

A D-vitaminszintek mérésének laboratóriumi lehetőségei

Toldy Erzsébet

Központi Laboratórium Markusovszky Egyetemi Oktató Kórház,
Pécsi Tudományegyetem Egészségügyi Kar, Gyakorlati Diagnosztikai
Intézet, Kaposvár

„Endokrinológiai és anyagcsere megbetegedések laboratóriumi diagnosztikája”-
kötelező szinten tartó tanfolyam 2014. január 13-17.

Szervező: Semmelweis Egyetem, ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet

Témák, amihez kérem az együtt gondolkodást

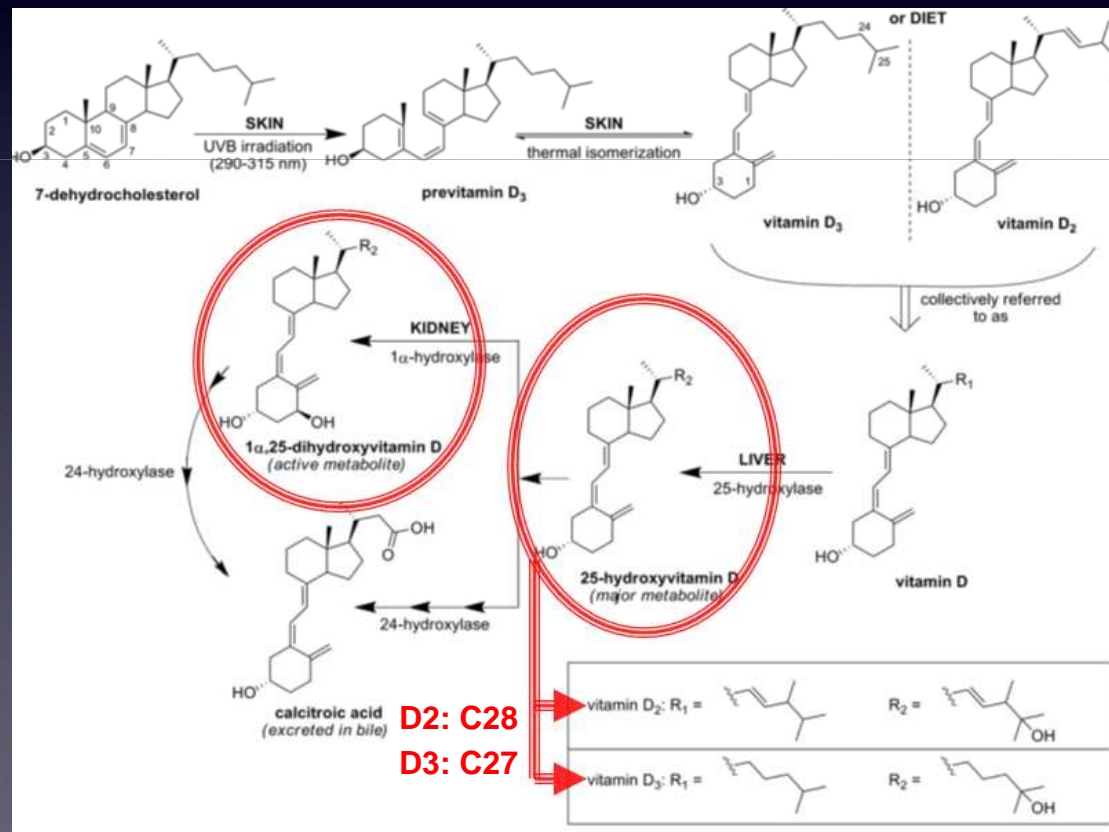
- D vitamin szintek ismeretének jelentősége
- Mérés
- Döntéshozatali határértékek
- Kötőfehérje interakciók (saját eredmények NEJM-2013).
- 25OHD mérések számának

D vitamin (Calciferol)



1928, Windaus:
kémiai szerkezetét leírta:
“Steroid pro hormone”
Nobel Díj

**Napjainkig, több mint 50 metabolitját
írták már le**



D vitamin források

Bőr

~100-500 IU
D₂ – növényi
eredetű élelem

Étel

D₃ – állati
eredetű élelem

7-dehydrokoleszterin

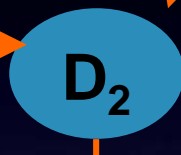
UVB3

5-10 perc napozás

Previtamin D₃

2x1héten:

~20 000 IU

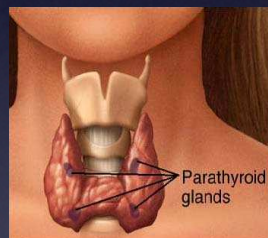


25-Hydroxiláció

Inaktív fotoproduktum

25-OH Vitamin D

D-vitamin
raktár: zsírdepó
és máj



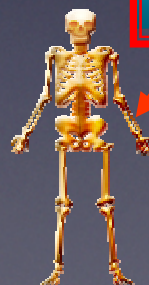
PTH

1-alfa-Hydroxiláció

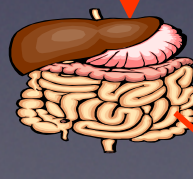
Legtöbb
sejtben

Ca⁺⁺/PO₄³⁻ +/-
reguláció

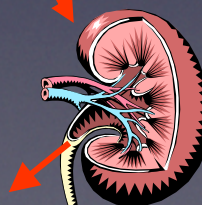
1,25 (OH)₂ D₃ vitamin = Calcitriol = D hormon



Csont mineralizáció



Ca⁺⁺/PO₄³⁻ +/- homeostasis



Extraszkeletális
hatás

Az 1,25 dihidroxi D-vitamin több mint 200 gént szabályoz

Többek között regulálja a

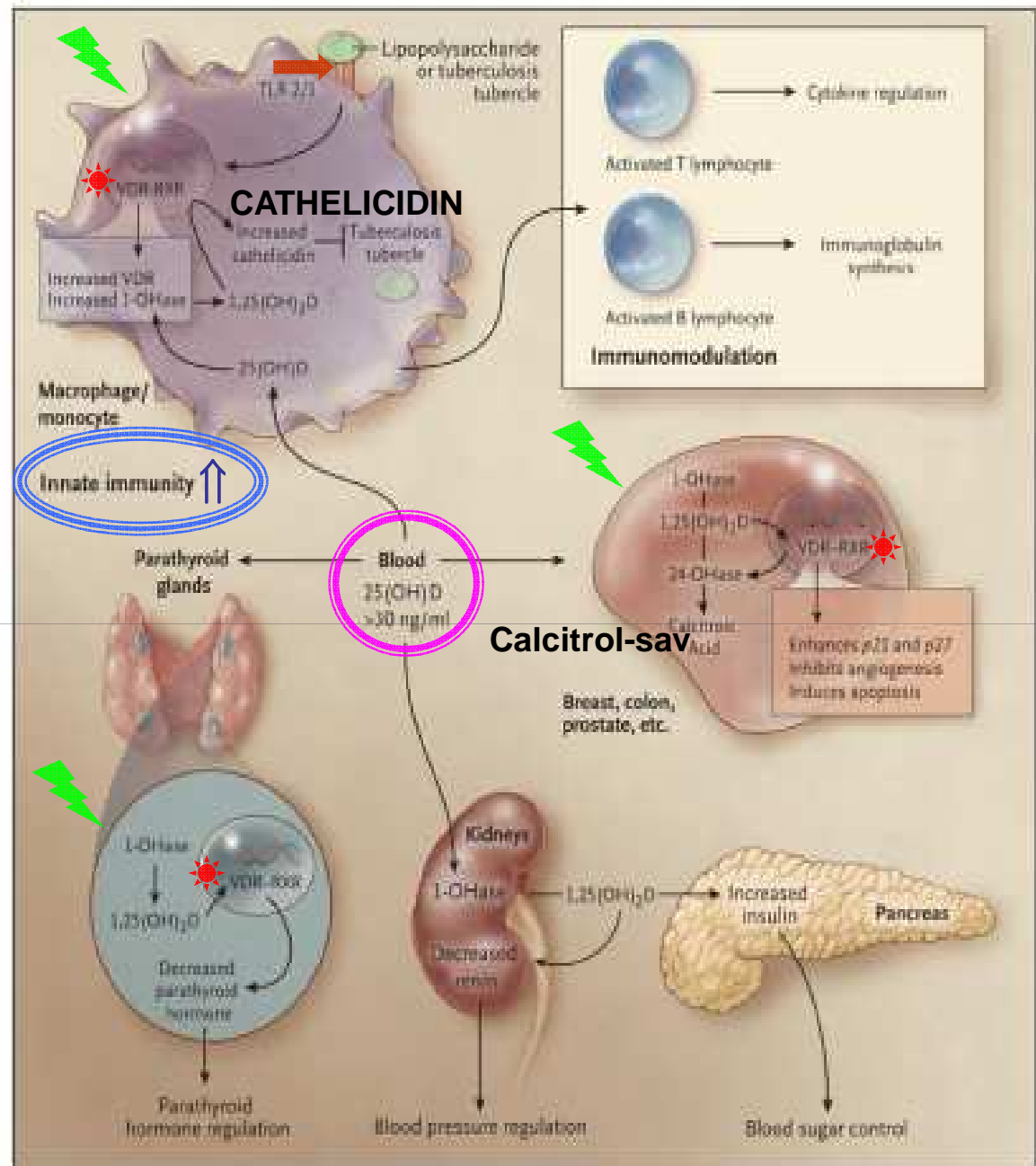
- Sejtproliferációt ↓ úgy a normál, mind a carcinoma sejtben.
- Sejtdifferenciálódást ↑
- Apoptosist ↑
- Angiogenesisist ↓

D-hormon hatása a csontképzésen túli folyamatokban

➔ **Toll-like receptor**

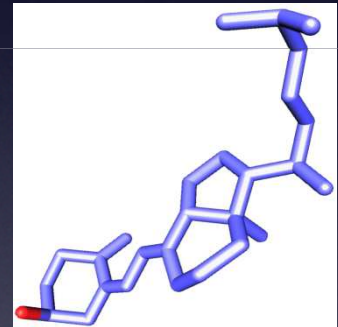
☀ **VDR-RXR=receptor**

⚡ **Locális hatás:** sejten belül keletkező aktív D vitamin nem befolyásolhatja normális körülmények között a Ca-homeostasiszt.



A D-vitamin szintje összefüggésbe hozható:

- Immunválaszkészséggel (aktivizálja az in nate választ)
- Tumorgenesisssel
- Cardiovascularis betegségek megelőzésével
- Hypertoniával
- Izületi gyulladással (Osteoarthritis)
- Infertilitással és a magzat fejlődésével
- Insulin aktivitásával és rezisztenciával
- Pszichiátriai zavarokkal: érzékelési problémák, depresszió, schizophrenia, autista.
- Mortalitással



A szakmai irányelvek szerint az egészség egyik feltétele a megfelelő D-vitamin ellátottság: népegészségügyi következménnyel jár

2012 ■ 153. évfolyam, Supplemmentum ■ 5–26.

Hazai konszenzus a D-vitamin szerepéről a betegségek megelőzésében és kezelésében

Takács István dr.¹ • Benkő Ilona dr.² • Toldy Erzsébet dr.³
Wikonkál Norbert dr.⁴ • Szekeres László dr.⁵ • Bodolay Edit dr.⁶
Kiss Emese dr.⁷ • Jambrik Zoltán dr.⁸ • Szabó Boglárka dr.⁹
Merkély Béla dr.⁹ • Valkusz Zsuzsa dr.¹⁰ • Kovács Tibor dr.¹¹
Szabó András dr.¹¹ • Grigoreff Orsolya dr.¹ • Nagy Zsolt dr.¹
Demeter Judit dr.¹ • Horváth Henrik Csaba dr.¹
Bittner Nóra dr.¹² • Várbiro Szabolcs dr.¹³ • Lakatos Péter dr.¹

¹Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. Belgyógyászati Klinika, Budapest

²Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum,
Farmakológiai és Szemkéséptani Intézet, Debrecen

³Markovitsy Kórház, Székesfehérvár

⁴Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, III. Nefrológiai és Nőgyógyászati Klinika, Budapest

⁵Szani András Reumatológia, Pécs

⁶Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, III. Belgyógyászati Klinika, Debrecen

⁷Országos Reumatológiai és Fizioterápiás Intézet, Budapest

⁸Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Cardiovacuáris Centrum, Budapest

⁹Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Szegedi Gyógyászati Alapítványi Központ, I. Belgyógyászati Klinika, Szeged

¹⁰Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Neurológiai Klinika, Budapest

¹¹Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, II. Gyermekgyógyászati Klinika, Budapest

¹²Országos Onkológiai Intézet, Budapest

¹³Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, II. Radikális és Nőgyógyászati Klinika, Budapest

Grant, W. B., et al.: *Estimated benefit of increased vitamin D status in reducing the economic burden of disease in western Europe.*

Progress in Biophysics and Molecular Biology., 2009, 99,

A D-vitamin ellátottság népegészségügyi és gazdaságossági vonzatai:

Prof. Dr. Lakatos Péter

A D-vitamin-szint 37,5–50 nmol/l-ről 75–100 nmol/l-re történő emelése, a rendelkezésre álló adatok alapján, a csípőtáji törtések számát 26%-kal, az I-es típusú diabetes előfordulását 78%-kal, az összes daganat gyakoriságát 35%-kal, az influenzás megbetegedések számát 90%-kal csökkentené. Ez a teljes mortalitást 7–10%-kal mérsékelné, és az átlagélettartam két-három évvel nőne [215]. Ezeket az adatokat Magyarországra vetítve azt jelenti, hogy a teljes populáció D-vitaminpótlásának 15 milliárd forintos költségével szemben az egészségügyi kiadások 250 milliárd forinttal csökkenének.

D vitamin ellátottságról valló 25(OH)D

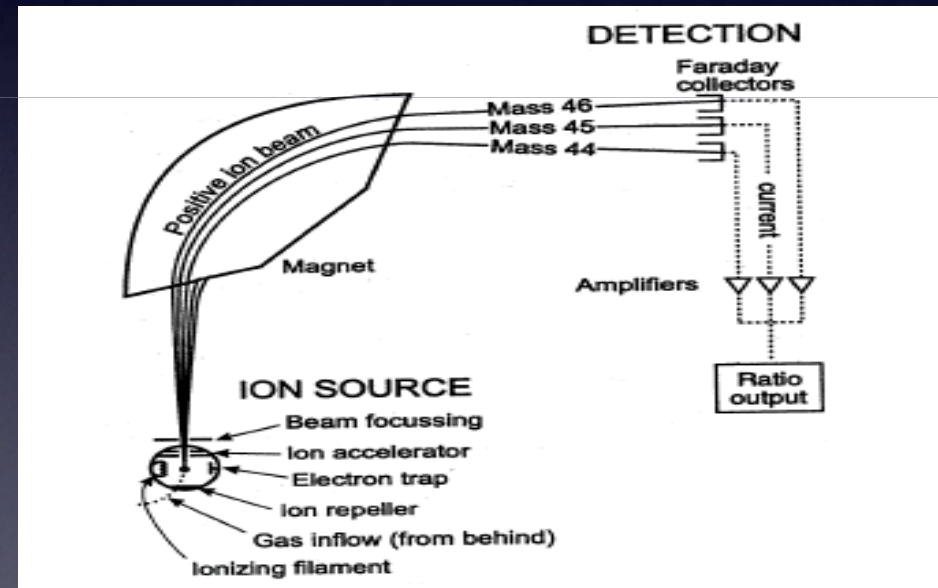
Cirkuláló forma	Biológiai féléletidő	Szintje árulkodik
D (D3; D2)	24 h	A legutóbbi : - napfény-expozíció - D-bevitel
25(OH)D 25(OH) D ₃ + 25(OH) D ₂	3 hét	Hosszabb időszak: -napfény-expozíció - D-bevitel Májproduktum: elsősorban szubsztrát dependens, jelentős reguláció alatt nem áll
1,25(OH) ₂ D 1,25(OH) ₂ D ₃ +1,25(OH) ₂ D ₂	4 h	Ca szükségletéről 1-alfa hydroxilase defektusról Szigorú reguláció alatt áll

D-vitamint mérő módszerek

Az egyes D-vitamin metabolitokat szelektíven mérni tudó módszerek:

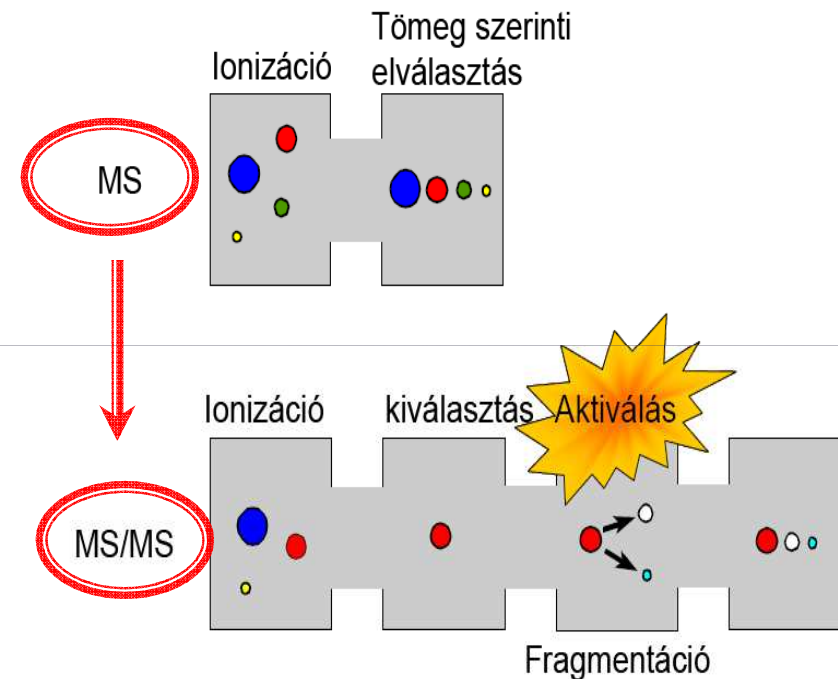
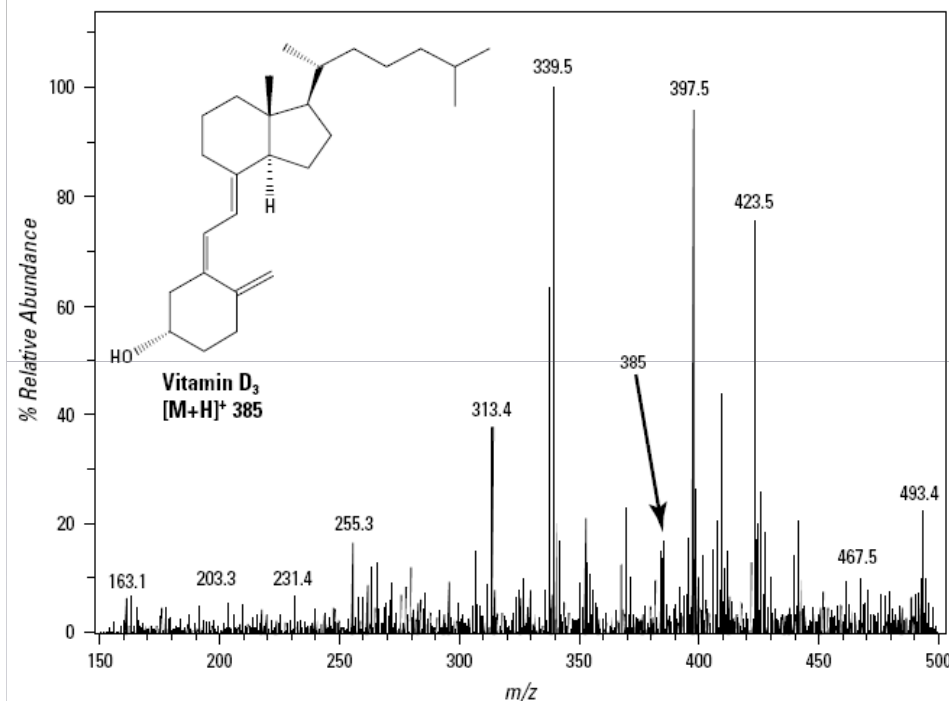
1,25-D-vitamin mérésére csak ezek fogadhatók el! (Clin Chem 57:9, 2011)

- magas nyomású kromatogram (HPLC) és UV detektálás
- tömegspektrometria (LC-MS/MS): „Gold standard”



Elve: illékonyá tétel → ionizálás → az ionok szétválogatása m/z nagyságuk alapján → detektálás.

A 25(OH)D-vitamin tömegspektrumátgörbék serege jellemez –a fragmentáció miatt, ezért ionokról újabb tömegspektrum felvétele szükséges



Ezzel nemcsak a tömegéről, hanem a szerkezetéről is információt kaphatunk.

Interferencia ritkán fordul elő, képes egy assay-n belül több metabolitot is mérni

Korlátok: extrakció ellenőrzése, Spiking módszer, El-Khoury et al: review, Clin Biochem 44 2011. 66-76

Measurement of 25-OH-Vitamin D3 and 3-Epi-25-OH-Vitamin D3 by LC/MS/MS

Selective quantitation of Vitamin D3 epimers using the AB SCIEX Triple Quad™ 4500 LC/MS/MS system

(For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.)

Michael Jarvis¹, Evelyn McClure¹, Dan Leigh², Dan Blake², and Phil Koerner³

¹AB SCIEX, Concord, Canada; ²AB SCIEX, Warrington, UK; ³Phenomenex, Torrance, CA, USA

Introduction

Due to the similarity in chemical structure (see Figure 1), 25-OH-Vitamin D3 and 3-epi-25-OH-Vitamin D3 display very similar chromatography, and produce the same fragment ions when subjected to collisionally-induced dissociation (CID) in a tandem quadrupole mass spectrometer. Since it is not possible to distinguish these epimers by tandem mass spectrometry alone, it is essential to resolve these epimers chromatographically, to avoid the overestimation of 25-OH-Vitamin D3 levels when analysis is performed by LC-MS/MS.

Chromatographic separation cannot be achieved using a standard C18 HPLC column, however we have developed an LC-MS/MS method utilizing a Phenomenex Kinetex PFP column that achieves baseline separation of 25-OH-Vitamin D3 and 3-epi-25-OH-Vitamin D3 in a total run time of 6 minutes, employing a shallow gradient consisting of water and methanol, with formic acid additive. "Blank" stripped serum and spiked serum samples have been analyzed to determine LOD and LOQ for the method.

