

Diplomarbeit

**KORRELATIONEN ZWISCHEN VIER AUTOMATISIERTEN IMMUNOASSAYS
FÜR DIE 25-HYDROXYVITAMIN D-BESTIMMUNG
UND DEREN EINFLUSS AUF DIE KLASSIFIKATION DES VITAMIN D-STATUS**

eingereicht von
Johannes Schmid
Geb.Dat.: 07.06.1989

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**
an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der
**Univ. Klinik für Innere Medizin
Klinische Abteilung für Endokrinologie und Stoffwechsel**

unter der Anleitung der Betreuer
Priv.-Doz. Dr. Stefan Pilz, PhD
und
Priv.-Doz. Dr. Andreas Tomaschitz

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 30.09.2012

.....

DANKSAGUNGEN

An erster Stelle möchte ich mich bei Doz. Stefan Pilz für die Bereitstellung des Themas, die gute Unterstützung und die unkomplizierte Betreuung der Arbeit bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner wunderbaren Familie, meinen Eltern und Schwestern, die für mich immer einen Ort der Geborgenheit bedeuten, und mir während des ganzen Studiums eine unverzichtbare Stütze waren.

Ich bedanke mich bei meinen Kollegen und Freunden, ohne die meine Studienzeit wohl nicht vorstellbar wäre, und die mir immer zur Seite stehen.

Dank gebührt auch dem Endo-Labor unter der Leitung von Prof. Obermayer-Pietsch, sowie Doz. Raggam und Doz. Meinitzer für die freundliche Hilfe bzw. die Durchführung der Messungen.

ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: Vitamin D spielt nicht nur eine entscheidende Rolle im Kalzium- und Knochenstoffwechsel, sondern ist in einer Vielzahl anderer Stoffwechselwege involviert. Diese neueren Erkenntnisse führen zu einer gesteigerten Nachfrage nach 25-Hydroxyvitamin D (25(OH)D) -Bestimmungen und stellen neue Anforderungen an Analysemethoden. Die Arbeit vergleicht vier automatisierte Immunoassays zur Bestimmung von 25(OH)D.

Methoden: Es werden Assays von DiaSorin (LIAISON 25(OH)D TOTAL), IDS (iSYS 25(OH)D), Abbott (ARCHITECT 25(OH)D) und Roche (cobas 25(OH)D total) verwendet. Die gemessenen Werte werden in Streudiagrammen und Bland-Altman-Plots dargestellt, es werden Korrelationskoeffizienten und Deming-Regressionen berechnet, sowie Unterschiede in der Klassifizierung des Vitamin D-Status dargestellt.

Ergebnisse: Die Korrelationen sind ausreichend bis niedrig, es zeigen sich systematische Abweichungen zwischen den Assays und größere Unterschiede in der Statusbestimmung.

Diskussion: Die Variabilität zwischen den Assays führt zu einer schlechten Vergleichbarkeit der Werte, auf deren Basis eine einheitliche Klassifizierung des Vitamin D-Status kaum möglich ist. Es sollten daher die Bestrebungen zum Erreichen einer Standardisierung und zur Verbesserung der Bestimmungsmethoden weiter vehement verfolgt werden. Bis dahin ist es wichtig, sich bei der Interpretation der Messungen in der klinischen Praxis der Einschränkungen der jeweiligen Methode bewusst zu sein.

ABSTRACT

Introduction: Vitamin D is not only essential for calcium and bone metabolism, but is also involved in a wide range of other processes in the organism. These recent findings lead to an increasing demand for 25-Hydroxyvitamin D (25(OH)D) measurements, which results in new challenges for measurement methodologies. In this thesis four automated immunoassays for the determination of 25(OH)D were compared.

Methods: The assays used were DiaSorin (LIAISON 25(OH)D TOTAL), IDS (iSYS 25(OH)D), Abbott (ARCHITECT 25(OH)D) and Roche (cobas 25(OH)D total). The results were illustrated with scatter plots and Bland-Altman plots, additionally correlation coefficients and Deming regression were calculated and the impact on the vitamin D status classification was shown.

Results: The correlation coefficients turned out to be reasonable to low. There occurred considerable bias between most of the assays and there were also substantial differences regarding the vitamin D status classification.

Discussion: The 25(OH)D-assays' comparability is limited due to variable results and consequently a uniform classification of vitamin D status is hardly possible. Therefore it is necessary to push on the efforts to introduce standardised procedures and to improve the methods. Meanwhile laboratories and clinicians must be aware of the limitations of the method used when interpreting the results.

INHALTSVERZEICHNIS:

| | |
|---|-------------|
| Glossar und Abkürzungen | viii |
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Allgemeiner Teil | 2 |
| 2.1 Vitamin D | 2 |
| 2.1.1 Struktur | 2 |
| 2.1.2 Quellen und Synthese..... | 3 |
| 2.1.3 Metabolismus | 6 |
| 2.1.4 Der Vitamin D-Rezeptor | 7 |
| 2.1.5 Bedeutung für den Organismus | 8 |
| 2.1.5.1 Evolutionäre Aspekte | 8 |
| 2.1.5.2 Klassische Funktionen des Vitamin D | 9 |
| 2.1.5.3 Nicht-klassische Effekte | 11 |
| 2.2 Vitamin D-Statusbestimmung | 14 |
| 2.2.1 Vitamin D-Status..... | 14 |
| 2.2.2 Messmethodik | 16 |
| 2.2.2.1 Herausforderungen der 25(OH)D-Messung | 16 |
| 2.2.2.2 CPBA | 17 |
| 2.2.2.3 RIA..... | 18 |
| 2.2.2.4 CLIA | 18 |
| 2.2.2.5 HPLC..... | 19 |
| 2.2.2.6 LC-MS/MS | 19 |
| 2.2.3 Stabilität der Proben..... | 20 |

| | |
|---|-----------|
| 3 Methoden | 21 |
| 3.1 25(OH)D-Bestimmung | 21 |
| 3.1.1 DiaSorin LIAISON 25(OH)D TOTAL CLIA | 21 |
| 3.1.2 IDS iSYS 25(OH)D CLIA | 22 |
| 3.1.3 Abbott ARCHITECT 25(OH)D CLIA | 22 |
| 3.1.4 Roche cobas 25(OH)D total ECLIA | 23 |
| 3.2 Patientenkollektiv | 23 |
| 3.2.1 Die GECOH Studie | 23 |
| 3.2.2 Ein- und Ausschlusskriterien | 24 |
| 3.3 Proben und Ablauf | 24 |
| 3.4 Statistische Analyse | 25 |
| 4 Ergebnisse | 27 |
| 4.1 Deskriptive Statistik | 27 |
| 4.2 Korrelationen | 28 |
| 4.3 Auswirkungen auf den Vitamin D-Status | 34 |
| 4.3.1 DiaSorin vs. Roche | 36 |
| 4.3.2 DiaSorin vs. Abbott | 36 |
| 4.3.3 DiaSorin vs. IDS | 37 |
| 4.3.4 IDS vs. Roche | 37 |
| 4.3.5 IDS vs. Abbott | 37 |
| 4.3.6 Abbott vs. Roche | 38 |
| 5 Diskussion | 39 |
| 5.1 Vergleichbare Studien | 39 |
| 5.2 Mögliche Gründe für Abweichungen | 41 |
| 5.3 Verbesserungsansätze | 42 |
| 5.4 Limitationen | 43 |

| | |
|------------------------------------|-----------|
| 5.5 Conclusio..... | 43 |
| Referenzen..... | 45 |
| Abbildungsverzeichnis | 50 |
| Tabellenverzeichnis..... | 51 |

GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN

| | |
|-------------------------|---|
| 25(OH)D | 25-Hydroxyvitamin D |
| 1,25(OH) ₂ D | 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D |
| AARR | Aldosterone to active renin ratio |
| BMI | Body mass index |
| Ca ²⁺ | Kalzium |
| CaSR | Calcium-sensing receptor |
| CDK | Cyclin dependent kinase |
| C/EBP β | CCAAT enhancer binding protein β |
| CLIA | Chemiluminescence immunoassay |
| CPBA | Competitive protein binding assay |
| CV | Coefficient of variation |
| d | Tag |
| DBP | Vitamin D-binding protein |
| DC | Dendritische Zellen |
| DEQAS | Vitamin D External Quality Assessment Scheme |
| ECLIA | Electrochemiluminescence immunoassay |
| EGFR | Epidermal growth factor receptor |
| EIA | Enzyme immunoassay |
| FGF23 | Fibroblast growth factor 23 |
| FGFR1 | Fibroblast growth factor receptor 1 |
| GECHO | Graz Endocrine Causes of Hypertension Study |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| IOM | Institute of Medicine (USA) |
| IU | International unit (Internationale Einheit) |
| LC-MS/MS | Liquid chromatography tandem mass spectrometry |
| LURIC | Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study |
| μ | Mittelwert bzw. mikro- |
| NCX1 | Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger 1 |

| | |
|--------|--|
| NHANES | (Third) National Health and Nutrition Examination Survey |
| NIST | National Institute of Standards and Technology |
| OPG | Osteoprotegerin |
| PMCA1b | Plasma membrane Ca ²⁺ ATPase 1b |
| PTH | Parathormon |
| RAAS | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System |
| RANK | Receptor activator of NF-κB |
| RANKL | Receptor activator of NF-κB ligand |
| RCT | Randomized controlled trial |
| RIA | Radioimmunoassay |
| RMP | Reference Measurement Procedure |
| RXR | Retinoid X receptor |
| σ | Standardabweichung |
| SSF | Sonnenschutzfaktor |
| TGF-α | Transforming growth factor α |
| TRPV | Transient receptor potential vanilloid ion channel |
| VDR | Vitamin D receptor |
| VDRE | Vitamin D-responsive elements |
| WHI | Women's Health Initiative |

1 EINLEITUNG

Schon seit Beginn des letzten Jahrhunderts ist die Bedeutung des Vitamin D für den menschlichen Organismus bekannt. Während sich das Wissen über diesen Stoff jedoch lange Zeit nur auf dessen zentrale Rolle im Kalzium- und Knochenstoffwechsel beschränkte, entflammte das Interesse an Vitamin D in den letzten Jahrzehnten erneut als vermehrt Hinweise auftauchten, dass dieses Hormon über seine Funktionen im Kalziumstoffwechsel hinaus eine große Vielfalt weiterer Aufgaben im Körper wahrnimmt. So beeinflusst Vitamin D beispielsweise die Zellteilung und -differenzierung in vielen Geweben, das Immunsystem und verschiedene Stoffwechselwege. Ein Vitamin D-Mangel geht mit einem erhöhten Risiko für eine heterogene Gruppe von Krankheiten, wie Krebs, Autoimmunkrankheiten, Hochdruck oder Diabetes einher (1). Wachsendes Interesse an Vitamin D und zunehmende Erkenntnisse über seine Bedeutung führen zu einer steigenden Nachfrage nach Vitamin D-Bestimmungen, die wiederum neue Anforderungen in Bezug auf Schnelligkeit und Effizienz an die Analyseverfahren stellt. Daher wurden in letzter Zeit von mehreren Herstellern automatisierte Methoden, basierend auf dem Prinzip eines Chemilumineszenz Immunoassays, auf den Markt gebracht, die einfache und effiziente Messungen von 25-Hydroxyvitamin D (25(OH)D), ein Vitamin D-Metabolit dessen Konzentration im Blut die Vitamin D-Versorgung widerspiegelt, erlauben.

Die Messgenauigkeit dieser Methoden wurde jedoch wiederholt in Frage gestellt und auch jüngere Studien geben Hinweise auf relativ große Abweichungen der Messungen zwischen den Assays. In dieser Arbeit soll daher die Vergleichbarkeit dieser automatisierten Assays evaluiert werden. Es werden vier automatisierte Assays verschiedener Hersteller gegenübergestellt: DiaSorin LIAISON 25(OH)D TOTAL, IDS iSYS 25(OH)D, Abbott ARCHITECT 25(OH)D und Roche cobas 25(OH)D total. Dabei wird insbesondere Augenmerk auf die Korrelationen zwischen den Assays und die Auswirkungen auf die Klassifizierung des Vitamin D-Status gelegt. Im Allgemeinen wird eine gute Übereinstimmung zwischen den Methoden erwartet.

2 ALLGEMEINER TEIL

Zu Beginn der Arbeit wird ein Überblick über verschiedene grundlegende Aspekte des Vitamin D gegeben, sowie anschließend auf die Problematik der Vitamin D-Statusbestimmung und die Varianten der 25(OH)D-Messung eingegangen.

2.1 VITAMIN D

2.1.1 STRUKTUR

Vitamin D (Calciferol) kommt im Wesentlichen in zwei Formen vor, nämlich Vitamin D₃ (Cholecalciferol) und Vitamin D₂ (Ergocalciferol). Es handelt sich dabei um Steroidderivate, sogenannte 9,10-Secosteroide, bei denen der B-Ring des Cholesterinmoleküls an der Position 9,10 geöffnet ist. Vitamin D₂ unterscheidet sich von Vitamin D₃ durch eine zusätzliche Doppelbindung in der Seitenkette und eine Methylgruppe an C-24 (**Abbildung 1**) (2,3). Von besonderer Bedeutung für das chemische Reaktionsverhalten von Vitamin D ist seine Cis-trien-Struktur, die das Molekül empfindlich für Oxidation, freie Radikale und Konformationsänderungen durch UV Strahlung macht (4).

Wenn in dieser Arbeit von Vitamin D ohne nähere Bezeichnung die Rede ist, dann sind beide Formen inbegriffen.

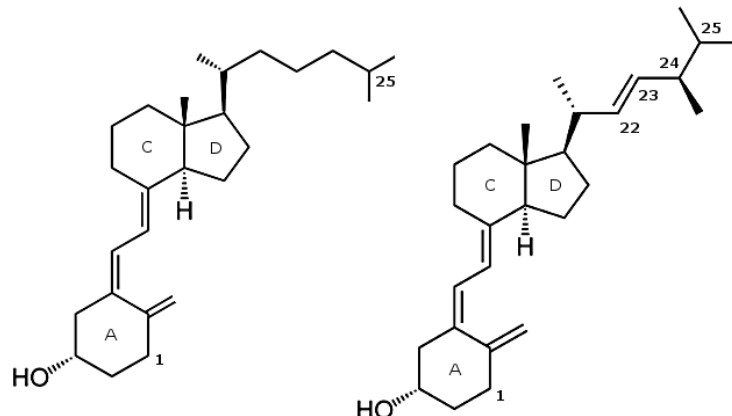


Abbildung 1. Strukturformeln von Cholecalciferol (links) und Ergocalciferol (rechts)

2.1.2 QUELLEN UND SYNTHESE

Der Mensch kann Vitamin D sowohl selbst mithilfe von Sonnenlicht in der Haut synthetisieren, als auch über die Nahrung aufnehmen. Der Großteil des im Körper vorhandenen Vitamin D, in Westeuropa etwa 90%, wird über die UV-abhängige Bildung von Vitamin D₃ in der Haut bereitgestellt, der Rest wird exogen in Form von Vitamin D₃ oder Vitamin D₂ über die Nahrung oder Vitamin D-Supplemente zugeführt (5).

Als Vorläufermolekül für das endogene Vitamin D₃ dient 7-Dehydrocholesterol (Provitamin D₃), das durch eine mehrstufige Synthese aus Cholesterin direkt in der Haut gebildet wird. Bei UV-B Exposition wird 7-Dehydrocholesterol bei Wellenlängen zwischen etwa 290 und 315 nm mit einem Maximum bei ca. 298 nm in einer photochemischen Reaktion zu Prävitamin D₃ umgewandelt (3,5). Dieses thermodynamisch instabile Molekül isomerisiert in der Folge spontan mit einer Halbwertszeit von etwa 2,5 h zu Vitamin D₃. Interessanterweise kommt es auch bei exzessiver UV-B Bestrahlung nicht zu einer Vitamin D Vergiftung, da sowohl Prävitamin D₃ als auch Vitamin D₃ durch weitere photochemische Reaktionen teils irreversibel zu einer Reihe anderer Produkte ohne Vitamin D-Aktivität umgewandelt werden. Auch bei Wellenlängen über 300 nm kommt es wahrscheinlich wegen solcher Konkurrenzreaktionen zu einer stark verminderten Vitamin D₃-Synthese. (5)

Das Ausmaß der Vitamin D₃ Synthese eines Menschen ist von mehreren Faktoren abhängig. Bestimmend ist vor allem die Zeit, über die ein Mensch einer UV-B Bestrahlung ausgesetzt ist, und diese hängt stark ab von den Lebensumständen, also von Beruf, Freizeitaktivitäten, Alter, Kleidungsgewohnheiten aber auch Morbidität.

