

# Hvordan måle vitamin D-status?

Vitamin D har en viktig funksjon i kalkomsetningen og er også blitt mye omtalt i forbindelse med en rekke sykdommer. Det er omdiskutert hvilket nivå av vitamin D som er optimalt og når og hos hvem det bør måles. Vi gir her en oversikt over vitamin D-metabolismen, drøfter hvilket serumnivå som er optimalt og gir en innføring i de forskjellige målemetodene og hva som skiller dem.

**Sandra Rinne Dahl**  
**Per Medbøe Thorsby**  
 pertho@ous-hf.no

D-vitaminene er en gruppe steroidliknende hormoner. Deres hovedfunksjon er medregulering av kalkstoffsiftet. I de senere år er det blitt avdekket at vitamin D muligens kan påvirke en rekke andre kroppsfunksjoner og tilstander. Effekten på muskelstyrke er godt etablert (1), men effekter på hjerte- og karsykdom, infeksjoner, autoimmune sykdommer, metabolsk syndrom, type 2-diabetes og kreft har vært diskutert (2-4).

Vitamin D forekommer i to former: vitamin D<sub>2</sub> (ergokalsiferol) og vitamin D<sub>3</sub> (kolekalsiferol). Begge finnes i maten. Mens vitamin D<sub>2</sub> forekommer i små mengder i blant annet sopp, er det større mengder vitamin D<sub>3</sub> i fet fisk (5). Den viktigste kilden er imidlertid egenproduksjonen av vitamin D<sub>3</sub>, som finner sted når huden utsettes for ultrafiolette stråler (290–315 nm) (6, 7).

Alle former av vitaminet transporteres i blodet bundet til vitamin D-bindende protein (DBP). Den videre metabolisme av vitamin D<sub>3</sub> i kroppen er vist i figur 1. Det antas at vitamin D<sub>2</sub> omsettes på samme måte.

Vitamin D<sub>3</sub> hydroksyleres til 25-hydroksyvitamin D<sub>3</sub> (25-OH-D<sub>3</sub>, kalsidiol) i leveren. Denne metabolitten blir omdannet til 1,25-dihydroksyvitamin D<sub>3</sub> (1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, kalsitriol) i nyrene av 1 $\alpha$ -hydroksylasen. 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> er den formen for vitaminet som har hormonaktivitet (2, 7). Konsentrasjonsforskjellen i blodet mellom 25-OH-vitamin D<sub>3</sub> og 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> er 1 000 ganger (nmol/l versus pmol/l).

Det skjer også en stor grad av hydroksylering, omdanning til aktivt vitamin D (1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>), intracellulært i øvrige vev, for eksempel bein, tarmepitel, prostataceller og immunceller (5). 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> induserer hydroksylering av 25-OH-vitamin D til 24,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D, som antakelig er biologisk inaktiv (fig 1). En annen metabolitt av 25-OH-D<sub>3</sub> er 3-epi-25-OH-vitamin D<sub>3</sub>, som dannes ved epimerisering

i C3-posisjon (8). Denne metabolitten forekommer i høy konsentrasjon hos barn som er under ett år (9), men det er nylig blitt vist at den også forekommer hos voksne (10). Den biologiske betydningen av 3-epi-25-OH-vitamin D<sub>3</sub> er uklar.

## Kliniske indikasjoner for vitamin D-måling

Vi har etablert et referanseområde for nivået av 25-OH-vitamin D (37–131 nmol/l) på bakgrunn av prøver fra et representativt utvalg av den norske befolkning (11). Hva som er optimale nivåer av vitamin D, er imidlertid mye diskutert. Den amerikanske endokrinologiske foreningen publiserte i 2011 retningslinjer for inntak av kalsium og vitamin D i kosten. I disse ble også normalområdet for 25-OH-vitamin D<sub>3</sub> diskutert. Konklusjonen var at 25-OH-vitamin D-nivået bør ligge mellom 75 nmol/l og 250 nmol/l (12). Det ser ut til at det er ønskelig med serum-25-OH-vitamin D-verdier på > 50 nmol/l for å hindre rakkitt og osteomalasi.