The method developed here permitted the independent measurement of both 25-OH-Vitamin D3 and 3-epi-25-OH-Vitamin D3 in a single LC-MS/MS analysis. The estimated Limit of Quantitation was approximately 2 ng/mL for each analyte, and the method displayed good accuracy, reproducibility, and linearity over a concentration range from 0-100 ng/mL.

Figure 1. Structures of 25-OH-Vitamin D3 epimers.

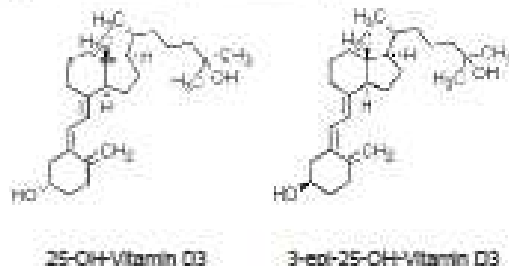
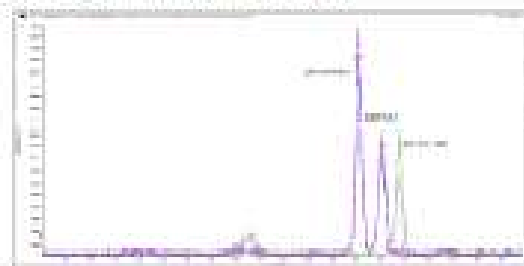
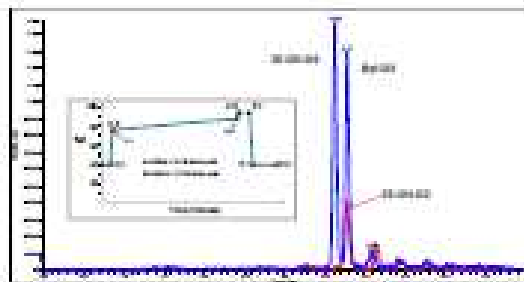


Figure 2. Separation of 25-OH-Vitamin D3 and 3-Epi-25-OH-Vitamin D3 using a 10-minute isocratic flow gradient.



Using a 10-minute isocratic gradient at a flow rate of 800 µL/minute, 25-OH-Vitamin D3 (25-OH-D3) and 3-epi-25-OH-Vitamin D3 (Epi-D3) were completely baseline separated, using a Phenomenex Kinetex PFP analytical column. 25-OH-Vitamin D3 was also chromatographically separated from the two D3 epimers.

Figure 3. Separation of 25-OH-Vitamin D3 and 3-Epi-25-OH-Vitamin D3 using a 6-minute binary flow gradient.

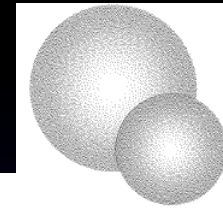


When a binary gradient was employed at a flow rate of 400 µL/minute, 25-OH-Vitamin D3 (25-OH-D3) and 3-epi-25-OH-Vitamin D3 (Epi-D3) were completely separated using a Phenomenex Kinetex PFP analytical column, with a reduced run-time of only 6 minutes. Furthermore, the sensitivity of the method was greatly improved, since the peak widths were significantly narrower. 25-OH-Vitamin D3 (25-OH-D3) was not chromatographically separated from Epi-D3, however there are no cross-interferences in the MRM channels for these analytes.

**2012-ben epiformát
szelektíven mérni tudó
módszert dolgoztak ki:
Az extrakció során elúció
átfolyási sebességének
csökkentésével**

**Még nem standardizált
módszer!**

Külső Quality eredmények: CV Pontosság ? Független Quality Scheme DEQAS adatai különböző 25-OH Vitamin D tesztek esetén



D • E • Q • A • S
VITAMIN D
EXTERNAL QUALITY
ASSESSMENT SCHEME

25 Hydroxyvitamin D April 2008

Results for major method groups nmol/L (ng/ml)

Sample	Method	n	Method Mean	SD	CV
331	Automated IDS EIA	21	20.6 (8.2)	6.9 (2.8)	33.7
331	Chromatographic Ligand Binding Assay	1	15.8 (6.3)	0.0 (0.0)	0.0
331	DiaSorin Liaison	22	15.6 (6.2)	2.8 (1.1)	17.8
331	DiaSorin Liaison Total	88	15.2 (6.1)	3.1 (1.3)	20.7
331	DiaSorin RIA	40	15.4 (6.2)	3.6 (1.5)	23.6
331	HPLC	16	17.2 (6.9)	7.4 (3.0)	43.1
331	IDS EIA	67	18.9 (7.6)	4.1 (1.6)	21.8
331	IDS RIA	26	22.3 (8.9)	4.0 (1.6)	17.9
331	LC-MS	34	16.1 (6.5)	3.5 (1.4)	21.6
331	Roche 25OHD3	15	29.8 (11.9)	9.4 (3.7)	31.4
331	Unknown	1	23.3 (9.3)	0.0 (0.0)	0.0
331	(all methods)	331	17.5 (7.0)	5.0 (2.0)	28.6

25(OH)D vitamint mérő módszerek:

Fehérje kötésen alapuló

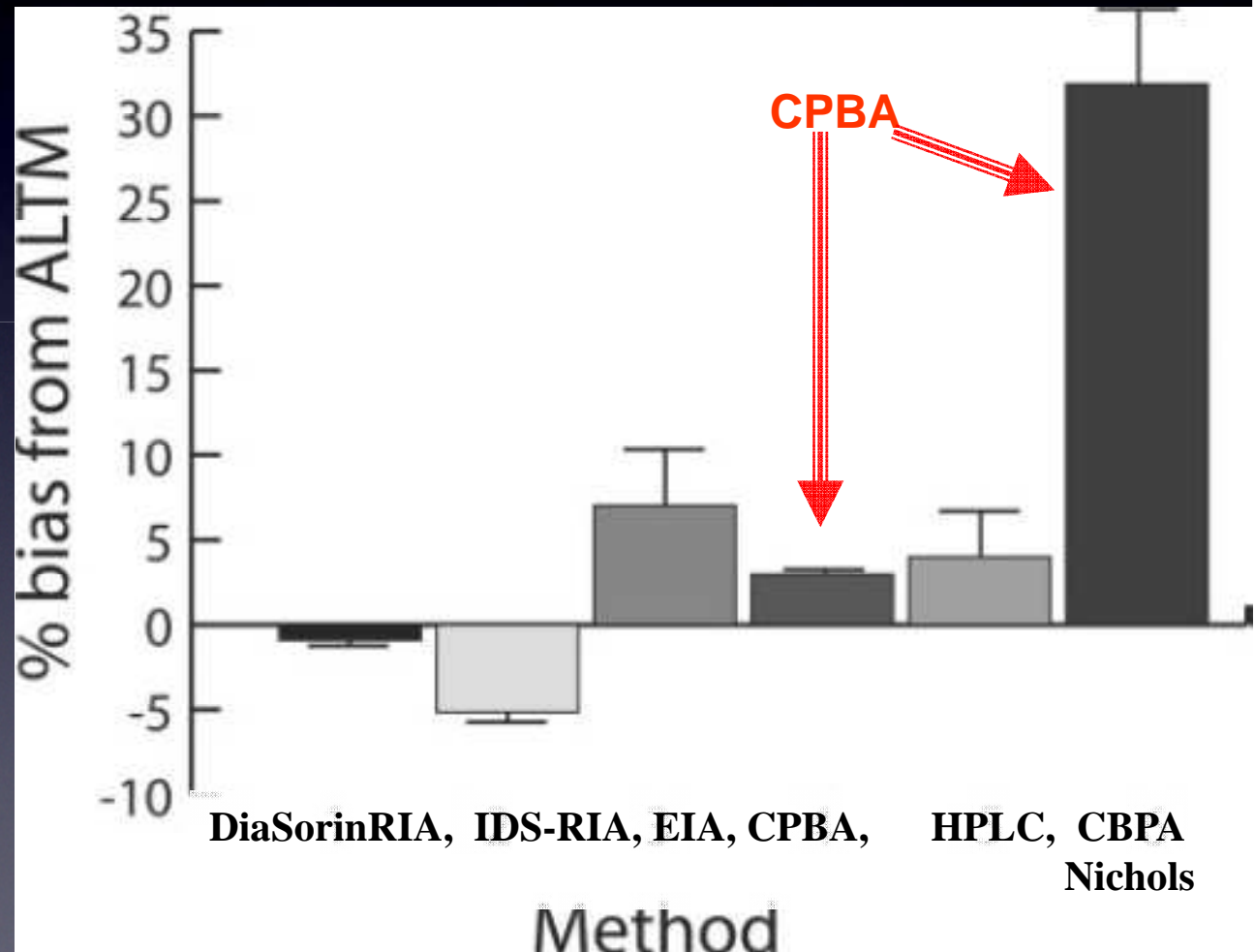
- **Kompetitív (1971): CPBA**, sikere az előkezeléstől függött

25OHD módszerek pontossága a DEQAS külső kontroll adatai alapján.

ALTM: All Laboratory Trimmed Mean

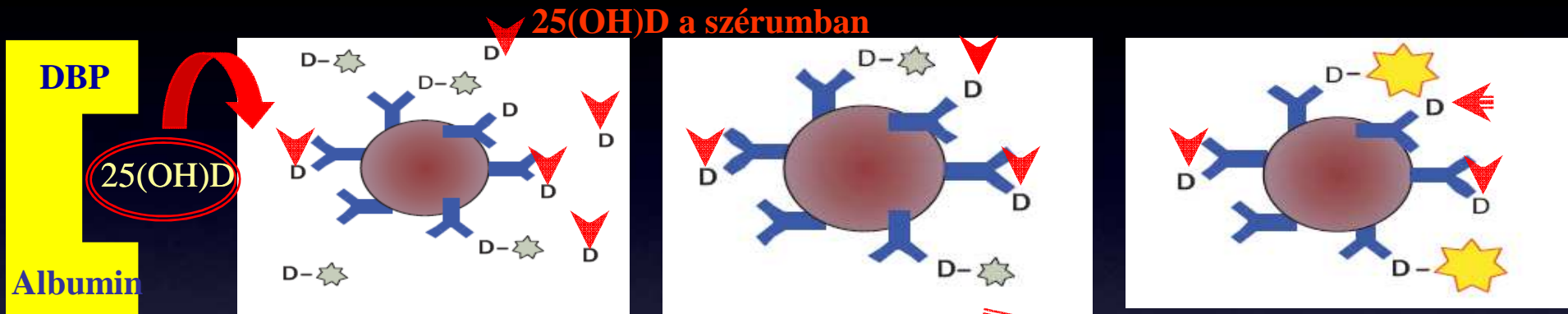


>30%-os torzítás!

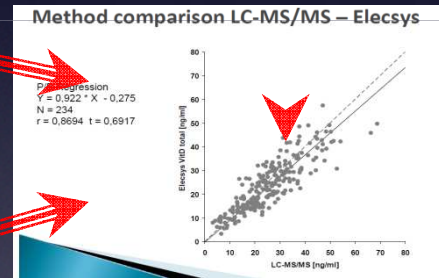


Hazánkban jelenleg leggyakrabban alkalmazott rutin 25(OH)D vitamint mérő módszerek: teljesen automatizáltak

I. Antitest kötésen alapuló: RIA, CLIA, LIA (DiaSorin, Abbott, Siemens)



II. Fehérje kötésen alapuló : ECL-PBA (Roche)



Natural VDBP

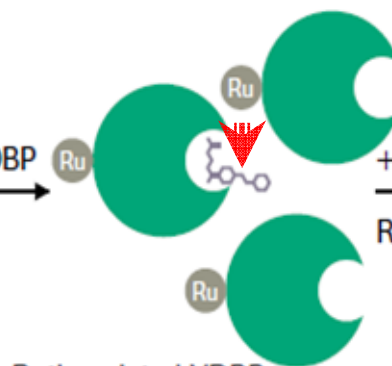
Denaturated VDBP



Pretreatment
Sample, PT1,
PT2, 9 min

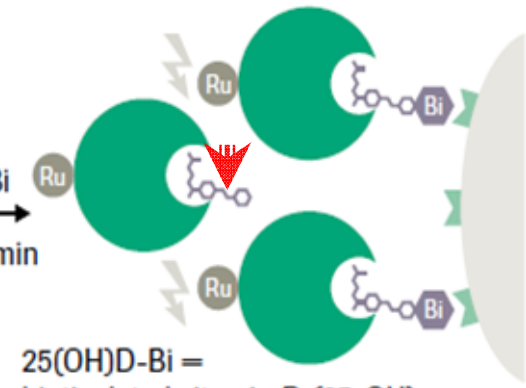


+ Ruthenylated-VDBP
R1, 9 min



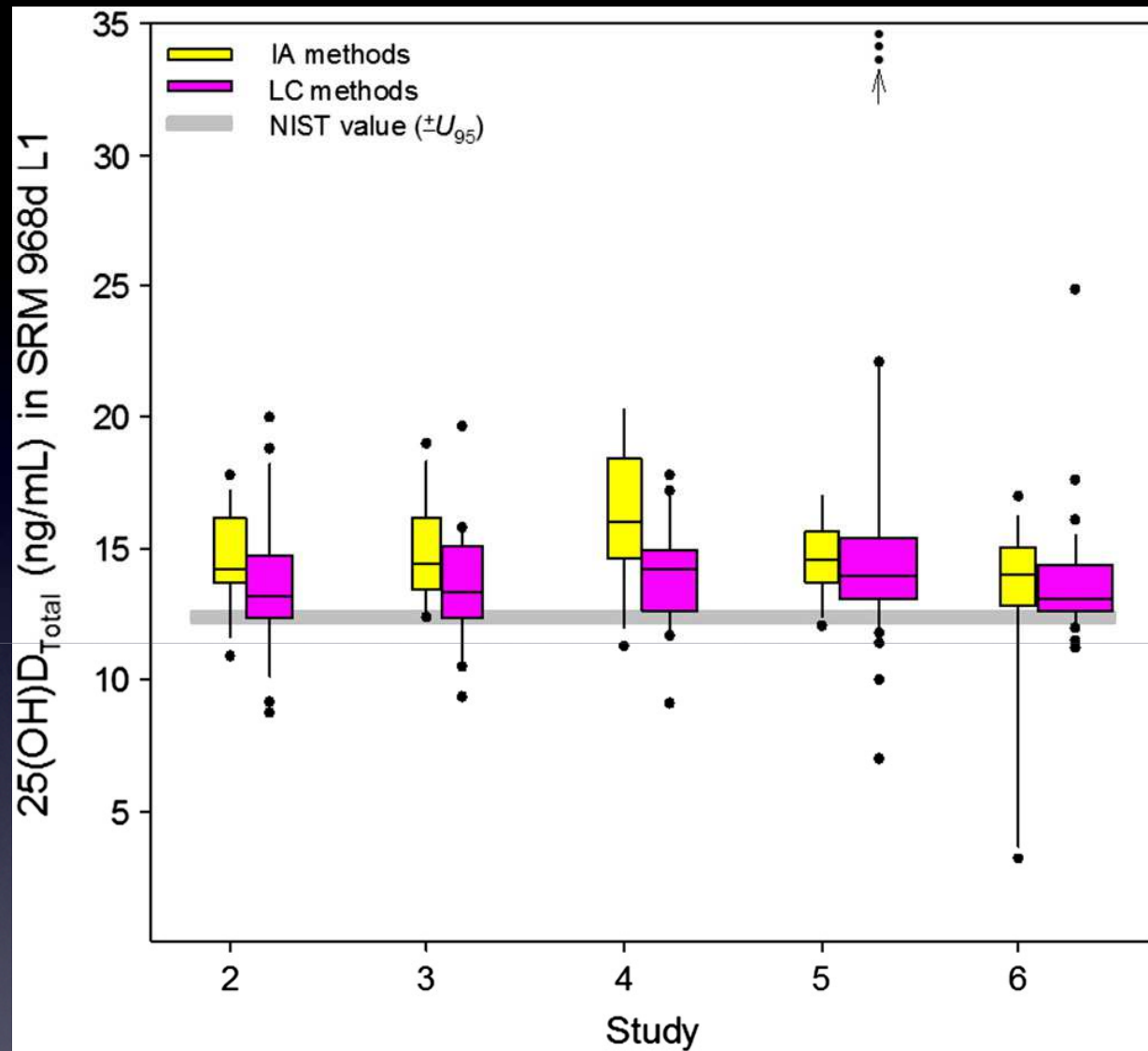
Ruthenylated VDBP

+ 25(OH)D-Bi
R2, Beads, 9min



25(OH)D-Bi =
biotinylated vitamin D (25-OH)

VDBP = Vitamin D binding protein
PT1, PT2 = pre-treatment components



25(OH)D szintek az immunoassay és LC-MS/MS módszerekkel mérve

CCA, 2013. Mary Bedner et al ,An assessment of 25-hydroxyvitamin D measurements in comparability
 2 studies conducted by the Vitamin D Metabolites Quality
 3 Assurance Program

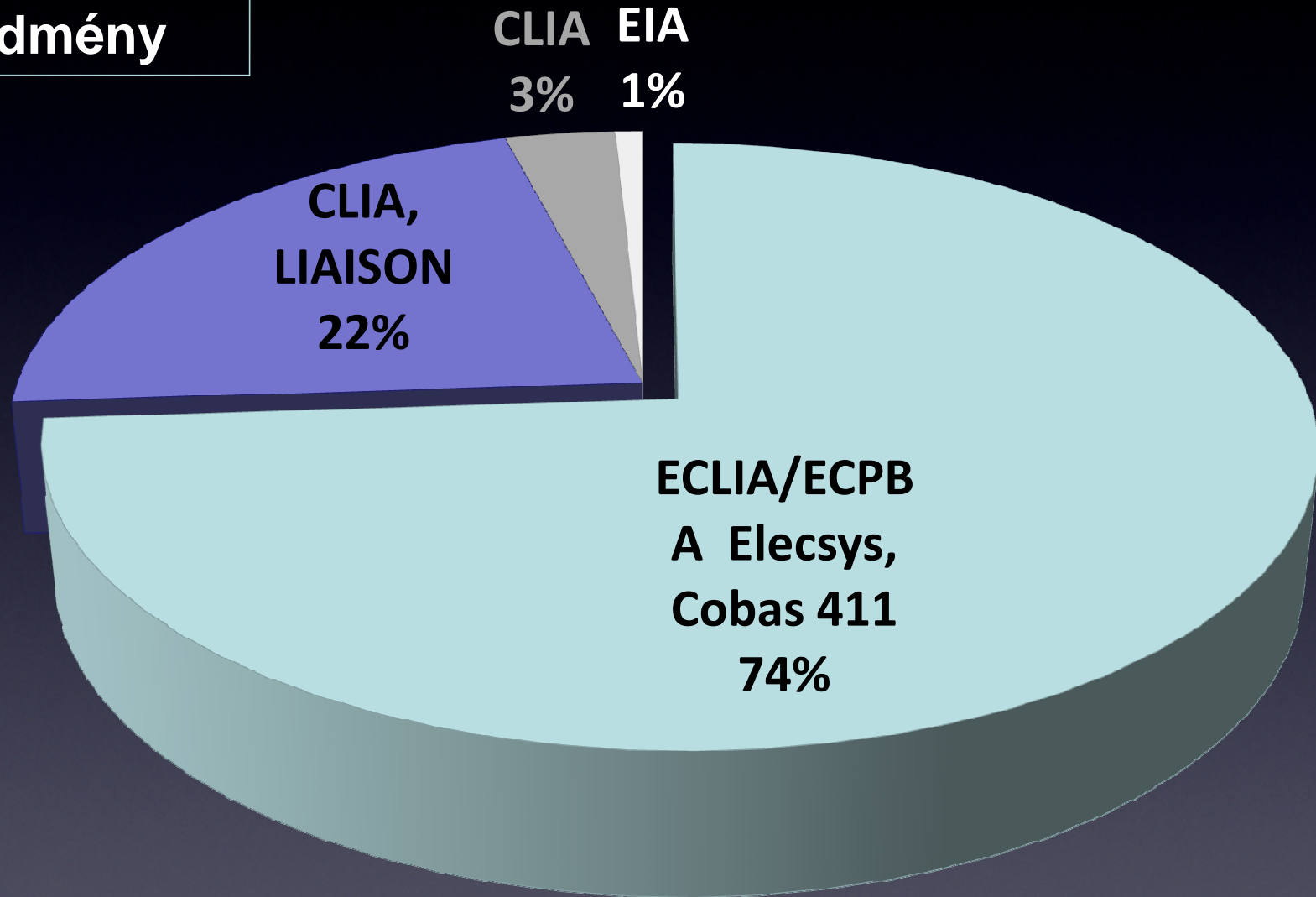
National Institute of Standards and Technology (NIST) Material Measurement Laboratory, Chemical Sciences
 Division, United States

Hazánkban leggyakrabban
alkalmazott két módszerrel
mért 25(OH)D szintek
összehasonlítása:

LIA, DiaSorin és PBA, Roche

Alkalmazott módszerek: 25OHD

N=246
eredmény





LIA-DiaSorin és BP-Roche módszerek közötti különbségek

	<i>DiaSorin</i>	<i>Roche</i>
Funkcionális szenzitivitás	5,4 nmol/l* 20%-os inter-assay precizitásnál	12,5 nmol/l 30%-os totál precizitásnál
Mérési tartomány	5,4-375 nmol/l	~7.50-175 nmol/L

Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 136 (2013) 139–145

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

 **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** 

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb

Review

Evaluation of two automated immunoassays for 25-OH vitamin D: Comparison against LC-MS/MS

Shilen A. Hsu^a, Joshua Soldo^{b,*}, Manjula Gupta^a

25-(OH)D-vitamin módszerek antitestjei eltérő arányban keresztreagálnak a metabolitokkal

