

Vitamin D in presnovki: fiziologija, patofiziologija in referenčne vrednosti

Vitamin D and metabolites: physiology, pathophysiology and reference values

Joško Osredkar*, Janja Marc**

Ključne besede
vitamin D – kri
referenčne vrednosti

Key words
vitamin D – blood
reference values

Izvleček. V predstavljenem delu smo določili orientacijske referenčne vrednosti vitamina D in njegovih presnovkov v krvnem serumu ljudi, ki jih imamo glede na presnovo vitamina D za zdrave. Pri delu smo sledili priporočilom, ki jih je za določanje referenčnih vrednosti objavila Mednarodna zveza za klinično kemijo. Najprej smo predstavili nomenklaturu, fizikalno-kemijske lastnosti, fiziologijo in patofiziologijo vitamina D ter najznačilnejše bolezni, povezane s spremembo serumskih koncentracij vitamina D in presnovkov. V nadaljevanju smo opisali analitični postopek za določanje koncentracije vitamina D in presnovkov, ki ga uporabljamo na Inštitutu za klinično kemijo in klinično biokemijo. Izbrali smo metodo, kjer vse tri presnovke določamo sočasno. Metoda ima tri stopnje: deproteinizacija seruma (acetoni-tril), ločevanje presnovkov in določanje koncentracije posameznih presnovkov. Referenčne posameznike smo izbrali prospektivno – uporabili smo kri, ki je ostala po analizah ob rednih sistematskih pregledih. Po izključevanju na podlagi meril, ki smo jih postavili glede na ugotovitve o fiziologiji in patofiziologiji vitamina D, smo dobili 120 vzorcev za kalcidiol in kalcitriol, za kalcidiol pa smo imeli na razpolago 240 vzorcev, ki smo jih razdelili na spomladansko in jesensko podskupino. Izbrali smo neparametrično statistično obravnavo, kljub temu pa smo določili tip porazdelitve, ki je bila pri vseh presnovkih normalna (Gaussova). Nato smo izračunali range 2,5 in 97,5 percentila. Te predstavljajo spodnjo in zgornjo mejo referenčnega intervala. Nato smo izračunali še intervale zaupanja 0,90 za zgornje in spodnje meje referenčnega intervala. Ugotovili smo tudi, da se spomladanske

Abstract. The object of this study was to determine reference levels of vitamin D and its metabolites in the sera of individuals with normal vitamin D metabolism. The measurements were done in compliance with the instructions for reference value determinations given by International Federation of Clinical Chemistry. The paper presents the nomenclature, physical and chemical properties, and physiology and pathologic physiology of vitamin D, as well as various diseases associated with changed serum levels of vitamin D and its metabolites. There follow the description of the method for determining vitamin D levels, used at the Institute of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, which allows for simultaneous determinations of three vitamin D metabolites and consists of the following three phases: serum deproteinization (acetone-trile), solid phase extraction, and high pressure liquid chromatography and competitive protein binding assay. Reference individuals for our study were selected prospectively: we used blood samples obtained from them on periodic medical examinations. After excluding samples which failed to meet the set criteria of vitamin D physiology and pathologic physiology, we obtained 120 samples for calcidiol and calcitriol determinations, and 240 samples for calcidiol measurements. The latter were further divided into a spring and autumn subgroup. The results were analysed using a nonparametric statistical test. In addition a normal metabolite distribution (Gauss) was applied. We obtained mean 0.95 intervals with a 0.90 confidence interval for the reference values of calcidiol, calcitriol and calcitriol of adult males in Slovenia,

*Doc. dr. Joško Osredkar, dipl. ing. farm., Inštitut za klinično kemijo in klinično biokemijo Klinični center, 1525 Ljubljana
**Mag. Janja Marc, dipl. ing. farm., Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

in jesenske vrednosti kalcidiola med seboj značilno razlikujejo. Osrednji 0,95 interval z intervalom zaupanja 0,90 za spodnje in zgornje referenčne meje za odrasle moške v Sloveniji, ki jih imamo glede na presnovo vitamina D za zdrave, je v primeru kalciola med 3,4 (3,1–3,4) in 8,2 (7,2–8,4) nmol/l, v primeru kalcidiola pri jesenskih vzorcih med 114 in 172 nmol/l ter spomladanskih vzorcih med 50 in 107 nmol/l, medtem ko je v primeru kalcitriola med 93 in 139 nmol/l.

considered healthy according to their vitamin D metabolism.

Uvod

Vitamini so organske sestavine hrane, ki delujejo kot katalizatorji in so v zelo majhnih količinah potrebne za normalen razvoj organizma. V organizmu se ne sintetizirajo ali pa se ne sintetizirajo v dovolj velikih količinah, zato jih moramo vnašati s hrano ali kako drugače.

Vitamine delimo v dve skupini. V prvi so lipofilni vitamini A, D, E in K, v drugi pa so vodotopni vitamini tiamin (B_1), riboflavin (B_2), niacin (B_6), folna kislina, biotin, pantotenska kislina, B_{12} in C. Zaradi razlik v vodotopnosti se ti dve skupini razlikujeta v nekaterih temeljnih bioloških lastnostih. Vodotopni vitamini se v organizmu praktično ne shranjujejo in če jih vnesemo v organizem v presežku, se večinoma izločijo s sečem. V maščobah topni vitamini pa se v organizmu shranjujejo in če jih vnašamo v presežku, lahko pride do hipervitaminoze (predvsem vitamina A in D) (1).

Iz 7-dehidroholesterolu v nizu reakcij nastaja vitamin D. Ta je eden najpomembnejših esencialnih bioregulatorjev presnove Ca^{2+} in fosfata pri višje razvitih živalih. Skupaj s peptidnim hormonoma parathormonom (PTH) in kalcitoninom (CT) vzdržuje homeostazo Ca^{2+} in fosfata.

Nomenklatura vitamina D

Tabela 1. Primeri starih in priporočenih trivialnih imen za snovi iz skupine vitamina D.

Staro trivialno ime	Priporočeno trivialno ime
Holekalciferol	Kalcio ali holekalciferol
25-hidroksiholekalciferol	Kalcidiol
1α, 25-dihidroksiholekalciferol	Kalcitriol
Ergokalciferol	Erkalcio ali ergokalciferol
1α, 25-dihidroksiergokalciferol	Erkalcitriol
1α, 24R, 15-trihidroksiholekalciferol	Kalcitetro

V skladu s priporočili IUPAC-IUB Komisije za biokemično nomenklaturu se izraz vitamin D nanaša na vse steroide, ki imajo kakovostno enake biološke učinke kot kalcio. Torej se izrazi, kot so aktivnost vitamina D, antagonist vitamina D, pomanjkanje vitamina D in podobno, lahko uporabljajo. Izraz vitamin D smemo uporabljati kot sinonim za

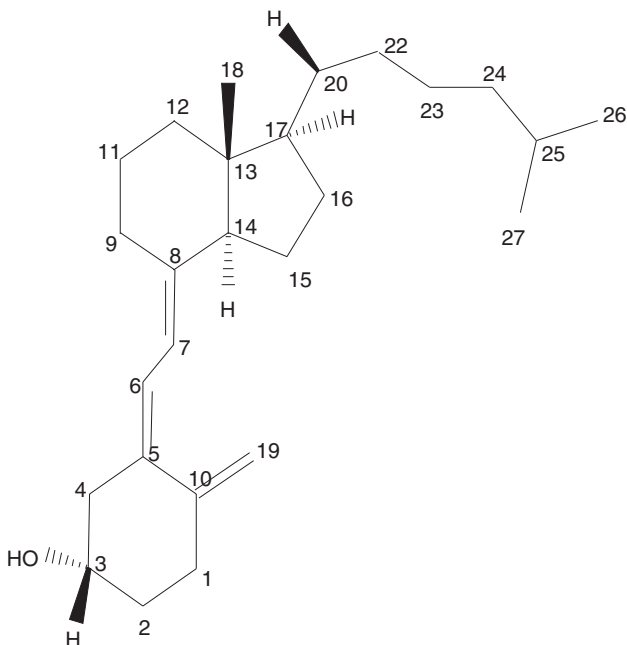
kalciol. IUPAC-IUB priporoča za vitamin D in njegove presnovke nova, poenostavljena trivialna imena. Nekaj primerov je navedenih v tabeli 1. Uporabo starih trivialnih imen IUPAC-IUB izjemoma dovoljuje, vendar je ne priporoča (2).

Zgradba in fizikalno-kemične lastnosti vitamina D

Kemično spadajo vitamin D in njegovi presnovki v skupino sekosteroidov z odprtim obročem B. Zgradbo kalciola prikazuje slika 1.

V raztopini prevladujeta dve konformaciji, »iztegnjena« (slika 1) in »stisnjena« (vrtenje okrog vezi C₆–C₇), ki sta v dinamičnem ravnotežju (3). Fiziološko pomembnejša je cis-trans izomerizacija kalciola okrog dvojne vezi C₅–C₆, ki pod vplivom UV-žarkov poteka v koži. Verjetno je to eden od varovalnih mehanizmov, ki organizem varujejo pred hipervitaminozo D, kajti nastali 5E-kalciol je bistveno manj aktiven kot 5Z-kalciol.

