773X.

FARRELL, Christopher et al. 2012. State-of-the-Art Vitamin D Assays: A Comparison of Automated Immunoassays with Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Methods. In: *Clinical Chemistry*. 2012, n. 3 (58), p. 531 – 542. ISSN 0009-9147.

FRIEDECKÝ, Bedřich a Jaroslava VÁVROVÁ. 2016. Aktualizace poznatků o stavu měření 25-hydroxyvitaminu D v séru/plasmě. Minireview 2015 – 2016. In: *Klinická biochemie a metabolismus*. 2016, č. 1, s. 10 - 13. ISSN 1270-7921.

FRIEDECKÝ, Bedřich a Jaroslava VÁVROVÁ. 2014. Standardizace 25-hydroxyvitaminu D-VDSP (Vitamin D Standardization Program). In: *FONS*. 2014, č. 4 (24), s. 18 - 19. ISSN 1211-7137.

FRIEDECKÝ, Bedřich a Jaroslava VÁVROVÁ. 2012a. Současný stav stanovení vitaminu D v séru. In: *Klinická biochemie a metabolismus*. 2012, č. 3, s. 174 - 178. ISSN 1270-7921.

FRIEDECKÝ, Bedřich a Jaroslava VÁVROVÁ. 2012b. Zpráva o srovnatelnosti, standardizaci a hodnocení výsledků vitaminu D. In: *FONS: informační bulletin*. 2012, č. 1, s. 12 - 15. ISSN 1211-7137.

FRIEDECKÝ, Bedřich a Jaroslava VÁVROVÁ. 2011. Stanovení 25-hydroxyvitaminu D v séru/plasmě – minireview. In: *Klinická biochemie a metabolismus*. 2011, č. 3, s. 149 - 154. ISSN 1270-7921.

HENDL, Jan. 2009. *Přehled statistických metod: analýza a metaanalýza dat*. 3., přeprac. vyd. Praha: Portál, 2009. 695 s. ISBN 978-80-7367-482-3.

HLÚBIK, Pavel a Libuše OPLTOVÁ. 2004. *Vitaminy*. Praha: Grada Publishing, 2004. 232 s. ISBN 80-247-0373-4.

HULEJOVÁ, H., I. MAŘÍK a O. MAŘÍKOVÁ. 2005. Biochemické monitorování kostních onemocnění v klinické praxi: průměrné hodnoty kostní alkalické fosfatázy, osteokalcinu a 25 OH-vitaminu D u dětí v České republice. In: *Pohybové ústrojí*. 2005, č. 1, 2, s. 62 - 76. ISSN 1212-4575.

JENŠOVSKÝ, Jiří. 2013. Osteoporóza u mužů. In: *Interní medicína*. 2013, č. 15 (1), s. 15 - 17. ISSN 1212-7299.

KALVACHOVÁ, Božena. 2012. Endokrinní mikrosystémy kalcitriolu – vývojové aspekty a předpoklady jejich celoživotní funkčnosti. In: *Vnitřní lékařství*. 2012, č. 58 (5), s. 396 - 399. ISSN 0042-773X.

