

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

# **DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Tomáš Matějka**

**2020**

Doktorský studijní program  
**Pediatric**

**Změny kostního a minerálního metabolismu a role  
vitaminu D u novorozenců s velmi a extrémně nízkou  
porodní hmotností.**

**Changes in Bone and Mineral Metabolism and the Role of  
Vitamin D in Very Low Birth Weight Infants.**

**MUDr. Tomáš Matějka**

Školitel: doc. MUDr. Sylva Skálová, Ph.D.  
Školitel konzultant: prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., dr.h.c.

## **Prohlášení autora**

---

### **Prohlášení:**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

**Hradec Králové, 2020**

**Tomáš Matějek, podpis:**

## Poděkování

Rád bych poděkoval všem, kteří se podíleli na vytvoření této práce. Především bych rád poděkoval své přítelkyni a kolegyni MUDr. Martině Navrátilové, za mnohaletou podporu a pomoc v průběhu postgraduálního studia i řešení disertační práce. Dále moje velké díky patří kolegům MUDr. Janu Malému, Ph.D., MUDr. Janě Zemánkové, Ph.D. a MUDr. Evě Tiché za vytvoření vhodných podmínek pro zdárný průběh a dokončení studie.

Velice vděčný jsem svému školiteli specialistovi prof. MUDr. Vladimírovi Paličkovi, CSc., dr.h.c. za finanční podporu, bez níž by tato práce vůbec nevznikla, dále za připomínky a nápady, které přispěly k celkovému nastavení studie.

Děkuji také primáři novorozeneckého úseku doc. MUDr. Zdeňkovi Kokštejnovi, CSc. za umožnění postgraduálního studia a za podporu v začátcích studie.

V neposlední řadě bych rád poděkoval přednostce Dětské kliniky a své současné školitelce doc. MUDr. Sylvě Skálové, Ph.D. za motivaci k dokončení postgraduálního studia a přečtení pracovní verze disertační práce.

Práce by nemohla vzniknout ani bez kolektivu lékařů a sestřiček novorozeneckého úseku Dětské kliniky, kteří se podíleli na péči o naše malé pacienty. Jmenovitě rád bych poděkoval staničním sestřím Evě Jarkovské, Aleně Umlaufové a Lence Caletkové za pomoc při logistice s pravidelnými odběry krve a moče.

Veliký dík též patří sestřičkám (zejména Martině Hudečkové) na Porodnicko-Gynekologické klinice za aktivní přístup při organizaci a získávání biologického materiálu z pupečního provazce a od matek. Za cenné rady a podporu děkuji i prof. MUDr. Mariánu Kacerovskému, Ph.D.

Důležitou součástí studie byl i kolektiv pracovníků Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, kteří se podíleli na zpracování velkého množství biochemických analýz a denzitometrických vyšetření provedených v rámci této studie, čehož si velice cením. Zejména bych chtěl poděkovat Ing. Lence Žaloudkové a PharmDr. Janě Malákové, Ph.D. Dále jsem vděčný Věře Holkové za provedení všech denzitometrií.

Největší dík však patří mým nejbližším, zejména synům Lukášovi a Hugovi, že mě mají rádi takového, jaký jsem. Dále mým rodičům Evě a Ivovi Matějkovým, za mnohaletou podporu a důležité rady, kterým jsem ne vždy naslouchal tak dobře, jak jsem měl.

## Obsah

1	Seznam použitých zkratek.....	5
2	Souhrn .....	8
2	Summary .....	10
3	Úvod do problematiky.....	12
3.1	Vývoj a regulace vývoje fetálního skeletu .....	12
3.2	Role kalcitotropních hormonů při vývoji kosti u plodu a novorozence .....	15
3.2.1	Role parathormon-related peptidu ( PTHrP).....	16
3.2.2	Role parathormonu .....	16
3.2.3	Role kalcitoninu .....	18
3.2.4	Role vitamínu D .....	18
3.3	Kalcium-fosfátový metabolismus u novorozence .....	18
3.3.1	Regulace kalcium fosfátové homeostázy .....	19
3.3.2	Role FGF23/Klotho v regulaci fosfátové homeostázy u fétu/novorozence .....	20
3.3.3	Sérové minerály a kalcitotropní hormony u novorozence.....	21
3.3.4	Vstřebávání Ca a P ze střeva u novorozence.....	21
3.3.5	Ledviny u novorozence .....	22
3.4	Metabolické kostní onemocnění nezralých novorozenců.....	22
3.4.1	Terminologie kostní patologie .....	23
3.4.2	Vliv předčasného porodu na kostní metabolismus.....	25
3.4.3	Rizikové faktory MBD .....	28
3.4.4	Diagnostika MBD .....	30
3.4.4.1	Zobrazovací vyšetření .....	31
3.4.4.2	Biochemické markery kostního metabolismu.....	32
3.4.5	Léčba metabolického kostního onemocnění nezralých novorozenců .....	37
3.4.5.1	Parenterální výživa.....	37
3.4.5.2	Enterální výživa .....	38

3.5	Vitamin D .....	39
3.5.1	Metabolismus vitamínu D .....	39
3.5.2	Vitamin D a imunitní systém .....	41
3.5.2.1	Vitamin D a vrozený imunitní systém .....	42
3.5.2.2	Vitamin D a získaný imunitní systém .....	44
3.5.3	Hodnocení zásob vitamínu D .....	46
3.5.3.1	C3 epimery vitamínu D .....	47
3.5.4	Sérové hodnoty vitamínu D u těhotných žen a novorozenců a jejich souvislost s morbiditou .....	48
4	Cíle disertační práce .....	50
5	Metody a soubor nemocných .....	51
5.1	Parathormon - referenční meze u novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti a souvislost s dalšími ukazateli kostního metabolismu – pilotní studie .....	51
5.1.1	Soubor pacientů .....	51
5.1.2.	Protokol studie .....	51
5.1.3.	Statistické hodnocení .....	53
5.1.4.	Cíle pilotní studie .....	53
5.2	Prospektivní observační kohortová studie .....	53
5.2.1.	Cíle prospektivní observační studie .....	53
5.2.2.	Soubor pacientů .....	54
5.2.2.1.	Stav vitamínu D u matek a jejich novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností při narození (pupečnicková krev) a při propuštění z nemocnice při současném obecně doporučovaném dávkování vitamínu D .....	54
5.2.2.2.	Laboratorní parametry kostního metabolismu a sledované charakteristiky časné morbidity ve skupině novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti. Vitamin D jako rizikový faktor pro syndrom dechové tísně u předčasně narozených dětí .....	54
5.2.3.	Protokol studie .....	54
5.2.4.	Sledované laboratorní a klinické charakteristiky .....	56

5.2.5.	Statistické hodnocení.....	57
6	Výsledky.....	57
6.1	Parathormon - referenční meze u novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti a souvislost s dalšími ukazateli kostního metabolismu – pilotní studie.....	57
6.1.1.	Parathormon .....	59
6.1.2.	Vztah mezi parathormonem a ostatními markery kostního metabolismu.....	61
6.2	Výsledky prospektivní observační kohortové studie.....	63
6.2.1.	Stav vitamínu D u matek a jejich novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností při narození (pupečnicková krev) a při propuštění z nemocnice při současném obecně doporučeném dávkování vitamínu D. ....	63
6.2.2.	Laboratorní parametry kostního metabolismu a sledované charakteristiky časné morbidity ve skupině novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti. Vitamin D jako rizikový faktor pro syndrom dechové tísně u předčasně narozených dětí. ....	69
7	Diskuse .....	76
7.1.	Parathormon - referenční meze u novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti a souvislost s dalšími ukazateli kostního metabolismu – pilotní studie.....	76
7.2	Diskuze - Prospektivní observační kohortové studie .....	78
7.2.1.	Stav vitamínu D u matek a jejich novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností při narození (pupečnicková krev) a při propuštění z nemocnice při současném obecně doporučeném dávkování vitamínu D. ....	78
7.2.2.	Laboratorní parametry kostního metabolismu a sledované charakteristiky časné morbidity ve skupině novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti. Vitamin D jako rizikový faktor pro syndrom dechové tísně u předčasně narozených dětí. ....	80
8	Závěry.....	84
8.1.	Parathormon - referenční meze u novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti a souvislost s dalšími ukazateli kostního metabolismu – pilotní studie.....	84
8.2.	Prospektivní observační kohortové studie .....	85
8.2.1.	Stav vitamínu D u matek a jejich novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností při narození (pupečnicková krev) a při propuštění z nemocnice při současném obecně doporučeném dávkování vitamínu D. ....	85

8.2.2.	Laboratorní parametry kostního metabolismu a sledované charakteristiky časně morbidity ve skupině novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti. Vitamin D jako rizikový faktor pro syndrom dechové tísně u předčasně narozených dětí. ....	85
9	Seznam použité literatury .....	87



## 1 Seznam použitých zkratek

<b>1,25(OH)<sub>2</sub>D</b>	1,25-dihydroxy vitamin D (kalcitriol)
<b>25(OH)D</b>	25-hydroxy vitamin D (kalcidiol)
<b>AAP</b>	Americká akademie pro pediatrii
<b>ALP</b>	alkalická fosfatáza
<b>APC</b>	buňky prezentující antigen
<b>BA</b>	plocha kosti (bone area, cm <sup>2</sup> )
<b>BMC</b>	obsah minerálu v kosti (bone mineral content, g)
<b>BMD</b>	kostní minerální denzita (bone mineral density, g/cm <sup>2</sup> )
<b>BPD</b>	bronchopulmonální dysplázie
<b>PTH</b>	parathormon
<b>Ca</b>	kalcium
<b>CaSR</b>	„calcium-sensing“ receptor
<b>C3-epi-25(OH)D</b>	C3 epimer 25-hydroxyvitaminu D
<b>CYP27B1</b>	1- $\alpha$ -hydroxyláza vitaminu D
<b>CYP24A1</b>	24-hydroxyláza vitaminu D
<b>DBP</b>	vitamin D vázající protein (vitamin D binding protein)
<b>DXA</b>	dvoufotonová rentgenová absorpční fotometrie, denzitometrie
<b>EIA</b>	enzymatická imunoesej
<b>ELBW</b>	novorozenci extrémně nízké porodní hmotnosti, pod 1000g (extremely low birth weight infants)
<b>ESPGHAN</b>	Evropská asociace pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu
<b>FGF23</b>	fibroblastový růstový faktor 23
<b>FGFR</b>	receptor pro fibroblastový růstový faktor 23
<b>GFR</b>	glomerulární filtrace
<b>GT</b>	gestační týden
<b>IQR</b>	mezikvartilové rozmezí
<b>IL</b>	interleukin

<b>IMV</b>	umělá plicní ventilace
<b>INF</b>	interferon
<b>LBW</b>	novorozenci nízké porodní hmotnosti, pod 2500g (low birth weight infants)
<b>LC – MS / MS</b>	tandemová hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií
<b>MBD</b>	metabolické kostní onemocnění (metabolic bone disease)
<b>nCPAP</b>	nasální kontinuální přetlaková dechová podpora
<b>NEC</b>	nekrotizující enterokolitida
<b>NaPi2a a NaPi2c</b>	ko-transportéry fosforečnanu sodného
<b>P</b>	fosfor
<b>PAMPs</b>	patogen associated molecular patterns; molekulární vzorce spojené s patogenem
<b>PBM</b>	vrchol tvorby kostní hmoty (peak bone mass)
<b>PDA</b>	patent ductus arteriosus
<b>PINP</b>	procollagen type I N-terminal propeptide
<b>PN</b>	parenterální nutrice (výživa)
<b>PRRs</b>	patterns recognition receptors; receptory rozpoznávající vzorce
<b>PTHrP</b>	parathormon - related peptid
<b>PVL</b>	periventrikulární leukomalacie
<b>RDS</b>	syndrom dechové tísně
<b>RIA</b>	radio imunoesej
<b>ROP</b>	retinopatie nedonošených novorozenců
<b>RSV</b>	respirační syncytiální vir
<b>SIP</b>	spontánní střevní perforace
<b>S-Ca</b>	sérová hodnota kalcia
<b>S-P</b>	sérová hodnota fosforu
<b>TLRs</b>	Toll-like receptors
<b>TNF</b>	tumor necrosis factor
<b>Tregs</b>	regulační T lymfocyty

<b>TRP</b>	tubulární reabsorpce fosfátů
<b>Vdr</b>	receptor vitamínu D
<b>VLBW</b>	novorozenci velmi nízké porodní hmotnosti, pod 1500g (very low birth weight infants)
<b>U-Ca</b>	koncentrace kalcia v moči
<b>U-P</b>	koncentrace fosforu v moči

## 2 Souhrn

### CÍL STUDIE

Disertační práce má několik stanovených cílů. Za prvé odhadnout fyziologické hladiny parathormonu u novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti a posoudit jeho vztah k ostatním parametrům kostního metabolismu. Za druhé zhodnotit stav zásobení vitamínem D u matek a jejich novorozenců s velmi nízkou a extrémně nízkou porodní hmotností při narození (pupečnicková krev) a při propuštění z nemocnice. Za třetí porovnat laboratorní parametry kostního metabolismu (včetně kostní denzitometrie) a sledované charakteristiky časné nemoci ve skupině novorozenců velmi nízké a extrémně nízké porodní hmotnosti s hladinami 25(OH)D v pupečnickové krvi  $\leq 25$  nmol/l a  $> 25$  nmol/l. A za čtvrté posoudit, zda je deficit vitamínu D v pupečnickové krvi rizikovým faktorem pro rozvoj syndromu dechové tísně novorozence.

### METODIKA

Jedná se o soubor prospektivních observačních studií zahrnující nezralé novorozence s porodní hmotností pod 1500 g. V roce 2014 byla nejprve vypracována pilotní studie zahrnující celkem 20 nezralých, ale jinak zdravých novorozenců. V letech 2015-2016 následovaly observační kohortové studie, ve kterých podle sledovaných cílů splnilo indikační kritéria 94 (stav vitamínu D), respektive 81 dětí (vliv vitamínu D na morbiditu) z celkového počtu 183 narozených nezralých novorozenců. Parametry minerálového a kostního metabolismu byly analyzovány z pupečnickové krve, séra a moče novorozenců v průběhu hospitalizace (parathormon, 25-hydroxy vitamin D, S-Ca, S-P, ALP, U-Ca, U-P) a ze séra těhotných žen těsně před porodem (25-hydroxy vitamin D). Kostní mineralizace byla hodnocena před propuštěním z nemocnice pomocí kostní denzitometrie.

### VÝSLEDKY

Fyziologické rozmezí hladin PTH u předčasně narozených novorozenců bylo odhadnuto jako 1.6 – 9.3 pmol/l. Nebyla pozorována žádná statisticky významná korelace hladiny PTH s hodnotou S-Ca, S-P nebo ALP, s výjimkou 56. dne života ( $p = 0.03$ ;  $Rho = 0.76$ ;  $n = 8$ ). Od druhého měsíce života byla prokázána statisticky významná korelace mezi PTH a 25(OH)D ( $Rho = -0.71$ ,  $p = <0.0001$ ). 75 % nezralých novorozenců při narození a 30 % dětí při propuštění z nemocnice mělo deficienci vitamínu D ( $< 50$  nmol/l). V prospektivní kohortové studii z let 2015-2016 byl v pupečnickové krvi medián (IQR) hodnot 25(OH)D 21 (14-36) nmol / l, při propuštění novorozenců z nemocnice byl medián (IQR) 25(OH)D 46 (37-

60) nmol / L. Hladina 25(OH)D byla < 50 nmol / l u 71.3 % matek, v 91.5 % vzorků pupečnickové krve a téměř u 60 % předčasně narozených novorozenců při propuštění z nemocnice (tj. po 8 týdnech suplementace vitamínem D). Parametry minerálového a kostního metabolismu včetně kostní denzitometrie a výskyt sledované morbidity byly u novorozenců v obou skupinách [skupina A (n = 31): 25(OH)D ≤ 25 nmol / l a skupina B (n = 38): 25(OH)D > 25 nmol / l] srovnatelné (statisticky nesignifikantní rozdíl). Pouze u novorozenců ve skupině s 25(OH)D ≤ 25 nmol / l byl nalezen nižší obsah vápníku v moči ve věku 28 dnů (p = 0.0272). Dále bylo zjištěno, že nízká hladina vitamínu D z pupečnickové krve nevede k vyššímu nebo nižšímu riziku RDS (odds ratio 1.044; 95% confidence interval 0.349-0.88; p = 0.0771).

## ZÁVĚR

Fyziologické rozmezí pro sérové hladiny PTH u nedonošených novorozenců jsou velmi blízké referenčním limitům pro dospělé (1 – 7 pmol/l). Hladina PTH nad tímto rozmezím může být považována za hyperparatyreózu i u předčasně narozených novorozenců. Vzhledem k velmi vysoké prevalenci deficiencie vitamínu D u matek nebyla v našem souboru novorozenců s porodní hmotností pod 1500 g aktuálně doporučená dávka vitamínu D (800 IU denně) pro nezralé novorozence schopna zvýšit hladiny vitamínu D nad 50 nmol / l před propuštěním z nemocnice. Porovnáním skupin nezralých novorozenců s hladinou vitamínu D ≤ a > 25 nmol/l jsme neprokázali žádný benefit plynoucí z pupečnickové hladiny vitamínu D > 25 nmol/l.

## 2 Summary

### PURPOSE

Firstly, the aim of dissertation work was to estimate physiological parathyroid hormone (PTH) levels and their relationship with bone metabolism parameters in otherwise healthy preterm newborns with birth weight 1000-1500 g. Secondly, to evaluate vitamin D status in mothers and their very low birth weight infants (VLBW) at birth (umbilical cord blood) and at discharge with currently recommended supplementation of vitamin D. Thirdly, to compare clinical outcomes of VLBW infants with 25-hydroxy vitamin D [25(OH)D] levels  $\leq$  and  $>$  25 nmol/l in umbilical cord blood and finally to evaluate umbilical cord vitamin D as a risk factor for respiratory distress syndrome in preterm infants.

### METHODS

It is a set of prospective observational studies involving immature newborns with birth weight below 1500 g. In 2014, a pilot study was first developed. PTH, 25(OH)D, S-Ca, S-P and ALP were analysed from blood samples obtained from 20 preterm infants once a week up to the 36th gestational week. In 2015-2016, an observational cohort study followed. From a total of 183 immature newborns, 94 (vitamin D status) and respectively 81 children (effect of vitamin D on morbidity) met inclusion criteria for the study according to follow up goals. The parameters of mineral and bone metabolism were analysed in umbilical cord blood and newborn serum and urine during hospitalisation (PTH, 25-hydroxy vitamin D, S-Ca, S-P, ALP, U-Ca, U-P) and in pregnant women before delivery (25-hydroxy vitamin D). Bone mineralization was evaluated by bone densitometry.

### RESULTS

In a pilot study, from the total 134 examined serum samples for PTH levels the estimated reference range was 1.6 – 9.3 pmol/l. No statistically significant correlation of PTH level with that of S-Ca, S-P or ALP was observed, except for the 56th day of life ( $p = 0.03$ ;  $Rho = 0.76$ ;  $n = 8$ ). From the second month of life there was a statistically significant relationship only between PTH and 25(OH)D ( $Rho = -0.71$ ,  $p = <0.0001$ ). In our cohort vitamin D deficiency (50 nmol/l) occurred in 75 % at birth and at 30 % in the 36th gestational week. In prospective cohort study median (IQR) serum 25(OH)D was 21 (14-36) nmol/L in cord blood, and 46 (37-60) nmol/L at discharge. Serum 25(OH)D was  $<$  50 nmol/L in 71.3 % of mothers, in 91.5 % of cord blood samples, and in almost 60 % of preterm newborns at discharge (after 8 weeks of supplementation). The laboratory findings and the subsequent

clinical outcomes including bone densitometry were comparable (non-significant difference) in infants in both groups [Group A: 25(OH)D  $\leq$  25 nmol/l and Group B: 25(OH)D  $>$  25 nmol/l]. Only the infants in the 25(OH)D  $<$  25 nmol/L group had lower urine calcium level at age of 28 days ( $p = 0.0272$ ). In addition, we found in this study that umbilical cord vitamin D level does not lead to higher or lower risk of RDS (odds ratio 1.044; 95% confidence interval 0.349-0.88;  $p = 0.0771$ ).

## CONCLUSION

The physiological range indicated by the measurements was close to the reference limits for adults (1.6 – 9.3 pmol/l). PTH level above this range can be considered as hyperparathyreosis in preterm neonates. In our prospective cohort study we found out that due to very high prevalence of 25(OH)D deficiency among mothers, the current, generally recommended dose of vitamin D (800 IU per day) for VLBW infants was unable to improve vitamin D levels above the desired 50 nmol/L before discharge. We compared groups of preterm newborns with vitamin D  $\leq$  and  $>$  25 nmol / l and we didn't found any benefit from umbilical cord vitamin D level  $>$  25 nmol / l.

### 3 Úvod do problematiky

V těle donošeného novorozence je přibližně 28g vápníku, z toho 99 % je uloženo v kostech (8g / kg hmotnosti), kde plní strukturální a metabolické funkce. Zbylé 1 % kalcia je součástí tělních tekutin a podílí se na mnoha fyziologických procesech (svalové kontrakce, membránový transport, vedení nervového vzruchu, enzymatické reakce či koagulace). Sérový vápník existuje ve třech formách: v 50 % jako ionizovaný (iCa), ve 40 % navázaný na albumin a v 10 % jako komplex s anionty. V pupečnickové krvi donošeného novorozence se pohybuje hodnota celkového kalcia kolem 2.55 mmol/l a ionizovaného kolem 1.45 mmol/l. U nedonošených novorozenců se pak hodnota iCa v pupečnickové krvi pohybuje v rozmezí 1.43-1.47 mmol/l (1).

#### 3.1 Vývoj a regulace vývoje fetálního skeletu

Obratlovci mají jedinečnou schopnost vytvářet během svého embryonálního vývoje skelet, který neplní pouze podpůrnou a protektivní funkci, ale také reguluje několik homeostatických pochodů u dospělých jedinců. Vývoj skeletu je jeden z klíčových procesů nitroděložního i postnatálního růstu, přičemž těžké vrozené vady skeletu jsou neslučitelné s dlouhodobým přežitím. Kosterní systém je tvořen chrupavčitou a kostní tkání, jejichž původ je mezodermální. Přesné umístění budoucí kosti, respektive chrupavky je v časném embryonálním vývoji pod kontrolou několika důležitých signálních cest (Wnts, Hedgehogs, Bmps – bone morphogenic proteins, Fgfs – fibroblast growth factors a Notch/Delta) (2). Mezi 5. - 8. gestačním týdnem dochází v těchto určených anatomických lokacích k zahušťování mezenchymu. Pro kost jakožto mineralizovaný orgán je osifikace nejdůležitější proces při jejím vývoji a je řízen dvěma hlavními mechanismy – desmogenní (endesmální) a chondrogenní (enchondrální) osifikace. Uvnitř kondenzovaného mezenchymu se z osteochondrálních progenitorových buněk diferencují buď osteoblasty, které vytvářejí endesmální osifikací desmogenní kost (lebka, mandibula) nebo chondrocyty, které iniciují tvorbu chrupavčitého základu kosti pro budoucí chondrogenní osifikaci kosti (dlouhé kosti, páteř) (1-3). Kompletní chrupavčitý základ kosti je vytvořen na konci 8. týdne těhotenství. Mezi 8. – 12. týdnem gravidity vznikají primární osifikační centra v tělech obratlů a dlouhých

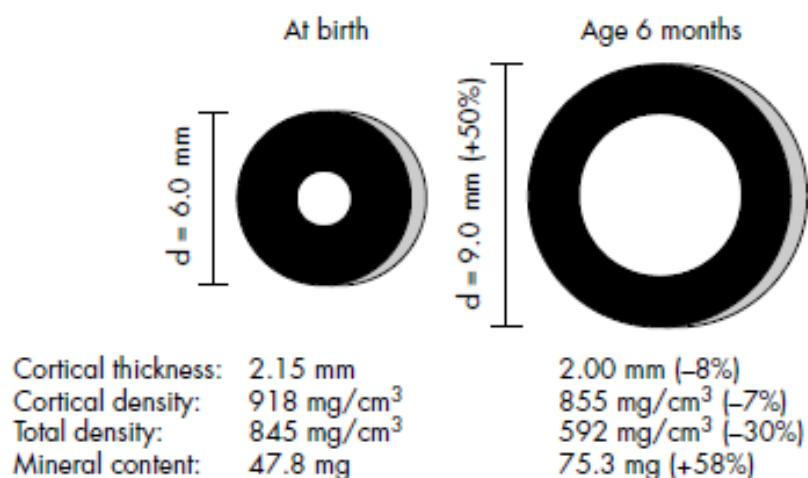


kostí. Jak dochází k prodlužování chrupavčitého základu kosti na obou koncích, tak nejstarší chondrocyty nejbližší středu hypertrofují a následně podléhají apoptóze. Současně dochází k prorůstání cév do chrupavčitého základu kosti a s nimi pronikají dovnitř i osteoblasty, pod jejichž vlivem dochází k diferenciaci progenitorových hemopoetických buněk v další důležitou kostní buňku – osteoklast. Osteoklasty resorbují tyto apoptotické chondrocyty včetně okolní matrix. Osteoblasty vytváří primární osteoid, který následně mineralizuje za vzniku primárních osifikačních center. Přibližně od poloviny druhého trimestru pokračuje kostní formace cestou chondrogenní a desmogenní osifikace. Při chondrogenní osifikaci osteoblasty vytvářejí z osteoidu primární trabekuly a růst kosti je zajištěn náhradou chrupavčitého základu (dlouhé kosti, páteř). Naproti tomu při desmogenní osifikaci osteoblasty vytváří osteoid a ten se následně mineralizuje bez chrupavčitého základu (lebka, mandibula) (1-3). V průběhu prvního trimestru dochází též k ventrální a dorsální kondenzaci somatického mezodermu, jejímž výsledkem je základ kosterního svalstva. V 16. gestačním týdnu je plně založen základ kostí a svalů, včetně jejich funkčního spojení. Od 34. týdne gestace vzniká sekundární osifikační centrum v hlavici femuru a současně procesem růstu, proliferace a diferenciaci se chrupavka na konci dlouhých kostí organizuje do růstových štěrbin (1).

Regulaci vzniku a vývoje skeletu lze nejlépe vysvětlit pomocí funkčního modelu kostního vývoje autorů Rauch a Schoenau odvozeného od Frostovy teorie mechanostatického senzoru (4-6). Tento model rozlišuje dvě fáze kostního vývoje. V první fázi, na podkladě informací z genomu, vzniká chrupavčitý základ skeletu. Jak již bylo uvedeno, celý proces je řízen morphogeny, což jsou signální molekuly, které ovlivňují v přesně vymezeném místě cílové buňky (2). Druhá fáze začíná mineralizací tohoto chrupavčitého základu. Prostorové informace, tj. kde má být mineralizace posílena nebo naopak kost odbourána, poskytuje mechanické zatížení kosti. Deformace kosti generuje pohyb tekutiny v kanalikulech, na což jsou citlivé osteocyty. V případě překročení akceptovatelné deformace osteocyty vyšlou signál, který by měl vést ke zvýšení kostní síly (změny kostní hmoty a architektury) a mechanické napětí se tak vrátí na akceptovatelnou úroveň. Během růstu je kostní stabilita trvale ohrožována dvěma procesy: prodloužení kosti a zvýšení svalové síly při kontrakci. Tyto změny vytvářejí potřebu pro adaptační změny v kostní hmotě a architektuře. Lze tedy tvrdit, že postembryonální vývoj skeletu je určován funkčními požadavky, což znamená, že kostní síla roste pouze v případě zvyšujících se nároků na udržení kostní stability (1, 4-6). Hypotéza mechanostatem kontrolovaného vývoje fetálního skeletu je ve shodě s klinickým a

experimentálním pozorováním. Omezení fetálních pohybů vede ke snížení kostní síly u plodu a novorozence. Děti s kongenitálním neuromuskulárním onemocněním mají méně kostní hmoty a sníženou tloušťku kompaktní kosti. V experimentálním modelu byly krysí plody paralyzovány v průběhu třetího trimestru. Výsledkem bylo snížené množství kompaktní kosti při narození (1, 4). Během intrauterinního života je fétus vystaven vysoké hladině placentárních estrogenů. Předpokládanou úlohou estrogenů v mechanostatickém systému je snižování hranice akceptovatelné deformace na endostálním povrchu kosti, což má za následek nárůst endostální kompaktní kosti a současně malou dřevnou dutinu. Po narození, když odezní vliv mateřských estrogenů a dalších hormonů, dojde ke změně nastavení mechanostatu a ten vyhodnocuje větší množství kosti blízko dřevné dutiny jako mechanicky nevýhodné. Výsledkem je resorpce této kosti a zvětšení dřevné dutiny, což je v souladu s klinickými pozorováními a v denzitometrické terminologii se označuje jako pokles volumetrické kostní minerální denzity. U donošených novorozenců dochází do 6 měsíců věku ke zvětšení průměru kosti o 50 %, současně klesá kostní minerální denzita o 30 %, přestože obsah minerálů stoupne o 58 %. Tloušťka kompaktní kosti se změní jen minimálně (schéma 1) (7). Ve stejném čase kost rychle roste i do délky, což má destabilizační efekt a kost je nucena k novotvorbě na periostálním okraji. V prvních měsících života tedy dochází k redistribuci kostní tkáně z endostálního okraje k periostálnímu s menšími nároky na množství kalcia, které má být vstřebáno z nutričních zdrojů (4, 7).

**Schéma 1 Normální změny kosti při postnatálním růstu u donošeného novorozence** (převzato z Rauch a kol. 2001) (7)



Předčasným porodem dochází k ukončení vlivu estrogenů mnohem dříve než u donošených novorozenců. Výsledkem je časnější start postnatálních změn v kostech nezralých novorozenců. Současně je nutné mít na mysli, že tito velmi a extrémně nezralí novorozenci ztratili možnost velmi výhodné fetální akrece minerálu při mechanostatem řízeném nitroděložním nárůstu kostní síly a délky. Dochází tedy ke kostním změnám zcela odlišným od vývoje kostí donošeného novorozence. Mechanické zatížení kosti je podstatně nižší, jednak při nižším svalovém tonu nezralého novorozence a při mnohem snazších pohybech v extrauterinním světě. Jelikož systém mechanostatu není předčasným porodem narušen, v termínu porodu mají původně nedonošení novorozenci oproti donošeným kratší kosti s větší dřevnou dutinou a nižší kostní densitou. Tyto změny v literatuře označované jako „osteopenie při nezralosti“ jsou pouze vyjádřením fyziologické postnatální adaptace (4).