Med študijem povezave med zgradbo in delovanjem vitamina D so ugotovili, da ima hidroksilna skupina na atomu C₃ razmeroma manj pomembno vlogo. Za doseg maksimalne učinkovitosti sta bistveni hidroksilni skupini na C₁ in C₂₅. Navzoči morata biti obe hkrati. Analogi brez ene ali druge skupine so *in vitro* skoraj neaktivni, *in vivo* pa se lahko presnavljajo v aktivne presnovke. Dvojna vez in dodatna hidroksilna skupina v stranski verigi sekosteroidnega obroča pri sesalcih ne vplivata na biološko aktivnost, druge modifikacije stranske verige (podaljševanje, krajšanje, dodatna hidroksilacija) pa jo močno zmanjšajo (3).



Slika 1. Kalciol; (5Z,7E)-(3S)-9,10-seko-5,7,10(19)-holestatrien-3-ol.

Kalciol in erkalciol sta v obliki brezbarvnih do bledorumenih kristalov, ki so netopni v vodi, zmerno topni v maščobah, oljih in etanolu ter dobro topni v acetonu, dietiletru in petroletru (4). Nekatere druge fizikalno-kemične lastnosti so navedene v tabeli 2.

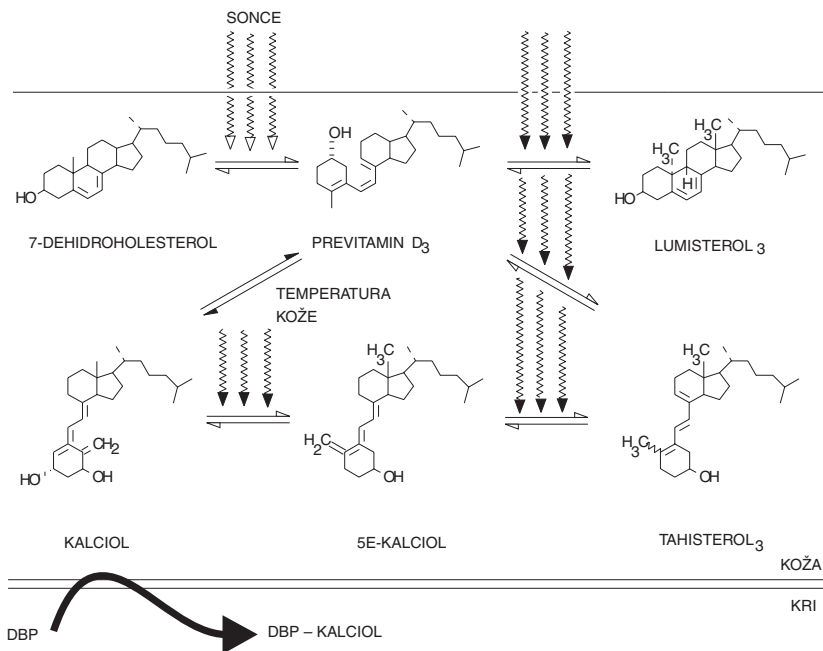
Tabela 2. Nekatere fizikalno-kemične lastnosti kalciola, erkalciola in kalcitriola.

Presnovek	Mol. masa	Tališče [° C]	UV-absorpcija v etanolu		
			λ [nm]	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	ξ [l/mol cm]
Kalciol	384,6	84–85	264	485	18300
Erkalciol	396,6	121	264	462	19400
Kalcitriol	416,6	114–115	264	418	–

Fiziologija in patofiziologija vitamina D

Biosinteza vitamina D

Do sinteze kalciola prihaja v idealnih okoliščinah tudi v organizmu (zadostna izpostavljenost sončni svetlobi); ta sinteza zadostuje potrebam organizma. Naslednja pomembna



Slika 2. Sinteza kalciola iz 7-dehidroholesterola v koži. DBP – vitamin D vezoča beljakovina.

lastnost kalciola je njegova bioaktivacija, ki poteka z dvema zaporednima hidroksilacijama v jetrih in ledvicah.

Kaciol se sintetizira v koži iz 7-dehidroholesterolola pod vplivom UV-svetlobe (slika 2). Danes je znano, da je temeljni strukturni pogoj za fotokemično pretvorbo steroidov Δ_{5-7} sistem dvojnih vezi v obroču B. Ta specifično locirani sistem absorbira UV-svetlobo določenih dvojnih vezi, kar vodi v serijo konverzij, te pa vodijo do nastanka previtamina D_3 .

Koža je zelo bogat vir 7-dehidroholesterolola. Če je izpostavljena UV-žarčenju, se le-ta pretvori v previtamin D_3 v celotni povrhnjici. Najvišja koncentracija 7-dehidroholesterolola je v stratum spinosum in stratum basale; večina sinteze vitamina D_3 verjetno poteka tam. Sončna svetloba navadno pretvori okrog 15 % razpoložljivega 7-dehidroholesterolola v previtamin D_3 , do tega pride približno 30 minut po obsevanju. Daljši čas obsevanja (npr. do 8 ur) ne povečuje koncentracije previtamina D_3 , vodi pa do sinteze lumisterola₃, tahisterola₃ in 5E(trans)kalciola.

Optimalna pretvorba se doseže z valovno dolžino 295 nm, pri kateri se v previtamin D_3 pretvori 65–71 % 7-dehidroholesterolola. Primeri, da bi prišlo do hipervitaminoze D zaradi intenzivne izpostavljenosti sončni svetlobi, niso znani. Vitamin D_3 , ki je nastal v koži, se veže na vitamin vezočo beljakovino (angl.: *vitamin D binding protein* DBP) in vstopa v obtok. DBP praktično nima afinitete do lumisterola₃ in tahisterola₃. Pretvorba previtamina D in vitamina D v biološko neaktivni obliki verjetno pomembno uravnava kožne rezerve vitamina D_3 . Koncentracija 7-dehidroholesterolola v povrhnjici se z leti manjša, kar je verjetno razlog, da se v starosti pojavijo bolezni, povezane z motnjami v presnovi Ca^{2+} .

Absorpcija in prenos vitamina D

V organizmu verjetno ni specifičnega mehanizma za absorpcijo peroralno vnesenega vitamina D. To je razumljivo, saj vitamin D_3 v velikih količinah nastaja v koži in lahko zadošči potrebam organizma brez absorpcije v črevesju. Absorpcija – spodbujajo jo soli žolčnih kislin, mleko in maščobe – poteka vzdolž celotnega tankega črevesa z mehanizmom pasivne difuzije. Približno 90 % absorbiranega vitamina D se veže na hilomikrone limfe, medtem ko se ga približno 9,5 % veže na α -globulin. Ta je verjetno identičen specifični beljakovini, ki veže vitamin D v krvi.

Vitamin D vezoča beljakovina (DBP) spada v α -frakcijo globulinov, ima molekulsko maso približno 58.000 in izoelektrično točko pri pH 4,89.

V limfi se vitamin D prenaša v neesterificirani obliki in je, verjetno zaradi hidrofilne hidroksilne skupine na mestu 3, na površini hilomikronov. S tega položaja se lahko brez težav prenese na DBP. V krvi se vsaj del na hilomikrone vezanega vitamina D prenese na DBP, drugi del pa se sprostí, ko se hilomikroni razgradijo. Ostali hilomikroni, skupaj z vezanim vitaminom D, potujejo v jetra.

Vitamin D in njegovi presnovki krožijo po krvi, večinoma vezani na DBP. Ta prenašalna beljakovina ima večjo afiniteto za kalcidiol kot za kaciol ali njegove dihidroksilirane presnovke. Plazemska koncentracija DBP je veliko večja kot normalna koncentracija kalcidiola, zato tudi pri najvišjih fizioloških plazemskih koncentracijah kalcidiola več kot 90 %

plazemskega DBP kroži po krvi brez vezanega kalcidiola. Plazemska koncentracija DBP je neodvisna od koncentracije vitamina D, čeprav se spremeni med nosečnostjo in zdravljenjem s hormoni (4).

Porazdelitev in shranjevanje vitamina D

Ravni kalciola in kalcidiola v različnih organih, razen v plazmi, niso natančno poznane. Relativno največ kalciola se nahaja v maščobnem tkivu, nato v plazmi, pljučih, jetrih in srcu. Kalcidiola je največ v ledvicah, jetrih, pljučih, aorti in srcu, to je v organih, ki so posebno nagnjeni h kalcifikaciji in hipervitaminozi D. Razlika v porazdelitvi nastane predvsem zato, ker je kalcidiol vezan večinoma na DBP, medtem ko je kalciool porazdeljen med DBP in lipoproteini.

Kalcidiol je glavni presnovek kalciola v plazmi, sledi mu 24-hidroksikalcidiol. Podatki o plazemski koncentraciji kalciola se v literaturi zelo razlikujejo (4) (tabela 3).

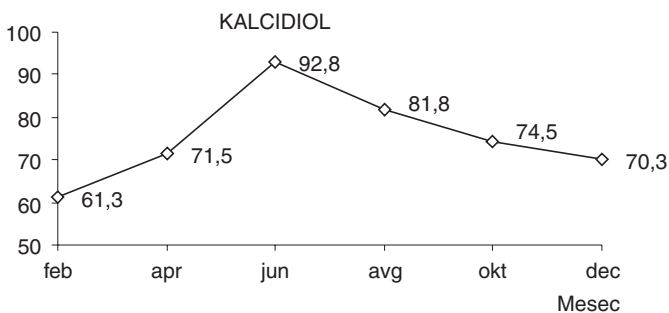
Tabela 3. Plazemske koncentracije vitamina D in njegovih presnovkov pri odraslih (4).

