

Význam metabolitů vitaminu D a správnost jejich stanovení – editorial

Radovan Bílek

Endokrinologický ústav, Praha

Komentář k | Editorial on

Vaňuga A et al. Úskalía stanovenia vitamínu D. Vnitř Lék 2017; 63(6): 403–408.

Vitamin D je neaktivním prekurzorem biologicky účinného $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitaminu D}$ [$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$], který spolu s parathormonem a kalcitoninem řídí homeostázu vápníku. Do organismu se vitamin D dostává exogenně ve formě vitaminu D_2 (ergokalciferol) přítomného např. v rybím oleji a mléce, ale hlavním zdrojem vitaminu D je jeho endogenní biosyntéza z prekurzoru 7-dehydrocholesterolu, u kterého je fotolyticky po expozici plazmatické membrány keranocytů v kůži slunečním světlem o vlnových délkách 285–320 nm otevřen kruh B. Z tohoto previtaminu D_3 vzniká spontánní izomerací při tělesné teplotě vitamin D_3 (cholecalciferol).

Z hlediska biologické funkce je otázkou, zda je vitamin D_2 rovnocenný s vitaminem D_3 . Někteří autoři uvádějí, že vitamin D_2 zvyšuje hladinu $25(\text{OH})\text{D}$ méně účinně než vitamin D_3 a že nutriční efekt obou vitaminů D není ekvivalentní, popř. že podávání D_3 starším pacientům vedlo k redukci počtu zlomenin, přičemž tohoto výsledku nebylo dosaženo podáváním D_2 apod. Obvykle je koncentrace cirkulujícího vitaminu D_2 a jeho metabolitů více než 10krát nižší než koncentrace vitaminu D_3 a jeho metabolitů. Oba druhy vitaminu D, tj. D_2 a D_3 , se liší v postranním řetězcí molekuly na 17 β -pozici sekosteroidu (vitamin D_2 má jednu dvojnou vazbu a jednu metylovou skupinu navíc), jejich další metabolická cesta je ale stejná, tj. pomocí hydroxyláz patřících do rodiny cytochrom P450 enzymů nejprve probíhá hydroxylace vitaminu D v poloze C25 prostřednictvím v játrech produkováné 25-hydroxylázy za vzniku 25-hydroxyvitaminu D [$25(\text{OH})\text{D}$]. Koncentrace tohoto biologicky ještě neúčinného metabolitu vitaminu D v krvi odráží míru zásobení organismu vitaminem D z exogenních (D_2) i endogenních (D_3) zdrojů.

Biologicky aktivní, hormonálně účinný $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}$ [$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$] vzniká v ledvinách účinkem hormonálně [PTH stimuluje, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ vykazuje negativní zpětnou vazbu] regulované 1α -hydroxylázy. V ledvinách, ale i ve většině dalších tkání, existuje enzym 24-hydroxyláza, která katalyzuje syntézu $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ z $25(\text{OH})\text{D}$, především však inaktivuje $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ jeho přeměnou na $1\alpha,24,25(\text{OH})_3\text{D}$. Na vlastní inaktivaci se $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ podílí tím, že stimuluje expresi 24-hydroxylázy.

Málo je známo o dalších metabolitech vitaminu D, ať již se jedná o $23,25(\text{OH})_2\text{D}$, nebo o různé oxidované formy typu 25-OH-24 oxo- D_3 , $23,25(\text{OH})_2\text{-24-oxo-}\text{D}_3$, a také o glukuronidové nebo sulfátové konjugáty. Dalším potenciálně biologicky aktivním metabolitem vitaminu D nalezeným v řadě tkání je epimer $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, tj. 3-epi- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ vznikající z $25(\text{OH})\text{D}$ účinkem hydroxylázy nepatřící do rodiny cytochrom P450 enzymů. Celkem bylo izolováno a chemicky charakterizováno více než 37 různých metabolitů vitaminu D. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ realizuje svoji biologickou funkci interakcí s jaderným receptorem specifickým pro vitamin D (VDR), ale i negenomicky interakcí s membránovými receptory cílových buněk.

Ledviny jsou téměř výlučným zdrojem cirkulujícího $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, ale i řada dalších buněk a tkání exprimuje 1α -hydroxylázu, a mohou tak lokálně autokrinním či parakrinním mechanismem vytvářet $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$. Tento hormon je klíčovým regulátorem homeostázy kalcia a fosforu ve smyslu absorpce střevního kalcia a mobilizace kalcia z kosti, ale má také silné antiproliferativní, prodiferenční, proapoptické a imunomodulační (suprese humorální odezvy, aktivace celulární odezvy) účinky. Tyto vlastnosti $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ jsou úzce spjaté s karcinogenezí a dostupnost $25(\text{OH})\text{D}$ pro lokální biosyntézu $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ v extrarenálních buňkách je významná v prevenci maligních onemocnění.