### **3.2 Role kalcotropních hormonů při vývoji kosti u plodu a novorozence**

Chrupavčitý základ kosti vzniklý během embryonálního období je v průběhu dalšího vývoje resorbován a nahrazován kostí. Tato enchondrální osifikace pokračuje až do uzávěru růstových štěrbin v pubertě. Růst a mineralizace skeletu jsou závislé na adekvátní dodávce minerálů. Ve třetím trimestru gravidity dochází k přesunu 80 % vápníku a fosforu určených k mineralizaci fetálního skeletu (1). Během nitroděložního vývoje plodu zajišťuje adekvátní dodávku kalcia (Ca), fosforu (P) a magnézia (Mg) placenta a to aktivním transportem. Postnatálně jsou novorozenci zcela závislí na absorpci minerálů ze střeva. Sérová hodnota Ca, P u fétu signifikantně převyšuje normy pro dospělé jedince i hodnoty u matky (8). Tento stav „fetální hyperkalcémie“ je udržován i v situacích vedoucích k nedostatku Ca v těle matky (těžká deficiencie vitamínu D, hypoparathyreóza). Tyto vysoké sérové koncentrace vápníku jsou potřebné k facilitaci mineralizace skeletu. Při poklesu sérového kalcia na nebo pod mateřské hodnoty dochází k signifikantní redukci kostního minerálového obsahu (BMC) (8).

V průběhu fetálního a neonatálního vývoje hrají při vývoji a mineralizaci skeletu kalcotropní hormony odlišnou úlohu (3). Pro fétu savců, včetně lidského je typická nízká sérová hladina parathormonu, kalcitriolu, fibroblastového růstového faktoru 23 a vysoké hladiny parathormon-related peptidu a kalcitoninu. Na rozdíl od kalcitriolu, kalcidiol přechází volně přes placentu a v termínu porodu dosahuje přibližně 75-100 % koncentrace mateřských hodnot (3). Velmi nízká koncentrace kalcitriolu je způsobena zpětnovazebným

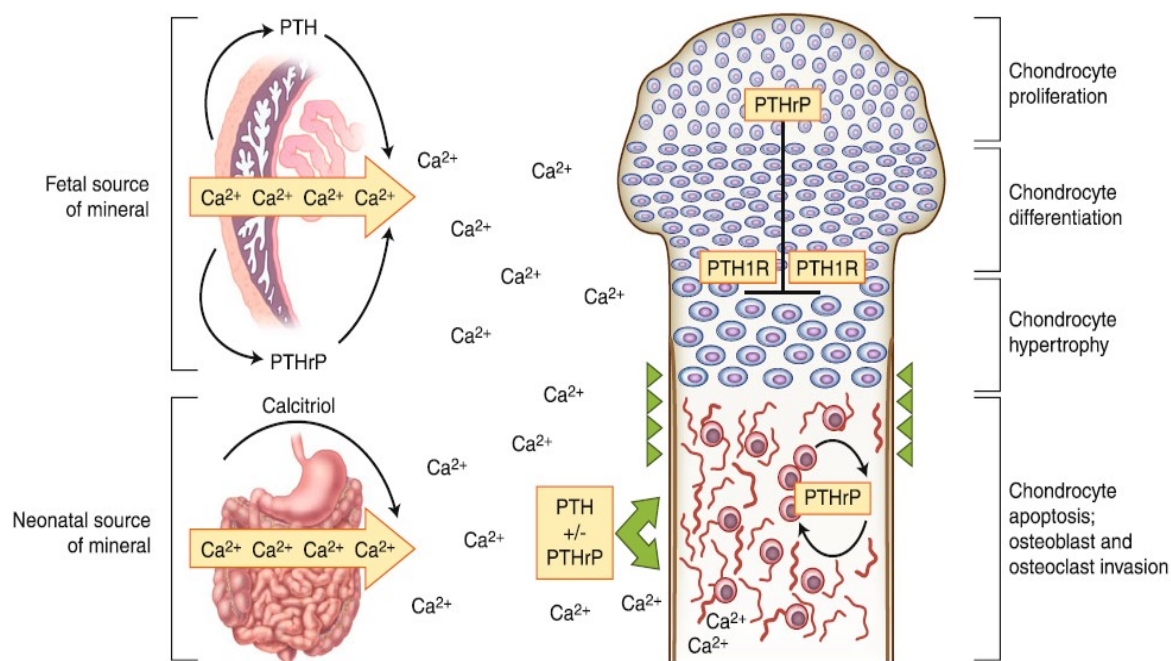
útlumem aktivity 1- alfa-hydroxylázy v ledvinách fétu z důvodu hyperkalcémie, hyperfosfatémie a nízké hladiny PTH (3).

### **3.2.1 Role parathormon-related peptidu (PTHrP)**

Většina znalostí stran významu PTHrP pro vývoj fetálního skeletu vychází z animálních studií. PTHrP hraje klíčovou roli ve stimulaci placentárního přesunu kalcia a následně v udržování zvýšení sérové hodnoty Ca u fétu (8). Chybění PTHrP (tzv. PTHrP null fetus) vede u plodu k poklesu sérové hladiny vápníku na úroveň mateřskou. Hladina PTH ve snaze kompenzovat pokles kalcémie stoupá trojnásobně. U PTHrP null fétů se dále rozvíjí hyperfosfatémie, z čehož lze usuzovat, že PTHrP brání nadměrné elevaci fosfatémie (8, 9). Hlavním zdrojem PTHrP je placenta, dále je též produkován perichondrálními buňkami a proliferujícími chondrocyty, zatímco receptor je exprimován na pre-hypertrofických chondrocytech a osteoblastech. Hlavní úlohou PTHrP v chrupavčitém základu kosti je opožďovat terminální diferenciaci pre-hypertrofických chondrocytů a stimulovat kostní formaci cestou osteoblastů (schéma 2) (8). V případě chybění PTHrP (PTHrP null fetus) startuje kostní formace dříve a výsledkem je chondrodysplázie s krátkými končetinami (8).

### **3.2.2 Role parathormonu**

Parathormon je syntetizován v příštítných tělískách plodu a během celého těhotenství je fetální sérová hladina velmi nízká. Přesto bylo na animálních modelech prokázáno, že jeho ztráta vede k těžké fetální hypokalcémii (i pod hodnoty mateřské kalcémie), hyperfosfatémii a hypomagnezémii. Sérové hodnoty PTHrP nereagují na tyto minerálové změny způsobené deficiencí PTH. PTH se také podílí na transportu vápníku a dalších minerálů v placentě, nicméně jeho efekt je podstatně slabší než u PTHrP. PTH reguluje mineralizaci fetálního skeletu i nepřímo a to udržováním stabilní kalcémie, fosfatémie a magnezémie (8).



**Schéma 2 Role PTH, PTHrP a kalcitriolu během fetálního a novorozeneckého období**

*Během fetálního vývoje je placenta hlavním zdrojem minerálů. PTHrP a PTH jsou produkovány v placentě za účelem stimulace transportu vápníku do plodu. PTHrP a PTH spolupracují na udržení vysoké hladiny vápníku a fosforu v krvi, které jsou potřebné pro mineralizaci fetálního skeletu. Střevní absorpce vápníku není pro plod relevantní, ale stává se hlavním zdrojem minerálů pro novorozence. Po narození se vápník vstřebává pasivně, ale proces se brzy stává aktivním, kalcitriol dependentním. Ve fetální skeletu je PTHrP produkován proliferujícími chondrocyty a perichondrálními buňkami (šipky), kde zpožďuje terminální diferenciaci pre-hypertrofických chondrocytů. PTHrP je také produkován v pre-osteoblastech a osteoblastech, kde stimuluje tvorbu kosti (půlkruhové šipky). Zdá se, že kalcitriol není nutný pro regulaci hladiny vápníku v krvi, tvorby endochondrální kosti nebo mineralizace skeletu u plodu (3).*

### **3.2.3 Role kalcitoninu**

Pro fetální kostní metabolismus se jeví kalcitonin jako nedůležitý. V animálních modelech bylo prokázáno, že v případě vypnutí genů pro kalcitonin mají plody zcela normální transport Ca přes placentu, sérové minerály a enchondrální kostní vývoj.

### **3.2.4 Role vitaminu D**

U vitamin D těžce deficitních krys,  $\alpha$ -1-hydroxyláza null prasat a Vdr null myši byla intrauterinně normální sérová hladina kalcia, fosforu a PTH a tak tomu bylo až do porodu. Tyto nálezy potvrzují i pozorování u dětí. Novorozenci s deficiencí 1- alfa-hydroxylázy (vitamin D dependentní křivice, typ I) nebo s chyběním receptoru pro vitamin D (vitamin D dependentní křivice, typ II) mají při porodu zcela normálně vyvinutý skelet. Několik klinických randomizovaných studií nenašlo souvislost mezi suplementací vitaminem D matkám v průběhu gravidity a hladinou S-Ca, S-P, antropometrickým měřením a radiologickými známkami rachitidy u novorozenců (3, 8). Javaid a spol. (10) nenašli asociaci mezi hladinou vitaminu D u gravidních žen a antropometrickým měřením novorozenců při narození a u dětí ve věku 9 měsíců. Nicméně ve stáří 9 let byla hodnota BMC nižší ve skupině dětí, jejichž matky měly při porodu hladinu 25(OH)D pod 27 nmol/l a to v porovnání s dětmi matek, které měly hladinu 25(OH)D nad 50 nmol/l. Tato data dávají prostor pro teorii, že expozice vitaminu D během fetálního vývoje programuje dosažení vrcholové kostní hmoty v dětství. Současné poznatky nasvědčují, že vitamin D, kalcitriol nebo jeho receptor nejsou potřeba k normální fetální kalciové homeostáze, vývoji a mineralizaci fetálního skeletu.

## **3.3 Kalcium-fosfátový metabolismus u novorozence**

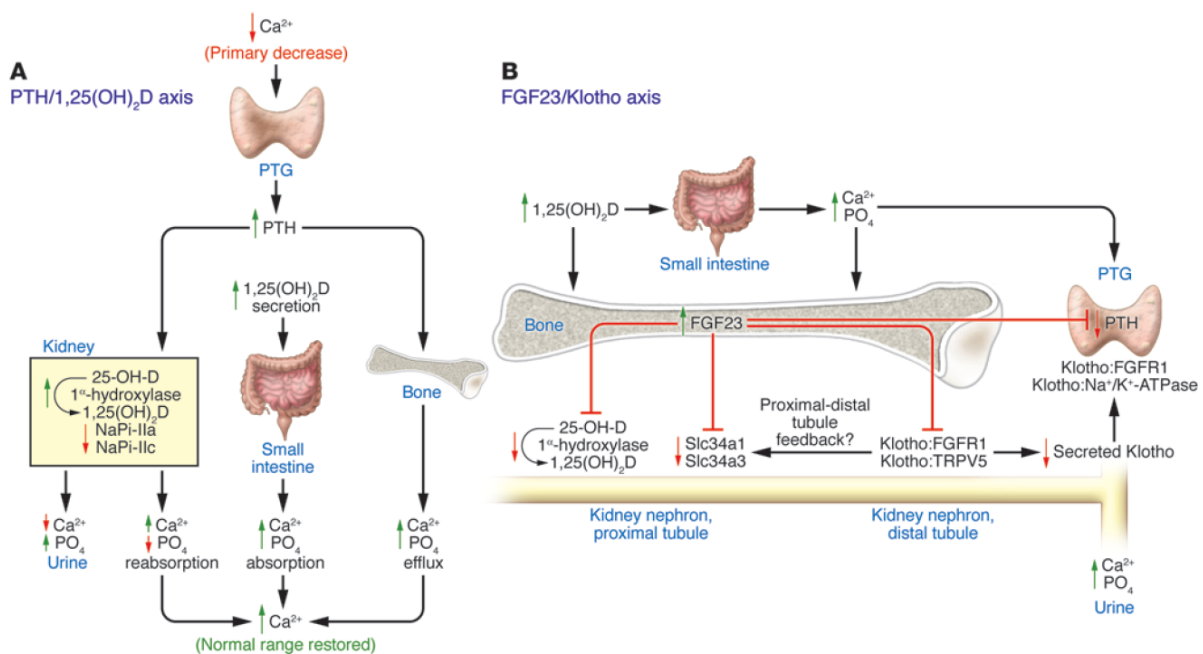
Po přerušení pupečního provazce a prvních nádeších dochází k rychlým změnám regulace metabolismu minerálů. Placentární výměna minerálů je náhle ztracena a dýchání vede ke vzestupu pH krve. Tyto změny vyvolávají pokles celkového i ionizovaného vápníku v séru. Střevo se stává hlavním zdrojem minerálů, ledviny začínají reabsorbovat minerály a kostní metabolismus se stává důležitým pro udržení stabilních hodnot minerálů v séru.

### 3.3.1 Regulace kalcium fosfátové homeostázy

Historicky bylo na kalcium fosfátovou homeostázu pohlíženo z perspektivy osy PTH-1,25(OH)<sub>2</sub>D. V reakci na hypokalcémii příštítná tělíska zvyšují produkci a sekreci PTH, který v distálních tubulech snižuje exkreci kalcia a v proximálních tubulech inhibuje reabsorpci fosfátu a v neposlední řadě PTH stimuluje produkci 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Kalcitriol zvyšuje aktivní vstřebávání vápníku a fosforu v tenkém střevě. PTH má také přímý vliv na kosti cestou PTH receptorů na osteoblastech, což vede ke zvýšenému vyplavování kalcia a fosforu z kostí. Přímý vliv PTH na kosti a ledviny, v součinnosti s kalcitriolem, vede k normalizaci sérového kalcia. Fosfaturický efekt PTH kompenzuje vitamínem D zprostředkované vstřebávání fosforu v gastrointestinálním traktu a PTH zprostředkované vyplavení P z kostí, čímž je zajištěna ochrana před hyperfosfatémií (schéma 3) (11).

Relativně nedávno byla identifikována nová hormonální kaskáda zahrnující FGF23 a Klotho, která reguluje především fosfatémií, homeostázu vitamínu D a mineralizaci kosti (11). FGF23 je 32 kDa protein s N-terminální oblastí, obsahující FGF-homologickou doménu. Členové podrodiny FGF působí jako hormony/systémové faktory kvůli jejich schopnosti interagovat s FGF receptorem (FGFR) v přítomnosti členů rodiny proteinů Klotho. FGF23 se váže na Klotho (KL), který kóduje membránový protein typu I podobný beta-glykosidáze, který je nezbytným kofaktorem pro vazbu FGF23 na FGFR. FGF23 je hormon dominantně produkovaný osteocyty a osteoblasty, který působí na vzdálené tkáně a reguluje dodávku fosforu do kostí. K jeho hlavnímu účinku dochází v ledvinách, kde FGF23 snižuje expresi ko-transportérů fosforečnanu sodného 2a a 2c (NaPi2a a NaPi2c) v proximálních tubulech, čímž zvyšuje vylučování fosforu do moči. Po vazbě FGF23 na komplex Klotho:FGFR1 také inhibuje renální expresi 1- $\alpha$ -hydroxylázy (Cyp27b1) a zvyšuje expresi 24-hydroxylázy (Cyp24a1), které společně snižují cirkulující koncentraci kalcitriolu (11-13). Ve střevech FGF23 redukuje reabsorpci fosforu nepřímo prostřednictvím jeho účinku na snížení hladiny kalcitriolu v séru a přímo inhibicí exprese NaPi2b (13). Výsledným efektem je snížení sérového fosforu. FGF23 také působí na příštítná tělíska a inhibuje PTH, což přispívá ke snížení kalcitriolu v séru. Vysoký sérový fosfor a kalcitriol jsou silné podněty pro syntézu a uvolňování FGF23, zatímco PTH stimuluje uvolňování FGF23 jen minimálně. Receptor pro

detekci hladiny fosforu je pravděpodobně exprimován osteoblasty a osteocyty (schéma 3) (11-13).



**Schéma 3 Regule kalcium fosfátové homeostázy**

(A) Osa PTH/1,25(OH)<sub>2</sub>D; (B) Osa FGF23/Klotho. Převzato z (11).

### 3.3.2 Role FGF23/Klotho v regulaci fosfátové homeostázy u fětu/novorozence

Na základě animálních studií je FGF23 přítomný ve fetální cirkulaci v hladinách kolísajících od nízkých po fyziologické pro dospělé. Absence Klotho nebo FGF23 nenarušuje metabolismus fetálního fosforu ani nadbytek FGF23 významně neovlivňuje metabolismus fetálního fosforu (12). Poruchy signalizace FGF23 začnou významně ovlivňovat homeostázu fosforu až po narození. Nedostatek FGF23 vede k hyperfosfatémii, extraskeletální kalcifikaci a k časnému úmrtí. Nadbytek FGF23 způsobuje hypofosfatémii (manifestace již 12 hodin po narození) vedoucí k následnému rozvoji křivice či osteomalacie. Zatímco ztráta Klotho nebo FGF23 se neprojeví dříve než 5 až 7 dnů po narození. Na základě animálních studií lze předpokládat, že děti s abnormalitami signalizace FGF23 budou při narození bez zjevných odchylek, poruchy metabolismu fosforu se začnou objevovat během dnů, týdnů nebo měsíců. Existuje velmi omezené množství studií zabývajících se FGF23 u novorozenců. Byly



nalezeny více než dvojnásobně zvýšené hladiny FGF23 oproti dospělým normám. Biologický význam zvýšené hladiny FGF23 u novorozenců je dosud nejasný (14, 15).

### **3.3.3 Sérové minerály a kalciotropní hormony u novorozence**

Sérum a ionizovaný vápník klesají o 20–30 % během prvních 12 až 24 hodin po narození. V jedné studii průměrný ionizovaný vápník klesl z 1.45 mmol / l v pupečnickové krvi na 1.20 mmol / l do 24 hodin po narození (16). Pokles vápníku může být větší po elektivním císařském řezu než u vaginálního porodu, což naznačuje, že vaginální porod je dalším spouštěčem změny regulace minerální homeostázy. Sérový vápník klesá více u novorozenců krmených umělým mlékem, protože na fosfor bohatší formule více zvyšují sérovou hladinu fosforu a tím dochází k většímu vychytávání kalcia z oběhu. Nezralost sama o sobě vede k dramatictějšímu poklesu kalcémie. Až 75 % nezralých novorozenců (zejména s porodní hmotností pod 1500g) je ohroženo hypokalcémií, která je ale obvykle asymptomatická. V reakci na pokles sérové kalcémie stoupá u donošených i nedonošených sérový PTH z původně velmi nízkých hladin v pupečnickové krvi. PTH stimuluje  $\alpha$ -1-hydroxylázu k tvorbě kalcitriolu, který také po narození stoupá. Bylo prokázáno, že u novorozenců narozených po 28. týdnu gestace je tato aktivace vitamínu D plně funkční během 24 hodin. Po dosažení minimální hladiny za 24–48 hodin S-Ca během několika dalších dnů stoupá na normální hodnoty pro dětský věk. Během prvních 24–48 hodin současně s poklesem koncentrací vápníku kompenzačně stoupá sérový fosfor, aby následně dosáhl normálních hodnot pro novorozence (1.8-2.6 mmol/l). Tyto změny koncentrací vápníku a fosforu odpovídají přechodnému, fyziologickému hypoparatyreoidismu u novorozence (8, 16-18).

### **3.3.4 Vstřebávání Ca a P ze střeva u novorozence**

Intestinální absorpce kalcia je u novorozenců (zejména těch nezralých) zajištěna pasivní difúzí v distální části tenkého střeva a je facilitována přítomností laktózy v mateřském mléce. V průběhu čtyř týdnů se v souvislosti s maturací střevní sliznice zvyšuje vstřebávání vitamínu D, zvyšuje se exprese receptorů pro kalcitriol a asociovaných Ca transportních proteinů (Calbindin D9K, D28K) a postupně se dominantním mechanismem pro absorpci vápníku ze střeva stává aktivní transport řízený kalcitrolem (3, 16, 17). Tato vývojově

programovaná maturace střeva novorozence vysvětluje, proč nezralí novorozenci zpočátku nereagují na kalcitriol, ale jsou přechodně závislí na pasivní absorpci kalcia.

### **3.3.5 Ledviny u novorozence**

Dalo by se očekávat, že prenatálně vysoká hladina vápníku a nízký PTH v krvi plodu povedou ke zvýšenému vylučování vápníku do moči při narození, nicméně není tomu tak. To je pravděpodobně způsobeno nízkým průtokem krve ledvinami a nízkou glomerulární filtrací a relativně nízkou expresí „vitamin D“ receptoru (Vdr) a „calcium-sensing“ receptoru (CaSR). Po prvním týdnu života se vylučování vápníku močí postupně zvyšuje i přes nižší sérovou hodnotu kalcia a vyšší PTH. K této změně přispívá zvýšení průtoku krve ledvinami, glomerulární filtrace (GFR) a exprese Vdr a CaSR. Vylučování fosforu je při narození také nízké a následně se zvyšuje. K nízkému vylučování fosforu přispívá několik výše uvedených faktorů: nízký PTH, nízký průtok krve ledvinami a GFR. Progresivní, vývojový vzestup fosfaturické odpovědi na PTH byl prokázán u donošených i předčasně narozených dětí. Nárůst kalcitriolu po porodu je způsoben „upregulací“ renální  $\alpha$ -1-hydroxylázy, stimulované vzestupem PTH (16).

## **3.4 Metabolické kostní onemocnění nezralých novorozenců**

V posledních letech je v souvislosti se zlepšováním péče o novorozence s velmi a extrémně nízkou porodní hmotností věnována zvýšená pozornost dlouhodobým následkům nezralosti. Mezi ně lze zařadit i případnou redukci definitivní tělesné výšky a nedosažení dostatečné vrcholové kostní hmoty s možným vlivem na vznik časně osteoporózy v dospělosti. Důvodem těchto problémů je významné snížení kostní minerální denzity (BMD) v prvních měsících života, v literatuře variabilně označované jako metabolické kostní onemocnění (MBD – *metabolic bone disease*), osteopenie, osteomalacie či rachitida při nezralosti. Optimální přístup s cílem prevence rozvoje MBD je stále zahalen řadou kontroverzí. Tato kapitola nabízí souhrnné aktuální informace o terminologii kostní patologie, incidenci, následcích, diagnostice a léčbě metabolického kostního onemocnění nezralých novorozenců.

### **3.4.1 Terminologie kostní patologie**

Fyziologický proces kostní mineralizace (tvorba hydroxyapatitu) probíhá ve dvou krocích: 1) skupina osteoblastů vytvoří depozita organické kostní matrix (osteoid) na povrchu již mineralizované kosti; 2) s odstupem několika dnů dochází k zabudování minerálů (vápník, fosfor a další) do tohoto nově syntetizovaného osteoidu (mineralizace). U nedonošených novorozenců je nutné počítat s možným narušením obou těchto pochodů, tj. jak s tvorbou organické kostní matrix, tak s poruchou vlastní mineralizace. Tím se dostáváme k nejčastějším patologickým stavům skeletu nezralých novorozenců - osteopenii a osteomalacii (6).

Osteomalacie je porucha fyziologického procesu mineralizace, tj. inkorporace minerálů do nově vytvořené kostní matrix (6). To vede k akumulaci nemineralizovaného osteoidu s „měknutím“ kosti, což se může u novorozence klinicky prezentovat jako dolichocefalické oploštění lebky. Na prostém rentgenovém snímku zápěstí často diagnostikujeme „vymytý“ vzhled kosti. Pokud porucha mineralizace postihuje i růstové chrupavky, pak mluvíme o rachitidě, pro kterou je typická neostrá/nepravidelná hranice mezi růstovou chrupavkou a metafýzou na rentgenové vyšetření zápěstí (obrázek č. 1). Po dobu otevřených růstových chrupavek se oba stavy (osteomalacie a rachitida) vyskytují současně. Etiologicky se na rozvoji osteomalacie/rachitidy podílí zejména nedostatečný přísun vápníku, fosforu potažmo vitamínu D (1, 6).



**Obrázek 1 Rentgenové vyšetření zápěstí**

*Typický obraz „vymyté kosti“ a neostrou/nepravidelnou hranici mezi růstovou chrupavkou a pohárkovitě deformovanou metafýzou (označeno šipkou) jako známky osteomalacie/rachitidy (19)*

Osteopenie je podle Raucha (6) snížené množství kostní tkáně, což na strukturální úrovni znamená sníženou tloušťku kompaktní kosti a sníženou tloušťku nebo počet trámců spongiózní kosti. Osteopenie je u nezralých novorozenců způsobena nedostatečnou depozicí či zvýšenou resorpcí osteoidu, přičemž na rozdíl od osteomalacie je mineralizace zbylého osteoidu normální. Důvodem osteopenie mohou být závažná systémová onemocnění, vedlejší efekt léků či nedostatek mechanické stimulace (1, 6).

Na základě definice osteomalacie a osteopenie je zřejmé, že v etiologii kostního onemocnění nedonošených novorozenců se ve většině případů uplatňují oba tyto patologické procesy, které nelze odlišit ani zobrazovacím vyšetřením (6). Osteopenie, osteomalacie/rachitida, osteopatie nedonošených jsou názvy zavádějící, nepostihující

komplexnost problematiky. Dále je chybou interpretovat rentgenový popis rachitidy u nezralých novorozenců jako vitamin D deficitní rachitidu. Z těchto důvodů se metabolické kostní onemocnění jeví jako nejvhodnější označení pro onemocnění postihující rychle rostoucí kosti nedonošených novorozenců. Z výše uvedeného vyplývá, že v patofyziologii MBD se kombinují tyto příčiny - ztráta fetální akrece vápníku a fosforu, časnější začátek přestavby kostí, nedostatečný přísun minerálů (osteomalacie/rachitida) a porucha formace kostní matrix (osteopenie) (20).

### **3.4.2 Vliv předčasného porodu na kostní metabolismus**

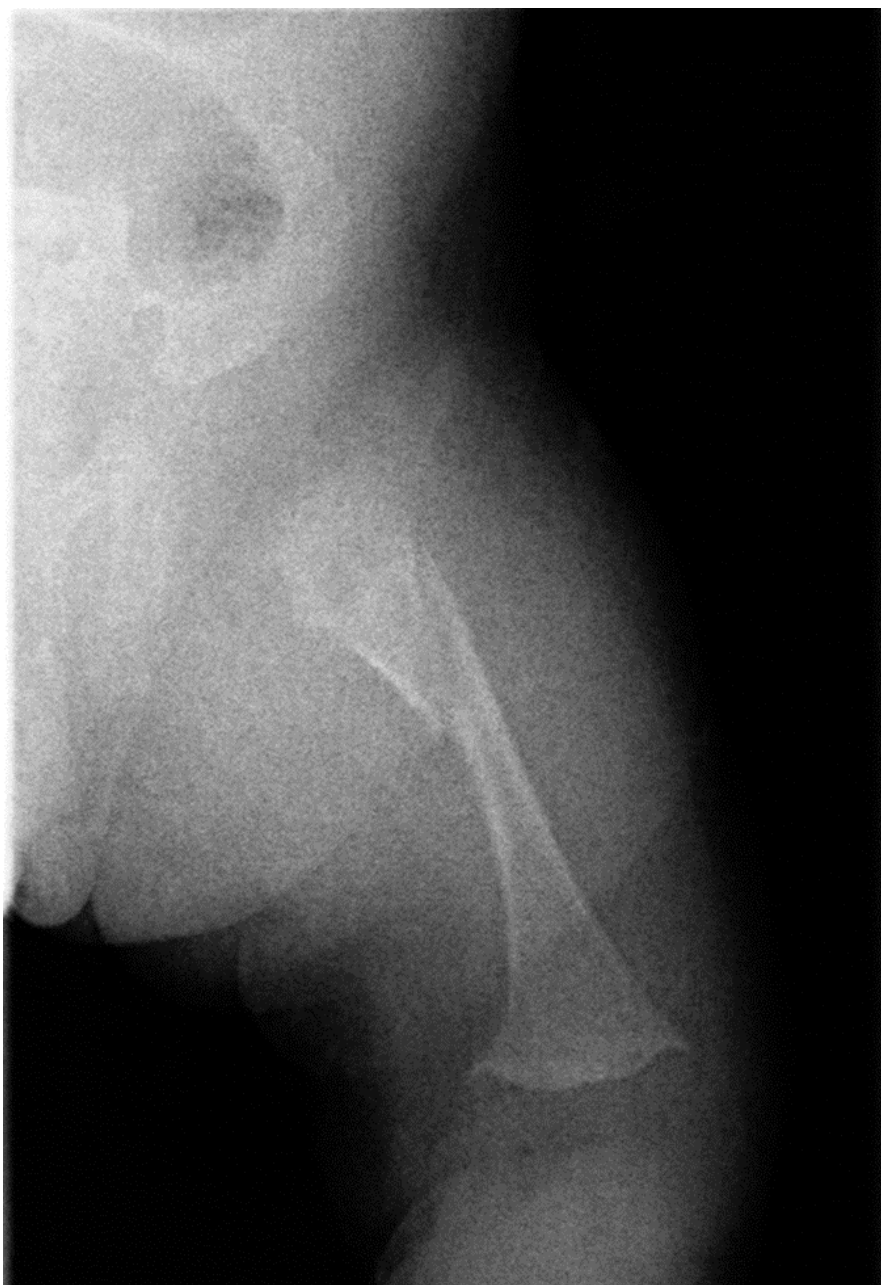
Dětství a adolescence představuje období tvorby vrcholu kostní hmoty (PBM – *peak bone mass*), čehož je dosaženo na konci druhé a počátku třetí životní dekády. Kostní síla je ze 70 % určována kostní minerální denzitou (BMD – *bone mineral density*) a z 30 % pak kostní kvalitou. Na kostní kvalitě se podílí architektura, mineralizace, kostní obrat či nahromaděná poškození (mikrofraktury) (1). V klinické praxi nemáme v současné době k dispozici přístroj, který by uměl změřit kostní pevnost, proto ji odhadujeme pomocí BMD, kterou měříme kostní denzitometrií. Fyziologická hodnota BMD je u každého dospělého jedince určena rovnováhou mezi dosaženým vrcholem kostní hmoty a ztrátou kostní hmoty vlivem stárnutí. U jedinců, u kterých v průběhu dětství a adolescence nedosáhne kostní hmota patřičných vrcholových hodnot, může dojít k narušení této rovnováhy a tím k rozvoji osteoporózy mnohem dříve (1).

Pokrok v intenzivní péči o novorozence vedl v posledních 20 letech k výraznému zlepšení přežívání nezralých novorozenců. Nicméně u novorozenců s extrémně nízkou porodní hmotností pod 1000g (ELBW – *extreme low birth weight*) je nadále potřeba počítat s významnou incidencí časně a pozdní morbidit (21). Do popředí zájmu neonatologů se dostaly mimo jiné i nutriční požadavky. Cílem výživy nezralých novorozenců je přiblížit dodávku živin k intrauterinnímu příjmu zdravého fétu. Správné složení výživy je také důležité pro správný vývoj a mineralizaci skeletu. Nezralí novorozenci, zejména ti, kteří se narodí před 28. gestačním týdnem, jsou ohroženi nižší BMD, protože největší část kostní mineralizace fetálního skeletu se odehrává ve třetím trimestru těhotenství s maximem krátce před vlastním porodem. Postnatálně vlivem časněji zahájené přestavby skeletu, relativně rychlému růstu kosti a nízké retenci minerálů (ve srovnání s intrauterinní) dochází k další významné

redukci kostní denzity. Výsledkem těchto postnatálních změn u nedonošených dětí je metabolické kostní onemocnění se všemi možnými důsledky (22).