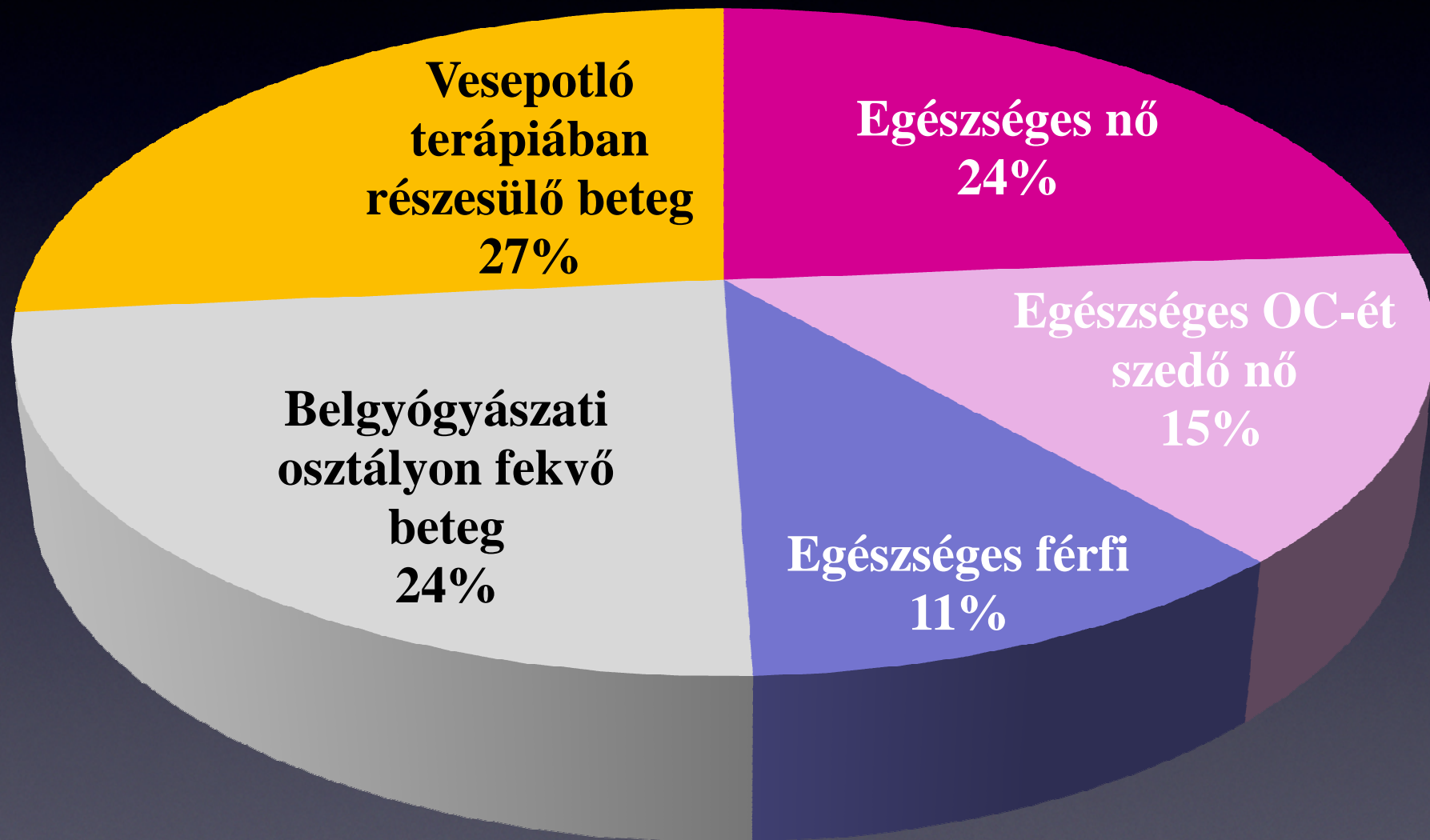
Keresztreakciók >50-100 ng/ml koncentráció viszonyokra vonatkoznak

Gyártók, Módszer	25(OH)D ₂	25(OH)D ₃	3-epi- 25(OH)D ₃	24,25 (OH) ₂ D	D2, D3 substitutio
DiaSorin RIA LIA	102%	100%	0%	0%	0,8%
Roche 25(OH)D ECLPB	81%	98%	93%	121%	<6%

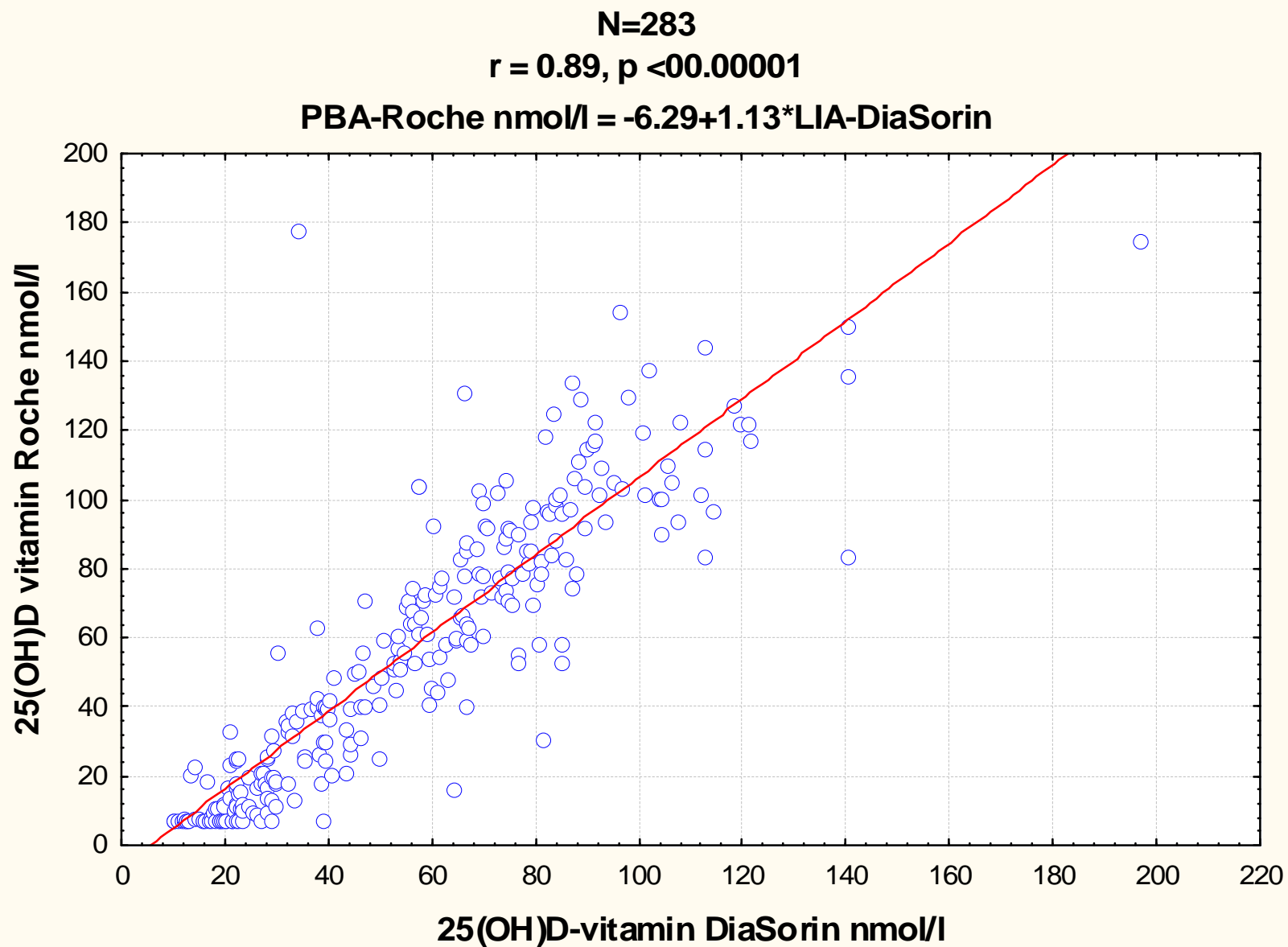
1 µg = 40 IU Calciferol – 1000 NE = 25 ug ~3,3 ng/ml vérszint

Két módszer összevetése

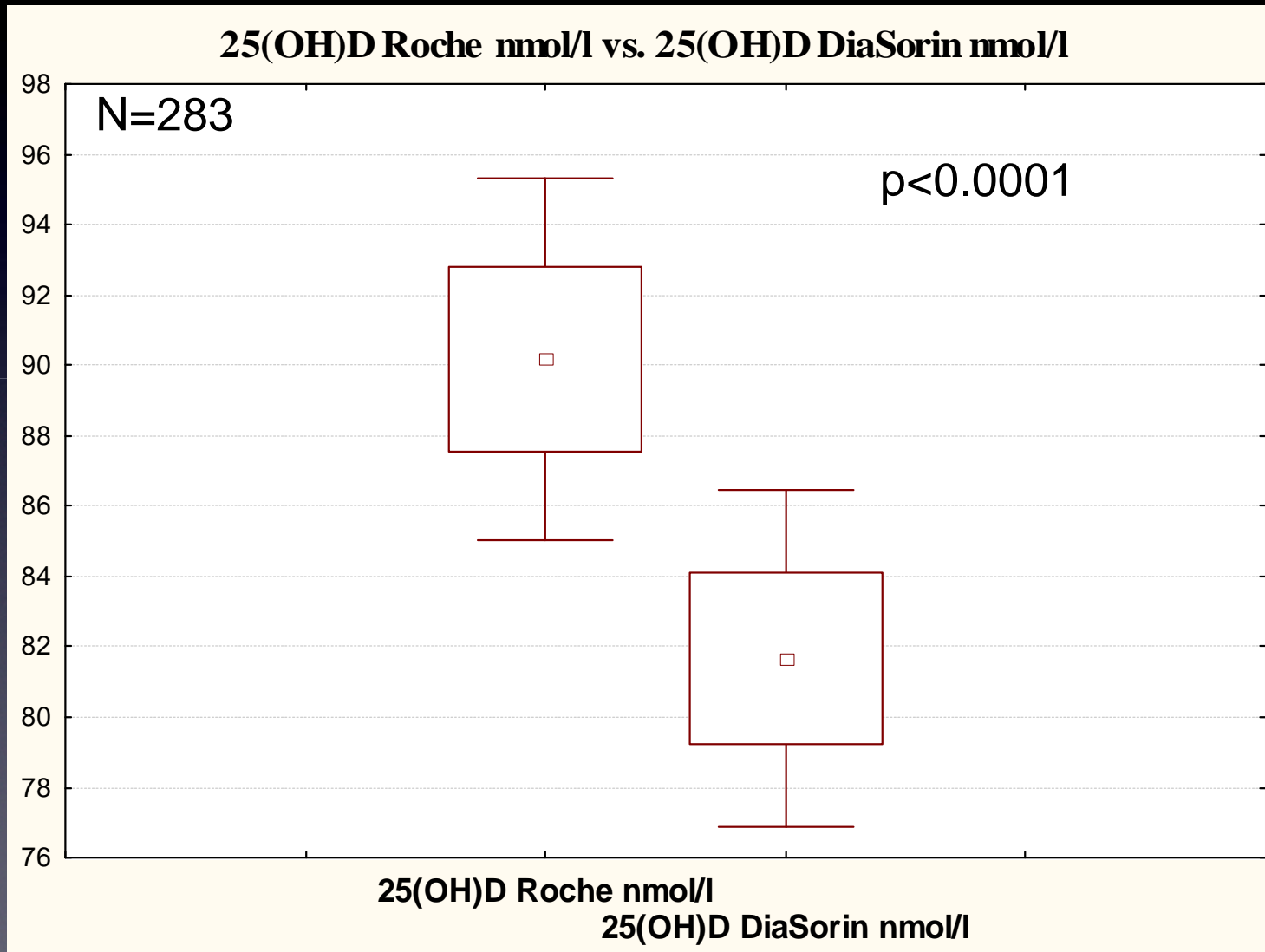
N=283



Két módszer közötti korreláció

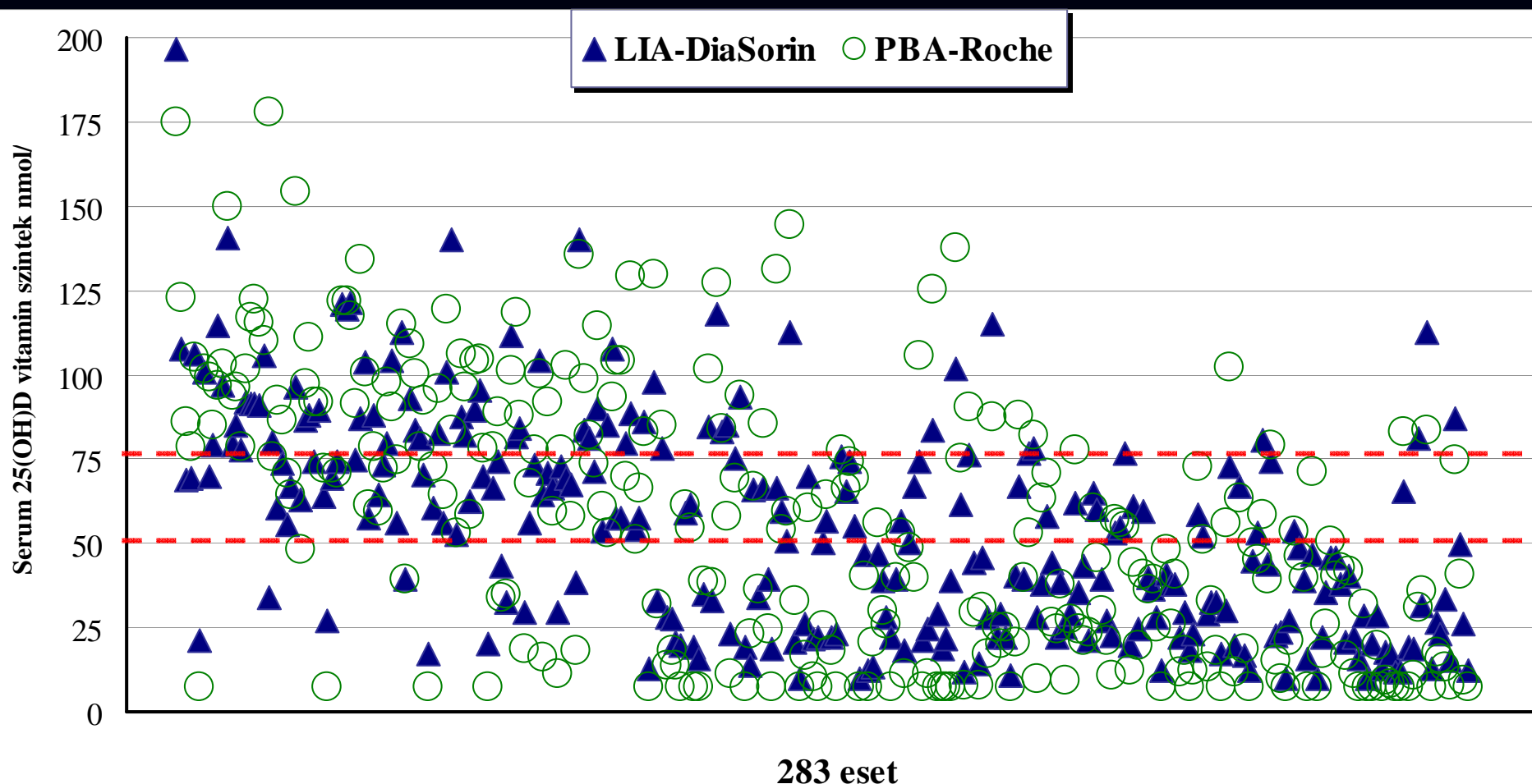


Két módszerrel mért 25(OH)D szintek közötti eltérés



DiaSorin-LIA és Roche-PBA 80%-ban (227 esetben) leletazonosságot mutat.

A fennmaradó 55 esetben a PBA 34 esetben felülértékeli a D vitamin
ellátottságot, viszont 21 esetben alul a LIA módszerhez képest,
klinikai állapottól függetlenül

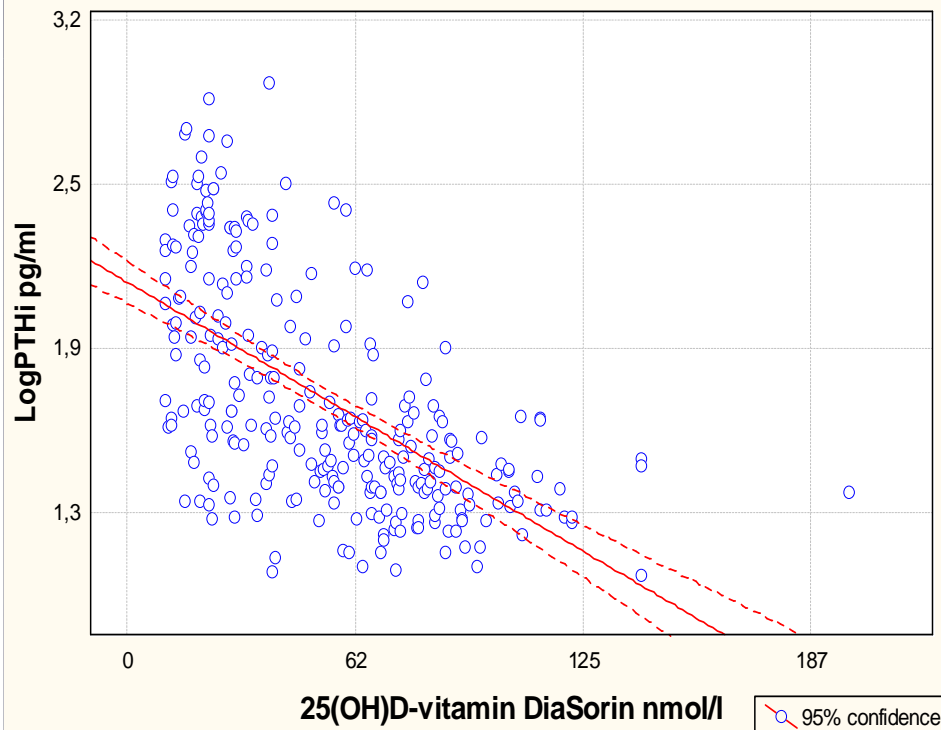


Plauzibilitási vizsgálat: Összefüggés a D-vitamin szintek és a PTHi leletek között (N=283)