Presnovek	Plazemska koncentracija pg/ml	nmol/l
Kalciool	15000–60000	39–156
	2000–3000	5,2–7,8
	500–2000	1,3–5,2
Kalcidiol	15000–38000	37,4–94,9
	5000–50000	12,5–124,8
Kalcitriol	24–40	0,057–0,096
	30–40	0,072–0,096

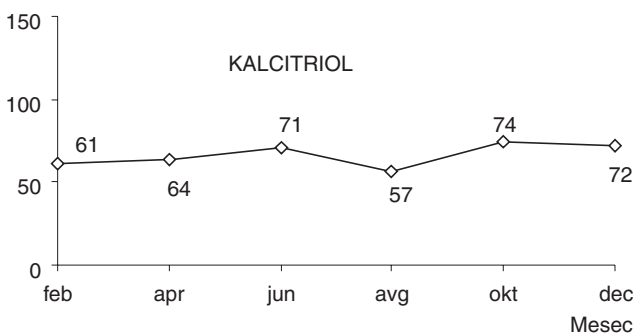
Raven kalcidiola in 24-hidroksikalcidiola v serumu se spreminja prek leta, največja je od junija do avgusta, najmanjša pa v zimskih mesecih (slika 3), kar je povezano z močjo sončnih žarkov. Ker je večina ljudi poleti bolj izpostavljena UV-sevanju, pa tudi UV-žarki so takrat močnejši, so te ugotovitve razumljive. V nasprotju s tem pa je raven kalcitriola v serumu razmeroma stalna, kar kaže na obstoj zelo učinkovitega regulatornega mehanizma, ki ga pri 24-hidroksikalcidiolu ni.

V nasprotju z vitamini A, E in K se vitamin D ne shranjuje v jetrih. Človekova jetra vsebujejo vitamin D le v sledovih (približno 1 µg/100 g). Primarna naloga jeter pri presnavljanju tega vitamina je nastanek kalcidiola, ki se nahaja predvsem v ekstracelularnih tekočinah. Manj jasne so naloge jeter pri njegovi inaktivaciji in izločanju razpadnih produktov z žolčem. Z aplikacijo radioaktivno označenega vitamina D so ugotovili, da sta pri človeku najpomembnejša organa, kjer se shranjuje, maščobno tkivo in skeletno mišičje. Kromatografija radioaktivnih vzorcev je pokazala, da se v maščobnem tkivu nahaja predvsem nespremenjeni kalciool, medtem ko mišice vsebujejo predvsem kalcidiol.

Serumska koncentracija (pmol/l)



Serumska koncentracija (pmol/l)



Slika 3. Spremembe serumskih koncentracij kalcidiola in kalcitriola v različnih mesecih leta (4).

Bioaktivacija vitamina D

Hidroksilacija kalciola v jetrih

Do hidroksilacije kalciola v kalcidiol primarno prihaja v jetrih. Ugotovili so tudi, da je kalcidiol kvantitativno najpomembnejša oblika vitamina D v krvni plazmi. Do hidroksilacije pa ne prihaja le v jetrih, ampak tudi v tankem črevesu in ledvicah, čeprav v manjšem obsegu. Encim, ki omogoči to hidroksilacijo, je kalcio-25-hidroksilaza, ki je od citokroma P-450 odvisni monoooksigenazni sistem. Encim se nahaja v mitohondrijih in mikrosomskih frakcijah jetrnih celic. Najpomembnejša pri uravnavanju aktivnosti jetrne 25-hidroksilaze je koncentracija vitamina D v jetrih (5).

Hidroksilacija kalcidiola v ledvicah

Hidroksilacija kalcidiola v ledvicah lahko poteka na dveh mestih, na C_1 ali C_{24} . Reakciji omogočata dva mitohondrijska encima, kalcidiol- 1α -hidroksilaza (krajše 1-hidroksilaza)

in kalcidiol-24-hidroksilaza (krajše 24-hidroksilaza). Nahajata se v proksimalnem delu ledvičnega tubula. Aktivnosti obeh sta natančno nadzorovani in recipročni. Če je koncentracija kalcitriola povečana, pride do inhibicije 1-hidroksilaze in do aktivacije 24-hidroksilaze. Posledica tega je sinteza 24-hidroksikalcidiola namesto kalcitriola. Mehani- zem uravnavanja še ni natančno znan, znani pa so nekateri njegovi dejavniki: kalcitriol, PTH, kalcitonin, prolaktin, estradiol, testosteron, inzulin, rastni hormon in Ca^{2+} (4).

Tvorba kalcitriola zunaj ledvic

Ledvice so poglaviti organ sinteze kalcitriola, vendar ta proces poteka tudi zunaj ledvic (mielomske celice (6), kostne celice (7), embrionalne črevesne celice (8), kožne celice). Med nosečnostjo nastaja kalcitriol tudi v posteljici (9).

Razpad in izločanje vitamina D

Glavno mesto razgradnje kalcitriola in 24-hidroksikalcitriola so jetra. Tu pride do konjugacije med hidroksilno skupino na atomu C_3 kalcitriola in glukuronsko kislino. V jetrih nastajajo še drugi presnovki, ki se prav tako izločajo v žolč.

Do inaktivacije kalcitriola in 24-hidroksikalcitriola prihaja tudi v ledvicah in črevesnih celicah. Stranska veriga kalcitriola se v ledvicah oksidira, pri čemer nastane npr. kalcitroj- ska kislina (1-hidroksi-24,25,26,27-tetranor-holekalciferol-23-karboksilna kislina), 1,25-hidroksiholekalciferol-26,23-lakton ali kalcitetrol (1,24,25-trihidroksiholekalciferol). Tako se presnovi 30–40% kalcitriola. Nekateri raziskovalci domnevajo, da konjugacija kalcidiola v jetrih in enterohepatični obtok glukoronida predstavljata depo kalcidiola v organizmu (10).

Biološki procesi, ki jih nadzoruje vitamin D

Glavna naloga vitamina D v organizmu je vzdrževanje homeostaze Ca^{2+} . Najpomembnejši organi, na katere vpliva, so tanko črevo, okostje in ledvice. V tankem črevesu spodbuja absorpcijo Ca^{2+} in fosfata, v ledvicah reabsorpcijo teh ionov, v okostju pa mobilizacijo in vgrajevanje mineralov. Vsi ti procesi so povezani z vzdrževanjem normalne plazemske koncentracije Ca^{2+} in fosfata. Ca^{2+} nadzoruje veliko pomembnih biokemičnih procesov, kot so mišično krčenje, prenos živčnega signala, strjevanje krvi itd.

Mehanizmi, ki nadzirajo sintezo in delovanje kalcitriola, močno spominjajo na mehanizme, kakršne poznamo pri klasičnih steroidnih hormonih. Splošni model za hormonsko aktivnost predvideva obstoj specifičnih celic v tarčnem organu, ki imajo zelo specifične receptorske beljakovine za hormon. Ko se hormon veže nanj, se premakne v kromatin, kjer spodbudi prepis določenih genov v mRNA in s tem poveča sintezo ustreznih beljakovin. Ugotovili so, da kalcitriol ustreza vsem tem zahtevam. V črevesnih celicah spodbuja sintezo od vitamina D odvisne, kalcij vezoče beljakovine (CaBP). Količina črevesnega CaBP je natančno sorazmerna količini kalcitriola, ki se nahaja tam. Danes poznamo tri vrste CaBP, ki se razlikujejo po molekularni masi in vezavni kapaciteti za Ca^{2+} . Obstaja velika družina znotrajceličnih beljakovin, ki vežejo Ca^{2+} , vendar večina od njih ni odvisna od vitamina D.

Specifične receptorske beljakovine se ne nahajajo samo v najbolj znanih tarčnih organih vitamina D (črevesje, kosti, ledvica, koža), ampak tudi drugod: v mlečnih žlezah, trebušni slinavki, obščitničnih žlezah, hipofizi in posteljici. Receptorji v mlečnih žlezah verjetno služijo za uravnavanje vsebnosti Ca^{2+} v mleku. Celice β otočkov trebušne slinavke vsebujejo razmeroma velike koncentracije CaBP. Pri živalih pomanjkanje vitamina D povzroči motnje v izločanju inzulina. Obstajajo tudi znaki, da 24-hidroksikalciadiol in kalcitriol vplivata na izločanje PTH. Citosolske receptorje za kalcitriol so našli tudi v človeških mononuklearnih limfocitih in v nekaterih vrstah malignih celic. Dokazano je, da kalcitriol lahko pospeši diferenciacijo malignih celic pri levkemiji. Med nosečnostjo in dojenjem se črevesni prenos Ca^{2+} poveča predvsem zaradi povečane sinteze CaBP. Raziskave s pomočjo imunoloških metod so pokazale obstoj CaBP v posteljici, kar je pomembno pri razvoju okostja otroka. Posteljica vsebuje receptorje za kalcitriol, ta pa uravnava prenos Ca^{2+} preko nje. Vitamin D je potreben tudi za normalno mišično krčenje, tvorbo zobne sklenine ter agregacijo trombocitov (4, 5).

