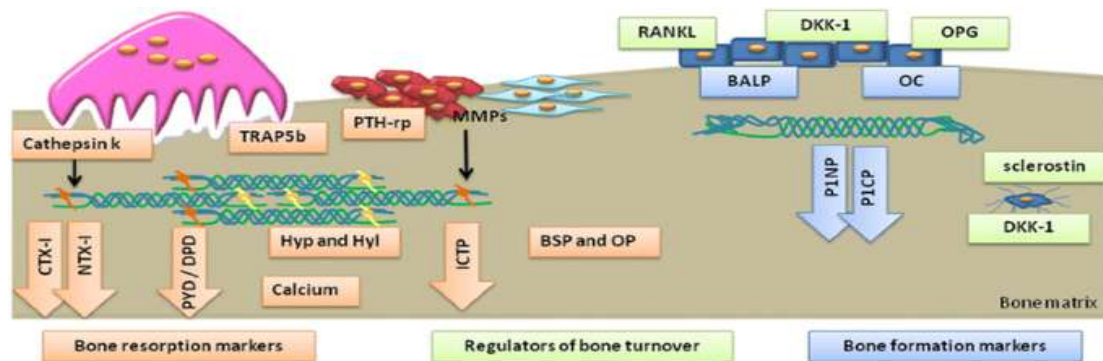


Metabolismus kostí a kostní markery v klinické biochemii

Martin Beránek





Kost a její funkce

- Mechanická opora a ochrana orgánů těla
- Pevný podklad pro pohyb (úpony svalů a chr.)
- Kostní dřeň zajišťuje krvetvorbu
- > 200 druhů kostí
- Vzniká osifikací vaziva a chrupavky
- *Buňky*: osteoblasty, osteocyty, osteoklasty
- Celoživotní **remodelace kostí** (10 % obnova ročně)
- Zásobárna minerálů (zejména vápníku)

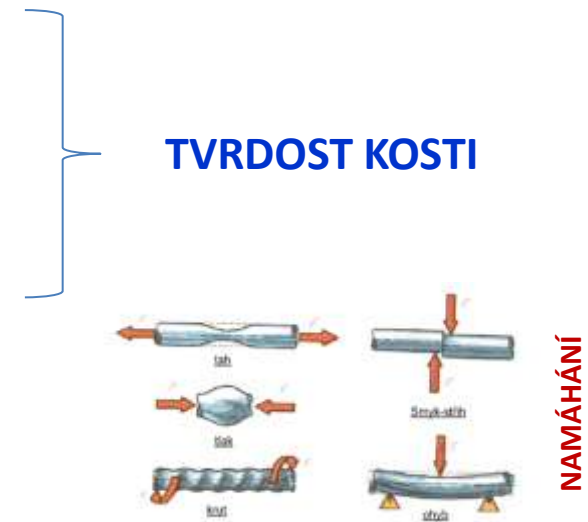
Chemické složení a fyzika kostí

2/3 anorganická část

- Krystaly Ca a P - amorfní nebo hydroxyapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
- Na^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , F^- , HCO_3^{3-}
- 99 % Ca v kostech (a zubech)

1/3 organická část

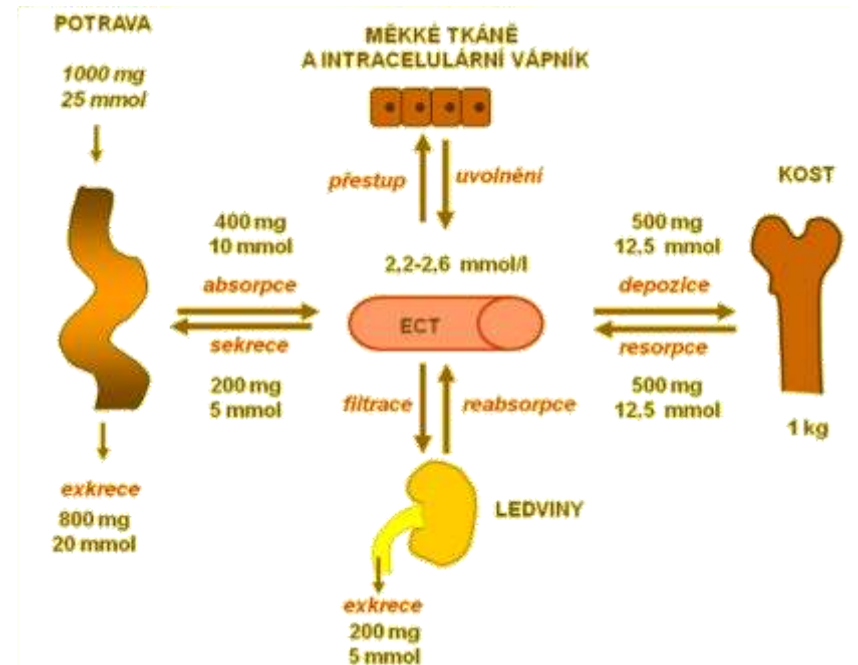
- 90 % kolagen I. typu
- Osteokalcin produkovaný osteoblasty
- Osteonektin, proteoglykany, sialoproteiny





Pojmy absorpce, resorpce, reabsorpce

- **Absorpce** = vstřebávání látky z GIT nebo kůže do krve a odtud do *cílové tkáně* (např. do kosti)
- **Resorpce** = zpětné (opětovné) vychytávání látek z cílových tkání nebo tubulů ledvin **do krve**
- Resorpce = reabsorpce
- *Absorpce vede k procesům označovaným novotvorba, tvorba, depozice či formování kosti*



Remodelace kosti

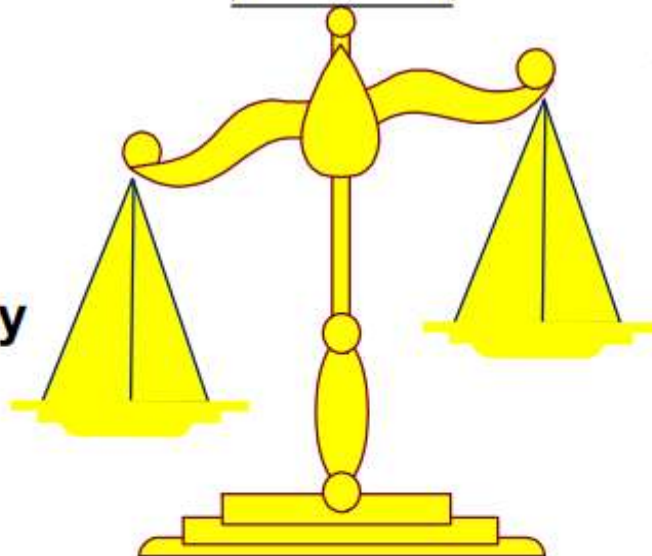
Rovnováha resorpce a formace kosti

+ kostní denzita -



**formování kostní hmoty
4-5 měsíců**

**resorpce kostní hmoty
4-5 týdnů**

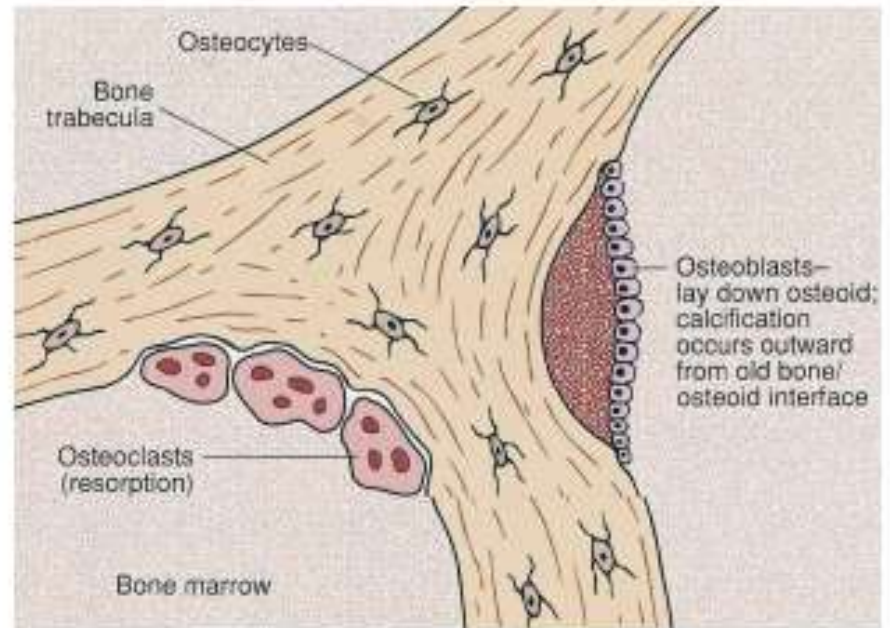
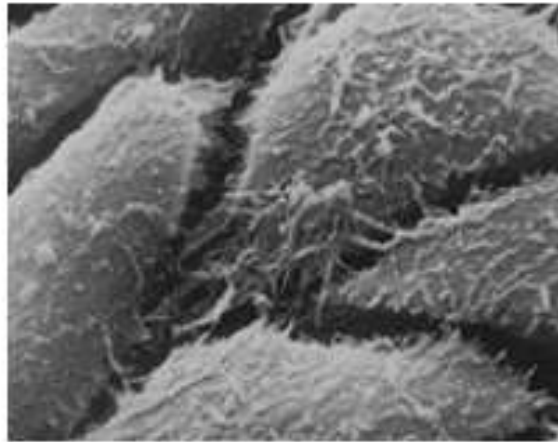