- KAZDA, Antonín et al. 2012. *Kritické stavy: metabolická a laboratorní problematika*. 1. vyd. Praha: Galén, 2012. 346 s. ISBN 978-80-7262-763-9.
- KLAPKOVÁ, Eva et al. 2012. Stanovení 25-hydroxyvitaminu D u postmenopauzálních žen a porovnání imunochemického a chromatografického stanovení. In: *FONS*. 2012, č. 4 (24), s. 7 - 9. ISSN 1211-7137.
- KULDA, Vlastimil. 2012. Metabolismus vitaminu D. In: *Vnitřní lékařství*. 2012, č. 58 (5), s. 400 - 404. ISSN 0042-773X.
- LINHARTOVÁ, K., G. ŠTĚRBÁKOVÁ a R. ČERMÁK. 2012. Vitamin D a aortální stenóza. In: *Vnitřní lékařství*. 2012, č. 58 (5), s. 390 - 392. ISSN 0042-773X.
- MATĚJOVSKÁ KUBEŠOVÁ, Hana et al. 2012. Vitamin D – připomínka známých a přehled méně známých skutečností. In: *Vnitřní lékařství*. 2012, č. 58 (3), s. 196 - 201. ISSN 0042-773X.
- MAYER, Otto. 2012. Vitamin D a riziko kardiovaskulárních chorob. In: *Vnitřní lékařství*. 2012, č. 58 (5), s. 386 - 389. ISSN 0042-773X.
- MURRAY, Robert K. et al. 2012. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. vyd. Praha: Galén, c2012. 730 s. ISBN 978-80-7262-907-7.
- ONG, Lizhen et al. 2012. Current 25-OH vitamin D assays: Do they pass the test? In: *Clinica Chimica Acta*. 2012, n. 413, p. 1127 – 1134. ISSN 0009-8981.
- PEŠTA, Martin. 2012. Polymorfismus genu pro receptor vitaminu D. In: *Vnitřní lékařství*. 2012, č. 58 (5), s. 381 - 385. ISSN 0042-773X.
- POLÍVKA, Jiří et al. 2012. Vitamin D a neurologická onemocnění. In: *Vnitřní lékařství*. 2012, č. 58 (5), s. 393 - 395. ISSN 0042-773X.
- SEIDL Zdeněk a Jiří OBENBERGER. 2004. *Neurologie pro studium i praxi*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004. 364 s. ISBN 80-247-0623-7.
- SOUČEK, Miroslav et al. 2011. *Vnitřní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2011. 1577 s. ISBN 978-80-247-2110-1.

SOTORNÍK, I., Š. KUTÍLEK. 2011. *Kostní minerály a skelet při chronickém onemocnění ledvin*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011. 407 s. ISBN 978-80-7262-769-1.

ŠVAČINA, Štěpán et al. 2010. *Poruchy metabolismu a výživy*. 1. vyd. Praha: Galén, 2010. 503 s. ISBN 978-80-7262-676-2.

ŠOJDR, Václav. 2014. *Srovnání dvou metod stanovení vitamínu D v krevním séru*. Olomouc, 2014. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Fakulta přírodovědecká, Katedra organické chemie.

STEPMAN, Hedwig et al. 2011. Candidate Reference Measurement Procedures for Serum 25-Hydroxyvitamin D₃ and 25-Hydroxyvitamin D₂ by Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. In: *Clinical Chemistry*. 2011, n. 3 (57), p. 441 – 448. ISSN 0009-9147.

ŠTERZL, Ivan. 2012. D vitamin a imunita. In: *Vnitřní lékařství*. 2012, č. 58 (5), s. 405 - 410. ISSN 0042-773X.

TAI, S. S., M. BEDNER a PHINEY, K. W. 2010. Development of a Candidate Reference Measurement Procedure for the Determination of 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ in Human Serum Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. In: *Analytical Chemistry*. 2010, n. 5 (82), p. 1942 – 1948. ISSN 0003-2700.

TESAŘ, V., O. SCHUCK et al. 2006. *Klinická nefrologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2006. 650 s. ISBN 80-247-0503-6.

TOPINKOVÁ, Eva. 2006. *Obrazový atlas chorobných stavů: diferenciální diagnostika*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2006. 346 s. ISBN 80-247-1670-4.

ÚZIS. 2013. *Hospitalizovaní v nemocnicích ČR 2012*. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2013. 160 s. ISBN 1803-0130. Dostupné z:

<http://www.uzis.cz/publikace/hospitalizovani-nemocnicich-cr-2012>

VÁVROVÁ, Jaroslava et al. 2007. *Vitamíny a stopové prvky*. 1. vyd. Pardubice: SEKK, 2007. 155 s. ISBN 978-80-254-1171-1.

