

Diplomarbeit

# **Auswirkung von Vitamin D Supplementation auf Marker des kardiovaskulären Risikos**

Prospektive, placebo-kontrollierte Doppelblindstudie zur Untersuchung  
der Wirkungen von Vitamin D Supplementation bei Patienten mit  
niedrigem 25-OH-Vitamin D Spiegel auf Marker für das  
kardiovaskuläre Risiko

eingereicht von

**Elmar Kahr**

Mat.Nr.: 0311798

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 Nuklearmedizin**

unter der Anleitung von

**Univ. Prof. Dr. Harald Dobnig**

**Ass. Dr. Harald Sourij**

### *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 .....*

*Unterschrift*

## Danksagungen

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Harald Dobnig für die raschen Antworten auf Anfragen und die Unterstützung bei der Suche einer Diplomarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Ass. Dr. Harald Sourij für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung bei der Bearbeitung der Fragestellung. Seine Fachkompetenz und sein Engagement haben mir das Schreiben der Diplomarbeit sehr erleichtert. Abgesehen davon konnte ich unter seiner Anleitung viele neue Einblicke in mein Themengebiet sowie in der Interpretation der Ergebnisse gewinnen.

Weiters möchte ich mich bei meiner Frau Christine bedanken, die mir in der Zeit der Diplomarbeit besonders viele Freiräume zum Arbeiten geschaffen hat und während dessen unsere zwei Kinder liebevoll betreut hat. Bedanken möchte ich mich auch für ihre Ermutigung und Liebe in den Höhen und Tiefen dieses Arbeitsprozesses.

Besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mich während des gesamten Studiums emotional und finanziell unterstützt haben.

Danke!

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Niedrige Vitamin D Spiegel stellen ein globales Problem dar, dass u.a. mit verringerter Knochendichte und vermehrten Stürzen oder Frakturen assoziiert ist. Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen niedrigem Vitamin D Spiegel und kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonie, Diabetes mellitus oder dem metabolischen Syndrom festgestellt werden.

Ziel dieser Diplomarbeit ist es, die Auswirkung einer Vitamin D<sub>3</sub> Substitutionstherapie auf Marker des kardiovaskulären Risikos bei Patienten mit niedrigem Vitamin D Spiegel zu untersuchen.

**Methoden:** Bei dieser randomisierten placebo-kontrollierten Doppelblindstudie wurden Patienten mit niedrigem 25(OH)D Spiegel (< 20 ng/dl) an der Ambulanz der Klinischen Abteilung für Endokrinologie und Nuklearmedizin identifiziert. Die Verumgruppe erhielt über einen Zeitraum von 3 Monaten täglich 2400 IU Vitamin D<sub>3</sub>.

Zu Beginn und am Ende dieses Zeitraumes wurde die Endothelfunktion mittels Pulswellenanalyse nach inhalativer Sultanolgabe bestimmt und die „colony forming units“ entsprechend dem Assay von Hill et.al. kultiviert. Beide angewandten Methoden sind mittlerweile gut etablierte Surrogatparameter für kardiovaskuläres Risiko.

**Ergebnisse:** Durch die Substitution konnte der 25(OH)D Spiegel in der Verumgruppe signifikant angehoben werden ( $52,9 \pm 18,5$  vs.  $22,2 \pm 8,5$  ng/ml in der Placebogruppe). Die Endothelfunktion hat sich nach 12 Wochen in der Vitamin D Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe nicht verbessert (Veränderung des „reflection index“ durch Salbutamol  $7,2 \pm 4,4$  vs.  $7,4 \pm 4$ ;  $p = \text{NS}$ ). Beim Wachstumsverhalten der CFU-Hill Kolonien konnte kein Unterschied im Zellwachstum zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden.

**Schlussfolgerung:** Bei unserem Kollektiv von gesunden Probanden die lediglich einen isolierten Vitamin D Mangel aufwiesen, konnte keine Verbesserung der Endothelfunktion festgestellt werden.

## Abstract

**Background:** Low levels of vitamin D represent a considerable global problem and are clearly related to reduced bone mineral density, as well as to falls and fractures. Furthermore, 25(OH)D levels have been associated with well known cardiovascular risk factors such as hypertension, diabetes mellitus and the metabolic syndrome.

This study was conducted to investigate the effect of a vitamin D supplementation on markers for cardiovascular risk in patients with low 25(OH)D levels.

**Methods:** In this randomized, double blind, placebo-controlled study, patients with a 25(OH)D level below 20ng/dl were identified at the outpatient clinic of the Department of Endocrinology and Nuclear Medicine. The test group received a supplement consisting of 2400 IU of vitamin D daily for 3 months.

At baseline and after the 3 months the endothelial function was assessed by “pulse wave analysis” after salbutamol was given by inhalation, and “colony forming units” were cultured according to the protocol of Hill et.al.. Meanwhile, both methods are acknowledged surrogate markers for cardiovascular end-point studies.

**Results:** With substitution the 25(OH)D level could be raised significantly in the vitamin D group ( $52,9 \pm 18,5$  vs.  $22,2 \pm 8,5$  ng/ml) compared with placebo. The endothelial function after 12 weeks, however, was not better in the vitamin D group (change of reflection index after salbutamol  $7,2 \pm 4,4$  vs.  $7,4 \pm 4$  p = NS) compared with placebo. There was no difference between the CFU-Hill count in both groups.

**Conclusion:** There was no improvement of endothelial function in a cohort of healthy people with isolated vitamin D deficiency.

# Inhaltsverzeichnis

<b>DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>3</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>8</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
<b>2 ALLGEMEINER TEIL .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Vitamin D .....</b>	<b>11</b>
2.1.1 Einführung .....	11
2.1.2 Physiologie von Vitamin D.....	11
2.1.3 Vitamin D im Kalzium- und Phosphathaushalt .....	15
2.1.4 Nicht-klassische Effekte von Vitamin D.....	20
2.1.5 Vitamin D Mangel .....	24
2.1.6 Endogene Vitamin D Produktion .....	26
2.1.7 Vorgaben und Behandlungsstrategien .....	26
2.1.8 Vitamin D Intoxikation.....	27
2.1.9 Laborwerte.....	27
<b>2.2 Endothel .....</b>	<b>28</b>
2.2.1 Einführung .....	28
2.2.2 Physiologische Regulation des Gefäßtonus durch NO .....	29
2.2.3 Regulation des Gefäßtonus durch NOS.....	30
2.2.4 Bestimmung des Gefäßtonus durch andere endothelabhängig produzierte Faktoren ....	31
2.2.5 Andere Funktionen des Endothels .....	32
2.2.6 Endotheldysfunktion, Progression der Atherosklerose und Prognose.....	34
2.2.7 Therapeutische Interventionen zur Verbesserung der Endothelfunktion .....	34
<b>2.3 Colony Forming Units .....</b>	<b>37</b>
2.3.1 Einführung .....	37
2.3.2 Charakterisierung von endothelial progenitor cells (EPC) .....	37
2.3.3 Entwicklung von CFU-Hill Kolonien.....	38
2.3.4 Materialien und Methoden für die Kultivierung von CFU-Hill Kolonien .....	40
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Studienhintergrund .....</b>	<b>43</b>
<b>3.2 Studienziel.....</b>	<b>43</b>

<b>3.3</b>	<b>Studienablauf</b> .....	<b>44</b>
<b>3.4</b>	<b>Studienteilnehmer</b> .....	<b>44</b>
3.4.1	Einschlusskriterien.....	44
3.4.2	Ausschlusskriterien.....	45
<b>3.5</b>	<b>Beschreibung der Untersuchungsmethoden</b> .....	<b>45</b>
3.5.1	Endothelfunktionsmessung .....	45
<b>3.6</b>	<b>Studienrisiken</b> .....	<b>47</b>
<b>3.7</b>	<b>Statistische Analyse</b> .....	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE – RESULTATE</b> .....	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Deskriptive Analyse</b> .....	<b>49</b>
<b>4.2</b>	<b>Auswertung der metabolischen Parameter</b> .....	<b>50</b>
<b>4.3</b>	<b>Auswertung der Endothelfunktion</b> .....	<b>52</b>
<b>4.4</b>	<b>Auswertung der CFU-Hill Kolonien</b> .....	<b>53</b>
<b>4.5</b>	<b>Auswertung der Blutdruckwerte</b> .....	<b>54</b>
<b>4.6</b>	<b>Nebenwirkungen von Vitamin D</b> .....	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>56</b>
<b>5.1</b>	<b>Studienergebnisse</b> .....	<b>56</b>
<b>5.2</b>	<b>Limitation der Studie</b> .....	<b>58</b>
<b>5.3</b>	<b>Schlussfolgerungen - Resumee</b> .....	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>60</b>
<b>6.1</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>60</b>
<b>6.2</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>61</b>
<b>6.3</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>62</b>
	<b>CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>69</b>

## Glossar und Abkürzungen

1,25 (OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1,25-Dihydroxycholecalciferol
25(OH)D <sub>3</sub>	25-Hydroxycholecalciferol
ACE	Angiotensin-Konversionenzym
Ca	Kalzium
CFU	Colony forming units
DBP	Vitamin D-Bindungsprotein
d.h.	das heißt
EDRF	endothel-derived relaxing factor
EPC	endothelial progenitor cell
et.al.	et alli (und andere)
FGF23	fibroblast-derived growth factor 23
GTN	Glyceroltrinitrat
IGF-1	insulin-like growth faktor 1
IU	International Units
Lj.	Lebensjahr
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NS	Nicht Signifikant
p	Signifikanzniveau
PTH	Parathormon
RI	Reflexion Index
SD	Standartabweichung
u.a.	unter anderem
VDR	Vitamin D Rezeptor
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

Vitamin D Mangel stellt ein weltweit verbreitetes Problem dar. Die Gründe dafür sind sehr vielfältig und oftmals zivilisationsbedingt.

Mit einem niedrigen 25-Hydroxyvitamin D Spiegel geht eine Vielzahl von Erkrankungen einher, unter anderem ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse. Menschen, die in höheren geografischen Breiten wohnen, neigen in den Wintermonaten stark dazu, einen niedrigen Vitamin D Spiegel zu entwickeln. Genau zu dieser Zeit sterben in dieser Population gehäuft Menschen an kardiovaskulären Events. (1) Ein niedriger Vitamin D Spiegel steht in Zusammenhang mit einigen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie zum Beispiel Hypertonus, Diabetes mellitus oder dem metabolischen Syndrom. Zusätzlich gibt es eine inverse Korrelation zwischen 25-Hydroxyvitamin D Spiegel und koronaren Verkalkungen – ein Indikator für Atherosklerose und ein Vorreiter für kardiovaskuläre Ereignisse. In einigen Studien wurde gezeigt, dass durch die Normalisierung des Vitamin D Spiegels bei Hochrisikopatienten auch der Blutdruck gesenkt werden konnte. (2) In weiteren klinischen und präklinischen Studien wurde die positive Wirkung von Vitamin D auf die Fibrinolyse, Blutfette, Thrombogenität, Endothelregeneration und das Wachstum von glatten Muskelzellen beobachtet. (3)

Den bedeutsamen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen und positive Familienanamnese ist gemeinsam, dass sie zu einer Endotheldysfunktion führen. Eine geminderte Endothelfunktion, welche wir mit dem Pulswellenanalysegerät messen können, ist wesentlich an der Entwicklung und Progression der Atherosklerose beteiligt. Viele klinische Studien haben bestätigt, dass Patienten mit Endotheldysfunktion ein deutlich erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse haben. (4)

In dieser Diplomarbeit wird der Effekt der Vitamin D Supplementation auf Marker des kardiovaskulären Risikos untersucht. Bei diesen Markern handelt es sich um die Endothelfunktion mittels Pulswellenanalyse und die colony forming units - endothelial cells (CFU-Hill Kolonien). Beide Marker sind gut etablierte Methoden in der Erfassung des kardiovaskulären Risikos und starke Surrogatparameter für kardiovaskuläre Endpunkte.

Wir wollen herausfinden, welche Wirkung die Vitamin D<sub>3</sub> Substitutionstherapie auf die Endothelfunktion und CFU-Hill Kolonien hat.

Wenn ein positiver Effekt der Substitutionstherapie auf die untersuchten Marker des kardiovaskulären Risikos zu beobachten ist, wäre dies ein einfaches, günstiges und sicheres Mittel um kardiovaskuläre Prävention zu betreiben.

## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Vitamin D

---

#### 2.1.1 Einführung

Die Entdeckung von Vitamin D ist eng mit der Suche nach einer Therapie für Rachitis verknüpft. Die Beziehung zwischen Rachitis und dem Mangel an Sonnenlicht wurde im 19. Jahrhundert entdeckt. In England und Polen wurde eine höhere Inzidenz für Rachitis bei Kindern aus Großstädten als bei Kindern vom Land festgestellt. Huldshinsky konnte im Jahr 1919 radiologisch eine Verbesserung der Rachitis bei Kindern nach längerer Sonnenlichtexposition beweisen. (5)

Unabhängig von dieser Erkenntnis war der englische Arzt Mellanby etwa zur gleichen Zeit davon überzeugt, dass Rachitis durch ein Ernährungsdefizit verursacht werde. Er zeigte an Experimenten mit Hunden, dass Rachitis insbesondere durch Lebertran geheilt werden konnte, und er hielt das kurz zuvor in Lebertran entdeckte Vitamin A für den auslösenden Faktor. Es war bekannt, dass Vitamin A durch Oxidation zerstört wird. Jedoch war oxidiertes Lebertran weiterhin in der Lage Rachitis zu heilen. Der Chemiker McCollum schloss daraus, dass ein weiterer Stoff, unabhängig vom bekannten Vitamin A, für diesen Effekt verantwortlich war. Als das vierte gefundene Vitamin (nach Vitamin A, B, und C) wurde es daraufhin „Vitamin D“ genannt. (6)

#### 2.1.2 Physiologie von Vitamin D

##### 2.1.2.1 Synthese von Vitamin D

Vitamin D, auch Cholecalciferol genannt, kann im Körper in mehreren Schritten aus Cholesterin gebildet oder diätetisch zugeführt werden. Calciferole zählen zu den Hormonen und sind keine Vitamine im eigentlichen Sinn, da sie im Körper mit Hilfe von ultraviolettem Licht selbst gebildet werden können. (Definitionsgemäß sind Vitamine Substanzen, die der Körper selbst nicht herstellen kann, aber zum Leben braucht.) Man unterscheidet zwischen Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) aus pflanzlicher Kost und Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) aus tierischer Kost. (6) Die

chemische Struktur der beiden unterscheidet sich lediglich durch den Besitz einer Doppelbindung zwischen C22 und C23 sowie einer zusätzlichen Methylgruppe an C24 in der Seitenkette. (7) Obwohl Vitamin D<sub>2</sub> etwas anders metabolisiert wird als Vitamin D<sub>3</sub> werden schlussendlich beide zu 25-Hydroxyvitamin D (25(OH)D) und 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) umgewandelt. (8)

### **2.1.2.2 Vier Schritte zur biologisch aktiven Form von Vitamin D**

**Schritt 1:** 7-Dehydrocholesterin (Provitamin D<sub>3</sub>) wird in der Leber aus Cholesterin synthetisiert.

**Schritt 2:** Durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (UVB, 280 - 310nm) wird das in der Haut (Stratum spinosum und Stratum basale (8)) abgelagerte Provitamin D<sub>3</sub> in Vitamin D<sub>3</sub> umgewandelt. Dabei wird der B-Ring von 7-Dehydrocholesterin gespalten und Vitamin D<sub>3</sub> und die inaktiven Verbindungen Lumisterol und Tachysterol erzeugt. Die Umformung geschieht sehr schnell und erreicht ihr Maximum nach ein paar Stunden in Solar- oder ultraviolettem Licht. Die Pigmentierung und das Alter der Haut, sowie die Intensität und die Zeit der Exposition wie auch die Verfügbarkeit von Provitamin D<sub>3</sub> sind alles Faktoren, welche die Entstehung von Vitamin D<sub>3</sub> beeinflussen.

Unserer Haut schützt sich vor Intoxikation durch exzessive Sonnenbäder durch kurzfristige und langfristige Schutzmaßnahmen. Einerseits ist Vitamin D<sub>3</sub> photolabil, d.h. wird Vitamin D<sub>3</sub> nicht schnell genug im Blut abtransportiert, entstehen durch UVB- und UVA-Strahlung inaktive Verbindungen. Die Bildung von Lumisterol ist sogar reversibel und kann wieder zu Provitamin D<sub>3</sub> umgewandelt werden.

Kürzere Aufenthalte in der Sonne hingegen führen aufgrund der langsamen Konversion von Lumisterol zu Provitamin und weiter zu Vitamin D<sub>3</sub> zu einer verlängerten Freisetzung von Vitamin D<sub>3</sub>. (7) (8) So wird bei kurzen Aufenthalten im Sonnenlicht ähnlich viel Vitamin D<sub>3</sub> gebildet wie bei einer Bestrahlung über längere Zeit. Langfristig schützt sich der Körper vor Vitamin D Intoxikation durch die Bildung von Melanin in der Haut, welches UV-Licht absorbiert. (9)

**Schritt 3:** Über den Blutkreislauf gelangt Vitamin D<sub>3</sub> in die Leber wo es zu 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)D<sub>3</sub>) hydroxyliert wird. In den Hepatozyten haben sowohl Mitochondrien als auch Mikrosomen die Kapazität, jeweils in unterschiedlicher Kinetik und durch unterschiedliche Enzyme 25(OH)D<sub>3</sub> zu produzieren. (8)

**Schritt 4:** 25(OH)D<sub>3</sub> wird über den Blutweg in die Niere transportiert, wo es durch das Enzym 1 $\alpha$ -Hydroxylase erneut hydroxyliert wird. Es entsteht 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, Calcitriol), die biologisch aktive Form von Vitamin D. (7)

### **2.1.2.3 Regulation der Biosynthese**

Aufgrund der Bedeutung der Calciferole für die Regulation der extrazellulären Kalziumkonzentration und dessen engen Spielraum für die Aufrechterhaltung der normalen Zellfunktion, wird die Biosynthese von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sehr genau geregelt. Dies gilt weniger für die hepatische Bildung von 25 Hydroxycholecalciferol, welche lediglich einer einfachen Produkthemmung unterliegt, sondern vielmehr für die Biosynthese von 1 $\alpha$ -Hydroxylase in den proximalen Tubulusepithelien der Niere.