Kostní remodelace

- udržení mechanické integrity kostí a regulace kalciofosfátového metabolismu
 - Část kosti je vždy odstraněna (**osteoklasty**) a nahrazena nově vytvořenou kostí (**osteoblasty**)
 - Výsledkem je nová bílkovinná kostní matrix (**osteoid**), která je následně pasivně mineralizována.
- na aktivaci kostní resorpce a novotvorby se podílejí všechny tři základní kostní buňky
 - osteocyty, osteoblasty a osteoklasty

Kostní buňky

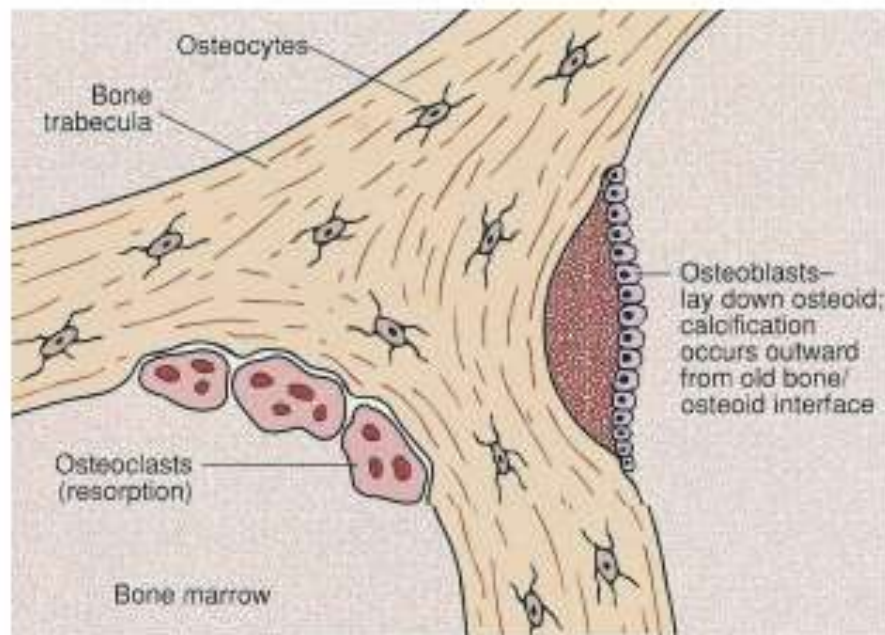
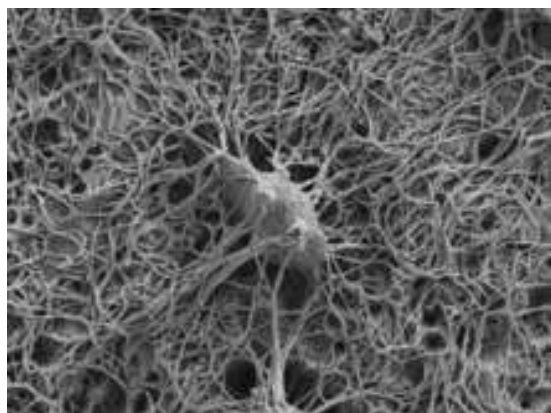
■ Osteoblasty



- vytvářejí souvislou vrstvu na povrchu kosti
- nelze je nalézt jednotlivě
- životnost 1-10 týdnů
- při růstu kosti některé zarůstají do kosti a transformují se do osteocytů
- při růstu vytvářejí osteoid – málo mineralizovanou kost

Kostní buňky

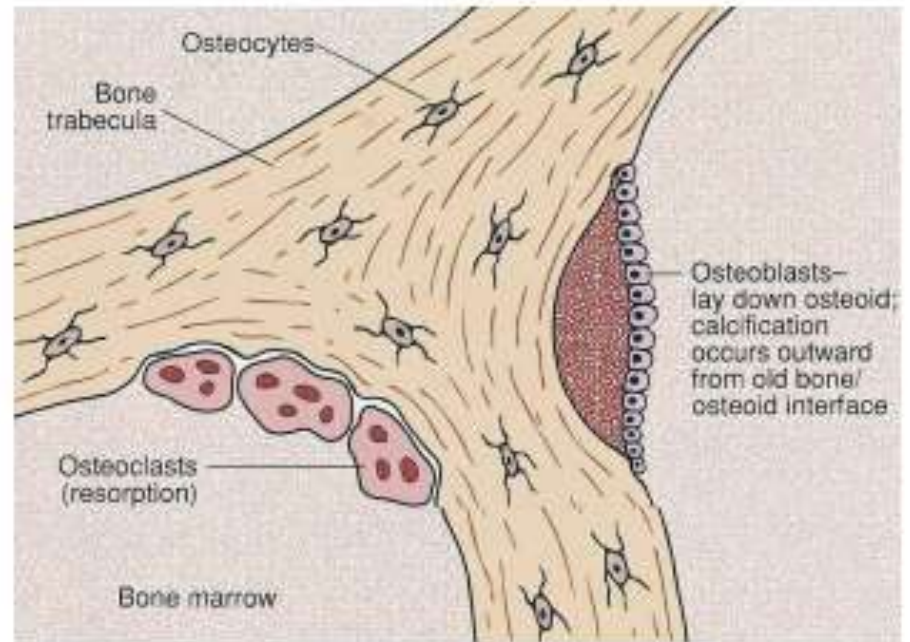
■ Osteocyty



- buňky uvnitř kosti
- funkce není příliš prozkoumána, ale je empiricky zjištěno, že po jejich odstranění kost degraduje a přestává být funkční

Kostní buňky

■ Osteoklasty



- mnohojaderné buňky původem mononukleární leukocyty
- funkce - odbourávání kostní matrix
- obsahují kyselé a neutrální hydrolázy v lysosomech
- funkci osteoklastů inhibují – kalcitonin, estrogeny, androgeny
- zvýšenou proliferaci osteoklastů ovlivňuje kalcitriol

Stimulace tvorby kosti

Fyzická aktivita	+	zvyšuje kostní hustotu
Růstový hormon	+	stimulace tvorby kosti
Thyroidní hormony	+	stimulují resorpci kosti, která následně stimuluje tvorbu kostní hmoty
Estrogen	+	ovlivňují absorpci Ca ve střevě, nepřímo inhibují osteoklasty
Kalcitonin	+	suprese osteoklastů
Vit. D3	+/-	nezbytný pro mineralizaci, vyšší koncentrace působí osteolyticky
Vápník	+	převážně v dětství, dospívání a ve stáří
Fluoridy	+	stimulují osteoblasty

Inhibice tvorby kosti

- | | | |
|-----------------|-----|---|
| Věk | - | od 30 let kostní hmoty ubývá |
| Glukokortikoidy | - | přímo inhibují syntézu proteinů osteoblastů, nepřímo inhibují resorpci Ca ve střevě |
| PTH | - | aktivace osteoklastů,
inhibice syntézy kolagenu v osteoblastech |
| Vit. D3 | +/- | nezbytný pro mineralizaci, vyšší koncentrace působí osteolyticky |

Porušená rovnováha tvorby a resorpce kostní hmoty

- Zvýšená resorpce i novotvorba
 - Zlomeniny, osteomalácie
- Snížená resorpce i novotvorba
 - Stařecká osteoporóza
 - resorpce i novotvorba
- Zvýšená resorpce a normální novotvorba
 - Časná postmenopauza, osteolýza
- Zvýšená resorpce a snížená novotvorba
 - Kortikoidy
- Normální resorpce a zvýšená novotvorba
 - Osteoplastické procesy

