



# D vitamin laboratóriumi vizsgálata

Bekő Gabriella

Semmelweis Egyetem, Központi Laboratórium (Pest)

2007. október 5.



## Háttér

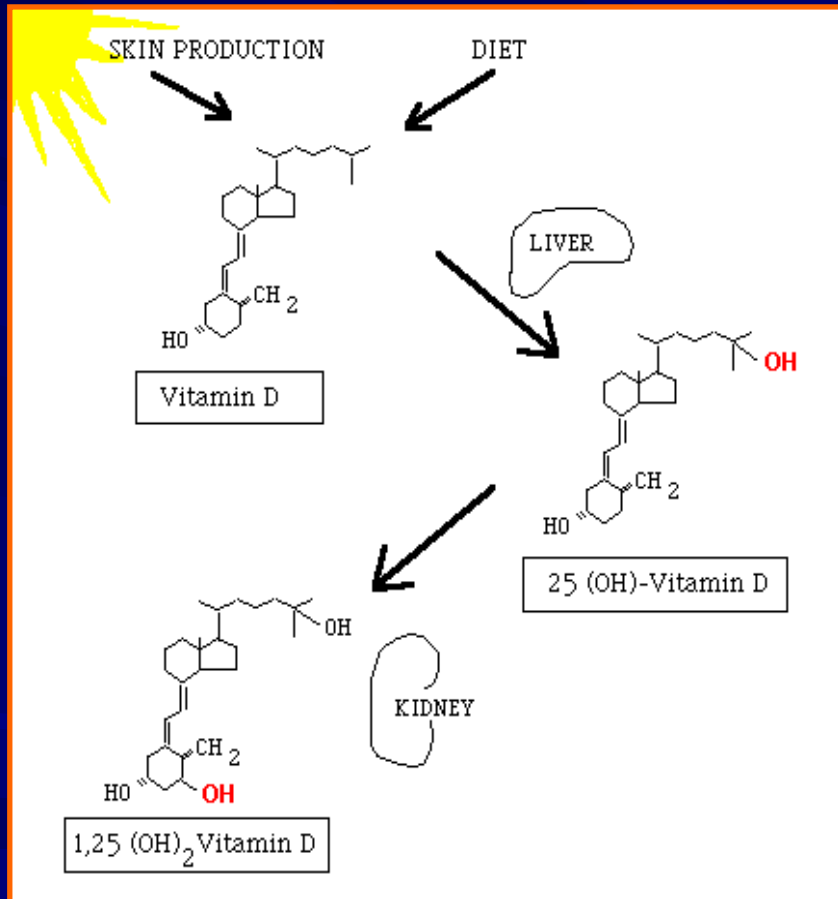
- *A legújabb irodalomban D-vitamin helyett inkább **D-hormonról** írnak.*
  - szteránvázas vegyület
  - a szervezet felnőtt korban kellő mennyiségben állítja elő
  - nem kofaktora semelyik enzimnek sem
  - a neurohumorális rendszerrel a mellékpajzsmirigy hormonján keresztül van kapcsolata

## Hogyan jut a szervezet kellő D vitaminhoz?

- D2 vitamint (ergokalciferol) -a növények termelik
- D3 vitamin (kolekalciferol)
  - 7-dehidrokoleszterin biohasznosulása (bőrben, UV hatására)
  - legfontosabb források:
    - halolaj, halak, tojássárgája, tejtermékek +Dvit., máj, számos más táplálék

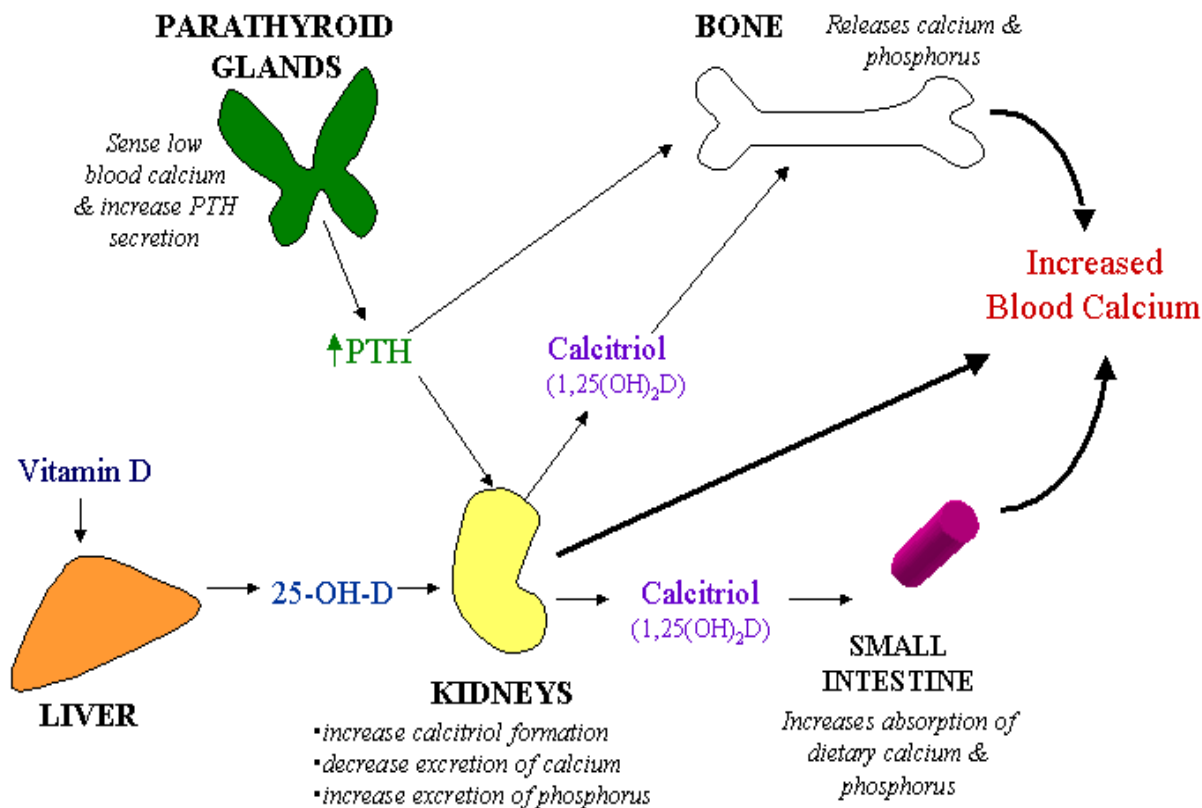


# D vitamin sorsa a szervezetben



1. 7-dehidroxikoleszterin fotolitikus átalakulása a bőrben D3-previtaminná majd D3 vitaminná
2. 25-ös szénatom hidroxilálódik a májban létrejön a **25-(OH)-D3** (CYP27 hatására) **Szérumszintje tökéletes jelzője a D-vitamin háztartás állapotának**
3. Bioaktiváció a vesében, létrejön az 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D3 (CYP1 hatására)

# A D-vitamin biológiai hatásai



1. Segíti a Ca felszívódását
2. Normalis se kalcium- és foszfát-homeosztázist a csont reszorpcióján keresztül is szabályozza
3. Gátolja a parathormon secretióját (hiányában secunder paratyreosis alakul ki)
4. Vesékben növeli a Ca reabsorpciót, segíti a Ca transzportot a distalis tubulusokba.