- Calciferole werden im Blut mit einem speziellen Vitamin D-Bindungsprotein (DBP) transportiert, welche als Komplex mit dem Protein glomerulär filtriert werden. Um einen Verlust an 25-Hydroxycholecalciferol im Urin zu verhindern, verfügen die proximalen Tubulusepithelzellen über einen speziellen Rezeptor. Dieser bindet den Komplex aus DBP und 25-Hydroxycholecalciferol und löst dessen Internalisierung und die intrazelluläre Freisetzung von 25-Hydroxycholecalciferol aus.
- Die 1 $\alpha$ -Hydroxylase wird auf der Ebene der Genexpression reguliert. cAMP ist der wichtigste Induktor, während Phosphat, Kalzium (Ca<sup>2+</sup>) und 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> die Transkription des 1 $\alpha$ -Hydroxylasegens hemmen. Somit hemmt auch überschüssiges Vitamin D die Transkription des 1 $\alpha$ -Hydroxylase-Gens, also seine eigene Synthese. (7)

Calcium und Phosphat haben beide einen direkten und einen indirekten Effekt auf die  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  Produktion. Insulin-like growth faktor 1 (IGF-1) spielt ebenso eine Rolle für die Stimulation der Vitamin D Synthese während fibroblast-derived growth factor 23 (FGF23) diese inhibiert. FGF23 ist ein kürzlich entdecktes Zytokin, welches in Knochen und Geweben produziert und vom Serumphosphatspiegel reguliert wird. Es hemmt die  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  Produktion, blockiert die renale Phosphat Reabsorption und senkt somit den Serumphosphatspiegel. Phosphat hemmt die Produktion von Wachstumshormon in der Hypophyse was zu einer Senkung von IGF-1 führt. Wie schon erwähnt, stimuliert IGF-1 die  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  Synthese. (8)

- Bei niedrigem Serum  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel wird Parathormon (PTH) von der Nebenschilddrüse ausgeschüttet. PTH führt über die Aktivierung der Adenylatcyclase zu einem erhöhten cAMP-Spiegel und somit zu einer verstärkten Bildung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in den Nieren.
- Steigt der Serum  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel, wird die Ausschüttung von PTH vermindert, die Produktion von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gebremst (7) und zusätzlich aktives Vitamin D durch die 24-Hydroxylase zum weniger aktiven Metaboliten  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  umgewandelt (10). 24-Hydroxylase katalysiert eine Reihe von Oxidationsreaktionen am C24 und C23, was zu Abspaltungen von Seitenketten und zu Inaktivierung führt. 24-Hydroxylase ist in reziproker Weise zur  $1\alpha$ -Hydoxylase geregelt. Die Aktivität wird durch Phosphat gesteigert und PTH reduziert. (11)

#### **2.1.2.4 Funktion von Calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ )**

In den Zellen der Zielorgane wirkt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wie ein Steroidhormon. Im Gegensatz zu anderen Hormonen binden Steroidhormone nicht an Rezeptoren der Plasmamembran, sondern sie binden an Rezeptoren im Zellinneren, die selbst Transkriptionsfaktoren sind. Der Komplex aus Vitamin D und Vitamin-D-Rezeptor (VDR) entfaltet seine Wirkung, indem er sich an hoch spezifische DNA-Sequenzen heftet und dort die Genexpression verändert. Dies führt schließlich zu Änderungen in der Proteinsynthese mit entsprechenden biologischen Wirkungen. (12) Die

Wirksamkeit von Vitamin D ist also auch von der Rezeptordichte abhängig, die in den verschiedenen Geweben unterschiedlich reguliert wird. (11)

#### **2.1.2.5 Transport von Vitamin D**

Auf Grund der lipophilen Eigenschaft von Vitamin D Metaboliten werden diese im Blutkreislauf an Plasmaproteine gebunden. Das wichtigste Transportprotein ist das Vitamin D-Bindungsprotein (DBP), ein in der Leber produziertes  $\alpha$ -Protein. (8)

99 % der Vitamin D Verbindungen sind proteingebunden (85 % DPB und 15 % Albumin (8)), was eine große Auswirkung auf die Pharmakokinetik hat. DBP-gebundene Vitamin D Metaboliten haben einen limitierten Zugang zu Zielzellen und sind deshalb auch weniger empfindlich gegenüber dem Metabolismus der Leber. Dies führt damit zu einer längeren Zirkulation und einer längeren Halbwertszeit. Aktivierte Vitamin D Verbindungen korrelieren mit der Konzentration von freiem Vitamin D. Daher kann man sagen, dass DBP auch als Puffer für freie, aktivierte Vitamin D Verbindungen fungiert und somit vor Intoxikation schützt. DBP bindet  $25(\text{OH})\text{D}$  und  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ungefähr 30-mal stärker als  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (8). Der Serumspiegel von DBP wird nicht durch Vitamin D reguliert. Er ist bei Lebererkrankungen, nephrotischem Syndrom und Unterernährung verringert, während der Schwangerschaft und unter Östrogentherapie erhöht. Die Konzentration von freiem  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bleibt trotz Änderungen des DBP Spiegels konstant – ein Beispiel für die strenge Selbstregulation des Vitamin D Metabolismus. (11)

#### **2.1.3 Vitamin D im Kalzium- und Phosphathaushalt**

Der Organismus des erwachsenen Menschen enthält etwa 1400 g Kalzium, davon befinden sich 99 % in den Knochen, 1 % in den Weichteilen und nur 0,03 % im Plasma.

Als wichtigstes zweiwertiges Ion ist Kalzium auch essentiell für die Funktion der Zellmembran, für die neuromuskuläre Erregbarkeit, für zahlreiche enzymatische Reaktionen, für die Blutgerinnung und für die Regulation von Hormonen.

Störungen der Kalziumhomöostase können zu Hypokalzämie oder Hyperkalzämie führen. In beiden Fällen treten akute oder chronische Krankheitserscheinungen auf, die eine medikamentöse Behandlung notwendig machen.

Vitamin D spielt im Hormonsystem eine entscheidende Rolle, in der Interaktion zwischen Nieren, Knochen, Nebenschilddrüsen und Intestinaltrakt, um den engen Grenz.Bereich des Kalziumspiegels, welcher für die normale physiologische Zell- und Skelettfunktion von großer Relevanz ist, aufrecht zu erhalten.

Diese Kalziumhomöostase wird gemeinsam von Vitamin D, PTH aus der Nebenschilddrüse und Calcitonin aus der Schilddrüse geregelt. (10)

### **2.1.3.1 Wirkung von Vitamin D auf die Nebenschilddrüse**

Vitamin D hat einen großen Einfluss auf die Funktion der Nebenschilddrüse (NSD). Während Vitamin D Mangel zu einer Hyperplasie der NSD und zu vermehrter PTH Synthese und Sekretion führt, wird bei Vitamin D Gabe die PTH Synthese und das Wachstum der NSD Zellen vermindert. Durch diesen Effekt eignet sich Vitamin D als Therapie bei sekundärem Hyperparathyreoidismus bei chronischer Niereninsuffizienz. (13)

Geringe Änderungen der Konzentration des ionisierten Kalziums werden über einen speziellen Kalziumrezeptor von Zellen der Parathyroidea registriert und beeinflussen die Synthese und Sekretion von PTH (Hypokalzämie bewirkt eine vermehrte, Hyperkalzämie eine verminderte PTH-Synthese und –Ausschüttung). Auf diesem Weg wird die Konstanz des Serumspiegels des ionisierten Kalziums gewährleistet. Hauptzielorgane der PTH Wirkung sind die Knochen, die Nieren und der Darm. (10)

Über eine Stimulation der Adenylatzyklase in Nieren und Knochen erfolgt die Parathormonwirkung: In den Nieren wird Phosphat vermehrt ausgeschieden und Kalzium reabsorbiert. Durch den absinkenden Phosphatspiegel wird die renale  $1\alpha$ -Hydroxylase stimuliert und vermehrt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  synthetisiert. Das fördert die enterale Kalziumabsorption. Eine negative Kalziumbilanz des Knochens tritt bei pathologisch erhöhten PTH-Konzentrationen ein. (14)

Bei einem Vitamin D Mangel werden die Zellen der Nebenschilddrüse zum maximalen Wachstum angeregt, was in weiterer Folge zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus führt. PTH verstärkt den Metabolismus von  $25(\text{OH})\text{D}$  und  $1,25(\text{OH})\text{D}$  und treibt dadurch den Vitamin D Mangel weiter an. Wie erwähnt führt PTH auch zu vermehrter Phosphaturie, wodurch ein niedriger Serumphosphat Spiegel entsteht. (15)

### **2.1.3.2 Regulation der Serum-Kalzium-Konzentration auf einen Blick**

1. Absinken des Serum- $\text{Ca}^{++}$
2. Sekretion von Parathormon
3. Kalzium und Phosphat Mobilisation aus den Knochen, Retention vom Kalzium der Nieren (8), Förderung der Ausscheidung von Phosphat in den Nieren
4. Absinken des Serum-Phosphatspiegels
5. Enterale Reabsorption und ossäre Mobilisation von  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{HPO}_4$
6. Normalisierung des Serum- $\text{Ca}^{++}$  (14)

Wie oben besprochen spielt auch Calcitonin eine Rolle im Kalziumhaushalt. Es bewirkt eine Hemmung der Osteoklastenaktivität und wird über die Kalziumkonzentration im Blut gesteuert. Hohe Kalziumspiegel fördern und niedrige hemmen die Sekretion von Calcitonin aus den parafollikulären C-Zellen der Thyroidea. (8) (14)

### **2.1.3.3 Wirkung von Vitamin D auf die Intestinale Calciumresorption**

Ohne Vitamin D werden nur 10 bis 15 % des Kalziums und nur 60 % des Phosphats aus dem Darm absorbiert. Die Interaktion zwischen 1,25(OH)D mit dem Vitamin D Rezeptor erhöht die Effizienz der intestinalen Kalziumaufnahme auf 30 bis 40 % und die Phosphataufnahme auf ungefähr 80 %. (15)

$\text{Ca}^{2+}$  wird im Duodenum aktiv transzellulär und im restlichen Dünndarm passiv parazellulär absorbiert. Die aktive Resorption ist bei Bedarfschwankungen von großer Bedeutung und kann durch Vitamin D beeinflusst werden. (16) Ob Vitamin D auch einen nicht-genomischen Effekt auf den vesikulären und den parazellulären Weg der Kalziumaufnahme im Darm hat, wird kontrovers diskutiert. (11)

Die enterale Kalziumaufnahme benötigt die epithelialen Kalzium Kanäle TRPV6 (auch bekannt als CaT1 oder ECaC2) und in kleinerem Ausmaß auch TRPV5 (ECaC1). (11) Durch diese Kanäle strömt  $\text{Ca}^{2+}$  entlang dem elektrochemischen Gradienten in die Zellen ein. Anschließend lagert es sich an das zytosolische Protein Calbindin, ein Kalzium bindendes Protein. Dieser Komplex wandert zur

basolateralen Membran, wo  $\text{Ca}^{2+}$  durch den  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Austauscher (NCX1) sekundär-aktiv und über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA1) primär-aktiv aus der Zelle ausgeschleust wird und schlussendlich in den Blutstrom gelangt. Vitamin D stimuliert alle drei Schritte durch vermehrte Proteinexpression (genomischer Effekt). Am wichtigsten ist jedoch die vermehrte Calbindinexpression. (16) (17)

Darüber hinaus stimuliert Vitamin D die Phosphatresorption im Intestinaltrakt. Hierbei spielt offensichtlich die gesteigerte Expression eines  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ -Symporters eine wichtige Rolle. (7)

#### **2.1.3.4 Wirkung von Vitamin D an der Niere**

Der wichtigste Effekt von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  an der Niere ist die Steigerung der Kalziumrückresorption. Ein weiterer Effekt ist die Phosphatrückresorption. (7)

Die intestinalen Kalziumkanäle TRPV5 und TRPV6 findet man auch in den distalen Tubuluszellen der Niere. Sie haben dort eine hohe Selektivität für Kalzium. Ein negatives Feedback verhindert ein Overload von Kalzium. (18)

In den Nieren werden VDR exprimiert und  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stimuliert Calbindin und  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in den distalen Tubuli, genauso wie die Produktion von  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in den proximalen Tubuli. Dennoch wird die genaue Rolle von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in der Regulation des Kalzium- und Phosphattransports durch das renale Epithel in der Literatur kontrovers diskutiert. Man nimmt an, dass der Metabolit  $25(\text{OH})\text{D}_3$  für die Stimulation der Kalzium und Phosphatreabsorption im Tubulussystem der Niere wichtiger sein könnte als  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . In vivo Studien, die den Effekt von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf andere Hormone untersuchen - insbesondere PTH - sind schwierig. (8)

#### **2.1.3.5 Wirkung von Vitamin D auf den Knochenstoffwechsel**

Vitamin D ist essentiell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des mineralisierten Skeletts. Wie bereits erwähnt entsteht durch Vitamin D Mangel bei Kindern und Jugendlichen eine Rachitis und bei Erwachsenen eine Osteomalazie. (6)

Fällt der Vitamin D Spiegel unter  $30\text{ng/ml}$ , gibt es eine signifikante Erniedrigung der intestinalen Kalziumabsorption, welche mit einem erhöhten Spiegel von PTH einhergeht. PTH fördert die tubuläre Reabsorption von Kalzium und stimuliert die

Produktion von  $1,25(\text{OH})\text{D}_3$ . (11) Darüber hinaus aktiviert PTH die Knochenresorption durch Osteoklasten. Die Aktivierung erfolgt jedoch indirekt über Rezeptoren an Osteoblasten. Diese stimulieren in weiterer Folge die Bildung von Osteoklasten aus Präosteoklasten. Osteoklasten lösen die mineralisierte kollagene Matrix im Knochen und führen zu Osteopenie und Osteoporose mit erhöhtem Frakturrisiko. (19)

Die Osteoklastogenese wird in reziproker Weise durch Vitamin D geregelt. Zuerst bindet  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  am intrazellulären VDR im Osteoblasten und bildet mit diesem einen Komplex. Der Komplex heftet sich an DNA-Sequenzen und induziert auf dieser Ebene die Expression von RANKL, welcher entweder an RANK einen Oberflächenrezeptor von Osteoklastenvorläufern oder an den OPG-Rezeptor, bindet. Die Bindung von RANKL an RANK am Präosteoklasten/Osteoklasten führt zu dessen Reifung und Aktivierung. Osteoprotegerin, ebenfalls von Osteoblasten gebildet, bindet und neutralisiert RANKL und verhindert somit die Osteoklastenaktivierung. Somit stellt die Achse RANK, RANKL, Osteoprotegerin die entscheidende regulatorische Achse im Knochenstoffwechsel dar. (20)

### **2.1.3.6 Osteoporose und Frakturen**

Eine amerikanische Studie hat gezeigt, dass 93 % der Personen zwischen 10 und 65 Jahren, die in eine Notaufnahme wegen Muskel- und Knochenschmerzen kommen und eine Vielfalt von Diagnosen inklusive Fibromyalgia und Depression aufweisen, einen Vitamin D Mangel haben. (21)

Ungefähr 33 % der Frauen zwischen 60 und 70 Jahren und 66 % der über 80 jährigen haben Osteoporose. (19) 47 % der Frauen und 22 % der Männer über 50 werden im Laufe ihres Lebens eine osteoporotische Fraktur erleiden. Eine Studie von Chapuy et.al. zeigte an 3270 älteren Frauen, die 1200 mg Kalzium und 800 IU Vitamin  $\text{D}_3$  täglich einnahmen, eine Reduktion von Hüftfrakturen um 43 % und von nonvertebralen Frakturen um 32 % innerhalb von 18 Monaten. (22) Diesen positiven Effekt von Vitamin  $\text{D}_3$  und Kalzium auf das Frakturrisiko unterstreichen auch ähnliche Studien. Um Frakturen vorzubeugen, ist es wichtig, dass der Serumspiegel von  $25(\text{OH})\text{D}_3$  über 26 ng/ml gehoben wird. (15)

## **2.1.4 Nicht-klassische Effekte von Vitamin D**

### **2.1.4.1 Extrarenale Vitamin D Produktion**

Auch andere Zelltypen können unter speziellen Bedingungen (Schwangerschaft, chronische Niereninsuffizienz, Sarkoidose, Tuberkulose, granulomatöse Erkrankungen, rheumatische Arthritis) einen Beitrag zum  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  Spiegel leisten. Allerdings dient das extrarenal produzierte  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hauptsächlich als autokriner/ parakriner Faktor für zellspezifische Funktionen. (23)

Bis heute wurde die  $1\alpha$ -Hydroxylase in vielen Zellen und Geweben nachgewiesen: Prostata, Brust, Darm, Lunge, pankreatische  $\beta$  Zellen, Monozyten und Nebenschilddrüse. (23)

Die Regulation von extrarenaler  $1\alpha$ -Hydroxylase unterliegt ganz anderen Faktoren als das gleiche Enzym in der Niere. Die Synthese und der Abbau von extrarenalem  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  werden von lokalen Faktoren wie Zytokinen und Wachstumshormonen gesteuert, wobei die genauen Mechanismen noch nicht ganz geklärt sind. (11)

Zytokine wie  $\gamma$ -Interferon und TNF- $\alpha$  stimulieren die  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  Synthese in Makrophagen und Keratinozyten. Dies ist wichtig für das Verständnis der Pathophysiologie von Hyperkalzämie und dem hohen  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  Spiegel bei Patienten mit Sarkoidose, Lymphomen und granulomatösen Erkrankungen. (8)

Es wurde bereits eine große Zahl von anderen Vitamin D Metaboliten identifiziert, deren physiologische Rollen jedoch noch nicht geklärt sind. (8)

### **2.1.4.2 Wirkung von Vitamin D in weiteren Geweben**

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kontrolliert direkt oder indirekt mehr als 200 Gene. Es inhibiert die Zellproliferation, steuert Zelldifferenzierung, Apoptose und Angiogenese. Vitamin D verringert die Proliferation sowohl in normalen Zellen als auch in Krebszellen und induziert ihre terminale Differenzierung. Eine praktische Anwendung ist die Verwendung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  Analoga bei der Behandlung von Psoriasis.