Neben der Expositionsdauer ist auch die UV-B Intensität entscheidend für die Produktion. Ein Großteil des UV-B wird auf dem Weg durch die Atmosphäre absorbiert und der Anteil, der die Erdoberfläche erreicht, ist in großem Maße abhängig vom Sonneneinfallswinkel, der wiederum von Breitengrad, Jahres- und Tageszeit bestimmt wird. Das hat zur Folge, dass in nördlichen und südlichen Breiten über 33° (Graz liegt etwa auf dem 47. Breitengrad) in den Wintermonaten praktisch kein Vitamin D₃ gebildet werden kann (3).

Außerdem spielen natürlich auch Faktoren wie Bewölkung, Höhenlage, Ozongehalt der Luft und Luftverschmutzung eine Rolle. (5)

Auch die Hautfarbe hat einen großen Einfluss auf die Effizienz der Vitamin D-Produktion. Aufgrund der UV-Absorption durch Melanin können Menschen dunklerer Hautfarbe weitaus weniger Vitamin D₃ synthetisieren als Hellhäutige (5). Es gibt in diesem Zusammenhang sogar Hypothesen, wonach es im Rahmen der Evolution nur hellhäutige Völker aufgrund der besseren Vitamin D-Bildung geschafft haben, sich in sonnenarmen Regionen anzusiedeln (vgl. Kapitel 2.1.5.1). Ähnlich wie mit der Hautfarbe verhält es sich mit Sonnenschutzmitteln. So reduziert ein Sonnenschutzmittel mit SSF 30 die Vitamin D₃-Bildung um über 95 % (6).

Ein weiterer diskutierter Faktor für die Vitamin D₃-Synthesekapazität ist die 7-Dehydrocholesterol-Konzentration in der Haut, die starke interindividuelle Unterschiede zeigt und vermutlich sogar je nach untersuchter Körperregion verschieden ist. Vor allem im Alter könnte eine verminderte 7-Dehydrocholesterol-Konzentration bzw. -Synthese eine Ursache für die verminderte Vitamin D₃-Synthese darstellen, wobei es hierzu unterschiedliche Meinungen gibt. (5)

Aufgrund der vielen Faktoren ist es schwer, allgemeine Empfehlungen für die Sonnenexposition zu finden um eine ausreichende Vitamin D-Bildung in der Haut sicher zu stellen, zumal auch die kanzerogenen Effekte der UV-B Strahlung in Betracht gezogen werden müssen. Nach Holick (7) reicht aber in vielen Fällen die Exposition von Armen und Beinen für 5 bis 30 Minuten 2 Mal die Woche aus, um eine ausreichende Vitamin D-Versorgung zu erreichen.

Das in den Grundnahrungsmitteln natürlicherweise enthaltene Vitamin D kann den Bedarf in der Regel nicht decken, sodass der Mensch auf Sonnenbestrahlung angewiesen bleibt. Vitamin D findet sich insbesondere in fetten Seefischen, wie Lachs, Makrele oder Hering (8) und in weitaus geringeren Mengen auch in (fetthaltigen) Milchprodukten, Ei oder Fleisch (5). Diese Nahrungsmittel tierischen Ursprungs enthalten überwiegend Vitamin D₃. Sonnenexponierte Pilze und Hefen enthalten als nichttierische Nahrungsmittel Vitamin D₂. Ähnlich wie dem Vitamin D₃ 7-Dehydrocholesterol als Vorläufermolekül dient, ist der Ausgangsstoff für die Entstehung von Vitamin D₂ das in der Zellmembran von Pilzen vorkommende Ergosterol (Provitamin D₂) (9). In manchen

Ländern wie den USA wird Vitamin D auch in der Nahrungsmittelindustrie zugesetzt und z.B. Milch oder Orangensaft mit Vitamin D angereichert.

Nachdem gegen Ende des 19. Jahrhunderts die Bedeutung der Sonnenexposition für die Knochengesundheit zunehmend erkannt wurde, schaffte man es etwa in den 30er Jahren des vorigen Jahrhunderts, Vitamin D₂ durch UV-Bestrahlung von Ergosterol, das aus Hefen gewonnen wurde, herzustellen. Die billige Verfügbarkeit von Vitamin D₂ ermöglichte durch Anreicherung von Lebensmitteln oder Supplementierung bald eine erfolgreiche Bekämpfung der damals in Industriezentren häufig vorkommenden Rachitis (5). Heute ist man in der Lage auch Vitamin D₃ herzustellen. In den USA wird Vitamin D₂, in Europa überwiegend D₃ zur Supplementierung verwendet (2). Auch wenn lange Zeit die Meinung vertreten wurde, Vitamin D₂ und D₃ seien therapeutisch gleichwertig (10), zeigen sich in letzter Zeit deutliche Hinweise, dass Vitamin D₃ bei der Verbesserung des Vitamin D-Status dem Vitamin D₂ überlegen ist (11,12). Für die Mengenangabe sind Internationale Einheiten (IU) gebräuchlich, wobei 1 IU sowohl für Vitamin D₂ als auch für Vitamin D₃ 0,025 µg entspricht, was wegen des wahrscheinlichen Unterschieds in der biologischen Aktivität und des unterschiedlichen Molekulargewichts der beiden Formen fragwürdig erscheint (2,5). Seit dem Beginn der Supplementierung herrscht Unklarheit über die Zufuhrempfehlungen für die Vitamin D-Substitution. Der Bericht von 2010 des US Institute of Medicine (IOM) (13) empfiehlt eine zugeführte Vitamin D-Tagesdosis von 600 IU (15 µg) für das Alter von ein bis 70 Jahren bzw. 800 IU (20 µg) für über 70-jährige, um einen 25(OH)D Spiegel von über 20 ng/ml (vgl. Kapitel 2.2.1), welcher laut IOM als suffizient beurteilt wird, zu gewährleisten (14). Für den deutschsprachigen Raum gibt es Empfehlungen von 400 IU (10 µg)/d für Säuglinge und 800 IU (20 µg)/d ab dem zweiten Lebensjahr (15). Das IOM geht von Obergrenzen für die Einnahme von Vitamin D von z.B. 1000 IU (25 µg)/d in den ersten sechs Monaten und 4000 IU (100 µg)/d ab dem neunten Lebensjahr aus. Es gibt derzeit noch intensive Diskussion über die notwendigen Dosierungen bzw. über die als suffizient angesehenen 25(OH)D Werte. Zur Festlegung dieser Empfehlungen wurden ausschließlich Effekte des Vitamin D auf die Knochengesundheit herangezogen, da die extraskeletalen Wirkungen von Vitamin D derzeit noch als unzureichend angesehen werden, um als eine fundierte Basis für derartige Empfehlungen zu gelten.

2.1.3 METABOLISMUS

Im Blut sind Vitamin D und seine Metaboliten zu 99 % an Proteine gebunden, vor allem an das Vitamin D binding protein (DBP) aber auch an Albumin und Lipoproteine (16). Vitamin D₃, das in der Haut gebildet worden ist, bindet sofort an DBP. Das über den Gastrointestinaltrakt aufgenommene Vitamin D wird zunächst an Chylomikronen gebunden und geht dann auf DBP über. Vitamin D₂ hat eine geringere Affinität zu DBP als Vitamin D₃, was zu einer verkürzten Plasmahalbwertszeit und unterschiedlicher Aktivität der beiden Formen führt (5). Es gibt mittlerweile deutliche Hinweise, dass Vitamin D₂ weniger effektiv zu einem Konzentrationsanstieg des im folgenden Schritt gebildeten 25(OH)D führt als oral zugeführtes Vitamin D₃ (11,12).

In der Leber kommt es mit Hilfe des Enzyms 25-Hydroxylase zur Umwandlung von Vitamin D zu 25(OH)D, welches die höchste Konzentration aller Vitamin D-Metaboliten im Blut aufweist. Der Komplex aus 25(OH)D und DBP wird nach glomerulärer Filtration in der Niere durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen des proximalen Tubulus aufgenommen. Nach der Trennung von DBP wird 25(OH)D intrazellulär von der 1 α -Hydroxylase zu 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D, Calcitriol) umgewandelt. Diese Reaktion wird neben einer Produkthemmung stark vom Kalzium- und Phosphathaushalt beeinflusst, insbesondere über Stimulation durch Parathormon (PTH). 1,25(OH)₂D ist die eigentlich aktive Vitamin D-Form mit der größten Affinität zum Vitamin D-Rezeptor (VDR). Die Affinität ist etwa 100-fach höher als die des 25(OH)D (1). Die Serumkonzentrationen sind jedoch um ein Vielfaches geringer und auch die Halbwertszeit ist mit 4-6 h niedriger als bei 25(OH)D mit etwa 3 Wochen (17). Der Serumspiegel von 1,25(OH)₂D wird in erster Linie von der Aktivität der renalen 1 α -Hydroxylase bestimmt, obwohl gezeigt wurde, dass viele verschiedene Zellen des Körpers dieses Enzym aufweisen. Das extrarenal gebildete 1,25(OH)₂D scheint vor allem auto- und parakrine Funktionen zu haben (5,18). Um die Bildung nennenswerter Mengen von 1,25(OH)₂D zu ermöglichen, müssen jedoch neben der Anwesenheit der 1 α -Hydroxylase eine Reihe weiterer Faktoren vorhanden sein, wie z.B. die Fähigkeit der Zelle zur Endozytose des DBP-25(OH)D-Komplexes (5).

Der Hauptschritt für den Abbau von 25(OH)D und 1,25(OH)₂D ist eine weitere Hydroxylierung mit Hilfe einer 24-Hydroxylase, die durch VDR-Aktivierung im Sinne eines Regelkreises induziert wird. Die dadurch entstehenden Metaboliten wie z.B. 24,25(OH)₂D oder 1,24,25(OH)₃D werden in der Folge zu wasserlöslicher Calcitronsäure umgewandelt (19). Neben diesem wurden noch eine Reihe weiterer kataboler Wege beschrieben, deren Metaboliten mehr oder weniger starke biologische Aktivität aufweisen (1). Bei der Charakterisierung der biologischen Bedeutung der zahlreichen Vitamin D-Metaboliten gibt es noch einen großen Forschungsbedarf.

2.1.4 DER VITAMIN D-REZEPTOR

Der aus 427 Aminosäuren bestehende VDR gehört zur Gruppe der nukleären Rezeptoren für Steroidhormone und fungiert somit als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor (17). Unter dem Einfluss zellspezifischer intrazellulärer Bindungsproteine bindet zunächst 1,25(OH)₂D an der Liganden-Bindungs-Domäne des VDR. Ermöglicht durch die so verursachte Konformationsänderung kommt es nun zu einer Translokation in den Zellkern und zu einer Heterodimerisierung mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Dieser Komplex interagiert mit speziellen DNA-Sequenzen, sogenannten Vitamin D-responsive elements (VDRE), in der Promotorregion von 1,25(OH)₂D Zielgenen. Diese von einer Vielzahl zell- und promotorspezifischer Koregulatoren abhängigen Interaktionen ermöglichen die Regulation und Expression Vitamin D-responsiver Gene. Auf diese Weise werden etwa 0,8 bis 5 % des Genoms beeinflusst (20). Besonders bemerkenswert ist, dass der VDR in fast allen Zellen des Körpers vorkommt, wodurch die große pathophysiologische Bedeutung des Vitamin D unterstrichen wird und es deshalb auch plausibel erscheint, dass Vitamin D auch bei vielen extraskelettalen Erkrankungen eine Rolle spielen könnte. (1)

Neben den genomischen scheint es auch nicht-genomische Effekte des Vitamin D zu geben, die zu schnell ablaufen um das Ergebnis veränderter Gentranskription zu sein. Diese Effekte werden wahrscheinlich durch verschiedene Membranrezeptoren mit ungeklärten Transduktionsmechanismen vermittelt. (1)

2.1.5 BEDEUTUNG FÜR DEN ORGANISMUS

Bei seiner Entdeckung 1922 wurde Vitamin D als das vierte bekannte Vitamin alphabetisch mit „D“ bezeichnet. Im eigentlichen Sinn handelt es sich bei dieser Verbindung jedoch nicht um ein Vitamin sondern um einen Hormonvorläufer (Pro-Hormon), sodass sie in der Lage ist, in vielfältiger Weise in den Stoffwechsel des menschlichen Organismus einzugreifen. Vermehrte Forschung führte in den letzten Jahrzehnten zu vielen neuen Erkenntnissen über die umfassende Bedeutung dieses Hormons, die weit über den Kalzium- und Knochenstoffwechsel hinausreicht und vermutlich bei vielen chronischen Erkrankungen eine pathophysiologische und möglicherweise auch klinische Relevanz hat. (19)

2.1.5.1 EVOLUTIONÄRE ASPEKTE

Vitamin D kam vermutlich schon vor über 500 Millionen Jahren in Lebewesen vor. So fand man in einer Phytoplanktonart aus jener Zeit Ergosterol, das bis zu 1 % des Trockengewichts dieser Einzeller ausmachte. Möglicherweise lag die Bedeutung des entstehenden Vitamin D₂ im Schutz der Nukleinsäuren vor UV-Strahlung und in einem Einfluss auf die Kalziumhomöostase. Als Wirbeltiere begannen das Festland zu besiedeln, war es notwendig die zur Skelettbildung lebenswichtige Versorgung mit Kalzium sicherzustellen, was aus noch ungeklärten Gründen vor allem durch Sonnenbestrahlung und Produktion von Vitamin D, das einen effizienten Kalziumstoffwechsel ermöglichte, geschah. Es gibt jedoch Hinweise, dass das Vitamin D-System schon vor der Ausbildung kalzifizierter Strukturen vorhanden war (20). Über die Jahrmillionen hinweg spielte Vitamin D in seiner grundlegenden Bedeutung für den Knochen und die allgemeine Gesundheit eine entscheidende Rolle in der Evolution der Wirbeltiere. (3)

Als unsere frühen Vorfahren mit dunkler Hautfarbe zunehmend nördlichere Breiten besiedelten, kam es durch die niedrigere Sonnenintensität wahrscheinlich zu einem Vitamin D-Mangel, der in utero zu einer infantilen Rachitis und neben anderen Skelettfehlbildungen zu einem deformierten Becken führen kann. Für weibliche Nachkommen bedeutete das eine erschwerte bzw. unmögliche Geburt, was das Überleben der Spezies gefährden würde. Eine verminderte Hautpigmentierung brächte

hier einen Vorteil. Daher wird vermutet, dass eine effizientere Vitamin D-Produktion ein Grund für die Entwicklung der weißen Hautfarbe war. (5) Interessanterweise konnte auch beim Neandertaler eine evolutionäre Entwicklung von einer dunklen zu einer helleren Hautfarbe nachgewiesen werden, was die These eines Selektionsdruckes zu einer helleren Hautfarbe hin weiter untermauert.

2.1.5.2 KLASSISCHE FUNKTIONEN DES VITAMIN D

Vitamin D beeinflusst den Kalzium- und Phosphatstoffwechsel maßgeblich und ist damit nicht nur für die Knochengesundheit wichtig, sondern durch die Aufrechterhaltung eines konstanten Kalziumspiegels auch für zahlreiche biologische Funktionen, wie Muskelkontraktion, Nervenleitung, Hormon- und Transmittersekretion, Enzymaktivierung und -deaktivierung (21). Dabei entfaltet es seine Wirkung in verschiedenen Geweben: Darm, Nebenschilddrüse, Knochen und Niere sind die klassischen Zielorgane des Vitamin D.