- VONDRA, K., O. TOPOLČAN a D. JANÍČKOVÁ ŽĎÁRSKÁ. 2012. Stane se vitamin D novým antidiabetikem? In: *Vnitřní lékařství*. 2012, č. 58 (5), s. 411 - 416. ISSN 0042-773X.
- VYSKOČIL, Václav. 2010. Současné možnosti léčby osteoporózy. In: *Vnitřní lékařství*. 2010, č. 56 (7), s. 749 - 758. ISSN 0042-773X.
- ZADÁK, Z., J., KVĚTINA et al. 2011. *Metodologie předklinického a klinického výzkumu v metabolismu, výživě, imunologii a farmakologii*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011. 333 s. ISBN 978-80-7262-748-6.
- ZAMRAZIL, Václav. 2012. Význam vitaminu D – nové poznatky, které svědčí o jeho úloze v medicíně. In: *Vnitřní lékařství*. 2012, č. 58 (5), s. 379 - 380. ISSN 0042-773X.
- ZAMRAZIL, V., T. PELIKÁNOVÁ et al. 2007. *Akutní stavy v endokrinologii a diabetologii*. 1. vyd. Praha: Galén, 2007. 177 s. ISBN 978-80-7262-478-2.
- ZDRAŽILOVÁ – DUBSKÁ, Lenka et al. 2012. *Laboratorní diagnostika v onkologii*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, 2012. ISBN 978-80-210-5855-2.
- ZIMA, Tomáš. 2010. Laboratorní diagnostika a endokrinologie. In: *Vnitřní lékařství*. 2010, č. 56 (7), s. 771 - 773. ISSN 0042-773X.
- ZIMA, Tomáš et al. 2007. *Laboratorní diagnostika*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007. 906 s. ISBN 978-80-7262-372-3.
- ZVÁROVÁ, Jana. 2011. *Základy statistiky pro biomedicínské obory I*. 2., dopln. vyd. Praha: Karolinum, 2011. 219 s. ISBN 978-80-246-1931-6.
- ŽOFKOVÁ, Ivana. 2013. Léky indukovaná osteoporóza. In: *Vnitřní lékařství*. 2013, č. 59 (1), s. 59 - 63. ISSN 0042-773X.
- ŽOFKOVÁ, Ivana. 2012. *Osteologie a kalcium-fosfátový metabolismus: aktuální témata*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2012. 142 s. ISBN 978-80-247-3919-9.
- ŽOFKOVÁ, Ivana. 2011. Význam genetiky v predikci rizika osteoporózy. In: *Vnitřní lékařství*. 2011, č. 57 (1), s. 78 - 84. ISSN 0042-773X.

Elektronické zdroje

NIH. 2011. Vitamin D: Fact Sheet for Health Professionals. [online]. Rockville Pike USA: NIH, 2011 [cit. 2014-05-28]. Dostupné z:

<http://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD-HealthProfessional/>

SEKK. 2009. *Komentář k vyhodnocení kontrolního cyklu BM/09 – Kostní markery*. [online]. Pardubice: SEKK, 2009 [cit. 2014-05-26]. Dostupné z:

www.sekk.cz

SEKK. 2010a. *Komentář k vyhodnocení kontrolního cyklu BM1/10 – Kostní markery*. [online]. Pardubice: SEKK, 2010 [cit. 2014-05-26]. Dostupné z:

www.sekk.cz

SEKK. 2010b. *Komentář k vyhodnocení kontrolního cyklu BM2/10 – Kostní markery*. [online]. Pardubice: SEKK, 2010 [cit. 2014-05-26]. Dostupné z:

www.sekk.cz

SEKK. 2011a. *Komentář k vyhodnocení kontrolního cyklu BM1/11 – Kostní markery*. [online]. Pardubice: SEKK, 2011 [cit. 2014-05-26]. Dostupné z:

www.sekk.cz

SEKK. 2011b. *Komentář k vyhodnocení kontrolního cyklu BM2/11 – Kostní markery*. [online]. Pardubice: SEKK, 2011 [cit. 2014-05-26]. Dostupné z:

www.sekk.cz

SEKK. 2012a. *Komentář k vyhodnocení kontrolního cyklu BM1/12 – Kostní markery*. [online]. Pardubice: SEKK, 2012 [cit. 2014-05-26]. Dostupné z:

www.sekk.cz

SEKK. 2012b. *Komentář k vyhodnocení kontrolního cyklu BM2/12 – Kostní markery*. [online]. Pardubice: SEKK, 2012 [cit. 2014-05-26]. Dostupné z:

www.sekk.cz

SEKK. 2013a. *Příručka kvality: příloha č. 5.01.1.1*. [online]. Pardubice: SEKK, 2013 [cit. 2014-05-26]. Dostupné z:

www.sekk.cz

SEKK. 2013b. *Komentář k vyhodnocení kontrolního cyklu BM1/13 – Kostní markery*. [online]. Pardubice: SEKK, 2013 [cit. 2014-05-26]. Dostupné z:

