

Praktická cvičení z biochemie 1. LF UK

Vitamin D a metabolismus kostí

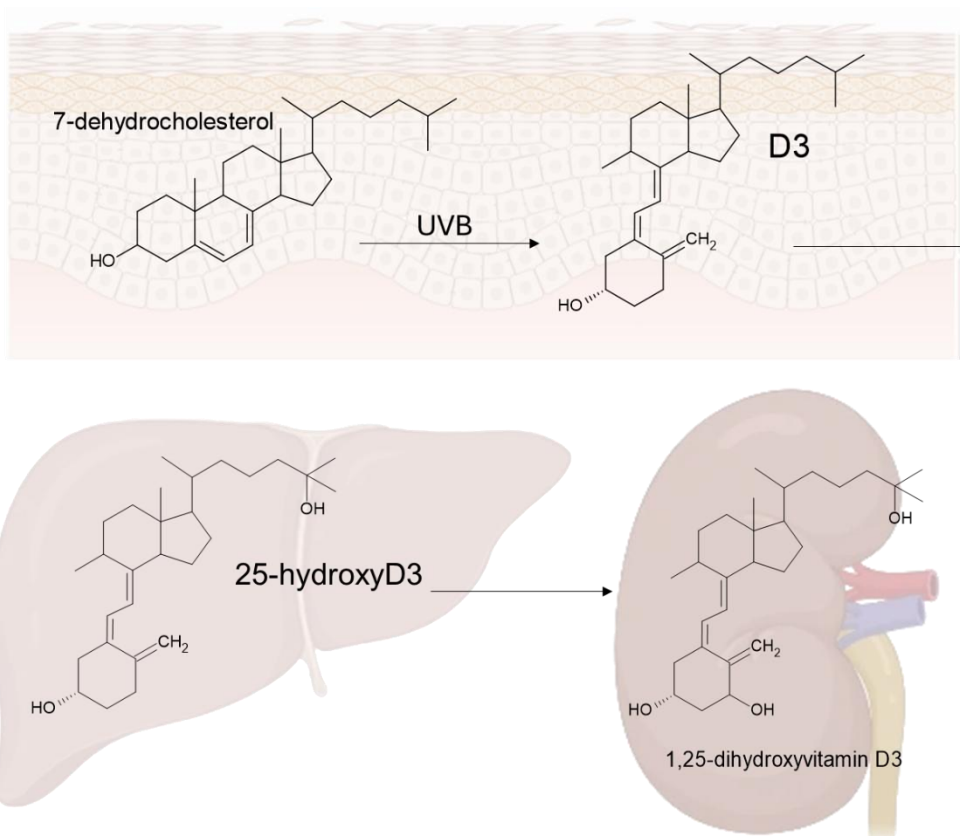


Aleš Dvořák, Kateřina Žížalová



Úloha vitamínu D

V těle vzniká vitamin D přirozeně z chemické sloučeniny odvozené od cholesterolu. Jedná se o provitamin 7-dehydrocholesterol, který běžně vyrábíme a který UVB záření (280–315 nm) přeměňuje na vitamin D3 (cholecalciferol). D2 pak značí rostlinnou formu ergocalciferol. Vitaminy D2 i D3 můžeme přijímat stravou. Obě formy jsou pak pomocí enzymů s hydroxylasovou aktivitou upraveny v játrech a aktivovány v ledvinách na účinnou molekulu vitamínu D potřebnou pro kalciofosfátový metabolismus.



Dle <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278935> upraveno v ACD/ChemSketch™ a BioRender.com

Parathormon (PTH) a vitamin D tvoří těsně regulovaný zpětnovazebný systém: PTH účinkuje na střevo, ledviny a kost. Je hlavním stimulatorem syntézy aktivního vitamínu D v ledvinách, zatímco nadbytek tohoto vitamínu D působí negativní zpětnou vazbou na sekreci PTH. Hlavní funkcí PTH je regulace koncentrace ionizovaného vápníku v cirkulaci. Zároveň má reciproční účinek na metabolismus fosfátů. Naproti tomu vitamin D stimuluje jak homeostázu vápníku, tak fosfátů a hraje klíčovou roli v zajištění dostatečného množství minerálů pro normální tvorbu kosti [1].