# Hiánybetegség

- **D vitaminhiány:**

- A gyermekekben angolkór (deformálódott koponyacsontok, "tyúkmell"/kiálló szegycsont, púposság, görbe vagy X lábak, duzzadt ízületek).

- A felnőttekben csontlágylás (csontfájdalmak, puha csontok, spontán csonttörések, gerinctörés).



# A D-vitamin metabolizmus szerzett, vagy veleszületett zavarai

## ■ a. Szerzett

- Krónikus urémia
- Tumor indukálta osteomalacia
- Felszívódási zavar

## ■ b. Veleszületett

- D vitamin dependens rachitis (I., II. típus)
- Hypophosphatemiás, gyakran nemhez kötöten öröklődő, X kromoszómához kötött D-vitamin rezisztens rachitis
- Felszívódási zavar

## A D vitamin biológiai hatásai

- idős emberek osteoporosisa esetén a csonttörések száma jelentősen csökkenthető D-vitamin-terápiával

***D-vitamin-kezeléskor a csont ásványianyagtartalma nem nő számottevően, a törések száma mégis 30–70%-kal redukálódik.***

Ez a tény részben a D-vitamin-kezeléssel járó izomerő-fokozódásnak tulajdonítható, részben pedig a csont minőségében bekövetkező változásoknak



## D-vitamin biológiai hatásai 2.

- Haematopoeticus szövetekben -antiproliferáció és -differenciáció serkentése

***A D-vitamin potenciális gyógyszerként szerepelhet a leukaemiák és más myeloproliferatív kórképek kezelésében.***

## D-vitamin biológiai hatásai 3

- A D-vitamin szerepet játszhat az ischaemiás szívbetegség kivédésében

*D-vitamin-hiányban hozzávetőleg 20–30%-kal gyakoribbak az ischaemiás jellegű cardiovascularis események.*

## D-vitamin biológiai hatásai 4

- **Hasnyálmirigyben az inzulinszintézis/-szekréció serkentése**

*D-vitamin-hiányos területeken a 2-es típusú diabetes mellitus, a glükóztolerancia és a metabolikus X-szindróma gyakrabban fordul elő.*

## D-vitamin biológiai hatásai 5

- Veseelégtelenségben számos ureamiás szövődmény okának az emelkedett PTH-t tekintik

***A D-vitamin terápia a krónikus vesebetegek gyógyszeres kezelésének fontos eleme***

## D-vitamin biológiai hatásai 6

### ■ Daganatok

melanoma, leukaemia, osteo-, fibrosarcoma, adenoma, neuroblastoma, pancreas adenocarcinoma, hólyag-, emlő-, cervix-, prostata-, colon- és medullaris pajzsmirigy-carcinoma

antiproliferatív, a differenciáció serkentése

***A D-vitamin sejtproliferációt gátló és sejt differenciálódást indukáló szerepét egyre nagyobb figyelem kíséri.***

## D-vitamin biológiai hatásai 7

- Immunrendszer ( monocyta és macrophag, lymphocyta)
- *antivirális/-bakteriális és tumorelles hatás és a védekezés serkentése*
- *immunszuppresszió*
- *gátolja a B- és T-sejtek proliferációját, így hatásos autoimmun betegségekben*

## D vitamin terápia daganatos megbetegedésben

- A Kanadai Rákellenes Társaság szerint elegendő bizonyíték áll rendelkezésre arra nézve, hogy ajánlható legyen a D-vitamin mint hatékony ellenszer a vastag- és végbélrák, az emlőrák és a prosztatatarák kialakulásával szemben.

Az ajánlás egybehangzó a nebraskai Creighton Egyetem kutatói által a témakörben végzett széleskörű kutatás eredményével, melyet az American Journal of Clinical Nutrition szakfolyóirat tett közzé. A négy éven át folytatott vizsgálatot 1180 vidéken élő, 55 évnél idősebb nő bevonásával végezték. Eredményei kimutatják, hogy azoknál a vizsgálati alanyoknál, akik kalciumot és D-vitamint szedtek, egy év múlva 77%-kal csökkent a rák kockázata azokhoz képest, akik a kalcium mellé csak placebot kaptak.

Forrás :

<http://www.radio-canada.ca/nouvelles/Science-Sante/2007/06/07/004-vitamineD-cancer-lutte.shtml>

# D vitamin és a daganatos megbetegedések

- A Kalifornia Egyetem (San Diego) kutatócsoportja azt vizsgálta, hogy a vér D-vitamin (25-hidroxivitamin D<sub>3</sub>) koncentrációja milyen összefüggést mutat a vastagbélrák- és az emlőrák kockázatával, pontosabban: milyen mértékű D-vitamin koncentráció véd a rák ellen.

D-vitamin a napfény hatására a bőrünkben képződik. Az egyenlítőtől távolodva, az északibb országokban és főként a téli időszakban a D-vitamin hiányban szenvedők száma megnő.

Fordított az összefüggés a D-vitamin szint és a vastagbél-, illetve az emlőrák gyakorisága között:  
minél magasabb a D-vitamin szint, annál ritkább a rák előfordulása.

Megállapították, hogy ha **24 - 32 ng/ml** a vér D-vitamin értéke, már akkor is sok daganatos betegséget meg lehet előzni.

De az **optimális D-vitaminszint 55ng/ml**.



# Páciensek osztályozása D vitamin szintjük alapján

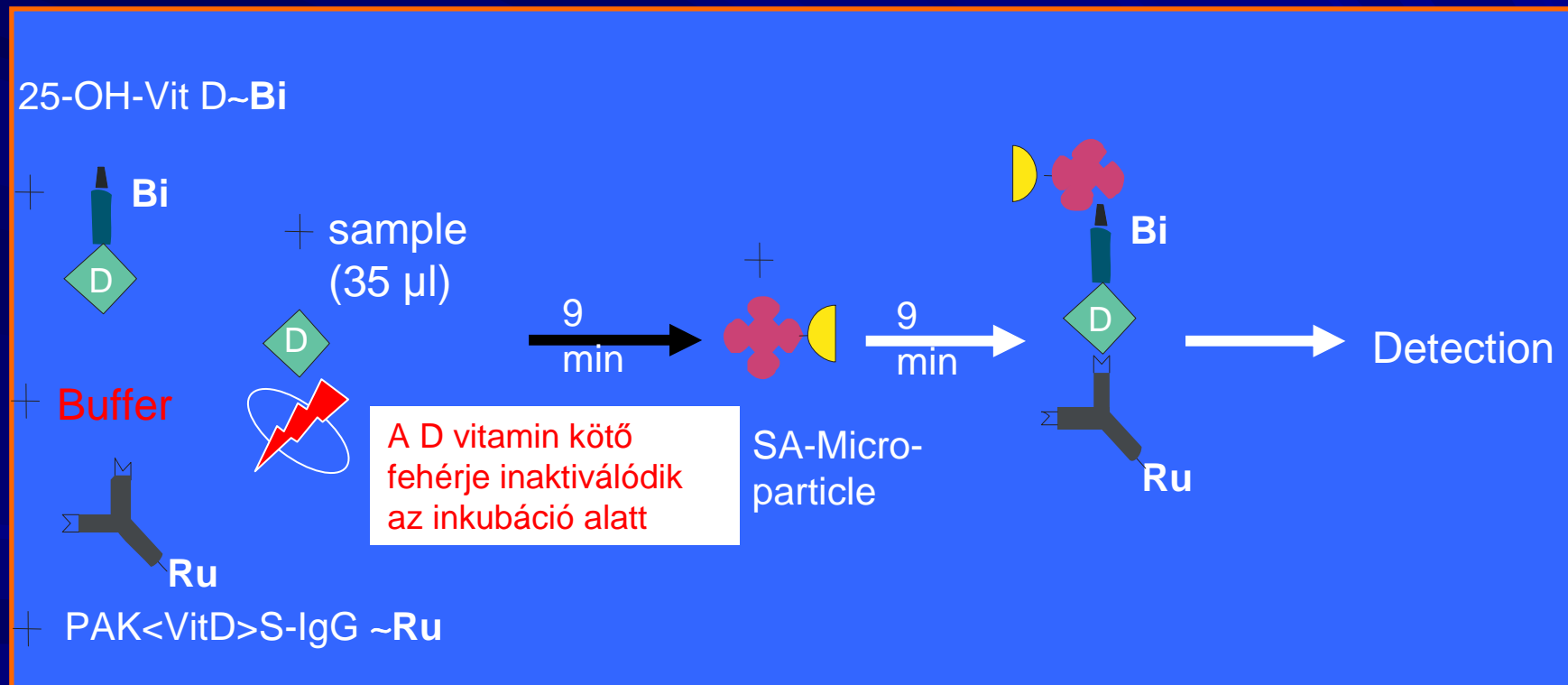
- Súlyos D vitamin hiány: < 5 ng/ml / < 12.5 nmol/L
- D vitamin hiány: 5 – 10 ng/ml / 12.5 - 25 nmol/L
- Enyhe D vitamin hiány: 10 – 24 ng/ml 25 – 60 nmol/L
- **Megfelelő D vitamin szint:** **24 – 80ng/ml/** 60 to 200 nmol/L
- D vitamin toxicitás: > 200 ng/ml > 500 nmol/L