Die intestinale Kalziumabsorption wird durch die $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -abhängige Expression verschiedener Proteine beeinflusst: In der apikalen Membran der Darmepithelzelle finden sich die Kalziumkanäle TRPV6 und der hier weniger bedeutungsvolle TRPV5, die die Kalziumaufnahme aus dem Darmlumen in die Zelle als ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ermöglichen. In der Folge gelangt das Kalzium (Ca^{2+}) gebunden an das Transportprotein Calbindin D an die basolaterale Membran wo es von einer Ca^{2+} -ATPase (PMCA1b) und einem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX1) in die Zirkulation ausgeschleust wird. Es scheinen außerdem auch vesikuläre und parazelluläre Mechanismen der Kalziumaufnahme zu existieren, deren Bedeutung noch unklar ist. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ erhöht außerdem die aktive Phosphataufnahme im Darm, indem es die Expression eines Na^+ -Phosphat-Kotransporters stimuliert. (1)

Die Funktion der Nebenschilddrüse wird stark von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ beeinflusst. So führt ein $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -Mangel zu einer Hyperplasie und einer erhöhten Produktion von PTH. In den Hauptzellen der Nebenschilddrüse bewirkt der $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -VDR-Komplex jedoch nicht nur eine verminderte Transkription des PTH-Gens sondern auch eine vermehrte Expression

des VDR und außerdem eine verminderte Kalziumempfindlichkeit durch die Induktion des CaSR-Gens. Die antiproliferative Wirkung des $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ scheint über VDR- und Kalzium-unabhängige Mechanismen vermittelt zu werden. Möglicherweise hat $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ auch einen Einfluss auf Klotho, ein Membranprotein, das in Verbindung mit FGFR1 den Rezeptor für FGF23 darstellt, und somit in der Phosphathomöostase der Zelle involviert ist. (1,21)

PTH selbst ist ein zentrales Hormon in der Regulation des Kalziumstoffwechsels und bewirkt über Knochenabbau, gesteigerte Phosphatausscheidung und Kalziumrückresorption in der Niere und vermehrte Vitamin D-abhängige Kalziumaufnahme im Darm eine Erhöhung des Kalziumspiegels (22). Gleichzeitig fördert es die Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ durch Stimulation der 1α -Hydroxylase (1).

Im Skelett ist $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ gemeinsam mit normalen Kalzium- und PTH-Spiegeln unabdingbar für das Knochenwachstum und den physiologischen Knochenumbau, sodass ein Mangel beim Kind zu Rachitis, beim Erwachsenen zu Osteomalazie führt und das Auftreten von Osteoporose begünstigt. Ein wichtiger Faktor ist dabei die Modulation der Aktivität und Interaktion von knochenabbauenden Osteoklasten einerseits und Osteoblasten andererseits, die Osteoid (Kollagen) bilden und dessen nachfolgende Mineralisation unterstützen. In Osteoblasten bewirkt der $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -VDR-Komplex zum einen (wie u. a. auch PTH und verschiedene Prostaglandine) eine vermehrte Expression des Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) zum anderen eine verminderte Expression von Osteoprotegerin (OPG). RANKL, das sich an der Oberfläche der Osteoblasten befindet, induziert über die Bindung an den Membranrezeptor RANK der monozytären osteoklastischen Progenitorzellen deren Reifung zu Osteoklasten. Das sezernierte OPG hingegen verhindert die Interaktion mit RANK indem es an RANKL bindet und auf diese Weise die Osteoklastenaktivierung hemmt. (1,23)

In der Niere hemmt $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ die 1α -Hydroxylase und stimuliert die 24 -Hydroxylase im Sinne einer negativen Rückkopplung. Es verstärkt die renale Kalzium-Rückresorption, wobei TRPV5 eine wichtige Rolle spielt, erhöht die Calbindin-Expression und beschleunigt den PTH-abhängigen Kalziumtransport im distalen Tubulus. Das Ausmaß des Einflusses

auf den Kalziumstoffwechsel der Niere wird jedoch wegen den gleichzeitigen Effekten des $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ auf PTH und die intestinale Kalziumabsorption kontroversiell betrachtet. (1)

2.1.5.3 NICHT-KLASSISCHE EFFEKTE

Die Entdeckung des beinahe ubiquitären Vorkommens des VDR gab einen ersten Hinweis auf die umfassenden Wirkungen von Vitamin D. Weitere Erkenntnisse der letzten Jahrzehnte über epidemiologische, genetische, und biochemische Zusammenhänge des Vitamin D-Systems mit einer Fülle von Effekten, die nicht mit dem Kalziumstoffwechsel zusammenhängen, deuten auf seine große Bedeutung für verschiedenste extraskelettale Erkrankungen hin. Vitamin D nimmt Einfluss auf Apoptose, Zellwachstum und -differenzierung, moduliert Immunantworten und spielt eine Rolle im Glukosestoffwechsel, im kardiovaskulären System sowie im Muskel- und Nervengewebe. (1,20)

Krebs:

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, dass hohe Sonnenexposition mit einem niedrigeren Risiko an Krebs zu sterben einhergeht (24), was in jüngeren Studien bestätigt wird (25). Es wird daher davon ausgegangen, dass ein guter Vitamin D-Status mit erniedrigter Krebsinzidenz und -mortalität assoziiert ist, bzw. ein Mangel entsprechend eine höhere Krebsmortalität bedeutet. Die Studienlage zu diesem Thema ist zurzeit nicht eindeutig, ein großer Teil der Arbeiten scheinen diese Hypothesen jedoch zu bestätigen (16). Zu nennen sind in diesem Zusammenhang die LURIC Studie (26), die zeigte, dass ein niedriger Vitamin D-Spiegel ein unabhängiger Risikofaktor für tödlichen Krebs ist, sowie die NHANES Studie aus den USA (27), die zwar eine Assoziation von Vitamin D-Mangel mit der Mortalität durch Kolonkarzinom, nicht aber mit der gesamten Krebsmortalität ergab. Zu dieser Thematik gibt es auch Interventionsstudien wie die WHI Studie (28), die in einem Beobachtungszeitraum von sieben Jahren jedoch keinen Effekt einer Vitamin D-Supplementierung auf die Inzidenz kolorektaler Karzinome fand, und eine Studie von Lappe et al. (29), die im Vergleich zu Placebo eine signifikante Reduktion der Krebsinzidenz postmenopausaler Frauen bei Vitamin D- und Kalzium-Supplementierung ergab. Es besteht daher ein großer Bedarf für weitere Vitamin D-Interventionsstudien.

Es wurden auch auf zellulärer Ebene antikarzinogene Effekte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ beobachtet sowie auf molekularer Ebene verschiedene Mechanismen entdeckt, die die Entstehung und das Fortschreiten von Krebs hemmen können. Der Zellzyklus von Krebszellen kann an vielen Stellen durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ gehemmt werden, etwa durch vermehrte Synthese oder Stabilisierung von p21 und p27, Inhibitoren Cyclin abhängiger Kinasen (CDK). Es gibt noch viele weitere tumorspezifische Mechanismen, z.B. induziert $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ in Tumorzellen mit TGF- α /EGFR Überexpression einen vermehrten Abbau des ligandenaktivierten EGFR und führt damit zu einem verminderten Wachstum dieser Zellen. Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang die autokrinen Wirkungen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, die die Anwesenheit von $25(\text{OH})\text{D}$ und der 1α -Hydroxylase voraussetzen. Außer dem Einfluss auf die Zellproliferation besitzt $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ auch anti- sowie in Krebszellen verstärkte proapoptotische Eigenschaften, die wichtig für die normale Gewebsentwicklung sind und das Wachstum in Tumoren bremsen können. (1)

Immunsystem:

Es war schon um 1800 bekannt, dass vermehrte Sonnenexposition einen günstigeren Verlauf für Tuberkulosekranke bedeutet. In der Tat besteht ein Zusammenhang zwischen $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -VDR-Funktion und angeborener und erworbener Immunität, der durch epidemiologische Beobachtungen und Erkenntnisse auf molekularer Ebene gestützt wird. Beispielhaft genannt sei hier die Induktion von p21, das bedeutsam für die Differenzierung von Makrophagen ist, und von C/EBP β , einem für antibakterielle, antivirale und antitumorale Funktionen von Makrophagen entscheidender Transkriptionsfaktor. γ -Interferon, ein bei der Abwehr von Mykobakterien involviertes Zytokin, stimuliert (ebenfalls C/EBP β -mediert) die 1α -Hydroxylase in Makrophagen und hemmt dort gleichzeitig den Abbau von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Durch Modulation von Zytokinen und direkte Effekte wird die Funktion der verschiedenen T-Zellen beeinflusst.

Neben diesen positiven Effekten für die Infektabwehr spielt $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zudem eine Rolle in der Aufrechterhaltung der immunologischen Selbsttoleranz. Dabei scheinen dendritische Zellen (DC) wichtig zu sein, die von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ in einem unreifen Zustand gehalten werden und in der Folge die Reifung naiver T-Zellen zugunsten immuntoleranter T-Zellen beeinflussen (1). Vermutlich kommt es außerdem zu einer Vermehrung regulatorischer T-Zellen (Tregs), die autoimmunologische Vorgänge inhibieren. Da die

Tregs eine Art Schutzfaktor vor Autoimmunerkrankungen darstellen, sind derzeit zahlreiche Therapieansätze (u.a. auch Vitamin D-Supplementierung) in Erforschung mittels derer man versucht diese Zellen zu vermehren bzw. zu stimulieren (24). Es wurde beschrieben, dass es durch die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ in der Tat zu einem verminderten Auftreten verschiedenster Autoimmunerkrankungen kommt. Insbesondere für Diabetes mellitus Typ 1 oder multiple Sklerose, aber auch Thyreoiditis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, systemischen Lupus erythematoses oder verschiedene Arthritiden scheint es einen protektiven Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zu geben, wobei es dazu noch keine großen Placebo-kontrollierten Studien gibt. (1,24)

Kardiovaskuläres System:

$1,25(\text{OH})_2\text{D}$ hat über direkte und indirekte Effekte auf mehrere kardiovaskuläre Risikofaktoren auch einen Einfluss auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Besonders wichtig ist die inverse Korrelation mit PTH, das den Blutdruck steigert und auch Wirkungen auf den Herzmuskel selbst zeigt, wie Myokardhypertrophie oder proarrhythmische Effekte. Gleichzeitig scheint es noch andere Vitamin D-medierte Mechanismen zu geben, die das kardiovaskuläre Risiko senken, etwa antiinflammatorische, antidiabetische und vaskuloprotektive Effekte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ und Einfluss auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Vitamin D als eine Art Renin-Inhibitor fungiert und direkt die Genexpression dieses Enzyms supprimiert. Außerdem konnte in Tier- bzw. Zellkultur-Studien das $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ die Herzfunktion verbessern, das Muskelwachstum in Kardiomyozyten regulieren und auf diese Weise vor Myokardhypertrophie schützen. Zudem dürfte $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ antiatherogen wirken durch Hemmung der Cholesterinaufnahme in Makrophagen und damit der Schaumzellbildung, durch verminderte Proliferation und Migration glatter Muskelzellen sowie durch Unterdrückung der Endothelaktivierung. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass tatsächlich eine Korrelation zwischen niedrigem Vitamin D-Status und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, wie Herzversagen oder Schlaganfall, besteht. Zu dieser Thematik gibt es jedoch nur spärliche Daten aus RCTs. (19)

Weitere Gebiete:

Es gibt noch eine Reihe anderer extraskelettaler Vitamin D-Effekte die nicht unerwähnt bleiben sollen. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ stimuliert die Insulinsekretion, verbessert die Prognose bei chronischen Nierenerkrankungen, scheint neuroprotektive Wirkung zu haben und ist für die normale Differenzierung und Funktion der Haut von Bedeutung, weshalb es bei einer Reihe von Hauterkrankungen, insbesondere bei Psoriasis therapeutische Anwendung findet. Ein Mangel an Vitamin D führt zu Muskelschwäche und Atrophie, nicht nur wegen des niedrigen Kalziumspiegels, sondern auch durch direkte Effekte auf die Skelettmuskulatur bzw. das neuromuskuläre System (1). Vitamin D beeinflusst außerdem reproduktive Funktionen und hat eventuell auch antidepressive Wirkung (24).

Die meisten der oben beschriebenen Erkenntnisse wurden durch Beobachtungen von VDR- oder 1α -Hydroxylase-Knockout-Mäusen oder Patienten mit bestimmten erblichen Rachitisformen gewonnen. Auch epidemiologische Untersuchungen und Beobachtungsstudien lieferten wertvolle Beiträge, doch die tatsächliche Bedeutung eines therapeutischen oder präventiven Vitamin D-Einsatzes für die allermeisten der beschriebenen Erkrankungen ist nach wie vor weitgehend unklar, da auf diesem Gebiet großangelegte RCTs momentan noch fehlen (24). Eine solche Studie, die zur Zeit läuft, ist die VITAL study (30), eine randomisierte, doppelverblindete, placebokontrollierte Studie mit 20.000 Probanden, die die präventiven Effekte von Vitamin D_3 in ausreichender Dosierung (2000 IU/d) auf kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs evaluieren soll.

2.2 VITAMIN D-STATUSBESTIMMUNG

2.2.1 VITAMIN D-STATUS

Zur Bestimmung des Vitamin D-Status wird allgemein anerkannt der Serumspiegel von $25(\text{OH})\text{D}$ herangezogen. Dieser Vitamin D-Metabolit spiegelt die Versorgungslage mit Vitamin D am besten wider, da die Hydroxylierung von Vitamin D zu $25(\text{OH})\text{D}$ praktisch ein quantitativer Prozess ist und $25(\text{OH})\text{D}$ eine vergleichsweise lange Halbwertszeit von

etwa 3 Wochen im Blut aufweist (2,17). Außerdem sind die Serumspiegel des 25(OH)D bis zu 1000-fach höher als die von 1,25(OH)₂D und es gibt zunehmende Evidenz dafür, dass die entscheidende Determinante für den intrazellulären 1,25(OH)₂D Spiegel der zirkulierende 25(OH)D Wert ist, da die meisten Zellen bzw. Organe des Körpers in der Lage sind, das 25(OH)D zu dem aktiveren Vitamin D-Metaboliten 1,25(OH)₂D zu konvertieren.

Zur Klassifizierung des Vitamin D-Status herrscht leider noch keine Einigkeit. Die meistverwendete Einteilung, die auch in dieser Arbeit verwendet wird, basiert auf der Entwicklung eines sekundären Hyperparathyreoidismus bei Vitamin D-Mangel. Demnach werden 25(OH)D Werte über 30 ng/mL (75 nmol/L), bei denen es zu keinem Anstieg des PTH kommt, als normal betrachtet. Zwischen 20 ng/ml (50 nmol/L) und 30 ng/mL (75 nmol/L) spricht man von Vitamin D-Insuffizienz und unter 20 ng/mL (50 nmol/L) von Vitamin D-Defizienz (19). Das IOM definiert eine Vitamin D-Suffizienz mit Werten zwischen 20 ng/mL (50 nmol/L) und 50 ng/mL (125 nmol/L) (14), andere Autoren verwenden noch niedrigere Schwellenwerte.

Etwas umständlich ist die Verwendung unterschiedlicher Einheiten. Der Faktor zur Umrechnung von ng/mL zu nmol/L ist 2,496. (19)

Es hat sich gezeigt, dass die Prävalenz des Vitamin D-Mangels nicht nur in den Industrieländern sondern auch weltweit sehr hoch ist (31). Es wird geschätzt, dass nach der obigen Klassifikation weltweit über eine Milliarde Menschen einen insuffizienten bzw. defizienten Vitamin D-Status haben (7). Diese Erkenntnis führte gemeinsam mit der Etablierung des Vitamin D-Mangels als universeller Risikofaktor in den letzten Jahren zu einem vermehrten Interesse an Vitamin D und einer immer stärkeren Nachfrage nach Vitamin D-Statusbestimmungen. Um dieser Entwicklung gerecht zu werden, sind Labors auf automatisierte Methoden zur 25(OH)D-Bestimmung angewiesen, die einen höheren Probendurchsatz ermöglichen (32). Die große Vielfalt der möglichen Methoden (siehe Kapitel 2.2.2) führt zu einer schlechten Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da teilweise eine erhebliche Variabilität zwischen den einzelnen Methoden herrscht. Auch bei prinzipiell gleichen Verfahren führen die teils großen Unterschiede, die zwischen den Analysegeräten verschiedener Hersteller oder verschiedenen Labors bestehen, zusätzlich zu einer beträchtlichen Ergebnisvariabilität. Das alles stellt ein nicht zu unterschätzendes Problem sowohl für die Interpretation und Zusammenfassung epidemiologischer Daten

als auch für die Beurteilung von Laborergebnissen in der Klinik dar (33). Aus diesem Grund ist die Fragestellung der vorliegenden Diplomarbeit, also die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Messmethoden von hoher klinischer Relevanz.

2.2.2 MESSMETHODIK

Im Laufe der Zeit, insbesondere in den letzten 3 Jahrzehnten, haben sich verschiedene Methoden für die 25(OH)D-Messung etabliert, angefangen von kompetitiven Protein-Bindungs-Assays (CPBA) über Radioimmunoassays (RIA), Enzymimmunoassays (EIA) und direkte Bestimmungsmethoden, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS), bis hin zu automatisierten Chemilumineszenz-Immunoassays (CLIA) (2). Eine Auswahl dieser Methoden soll in diesem Kapitel kurz vorgestellt werden.