www.sekk.cz

SEKK. 2013c. *Komentář k vyhodnocení kontrolního cyklu BM2/13 – Kostní markery*. [online]. Pardubice: SEKK, 2013 [cit. 2014-05-26]. Dostupné z:

www.sekk.cz

SEKK. 2014a. *Zprávy pro účastníky EHK*. [online]. Pardubice: SEKK, 2014 [cit. 2014-05-25]. Dostupné z:

www.sekk.cz

SEKK. 2014b. *Komentář k vyhodnocení kontrolního cyklu BM1/14 – Kostní markery*. [online]. Pardubice: SEKK, 2014 [cit. 2014-05-26]. Dostupné z:

www.sekk.cz

SEKK. 2014c. *Komentář k vyhodnocení kontrolního cyklu BM2/14 – Kostní markery*. [online]. Pardubice: SEKK, 2014 [cit. 2015-01-26]. Dostupné z:

www.sekk.cz

SEKK. 2015a. *Komentář k vyhodnocení kontrolního cyklu BM1/15 – Kostní markery*. [online]. Pardubice: SEKK, 2015 [cit. 2015-02-23]. Dostupné z:

www.sekk.cz

SEKK. 2015b. *Komentář k vyhodnocení kontrolního cyklu BM2/15 – Kostní markery*. [online]. Pardubice: SEKK, 2015 [cit. 2016-03-23]. Dostupné z:

www.sekk.cz

SEKK. 2016. *Komentář k vyhodnocení kontrolního cyklu BM1/16 – Kostní markery*. [online]. Pardubice: SEKK, 2016 [cit. 2016-03-23]. Dostupné z:

www.sekk.cz

Seznam obrázků

Obr. 1 Biosyntéza vitamínu D	15
Obr. 2 Metabolismus vitamínu D	18
Obr. 3 Doporučený algoritmus vyšetření u nemocných s podezřením na osteopatii	22
Obr. 4 Princip stanovení Vitamin D total (Roche)	45
Obr. 5 Chromatogram kalibrátoru firmy Recipe	49
Obr. 6 Chromatogram kontrolního materiálu firmy Recipe (koncentrační hladina 1)	49
Obr. 7 Chromatogram kontrolního materiálu firmy Recipe (koncentrační hladina 2)	49

Seznam tabulek

Tab. 1 Klasifikace, biomedicínský význam a symptomy deficitu vitaminů.....	12
Tab. 2 Hlavní biochemické markery v laboratorní diagnostice osteopatie.....	24
Tab. 3 Hlavní rizikové faktory vzniku osteomalacie (rachitidy).....	26
Tab. 4 Sumarizace výsledků EHK SEKK spol. s r. o. pro analyt 25-OH vitamin D.....	37
Tab. 5 Souhrnná statistika výsledků EHK SEKK spol. s r. o. pro analyt 25-OH vitamin D a kvantitativní výsledky.....	39
Tab. 6 Sumarizace výsledků EHK SEKK spol. s r. o. pro různé výrobce diagnostických souprav a analyt 25-OH vitamin D v nmol/l.....	40
Tab. 7 Hodnocení stavu saturace organismu podle koncentrace 25-OH vitaminu D.....	41
Tab. 8 Zahraniční kontrolní cyklus DEQAS pro analyt 25-OH vitamin D, přehled celkových mezilaboratorních reprodukovatelností.....	41
Tab. 9 Analytické charakteristiky soupravy pro stanovení celkového vitaminu D (Roche Diagnostics).....	45
Tab. 10 Analytické charakteristiky soupravy pro stanovení 25-OH vitaminu D (Abbott).....	46
Tab. 11 Analytické charakteristiky soupravy pro stanovení 25-OH vitaminu D ₂ /D ₃ (Recipe).....	48
Tab. 12 Výsledky kvantitativního stanovení vitaminu D pomocí tří diagnostických souprav v nmol/l.....	50
Tab. 13 Sumární statistika stanovení vitaminu D (Roche, ECLIA).....	51
Tab. 14 Sumární statistika stanovení vitaminu D (Recipe, HPLC).....	52
Tab. 15 Sumární statistika stanovení vitaminu D (Abbott, CMIA).....	52