Spremembe koncentracij vitamina D in presnovkov pri nekaterih boleznih

Rahitis in osteomalacija

Pomanjkanje vitamina D vodi – zaradi neuravnotežene absorpcije Ca^{2+} in fosfata – do rahitisa pri otrocih in osteomalacije pri odraslih. Rahitis je najbolj znana hipovitaminoza; v Evropi je bila zelo razširjena ob koncu 19. stoletja, predvsem na industrijskih območjih.

Rahitis se navadno najprej pojavi pri otrocih med 6. in 24. mesecem starosti. Prvi simptom je motena mineralizacija rastočih kosti, pri katerih se kostni matriks še razvija. Kasneje se pojavijo deformacije okostja. Drugi simptomi so mišična šibkost, zmanjšanje plazemske koncentracije Ca^{2+} in večja aktivnost alkalne fosfataze v kosteh.

Pri osteomalaciji pride do izgube Ca^{2+} in fosfata iz že nastalih kosti, kar povzroči premajhno mineralizacijo kostnega tkiva, to pa vodi do šibkosti kosti, bolečin in celo do zlomov. Osteomalacija se pogosto pojavi pri ženskah, ki so rodile več otrok, in sicer zaradi nekompenzirane izgube Ca^{2+} v nosečnosti.

Najpogostejši razlogi za rahitis in osteomalacijo so nezadostna izpostavljenost sončni svetlobi in/ali nezadosten vnos vitamina D s hrano, poleg tega pa še pomanjkanje fosfata. Drugi razlogi so preslabo delovanje črevesja in pomanjkanje žolčnih kislin, ki so nujne za absorpcijo vitamina D. Do rahitisa in osteomalacije pride tudi pri prizadetosti jetrne 25-hidroksilaze in pri nefrozah. Motnje v presnovi vitamina D so prav tako lahko posledica zdravljenja z nekaterimi zdravilnimi učinkovinami, med katerimi sta najbolj znana fenobarbiton in izoniazid.

Poleg opisane oblike rahitisa obstajajo tudi genetsko pogojene napake presnove vitamina D, ki se kažejo kot rahitis. Lahko gre za motnje v sintezi kalcitriola (odsotnost encimov) ali pa za motnje v sintezi receptorske beljakovine za kalcitriol (4).

Ledvična osteodistrofija

Ledvična osteodistrofija je posledica ledvičnih bolezni različnega izvora. Za nastanek kalcitriola, ki je bistven hormon za absorpcijo Ca^{2+} iz črevesja, so potrebne nepoškodovane ledvice. Ledvična osteodistrofija je pogost zaplet pri bolnikih, ki so podvrženi dializi. Stopnja osteodistrofije je sorazmerna z okvaro ledvic. Nepravilnosti okostja se kažejo kot zmanjšanje kostnega tkiva in splošna demineralizacija ter so združene z bolečinami v kosteh, zlomi, deformacijami in nenormalno držo. Pri otrocih je prizadeta rast. V serumih nezdravljenih bolnikov najdemo hipokalcemijo, hiperfosfatemijo, povečano alkalno fosfatazo in povišano raven PTH. Ledvična osteodistrofija je pogostejša pri otrocih kot pri odraslih, in sicer zaradi večje občutljivosti rastočih kosti za spreminjajoče se ravni vitamina D, fosfata in PTH, do katerih pride pri kroničnih ledvičnih boleznih.

O patogenezi te bolezni je znano, da kronična ledvična odpoved, zaradi pomanjkljive absorpcije Ca^{2+} v črevesju in filtracije fosfata v ledvicah, vodi do hipokalcemije, ta pa do hiperfosfatemije in zvišane ravni PTH. Ko ledvična odpoved napreduje, se plazemska raven kalcitriola znižuje, medtem ko presežek PTH povzroča bolezensko resorpcijo kosti (4).

Hipoparatiroidizem

Hipoparatiroidizem (prekinjeno ali zmanjšano nastajanje PTH) je lahko posledica kirurško odstranjenih obščitničnih žlez ali pa motenj v teh žlezah. Izločanje PTH je posledica hipokalcemije. Bolniki s hipoparatiroidizmom niso sposobni tvoriti tega signala, torej tudi ne pretvorbe kalcidiola v kalcitriol. Zato se plazemska koncentracija Ca^{2+} še naprej zmanjšuje, kar lahko vodi do hiperfosfatemije. Do pomanjkanja kalcitriola pri bolnikih s hipoparatiroidizmom pride, ker je premalo dveh pomembnih stimulusov 1-hidroksilaze: PTH in hipofosfatemije. Pri zdravljenju je treba kompenzirati primanjkljaj kalcitriola, in sicer s fiziološkimi odmerki kalcitriola, 1α -hidroksivitamina D ali pa farmakološkimi odmerki vitamina D (4).

Osteoporoz

Natančen vzrok osteoporoze ni znan, verjetno pa gre za moteno sintezo organskega matriksa kosti. Prizadene predvsem starejše ljudi, pri katerih so koncentracije spolnih hormonov zmanjšane, in tiste, ki so bili zdravljeni s steroidi (npr. glukokortikoidi). Bolniki imajo zmanjšano koncentracijo kalcitriola, povečano koncentracijo PTH ter pospešeno izločajo Ca^{2+} in fosfat s sečem. Navadno je uspešno zdravljenje s kalcidiolom ali kalcitriolom in 1α -hidroksivitaminom D (4).

Hipervitaminska D

Vitamin D, ki nastane endogeno, z delovanjem svetlobe na kožo, nikoli ne učinkuje toksično. Če pa ga v organizem vnašamo v prevelikih količinah, lahko pride do zastrupitve. Njeni znaki so slabost, izguba teka, glavobol, bolečine v trebuhu, krči, bruhanje, driska in poliurija. Poviša se serumska koncentracija Ca^{2+} , kar lahko povzroči kalcifikacijo mehkih tkiv, predvsem ledvic, srca, pljuč in arterij. Zato je treba med kakršnikoli zdravljenjem z vitaminom D nadzorovati koncentracijo Ca^{2+} v serumu in seču (11).

Analizni postopki za določanje koncentracij kalciola, kalcidiola in kalcitriola

Biološke metode

Biološke metode so primerne predvsem za biološko preizkušanje vitamina D, ki je v različnih zdravilnih pripravkih ali dodan hrani. S temi metodami lahko merimo stopnjo kalcifikacije kosti po aplikaciji vitamina D, delež anorganskih soli v kostni masi po zdravljenju z vitaminom D in povečanje koncentracije Ca^{2+} v serumu testnih živali. Gre torej za merjenje posledic delovanja vitamina D. Te metode so dolgotrajne in drage, moteča pa je tudi razmeroma velika variabilnost rezultatov znotraj iste skupine. Kljub naštetim pomanjkljivostim se še vedno uporabljajo za vrednotenje bioloških učinkov novih preparatov, ki vsebujejo vitamin D (4).

Kolorimetrične metode

Podlaga večine kolorimetričnih metod je reakcija med vitaminom D in antimonovim trikloridom, pri kateri nastane obarvan kompleks, katerega absorpcijo merimo. Metode so dodatno modificirane, vendar so premalo občutljive za uporabo v klinični kemiji. Uporaba omejuje še slaba specifičnost, kar zahteva pred določanjem eno ali več stopenj čiščenja vzorca (11, 13).

Plinska kromatografija

Čeprav so plinsko kromatografijo zelo pogosto uporabljali pri določevanju velikega števila steroidov in hormonov, v analitiki vitamina D in presnovkov ni našla pravega mesta. Proste hidroksilne skupine, dvojne vezi in možnost toplotne izomerizacije vitamina D med postopkom kromatografije povzročijo razširitve vrhov, nelinearen odziv detektorja ter pojav dvojnih vrhov na kromatogramu (11, 13).

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

V primerjavi s plinsko kromatografijo pri tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti (HPLC) nimamo težav, povezanih s toplotnimi pretvorbami vitamina D. Ker ta vitamin in njegovi presnovki največ absorbirajo pri valovni dolžini 254 nm, ga lahko odkrivamo s spektrofotometrom, ki spada v standardno opremo modernih tekočinskih kromatografov. HPLC omogoča tudi ločevanje presnovkov vitamina D, kar je potrebno, če jih želimo določati z imunološkimi metodami (5, 11, 13).

Radioimunološke metode in metode s kompetitivno vezavo na beljakovino

Pri teh metodah predstavlja presnovek vitamina D ligand, ki se veže na beljakovino. Ta je največkrat serumska prenašalna beljakovina, DBP, specifično protitelo ali zelo specifična receptorska beljakovina. Vitamin D, ki ga določamo, tekmuje z dodanim radioaktivnim vitaminom D za specifična vezavna mesta. Ko ločimo vezan in nevezan vitamin D, lahko z umeritvenimi krivuljami dobimo koncentracijo vitamina D, ki ga določamo iz množine vezanega označenega vitamina D.