2.2.2.1 HERAUSFORDERUNGEN DER 25(OH)D-MESSUNG

Die Messung von 25(OH)D bringt einige Schwierigkeiten mit sich, für die zu einem großen Teil die Molekülstruktur des 25(OH)D selbst verantwortlich ist. 25(OH)D ist sehr lipophil und damit schwer in wässrigen Medien löslich, was die Interaktion mit Proteinen oder Antikörpern für den Nachweis mit Liganden-Bindungsassays erschwert. Es kommt außerdem in den beiden Formen 25(OH)D₂ und 25(OH)D₃ vor, sodass entweder eine Form vernachlässigt werden muss oder Tests notwendig sind, die für beide Formen heterospezifisch sind. (4)

Ein besonders großes Problem sind sogenannte Matrixeffekte bei der Bestimmung, für die 25(OH)D als lipophiles Molekül besonders anfällig ist. Die Proben werden in der Regel mit einem Standard verglichen, der eine definierte Menge 25(OH)D enthält. Enthält nun die Probe (für gewöhnlich Plasma oder Serum) irgendwelche Substanzen, die im Standard nicht vorhanden sind, so können diese mit den Liganden (je nach Methode DBP oder Antikörper) interagieren und deren Bindung oder Affinität an das nachzuweisende 25(OH)D beeinflussen, was am Ende zu verfälschten Ergebnissen führen kann. Verantwortlich für diese Interferenzen sind zumeist Lipide, aber methodenabhängig auch andere Stoffe, z.B. DBP (34). Die Matrixeffekte sind unberechenbar und schwanken von

Probe zu Probe. Besonders anfällig dafür sind die neueren, automatisierten und daher notwendigerweise vereinfachten Assays, die keine Lösungsmittelextraktions- und Chromatographieschritte mehr enthalten. (2,4)

Die Herstellung der Standards stellt ein weiteres Problem dar. Dazu wird Serum von endogenem 25(OH)D befreit und eine Lösung mit einer definierten Menge an 25(OH)D hinzugefügt. Für die Entfernung des endogenen 25(OH)D wird meist Aktivkohle verwendet in Verbindung mit einer vorangehenden Ansäuerung der Probe, um 25(OH)D von DBP zu lösen. Die zugefügte 25(OH)D-Lösung wird mit organischen Lösungsmitteln hergestellt und kann Verunreinigungen enthalten. Auch wenn zumeist humanes Serum als Basis verwendet wird, so verändern all diese Verfahren die Matrix des Standards, sodass sich diese am Ende von der Matrix der Proben unterscheidet. Außerdem scheint es für Verfahren ohne Extraktionsschritte einen Unterschied zu machen, ob das 25(OH)D endogenen Ursprungs ist oder erst in vitro zugefügt wurde. (2)

2.2.2.2 CPBA

Zu den ersten Messmethoden für die 25(OH)D-Bestimmung gehört der kompetitive Protein-Bindungs-Assay (CPBA). Als Bindungsprotein (Ligand) dient dabei das DBP. Der Tracer, also die Substanz, die später gemessen werden kann, ist mit Tritium markiertes 25(OH)D, das mit dem 25(OH)D aus der Probe um Bindungsstellen am DBP konkurriert. Vom gemessenen Wert des gebundenen Tracers kann so auf die 25(OH)D-Konzentration rückgeschlossen werden. Je mehr markiertes 25(OH)D an DBP bindet, desto niedriger ist die ursprüngliche 25(OH)D Konzentration in der Probe. Diese Methode erfordert eine Vielzahl an Vorbereitungs- und Zwischenschritten, wie Lösungsmittelextraktion der Probe, Trocknung und Reinigung mittels Säulenchromatographie. Sie ist deshalb sehr aufwendig und daher nicht geeignet für die Anforderungen klinischer Labors mit hohem Probendurchsatz. Versuche, das Verfahren zu vereinfachen, blieben wegen zu ungenauer Ergebnisse erfolglos. Das DBP ist heterospezifisch für beide 25(OH)D-Formen, gleichzeitig kommt es jedoch zu Interferenzen und Kreuzreaktionen mit anderen endogenen Vitamin D-Metaboliten (35). Das Verfahren zeigt jedoch eine vergleichsweise geringere Anfälligkeit für Matrixeffekte. (2,4)

2.2.2.3 RIA

Ein Radioimmunoassay (RIA) verwendet spezifische Antikörper, die je nach verwendetem System abhängig vom zur Herstellung verwendeten Antigen auch für beide 25(OH)D-Formen spezifisch sein kann. An diesen Antikörpern ist ein mit ^{125}I -markiertes Antigen als Tracer gebunden. Wird nun die Probe zugegeben, findet eine kompetitive Reaktion statt, und ein Teil des radioaktiven Tracers wird vom 25(OH)D der Probe aus der Bindung verdrängt. Die Menge des gebundenen Tracers verhält sich invers zur Konzentration des 25(OH)D und kann nach Entfernung des ungebundenen Anteils gemessen werden. Auch bei diesem Verfahren sind natürlich verschiedene Zwischenschritte notwendig, wie die Denaturierung des DBP, um das 25(OH)D aus dessen Bindung zu lösen. Auf die aufwendigen Extraktionsverfahren wird jedoch verzichtet, sodass die Methode weitaus einfacher durchzuführen ist als ein CPBA und deshalb lange Zeit weit verbreitet war. Der RIA von DiaSorin beispielsweise wurde bei einem Großteil der Forschungsarbeiten, die Zusammenhänge zwischen 25(OH)D und verschiedenen Krankheiten untersuchten, verwendet. (4,36)

2.2.2.4 CLIA

Das Prinzip des Chemilumineszenz Immunoassays (CLIA) wird in den meisten automatisierten Analysesystemen eingesetzt, so auch bei den in dieser Arbeit verglichenen Assays. Bei dieser Form eines Immunoassays werden Antikörper oder Antigene (25(OH)D) verwendet, die mit einer lumineszierenden Substanz (z.B. Luminol oder Acridiniumester) markiert sind. Diese Substanzen geben bei der Zugabe eines Katalysators Licht ab, das mit einem Photomultiplier gemessen werden kann (36). Eine spezielle Form ist der Elektrochemilumineszenz Immunoassay (ECLIA), bei dem ein Label (z.B. Ruthenium) verwendet wird, das von einer applizierten Spannung zur Lumineszenz angeregt wird (37). In Kapitel 3.1 werden die vier in dieser Arbeit verwendeten CLIAS näher beschrieben.

Der große Vorteil der Methode ist die Möglichkeit der Implementierung in vollautomatisierte Systeme, die einen hohen und effizienten Probendurchsatz ermöglichen. Limitationen der Methode ergeben sich jedoch durch das Fehlen von

entsprechenden Extraktionsschritten, was zu einer Anfälligkeit für die oben beschriebenen Matrixeffekte führt (2). Insbesondere scheint die DBP-Konzentration die Messwerte stark zu beeinflussen (38).

2.2.2.5 HPLC

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) ist anders als die oben vorgestellten Assays eine direkte Nachweismethode. Dabei wird ein Gemisch aus wässriger Pufferlösung und organischem Lösungsmittel als mobile Phase mit hohem Druck (50 bis 150 bar) durch eine Trennsäule aus dicht gepackten Partikeln (stationäre Phase) gepumpt. Die vorbehandelte Probe wird in den Flüssigkeitsstrom der mobilen Phase transferiert und auf dem Weg durch die Säule aufgetrennt. Die am Ende der Säule erscheinenden Substanzen mit entsprechenden Absorptionsspektren können mittels UV-Detektor registriert werden. Durch die Auftragung der UV-Absorption über die Zeit entsteht eine Kurve mit Peaks, die für bestimmte Stoffe charakteristisch sind (36). Mit dieser Methode können 25(OH)D₂ und 25(OH)D₃ getrennt quantifiziert werden. Von Vielen wird die HPLC neben der LC-MS/MS als Goldstandard für die 25(OH)D-Messung angesehen, sie ist jedoch sehr zeit- und arbeitsaufwendig und daher nicht für klinische Labors mit hohem Probendurchsatz geeignet (4).

2.2.2.6 LC-MS/MS

Die Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) vereint die Vorteile der HPLC mit denen eines massenspektrometrischen Detektionsverfahrens, das früher nur bei gaschromatographischen Methoden möglich war. Nach der Auftrennung der Stoffe durch Flüssigkeitschromatographie ähnlich wie bei der HPLC wird die mobile Phase mithilfe der Electrospray-Ionisation mit Ladungen versehen und in feinste Teilchen bis auf Molekülgröße zerstäubt. Der so erzeugte Ionenstrom wird nun in das Vakuum des Tandem-Massenspektrometers geleitet. Dieses wiederum besteht aus zwei Massenfiltern mit dazwischengeschalteter Kollisionskammer und einem Ionendetektor. In den Massenfiltern sorgen spezifische Radiofrequenzmuster dafür, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt jeweils nur Teilchen mit einem bestimmten Massen-Ladungs-Verhältnis

passieren können. In der Kollisionskammer werden die Moleküle fragmentiert, sodass nach der Passage des zweiten Massenfilters nur ein definiertes Fragment-Ion des Analyten den Detektor erreicht. (36)

Die LC-MS/MS ist richtig durchgeführt eine sehr genaue Methode und der Probendurchsatz ist zwar niedriger als bei automatisierten Immunoassays, aber weitaus höher als bei der HPLC (4). Damit wird es auch für klinische Labors möglich auf eine exaktere Methode zurückzugreifen. Die LC-MS/MS wird mittlerweile weit verbreitet als Referenzmethode für Vergleichsstudien und zur Kalibrierung der Standards von Immunoassays verwendet. Bei all den Vorteilen darf jedoch nicht vergessen werden, dass die LC-MS/MS nur sehr schwer zwischen 25(OH)D und manchen Isomeren mit ähnlichen Fragmentationsmustern (z.B. 3-epi-25(OH)D₃ oder 7- α -hydroxy-4-cholesten-3-on) unterscheiden kann, sodass diese die Ergebnisse verzerren können (34).

2.2.3 STABILITÄT DER PROBEN

Eine sehr angenehme Eigenschaft des 25(OH)D ist seine bemerkenswerte Stabilität in der Probe. Auch bei wiederholten Gefrier-Auftau-Zyklen kommt es zu keiner signifikanten Änderung der gemessenen 25(OH)D-Konzentrationen (35). In Proben, die bei -20°C gelagert werden, sind auch nach mehreren Jahren keine messbaren Konzentrationsveränderungen feststellbar und auch bei Raumtemperatur bleiben die Proben lange Zeit stabil. Ein wichtiger Grund für die hohe Widerstandsfähigkeit des 25(OH)D in Serum- oder Plasmaproben (z.B. auch gegen UV-Bestrahlung) ist seine nahezu vollständige und feste Bindung an das DBP. (2,4)

3 METHODEN

3.1 25(OH)D-BESTIMMUNG

Es werden die 25(OH)D-Konzentrationen von 113 Proben jeweils mit vier automatisierten Chemilumineszenz Immunoassays (vgl. Kapitel 2.2.2.4) unterschiedlicher Hersteller bestimmt. Die verwendeten Geräte sind IDS-iSYS, DiaSorin LIAISON, Abbott ARCHITECT i2000SR und Roche cobas e 602. Im Folgenden werden die angewendeten Assays kurz charakterisiert.

3.1.1 DIASORIN LIAISON 25(OH)D TOTAL CLIA

Das DiaSorin LIAISON 25(OH)D TOTAL Kit ist ein CLIA, der für humanes Serum oder Plasma bestimmt ist. In einem ersten zehnmütigen Inkubationsschritt wird das 25(OH)D der Probe mittels Pufferlösung (10 % Ethanol) vom DBP dissoziiert. Das nun freie 25(OH)D bindet an 25(OH)D-spezifische Antikörper, die an magnetische Partikel gebunden sind. Der Tracer, mit Isoluminol markiertes 25(OH)D, wird hinzugefügt und konkurriert nun um die Bindung mit den Antikörpern. Nach einem zweiten Inkubationsschritt von 10 Minuten wird der nicht gebundene Anteil entfernt und das Triggerreagens für die Lumineszenzreaktion zugegeben, sodass das entstehende Lichtsignal, das in inverser Beziehung zur 25(OH)D-Konzentration der Probe steht, gemessen werden kann.

Das benötigte Probenvolumen beträgt 25 µL, der Messbereich liegt zwischen 4 und 150 ng/mL. Die Wiederholungspräzision („within-run-precision“), also die Genauigkeit bei wiederholter Messung der gleichen Probe, wird durch den Variationskoeffizienten ($CV=\sigma/\mu$) angegeben, der hier 2,9-5,5 % beträgt.

3.1.2 IDS iSYS 25(OH)D CLIA

Für die Messung mit dem IDS iSYS 25(OH)D CLIA können Serum- oder Plasmaproben, jedoch nicht EDTA-Plasma verwendet werden. Die Proben werden vorbehandelt um das DBP zu denaturieren. Nach der Neutralisierung mittels Pufferlösung wird ein für 25(OH)D spezifischer mit Acridinium markierter Antikörper hinzugefügt. Nach einem Inkubationsschritt werden an 25(OH)D gebundene magnetische Partikel hinzugefügt und diese nach einem weiteren Inkubationsschritt mit einem Magneten wieder eingefangen. Die freien Anteile werden in einem Waschschrift entfernt, und durch den Zusatz von Triggerreagenzien die Lumineszenzreaktion mit der Acridiniummarkierung gestartet. Das entstehende Licht wird gemessen und ist umgekehrt proportional zur 25(OH)D-Konzentration der Probe.

Das benötigte Probenvolumen beträgt 10 µL, der Messbereich liegt zwischen 5 und 140 ng/mL. Für die Wiederholungspräzision wird ein CV von 5,5-12,1 % angegeben.

3.1.3 ABBOTT ARCHITECT 25(OH)D CLIA

Auch für den Abbott ARCHITECT 25(OH)D CLIA können Serum- oder Plasmaproben verwendet werden. Die Probe wird zunächst vorbehandelt und dann mit einer Pufferlösung und magnetischen Partikeln, die mit 25(OH)D-spezifischen Antikörpern beschichtet sind, inkubiert, sodass das 25(OH)D aus der Probe an die Antikörper bindet. Nun wird ein Komplex aus biotinyliertem 25(OH)D und Acridinium-markierten Anti-Biotin-Antikörpern als Tracer hinzugefügt, der um die Bindungsstellen an den 25(OH)D-spezifischen Antikörpern konkurriert. Es folgt ein Waschschrift und die Zugabe von Triggerreagenzien, die zur Lumineszenzreaktion führen. Das gemessene Licht ist auch hier indirekt proportional zur 25(OH)D-Konzentration der Probe.

Die verwendete Probenvolumen beträgt hier 60 µL, der Messbereich ist 8-160 ng/mL und der CV der Wiederholungspräzision beträgt 1,4-3,7 %.

3.1.4 ROCHE COBAS 25(OH)D TOTAL ECLIA

Roche cobas 25(OH)D total ist ein ECLIA zur Bestimmung von 25(OH)D in Humanserum oder -plasma. Die Probe wird in einem ersten Schritt mit Reagenzien inkubiert um das gebundene 25(OH)D vom endogenen DBP freizusetzen. Als Tracer dient Ruthenium-markiertes DBP, das in einem zweiten Inkubationsschritt mit 25(OH)D einen Komplex bildet. Nun wird biotinyliertes 25(OH)D zugesetzt, das an noch freies ruthenyliertes DBP bindet. Dieser Komplex wird in der Folge über die starke Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung an ebenfalls zugesetzte Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel gebunden. Die feste Phase wird magnetisch auf einer Elektrodenoberfläche fixiert, sodass nach einem Waschschrift durch Anlegen einer Spannung die Elektrochemilumineszenzreaktion induziert werden kann. Das gemessene Licht ist indirekt proportional zur 25(OH)D-Konzentration der Probe.

Das Probenvolumen beträgt 15 μ L, der Messbereich liegt zwischen 3 und 70 ng/mL und der CV der Wiederholungspräzision wird mit 2,2-6,8 % angegeben.

3.2 PATIENTENKOLLEKTIV

3.2.1 DIE GECOH STUDIE

Die Blutproben für diese Arbeit wurden von Patienten und Patientinnen im Rahmen der Graz Endocrine Causes of Hypertension (GECOH) Studie gewonnen, weshalb die Studie im Folgenden kurz beschrieben wird. Genauere Informationen können dem publizierten Studienprotokoll entnommen werden (39).