En rekke vev produserer det aktive 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D fra sirkulerende 25-OH-vitamin D. Effektiv lokal produksjon av 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D krever et høyere nivå av 25-OH-vitamin D enn det som er nødvendig for den klassiske beinhevirkningen av vitaminet (12). Det kan derfor være gunstig med serum-25-OH-vitamin D-verdier på > 75 nmol/l for å maksimere effekten av vitaminet på kalsium-, bein- og muskelmetabolismen, i tillegg til at det muligens gir redusert risiko for andre sykdommer (12). Dette er omdiskutert (13).

Det er mange årsaker til vitamin D-mangel. De viktigste er lavt inntak, malabsorpsjon av vitaminet, lite soleksponering, økt tap av vitaminet (nefrotisk syndrom), økt metabolisering (antiepileptika) eller perifer resistens. Vitamin D-mangel kan gi hypokalsemi, men dette er sjeldent, selv ved alvorlig mangel (< 20 nmol/l) (1). Det er særlig hos innvandrere fra Sørøst-Asia og Nord-Afrika og hos eldre som er lite ute at vi finner vitamin D-mangel i Norge i dag (11).

Store doser vitamin D (over 10 000 IE/dag eller 250  $\mu$ g/dag) kan gi hyperkalsemi eller utløse dette ved for eksempel uopp-

daget primær hyperparatyroidisme. Muligens bør man måle nivået av parathyreoideahormon (PTH) og følge kalsiumnivået nøye ved doser over 4 000 IE – dag/100  $\mu$ g/dag (12, 14).

## Hva bør måles og når?

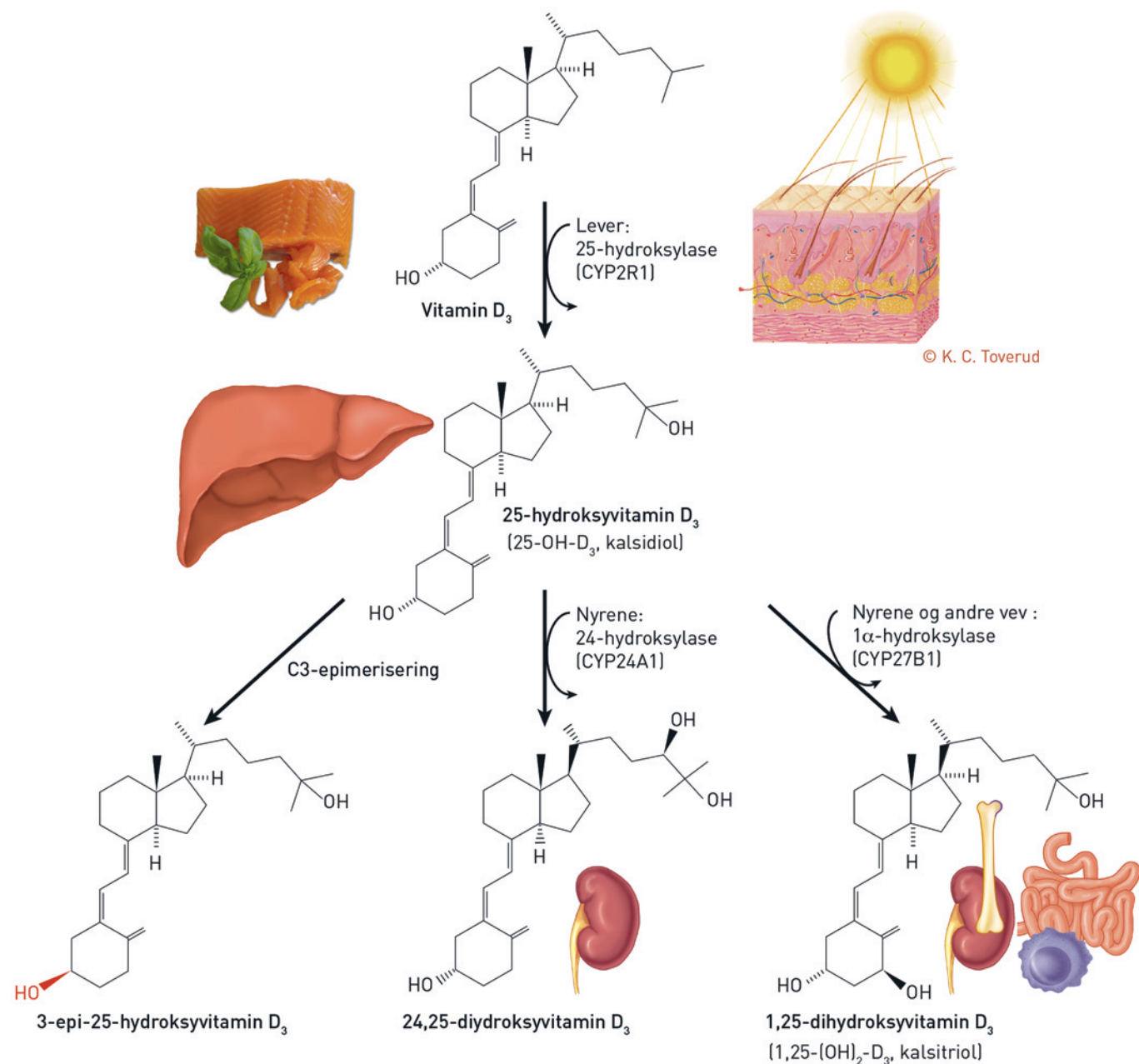
Bestemmelse av den totale 25-OH-vitamin D-konsentrasjonen i serum (summen av 25-OH-vitamin D<sub>2</sub> og 25-OH-vitamin D<sub>3</sub>) er et mål på organismens vitamin D-lager og er for de fleste formål tilstrekkelig for å vurdere en persons vitamin D-status. Har man klinisk mistanke om vitamin D-mangel, for eksempel hvis pasienten tilhører en av de nevnte risikogrupperne, mener vi at man av praktiske og samfunnsøkonomiske årsaker bør starte behandling med 10–20  $\mu$ g (400–800 IE) vitamin D daglig (15), for så å ta prøver etter 3–6 måneder for å kontrollere statusen.