Seznam grafů

Graf 1 Rozložení četnosti koncentrací pro soubor Roche, ECLIA.....	51
Graf 2 Rozložení četnosti koncentrací pro soubor Recipe, HPLC.....	52
Graf 3 Rozložení četnosti koncentrací pro soubor Abbott, CMIA.....	53
Graf 4 Srovnání metod stanovení 25-OH Vitamin D ₂ /D ₃ HPLC (Recipe) a Elecsys Vitamin D total (Roche) pomocí Passing-Bablokovy regrese.....	54
Graf 5 Srovnání metod stanovení 25-OH Vitamin D ₂ /D ₃ HPLC (Recipe) a Elecsys Vitamin D total (Roche) pomocí Bland – Altman analýzy.....	54
Graf 6 Srovnání metod stanovení 25-OH Vitamin D ₂ /D ₃ HPLC (Recipe) a 25-OH Vitamin D (Abbott) pomocí Passing-Bablokovy regrese.....	55
Graf 7 Srovnání metod stanovení 25-OH Vitamin D ₂ /D ₃ HPLC (Recipe) a 25-OH Vitamin D (Abbott) pomocí Bland – Altman analýzy.....	56
Graf 8 Srovnání imunochemických metod stanovení 25-OH Vitamin D total Roche a Abbott pomocí Passing-Bablokovy regrese.....	57
Graf 9 Srovnání imunochemických metod stanovení 25-OH Vitamin D total Roche a Abbott pomocí Bland – Altman analýzy.....	57

Seznam použitých zkratk a symbolů

AIM	akutní infarkt myokardu
BM	bone markers (kostní markery)
bpn	bez patologického nálezu
CMIA	chemiluminescent microparticle immunoassay (chemiluminiscenční mikročasticová imunoanalýza)
CMP	cévní mozková příhoda
CNS	centrální nervová soustava
CoA	koenzym A
ČR	Česká republika
ECLIA	elektrochemiluminiscenční imunoanalýza
EF	ejekční frakce (srdeční)
EHK	externí hodnocení kvality
FN	fakultní nemocnice
HAMA	human antimouse antibodies (protilátky proti myší protilátce)
HPLC-ED	kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
i. m.	intra muskulárně
IS	interní standard
iPTH	intaktní parathormon
i. v.	intra venózně
k.	kyselina
LC	kapalinová chromatografie
LK	levá komora (srdeční)
MMP	matrixové metaloproteinázy
NAD	nikotinamidadenindinukleonid
NADP	nikotinamidadenindinukleonidfosfát
NIH	National Institutes of Health (Národní ústav zdraví)
NIST	National Institute of Standards and Technology (Národní ústav standardů a technologie)
p. o.	per os
PTH	parathormon

RLU	relative light units (relativní světelné jednotky)
RS	roztroušená skleróza
RT	retention time (retenční čas)
RTG	rentgen
SEKK	system externí kontroly kvality
SLP	správná laboratorní praxe
SRM	Standard Reference Materials (standardní referenční materiál)
sy.	syndrom
UZ	ultrazvukové vyšetření
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky

Přílohy

Příloha č. 1 Kazuistika - intoxikace vitamínem D

Zdroj: Bučková et al., 2013 (převzato a kráceno).

Osobní anamnéza: 21-letý muž pocházející ze Sýrie bez pozoruhodností do současného stavu.

Iniciální problémy: koncem roku 2012 přijat na Interní kardiologickou kliniku FN Brno-Bohunice pro progredující slabost, nevolnost, zvracení a dyspepsii. Laboratorně byly zjištěny známky nefropatie: urea 8,6 mmol/l (norma 2,8-8,1 mmol/l), kreatinin 270 μmol/l (norma 62-106 μmol/l) a elevace amylázy 3,52 μkat/l (norma), ostatní laboratorní nálezy bez pozoruhodností. Z osobní anamnézy vyplynulo, že pacienta v nedávné době opakovaně hospitalizovali pro obdobné potíže s dg. iritační pankreatitida po dietní chybě. Retence dusíkatých látek byla vysvětlena užíváním anabolik a steroidů. Tento stav byl léčen pomocí rehydratační terapie, blokátorů protonové pumpy (Helicid 20 mg) a diety.