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ist auch ein potenter Immunmodulator. In Monozyten und Makrophagen, die mit Lipopolysacchariden oder Mycobacterium tuberculosis in Kontakt kommen, kommt es zu einer Upregulation von Vitamin D Rezeptorgenen und dem 25-Hydroxyvitamin D- $1\alpha$ -Hydroxylasegen. Die vermehrte Bildung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  führt zur Synthese von Cathelicidin, einem Peptid, das dabei hilft M.

tuberculosis und andere infektiöse Erreger zu zerstören. Wenn der Serumspiegel von  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  unter 20 ng/ml fällt, sind die Monozyten und Makrophagen nicht mehr in der Lage diese immunologische Reaktion zu induzieren. Das könnte auch erklären, weshalb schwarze Amerikaner, die an einem Vitamin D Mangel leiden, eher dazu neigen an Tuberkulose zu erkranken als Weiße. Zusätzlich verläuft diese Krankheit bei den Schwarzen meist aggressiver als bei Weißen. (15)

Eine wichtige Beobachtung ist, dass man VDR nicht nur in den klassischen Zielgeweben, sondern auch in anderen Organsystemen findet. VDR befinden sich in Zellen des Hämatopoetischen- und Immunsystems, des Herzens, des Skeletts, des glatten Muskels, des Gehirns, der Leber, der Brust, des Endothels, der Haut (Keratinozyten, Melanozyten und Fibroblasten), und in endokrinen Drüsen (Hypophyse, Parathyreoidea,  $\beta$ -Zellen des Pankreas, Thyreoidea, Nebenniere, Ovarien, Testis). Darüber hinaus besitzen Malignome oft VDR und reagieren auf die antiproliferative Eigenschaft von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ .

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hat Einfluss auf die Produktion und Sekretion von Insulin aus dem Pankreas, Prolaktin aus der Hypophyse und PTH aus der Parathyreoidea. Ebenso reguliert Vitamin D die Zytokinproduktion und Sekretion von Lymphozyten (Interleukin-2) und Monozyten (Tumor Nekrose Faktor).

Die myokardiale Kontraktilität und der Gefäßtonus werden ebenso wie die Leberregeneration von Vitamin D moduliert.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  reduziert die Proliferationsraten von vielen Zelllinien, einschließlich normale Keratinozyten, Fibrozyten, Lymphozyten und transformierten Zellen der Mamma, des Skeletts, des Verdauungstrakts, des lymphatischen und myeloischen Systems. Auch die Differenzierung von Zellen ist unter Vitamin D verbessert. Calcitriol und seine Analoga haben ein hohes Potential um physiologische und pathophysiologische Prozesse zu modulieren.

Die obige Darstellung zeigt, dass Vitamin D mit seinem weit reichenden Wirkungsspektrum im menschlichen Körper nicht nur in der Behandlung von Osteoporose, Psoriasis und sekundären Hyperparathyreoidismus verwendet werden kann. Es gibt zurzeit zahlreiche Versuche in der Behandlung von verschiedenen Krebserkrankungen mit Vitamin D Analoga. Somit ist Vitamin D mittlerweile auch außerhalb der Regulation des Kalziumstoffwechsels klinisch in Anwendung und Erprobung. (8)

### **2.1.4.3 Auswirkung von Vitamin D Mangel auf chronische Erkrankungen**

#### *KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN*

Im Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen scheint es ein Vorteil zu sein, in Regionen zu wohnen, die näher zur Äquatorialregion liegen. In einer Studie in der Patienten mit Hypertonus 3x pro Woche über einen Zeitraum von 3 Monaten einer UVB-Bestrahlung ausgesetzt wurden, zeigte sich eine Erhöhung des 25(OH)D Spiegels um etwa 180 % und eine Normalisierung des Blutdrucks. Zusätzlich steht ein Vitamin D Mangel im Zusammenhang mit chronischer Herzinsuffizienz und erhöhten zirkulierenden Entzündungswerten (C-reaktives Protein, Interleukin-10). (15)

Ebenso entwickeln Knock-Out-Mäuse ohne VDR eine myokardiale Hypertrophie und -dysfunktion. Fast alle Erwachsenen mit Herzinsuffizienz weisen einen reduzierten Vitamin D Spiegel auf. In prospektiven Studien war Vitamin D Mangel ein unabhängiger Risikofaktor für die Gesamtmortalität, Tod infolge von Herzinsuffizienz und plötzlichen Herztod. Verschiedene Wirkungen von Vitamin D auf die Elektrophysiologie, Kontraktilität und Struktur des Herzens weisen darauf hin, dass Vitamin D Mangel einen kausalen Einfluss auf myokardiale Erkrankungen hat. (24)(25)

Unklar bleibt nur, ob der Vitamin D Mangel der Grund oder die Konsequenz von einem schlechten Gesundheitszustand ist. (26)

#### *KREBS*

Aktuelle Studien zeigen, dass ein niedriger 25(OH)D Spiegel auch ein Risikofaktor für die Mortalität bei Krebs ist. (27)(28) Menschen, die in höheren geographischen Breiten wohnen, haben ein erhöhtes Risiko an Hodgkin Lymphomen, Colorectalen- (29), Pankreas-, Prostata-, Ovarial-, Mammakarzinomen und anderen Krebsarten zu erkranken oder daran zu versterben im Vergleich zu Menschen in niedrigeren Breitengraden. Sowohl prospektive als auch retrospektive Studien zeigen, dass ein Serumspiegel 25(OH)D unter 20ng/ml mit einem 30 – 50 % erhöhten Risiko für Krebs in Colon (29), Prostata und Brust assoziiert ist. (15)

Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist, dass Zellen aus dem Colon, Prostata, Brust und anderen Geweben 25-Hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -Hydroxylase exprimieren und lokal 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> produzieren, um Gene zu kontrollieren, die Krebs

verhindern helfen, indem sie die Zellproliferation und –differenzierung beeinflussen. Es wird zudem vermutet, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bei malignen Zellen eine Apoptose induzieren und die Angiogenese unterdrücken kann. Das würde plausibel erklären, warum Menschen mit vermehrten Sonnenaufenthalten und hohem  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  Spiegel ein niedrigeres Risiko für Krebs haben. Dennoch kann man nicht sagen, dass ein suffizienter Vitamin D Status allein vor der Entstehung oder der Progression von Krebs schützt. (30)(6)(27)

#### *AUTOIMMUNE ERKRANKUNG*

Das Leben in höheren geographischen Breiten birgt ein erhöhtes Risiko für Typ 1 Diabetes, Multiple Sklerose(31) und Morbus Crohn. Frauen die mehr als 400 IU pro Tag zu sich nehmen, verringern ihr Risiko an Multipler Sklerose zu erkranken um 42%. Ähnliche Beobachtungen werden auch bei der rheumatoiden Arthritis gemacht. (15)

#### *PSYCHIATRISCHE ERKRANKUNGEN*

Vitamin D Mangel geht mit einer erhöhten Inzidenz von Schizophrenie und Depression einher. (15)

#### **2.1.4.4 Muskelstärke und Stürze**

Vitamin D Mangel führt zu Muskelschwäche. Die Skelettmuskeln besitzen VDR und benötigen wahrscheinlich Vitamin D für ihre optimale Funktion. Durch die Anhebung des Vitamin D Spiegels in einen normalen Bereich kommt es zu einer kontinuierlichen Verbesserung der Muskelkraft.

Untersuchungen bei Vitamin D defizienten Senioren über 70 Jahren zeigten in einer doppelblind-randomisierten Studie, die u.a. an der Grazer Klinik durchgeführt wurde, dass eine tägliche Einnahme von 800 IU Vitamin  $\text{D}_3$  plus Kalzium einer Kalzium-Monotherapie in Hinblick auf eine Sturzreduktion deutlich überlegen war. (32) Weiters zeigte eine Metaanalyse von fünf randomisierten klinischen Studien (1237 Personen) eine Reduktion des Sturzrisikos um 22 % unter Vitamin D Therapie, verglichen mit Placebo- oder Kalziumeinnahme. Die gleiche Analyse hat gezeigt, dass die tägliche Einnahme von 400 IU Vitamin  $\text{D}_3$  nicht effektiv ist um

Stürze vorzubeugen. Täglich 800 IU Vitamin D<sub>3</sub> plus Kalziumeinnahme scheinen demnach das Sturzrisiko zu senken. (29)

### 2.1.5 Vitamin D Mangel

Je tiefer der Sonnenstand, desto länger ist der Weg des Sonnenlichts durch die Atmosphäre und umso stärker ist die Absorption des Lichts. Die kurzwellige UVB-Strahlung wird durch die Atmosphäre wesentlich stärker absorbiert als längerwellige Strahlung. Deshalb ist die Höhe des Sonnenstandes ein entscheidender Faktor für die Vitamin D Bildung in der Haut. In den Wintermonaten ist es aus diesem Grund schwer, Vitamin D in ausreichenden Mengen über die Haut zu produzieren. Oberhalb des 52. Breitengrades (London, Berlin) sistiert die Vitamin D Bildung in der Haut während der sechs „dunklen“ Monate weitgehend. Unterhalb des 37. Breitengrades (Los Angeles, Sizilien) ist hingegen eine ausreichende Vitamin D Synthese sicher über das ganze Jahr möglich. In unseren gemäßigten Breiten steigt die Vitamin D Biosynthese mit der Höhe des Sonnenstandes exponentiell an und ist daher stark von der Jahreszeit abhängig. (9)

Obwohl es keinen Konsens über einen „optimalen“ Vitamin D Spiegel gibt, sprechen die meisten Experten bei einem 25(OH)D Spiegel unter **20ng/ml (50nmol/l)** von einem Vitamin D Mangel. Nach dieser Definition haben weltweit schätzungsweise eine Milliarde Menschen einen Vitamin D Mangel. Wie verschiedene Studien zeigen, haben zwischen 40 und 100 % der älteren Frauen und Männer in den USA und Europa einen Mangel an Vitamin D. Über 50 % der postmenopausalen Frauen, die Medikamente gegen Osteoporose einnehmen, haben suboptimale 25(OH)D Spiegel unter 30ng/ml. (33) Auch Kinder und Jugendliche haben häufig einen Vitamin D Mangel. Gemäß einer Studie in Boston haben z.B. 52 % der lateinamerikanischen und schwarzen Jugendlichen (34) und einer weiteren Studie in Maine 48 % der weißen Mädchen (35) einen 25(OH)D Spiegel unter 20ng/ml.

Die folgende Tabelle zeigt, dass der Vitamin D Mangel ein globales Problem aller Altersstufen darstellt.

Ort	geogr. Breite	Gruppe, Alter	Sommer/Herbst (ng/ml ± SA)	Winter/Frühling (ng/ml ± SA)
Miami	26°	über 18. Lj.	26,8 ± 10 (Männer) 25,0 ± 9,4 (Frauen)	23,3 ± 8,4
Boston	43°	weiße Frauen 20.-40. Lj.	34,2 ± 13,2	24,0 ± 8,6
Boston	43°	schwarze Frauen 20.-40. Lj.	16,4 ± 6,6	12,1 ± 7,9
Paris	49°	männliche Jugendliche	23,4 ± 8,0	8,2 ± 2,8

Tabelle 1: Geografische Breite, und Vitamin D Spiegel

In Europa, wo nur sehr wenigen Nahrungsmitteln Vitamin D zugesetzt wird, stehen Kinder und Erwachsene unter besonders hohem Risiko. Menschen, die in Äquatornähe wohnen und der Sonne ohne Sonnenschutz ausgesetzt sind, haben einen robusten Vitamin D Spiegel über 30ng/ml. Trotzdem findet man auch in diesen Regionen Vitamin D Mangel speziell bei Menschen, die den Großteil ihrer Haut vor der Sonne mit Kleidung bedecken.

Besonders gefährdet sind Schwangere und stillende Mütter. 73 % der Frauen und 80 % ihrer Babys haben zum Zeitpunkt der Geburt eine 25(OH)D Spiegel unter 20ng/ml.

Wie oben erwähnt, fällt der 25(OH)D Spiegel je nach Jahreszeit, geographischer Breite, Ernährungsgewohnheiten, Bekleidungsgehnheiten, Alter, Hauttyp und Lebensstil in einen Bereich, in den von einem Vitamin D Mangel gesprochen wird.

Weitere Gründe für die Entstehung von Vitamin D Mangel sind:

- Malabsorption durch Krankheiten des Verdauungstraktes
- Adipositas – verringert die Verfügbarkeit von Vitamin D aus dem Körperfett  
Es besteht eine inverse Beziehung zwischen BMI und 25(OH)D Spiegel
- Verstärkter Katabolismus durch verschiedene Medikamente (Antikonvulsiva, Glucokortikoide, antiretrovirale Medikamente)
- Geringer Vitamin D Gehalt der Muttermilch
- Verringerte Synthese durch Leber- und Nierenerkrankungen
- Erbkrankheiten, die z.B. zu einer verminderten Synthese oder zu Mutationen von VDR führen
- Erworbene Erkrankungen wie Tumor-induzierte Osteomalazie, primärer Hyperparathyreoidismus, granulomatöse Erkrankungen und Hyperthyreose

***Da - wie oben angesprochen - ein niedriger Vitamin D Spiegel häufig zivilisationsbedingt ist, wird er oft als normal angesehen, ist aber trotzdem nicht gesund.*** (15)

### **2.1.6 Endogene Vitamin D Produktion**

Vernünftige Aufenthalte an der Sonne können eine adäquate Vitamin D Bildung induzieren. Vitamin D wird anschließend im Körperfett gespeichert und in den Wintermonaten wieder abgegeben. Eine Sonnenbestrahlung der Arme und Beine für 5 bis 30 Minuten (abhängig von der Tageszeit, Jahreszeit, geografischen Breite und Hautpigmentierung) zwischen 10 und 15 Uhr, zweimal in der Woche ist oftmals ausreichend. Unter optimalen Bedingungen kann die Haut eines jungen Menschen täglich 10.000 bis 20.000 IU Vitamin D<sub>3</sub> bilden. Dagegen enthalten nur wenige Nahrungsmittel Vitamin D<sub>3</sub> in vergleichbarer Menge. Vitamin D findet sich vor allem in Fischfetten, Pilzen, Eiern und in geringem Maß auch in Milchprodukten. (15)

### **2.1.7 Vorgaben und Behandlungsstrategien**

Das Ernährungskomitee der EU empfiehlt eine tägliche Vitamin D Einnahme von 200 IU für Kinder und Erwachsene bis 60 Jahren und 400 IU für Erwachsene über 60 Jahren. (36) Die meisten Experten empfehlen, dass Kinder und Erwachsene ohne adäquate Sonnenexposition 800 bis 1000 IU pro Tag benötigen. Kinder mit Vitamin D Mangel sollten aggressiv therapiert werden, um Rachitis vorzubeugen. (15)

Vitamin D<sub>2</sub> muss dreimal so hoch wie Vitamin D<sub>3</sub> dosiert werden um den Serumspiegel von 25(OH)D aufrechtzuerhalten. (37) Eine kosteneffektive Methode um einen Vitamin D Mangel zu korrigieren ist die Gabe von 50.000 IU Vitamin D<sub>2</sub> einmal wöchentlich für 8 Wochen. Alternativ dazu kann man auch 1000 IU Vitamin D<sub>3</sub> oder 3000 IU Vitamin D<sub>2</sub> pro Tag verordnen. (6) (15)

Weiters sind Behandlungsmethoden beschrieben, im Rahmen derer Patienten 100.000 IU Vitamin D<sub>3</sub> einmal alle 3 Monate bekommen haben und der 25(OH)D Spiegel über 20ng/ml gehalten werden konnte. All diese Methoden senken das

Risiko für Frakturen. (38) Generell ist aber ein maximaler Abstand zwischen zwei Vitamin D Gaben bei etwa 4 Wochen angesiedelt.

### **2.1.8 Vitamin D Intoxikation**

Vitamin D Intoxikation ist extrem selten, kann aber bei unachtsamer oder vorsätzlicher Einnahme extrem hoher Dosen vorkommen. Dosierungen über 50.000 IU pro Tag über einen längeren Zeitraum können den Serumspiegel von 25(OH)D über 150ng/ml (374nmol/l) heben und sind vergesellschaftet mit Hyperkalzämie und Hyperphosphatämie. Die Einnahme von 10.000 IU pro Tag über fünf Monate führt jedoch zu keiner Toxizität. (39) Bei Patienten mit chronischen granulomatösen Erkrankungen ist zu beachten, dass bei einem Serumspiegel über 30ng/ml Hyperkalzurie und Hyperkalzämie auftreten können, da Makrophagen unkontrolliert 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> produzieren. Bei diesen Patienten sollte der Serumspiegel zwischen 20 und 30 ng/ml gehalten werden, um Vitamin D Mangel und sekundären Hyperparathyreoidismus zu verhindern. (15)

### **2.1.9 Laborwerte**

Die Bestimmung des 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Spiegels aus dem Serum reflektiert nur die Vitamin D Aufnahme mit der Nahrung bzw. die Eigensynthese in der Haut und die Nierenfunktion während der letzten Stunden bis Tage. Für die Untersuchung des längerfristigen Vitamin D Status ist die Bestimmung des 25(OH)D<sub>3</sub> Spiegels im Blut sinnvoller, da dessen Halbwertszeit je nach Vitamin D Gesamtstatus ein bis zwei Monate beträgt. Der 25(OH)D<sub>3</sub> Wert steigt proportional mit der Einnahme von Vitamin D. Deshalb wird der Blutplasma Spiegel von 25(OH)D<sub>3</sub> üblicherweise als Indikator für den Vitamin D Status verwendet. (40) Es vergehen bis zu vier Monate bis sich nach einer Änderung der täglichen Vitamin D Zufuhr ein neues Fließgleichgewicht mit einem stabilen Serumwert einstellt. (36)

## 2.2 Endothel

---

### 2.2.1 Einführung

Das Endothel ist ein entscheidender Regulator der Gefäßhomoöstate und der Balance zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion. Es bildet die entscheidende Barriere zwischen Blutstrom und Gefäßwand. Ebenso spielt es eine zentrale Rolle für die Inhibierung und Stimulation der glatten Muskelzellproliferation (41) und –migration, die Interaktion von Leukozyten mit der Gefäßwand sowie für die Homoöstate von Thrombozyten und Fibrinolyse. Alle Gefäße sind von Endothel ausgekleidet.