Aktivní forma vitamínu D tvořená ledvinami je ve výsledku stejná – je jedno, zda vzniká z D2 či D3. Nicméně pokud přijímáme D2 formu, tedy tu rostlinnou, dosáhneme jen poloviční koncentrace aktivní formy vitamínu D v porovnání s adekvátním příjmem D3.

Pro člověka je tedy nejlepším zdrojem vitamínu D právě prekurzor D3 [2], který si ale umíme i vyrobit, pokud jsme dostatečně dlouho na slunci.

Přirozená produkce vitamínu D je ovlivněna lidskými činnostmi. Například smog ve městech může UVB záření zachytávat, stejně jako opalovací krémy, což snižuje přirozenou syntézu vitamínu D3 [3]. U opalovacích krémů nepanuje v literatuře shoda, protože prostup UVB závisí na poctivosti namazání [4], [5]. Lidé to často nedělají správně, přesto v průměru platí, že krém s SPF 30 zabrání průniku 95 % UVB na pokožku.

Podle výpočetních modelů si člověk v našem podnebném pásmu vytvoří dostatek vitamínu D3 při pobytu na slunci v létě kolem poledne zhruba za 15–30 minut, pokud je odkryto alespoň 25 % těla [6] [7]. Zároveň se s velkou pravděpodobností dá říct, že v zimních měsících, kdy je UV index nižší než 3, a kdy se hodně oblékáme, nedokážeme přirozeně vytvořit dost vitamínu D [8]. Na druhou stranu v období, kdy ho dostatek máme, si vitamin D skladujeme v tuku, odkud může být uvolněn až 5 let po uložení [9]. Nicméně neplatí, že čím déle jsme na slunci tím více vitamínu D vyrobíme. Tělo má pojistku – jakmile se vytvoří určité množství, další UV záření začne nadbytečný vitamin D rozkládat, aby nedošlo k nežádoucím účinkům. Produkci vitamínu D kůží ovlivňuje i to, kolik máme melaninu, který dává naší pokožce tmavší barvu [10]. Melanin UVB pohlcuje a tím trochu snižuje syntézu D3 [11].

Referenční rozmezí pro 25OH vitamín D je 30-80 ng/ml, ovšem mnoho studií ukazuje na jeho velký nedostatek v populaci [12][13][14]. Nejspolehlivější možností, jak získat dostatek vitamínu D, je doplňovat ho stravou. Jeho získávání ze slunce komplikuje totiž řada faktorů – již zmiňovaný odstín kůže, vrstvy oblečení, používání krémů nebo znečištění ovzduší. Podle Státního zdravotního ústavu přijmou Češi až 28 % vitamínu D ve vejcích.¹ Měli bychom ale vitamin D doplňovat i jinak. Například jíst 2x týdně tučnější rybu (sleď, makrela, losos, pstruh, sardinky), pravidelně jíst mléčné výrobky, případně kupovat oleje či jiné potraviny, které výrobci obohacují vitamínem D.² Na druhou stranu je možné se vitamínem D i předávkovat [15]. Ročně se příznaky předávkování projeví u cca 4500 Američanů. Tohle procento by odpovídalo asi stovce Čechů ročně. Je to tedy poměrně raritní. Projevuje se to hlavně při dlouhodobě vysoké suplementaci, a to dehydratací, častým močením, bolestí kostí, ledvinovými kameny, zmateností, letargií, únavou, obtížnou chůzí, zvracením a nevolností³.

Ve zdraví i v nemoci

Receptor pro vitamin D (VDR) mají skoro všechny naše buňky. Vitamin D tak ovládá prostřednictvím zmíněného VDR až 3 % našich genů.⁴ Na VDR se váže aktivní vitamin D a tento komplex funguje jako „partner“ pro receptor RXR (retinoidní X receptor); společně se vážou na DNA [16].