Občutljivost teh metod je največja med vsemi do sedaj razvitimi metodami, prednosti pa so še naslednje: majhen volumen vzorca (0,1–1 ml), malo rokovanja z vzorci, hitra

izvedba postopka, možnost analize večjega števila vzorcev hkrati. Glavna pomanjkljivost je slaba specifičnost, zato je treba pred izvedbo končne meritve pripraviti vzorec (ekstrakcija lipidov, ločevanje različnih presnovkov vitamina D) (11, 13).

Eksperimentalni del

Delovni načrt

V prejšnjih raziskavah je bilo ugotovljeno, da so koncentracije in koncentracijska razmerja kalciola, kalcidiola in kalcitriola v krvnem serumu pomemben dejavnik za vzdrževanje homeostaze Ca^{2+} (13). Ogroženi so predvsem ljudje z ledvičnimi in jetrnimi boleznimi, kajti pri njih je motena presnova kalciola v kalcitriol. V Sloveniji je postopek, s katerim sočasno določamo vse tri presnovke vitamina D, v uporabi šele od leta 1993, zato ustreznih referenčnih vrednosti še nismo določili. Serumska koncentracija vitamina D_3 je odvisna tudi od geografske lege in letnega časa, zato je treba določiti referenčne intervale, ki bodo odražali dejanske serumske koncentracije vitamina D_3 pri slovenski populaciji.

Celoten postopek lahko razdelimo v naslednje faze:

- pridobivanje podatkov o fiziologiji in patofiziologiji vitamina D in presnovkov,
- pridobivanje podatkov o postopkih za določanje referenčnih vrednosti,
- izbira metode za določitev serumskih koncentracij vitamina D in presnovkov,
- izbiranje referenčnih posameznikov,
- zbiranje vzorcev,
- analiza vzorcev,
- statistična obdelava rezultatov in
- določitev referenčnih intervalov.

Izbira metode

Tabela 4. Nadzor kakovosti postopka za določanje kalciola, kalcidiola in kalcitriola.

	Kalciol	Kalcidiol	Kalcitriol
Ponovljivost v seriji (KV %)	9,93	6,33	5,90
Ponovljivost med serijami (KV %)	11,37	9,17	7,77
Izkoristek metode (%)	72,10	86,00	94,90
Občutljivost metode	1,90 nmol/l	5,50 nmol/l	5,30 nmol/l

V letih 1992–1994 je bil v okviru Hormonskega laboratorija (Inštitut za klinično kemijo in klinično biokemijo) ter Katedre za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani razvit postopek za sočasno določanje kalciola, kalcidiola in kalcitriola v serumu. Postopek ustreza vsem kvalitativnim zahtevam za tovrstne preiskave in je uveden v klinično laboratorijsko prakso v že omenjenem inštitutu (11, 18) (tabela 4).

Metoda je ovrednotena tudi s stališča nadzora kakovosti postopka.

Izbira referenčnih posameznikov

Referenčne posameznike smo izbrali po prospektivni (*a priori*) metodi. Uporabili smo vzorce krvi, ki je ostala po odvzemu ob sistematskih pregledih posameznikov. Preverili smo ustreznost vzorcev in jih po potrebi izključili.

Izključili smo posameznike, za katere je bila potrjena vsaj ena od naslednjih diagnoz: ledvične bolezni, jetrne bolezni, bolezni okostja, motnje absorpcije, anemije, kakršnakoli infekcijska bolezen, dolgotrajno uživanje zdravil (tudi kontracepcijskih sredstev), uživanje kakršnihkoli farmakološko aktivnih dodatkov k hrani (napitek Red Bull, vitaminski preparati, preparati za povečanje mišične mase, ...), nosečnost, uživanje nikotina (več kot 10 cigaret na dan), kakršenkoli patološki rezultat encimskih preiskav. Ob upoštevanju vseh teh izključitvenih kriterijev smo prišli do zaključka, da je bila skupina, ki so jo sestavljale ženske premajhna, da bi lahko izračunali orientacijske referenčne vrednosti za vsak spol posebej; zato smo izračunali skupne orientacijske referenčne vrednosti.

Dodatek

Odvzem vzorcev

Vzorci so bili vsem posameznikom odvzeti zjutraj na tešče po postopku, ki je standardiziran za odvzem krvi iz vene. Preiskovanci so sedeli, kri jim je bila odvzeta iz vene na desni ali levi podlahti.

Takoj po odvzemu smo kri centrifugirali ($t = 10 \text{ min}$, $3000 \times g$), serum smo hranili do analize pri temperaturi -20°C .

Analiza vzorcev

Postopek, ki smo ga uporabili, ima tri stopnje:

- deproteinizacija seruma,
- ločitev presnovkov in
- določitev koncentracije posameznih presnovkov.

Deproteinizacija

Najprej smo 1 ml seruma dodali 1 ml acetonitrila, to 30 sekund stresali na stresalniku in nato v hladilni centrifugi centrifugirali pri 2700 obratih/min pri 4°C . Supernatant smo prenesli v drugo epruveto, dodali 1 ml K_2HPO_4 (pH 10,5), 30 sekund stresali na stresalniku in spet centrifugirali pri 2700 obratih/min pri 4°C .

Ločitev presnovkov

Presnovke smo ločevali z metodo ločitve na kolonah s trdnimi nosilci (kolone SPE). Kolone smo namestili na stojalo. Podtlak je bil izključen in smo ga vključili šele, ko smo na kolono nalili prvo topilo. Kolone smo spirali z naštetimi topili v naslednjem vrstnem redu: 5 ml heksana, 5 ml 2-propanola, 5 ml metanola in 5 ml demineralizirane vode.

Ko je vsa voda odtekla iz kolone, je bila ta pripravljena za aplikacijo vzorcev.

Na pripravljene kolone smo nanесли vzorec, ki smo ga v prejšnji stopnji deproteinizirali. Vzorec smo spirali z naslednjimi topili:

- 5 ml demineralizirane vode – eluat smo zavrgli,
- 5 ml raztopine metanol/demineralizirana voda (70/30 vol %) – eluat smo zavrgli,
- 5 ml raztopine heksan/diklorometan (90/10 vol %) – eluat smo lovili v epruvete,
- 5 ml raztopine 2-propanol/heksan (1/99 vol %) – eluat smo zavrgli,
- 5 ml raztopine 2-propanol/heksan (5/95 vol %) – eluat smo lovili v epruvete za scintilacijsko merjenje.

Epruvete z eluati, ki smo jih shranili, smo prenesli v vodno kopel (37 °C) in v atmosferi N₂ uparili do suhega.

V eluatu sta se po spiranju z raztopino 10-odstotnega diklormetana v heksanu nahajala kalcio in kalcidiol, kalcitriol pa je bil v eluatu po spiranju s 5-odstotnim 2-propanolom v heksanu.

Suhi preostanek eluata s kalcio in kalcidiolom smo raztopili v 75 µl zmesi heksan/diklormetan/metanol (60/39/1) in aplicirali v normalnofazni tekočinski kromatografski sistem visoke ločljivosti s stacionarno fazo Nucleosil® 100 in z mobilno fazo heksan/diklorometan/metanol (60/39/1). Pri hitrosti pretoka mobilne faze 1 ml/min se je kalcio eluiral med 5. in 6. minuto, kalcidiol pa med 13. in 14. minuto. Eluata smo med 5. in 6. ter med 13. in 14. minuto lovili v epruvete, te prenesli v vodno kopel (T = 37 °C) in v atmosferi N₂ (P = 5 psi) uparili do suhega.

Določitev koncentracije posameznih presnovkov

Koncentracijo kalcidiola smo določili spektrofotometrično v UV-območju, kalcidiol in kalcitriol pa z metodo CPBA.

Določitev koncentracije kalcio

Do suhega uparjen eluat iz NP HPLC, ki je vseboval kalcio, smo rekonstituirali v 40 µl metanola in injicirali v reverznofazni sistem tekočinske kromatografije visoke ločljivosti s stacionarno fazo Nukleosil 100® C₁₈ ter mobilno fazo metanol/voda (98/2 vol %). Pri hitrosti mobilne faze 1 ml/min se je kalcio eluiral po 8 minutah. V kromatografski sistem smo nato aplicirali serijo raztopin različnih koncentracij standardov kalcio, ki smo jih kasneje uporabili za izdelavo umeritvene krivulje.

Koncentracijo kalcio smo določili tako, da smo izmerili višino vrha kalcio, ki nam je kazal izmerjeno absorbanco kalcio pri 264 nm, nato pa smo iz standardne krivulje, ki smo jo konstruirali iz višin vrhov in koncentracij uporabljenih raztopin standardov, odčitali koncentracijo kalcio v apliciranih vzorcih.

Določitev koncentracije kalcidiola

Eluat, ki je vseboval kalcidiol in ekstrakte standardov različnih koncentracij kalcidiola, smo raztopili v 50 µl zmesi alkoholov etanol/metanol/izopropanol (95/5/5 vol %). Plastične epruvete (12 × 70 mm) smo ustrezno označili ter vanje pipetirali vzorce in reagente.