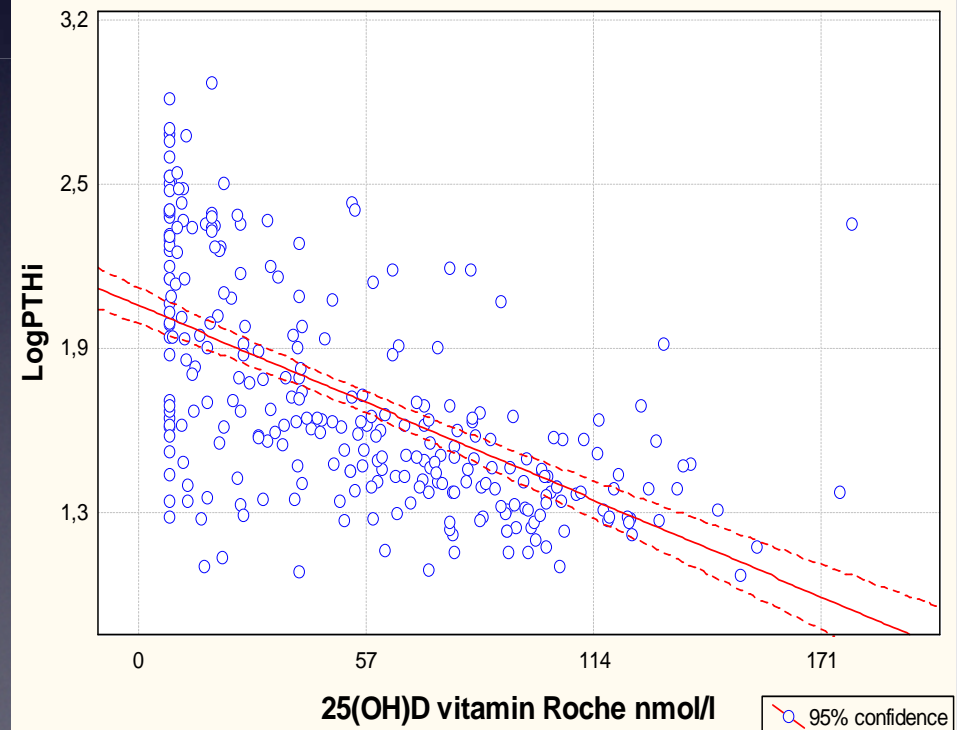
LIA

PBA

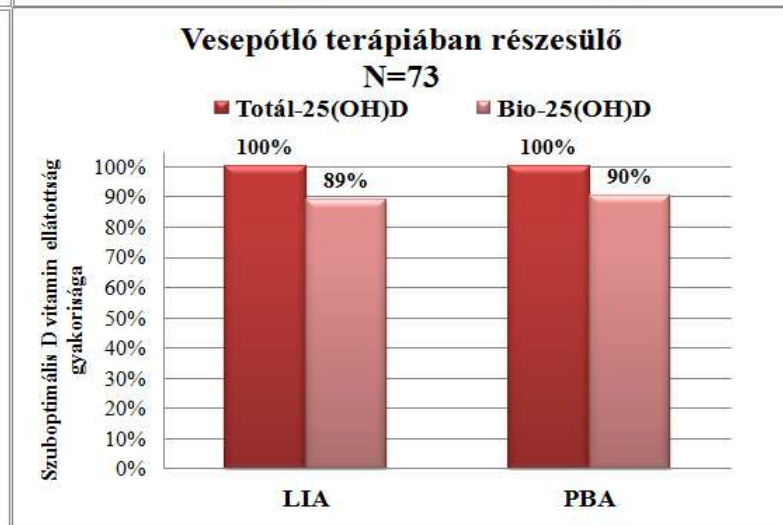
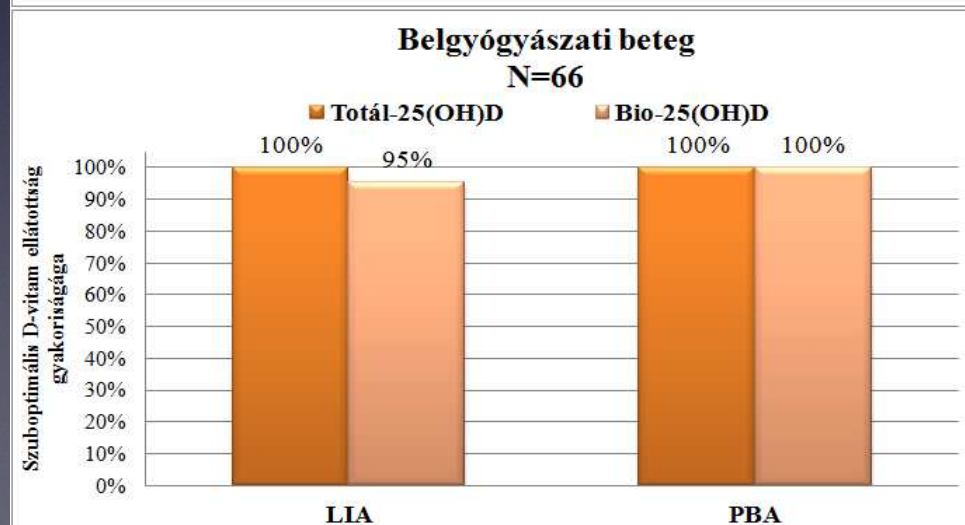
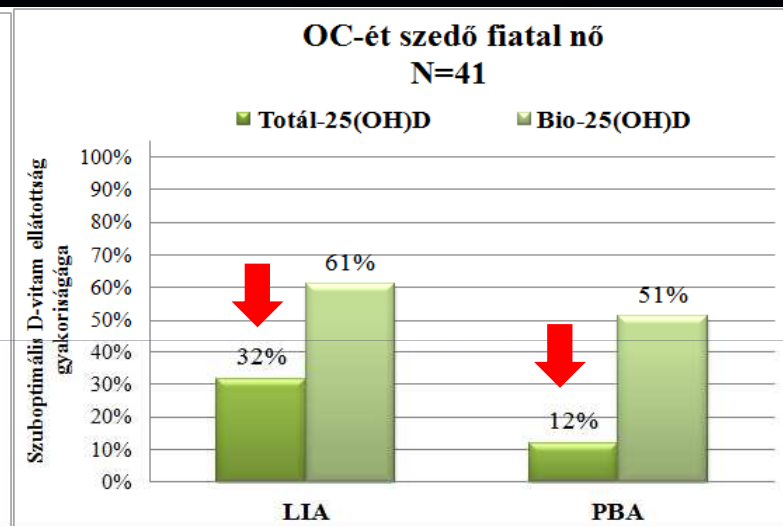
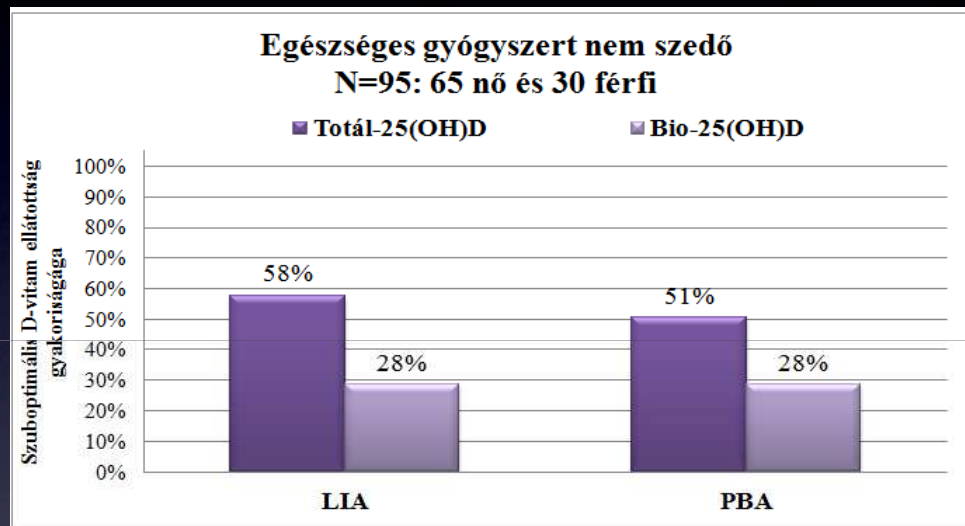
LogPTHi pg/ml = 2.1570 - .0083 * 25(OH)D-vitamin DiaSorin nmol/l
 $r = -0.60$; $p < 0,001$



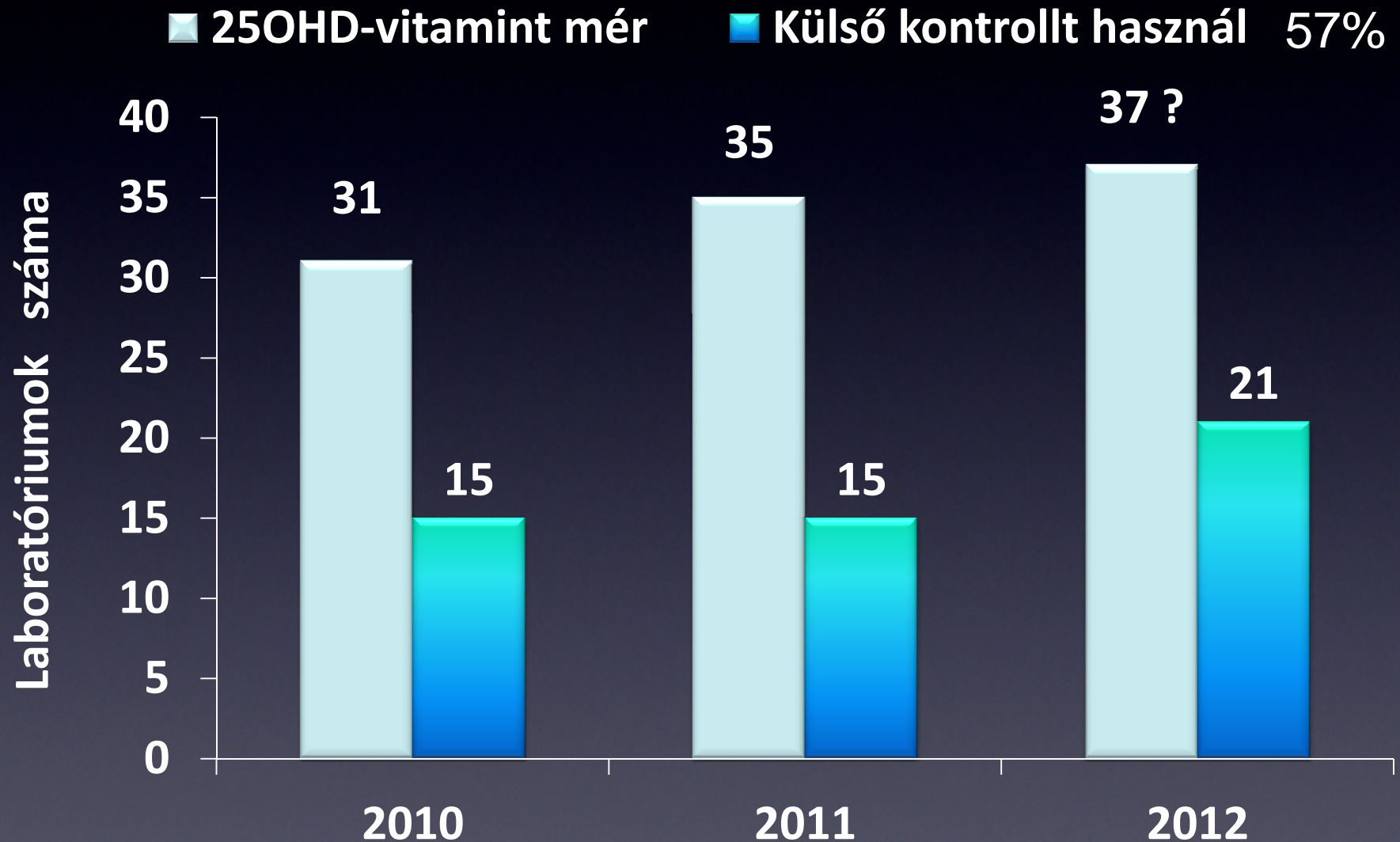
LogPTHi pg/ml = 2.0672 - .0066 * 25(OH)D vitamin Roche nmol/l
 $r = -0.60$; $p < 0,001$



Két módszer összevetése: szuboptimális totál- és bio-25(OH)D-vitamin ellátottság előfordulása egészséges- és beteg- esetekben.

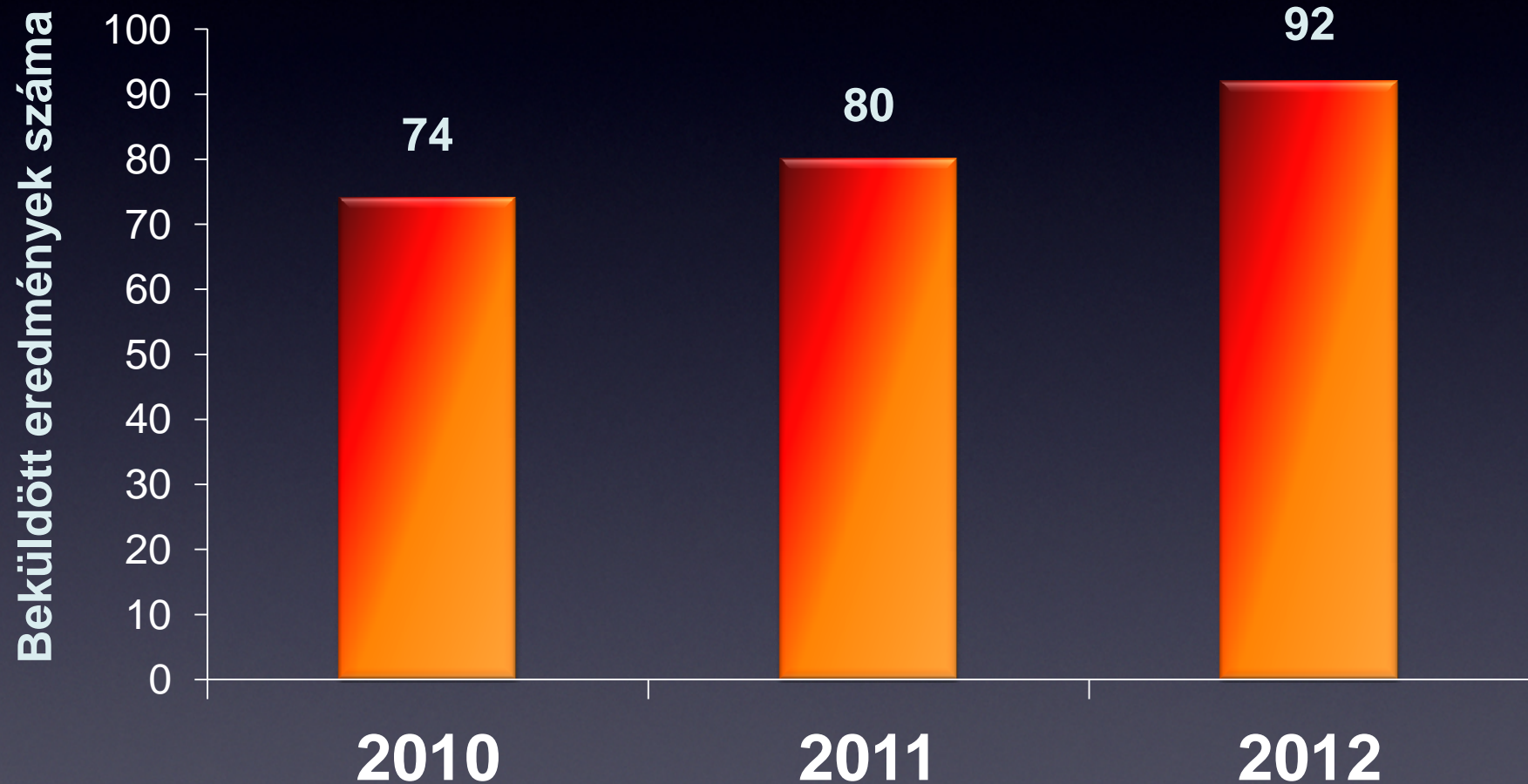


25(OH)D szinteket mérő és QualiCont kontrollt használó laboratóriumok száma



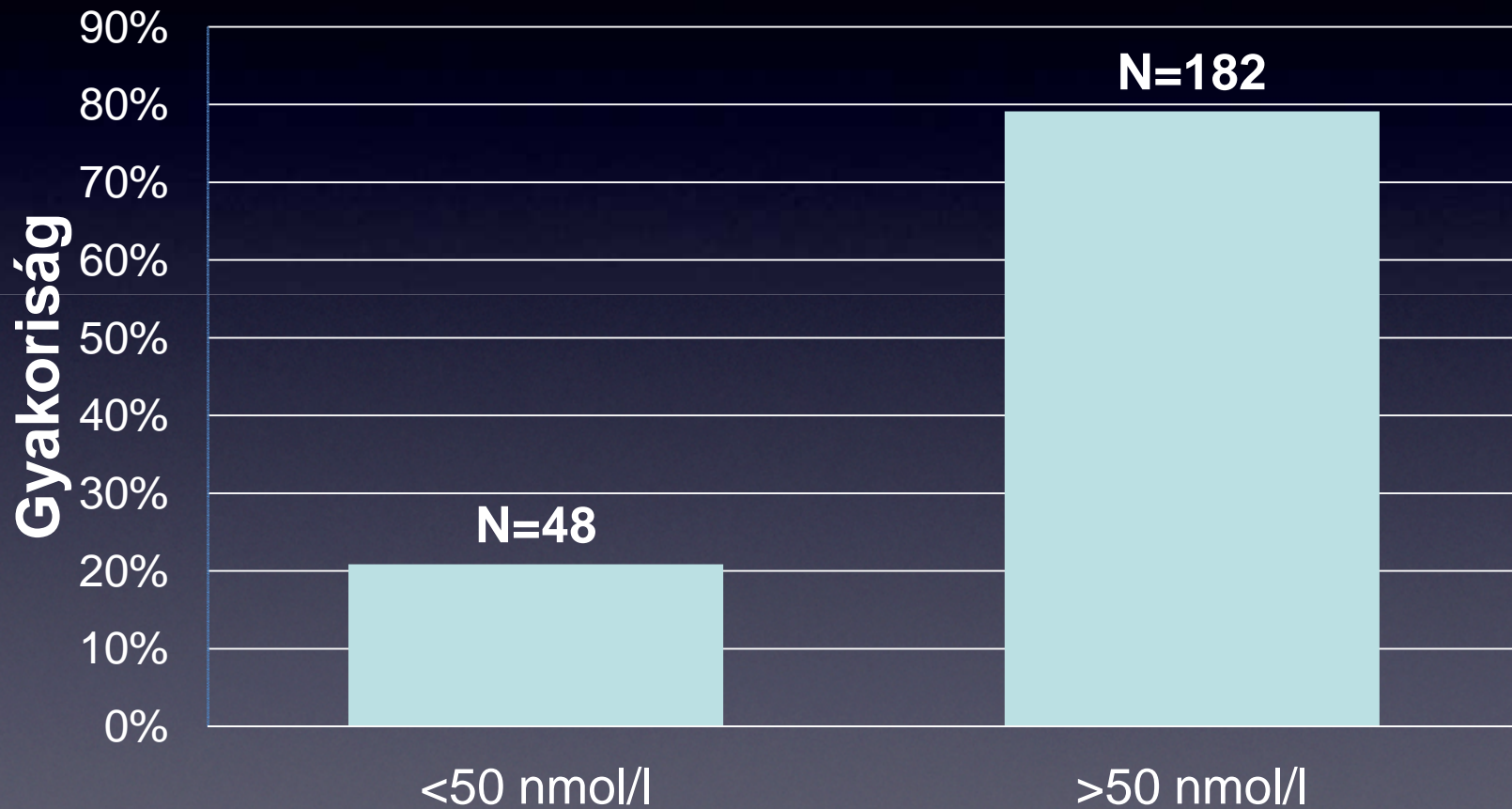
QuliCont-hoz beküldött eredmények az elmúlt három évben : **25OHD-vitamin**

összesen 246 beküldött eredmény



A körkontroll szérumok mérési tartományai: 25OHD-vitamin

Összesen 230 Kontroll szérum

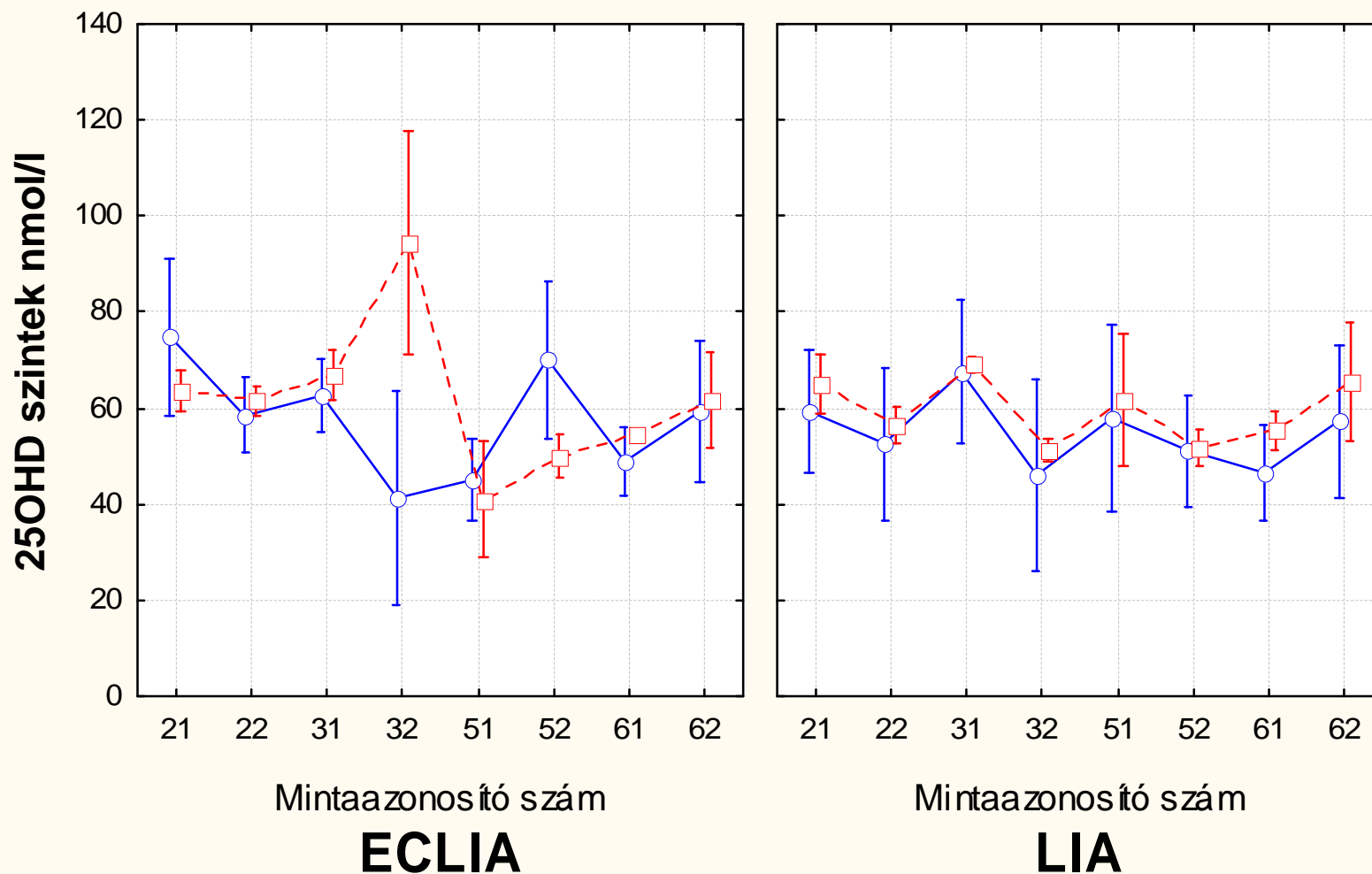


25OHD vitamin mérési tartományok

viszonya a két leggyakrabban alkalmazott módszer esetében

25OHD szintek eltérése a célértéktől két módszer esetében
Középtételek és Conf. Intervals (95%)

—○— Eredmények -□- Célértékek



Következtetések-két 25OHD módszer I.

- A két módszer kiváló korrelációt mutat egymással, de a PBA-val magasabb szintek mérhetőek, mint LIA-val.
- Összességében mindkét módszer kiváló, biológiába illő korrelációt mutat a PTHi szintekkel.
- DiaSorin-LIA és Roche-PBA módszer az esetek 80%-ában leletazonosságot mutat.
- A nem egybehangzó leletek többségénél (62%) a BP módszer inkább felülértékeli a D vitamin ellátottságot a LIA módszerhez képest.

Következtetések: két 25OHD módszer II.