Mechanische Veränderungen und alle Konzentrationsänderungen vasoaktiver Substanzen im strömenden Blut werden vom Endothel wahrgenommen und als Reaktion in die Gefäßwand weitergeleitet.

Seit 1980 rückte die Bedeutung des Endothels in den Blickpunkt der Kreislaufforscher. Furchgott und Zawadski machten die Beobachtung, dass sich Gefäße unter Acetylcholin nur dann dilatieren, wenn das Endothel der Gefäße intakt war. Sie schlussfolgerten, dass Endothel eine Substanz produzieren muss, dessen Freisetzung durch Acetylcholin stimuliert wird, während bei geschädigtem Endothel eine Vasokonstriktion infolge direkter Wirkung von Acetylcholin am glatten Gefäßmuskel auftritt. Diese Substanz nannten sie Endothel-derived relaxing factor (EDRF). (42) Der EDRF wurde in der Folge als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert, der neben seiner vasodilatatorischen Wirkung als genereller Botenstoff im Organismus zahlreiche Funktionen ausübt. Es spielt auch eine wichtige Rolle im Nervensystem und der Immunabwehr.

NO wird über das Enzym NO-Synthase (NOS) gebildet. Durch Scherkräfte die am Endothel wirken, aber auch durch andere Stimuli wie Zytokine, Endotoxine und Lipopolysaccharide wird die endotheliale NOS aktiviert.

Bei kardiovaskulären Erkrankungen ist die Regulation des Gefäßtonus durch NO gestört. Wir können davon ausgehen, dass eine Schädigung der Gefäßfunktion weit reichende Auswirkungen nicht nur auf die Durchblutung, sondern auch auf Organfunktionen hat. Heute wird eine Endothelfunktionsstörung als wichtiger Prozess in der Pathogenese der Atherosklerose angesehen. (43)

### **2.2.2 Physiologische Regulation des Gefäßtonus durch NO**

NO wird aus der Aminosäure L-Arginin durch die NOS gebildet. Dieses Enzym ist in gesunden Endothelzellen exprimiert und wird durch Rezeptorstimulation oder Änderungen des Blutflusses aktiviert. (44)

In Knockout-Mausmodellen, bei denen die endotheliale NOS ausgeschaltet ist, kommt es zu erhöhtem arteriellen Blutdruck. (45) Zudem reagieren diese Tiere auf Gefäßverletzungen mit verstärkter Intimaproliferation. Dies zeigt, dass die Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen eine weitere Funktion von NO ist. Durch Studien konnte man zeigen, dass im Körper ein physiologischer NO-abhängiger Vasodilatator-Tonus vorhanden ist, der für die Regulation des Blutflusses und des Blutdruckes essentiell ist. Durch die kontinuierliche Freisetzung von NO aus dem Endothel bleiben die Gefäße in einem erweiterten Zustand. (46) Dieses endogene vasodilatatorische System wird bei der Therapie mit Nitraten imitiert, die in den Gefäßwänden NO freisetzen.

In der hier durchgeführten Studie wurde deshalb Glyceroltrinitrat verwendet, um die Endothel-unabhängige Vasodilatation der glatten Muskelzellen zu beurteilen.

NO hemmt durch einen cGMP abhängigen Mechanismus auch die Thrombozytenaggregation (47) und die -adhäsion. Zusätzlich reagiert NO auch mit Prostazyklin, welches auch die Aggregation der Thrombozyten hemmt. Darüber hinaus erzeugen die Thrombozyten selbst NO über eine eigene NOS, das als negativer Feedback-Mechanismus die Thrombozytenadhäsion hemmt. Somit wird die Thrombozytenaggregation einerseits von NO aus den Thrombozyten selbst und andererseits vom Endothel produzierten NO und Prostazyklin gehemmt. Nitrovasodilatoren können somit – in Kombination mit Prostazyklinen – eine nützliche antithrombotische Therapie darstellen. Die Interaktion von Gefäßwand und Leukozyten wird auch durch NO mittels Inhibierung der Aktivierung der Leukozyten und Inhibierung der Expression von Adhäsionsmolekülen gehemmt.

Die endothelabhängige, NO-vermittelte Relaxation ist in isolierten Gefäßringen von Arterien ausgeprägter als in Venen. Dies weist darauf hin, dass Arterien mehr NO erzeugen als Venen. Dieser Unterschied könnte zumindest zum Teil erklären, weshalb Thoraxarterien-Grafts länger offen bleiben als Venengrafts.

Das Prinzip der Regulation des Gefäßtonus durch das Endothel wurde getestet, indem man Acetylcholin als Stimulator der endothelialen NO-Freisetzung intrakoronar infundiert hat. (48) Bei Probanden mit normalen Koronararterien

konnte man eine Vasodilatation der Koronarien angiografisch beobachten. Dagegen kam es bei Patienten mit arteriosklerotisch veränderten Koronarien zu einer Vasokonstriktion durch die direkte Wirkung von Acetylcholin am glatten Gefäßmuskel. Hieraus ist ersichtlich, dass arteriosklerotische Gefäße eine erheblich verminderte NO-Bioverfügbarkeit nach Stimulation durch Acetylcholin aufweisen. Die Testung der Endothelfunktion hat damit eine zunehmende Bedeutung in der Klinik als kardiovaskulärer Surrogatparameter erhalten. (43)

### **2.2.3 Regulation des Gefäßtonus durch NOS**

Die induzierbare Isoform der NOS kann in den Gefäßwänden durch bestimmte Zytokine, Endotoxine und Lipopolysaccharide induziert werden, z.B. bei Sepsis. Die Aktivierung geschieht sowohl in den Endothelien als auch in den glatten Muskelzellen. Dies führt zu einer vaskulären Relaxation, die weitgehend resistent gegenüber Vasokonstriktoren ist. Das durch die induzierbare NO-Synthase in großen Mengen freigesetzte NO ist verantwortlich für die Vasodilatation und die Resistenz gegenüber Vasokonstriktoren, die beim septischen Schock bzw. bei der Zytokin-Therapie eingesetzt werden. Die erhöhte NOS Aktivierung könnte am venösen Pooling und der kardialen Dysfunktion bei Sepsis beteiligt sein. Darüber hinaus ist die kardiale Dysfunktion der dilatativen Kardiomyopathie auch mit der Induktion dieses Enzyms verbunden. (49)

Der hyperdynamische Status der Zirrhose ist mit einer Vasodilatation, einer verminderten Reaktion auf Vasokonstriktoren und einer hohen Konzentrationen von Endotoxin im Kreislauf verbunden. Dieser hyperdynamische Status dürfte u.a. Folge einer gesteigerten NO-Produktion durch die induzierbare NOS sein. Die Serumkonzentration der Nitrite und Nitrate, der oxidierten Metaboliten des NO, sind erhöht bei Patienten mit Zirrhose, insbesondere bei solchen mit dem hepatorenalen Syndrom. Die Konzentration korreliert mit dem Grad der Sepsis. Insbesondere ist davon auszugehen, dass eine gestörte endotheliale NO-Verfügbarkeit (definiert als die NO-Konzentration, die biologisch als NO wirksam werden kann und nicht inaktiviert oder in toxische Substanzen umgewandelt wird) ein gestörtes Gleichgewicht in der Endothelzelle anzeigt.

Die biologische NO-Verfügbarkeit wird nicht nur von der endothelialen Produktion durch die NOS, sondern auch von der Inaktivierung von NO bestimmt. Eine

vermehrte Konzentration von Radikalen - insbesondere Sauerstoffradikalen - bzw. eine reduzierte endogene antioxidative Kapazität vermindert die biologische Verfügbarkeit von NO. Ein gestörtes Gleichgewicht signalisiert nicht nur eine verminderte endotheliale NO-Verfügbarkeit und damit eine verminderte Endothel-abhängige Vasodilatation, sondern auch eine Dominanz von oxidativem Stress, welcher mit Aktivierung von Signaltransduktionswegen verbunden ist, die als proinflammatorisch, proliferativ und proarteriosklerotisch anzusehen ist. Tatsächlich kann die endotheliale NOS bei Mangel an notwendigen Kofaktoren, die zur NO-Bildung notwendig sind, selbst Sauerstoffradikale bilden.

Während oxidativer Stress proinflammatorische und proarteriosklerotische Effekte ausübt, werden diese durch eine „physiologische“ Konzentration von NO inhibiert. Ähnliche Überlegungen gelten auch für NO als antiapoptotisches Molekül, denn NO kann über eine Reihe von Mechanismen die Apoptose von Endothelzellen hemmen. Dies unterstreicht die Tatsache, dass NO eine zentrale Rolle nicht nur als Effektormolekül, welches über cGMP Vasodilatation hervorruft, sondern auch als fundamentales Signaling-Molekül in der Zelle spielt.

#### **2.2.4 Bestimmung des Gefäßtonus durch andere endothelabhängig produzierte Faktoren**

Neben NO werden im Endothel weitere vasoaktive Substanzen produziert bzw. zu aktiven Peptiden umgewandelt oder inaktiviert. Hierzu gehören:

- Prostaglandine wie das Prostazyklin
- die Synthese von Endothelin, einem im Endothel gebildeter Vasokonstriktor
- Angiotensin II (Vasokonstriktor), welches an der Endotheloberfläche durch das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) aus Angiotensin I gebildet wird
- Inaktivierung von Bradykinin (erhöht die Gefäßpermeabilität), ebenfalls durch ACE

Es bestehen komplexe Interaktionen zwischen Tonus regulierenden Faktoren, so inhibiert z.B. NO die Expression und Wirkung von Endothelin. Das ACE inaktiviert Bradykinin, sodass die lokale Konzentration von Bradykinin sinkt und somit weniger davon zur Verfügung steht, um die Freisetzung von NO aus dem Endothel zu stimulieren. Klinisch ist diese Interaktion von Bedeutung, da über eine

Hemmung der ACE durch ACE-Hemmer eine verstärkte NO-vermittelte Vasodilatation über Bradykinin und dessen Rezeptor erreicht wird. (50)

Neben NO wird durch Acetylcholin, Bradykinin und andere Stimuli vom Endothel ein sogenannter Endothel-derived hyperpolarization factor (EDHF) freigesetzt, der zur Endothel-abhängigen Vasodilatation beiträgt. Eine Hemmung dieses Enzyms hemmt die Dilatation von peripheren Widerstandsgefäßen. (43)

### 2.2.5 Andere Funktionen des Endothels

Neben der Regulation des Gefäßtonus sind andere Funktionen des Endothels für die physiologische Regulation der Gefäßwand und ihrer strukturellen Integrität von großer Bedeutung. Dazu zählen die Regulation der Adhäsion von Zellen auf der Oberfläche des Endothels sowie die Regulation der Permeabilität. Diese beiden Phänomene spielen auch bei den pathologischen Veränderungen von akuten und chronischen Gefäßerkrankungen eine wichtige Rolle.

In Tabelle 2 sind die Funktionen des Endothels noch einmal zusammengefasst.

Funktionen des Endothels
1. Bildung und Freisetzung vasoaktiver Substanzen
• NO
• EDHF
• Prostaglandine
• Endothelin
2. Umbau/Abbau vasoaktiver Substanzen
• Angiotensin I (durch endothelgebundenes ACE)
• Bradykinin
• Serotonin
• ADP
• Adenosin
• Noradrenalin
3. Homöostase, Thrombolysse/Fibrinolyse
• Bildung von Plasminogen Aktivator (t-PA)

• Bildung von Thrombomodulin
• Bildung von Plasminogen Activator Inhibitor (PAI-I)
• Bildung von Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)
• Bildung von von-Willebrand-Faktor, „Heparine“
<b>4. Regulation von Leukozytenadhäsion, Lipid-up-take</b>
• Expression von Oberflächenadhäsionsmoleküle
• Sekretion von Monozyten-Stimulationfaktor, LDL- und Scavenger Rezeptoren, LOX-1 (Rezeptor für oxidiertes LDL)
<b>5. Regulation der Gefäßstruktur (Remodeling)</b>
• Hemmung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen

Tabelle 2: Funktionen des Endothels (43)

Störungen der endothelialen Permeabilität sind bei Patienten mit Hypertonie, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus nachgewiesen worden. Im Rahmen von entzündlichen Prozessen kommt es durch Zytokine zu Veränderungen der Permeabilität. Es strömen vermehrt Substanzen aus dem Blut in die Gefäßwand ein. Eine gestörte Permeabilität führt zu verstärkter Ablagerung von Lipiden und anderen pathologisch wirkenden Substanzen in der Gefäßwand. Zusätzlich können Wachstumsfaktoren und vasoaktive Hormone verstärkt in die Gefäßwand eindringen und dort strukturelle Veränderungen beeinflussen. Bei Störungen der Endothelzellfunktion kann es leichter zu Koagulation und Thrombose kommen.

	<b>Funktion</b>	<b>Klinik</b>
Vasoaktive Substanzen	Vasodilatation, Vasokonstriktion, Regulation der Durchblutung, langfristig struktureller Gefäßumbau	Vasospasmus, Hypertonie, Atherosklerose, Angia pectoris bei normalen Koronararterien
Homöostase/ Gerinnung	Hemmung der Thrombozytenadhäsion und aggregative Hemmung bzw. Aktivierung des fibrinolytischen Systems	Thrombose, Infarkt
Adhäsionsmoleküle	Adhäsion von Leukozyten →Entzündung, zytotoxische Wirkung	Reperfusion nach Infarkt, Atherosklerose

Tabelle 3: Funktion und Pathophysiologie der endothelialen Regulation.(43)

## **2.2.6 Endotheldysfunktion, Progression der Atherosklerose und Prognose**

Den bedeutsamen kardiovaskulären Risikofaktoren Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen und positive Familienanamnese ist gemeinsam, dass sie zu einer Endotheldysfunktion führen. Hierunter versteht man klinisch eine verminderte NO-Aktivität oder NO-Verfügbarkeit. Diese Dysfunktion des Endothels stellt kein Begleitphänomen dar, sondern ist wesentlich an der Entwicklung und Progression der Atherosklerose beteiligt. Wie bereits erwähnt ist die Endotheldysfunktion nicht auf eine Störung der endothelabhängigen Vasodilatation beschränkt, sondern betrifft auch die Funktionen des Endothels wie

- die Regulation der Leukozytenadhäsion und –infiltration,
- die Thrombozytenadhäsion und –aggregation,
- die Inhibition der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie
- die Induktion der Apoptose von Makrophagen.

Dies führt zu einem proinflammatorischen und prothrombotischen Phänotyp des Endothels. Speziell diese Veränderungen sind für die proatherogenen Effekte der Endotheldysfunktion von besonderer Bedeutung.

Viele klinische Studien haben bestätigt, dass Patienten mit Endotheldysfunktion ein deutlich erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse haben. (4)(43)(51)(52)

## **2.2.7 Therapeutische Interventionen zur Verbesserung der Endothelfunktion**

Etablierte Therapieprinzipien bei kardiovaskulären Erkrankungen zielen darauf ab, die Gefäße zu erweitern und damit die Perfusion zu verbessern bzw. zur systemischen Entlastung beizutragen. Hierzu versucht man die Plättchenaggregation und Thrombose zu inhibieren, neurohumorale Faktoren zu beeinflussen ( $\beta$ -Blocker) und Gefäßstenosen zu beseitigen (Ballondilatation) bzw. zu umgehen (Bypass-Operationen).

Wenn man davon ausgeht, dass das Endothel (welches umfangreiche protektive Wirkungen entfaltet), eine wichtige Rolle bei der Organperfusion spielt, und das eine Endotheldysfunktion für die Entstehung und Progression der Atherosklerose

wesentlich ist, dann repräsentiert die Erhaltung bzw. Wiederherstellung einer normalen Endothelfunktion ein attraktives und wichtiges Therapieziel. Dabei dürfte die Stärkung endogener, protektiver endothelialer Systeme wie das L-Arginin/NO-System langfristig dem Ersatz von NO z.B. durch NO-Donatoren deutlich überlegen sein. Der Verbesserung der NO-Verfügbarkeit kommt eine besondere Rolle zu, da NO viele fundamentale, protektive kardiovaskuläre Wirkungen entfaltet.

In den vergangenen Jahren haben eine Reihe von Studien aufgezeigt, dass eine gestörte Endothelfunktion keine irreversible Schädigung der Gefäßfunktion darstellt, sondern dass verschiedene Interventionen die Endothelfunktion akut - bzw. nach einer chronischer Therapie - verbessern können.

Verbesserung der Endothelfunktion
• Lipidsenkung
• Statin-Therapie
• ACE-Hemmer
• AT1-Rezeptor Antagonisten
• Körperliches Training
• Antioxidantien (akut)
• L-Arginin
• Tetrahydrobiopterin
• Folsäure
• Spironolacton
• Allopurinol
• Östrogene
• Gentherapie (NO-Synthase)

Tabelle 4: Therapeutische Konzepte zur Verbesserung der Endothelfunktion

Entscheidende Ursache der endothelialen Dysfunktion ist eine gestörte Balance zwischen endothelialer Bildung von NO und Sauerstoffradikal vermittelter Inaktivierung von NO.