Po dodatku ^3H kalcidiola smo zmes v epruvetah dobro premešali in pokrili z aluminija-sto folijo, da ni bila izpostavljena sončni svetlobi. Epruvete smo postavili v hladilnik ($T = 2-8^\circ\text{C}$). Liofilizirano vitamin D vežočo beljakovino smo rekonstituirali v 16 ml demineralizirane vode in jo dodali v ustrezne epruvete. Te smo spet premešali in pustili stati v hladilniku ($t = 3-4$ ure, $T = 2-8^\circ\text{C}$). Nato smo dodali suspenzijo z dekstranom prekritega oglja in vse pustili stati pri sobni temperaturi ($t = 20$ min). Po končani inkubaciji smo vse epruvete razen dveh (1 in 2) centrifugirali v hladilni centrifugi ($1300-1500 \times g$, $T = 2-8^\circ\text{C}$). V vsako epruveto za scintilacijsko merjenje, ki smo jo prej ustrezno označili, smo dodali $10 \mu\text{l}$ scintilacijske tekočine. Takoj po končanem centrifugiranju smo odlili bistri supernatant v epruvete za scintilacijsko merjenje in jih pokrili.

Radioaktivnost smo merili najmanj 2 minuti v β -scintilacijskem števcu.

Iz rezultatov analize standardnih raztopin kalcidiola smo pripravili umeritveno krivuljo, iz katere smo odčitali delež vezave kalcidiola v vzorcih.

Določitev koncentracije kalcitriola

Epruvete z eluatom po SPE, v katerem se je nahajal kalcitriol, smo prenesli v vodno kopal ($T = 37^\circ\text{C}$), uparili v atmosferi N_2 ($P = 5$ psi) in rekonstituirali v $200 \mu\text{l}$ ledenomrzlega etanola. Vzorce smo premešali, pustili stati 5 min, nato smo jih spet premešali. Postopek določanja koncentracije kalcitriola smo začeli najkasneje po 30 minutah.

Zadostno število epruvet smo ustrezno označili ter vanje pipetirali vzorce in reagente.

V ustrezne epruvete smo najprej dodali določene količine reagenta z receptorsko beljakovino. Vsebinsko smo previdno premešali na stresalniku in inkubirali ($T = 15-20^\circ\text{C}$, $t = 1$ ura). Po končani inkubaciji smo prenesli epruvete na led in v ustrezne epruvete dodali suspenzijo aktivnega oglja v dekstranu. Vsebinsko smo premešali in znova inkubirali ($T = 2-8^\circ\text{C}$, $t = 30$ min), nato pa smo epruvete centrifugirali ($1400 \times g$, $T = 2-8^\circ\text{C}$). Bistri centrifugat smo prelili v epruvete za scintilacijsko merjenje, v katere smo prej dodali po $10 \mu\text{l}$ scintilacijske tekočine.

Radioaktivnost smo merili z β -scintilacijskim števcem 5–10 minut.

Iz izmerjenih in izračunanih rezultatov analize standardnih raztopin, TC, NSB in B_0 smo narisali umeritveno krivuljo ter z nje odčitali koncentracijo kalcitriola v vzorcih.

Material in oprema

Topila

Vsa topila, ki smo jih uporabili (razen demineralizirane vode), so proizvod podjetja Merck, Darmstadt, in so bila označena s stopnjo čistote za kromatografijo; uporabili smo jih, ne da bi jih prej čistili: acetonitril, heksan, 2-propanol, metanol, etanol, diklormetan in demineralizirano vodo.

Reagenti

Reagenti za določanje kalcidiola

Reagenti za določanje kalcidiola so proizvod podjetja Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA 92675, ZDA.

Reagenti za določanje kalcitriola

Reagenti za določanje kalcitriola so proizvod podjetja Nichols Institute Diagnostics B. V., Nieuweweg 172, 6603 BT Wijchen, Nizozemska.

Izračuni

Pri postopkih, ki smo jih izvajali, smo sledili shemi, ki jo za pridobitev referenčnih vrednosti priporoča IFCC.

Pri kalciole in kalcitriolu se za razdelitev referenčnih vrednosti v podskupine nismo odločili, pri kalcidiolu pa smo se na podlagi podatkov v literaturi (5) odločili, da razdelimo vrednosti v dve podskupini: pomladansko in jesensko.

Na podlagi vizualnega pregleda porazdelitve smo ugotovili, da gre pri kalciole in kalcidiolu za unimodalno porazdelitev, ki spominja na normalno (Gaussovo) porazdelitev. Pri kalcitriolu pa je ena vrednost močno odstopala od drugih, ki so se sicer porazdeljevale podobno normalni porazdelitvi.

Pri kalciole in kalcidiolu nismo opazili nobene vrednosti, ki bi močno odstopala od drugih. Pri kalcitriolu pa smo na podlagi analize histograma (slika 7) opazili vrednost, ki je odstopala od večine in smo jo na podlagi rezultatov matematične obravnave identificirali kot vrednost, ki močno odstopa (angl. *outlier*).

Ker smo imeli na razpolago razmeroma malo vzorcev (120), smo se odločili za neparametrično metodo.

Porazdelitev smo preverili z uporabo Kolmogorov-Smirnov testa za porazdeljevanje vrednosti. Uporabili smo naslednjo formulo:

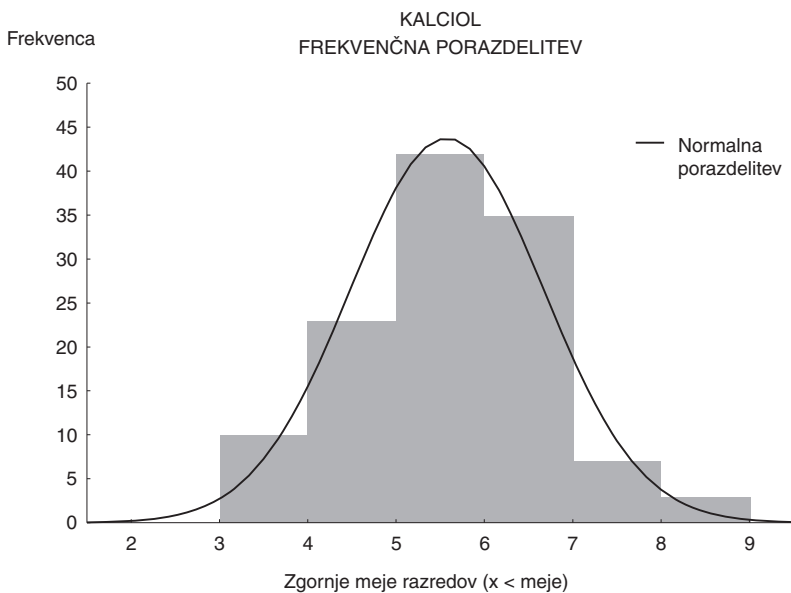
$$\frac{D_{\max} \geq 0,886}{\sqrt{N}} \Rightarrow \text{porazdelitev ni Gaussova}$$

$$\frac{D_{\max} < 0,886}{\sqrt{N}} \Rightarrow \text{porazdelitev je Gaussova}$$

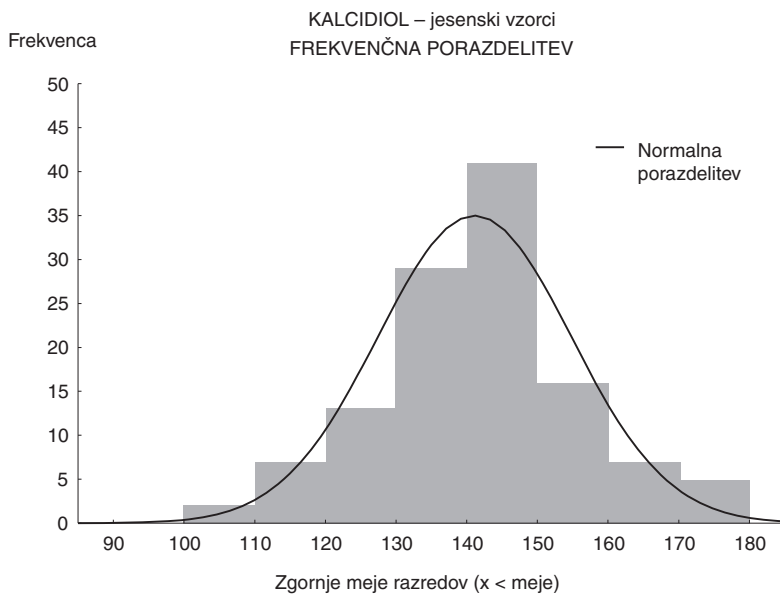
Porazdeljevanje vrednosti kalciole, kalcidiola (jesenskih in spomladanskih vzorcev) in kalcitriola je prikazano v tabeli 5.

Tabela 5. Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za porazdeljevanje vrednosti kalciole, kalcidiola (jesenskih in spomladanskih vrednosti) in kalcitriola.

