

# ADAPTACE METODY RECIPE® 25-OH-VITAMIN D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> IN PLASMA AND SERUM – ON LINE ANALYSIS PRO VZORKY SUCHÉ KREVŇÍ SKVRNY (DBS)

**Voříšek V.<sup>1,2</sup>, Šafaříková L.<sup>2</sup>, Horna A.<sup>2</sup>, Plecháčová I.<sup>2</sup>, Kabrhelová J.<sup>2</sup> and Knirsch M.<sup>3</sup>**

1/ÚSTAV KLINICKÉ BIOCHEMIE A DIAGNOSTIKY FAKULTNÍ NEMOCNICE V HRADCI KRÁLOVÉ, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

2/RADANAL s.r.o., Okružní 613, 530 03 Pardubice

3/ RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, Dessauerstrasse 3, 80992 München, Bayern, Bundesrepublik Deutschland

Corresponding author: horna@radanal.cz

**Klíčová slova:** suchá krevní skvrna, dried blood spot (DBS), cholekalciferol, ergokalciferol, UHPLC/HRMS



## Cíl práce

Na platformě ověřené komerční metody fy RECIPE pro stanovení 25-hydroxy-vitaminů D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> v plasmě či séru vyvinout robustní a spolehlivou metodu DBS, která je pro pacienta atraktivní s ohledem na korespondenční formu méně invazivního odběru vzorků.