Besonders erfolgreiche therapeutische Interventionen, wie z.B. die ACE-Hemmer oder Statin-Therapie, bewirken dabei sowohl eine Steigerung der endothelialen

NO-Produktion, als auch eine Verminderung der NO-Inaktivierung. Diese Einschätzung wird durch aktuelle Interventionsstudien mit Statinen (53) und ACE-Hemmern (54) nachdrücklich unterstützt. In diesen Studien kommt es bereits nach etwa 6 - 12 Monaten Therapie zu einer signifikanten Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse. Innerhalb dieses Zeitraums ist eine nennenswerte Regression atherosklerotischer Läsionen nicht anzunehmen, eine Verbesserung der Endothelfunktion kann in dieser Zeit jedoch definitiv erreicht werden. (55) (43)

## 2.3 Colony Forming Units

---

### 2.3.1 Einführung

Bei der Entstehung von neuen Blutgefäßen unterscheidet man zwischen der „Angiogenese“ und der „Vaskulogenese“. Unter Angiogenese versteht man die Proliferation und Migration von endothelialen Zellen von benachbarten Blutgefäßen. Die Kapillaren entstehen durch Sprossung aus einem vorgebildeten Kapillarsystem. Die Vaskulogenese ist die Neubildung von Gefäßstrukturen durch zirkulierende mesodermale Stammzellen (Angioblasten), die sich zu endothelialen Vorläuferzellen (endothelial progenitor cell (EPC)) ausbilden. Früher wurde angenommen, dass EPC oder Angioblasten nur in der Embryonalzeit eine Rolle spielen. Neue Forschungsergebnisse weisen allerdings darauf hin, dass sie auch bei Erwachsenen vorkommen. (56)(57) EPCs sind nicht nur an der laufenden Gefäßhomöostase beteiligt, sondern wirken auch bei der Tumorangiogenese und der Ischämie-induzierten Vaskulogenese mit. (58)(59) Diese neuen Ergebnisse zeigen, dass EPCs auch therapeutisch genutzt werden können. Sie könnten die Revaskularisation von Ischämiegebieten verbessern und die Beteiligung von EPCs an der Tumorangiogenese limitieren.

### 2.3.2 Charakterisierung von endothelial progenitor cells (EPC)

Wegen des Mangels an Oberflächenantigenen und Oberflächenmarkern um EPCs von Endothelzellen und Hämatopoetischen Zellen zu unterscheiden, sind Studien zur Charakterisierung von EPCs nicht leicht durchzuführen. (56)(57) Einige Forscher haben einen alternativen Weg gefunden EPCs von anderen Zellen zu unterscheiden, indem sie ein in vitro unterschiedliches Wachstumsverhalten festgestellt haben. Sie haben eine Hierarchie von Proliferationspotenzialen der EPCs beschrieben, ähnlich zu den Stufenleitern des hämatopoetischen Systems. (60)

Der genaue Mechanismus, wie EPCs an der Vaskulogenese mitarbeiten, bleibt unklar. Entweder wirken sie direkt auf die Proliferation und Integration von Endothelzellen, oder indirekt über die Sekretion von Wachstumsfaktoren (parakriner Effekt).

### 2.3.3 Entwicklung von CFU-Hill Kolonien

Es gibt Untersuchungen, bei welchen eine Korrelation zwischen der Häufigkeit von speziellen Populationen in der Zellkultur von zirkulierenden EPCs und zahlreichen klinischen Faktoren festgestellt wurde. Die Studie von Hill et al. zeigt, dass die Anzahl von EPCs ein Surrogatparameter für die Gefäßfunktion und das kardiovaskuläre Risiko ist. Dieser Test wurde standardisiert und ist als „5-Day CFU-Hill colony“ bekannt. Die Ergebnisse zeigen, dass Endothelverletzungen und der Mangel an EPCs zu einer Zunahme von kardiovaskulären Krankheiten führen. Man findet z.B. weniger EPCs bei Patienten mit einem erhöhten Risiko für eine kardiovaskuläre Erkrankung. Umgekehrt verhält es sich bei Gesunden. Die Anzahl der CFU-Hill Kolonien haben eine negative Korrelation mit dem „Framingham cardiovascular risk Score“ und eine positive mit der Gefäßfunktion anhand der „flow-mediated brachial artery reactivity“, gezeigt. (61) Es besteht auch eine signifikante Beziehung zwischen erniedrigten CFUs und gehäuft auftretenden kardiovaskulären Ereignissen. (62)

Die 5 Tage CFU-Hill Kolonie wird mittlerweile für zahlreiche Untersuchungen zur Erforschung von KHK, rheumatoider Arthritis, PAVK, Diabetes und COPD herangezogen.

Im Rahmen dieser Studie untersuchen wir die Korrelation zwischen niedrigem Vitamin D Spiegel und dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen. Aus diesem Grund haben wir CFUs zu Beginn und am Ende der Studie von den Probanden angelegt. Wir haben damit untersucht, ob sich das Risikoprofil unter Vitamin D Supplementation verändert.

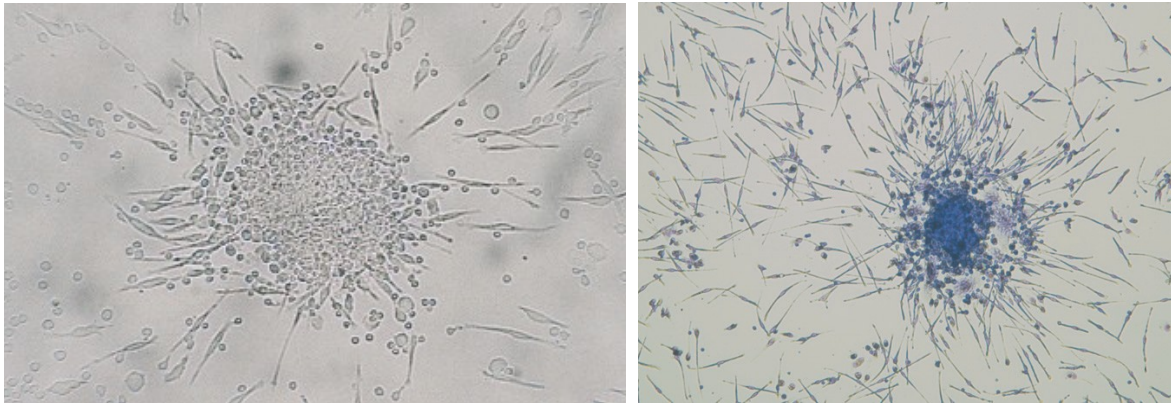
Dazu wird Nativblut zentrifugiert um mononukleäre Zellen zu gewinnen, welche auf Fibronectin beschichteten 6-Well-Platten mit dem Kulturmedium „EndoCult Liquid Medium“ für zwei Tage kultiviert werden. Nach zwei Tagen kann man zwischen ausgereiften Endothelzellen und Monozyten unterscheiden.

Die nicht adhärenen Zellen werden abpipettiert, ausgezählt und erneut auf einer 24-Well-Platte kultiviert. Am fünften Tag werden die Kulturen evaluiert und quantifiziert.

Die hier beschriebene Methode ist relativ zeitintensiv. Pro Patient benötigt man ungefähr 5 Stunden um bei Erst- und Zweitvisite CFUs anzulegen.

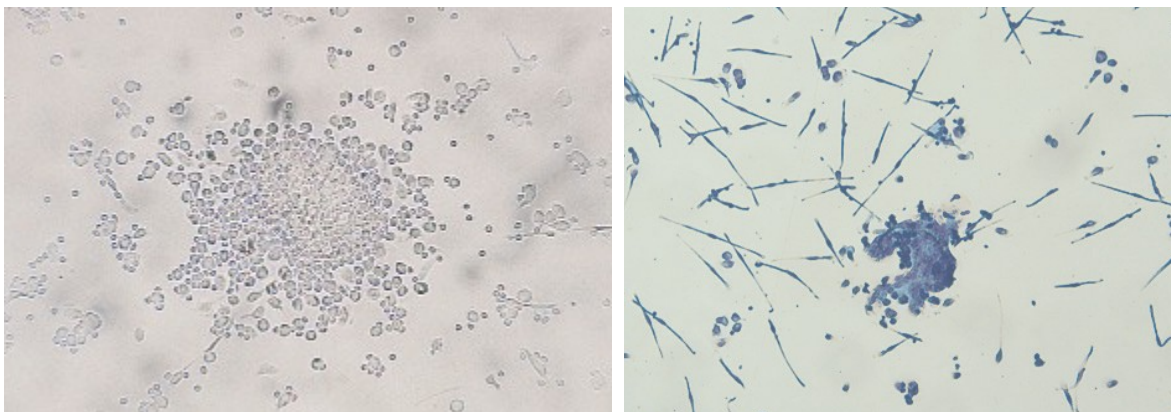
Eine CFU-Hill Kolonie ist definiert als eine zentrierte runde Zellansammlung mit spindelförmigen Zellen, welche die Kolonie in der Peripherie umrunden (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1: CFU-Hill Kolonien am Tag 5



Sehr wichtig ist die Erkennung der CFUs unter dem Mikroskop. Wie Abbildung 2 zeigt, erfüllen diese Kolonien am Tag 5 nicht die Kriterien von CFU-Hill Kolonien.

Abbildung 2: Kolonien am 5. Tag, die nicht die Kriterien für CFU-HILL Kolonien erfüllen



Das erste Foto in Abbildung 2 zeigt nur runde Zellen. Auf dem zweiten Bild sind bereits beide Zelltypen zu erkennen, jedoch umrunden die spindelförmigen Zellen nicht die Kolonie in der Mitte des Bildausschnittes. Somit handelt es sich in beiden Fällen nicht um CFU-Hill Kolonien.

## **2.3.4 Materialien und Methoden für die Kultivierung von CFU-Hill Kolonien**

### **2.3.4.1 Aufbewahrungslösung/ Kulturlösung**

- EndoCult® Liquid Medium

### **2.3.4.2 Ausrüstung**

- Sicherheitskabine für Level II, für den Umgang mit biologischen Materialien
- Zentrifuge
- Inkubator für 37°C mit Luftkontrolle
- Pipetten
- Mikropipetten
- Zellplatte
- Mikroskope
- 6-Well Platten
- 24-Well Platten

### **2.3.4.3 Reagenzien und Hilfsstoffe**

- 50ml Polypropylen Reagenzröhrchen
- 15 ml Polypropylen Reagenzröhrchen
- 5 ml Polypropylen Reagenzröhrchen
- 3 % Essigsäure mit Methylenblau
- Ficoll-Paque™ PLUS
- Phosphate Buffered Saline (PBS)
- Fibronectin

### **2.3.4.4 Procedere/Protokoll**

1. Es wird cirka 30 ml Nativblut von Probanden in EDTA Röhrchen abgenommen.
2. 15 ml Ficoll wird in ein Röhrchen gegeben und das Blut langsam dazu pipettiert.
3. Dieses Blut wird anschließend bei 23°C mit 800 G für 22 Minuten ohne Bremsung zentrifugiert.
4. Hieran wird der durch die Zentrifugation entstandene Buffycode abpipettiert und in ein neues Reagenzröhrchen gegeben.

5. Dieses Röhrchen wird mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und erneut mit 360 G, bei 10°C für 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Vorgang dient zur „Waschung“ der Zellen.
6. Der dadurch entstehende Überstand wird verworfen und das Zellglomerulat, das an der Innenseite heftet, wird erneut mit PBS auf 50ml aufgemischt.
7. 100µl werden zum Mikroskopieren blau gefärbt um die Monozyten unter dem Mikroskop auf einer Zählplatte zählen zu können.
8. Danach errechnet man die Menge, die benötigt wird, um genau  $10^6$  Zellen auf Fibronectin beschichteten 6-Well-Platten mit dem Kulturmedium EndoCult zu kultivieren.

Abbildung 3: Zellkultur am Tag 1

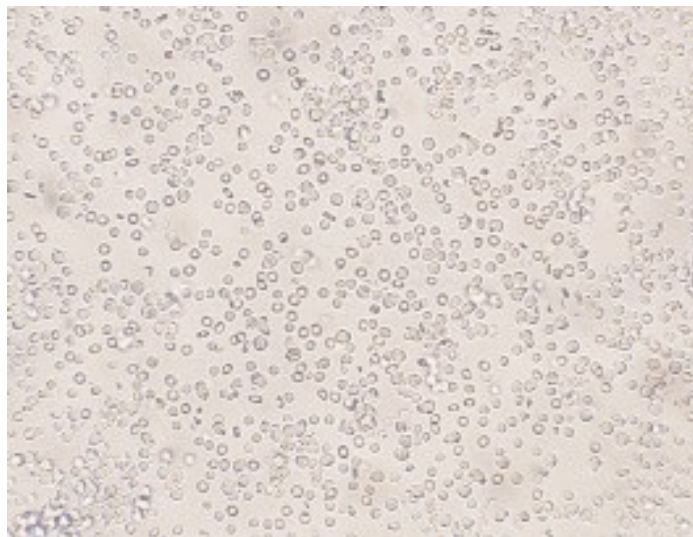


Abbildung 3 zeigt die Zellen am Tag 1 der Zellkultur unter dem Mikroskop. Die Zellen besitzen großes Wachstumspotential. Die Mehrheit sind nicht adherente Zellen mit einer runden Morphologie. Die restlichen adherenten Zellen erscheinen eher als einzelne Zellen oder als kleine Dumps.

9. Zum Kultivieren werden die Platten in einen Wärmeschrank mit 37°C gestellt.
10. Nach 48 Stunden werden die nicht adherenten Zellen abpipetiert und wieder auf einer Zählplatte unter dem Mikroskop gezählt.

11. Danach wird eine Million Zellen auf Fibronectin beschichteten 24-Well-Platten erneut kultiviert.

Abbildung 4: Zellkultur am Tag 3

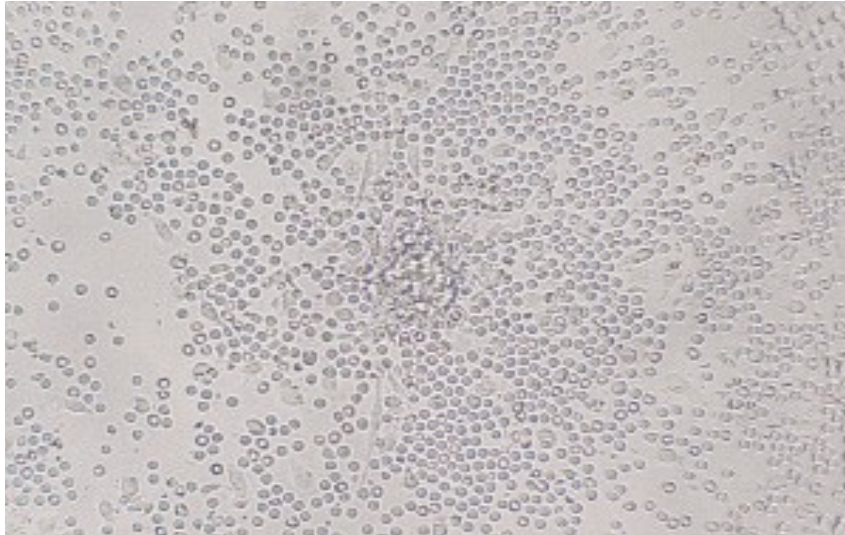


Abbildung 4 zeigt die Zellkultur am Tag 3. Kleine Kolonien können bereits sichtbar werden. Wenn Kolonien sichtbar werden, erscheinen sie am Tag 3 als runde, ballähnliche Cluster mit sehr wenigen spindeligen Zellen in der Peripherie.

12. Am Tag fünf werden die charakteristischen CFU-Hill Kollonien unter dem Mikroskop bestimmt und gezählt (siehe Abbildung 1).

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Studienhintergrund**

---

Verschiedene Studien zeigen, dass niedriger Vitamin D Spiegel ein globales Problem darstellt. (15) (63) Mangel an Sonnenlicht - aufgrund reduzierter Aktivitäten im Freien, Luftverschmutzung und globale Verdunkelung oder zunehmende Verstädterung führen insgesamt dazu, dass zunehmend mehr Menschen einen Vitamin D Mangel bekommen. Auch die Aufnahme von Vitamin D über die Nahrung ist zu gering, um eine ausreichende Wirkung auf den Vitamin D Status zu haben. (64)

Nach den Ernährungsrichtlinien sollte die erwünschte Serumkonzentration von 25(OH)D über 20 bis 30 ng/ml liegen. (64) Eine Untersuchung, die an der österreichischen Bevölkerung durchgeführt wurde, hat aufgedeckt, dass 26 % der normalen Erwachsenen einen 25(OH)D Spiegel unter 12ng/ml aufweisen. (65) Ein niedriger Vitamin D Spiegel steht in Zusammenhang mit einer verringerten Knochendichte (66), vermehrten Stürzen (67) oder erhöhtem Risiko für Knochenbrüche (68). Darüber hinaus stellte man fest, dass der 25(OH)D Spiegel auch mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonus (69), Diabetes Mellitus (70) oder dem metabolischen Syndrom (71) und folglich mit kardiovaskulären Erkrankungen (1) (72) in Zusammenhang steht. In-vitro Studien haben gezeigt, dass Vitamin D die Proliferation von glatten Muskelzellen und die Thrombogenität reduziert und die Fibrolyse und Endothelregeneration steigert. (3) All diese Daten weisen darauf hin, dass Vitamin D, neben den bereits gut etablierten Effekten auf den Kalzium und Knochenstoffwechsel eine positive Auswirkung auf das kardiovaskuläre System haben könnten.

### **3.2 Studienziel**

---

Da die Assoziation zwischen 25(OH)D Spiegel und kardiovaskulärem Risiko wenig erforscht ist, zielt die Studie darauf ab, die Auswirkung der Vitamin D Supplementation auf die Änderung von Markern des kardiovaskulären Risikos

(CFU-Hill und Endothelfunktion) zu untersuchen, um einen Zusammenhang zu belegen.

Wir gehen von der Annahme aus, dass sich eine positive Veränderung der CFUs und der Endothelfunktion unter Vitamin D Einnahme im Vergleich zur Placebo-Gruppe ergibt. Man könnte dann relativ einfach und kosteneffektiv die Endothelfunktion verbessern, in weiterer Folge das Atheroskleroserisiko reduzieren und somit das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse senken.