Většina studií popisující incidenci MBD při nezralosti byla provedena v 80. a 90. letech minulého století a týkala se novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti pod 1500g (VLBW – *very low birth weight*). Tato „historická“ incidence MBD se pohybovala v rozmezí 30-50 % (23, 24). Dle nedávných retrospektivních studií je incidence MBD u novorozenců s porodní hmotností mezi 1000 – 1500 g do 10 %. Naproti tomu pro novorozence s porodní hmotností pod 1000g se incidence MBD pohybuje kolem 30 %. Pro novorozence s porodní hmotností pod 600g je incidence až 55% (24, 25). Je třeba mít na paměti, že vzhledem k absenci široce akceptovaných diagnostických kritérií je přesná incidence MBD stále diskutabilní. Výše zmíněné studie využívaly k diagnostice prosté rentgenové vyšetření, o kterém je známo, že je zatíženo chybou subjektivního vnímání a k zachycení známek MBD je potřeba minimálně 20 – 40 % demineralizace skeletu (23, 24, 26). Z těchto důvodů je možno reálně uvažovat o incidenci ještě vyšší.

Proč se vlastně MBD u nezralých novorozenců zabývat? Existují krátkodobé a dlouhodobé následky a jaký je jejich dopad na další vývoj dítěte? Odpovědět na tyto otázky není na základě současných poznatků snadné. Mezi krátkodobé následky řadíme zlomeniny kostí. Koncem minulého století se incidence fraktur pohybovala mezi 10-30 % (23, 27). Dle některých autorů (22, 23) se četnost fraktur snížila, což podporuje i práce Viswanathana (24) se zjištěnou incidencí zlomenin 12,2 % u skupiny ELBW novorozenců. Nejčastěji se jednalo o náhodně zjištěné zlomeniny žeber (až 70 %) při rentgenovém vyšetření z jiné indikace, v menším zastoupení pak fraktury humeru (20 %) nebo femuru (10 %, obrázek č. 2) (24). Obvykle se zlomeniny objevují od 10. – 12. týdne života a jejich výskyt klesá do šestého měsíce nekorigovaného věku. Do přímé souvislosti jsou dávány tyto rizikové faktory: totální parenterální výživa déle než čtyři týdny, cholestáza, těžší formy bronchopulmonální dysplázie, léčba kortikosteroidy či furosemidem déle než dva týdny (24, 27). V současné době nejsou známy dlouhodobé následky fraktur vzniklé v tomto věku (23). Souvislost mezi MBD, dolichocefálií a myopií byla předmětem zkoumání, ale nebyla potvrzena (23, 28).



***Obrázek 2 Fraktura pravého femuru jako následek metabolického kostního onemocnění při nezralosti***

K rozvaze nad dlouhodobými následky MBD u novorozenců je k dispozici jen omezené množství klinických studií. Z několika prací vyplývá, že u původně nezralých novorozenců dochází při srovnání s donošenými k normalizaci kostní denzity v rozmezí 6 měsíců až 2 let (29-31). Logicky se tedy nabízí odpověď, že MBD u nezralých novorozenců nemá vliv na další vývoj skeletu. Nicméně další sledování původně nezralých novorozenců ukazuje signifikantní tendenci k nižší tělesné výšce a obvykle i redukci kostní denzity.

Bowden u 8 letých původně nezralých novorozenců prokázal výšku o 4,9 cm nižší, než měla kontrolní skupina původně donošených novorozenců. Významný rozdíl v parametrech densitometrie nebyl prokázán (32). Ke stejnému zjištění dospěl i Smith (33). V jiné studii byla u 20 novorozenců pod 1500g také prokázána signifikantní redukce tělesné výšky, ale i kostní denzity a to mezi 5. – 9. rokem ve srovnání s populačními daty (34). U více než 200 novorozenců s porodní hmotností pod 1850g narozených v Anglii v letech 1982-1985 byla ve 20 letech věku prokázána nižší tělesná výška a snížená kostní denzita bederní páteře. U hypotrofických novorozenců s porodní hmotností pod 1250g byly tyto změny ještě výraznější (35).

Souhrnně lze říci, že i přes významný pokrok intenzivní novorozenecké péče v posledních 20 letech, jak po stránce výživy (např. strategie parenterální výživy, časná enterální výživa, umělé mléčné formule pro nedonošené novorozence, fortifikace mateřského mléka, atd.), tak ve smyslu zlepšení managementu ventilační podpory a bronchopulmonální dysplázie, se incidence MBD nezměnila. Došlo ale k přesunu onemocnění na novorozence nejnižší váhové kategorie (ELBW). Zdá se, že incidence patologických fraktur na podkladě MBD se snižuje, přesto je zde ale více než 10% riziko této časné komplikace (24). Rozdíly ve skeletu původně nezralých novorozenců oproti zdravé populaci pozorované ve školním věku nebo u mladých dospělých (redukce finální tělesné výšky, event. snížení kostní denzity) by mohly představovat významný rizikový faktor k rozvoji časné osteoporózy. Pokud by tomu tak bylo, pak by se jednalo o závažnou dlouhodobou morbiditu. K rozklíčování této problematiky jsou zapotřebí další dlouhodobé studie.

### **3.4.3 Rizikové faktory MBD**

Etiologie metabolického kostního onemocnění u nezralých novorozenců je multifaktoriální, nejvýznamnějším rizikovým faktorem je nedostatečná nutrice, nelze ale opomíjet i vlivy prostředí a vlivy biomechanické.

Existuje celá řada rizikových faktorů, které jsou dávány do spojení s rozvojem MBD (Tabulka 1).



**Tabulka 1 Metabolické kostní onemocnění při nezralosti - rizikové faktory (19).**

<b>Prenatální</b>
- <b>Preeklampsie</b>
- <b>Chorioamnioitida, placentární infekce</b>
- <b>Intrauterinní růstová restrikce</b>
<b>Postnatální</b>
- <b>Nízké gestační stáří</b>
- <b>Velmi a extrémně nízká porodní hmotnost</b>
- <b>Poruchy výživy</b>
o opožděné dosažení plného enterálního příjmu
o dlouhodobá parenterální výživa
o deficiencie vitamínu D
- <b>Hliníkem kontaminované roztoky parenterální výživy</b>
- <b>Léky (kortikosteroidy, furosemid, kofein, syntophyllin, heparin, phenobarbital)</b>
- <b>Neonatální morbidita</b>
o bronchopulmonální dysplázie
o nekrotizující enterokolitida, vrozené vady střeva vedoucí k resekci/enterostomii
o cholestáza
o opakované infekce
- <b>Nedostatek mechanické stimulace/imobilita</b>
o dlouhodobá potřeba sedace, relaxace
o mozkové patologie

Většina jich je s výživou přímo nebo nepřímo spojena. V posledním trimestru těhotenství dochází k retenci 2/3 kalcia a fosforu ve fetálním skeletu. Zásadní roli v tomto procesu hraje placenta, tudíž při poruše její funkce např. při preeklampsii nebo zánětu lze předpokládat alteraci retence minerálů do kosti. Tomu odpovídá zvýšená incidence MBD u hypotrofických novorozenců (23). Předčasným porodem jsou děti velmi a extrémně nízké porodní hmotnosti ochuzeny o výhodnou intrauterinní akreci minerálů a postnatálně jsou velmi náchylné na nedostatečný příjem kalcia a fosforu, což je klíčový faktor vedoucí k redukci kostní mineralizace a k rozvoji MBD. Problémy se zajištěním dostatečného příjmu potřebných živin a minerálů u nezralých novorozenců nesouvisí jen s vlastní nezralostí, ale vliv zde má také neonatální morbidita, která se zásadní měrou podílí na délce parenterální výživy (PN) a přidružené medikamentózní léčbě. Dodávka vápníku a fosforu v PN je omezená z důvodu špatné rozpustnosti minerálů v používaných roztocích. Dalším problémem PN je vysoký obsah hliníku v roztocích PN (zejména kalciové a fosfátové roztoky, aminokyseliny, albumin). Akumulace hliníku vede k poruše tvorby kostní matrix a mineralizace kosti (1). Léky, které nejvíce zvyšují riziko neadekvátní kostní mineralizace,

shrnuje tabulka č. 1. Kortikosteroidy inhibují funkci osteoblastů, dále redukují střevní absorpci a tubulární reabsorpci kalcia (vede ke kalciiurii se zvýšeným rizikem nefrokalcinózy). Furosemid a další kličková diuretika zvyšují renální ztráty Ca a tím vedou k jeho negativní bilanci (thiazidová diuretika mají opačný efekt). Aminophylliny (kofein, syntophyllin) též vedou ke zvýšeným ztrátám Ca do moči, nicméně významnost je oproti steroidům a furosemidu podstatně nižší. Dlouhodobé podávání heparinu je asociováno s poklesem kostní denzity. Heparin snižuje aktivitu osteoblastů, vede k abnormálnímu metabolismu vitamínu D a k sekundární hyperparathyreóze. A konečně, dlouhodobé užívání phenobarbitalu (a/nebo phenytoinu) urychluje degradaci vitamínu D, což může vést k nedostatečnému vstřebávání Ca (1).

Fyzická aktivita hraje klíčovou roli při mineralizaci kosti. Vývoj skeletu je určován funkčními požadavky, což znamená, že kostní síla/pevnost (určována ze 70 % kostní denzitou) roste pouze v případě zvyšujících se nároků na udržení kostní stability. Největší nároky na udržení kostní stability kladou svalové kontrakce, na což kost reaguje posílením mineralizace s cílem zvýšení kostní síly (1, 4-6). Nedostatek fyzické aktivity vlivem dlouhodobé sedace, relaxace či z důvodu poškození mozku vede ke zvýšené kostní resorpci a je dobře popsáný rizikový faktor pro rozvoj MBD (22, 36).

#### **3.4.4 Diagnostika MBD**

K rozvoji metabolického kostního onemocnění nezralých novorozenců dochází typicky mezi 6. – 12. postnatálním týdnem (1) (37). Diagnostika MBD je stejně jako u jiného onemocnění založena na anamnéze s identifikací rizikových pacientů, klinickém stavu, zobrazovacích vyšetřeních a pravidelném sledování biochemických markerů. Mezi děti s nejvyšším rizikem patří ELBW a VLBW novorozenci s komplikovaným průběhem - opakované infekce, dlouhodobé ventilační obtíže a významná resekce střeva s eventuální enterostomií nebo syndromem krátkého střeva (viz také tabulka č. 1.). Klinický průběh je obvykle asymptomatický. Pravděpodobně nejčastější manifestací rozvoje MBD je nález osteomalacie/rachitidy skeletu na rentgenovém snímku provedeném z jiné indikace. Méně často je prvním příznakem až fraktura žeber a/nebo dlouhých kostí.

### 3.4.4.1 Zobrazovací vyšetření

Rentgenové vyšetření je nejrozšířenější a nejběžněji užívanou zobrazovací metodou k objektivizaci stavu skeletu v případě podezření na MBD. Není ale přínosné pro časnou diagnostiku MBD, navíc je zatíženo subjektivní chybou. Viditelné změny, jako zvýšená průsvitnost kostí při rentgenovém vyšetření („vymyté“ kosti“) nebo rachitické změny růstových štěrbin, lze detekovat až při 20 - 40% snížení mineralizace kosti (Obrázek č. 1) (23, 24, 26).

Kostní denzitometrie měří kostní denzitu a ta vyjadřuje množství minerálů v kosti (BMC – *bone mineral content*) ve sledovaném úseku (v  $\text{g}/\text{cm}^2$ ) nebo objemu kosti (v  $\text{g}/\text{cm}^3$ ). Nejrozšířenějším systémem denzitometrie je dvoufotonová rentgenová absorpční fotometrie (DXA), která je v současné době považována za zlatý standard pro vyšetření dospělých. Radiační dávka je i pro novorozence zanedbatelná (37). Výsledky denzitometrického vyšetření se vyjadřují jako T- nebo Z-skóre. T-skóre udává počet odchylek výsledku vyšetření od tabulkové hodnoty kostní minerální denzity mladých zdravých jedinců stejného pohlaví (normativní data). Z-skóre vyjadřuje totéž, ale porovnává výsledek vyšetření s průměrnými hodnotami u zdravých osob stejného pohlaví i věku. Skóre + 1 až -1 směrodatná odchylka se považuje za normální. Větší odchylky vypovídají o různém stupni řídnutí kostí. DXA je považována za neinvazivní, bezpečné a velmi citlivé vyšetření kostní denzity i u donošených a nedonošených novorozenců (22). Významným problémem je velmi omezená možnost tyto výsledky porovnávat s normativními daty pro výpočet T- nebo Z-skóre, tj. posoudit odchylku od zdravé populace novorozenců. Se zavedením speciálního neonatálního softwaru, obsahujícího průměrné hodnoty zdravých donošených novorozenců, se tato možnost nabízí pro donošené novorozence. I přesto, že existují historická normativní data celotělové denzitometrie pro nezralé novorozence (38), lze tato data použít jen obtížně pro srovnání s výsledky nezralých novorozenců získanými na jiných přístrojích s rozdílným softwarem. Navíc z důvodu špatné dostupnosti přístroje a omezené možnosti transportu nezralého novorozence na vyšetření je velmi nepravděpodobné zavedení rutinního vyšetření denzitometrie v klinické praxi, její nezastupitelné místo zůstává prozatím v oblasti neonatologického klinického výzkumu.

### **3.4.4.2 Biochemické markery kostního metabolismu**

#### **3.4.4.2.1 Kalcium**

Vyšetřování sérového kalcia je nepřínosné k diagnostice MBD. Důvodem je precizní hormonální regulace zajišťující stabilní kalcémii i za cenu významné demineralizace kosti (22, 23).

#### **3.4.4.2.2 Fosfor**

Pokles sérové hladiny fosforu pod 1.8 mmol/l, tj. pod hodnotu renálního prahu pro fosfor, je u nedonošených novorozenců možné naopak považovat za známku fosfátového deficitu a současně je významně asociován s vysokým rizikem rozvoje MBD. Vyšetření má dobrou specifitu (95 %), ale velmi nízkou senzitivitu (50 %) (22, 39).

#### **3.4.4.2.3 Alkalická fosfatáza (ALP)**

Mezi markery kostní formace řadíme sérový osteokalcin, procollagen type I N-terminální propeptid (PINP) a sérovou hladinu alkalické fosfatázy (1). Pro osteokalcin a PINP jsou k dispozici referenční meze pro pediatrickou populaci (40). V současné době však neexistují data podporující využitelnost těchto parametrů k diagnostice MBD při nezralosti. Tkáňově nespecifická alkalická fosfatáza existuje ve více isoformách – kostní, jaterní a ledvinné. U novorozenců představuje kostní isoforma 90 % celkové ALP (26, 36). Kostní ALP je bohatě obsažena ve fosfolipidové stěně vesikuly, která vzniká z membrány osteoblastu. Zde působí jako transferáza pro fosfáty. Kalcium vstupuje do vesikuly difúzí. Vzniká hydroxyapatitový krystal, který se po protržení stěny vesikuly spojí s kolagenem I a tím se vytváří v osteoidu nidus pro další krystalizaci. Ta pokračuje pouze v přítomnosti dostatečného množství Ca a P. Jedná se tedy o marker kostní formace a mineralizace. Elevace ALP reflektuje zvýšený obrat a ruptury vesikul jako snahu osteoblastů podpořit kostní mineralizaci. K tomu dochází jak při kostní formaci (normální růst, ale i hojení MBD), tak i při nedostatku substrátu k tvorbě hydroxyapatitu (26). Při cholestáze také dochází k elevaci

celkové ALP, ale vyšetření bilirubinu a jaterních enzymů nám vcelku přesně odliší cholestázu s poškozením hepatocytu od zvýšení kostní isoformy ALP. Na základě několika studií bylo prokázáno, že vyšetření kostní ALP nepřináší zlepšení senzitivity (73 %) či specifity (73-80 %) pro MBD při nezralosti ve srovnání s analýzou celkové ALP, které je finančně podstatně méně nákladné (39, 41). Situace se dále komplikuje při deficitu zinku či malnutrici, kdy může být naopak hladina ALP nepřiměřeně nízká. S tímto problémem se můžeme setkat u novorozenců po resekci střeva a/nebo s enterostomií vyžadujícími dlouhodobou parenterální výživu.

ALP je dostupný a běžně užívaný parametr kostního metabolismu v neonatologii, nicméně je to test s velmi limitovanou užitečností. Hung zjistil, že hodnota ALP nad 12  $\mu$ kat/l (700 IU/l) ve 3. týdnu života má velmi nízkou senzitivitu a specifitu (73 %) pro rozvoj MBD v dalším postnatálním průběhu (41). Částečně lze ALP využít v panelu s dalšími markery, zejména fosforem. Maria Christina Backström prokázala, že spojení ALP a P poskytuje 100% senzitivitu ale pouze 70% specifitu pro sníženou kostní denzitu (39). Nebyla prokázána souvislost mezi ALP a hladinou vitamínu D u novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti. Vysoké hladiny ALP nekorelují s hladinami kalcitrolu a vysoké dávky vitamínu D nemají efekt na hladinu ALP (26). Další studie neprokázaly žádnou souvislost mezi ALP a rentgenovými známkami demineralizace kosti či kostní denzitou na denzitometrii. Z toho vyplývá, že ALP nereflektuje minerální zásoby pacienta, nelze podle žádné její hodnoty řídit suplementaci Ca a P. ALP měřená v průběhu hospitalizace nebo při propuštění nemůže spolehlivě predikovat přítomnost nebo tíži MBD (25, 26, 42).

#### **3.4.4.2.4 Odpady kalcia a fosforu do moči**

Renální nálož Ca vychází z rozdílu mezi střevní absorpcí a kostní retencí. Měkko-tkáňová retence je považována za zanedbatelnou. Renální exkrece vápníku hraje minimální roli v homeostáze vápníku. Hlavní faktory ovlivňující odpady Ca do moči u nezralých novorozenců jsou nedostatek fosforu, nedostatečný příjem/vstřebání vápníku a léky (furosemid, kortikosteroidy, kofein, aminophyllin). Absorpce fosfátů ve střevě je velmi efektivní a neregulovaná. Ledviny mají klíčovou úlohu v udržování sérové hladiny fosforu cestou jeho exkrece (regulováno PTH a FGF23 (11, 43). Tubulární reabsorpce je aktivní a saturabilní proces. K fosfaturii dochází při překročení renálního prahu pro fosfor, tím by u

VLBW novorozenců měla být sérová hladina P 1,8 mmol/l. Při poklesu pod tuto hodnotu v séru je všechno P z moči vstřebáno. Maximální sérová hodnota P, nad kterou je 100% saturována reabsorpce je 2.45 mmol/l (43). U extrémně nezralých novorozenců (23. - 25. gestační týden) je renální práh pro fosfor ještě snížen. I při fosfatémii kolem 1 mmol/l byla zjištěna pozitivní exkrece P v prvních 5. týdnech života, později renální práh stoupá k sérové hodnotě 1.8 mmol/l (44).

K posouzení adekvátního příjmu minerálů potřebných k tvorbě hydroxyapatitu lze využít stanovení prostých močových koncentrací Ca a P nebo jejich kreatininové indexy, které zohledňují zahuštění moče. Další možností je výpočet tubulární reabsorpce fosfátů (TRP) podle vzorce:  $1 - \frac{U-P \text{ (mmol/l)} \times S\text{-krea (mmol/l)}}{(U - \text{krea (mmol/l)}) \times S-P \text{ (mmol/l)}} \times 100$  (45). Tubulární reabsorpce nad 95 % je považována za známku nedostatku P v organismu. TRP má však několik nevýhod. Za prvé je to relativně složitý výpočet s nutností znalosti sérové hodnoty kreatininu, která je u nedonošených novorozenců často nulová a znemožňuje vlastní výpočet TRP. Za druhé nám TRP neposkytuje žádnou informaci o stavu zásob kalcia. A za třetí může být ovlivněna sekundární hyperparathyreózou při depleci Ca. 24 - hodinové sběry moče jsou v neonatologii nepraktické. Jako nejlépe korelující s 24 - hodinovým sběrem se ukázal být 6 -hodinový noční sběr moče (46). Limitací vyšetření odpadů Ca a P do moči stále zůstává absence jednoznačných referenčních mezí pro nezralé novorozence. Sledováním odpadů Ca a P do moči s cílem stanovení jejich mezních hodnot u nezralých novorozenců se v minulosti zabývaly dvě studie. Frank Pohland zjistil, že u novorozenců, kteří měli více než 1.2 mmol/l Ca a 0.4 mmol/l P v alespoň 50 % vzorků moče, byla zjištěna kostní minerální akrece srovnatelná s intrauterinní (47). Studie vycházela z předpokladu lehce pozitivních odpadů Ca a P do moči, kdy lze očekávat dostatečné sérové hladiny minerálů k dobré kostní minerální akreci. Je nutné upozornit, že se jedná o studii z roku 1994, která nevzala v úvahu morbiditu a medikaci u sledovaných novorozenců. Je možné spekulovat, že doporučené odpady Ca a P do moči a lepší kostní akreci měly jen „zdravější děti“. Výsledkem Aladangadyho sledování Ca/krea a P/krea indexů v moči od čtvrtého postnatálního týdne u 186 nezralých novorozenců (24. - 34. gestační týden) byl návrh referenčních mezí pro tyto parametry (10. a 90. percentil pro Ca/krea 0.5 a 3; 10. a 90. percentil pro P/krea 4 a 25) (48). Cílem studie nebylo prokázat benefit udržování indexů v daném rozmezí, čili zda zlepšují kostní minerální akreci. Správnost referenčních mezí Ca/krea a P/krea indexů se opírala o nepřímé hodnocení dobré kondice kostí nezralých novorozenců na základě sérologických kostních markerů (Ca, P, ALP).

Souhrnně lze říci, že močové odpady Ca a P také nelze využít jako spolehlivý marker pro diagnostiku MBD. Zdá se však, že by jejich změny mohly předcházet odchýlkám v sérových parametrech (49). Pokud by se dalším výzkumem podařilo stanovit referenční meze cílené na zlepšení kostní minerální akrece a odpovídaly by dnešním výživovým zvyklostem, pak by jejich přínosnost významně stoupla.

#### **3.4.4.2.5 Vitamín D**

V průběhu vývoje lidského jedince se situace mění. Zatímco součinnost PTH a PTHrP je prenatálně nezbytná pro normální vývoj a optimální mineralizaci fetálního skeletu, tak přítomnost vitamínu D není pro správný vývoj fetálního skeletu vyžadována. Navzdory deficienci vitamínu D u matky nebyl prokázán vliv na pupečnickové hodnoty kalcia, fosforu, morfologii skeletu či obsah minerálů v kosti u donošeného novorozence (8, 50). Postnatální úlohou aktivovaného vitamínu D je zajištění absorpce Ca a v menší míře i P ze střeva. Zdá se, že hydroxylace vitamínu D na kalcitriol je funkční od prvního dne života i u nezralých novorozenců (18). Určitá data nicméně naznačují, že vstřebávání Ca ze střeva je u velmi nezralých novorozenců v prvním měsíci života zajištěna zejména pasivní difúzí. Současně se v průběhu čtyř týdnů, v souvislosti s maturací střevní sliznice, zvyšuje vstřebávání vitamínu D a také exprese receptorů pro kalcitriol a asociovaných Ca transportních proteinů (Calbindin D9K, D28K). Postupně se dominantním mechanismem pro absorpci kalcia ze střeva stává aktivní transport řízený kalcitriolem (8, 17, 51). Nejlepší marker k hodnocení stavu zásob vitamínu D je 25-hydroxyvitamín D (25OHD) (52, 53). Hypovitaminóza D patří také do rizikových faktorů rozvoje metabolického kostního onemocnění při nezralosti, cestou sekundární hyperparatyreózy vede k resorpci Ca z kostí. Nezralí novorozenci jsou díky časté insuficienci vitamínu D u matek náchylní k hypovitaminóze D se všemi u donošených novorozenců popsanými negativními dopady. Přestože vitamín D hraje významnou roli v kalcium-fosfátovém metabolismu, stanovování jeho sérové hladiny v rámci diagnostiky MBD není součástí základního panelu vyšetřování (36, 53), protože prozatím neexistují žádná klinická data, která by to podporovala. Zvýšená suplementace vitamínu D snižuje výskyt jeho insuficience, nebyl ale prokázán vliv na BMC či BMD (54, 55). Doporučení obvykle zmiňují opatrnost u novorozenců s rizikem malabsorpce (cholestáza, resekce střeva), kde je vhodné sérovou hladinu vitamínu D vyšetřit. Jako bezpečná je považována sérová hladina 25OHD

nad 50 nmol/l pro všechny pediatrické pacienty (3, 53, 56). Nelze však opomenout fakt, že prozatím nebyl u nezralých novorozenců prokázán jakýkoliv benefit udržování sérové hladiny 25OHD nad 50 nmol/l.

#### **3.4.4.2.6 Parathormon**

Příštítná tělíska jsou velmi citlivá na výkyvy ionizovaného kalcia. V případě nedostatku vápníku v organismu dochází ke zvýšenému vyplavování PTH. Parathormon stimuluje proliferaci a diferenciaci osteoklastů a tím vede k dalšímu vyplavování minerálů již z demineralizované kosti nezralých novorozenců.

V poslední době některé studie poukázaly na vztah mezi sekundární hyperparatyreózou a metabolickým onemocněním kostí předčasně narozených dětí, zejména v kategorii novorozenců s nejnižší hmotností a s mnohočetnou morbiditou (57-59). Až 80 % novorozenců s extrémně nízkou porodní hmotností s rentgenovými příznaky MBD mělo hladiny PTH vyšší než referenční hodnoty pro dospělé (58). Zdá se, že se sérová hladina PTH > 4.5 pmol/l v termínu porodu u původně nezralých novorozenců by mohla predikovat snížení BMC (senzitivita 40 % a specifická 88 %) (60). Elevace PTH by mohla být citlivým indikátorem nedostatku vápníku i u předčasně narozených dětí. Dlouhodobé zvýšení hladiny PTH přímo indukuje resorpci kosti a snižuje obsah minerálů v kostech, což může vést ke zlomeninám. Přítomnost hyperparatyreózy může být tedy klíčovým ukazatelem závažnosti osteopatie předčasně narozených dětí. Na základě prospektivní studie zahrnující 79 předčasně narozených novorozenců s porodní hmotností nižší než 1250 g, Carolina Moreira (61) předpokládala, že PTH může být časným markerem MBD s lepší specificitou než alkalická fosfatáza. Dle současných poznatků není jasné, zda jsou referenční hodnoty PTH pro předčasně narozené novorozence shodné nebo odlišné od těch, které se používají u donošených novorozenců nebo dospělých (57-59, 62). Vzhledem k tomu, že referenční hodnoty nejsou známy, lze spekulovat o tom, že zvýšené hladiny PTH u předčasně narozených novorozenců jsou výsledkem jejich adaptačních postnatálních procesů. K zodpovězení těchto otázek je zapotřebí dalších studií s cílem stanovení fyziologických mezí PTH pro nedonošené novorozence a odhalení skutečné incidence sekundární hyperparatyreózy v souvislosti s rozvojem MBD.



### **3.4.5 Léčba metabolického kostního onemocnění nezralých novorozenců**

Základem úspěšné léčby MBD a tím snížení rizika možných následků tohoto onemocnění je důsledná prevence nedostatečné dodávky substrátů pro mineralizaci kosti. Podstatou prevence/léčby MBD je časná optimální nabídka vápníku, fosforu a vitamínu D cestou parenterální i enterální výživy.

#### **3.4.5.1 Parenterální výživa**

V parenterální výživě jsou kalcium a fosfor přímo dostupné pro metabolismus, ale limitujícím faktorem je precipitace Ca a P v roztoku neboli špatná rozpustnost kalciových a fosfátových solí. Lepší rozpustnost těchto solí a tím vyšší retenci Ca a P do kosti zajišťuje – molární poměr Ca:P 1-1.3:1 (hmotnostní poměr 1.3-1.7:1), užití organických solí (kalcium glukonát, kalcium chlorát nebo glycerol fosfát sodný). Nevýhodou velmi oblíbeného Ca glukonátu je vyšší kontaminace hliníkem. Obsah Ca do 60 mg/100 ml a P do 47 mg/100 ml roztoku parenterální výživy je spojen se stabilní kostní a minerálovou homeostázou (retence Ca a P přes 90%), bez zvýšeného rizika hyperkalciurie. Většina v současnosti užívaných roztoků parenterální výživy nám dovolí dosáhnout přibližně 60-70 % fyziologických intrauterinních potřeb Ca a P (90 mg/kg/den respektive 70 mg/kg/den, tj. do maximální dávky 2.25 mmol/kg/den) (1, 22, 63). Studie na poli parenterální výživy jasně prokázaly, že deficiencie vitamínu D je při totální parenterální výživě u novorozenců vzácná a není důvodem rozvoje MBD. Dodávka 160-400 IU/kg/den v lipidových emulzích je dostatečná (např. Vitalipid obsahuje 40 IU/ml) (1). Doporučené dávky minerálů a vitamínu D pro parenterální výživu nezralých novorozenců shrnuje tabulka 2.

---

**Tabulka 2 Doporučené dávky minerálů a vitamínu D pro parenterální výživu nezralých novorozenců.**

*(1 mmol = 40 mg Ca; 1 mmol = 31 mg P)*

Ca	P	Vitamin D	Ca/P poměr
60-90 mg/kg/den	47-70 mg/kg/den	160-400 IU/kg/den	1,3:1 – 1.7:1 (mg:mg)
1.5-2.25 mmol/kg/den	1.5-2.25 mmol/kg/d		1:1 – 1.3-1 (mmol:mmol)

---

Volně převzato z (1).

### 3.4.5.2 Enterální výživa

Adekvátní enterální výživa s optimálním obsahem a poměrem kalcia a fosforu pro tvorbu hydroxyapatitu má klíčovou úlohu v prevenci MBD nezralých novorozenců. Z gastrointestinálního traktu se vstřebává přibližně 50-60 % kalcia a 80-90 % fosforu (1, 22, 53). Bilanční metabolické studie u nezralých novorozenců, kmených fortifikovaným ženským mlékem nebo formulí pro nedonošené novorozence, prokázaly, že maximální možná retence kalcia a fosforu je 60-90 mg/kg/den, respektive 50-75 mg/kg/d. I když tyto hodnoty jsou nižší než zjištěná intrauterinní akrece, zdá se, že jsou dostatečné k prevenci rozvoje MBD. Na základě informací o vstřebatelnosti a retenci kalcia a fosforu byla vytvořena stávající doporučení (tabulka 3). V zámoří přikládají větší význam pasivní difúzi Ca a P přes střevní stěnu (1, 53), kdežto v Evropě převládá názor nezastupitelnosti aktivního vitamin D dependentního transportu vápníku a částečně i fosforu ze střeva (51). To se odráží v oficiálních doporučeních, Americká akademie pro pediatrii doporučuje maximalizovat dodávku Ca a P (až 220mg/kg/den Ca; 140mg/kg/den P), kdežto evropská společnost pro dětskou gastroenterologii a výživu navrhuje nižší dávky minerálů (140 mg/kg/den Ca; 90 mg/kg/den P), ale dvojnásobně vyšší dávku vitamínu D (1000 IU/den versus 400 IU/den) (51, 53).