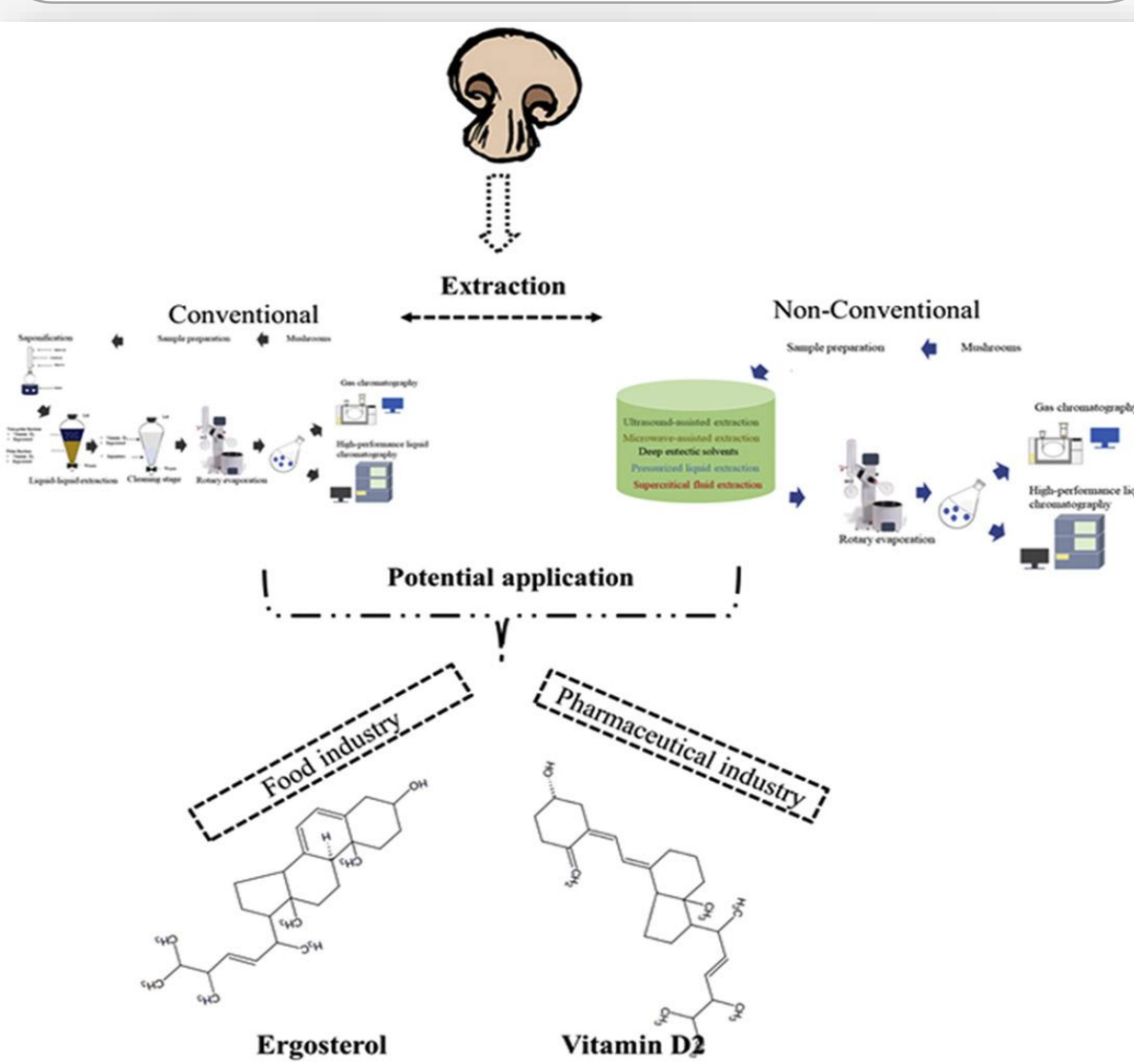
## Úvod

„Vitamin D“ zahrnuje skupinu steroidů, které hrají klíčovou roli v inkorporaci vápníku do kostní hmoty, v buněčné proliferaci, pozitivní vliv vyšších hladin ergokalciferolu (D<sub>2</sub>) zejména cholekalciferolu (D<sub>3</sub>) na úroveň humorální imunitní připravenosti organismu a modulaci jeho protizánětlivé odpovědi (v konotaci s vážnými průběhy COVID-19 – cytokinová bouře - velmi pozoruhodná role!). V prevenci i pozitivní vliv na DM I. a II. typu, homeostasis TK,...

Dostatečná expozice slunečnímu světlu (UV-B) znamená rychlou biosynthesu (konverzi) D<sub>2</sub> na klíčový D<sub>3</sub>. V zimním a časném jarním období klimatu mírného pásma je potom vhodná dieta bohatá na kalciferol nezbytná pro udržení dostatečné imunitní obranyschopnosti. Optimální denní dávka vitaminu D<sub>3</sub> ve věkovém rozpětí 1 – 70 let bez ohledu na pohlaví je 15 µg (Zákon č. 352/2009 Sb. „DDD je od 25 let věku výše jen 5 µg). Aktivní metabolit 1,25-dihydroxycholecalciferol hraje důležitou regulační roli v produkci antimikrobiálních peptidů (např. kalicidinu). Kalcitriol je steroidní hormon přes parathormon (hydroxylace v tkáni ledvin) zajišťuje biologickou dostupnost vápníku pro jeho inkorporaci do kostní hmoty.

### Mimotělní zdroje vitaminu D<sub>2</sub>:

sušené houby (UV – na slunci), kvasinky (*S.cerevisiae*) – kvasnice (český chléb)

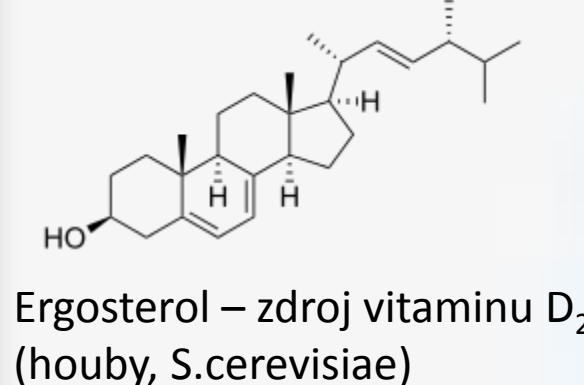


### Mimotělní zdroje vitaminu D<sub>3</sub>:

Potraviny živočišného původu (ryby, zejména tresčí játra), Potraviny rostlinného původu – č. Solanaceae – zejména rajčata a brambory, obsah D<sub>3</sub> a 7-dehydrocholesterolu klesá ve směru: listy – plody – stonky - oddenky(hlízy)

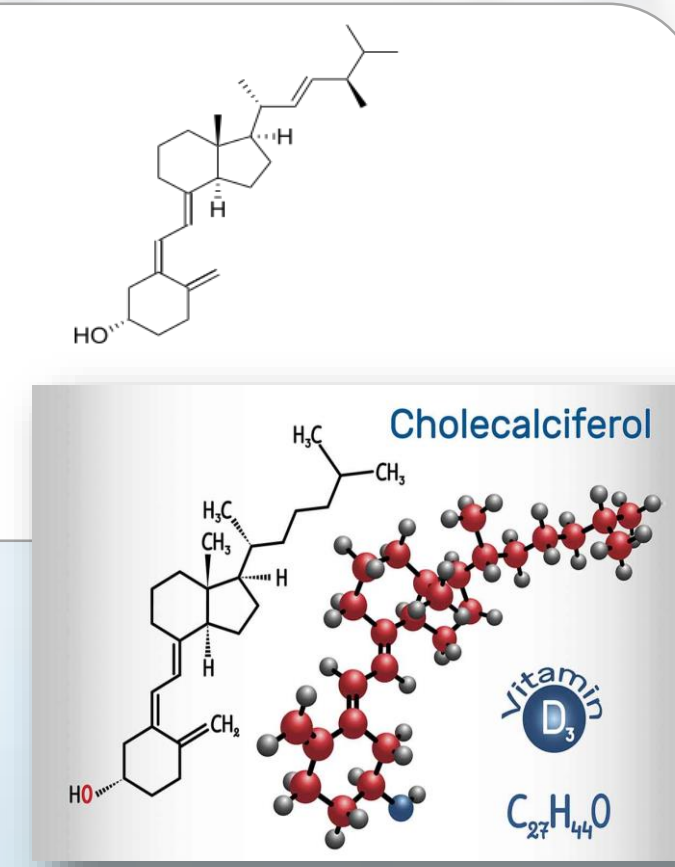
Obiloviny (zejména oves), tzv. fortifikovaná rostlinná mléka (ovesné, mandlové, kokosové)