# 25-(OH)-D<sub>3</sub> vitamin mérés lehetőségei

- LC MS-MS
- HPLC
- RIA, ELISA
- Automatán mérhető immunológiai tesztek:
  - DiaSorin Liaison
  - Roche Elecsys, E170 Modular, Cobas e  
(**Vitamin D<sub>3</sub>(25-OH) Elecsys, cobas e**)

# Vitamin D<sub>3</sub> (25-OH), Elecsys, cobas e Competitive Assay alapelve

A D vitamin kötő fehérje inaktiválása a kulcsa a korrekt  
D vitamin mérésnek



Bi: Biotin Ru: Ruthenium  
SA: Streptavidin

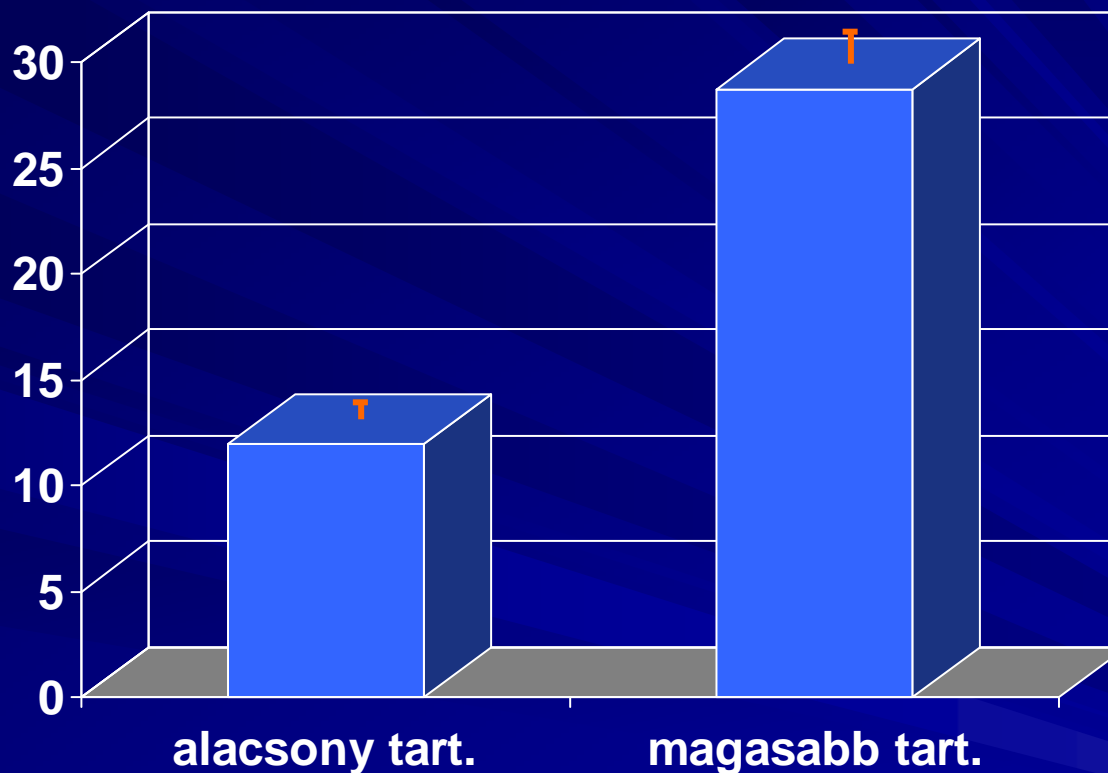
## Vitamin D<sub>3</sub> (25-OH), Elecsys, cobas e Teljesítményjellemzők

- Precizitás: E170: CV% 3,7 – 7,8
- Mérési tartomány: 4-100 ng/ml (10-250 nmol/l)
- Az eljárás korlátai:

Komponens	Vizsgált max. koncentráció	keresztreakció
1,25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>3</sub>	n.a	100 %
24,25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>3</sub>	1000 ng/ml	< 10%
25 (OH) Vitamin D <sub>2</sub>	5000 ng/ml	< 2 %
Cholecalciferol	5000 ng/ml	< 0.1%
Ergocalciferol	5000 ng/ml	< 0.1%

## Vitamin D<sub>3</sub> (25-OH) Elecsys, cobas e E 170Modular-on mért intraassay

25OH-D<sub>3</sub>-vitamin  
(ng/ml)



Mintaszám	10	10
Átlag	11,96	28,73
SD	0,607	1,066
Varációs koefficiens	5,05	3,71

# Vitamin D<sub>3</sub> (25-OH), Elecsys, cobas e A meghatározás referens metodikája az LC-MS-MS (Folyadék kromatográfia+Tandem tömegspektrometria)

*Clinical Chemistry* 50, No. 8, 2004

1415

**Candidate Reference Method for the Quantification of Circulating 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry**, Michael Vogeser,<sup>1\*</sup> Apostolos Kyriatsoulis,<sup>2</sup> Erasmus Huber,<sup>2</sup> and Uwe Kobold<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Institute of Clinical Chemistry, Hospital of the University of Munich, Munich, Germany; <sup>2</sup>Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany; \* address correspondence to this author at: Institute of Clinical Chemistry, Hospital of the University of Munich, D-81366 Munich, Germany; fax 49-89-7095-3240, e-mail Michael.Vogeser@med.uni-muenchen.de)

Quantification of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25-hydroxycholecalciferol) in serum is the best-established indicator of vitamin D status (1). Vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) is absorbed from the diet, and, given sufficient ultraviolet irradiation, nutritionally adequate amounts of vitamin D<sub>3</sub> are formed in the skin from its precursor, 7-dehydrocholesterol. In the liver, vitamin D<sub>3</sub> undergoes hydroxylation