**Tabulka 3 Doporučené dávky minerálů a vitamínu D pro enterální výživu nezralých novorozenců.**

	<b>Itani, Tsang 2006</b>	<b>ESPGHAN 2010</b>	<b>AAP 2013</b>
<b>Ca (mg/kg/den)</b>	120-200	120-140	150-220
<b>P (mg/kg/den)</b>	70-120	65-90	75-140
<b>Vitamin D (IU/den)</b>	150-400	800-1000	200-400

Volně převzato z (1).

### **3.5 Vitamin D**

Vitaminy skupiny D jsou především endogenní produkty savčích organismů a některých rostlin resp. hub, z nichž jsou syntetizovány vlastní účinné látky povahy steroidních hormonů, které se účastní celé řady klíčových metabolických dějů prakticky v každé jaderné buňce, ať už na endokrinní či subcelulární úrovni. Vitamin D tak představuje nesmírně zajímavou a pleiotropně působící molekulu (64).

#### **3.5.1 Metabolismus vitamínu D**

Pod pojmem vitamin D rozumíme dva ve vodě nerozpustné sekosteroidy – ergokalciferol (vitamin D2) a cholekalciferol (vitamin D3). Vitamin D2 je rostlinného původu. U novorozenců je využíván zejména jako zdroj vitamínu D pro roztoky parenterální výživy (např. Vitalipid N Infant, Fresenius Kabi AB, Uppsala, Sweden). Vitamin D3 je naopak živočišného původu. Je tedy v malém množství součástí mateřského mléka (20 I.U./100 ml) a zejména je využíván pro výrobu přípravků pro enterální suplementaci (Vigantol gtt./drops/, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Vitamin D2 a D3 se vzájemně liší strukturou postranního řetězce, fyziologické účinky obou látek na lidský organismus se podle převažujících teorií významně neliší, i když zatím není úplná jednota v názorech na působení těchto jednotlivých látek. Koncentraci aktivního vitamínu v séru však více ovlivňuje cholekalciferol (64).

V kůži přítomný 7-dehydrocholesterol je konvertován působením UV záření na 7-dehydrocholecalciferol (provitamin D<sub>3</sub>). Rychlou termickou izomerací je dále syntetizován vlastní vitamin D<sub>3</sub>, cholecalciferol. Účinnost pronikání světla je pod kontrolou kožního pigmentu, dalším působením UVB záření se mění provitamin D<sub>3</sub> i vitamin D<sub>3</sub> na inaktivní fotoprodukty. Produkce vitaminu D v kůži jakožto hlavního zdroje pro lidský organismus se u nezralých novorozenců neuplatňuje.

Cholecalciferol se za normálních podmínek z více než 50 % ukládá do tukové tkáně, která se tak stává fyziologicky významnou zásobárnou vitaminu D. Působením enzymu 25-hydroxylázy (mikrozomální enzym ze skupiny cytochromu P450 – CYP27A1) se podle potřeb organismu konvertuje u člověka převážně v játrech na 25-OH vitamin D<sub>3</sub>, což je počáteční krok aktivace vitaminu D. K dalšímu metabolickému procesu dochází v ledvinách, kde působením enzymu 1-alfa-hydroxylázy (CYP27B1) se konvertuje 25-OH vitaminu D<sub>3</sub> na hlavní metabolit 1-alfa,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>. Podobně je aktivován i vitamin D<sub>2</sub>. Syntéza 1,25(OH)<sub>2</sub>D je přísně regulována negativní zpětnou vazbou: vysoké hladiny 1,25(OH)<sub>2</sub>D a FGF23 inhibují CYP27B1 a indukují cytochrom P45024A1 (CYP24A1), který transformuje 1,25(OH)<sub>2</sub>D do neaktivní formy 24,25(OH)<sub>2</sub>D (65). Biologická role 24,25(OH)<sub>2</sub>D zůstává stále kontroverzní. Současné dogma předpokládá, že 24-hydroxylace je prvním krokem na cestě k inaktivaci vitaminu D, ať už je substrátem 25(OH)D nebo aktivní forma vitaminu D. Katabolická úloha CYP24A1 byla posílena nálezem ztrátové mutace CYP24A1, při které dochází k rozvoji hyperkalcémie. Řada důkazů však naznačuje, že 24,25(OH)<sub>2</sub>D může mít jedinečné biologické účinky související s mineralizací kostí nebo chrupavky, opravou zlomenin kostí nebo potlačením uvolňování parathormonu. Toto druhé působení je zvláště relevantní u populace předčasně narozených, u nichž je vysoké riziko metabolického kostního onemocnění (66).

Metabolismus 25(OH)D je poměrně pomalý s méně těsnou zpětnovazebnou regulací. Proto se hladina 25(OH)D v séru zvyšuje úměrně s příjmem, a je tak dobrým ukazatelem nutričního stavu organismu a zásob vitaminu D v těle, nezávisle na hladinách 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Zatímco dominantním aktivátorem 1-alfa-hydroxylázy je parathormon, nejvýraznějšími inhibitory jsou již vytvořené 1,25(OH)<sub>2</sub>D a FGF23. Kalcitriol je silným inhibitorem 1-alfa-hydroxylázy, protože může potlačit transaktivaci parathormonem (64). Vitamin D a jeho hydroxylované metabolity jsou lipofilní látky málo rozpustné ve vodě. Přibližně 60–90 % kalciferolu z potravy je vstřebáváno v tenkém střevě, převážně v jeho proximálním úseku, mechanismem podobným vstřebávání cholesterolu a jiných, v tucích rozpustných sterolů.

Absorpce je pozitivně ovlivněna žlučovými kyselinami, s nimiž vitamin D tvoří komplexy. V plazmě jsou lipofilní molekuly vitamínu přenášeny k cílovým tkáním transportními bílkovinami. Systémové řízení homeostázy vitamínu D je komplexní děj, který je kontrolován hlavními a vedlejšími mechanismy. Jedním z hlavních mechanismů kromě autoregulace  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  jsou sérové hladiny PTH, který zvyšuje koncentraci sekosteroidu v séru i tím, že zpomaluje jeho degradaci. Současně snižuje aktivitu 24-hydroxylázy, takže klesá podíl neaktivního metabolitu. Neméně významným mechanismem je i nepřímý stimulační vliv PTH zprostředkovaný poklesem hladin anorganického fosfátu. Kalcium, jako další z hlavních regulátorů hladin  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , tlumí aktivitu 1-alfa-hydroxylázy přímo, ale i nepřímo prostřednictvím PTH. Vzestup kalcémie produkci  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  snižuje. Mechanismus regulačního účinku fosfátu je zprostředkován FGF23, pokles sérové hladiny fosfátu zvyšuje aktivitu 1-alfa-hydroxylázy. I když vliv fosfátu není závislý na PTH, je podstatně slabší v porovnání s účinkem PTH. Aktivita 1-alfa-hydroxylázy je modulována také stavem acidobazické rovnováhy a hladinami některých hormonů (inzulin, somatotropin, IGF-I, prolaktin, kalcitonin a pohlavní hormony) (64).

### **3.5.2 Vitamin D a imunitní systém**

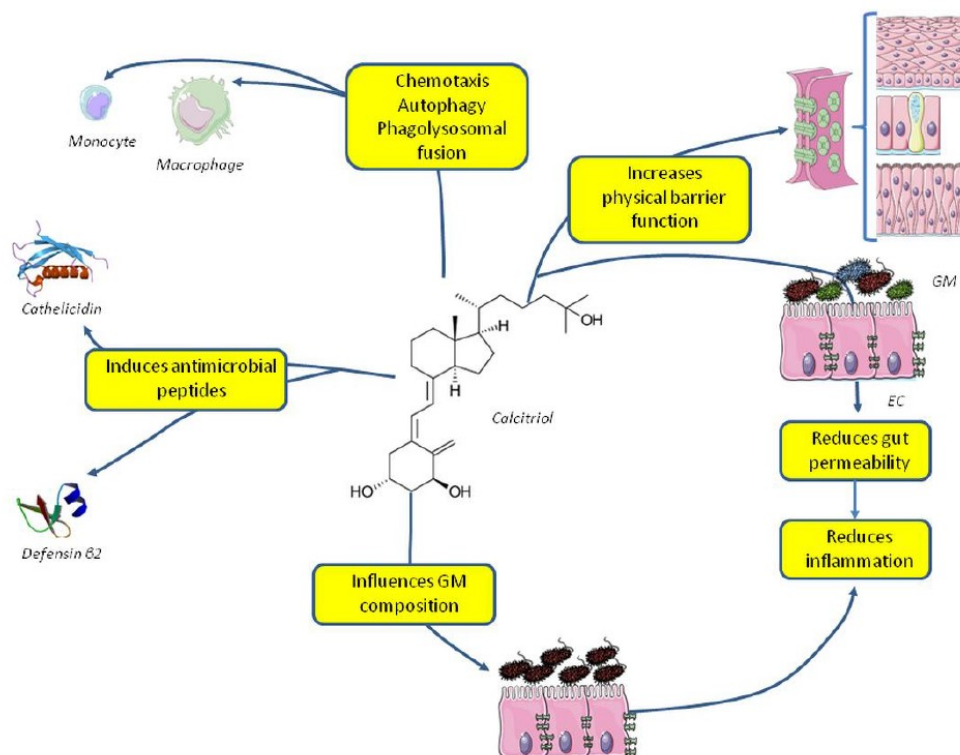
Aktivní metabolit vitamínu D je především produktem jedné specializované buňky v ledvinách a jeho působení je vzdálené od místa produkce cestou vazby na Vdr, což je jaderný transkripční faktor (67). Kalcitriol může být syntetizován i v ostatních tkáních (např. lymfatická tkáň, kůže, pankreas, prostata, mléčná žláza, placenta) (64). Dále je kromě ledvin 1-alfa-hydroxyláza (CYP27B1) exprimována imunitními buňkami. Tyto buňky mající autokrinní a / nebo parakrinní účinky produkují  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  ve vysoké koncentraci do okolí. Regulace syntézy CYP27B1 v imunitních buňkách se liší od signálů regulujících produkci ledvin  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Zánětlivé signály, jako je lipopolysacharid a cytokiny, indukují v monocytech a makrofázích produkci CYP27B1 (65). Předpokládá se, že takto syntetizovaný kalcitriol je zodpovědný za imunomodulaci.

### 3.5.2.1 Vitamin D a vrozený imunitní systém

Vrozený imunitní systém je první obranou proti infekci. Jeho rychlá reakce je nezbytná v boji proti patogenům. Každý systém těla, včetně imunitního, podléhá změnám při přechodu z chráněného nitroděložního prostředí do nesmírně odlišného prostředí vnějšího světa. V důsledku nefunkční získané imunity je novorozenec většinou závislý na vrozené imunitě jako ochraně před patogeny během tohoto přechodu. Toll-like receptory (TLR) rozpoznávají cizí antigeny od vlastních a následně iniciují imunitní odpověď. TLR se začínají vyvíjet v enterocytech tenkého střeva již od 18. – 21. týdne těhotenství (68), zatímco intrapulmonální zánětlivá odpověď není u fetálního myšního modelu detekovatelná do 14. – 15. dne gestace, což odpovídá přibližně 30 týdnům těhotenství u lidí (69). Také TLR4 na monocytech jsou u předčasně narozených dětí exprimované v nízkém počtu (67). Vrozený imunitní systém není u předčasně narozených dětí s velmi nízkou porodní hmotností zcela funkční a v čase teprve dozrává. Rozlišuje patogeny od vlastních buněk a rezidentních mikrobů (mikrobiom) identifikací PAMPs (patogen associated molecular patterns; molekulární vzorce spojené s patogenem) pomocí PRRs (patterns recognition receptors; receptory rozpoznávající vzorce). Nejlépe poznané PRRs jsou TLRs (Toll-like receptors). Jakmile je patogen identifikován, může s ním imunitní systém naložit celou řadou způsobů včetně fagocytózy, opsonizace nebo prezentace patogenu buňkám získaného imunitního systému. Monocyty, makrofágy a epitelální buňky v reakci na zánětlivé cytokiny a aktivaci TLR produkují díky obsahu CYP27B1 intracelulárně kalcitriol s navazujícím intrakrinním efektem. Zvýšená intracelulární hladina kalcitriolu ve výše zmíněných buňkách imunitního systému vede k produkci antimikrobiálních peptidů (Defensin  $\beta$ 2, Cathelicidin). Cathelicidin způsobuje poškození lipoproteinových membrán mikrobů. Vede také k transkripci genů Beclin-1 a Atg5 souvisejících s fagocytózou makrofágů. Kromě přímé antimikrobiální aktivity se cathelicidin podílí na dalších imunitních funkcích, jako je chemotaxe, uvolňování cytokinů, zánětlivá reakce, vaskulární permeabilita a reparace (65, 67). Receptory pro kalcitriol mají i další buňky vrozeného imunitního systému. U neutrofilů vitamin D zlepšuje motilitu a snižuje produkci leukotrienu B4, který hraje důležitou roli v chemotaxi a oxidativním vzplanutí (67). Souhrnně lze říci, že vitamin D je schopen modulovat vrozený imunitní systém, rovněž zvyšuje fagocytární schopnost imunitních buněk a posiluje funkci mechanické bariéry epitelových buněk a to zejména ve střevě (Schéma 4). Vzhledem k roli vitaminu D v obraně organismu proti patogenům, u pacientů postižených akutními nebo

chronickými infekcemi musí být zajištěna dostatečná dávka vitamínu D. Schopnost imunitních buněk hydroxylovat 25(OH)D na jeho aktivní formu 1,25(OH)<sub>2</sub>D naznačuje, že u pacientů s infekcemi je podávání vitamínu D lepší než použití přípravků s hydroxylovanými metabolity, aby se umožnila autokrinní / parakrinní funkce 1,25(OH)<sub>2</sub>D bez překonání hydroxylace a systému zpětné vazby (65).

Po pojem mikrobiom se rozumí všechny komenzální, symbiotické a patogenní mikroorganismy žijící v různých částech lidského těla. Mikrobiom a hostitel mají několik vztahů a pro vývoj, zrání a správnou funkci imunitního systému je nutná dokonalá rovnováha mezi mikrobiomem a hostitelem. Několik článků naznačuje, že vitamin D je jedním z aktérů komplexního vztahu mezi mikrobiomem žijícím ve střevech (GM) a modulací imunitního systému. Vitamin D je zodpovědný za složení mikrobiomu, bariérovou funkci střevního epitelu a za modulaci imunitního systému střeva, takže nízké hladiny mohou být spojeny s větší propustností střev a následně s GM-indukovanou metabolickou endotoxémií, která vyvolává zánět nízkého stupně (65).

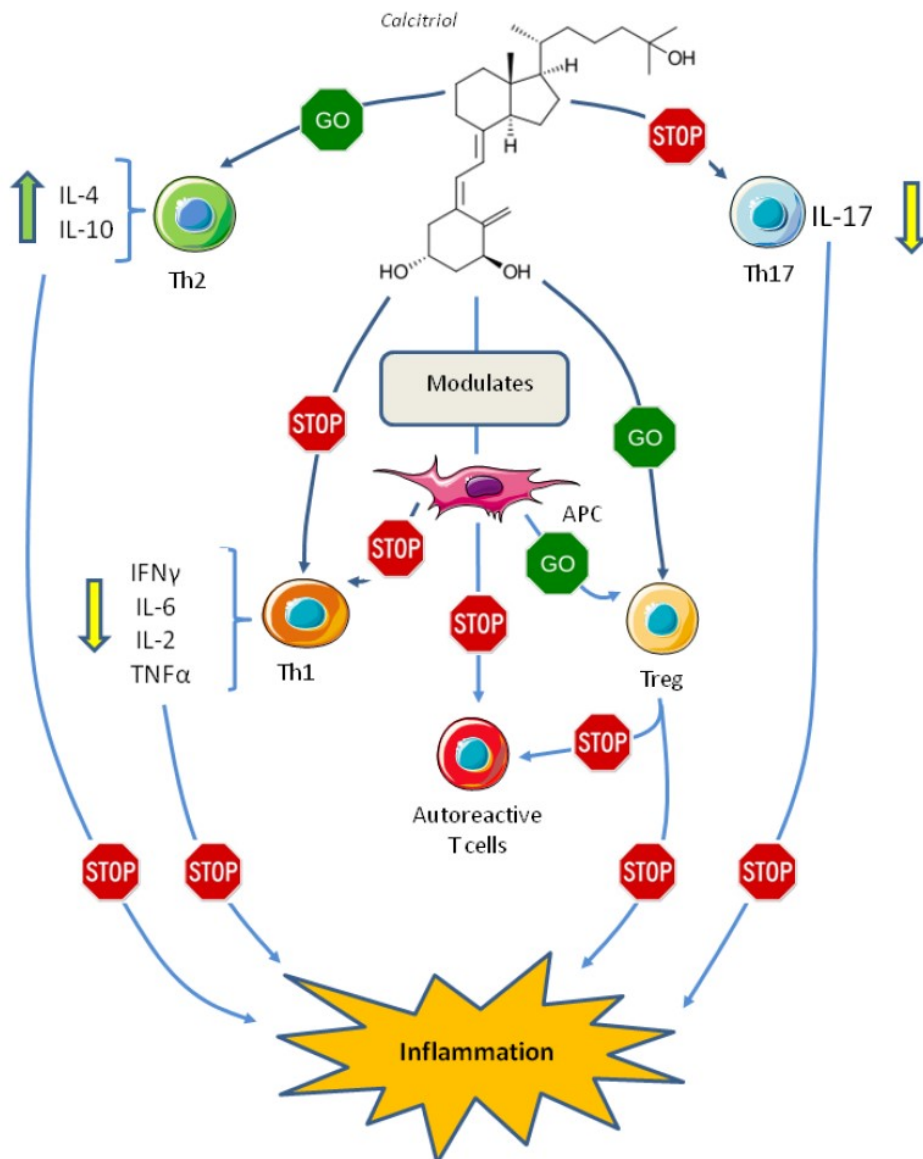


**Schéma 4** Efekt vitamínu D na vrozený imunitní systém a střevní mikrobiom  
Zkratky: EC (enteral cell, střevní buňky); GM (gut microbiota, střevní mikrobiom). Převzato z (65).

### 3.5.2.2 Vitamin D a získaný imunitní systém

Adaptivní imunitní systém neboli získaný imunitní systém je druhou obranou proti infekci. Jeho úlohou je specificky bojovat proti patogenům, je aktivován expozicí patogenům a na rozdíl od vrozeného imunitního systému je díky imunologické paměti schopen odpovídajícím způsobem zvýšit svoji imunitní odpověď. Adaptivní imunitní systém se skládá z T a B lymfocytů a je také zodpovědný za autoimunitní reakci. T, B lymfocyty a dendritické buňky také exprimují CYP27A1 a CYP27B1 spolu s Vdr. Jsou proto citlivé na imunomodulační účinky vitaminu D. Vdr je exprimován pouze v aktivovaných T a B lymfocytech (65, 67). V experimentálních modelech byl prokázán imunomodulační vliv kalcitriolu na několika úrovních. Za prvé „down-reguluje“ imunitní odpověď zprostředkovanou Th1 lymfocyty, čímž inhibuje produkci prozánětlivých cytokinů. Za druhé zvyšuje imunitní odpověď zprostředkovanou Th2 lymfocyty. A za třetí má schopnost suprimovat Th17 aktivitu a podpořit regulační T lymfocyty (Tregs). Th17 lymfocyty produkují IL-17 a jsou spojovány s patogenezi některých autoimunitních chorob. Celkový účinek vitaminu D na diferenciaci Th lymfocytů může být také zprostředkován jeho účinkem na dendritické buňky, jedná se o buňky prezentující antigen (APC), které jsou odpovědné za diferenciaci T lymfocytů na efektorovou buňku s/ nebo protizánětlivými vlastnostmi. Modulace APC je rozhodující pro iniciaci a udržení adaptivní imunitní odpovědi a vlastní tolerance. In vitro diferenciaci dendritických buněk v přítomnosti  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  indukuje „tolerantní stav“ charakterizovaný nízkými hladinami zánětlivých cytokinů, jako je IL-12 a TNF-alfa, zvýšenými hladinami protizánětlivých IL-4 a IL-10, zvýšenou diferenciací Treg buněk a indukci apoptózy v autoreaktivních T lymfocytech (65, 67) (Schéma 5). Souhrnně vzato, k prokázání skutečné úlohy vitaminu D v modulaci získaného imunitního systému u lidí nejsou aktuální znalosti dostatečné. Terapeutické použití vitaminu D a jeho metabolitů u pacientů s cílem modulovat získaný imunitní systém nemá prozatím dostatečnou literární oporu (65).





**Schéma 5 Efekt vitamínu D na získaný imunitní systém**

*Zkratky: APC, antigen předkládající buňky; IFN, interferon; IL, interleukin; Th1, T pomocné lymfocyty 1; Th2, T pomocné lymfocyty 2; Th17, T pomocné lymfocyty 17; TNF, tumor necrosis factor; Treg, T regulační lymfocyty. Převzato z (65).*

### 3.5.3 Hodnocení zásob vitamínu D

Cirkulující 25(OH)D je nejlepším indikátorem stavu vitamínu D v organismu (56). Ačkoli neexistuje globální shoda o optimálních hladinách 25(OH)D v séru, u mnoha autorů je sérová koncentrace <50 nmol/l považována za deficitní a sérová koncentrace <25 nmol/l pak za těžký deficit vitamínu D pro celou dětskou populaci (70-74). Hladina kalcidiolu větší než 50 nmol/l je jednoznačně spojována s prevencí rachitidy v dětském věku, onemocnění způsobeného závažnou nutriční deprivací (51, 70). S rostoucím povědomím o dalších vlivech vitamínu D na imunitní systém, respirační systém, alergické a atopické onemocnění, byla navržena optimální hladina 25(OH)D > 75 nmol/l (51, 75, 76). Nicméně optimální hladina vitamínu D pro novorozence zůstává nadále neznámá a aplikace norem pro dospělé na novorozence je zpochybnitelná (72). K dispozici máme pouze omezené údaje o klinické důležitosti optimální hladiny vitamínu D v séru (> 50 nebo 75 nmol/l), zejména u předčasně narozených novorozenců a stále existuje mnoho kontroverzí. Nalezení optimální hladiny vitamínu D pro předčasně narozené děti v časném novorozeneckém období vyžaduje další výzkum.

Relativně nedávno začal být pro stanovování vitamínu D používán systém tandemové hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií (LC – MS / MS). Zejména pro své rychlejší, specifitější a citlivější hodnocení si systém získal široké uplatnění (77). Z důvodu jejich snadného použití v klinické praxi stále převažuje použití velice rozšířených imunoesejí a to enzymatická imunoesej (EIA) a radio imunoesej (RIA). Gallo prokázal, že ve srovnání s LC – MS / MS mají oba imunologické testy špatné Bland-Altmanovy meze shody pro sérovou hladinu 25(OH)D (RIA: meze shody –27 až +13%; EIA: –12 až 41%). Výsledky sérových hladin vitamínu D pomocí obou imunotestů byly velmi odlišné. Důvodem je pravděpodobně interference protilátek s jinými metabolity vitamínu D jako je 24,25(OH)<sub>2</sub>D nebo C-3 epimery 25(OH)D [C3-epi-25(OH)D]. Na základě těchto údajů se u novorozenců a kojenců do 6 týdnů doporučuje LC-MS / MS ke stanovování hodnot vitamínu D (77).

### 3.5.3.1 C3 epimery vitamínu D

Jak kalcidiol, tak kalcitriol mohou být nevratně metabolizovány řadou oxidací postranního řetězce, které vedou k jejich inaktivaci (viz kapitola metabolismus vitamínu D). Kromě toho bylo relativně nedávno objeveno, že vitamin D<sub>3</sub> může být alternativně metabolizován cestou epimerizace C-3, která je paralelou ke standardní metabolické cestě (78). Tento proces byl poprvé popsán v neonatálních lidských keratinocytech. Při epimerizaci C-3 je hydroxylová skupina v poloze C-3 A-kruhu převedena z alfa na beta orientaci. Studie in vitro i in vivo podporují, že všechny meziprodukty metabolismu vitamínu D mohou být epimerizovány a že tyto epimery mohou být dále metabolizovány stejnými enzymy odpovědnými za hydroxylační a oxidační reakce jako ve standardní cestě, čímž se produkuje C3-epi-25(OH)D, C3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D a C3-epi-24,25(OH)<sub>2</sub>D (79). Ačkoliv dosud nebyl identifikován enzym odpovědný za epimerizaci, aktivita se zdá být jednosměrná a nezávislá na přítomnosti hydroxylových skupin v polohách C-1 nebo C-25. Je také nezávislý na enzymech cytochromu P450 (CYP24, CYP27A1 a CYP27B1). Zdá se, že epimerizace je běžným mechanismem všech hlavních metabolitů vitamínu D. Vyskytuje se i v extrarenálních tkáních a používá enzymy odlišné od klasických jaterních enzymových systémů zapojených do metabolismu vitamínu D (78).

Biologická data naznačují, že C3-epi kalcitriol poskytuje některé, ale ne všechny fyziologické vlastnosti kalcitriolu. Studie in vitro a in vivo potvrdily, že C3-epi-25(OH)D může být metabolizován na 1,25 - formu. C3-epi-25(OH)D a C3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D se vážou na vitamin D vázající protein (DBP) z 36-46 % a na receptor vitamínu D z 2-3 % ve srovnání s příslušnými 25(OH)D a 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Je zajímavé, že C3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D je schopen potlačit sekreci parathormonu a indukovat syntézu fosfolipidů v plicních alveolárních buňkách typu II v hladinách přibližně rovných neepimerní formě. Vzhledem k tomu, že k této aktivitě dochází navzdory neekvivalentní vazbě V<sub>DR</sub>, předpokládá se, že C3-epi-kalcitriol má vyšší metabolickou stabilitu ve srovnání s kalcitriolem (78).

Na základě klinických studií byla prokázána přítomnost C3-epi-25(OH)D v kojenecké, pediatrické i dospělé populaci. Při analýze 9 studií bylo odhaleno, že průměrná hladina C3 epimeru 25(OH)D byla u kojenců do jednoho roku 18.2 nmol/l (což dělalo 21.4 % z celkového kalcidiolu), v pediatrické populaci (1-18 let) a u dospělých byla průměrná hodnota 2.5, respektive 4.3 nmol/l (5.9, respektive 6.1 % z celkového kalcidiolu) (78).

C3-epi-25(OH)D je přítomen u některých těhotných žen a donošených novorozenců, ale nezdá se, že by byl účinně přenášen transplacentárně (80, 81). U těhotných žen bez suplementace byly hladiny C3 epimerů v mateřském séru před porodem a v pupečnickové krvi velmi nízké [1.8, respektive 0 % C3-epi- 25(OH)D z 25(OH)D]. Naopak ve skupině matek s pravidelnou suplementací vitamínem D došlo k vzestupu C3 epimerů jak v séru před porodem [6.3 % C3-epi-25(OH)D z 25(OH)D], tak i v pupečnickové krvi [10.5 % C3-epi-25(OH)D z 25(OH)D] (80). V jiné studii byl v pupečnickové krvi donošených novorozenců C3 epimer 25(OH)D z celkového kalcidiolu taktéž do 10 %, u matek byla suplementace vitamínem D zaznamenána ve 40 % (81). Transplacentární přenos C3 epimerů od matky je funkční, ale jednoznačně nehraje hlavní roli. Vysoké koncentrace C3 epimerů v dětství jsou pravděpodobně způsobeny postnatální tvorbou než fetálními zásobami (66, 79, 80). I když zůstává mechanismus vzniku C3 epimerů neznámý, je plně funkční i u nezralých novorozenců. Ve skupině 32 novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností bylo zastoupení C3-epi- 25(OH)D 6.5-8.0 % z celkového 25(OH)D. Postnatálně během 4-8 týdnů při suplementaci vitamínem D (400-800IU/denně) došlo k rychlému vzestupu hladin C3 epimeru kalcidiolu na 30-45 % z celkového kalcidiolu (66). Sérové výsledky 24,25(OH)<sub>2</sub>D ukazují, že absolutní koncentrace tohoto metabolitu roste v čase velmi pozvolna. To má za následek vyšší 25(OH)D: 24,25 (OH)<sub>2</sub>D poměr (ratio 20-40) než rozmezí pozorované u dospělých (ratio 5-20). To naznačuje, že cytochrom CYP24A1 po narození dozrává pomaleji, čímž dochází k pomalejší degradaci 1,25(OH)<sub>2</sub>D (66).

#### ***3.5.4 Sérové hodnoty vitamínu D u těhotných žen a novorozenců a jejich souvislost s morbiditou***

V posledních letech se objevila řada studií poukazujících na deficitní (pod 50 nmol/l) až těžce deficitní (pod 25 nmol/l) hladiny 25(OH)D u těhotných žen a jejich donošených i nedonošených novorozenců (55, 82-85). Současně bylo zjištěno, že tyto hladiny spolu korelují. Hladina 25(OH)D u donošeného novorozence obvykle dosahuje 70-100 % hladiny matky (3, 84). Globální prevalence sérové hladiny 25(OH)D < 50 nmol/l se u těhotných žen pohybuje kolem 50 % a u novorozenců kolem 75 %. Těžká deficiencie vitamínu D (< 25 nmol/l) byla zachycena u přibližně 20 % těhotných žen a 30 % novorozenců (72).