Onemocnění kostí

Osteoporóza (řidnutí kostí)

snížení kostní hmoty

1/4 žen a 1/20 mužů nad 60 let

Sekundární osteoporóza může být zapříčiněna:

některými léčivý

(dlouhodobé užívání kortikosteroidů,
heparinu)

kouřením

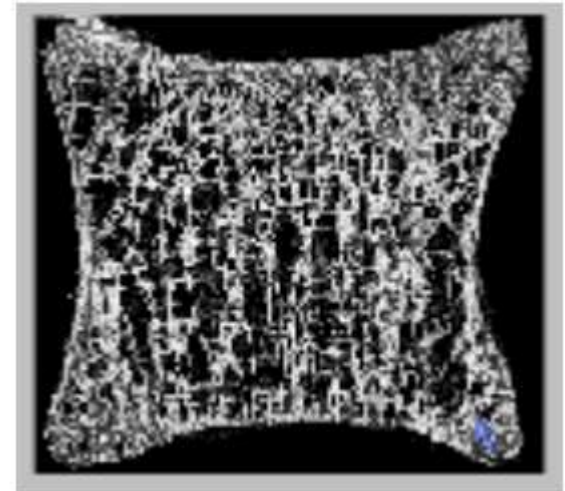
alkoholem

hyperthyroidismem

gastrointestinálními poruchami

Cushingův syndrom

metastázy



Patofyziologie osteoporózy

↓ Estrogen

Osteoklasty ↑

Osteoblasty ↑



Ztráta kostní
hmoty

↑ Ca v plasmě

↓ PTH

↓ DihydroxycholekalCIFerol

↓ Absorpce Ca ve střevě — **Negativní bilance Ca**

Onemocnění kostí

Pagetova choroba

= zvýšená osteoklastická aktivita, vede ke zvýšené kostní resorpci

- Zvýšená aktivita osteoblastů produkuje novou tkáň, ta je ale opět odbourávána
- Klinickým projevem bývá bolest kostí

Biochemie:

vysoká aktivita ALP

zvýšená exkrece Pro-OH v moči

Vyšetření kostního metabolismu

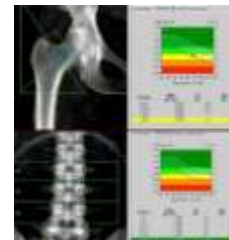
speciální vyšetření

celotělový scintigram, biopsie

určení prognózy a terapie

sledování: laboratorně 2-3x ročně

denzitometricky 1x ročně



BMD = bone marrow densitometry

Kostní markery

- Termín je používán pro biochemické produkty (molekuly) měřené v krvi nebo v moči
 - reagují na metabolickou aktivitu kosti, ale samy nemají žádnou kontrolní ani regulační funkci v kostním metabolismu

Kostní markery

Markery kostní resorpce

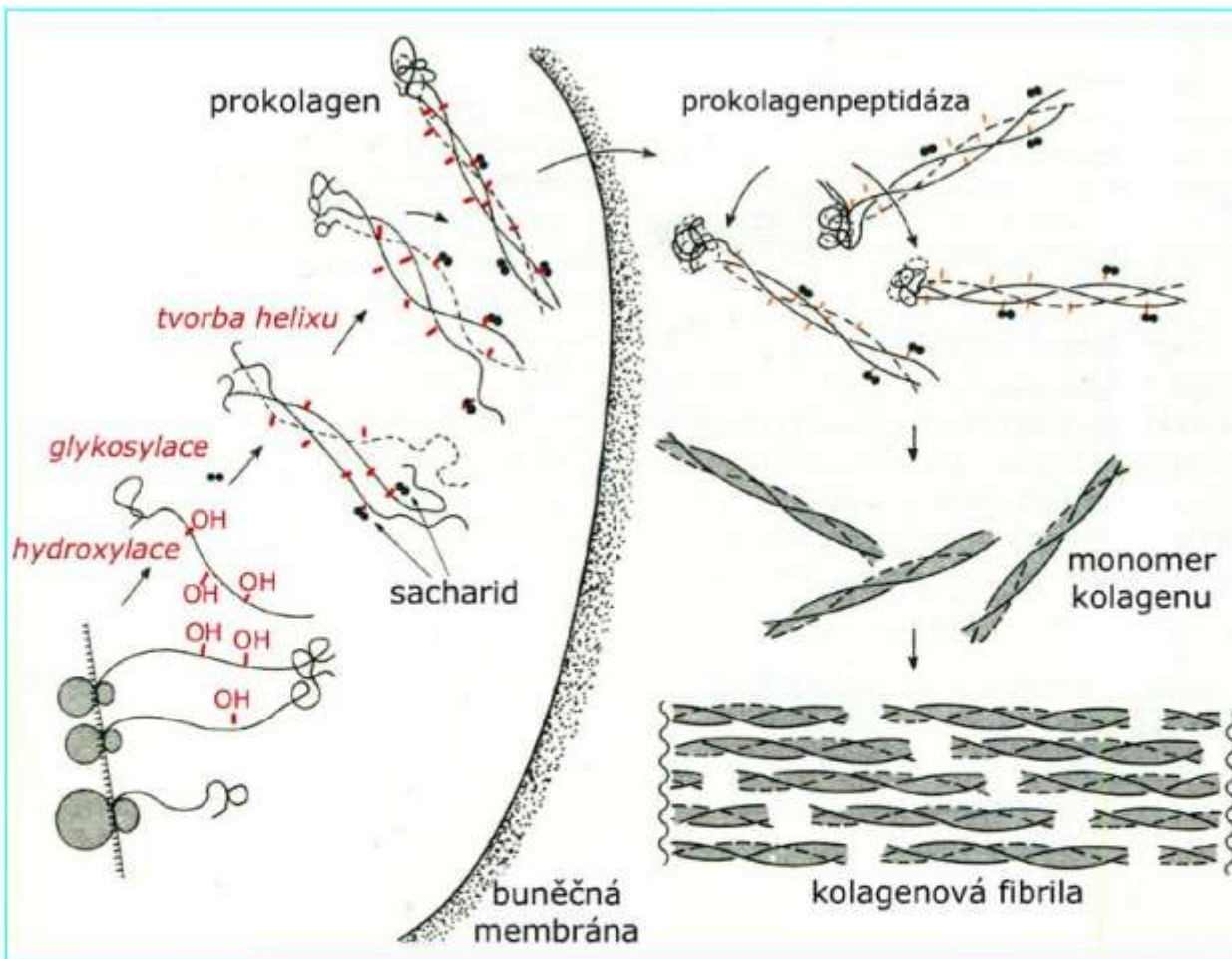
- reflektují na aktivitu a počet kostních buněk osteoklastů
 - degradace bílkovin kostní matrix nebo enzymatická aktivita osteoklastů

Markery kostní novotvorby

- reflektují na aktivitu a počet kostních buněk osteoblastů
 - syntéza bílkovin kostní matrix nebo enzymatická aktivita osteoblastů

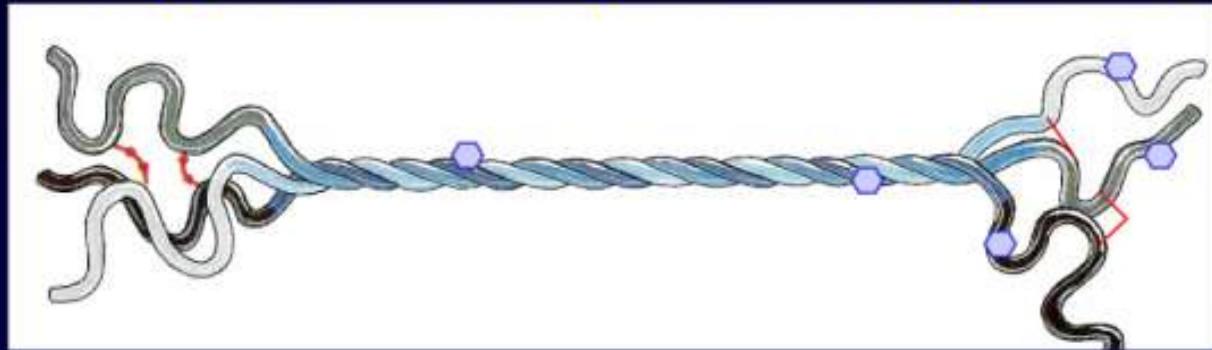
Kostní markery novotvorby kostní hmoty

- **Kostní alkalická fosfatáza**
 - vzniká v osteoblastech a má úlohu v mineralizaci kosti
- **Osteokalcin**
 - protein tvořený osteoblasty; součást nekolagenové složky nové kostní struktury; část osteokalcinu vstupuje do krevního oběhu

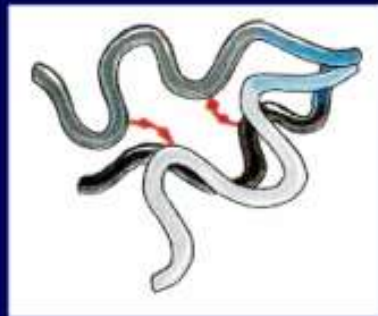


1. tvorba polypeptidového řetězce prokolagenu
2. hydroxylace
3. připojení sacharidových skupin
4. trojitá šroubovice prokolagenu
5. hotový prokollagen opouští buňku
6. v extracelulárním prostoru se působením prokollagenpeptidázy odštěpí globulární struktury, tj. odštěpení N-koncového peptidu obsahujícího cystin
7. uspořádání kolagenových vláken - tyčinky posun o $\frac{1}{4}$, příčné zesílení lisylovými postranními řetězci = zpevnění vláken