### **3.3 Studienablauf**

---

Dieses Projekt wurde bei der Ethikkommission in Graz zur Begutachtung eingereicht und unter der Nummer EK-19-084ex07/08 genehmigt.

Das Studiendesign wurde als offene, prospektive, randomisierte Doppelblindstudie festgelegt.

Für die Studie wurden an der Klinischen Abteilung für Endokrinologie und Nuklearmedizin 40 Patienten mit einem 25(OH)D Spiegel unter 20ng/ml rekrutiert. Bei einer Baseline Untersuchung wurden bei den Patienten eine körperliche Untersuchung, ein Routinelabor und eine Endothelfunktionsmessung durchgeführt, sowie CFU-Hill bewertet.

Die Patienten wurden randomisiert und erhielten für 12 Wochen entweder täglich 2400 IU Vitamin D oder ein Placebo. Danach wurden die Baseline Messungen erneut wiederholt.

Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich von Jänner bis September 2009.

### **3.4 Studienteilnehmer**

---

#### **3.4.1 Einschlusskriterien**

- Alter zwischen 45 und 75 Jahre
- Untersuchungsgruppe: 25(OH)D Spiegel unter 20ng/ml
- Informed consent

### **3.4.2 Ausschlusskriterien**

- Diabetes mellitus
- anamnestisch vaskuläres Ereignis
- Kreatinin >1.5mg/dl
- GOT/GPT>3xULN
- RR>160/100
- HI>NYHA II
- ACE-Inhibitoren, ARB, Statin neu
- Hyperkalzämie
- Urolithiasis
- schwere psychiatrische Erkrankung

## **3.5 Beschreibung der Untersuchungsmethoden**

---

Im Rahmen der Studie werden die Parameter für kardiovaskuläres Risiko, Endothelfunktion und CFU-Hill Kolonien, untersucht. Die CFU-Hill Kolonien sind bereits in Kapitel 2.3 genau beschrieben. Nachfolgend wird die Untersuchung der Endothelfunktion im Detail erläutert.

### **3.5.1 Endothelfunktionsmessung**

Um die Endothelfunktion zu messen (siehe Abbildung 5) wird eine Pulswellenanalyse mittels Finger-Photoplethysmography (Micro Medical, Rochester, Kent, U.K.) durchgeführt. (73) (74)

Bei diesem Pulswellenanalysegerät handelt es sich um ein Instrument zum schnellen, nicht invasiven Messen der Gefäßstruktur und –funktion.

Dabei wird eine Sonde am rechten Zeigefinger platziert um Pulswellen zu registrieren. Zur Bewertung der Endothelfunktion wird die Veränderung des Reflexion Index (RI) nach Gabe eines Endothel-abhängigen Stimulus (vasoaktive Medikamente) gemessen. Der RI ist ein Maß für den Gefäßtonus der kleinen Arterien.



Abbildung 5: Pulswellenanalysegerät

Zum Aufzeichnen digitaler Pulskurven wird die Transmission von infrarotem Licht durch die Fingerbeere gemessen. Der RI wird aufgrund der durchschnittlichen Pulswellenform nach einer Pulswellenanalyse von ca. 12 Sekunden ermittelt.

Es gibt zwei Komponenten die für die Kontur der Pulsquelle verantwortlich sind. Die direkte Komponente ist die Weiterleitung der Druckwelle über den direktesten Weg vom linken Ventrikel bis zum Finger. Diese wird in der ersten Auslenkung der Pulsquelle sichtbar. Die zweite Komponente ist die reflektierte Druckwelle die vom Unterkörper wieder zurück in die Aorta und folglich zum Finger geleitet wird. Die relative Amplitude der beiden Komponenten hängt von der Menge der Reflexion des Unterkörpers ab. Dies wiederum hängt vom Gefäßtonus der kleinen Gefäße ab. RI ist definiert als ein Maß für die Reflexion. Der RI ermittelt die Gefäßfunktion indem er die Reaktion des Endothels auf einen Vasodilatator misst und errechnet sich als prozentuellen Anteil der Reflexionsamplitude an der direkten Druckamplitude. Eine Verringerung des Verhältnisses durch die Gabe von Salbutamol deutet auf eine periphere Vasodilatation hin und lässt sich somit als Endothelfunktion quantifizieren.

Für diese Studie wurden Messungen in Ruhe und nach Gabe von Glyceroltrinitrat unter die Zunge, und zuletzt nach Gabe von Salbutamol durchgeführt.

Im Abstand von drei und fünf Minuten nach Gabe von GTN (0,4mg) wird die Pulswellenanalyse erneut durchgeführt und der Durchschnitt dieser zwei

Messungen errechnet:  $RI_{GTN}$  ( $\Delta RI_{GTN} = \% \text{ Veränderung von Baseline}$ ). Nach 20 Minuten wird 600  $\mu\text{g}$  Salbutamol inhaliert.

10 und 15 Minuten nach Applikation wird wieder  $RI_{salb}$  ermittelt und der Durchschnitt dieser beiden Messungen errechnet ( $\Delta RI_{salb} = \% \text{ Veränderung von Baseline}$ ).

Die Veränderung des RI nach Salbutamol Gabe ( $\Delta RI_{salb}$ ) ist ein gängiger Test für die endotheliale Vasodilatation (74), welche wiederum von der endothelialen NO Bildung abhängig ist. (73) Die Veränderung des RI nach Glyceroltrinitrat ( $\Delta RI_{GTN}$ ) beschreibt die endothelunabhängige Vasodilatation zur Beurteilung der glatten Muskelzellfunktion. Bei Gabe von Nitraten wird somit nicht die Freisetzung von NO aus dem Endothel gefördert sondern NO aus dem Pharmakon freigesetzt. (43)

Behandlungsinduzierte Veränderungen der Endothelfunktion können einige falsch positive Resultate ergeben (Hormonersatztherapie und antioxidative Vitamine) aber keine falsch negativen Ergebnisse. Folglich ist die Endothelfunktion ein hoch sensitiver, obgleich nicht perfekt spezifischer Test um vorherzusagen, welche Intervention am wahrscheinlichsten kardiovaskuläre Events reduziert. (75)

Deshalb eignet sich die Endothelfunktionsmessung sehr gut als Surrogatparameter für das kardiovaskuläre Risiko. (76)

### 3.6 Studienrisiken

---

Das Risiko für die Studienteilnehmer wird sehr klein gehalten, da bei der verwendeten Vitamin D<sub>3</sub> -Dosis von keinen Nebenwirkungen auszugehen ist.

Außerdem untersuchen wir Patienten, die von vornherein einen niedrigen Vitamin D Spiegel haben.

### 3.7 Statistische Analyse

---

Die statistische Datenauswertung wird mit der Statistik und Analysesoftware SPSS 17.0 durchgeführt. Weiters wird für Berechnungen und zum Erstellen von Grafiken

Microsoft Excel 2003 verwendet. Die Datenerhebung erfolgte - wie oben erwähnt - im Rahmen der prospektiven Studie.

Für die Auswertung der Endothelfunktion wurde eine Intention to treat Analyse durchgeführt. Für jene Patienten, die vorzeitig aus der Studie ausgeschieden sind, wurde die Endothelfunktionsmessung zu Baseline auch für die drei Monatsauswertung herangezogen, gemäß dem last observation carried forward Prinzip.

Der Levene-Test wurde zur Testung der Homogenität verwendet. Mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Test stellten wir fest, dass es sich um normalverteilte Werte handelte. Dementsprechend kann ein T-Test für die Auswertung gerechnet werden.

Mit dem gepaarten T-Test verglichen wir innerhalb der Gruppe (Placebo oder Verum) die Endothelfunktion am Beginn mit der Endothelfunktion am Ende der Studie.

Mit dem ungepaarten T-Test wurde die Placebo- mit der Verumgruppe verglichen und auf Signifikanz geprüft.

Die Korrelationen wurden auf zweiseitigem Signifikanzniveau getestet. Statistisch signifikante Testergebnisse befinden sich auf dem Niveau von 5 prozentiger Irrtumswahrscheinlichkeit.

## 4 Ergebnisse – Resultate

### 4.1 Deskriptive Analyse

---

#### *Patientendaten*

Insgesamt erfüllten 40 Patienten die zuvor definierten Studienkriterien, davon sind 29 Frauen (72,5 % der Probanden) und 11 Männer (27,5 %).

Im Durchschnitt sind die Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung 57 Jahre alt, wobei der jüngste Patient 45 und der älteste Patient 75 Jahre ist.

Der Body Mass Index (BMI) aller getesteten Patienten beträgt im Mittel  $24,4 \pm 5,4$  kg/m<sup>2</sup>. Der durchschnittliche Bauchumfang beträgt  $96 \pm 13$  cm und der durchschnittliche Hüftumfang  $110 \pm 11$  cm. Der Mittelwert von Waist-to-hip-ratio beträgt  $0,89 \pm 0,04$ . Diese Daten lassen darauf schließen, dass es sich eher um übergewichtige Personen handelt.

Es befinden sich 7 Zigarettenraucher (3 in der Verumgruppe und 4 in der Placebogruppe) im Studienkollektiv.

## 4.2 Auswertung der metabolischen Parameter

Zu Beginn und am Ende der Studie erfolgte eine Blutabnahme bei den Patienten. Im Zuge dieser Laborauswertung wurden auch die 25(OH)D<sub>3</sub> Spiegel zu Baseline und Woche 12 bestimmt (siehe Tabelle 5).

	Placebo (n = 15)		Vitamin D (n = 14)	
	Woche 0	Woche 12	Woche 0	Woche 12
25(OH)D <sub>3</sub> (ng/ml)	16,51 ± 4,77	22,23 ± 8,52	19,04 ± 4,71	53,89 ± 20,13

Tabelle 5: Ergebnisse der Laborwerte des Vitamin D Spiegels

Es kam zu einem deutlichen Vitamin D Anstieg in der Verumgruppe. Obwohl die Studie über die Frühlings- und Sommermonate gelaufen ist, kam es trotzdem nur zu einem sehr geringen Anstieg des 25(OH)D<sub>3</sub> Spiegels in der Placebogruppe. Dieses Ergebnis zeigt, dass innerhalb von 12 Wochen durch eine Vitamin D Supplementation eine Normalisierung des Vitamin D Spiegels erreicht wird.

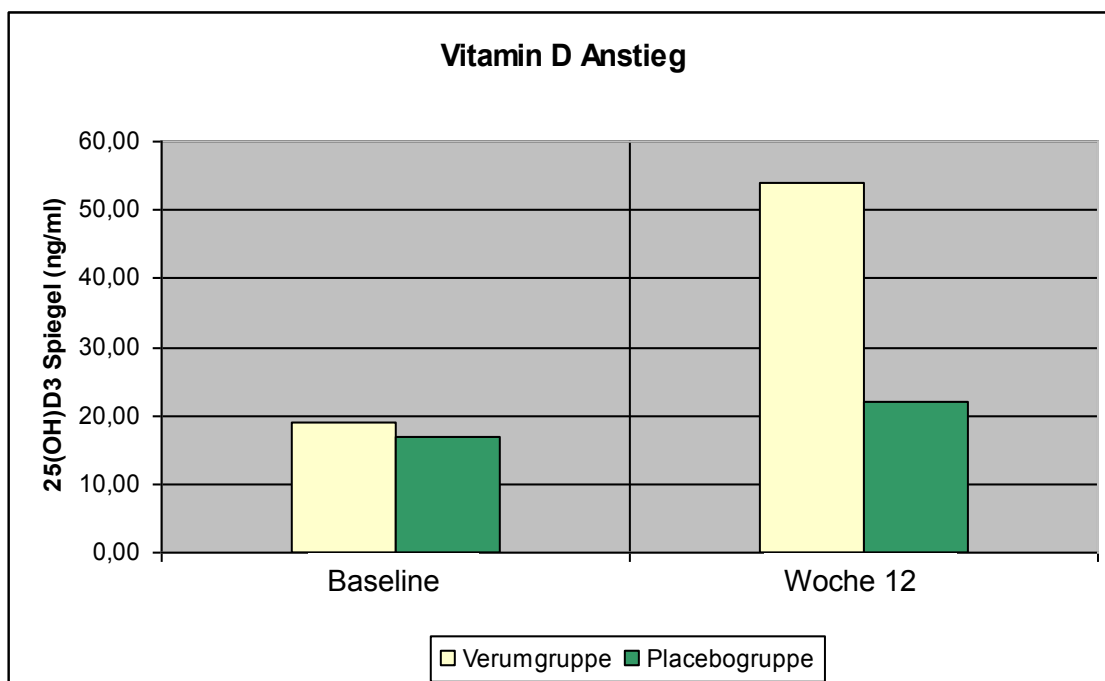


Abbildung 6: Mittelwerte der 25(OH)D<sub>3</sub> Spiegel

In der nachfolgenden Tabelle 8 ist eine Auswertung der metabolischen Parameter für den Fettstoffwechsel und die Nierenwerte abzulesen.

Tabelle 6: Ergebnisse der Laborwerte vom Fettstoffwechsel und der Niere

	Placebo (n = 15)		Vitamin D (n = 14)	
	Woche 0	Woche 12	Woche 0	Woche 12
Cholesterin (mg/dl)	198,07 ± 36,37	202,13 ± 29,26	223,21 ± 63,12	207,79 ± 44,36
LDL-Cholesterin (mg/dl)	115,46 ± 32,84	116,62 ± 22,29	120,21 ± 32,73	114,29 ± 30,77
HDL-Cholesterin (mg/dl)	59,73 ± 15,13	60,80 ± 15,17	69,07 ± 15,68	68,36 ± 18,07
Triglyzeride (mg/dl)	139,73 ± 91,01	162,47 ± 101,07	140,79 ± 89,84	132,29 ± 80,32
Kreatinin (mg/dl)	0,96 ± 0,24	0,95 ± 0,19	0,86 ± 0,12	0,85 ± 0,008
Harnstoff (mg/dl)	32,60 ± 10,47	34,13 ± 9,87	32,50 ± 7,59	32,07 ± 6,62

Daten sind Mittelwerte ± SD.

In Abbildung 7 werden 3 Parameter des Fettstoffwechsels von der Placebogruppe denjenigen der Vitamin D Gruppe gegenübergestellt. Anhand der Grafik erkennt man noch einmal deutlich die Senkung von Cholesterin, LDL-Cholesterin und Triglyzeride der Verumgruppe. In der Vergleichsgruppe lagen alle Werte leicht über dem Ausgangswert. Diese Ergebnisse zeigen statistisch keine Signifikanz.

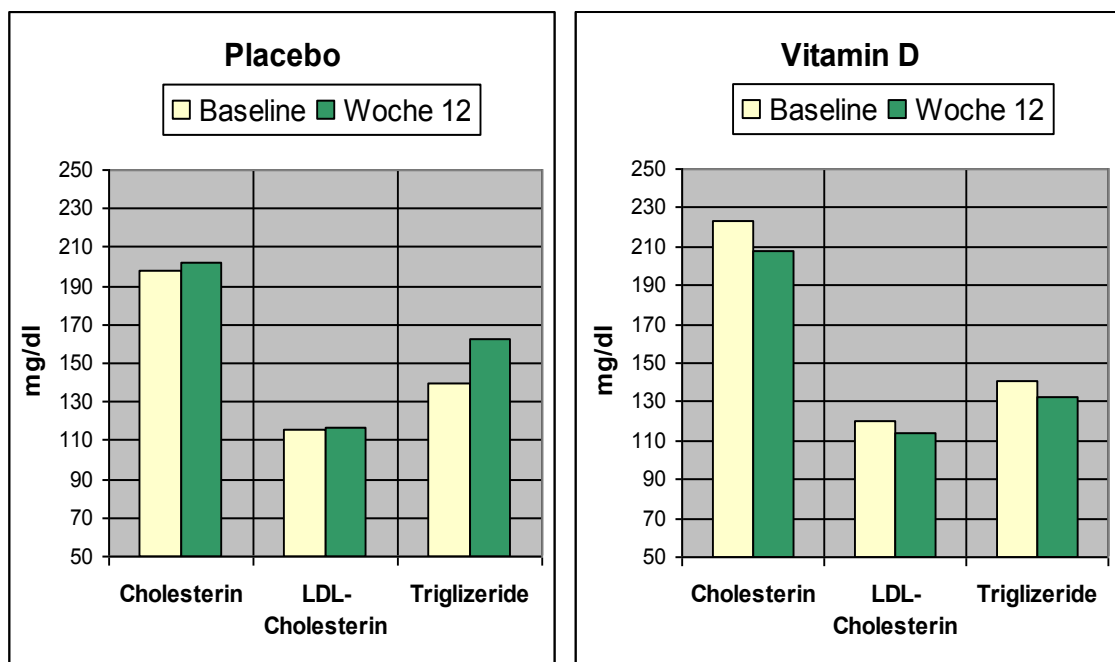


Abbildung 7: Parameter des Fettstoffwechsels

### 4.3 Auswertung der Endothelfunktion

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Endothelfunktionsmessung aufgeschlüsselt.