Bestemmelse av 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D-konsentrasjonen i serum reflekterer kalsiumbalansen og er mest relevant der man mistenker nedsatt produksjon, som ved nyresvikt, eller økt produksjon, som ved sarkoidose og lymfom (16).

Måling av PTH-nivå kan si noe indirekte om betydningen av eventuelle lave vitamin D-nivåer, men har antakelig liten klinisk relevans i vurdering av vitamin D-status. Selv ved lave nivåer av vitamin D (< 37 nmol/l) har kun omtrent halvparten av pasientene tegn på sekundær hyperparatyroidisme i form av høye PTH-nivåer, og kun ca. 25 % har tegn på osteomalasi i form av forhøyet nivå av alkalisk fosfatase (1). Disse kan derfor ikke brukes som surrogatmarkører for D-vitaminmangel.

## Hvilken metode måler hva?

Ved flere av de største norske laboratoriene der man analyserer vitamin D bestemmes konsentrasjonen av 25-OH-vitamin D<sub>2</sub> og 25-OH-vitamin D<sub>3</sub> i pasientens serum med en LC-MS/MS-metode (væskekromatografi-tandemmassespektrometri). Alternative metoder er immunoassay eller HPLC-UV. Av disse er immunoassay mest brukt. Vi har derfor valgt å sammenlikne LC-MS/MS-metoden og immunoassay.