Přestože hlavní funkcí vitamínu D je jeho úloha v metabolismu kostí, v posledních letech přitahují pozornost i jeho další biologické účinky, zejména ty imunomodulační. Klinický výzkum na poli vitamínu D byl eskalován objevem, že mnoho typů lidských buněk nese receptor pro vitamin D a ten může hrát roli v regulaci buněčné proliferace a diferenciaci (74). Hypovitaminóza D u matek během těhotenství a následná nedostatečná hladina v pupečnickové krvi novorozenců je spojována s možným rozvojem následujících chorob: diabetes mellitus I. typu v dětském věku (86), alergie (87), vyšší riziko infekcí horních a dolních cest dýchacích, bronchiolitidy způsobené respiračním syncytiálním virem (RSV), opakující se pískání, bronchiální astma ve věku 6 let (67, 88, 89), neurokognitivní vývojové poruchy (poruchy řeči, poruchy autistického spektra v časném dětství) (90-92) a snížená kostní hmota u dětí a mladých dospělých s následným rizikem vzniku časně osteoporózy (10, 93). Existují přesvědčivé důkazy, že nízká hladina vitamínu D vede u novorozenců k poruše funkce imunitního systému (94-97). Mechanismus, kterým vitamin D ovlivňuje imunitu, je složitý proces rozebraný v samostatné kapitole (viz 3.5.2). Novorozenci s velmi nízkou porodní hmotností jsou taktéž významně ohroženi nízkou sérovou hladinou vitamínu D z důvodu vysoké prevalence deficiencie vitamínu D v těhotenství, nedostatečné expozice slunečnímu záření během hospitalizace, minimálního množství tukové tkáně (v níž jsou vitamin D a jeho metabolity skladovány) a díky problémům s dosažením adekvátní enterální výživy (53). Na základě několika studií se zdá, že vhodná koncentrace vitamínu D je prospěšná pro prenatální vývoj plic. Nedostatek vitamínu D je dáván do souvislosti s vyšším rizikem syndromu dechové tísně (RDS) a bronchopulmonální dysplázie (BPD) (98-101). Nezralí novorozenci jsou vzhledem k časté hypovitaminóze D u matek náchylní k rozvoji deficitu vitamínu D. Dopad nízkých hladin vitamínu D na časnou a pozdní morbiditu nezralých novorozenců by měl být předmětem dalších studií.

Kombinace celosvětově prokázané vysoké prevalence deficiencie vitamínu D a asociace nízkých hladin vitamínu D s řadou onemocnění prezentujících se od útlého věku by měla vést k zamyšlení nad adekvátností současně používaných norem pro hodnocení zásob vitamínu D a s tím souvisejícího doporučení pro suplementaci vitaminem D, jak pro novorozence a děti, tak pro těhotné ženy. Cílem dalších studií by mělo být zodpovězení těchto otázek.

## 4 Cíle disertační práce

### 1) Cíle pilotní studie:

Odhadnout fyziologické hladiny parathormonu u novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti bez závažné morbidity a posoudit vztah mezi PTH a 25(OH)D, celkovým sérovým vápníkem, sérovým fosforem a alkalickou fosfatázou.

### 2) Cíle prospektivní observační kohortové studie:

- a) Zhodnotit stav vitamínu D u matek a jejich novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností při narození a při propuštění z nemocnice při současném obecně doporučovaném dávkování vitamínu D Evropskou společností pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu.
- b) Porovnat laboratorní parametry kostního metabolismu a sledované charakteristiky časně nemocnosti ve skupině novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti s hladinami 25(OH)D v pupečnickové krvi  $\leq 25$  nmol/l ve srovnání se skupinou novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti s hladinami 25(OH)D v pupečnickové krvi  $> 25$  nmol/l.
- c) Zhodnotit, zda je vitamin D v pupečnickové krvi rizikový faktor pro syndrom dechové tísně u předčasně narozených dětí.

## **5 Metody a soubor nemocných**

### **5.1 Parathormon - referenční meze u novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti a souvislost s dalšími ukazateli kostního metabolismu - pilotní studie**

#### **5.1.1 Soubor pacientů**

Klinická studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (referenční číslo 2013010 S11P). Jednalo se o prospektivní observační studii v Perinatologickém centru Fakultní nemocnice Hradec Králové, která zahrnovala novorozence s porodní hmotností 1000 až 1500 g narozených ve 27. až 31. gestačním týdnu, v období od listopadu 2013 do září 2014. Rodiče podepsali informovaný souhlas před zařazením jejich dítěte do studie. Do studie byli zahrnuti předčasně narození novorozenci bez jiné závažné novorozenecké komorbidity. Vylučovacími kritérii byly vrozené vývojové vady, intrauterinní růstová restrikce, intraventrikulární krvácení stupně III a IV dle Volpeho klasifikace (102), periventrikulární leukomalacie, bronchopulmonální dysplázie středního a těžkého stupně dle Jobeho klasifikace (103), nekrotizující enterokolitida klasifikována dle Bellovy stupnice (104), sepse s multiorgánovou dysfunkcí a novorozenci, kteří zemřeli během hospitalizace.

#### **5.1.2. Protokol studie**

Vzorky krve byly získávány přednostně z pupečního provazce při narození. Pouze v případě nedostupnosti pupečnickové krve byla při příjmu na novorozeneckou jednotku intenzivní péče odebrána krev přímo novorozenci. Krev byla analyzována na hladiny PTH a 25(OH)D. PTH, 25(OH)D, S-Ca, S-P a ALP byly měřeny jedenkrát týdně až do 36. týdne těhotenství. Odběry krve byly prováděny mezi 7. a 8. hodinou ranní. Krev byla odebrána do standardní zkumavky a centrifugována nejpozději do 30 minut. Po oddělení séra byly okamžitě stanoveny hladiny S-Ca, S-P, ALP a PTH. Druhá část séra byla ihned zmrazena na teplotu -80 °C a skladována do definitivní analýzy 25(OH)D. S-Ca, S-P a ALP byly měřeny systémem Cobas 8000, Roche, Basilej, Švýcarsko.

Parathormon byl analyzován chemoluminiscenčním testem na Liaison XL (DiaSorin Deutschland GmbH, Dietzenbach, Německo) určeným pro kvantitativní stanovení 1-84 PTH s vyloučením zkřížené reakce s 7-84 PTH fragmentem obsaženým v lidském séru. Jedná se o

jednu ze dvou imunoanalýz třetí generace. Referenční rozmezí pro dospělé je 1 - 7 pmol/l. Variační koeficient je 5,3 % (105). Vzorky séra nebyly před analýzou nikdy rozmrazeny.

25(OH)D byl stanoven pomocí izotopové diluční kapalinové chromatografie - tandemové hmotnostní spektrometrie ID-LC MS/MS. Tento test kvantitativně měřil oba hlavní metabolity vitamínu D - 25(OH)D<sub>2</sub> a 25(OH)D<sub>3</sub>, nezávisle na sobě, stejně jako C3 epimery těchto metabolitů. ID-LC MS/MS je referenční metoda, ale LC MS/MS s použitím standardního referenčního materiálu SRM972 pro vnitřní kontrolu kvality od National Institute of Standards and Technology (NIST) umožňuje laboratořím také kontrolovat, zda je jejich metoda zatížena interferencí s C3 epimery. Citlivost LC MS/MS metody a separace epimerů 25(OH)D<sub>3</sub> C3 epimerů z metabolitů 25(OH)D<sub>2</sub> a 25(OH)D<sub>3</sub> je velmi důležitá pro vzorky od dětí do 1 roku věku, aby se předešlo nadhodnocení cirkulujícího 25(OH)D (106). Pro účely této studie jsme definovali celkový 25(OH)D jako součet 25(OH)D<sub>2</sub> a 25(OH)D<sub>3</sub> bez C3 epimerů 25(OH)D<sub>2,3</sub>.

Parenterální a enterální výživa sledovaných novorozenců byla vedena podle nutričního protokolu, který byl sestaven dle aktuálních výživových doporučení pro předčasně narozené novorozence (1, 51, 53). V parenterální výživě byl přívod Ca a P postupně zvyšován z 1 mmol/kg/den během prvního dne na 2.25 mmol/kg/den během následujících 4 - 5 dnů. Enterální výživa byla zahájena 30 ml mléka/kg/den a navyšována o 30 ml mléka/kg/den. Děti byly živěny fortifikovaným mateřským mlékem (Nestlé FM85) nebo speciální formulí pro nezralé novorozence (Nutrilon Nenatal, Nestlé PreBeba). Cílové množství mléka bylo 175 - 185 ml/kg/den s odpovídajícím denním příjmem vápníku 190-210 mg/kg/den a fosforu 105-140 mg/kg/den. Suplementace Ca a P byla zahájena na základě nutričního protokolu pouze u novorozenců s hypofosfatemíí pod 1.8 mmol/l prokázané ve dvou po sobě následujících vzorcích krve. Snížení sérového fosforu pod 1.8 mmol/l je způsobeno buď prostým nedostatkem fosforu nebo následkem nedostatku vápníku mechanismem sekundární hyperparathyreózy. Z tohoto důvodu byla suplementace realizována formou Ca/P kapslí obsahujících 52 mg Ca a 26 mg P při denní dávce 2 kapsle/kg, ale ne dříve než ve 3. nebo 4. týdnu života. Účelem bylo nabídnout dítěti optimální poměr Ca:P (2:1) a nezasahovat příliš rychle do adaptačního postnatálního období trvajícího dva až tři týdny.

Enterální a parenterální aplikace vitamínu D všem novorozencům zařazeným do studie byla v souladu s doporučením Evropské společnosti pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu (51). Po narození byla dodávka vitamínu D zajištěna parenterální výživou



obsahující vitamin D2 (Vitalipid N Infant, Fresenius Kabi AB, Uppsala, Švédsko). Po dosažení enterálního příjmu mléka nad 150 ml/kg/den byla zahájena suplementace 500 IU vitaminu D3 (Vigantol gtt./kapky/, Merck KGaA, Darmstadt, Německo). Při cílové dávce fortifikovaného mateřského mléka nebo formule pro nedonošené 175 - 185 ml/kg/den byl celkový denní příjem vitaminu D mezi 800 - 1000 IU.

### **5.1.3. Statistické hodnocení**

Pro zhodnocení demografických a klinických charakteristik předčasně narozených novorozenců byla použity metody deskriptivní statistiky. Všechny hodnoty minerálů v séru a moči, ALP, PTH a 25(OH)D jsou vyjádřeny jako medián a mezikvartilové rozmezí (IQR). K posouzení vztahu mezi PTH a dalšími laboratorními parametry kostního metabolismu byl použit Spearmanův korelační test. Hladina významnosti byla stanovena na  $\alpha = 0.05$ .

### **5.1.4. Cíle pilotní studie**

Odhadnout fyziologické hladiny parathormonu (PTH) u novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti bez závažné morbiditity a posoudit vztah mezi PTH a 25(OH)D, celkovým sérovým vápníkem (S -Ca), sérovým fosforem (S- P) a alkalickou fosfatázou (ALP).

## **5.2 Prospektivní observační kohortová studie**

### **5.2.1. Cíle prospektivní observační studie**

Primárním cílem bylo zhodnotit stav vitaminu D u matek a jejich novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností při narození a při propuštění z nemocnice při současném obecně doporučeném dávkování vitaminu D Evropskou společností pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu.

Sekundárním cílem bylo porovnat laboratorní parametry kostního metabolismu a sledované charakteristiky časně nemocnosti ve skupině novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti s hladinami 25(OH)D v pupečnickové krvi  $\leq 25$  nmol/l ve srovnání se skupinou novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti s hladinami 25(OH)D v pupečnickové krvi  $> 25$  nmol/l.

Terciálním cílem bylo posoudit, zda je vitamin D v pupečnickové krvi rizikovým faktorem pro syndrom dechové tísně u předčasně narozených dětí.

### **5.2.2. Soubor pacientů**

Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (referenční číslo 201510 S14P). Studie probíhala v perinatologickém centru Fakultní nemocnice Hradec Králové a zahrnovala všechny novorozence s porodní hmotností do 1500 g přijaté na jednotku intenzivní a resuscitační péče pro novorozence v období od ledna 2015 do prosince 2016. Od všech těhotných žen před hrozícím předčasným porodem byl získán informovaný písemný souhlas a poté rodiče podepsali informovaný souhlas před zařazením novorozence do studie. Informace o prenatální suplementaci vitamínu D matkám předčasně narozených novorozenců zařazených do studie nejsou k dispozici.

#### **5.2.2.1. Stav vitamínu D u matek a jejich novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností při narození (pupečnicková krev) a při propuštění z nemocnice při současném obecně doporučovaném dávkování vitamínu D.**

Kritéria pro vyloučení ze studie byla: neposkytnutí informovaného souhlasu se studií; chybějící vyšetření vitamínu D v mateřském séru před porodem nebo chybějící vyšetření vitamínu D z pupeční krve; novorozenci, kteří zemřeli krátce po narození anebo měli vrozené vývojové vady.

#### **5.2.2.2. Laboratorní parametry kostního metabolismu a sledované charakteristiky časně morbidity ve skupině novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti. Vitamin D jako rizikový faktor pro syndrom dechové tísně u předčasně narozených dětí.**

Kritéria pro vyloučení ze studie byla: neposkytnutí informovaného souhlasu se studií; chybějící vyšetření vitamínu D z pupeční krve; intrauterinní růstová restrikce plodu; vrozené vývojové vady novorozence.

### **5.2.3. Protokol studie**

Těhotným ženám byly vzorky žilní krve odebrány krátce před porodem. Dále byly provedeny odběry krve z pupečního provazce, u novorozenců byly realizovány odběry žilní krve ve stáří 28 dní a při propuštění z nemocnice. Vzorky mateřského séra a pupečnickové krve byly analyzovány pouze na sérové hladiny 25(OH)D. Parathormon, 25(OH)D, S-Ca, S-P, alkalická fosfatáza, vápník v moči a fosfor v moči vyjádřené jako poměr ke kreatininu v moči byly měřeny u novorozenců ve stáří 28 dní a při propuštění z nemocnice. Odběry krve byly prováděny mezi 7. a 8. hodinou ranní. Krev byla odebrána do standardní zkumavky a

centrifugována nejpozději do 30 minut. Po oddělení séra byly okamžitě stanoveny hladiny S-Ca, S-P, ALP a PTH. Druhá část séra byla ihned zmrazena na teplotu  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a skladována do definitivní analýzy 25(OH)D. Před odběry krve byly sesbírány vzorky moče v intervalu šesti hodin. Bylo prokázáno, že výsledky odpadů minerálů do moči za 6 hodin vysoce korelují s jejich celkovou denní exkrecí (46). S-Ca, S-P, ALP, U-Ca, U-P a U-kreatinin byly měřeny systémem Cobas 8000, Roche, Basilej, Švýcarsko. Parathormon byl analyzován chemoluminiscenčním testem na Liaison XL (DiaSorin Deutschland GmbH, Dietzenbach, Německo) určeným pro kvantitativní stanovení 1-84 PTH s vyloučením zkřížené reakce s 7-84 PTH fragmentem obsaženým v lidském séru. Jedná se o jednu ze dvou imunoanalýz třetí generace. Referenční rozmezí pro dospělé je 1 - 7 pmol/l. Variační koeficient je 5,3% (105). Vzorky séra před stanovováním PTH nebyly nikdy zmrazeny.

25(OH)D byl stanoven pomocí izotopové diluční kapalinové chromatografie - tandemové hmotnostní spektrometrie ID-LC MS/MS. Tento test kvantitativně měřil oba hlavní metabolity vitamínu D - 25(OH)D<sub>2</sub> a 25(OH)D<sub>3</sub>, nezávisle na sobě, stejně jako C<sub>3</sub> epimery těchto metabolitů. ID-LC MS/MS je referenční metoda, ale LC MS/MS s použitím standardního referenčního materiálu SRM972 pro vnitřní kontrolu kvality od National Institute of Standards and Technology (NIST) umožňuje laboratořím také kontrolovat, zda je jejich metoda zatížena interferencí s C<sub>3</sub> epimery. Citlivost LC MS/MS metody a separace epimerů 25(OH)D<sub>3</sub> C<sub>3</sub> epimerů z metabolitů 25(OH)D<sub>2</sub> a 25(OH)D<sub>3</sub> je velmi důležitá pro vzorky od dětí do 1 roku věku, aby se předešlo nadhodnocení cirkulujícího 25(OH)D (106). Pro účely této studie jsme definovali celkový 25(OH)D jako součet 25(OH)D<sub>2</sub> a 25(OH)D<sub>3</sub> bez C<sub>3</sub> epimerů 25(OH)D<sub>2,3</sub>.

Parenterální a enterální výživa sledovaných novorozenců byla vedena podle nutričního protokolu, který byl sestaven dle aktuálních výživových doporučení pro předčasně narozené novorozence (1, 51, 53). V parenterální výživě byl přívod Ca a P postupně zvyšován z 1 mmol/kg/den během prvního dne na 2.25 mmol/kg/den během následujících 4 - 5 dnů. Enterální výživa byla zahájena 30 ml mléka/kg/den a navyšována o 30 ml mléka/kg/den. Děti byly živeny fortifikovaným mateřským mlékem (Nestlé FM85) nebo speciální formulí pro nezralé novorozence (Nutrilon Nenatal, Nestlé PreBeba). Cílové množství mléka bylo 175 - 185 ml/kg/den s odpovídajícím denním příjmem vápníku 190-210 mg/kg/den a fosforu 105-140 mg/kg/den. Enterální a parenterální aplikace vitamínu D všem novorozencům zařazeným do studie byla v souladu s doporučením Evropské společnosti pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu (51). Po narození byla dodávka vitamínu D zajištěna parenterální

výživou obsahující vitamin D2 (Vitalipid N Infant, Fresenius Kabi AB, Uppsala, Švédsko). Po dosažení enterálního příjmu mléka nad 150 ml/kg/den byla zahájena suplementace 500 IU vitaminu D3 (Vigantol gtt./kapky/, Merck KGaA, Darmstadt, Německo). Při cílové dávce fortifikovaného mateřského mléka nebo formule pro nedonošené 175 - 185 ml/kg/den byl celkový denní příjem vitaminu D mezi 800 - 1000 IU.

Ačkoli neexistuje globální shoda o optimálních hladinách 25(OH)D v séru, u mnoha autorů je sérová koncentrace <50 nmol/l považována za deficientní a sérová koncentrace <25 nmol/l pak za těžkou deficienci vitaminu D pro celou dětskou populaci (70-74). Novorozenci splňující indikační kritéria byli rozděleni podle sérové hladiny 25(OH)D na dvě skupiny: na skupinu A s hladinou 25(OH)D ≤ 25 nmol a skupinu B s hladinou 25(OH)D > 25 nmol/l.

#### **5.2.4. Sledované laboratorní a klinické charakteristiky**

Laboratorní měření zahrnovala hladiny vápníku, fosforu, alkalické fosfatázy a parathormonu v séru a kreatininové indexy vápníku a fosforu v moči. Mezi klinické charakteristiky byly zařazeny: intubace na porodním sále, skóre APGAR ≤ 3 v 1. a 5. minutě, syndrom dechové tísně (RDS; diagnostika se zakládá na přítomnosti dechové tísně a typických radiologických nálezů na rentgenovém snímku hrudníku), podání surfaktantu, bronchopulmonální dysplazie (BPD, ≥ střední stupeň; definice BPD podle Jobeho a Bancalariho (103)), použití kortikosteroidů (hydrocortison) pro BPD, medikamentózně léčená otevřená tepenná dučej (patent ductus arteriosus, PDA), pneumothorax, nekrotizující enterokolitida (NEC; definováno pomocí Bellových kritérií (104)), spontánní střevní perforace (SIP), intraventrikulární krvácení (stupeň II-IV, definováno podle Volpeho klasifikace (102)), cystická periventrikulární leukomalacie (PVL), časná a pozdní sepse (kultivačně prokázaná nebo klinicky suspektní sepse léčená antibiotiky po dobu nejméně 5 dnů), retinopatie nedonošených novorozenců všech stupňů, délka hospitalizace, hmotnost, výška a obvod hlavy při propuštění, počet dnů ventilační podpory do propuštění (neinvasivní pozitivní přetlaková ventilace a umělá plicní ventilace), denzitometrie bederní páteře při propuštění a mortalita. Kostní mineralizace byla hodnocena před propuštěním pomocí kostní denzitometrie s použitím komerčně dostupného přístroje DXA (Hologic Discovery A, výrobce, Hologic Inc., 250 Campus Drive, Marlborough, MA 01752 USA) v režimu AP Spine, protokol Infant Spine Analysis (APEX pro Windows 7 verze 4.5.3.2); Hologic). Cílovou oblastí byla denzitometrie bederní páteře (L1-L4). Všechna vyšetření provedl jeden technik. Kostní minerální denzita (BMD, g/cm<sup>2</sup>) byla kalkulována jako podíl obsahu minerálních látek (BMC, g) na plochu kosti (BA, cm<sup>2</sup>).

### **5.2.5. Statistické hodnocení**

Data byla analyzována pomocí statistického softwaru NCSS 11 (2016) (NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA, [ncss.com/software/ncss](http://ncss.com/software/ncss)). Kvalitativní data jsou prezentována jako čísla a procenta, zatímco kvantitativní data jsou uváděna jako medián s mezikvartilovým rozmezím (IQR). Pro kvalitativní údaje bylo meziskupinové srovnání provedeno pomocí testu chí-kvadrát nebo Fisherova exaktního testu. Pro kvantitativní údaje bylo meziskupinové porovnání vypočteno pomocí Mann-Whitneyho nebo Kolmogorov-Smirnovova testu. Srovnání mezi více než dvěma skupinami bylo vypočteno pomocí Kruskal-Wallis ANOVA s post-hoc Dunnovým testem. Ke stanovení korelace mezi dvěma kvantitativními parametry ve stejné skupině byly použity Spearmanovy korelační koeficienty. Nakonec byla použita logická regresní analýza k posouzení rizikových faktorů RDS. Hladina významnosti byla stanovena na  $\alpha = 0.05$ .

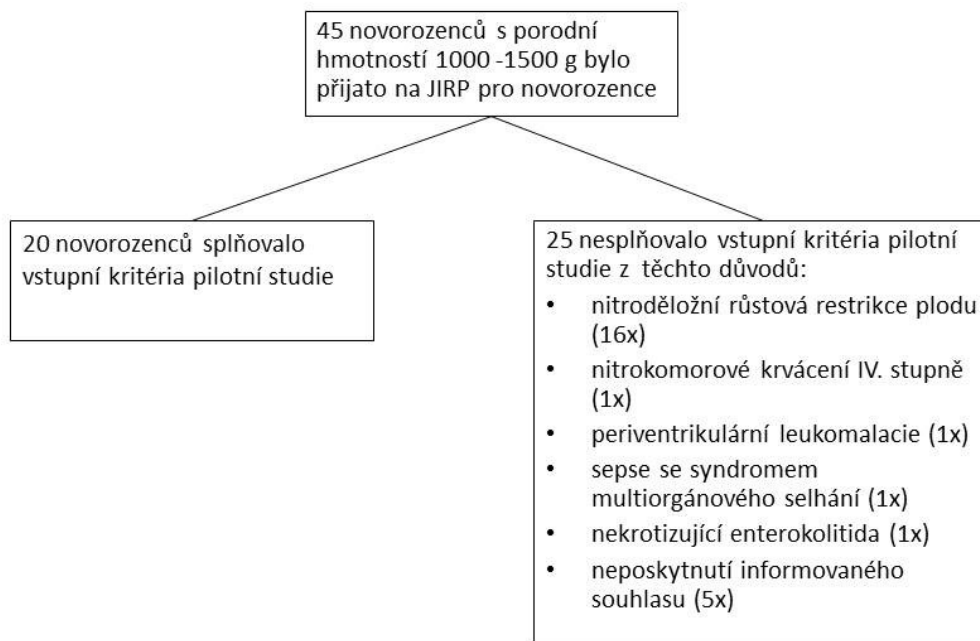
## **6 Výsledky**

### **6.1 Parathormon - referenční meze u novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti a souvislost s dalšími ukazateli kostního metabolismu - pilotní studie**

V období od listopadu 2013 do září 2014 bylo hospitalizováno 45 novorozenců s porodní hmotností 1000 g až 1500 g. 20 z nich splnilo vstupní kritéria pro tuto pilotní studii. Ostatní byli vyloučeni, nejčastěji z důvodu závažné morbidit (schéma 6 - vývojový diagram studijní skupiny). Medián (IQR) gestačního týdne byl 29.2 (28.1-30.1) a porodní hmotnost byla 1255 g (1150-1365 g). 65 % (13) sledované skupiny tvořili chlapci a 35 % (7) dívky. Parenterální výživa byla podávána po dobu 6 dnů (IQR 5-8,5) a během následujícího hospitalizačního pobytu byla enterální výživa 13 dětí zajištěna fortifikovaným mateřským mlékem, u 6 dětí kombinací fortifikovaného mateřského mléka a formule pro nedonošené a pouze formulí pro nedonošené u 1 novorozence. Pouze 3 novorozenci potřebovali dodatečnou suplementaci Ca a P od 2. měsíce života. 80 % dětí trpělo syndromem dechové tísně a medián (IQR) trvání podpory dýchání byl 22 (2-37) dnů. Vzhledem k metodice studie nedošlo u žádného

novorozence k rozvoji závažné novorozenecké komorbidity. Demografické a klinické charakteristiky jsou shrnuty v tabulce 4.

### Schéma 6 Vývojový diagram souboru pacientů



**Tabulka 4 Demografické a klinické charakteristiky**

<b>Charakteristiky</b>	<b>Hodnoty</b>
Porodní hmotnost, g, medián (IQR)	1255 (1150 – 1365)
Gestační týden, medián (IQR)	29.2 (28.1-30.3)
Kompletní indukce plicní zralosti, počet (%)	12 (60)
Mužské pohlaví, počet (%)	13 (65)
Syndrom dechové tísně, počet (%)	16 (80)
nCPAP, dny, medián (IQR)	22 (2-37)
Umělá plicní ventilace, dny, medián (IQR)	0 (0-0)
Enterální výživa - fortifikované mateřské mléko, počet (%)	13 (65)
Enterální výživa – Formule pro nedonošené děti, počet (%)	6 (30)
Parenterální výživa – dny, medián (IQR)	6 (5-8.5)
Bronchopulmonální dysplázie (mírná forma), počet (%)	10 (50)
Bronchopulmonální dysplázie (střední/těžká forma), počet (%)	0 (0)
Pneumothorax	0 (0)
Časná sepse novorozence, počet (%)	0 (0)
Pozdní sepse novorozence, počet (%)	4 (20)
Nekrotizující enterokolitida	0 (0)
Nitrokomorové krvácení stupeň I., počet (%)	7 (35)
Nitrokomorové krvácení stupeň II. a III., počet (%)	0 (0)
Periventrikulární leukomalacie, počet (%)	0 (0)
Retinopatie nedonošených stupeň I., počet (%)	1 (5)
Retinopatie nedonošených stupeň II-V., počet (%)	0 (0)

### **6.1.1. Parathormon**

Hladina PTH v pupečnickové krvi (n = 10) byla velmi nízká (medián; IQR): 0.9 (0.6 - 1.6) pmol/l. U ostatních novorozenců, u nichž nebyla k dispozici pupečnicková krev, byl PTH měřen v séru během prvních 24 hodin života (n = 7) a jeho hladina byla zcela odlišná

(medián; IQR): 7.4 (4.8 - 11.9) pmol/l. Ve všech vzorcích vyšetřovaných od prvního postnatálního týdne (n = 134) byl medián (IQR) sérových hodnot PTH 4.1 (2.6 - 6.7) pmol/l. Hladiny PTH vyšetřované v týdenních intervalech jsou shrnuty v tabulce 5. Fyziologické rozmezí hladin PTH u předčasně narozených novorozenců bylo odhadnuto jako 1.6 - 9.3 pmol/l. Bylo vypočteno jako 10. percentil (dolní mez) a 90. percentil (horní limit) všech měřených hladin PTH od prvního týdne života (n = 134).

**Tabulka 5 Sérové hodnoty PTH a vitamínu D v průběhu studie**

<b>Týden života</b>	<b>PTH (pmol/l)</b>	<b>Celkový 25(OH)D<sub>2,3</sub> bez C3 epimerů (nmol/l)</b>
0 Pupečnicková krev*	0.9 (0.6 – 1.8) (n = 10)	20.1 (18.6 – 25.4) (n = 12)
0 Krev novorozence**	7.4 (4.8 – 11.9) (n = 7)	45.7 (25.0 – 54.2) (n = 8)
1 (n = 20)	3.7 (2.9 – 6.5)	40.6 (30.9 – 54.7)
2 (n = 20)	5.4 (3.5 – 7.2)	51.1 (38.0 – 57.2)
3 (n = 20)	3.5 (3.0 – 5.4)	55.6 (41.6 – 60.0)
4 (n = 20)	4.5 (3.3 - 6.6)	54.9 (42.6 – 57.7)
5 (n = 20)	4.4 (3.1 – 6.4)	53.6 (45.1 – 61.1)
6 (n = 18)	2.9 (2.3 – 6.0)	52.1 (49.9 – 68.5)
7 (n = 11)	5.6 (1.5 – 7.4)	50.3 (41.8 – 61.7)
8 (n = 8)	4.3 (1.4 – 7.8)	53.2 (37.1 – 69.0)



Legenda:

Medián (IQR); PTH – parathormon; 25(OH)D<sub>2,3</sub> - 25-hydroxy vitamin D<sub>2, 3</sub>

\* pupečnicková krev (2x neúspěšné stanovení PTH)

\*\* odběr krve novorozenci v prvních 24 hodinách (1x neúspěšné stanovení PTH)

### **6.1.2. Vztah mezi parathormonem a ostatními markery kostního metabolismu**

Stanovené hladiny S-Ca, S-P a ALP jsou shrnuty v tabulce 6. Nebyla zjištěna žádná statisticky významná korelace mezi PTH a S-Ca nebo S-P. Podobně nebyl potvrzen žádný vztah mezi hladinami PTH a ALP, s výjimkou 56. dne života ( $p = 0.03$ ;  $Rho = 0.76$ ;  $n = 8$ ). Medián (IQR) hladiny vitamínu D [25(OH)D] ve vzorcích pupečnickové krve ( $n = 12$ ) byl 20.1 (18.6 – 25.4) nmol/l a v séru novorozenců vyšetřených v prvních 24 hodinách po narození byl 45.7 (25.0 – 54.2) nmol/l (Tabulka 5). Pouze 25 % novorozenců v naší kohortě mělo hladinu 25(OH)D v pupečnickové krvi vyšší než doporučených 50 nmol/l. 75 % novorozenců bylo vitamin D deficitních (tj. pod 50 nmol/l) a více než polovina dětí měla těžký deficit vitamínu D (tj. pod 25 nmol/l). Od druhého postnatálního týdne průměrná hladina 25(OH)D mírně překročila doporučených 50 nmol/l. Přesto byl ve 36. gestačním týdnu zjištěn deficit vitamínu D (tj. pod 50 nmol/l) u 30 % nezralých novorozenců zařazených v naší studii, medián (IQR) 58.1 (44.1 – 70.5) nmol/l. V prvních 4 postnatálních týdnech nebyla zachycena signifikantní korelace mezi PTH a vitamínem D [25(OH)D]. Situace se ale změnila od 2. měsíce života (graf 1), kdy byla prokázána významná korelace mezi PTH a 25(OH)D ( $Rho = -0.71$ ,  $p = <0.0001$ ;  $n = 55$ ). S klesající hladinou vitamínu D rostla sérová hladina PTH.