Biologicky Aktivní formy jsou steroly: 25(OH)D<sub>2</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub> – biosynthesa v játrech 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> – biosynthesa v ledvinách (KALCITRIOL) – přes 25(OH)D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> (stimulace parathormonem – příštítná tělíska)

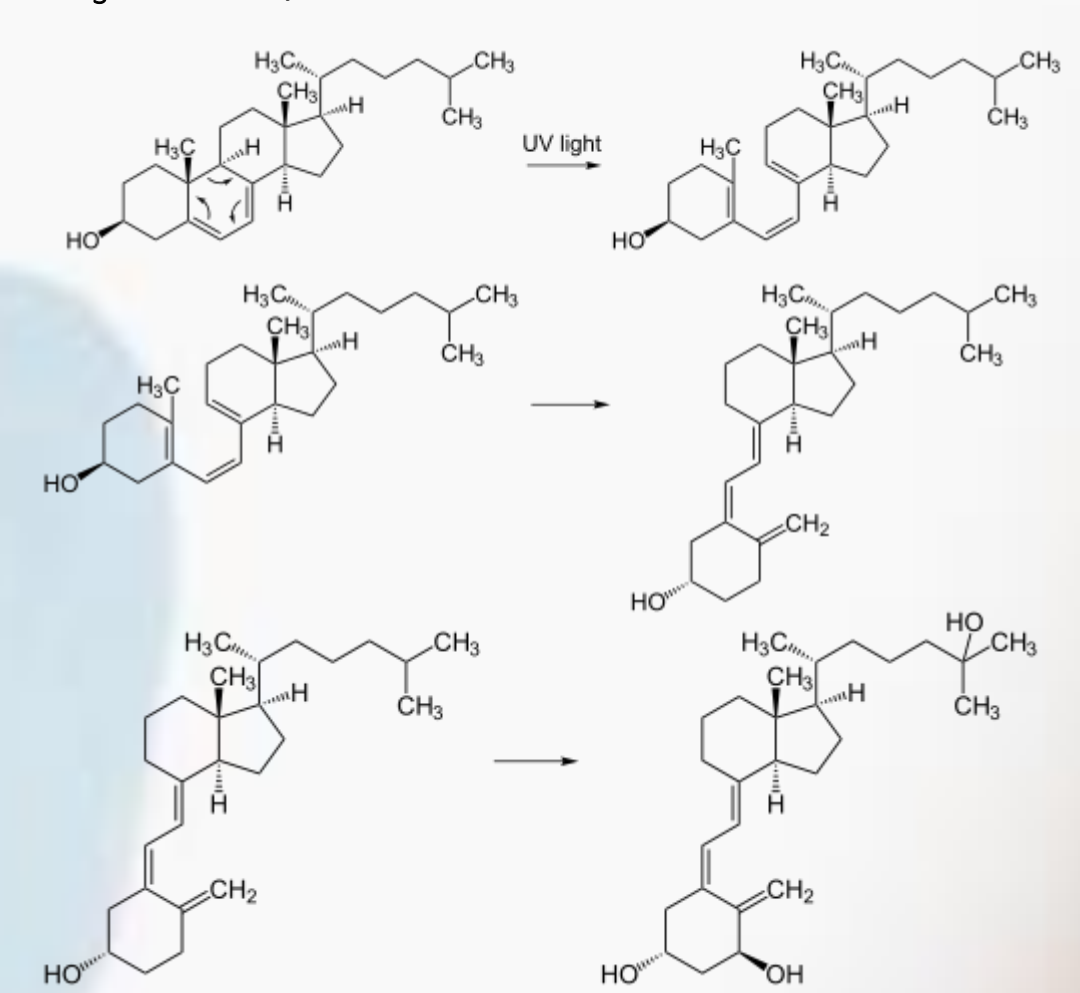


VITAMIN D<sub>2</sub> – ERGOKALCIFEROL

VITAMIN D<sub>3</sub> – CHOLEKALCIFEROL

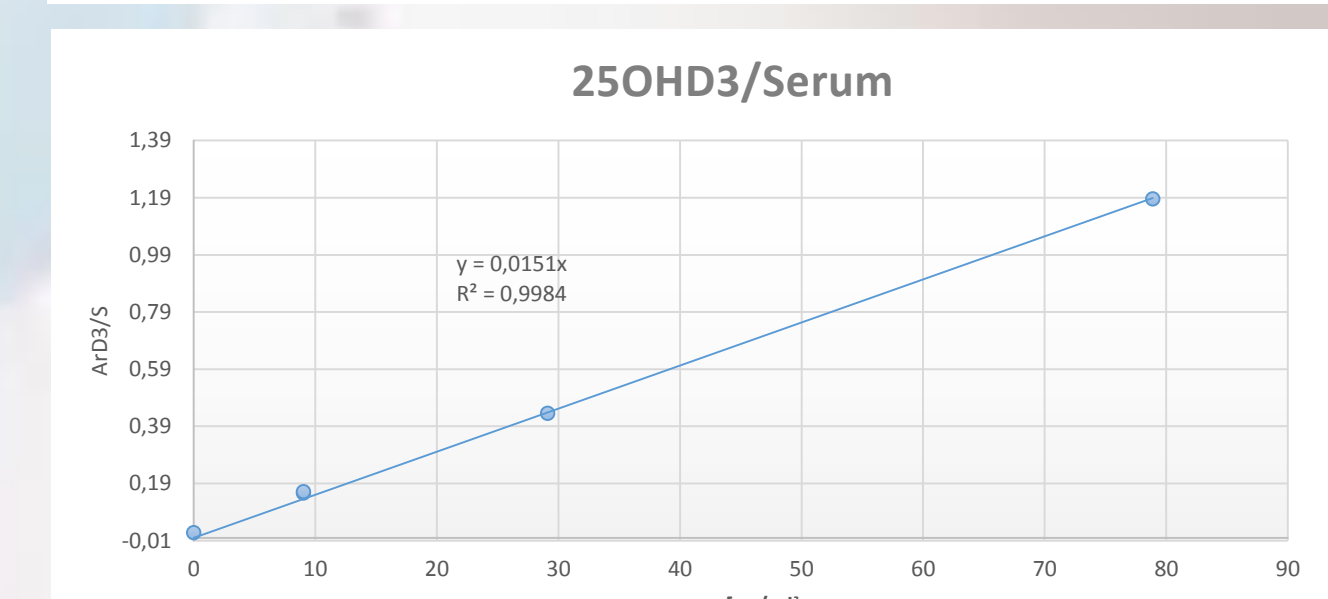
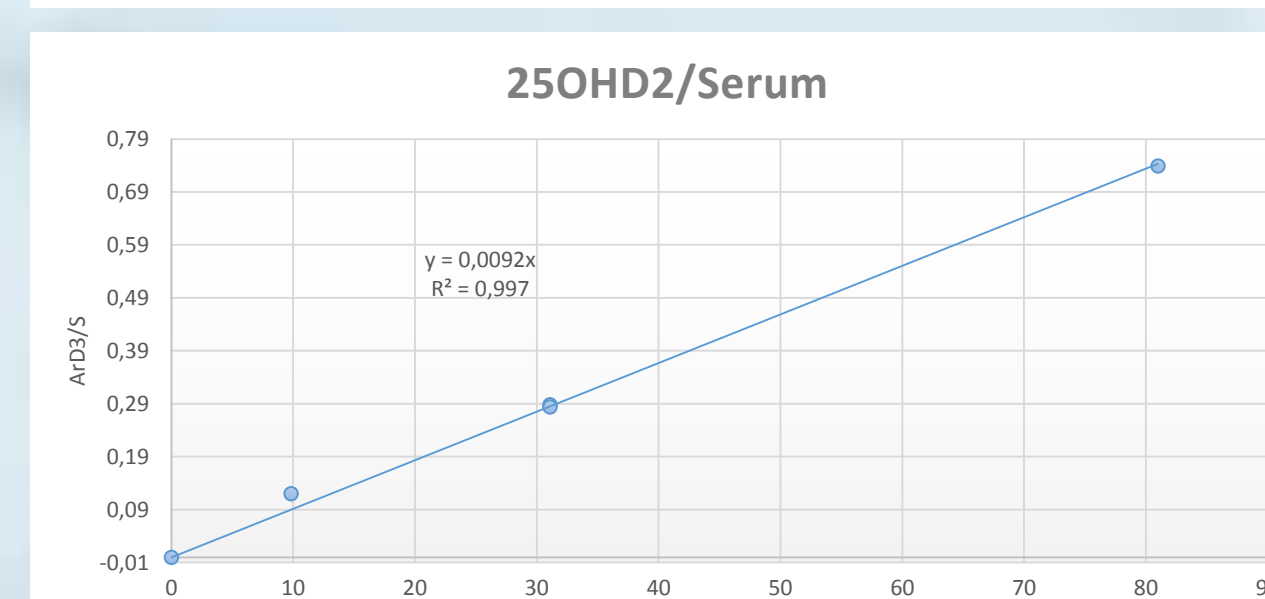