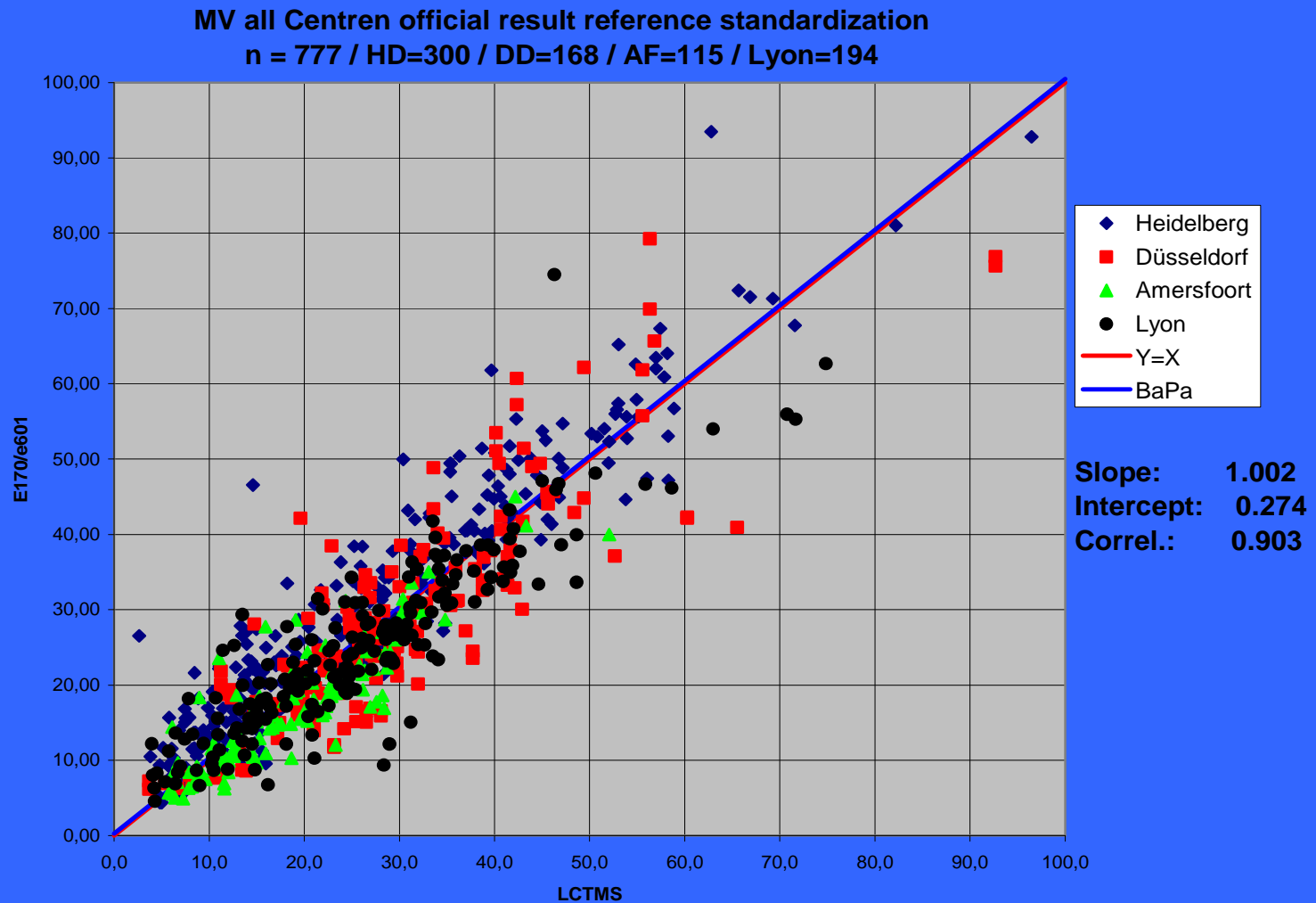
the procedure included derivatization, which is complex and labor-intensive. Reference systems based on LC-MS were accepted in clinical chemistry recently (19, 20), and we decided to develop a convenient and specific isotope-dilution LC-TMS method for the quantification of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in serum as a candidate reference method.

For use as an internal standard, stable-isotope-labeled 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> was synthesized as described previously (14, 17); the molecule contained three deuterium atoms and one <sup>13</sup>C atom. 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> was from Sigma Chemical Co.

A Waters Alliance 2690 HPLC module coupled with a split of ~1:10 to a Micromass Quattro LC TMS system was used.

For sample preparation, we added 30 μL of an internal standard working solution (570 nmol/L) to 200 μL of serum. After vigorous mixing, the samples were allowed to equilibrate at 37 °C for 2 h. We added 20 μL of a 1

# Vitamin D<sub>3</sub> (25-OH), Elecsys, cobas e Összehasonlítás a referens metodikával : LC-MS-MS 4 referens laboratóriumban



# Referencia és standardizáció kérdése

## ■ HPLC (BIORAD)

### Visszavezethetőség:

A kalibrátor értékeket tiszta anyagokhoz hozzáadott mennyiségekkel végzett elemzésre lehet visszavezetni