Dlouhodobý nedostatek vitaminu D a z něho vyplývající snížení hladiny $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ způsobuje křivici u dětí a osteomalacii u dospělých. Spolu s nedostatkem kalcia a dalšími změnami souvisejícími se vzrůstajícím věkem se podílí i na osteoporóze, alopecii, slábnutí svalů, vývoji sekundárního hyperparatyreoidizmu u pacientů s chronickou renální nedostatečností a současný výzkum naznačuje i jeho spojení se zvýšeným krevním tlakem, s depresí, s poruchami imunitního systému vedoucími k mnohočetné skleróze, k revmatické artritidě a k diabetu. Všechny buňky imunitního systému exprimují VDR a jeho stimulace má za následek aktivaci vrozené imunitní odezvy realizované obecným obranným mechanismem (makrofágy apod), naopak ale dochází k potlačení specifické imunitní odezvy selektivní inhibicí antigenem aktivovaných T buněk. Nedostatek vitaminu D má

za následek nedostatečnou aktivaci VDR, což umožňuje vývoj autoreaktivních T-lymfocytů, naopak přítomnost $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ a funkčního VDR nastoluje rovnováhu a zabraňuje vývoji autoimunity. Téměř všechny VDR pozitivní buňky odpovídají na interakci s $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ utlumením buněčné replikace v důsledku snížení hyperfosforilace proteinů podílejících se na buněčném cyklu a u většiny tkání dochází k indukci diferenciaci. V současné době roste počet studií, ze kterých vyplývá vztah mezi prevalencí výskytu rakoviny především tlustého střeva, prostaty a prsu, ale i řady dalších maligních onemocnění, a mírou zásobení organismu vitamínem D.

Z výše uvedeného je patrné, že správné stanovení vitamínu D a jeho metabolitů z hlediska přesnosti, ale především pravdivosti, je velkou výzvou do budoucnosti a vývoj technik, které toto správné stanovení umožní, bude odrážet potřeby, které neustále vzrůstají vzhledem k významu vitamínu D a jeho metabolitů. Výhodou imunoanalytických postupů je velká kapacita stanovení a analytická citlivost v řádu pg/zkumavku. Imunoanalytické stanovení hydroxylovaných metabolitů vitamínu D je ale také zatíženo řadou problémů, přičemž největším je specifita použité protilátky, která může zkřížené interagovat jak s metabolity vitamínu D_3 , tak i s metabolity vitamínu D_2 . Poměrně vysoké zkřížené reakce mají protilátky některých výrobců vůči $24,25(\text{OH})_2\text{D}$, přičemž v cirkulaci je tento metabolit v nanomolovém množství. Zásadní je rovněž problém se specificitou protilátky při stanovení $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, jehož koncentrace je přibližně o 3 řády nižší než koncentrace $25(\text{OH})\text{D}$. Nedostatečně účinný proces separace $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ od $25(\text{OH})\text{D}$ nebo použití protilátky vykazující i jen nízkou zkříženou reakci vůči $25(\text{OH})\text{D}$ bude mít za následek falešně vysoké výsledky stanovení $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$. Velmi málo je diskutována specifita používaných protilátek vůči konjugátům (sulfát, glukuronid) hydroxylovaných metabolitů vitamínu D, přičemž v cirkulaci může být i stejné množství např. $25(\text{OH})\text{D}_3$ a $25(\text{OH})\text{D}_3$ -3-sulfátu. Dalším problémem může být silná vazba metabolitů vitamínu D na vitamín D vazebný protein (VDBP), který váže přibližně 85–88 % metabolitů vitamínu D v cirkulaci, zbytek cirkulujících metabolitů je vázán na albumin, pouze 0,03 % $25(\text{OH})\text{D}$ a 0,4 % $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ je v cirkulaci volných. Precipitace séra organickými rozpouštědly nebo kyselinami může vést ke ztrátám způsobeným koprecipitací metabolitů vitamínu D s vazebnými proteiny. Problémem je tedy standardizace použitých imunoanalytických kitů,

kdy různé typy esejí dávají různé výsledky, na jejichž základě jsou odvozovány i různá referenční rozmezí a přijímají se klinická rozhodnutí, která nemusí odrážet skutečný stav zásobení populace vitamínem D.

Chromatografické postupy mají velkou výhodu ve skutečnosti, že umožňují separaci jednotlivých odlišně hydroxylovaných a jinak derivatizovaných (různé typy konjugátů, např. sulfáty a glukuronidy) metabolitů vitamínu D včetně rozlišení metabolitů cholekalciferolu (D_3) od metabolitů ergokalciferolu (D_2), nebo např. stanovení 3-epi- $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vedle $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Nevýhodou mohou být v oblasti rutinních analýz relativně složitě přípravy vzorků před vlastní chromatografickou analýzou (extrakce organickými rozpouštědly často spojená s extrakcí na pevné fázi a další chromatografickou předseparací), metody jsou limitovány kapacitně, a dihydroxylované metabolity vitamínu D [především $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$] vyžadují citlivější postup detekce, než je obvyklá spektrofotometrická detekce v ultrafialové oblasti.

Obecně výhodné z hlediska univerzálnosti, citlivosti detekce, specificity, i z časového hlediska jsou postupy založené na kombinaci vysokoúčinného kapalinového chromatografu (HPLC) pracujícího v režimu reverzní fáze (RP-HPLC) s detekcí analytu provedenou na hmotovém detektoru (MS), který většinou pracuje v tandemovém zapojení (MS/MS). Je zde dvojí separační princip, tj. chromatografický a hmotově-spektrometrický, založený na poměru hmoty iontu k jeho náboji. Jednoznačnost stanovení jednotlivých metabolitů ve spektru řady dalších metabolitů vitamínu D, použití izotopicky značených standardů eliminujících vliv biologické matrice při kvantifikaci a další vývoj spojený s automatizací vedou k závěru, že imunoanalytické postupy stanovení metabolitů vitamínu D jsou nebo v blízké budoucnosti budou technikou MS překonány, a již nyní jsou postupy HPLC-MS/MS užívány jako vhodná referenční metoda stanovení metabolitů vitamínu D. Limitujícím faktorem je vysoká pořizovací cena přístroje, který zatím není běžnou součástí klinicko-biochemické laboratoře.

doc. Ing. Radovan Bílek, CSc.

✉ rbilek@endo.cz

Endokrinologický ústav, Praha

www.endo.cz

Doručeno do redakce 20. 6. 2017