¹ <https://zeptejsevedce.cz/dotazy-a-odpovedi/co-to-je-fortifikace-vajec-vitaminem-d-a-jak-probiha/>

² https://szu.gov.cz/wp-content/uploads/2023/11/vitamin_D_tisk_2_logo_2021.pdf

³ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557876/>

⁴ Článek Vitamin D: skeletální a extraskeletální účinky, prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc. <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2013/05/07.pdf>

Nedostatek vitamínu D je často vídán u pacientů s nádorovými nemocemi⁵ a diabetem mellitem 2. typu [17], přičemž nedostatek tohoto vitamínu zhoršuje dokonce průběh této nemoci [18] [19]. Při nedostatku vitamínu D hrozí vyšší riziko infekcí a vyšší pravděpodobnost vzniku autoimunitních chorob [20]. Je potřeba říct, že u všech výše jmenovaných nemocí je pozorována nedostatečná koncentrace vitamínu D v krvi pacientů, nicméně zatím se nedá s jistotou říct, že suplementace tímto vitamínem vede jednoznačně k jejich prevenci. Na druhou stranu se na více než tisícovce lidí ukázalo, že příjem 50 µg (2000 UI) vitamínu D3 denně zpomalí celkem výrazně buněčné stárnutí již po pár letech užívání [21]. Hlavní rolí vitamínu D je však udržení metabolismu vápníku a fosfátů, což má přímý vliv na zdraví našeho srdce [22] i na metabolismus kostí.

Praktika

V těchto praktikách budete stanovovat Ca^{2+} a PO_4^{3-} klasickou metodou s využitím kitu pro rutinní biochemické laboratoře; a vitamín D3 a D2 pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí na trojitém kvadrupolu.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) je analytická technika sloužící k separaci, identifikaci a kvantifikaci složek v kapalné směsi.

Základem je distribuce látek mezi dvěma fázemi (pevnou a kapalnou):

- **Mobilní fáze:** Kapalně rozpouštědlo, které unáší vzorek systémem.
- **Stacionární fáze:** Pevná náplň uvnitř chromatografické kolony, která zadržuje vzorek.
- **Dělení:** Jednotlivé molekuly vzorku putují kolonou různou rychlostí na základě své afinity (přilnavosti) k pevné fázi kolony.

Hmotnostní detektor (MS)

MS s trojitým kvadrupólem (**QQQ** nebo **Triple Quad**) funguje jako velmi přesný „filtr“ molekul. Je to zlatý standard pro **kvantitativní analýzu** (měření množství), protože dokáže eliminovat šum pozadí.

Jak QQQ funguje (v kostce)

Pracuje ve třech fázích (Q1 – Q2 – Q3), přičemž molekuly, které přichází z HPLC se ionizují (získávají náboj, tvoří ionty):

1. **Q1 (První kvadrupól):** Funguje jako selektor podle molekulové hmotnosti. Ze směsi iontů, které přicházejí z HPLC, vybere pouze ten jeden konkrétní ion (tzv. **prekurzor**), který nás zajímá. V našem případě se jedná o ionty odpovídající vitamínu D. Ostatní odletí pryč.