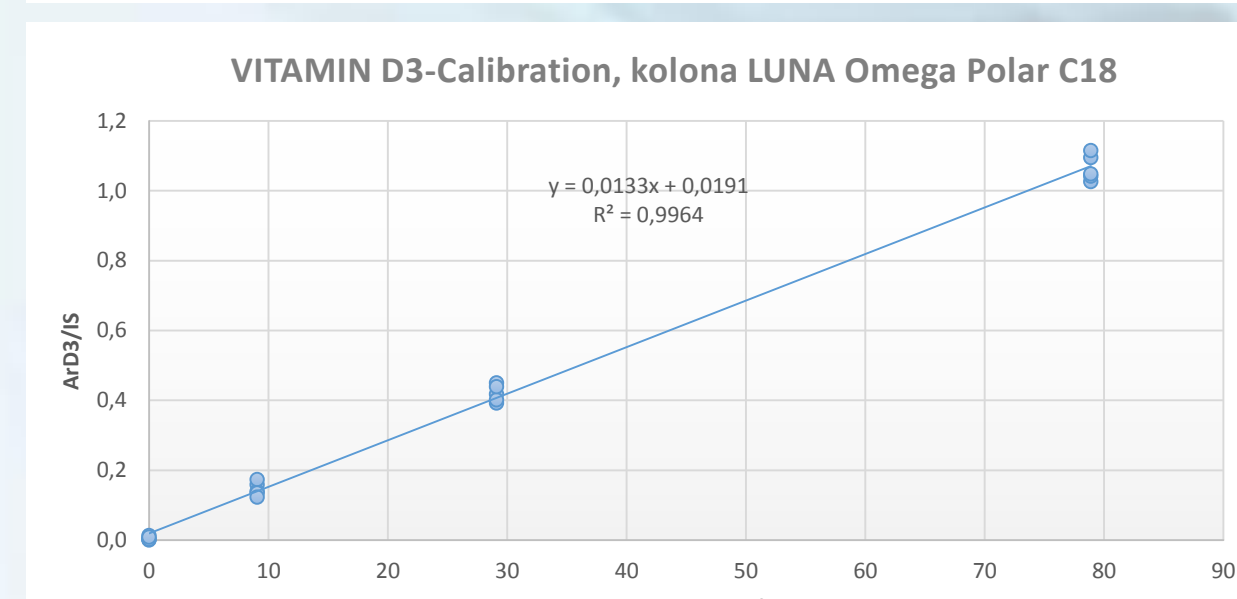
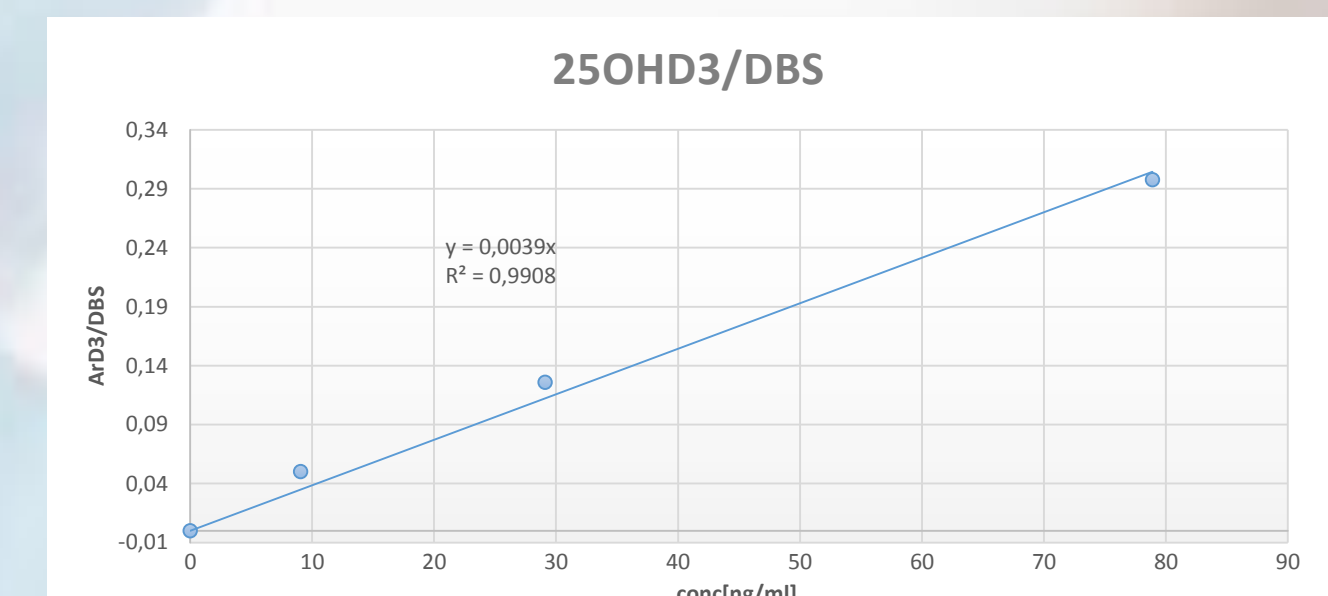
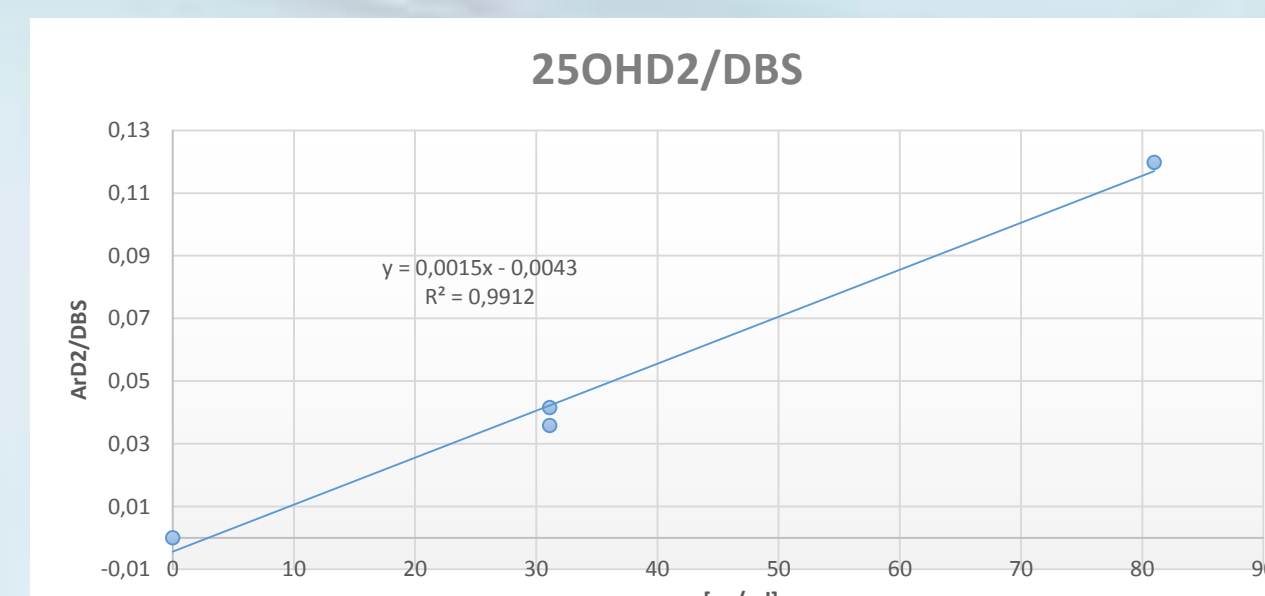
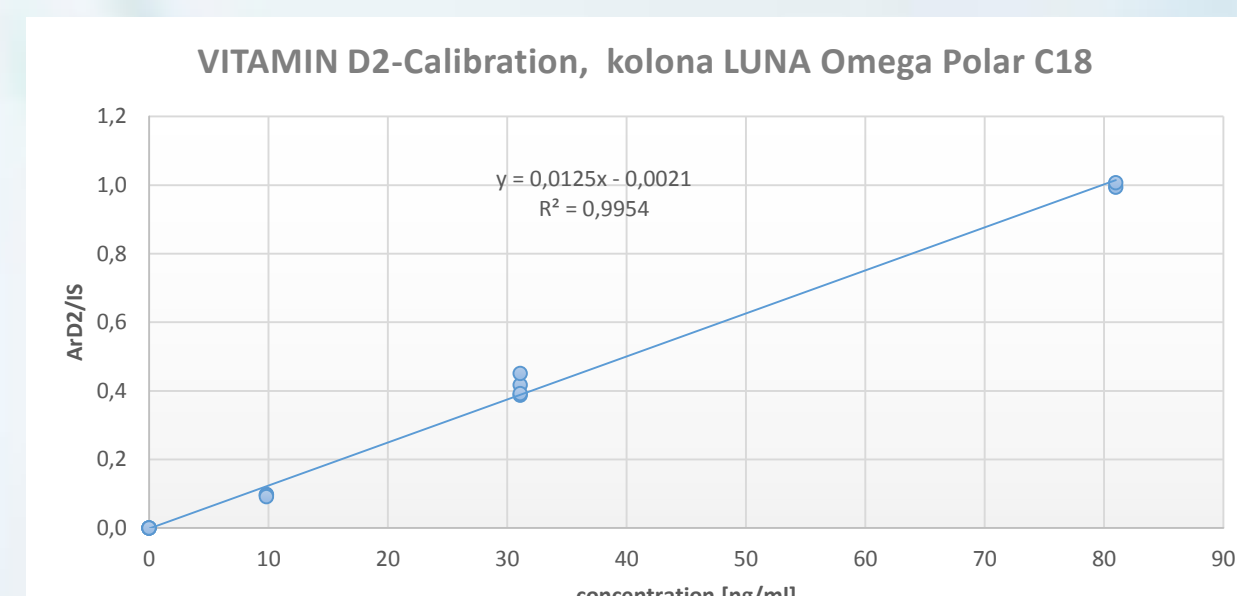