Die GECOH Studie, eine 2009 begonnene, prospektive Single-Center-Studie, untersucht die diagnostische Genauigkeit der Aldosteron-zu-aktivem-Renin-Ratio (AARR) beim Screening auf einen primären Hyperaldosteronismus. Im Verlauf von voraussichtlich vier Jahren werden insgesamt 400 Probanden bzw. Probandinnen in die Studie aufgenommen werden. Die Studienpopulation besteht dabei aus Patienten und Patientinnen, die routinemäßig an die Ambulanz der Universitätsklinik für Innere Medizin des LKH Graz zur

Abklärung auf einen endokrinen Hypertonus überwiesen werden. Nach einem standardisierten Schema wird bei den Studienteilnehmern und Studienteilnehmerinnen zunächst die AARR als Screening-Test bestimmt und nach 2 bis 6 Wochen eine wiederholte AARR-Bestimmung sowie ein Kochsalzbelastungstest durchgeführt. Vor dem Kochsalzbelastungstest werden Na- und Aldosteronwerte im 24h-Harn gemessen. Es werden außerdem Parameter des Ca^{2+} Stoffwechsels (Serum- und Harn- Ca^{2+} , Vitamin D-Status und PTH) bestimmt und die Patienten und Patientinnen auf andere endokrine Formen des Hypertonus, wie Phäochromozytom oder Morbus Cushing untersucht. Als diagnostische Kriterien für primären Hyperaldosteronismus wurden folgende Kriterien festgelegt: Mindestens eine AARR von über 5,7 inklusive eines Aldosteronwertes über 9 ng/d, was einem positivem Screening-Ergebnis entspricht, und zusätzlich Aldosteronwerte nach dem Kochsalzbelastungstest von über 10 ng/dL als Bestätigungstest. Patienten und Patientinnen die diese Kriterien aufweisen haben definitionsgemäß einen primären Hyperaldosteronismus.

3.2.2 EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN

Das Haupteinschlusskriterium der GECOH-Studie ist ein arterieller Hypertonus (definiert als ein Blutdruck von über 140 mmHg systolisch oder 90 mmHg diastolisch bei mindestens zwei Arztbesuchen, bzw. über 130 mmHg systolisch oder 85 mmHg diastolisch bei Messung zu Hause, bzw. ein Mittel bei der 24h-Blutdruckmessung von über 125 mmHg systolisch oder 80 mmHg diastolisch, bzw laufende medikamentöse Behandlung aufgrund arterieller Hypertonie). Die Patienten bzw. Patientinnen sind älter als 18 Jahre und geben eine schriftliche Einverständniserklärung. Ausgeschlossen werden Patienten und Patientinnen mit Grunderkrankungen oder Therapien, die wahrscheinlich die AARR beeinflussen, oder mit Kontraindikationen gegen den Kochsalzbelastungstest.

3.3 PROBEN UND ABLAUF

Die verwendeten Proben stammen aus den im Rahmen der GECOH Studie zwischen 2009 und 2011 durchgeführten Blutabnahmen beim ersten Ambulanzbesuch der

Studienteilnehmer und Studienteilnehmerinnen. Die Patienten und Patientinnen kommen morgens nüchtern (nach 12-stündiger Nahrungskarenz) zur Blutabnahme. Die gewonnenen Proben werden binnen einer Stunde zentrifugiert und dann sofort tiefgefroren oder noch am selben Tag analysiert. Die Bestimmung mit IDS wurde am Tag der Blutabnahme aus dem Serum durchgeführt. Für die anderen Immunoassays wurde EDTA-Plasma verwendet, das zunächst bei -80°C oder teilweise bei -20°C gelagert wurde. Die Bestimmung mit DiaSorin wurde 2010, mit Abbott und Roche im Januar 2012 durchgeführt. Während die Bestimmungen mit IDS im endokrinologischen Labor erfolgten, wurden die drei anderen Assay-Messungen im Labor des Klinischen Institutes für Medizinische und Chemische Laboratoriumsdiagnostik (KIMCL) des LKH Graz bestimmt. Aufgrund der sehr großen Stabilität des an DBP gebundenen 25(OH)D (siehe Kapitel 2.2.3) sollte die lange Lagerungszeit kaum Einfluss auf die Ergebnisse haben. Zusätzlich wird auch der PTH-Wert beim ersten Ambulanzbesuch sowie der BMI ermittelt.

3.4 STATISTISCHE ANALYSE

Die Variablen, also die vier 25(OH)D-Konzentrationen von IDS, DiaSorin, Abbott und Roche, sowie Alter, BMI und PTH, werden zunächst mittels Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest auf eine Normalverteilung überprüft, welche die Voraussetzung für die weiteren parametrischen statistischen Tests ist. Nicht normalverteilte Variablen werden für die statistischen Analysen logarithmiert um sich einer Normalverteilung anzunähern. Zur Prüfung der Korrelationen der Variablen wird der Korrelationskoeffizient nach Pearson verwendet. Die Ergebnisse der 25(OH)D-Messungen der einzelnen Assays werden in jeweils drei Gruppen, entsprechend der Klassifizierung des Vitamin D-Staus (siehe Kapitel 2.2.1), eingeteilt: Defizienz < 20 ng/mL, Insuffizienz ≥ 20 und < 30 ng/mL und Suffizienz ≥ 30 ng/mL. Auf diese Weise können die Unterschiede, die für die Statusbestimmung entstehen, in Kreuztabellen dargestellt werden. Die Werte werden mit Streudiagrammen, Bland-Altman-Plots und Boxplots grafisch dargestellt.

In einem Bland-Altman-Plot werden die Differenzen zwischen zwei Messmethoden auf der y-Achse gegen die Mittelwerte aus den beiden Methoden auf der x-Achse aufgetragen. Außerdem werden der Mittelwert und das 95 % Intervall ($\pm 1,96 \cdot \sigma$) der

Differenz als Geraden eingetragen. Das ermöglicht die Beurteilung konzentrationsabhängiger Abweichungen und der Schwankungsbreite und kann Hinweise auf systematische Fehler geben.

Die statistischen Auswertungen werden mit der IBM Software SPSS und Microsoft Excel durchgeführt. Als statistisches Signifikanzniveau wird ein P-Wert <0.05 angesehen.

4 ERGEBNISSE

4.1 DESKRIPTIVE STATISTIK

In die Auswertung wurden 106 Proben einbezogen, bei denen mit allen vier Immunoassays gültige Werte gemessen wurden. Proben mit fehlenden Werten oder ungültigen Messergebnissen (Konzentrationen außerhalb des Messbereichs) wurden ausgeschlossen.

Die untersuchten Parameter waren nach dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest normalverteilt, nur PTH wurde logarithmiert um eine Normalverteilung zu erreichen.

Beim Vergleich der vier Immunoassays zeigten sich teils starke Unterschiede zwischen den jeweils gemessenen Werten. **Tabelle 1** zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie Minima und Maxima der gemessenen Werte. In **Abbildung 2** werden die Assays in Form von Boxplots gegenübergestellt.

DiaSorin scheint von allen vier Assays am nächsten beim Durchschnitt zu liegen, IDS und Roche messen im Vergleich zu den anderen Assays tendenziell höhere Werte, Abbott hingegen liegt in einem niedrigeren Bereich. Bei alleiniger Betrachtung der zusammengefassten Werte scheinen IDS und Roche am ehesten vergleichbar zu sein, Abbott weicht von diesen beiden sehr stark ab.

Tabelle 1. Statistische Kenngrößen der Immunoassays

| | Mittelwert | σ | Minimum | Maximum |
|-----------------|------------|----------|---------|---------|
| DiaSorin | 20,35 | 8,57 | 4,00 | 40,80 |
| IDS | 27,97 | 11,51 | 8,00 | 62,10 |
| Abbott | 14,71 | 7,93 | 1,10 | 36,60 |
| Roche | 28,70 | 12,54 | 6,90 | 70,00 |

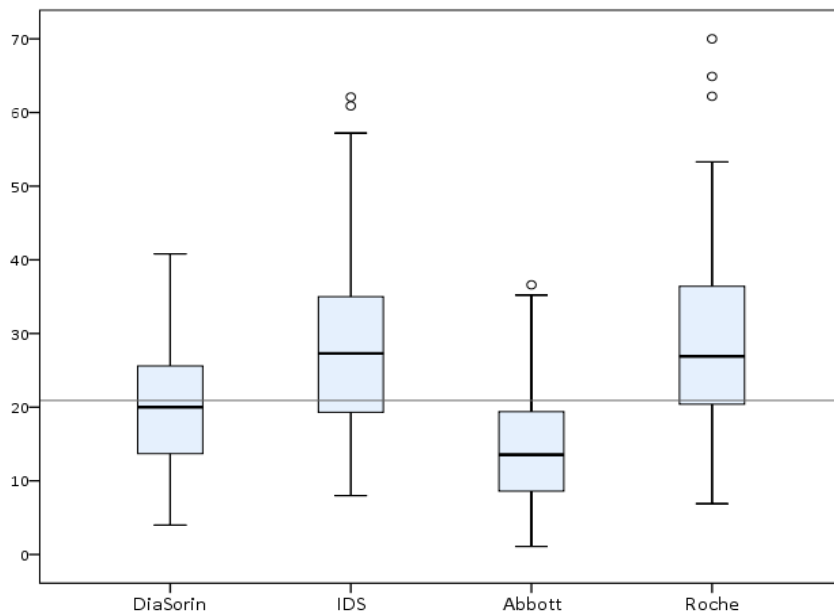


Abbildung 2. Boxplots der einzelnen Immunoassays. Die Box wird durch die beiden Quartilen begrenzt, die mittlere Linie zeigt den Median. Die Whiskers reichen bis zu den Maxima und Minima, die dargestellten Ausreißer ausgenommen. Der Median aus allen Werten ist durch eine horizontale Gerade dargestellt.

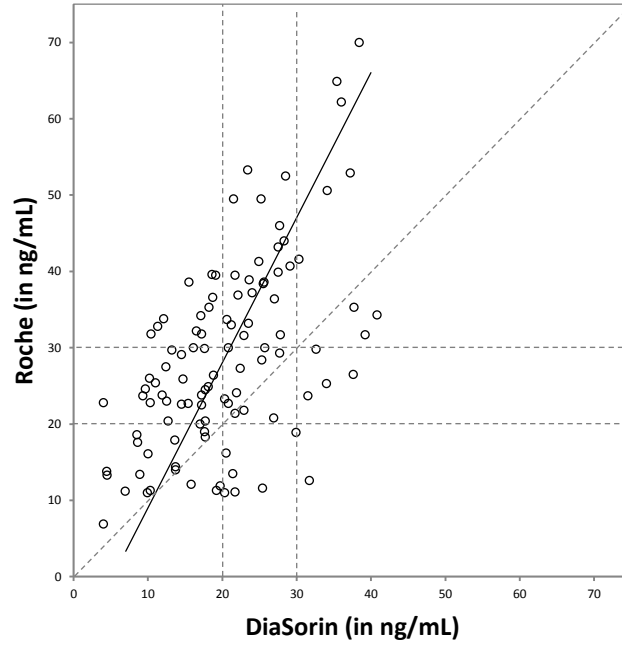
4.2 KORRELATIONEN

Tabelle 2. Korrelationskoeffizienten nach Pearson.
Alle Korrelationen sind signifikant (p -Wert $< 0,01$).

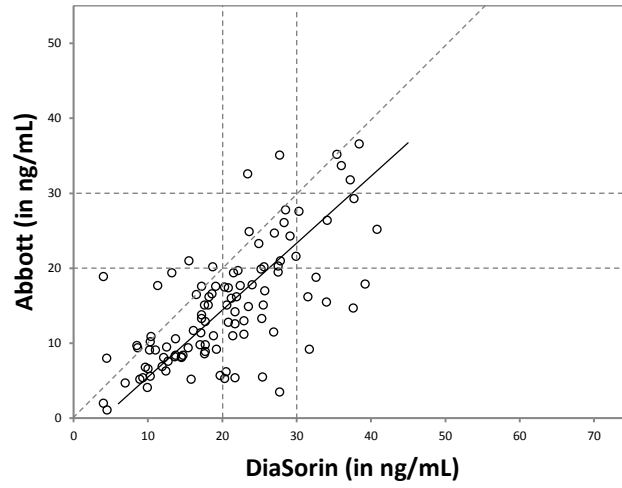
| | DiaSorin | IDS | Abbott |
|---------------|-----------------|------------|---------------|
| Roche | 0,568 | 0,612 | 0,846 |
| Abbott | 0,688 | 0,665 | |
| IDS | 0,771 | | |

Zur Beurteilung der Korrelationen zwischen den Assays wurde jeweils der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet (siehe **Tabelle 2**). Dieser Koeffizient sagt etwas über die Stärke des Zusammenhangs zwischen zwei Variablen aus, jedoch nichts über dessen Steigung. Er kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen, negative Werte bedeuten einen negativen Zusammenhang. Je näher der Wert bei 1 bzw. -1 liegt, desto stärker ist der lineare Zusammenhang, je näher er bei 0 liegt, desto größer ist die Streuung der Werte. Die Korrelationen sind im Allgemeinen relativ niedrig. Am besten korrelieren die Werte von Abbott und Roche gefolgt von DiaSorin und IDS, am schlechtesten korrelieren DiaSorin und Roche. Bei einer geschlechtergetrennten Auswertung zeigt sich ein sehr ähnliches Bild der Korrelationskoeffizienten.