Syntéza kolagenu a markery novotvorby PINP, PICP



Přeměna prokolagenu na tropokolagen



**N-terminální propeptid
PINP**



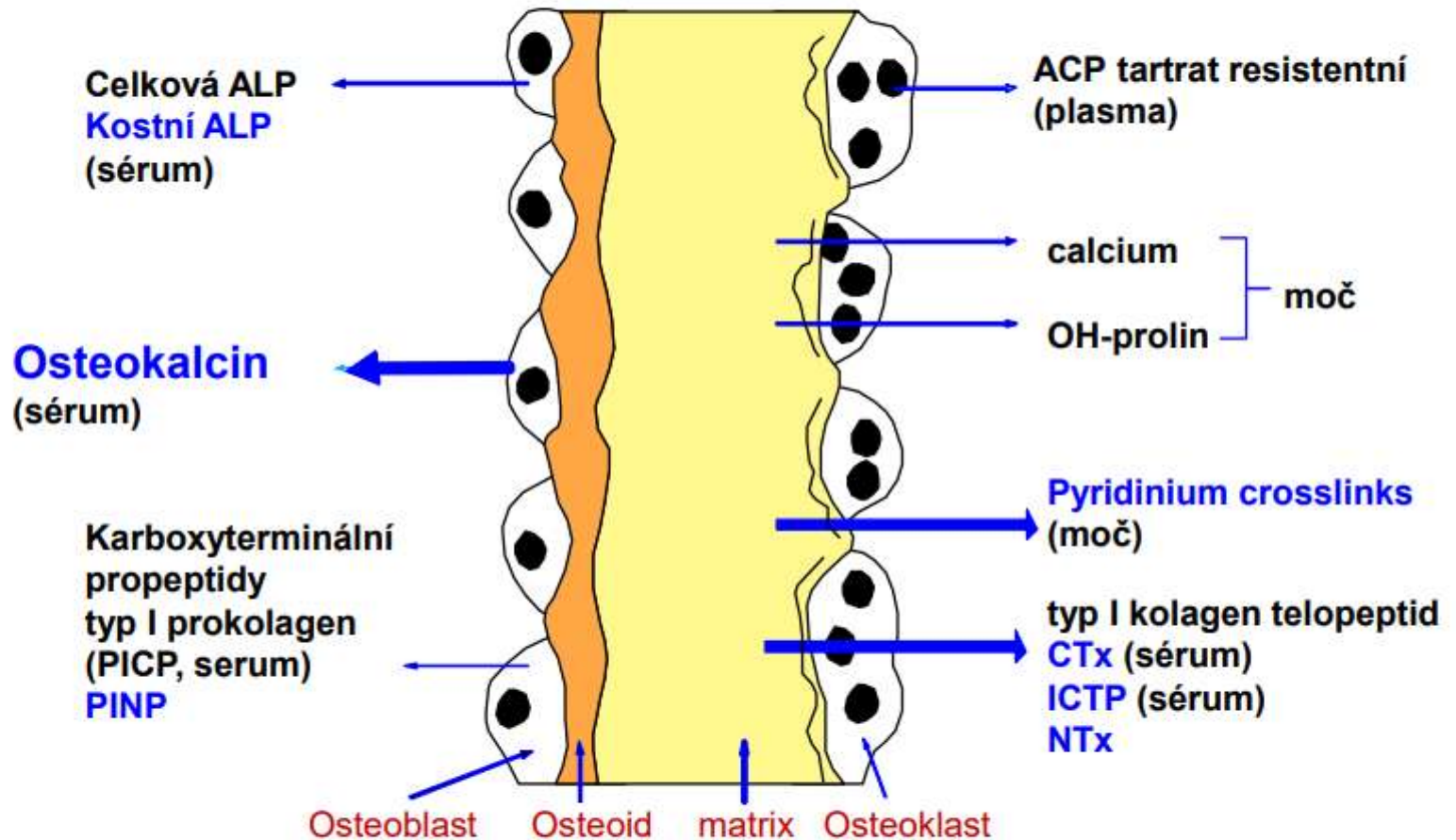
tropokolagen



**C-terminální
propeptid PICP**

Tvorba kosti

Kostní resorpce



Ostatní markery: 25 OH D₃, Calcitonin, Ca, PTH

Vyšetření moče nebo krve, ukazující kostní resorpci

CTx

- C-telopeptid: C-terminální telopeptid kolagenu typu 1 (fragment proteinové matrix)

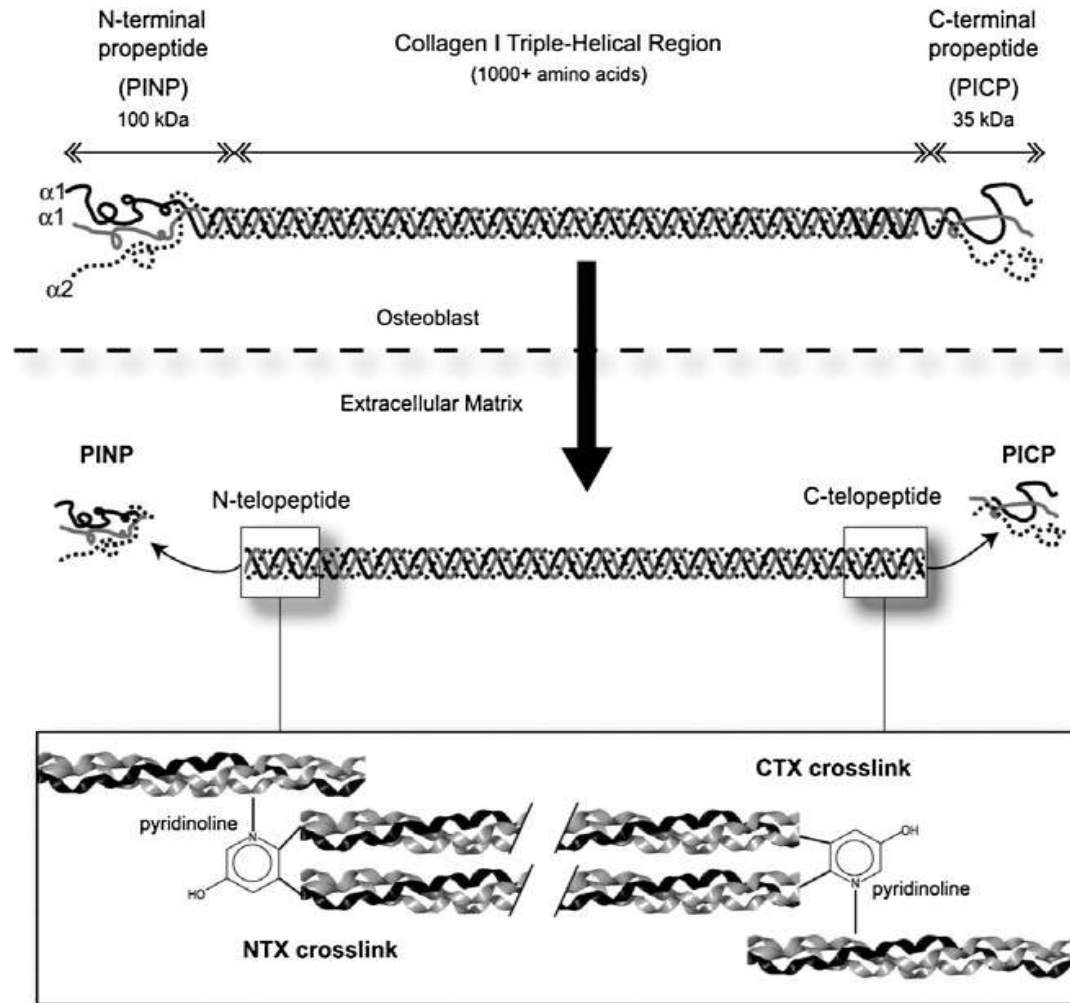
NTx

- N-telopeptid: N-terminální telopeptid kolagenu typu 1 (jiný fragment proteinové matrix)

DPD

- Deoxypyridinolin: produkt odbourávání kolagenu s kruhovou strukturou
- Pyridiniové příčné vazby (crosslinks) – skupina štěpných produktů kolagenu, zahrnující DPD

Vyšetření moče nebo krve, ukazující kostní resorpci



Metody stanovení

- Rutinně
 - Ca, P, ALP, ACP
- Imunochemie
 - ALPK, PICP, PINP (ELISA)
 - Osteokalcin, CTx, PTH, 25-OH D (automatizovaně)
 - 1,25 (OH)₂ D (RIA)
 - DPD