Tvorba D<sub>3</sub> ze 7-dehydrocholesterolu v kůži obratlovců včetně člověka:



## Kalibrace

Kalibrováno na ClinCal®-Calibrator RECIPE (0 – 197 nmol/l/D<sub>3</sub>, r<sup>2</sup> = 0.9964, 0 – 196 nmol/l/D<sub>2</sub>, r<sup>2</sup> = 0.9954 kontrolováno pomocí ClinChek® - Control (serum, Level I s cílovou hodnotou 35.5 nmol/l, bias 11% pro D<sub>2</sub>, s cílovou hodnotou 37.1 nmol/l, bias 9.4% pro D<sub>3</sub>, Level II s cílovou hodnotou 103.0 nmol/l, bias 6.3% pro D<sub>2</sub>, s cílovou hodnotou 105.0 nmol/l, bias 4.6 % pro D<sub>3</sub>).



## Preanalytická fáze

**odběr vzorků DBS CAPITAINER (Sweden):** Kapka kapilární krve z prstu dobrovolníka byla aplikována na startovací pozici speciální odběrové soupravy fy Capitainer (Quantitative blood sampling card Capitainer B, The quantitative DBS system) zkoncentrována na produktový disk, který byl použit k vlastní analýze.

## Analytická metodika

### 1. Počáteční příprava analytického vzorku:

K extrakci z disku DBS byl použit roztok RECIPE Precipitant P/IS (d<sub>6</sub>-25-OH-D<sub>3</sub>, parent iont 389.368 m/z) o objemu 200µl vortex 90 minut, centrifugace 15000 ot/min po dobu 5 minut, 10 minut inkubace při 4°C, opět centrifugace při stejných podmínkách jako v první a nástřik 50 µl výsledného supernatantu přímo na systém UHPLC/HRMS. Na základě studia výtěžnosti byl čas vortexování ustálen až na 6 hodinách, objem P/IS 400 µl, poté následovala již jen centrifugace za stejných podmínek bez inkubace.

### 2. Počáteční příprava analytického vzorku

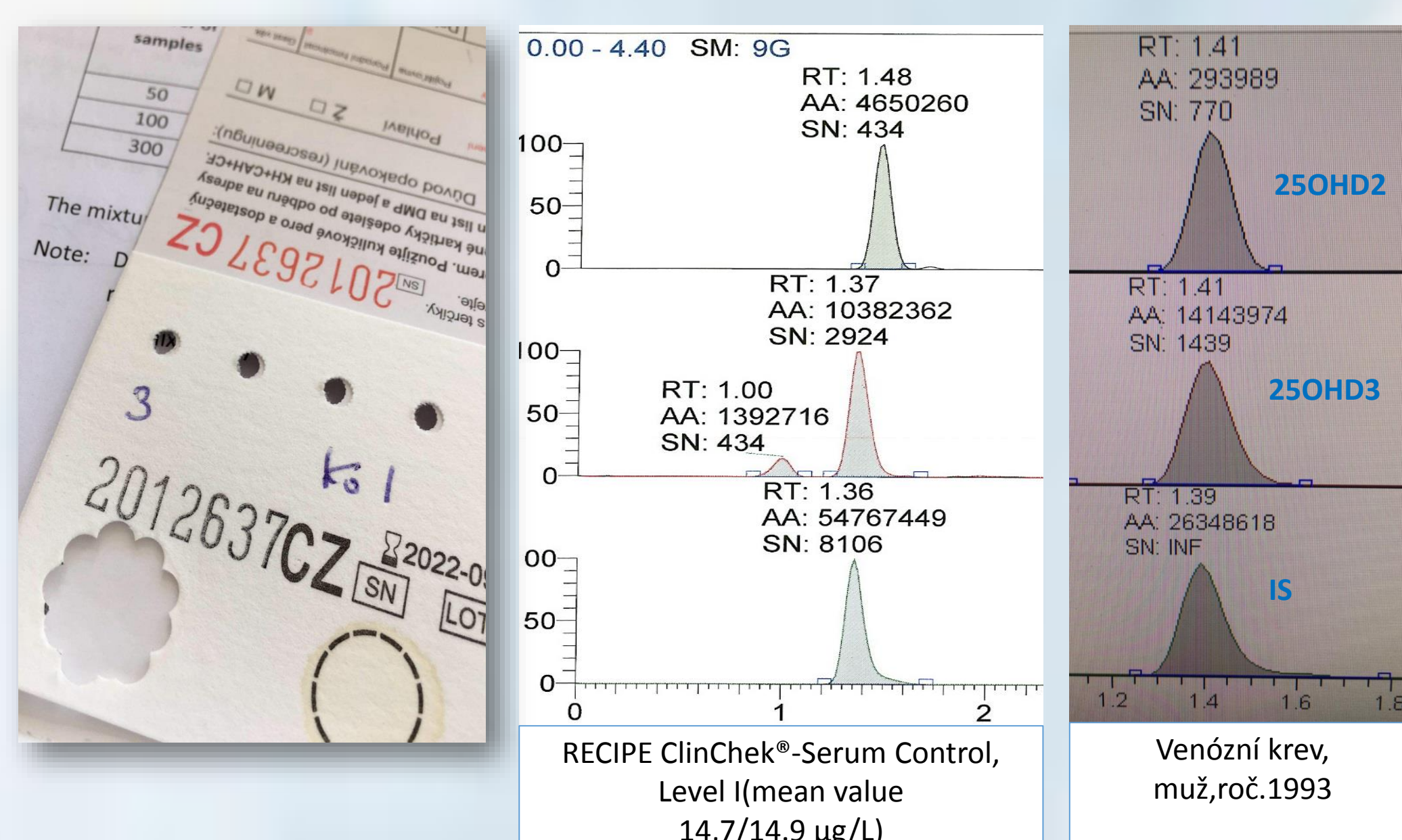
Celý proces byl také zkoušen na systému 10539735 fy Whatman. Terčíky určené pro novorozenecký screening (filtrační papír s vyšším obsahem celulózy). Poněvadž se jedná o mnohem tenčí sací vrstvu může být doba vortexování oproti systému fy Capitainer zkrácena na dobu maximálně 3 hodin, doba 2 hodin již stačí.