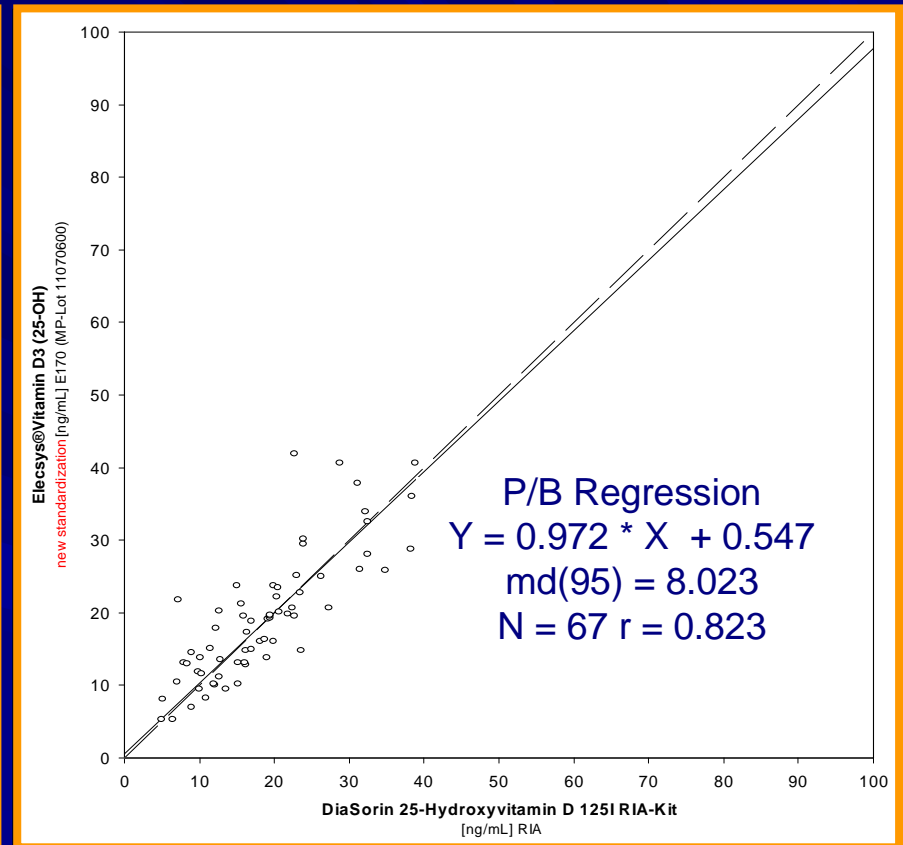
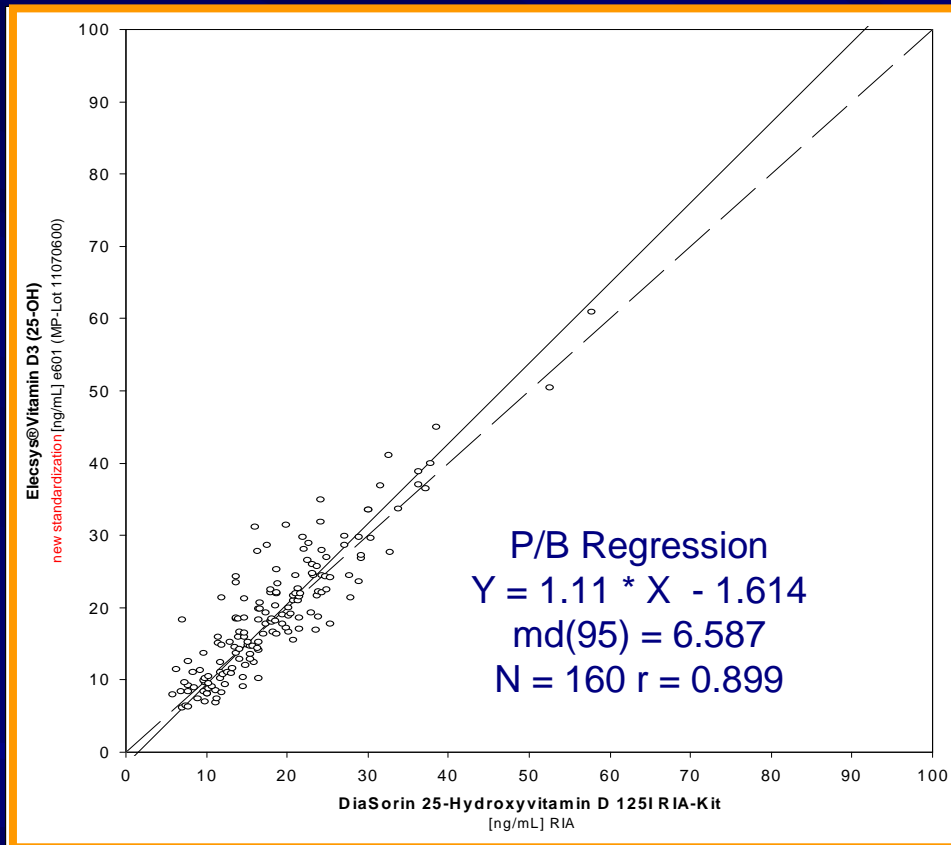
## ■ DiaSorin Liaison

### Visszavezethetőség:

RIA-val való összemérést említi



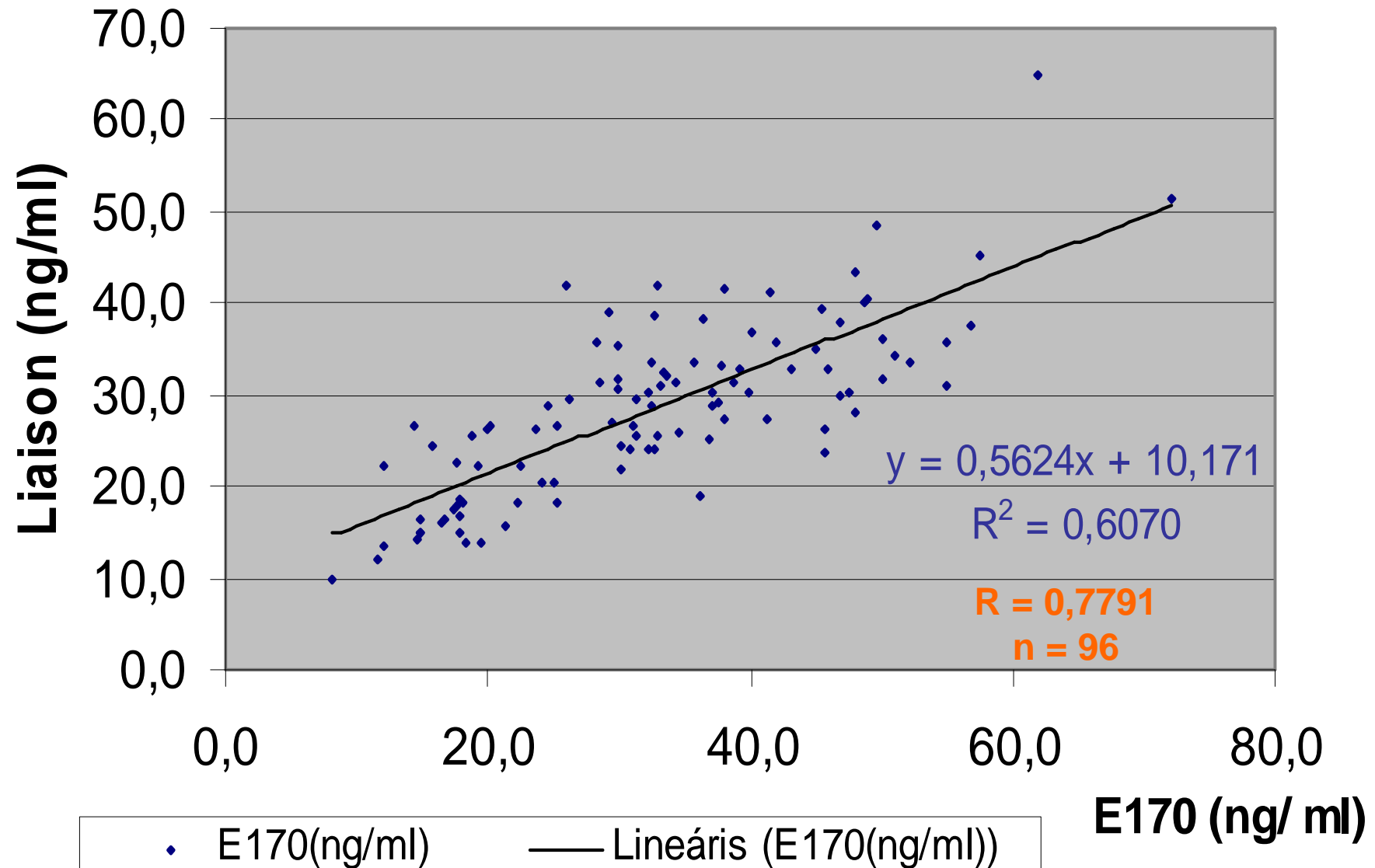
# Vitamin D<sub>3</sub> (25-OH) Elecsys, cobas immuntereszt összehasonlítása DiaSorin RIA teszttel