Druhý hospitalizační den byla laboratorně zjištěna **těžká hyperkalcémie 3,8 mmol/l** (norma 2,15-2,5 mmol/l) a hraniční fosfatémie 0,81 mmol/l (norma 0,81-1,45 mmol/l). Následně stanovena koncentrace vitamínu D₃ v toxických koncentracích >350 nmol/l (imunochemicky). Pro snížení hyperkalcémie byla nasazena i. v. terapie rehydratační a podpora diurézy furosemidem a intranasálním kalcitoninem. Jiná etiologie hyperkalcémie vyloučena – PTH bpn, RTG skeletu a UZ gastrointestinálního traktu bpn.

Přes jazykovou bariéru s pacientem byla dodatečně zjištěna skutečnost, kdy si pacient opakovaně aplikoval i. m. blíže nespécifikovanou látku pro veterinární účely s obsahem anabolik a vitamínu D₃ v rozmezí 3 měsíců a celkovou aplikační dávkou vitamínu D₃ 14 miliónů IU (denní dávka vitamínu D 140 000 IU, doporučená denní dávka vitamínu D činí 600–1200 IU). Následné laboratorní stanovení bylo provedeno pomocí HPLC-ED a **plazmatická koncentrace vitamínu D činila 1583 nmol/l**.

Léčebné opatření: pro přetrvávající hyperkalcémii byla k zavedené terapii (hyperhydratace, furosemid, kalcitonin) přidána terapie kortikoidní a léčba bisfosfonáty, včetně přechodné parenterální výživy z důvodu elevace pankreatických enzymů.

Vývoj onemocnění: z podezření na možnou kardiovaskulární patologii doplněno ultrazvukové vyšetření srdce s nálezem dysfunkce LK (EF 40%), které potvrdilo kardiální postižení pro přetrvávající hyperkalcémii. Po zavedené terapii bisfosfonáty dochází k postupnému

snižování kalcémie, normalizaci hodnot pankreatických enzymů a kardiálních funkcí. Pacient propuštěn do domácího došetření po 33 dnech s plazmatickou koncentrací vitamínu D 1024 nmol/l a kalcia 2,99 mmol/l.

Ambulantní léčba pokračovala v užívání diuretik (p. o.) a bisfosfonátem. Po dvouměsíční ambulantní léčbě dochází k normalizaci plazmatické koncentrace kalcia, elevace hodnot vitamínu D přetrvává (680 nmol/l, imunochemicky ECLIA).

Příloha č. 2 Klasifikace osteoporózy podle MKN-10

Kódovací znak	Diagnóza
M80.	Osteoporóza s patologickou zlomeninou – frakturou
M80.0	Postmenopauzální osteoporóza s patologickou frakturou
M80.1	Postovarektomická osteoporóza s patologickou frakturou
M80.2	Osteoporóza z nečinnosti s patologickou frakturou
M80.3	Pooperační malabsorpční osteoporóza s patologickou
M80.4	Osteoporóza způsobená léčivý s patologickou frakturou
M80.5	Idiopatická osteoporóza s patologickou frakturou
M80.8	Jiná osteoporóza s patologickou frakturou
M80.9	Neurčená osteoporóza s patologickou frakturou
M81.	Osteoporóza bez patologické fraktury
M81.0	Postmenopauzální osteoporóza
M81.1	Postovarektomická osteoporóza
M81.2	Osteoporóza z nečinnosti
M81.3	Pooperační malabsorpční osteoporóza
M81.4	Osteoporóza způsobená léčivý
M81.5	Idiopatická osteoporóza
M81.6	Lokalizovaná osteoporóza [Lequesneova]
M81.8	Jiná osteoporóza (stařecká osteoporóza)
M81.8	Osteoporóza NS
M82.*	Osteoporóza při nemocech zařazených jinde
M82.0*	Osteoporóza při mnohočetné myelomatóze (C90.0+)
M82.1*	Osteoporóza při endokrinních poruchách (E00–E34+)
M82.8*	Osteoporóza při jiných nemocech zařazených jinde

Zdroj: SZO, MKN-10, s. 471.