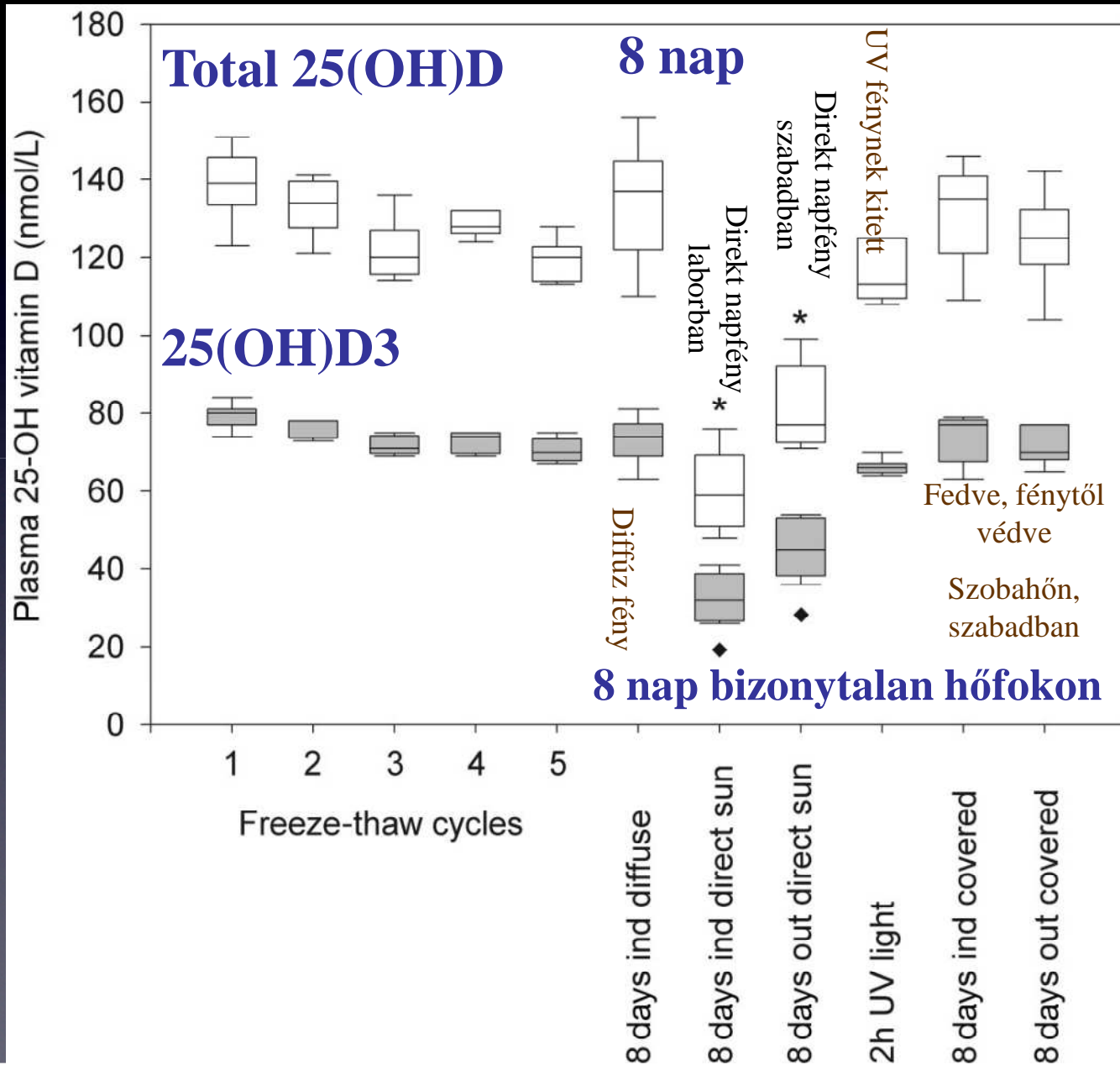
➤ A nem egybehangzó leletek magyarázata lehet:

- 1.) konszenzus által javasolt cutoff értékeket használunk és nem módszerspecifikus referencia tartományokat,
- 2.) nem vesszük figyelembe a D-vitamin kötőfehérjékben (DBP+Albumin) beálló egyedi ingadozásokat.

➤ A két módszer a bio-25(OH)D- szint alapján minden klinikai szituációban közel azonosnak ítéli meg a vitaminellátottságot.

➤ Mindkét módszer esetében javasolt a bio-25(OH)D meghatározása fokozott E2 hatásban.

Preanalitikai megfontolások: Clin Chem 2008. 54:1 Lewis JG. Rlder PA.



Módszer:
HPLC-MS/MS

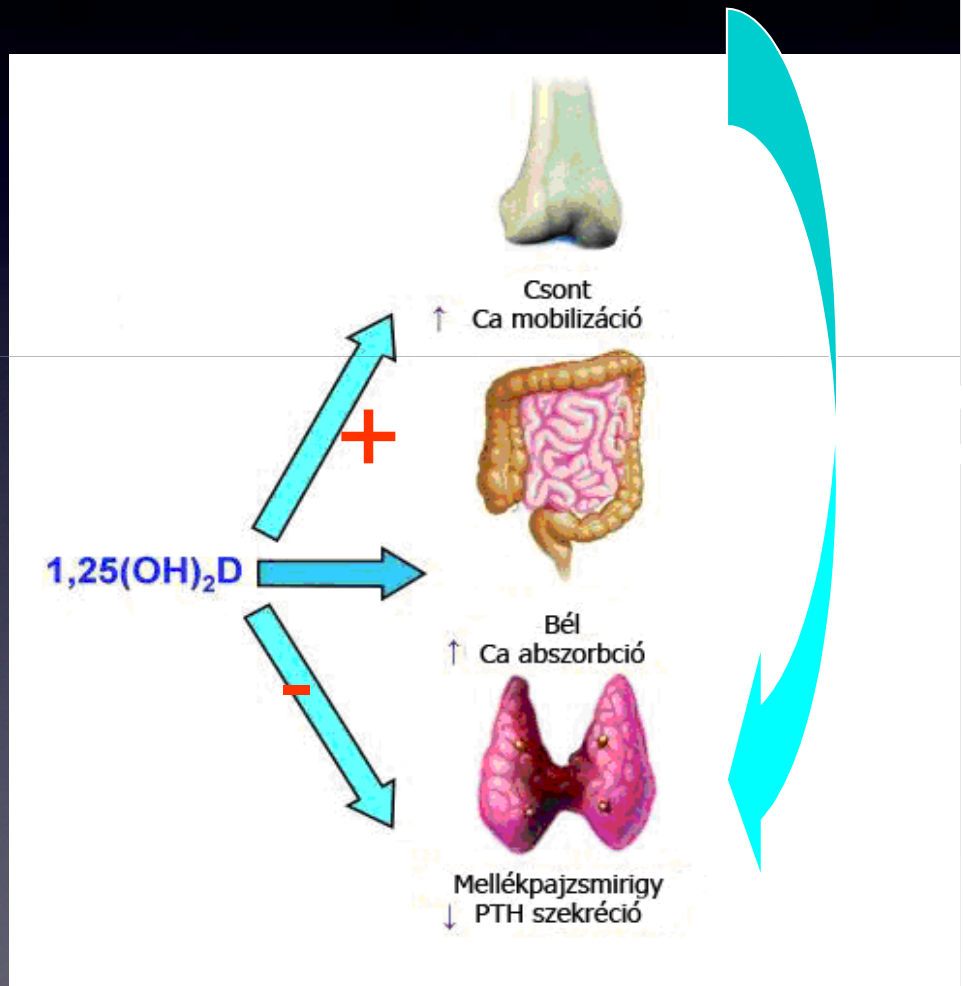
A 25(OH)D szintek döntéshozatali határértéke

Ismerjük?

A plazmában keringő összes 25(OH)D- vitamin optimális értéke

Felette már nincs
kompenzatorikus PTH-szint
emelkedés, amit az alacsony
szérum Ca-szint okozna

Optimális: >75 nmol/l
Elégtelen: 50- 75 nmol/l
Hiányos: <50 nmol/l



Irányelvekben nincs egység a döntéshozatali határértékekben

MF. Holick et al 2011; 96
J Clin Endocrin Metab

Mayo Clin Proc. 2011;86(1):50-60

Clinical Practice Guideline

Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline

assay, to evaluate vitamin D status in patients who are at risk for vitamin D deficiency. Vitamin D deficiency is defined as a 25(OH)D below 20 ng/ml (50 nmol/liter), and vitamin D insufficiency as a 25(OH)D of 21–29 ng/ml (525–725 nmol/liter). We recommend against using the serum 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)₂D] assay for this purpose and are in favor of using it only in monitoring certain conditions, such as acquired and inherited disorders of vitamin D and phosphate metabolism (1|⊕⊕⊕⊕).

More recently, the criterion for optimal vitamin D status has moved away from being defined as the 25(OH) D concentration needed to achieve skeletal health to that which demonstrates optimal benefits on nonskeletal health outcomes.

Egészségre alapozott határértékeket javasolnak, de csak populációs és ajánlott 25OHD értékek állnak a rendelkezésre

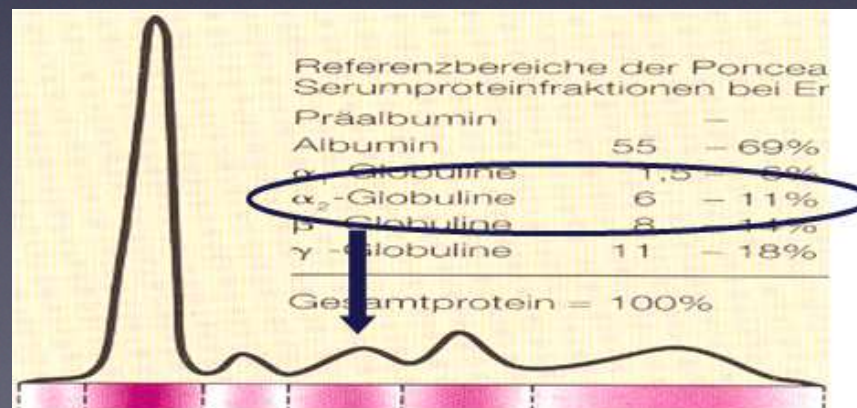
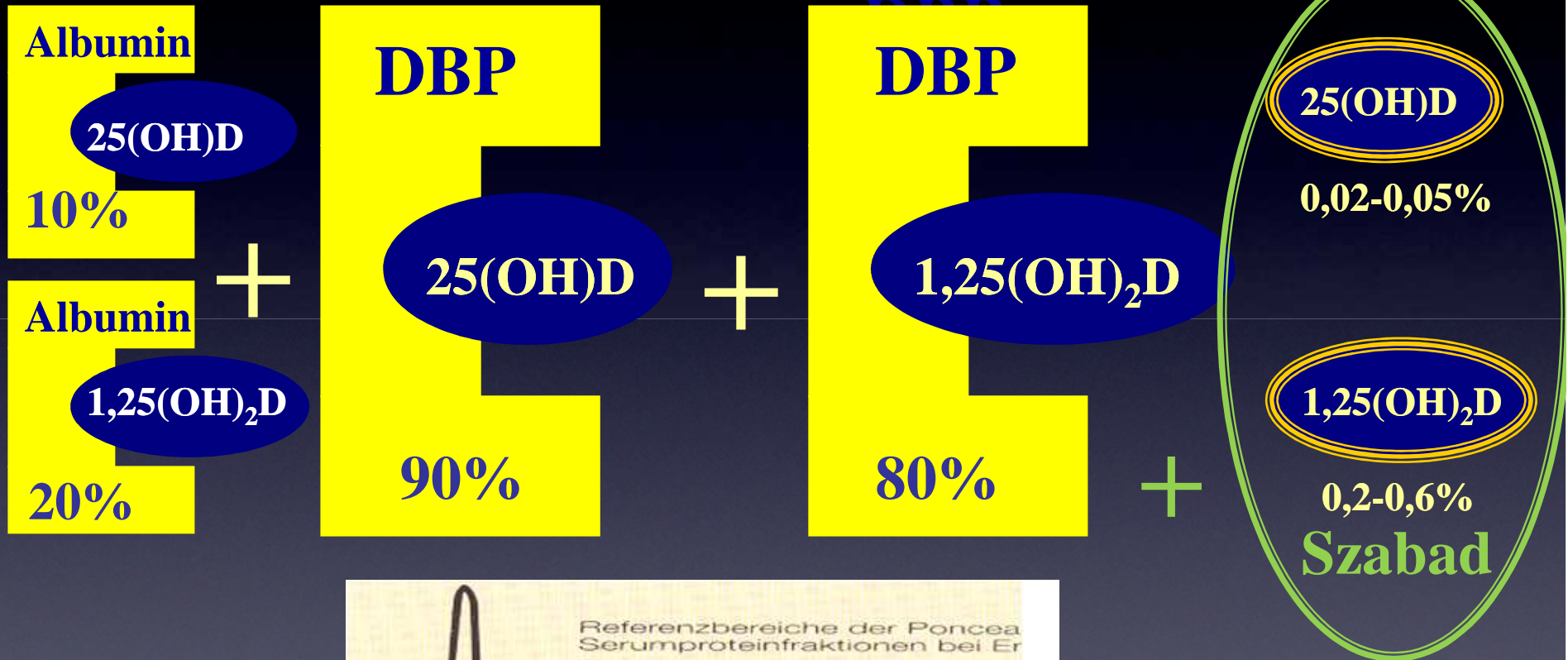
Szakmai irányelvek korlátai

- A döntéshozatali határértékeket módszertől függetlenül definiálják.
- Csak a totál-25-hidroxi-D szintek alapján ítélik meg a vitamin ellátottságot
- Nem veszik figyelembe a normálistól eltérő, fehérje frakciók megváltozásából adódó egyéni különbségeket

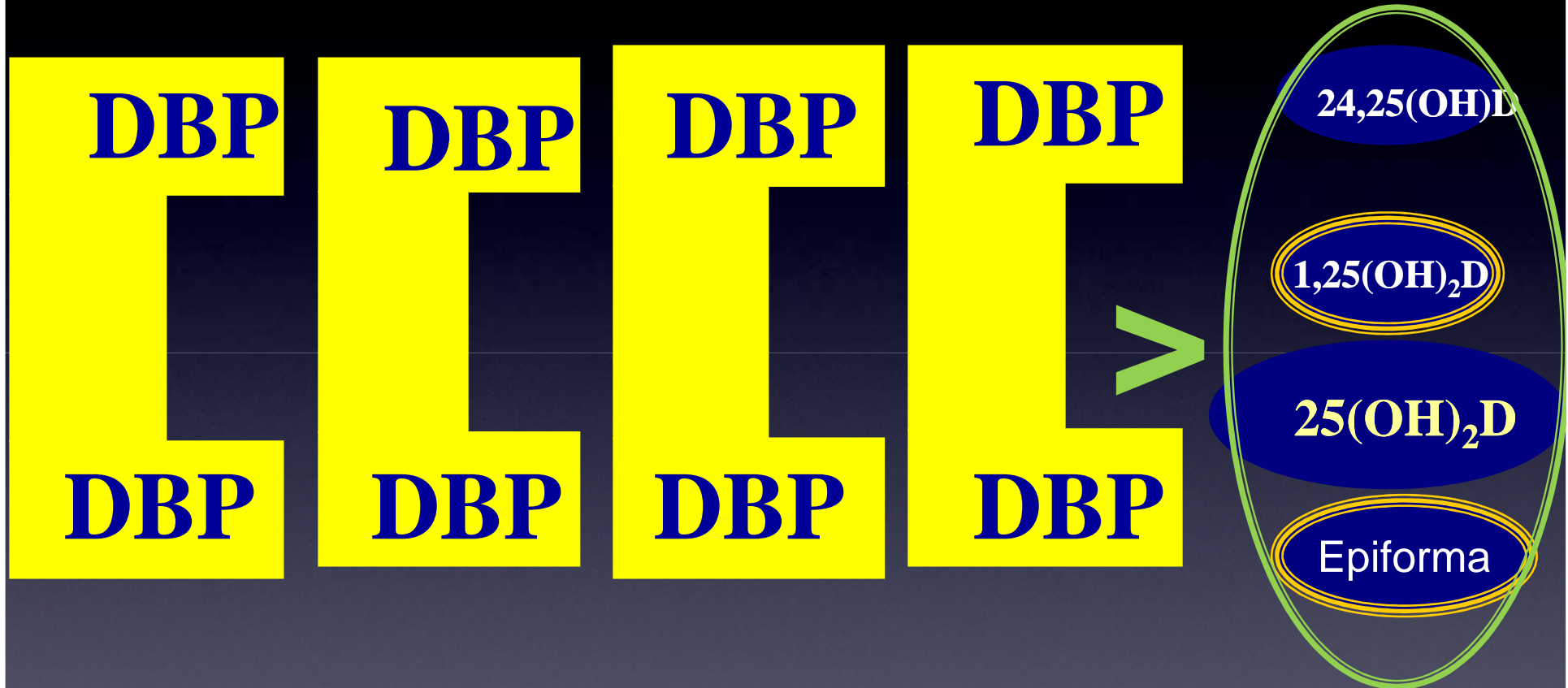
**A D-vitamin és a kötőfehérjék kapcsolata:
helyes-e az összes 25(OH)D szintek alapján
megítélni a D-vitamin ellátottságot?**

In vivo interakciók:

a cirkuláló 25(OH)D és 1,25(OH)₂D vitamin többsége (99%) transzport proteinhez kötött



DBP koncentrációviszonya a vérben több mint 20-szor nagyobb, mint az összes D-metabolit



Koncentráció: 4-10 vs. 0,19-0,48 μM

Biol.féléletidő: 1-2 vs. 20 nap

Mit tudunk jelenleg a DBP-ről?

Szintézisének helye:

főként a máj, de a vesében, gonádokban, zsírszövetben, fehérvérsejtekben is.

Kiterjedt polymorphismust mutat:

>120 ritka variáns

leggyakoribb izoformjai - fajonkénti varianciát mutat

Gc1F, Gc1S, Gc2

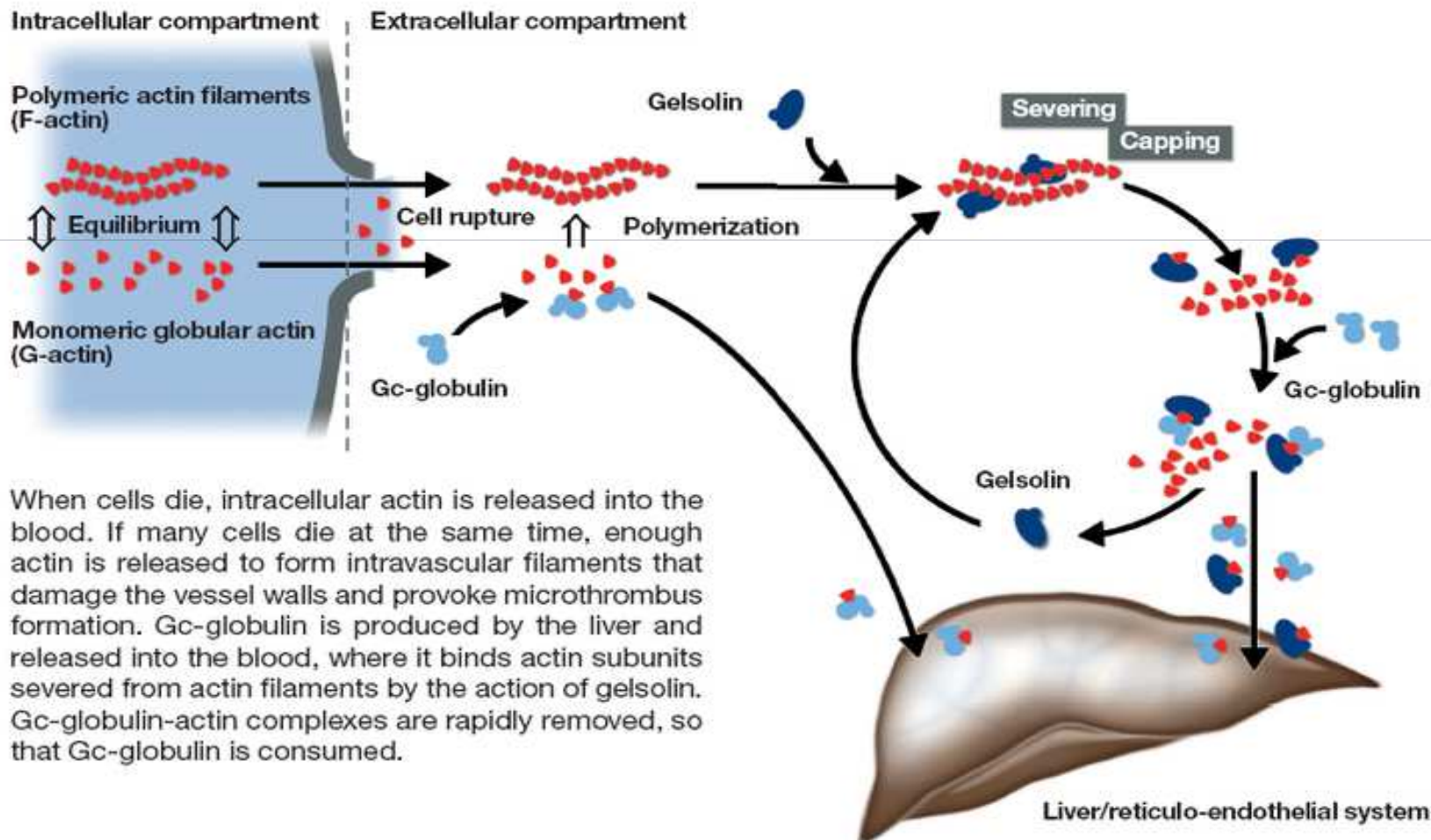
Kapcsolat áll fenn a DBP polymorphismusa és egyes

betegségek iránti fogékonyság között : osteoporosis, diabetes, thyreoiditis, SM, AIDS, RA, sarcoidosis.

DBP FUNKCIÓI - 1.

Extracelluláris aktin-eltávolító funkciója

The extracellular actin scavenging system



DBP FUNKCIÓI -2.

- **Erősíti a komplement faktor 5- peptidek kemotaktikus aktivitását**
- **Pozitív akut fázis protein: szintjük jól korrelál egyes gyulladásos betegséggel (pl. peritonitis, periodontitis).**
- **Megköti a zsírsavakat,**
- **Stimulálja az osteoclastokat**

DBP genotípustól függő funkciói- 3.

- **Aktiválja az in nate immunválaszt, modulálja a monocyta választ.**
- **Aktiválja a macrophagokat (MAF aktivátor)**
 - Különböző affinitással kötődik a D-vitaminhoz és analógjaihoz az N-terminális régióban az $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ kisebb affinitással kötődik, mint a $25(\text{OH})\text{D}$
- **Nélkülözhetetlen szerepe van a D-vitamin biológiai hasznosításában,**
 - amellet, hogy pl. Cirrhosisban a kötőhelyeinek csak 5% -a van telítve D-vit. metabolittal, az $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ és egyéb dehidroxilált metabolitok csak általa képesek eljutni a célszervhez,
 - **Növeli a 25OHD biológiai féléletidejét**
- **Szállít: D-vitamint és endotoxinokat,** különböző affinitással kötődik a D-vitaminhoz és analógjaihoz az N-terminális régióban (Domén I).