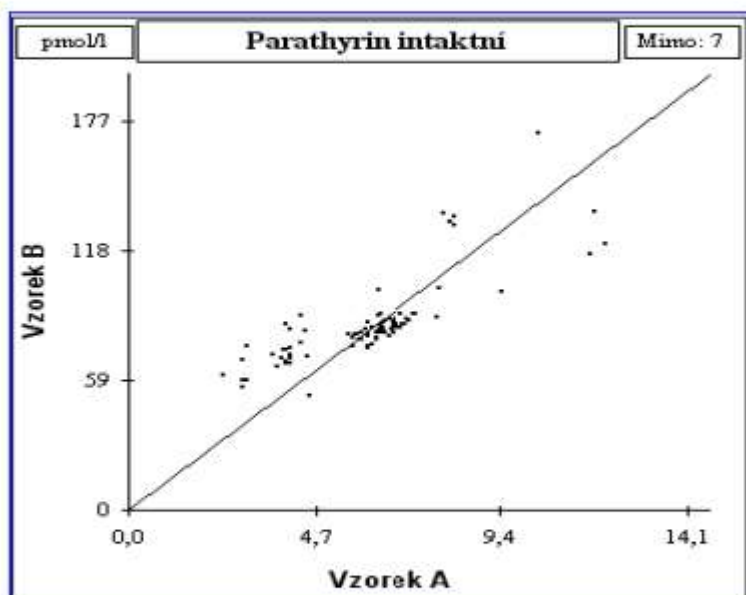
Preanalytika

Jednotky – základ porovnatelnosti mezi laboratořemi

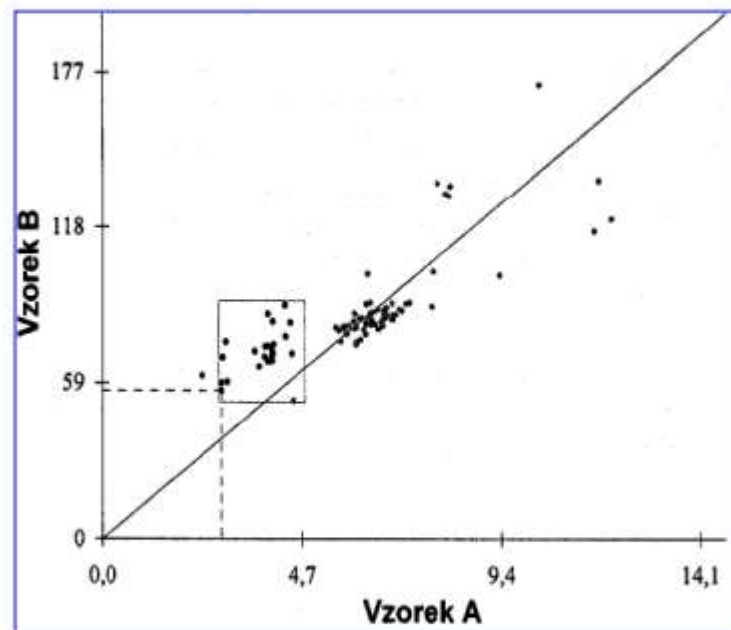
	požadovaná	vydávaná	počet laboratoří
PTH	pmol/l	ng/l	15
		pg/ml	27
B-CTx	μg/l	pmol/l	1
		ng/l	11
		ng/ml	6
		pg/ml	6
P1NP	μg/l	ng/ml	3
OTC	μg/l	nmol/l	1
		ng/ml	14
25-0H D	nmol/l	μg/l	6
		ng/ml	4

- informace klinikům zkreslená, resp. nesrovnatelná s ostatními
- prefix v čitateli i jmenovateli zlomků – neodpovídá požadavku SI

PTH



Hodnocení všech účastníků



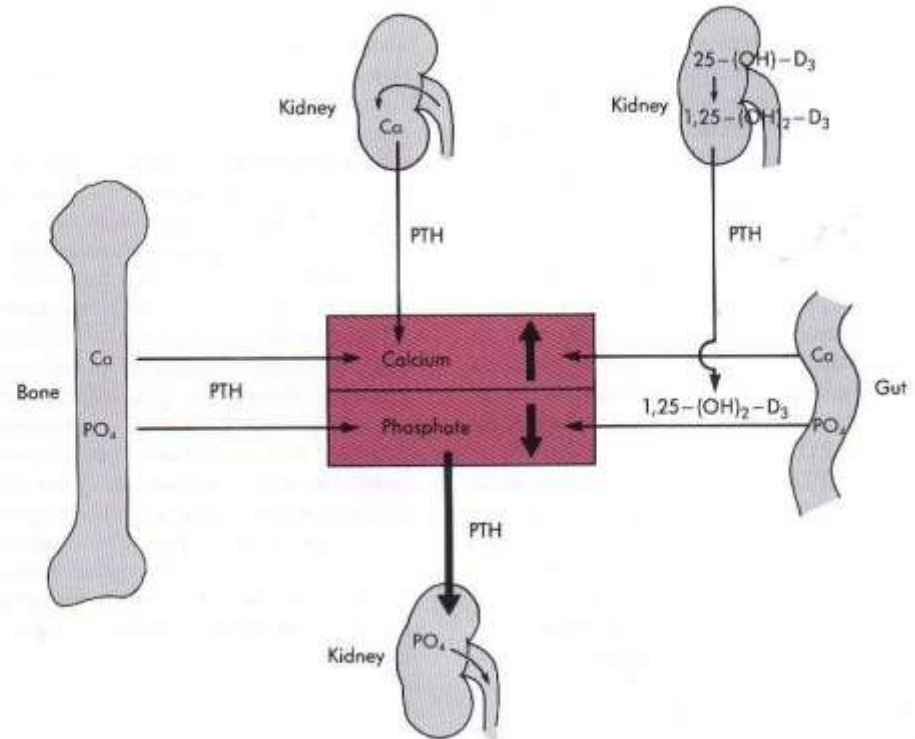
Hodnocení ve skupině
jednoho výrobce

Inhibice novotvorby kosti

Věk	-	od 30 let kostní hmoty ubývá
Glukokortikoidy	-	přímo inhibují syntézu proteinů osteoblastů, nepřímo inhibují resorpci Ca ve střevě
PTH	-	aktivace osteoklastů, inhibice syntézy kolagenu v osteoblastech
Vit. D3	+/-	nezbytný pro mineralizaci, vyšší koncentrace působí osteolyticky

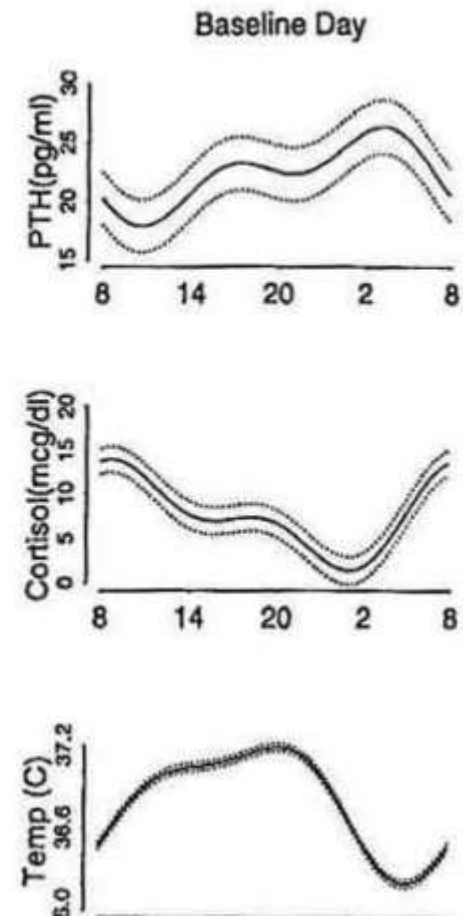
Účinek PTH

- prostřednictvím receptoru s adenylcyklázovou aktivitou
- stimulace osteoklastické resorpce kosti (receptor na osteoblastech)
- stimulace tubulární resorpce kalcia
- fosfaturický efekt
- stimulace produkce $1,25(\text{OH})_2\text{D}$,
zvýšení reabsorpce kalcia



Denní rytmus PTH

hlavní maximum: 03:15
vedlejší maximum: 17:30
hlavní minimum: 10:45
vedlejší minimum: 21:00