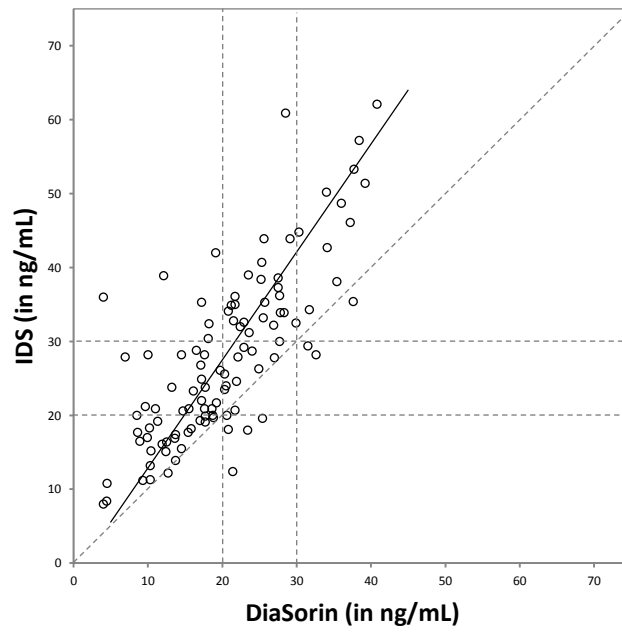
A



B



C



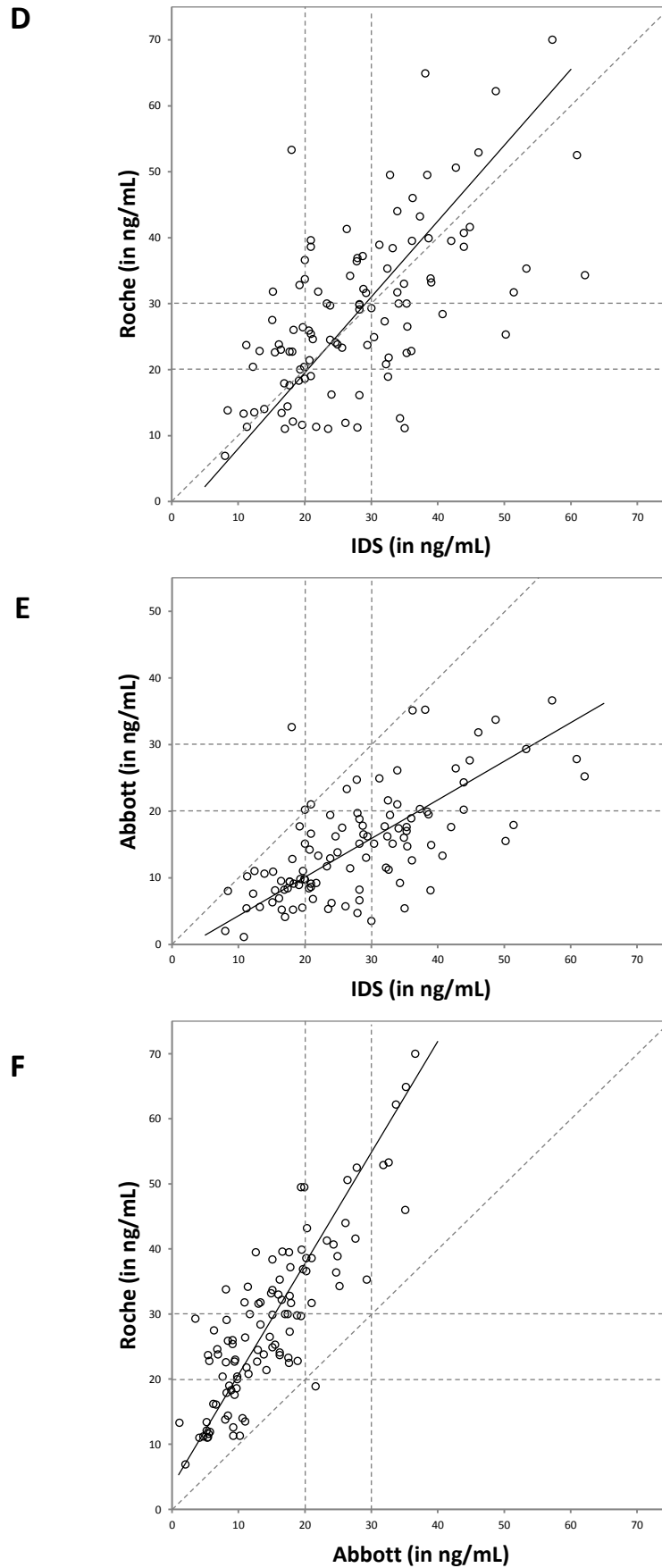
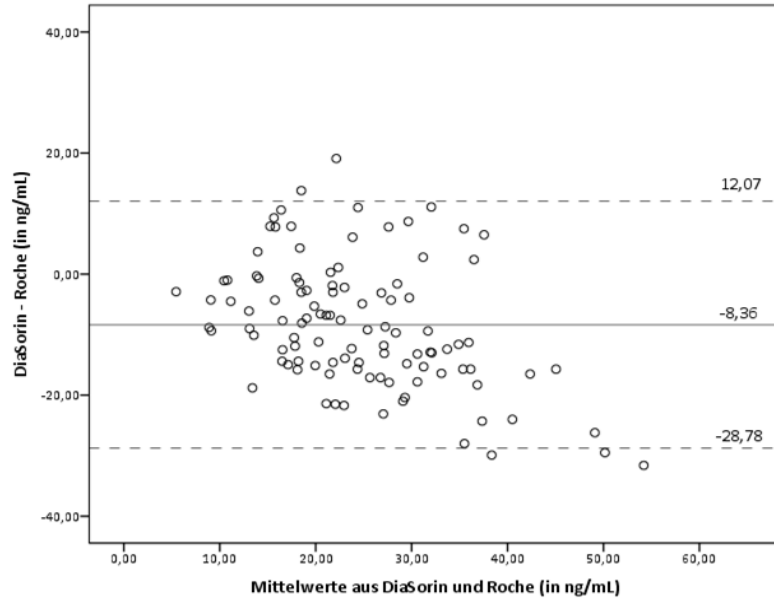
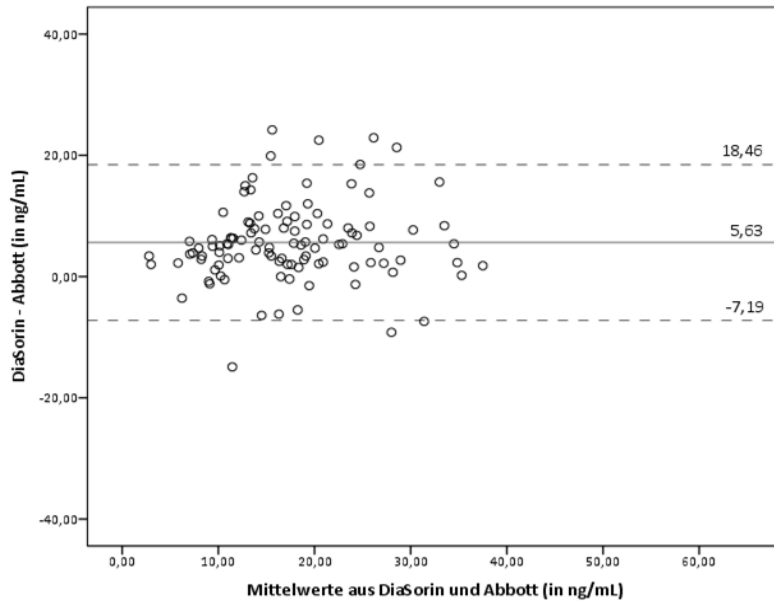


Abbildung 3. Streudiagramme. Ein Punkt steht jeweils für eine Probe. Eine mittels Deming-Regression berechnete Ausgleichsgerade ist dargestellt. Die horizontalen und vertikalen strichlierten Geraden zeigen die Grenzen für die Klassifizierung des Vitamin D-Status an (20 bzw. 30 ng/mL). Zur Orientierung ist eine strichlierte Gerade mit der Steigung 1 eingezeichnet.

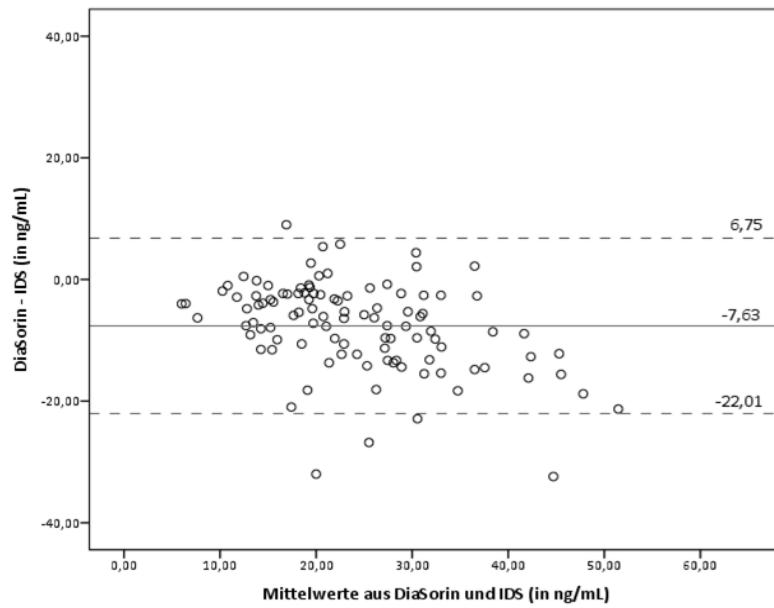
A



B



C



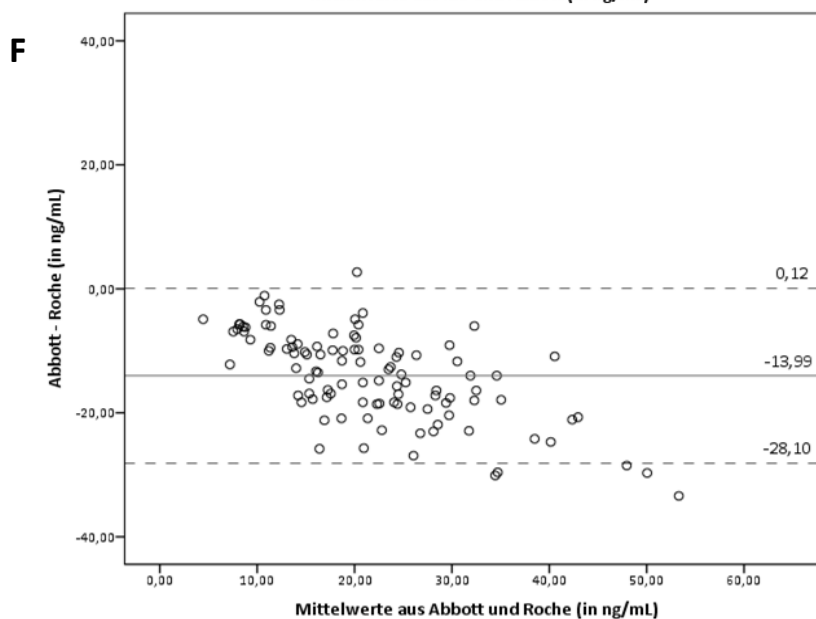
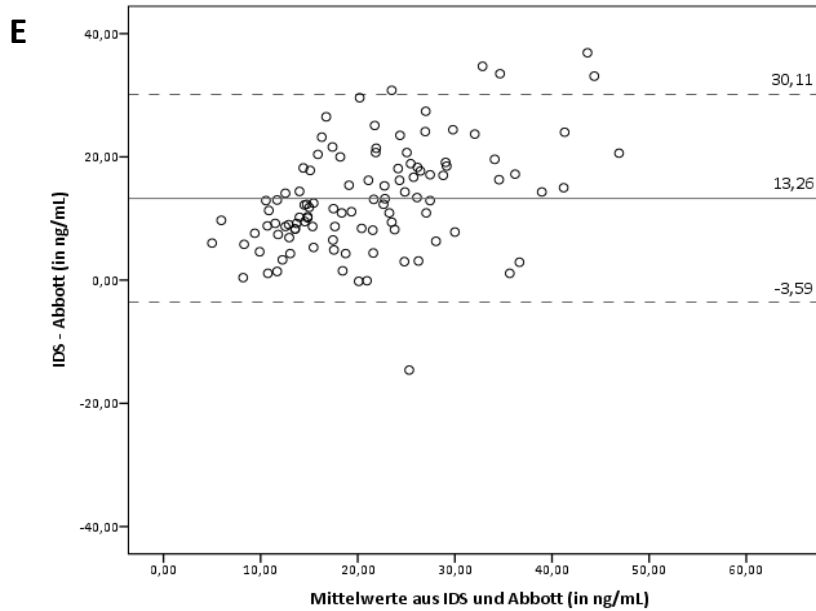
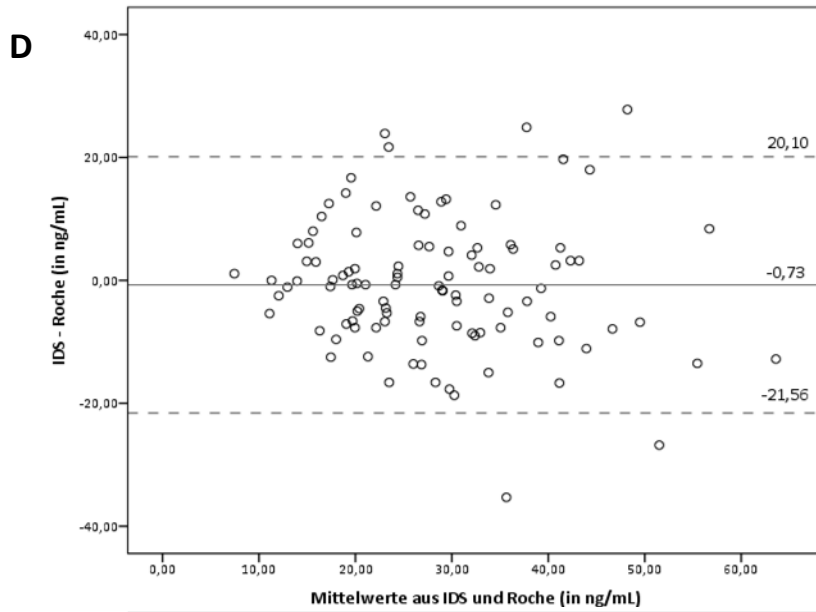


Abbildung 4. Bland-Altman-Plots. Es sind der Mittelwert und die 1,96-fachen Standardabweichungen (entsprechend einem 95%-Intervall) der Differenzen eingetragen.

Es liegt außerdem wie erwartet für alle vier Assays eine signifikante negative Korrelation mit der PTH-Konzentration vor. Die Pearson'schen Korrelationskoeffizienten betragen hier für DiaSorin -0,36, IDS -0,41, Abbott -0,33 und Roche -0,31. Auch zwischen BMI und den 25(OH)D-Werten zeigen sich negative Korrelationen. Diese Korrelationen sind insofern wichtig, da es sich um bekannte Zusammenhänge zwischen 25(OH)D einerseits und PTH bzw. BMI andererseits handelt, die bei validen Messungen entsprechend vorhanden sein sollten.

Die Streubreiten, die die Korrelationskoeffizienten wiedergeben, lassen sich in den in **Abbildung 3** dargestellten Streudiagrammen nachvollziehen. Beim Vergleich von Roche mit DiaSorin (**A**) oder IDS (**D**) ergibt sich eine breitere Punktwolke als beispielsweise im Diagramm von Abbott und Roche (**F**). Hier zeigt sich jedoch zusätzlich, dass zwischen einigen Assays systematische Messunterschiede vorliegen müssen. Besonders auffällig ist das beim Vergleich von Abbott mit IDS (**E**) oder mit Roche (**F**) zu sehen, wo bei den Messungen mit Abbott eine starke Tendenz zu weitaus niedrigeren Ergebnissen erkennbar ist. Die zur Orientierung eingetragenen nach der Deming-Regression berechneten Ausgleichsgeraden weichen in ihrer Steigung entsprechend stark von eins ab. Im Unterschied zur linearen Regression, bei der nach der Methode der kleinsten Quadrate die horizontalen oder vertikalen Abstände der einzelnen Werte von der Ausgleichsgeraden möglichst klein sind, werden bei der Deming-Regression die Normalabstände der Punkte von der Ausgleichsgeraden zur Berechnung herangezogen, sodass es für die Lage der Geraden in der Punktwolke keinen Unterschied macht, welche der Variablen nun der x- oder der y-Achse zugeordnet wird.

Die erwähnten systematischen Fehler können auch aus den Bland-Altman-Plots in **Abbildung 4** abgelesen werden. Hier sind jeweils die Mittelwerte der Messunterschiede als horizontale Geraden eingetragen, die sich insbesondere bei Abbott und IDS (**E**) bzw. bei Abbott und Roche (**F**) stark von null unterscheiden. Zwischen IDS und Roche (**D**) hingegen gibt es praktisch keinen Unterschied im systematischen Fehler, jedoch ist die Streubreite angegeben durch ein 95 %-Intervall relativ groß. DiaSorin stellt sich auch hier als zwischen IDS und Roche einerseits und Abbott andererseits liegend dar. Die geringsten Abweichungen von DiaSorin zeigt in den Bland-Altman-Plots Abbott (**B**), dicht gefolgt von

IDS (C). Die Größe der Messunterschiede scheint insbesondere bei den Vergleichen von DiaSorin mit Abbott und IDS mit Roche nicht stark von der Konzentration abzuhängen, da in den Bland-Altman-Plots die Größe der Abweichungen etwa gleichmäßig über die Konzentration variiert. Zu sehen ist jedoch, dass die Werte von IDS und Roche im Vergleich zu DiaSorin und Abbott bei Messungen in hohen Konzentrationsbereichen tendenziell noch stärker nach oben abweichen.

4.3 AUSWIRKUNGEN AUF DEN VITAMIN D-STATUS

Von besonderer praktischer Bedeutung ist die auf den Messwerten basierende Zuordnung eines Patienten oder einer Patientin zu einer Kategorie der Vitamin D-Status Klassifikation, da sich danach das weitere therapeutische Vorgehen, wie z.B. die Verordnung einer Vitamin D Supplementierung, orientiert. In dieser Arbeit wird die weit verbreitete Vitamin D-Status Einteilung verwendet (vgl. Kapitel 2.2.1): Defizienz < 20 ng/mL, Insuffizienz 20 bis 30 ng/mL und Suffizienz > 30 ng/mL. Es sollen nun die Auswirkungen der Messunterschiede zwischen den vier Assays auf den Vitamin D-Status der Probanden und Probandinnen dargestellt werden.