Kapcsolat a cirkuláló összes és szabad 25(OH)D mennyisége, valamint a DBP kötőkapacitása között

Összes 25(OH)D
mennyisége ↓↓↓↓

Szabad 25(OH)D ↑↑↑
+
DBP -GC 2/2 forma **alacsony**
affinitással köti a 25(OH)D-t

Összes 25(OH)D
Mennyisége ↑↑↑↑

Szabad 25(OH)D ↓↓↓
+
DBP -GC 1F/aF forma **nagy**
affinitással köti a 25(OH)D-t

A szérum összes 25(OH)D szintet befolyásoló tényezők

Calciferolok:
D3, D2

25-hydroxylase
activity



Szérum
összes
25 (OH)D

FGF23



24,25 (OH)₂D

24-hydroxylase

1,25 (OH)₂D

1 alfa-hydroxylase

26-hydroxylase

Epimerase
enzimek aktivitása

25,26 (OH)₂D
3-epi25(OH)D

Szabad

Albuminhoz
kötött

DBP-hez kötött

Biológiailag
hasznosítható

DBP és albumin szintek ismeretével lehetőség van a biológiailag hasznosítható 25(OH)D kalkulálására

totál-25(OH)D nmol/l

DBP-hez
kötött
mg/l

Albuminhoz
kötött
g/l

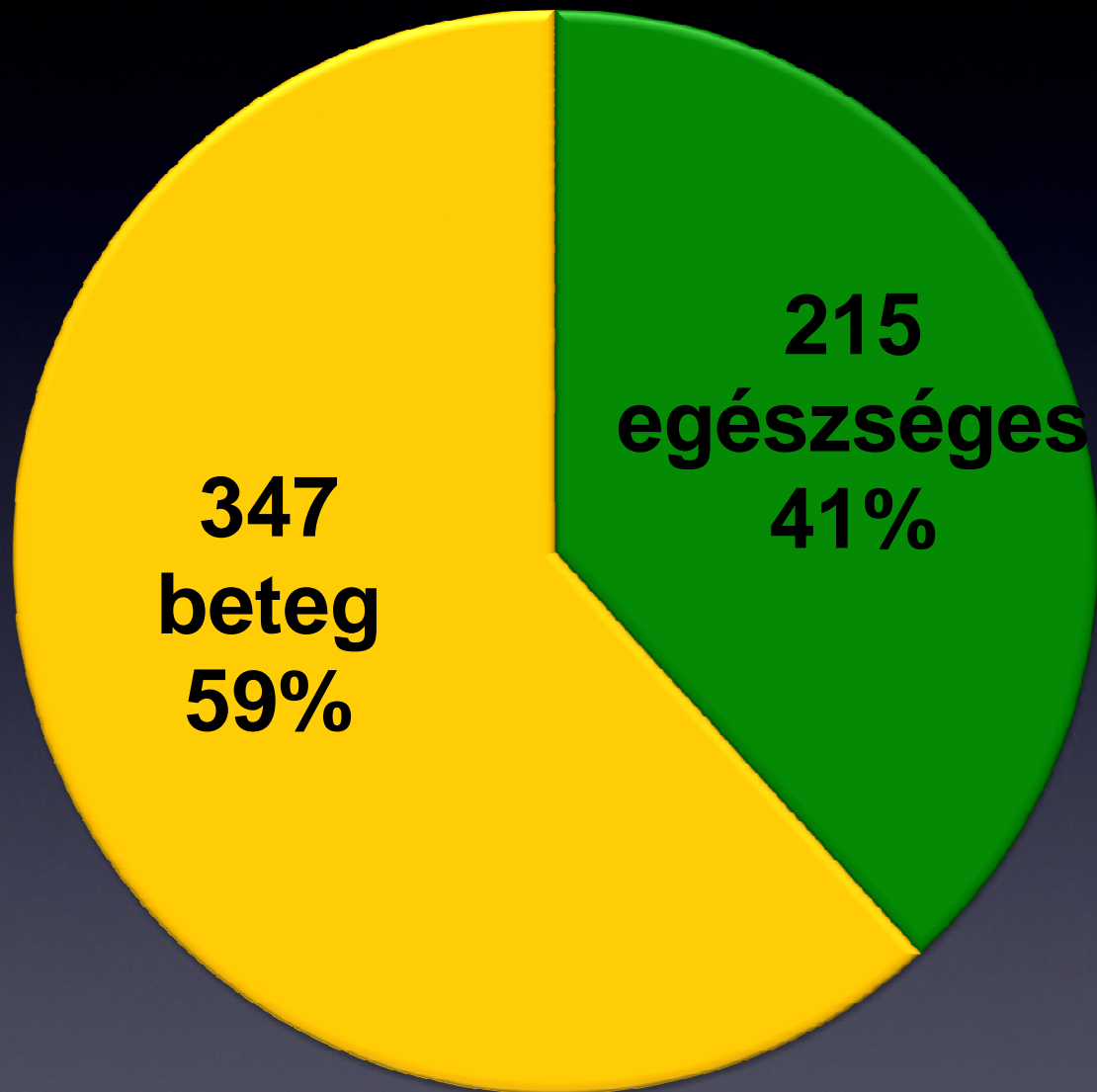
szabad-25(OH)D pmol/l
frakció
Sejtekbe bejut

bio-25(OH)D nmol/l
biológiailag hasznosítható frakció

25(OH)D-DBP kapcsolatának irányába történt vizsgálataink célja:

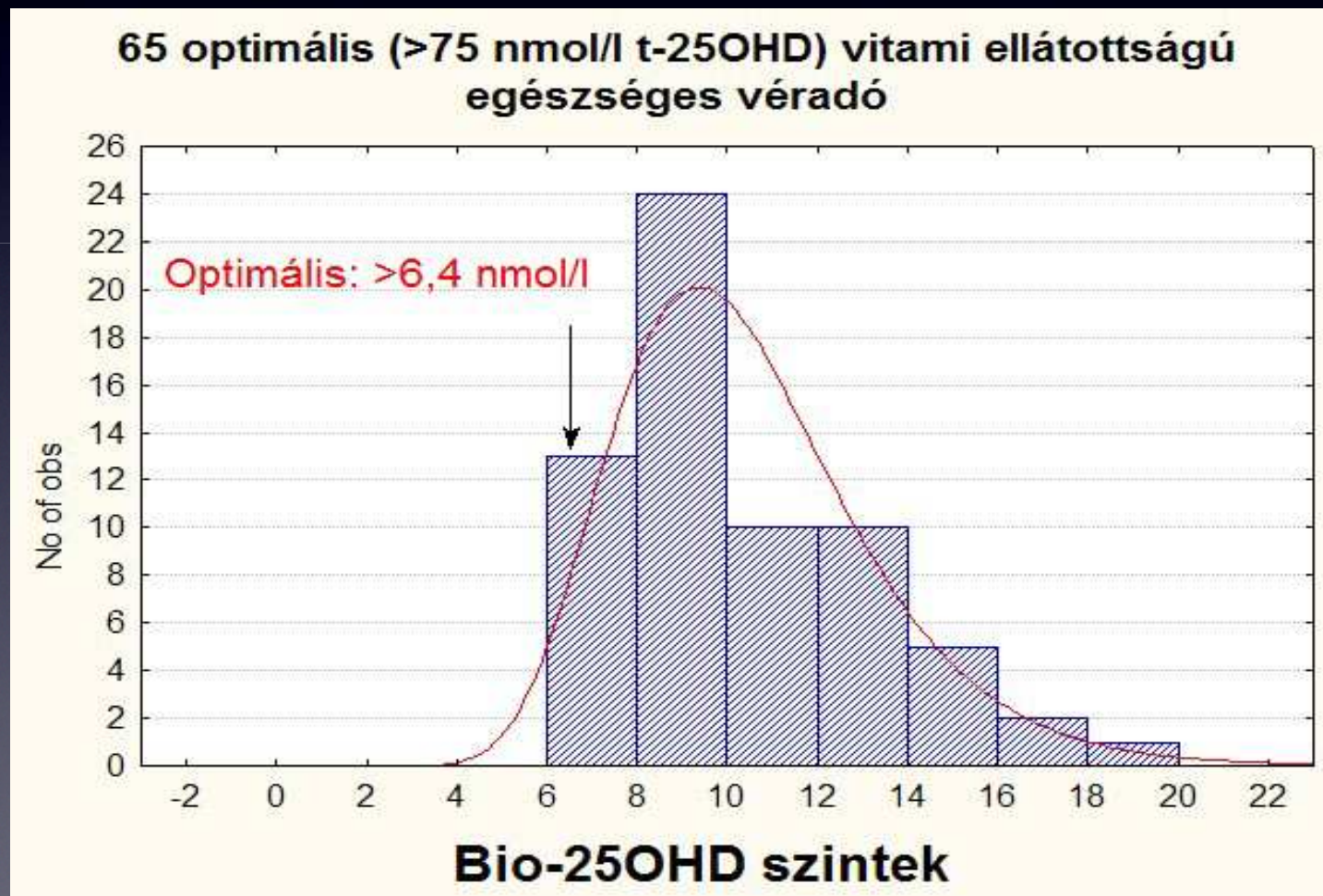
- Elemezni a totál- és bio-25(OH)D szinteket
 - Egészségesekben
 - Kórházban fekvő betegekben

Vizsgált 562 eset



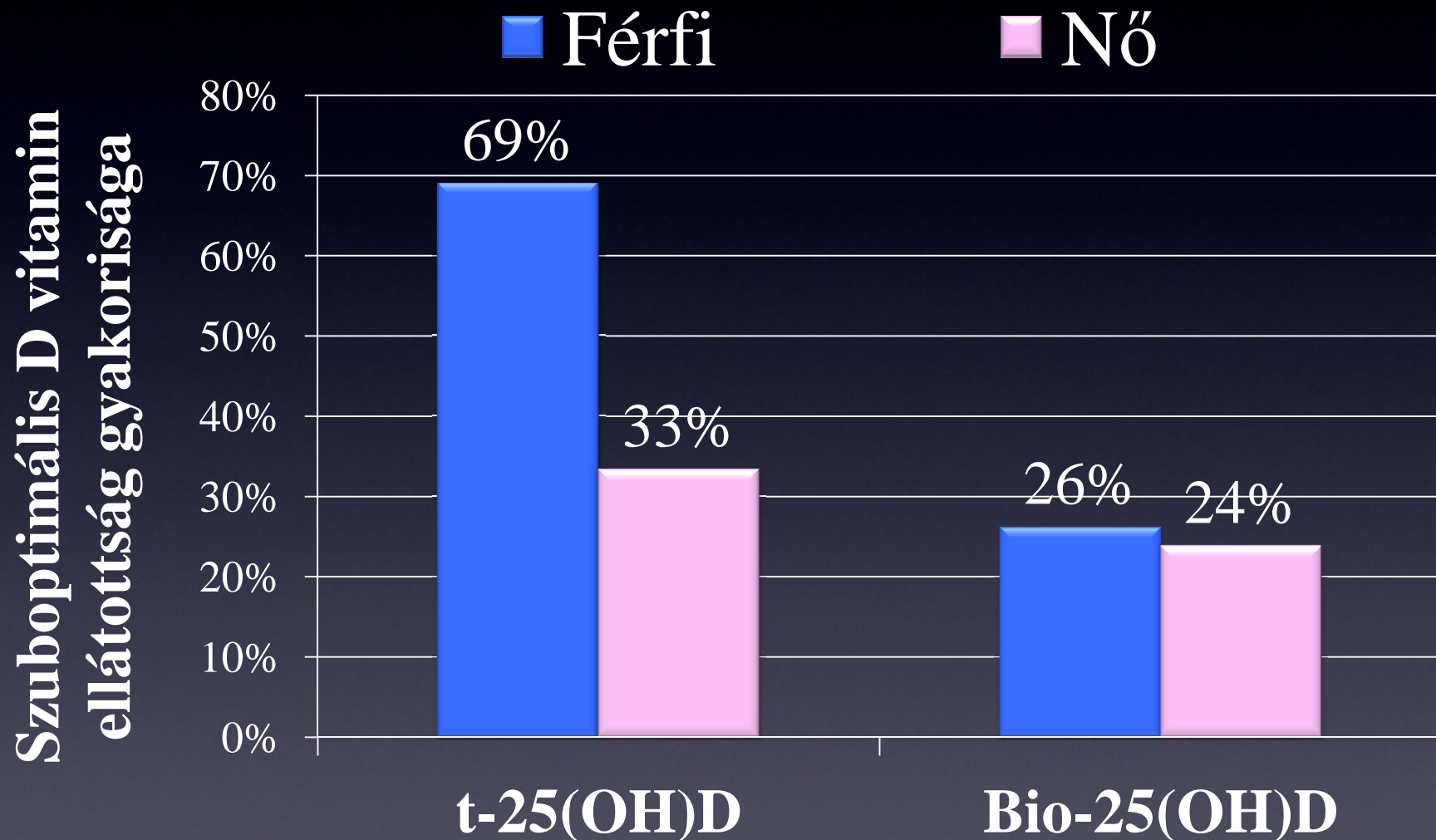
Eredmények értékelése biológiailag hasznosítható 25(OH)D vitamin

a mért 25(OH)D, DBP és Albumin szintekből *Powe C. E. és mtsai*
által definiált matematikai modell szerint

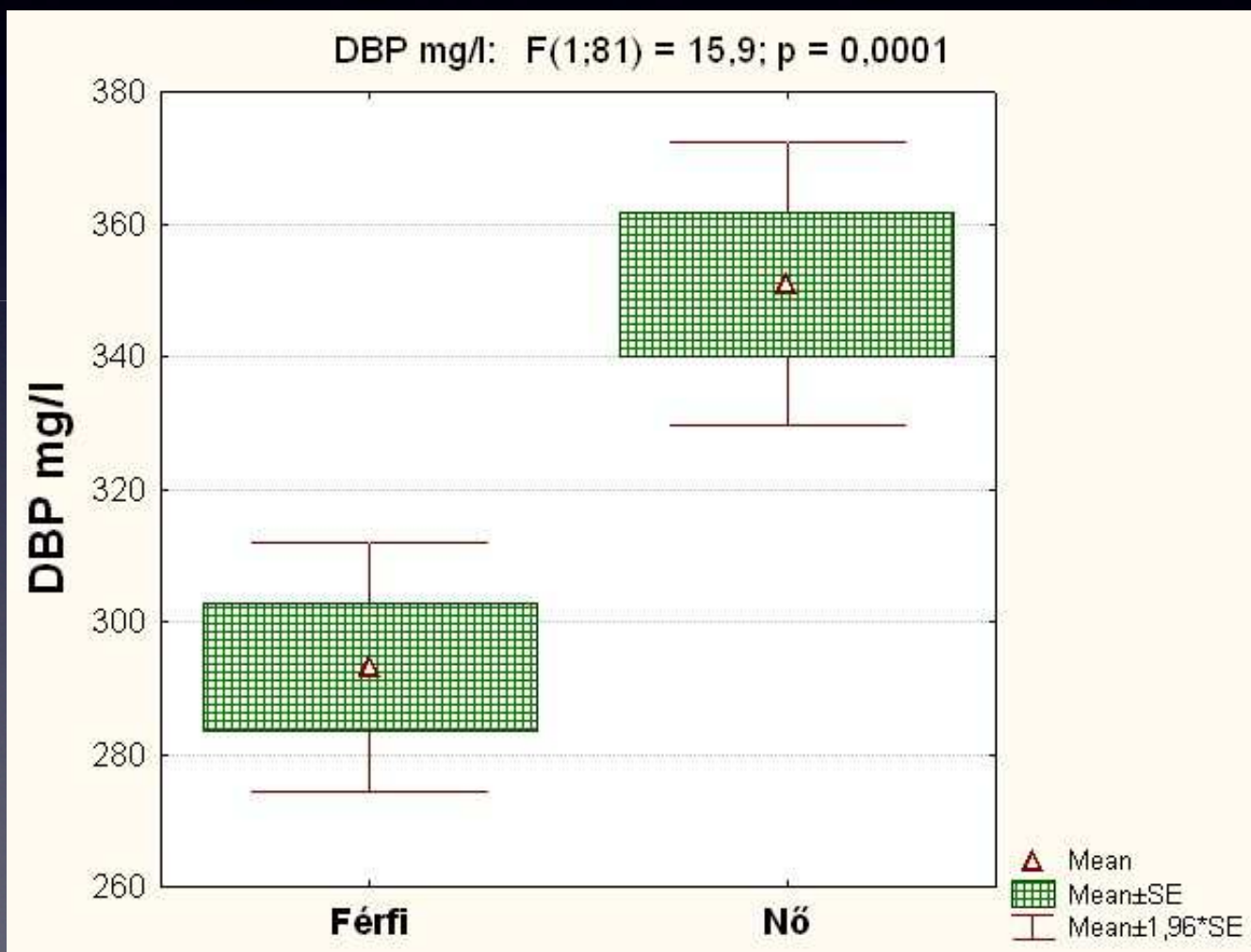


Egészségesek: Totál vs. Bio 25(OH)D

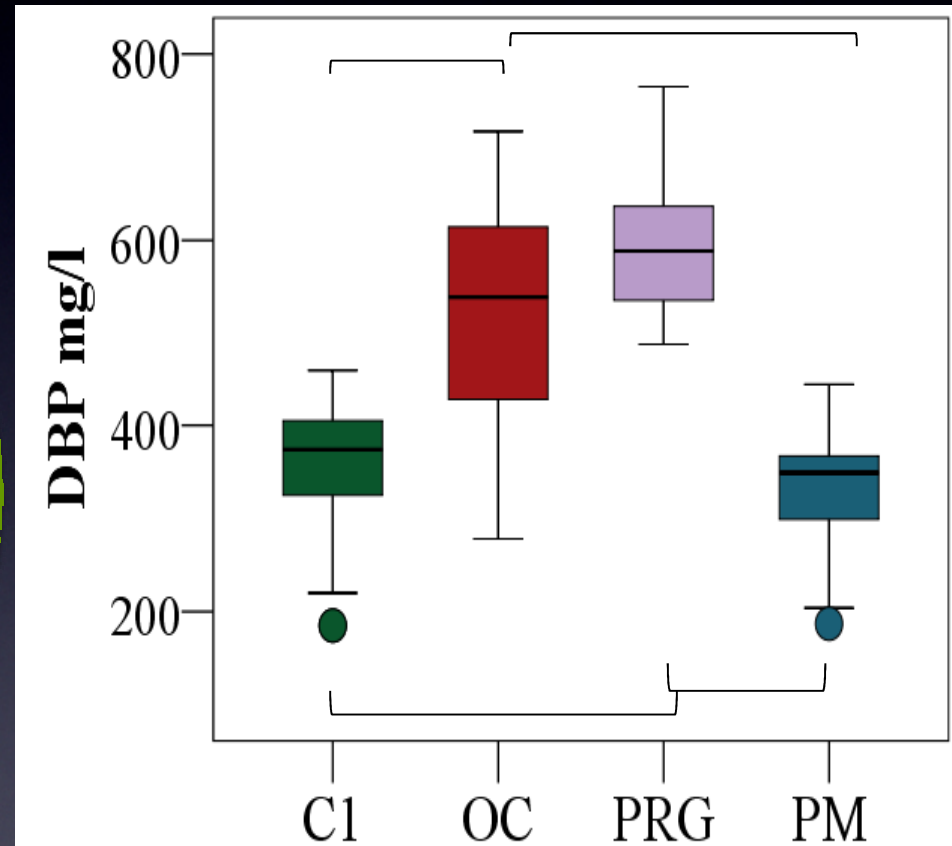
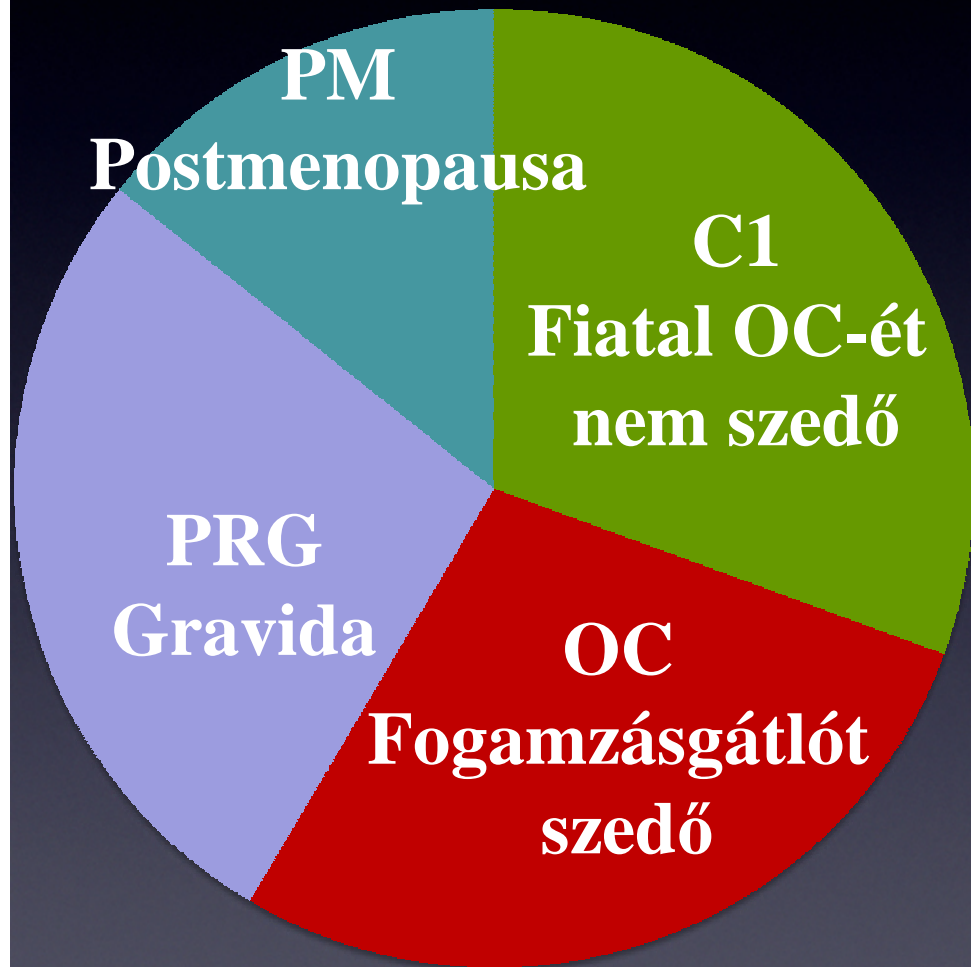
N=88 (44 ± 18 év)