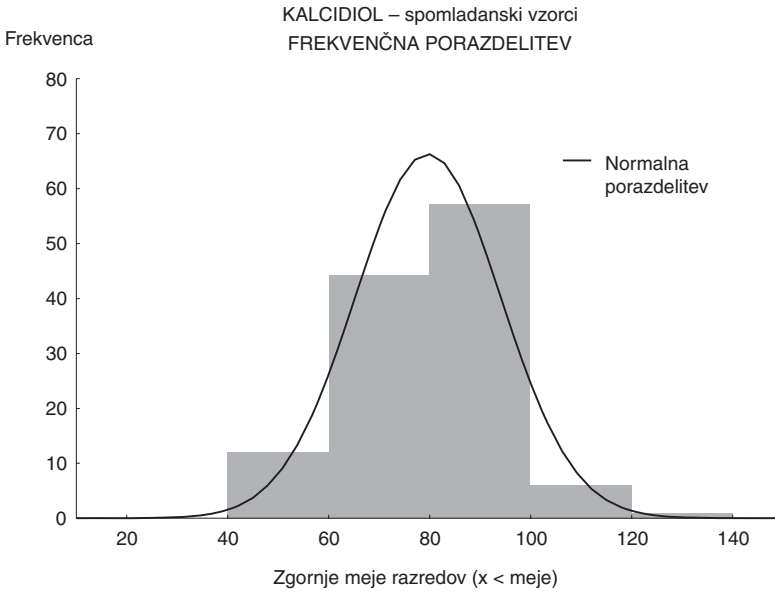
	Število vzorcev	D_{\max}	$\frac{0,886}{\sqrt{N}}$
kalciole	120	0,072828	0,0809
Kalcidiol-j	120	0,06004	0,0809
Kalcidiol-s	120	0,064925	0,0809
Kalcitriol	119	0,06004	0,0812



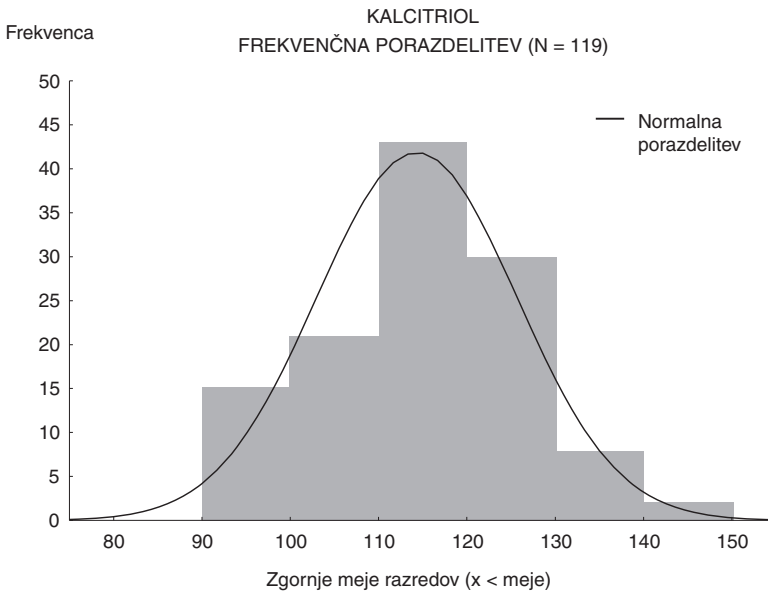
Slika 4. Histogram – frekvenčna porazdelitev rezultatov kalciola.



Slika 5. Histogram – frekvenčna porazdelitev rezultatov kalcidiola (jesenski vzorci).



Slika 6. Histogram – frekvenčna porazdelitev rezultatov kalcidiola (spomladanski vzorci).



Slika 7. Histogram – frekvenčna porazdelitev rezultatov kalcitriola (Število vzorcev = 119).

Rezultati

IFCC priporoča, da predstavimo referenčne intervale kot osrednje 0,95 intervale z intervalom zaupanja 0,90 za spodnje in zgornje referenčne meje (14). Rezultati so zbrani v tabeli 6.

Tabela 6. *Orientacijske referenčne vrednosti za kalciol, kalcidiol in kalcitriol. Osrednji 0,95 intervale z intervale zaupanja 0,90.*

	Kalciol (nmol/l)	Kalcidiol (nmol/l)		Kalcitriol (pmol/l)
		jesenski	pomladni	
Spodnji 0,90 interval zaupanja	3,1–3,4	105–118	41–55	91–95
Zgornji 0,90 interval zaupanja	7,2–8,4	164–177	100–126	133–145
Spodnja meja referenčnega intervala	3,4	114	50	93
Zgornja meja referenčnega intervala	8,2	172	107	139

Razprava

Bolezni, povezane s pomanjkanjem vitamina D, so predstavljale velik socialni in medicinski problem, predvsem ob koncu 19. stoletja v industrializiranih področjih. Te bolezni so prepoznavali predvsem kot rahitis. Premajhna izpostavljenost sončni svetlobi zaradi dolgotrajnega dela in onesnaženega ozračja je povzročila, da je bil rahitis endemična bolezen. Razvoj medicinske znanosti je kasneje prinesel poznavanje še drugih bolezni, povezanih s pomanjkanjem vitamina D in z motnjami presnove vitamina D.

Danes je zaradi drugačnih socialno-ekonomskih razmer skoraj povsod po svetu, tudi pri nas, ta vidik motenj v presnovi vitamina D skoraj nepomemben, pomembnejše pa so druge motnje, katerih poznavanje je prinesel razvoj medicine. V Sloveniji je v zadnjem času določanje vitamina D in njegovih presnovkov povezano predvsem s problematiko ledvične insuficience. Pri ljudeh, ki imajo okvarjeno delovanje ledvic, je zmanjšan tudi nastanek kalcitriola, kar lahko povzroči nastanek vseh bolezni, povezanih s tem presnovkom vitamina D. Ljudem, ki imajo ledvice okvarjene, je treba ustrezen presnovek vitamina D dodajati. Ker pa so tudi okvarjene ledvice prostor biotransformacije zdravil, je treba dodajati najmanjše količine zdravil, ki bodo še ustrezno učinkovale, ledvic pa ne bodo obremenjevale po nepotrebem.

Tu se srečamo s konceptom referenčnih vrednosti.

V svetu so referenčne vrednosti določene za večino analitov, ki jih v klinično-biokemični praksi določamo. Vendar pa teh vrednosti ne smemo nekritično prenašati v katerokoli okolje. Za to obstajata vsaj dva načelna razloga:

- večina proizvajalcev diagnostičnih reagentov in kemikalij priporoča, naj vsak laboratorij, ki te reagentne uporablja, sam določi referenčne vrednosti;

- čeprav so določeni postopki standardizirani in naj ne bi bilo metodoloških dejavnikov, ki vplivajo na napake, še vedno obstaja možnost, da se rezultati, dobljeni z uporabo naprav različnih proizvajalcev, med seboj bistveno razlikujejo.

Princip referenčnih vrednosti drugega razloga ne izključuje, vendar pa se na podlagi dobro pripravljene in dokumentiranega postopka o pridobivanju določenih referenčnih vrednosti lahko odločimo, ali bomo referenčne vrednosti, dobljene v nekem drugem laboratoriju, uporabili tudi sami.

Referenčne vrednosti vitamina D in njegovih presnovkov v človeškem serumu so v svetu verjetno določene v več laboratorijih. V literaturi, ki nam je bila dosegljiva, pa niso navedeni tako, da bi bili zadovoljivi za neposredno uporabo. V preglednih člankih je navedenih več referenčnih intervalov, ki se med seboj bistveno razlikujejo, manjka opis izvedbe postopka, v primarni literaturi pa praviloma vedno manjka vsaj postopek statistične obdelave referenčnih vrednosti.

Ta dejstva so razumljiva. Postopek za pridobivanje referenčnih vrednosti vse do leta 1991 ni bil standardiziran, leta 1991 pa je IFCC izdal priporočila, kako naj ti postopki potekajo.

V postopku, ki smo ga izvajali, smo se skušali kar najbolj dosledno držati priporočil, ki jih je objavil IFCC.

Izbira referenčnih posameznikov

Idealno bi bilo izbrati retrospektivno metodo izbire referenčnih posameznikov, vendar pa ta tip ni prišel v poštev predvsem zaradi naslednjih dejstev:

- finančna sredstva: če bi izbrali to metodo, bi bilo smiselno analizirati bistveno več vzorcev, kar bi metodo zelo podražilo;
- ustrezna dovoljenja za zbiranje vzorcev: ker bi jemali kri samo zaradi določanja referenčnih vrednosti za vitamin D, bi bilo potrebno soglasje ustreznih organov in daljavcev vzorcev, kar bi postopek znova podražilo in časovno zavleklo.

Izbrali smo prospektivno metodo izbire in uporabili vzorce, ki so ostali ob odvzemu krvi pri sistematskih pregledih odraslih ljudi, torej vzorcev nismo jemali posebej zaradi problema, ki smo ga obravnavali.

Merila izključevanja in razdeljevanje referenčnih posameznikov

Merila za izključevanje, ki smo jih postavili, so taka, da po podatkih iz literature in splošno privzetih merilih za »zdrave« ljudi omogočajo izbiro posameznikov, za katere lahko rečemo, da so glede na presnovo vitamina D zdravi. Na poseben problem smo naleteli pri merilu »dolgotrajno uživanje zdravil« (tudi peroralni kontraceptivi), saj smo morali zaradi njega izključiti velik del ženske populacije. Tako je v statističnem vzorcu ostalo premalo plazemskih vzorcev žensk, da bi lahko postavili zanesljiva merila posebej za žensko populacijo, zato smo v študiji združili vse vzorce, ne glede na spol in izračunali skupno vrednost.