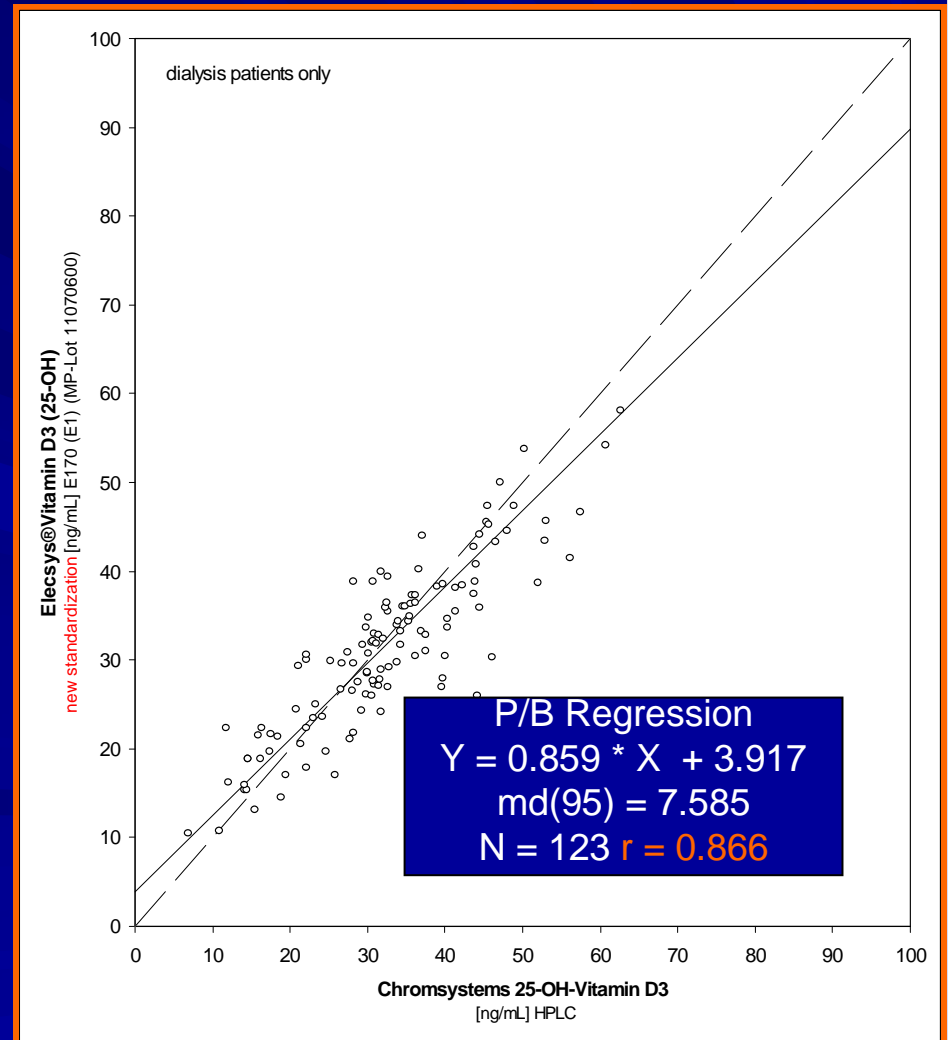
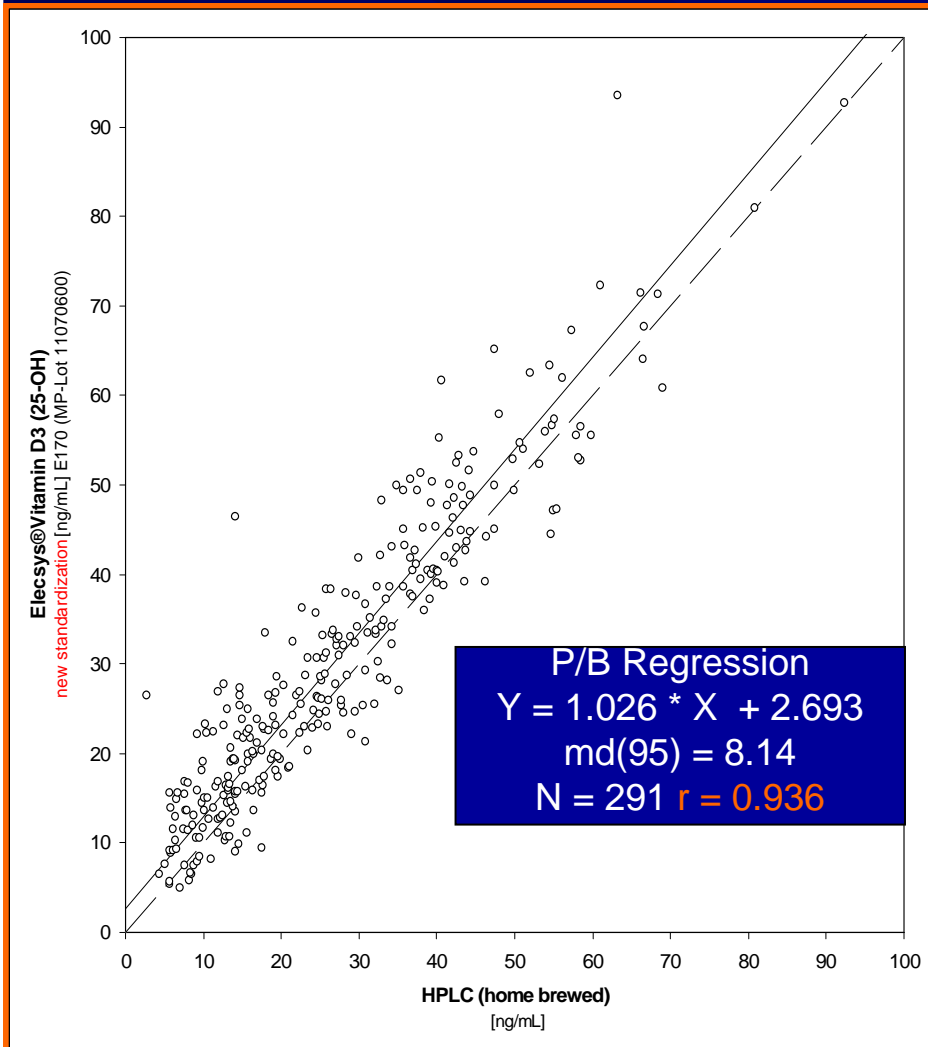
**Az összehasonlított tesztek esetén igen jó korrelációt találtak**

by Lukács Júlia (Roche)