**Figur 1** Vitamin D-metabolismen i kroppen. Vitamin D fra kosten eller fra endogen produksjon aktiveres i to trinn, ved hydroksylering i lever i 25-posisjon og hydroksylering i 1-posisjon i nyrer. Hydroksylering i 24-posisjon eller epimerisering i 3-posisjon gir inaktive metabolitter

Analyseprinsippene for LC-MS/MS og immunoassay er fundamentalt forskjellige. Immunoassaymetoden er basert på en immunologisk reaksjon mellom antigen (analytt) og et antistoff. Denne teknikken kan gi kryssreaksjoner mellom antistoffet og andre komponenter i prøven, noe som er den vanligste interferensen med teknikken.

LC-MS/MS-analysen er en direkte kjemisk måling av analyttkonsentrasjonen på bakgrunn av ladning og masse. Metoden er basert på en separasjon av analyttene på en kolonne, etterfulgt av deteksjon ved hjelp av massespektrometri (måling av molekylvekt).

Kun analytter som både har en definert retensjonstid på separasjonskolonnen og danner ioner med en definert molekylvekt blir detektert i massespektrometeret. Slik oppnås høy sensitivitet og spesifisitet. Vanligste form for interferenser er andre komponenter med samme masse som analytten.

#### Konsekvenser av analysemetode

Ved sammenlikning av metodene for måling av vitamin D-metabolittene må det tas noen hensyn som følge av metodeforskjellene.

Ved begge analysemetodene måler man i utgangspunktet både 25-OH-vitamin D<sub>3</sub>

og 25-OH-vitamin D<sub>2</sub>. Noen av immunoassaymetodene gjenfinder imidlertid ikke all 25-OH-vitamin D<sub>2</sub> i prøven, noe som kan gi et falskt lavt svar (17). Ved LC-MS/MS-analyse kan det gis separate svar for 25-OH-vitamin D<sub>3</sub> og 25-OH-vitamin D<sub>2</sub> eller laboratoriedatasystemet kan settes opp til å rapportere summen av disse. Forskjellen mellom de to målemetodene blir tydelig ved (med)bestemmelse av andre metabolitter (3-epi-OH-vitamin D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub>) (fig 1). Dette er vist i tabell 1.

Metabolitten 3-epi-25-OH-vitamin D<sub>3</sub> gjenkjennes ikke av antistoffet i immuno-

**Tabell 1** Forskjellen mellom analyseteknikker for bestemmelse av vitamin D-metabolitter i serum

Metabolitt	LC-MS/MS	Immunoassay
25-OH-vitamin D <sub>3</sub>	Måles	Måles
25-OH-vitamin D <sub>2</sub>	Måles	Måles, kan ha nedsatt gjenfinning
3-epi-25-OH-vitamin D <sub>3</sub>	Måles, kan interferere i analysen	Måles ikke
24,25-(OH) <sub>2</sub> -vitamin D <sub>3</sub>	Måles ikke	Måles, interferer i analysen

assyanalysene og gir derfor ikke noen kryssreaksjon. I LC-MS/MS-analysen vil 3-epi-25-OH-vitamin D<sub>3</sub> kunne medbestemmes som 25-OH-vitamin D<sub>3</sub>. Metabolitten har samme molekylvekt som 25-OH-vitamin D<sub>3</sub> og må separeres på kolonnen før deteksjon med massespektrometri. En LC-MS/MS-analyse kan gi for høyt svar dersom det hos en pasient er høy konsentrasjon av denne metabolitten og den ikke blir separert fra 25-OH-vitamin D<sub>3</sub> på kolonnen.

Metabolitten 24,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> har ofte 100 % kryssreaktivitet med anti-stoffet som er brukt i immunoassayanalysen. Denne metabolitten vil ikke interferere i LC-MS/MS, fordi den både har en annen molekylvekt og forskjellig retensjonstid fra 25-OH-vitamin D<sub>3</sub>. Immunoassayanalysen kan gi for høye svar dersom det hos en pasient er høy konsentrasjon av denne metabolitten.

### Konklusjon

For de fleste formål er det tilstrekkelig å vurdere en persons vitamin D-status ved å bestemme den totale 25-OH-D-konsentrasjonen i serum (summen av 25-OH-vitamin D<sub>2</sub> og 25-OH-vitamin D<sub>3</sub>). Der det er mistanke om vitamin D-mangel – hos eldre og hos innvandrere fra Sørøst-Asia og Nord-Afrika – mener vi man bør vurdere å starte med daglig vitamin D-tilskudd. Måling er først nødvendig etter 3–6 måneder for å kontrollere behandlingen og vurdere dose.