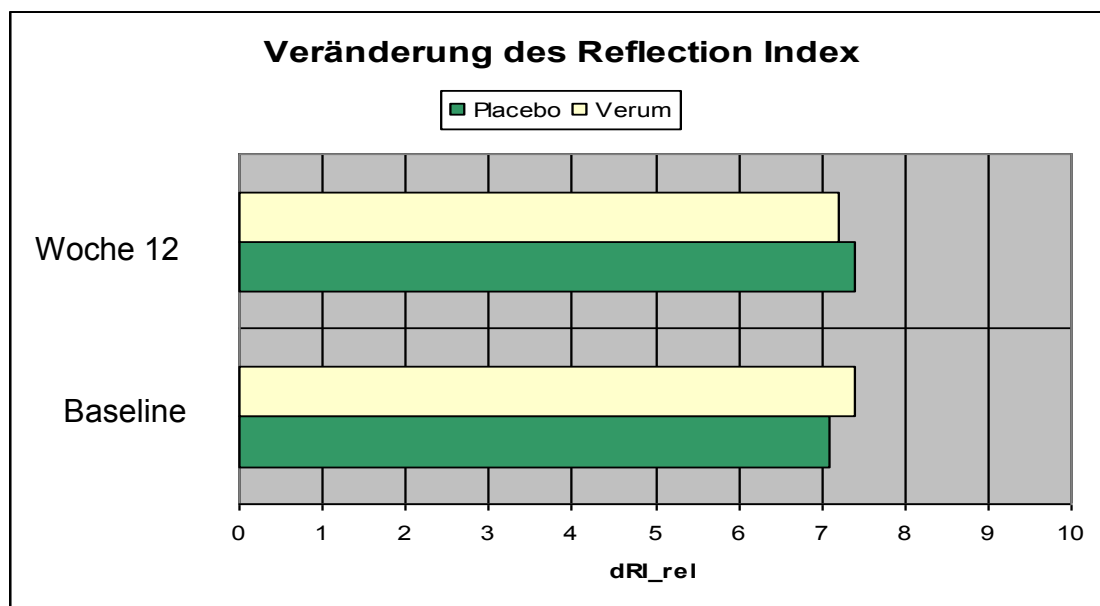
Tabelle 7: Ergebnisse der Endothelfunktion

	Placebo (n =16)	Vitamin D (n = 16)	p*
<b>Baseline <math>\Delta RI_{relSalb}</math></b>	7,1 $\pm$ 5,7	7,4 $\pm$ 5,5	NS
<b>Woche 12 <math>\Delta RI_{relSalb}</math></b>	7,4 $\pm$ 4	7,2 $\pm$ 4,4	NS

Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SD. \*Vitamin D Woche 12 vs. Placebo Woche 12.

In Abbildung 8 sind diese Ergebnisse grafisch dargestellt. Dabei wird sichtbar, dass bei einer Vitamin D Supplementation in einem Behandlungszeitraum von 12 Wochen bei gesunden Menschen die lediglich einen isolierten Vitamin D Mangel aufweisen, keine Verbesserung der Endothelfunktion zu beobachten ist.

Abbildung 8: Mittelwerte der Pulswellenanalyse



Zu Beginn der Studie gab es keinen signifikanten Unterschied von  $\Delta RI_{Salb}$  der beiden Gruppen (7,1  $\pm$  5,7 vs. 7,4  $\pm$  5,5). Es wurde auch kein signifikanter Unterschied von  $\Delta RI_{GTN}$  zwischen der Vitamin D und der Placebogruppe beobachtet.

Nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Wochen wurde kein statistisch signifikantes Ergebnis von  $\Delta RI_{\text{Salb}}$  in der Vitamin D Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe beobachtet ( $p = \text{NS}$ ). Innerhalb der Vitamin D Gruppe kam es im Untersuchungszeitraum zu keiner signifikanten Verbesserung der Endothelfunktion über die Studiendauer. Ähnliche Ergebnisse ließen sich auch in der Placebogruppe beobachten.

Auch bei dem endothelunabhängigen Parameter  $\Delta RI_{\text{GTN}}$  kam es zwischen den beiden Gruppen innerhalb des Untersuchungszeitraumes zu keiner Veränderung.

#### 4.4 Auswertung der CFU-Hill Kolonien

Bisher liegen noch keine Studien vor, die eine Veränderung der CFU-Hill Kolonien im Rahmen einer Vitamin D Supplementation erforscht haben.

In einer Subgruppe unserer Population untersuchten wir auch das Wachstumsverhalten der CFU-Hill Kolonien. Wir stellten dabei fest, dass kein wesentlicher Unterschied im Wachstum zwischen Placebo und Verumgruppe vorliegt.

In der nachfolgenden Tabelle 6 ist der Mittelwert der CFU-Hill Kolonien für die Placebo- und Vitamin D Gruppe innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 12 Wochen gesondert abzulesen.

	Placebo (n = 8)		Vitamin D (n = 5)		p
	Woche 0	Woche 12	Woche 0	Woche 12	
<b>CFU-Hill Kolonien</b>	1,5	1,25	0	1	NS

Tabelle 8: Auswertung CFU-Hill Kolonien

In Tabelle 6 ist abzulesen, dass es innerhalb des Beobachtungszeitraumes bei gesunden Probanden die lediglich einen Vitamin D Mangel aufweisen, kaum zu einer Verbesserung des kardiovaskulären Risikomarkers CFU-Hill Kolonien kommt. Sowohl in der Placebogruppe als auch in der Vitamin D Gruppe kam es zu keiner Veränderung des Medians.

## 4.5 Auswertung der Blutdruckwerte

Im Rahmen der Studie wurde zu Baseline und nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Wochen der Blutdruck gemessen. In der nachfolgenden Tabelle 7 sind die Messergebnisse für Placebo- und Verumgruppe gesondert aufgelistet.

Tabelle 9: Blutdruckwerte vor und nach der Behandlung mit Placebo oder Vitamin D

	Placebo (n=15)		Vitamin D (n=13)		p*
	Woche 0	Woche 12	Woche 0	Woche 12	
<b>Blutdruck systolisch (mmHg)</b>	133,67 ± 14,12	132,87 ± 14,31	134,17 ± 21,93	128,08 ± 21,05	NS
<b>Blutdruck diastolisch (mmHg)</b>	88,13 ± 8,18	87,87 ± 7,95	87,50 ± 13,23	85,42 ± 9,16	NS

Daten sind Mittelwerte ± SD. \*Vitamin D Woche 12 vs. Placebo Woche 12.

In Abbildung 7 ist der antihypertensive Effekt der Vitamin D Supplementation, den wir im Rahmen dieser Studie beobachten konnten, grafisch dargestellt.

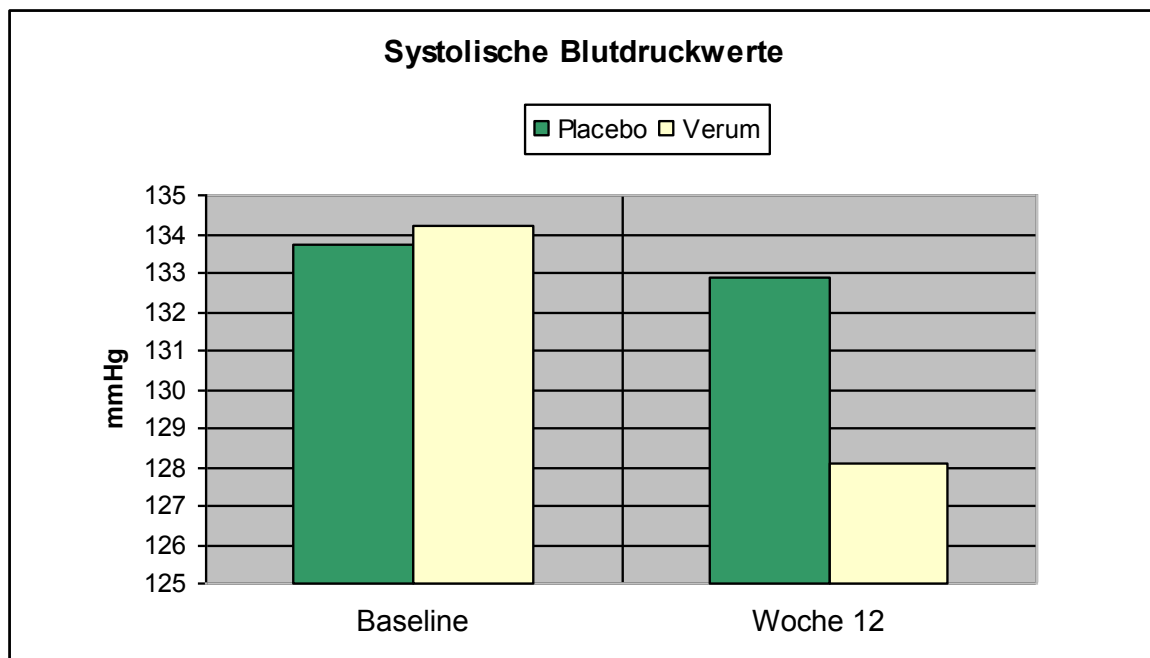


Abbildung 9: Mittelwerte des systolischen Blutdrucks

Es liegen einige aktuelle Studien vor die zeigen, dass Vitamin D den Blutdruck senken kann. (15) (24) Der Nachweis in einer randomisierten kontrollierten Studie ist bis dato noch ausständig.

Auch wir konnten in unserer Studie einen Trend durch die Vitamin D Supplementation feststellen, eine statistisch signifikante Verbesserung konnte jedoch nicht erreicht werden. Die Ergebnisse zeigen eine durchschnittliche Senkung des systolischen Blutdrucks von 6 mmHg in der Verumgruppe. Die Korrelation zwischen den Delta 25(OH)D Werten und der Blutdrucksenkung ist statisch nicht signifikant.

Wie oben angeführt, wurde ein antihypertensiver Effekt von Vitamin D bereits in früheren Studien bestätigt. Vitamin D wirkt über mehrere Mechanismen blutdrucksenkend. Zu diesen antihypertensiven Eigenschaften zählen der renoprotektive Effekt, die Suppression des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems, die direkte Wirkung auf die Gefäßwände und der Effekt auf den Kalziummetabolismus, einschließlich der Prävention von sekundärem Hyperparathyreoidismus. (24)

#### **4.6 Nebenwirkungen von Vitamin D**

---

Im Rahmen der Studie wurden bei der Erhebung des Routinelabors auch die Leberwerte (GGT, ALT, AST) ausgewertet. Eine Erhöhung der Leberenzyme durch die Vitamin D Supplementation konnte nicht festgestellt werden.

Der Kalziumspiegel wurde ebenfalls im Rahmen des Routinelabors zu Baseline und nach 12 Wochen gemessen. Es wurde bei keinem Patienten eine Hyperkalzämie auffällig.

In Summe kann festgehalten werden, dass die Verabreichung von täglich 2400 IU eine effiziente Dosierung zur Anhebung des Vitamin D Spiegels in den Normalbereich ist, bei der keine schwerwiegenden Nebenwirkungen zu erwarten sind.

## 5 Diskussion

### 5.1 Studienergebnisse

---

Primäres Ziel der Diplomarbeit war es, die Assoziation zwischen Vitamin D Status und kardiovaskulärem Risiko zu untersuchen.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass es innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 12 Wochen bei Patienten mit Vitamin D Defizienz zu keiner Verbesserung der Endothelfunktion durch Vitamin D Substitution kommt.

Weiters stellten wir bei den Zellkulturen keine Unterschiede in der Veränderung des Wachstumsverhaltes der CFU-Hill Kolonien zwischen der Placebo- und der Vitamin D Gruppe fest.

In der Verumgruppe kam es während der Studie zu einer Normalisierung der Vitamin D Spiegel, wohingegen die Placebogruppe keine suffizienten 25(OH)D Blutspiegel aufweisen konnte.

Auch in den Parametern des Fettstoffwechsels zeigten sich in der Verumgruppe positive Auswirkungen im Gegensatz zur Placebogruppe.

Der systolische Blutdruck senkte sich durchschnittlich in der Vitamin D Gruppe um 6 mmHg, während dieser in der Placebogruppe weitgehend gleich blieb.

Zwei andere Studien verfolgten ein ähnliches Ziel wie wir.

Sugden et.al. führten eine randomisierte Doppelblindstudie durch, in welcher die Auswirkung einer einmaligen im Winter verabreichten Gabe von 100.000 IU Vitamin D<sub>2</sub> auf die Endothelfunktion von Typ II Diabetikern mit einem Vitamin D Spiegel < 50 nmol/l untersucht wurde. Sie konnten eine signifikante Verbesserung der Endothelfunktion nachweisen (Verbesserung des flow mediated vasodilatation der Arteria brachialis um 2,3 % bei Vitamin D<sub>2</sub> Gabe, p = 0,048). (2)

Die wesentliche Unterscheidung der Studie von Sugden et.al. zu der von uns durchgeführten Studie liegt im Kollektiv der Studienteilnehmer. In unserer Studie bestand die Population aus gesunden Probanden die lediglich einen isolierten

Vitamin D Mangel aufweisen. Gesunde Menschen weisen in der Regel weniger Gefäßschäden auf als Typ II Diabetiker. Bei gesunden Probanden mit Vitamin D Mangel scheint eine Verbesserung der Endothelfunktion nicht mehr erreichbar zu sein. Bei Diabetikern mit manifester Endotheldysfunktion ist ein Effekt der Vitamin D Substitution auf die Endothelfunktion offensichtlich möglich.

Die Untersuchungen bei Sudgen et.al. erfolgten im Winter. In ihrer Diskussion schlagen sie weitere Studien auch in anderen Jahreszeiten vor.

Bei unserer Studie, die über das Jahr verteilt durchgeführt wurde, war keine signifikante Änderung der Endothelfunktion zu verzeichnen.

Weiterführende Studien sind notwendig. Wir empfehlen, diese einheitlich entweder im Sommer oder vorzugsweise im Winter durchzuführen, da sich in diesem Zeitraum Verum- und Placebogruppe maximal unterscheiden.

Eine Studie von Tarcin et.al. untersuchte die Auswirkung einer dreimaligen Verabreichung von 300.000 IU bei jungen, gesunden Patienten mit einem 25(OH)D Spiegel unter 25 nmol/l auf die Endothelfunktion mit Hilfe einer Ultraschallmessung der Arteria brachialis. Eine Kontrollgruppe mit einem durchschnittlichen 25(OH)D Spiegel von 75 nmol/l durchlief die gleichen Untersuchungen. Die Studie zeigte, dass ein Vitamin D Mangel mit einer Endotheldysfunktion assoziiert ist. Die Substitution von Vitamin D bewirkte eine signifikante Verbesserung der Endothelfunktion ( $p = 0,002$ ). Sie schlussfolgerten, dass Vitamin D Mangel als unabhängiger Risikofaktor für Atherosklerose gesehen werden kann. (77)

Bei dieser Studie von Tarcin et.al. handelt es sich nicht um eine randomisierte placebo-kontrollierte Studie. Dementsprechend müssten die Ergebnisse erst in einer randomisierten, kontrollierten Doppelblindstudie verifiziert werden. Bei der von uns durchgeführten klinischen Studie hingegen handelt es sich um eine prospektive, randomisierte, placebo-kontrollierte Doppelblindstudie welche die Ergebnisse von Tarcin et.al. nicht bestätigen konnte.

Unsere Studienergebnisse bedeuten nicht, dass Vitamin D keine Wirkung auf das kardiovaskuläre System hat, sondern zeigen uns, dass man in anderen

Risikokollektiven gleichwertige Untersuchungen durchführen sollte. Wir haben nachgewiesen, dass innerhalb von 12 Wochen an gesunden Probanden kein Effekt an der Endothelfunktion erkennbar ist.

Aus vielen Querschnitts- und Assoziationsstudien geht deutlich hervor, dass Vitamin D einen Einfluss auf das kardiovaskuläre System haben könnte.

Durch Vitamin D könnte die Endothelfunktion über mehrere Mechanismen verbessert werden. Interessanterweise verbessert Vitamin D die Endothelfunktion indirekt, indem es den Blutdruck über eine Reninsupprimierung senkt (78) und/oder den Gefäßwiderstand dadurch senkt. (79) Ferner ist belegt, dass Vitamin D Supplementation bei Patienten mit chronischem Herzversagen den TNF- $\alpha$  Spiegel reduziert. (80) Vitamin D reduziert ebenso die Aktivität von Makrophagen, einem Schlüsselement in der Genese von Atherosklerose. Weiters können menschliche Endothelzellen die aktive Form von Vitamin D synthetisieren, welche wiederum die inflammatorischen Zytokine der Blutgefäße modulieren können. Außerdem aktiviert der Vitamin D Rezeptor eine Vielfalt anderer Gene, unter anderem auch den vascular endothelial growth factor (VEGF). Dieser begünstigt die Synthese von NO der Endothelzellen. (2)

Viele Hypothesen sind plausibel und weitere klinische randomisierte Studien in Risikokollektiven wie Diabetiker, Hypertoniker oder Patienten mit manifester Atherosklerose dringend erforderlich, um zu zeigen, wie Vitamin D auf die Endothelfunktion wirkt.

## **5.2 Limitation der Studie**

---

Die Ergebnisse der durchgeführten Studie sind nur eingeschränkt aussagekräftig, da die Stichprobe von 40 untersuchten Patienten relativ klein ist.

Außerdem wurden die Patienten übers ganze Jahr verteilt untersucht, was die Vergleichbarkeit untereinander mindert, da die Vitamin D Bildung stark vom Sonnenlicht abhängig ist. Allerdings zeigt sich in der Placebogruppe nur ein marginaler Anstieg des Vitamin D Spiegels durch eine vermehrte Sonnenexposition.

Weiters ist festzustellen, dass alle Untersuchungspersonen unterschiedlichen Alters und Geschlechts sind. Ebenso bestehen Unterschiede in den Lebensgewohnheiten der Probanden.

Beim Patientenkollektiv handelt es sich um ein sehr breites Spektrum, was sich auch in der hohen Schwankungsbreite des RI der Endothelfunktion zeigt.

Leider haben wir keine Inflammationsmarker bestimmt, die uns eventuell eine Veränderung der biochemischen Verhältnisse der Endothelfunktion gezeigt hätten.

### **5.3 Schlussfolgerungen - Resumee**

---

Wie die von uns durchgeführte Studie zeigt, kam es in diesem Patientenkollektiv innerhalb des Untersuchungszeitraumes zu keiner Verbesserung der Endothelfunktion.

Da es viele Querschnitt- und Assoziationsstudien gibt, nach denen Vitamin D sowohl Einfluss auf mehrere kardiovaskuläre Risikofaktoren als auch auf kardiovaskuläre Endpunkte hat, sind weitere klinische randomisierte Untersuchungen in Risikokollektiven wie Diabetiker, Hypertoniker oder Patienten mit manifester Atherosklerose notwendig um den endgültigen Stellenwert von Vitamin D bzw. einer Vitamin D Substitution in der kardiovaskulären Prävention zu belegen.