Příloha č. 3 Klasifikace osteomalacie podle MKN-10

Kódovací znak	Diagnóza
M83.	Osteomalacie dospělých Nepatří sem: osteomalacie: dětská a juvenilní (E55.0), vitamin D – rezistentní (E83.3), ledvinná osteodystrofie (N25.0), křivice (aktivní) (E55.0), . s následky (E64.3), . vitamin D – rezistentní (E83.3).
M83.0	Osteomalacie v šestinedělí
M83.1	Stařecká osteomalacie
M83.2	Osteomalacie dospělých způsobená malabsorpcí
M83.3	Osteomalacie dospělých způsobená podvýživou
M83.4	Hliníková kostní nemoc
M83.5	Jiná osteomalacie u dospělých způsobená léčivý
M83.8	Jiná osteomalacie dospělých
M83.9	Osteomalacie dospělých NS

Zdroj: SZO, MKN-10, s. 472.

Příloha č. 4 Klasifikace ostatních dg. souvisejících s nedostatkem a/nebo nadbytkem vitamínu D podle MKN-10.

Kódovací znak	Diagnóza
E55	Karence vitamínu D Nepatří sem: osteomalacie dospělých (M83.–), osteoporóza (M80–M81), následky křivice (E64.3)
E55. 0	Křivice, aktivní Osteomalacie: . dětská . dospívajících Nepatří sem: křivice: u célikalie (K90.0), Crohnovy nemoci (K50.–), neaktivní (E64.3), renální (N25.0), vitamin D rezistentní (E83.3)
E55. 9	Karence vitamínu D NS (avitaminóza D)
E83	Poruchy metabolismu minerálů Nepatří sem: nutriční karence minerálů (E58–E61), poruchy příštítné žlázy–parathyroidey (E20–E21), karence vitamínu D (E55.–).
E83. 0	Poruchy metabolismu mědi (Menkesova nemoc, Wilsonova nemoc)
E83. 1	Poruchy metabolismu železa (hemochromatóza) Nepatří sem: anemie: z nedostatku železa (D50.–), sideroblastická (D64.0–D64.3).
E83. 2	Poruchy metabolismu zinku (Acrodermatitis enteropathica)
E83. 3	Poruchy metabolismu fosforu a fosfatáz (nedostatek kyselé fosfatázy, rodinná hypofosfatemie, hypofosfatázie, vitamin D rezistentní: osteomalacie, křivice). Nepatří sem: osteomalacie dospělých (M83.–), osteoporóza (M80–M81).
E83. 4	Poruchy metabolismu magnezia (hypermagnezemie, hypomagnezemie)
E83. 5	Poruchy metabolismu kalcia (rodinná hypokalciurická hyperkalcemie, idiopatická hyperkalciurie). Nepatří sem: chondrokalcinóza (M11.1–M11.2), hyperparathyreóza (E21.0–E21.3).

E83. 8 Jiné poruchy metabolismu minerálů

E83. 9 Poruchy metabolismu minerálů NS

Y54 Prostředky působící primárně na vodní rovnováhu, přeměnu minerálů a metabolismus kyseliny močové – léky, léčiva, návykové a biologické látky jako příčina nežádoucích účinků při léčebném použití.

Y54. 0 Mineralokortikoidy

Y54. 1 Antagonisté mineralokortikoidů [antagonisté aldosteronu]

Y54. 2 Inhibitory karboanhydrázy (acetazolamid)

Y54. 3 Tiazidová diuretika

Y54. 4 Diuretika působící v oblasti Henleovy kličky

Y54. 5 Jiná diuretika

Y54. 6 Prostředky udržující elektrolytovou, kalorickou a vodní rovnováhu (rehydratační soli)

Y54. 7 Prostředky ovlivňující metabolismus vápníku (hormony a deriváty parathyreoidní, skupina D vitamínu)

Y54. 8 Prostředky ovlivňující metabolismus kyseliny močové

Y54. 9 Minerální soli, nezařazené jinde

Zdroj: SZO, MKN-10, s. 176, 185, 795.

Příloha č. 5 Typické držení těla u nemocné s osteoporózou



Zdroj: Topinková, Eva. Obrazový atlas chorobných stavů. s. 80.

Příloha č. 6 Sekundární osteoporóza u pacienta dlouhodobě léčeného glukokortikoidy



Zdroj: Topinková, Eva. Obrazový atlas chorobných stavů. s. 82.