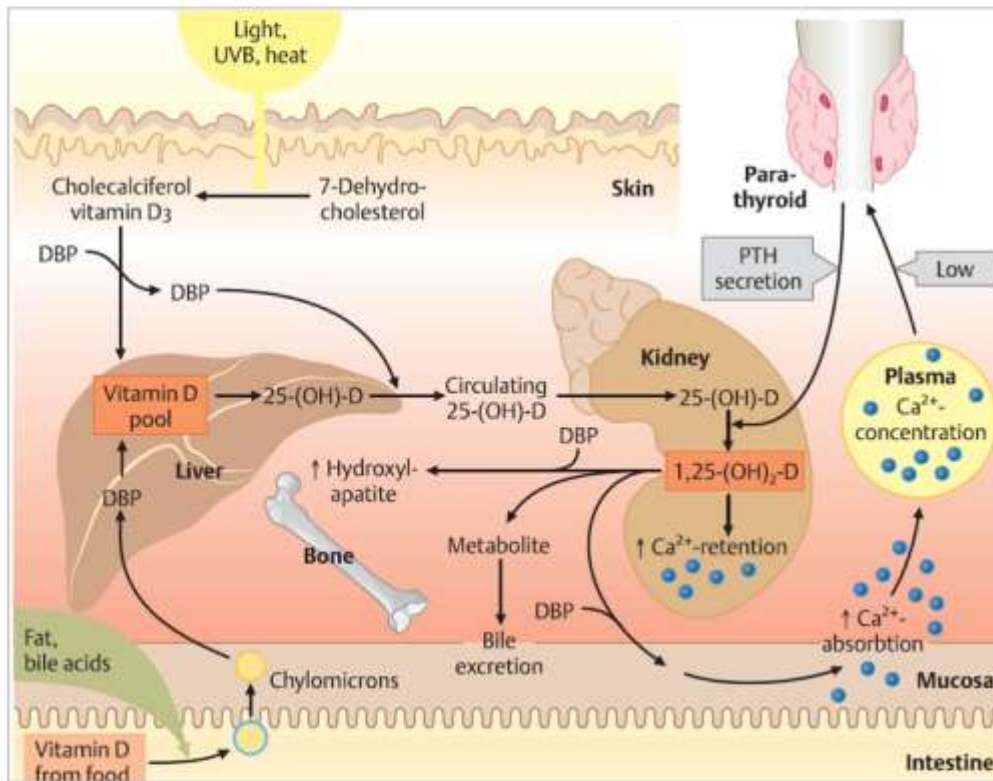
Indikační oblasti stanovení PTH

- hyperkalcémie, hypokalcémie
- hyperkalciurie, hypokalciurie
- chronické selhávání ledvin, dialyzování
- malabsorpční syndromy
- poruchy skeletu, poruchy růstu
- stavy po thyroidektomii
- urolitiáza s hypofosforémií
- neurologické manifestace (tetanie)
- recidivující pankreatitidy
- vředová choroba
- abnormální kalcifikace

Diferenční diagnostika zvýšení PTH

1. sekundární hyperparatyreóza
(nejvyšší koncentrace, >10x)
2. primární hyperparatyreóza
(<10x, adenom, hyperplazie, MEN I., MEN II.a)
3. terciární hyperparatyreóza
4. pseudohypoparatyreóza
(abnormity PTH-receptor-adenylátcyklázového komplexu,
Albrightova hereditární osteodystrofie)
5. atd.

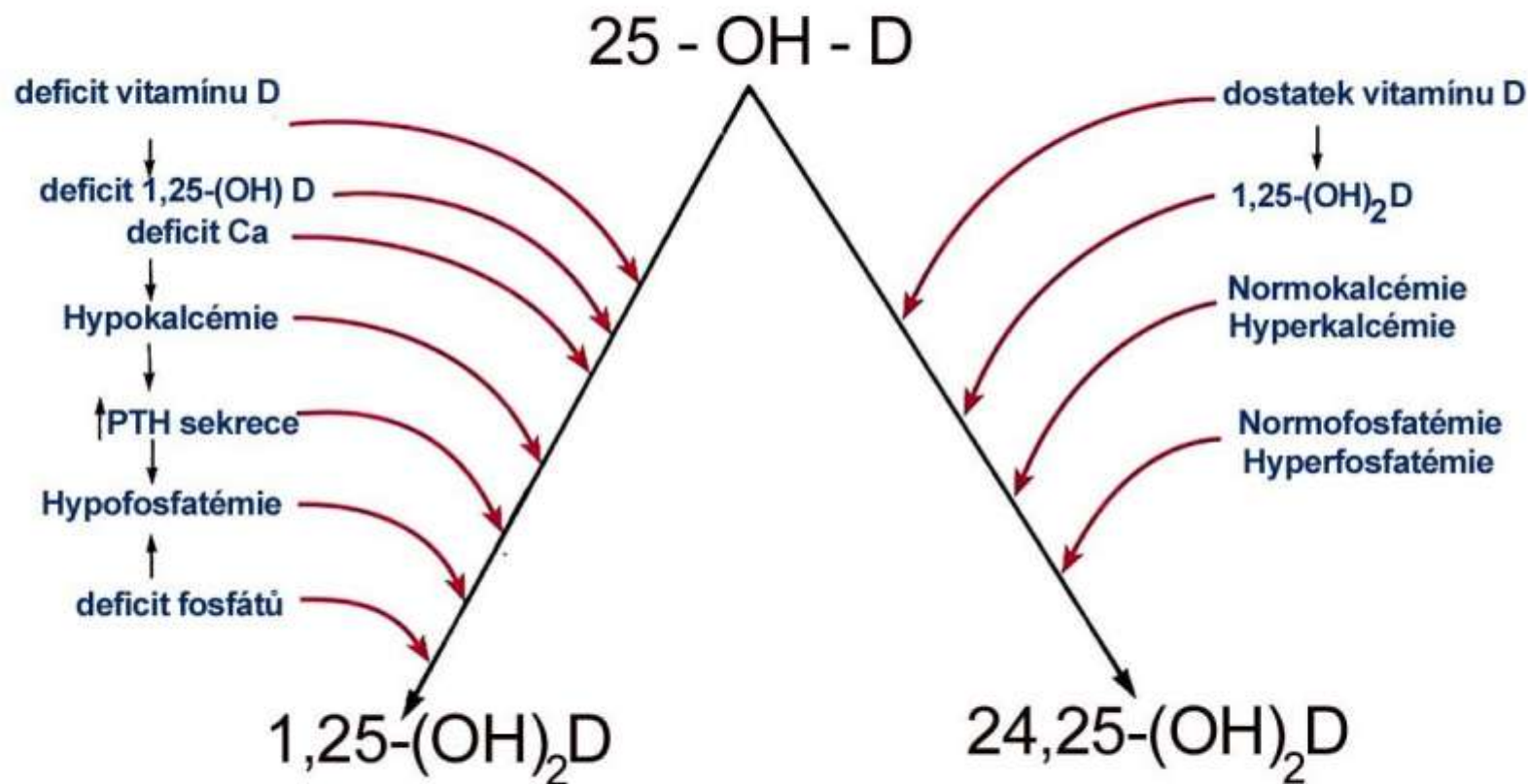
Metabolismus vitaminu D



hormonálně aktivní forma ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) vzniká sekvenční hydroxylací 25-hydroxylázou v játrech a 1α -hydroxylázou v ledvinách