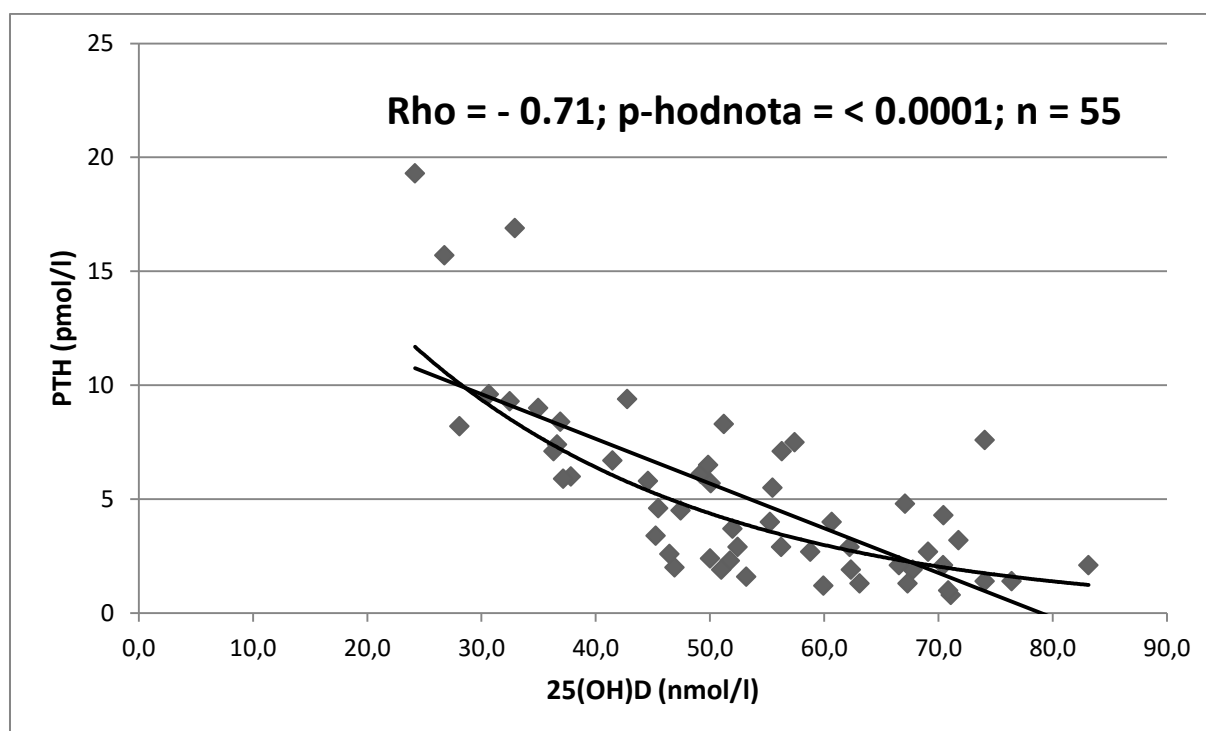
**Tabulka 6 Hodnoty celkového sérového kalcia (S-Ca), sérového fosforu (S-P) a alkalické fosfatázy (ALP) v průběhu studie**

<b>Týden života</b>	<b>S-Ca</b> mmol/l	<b>Phosphorus</b> mmol/l	<b>ALP</b> μkat/l
1 (n = 20)	2.3 (2.2-2.5)	2.1 (1.8-2.5)	5.7 (4.9-6.6)
2 (n = 20)	2.3 (2.2-2.5)	2.2 (2.0-2.4)	5.3 (5.0-6.2)
3 (n = 20)	2.5 (2.4-2.5)	2.2 (2.1-2.3)	5.7 (5.1-6.9)
4 (n = 20)	2.5 (2.4-2.5)	2.1 (1.9-2.1)	5.9 (4.6-7.0)
5 (n = 20)	2.4 (2.3-2.5)	2.1 (2.0-2.2)	5.8 (4.9-6.4)
6 (n = 18)	2.4 (2.3-2.5)	2.0 (1.9-2.2)	5.9 (5.0-6.5)
7 (n = 11)	2.4 (2.3-2.4)	2.0 (1.8-2.1)	5.5 (5.3-6.6)
8 (n = 8)	2.4 (2.3-2.4)	1.9 (1.7-2.0)	6.5 (5.8-7.9)

Legenda:

*Medián, IQR. Medián celkového S-Ca se neměnil od 1. týdne života až do 36. gestačního týdne (2.3 mmol / l [IQR 2.2-2.5]). Medián hodnot S-P měl klesající tendenci od 1. týdne života (2.1 mmol / l [IQR 1.8-2.5]) směrem k 8. týdnu života (1.9 mmol / l [IQR 1.7 až 2.0]) Medián hodnot ALP byl během studie stabilní a jeho hodnota se pohybovala kolem 6 μkat/l.*

**Graf 1 Korelace mezi parathormonem a 25-hydroxyvitaminem D**



Legenda:

*Na bodovém grafu jsou znázorněna měření 25(OH)D (osa x) ve vztahu k hodnotám PTH (osa y) od 5. postnatálního týdne. Statisticky významnou korelaci mezi hladinou parathormonu (PTH) a hladinou 25-hydroxyvitaminu D (25 (OH) D) je možné prokázat od druhého měsíce s korelačním koeficientem pro 25(OH)D  $Rho = - 0.71$  ( $p = <0.0001$ ,  $n = 55$ ). U novorozenců předčasně narozených je klesající hladina vitaminu D doprovázena zvýšením PTH.*

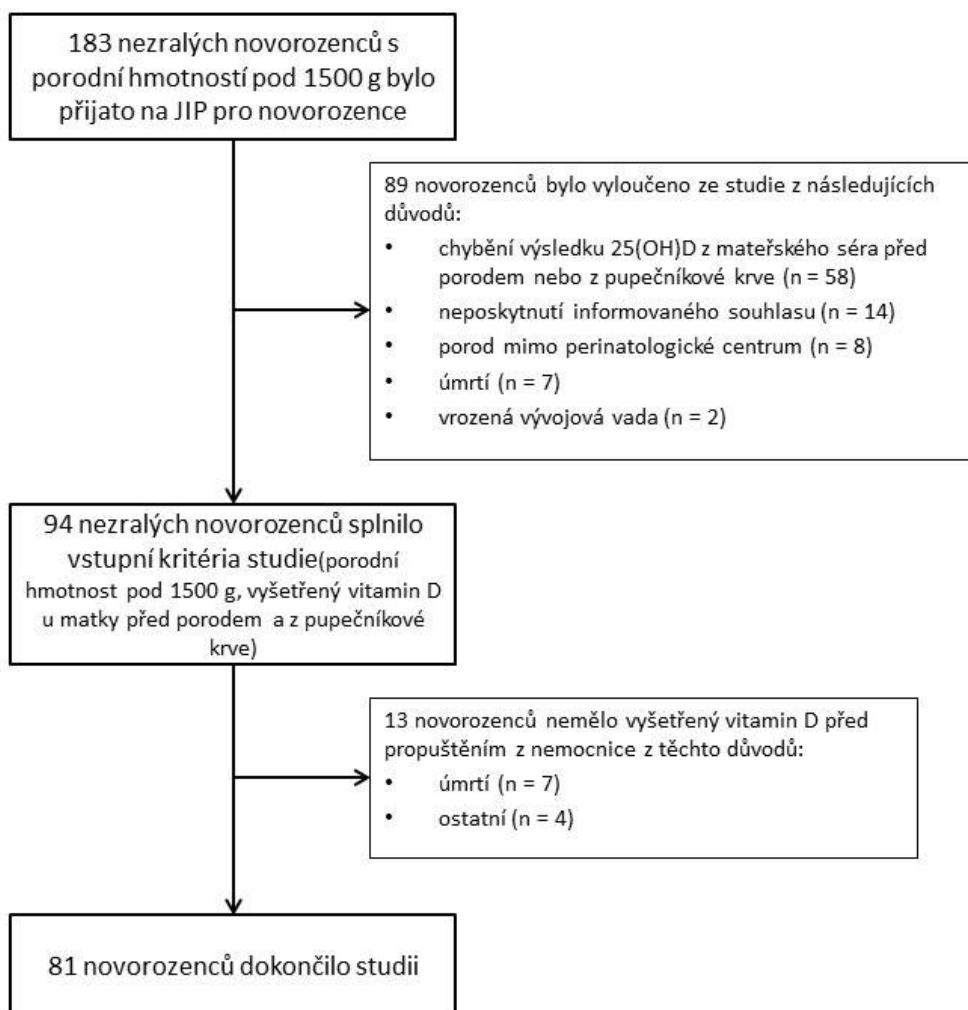
## **6.2 Výsledky prospektivní observační kohortové studie**

**6.2.1. Stav vitaminu D u matek a jejich novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností při narození (pupečnicková krev) a při propuštění z nemocnice při současném obecně doporučovaném dávkování vitaminu D.**

Od ledna 2015 do prosince 2016 bylo na novorozeneckou jednotku intenzivní a resuscitační péče přijato celkem 183 novorozenců s porodní hmotností pod 1500 g. 94 z nich splnilo vstupní kritéria pro tuto studii. Ostatní byli vyloučeni. 13 novorozenců nedokončilo

studii (chybějící vzorek krve při propuštění), nejčastěji kvůli úmrtí během pobytu v nemocnici (schéma 7 - vývojový diagram studijní skupiny). Medián (IQR) gestačního týdne při narození byl 29 (27-30) a porodní hmotnost byla 1160 (850-1316) gramů. 56.4 % (53) studijní skupiny byli chlapci a 43.6 % (41) dívky. Demografické charakteristiky podle gestačního týdne jsou shrnuty v tabulce 7. Všechny těhotné ženy byly kavkazského původu. Obecné charakteristiky matek jsou shrnuty v tabulce 8. Střední hodnota (IQR) vitamínu D [25(OH)D] vzorků mateřského séra před porodem byla 32 (22 - 53) nmol / l. Střední hladina (IQR) vitamínu D [25(OH)D] ve vzorcích pupečnickové krve byla 21 (14 - 36) nmol / l. Pouze 10.5 % (n = 9) těhotných žen a 2.1 % (n = 2) vzorků pupečnickové krve v naší kohortě mělo hladinu 25(OH)D nad 75 nmol / l. 72.1 % (n = 62) vzorků mateřského séra a 91.5 % (n = 86) vzorků pupečnickové krve bylo vitamín D deficientní (pod 50 nmol / l) a 56.4 % (n = 53) vzorků krve z pupečníku bylo těžce deficitní (pod 25 nmol / l). Při propuštění (průměrně v 37. gestačním týdnu) byly hladiny 25(OH)D pod 75 / 50 nmol/l zjištěny u 91.4 % (n = 74) respektive 59.3 % (n = 48) předčasně narozených novorozenců. U 7.4 % (n = 6) předčasně narozených dětí mělo při propuštění 25(OH)D pod 25 nmol / l. Hladiny 25-hydroxyvitamínu D v séru podle GT jsou shrnuty v tabulce 7. Hladiny 25(OH)D v mateřské i pupečnickové krvi vykazovaly sezónní kolísání (Tabulka 8). Byla zjištěna významná korelace mezi vitamínem D [25(OH)D] ve vzorcích mateřského séra a vzorcích pupečnickové krve ( $Rho = 0.83$ ,  $p < 0.0001$ ;  $n = 94$ ) (Graf 2).

Schéma 7 Vývojový diagram souboru pacientů



**Tabulka 7 Demografické charakteristiky novorozenců a hodnoty sérového 25-hydroxyvitaminu D**

<b>Charakteristiky</b>	<b>Všichni novorozenci (n=94)</b>	<b>Narození &lt; 28 GT (n = 33)</b>	<b>Narození &gt; 28 GT (n = 61)</b>
<b>Gestační týden, medián (IQR)</b>	29 (27-30)	26 (25-27)	30 (29-31)
<b>Porodní hmotnost, g, medián (IQR)</b>	1160 (850-1316)	820 (700-930)	1280 (1140-1350)
<b>Mužské pohlaví, počet (%)</b>	53 (56.4)	21 (63.6)	32 (52.5)
<b>25(OH)D u matek před porodem, medián (IQR), nmol/l</b>	32 (22-53)	40 (26-70)	31 (21-43)
<i>Matky s 25(OH)D &lt; 75 nmol/l, n (%)</i>	77 (89.5)	24 (74.4)	53 (96.4)
<i>Matky s 25(OH)D &lt; 50 nmol/l, n (%)</i>	62 (72.1)	17 (54.8)	45 (81.8)
<i>Matky s 25(OH)D &lt; 25 nmol/l, n (%)</i>	32 (37.2)	7 (22.6)	25 (45.5)
<b>25(OH)D z pupečnickové krve, medián (IQR), nmol/l</b>	21 (14-36)	29 (17-48)	17 (14-31)
<i>Pupečnicková krev s 25(OH)D &lt; 75 nmol/l, n (%)</i>	92 (97.9)	31 (93.9)	61 (100)
<i>Pupečnicková krev s 25(OH)D &lt; 50 nmol/l, n (%)</i>	86 (91.5)	28 (84.8)	58 (95.1)
<i>Pupečnicková krev s 25(OH)D &lt; 25 nmol/l, n (%)</i>	53 (56.4)	15 (45.5)	38 (62.3)
<b>Počet dětí při propuštění z nemocnice</b>	81	24	57
<b>Gestační stáří při propuštění, průměr (SD)</b>	37 (2.8)	38 (1.71)	37 (1.75)
<b>25(OH)D u dětí při propuštění, medián (IQR), nmol/l</b>	46 (37-60)	58 (38-72)	44 (37-55)
<i>Děti s 25(OH)D &lt; 75 nmol/l, n (%)</i>	74 (91.4)	19 (79.2)	55 (96.5)
<i>Děti s 25(OH)D &lt; 50 nmol/l, n (%)</i>	48 (59.3)	11 (45.8)	37 (64.9)
<i>Děti s 25(OH)D &lt; 25 nmol/l, n (%)</i>	6 (7.4)	3 (12.5)	3 (5.3)

Zkratky: GT, gestační týden; 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D

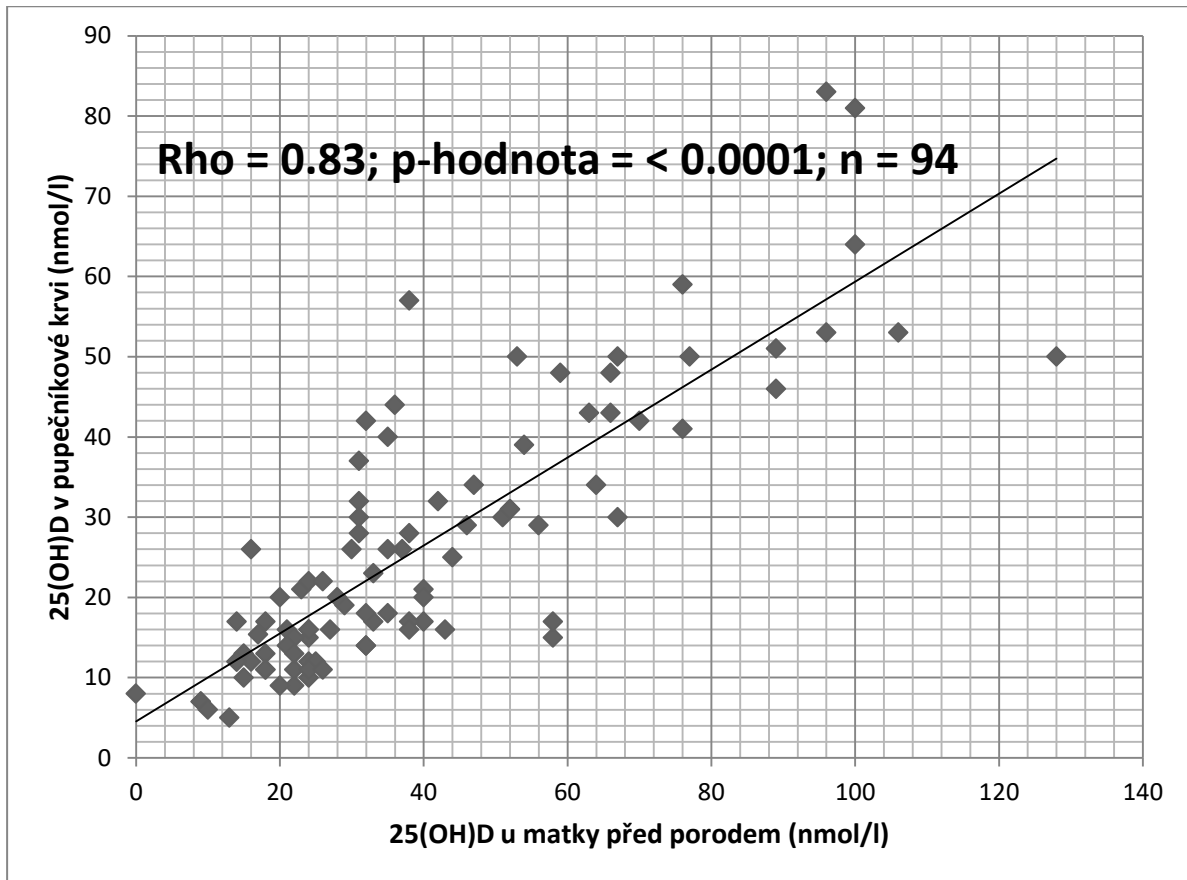
**Tabulka 8 Obecné charakteristiky matek ve studii a sezónní změny vitamínu D**

Charakteristiky		n = 86				
Věk (roky)	< 25	13 (15.1%)				
	26-30	33 (37.4%)				
	31-35	20 (23.3%)				
	> 35	20 (23.3%)				
Parita	Primipara	61 (70.9%)				
	Multipara	25 (29.1%)				
Těhotenství	Jednočetné	71 (82.6%)	<b>25(OH)D; medián (IQR); nmol/l</b>		<b>25(OH)D &lt; 50 nmol/l</b>	
	Dvojčata	15 (17.4%)	<b>Matky</b>	<b>Pupečník</b>	<b>Matky</b>	<b>Pupečník</b>
Roční období	Prosinec-Únor	27 (31.4%)	24 (19-39)	17 (13-27)	25 (92.6%)	28(100%)
	Březen-Květen	21 (24.4%)	24 (22-32)	16 (12-21)	21 (100%)	25 (100%)
	Červen-Srpen	16 (18.6%)	67 (33-91)	47 (29-53)	6 (37.5%)	11 (61.1%)
	Září-Listopad	22 (25.6%)	52 (29-62)	30 (16-44)	10 (45.5%)	22 (95.7%)

Legenda:

*Celkově bylo do studie zařazeno 86 matek. Věkové rozložení odpovídalo současným trendům. Počet prvorodiček převládá, stejně jako jednočetné těhotenství. Z 15 dvojčat osm dětí nesplnilo kritéria pro zařazení do studie. Počet porodů v jednotlivých ročních obdobích byl srovnatelný. Sérové hodnoty vitamínu D v mateřské i pupečnické krvi vykazovaly sezónní změny. V důsledku toho se výskyt deficitu vitamínu D lišil podle ročního období.*

**Graf 2** Korelace mezi mateřským sérovým 25(OH)D při porodu a hodnotou sérového 25(OH)D u novorozenců při narození



Legenda:

*Bodový graf znázorňuje zjištění hodnoty mateřského 25(OH)D před porodem (osa x) ve vztahu k hodnotám 25(OH)D v pupečnickové krvi (osa y). Byla nalezena statisticky významná korelace mezi oběma hladinami ( $Rho = 0.83$ ;  $p = < 0.0001$ ;  $n = 94$ ).*



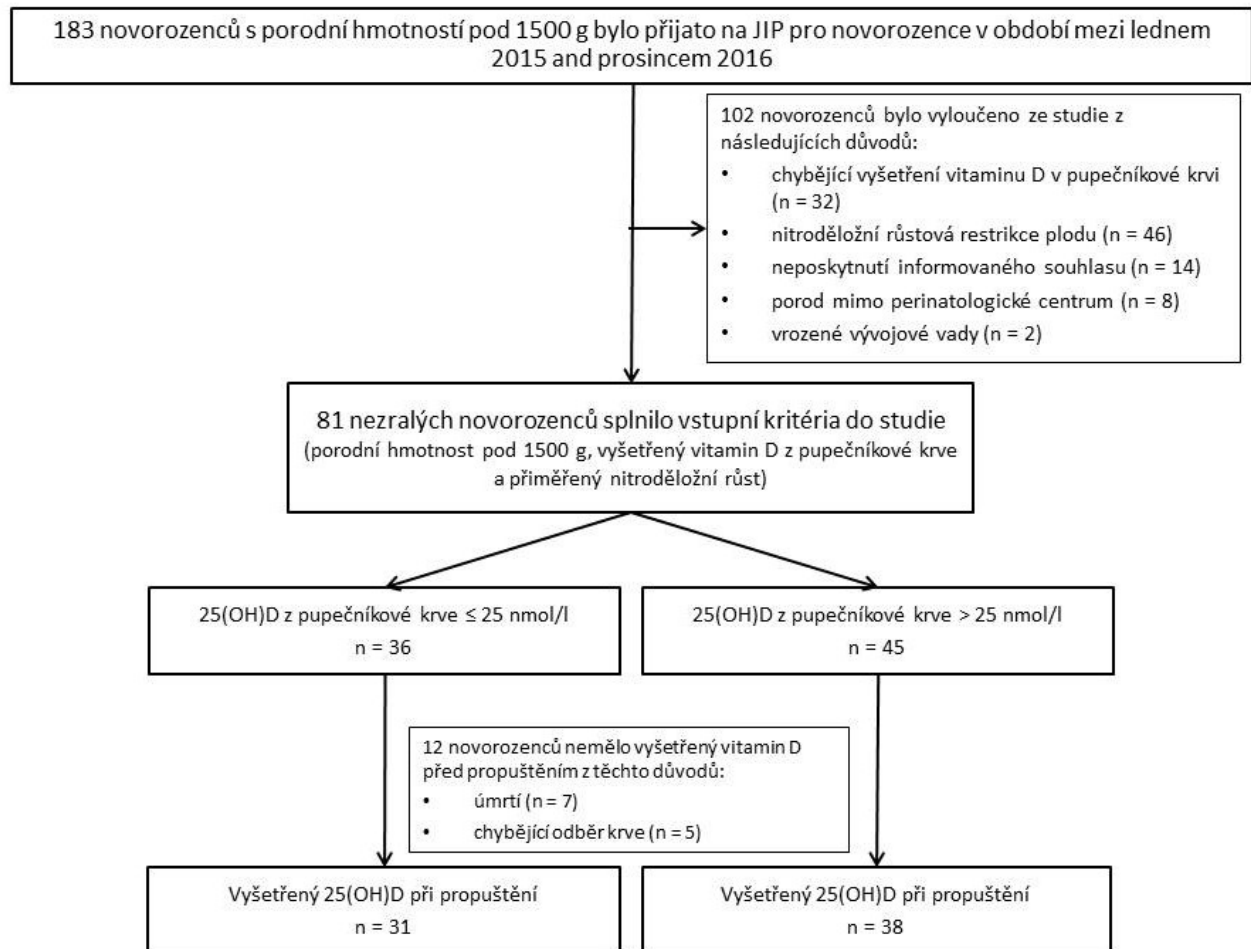
### **6.2.2. Laboratorní parametry kostního metabolismu a sledované charakteristiky časné morbidity ve skupině novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti. Vitamin D jako rizikový faktor pro syndrom dechové tísně u předčasně narozených dětí.**

Od ledna 2015 do prosince 2016 bylo na novorozeneckou jednotku intenzivní a resuscitační péče přijato 183 novorozenců s porodní hmotností pod 1500 g. 81 z nich splnilo vstupní kritéria pro tuto studii a bylo rozděleno do skupin podle hladiny vitamínu D v pupečnickové krvi [skupina A (n = 36): 25(OH)D ≤ 25 nmol / l a skupina B (n = 45): 25(OH)D > 25 nmol / l. 12 novorozenců nedokončilo studii (chybějící vzorky krve při propuštění), nejčastěji kvůli úmrtí během pobytu v nemocnici (Schéma 8 - vývojový diagram studijní skupiny). Medián (IQR) vitamínu D [25(OH)D] všech dostupných vzorků mateřského séra před porodem (n = 59; nedostupných bylo 22 vzorků) byl 38 (24 - 66) nmol / l. Medián (IQR) 25(OH)D vzorků mateřského séra novorozenců zahrnutých do skupiny A (n = 32) a skupiny B (n = 27) byl 24 (18-36), respektive 67 (52-89) nmol/l. Medián (IQR) gestačního týdne všech novorozenců zařazených do studie byl 29 (27-30) týdnů a medián (IQR) porodní hmotnosti byl 1190 (930-1340) g. Medián (IQR) hladiny 25(OH)D v pupečnickové krvi byl 29 (17-48) nmol / l. Při narození mělo 81.5 % novorozenců hladinu 25(OH)D <50 nmol / l a 44.4 % mělo hladinu <25 nmol / l. Všechny děti byly kavkazského původu. 59.3 % (48) ze studijní skupiny byli chlapci a 40.7 % (33) byly dívky (Tabulka 9).

S použitím mezní hodnoty 25(OH)D 25 nmol / l byly zařazení novorozenci rozděleni do dvou skupin, skupina A 25(OH)D ≤ 25 nmol / l a skupina B: 25(OH)D > 25 nmol / l. Následně byly obě skupiny porovnávány mezi sebou v laboratorních a klinických parametrech (Tabulka 9 a 10). U žádného z následujících laboratorních nálezů a klinických charakteristik nebyl nalezen statisticky významný rozdíl: intubace na porodním sále, Apgar skóre ≤ 3, RDS, podání surfaktantu, bronchulmonální dysplazie steroidy pro BPD, farmakologicky léčený PDA, pneumothorax, nekrotizující enterokolitida, spontánní střevní perforace, intraventrikulární krvácení III.-IV.stupně, PVL, časná sepse novorozence, pozdní sepse novorozence, retinopatie nedonošených novorozenců, délka hospitalizace, hmotnost, výška a obvod hlavy při propuštění, počet dnů umělé plicní ventilace, počet dnů neinvazivní dechové podpory do propuštění, úmrtí do propuštění, obsah a hustota minerálů v kostech (BMC a BMD) při propuštění. Medián (IQR) gestačního týdne novorozenců ve skupině A byl 29 (28-30) týdnů versus 28 (26-29) týdnů ve skupině B (signifikantní rozdíl) a medián (IQR) porodní hmotnosti byl 1270 (1075-1385) g ve skupině A versus 1110 (840-1330) g ve skupině

B (nesignifikantní rozdíl). Byl nalezen signifikantní rozdíl v mediánu Ca/kreatininového indexu. Ve stáří 28 dnů měli novorozenci ve skupině A:  $25(\text{OH})\text{D} \leq 25 \text{ nmol} / \text{l}$  nižší hladinu vápníku v moči ( $p = 0.0272$ ). Ostatní demografické charakteristiky a laboratorní výsledky (prenatální steroidy, způsob porodu, gestační týden při propuštění, hladina  $25(\text{OH})\text{D}$  při propuštění, sérový vápník, sérový fosfor, alkalická fosfatáza, PTH a fosfor/kreatininový index) byly srovnatelné u obou skupin novorozenců (Tabulka 9). Byla zachycena tendence k vyššímu riziku RDS, použití kortikosteroidů z důvodu BPD a ROP ve skupině s  $25(\text{OH})\text{D} > 25 \text{ nmol} / \text{l}$ , nicméně tento rozdíl nenabyl statistické významnosti. Logistická regresní analýza prokázala, že hladina vitamínu D z pupečnickové krve naší kohortě nevede k vyššímu nebo nižšímu riziku RDS a gestační týden je jediným nezávislým rizikovým faktorem pro RDS ( $p = 0.0124$ ), odds ratio (OR): 0.554, 95% CI (0.35–0.88). S každým poklesem gestačního stáří o jeden týden se zvyšuje pravděpodobnost RDS o 45 % (Tabulka 11).