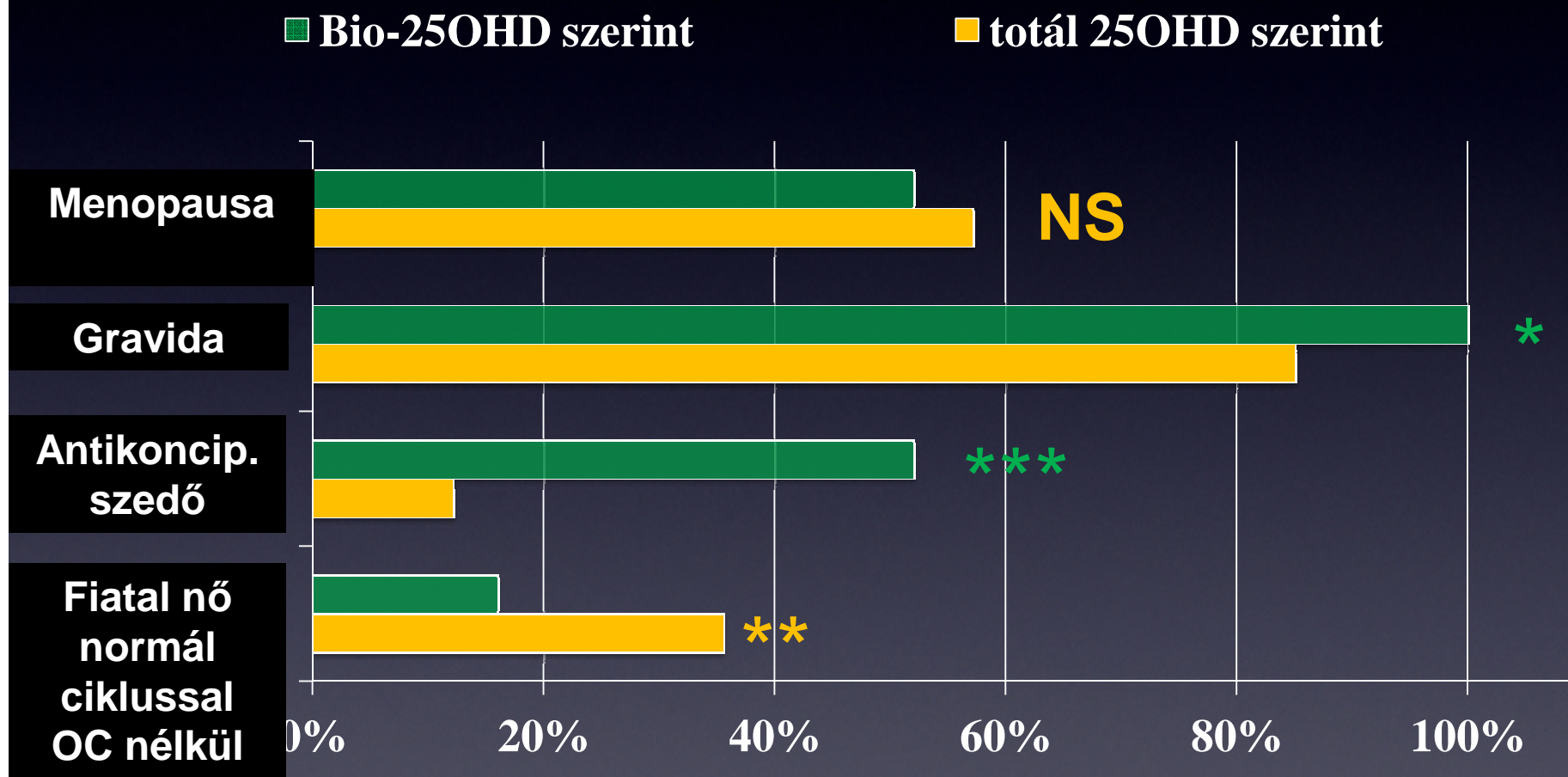
A nemek között szignifikáns különbség áll fenn a DBP-ben



Egészséges nők különböző reprodukciós állapotaiban (N=134)



Eltérő gyakoriság a szuboptimális D-vitamin ellátottságban egészséges nők különböző reprodukciós állapotaiban (N=134)



Szuboptimális D vitamin ellátottság gyakorisága

Különbség a D vitamin ellátottságban a fehér és sötétbőrű etnikumok között ???

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

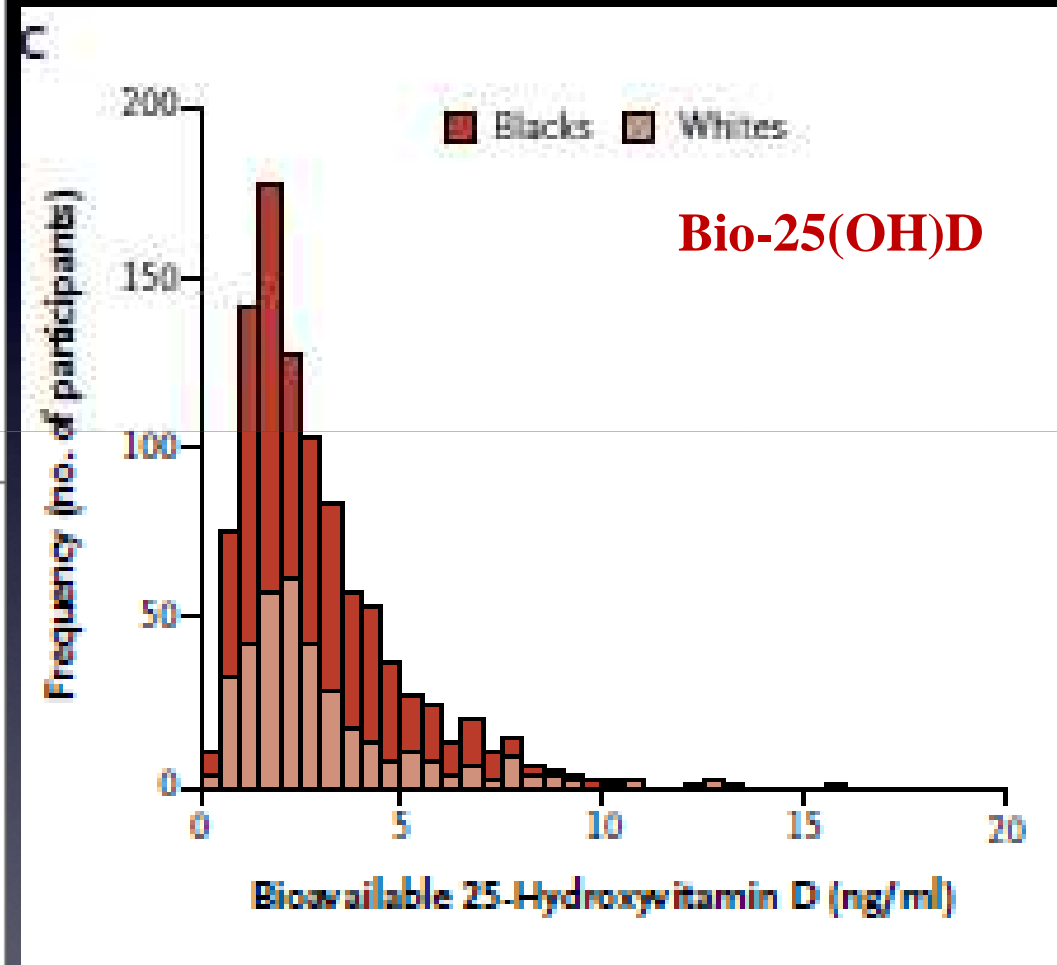
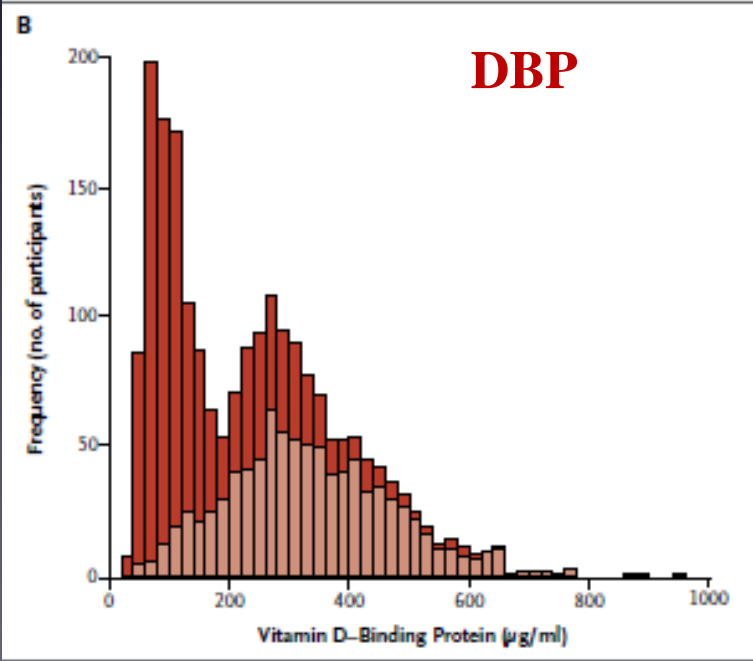
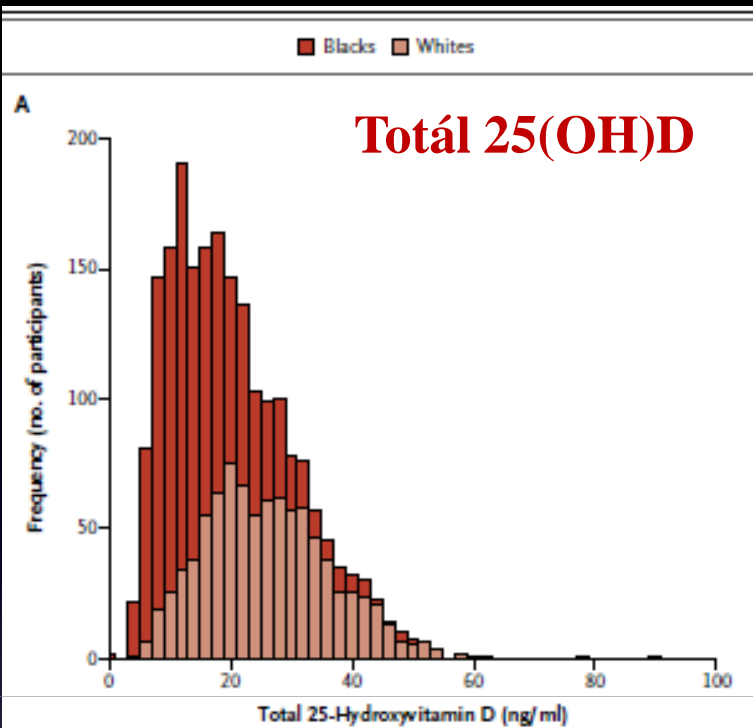
ORIGINAL ARTICLE

Vitamin D–Binding Protein and Vitamin D Status of Black Americans and White Americans

Camille E. Powe, M.D., Michele K. Evans, M.D., Julia Wenger, M.P.H.,
Alan B. Zonderman, Ph.D., Anders H. Berg, M.D., Ph.D., Michael Nalls, Ph.D.,
Hector Tamez, M.D., M.P.H., Dongsheng Zhang, Ph.D.,
Ishir Bhan, M.D., M.P.H., S. Ananth Karumanchi, M.D.,
Neil R. Powe, M.D., M.P.H., M.B.A., and Ravi Thadhani, M.D., M.P.H.

NEJM november 21, 2013

Baltimore-ban élő 3720 felnőtt: 1181- fekete és 904 fehér- bőrű



A fehér és sötét bőrűek közötti eltérés a három fő DBP izoforma előfordulási gyakoriságában

A

Vitamin D-Binding Protein

Genotype

Phenotype



rs7041-T (Asp)
rs4588-C (Thr)



rs7041-G (Glu)
rs4588-C (Thr)



rs7041-T (Asp)
rs4588-A (Lys)

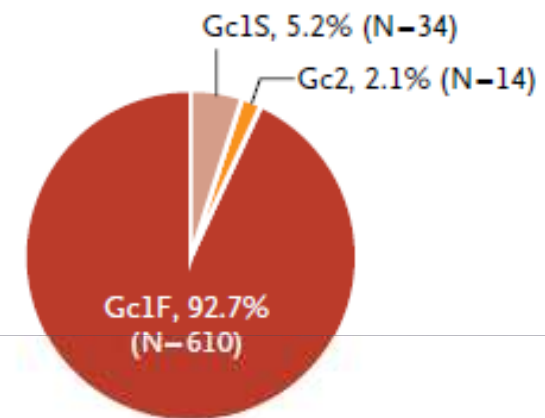


-25-hydroxyvitamin D

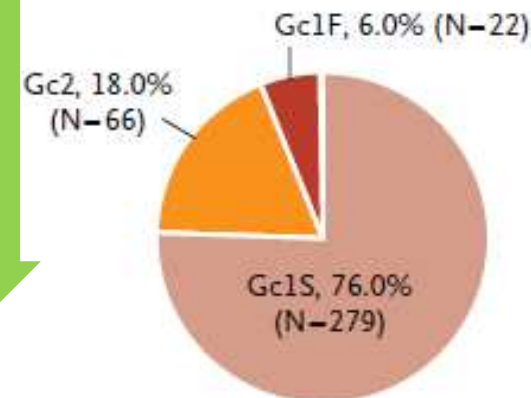
D-vit. Kötési kapacitás változása



Black Homozygotes (N=658)



White Homozygotes (N=367)



Totál25(OH)D és Bio 25(OH)D szintek, azonos PTHi szintek mellett, fehér és fekete bőrű Homozigótákban

- ✓ A totál 25(OH)D szintek genetikailag is meghatározottak
- ✓ A D vitamin ellátottságban nincs különbség a két etnikum között
- ✓ A sötét bőrű egyéneknél domináns DBP variáns késlelteti a 25(OH)D eliminációját (endocitosis a vese tubulusban) a fekete bőrűekben, amelynek eredménye a fehérekével közel azonos BioOHD szint.

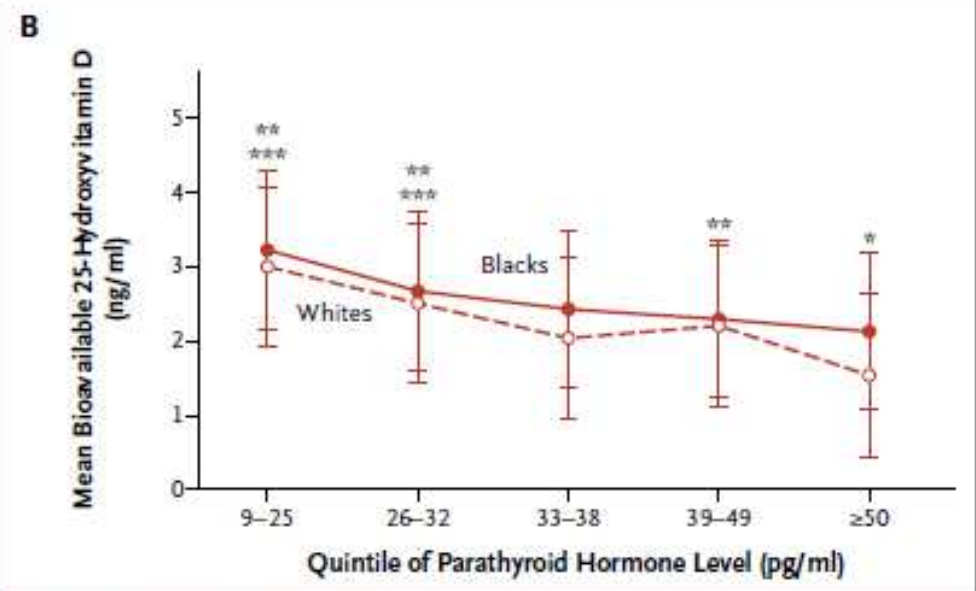
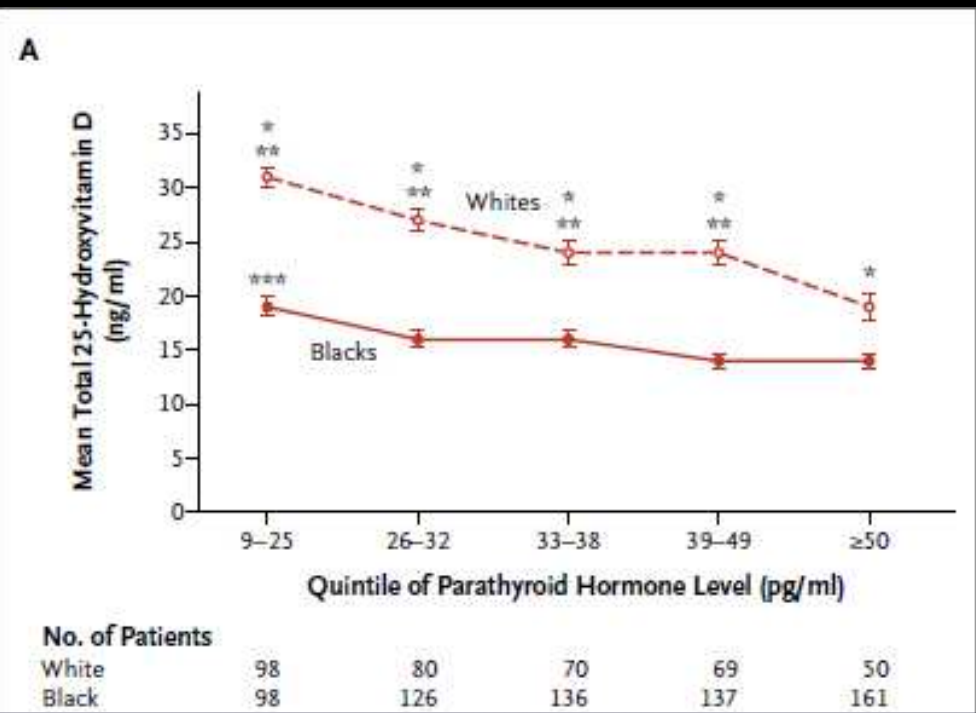
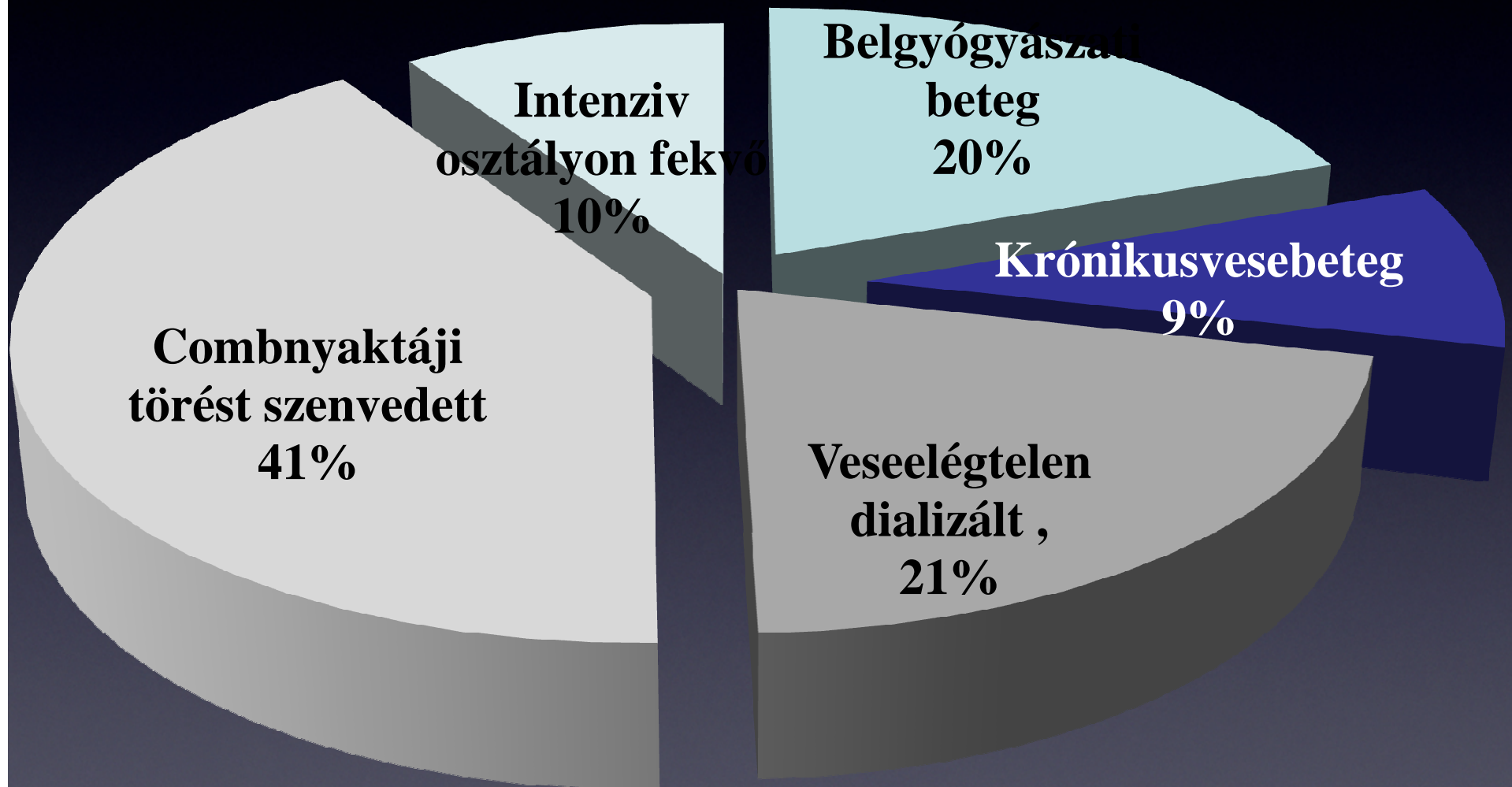


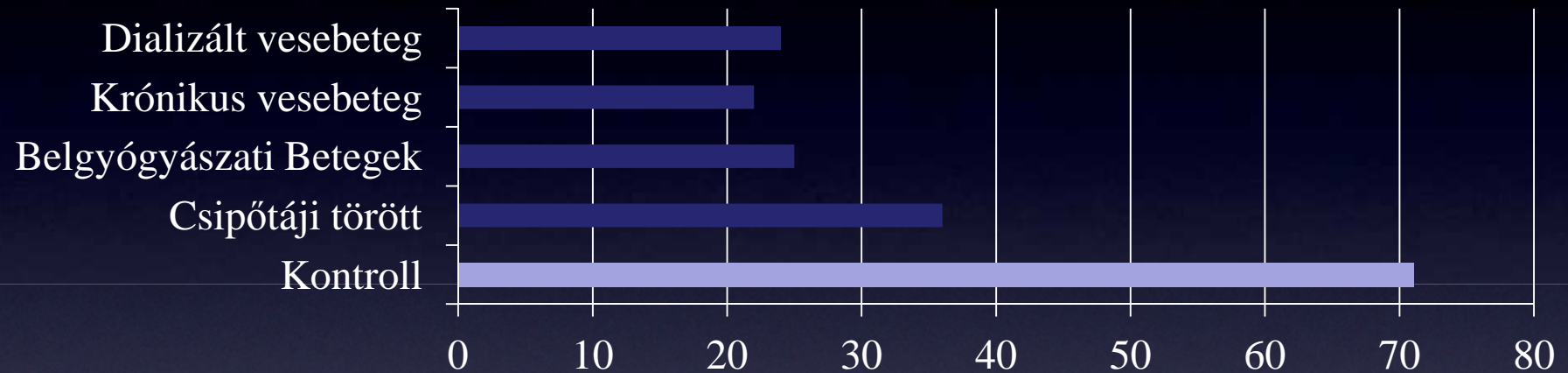
Figure 3. Total and Bioavailable 25-Hydroxyvitamin D Levels among Homozygous Blacks and Whites with Similar Parathyroid Hormone Levels.