1α -hydroxyláza je stimulována PTH a nízkou koncentrací Ca a P

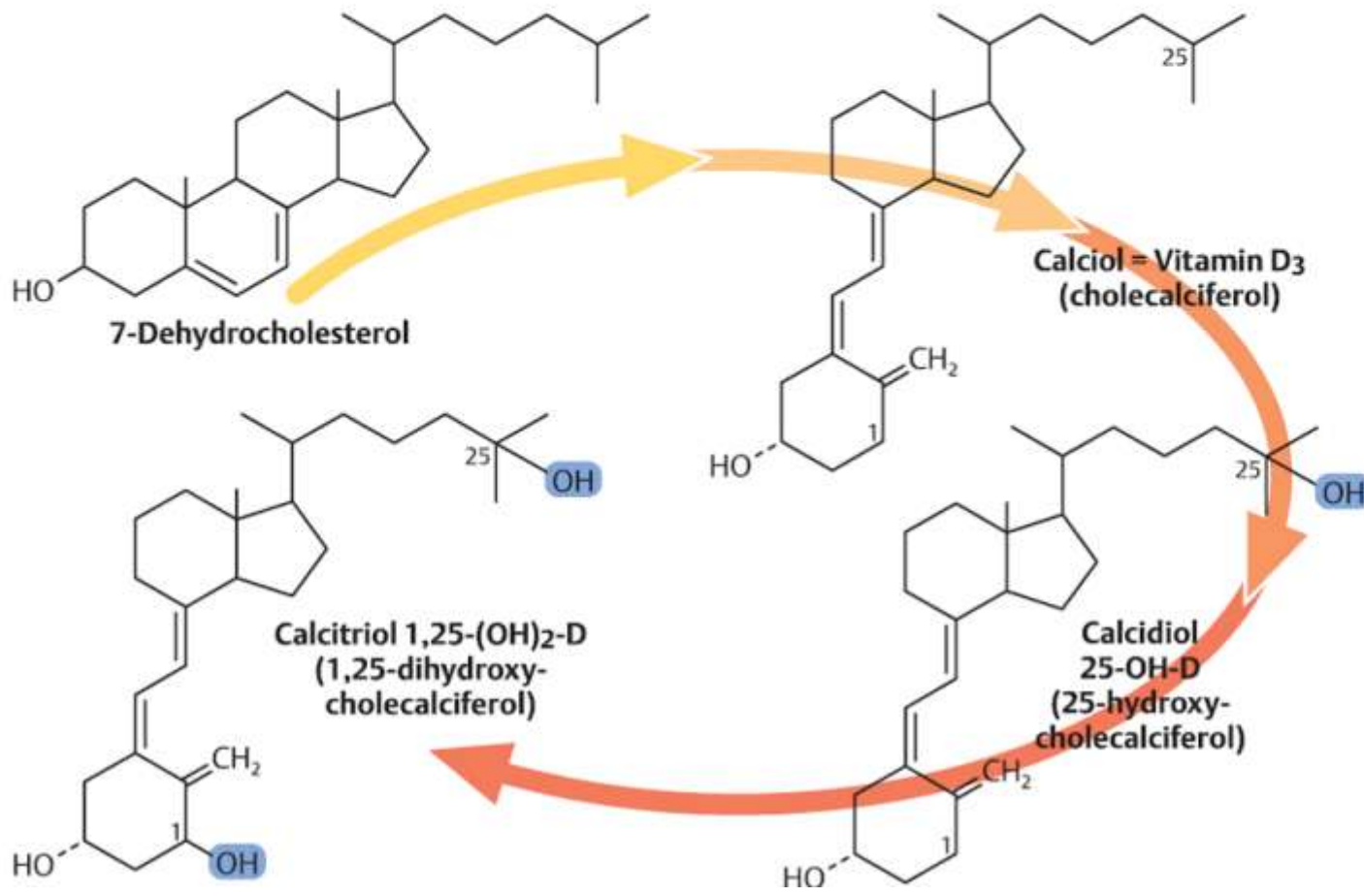
Stimulace a inhibice tvorby 1,25-(OH)₂-D



pravděpodobně také
růstový hormon,
prolaktin,
estrogeny

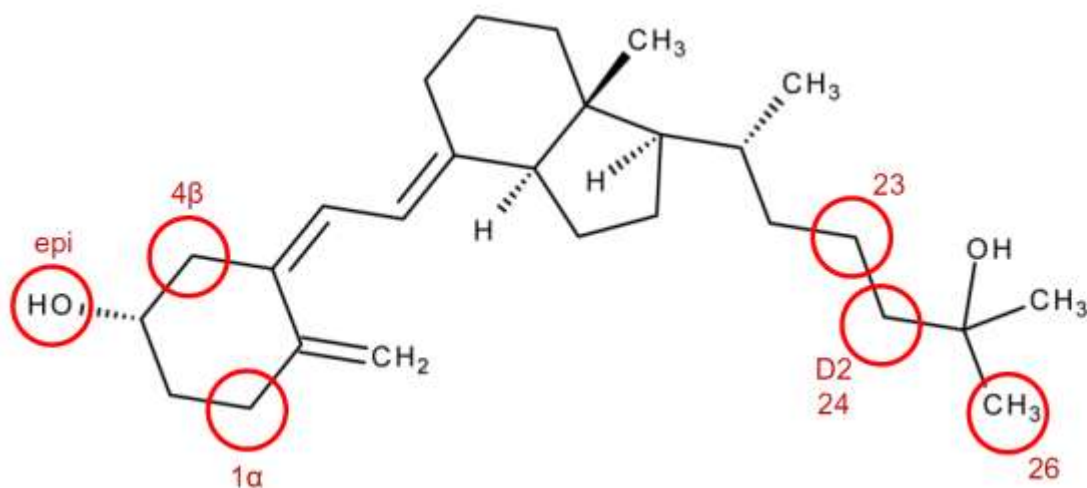
Vitamin D

- účinek prostřednictvím metabolitů
 - 40 metabolitů, 228 analogů
- cirkulace - vázán na protein (VDBP)



Hledání interferencí

– 40 metabolitů, 228 analogů



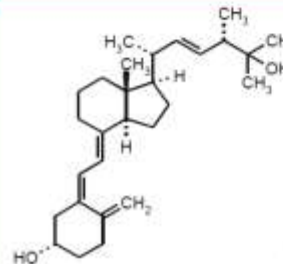
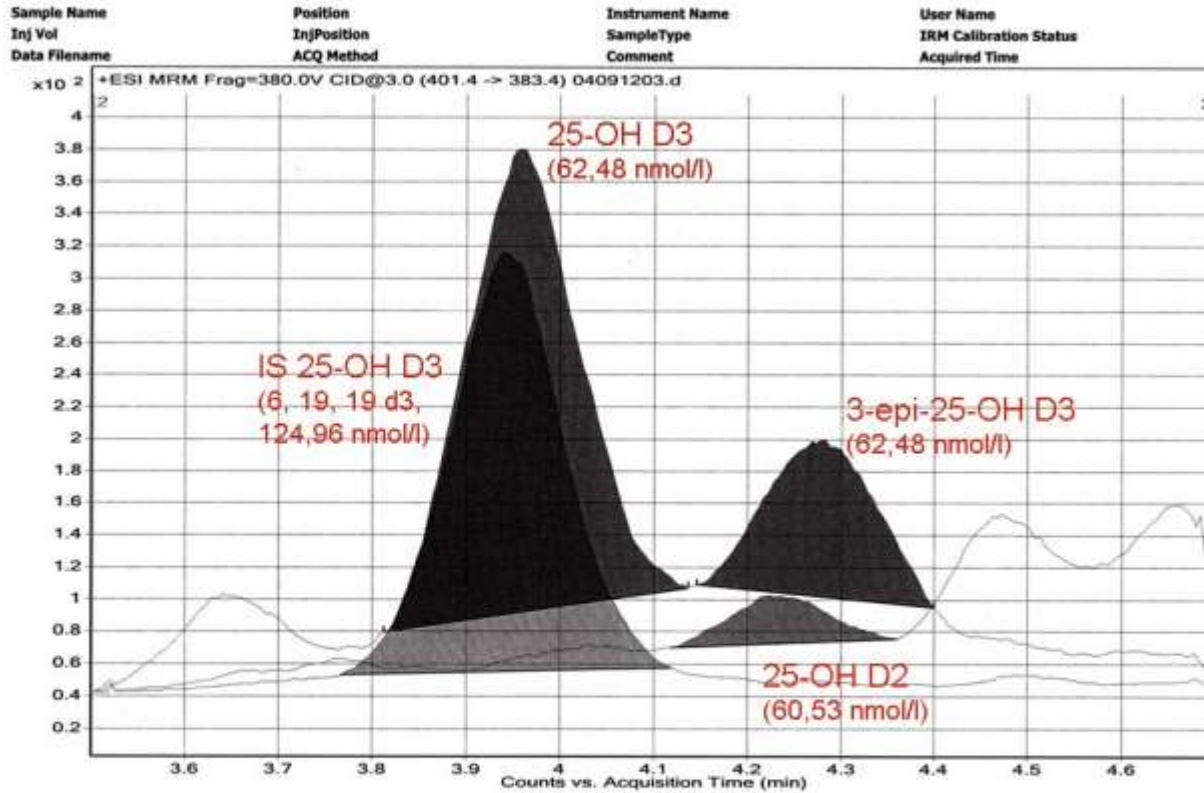
Problémy imunochemických stanovení vitamínu D spočívají v existenci řady interferujících vlivů a také v tom, že velikost a významnost těchto vlivů je různá u různých metod.

Imunochemická měření 25-OH vitamínu D. Dominují analytické nebo klinické problémy?

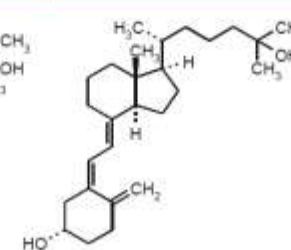
Co měříme

- 25-OH vitamín D (celkový)
- 25-OH D₃ (cholekalCIFerol)
- 25-OH D₂(ergokalCIFerol)
- 1,25-(OH)₂ vitamín D(kalcitriol)
- Metabolity 25-OH vitaminu D

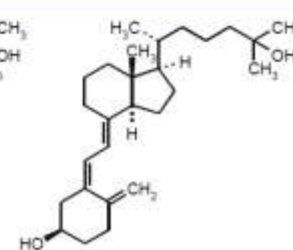
LC-MS/MS



25-hydroxyvitamin D₂
25(OH)D₂



25-hydroxyvitamin D₃
25(OH)D₃



3-epi-25-hydroxyvitamin D₃
3-epi-25(OH)D₃

Problematika analytického stanovení Vitaminu D

Časté omyly - víme, co měříme?