**Schéma 8 Vývojový diagram souboru pacientů**



**Tabulka 9 Porovnání demografických a laboratorních nálezů mezi skupinami**

<b>Charakteristiky</b>	<b>Všichni novorozenci (n= 81)</b>	<b>Skupina A (<math>\leq 25</math> nmol/l) (n = 36)</b>	<b>Skupina B (<math>&gt; 25</math> nmol/l) (n = 45)</b>	<b>P -hodnoty</b>
<b>Gestační stáří v týdnech, medián (IQR)</b>	29 (27-30)	29 (28-30)	28 (26-29)	<b>0.0484</b>
<b>Porodní hmotnost, g, medián (IQR)</b>	1190 (930-1340)	1270 (1075-1385)	1110 (840-1330)	0.0747
<b>Mužské pohlaví, n (%)</b>	48 (59.3)	19 (52.8)	29 (64.4)	0.288
<b>Prenatální steroidy (indukce plicní zralosti)</b>				
- Kompletní, n (%)	48 (59)	20 (56)	28 (62)	0.318
- Nekompletní, n (%)	31 (38)	14 (39)	17 (38)	
- Žádná, n (%)	2 (2)	2 (6)	0 (0)	
<b>Způsob porodu</b>				
- Vaginální, n (%)	41 (51)	18 (50)	23 (51)	0.921
- Císařský řez, n (%)	40 (49)	18 (50)	22 (49)	
<b>25(OH)D u matek před porodem, medián (IQR), nmol/l</b>	38 (24-66)	24 (18-36)	67 (52-89)	
<b>25(OH)D z pupečnickové krve, medián (IQR), nmol/l</b>	29 (17-48)	16 (12-18)	46 (32-53)	
- 25(OH)D < 50 nmol/l, n (%)	66 (81.5)	36 (100)	30 (66.7)	
<b>Počet dětí při propuštění, n</b>	69	31	38	
<b>Gestační týden při propuštění, průměr (SD)</b>	37 (2,5)	36.7 (2.3)	37.2 (2.5)	0,357
<b>25(OH)D u dětí při propuštění, medián (IQR), nmol/l</b>	48 (37-63)	48 (37-62)	48 (37-65)	0.937
- Děti s 25(OH)D < 75 nmol/l, n (%)	62 (89.1)	28 (90.3)	34 (89.5)	1.000
- Děti s 25(OH)D < 50 nmol/l, n (%)	38 (55.1)	17 (54.8)	21 (55.3)	1.000
- Děti s 25(OH)D < 25 nmol/l, n (%)	6 (8.7)	2 (6.5)	4 (10.5)	0.688
<b>Kalcium, medián (IQR), mmol/l</b>				
- Den 28	2.4 (2.4-2.5)	2.5 (2.4-2.5)	2.4 (2.4-2.5)	0.992
- Při propuštění	2.4 (2.3-2.5)	2.4 (2.3-2.4)	2.4 (2.3-2.5)	0.488
<b>Fosfor, medián (IQR), mmol/l</b>				
- Den 28	2.1 (1.9-2.2)	2.1 (1.9-2.2)	2.1 (2.0-2.2)	0.878
- Při propuštění	2.0 (1.9-2.0)	2.0 (1.9-2.1)	2.0 (1.9-2.0)	0.875

<b>Alkalická fosfatáza, medián (IQR), <math>\mu</math>kat/l</b>				
- Den 28	6.8 (4.8-7.2)	5.8 (4.9-6.9)	6.5 (4.6-7.3)	0.497
- Při propuštění	6.6 (5.6-7.8)	6.5 (5.1-8.0)	6.6 (5.7-7.8)	0.732
<b>PTH, medián (IQR), pmol/l</b>				
- Den 28	4.0 (2.7-5.6)	4.0 (3.0-5.7)	3.9 (2.0-5.6)	0.285
- Při propuštění	2.6 (1.6-4.6)	2.8 (2.0-4.8)	2.3 (1.3-3.9)	0.253
<b>Kalcium/kreatininový index, medián (IQR)</b>				
- Den 28	1.5 (0.8-2.7)	1.2 (0.7-2.0)	2.2 (1.1-3.1)	<b>0.0272</b>
- Při propuštění	1.8 (0.7-3.0)	1.7 (0.6-3.0)	1.8 (1.1-2.8)	0.517
<b>Fosfor/kreatininový index, medián (IQR)</b>				
- Den 28	5.6 (2.9-8.4)	5.8 (2.6-8.3)	5.5 (3.3-8.3)	0.670
- Při propuštění	0.9 (0.0-4.9)	0.0 (0.0-3.0)	1.5 (0.0-5.3)	0.196

*Zkratky: 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D; PTH, parathormon. P-hodnoty tučně označují statistickou významnost ( $p < 0.05$ ).*

**Tabulka 10 Porovnání skupiny A a B podle klinických charakteristik**

<b>Charakteristiky</b>	<b>Skupina A (<math>\leq 25</math> nmol/l) (n = 36)</b>	<b>Skupina B (<math>&gt; 25</math> nmol/l) (n = 45)</b>	<b>P-hodnoty</b>
<b>Intubace na porodním sále, n (%)</b>	2 (6)	7 (16)	0.286
<b>Apgar skóre <math>\leq 3</math></b>			
V 1. minutě, n (%)	2 (6)	5 (11)	0.454
V 5. minutě, n (%)	1 (3)	0 (0)	0.444
<b>Syndrom dechové tísně (RDS), n (%)</b>	27 (75)	41 (91)	0.0687
<b>Podání surfaktantu, n (%)</b>	12 (33)	21 (47)	0.225
<b>Broncho-pulmonální dysplasie (BPD, <math>\geq</math> středně těžká), n (%)</b>	2 (6)	3 (7)	1.000
<b>Steroidy (hydrocortison) pro BPD, n (%)</b>	2 (6)	10 (22)	0.0568
<b>PDA – farmakologicky léčená, n (%)</b>	3 (8)	4 (9)	1.000
<b>Pneumotorax, n (%)</b>	1 (3)	2 (4)	1.000
<b>Nekrotizující enterokolitida (všechny stádia NEC), n (%)</b>	1 (3)	6 (13)	0.125
<b>Spontánní střevní perforace (SIP), n (%)</b>	1 (3)	1 (2)	1.000
<b>Nitrokomorové krvácení (stupeň II-IV), n (%)</b>	3 (8)	8 (18)	0.330
<b>Cystická periventrikulární leukomalacie (PVL), n (%)</b>	0 (0)	0 (0)	1.000
<b>Časná sepe novorozence (&lt;72h)</b>			
- hemokultura pozitivní, n (%)	2 (6)	3 (7)	1.000
- klinicky suspektní (hemokultura negativní), n (%)	1 (3)	0 (0)	0.444
<b>Pozdní sepe novorozence</b>			
- hemokultura pozitivní, n (%)	6 (17)	5 (11)	0.526
- klinicky suspektní (hemokultura negativní), n (%)	1 (3)	3 (7)	0.625
<b>Retinopatie nedonošených (všechny stádia ROP), n (%)</b>	3 (8)	11 (24)	0.0774
<b>Délka pobytu v nemocnici, medián (IQR)</b>	60 (46-71)	59 (44-84)	0.528
<b>Propuštění</b>			
- Hmotnost (g), medián (IQR)	2760 (2540-2985)	2790 (2470-3090)	1.000
- Výška (cm), medián (IQR)	47 (46-49)	47 (45-49)	0.542
- Obvod hlavy (cm), medián (IQR)	34 (33-35)	34 (32-35)	0.822

<b>Potřeba umělé plicní ventilace, n (%)</b>	11 (30.6)	19 (43.2)	0,246
<b>Počet dnů na dechové podpoře do propuštění</b>			
- nCPAP, medián (IQR)	14 (4-43)	33 (10-52)	0.171
- IMV, medián (IQR)	0 (0-1)	0 (0-5)	0.432
<b>Úmrtí do propuštění, n (%)</b>	2 (6)	7 (16)	0.286
<b>Denzitometrie lumbální páteře před propuštěním, n</b>	32	36	
BMC (g); medián (IQR)	1,02 (0,83-1,18)	0,99 (0,76-1,13)	0.291
BMD (g/cm <sup>2</sup> ); medián (IQR)	0,13 (0,11-0,13)	0,12 (0,10-0,13)	0.198

*Zkratky: nCPAP, nasální kontinuální pozitivní přetlak; IMV, umělá plicní ventilace; P-hodnoty tučně označují statistickou významnost ( $p < 0.05$ )*

**Tabulka 11 Logistická regresní analýza rizikových faktorů RDS**

	B	SE	Wald	Significance	Odds ratio (OR)	95% CI for OR	
						Lower	Upper
<b>Gestační týden</b>	-0.59	0.26	-2.5	<b>0.0124</b>	0.554	0.349	0.88
<b>Vitamin D z pupečnickové krve (nmol/l)</b>	0.0428	0.0242	1.768	0.0771	1.044	0.995	1.094

Legenda:

*Logistická regresní analýza potvrzuje, že rizikovým faktorem pro RDS v našem souboru pacientů je pouze gestační stáří. Klesající gestační stáří vede ke zvýšenému riziku RDS. Hladina vitamínu D v pupečnickové krvi nevede k vyššímu nebo nižšímu riziku RDS.*

*Zkratky: RDS, syndrom respirační tísně; P-hodnoty tučně označují statistickou významnost ( $p < 0.05$ )*

## 7 Diskuse

### 7.1. Parathormon - referenční meze u novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti a souvislost s dalšími ukazateli kostního metabolismu - pilotní studie

Primárním cílem této pilotní studie bylo odhadnout fyziologické rozmezí hladin sérového PTH v souboru 20 předčasně narozených dětí s porodní hmotností 1000 - 1500 g. Ve snaze posoudit výhradně „fyziologické“ předčasně narozené novorozence byly do studie zařazeny pouze novorozenci bez těžké morbidit, která by mohla významně ovlivnit naměřené hodnoty. Pokud je nám známo, jednalo se o první studii, která se pokusila zjistit fyziologické hodnoty PTH u novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností. Z celkového počtu 134 vyšetřených hladin PTH bylo vypočteno fyziologické rozmezí pro PTH jako 1.65 – 9.3 pmol/l, které je velmi blízké referenčnímu rozmezí pro dospělé (1 - 7 pmol/l). Na základě tohoto zjištění, jsme došli k závěru, že hodnoty PTH pro dospělé mohou být využity v populaci předčasně narozených dětí. Současně se zdá, že vzestup PTH nad výše uvedené



rozmezí u předčasně narozených novorozenců lze považovat za hyperparatyreózu (107). Hodnoty PTH měřené v pupečnickové krvi byly velmi nízké, pod nebo na úrovni dolního limitu norem pro dospělé, což odpovídá předchozím pozorováním (16). V reakci na postnatální pokles ionizovaného vápníku v séru stoupá hladina PTH s cílem kompenzovat tento pokles kalcémie. Z předchozího výzkumu je zřejmé, že k tomu dochází v prvních 24 hodinách života. V průběhu prvního týdne života hladiny PTH pak klesají do referenčního rozmezí pro dospělé populaci (8, 16).

Druhým cílem pilotní studie bylo objasnit vztah mezi PTH a ostatními markery kostního metabolismu. Statisticky významná se ukázala být pouze korelace mezi PTH a 25(OH)D (107). Postnatální funkcí aktivovaného vitamínu D je zajistit absorpci Ca a v menším množství také P ze střeva. Zdá se, že u předčasně narozených dětí je hydroxylace vitamínu D na kalcitriol funkční od prvního dne života (18). Předpokládá se, že vstřebávání Ca ze střeva u velmi nezralých novorozenců je během prvního měsíce života zajištěna především pasivní difúzí. V souvislosti s dozráváním střevní sliznice stoupá v průběhu čtyř postnatálních týdnů resorpce vitamínu D a exprese receptorů pro kalcitriol a transportních proteinů asociovaných s vápníkem (Calbindin D9K, D28K). Dominantním mechanismem absorpce vápníku ze střeva se tak postupně stává transport řízený kalcitriolem (8, 51). Naše publikované výsledky podporují tyto předpoklady. Prokázali jsme, že od druhého měsíce života stoupá sérová hladina PTH v těsné korelaci s klesající hladinou vitamínu D [25(OH)D] (107). Vzestup PTH u novorozenců v našem souboru nelze považovat za projev sekundární hyperparatyreózy, ale spíše za fyziologické změny v rámci odhadovaného fyziologického rozmezí 1.6 – 9.3 pmol/l. Na základě výše zmíněného lze v případě dlouhodobého nedostatku vápníku a/nebo vitamínu D očekávat rozvoj sekundární hyperparatyreózy i u nedonošených novorozenců.

Limitací pilotní studie byl malý počet subjektů a absence objektivní zobrazovací metody diagnostikující MBD. Rentgenové záření detekuje změny při dosažení 20 – 40 % demineralizace (23, 24, 26). Denzitometrie by také nebyla přínosná vzhledem k omezené možnosti porovnání výsledků se standardními údaji pro výpočet T- nebo Z-skóre, tj. vyhodnotit odchylku od zdravé populace předčasně narozených novorozenců. Na základě normálních hodnot vápníku, fosforu a ALP předpokládáme dobrý stav skeletu novorozenců v našem souboru. Průměrné hodnoty celkové kalcémie během studie byly zcela normální a daleko od limitu, který by mohl signalizovat absolutní nedostatek vápníku v organismu. Pokles fosfatémie pod 1.8 mmol/l, tj. pod renální práh fosforu, lze považovat za známku

nedostatku fosforu a současně je významně spojen s vysokým rizikem rozvoje MBD. Jeho stanovení má dobrou specifitu (95 %), ale velmi nízkou senzitivitu (50 %) (22, 39). Medián sérového fosforu v našem souboru ve všech sledovaných týdnech byl nad uvedenou hodnotou 1.8 mmol/l. Pozvolný pokles hodnot S-P směrem k 8. postnatálnímu týdnu na 1.9 (1.7 – 2.0) mmol/l může souviset s akcelerací růstu a zvýšenou potřebou fosforu mimo kosti, zejména ve svalech (22). Ačkoli ALP je snadno stanovitelný a běžně používaný parametr metabolismu kostí v neonatologii, má velmi omezený význam. Hung zjistil, že hodnota ALP ve 3. týdnu života vyšší než 12  $\mu$ kat/l má velmi nízkou senzitivitu a specifitu (73 %) pro rozvoj MBD v dalším postnatálním průběhu (41). Částečně je možné použít měření ALP společně s dalšími markery, zejména s fosforem. Maria Christina Backströmová prokázala, že hladina ALP nad 12  $\mu$ kat/l spolu s hladinou P pod 1.8 mmol/l má 100% senzitivitu a 70% specifitu pro sníženou kostní denzitu (39). S přihlédnutím k velmi nízkým hodnotám ALP (kolem 6  $\mu$ kat/l) v naší skupině „fyziologických“ novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností je možné riziko rozvoje MBD považovat za minimální.

Řada studií z posledních let prokázala velmi nízké hladiny 25(OH)D jak u těhotných žen, tak u jejich donošených či nedonošených novorozenců (55, 82-85). Monangi poukázal na nedostatečné hladiny 25(OH)D u 2/3 matek a jejich předčasně narozených novorozenců (83). Výsledky pilotní studie jsou prakticky identické, 75 % našich novorozenců mělo v pupečnickové krvi deficitní hladiny 25(OH)D. I přes 4-8 týdnů trvající suplementaci vitamínem D dle aktuálního doporučení ESPGHAN přetrvával deficit vitamínu D až u 30 % novorozenců v pilotní studii.

## **7.2 Diskuze - Prospektivní observační kohortové studie**

### ***7.2.1. Stav vitamínu D u matek a jejich novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností při narození (pupečnicková krev) a při propuštění z nemocnice při současném obecně doporučovaném dávkování vitamínu D.***

Byla prokázána velmi vysoká prevalence deficitu vitamínu D (< 50 nmol / l) u těhotných žen (71.3 %) a v pupečnickové krvi jejich novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností (91.5 %) (88). Globální prevalence hladiny 25(OH)D < 50 nmol / l je 54 % u

těhotných žen a 75 % u novorozenců, zatímco 18 % těhotných žen a 29 % novorozenců má hladinu vitamínu D < 25 nmol / l, což je prahová hodnota svědčící o zvýšeném riziku rozvoje nutriční křivice (72). Těžký deficit vitamínu D byl v našem souboru nalezen u 36 % těhotných žen a 56 % předčasně narozených novorozenců. Ve srovnání se zbytkem světa máme podstatně horší výsledky. V řadě studií je možné nalézt dvojnásobné hodnoty vitamínu D v mateřské a pupečnickové krvi (75, 82, 83, 108-111). Pouze několik článků popisuje srovnatelné výsledky. Většina žen však měla nízké socioekonomické zázemí nebo se jednalo o stoupenkyně tradičního islámského stylu (84, 112, 113).

Dále náš výzkum našel silnou korelaci mezi hodnotou 25(OH)D v mateřské a pupečnickové krvi a tím pádem jasnou souvislost mezi nedostatečnými zásobami vitamínu D u žen během těhotenství s deficitem tohoto vitamínu u předčasně narozených novorozenců (88). Mnoho studií dospělo k podobným závěrům (84, 109, 110, 112, 113). Byla publikována řada randomizovaných studií na téma suplementace vitamínem D během těhotenství, nicméně s protichůdnými výsledky a závěry. Světová zdravotnická organizace nedoporučuje suplementaci vitamínem D těhotným ženám (114). Nicméně výzkum na tomto poli objevil, že aplikace jedné depotní dávky nebo pravidelné podávání vitamínu D těhotným ženám zvyšuje 25-hydroxyvitamin D v séru a může vést ke snížení rizika preeklampsie, nízké porodní hmotnosti a předčasněho porodu (115). De-Regil taktéž upozornil na spojitost suplementace vitamínem D v těhotenství s větší tělesnou délkou a obvodem hlavy u novorozenců po porodu (115). Systematická review a metaanalýza 43 studií, které zahrnovaly 8406 účastníků, ukázala velmi podobné údaje jako v předchozí studii, a to že prenatální suplementace vitamínem D je spojena se zvýšenou hladinou 25-hydroxyvitamínu D v mateřském séru a pupečnickové krvi, se zvýšením průměrné porodní hmotnosti, se snížením rizika nízké porodní hmotnosti, s poklesem rizika pískotů a prodloužením tělesné délky kojenců v jednom roce života (116). Americká společnost pro endokrinologii doporučuje pro těhotné a kojící ženy dávku vitamínu D alespoň 1500–2 000 IU / d, a to s cílem dosažení hladiny 25(OH)D nad 75 nmol / l (117). Při použití standardních dostupných multivitaminových preparátů (průměrně 400-800 IU vitamínu D denně) dosahuje pouze 11-21 % těhotných žen hladinu 25(OH)D nad 75 nmol / L (109). Nandal a kol. (113) uvedli, že téměř 70 % těhotných žen, které dostávaly dávku vitamínu D větší než 4 000 IU denně, mělo hladinu vitamínu D v pupeční krvi > 75 nmol / l, zatímco u těhotných žen bez suplementace to bylo pouze 3.3 %. O'Callaghan (110) navrhl jako doporučenou dávku 30 mikrogramů (1200 IU) vitamínu D denně, která by bezpečně udržovala sérové hladiny 25(OH)D  $\geq$  50 nmol / l téměř u všech těhotných žen s bílou pletí

žijících na severní polokouli. To vede k dosažení hladiny 25(OH)D v pupečnickové krvi  $> 25$  nmol / l u 99 % novorozenců a  $> 30$  nmol / l u 95 % novorozenců. Zdá se, že optimální dávka vitamínu D pro těhotné ženy je 1 000 - 2 000 IU denně. Nedostatky této studie lze spatřovat v nedostatečných informacích o sociálně-ekonomickém stavu matek a nejsou k dispozici žádné informace o suplementaci vitamínem D během těhotenství.

Pro předčasně narozené děti v našem souboru jsme použili podle ESPGHAN doporučovanou dávku vitamínu D 800 - 1 000 IU na den (51). To je ve shodě i s recentním doporučeným postupem České pediatrické společnosti pro suplementaci dětí vitamínem D (118). Novorozenci byli propuštěni do domácí péče průměrně v 37. gestačním týdnu (v průměru po 8 týdnech suplementace vitamínem D), ale přesto téměř 60 % z nich mělo nedostatečnou hladinu vitamínu D  $< 50$  nmol / l. Mnoho studií prokázalo, že dávka 800 - 1 000 IU dokáže účinně snížit prevalenci deficitu vitamínu D a vede k vyšším koncentracím 25(OH)D do 36. gestačního týdne (75, 108, 111, 119, 120). Je třeba zmínit, že hladiny vitamínu D v mateřské a pupečnickové krvi byly ve všech zmíněných studiích dvojnásobné než v naší studii (75, 108, 111, 119, 120). Na základě našich výsledků jsme došli k závěru, že v situaci velmi nízké hladiny 25(OH)D v mateřské a pupečnickové krvi aktuálně doporučovaná dávka vitamínu D 800-1000 IU nemusí být dostatečná k dosažení požadované hladiny 25(OH)D  $> 50$  nmol / l (88). Cho a kol. taktéž uvedli, že dávka 800 IU denně může efektivně zvýšit hladinu vitamínu D u novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti pouze v případě hladiny 25(OH)D při narození  $> 25$  nmol / l (121).

### ***7.2.2. Laboratorní parametry kostního metabolismu a sledované charakteristiky časné morbidity ve skupině novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti. Vitamin D jako rizikový faktor pro syndrom dechové tísně u předčasně narozených dětí.***

V naší prospektivní kohortové studii jsme nezjistili signifikantní rozdíl mezi vybranými parametry minerálového a kostního metabolismu či časnou morbiditou při porovnání skupin nezralých novorozenců s hladinou vitamínu D  $\leq$  nebo  $> 25$  nmol/l. To lze vysvětlit dvěma možnými způsoby. Buď hladina vitamínu D  $\leq$  nebo  $> 25$  nmol/l v pupečnickové krvi nemá žádný vliv na sledované parametry, nebo použitá mezní hodnota 25 nmol / l nemá dostatečnou sílu k detekci rozdílu.

V lednu 2015 byl publikován review stran vlivu vitamínu D na vývoj plic fétu a novorozence. Na základě velmi omezených humánních dat nebylo možné udělat žádné závěry. Laboratorní a animální výsledky však podporují hypotézu, že nedostatek vitamínu D je častým, modifikovatelným rizikovým faktorem pro RDS a BPD (98). V následujících letech vyšlo hned několik dalších studií zabývajících se touto problematikou. Onwuneme, Shah a Joung nenašli žádnou souvislost mezi stavem vitamínu D a RDS, BPD nebo jinými morbiditami nezralých novorozenců. Nicméně Onwuneme našel souvislost mezi stavem vitamínu D a akutní respirační morbiditou definováno jako rozdíl v délce trvání pozitivní přetlakové ventilace a nejvyšší potřebné koncentrace kyslíku na porodním sále a pravděpodobnost potřeby umělé plicní ventilace (99, 122, 123). Fettaah a kol. uvedli, že při použití mezní hodnoty 37.5 nmol / l se doba trvání umělé plicní ventilace mezi skupinami nelišila (100). V naší kohortě nebyla prokázána souvislost hladiny vitamínu D s RDS, BPD ani s trváním dechové podpory. Kromě toho jsme zjistili, že hladina vitamínu D v pupečnickové krvi nevede k vyššímu nebo nižšímu riziku RDS (odds ratio 1.044; 95% confidence interval 0.349-0.88; p = 0.0771). Několik recentních studií však našlo možné spojení mezi stavem vitamínu D a vyšším rizikem RDS nebo BPD. Podle Çetinkaya a kol. je hladina vitamínu D u matky a předčasně narozeného dítěte významným prediktorem BPD (124). Hegazy a kol. prokázal, že nízký sérový vitamin D je při narození nezávislým rizikovým faktorem pro RDS (odds ratio 0.904; 95% confidence interval 0.822-0.994; p = 0.036) (125). Fettaah publikoval práci se závěrem, že vyšší úroveň 25(OH)D může být preventivní pro vývoj RDS (odds ratio 0.6; 95% confidence interval 0.5-0.8; p = 0.001) (100). A konečně Yang (101) zjistil, že u nezralých novorozenců narozených před 30. gestačním týdnem a / nebo mezi 30. a 34. gestačním týdnem byla koncentrace vitamínu D významně nižší, pokud byl jejich stav komplikován rozvojem RDS a BPD, než u těch, které neměly RDS nebo BPD. První gestační věk byl významný z hlediska RDS i BPD a druhý byl významný pouze z hlediska BPD. Autoři předpokládají, že dostatečná hladina vitamínu D je prospěšná pro plicní zránění.

V naší studii byla zachycena tendence k vyššímu riziku RDS, použití kortikosteroidů pro BPD a ROP u novorozenců ve skupině B, nicméně tento trend nebyl statisticky významný. Gestační týden při narození ve skupině B (> 25 nmol / l) byl statisticky významně nižší než gestační týden ve skupině A ( $\leq$  25 nmol / l), což může vysvětlovat relativně vyšší výskyt RDS, použití kortikosteroidů a ROP v této skupině. Navíc multivariační logistická

regresní analýza prokázala, že v naší kohortě je pouze gestační týden nezávislým rizikovým faktorem pro RDS. To znamená, že s klesajícím gestačním týdnem stoupá riziko RDS.

K transplacentárnímu přenosu vápníku a fosforu nikoli však vitamínu D dochází hlavně ve třetím trimestru těhotenství (23). Rovněž bylo publikováno, že hladiny vitamínu D v pupečnickové krvi korelují s mateřskou hladinou vitamínu D jak u předčasně narozených dětí, tak i u donošených novorozenců (18). Studie Atasevena a kol. (126) prokázala, že stav vitamínu D nesouvisí s gestačním věkem [ $r = 0.039$ ;  $p = 0.634$ ]. V práci Parka a kol. sérové koncentrace 25(OH)D jednoznačně nekorelovaly s gestačním věkem. Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v koncentracích 25(OH)D ani ve výskytu těžkého deficitu vitamínu D u těžce, středně nebo lehce nezralých novorozenců (127). Jak jsme již dříve uvedli my i další, koncentrace 25(OH)D u plodu a novorozence závisí na mateřské hladině v průběhu celého těhotenství a významně s ní korelují, protože plod nemá endogenní produkci 25(OH)D a závisí na transplacentárním přenosu (84, 88, 109, 110, 112, 113). Na základě těchto zjištění jsme dospěli k závěru, že předčasný porod nevede k vyššímu riziku nízkých hladin 25(OH)D a pouze aktuální hladina 25(OH)D v mateřském séru je zodpovědná za hladinu vitamínu D u novorozence při porodu. Naše současné výsledky tyto závěry podporují. Předčasně narození novorozenci ve skupině s nižší hladinou vitamínu D měli vyšší gestační věk. Současně hladiny vitamínu D z mateřského séra před porodem u novorozenců zařazených do skupiny B s vyšší hladinou vitamínu D byly více než dvojnásobné než u mateřského séra novorozenců zařazených do skupiny A s nižší hladinou vitamínu D.

Několik studií uvádělo signifikantně nižší hladinu vitamínu D u matek a u jejich donošených či nezralých novorozenců s časnou nebo pozdní sepsí ve srovnání s těmi, kteří sepsí neměli (97, 128). Existuje také potenciální souvislost mezi nedostatkem vitamínu D a nekrotizující enterokolitidou u předčasně narozených dětí (129). Tayel a kol. našli vztah mezi polymorfismem genu pro Vdr (zejména genotyp FokI TT) a vyšším rizikovým faktorem pro novorozeneckou sepsi a nižší hladiny vitamínu D (130).

Role vitamínu D v metabolismu vápníku je obecně známa. Naše data tyto znalosti podporují. Novorozenci ve skupině s  $25(\text{OH})\text{D} \leq 25 \text{ nmol} / \text{L}$  měli ve věku 28 dnů v moči nižší odpady vápníku ( $p = 0.0272$ ). Rozdíl v Ca/krea indexu vymizel do propuštění a to v důsledku vyrovnání sérových hladin 25(OH)D mezi skupinami. Pokud jsme se zaměřili na porovnání stavu mineralizace skeletu mezi skupinami, BMC a BMD lumbální páteře se statisticky nelišily (medián 0.13 vs. 0.12  $\text{g}/\text{cm}^2$ ). Cho a kol. taktéž nenašli signifikantní rozdíl

v kostní denzitometrii lumbální páteře (BMD průměr  $0.11 \pm 0.02$  vs.  $0.10 \pm 0.02$  g/cm<sup>2</sup>) mezi dvěma skupinami nezralých novorozenců rozdělených podle hladiny pupečnickového vitamínu D  $\leq 25$  nmol/l vs.  $> 25$  nmol/l (121). U 279 novorozenců s porodní hmotností pod 1500g a ALP pod 8.5  $\mu$ kat/l při propuštění z nemocnice byla provedena denzitometrie lumbální páteře s následnou stratifikací do skupin dle hodnot naměřené BMD: špatné (<10. percentil)  $<0.068$  g/cm<sup>2</sup>, uspokojivé (10. - 25. percentil) 0.068-0.081 g/cm<sup>2</sup>, dobré (25.-75. percentil) 0.081-0.112 g/cm<sup>2</sup> a velmi dobré (>75. percentil)  $> 0.112$  g/cm<sup>2</sup> (131). Podle tohoto rozdělení by novorozenci v naší kohortě mohli být zařazeni do kategorie dobré až velmi dobré BMD, i přes vysokou prevalenci nízké hladiny vitamínu D v pupečnickové krvi (81.5 %) a při propuštění z nemocnice (55 %). V jiné studii nebyl prokázán vliv dávky vitamínu D 400 IU vs. 800 IU od narození do původního termínu porodu na kostní minerálovou denzitu (55). Několik prací našlo signifikantně nižší hodnoty BMD lumbální páteře u nezralých novorozenců při srovnání s kontrolní skupinou donošených novorozenců. Ve všech případech ale došlo k normalizace BMD u původně nezralých novorozenců nejpozději do 2 let (29-31). V roce 2006 byla v Lancetu publikována studie, která našla souvislost deficientní hladiny vitamínu D v pozdním těhotenství s redukcí BMC u 9 letých dětí při srovnání s kontrolní skupinou dětí matek s normální hladinou vitamínu D (10). Z toho je možné vyvozovat zvýšené riziko časně osteoporózy v dospělosti u dětí vitamín D deficientních matek. Dále je možné se domnívat, že v našem souboru námi nezachycený rozdíl v denzitometrii nevylučuje zvýšené riziko osteoporózy v dospělosti ve skupině novorozenců s těžce deficitní hladinou vitamínu D.

Dávkování vitamínu D u předčasně narozených novorozenců je v současnosti doporučováno mnoha skupinami (75). Z těch důležitějších, AAP doporučuje pro předčasně narozené děti dávku 200–400 IU vitamínu D denně (53) a ESPGHAN doporučuje 800–1 000 IU (51). Podle nedávné metaanalýzy by měla být dávka vitamínu D 400 IU / den dostatečná pro dosažení hladiny 25(OH)D  $> 50$  nmol / l, tj. hladiny, která je schopná zabránit rozvoji nutriční křivice u většiny novorozenců. Ve srovnání s donošenými novorozenci potřebují předčasně narození novorozenci vyšší příjem vitamínu D, aby dosáhli požadovaných hladin 25(OH)D (132). Kromě toho jsme již dříve prokázali, že u předčasně narozených dětí ani 800–1 000 IU / den nestačilo k dosažení suficientních hladin vitamínu D (88, 107). Také v této studii se suplementací vitamínu D 800 – 1 000 IU/den podle doporučení ESPGHAN u všech novorozenců mělo 55 % z nich při propuštění z nemocnice hladinu 25(OH)D  $<50$  nmol / l. Ve skupině A ( $<25$  nmol / l) došlo od narození do propuštění více než k dvojnásobnému zvýšení hladiny 25(OH)D. Ve skupině B ( $> 25$  nmol / l) nedošlo od narození do propuštění

prakticky k žádnému zvýšení hladiny 25(OH)D. Toto zjištění podporuje potřebu vyššího příjmu vitamínu D u nejvíce nezralých novorozenců k dosažení požadovaných hladin 25(OH)D > 50 nmol / l. Potřeba vyššího dávkování vitamínu D u předčasně narozených dětí může být vysvětlena nezralými funkcemi několika orgánů, jako je střevo, játra a ledviny (132). K dispozici jsou jen omezené znalosti o klinické důležitosti optimální hladiny vitamínu D, a to zejména u předčasně narozených novorozenců, a stále existuje mnoho kontroverzí. Optimální dávka suplementace vitamínu D pro předčasně narozené děti v časném novorozeneckém období vyžaduje další výzkum.

## **8 Závěry**

### **8.1. Parathormon - referenční meze u novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti a souvislost s dalšími ukazateli kostního metabolismu - pilotní studie**

Předčasně narození novorozenci, zejména ti s extrémně nízkou porodní hmotností, jsou velmi náchylní k rozvoji MBD. V současné době neexistuje „zlatý standard“ pro diagnostiku MBD. Relativně nově zvažovaným markerem pro diagnostiku MBD nedonošených dětí se ukázal být PTH. Na základě výsledků pilotní studie je odhadované fyziologické rozmezí PTH (1.65 – 9.3 pmol/l) pro novorozence s velmi nízkou porodní hmotností velmi blízké referenčnímu rozmezí pro dospělé (1 – 7 pmol/l). Z toho lze vyvozovat, že referenční meze pro PTH u dospělých lze použít také pro hodnocení hladin PTH u předčasně narozených novorozenců. Současně se zdá, že zvýšení PTH nad tyto normy lze považovat za hyperparatyreózu i u předčasně narozených novorozenců. Při prokázané korelaci mezi hladinou PTH a vitamínem D je možné v případě klinického či laboratorního podezření na MBD či hypovitaminózu D preferovat stanovení PTH, i s ohledem na významně nižší cenu vyšetření (1/3 nákladů oproti stanovení 25OHD). A v případě hyperparatyreózy doplnit vyšetření hladiny vitamínu D. V pilotní skupině předčasně narozených novorozenců byl deficit vitamínu D zachycen v 75 % při narození a v 30 % těsně před propuštěním z nemocnice. Účelem dalších studií by jednak mělo být potvrzení tohoto trendu na větší kohortě



novorozenců a objasnění potenciálního vlivu takto nízkých hladin vitamínu D na nemocnost a úmrtnost nezralých novorozenců.