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1: CFU-Hill Kolonien am Tag 5.....	39
Quelle: <a href="http://www.stemcell.com/technical/28711_endocult%20col.%20atlas.pdf">http://www.stemcell.com/technical/28711_endocult%20col.%20atlas.pdf</a> [Online] [Zitat vom 29. Oktober 2009]	
Abbildung 2: Kolonien am 5. Tag, die nicht die Kriterien für CFU-HILL Kolonien erfüllen.....	39
Quelle: <a href="http://www.stemcell.com/technical/28711_endocult%20col.%20atlas.pdf">http://www.stemcell.com/technical/28711_endocult%20col.%20atlas.pdf</a> [Online] [Zitat vom 29. Oktober 2009]	
Abbildung 3: Zellkultur am Tag 1 .....	41
Quelle: <a href="http://www.stemcell.com/technical/28711_endocult%20col.%20atlas.pdf">http://www.stemcell.com/technical/28711_endocult%20col.%20atlas.pdf</a> [Online] [Zitat vom 29. Oktober 2009]	
Abbildung 4: Zellkultur am Tag 3 .....	42
Quelle: <a href="http://www.stemcell.com/technical/28711_endocult%20col.%20atlas.pdf">http://www.stemcell.com/technical/28711_endocult%20col.%20atlas.pdf</a> [Online] [Zitat vom 29. Oktober 2009]	
Abbildung 5: Pulswellenanalysegerät.....	46
Abbildung 6: Mittelwerte der 25(OH)D <sub>3</sub> Spiegel.....	50
Abbildung 7: Parameter des Fettstoffwechsels .....	51
Abbildung 8: Mittelwerte der Pulswellenanalyse .....	52
Abbildung 9: Mittelwerte des systolischen Blutdrucks.....	54

## 6.2 Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1: Geografische Breite, und Vitamin D Spiegel.....	25
Tabelle 2: Funktionen des Endothels (43).....	33
Tabelle 3: Funktion und Pathophysiologie der endothelialen Regulation.(43).....	33
Tabelle 4: Therapeutische Konzepte zur Verbesserung der Endothelfunktion.....	35
Tabelle 5: Ergebnisse der Laborwerte des Vitamin D Spiegels.....	50
Tabelle 6: Ergebnisse der Laborwerte vom Fettstoffwechsel und der Niere.....	51
Tabelle 7: Ergebnisse der Endothelfunktion.....	52
Tabelle 8: Auswertung CFU-Hill Kolonien.....	53
Tabelle 9: Blutdruckwerte vor und nach der Behandlung mit Placebo oder Vitamin D.....	54

### 6.3 Literaturverzeichnis

---

1. **Zittermann, A.** Vitamin d and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2006, Bd. 92, S. 39-48.
2. **Sugden, J. A., et al.** Vitamin D improves endothelial function in patients with Type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. *Diabetic Medicine*. 2007, Bd. 25, S. 320-325.
3. **Wu-Wong, J. R., et al.** Effects of vitamin d analogs on gene expression profiling in human coronary artery smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2006, Bd. 186, S. 20-28.
4. **Halcox, J. P., et al.** Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002, Bd. 106, S. 653-658.
5. **Huldshinsky, K.** Heilung von Rachitis durch künstliche Höhensonne. *Dtsch Med Wochenschr*. 1919, Bd. 45, S. 712-713.
6. **DeGroot, L. J. und Jameson, J. L.** *Endocrinology, Volume 2, Fifth Edition*. Philadelphia : Elsevier Saunders, 2006.
7. **Löffler, G., Petrides, P. E. und Heinrich, P. C.** *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg : Springer, 2007.
8. **Gardner, D. G. und Shoback, D.** *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*. United States of America : McGraw-Hill Companies, 2007.
9. **Holick, M. F.** Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *Am J Clin Nutr*. 1995, Bd. 61, S. 638-645.
10. **Classen, M., Diehl, V. und Kochsiek, K.** *Innere Medizin*. München : Urban & Fischer, 2004. Bd. 5. Auflage.
11. **Dusso, A. S., Brown, A. J. und Slatopolsky, E.** Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005, 289, S. 8-28.
12. **Nelson, D. und Cox, M.** *Lehninger Biochemie*. Heidelberg : Springer, 2009. Bd. 4. Auflage.
13. **Dusso, A. S., Thadhani, R. und Slatopolsky, E.** Vitamin D receptor and analogs. *Semin Nephrol*. 2004, Bd. 24, S. 10-16.
14. **Herold, G.** *Innere Medizin*. Köln : s.n., 2008.
15. **Holick, M. F.** Vitamin D Deficiency. *The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE*. 2007, Vol. 357, pp. 266-281.

16. **Klinke, R., Pape, H. und Silbernagl, S.** *Physiologie*. Stuttgart : Thieme, 2005.
17. **Bouillon, R., Van Cromphaut, S. und Carmeliet, G.** Intestinal calcium absorption: Molecular vitamin D mediated mechanisms. *J Cell Biochem*. 2003, Bd. 88, S. 332-339.
18. **Hoenderop, J. P., et al.** Regulation of gene expression by dietary Ca<sup>2+</sup> in kidneys of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> - 1 alpha-hydroxylase knockout mice. *Kidney Int*. 2004, Bd. 65, S. 531-539.
19. **Boonen, S., et al.** Addressing the musculoskeletal components of fracture risk with calcium and vitamin D: a review of the evidence. *Calcified Tissue International*. 2006, Bd. 78, S. 257-270.
20. **Boyle, W. J., Simonet, W. S. und Lancey, D. L.** Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003, Bd. 423, S. 337-342.
21. **Plotnikoff, G. A. und Quigley, J. M.** Prevalence of severe hypovitaminosis D in patients with persistent, nonspecific musculoskeletal pain. *Mayo Clinic Proceedings*. 2003, Bd. 78, S. 1463-1470.
22. **Chapuy, M. C., et al.** Vitamin D<sub>3</sub> and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. *The New England Journal of Medicine*. 1992, Bd. 327, S. 1637-1642.
23. **Hewison, M., et al.** Vitamin D and barrier funktion: a novel role for extra-renal 1a-hydroxylase. *Mol. Cell Endocrinol*. 2004, 215, S. 31-38.
24. **Pilz, S., et al.** Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nature Reviews Cardiology*. 2009, Bd. 6, S. 621-630.
25. **Dobnig, H., et al.** Independent Association of Low Serum 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D Level With All-Cause and Cardiovascular Mortality. *Archives of Internal Medicine*. 2008, Bd. 168, S. 1340-1349.
26. **Pilz, S., et al.** Vitamin D and mortality in older men and women. *Clinical Endocrinology*. 2009, Bd. 71, S. 666-672.
27. **Pilz, S., et al.** Epidemiology of Vitamin D Insufficiency and Cancer Mortality. *Anticancer Research*. 2009, Bd. 29, S. 3699-3704.
28. **Pilz, S., et al.** Low Serum Levels of 25-Hydroxyvitamin D Predict Fatal Cancer in Patients Referred to Coronary Angiography. *British Journal of Nutrition*. 2009, Bd. 101, S. 1534-1540.

29. **Bischoff-Ferrari, H. A., et al.** Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006, Bd. 84, S. 18-28.
30. **Giovannucci, E., et al.** Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006, Bd. 98, S. 451-459.
31. **Ponsonby, A. L., McMichael, A. und van der Mei, I.** Ultraviolet radiation and autoimmune disease: insights from epidemiological research. *Toxicology*. 2002, Bd. 181, S. 71-78.
32. **Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Suppan K, Fahrleitner-Pammer A, Dobnig H.** Effects of a long-term vitamin D and calcium supplementation on falls and parameters of muscle function in community-dwelling older individuals. *Osteoporos Int*. 2009, Bd. 20, S. 315-322.
33. **Holick, M. F., et al.** Prevalence of Vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005, Bd. 90, S. 3215-3224.
34. **Gordon, C. M., et al.** Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 2004, Bd. 158, S. 531-537.
35. **Sullivan, S., et al.** Adolescent girls in Maine are at risk for vitamin D insufficiency. *Journal of the American Dietetic Association*. 2005, Bd. 105, S. 971-974.
36. **Food, Scientific Committee on.** <http://ec.europa.eu>. [Online] 16. Dezember 2002. [Zitat vom: 15. Oktober 2009.] [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out157\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out157_en.pdf).
37. **Armas, L. A., Hollis, B. W. und Heaney, R. P.** Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004, Bd. 89, S. 5387-5391.
38. **Trivedi, D. P., Doll, R. und Khaw, K. T.** Effect of four monthly oral vitamin D3 (cholecalciferol) supplementation on fractures and mortality in men and women living in the community: randomised double blind controlled trial. *BMJ*. 2003, Bd. 326, S. 469.

39. **Vieth, R.** Why the optimal requirement for vitamin D3 is probably much higher than what is officially recommended for adults. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004, Bde. 89-90, S. 575-9.
40. **Holick, M. F.** The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol.* 1981, 77, S. 51-58.
41. **Davignon, J. und Ganz, P.** Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004, Bd. 109, S. 3-27.
42. **Furchgott, R. F. und Zawadzki, J. V.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980, Bd. 288, S. 373-376.
43. **Drexler, H., et al.** *Endothelfunktion und kardiovaskuläre Erkrankungen.* Bremen : UNI-MED Verlag AG, 2003. Bd. 2. Auflage.
44. **Moncada, S. und Higgs, A.** The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England Journal of Medicine.* 1993, Bd. 329, S. 2002-2012.
45. **Huang, P. L., et al.** Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature.* 1995, Bd. 377, S. 239-242.
46. **Vallance, P., Collier, J. und Moncada, S.** Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 1989, Bd. 2, S. 997-1000.
47. **Loscalzo, L.** Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circulation Research.* 2001, Bd. 88, S. 756-762.
48. **Ludmer, P. L., et al.** Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholin in atherosklerotic coronary arteries. *The New England Journal of Medicine.* 1986, Bd. 315, S. 1046-1051.
49. **Drexler, H.** Nitric oxide and caronary endothelial dysfunction in humans. *Cardiovascular Reasearch.* 1999, Bd. 43, S. 572-579.
50. **Hornig, B., Kohler, C. und Drexler, H.** Role of bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans. *Circulation.* 1997, Bd. 95, S. 1115-1118.
51. **Schachinger, V., Britten, M. B. und Zeiher, A. M.** Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation.* 2000, Bd. 101, S. 1899-1909.
52. **Halcox, J. P., et al.** Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation.* 2002, Bd. 106, S. 653-658.

53. **Sacks, F. M., et al.** The effect of Pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *The New England Journal of Medicine*. 1996, Bd. 335, S. 1001-1009.
54. **Investigators, The Heart outcomes prevention evaluation study.** Effects of an Angiotensin-Converting Enzyme inhibitor, Ramipril, on cardiovascular events in highrisk patients. *The New England Journal of Medicine*. 2000, Bd. 342, S. 145-153.
55. **Mancini, G. B., et al.** Angiotensin-converting-enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1996, Bd. 94, S. 258-265.
56. **Rafii, S. und Lyden, D.** Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. 2003, 9, S. 702-712.
57. **Masuda, H. und Asahara, T.** Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovas Res*. 2003, 58, S. 390-398.
58. **Lyden, D., et al.** Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*. 2001, 7, S. 1194-1201.
59. **Kocher, A. A., et al.** Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac funktion. *Nat Med*. 2001, 7, S. 430-436.
60. **Ingram, D. A., et al.** Identification of a novel hierachy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2006, 104, S. 3546-3554.
61. **Hill, J. M., et al.** Circulating endothelial progenitor cells, vascular funktion and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003, Bd. 348, S. 593-600.
62. **Werner, N., et al.** Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *The New England Journal of Medicine*. 2005, Bd. 353, S. 999-1007.
63. **Vieth, R., Bischoff-Ferrari, H. und Boucher, B. J.** The urgent need to recommend an intake of vitamin d that is effective. *Am J Clin Nutr*. 2007, Bd. 85, S. 649-650.
64. **Norman, A. W., et al.** 13th workshop consensus for vitamin d nutritional guidelines. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007, 103, S. 204-205.
65. **Kudlacek, S., et al.** Assesment of vitamin d and calcium status in healthy adult austrians. *Eur J Clin Invest*. 2003, 33, S. 323-331.

66. **Bischoff-Ferrari, H., et al.** Positive association between serum 25-hydroxyvitamin d level and bone density in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2005, 53, S. 821-826.
67. **Bischoff-Ferrari, H., Dawson-Hughes, B. und Willett, W. C.** Effect of vitamin d on falls: A meta analysis. *JAMA.* 2004, 291, S. 1999-2006.
68. **Bischoff-Ferrari, H., et al.** Fracture prevention with vitamin d supplementation: A meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA.* 2005, 293, S. 2257-2264.
69. **Forman, J. P., et al.** Plasma 25-hydroxyvitamin d level and risk of incident hypertension. *Hypertension.* 2007, Bd. 49, S. 1063-1069.
70. **Hypponen, E. und Power, C.** Vitamin d status and glucose homeostasis in the 1958 british birth cohort: The role of obesity. *Diabetes Care.* 2006, Bd. 29, S. 2244-2246.
71. **Ford, E. S., et al.** Concentrations of serum vitamin d and the metabolic syndrome among u. S. Adults. *Diabetes Care.* 2005, Bd. 28, S. 1228-1230.
72. **Martins, D., et al.** Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum level of 25-hydroxyvitamin d in the united states: Dates from the third national health and nutrition examination survey. *Archives of Internal Medicine.* 2007, Bd. 167, S. 1159-1165.
73. **Wilkinson, I. B., et al.** Pulse-wave analysis: clinical evaluation of a noninvasive, widely applicable method for assessing endothelial function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2002, Bd. 22, S. 147-152.
74. **Chowienczyk, P. J., et al.** Photoplethysmographic assessment of pulse wave reflection: Blunted response to endothelium-dependent beta2-adrenergic vasodilation in type II diabetes mellitus. *Journal of the American College of Cardiology.* 1999, Bd. 34, S. 2007-2014.
75. **Widlansky, M. E., et al.** The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology.* 2003, Bd. 42, S. 1149-1160.
76. **Vita, J. A. und Keaney, J. F.** Endothelial dysfunction: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation.* 2002, Bd. 106, S. 640-642.
77. **Tarcin, O., et al.** Effect of vitamin D deficiency and replacement on endothelial dysfunction in asymptomatic subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2009, Bd. 94, S. 4023-4030.

78. **Li, Y. C., et al.** 1,25 Dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002, Bd. 110, S. 229-238.
79. **Norman, P. E. und Powell, J. T.** Vitamin D, shedding light on the development of disease in peripheral arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005, Bd. 25, S. 39-46.
80. **Schleithoff, S. S., et al.** Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2006, Bd. 83, S. 754-759.
81. **Sourij, H., et al.** Association of circulating endothelial progenitor cell growth in patients with type 2 diabetes with type of glucose-lowering treatment. *Diabetic Medicine*. 2007, Bd. 24, S. 926-927.
82. **Rohde, E., et al.** Immune cells mimic the morphology of endothelial progenitor colonies in vitro. *Stem Cells*. 2007, Bd. 25, S. 1746-1752.
83. **Rohde, E., et al.** Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. *Stem Cells*. 2006, Bd. 24, S. 357-367.
84. **Boyle, W. J., Simonet, W. S. und Lacey, D. L.** Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003, Bd. 423, S. 337-342.
85. **Borissova, B. J., et al.** The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in Type 2 diabetic patients. *Int J Clin Pract*. 2003, Bd. 57, S. 258-261.

## Curriculum vitae

### Elmar Kahr

E-mail: elmax.kahr@gmx.at

#### Persönliche Angaben:

**Geburtsdatum:** 17. 07. 1983

**Geburtsort:** Voitsberg

**Staatsbürgerschaft:** Österreich

**Familienstand:** verheiratet, zwei Kinder

#### Schulische Ausbildung:

1998 – 2002 Handelsakademie in Deutschlandsberg

1990 – 1998 Volksschule und Hauptschule in St. Stefan ob Stainz

#### Zivildienst

2002-2003 Rotes Kreuz Steiermark

#### Universitäre Ausbildung

**Okt. 2003 - Jän. 2010** Studium der Humanmedizin an der Med. Univ. in Graz

**Feb. 2009 – Jän. 2010** Praktisches Studienjahr (3. Studienabschnitt):

5 Wochen Allgemeinmedizinfamulatur in der Praxis von Dr. Roman Artner

5 Wochen an der Fachabteilung für HNO, KH der Elisabethinen Graz

10 Wochen an der Fachabteilung für Pulmologie, Universitätsklinik Graz

10 Wochen an der Fachabteilung für Unfallchirurgie, Universitätsklinik Graz

#### Famulaturen (im Ausmaß von insgesamt 19 Wochen)

09/2005 Chirurgische Abteilung, LKH Deutschlandsberg

08/2006 Abteilung für Innere Medizin, LKH Deutschlandsberg

09/2006 Chirurgische Abteilung, A.ö. Krankenhaus St. Josef Braunau GmbH

04/2007 Lehrarztpraxis für Allgemeinmedizin, Dr. Gstirner, Graz

08/2007 Abteilung für Psychiatrie, LKH Graz

09/2007 Abteilung für Kinderonkologie, LKH Graz

09/2008 Abteilung für Neurologie und Psychiatrie, Krankenhaus der Barmherzigen  
Brüder Graz

### **Spezielle Studienmodule**

- Klinisch – topographische Anatomie der Extremitäten  
(Ao. Univ. Prof. Dr. Reinhold REIMANN)
- Klinisch – topographische Anatomie der Eingeweide  
(Univ. Prof. Dr. Friedrich ANDERHUBER)
- Case – Based Learning in Klinik und Praxis  
(Univ. Prof. Dr. Josef SMOLLE)
- Angewandte Physiologie  
(Univ. Prof. Dr. Günther SCHWABERGER)
- Transfusionsmedizin  
(Univ. Prof. Dr. Gerhard LANZER)