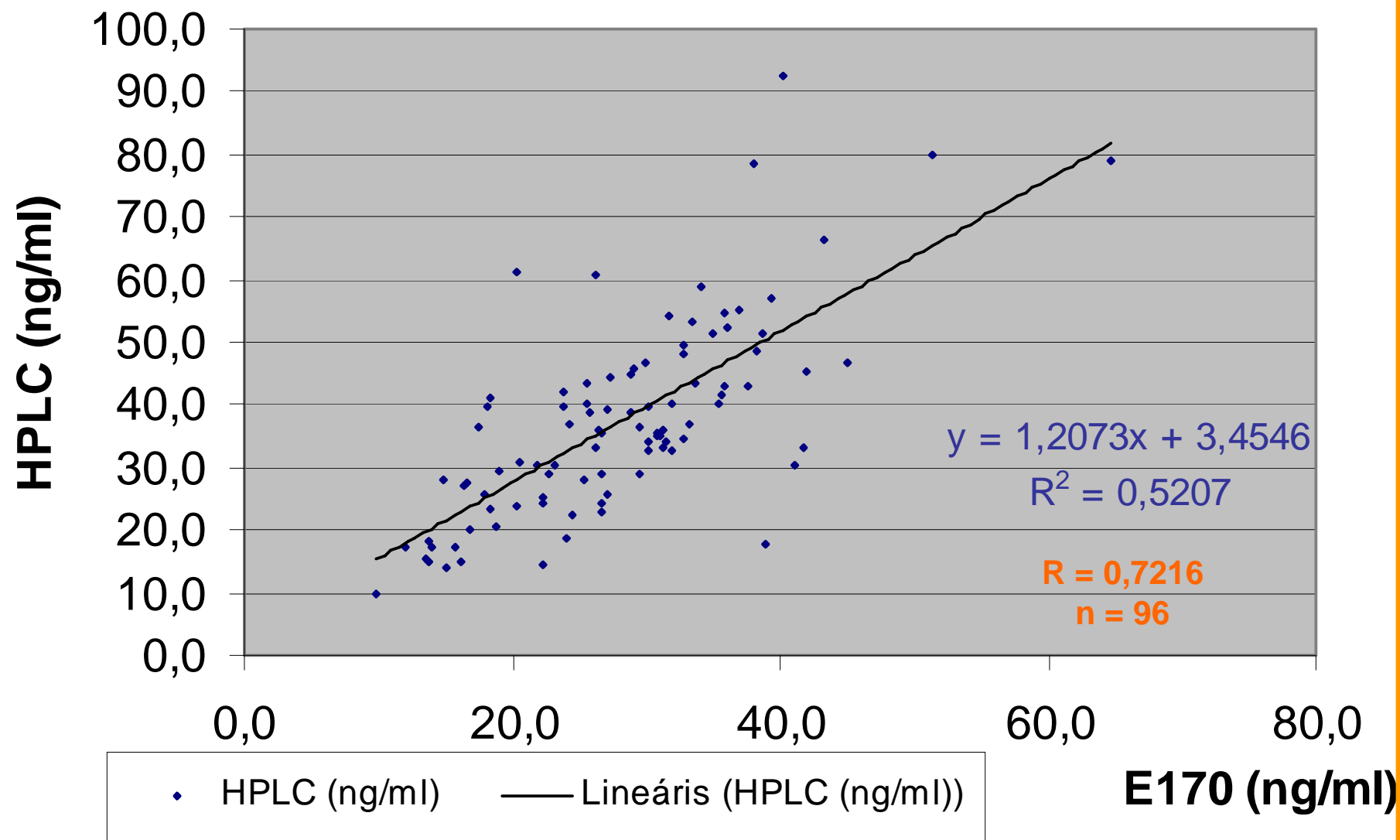
# 25(OH)-D-vitamin eredmények korrelációja E 170 Modular-on és Liaison-on mérve



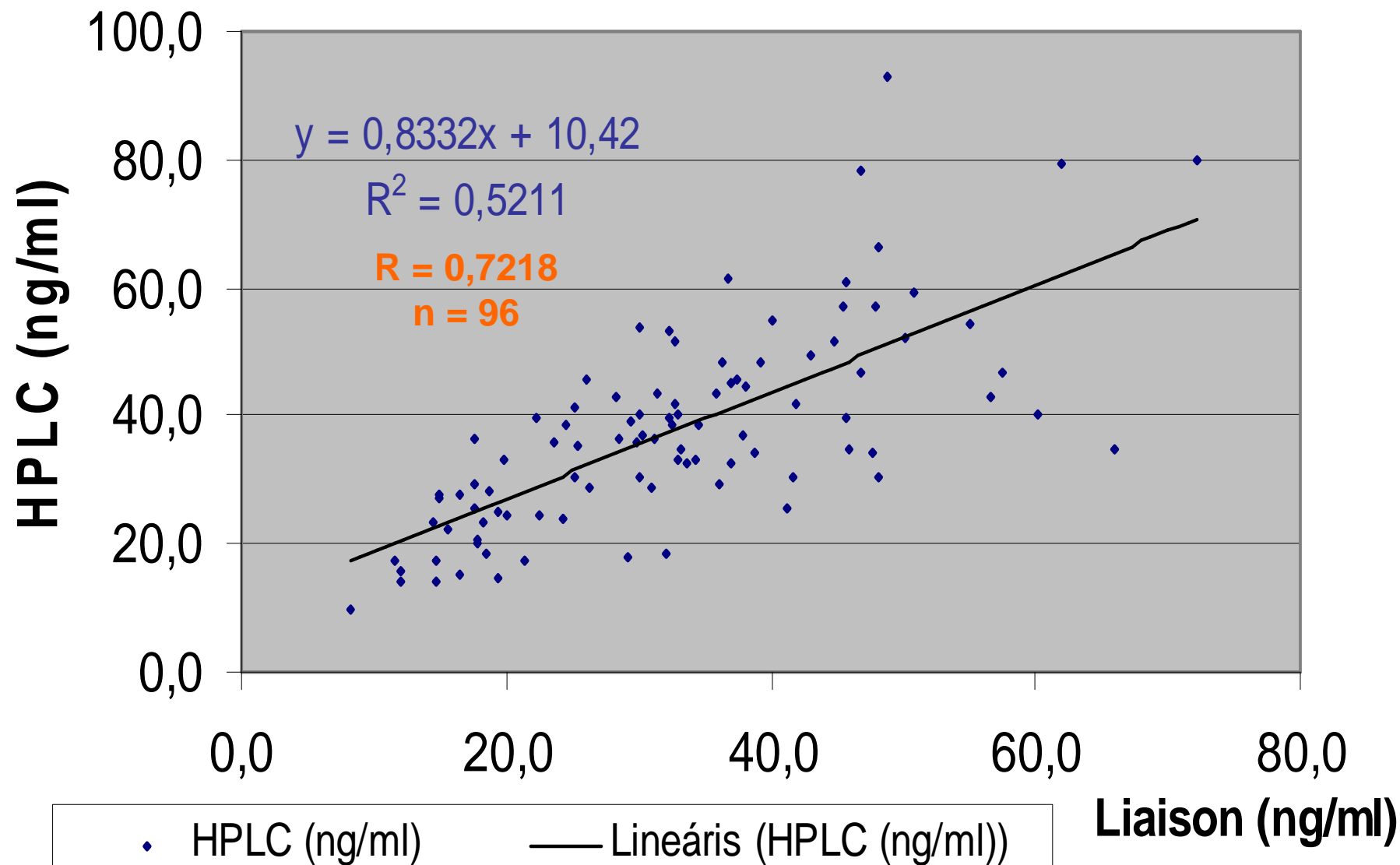
# Vitamin D<sub>3</sub> (25-OH) Elecsys, cobas e Metodika összehasonlítás E170 Modular és HPLC készülékeken