De to analytiske metodene som er mest brukt, LC-MS/MS og immunoassay, bestem-

mer den totale serumkonsentrasjonen, men ut fra forskjellige prinsipper. Kryssreaksjon mellom metabolittene, særlig 3-epi-25-OH-vitamin D<sub>3</sub> og 24,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub>, utgjør den største forskjellen mellom metodene. Den biologiske betydningen av metabolittene er imidlertid fortsatt uklar.

*Forfatterne har bidratt likt til artikkelen.*

*Vi takker Erik Fink Eriksen for verdifulle kommentarer til manuskriptet.*

### Sandra Rinne Dahl (f. 1979)

har en ph.d.-grad i analytisk kjemi og er faglig ansvarlig ved Hormonlaboratoriet, Oslo universitetssykehus.

Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

### Per Medbøe Thorsby (f. 1964)

er ph.d., seksjonsoverlege og medisinsk faglig ansvarlig ved Hormonlaboratoriet, Oslo universitetssykehus. Han er medlem av medisinsk fagkomité i Antidoping Norge og sitter som ekspert innen endokrinologi i European Medicines Agency (EMA).

Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

### Litteratur

1. Glerup H, Mikkelsen K, Poulsen L et al. Hypovitaminosis D myopathy without biochemical signs of osteomalacic bone involvement. *Calcif Tissue Int* 2000; 66: 419–24.

2. Plum LA, DeLuca HF. Vitamin D, disease and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 941–55.
3. Wang TJ, Zhang F, Richards JB et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010; 376: 180–8.
4. Johansson H, Odén A, Kanis J et al. Low serum vitamin D is associated with increased mortality in elderly men: MrOS Sweden. *Osteoporos Int* 2012; 23: 991–9.
5. Holick MF. The D-lightful vitamin D for health. *Journal of Medical Biochemistry* 2013; 32: 1–58.
6. Holick MF. Vitamin D and the skin: photobiology, physiology and therapeutic efficacy for psoriasis. Amsterdam: Elsevier, 1990.
7. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2001; 22: 477–501.
8. Kamao M, Tatematsu S, Sawada N et al. Cell specificity and properties of the C-3 epimerization of Vitamin D3 metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1984; 89–90: 39–42.
9. Singh RJ, Taylor RL, Reddy GS et al. C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3055–61.
10. Bailey D, Veljkovic K, Yazdanpanah M et al. Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D(3) C3-epimer. *Clin Biochem* 2013; 46: 190–6.
11. Meyer HE, Falch JA, Søgaard AJ et al. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism and the association with bone mineral density in persons with Pakistani and Norwegian background living in Oslo, Norway. *The Oslo Health Study. Bone* 2004; 35: 412–7.
12. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 1911–30.
13. Jorde R, Sneve M, Torjesen PA et al. No effect of supplementation with cholecalciferol on cytokines and markers of inflammation in overweight and obese subjects. *Cytokine* 2010; 50: 175–80.
14. Hathcock JN, Shao A, Vieth R et al. Risk assessment for vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 6–18.
15. Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Assessment of vitamin A and D in food supplements. Opinion of the Panel on Nutrition, Dietetic Products, Novel Food and Allergy of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. Oslo: Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM), 2013.
16. Souberbielle J-C, Courbebaisse M, Cormier C et al. When should we measure Vitamin D concentration in clinical practice? *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2012; 243: 129–35.
17. Janssen MJW, Wielders JPM, Bekker CC et al. Multicenter comparison study of current methods to measure 25-hydroxyvitamin D in serum. *Steroids* 2012; 77: 1366–72.

*Mottatt 9.8. 2013, første revisjon innsendt 30.11. 2013, godkjent 3.2. 2014. Redaktør: Kristin Viste.*