Iz uvoda je razvidno, da pri odraslih moških (starejših od 18 let) starostna doba pri presnovi vitamina D ni pomembna, zato jih nismo razdelili v podskupine glede na starost.

Po našem mnenju tudi socialno-ekonomski položaj in rasa nista dejavnika, ki bi lahko na geografskem področju Republike Slovenije bistveno vplivala na rezultate naše študije. Iz literaturnih podatkov pa lahko sklepamo, da se serumske vrednosti kalcidiola prek leta spreminjajo. Bistveno večje kot spomladi naj bi bile jeseni, zato smo serumske vrednosti kalcidiola razdelili na dve podskupini – na jesensko in spomladansko.

Zbiranje vzorcev

Vzorci smo zbirali septembra in oktobra leta 1994, le vzorce za določitev kalcidiola v spomladanskih mesecih smo odvzeli posebej v obdobju marec–april leta 1995.

Vzorci so bili odvzeti s postopkom, ki je v Republiki Sloveniji standardiziran za odvzem krvi iz vene. Ker so bili vsi vzorci odvzeti v isti ustanovi (Inštitut za klinično kemijo in klinično biokemijo), nismo predvideli variacij zaradi morebitnih sprememb, ki bi bile posledica različnega rokovanja z vzorci po odvzemu.

Izbira metode analize

Metoda, ki je v uporabi na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo (11), je edina, ki se v slovenskem prostoru uporablja za analizo vitamina D in njegovih presnovkov v človeškem krvnem serumu. Zato je bilo smiselno uporabiti to metodo, vendar pa bomo zaradi tega referenčne vrednosti, ki smo jih dobili, z gotovostjo primerjali le z vrednostmi, ki bodo v prihodnje dobljene z isto metodo.

Statistična obdelava rezultatov analize

V grobem delimo statistično obelavo na parametrično in neparametrično. Parametrična predpostavlja določen tip porazdelitve, pri neparametrični pa ne sklepamo glede na tip porazdelitve. Odločili smo se za neparametrično, vendar smo poizkusili določiti tudi tip porazdelitve.

V prvi stopnji smo izdelali histograme frekvenčnih porazdelitev vseh treh presnovkov vitamina D. Na podlagi vizualnega pregleda histogramov smo ugotovili, da porazdelitev rezultatov pri kalcitolu in kalcidiolu spominja na Gaussovo, zato smo začasno sprejeli to hipotezo. Pri kalcitriolu smo ugotovili, da ena vrednost nenavadno odstopa od drugih. Zakaj je prišlo do tega odstopanja, nam ni uspelo nedvoumno ugotoviti, zato smo postavili hipotezo, da je to vrednost, ki močno odstopa (outlier). Take vrednosti so tiste, ki so oddaljene za več kot tri standardne deviacije od aritmetične sredine vseh vzorcev. Ugotovili smo, da je ta vrednost oddaljena od aritmetične sredine celo za več kot štiri standardne deviacije, zato smo jo iz nadaljnjih izračunov izločili. Tudi po tem je bil vzorec dovolj velik, da je ustrezal postopku, ki ga za pridobitev referenčnih vrednosti priporoča IFCC.

V naslednji stopnji smo izdelali preglednice frekvenčne porazdelitve v razrede razvrščenih rezultatov analize. Nato smo s pomočjo Kolmogorov-Smirnov testa poskušali dokazati, da se podatki porazdeljujejo po Gaussovi porazdelitvi. Pri vseh treh presnovkih smo ugotovili, da se porazdeljujejo normalno.

Nato smo izdelali preglednico, v kateri smo rezultatom analize pripisali ustrezne range. Ta preglednica je podlaga za izračun referenčnih intervalov.

Ker smo imeli pri rezultatih za kalcidiol dve podskupini, smo se odločili, da potrdimo ali zavrnemo hipotezo, da se aritmetični sredini vzorcev, ki smo jih odvzeli pomladi in jeseni, bistveno razlikujeta. Ker vzorci niso izhajali od istih ljudi, smo se odločili za t-test za neodvisne vzorce. Testiranje hipoteze je pokazalo, da se aritmetični sredini obeh skupin signifikantno razlikujeta. Za kalcitriol je torej treba navesti referenčne intervale za obe letni obdobji. Pri interpretaciji pri posamezniku ugotovljenih vrednosti je treba razpolagati s podatkom, v katerem letnem času je bil vzorec odvzet.

Zadnja faza postopka bi verjetno morala vsebovati primerjavo naših referenčnih vrednosti s tistimi, ki so navedene v literaturi. Ker pa je iz že opisanih razlogov ta primerjava nesmiselna, smo se ji odpovedali.

Sklep

V delu smo poskušali določiti referenčne vrednosti za vitamin D in njegove presnovke v človeškem krvnem serumu. Sledili smo priporočilom IFCC, ki so temelj za standardizacijo metod za pridobitev referenčnih vrednosti, vendar pa je vsaj v Sloveniji njihova uporaba prej izjema kot pravilo.

Največji problem, s katerim smo se pri delu srečevali, je bilo izbiranje referenčnih posameznikov oziroma vzorcev njihove krvi. Vzrok težav je bila predvsem finančna zahtevnost projekta. Menimo, da smo tudi ta problem zadovoljivo rešili, čeprav bi si v prihodnje želeli več vzorcev. Naslednja težava je ustrezno strokovno izražje, ki se pri referenčnih vrednostih delno razlikuje od splošnega statističnega izražja. Treba bi bilo sprejeti določene slovenske izraze, s katerimi bi preprečili nastanek nesporazumov na tem področju, do katerih bo verjetno prišlo. Temeljne izraze smo v tem delu prevedli in uporabljali, vendar pa je potrebna kritična presoja.

Rezultat dela so določeni referenčni intervali z intervali zaupanja 0,90 za kalcidiol, kalcidiol in kalcitriol pri odrasli moški populaciji Republike Slovenije, ki jih imamo z vidika presnove vitamina D za zdrave.

Ker ti rezultati nimajo le strogo teoretičnega značaja, ampak so praktično uporabni in potrebni, vendar pa nepopolni, bo treba v prihodnosti določiti še referenčne vrednosti za žensko populacijo (s poudarkom na vrednostih med nosečnostjo in menopavzo) ter za otroke in mladostnike/ce. Ko bo to opravljeno, sledi določitev vrednosti vitamina D in presnovkov pri različnih boleznih, povezanih z vitaminom D.

Literatura

1. Friedrich W. Introduction. In: Walter de Gruyter ed. *Vitamins*. Berlin, New York: 1988: 1–61.
2. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) Nomenclature of Vitamin D. Recommendations 1981. *Eur J Biochem* 1982; 124: 223–7.
3. Procsal DA, Okamura WH, Norman AV. Vitamin D, its metabolites: a review of structural requirements for biological activity. *Am J Clin Nutr* 1976; 29: 1271–82.

4. Friedrich W. Vitamin D. In: Walter de Gruyter ed. *Vitamins*. Berlin, New York: 1988, 141–216.
5. Koshy TK. Vitamin D: An Update. *J Pharm Sci* 1982; 71: 137–153.
6. Frankel TI, Mason RS, Hersey P, et al. The Synthesis of Vitamin D Metabolites by Human Mieloma Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 627–31.
7. Howard GA, Turner RT, Sherard DJ, et al. Human Bone Cells in Culture Metabolize 25-hydroksy Vitamin D₃ and 24,25-dihidroksy Vitamin D₃. *J Biol Chem* 1981; 256: 7738–40.
8. Puzas JE, Turner RT, Howard GA, et al. Cells Isolated from Embriotic Intestine Synthesize 1,25-dihidroksy Vitamin D₃ and 24,25-dihidroksy Vitamin D₃ in Culture. *Endocrinology* 1980; 112: 378–80.
9. Gray TX, Leter GE, Loreno RS. Evidence for External 1 α -hydroxylation of 25-hydroxy Vitamin D₃ in Pregnancy. *Science* 1979; 204: 1311–3.
10. Gascobarre M, Gamache M. Contribution of the Billiary Pathway to the Homeostasis of Vitamin D₃ and of 1,25-dihidroksy Vitamin D₃. *Endocrinology* 1991; 129: 2335–44.
11. Marc J. *Razvoj analitičnega postopka sočasnega določanja koncentracij vitamina D₃ in njegovih presnovkov v krvnem serumu pacientov na peritonealni hemodializi*. Magistrsko delo. Ljubljana: Fakulteta za naravoslovje in tehnologijo Univerze v Ljubljani, 1993.
12. Kokalj T. *Postavitev in vrednotenje metode za določanje koncentracije vitamina D₃ in metabolitov v krvnem serumu*. Ljubljana: Raziskovalna naloga, Fakulteta za naravoslovje in tehnologijo Univerze v Ljubljani, 1992.
13. Osredkar J, Vrhovec I. Vitamin D in presnovki. Fiziologija, patofiziologija in metode določanja. *Farm Vestn* 1989; 40: 5–26.
14. Dybkaer R, Solberg HE. IFCC Expert Panel on Theory of Reference Values, ICSH Standing Committee on Reference Values. Approved Recommendation (1987) on the Theory of Reference Values. Part 6. Presentation of Observed Values Related to Reference Values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25: 657–62.

Prispelo 3. 10. 1995