## **8.2. Prospektivní observační kohortové studie**

### ***8.2.1. Stav vitamínu D u matek a jejich novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností při narození (pupečnicková krev) a při propuštění z nemocnice při současném obecně doporučovaném dávkování vitamínu D.***

Naše studie prokázala v České republice velmi vysokou prevalenci deficitu vitamínu D u těhotných žen a v pupečnickové krvi jejich novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností. Aktuálně doporučená dávka suplementace vitamínu D 800 IU denně nebyla schopna do propuštění z nemocnice dosáhnout hladiny vitamínu D nad požadovaných 50 nebo dokonce 75 nmol / l, a to kvůli velmi vysoké prevalenci maternální deficiencie 25(OH)D. Vysoce efektivní metodou, jak dosáhnout zlepšení hladin vitamínu D v pupečnickové krvi je cílená suplementace matek během těhotenství. Zdá se, že optimální dávka vitamínu D pro těhotné ženy by mohla být 1 000 až 2 000 IU denně. Současná výživová doporučení pro předčasně narozené děti nemusí být dostatečně efektivní k dosažení doporučené cílové hladiny vitamínu D > 50 nmol/l, zejména v situaci těžkého deficitu vitamínu D při narození.

### ***8.2.2. Laboratorní parametry kostního metabolismu a sledované charakteristiky časné morbidity ve skupině novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti. Vitamin D jako rizikový faktor pro syndrom dechové tísně u předčasně narozených dětí.***

V naší prospektivní kohortové studii jsme nezjistili signifikantní rozdíl mezi vybranými parametry minerálního a kostního metabolismu či sledovanými charakteristikami časné nemocnosti při porovnání skupin nezralých novorozenců s hladinou vitamínu D  $\leq$  nebo > 25 nmol/l. Hladina vitamínu D v pupečnickové krvi neměla žádnou souvislost s RDS, BPD ani délkou respirační podpory. Předčasný porod nevede ke zvýšenému riziku nízkých hladin 25(OH)D. Při použití mezní hodnoty vitamínu D 25 nmol / l nebyl prokázán vliv na

mineralizaci skeletu, BMC a BMD lumbální páteře se mezi skupinami nelišily. Porovnáním skupin nezralých novorozenců s hladinou vitaminu D  $\leq$  a  $>$  25 nmol/l jsme neprokázali žádný benefit plynoucí z pupečnickové hladiny vitaminu D  $>$  25 nmol/l.

### **Osobní přínos doktoranda a původnost řešení**

V rámci disertační práce jsem vytvořil design studií a připravil všechny potřebné dokumenty nutné k zahájení a zdárnému průběhu výzkumu. Dále jsem prováděl odbornou práci zahrnující zařazení novorozenců do studie, sledování a dohled nad průběhem studie a zejména sběr dat od všech pacientů (demografická data, sledované biochemické, klinické parametry, morbidita a výsledky denzitometrií). V těsné spolupráci s RNDr. Evou Čermákovou jsem následně statisticky vyhodnotil získaná data a výsledky předkládám v této práci. Závěry jsem prezentoval jak formou přednášek na řadě odborných akcí, tak cestou publikací v impaktovaném časopise.

Podarilo se splnit všechny vytyčené cíle disertační práce. Jedná se o první a doposud jedinou práci, která se pokusila odhadnout fyziologické hodnoty PTH u novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností. Poznatek stran shody s referenčními mezemi pro dospělé je důležitý v každodenní praxi pro správné hodnocení hyperparatyreózy v populaci nezralých novorozenců. Výsledky práce přinášejí důležitou informaci o vysoké prevalenci hypovitaminózy D v těhotenství a pupečnickové krvi nezralých novorozenců v České republice a nedostatečném efektu aktuálně platného a rutinně používaného dávkování vitaminu D. Myslím si, že tato informace může mít vliv na budoucí nutriční standardy týkající se suplementace vitaminem D jak u předčasně narozených dětí, tak i u těhotných žen. Zvažovaná role vitaminu D u mnoha onemocnění napříč medicínou je v posledních letech skloňována v řadě odborných periodik. Tato práce je jednou z mála, která se snažila ozřejmit roli vitaminu D v oblasti neonatologie. I když v souboru našich novorozenců se nepodařilo prokázat souvislost vlivu těžkého deficitu vitaminu D na kostní metabolismus či sledovanou morbiditu, stále se jedná o velmi cenné informace pro další, jistě potřebný výzkum na tomto poli.

## 9 Seznam použité literatury

1. Hay W. TP. Neonatal Nutrition and Metabolism. Cambridge UK: Cambridge University Press; 2006.
2. Yang Y. Skeletal morphogenesis during embryonic development. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009;19(3):197-218.
3. Kovacs CS. Bone development in the fetus and neonate: role of the calciotropic hormones. *Curr Osteoporos Rep.* 2011;9(4):274-83.
4. Rauch F, Schoenau E. The developing bone: slave or master of its cells and molecules? *Pediatr Res.* 2001;50(3):309-14.
5. Frost HM, Schönau E. The "muscle-bone unit" in children and adolescents: a 2000 overview. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000;13(6):571-90.
6. Rauch F, Schoenau E. Skeletal development in premature infants: a review of bone physiology beyond nutritional aspects. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2002;86(2):F82-5.
7. Rauch F, Schoenau E. Changes in bone density during childhood and adolescence: an approach based on bone's biological organization. *J Bone Miner Res.* 2001;16(4):597-604.
8. Kovacs CS. Bone metabolism in the fetus and neonate. *Pediatr Nephrol.* 2014;29(5):793-803.
9. Mitchell DM, Jüppner H. Regulation of calcium homeostasis and bone metabolism in the fetus and neonate. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17(1):25-30.
10. Javaid MK, Crozier SR, Harvey NC, Gale CR, Dennison EM, Boucher BJ, et al. Maternal vitamin D status during pregnancy and childhood bone mass at age 9 years: a longitudinal study. *Lancet.* 2006;367(9504):36-43.
11. Quarles LD. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin Invest.* 2008;118(12):3820-8.
12. Ma Y, Kirby BJ, Fairbridge NA, Karaplis AC, Lanske B, Kovacs CS. FGF23 Is Not Required to Regulate Fetal Phosphorus Metabolism but Exerts Effects Within 12 Hours After Birth. *Endocrinology.* 2017;158(2):252-63.
13. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2004;19(3):429-35.
14. Takaiwa M, Aya K, Miyai T, Hasegawa K, Yokoyama M, Kondo Y, et al. Fibroblast growth factor 23 concentrations in healthy term infants during the early postpartum period. *Bone.* 2010;47(2):256-62.
15. Fatani T, Binjab A, Weiler H, Sharma A, Rodd C. Persistent elevation of fibroblast growth factor 23 concentrations in healthy appropriate-for-gestational-age preterm infants. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2015;28(7-8):825-32.
16. Kovacs CS. Calcium, phosphorus, and bone metabolism in the fetus and newborn. *Early Hum Dev.* 2015;91(11):623-8.
17. Hsu SC, Levine MA. Perinatal calcium metabolism: physiology and pathophysiology. *Semin Neonatol.* 2004;9(1):23-36.
18. Salle BL, Delvin EE, Lapillonne A, Bishop NJ, Glorieux FH. Perinatal metabolism of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(5 Suppl):1317S-24S.
19. Matejek T, Navratilova M, Kokstein Z, Palicka V. Metabolic bone disease in prematurity. *Ces slov Pediatr.* 2015;70(5):303-12.
20. Matejek T. NM, Kokstein Z., Palicka V. Metabolic bone disease in prematurity. *Ces slov Pediatr.* 2015;70(5):303-12.

21. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Shankaran S, Laptook AR, Walsh MC, et al. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2010;126(3):443-56.
22. Pieltain C, de Halleux V, Senterre T, Rigo J. Prematurity and bone health. *World Rev Nutr Diet*. 2013;106:181-8.
23. Harrison CM, Gibson AT. Osteopenia in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2013;98(3):F272-5.
24. Viswanathan S, Khasawneh W, McNelis K, Dykstra C, Amstadt R, Super DM, et al. Metabolic bone disease: a continued challenge in extremely low birth weight infants. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2014;38(8):982-90.
25. Mitchell SM, Rogers SP, Hicks PD, Hawthorne KM, Parker BR, Abrams SA. High frequencies of elevated alkaline phosphatase activity and rickets exist in extremely low birth weight infants despite current nutritional support. *BMC Pediatr*. 2009;9:47.
26. Tinnion RJ, Embleton ND. How to use... alkaline phosphatase in neonatology. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2012;97(4):157-63.
27. Bishop N, Sprigg A, Dalton A. Unexplained fractures in infancy: looking for fragile bones. *Arch Dis Child*. 2007;92(3):251-6.
28. Gerding H, Busse H. Myopia of prematurity (MOP) is definitely not a consequence of skull deformation. *Eur J Pediatr*. 1995;154(3):245-7.
29. Ichiba H, Shintaku H, Fujimaru M, Hirai C, Okano Y, Funato M. Bone mineral density of the lumbar spine in very-low-birth-weight infants: a longitudinal study. *Eur J Pediatr*. 2000;159(3):215-8.
30. Yeste D, Almar J, Clemente M, Gussinyé M, Audí L, Carrascosa A. Areal bone mineral density of the lumbar spine in 80 premature newborns: a prospective and longitudinal study. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2004;17(7):959-66.
31. Quintal VS, Diniz EM, Caparbo VeF, Pereira RM. Bone densitometry by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) in preterm newborns compared with full-term peers in the first six months of life. *J Pediatr (Rio J)*. 2014;90(6):556-62.
32. Bowden LS, Jones CJ, Ryan SW. Bone mineralisation in ex-preterm infants aged 8 years. *Eur J Pediatr*. 1999;158(8):658-61.
33. Smith CM, Coombs RC, Gibson AT, Eastell R. Adaptation of the Carter method to adjust lumbar spine bone mineral content for age and body size: application to children who were born preterm. *J Clin Densitom*. 2006;9(1):114-9.
34. Chan GM, Armstrong C, Moyer-Mileur L, Hoff C. Growth and bone mineralization in children born prematurely. *J Perinatol*. 2008;28(9):619-23.
35. Fewtrell MS, Williams JE, Singhal A, Murgatroyd PR, Fuller N, Lucas A. Early diet and peak bone mass: 20 year follow-up of a randomized trial of early diet in infants born preterm. *Bone*. 2009;45(1):142-9.
36. Harrison CM, Johnson K, McKechnie E. Osteopenia of prematurity: a national survey and review of practice. *Acta Paediatr*. 2008;97(4):407-13.
37. Milan B, Štěpán K. *Metabolická onemocnění skeletu u dětí*. první vydání ed. Praha: Grada Publishing, a.s.; 2002.
38. Rigo J, Nyamugabo K, Picaud JC, Gerard P, Pieltain C, De Curtis M. Reference values of body composition obtained by dual energy X-ray absorptiometry in preterm and term neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1998;27(2):184-90.
39. Backström MC, Kouri T, Kuusela AL, Sievänen H, Koivisto AM, Ikonen RS, et al. Bone isoenzyme of serum alkaline phosphatase and serum inorganic phosphate in metabolic bone disease of prematurity. *Acta Paediatr*. 2000;89(7):867-73.

40. Bayer M. Reference values of osteocalcin and procollagen type I N-propeptide plasma levels in a healthy Central European population aged 0-18 years. *Osteoporos Int.* 2014;25(2):729-36.
  41. Hung YL, Chen PC, Jeng SF, Hsieh CJ, Peng SS, Yen RF, et al. Serial measurements of serum alkaline phosphatase for early prediction of osteopaenia in preterm infants. *J Paediatr Child Health.* 2011;47(3):134-9.
  42. Faerk J, Peitersen B, Petersen S, Michaelsen KF. Bone mineralisation in premature infants cannot be predicted from serum alkaline phosphatase or serum phosphate. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2002;87(2):F133-6.
  43. De Curtis M, Rigo J. Nutrition and kidney in preterm infant. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25 Suppl 1:55-9.
  44. Hellstern G, Pöschl J, Linderkamp O. Renal phosphate handling of premature infants of 23-25 weeks gestational age. *Pediatr Nephrol.* 2003;18(8):756-8.
  45. Jan J, Zdeněk S. *Neonatologie.* Praha: Mladá fronta a.s.; 2013.
  46. Boehm G, Wiener M, Schmidt C, Ungethüm A, Ungethüm B, Moro G. Usefulness of short-term urine collection in the nutritional monitoring of low birthweight infants. *Acta Paediatr.* 1998;87(3):339-43.
  47. Pohlandt F. Prevention of postnatal bone demineralization in very low-birth-weight infants by individually monitored supplementation with calcium and phosphorus. *Pediatr Res.* 1994;35(1):125-9.
  48. Aladangady N, Coen PG, White MP, Rae MD, Beattie TJ. Urinary excretion of calcium and phosphate in preterm infants. *Pediatr Nephrol.* 2004;19(11):1225-31.
  49. Catache M, Leone CR. Role of plasma and urinary calcium and phosphorus measurements in early detection of phosphorus deficiency in very low birthweight infants. *Acta Paediatr.* 2003;92(1):76-80.
  50. Rodriguez A, García-Esteban R, Basterretxea M, Lertxundi A, Rodríguez-Bernal C, Iñiguez C, et al. Associations of maternal circulating 25-hydroxyvitamin D3 concentration with pregnancy and birth outcomes. *BJOG.* 2015;122(12):1695-704.
  51. Agostoni C, Buonocore G, Carnielli VP, De Curtis M, Darmaun D, Decsi T, et al. Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;50(1):85-91.
  52. J F, Ľ P. Vitamín D – nový pohľad na starý vitamín. *Čes-slovPediatr.* 2009;49(7-8):344-51.
  53. Abrams SA, Nutrition Co. Calcium and vitamin d requirements of enterally fed preterm infants. *Pediatrics.* 2013;131(5):e1676-83.
  54. Backström MC, Mäki R, Kuusela AL, Sievänen H, Koivisto AM, Ikonen RS, et al. Randomised controlled trial of vitamin D supplementation on bone density and biochemical indices in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1999;80(3):F161-6.
  55. Natarajan CK, Sankar MJ, Agarwal R, Pratap OT, Jain V, Gupta N, et al. Trial of daily vitamin D supplementation in preterm infants. *Pediatrics.* 2014;133(3):e628-34.
  56. Institute of Medicine Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin DaC. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In: Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB, editors. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D.* Washington (DC): National Academies Press (US)
- National Academy of Sciences.; 2011.
57. Lothe A, Sinn J, Stone M. Metabolic bone disease of prematurity and secondary hyperparathyroidism. *J Paediatr Child Health.* 2011;47(8):550-3.
  58. Moreira A, February M, Geary C. Parathyroid hormone levels in neonates with suspected osteopenia. *J Paediatr Child Health.* 2013;49(1):E12-6.

59. Yeşiltepe Mutlu G, Kırmızıbekmez H, Ozsu E, Er I, Hatun S. Metabolic bone disease of prematurity: report of four cases. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2014;6(2):111-5.
60. Czech-Kowalska J, Czekuc-Kryskiewicz E, Pludowski P, Zaniuk K, Jaworski M, Luba A, et al. The Clinical and Biochemical Predictors of Bone Mass in Preterm Infants. *PLoS One*. 2016;11(11):e0165727.
61. Moreira A, Swischuk L, Malloy M, Mudd D, Blanco C, Geary C. Parathyroid hormone as a marker for metabolic bone disease of prematurity. *J Perinatol*. 2014;34(10):787-91.
62. Dowa Y, Kawai M, Kanazawa H, Iwanaga K, Matsukura T, Heike T. Screening for secondary hyperparathyroidism in preterm infants. *Pediatr Int*. 2016;58(10):988-92.
63. Pereira-da-Silva L, Costa A, Pereira L, Filipe A, Virella D, Leal E, et al. Early high calcium and phosphorus intake by parenteral nutrition prevents short-term bone strength decline in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;52(2):203-9.
64. Drabova KB-V, JulieLokaj, PetrDubska, LenkaObermannova, RadkaGreplova, KristinaDemplova, ReginaValik, DaliborSterba, Jaroslav. Vitamin D – jeho fyziologie, patofyziologie a význam v etiopatogenezi nádorových onemocnění. *Čas Lék čes*. 2013;152(1):20–30.
65. Sassi F, Tamone C, D'Amelio P. Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator. *Nutrients*. 2018;10(11).
66. Hanson C, Jones G, Lyden E, Kaufmann M, Armas L, Anderson-Berry A. Vitamin D metabolism in the premature newborn: A randomized trial. *Clin Nutr*. 2016;35(4):835-41.
67. Clancy N, Onwuneme C, Carroll A, McCarthy R, McKenna MJ, Murphy N, et al. Vitamin D and neonatal immune function. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013;26(7):639-46.
68. Fusunyan RD, Nanthakumar NN, Baldeon ME, Walker WA. Evidence for an innate immune response in the immature human intestine: toll-like receptors on fetal enterocytes. *Pediatr Res*. 2001;49(4):589-93.
69. Harju K, Glumoff V, Hallman M. Ontogeny of Toll-like receptors Tlr2 and Tlr4 in mice. *Pediatr Res*. 2001;49(1):81-3.
70. Braegger C, Campoy C, Colomb V, Decsi T, Domellof M, Fewtrell M, et al. Vitamin D in the healthy European paediatric population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;56(6):692-701.
71. Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M, Society DaTCotLWPE. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics*. 2008;122(2):398-417.
72. Saraf R, Morton SM, Camargo CA, Jr., Grant CC. Global summary of maternal and newborn vitamin D status - a systematic review. *Matern Child Nutr*. 2016;12(4):647-68.
73. Saggese G, Vierucci F, Prodam F, Cardinale F, Cetin I, Chiappini E, et al. Vitamin D in pediatric age: consensus of the Italian Pediatric Society and the Italian Society of Preventive and Social Pediatrics, jointly with the Italian Federation of Pediatricians. *Ital J Pediatr*. 2018;44(1):51.
74. Grossman Z, Hadjipanayis A, Stiris T, Del Torso S, Mercier JC, Valiulis A, et al. Vitamin D in European children-statement from the European Academy of Paediatrics (EAP). *Eur J Pediatr*. 2017;176(6):829-31.
75. Anderson-Berry A, Thoene M, Wagner J, Lyden E, Jones G, Kaufmann M, et al. Randomized trial of two doses of vitamin D3 in preterm infants <32 weeks: Dose impact on achieving desired serum 25(OH)D3 in a NICU population. *PLoS One*. 2017;12(10):e0185950.
76. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):1911-30.

77. Gallo S, Comeau K, Agellon S, Vanstone C, Sharma A, Jones G, et al. Methodological issues in assessing plasma 25-hydroxyvitamin D concentration in newborn infants. *Bone*. 2014;61:186-90.
78. Bailey D, Veljkovic K, Yazdanpanah M, Adeli K. Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D(3) C3-epimer. *Clin Biochem*. 2013;46(3):190-6.
79. Yazdanpanah M, Bailey D, Walsh W, Wan B, Adeli K. Analytical measurement of serum 25-OH-vitamin D<sub>3</sub>, 25-OH-vitamin D<sub>2</sub> and their C3-epimers by LC-MS/MS in infant and pediatric specimens. *Clin Biochem*. 2013;46(13-14):1264-71.
80. Bailey D, Perumal N, Yazdanpanah M, Al Mahmud A, Baqui AH, Adeli K, et al. Maternal-fetal-infant dynamics of the C3-epimer of 25-hydroxyvitamin D. *Clin Biochem*. 2014;47(9):816-22.
81. Kiely M, O'Donovan SM, Kenny LC, Hourihane JO, Irvine AD, Murray DM. Vitamin D metabolite concentrations in umbilical cord blood serum and associations with clinical characteristics in a large prospective mother-infant cohort in Ireland. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017;167:162-8.
82. Við Streyrn S, Kristine Moller U, Rejnmark L, Heickendorff L, Mosekilde L, Vestergaard P. Maternal and infant vitamin D status during the first 9 months of infant life-a cohort study. *Eur J Clin Nutr*. 2013;67(10):1022-8.
83. Monangi N, Slaughter JL, Dawodu A, Smith C, Akinbi HT. Vitamin D status of early preterm infants and the effects of vitamin D intake during hospital stay. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2014;99(2):F166-8.
84. Parlak M, Kalay S, Kalay Z, Kirecci A, Guney O, Koklu E. Severe vitamin D deficiency among pregnant women and their newborns in Turkey. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2015;28(5):548-51.
85. Kılıcaslan A, Kutlu R, Kilinc I, Ozberk DI. The effects of vitamin D supplementation during pregnancy and maternal vitamin D levels on neonatal vitamin D levels and birth parameters. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2017:1-8.
86. Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child*. 2008;93(6):512-7.
87. Reinholz M, Ruzicka T, Schaubert J. Vitamin D and its role in allergic disease. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(6):817-26.
88. Matejek T, Navratilova M, Zaloudkova L, Malakova J, Maly J, Skalova S, et al. Vitamin D status of very low birth weight infants at birth and the effects of generally recommended supplementation on their vitamin D levels at discharge. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2019:1-7.
89. Zosky GR, Hart PH, Whitehouse AJ, Kusel MM, Ang W, Foong RE, et al. Vitamin D deficiency at 16 to 20 weeks' gestation is associated with impaired lung function and asthma at 6 years of age. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11(4):571-7.
90. Whitehouse AJ, Holt BJ, Serralha M, Holt PG, Kusel MM, Hart PH. Maternal serum vitamin D levels during pregnancy and offspring neurocognitive development. *Pediatrics*. 2012;129(3):485-93.
91. Whitehouse AJ, Holt BJ, Serralha M, Holt PG, Hart PH, Kusel MM. Maternal vitamin D levels and the autism phenotype among offspring. *J Autism Dev Disord*. 2013;43(7):1495-504.
92. Hart PH, Lucas RM, Walsh JP, Zosky GR, Whitehouse AJ, Zhu K, et al. Vitamin D in fetal development: findings from a birth cohort study. *Pediatrics*. 2015;135(1):e167-73.
93. Zhu K, Whitehouse AJ, Hart PH, Kusel M, Mountain J, Lye S, et al. Maternal vitamin D status during pregnancy and bone mass in offspring at 20 years of age: a prospective cohort study. *J Bone Miner Res*. 2014;29(5):1088-95.

94. Walker VP, Zhang X, Rastegar I, Liu PT, Hollis BW, Adams JS, et al. Cord blood vitamin D status impacts innate immune responses. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(6):1835-43.
95. Dinlen N, Zenciroglu A, Beken S, Dursun A, Dilli D, Okumus N. Association of vitamin D deficiency with acute lower respiratory tract infections in newborns. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(6):928-32.
96. Camargo CA, Ingham T, Wickens K, Thadhani R, Silvers KM, Epton MJ, et al. Cord-blood 25-hydroxyvitamin D levels and risk of respiratory infection, wheezing, and asthma. *Pediatrics.* 2011;127(1):e180-7.
97. Cetinkaya M, Cekmez F, Buyukkale G, Erener-Ercan T, Demir F, Tunc T, et al. Lower vitamin D levels are associated with increased risk of early-onset neonatal sepsis in term infants. *J Perinatol.* 2015;35(1):39-45.
98. Lykkedegn S, Sorensen GL, Beck-Nielsen SS, Christesen HT. The impact of vitamin D on fetal and neonatal lung maturation. A systematic review. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;308(7):L587-602.
99. Onwuneme C, Martin F, McCarthy R, Carroll A, Segurado R, Murphy J, et al. The Association of Vitamin D Status with Acute Respiratory Morbidity in Preterm Infants. *J Pediatr.* 2015;166(5):1175-80.e1.
100. Fettah ND, Zenciroğlu A, Dilli D, Beken S, Okumuş N. Is higher 25-hydroxyvitamin D level preventive for respiratory distress syndrome in preterm infants? *Am J Perinatol.* 2015;32(3):247-50.
101. Yang Y, Feng Y, Chen X, Mao XN, Zhang JH, Zhao L, et al. Is there a potential link between vitamin D and pulmonary morbidities in preterm infants? *J Chin Med Assoc.* 2017.
102. Volpe JJ. Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2001;7(1):56-64.
103. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(7):1723-9.
104. Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, et al. Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg.* 1978;187(1):1-7.
105. Sturgeon CM, Sprague SM, Metcalfe W. Variation in parathyroid hormone immunoassay results--a critical governance issue in the management of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 26. England2011. p. 3440-5.
106. van den Ouweland JM, Beijers AM, Demacker PN, van Daal H. Measurement of 25-OH-vitamin D in human serum using liquid chromatography tandem-mass spectrometry with comparison to radioimmunoassay and automated immunoassay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010;878(15-16):1163-8.
107. Matejek T, Navratilova M, Zaloudkova L, Malakova J, Maly J, Skalova S, et al. Parathyroid hormone - reference values and association with other bone metabolism markers in very low birth weight infants - pilot study. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018:1-8.
108. Fort P, Salas AA, Nicola T, Craig CM, Carlo WA, Ambalavanan N. A Comparison of 3 Vitamin D Dosing Regimens in Extremely Preterm Infants: A Randomized Controlled Trial. *J Pediatr.* 2016;174:132-8.e1.
109. Zsimevich A, Fijałkowska A, Chełchowska M, Maciejewski T. Maternal serum vitamin D and parathormone concentrations during gestation and in umbilical cord blood - pilot study. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018;31(2):158-63.
110. O'Callaghan KM, Hennessy A, Hull GL, Healy K, Ritz C, Kenny LC, et al. Estimation of the maternal vitamin D intake that maintains circulating 25-hydroxyvitamin D in late gestation at a concentration sufficient to keep umbilical cord sera  $\geq 25$ -30 nmol/L: a dose-



response, double-blind, randomized placebo-controlled trial in pregnant women at northern latitude. *Am J Clin Nutr.* 2018.

111. Tergestina M, Rebekah G, Job V, Simon A, Thomas N. A randomized double-blind controlled trial comparing two regimens of vitamin D supplementation in preterm neonates. *J Perinatol.* 2016;36(9):763-7.

112. Kılıcaslan AÖ, Kutlu R, Kilinc I, Ozberk DI. The effects of vitamin D supplementation during pregnancy and maternal vitamin D levels on neonatal vitamin D levels and birth parameters. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.* 2017:1-8.

113. Nandal R, Chhabra R, Sharma D, Lallar M, Rathee U, Maheshwari P. Comparison of cord blood vitamin D levels in newborns of vitamin D supplemented and unsupplemented pregnant women: a prospective, comparative study. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(11):1812-6.

114. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. WHO Recommendations on Antenatal Care for a Positive Pregnancy Experience. Geneva: World Health Organization

Copyright (c) World Health Organization 2016.; 2016.

115. De-Regil LM, Palacios C, Lombardo LK, Peña-Rosas JP. Vitamin D supplementation for women during pregnancy. *Sao Paulo Med J.* 2016;134(3):274-5.

116. Roth DE, Leung M, Mesfin E, Qamar H, Watterworth J, Papp E. Vitamin D supplementation during pregnancy: state of the evidence from a systematic review of randomised trials. *Bmj.* 2017;359:j5237.

117. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1911-30.

118. Bronsky J, Kalvachova B, Kutilek S, Sebkova A, Skvor J, Sumnik Z, et al. Doporučený postup České pediatrické společnosti a Odborné společnosti praktických dětských lékařů ČLS JEP pro suplementaci dětí a dospívajících vitaminem D. *Čes-slov Pediatr.* 2019;74(8):473-82.

119. Mathur NB, Saini A, Mishra TK. Assessment of Adequacy of Supplementation of Vitamin D in Very Low Birth Weight Preterm Neonates: A Randomized Controlled Trial. *J Trop Pediatr.* 2016;62(6):429-35.

120. Bozkurt O, Uras N, Sari FN, Atay FY, Sahin S, Alkan AD, et al. Multi-dose vitamin d supplementation in stable very preterm infants: Prospective randomized trial response to three different vitamin D supplementation doses. *Early Hum Dev.* 2017;112:54-9.

121. Cho SY, Park HK, Lee HJ. Efficacy and safety of early supplementation with 800 IU of vitamin D in very preterm infants followed by underlying levels of vitamin D at birth. *Ital J Pediatr.* 2017;43(1):45.

122. Joung KE, Burris HH, Van Marter LJ, McElrath TF, Michael Z, Tabatabai P, et al. Vitamin D and bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *J Perinatol.* 2016;36(10):878-82.

123. Shah BA, Padbury JF, Anderson MP, Holick MF, Szyld E, Gordon CM. Vitamin D and associated perinatal-neonatal outcomes among extremely low-birth-weight infants. *J Perinatol.* 2018;38(10):1318-23.

124. Çetinkaya M, Çekmez F, Erener-Ercan T, Buyukkale G, Demirhan A, Aydemir G, et al. Maternal/neonatal vitamin D deficiency: a risk factor for bronchopulmonary dysplasia in preterms? *J Perinatol.* 2015;35(10):813-7.

125. Mohamed Hegazy A, Mohamed Shinkar D, Refaat Mohamed N, Abdalla Gaber H. Association between serum 25 (OH) vitamin D level at birth and respiratory morbidities among preterm neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018;31(20):2649-55.

126. Ataseven F, Aygun C, Okuyucu A, Bedir A, Kucuk Y, Kucukoduk S. Is vitamin d deficiency a risk factor for respiratory distress syndrome? *Int J Vitam Nutr Res.* 2013;83(4):232-7.
127. Park SH, Lee GM, Moon JE, Kim HM. Severe vitamin D deficiency in preterm infants: maternal and neonatal clinical features. *Korean J Pediatr.* 2015;58(11):427-33.
128. Dhandai R, Jajoo M, Singh A, Mandal A, Jain R. Association of vitamin D deficiency with an increased risk of late-onset neonatal sepsis. *Paediatr Int Child Health.* 2018;38(3):193-7.
129. Cetinkaya M, Erener-Ercan T, Kalayci-Oral T, Babayiğit A, Cebeci B, Semerci SY, et al. Maternal/neonatal vitamin D deficiency: a new risk factor for necrotizing enterocolitis in preterm infants? *J Perinatol.* 2017;37(6):673-8.
130. Tayel SI, Soliman SE, Elsayed HM. Vitamin D deficiency and vitamin D receptor variants in mothers and their neonates are risk factors for neonatal sepsis. *Steroids.* 2018;134:37-42.
131. Figueras-Aloy J, Alvarez-Dominguez E, Perez-Fernandez JM, Moretones-Sunol G, Vidal-Sicart S, Botet-Mussons F. Metabolic bone disease and bone mineral density in very preterm infants. *J Pediatr.* 2014;164(3):499-504.
132. Zittermann A, Pilz S, Berthold HK. Serum 25-hydroxyvitamin D response to vitamin D supplementation in infants: a systematic review and meta-analysis of clinical intervention trials. *Eur J Nutr.* 2019.