D vitamin ellátottság vizsgálata 347 kórházunkban fekvő betegben

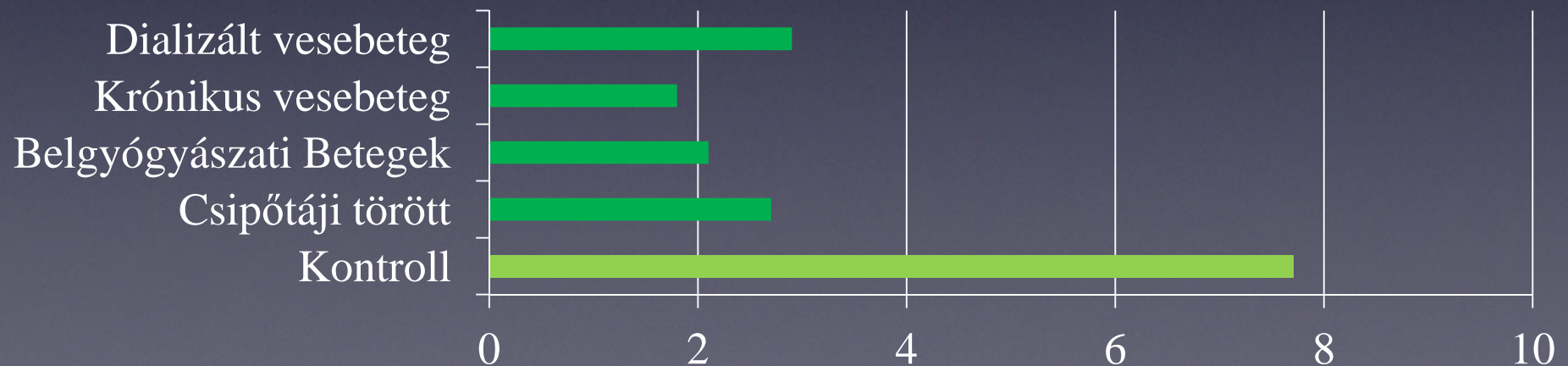


A két 25(OH)D frakció összehasonlítása a kontrollhoz képest a betegcsoportokban

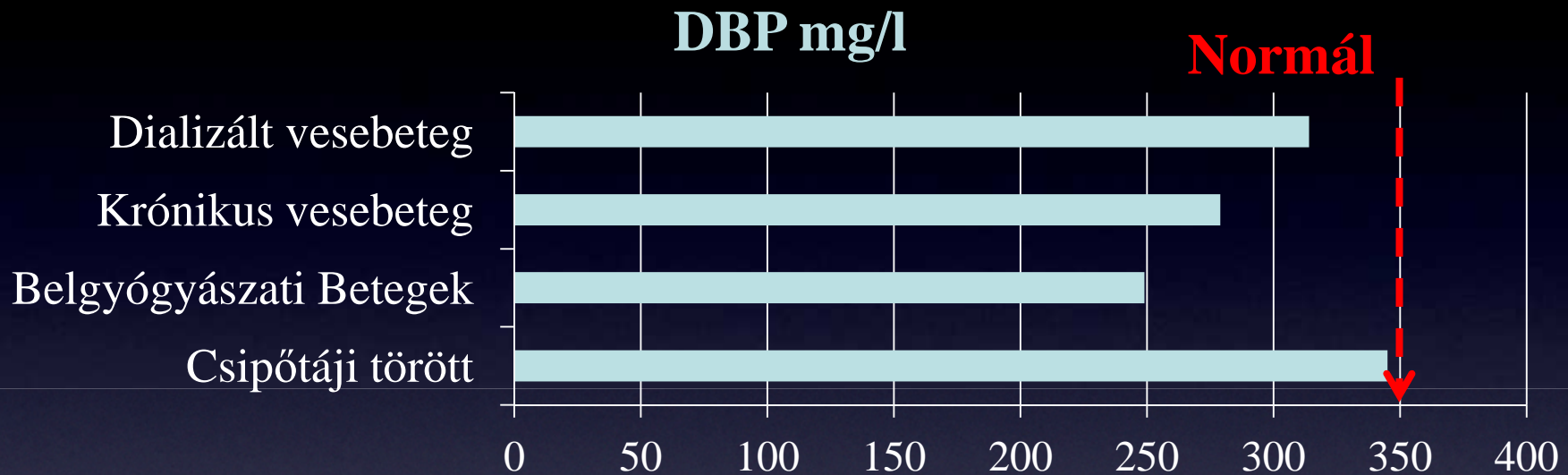
total 25(OH)D nmol/l



Bio25(OH)D nmol/l

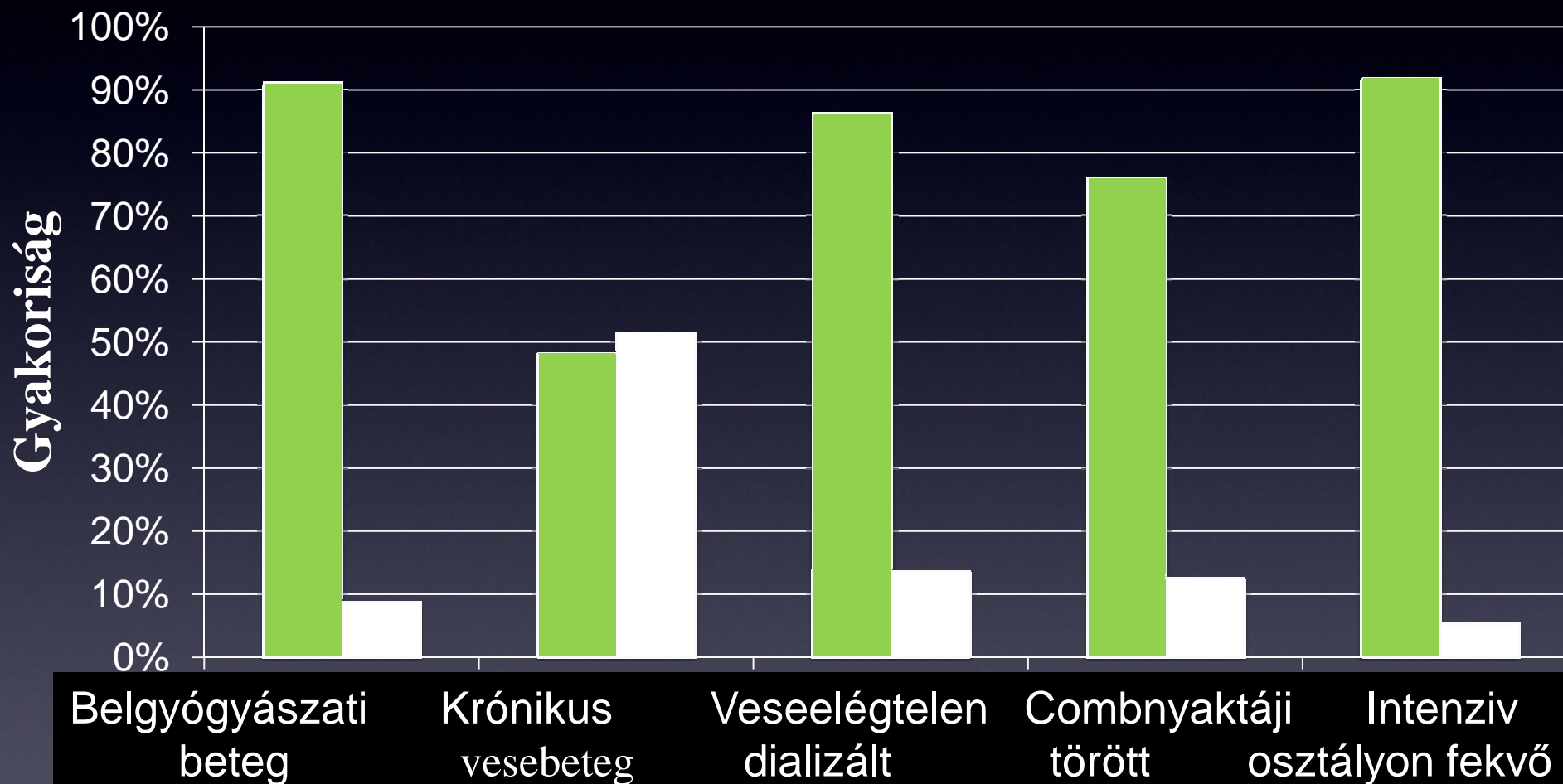


A kötőfehérjék változása a betegcsoportokban azonos tendenciát mutat

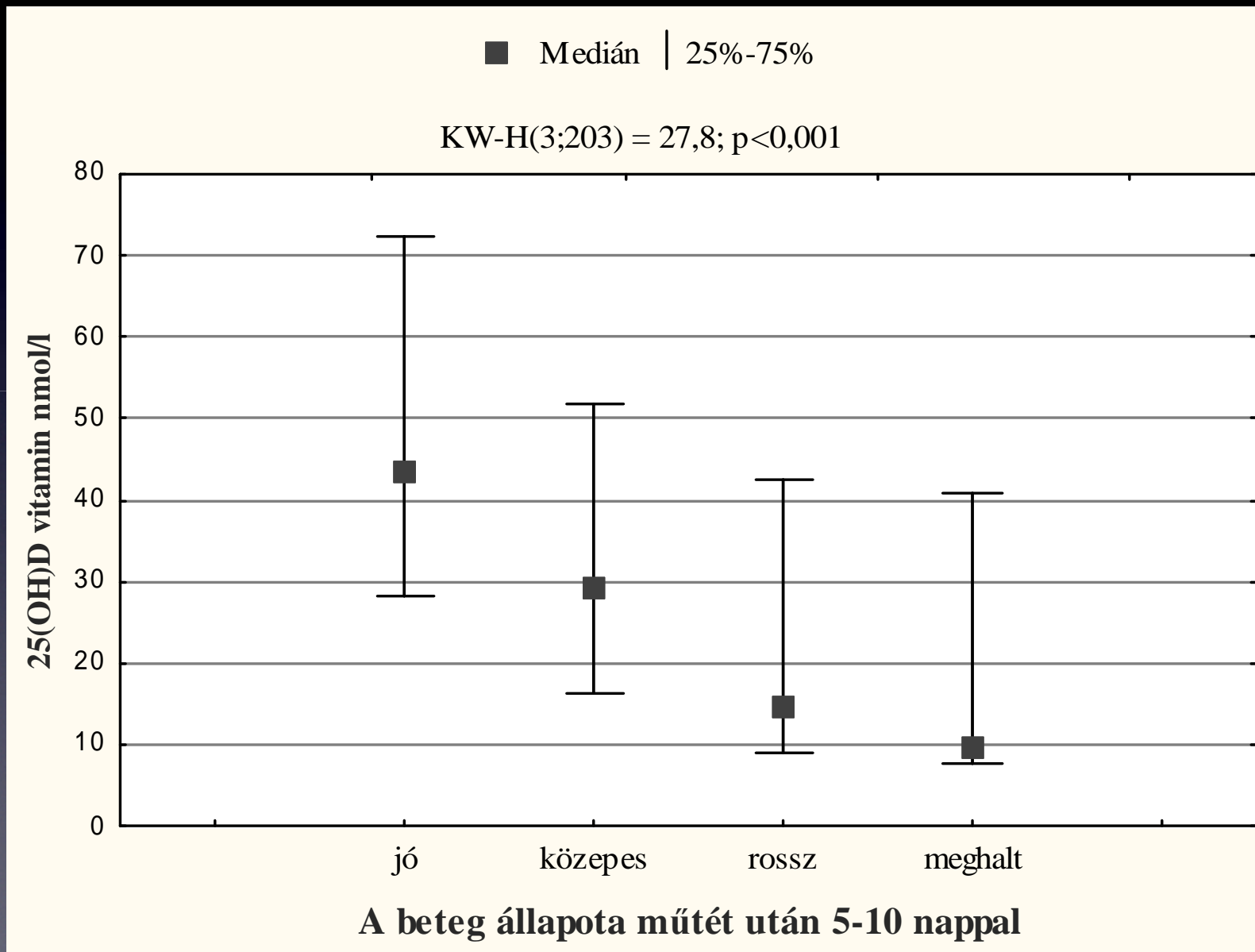


Betegek szuboptimális D vitamin ellátottságának gyakorisága: 97% a totál 25OHD alapján (N=347)

■ Hiány ■ Elégtelen



A combnyaktáji műtött 203 beteg korai állapota és a 25(OH)D vitamin szintjük közötti kapcsolat



Intenzív osztályon fekvő súlyos betegek: kapcsolat a betegség kimenetele és a 25(OH)D vitamin szintek között



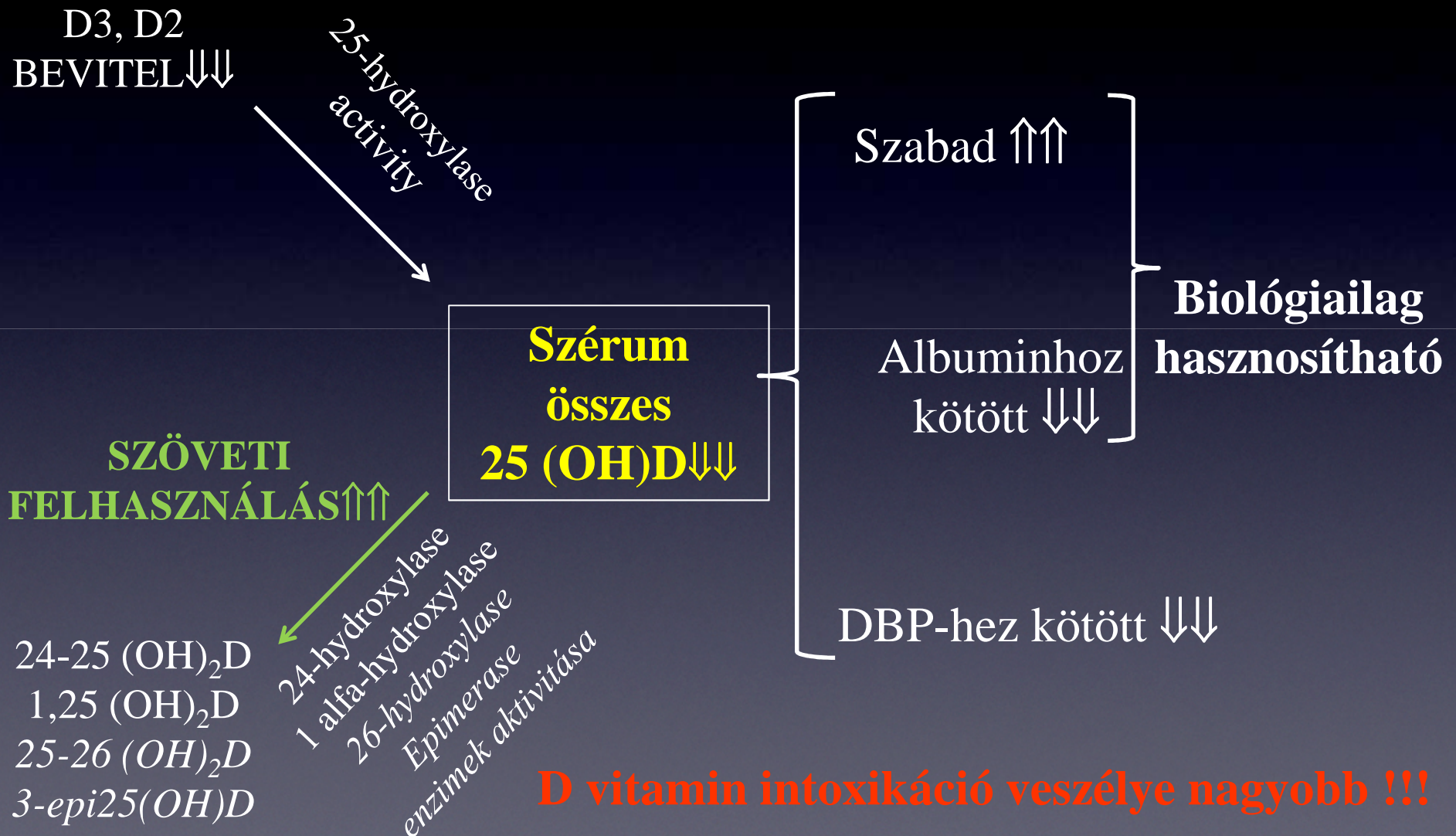
Következtetések-I.

- A kórházban fekvő betegek többsége súlyos D vitamin hiányban szenved.
- A legalacsonyabb 25(OH)D vitamin szintek a belgyógyászati és az intenzív osztályon fekvő betegek esetében tapasztalhatók.
- Csak az egészségeseknél bizonyítható a 25(OH)D-vitamin és a DBP szintek közötti összefüggés.
- A betegekben a DBP szintek növekedésével nem változnak arányosan a totál-25(OH)D vitamin szintek.
Feltételezhető ok:
 - a DBP kötési affinitása eltérő lehet a különböző klinikai állapotokban.

Következtetések-II.

- Mivel, a csipőtáji törést szenvedett betegekben a műtét utáni kedvezőbb eredmények szignifikánsan jobbak voltak a magasabb 25(OH)D szintek esetében, ezért a natív D vitamin adása javasolható.
- Az intenzív osztályon fekvő betegek esetében tapasztalt pozitív korreláció a D vitamin ellátottság és a túlélés között - még nem indikálhatja a D vitamin terápiát.
 - ennek oka a hormonális homeostasis felborulása miatt megváltozott regulációs mechanizmussal is magyarázhatóak.
- Feltételezhető, hogy ilyenkor a D vitamin intoxikáció veszélye fokozottabban fennáll!

A szérumban összes 25(OH)D szintet befolyásoló tényezők súlyos betegekben - teória



D vitamin intoxikáció veszélye nagyobb !!!

Kell-e szűrni D-vitamin eláttottságra, illetve hiányra?

Clinical Chemistry 56:5
728-734 (2008)

Opinion

The D-lemma: To Screen or Not to Screen for 25-Hydroxyvitamin D Concentrations

Michael F. Holick*

With the recognition of widespread vitamin D deficiency/insufficiency in children and adults, there is no need to measure everybody's blood 25(OH)D. It would be much more cost-effective to implement a vitamin D supplementation program for all children and adults.

- Álatában nem, inkább adjunk D-vitamint úgy a gyermekeknek, mind a felnőtteknek, különösen a nagyobb kockázati rizikóval rendelkezők körében.

Hazai konszenzusnak ez az egyik fő üzenete

Orv. Hetilap. 2012 :153. évfolyam, Szuppl. 5–26.

D-vitamin hiány szempontjából fokozott kockázatnak kitett csoportok: 2012-ben

I. táblázat | D-vitamin-hiány szempontjából fokozott a kockázat

Osteomaláciában
Osteoporosisban
Szekunder hyperparathyreosisban
Újszülötteknél
(ha AP >500 U/L, illetve kilencéves korig >1000 U/L)
Malabszorpciós szindrómákban
Krónikus májbetegségekben
Krónikus vesebetegségekben
Bizonyos gyógyszerek tartós használata esetén
(például: antiretrovírus, anti-AIDS,
antifungicid/ketoconazol/glükokortikoid,
cholestyramin, antikonvulzív hatású készítmények)
Gravidáknál és szoptató anyáknál
Időseknél többszörös elesés esetén
Túlsúlyos egyéneknél
Emlő- és colontumorosokban
Hypertoniában
Krónikus szívelégtelenségben
Életmódjuk vagy betegségük miatt napsugárzást tartósan nem kapó
egyéneknél

2013. októberében konszenzusba felterjesztett javaslat-1: akinél mérni kell a 25(OH)-D szintet

**D vitamin mérése szakmailag indokolt.
-egy alkalommal, a kezelés indítása előtt:**

- ✓ **Osteomalátia**
- ✓ **Secundáer hyperparathyreosis differenciálása**
- ✓ **Idült veseelégtelenségben**
- ✓ **Malabszorbtios szindrómában**
- ✓ **Idült májbetegségben**

**2013-as konszenzus üléskor felterjesztett
javaslat-2:
akinél nem kell mérni a 25(OH)-D szintet**

- Terápia monitorozás céljából:
elég a szérum és a vizelet Ca meghatározása
- Súlyos betegségben szenvedőknél sem mérjük!

D vitamin mérése a klinikai kép, egyéb laboreredmények mérlegelése alapján indokolt lehet, de nem rutinszerűen - 2013. javaslat-3.

- ✓ osteoporosis
- ✓ PCOS szindróma
- ✓ szisztémás autoimmun betegségek
- ✓ gyulladásos idegrendszeri betegségek
- ✓ gyulladásos bélbetegségek
- ✓ emlő és colon tumor
- ✓ malignus haematologiai betegségek
- ✓ bizonyos gyógyszerek tartós használata esetén (például: anti-retrovírus, antifungicid /ketoconazol/, glucocorticoid, cholestyramin, antikonvulzív hatású készítmények).
- ✓ életmódjuk vagy betegségük miatt napsugárzást tartósan nem kapó egyének
- ✓ idült szívelégtelenség
- ✓ obesitás



*Köszönöm a megtisztelő
figyelmet!*