### 3. UHPLC/HRMS

Systém Q EXACTIVE FOCUS (Thermo Fisher Scientific) v režimu plného skenu (full scan) Optimalizován v režimu Tune na MS7014 RECIPE® Optimisation Mix (parentní ionty: 395.325 – D<sub>2</sub>, 383.331- D<sub>3</sub>). UHPLC Ultima 3000, kolona LUNA®Omega, 1.6µm Polar C18, 50 x 2.1mm.

## Výsledky

Ve vzorcích DBS u první skupiny 8 dobrovolníků stanoven D<sub>3</sub> v rozsahu hodnot 22.56 – 93.56 nmol/l bez přepočtu na hematokrit D<sub>2</sub> v těchto vzorcích detekován nebyl. Po optimalizaci doby třepání ad1. byla pro ověření na reálném vzorku DBS testována krev dobrovolnice s již podstatně vyšší hodnotou (62.57 nmol/l) a dále měřeny další DBS. Druhá skupina 7 dobrovolníků porovnaný hodnoty v séru vs. DBS.



vzorek	DBS				SERUM		
	25OHD2 [µg/l]	25OHD2 [nmol/l]	25OHD3 [µg/l]	25OHD3 [nmol/l]	25OHD2 [nmol/l]	25OHD3 [µg/l]	25OHD3 [nmol/l]
LS1/DBS	8,1189	19,6476	29,1486	72,5801	0	15,5658	38,7587
LS2/DBS	8,3089	20,1075	26,5299	66,0595	nebylo testováno		
MARPLISm_93	0	0	24,5576	61,1484	0	35,5498	88,5189
MARPLISz_71	8,2235	19,9009	28,4183	70,7616	0,2966	0,7177	18,5340
MARPLISz_93	8,2628	19,9961	26,6676	66,4022	0	0	20,2460
VLDPLm_69	0	0	43,8831	109,2689	0	0	36,0264
IP	8,4980	20,5653	24,8268	61,8187	0	0	20,1662
ALSz_68	8,2687	20,0102	19,5521	48,6847	0	0	23,0024
AH	nebylo testováno				0	0	16,6394

## Diskuze a závěr

Za optimální hladiny vitaminu D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> jsou četnými odborníky považovány hladiny v plasmě/séru kolem 100 nmol/l a vyšší. Avšak v evropské populaci včetně naší jsou nalézány hodnoty bohužel běžně nižší než 50 nmol/l. Poznatky z první fáze vývoje metody byly úspěšně využity v nyní probíhající validační fázi, která zahrnovala přípravu 50 µl aliquotů rekonstituovaných kalibrátorů a kontrol hlubokým zmrazením na -70°C a jejich postupné proměřování v DBS režimu Capitainer a Whatman Validace DBS kalibrací bez nutnosti stanovení konvergenčního faktoru (kapalné vzorky v DBS/kapilární krev v. krev venózní) z první fáze vývoje metody bude nutným předpokladem použití metody v rutinním režimu monitorování DBS vzorků širší populace zejména v rámci. Nevýhoda Whatman terčíků oproti Capitainer diskům - větší poloměr, nutnost celý terčík rozštípat speciálními štípačnými kleštěmi na poměrně velký počet malých dílků terčíků →prodloužení doby centrifugace a celkové doby zpracování vzorku před extrakcí. Nízké nálezy D<sub>2</sub> jsou evidentně na konto kvality nutrice dobrovolníků/pacientů (i když prozatím statisticky nevýznamný počet), viz přiložené zdroje D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>.

## Poděkování

Poděkování všem spolupracovníkům Institutu nutrce a diagnostiky – RADANAL, s.r.o. za výborný a vysoce efektivní podíl na projektu. Zvláštní poděkování za dostatečně neocenitelnou výtečnou pomoc při zpracování práce Ing. Martině Plíškové, RADANAL, s.r.o.