U nás místo dihydroxyvitamínu D měříme celkový vitamín D

- **25-hydroxyvitamin D2/D3**

- zásobní forma vitaminu D
- Rutinní měření

- **1,25-dihydroxyvitamin D2/D3**

- aktivní forma vitaminu D

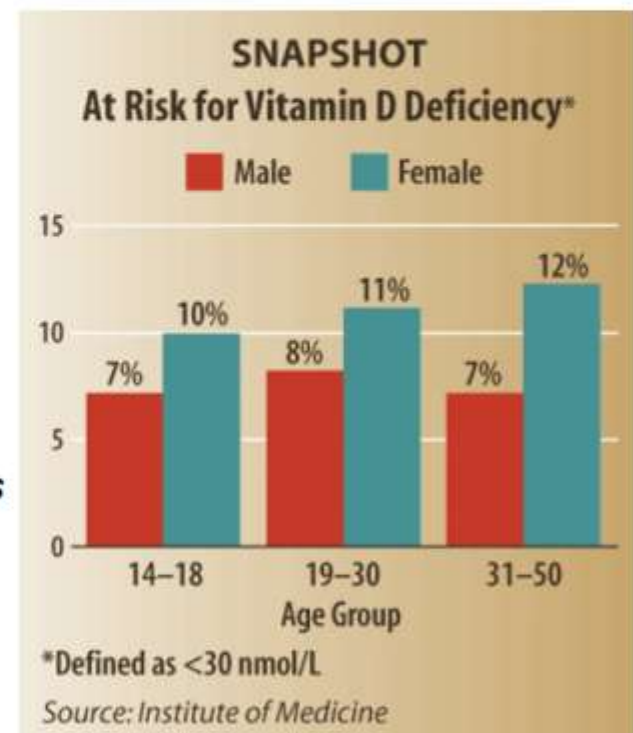
- Koncentrace v krvi je 1000 x menší než
25 hydroxyvitaminu D

Kriteria NHANES

- 25-hydroxyvitamin D (nmol/l)

Stav	25-hydroxyvitamin D (nmol/l)
nedostatek	< 30(25)
neadekvátní	30 - 50
dostačující	50(75) – 125
riziko hypervitaminosy	> 125

NHANES-National Healthy and Nutrition Examination Surveys



Looker A, Johnson MPA, Lacher DA et al. Vitamin D Status: United States, 2001-2006. *Clinical Laboratory News*, May 2011

Standardizační program VDSP



Vitamin D Standardization Program (VDSP)

VDSP Goal
Promote the standardized laboratory measurement of total 25-hydroxyvitamin D – a measure of vitamin D status – in order to improve clinical and public health practice worldwide.

VDSP Objectives

1. Standardize vitamin D measurement in national health surveys worldwide
2. Promote standardized 25(OH)D measurement by assay manufacturers and clinical and research laboratories
3. Conduct an international research program devoted to 25(OH)D and its laboratory measurement

VDSP* Background
Established November 2010 by the NIH Office of Dietary Supplements in response to expert analysis that large variations in laboratory assays for serum total 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] are confounding interpretation of study results and evaluation of vitamin D status.
*Sempos CT et al. *Scan J Clin Lab Invest* 2012; 72(Suppl 243): 32-40.

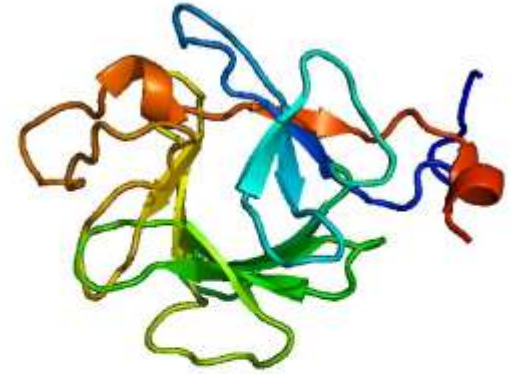
VDSP Reference Measurement System (RMS) Components
VDSP developed an RMS so that it is now possible to establish the world-wide standardization of 25(OH)D measurements.

- NIST & Ghent University Reference Measurement Procedures
- NIST Standard Reference Materials (SRM)
- CDC Vitamin D Standardization-Certification Program
- Accuracy-Based Quality Assurance Programs, e.g. CAP ABVD and DEQAS
- Study designs for standardizing completed studies

<http://ods.od.nih.gov/vdsp> 

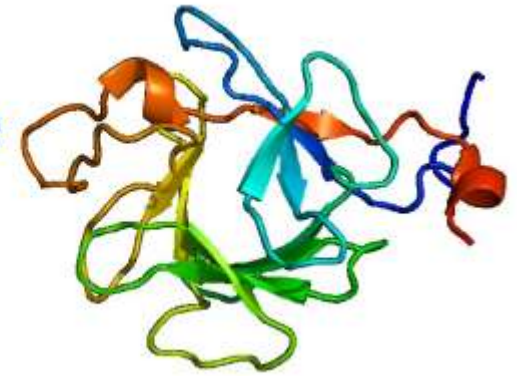
- Role VDSP
 - Tvorba referenčního systému
 - Kalibrace kitů referenční metodou
 - Kontrola kvality a verifikace bias v programech
 - Harmonizace výsledků měření
 - Programy verifikace bias a certifikace účastníků
 - DEQAS, ABVD CAP, NIST-NIH Vit-D-QAP

Fyziologie a patofyziologie FGF 23



- zásadní význam pro ledvinové funkce a pro **kostní metabolismus**
- **produkce v osteocytech a osteoblastech** je podmíněna činností membránového proteinu KLOTHO
- Cílovou oblastí osy klotho/FGF 23 jsou proximální ledvinové tubuly
- Regulační účinky vlivem osy klotho/FGF 23
 - zprostředkovány inhibicí kalcitriolu,
 - expresí Na/K kotransportérů,
 - vlivem na hladiny PTH a fosfátů

Fyziologie a patofyziologie FGF 23



- hlavní fyziologické funkce FGF 23
 - inhibice tubulární resorpce fosfátového aniontu v proximálním tubulu
 - inhibice konverze vitamínu D v ledvinách z formy 25-OH D do aktivní formy 1,25-(OH)₂ D (kalcitriol)
- zvýšená hladina FGF 23
 - markerem chronického selhání ledvin (CKD)
 - hladiny FGF 23 jsou indikativní také
 - u některých poruch kostního metabolismu
 - u kardiovaskulárních onemocnění

Jednotky měření

- ng/l
- Arbitrální jednotky: RU/ml
 - Portalle 2016: RU/ml
 - Dryah 2017: RU/ml
- *nejednotnost, bez harmonizace*
- *v renomovaných impaktovaných časopisech přetrvávají arb.j.*

Stabilita séra, plasmy, vliv teploty

- Plasma poskytuje signifikantně vyšší výsledky. Vzorky nutno skladovat zmrazené

Table 1 Stability at room temperature (RT) and at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ of iFGF23 concentration in serum and EDTA plasma samples of five healthy controls and five dialysis patients

Conditions of conservation	Serum iFGF23 (ng/L)	EDTA iFGF23 (ng/L)
Tested immediately (T0)	476.2 \pm 531.2	954.0 \pm 1021.3
Tested after 1 h at RT	474.5 \pm 530.0	947.2 \pm 1021.2
Tested after 4 h at RT	458.8 \pm 512.7*	950.2 \pm 1018.2
Tested after 7 h at RT	453.5 \pm 508.4*	942.9 \pm 1015.6
Tested after 24 h at RT	426.9 \pm 477.8*	957.2 \pm 1024.8
Tested after 24 h at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	477.7 \pm 535.7	957.1 \pm 1032.6

Data are mean \pm SD

* $p < 0.01$ versus T0 (Wilcoxon test)

Nesrovnatelnost ELISA

- **Interpretace dat klinických studií závisí zcela na metodě a analytu**
- Minimum dat o RI
- RI 10-50 ng/l (výjimka Ito 2005)
- difference metod Kainos, Immunotopic, Milipore jsou enormní
- difference iFGF a cFGF

Kostní markery

Výhody

- Snadný odběr vzorku
- Relativně specifické pro kost
- Doplnková informace k BMD
- Změny rychleji než BMD
- Řada dostupných metod

Nevýhody

- Souhrnná aktivita
- Významná biologická variabilita
- Nemáme marker pro osteocyty
- Řada dostupných metod
 - Variabilita výsledků mezi výrobci