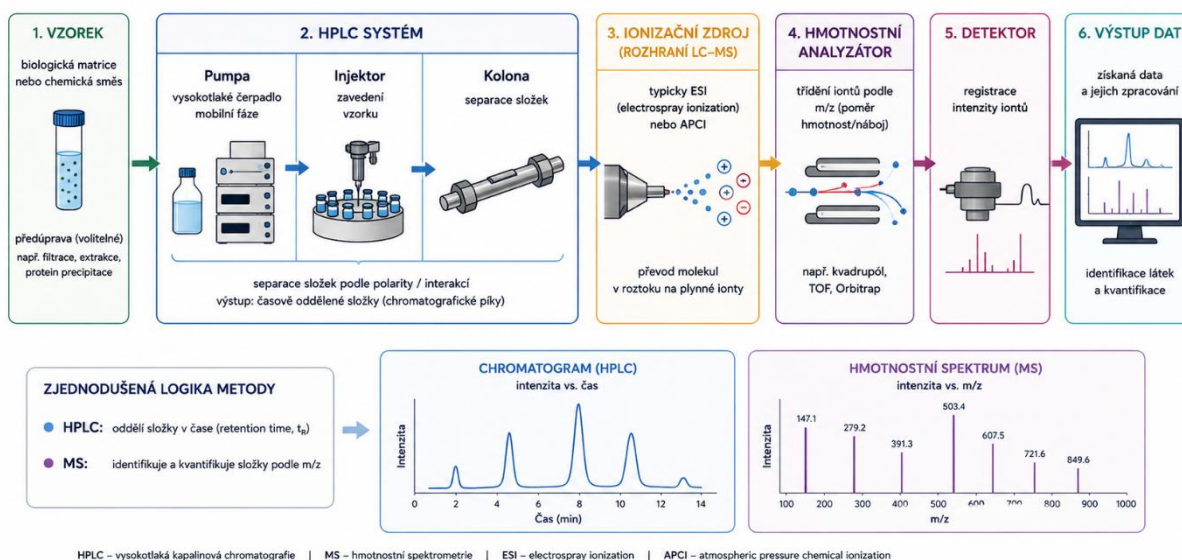
⁵ <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/diet/vitamin-d-fact-sheet>

- Q2 (Kolizní cela):** Vybraný ion zde narazí do molekul inertního plynu (argon/dusík) a **rozpadne se** na menší kusy (fragmenty).
- Q3 (Třetí kvadrupól):** Opět filtruje. Propustí k detektoru pouze jeden specifický fragment (tzv. **produktový ion**).

Tento proces se nazývá **MRM** (Multiple Reaction Monitoring).

Pravděpodobnost, že by ještě jiná látka ve směsi tvořila stejný prekurzorový ion jako vitamin D v Q1 a tvořila stejný fragment v Q2, je velmi malá. Proto označujeme MS detekci s QQQ za velmi citlivou a selektivní. Obvykle odhalí stopová množství látek (nanogramy až pikogramy). Zároveň to umožňuje analyzovat i velmi komplexní matrice jako jsou krev, sérum, kontaminované půdy nebo potraviny. Často se používá pro rutinní testování pesticidů, dopingovou kontrolu nebo měření koncentrace léků v plazmě.

SCHÉMA HPLC–MS METODY (LC–MS)



- [1] S. J. Khundmiri, R. D. Murray, and E. Lederer, “PTH and Vitamin D,” in *Comprehensive Physiology*, Wiley, 2016, pp. 561–601. doi: 10.1002/cphy.c140071.
- [2] L. Tripkovic *et al.*, “Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 95, no. 6, pp. 1357–1364, Jun. 2012, doi: 10.3945/ajcn.111.031070.