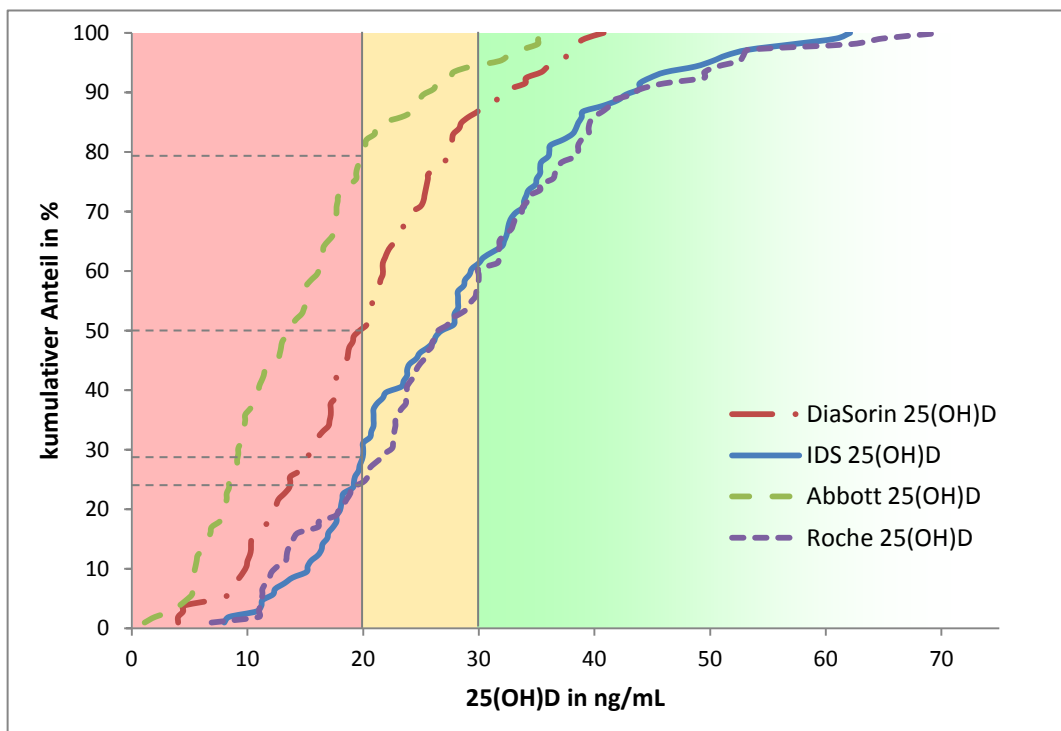


Abbildung 5. Anteil der Probanden und Probandinnen, deren gemessene Werte unterhalb eines entsprechend gewählten Grenzwerts (x-Achse) liegen.

Abbildung 5 stellt für die vier Assays den Anteil an Proben auf der y-Achse dar, deren Werte kleiner als der entsprechende Wert auf der x-Achse sind. Somit lässt sich z.B. ablesen, wie viele Prozent der Probanden und Probandinnen unter dem Grenzwert von 20 ng/mL liegen und als defizient eingestuft werden. Es zeigt sich sehr schön, dass eine im Vergleich systematisch niedriger messende Methode wie hier Abbott zu einem weitaus größeren Anteil an defizienten Probanden und Probandinnen führt. Gleichzeitig kann die Bedeutung der gewählten Grenzwerte abgelesen werden. Die Änderung eines Grenzwerts um wenige ng/mL führt zu einer starken Änderung des Anteils an entsprechend klassifizierten Probanden und Probandinnen.

Die Unterschiede, die sich bei den angenommenen Grenzwerten zwischen den Assays ergeben sind sehr groß. Als defizient klassifiziert werden bei Abbott 79,2 %, bei DiaSorin 50 %, bei IDS 28,3 % und bei Roche 23,6 %.

Im Folgenden ist ein detaillierter Vergleich zwischen je zwei der untersuchten Assays in Form von Kreuztabellen dargestellt, außerdem werden jeweils die Größe und Art der Abweichungen zusammenfassend beschrieben. Die Verteilung der Werte in den Kreuztabellen spiegelt sich auch in den Streudiagrammen von **Abbildung 3** wider.

4.3.1 DIASORIN VS. ROCHE

Aus **Abbildung 3** und **Abbildung 4 (A)** lässt sich erkennen, dass Roche insbesondere bei größeren Werten zu höheren Messungen neigt bei einer relativ großen Streubreite, die sich auch im Korrelationskoeffizienten von 0,57 widerspiegelt. So erklärt sich auch, dass ein großer Teil der Proben von Roche höher klassifiziert wird als von DiaSorin (**Tabelle 3**). Gleich klassifiziert werden lediglich 34 % der Proben.

Tabelle 3. Kreuztabelle: Verteilung der Proben bei Gegenüberstellung des Vitamin D-Status von DiaSorin und Roche.

| | | DiaSorin | | | Gesamt |
|-------|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| | | < 20 ng/mL | 20-30 ng/mL | > 30 ng/mL | |
| Roche | > 30 ng/mL | 12 (11,3%) | 24 (22,6%) | 9 (8,5%) | 45 (42,5%) |
| | 20-30 ng/mL | 23 (21,7%) | 9 (8,5%) | 4 (3,8%) | 36 (34%) |
| | < 20 ng/mL | 18 (17%) | 6 (5,7%) | 1 (0,9%) | 25 (23,6%) |
| | Gesamt | 53 (50%) | 39 (36,8%) | 14 (13,2%) | 106 (100%) |

4.3.2 DIASORIN VS. ABBOTT

Abbott misst tendenziell niedrigere Werte als DiaSorin bei vergleichsweise geringer Streubreite und einem Korrelationskoeffizienten von 0,69. Entsprechend wird von Abbott ein Teil der Proben niedriger klassifiziert, 61,3 % werden der gleichen Kategorie zugeordnet (**Tabelle 4**).

Tabelle 4. Kreuztabelle: Verteilung der Proben bei Gegenüberstellung des Vitamin D-Status von DiaSorin und Abbott.

| | | DiaSorin | | | Gesamt |
|--------|-------------|-------------------|------------------|-----------------|------------|
| | | < 20 ng/mL | 20-30 ng/mL | > 30 ng/mL | |
| Abbott | > 30 ng/mL | 0 (0%) | 2 (1,9%) | 4 (3,8%) | 6 (5,7%) |
| | 20-30 ng/mL | 2 (1,9%) | 10 (9,4%) | 4 (3,8%) | 16 (15,1%) |
| | < 20 ng/mL | 51 (48,1%) | 27 (25,5%) | 6 (5,7%) | 84 (79,2%) |
| | Gesamt | 53 (50%) | 39 (36,8%) | 14 (13,2%) | 106 (100%) |

4.3.3 DIASORIN VS. IDS

Die Werte von IDS sind im Allgemeinen höher als die von DiaSorin, die Streubreite ist relativ niedrig, der Korrelationskoeffizient beträgt 0,77. 46,2 % der Proben werden einer gleichen Kategorie zugeordnet, der Großteil hingegen (48,1 %) wird von IDS höher klassifiziert (**Tabelle 5**).

Tabelle 5. Kreuztabelle: Verteilung der Proben bei Gegenüberstellung des Vitamin D-Status von DiaSorin und IDS.

| | | DiaSorin | | | Gesamt |
|-----|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|
| | | < 20 ng/mL | 20-30 ng/mL | > 30 ng/mL | |
| IDS | > 30 ng/mL | 6 (5,7%) | 24 (22,6%) | 12 (11,3%) | 42 (39,6%) |
| | 20-30 ng/mL | 21 (19,8%) | 11 (10,4%) | 2 (1,9%) | 34 (32,1%) |
| | < 20 ng/mL | 26 (24,5%) | 4 (3,8%) | 0 (0%) | 30 (28,3%) |
| | Gesamt | 53 (50%) | 39 (36,8%) | 14 (13,2%) | 106 (100%) |

4.3.4 IDS VS. ROCHE

Beim Vergleich zwischen IDS und Roche fällt auf, dass es fast keine systematischen Abweichungen gibt, jedoch die Streubreite relativ hoch ist. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,61. 52,9 % der Proben werden gleich klassifiziert, der Rest wird in etwa gleichmäßig höher oder niedriger eingeteilt (**Tabelle 6**).

Tabelle 6. Kreuztabelle: Verteilung der Proben bei Gegenüberstellung des Vitamin D-Status von IDS und Roche.

| | | IDS | | | Gesamt |
|-------|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|
| | | < 20 ng/mL | 20-30 ng/mL | > 30 ng/mL | |
| Roche | > 30 ng/mL | 3 (2,8%) | 13 (12,3%) | 29 (27,4%) | 45 (42,5%) |
| | 20-30 ng/mL | 13 (12,3%) | 13 (12,3%) | 10 (9,4%) | 36 (34%) |
| | < 20 ng/mL | 14 (13,2%) | 8 (7,5%) | 3 (2,8%) | 25 (23,6%) |
| | Gesamt | 30 (28,3%) | 34 (32,1%) | 42 (39,6%) | 106 (100%) |

4.3.5 IDS VS. ABBOTT

Ein recht extremes Bild zeigt sich bei diesem Vergleich. Abbott misst im Durchschnitt nur etwa halb so große Werte wie IDS, die Streubreite ist vergleichsweise groß und der Korrelationskoeffizient beträgt 0,67. Gleich klassifiziert werden 35,9 %, die hauptsächlich

durch die von IDS als defizient klassifizierten Proben zustande kommen, der Rest wird von IDS fast ausnahmslos höher eingeteilt (**Tabelle 7**).

Tabelle 7. Kreuztabelle: Verteilung der Proben bei Gegenüberstellung des Vitamin D-Status von IDS und Abbott.

| | | IDS | | | Gesamt |
|--------|-------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------|
| | | < 20 ng/mL | 20-30 ng/mL | > 30 ng/mL | |
| Abbott | > 30 ng/mL | 1 (0,9%) | 0 (0%) | 5 (4,7%) | 6 (5,7%) |
| | 20-30 ng/mL | 0 (0%) | 4 (3,8%) | 12 (11,3%) | 16 (15,1%) |
| | < 20 ng/mL | 29 (27,4%) | 30 (28,3%) | 25 (23,6%) | 84 (79,2%) |
| | Gesamt | 30 (28,3%) | 34 (32,1%) | 42 (39,6%) | 106 (100%) |

4.3.6 ABBOTT VS. ROCHE

Sehr ähnlich verhält es sich beim Vergleich zwischen Abbott und Roche. Die Streubreite ist jedoch geringer und der Korrelationskoeffizient beträgt 0,85. Auch hier klassifiziert Roche durchgehend höher, gleich sind nur 28,3 % der Proben, diese wiederum hauptsächlich aus der Defizienzgruppe von Roche (**Tabelle 8**).

Tabelle 8. Kreuztabelle: Verteilung der Proben bei Gegenüberstellung des Vitamin D-Status von Abbott und Roche.

| | | Abbott | | | Gesamt |
|-------|-------------|-------------------|---------------|-----------------|------------|
| | | < 20 ng/mL | 20-30 ng/mL | > 30 ng/mL | |
| Roche | > 30 ng/mL | 24 (22,6%) | 15 (14,2%) | 6 (5,7%) | 45 (42,5%) |
| | 20-30 ng/mL | 36 (34%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 36 (34%) |
| | < 20 ng/mL | 24 (22,6%) | 1 (0,9%) | 0 (0%) | 25 (23,6%) |
| | Gesamt | 84 (79,2%) | 16 (15,1%) | 6 (5,7%) | 106 (100%) |

5 DISKUSSION

Die 25(OH)D-Bestimmung ist wohl keine triviale Messmethodik, wie schon in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben. Die Herausforderungen, die schon das Molekül selbst an die Messmethodik stellt werden durch den zunehmenden Bedarf an schnellen, effizienten und damit kostengünstigeren Verfahren noch größer. Offenbar ist eine geringere Messgenauigkeit der Preis für Vereinfachung und Effizienzsteigerung, die man vor allem in den letzten Jahren beobachten konnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ein schlechteres Bild als es zu erwarten gewesen wäre, denn die Unterschiede zwischen den einzelnen Assays sind teilweise gravierend. Am plakativsten ist hier wohl die Gegenüberstellung der Anteile der von Roche und Abbott als defizient klassifizierten Probanden und Probandinnen, die sich mit 23,6 % bzw. 79,2 % deutlich unterscheiden. Die Korrelationen sind akzeptabel bis schlecht, doch auch bei einer relativ guten Korrelation von 0,846 zwischen Abbott und Roche misst Roche annähernd doppelt so hohe Werte aufgrund systematischer Unterschiede.

5.1 VERGLEICHBARE STUDIEN

Ähnliche Studien zu diesem Thema bestätigen vielfach eine schlechte Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Methoden zur 25(OH)D-Bestimmung, insbesondere bei Betrachtung der automatisierten Immunoassays. Binkley et al. (40) wiesen 2004 auf sehr starke Unterschiede von Messungen in verschiedenen Laboratorien bzw. mit verschiedenen Methoden hin. Während bei einer Patientengruppe im ersten Labor bei einer Schwelle von 32 ng/mL 90 % als defizient eingestuft wurden, waren es in einem zweiten Labor bei einer sehr gut vergleichbaren Gruppe nur 17 %. Des weiteren verglich Binkley sechs andere Labors (HPLC, RIA bzw. CLIA) - jedoch mit geringer Probenzahl - und kam auch hier im Allgemeinen zu sehr variablen Werten. Snellman et al. (33) verglichen den DiaSorin LIAISON CLIA mit RIA und HPLC und fanden einen negativen Bias von -9,8 ng/mL zu HPLC, was große Auswirkungen auf die Klassifikation des Vitamin D Status hat.

Ähnliches berichten auch Barake et al. (41), die im Mittel 5 ng/mL niedrigere Werte beim DiaSorin LIAISON im Vergleich zu einem RIA feststellen konnten. Moon et al. (42) verglichen sowohl den DiaSorin LIAISON als auch den Roche Vitamin D total Assay mit LC-MS/MS und fanden für DiaSorin einen negativen (-1,8 ng/mL) und für Roche einen positiven (4 ng/mL) Bias, was auch mit den Daten in dieser Arbeit im Einklang steht. Eine ähnliche Studie von Emmen et al. (43) kam zu noch geringeren Abweichungen und beschreibt die Übereinstimmungen von Roche als ausreichen bis gut, ein Korrelationskoeffizient nach Pearson zwischen Roche und DiaSorin wird mit 0,86 angegeben (vgl. 0,568 in dieser Arbeit). Interessanterweise berichten Cavalier et al. (44) beim Vergleich zwischen Abbott und DiaSorin von höheren Werten bei Abbott mit einem mittleren Bias von 5,5 ng/mL, wohingegen sich in dieser Arbeit ein umgekehrtes Bild zeigt (-5,6 ng/mL), was sich teilweise durch weitaus höhere 25(OH)D-Konzentrationen der Proben bei Cavalier erklären lässt, zumal beschrieben wird, dass diese Abweichungen insbesondere bei Konzentrationen > 50 ng/mL auftreten. Eine größere Studie von Farrell et al. (32) stellt mehreren automatisierten Immunoassays, darunter auch drei der hier verwendeten Assays (DiaSorin, IDS, Abbott) sowie ein 25(OH)D₃ Assay von Roche, zwei LC-MS/MS gegenüber. Von den erwähnten Assays schnitten DiaSorin und IDS am besten ab, am schlechtesten Roche. Der Roche Assay wurde jedoch mittlerweile durch den auch hier verwendeten Vitamin D total Assay ersetzt, der besser abschneiden sollte. Im Gegensatz zu dieser Arbeit lieferte Abbott sogar noch höhere Werte als IDS mit einem jeweils positiven Bias im Vergleich zu LC-MS/MS von 4,56 bzw. 2,68 ng/mL. Die Studie wies auf teilweise große Variabilität insbesondere bei niedrigen Konzentrationen (< 8 ng/mL) hin und konnte nur DiaSorin, IDS (und Siemens) bei Beachtung der Limitationen automatisierter Assays für den Routineeinsatz empfehlen. Es sind noch kaum Studien vorhanden, die die Bedeutung bestimmter Faktoren für die Variabilität zwischen den Assays evaluieren. Heijboer et al. (38) untersuchten den Einfluss der DBP-Konzentrationen auf die Messergebnisse von fünf automatisierten Assays, darunter auch die in dieser Arbeit verwendeten, und zeigten signifikante negative Korrelationen zwischen den Abweichungen der Assays von LC-MS/MS und der DBP-Konzentration bei DiaSorin, IDS und Abbott. Es zeigten sich große Abweichungen zwischen den einzelnen Methoden, die außerdem zwischen den vier untersuchten Patientengruppen sehr variabel waren, was den Einfluss bestimmter Faktoren wie des untersuchten DBP als

Störgrößen nahelegt. Heijboer führte die Ergebnisse auf eine nicht vollständige Trennung des 25(OH)D von DBP in den automatisierten Assays zurück und kam zu dem Schluss, dass nicht alle Assays für die 25(OH)D-Messung in allen Patientengruppen geeignet sind.