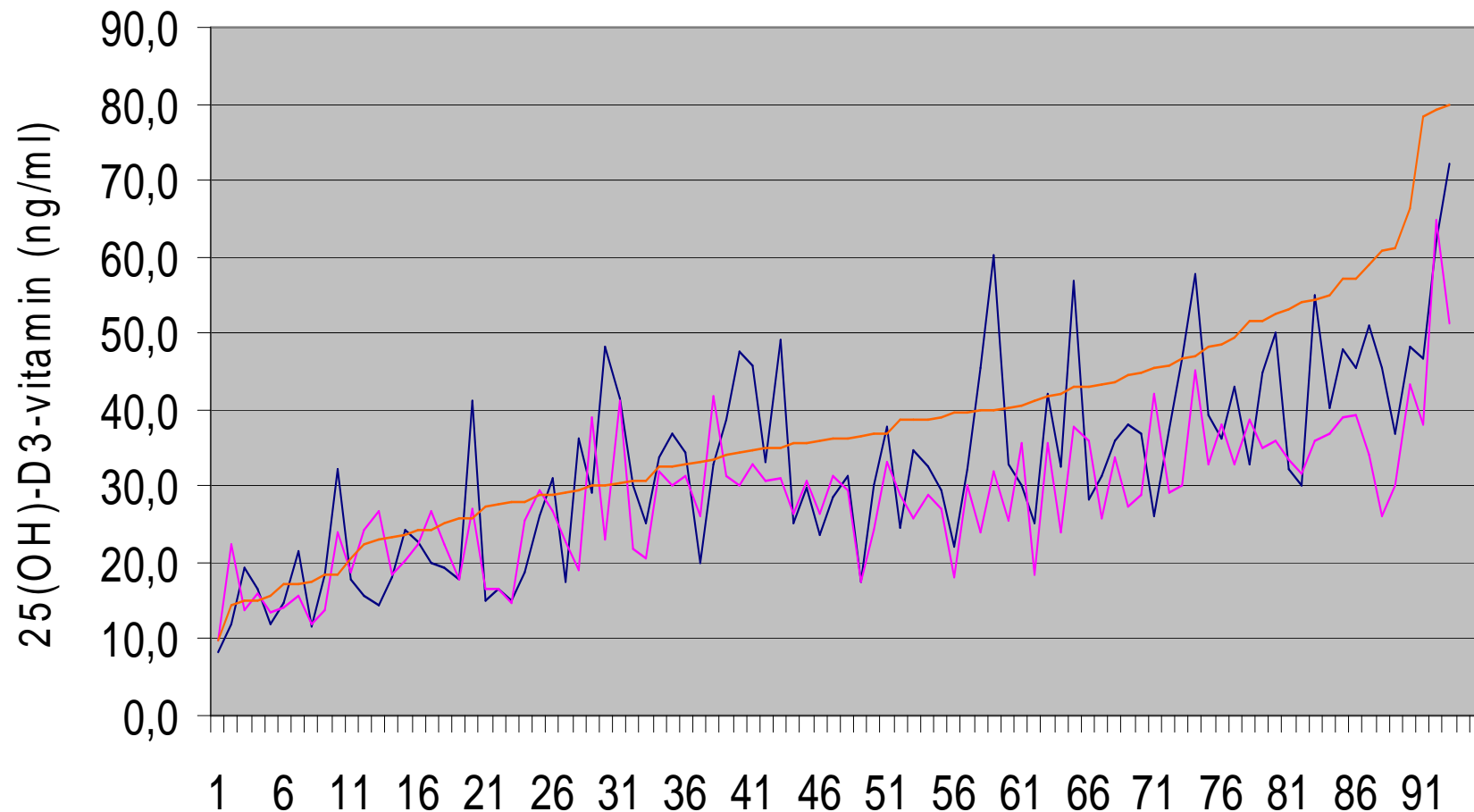
## 25(OH)-D-vitamin eredmények korrelációja E 170 Moduláron és HPLC-n mérve



# 25(OH)-D-vitamin eredmények korrelációja Liaison-on és HPLC-n mérve



# 25(OH)-D<sub>3</sub>-vitamin mérési eredmények összehasonlítása BioRad HPLC, DiaSorin Liaison, Roche E-170 Modular készülékekkel



— Liaison1 (ng/ml)

— E170-1 (ng/ml)

— HPLC (ng/ml)

minta száma  
**n = 96**

## **25(OH) D<sub>3</sub> vitamin (Elecsys, cobas e) A teszt előnyei**

- **A 2 automata D-vitamin-kit közül az egyik  
(a másik: Liaison DiaSorin)**
- **Az egyetlen teszt, amelyik konszolidált, integrált rendszeren  
működik**
- **Az egyetlen teszt, amelyet a várható referenciamódszerhez  
(LC-MS-MS) mértek be**
- **Széles mérési tartomány – kevés hígítás szükséges**
- **Jó precizitás (többnyire < 5%)**
- **A legteljesebb csontmarker és hormon-teszt-paletta**

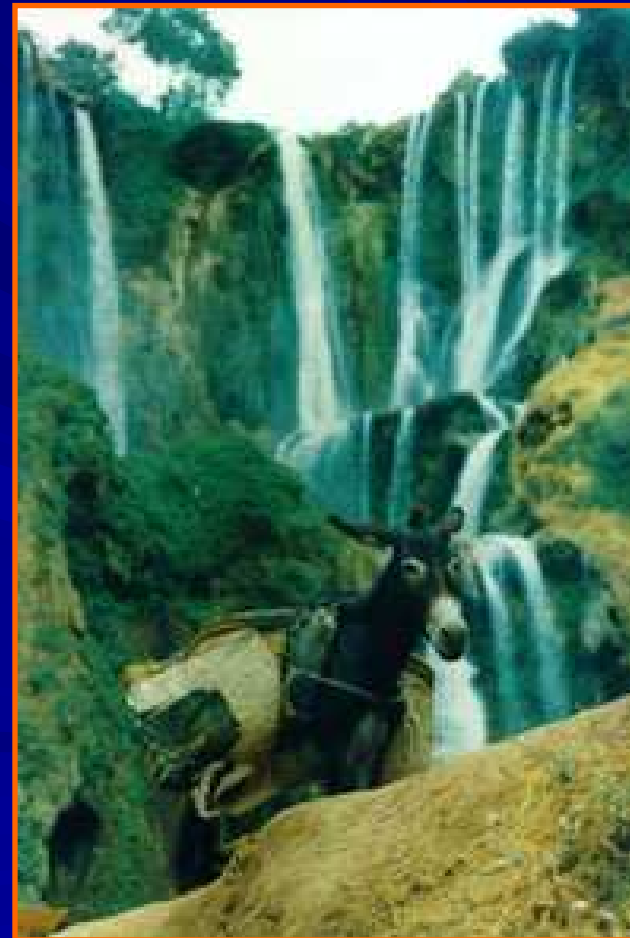
# Roche csontmarker és hormonteszt paletta

Elecsys®	Tipus	Kezelés formája	Kezeléssel elérendő	Mérési gyakoriság
<b>β Crosslaps</b>	Csontfelszívódási marker	Antireszorptív	min. 35% csökkenés	Alap (baseline) érték, majd a kezelés 3. hónapja, ezt követően 6 havonta
<b>Total P1NP</b>	Csontképződési marker	Antireszorptív	min. 40% csökkenés	Alap (baseline) érték, majd a kezelés 6. hónapja, ezt követően 6 havonta
		Anabolikus	min. 40% növekedés	Alap (baseline) érték, majd a kezelés 3. hónapja, ezt követően 6 havonta
<b>N-Mid Osteocalcin</b>	Csont-turnover marker	Antireszorptív	min. 20% csökkenés	Alap (baseline) érték, majd a kezelés 3. hónapja, ezt követően 6 havonta
<b>PTH</b>				
<b>25(OH)-D-vitamin</b>	Csont-mineralizáció elősegítője	D <sub>3</sub> vitamin terápia	75 nmol/L koncentráció	Alap (baseline) érték, majd a kezelés 3. hónapja, ezt követően 6 havonta



# Köszönet

- Olajos Ferencnek
- Szalay Albertnének
- Kovács Ferencnének





**Köszönöm a figyelmet!**