- [3] L. Barrea *et al.*, “Low serum vitamin D-status, air pollution and obesity: A dangerous liaison,” *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, vol. 18, no. 2, pp. 207–214, Jun. 2017, doi: 10.1007/s11154-016-9388-6.
- [4] T. Passeron *et al.*, “Sunscreen photoprotection and vitamin D status,” *British Journal of Dermatology*, vol. 181, no. 5, pp. 916–931, Nov. 2019, doi: 10.1111/bjd.17992.
- [5] D. D. Bikle, “Do sunscreens block vitamin D production? A critical review by an international panel of experts,” *British Journal of Dermatology*, vol. 181, no. 5, pp. 884–884, Nov. 2019, doi: 10.1111/bjd.18126.
- [6] A. R. Webb and O. Engelsen, “Calculated ultraviolet exposure levels for a healthy vitamin D status,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 82, no. 6, pp. 1697–703, 2006, doi: 10.1562/2005-09-01-RA-670.
- [7] V. Terushkin, A. Bender, E. L. Psaty, O. Engelsen, S. Q. Wang, and A. C. Halpern, “Estimated equivalency of vitamin D production from natural sun exposure versus oral vitamin D supplementation across seasons at two US latitudes,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 62, no. 6, pp. 929.e1-929.e9, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.jaad.2009.07.028.
- [8] M. Wacker and M. F. Holick, “Sunlight and Vitamin D,” *Dermatoendocrinol.*, vol. 5, no. 1, pp. 51–108, Jan. 2013, doi: 10.4161/derm.24494.
- [9] I. Martinaityte, E. Kamycheva, A. Didriksen, J. Jakobsen, and R. Jorde, “Vitamin D Stored in Fat Tissue During a 5-Year Intervention Affects Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels the Following Year,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 102, no. 10, pp. 3731–3738, Oct. 2017, doi: 10.1210/jc.2017-01187.
- [10] A. Slominski and A. E. Postlethwaite, “Skin Under the Sun: When Melanin Pigment Meets Vitamin D,” *Endocrinology*, vol. 156, no. 1, pp. 1–4, Jan. 2015, doi: 10.1210/en.2014-1918.
- [11] A. R. Young *et al.*, “Melanin has a Small Inhibitory Effect on Cutaneous Vitamin D Synthesis: A Comparison of Extreme Phenotypes,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 140, no. 7, pp. 1418-1426.e1, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.jid.2019.11.019.
- [12] R. Bouillon, “Vitamin D status in Africa is worse than in other continents,” *Lancet Glob. Health*, vol. 8, no. 1, pp. e20–e21, Jan. 2020, doi: 10.1016/S2214-109X(19)30492-9.
- [13] A. Clark *et al.*, “Egg enrichment with vitamin D: The Sunshine Eggs projects,” *Nutr. Bull.*, vol. 46, no. 3, pp. 332–338, Sep. 2021, doi: 10.1111/nbu.12509.
- [14] D. Holmannova *et al.*, “High prevalence of low vitamin D status in the Czech Republic: a retrospective study of 119,925 participants,” *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 79, no. 7, pp. 641–652, Jul. 2025, doi: 10.1038/s41430-025-01587-0.

- [15] E. Marcinowska-Suchowierska, M. Kupisz-Urbańska, J. Łukaszkiwicz, P. Płudowski, and G. Jones, "Vitamin D Toxicity—A Clinical Perspective," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 9, Sep. 2018, doi: 10.3389/fendo.2018.00550.
- [16] J. W. Pike and M. B. Meyer, "The Vitamin D Receptor: New Paradigms for the Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃," *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, vol. 39, no. 2, pp. 255–269, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.ecl.2010.02.007.
- [17] A. G. Pittas *et al.*, "Vitamin D Supplementation and Prevention of Type 2 Diabetes," *New England Journal of Medicine*, vol. 381, no. 6, pp. 520–530, Aug. 2019, doi: 10.1056/NEJMoa1900906.
- [18] D. Vasdeki *et al.*, "Vitamin D Supplementation: Shedding Light on the Role of the Sunshine Vitamin in the Prevention and Management of Type 2 Diabetes and Its Complications," *Nutrients*, vol. 16, no. 21, p. 3651, Oct. 2024, doi: 10.3390/nu16213651.
- [19] H. Fuentes-Barría *et al.*, "Vitamin D and Type 2 Diabetes Mellitus: Molecular Mechanisms and Clinical Implications—A Narrative Review," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 26, no. 5, p. 2153, Feb. 2025, doi: 10.3390/ijms26052153.
- [20] F. Vincenzi, C. Smirne, S. Tonello, and P. P. Sainaghi, "The Role of Vitamin D in Autoimmune Diseases," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 27, no. 1, p. 555, Jan. 2026, doi: 10.3390/ijms27010555.
- [21] H. Zhu *et al.*, "Vitamin D₃ and marine ω -3 fatty acids supplementation and leukocyte telomere length: 4-year findings from the VITamin D and Omega-3 Trial (VITAL) randomized controlled trial," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 122, no. 1, pp. 39–47, Jul. 2025, doi: 10.1016/j.ajcnut.2025.05.003.
- [22] F. Haider, H. Ghafoor, O. F. Hassan, K. Farooqui, A. O. M. Bel Khair, and F. Shoaib, "Vitamin D and Cardiovascular Diseases: An Update.," *Cureus*, vol. 15, no. 11, p. e49734, Nov. 2023, doi: 10.7759/cureus.49734.