5.2 MÖGLICHE GRÜNDE FÜR ABWEICHUNGEN

Obgleich alle untersuchten Assays CLIAS sind und damit das gleiche Prinzip zur Generierung eines Messsignals verwenden, so unterscheiden sie sich doch sehr stark im Detail. Zunächst werden die Proben unterschiedlich vorbehandelt um 25(OH)D vom DBP freizusetzen. In diesem „Extraktionsschritt“ wird jedoch auf Lösungsmittlextraktion und Proteinfällung, die in den aufwändigeren Methoden verwendet werden, verzichtet, sodass möglicherweise das 25(OH)D nicht vollständig dissoziiert und die Messungen anfälliger für Matrixeffekte werden (34). Insbesondere variable DBP-Konzentrationen (38), aber auch andere bislang unbekannte oder in ihrer Bedeutung noch nicht evaluierte Probenbestandteile spielen hier eine Rolle. Es werden außerdem unterschiedliche Antikörper bzw. DBP als Bindungsmoleküle verwendet, die jeweils unterschiedliche Affinität und Spezifität besitzen, sodass es in unterschiedlichem Ausmaß zu Kreuzreaktionen mit anderen Vitamin D-Metaboliten wie 24,25-dihydroxyvitamin D oder 3-epi-25-hydroxyvitamin D₃ kommen kann.

Diesen methodischen Besonderheiten stehen Unterschiede in der Standardisierung der Assays gegenüber. Als Referenzmethode wird zunehmend LC-MS/MS verwendet, wobei es freilich auch bei dieser Methode verschiedene Verfahren gibt, sodass es auch hier zu einer Variabilität zwischen unterschiedlichen Laboratorien kommen kann. Ein großes Problem ist, dass jeder Hersteller seine eigenen Standards verwendet, die sich in ihrer Zusammensetzung und ihrem Herstellungsprozess wiederum stark voneinander unterscheiden. Die Standardmatrix unterscheidet sich meist ohnehin schon von der der Proben (vgl. Kapitel 2.2.2.1), wenn nun auch die Standards untereinander nur schlecht vergleichbar sind, hat das natürlich entsprechende Auswirkungen auf die Variabilität der Ergebnisse.

5.3 VERBESSERUNGSANSÄTZE

Vor kurzem wurden Maßnahmen eingeleitet um dem Standardisierungsproblem zu begegnen. Das National Institute of Standards and Technology der USA (NIST) führte 2009 Standard Referenzmaterialien (SRM) ein und akzeptierte eine LC-MS/MS als Referenzmessmethode (RMP). Die SRMs basieren jedoch teilweise auf Pferdeserum und sind mit exogenen Metaboliten versetzt, sodass sie sich für einige Immunoassays nicht gut eignen (34). Noch nicht alle Hersteller verwenden diese SRMs.

Um die Qualität und Verlässlichkeit der Vitamin D-Messung zu beurteilen wurde 1989 DEQAS gegründet. Diese weltweite Organisation mit ca. 400 teilnehmenden Labors verteilt regelmäßig gepoolte Serumproben und führt statistische Analysen durch. Dadurch leistet DEQAS einen wichtigen Beitrag zur Qualitätssicherung für Laboratorien und liefert Informationen über mögliche Unstimmigkeiten einer Methode (4). Die Teilnahme an DEQAS zeigt den einzelnen Laboratorien zwar auf, wo sie sich im Vergleich mit ihrer Messmethodik befinden, aber es ist fraglich inwiefern die einzelnen Laboratorien bei festgestellten Abweichungen in der Lage sind, ihre Methodik adäquat zu verbessern oder zu adaptieren.

Wie diese Arbeit zeigt, ist die Verwendung universeller Grenzwerte für die Klassifikation des Vitamin D-Status nicht zielführend, denn offenbar ist die Einteilung in eine Gruppe mehr eine Funktion der verwendeten Methode als der tatsächlichen 25(OH)D-Konzentration. Es ist daher notwendig methodenspezifische Schwellen zu finden. In der Praxis könnte sich das jedoch schwierig gestalten, denn schon über die allgemeinen Grenzwerte herrscht Uneinigkeit. Basierend auf klinischen Daten (z.B. PTH-Konzentrationen) oder dem Vergleich mit Referenzmethoden sollte es jedoch über ein einheitliches Verfahren möglich sein, für jede Methode spezifische Grenzwerte zu finden. In diesem Zusammenhang sollte unterstrichen werden, dass vor allem Studien mit dem früher weit verbreitete DiaSorin RIA zur derzeit gültigen Vitamin D Status Klassifikation geführt haben, und man großen Wert auf einen Vergleich mit diesem Assay legen sollte. Das große klinische Problem dabei ist nun aber, dass man mit einer ganz exakten Messung wie z.B. LC-MS/MS zwar den richtigen 25(OH)D Wert bestimmen kann, es dann aber fraglich ist, ob man hierfür auch die älteren und nicht notwendigerweise mit

exaktesten Methoden gemessenen Schwellenwerte für die Vitamin D Status Klassifikation heranziehen kann.

5.4 LIMITATIONEN

Entsprechend der Fragestellung kann diese Arbeit leider keinen Aufschluss darüber geben, welche der untersuchten Methoden nun die besseren Ergebnisse liefert, da keine Goldstandardmethode wie HPLC oder LC-MS/MS als Referenzmethode verwendet wurde. Jedoch wird der DiaSorin LIAISON Assay sehr weit verbreitet eingesetzt und setzt dadurch in gewisser Weise Standards. Er scheint auch in annehmbarer Weise mit Referenzmethoden übereinzustimmen (32,33,42), sodass die Vergleiche mit dem DiaSorin Assay noch am ehesten eine grobe Beurteilung und Einschätzung eines Assays erlauben. Da in Österreich kein Vitamin D₂ zur Vitamin D-Substitution verwendet wird, hat dieses die Ergebnisse wahrscheinlich nicht beeinflusst. Bei verbreitetem Einsatz von Vitamin D₂ könnten aufgrund möglicher Spezifitätsunterschiede der Assays die Messungen noch weiter variieren.

Eine mögliche Limitation ergibt sich aus der teilweise langen Lagerung der Proben bis zur Messung. 25(OH)D ist zwar äußerst stabil, manche Proben wurden jedoch über zwei Jahre gelagert, sodass Konzentrationsänderungen nicht auszuschließen sind. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass die mittleren Konzentrationen von IDS (Messung am Tag der Blutabnahme) und Roche fast gleich sind, und die größten Unterschiede zwischen Roche und Abbott bestehen, die zum selben Zeitpunkt gemessen wurden.

5.5 CONCLUSIO

Keine der untersuchten Assays scheinen gut vergleichbare Ergebnisse zu liefern. Grund dafür sind zum einen systematische Messunterschiede und zum anderen niedrige Korrelationen und die teilweise großen Unterschiede bei Betrachtung der einzelnen Proben, was auf ein offenbar vorhandenes Spezifitätsproblem der Assays hindeutet. Die Auswirkungen auf die Vitamin D-Status-Klassifikation, die diese Variabilität zwischen den

Assays mit sich bringt, sind nicht akzeptabel, was eine wichtige Information für klinisch tätige Ärzte und Ärztinnen darstellt, die anhand der erhaltenen 25(OH)D Messwerte über die Einleitung einer Vitamin D Supplementierung entscheiden. Aus diesem Grund muss die verbreitete Verwendung standardisierter Methoden weiter vorangetrieben werden, müssen Qualitätssicherungsprogramme eingeführt, verbessert und weiter verfolgt werden und sollte versucht werden, methodenspezifische Grenzwerte zu finden. Auch ein vermehrtes Zurückgreifen auf alternative Methoden wie LC-MS/MS könnte in Betracht gezogen werden.

Es ist wichtig, dass sich Laboratorien und auch Kliniker bei der Interpretation der Ergebnisse über die Einschränkungen der verwendeten Methoden im Klaren sind. Für den einzelnen Patienten bzw. die einzelne Patientin ermöglichen die Werte zwar eine orientierende Beurteilung, müssen jedoch immer mit großem Vorbehalt und mit Rücksicht auf die Eigenheiten der jeweiligen Methode betrachtet werden.

REFERENZEN

- (1) Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005 Jul;289(1):F8-28.
- (2) Carter GD. Accuracy of 25-hydroxyvitamin D assays: confronting the issues. *Curr Drug Targets* 2011 Jan;12(1):19-28.
- (3) Holick MF. Vitamin D: evolutionary, physiological and health perspectives. *Curr Drug Targets* 2011 Jan;12(1):4-18.
- (4) Hollis BW. Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs. *Am J Clin Nutr* 2008 Aug;88(2):507S-510S.
- (5) Reichrath J, Lehmann B, Spitz J editors. *Vitamin D - Update 2012*. 1st ed. München-Deisenhofen: Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle; 2012.
- (6) Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1987 Jun;64(6):1165-1168.
- (7) Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007 Jul 19;357(3):266-281.
- (8) Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 2008 Apr;87(4):1080S-6S.
- (9) Vandamme EJ editor. *Biotechnology of vitamins, pigments, and growth factors*. 1st ed. London, New York: Elsevier; 1989.
- (10) Holick MF, Biancuzzo RM, Chen TC, Klein EK, Young A, Bibuld D, et al. Vitamin D2 is as effective as vitamin D3 in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 Mar;93(3):677-681.

- (11) Tripkovic L, Lambert H, Hart K, Smith CP, Bucca G, Penson S, et al. Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2012 Jun;95(6):1357-1364.
- (12) Armas LA, Hollis BW, Heaney RP. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Nov;89(11):5387-5391.
- (13) Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. 2010; Available at: <http://www.iom.edu/Reports/2010/Dietary-Reference-Intakes-for-Calcium-and-Vitamin-D/Report-Brief.aspx>. Accessed 02/21, 2012.
- (14) Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 Jan;96(1):53-58.
- (15) Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung editor. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Vitamin D. 1st ed. Neustadt a. d. Weinstraße: Neuer Umschau Buchverlag; 2012.
- (16) Pilz S, Dobnig H, Fahrleitner-Pammer A, Polt G, März W. Vitamin D deficiency: a global health problem. *J Lab Med* 2008;32(4):200.
- (17) Hart GR, Furniss JL, Laurie D, Durham SK. Measurement of vitamin D status: background, clinical use, and methodologies. *Clin Lab* 2006;52(7-8):335-343.
- (18) Morris HA, Anderson PH. Autocrine and paracrine actions of vitamin D. *Clin Biochem Rev* 2010 Nov;31(4):129-138.
- (19) Pilz S, Tomaschitz A, März W, Drechsler C, Ritz E, Zittermann A, et al. Vitamin D, cardiovascular disease and mortality. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011 Nov;75(5):575-584.
- (20) Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008 Oct;29(6):726-776.

- (21) Bienaimé F, Prié D, Friedlander G, Souberbielle JC. Vitamin D metabolism and activity in the parathyroid gland. *Mol Cell Endocrinol* 2011 12/5;347(1–2):30-41.
- (22) Klinker R, Pape H, Kurtz A, Silbernagl S editors. *Physiologie*. 6th ed. Stuttgart: Thieme; 2009.
- (23) Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*. 2nd ed. Stuttgart: Thieme; 2006.
- (24) Pilz S, Tomaschitz A, Pieber TR, Lafer I, Drechsler C, Meinitzer A, et al. Vitamin D: clinical implications beyond musculoskeletal diseases. *J Lab Med* 2011;35(4):211-216.
- (25) Grant WB, Mohr SB. Ecological studies of ultraviolet B, vitamin D and cancer since 2000. *Ann Epidemiol* 2009 Jul;19(7):446-454.
- (26) Pilz S, Dobnig H, Winklhofer-Roob B, Riedmüller G, Fischer JE, Seelhorst U, et al. Low serum levels of 25-hydroxyvitamin D predict fatal cancer in patients referred to coronary angiography. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008 May;17(5):1228-1233.
- (27) Freedman DM, Looker AC, Chang SC, Graubard BI. Prospective study of serum vitamin D and cancer mortality in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2007 Nov 7;99(21):1594-1602.
- (28) Wactawski-Wende J, Kotchen JM, Anderson GL, Assaf AR, Brunner RL, O'Sullivan MJ, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2006 Feb 16;354(7):684-696.
- (29) Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 2007 Jun;85(6):1586-1591.
- (30) Manson JE, Bassuk SS, Lee IM, Cook NR, Albert MA, Gordon D, et al. The VITamin D and Omega-3 Trial (VITAL): rationale and design of a large randomized controlled trial of vitamin D and marine omega-3 fatty acid supplements for the primary prevention of cancer and cardiovascular disease. *Contemp Clin Trials* 2012 Jan;33(1):159-171.

- (31) Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Eisman JA, et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporos Int* 2009 Nov;20(11):1807-1820.
- (32) Farrell CJ, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M. State-of-the-Art Vitamin D Assays: A Comparison of Automated Immunoassays with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Methods. *Clin Chem* 2012 Jan 9.
- (33) Snellman G, Melhus H, Gedeberg R, Byberg L, Berglund L, Wernroth L, et al. Determining Vitamin D Status: A Comparison between Commercially Available Assays. *PLoS One* 2010 Jul 13;5(7):e11555.
- (34) Carter GD. 25-Hydroxyvitamin D: A Difficult Analyte. *Clin Chem* 2012 Jan 19.
- (35) Ersfeld DL, Rao DS, Body JJ, Sackrison JL, Jr, Miller AB, Parikh N, et al. Analytical and clinical validation of the 25 OH vitamin D assay for the LIAISON automated analyzer. *Clin Biochem* 2004 Oct;37(10):867-874.
- (36) Thomas L editor. *Labor und Diagnose - Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*. 6th ed. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH; 2005.
- (37) Wagner D, Hanwell HE, Vieth R. An evaluation of automated methods for measurement of serum 25-hydroxyvitamin D. *Clin Biochem* 2009 Oct;42(15):1549-1556.
- (38) Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, Buijs MM. Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration. *Clin Chem* 2012 Mar;58(3):543-548.
- (39) Pilz S, Tomaschitz A, Stepan V, Obermayer-Pietsch B, Fahrleitner-Pammer A, Schweighofer N, et al. Graz Endocrine Causes of Hypertension (GECOH) study: a diagnostic accuracy study of aldosterone to active renin ratio in screening for primary aldosteronism. *BMC Endocr Disord* 2009 Apr 7;9:11.

(40) Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, Plum L, Lake E, Hansen KE, et al. Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardization. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Jul;89(7):3152-3157.

(41) Barake M, Daher RT, Salti I, Cortas NK, Al-Shaar L, Habib RH, et al. 25-Hydroxyvitamin D Assay Variations and Impact on Clinical Decision Making. *J Clin Endocrinol Metab* 2012 Jan 11.

(42) Moon HW, Cho JH, Hur M, Song J, Oh GY, Park CM, et al. Comparison of four current 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin Biochem* 2012 Mar;45(4-5):326-330.

(43) Emmen JM, Wielders JP, Boer AK, van den Ouweland JM, Vader HL. The new Roche Vitamin D Total assay: fit for its purpose?. *Clin Chem Lab Med* 2012 Jun 8;0(0):1-4.

(44) Cavalier E, Carlisi A, Bekaert AC, Rousselle O, Chapelle JP, Souberbielle JC. Analytical evaluation of the new Abbott Architect 25-OH vitamin D assay. *Clin Biochem* 2012 Apr;45(6):505-508.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Abbildung 1. Strukturformeln von Cholecalciferol und Ergocalciferol (modifiziert nach de.wikipedia.org/wiki/Cholecalciferol , de.wikipedia.org/wiki/Ergocalciferol und (3))..... | 2 |
| Abbildung 2. Boxplots der einzelnen Immunoassays | 28 |
| Abbildung 3. Streudiagramme. | 30 |
| Abbildung 4. Bland-Altman-Plots..... | 32 |
| Abbildung 5. Anteil der Probanden, deren gemessene Werte unterhalb eines entsprechend gewählten Grenzwerts liegen..... | 34 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Tabelle 1. Statistische Kenngrößen der Immunoassays..... | 27 |
| Tabelle 2. Korrelationskoeffizienten nach Pearson. | 28 |
| Tabelle 3. Kreuztabelle: DiaSorin und Roche. | 36 |
| Tabelle 4. Kreuztabelle: DiaSorin und Abbott. | 36 |
| Tabelle 5. Kreuztabelle: DiaSorin und IDS. | 37 |
| Tabelle 6. Kreuztabelle: IDS und Roche. | 37 |
| Tabelle 7. Kreuztabelle: IDS und Abbott. | 38 |
| Tabelle 8. Kreuztabelle: Abbott und Roche. | 38 |