

Vitamin D und Advanced Glycation Endproducts bei Gesunden, Hypertonikern und
Patienten mit Diabetes Mellitus

Gibt es Zusammenhänge zwischen Vitamin D-Mangel und einer Akkumulation von
Advanced Glycation End Products, sowie Sero-Markern für Inflammation und
oxidativem Stress?

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Michael
Stürmer

aus Würzburg

Würzburg, Februar 2020

Referent bzw. Referentin: apl. Prof. Dr. med. Udo Bahner

Korreferent bzw. Korreferentin: Univ. Prof. Dr. rer. nat. Helga
Stopper

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2021

Der Promovend ist Arzt

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen	2
1.1.1	<i>Definition und Begriffserklärung der Advanced Glycation Endproducts</i>	2
1.1.2	<i>Entstehung der Advanced Glycation Endproducts (AGEs)</i>	3
1.1.3	<i>Abbau der AGEs</i>	4
1.2	Nachweis der Advanced Glycation Endproducts	5
1.2.1	<i>Messung von Advanced Glycation Endproducts im Blut</i>	5
1.2.2	<i>Hautautofluoreszenz (SAF)</i>	5
1.3	Entwicklung des AGE-Readers	6
1.4	Vitamin D	7
1.4.1	<i>Terminologie Vitamin D</i>	7
1.4.2	<i>Biologische Wirkungen von Vitamin D</i>	8
1.4.3	<i>Vitamin D-Mangel und seine Bedeutung</i>	10
1.4.4	<i>Vitamin D-Diagnostik</i>	11
1.5	Fragestellung und Ziele	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Allgemeines	12
2.2	Probanden	12
2.3	Methoden	14
2.3.1	<i>AGE-Reader</i>	14
2.3.2	<i>Laborchemische Bestimmungen</i>	17
2.3.3	<i>Sonstige Bestimmungen</i>	19
2.4	Statistik	19
3	Ergebnisse	20
3.1	Demographische und laborchemische Ergebnisse (Gesunde und Hypertoniker)	20
3.2	Ergebnisse zur Hautautofluoreszenz (SAF) und AGE assoziierter Fluoreszenz im Plasma (AGE-FI) (Gesunde und Hypertoniker)	21
3.3	Ergebnisse - normotensive Probanden und hypertensive Patienten	23
3.4	Ergebnisse - Diabetiker und nicht diabetische Kontrollen	27
3.5	Einfluss des Diabetestyps	29
3.6	Einfluss des Vitamin D-Status (Diabetiker und Nicht-Diabetiker)	30
3.7	SAF und AGE-FI bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern	40
4.	Diskussion	43

5. Zusammenfassung	51
6. Literatur- und Abbildungs- und Abkürzungsverzeichnis	53

1 Einleitung

Die Glykierung von Proteinen ist ein spontan, nicht enzymatisch ablaufender Prozess, der zu irreversiblen Protein-Zucker Verbindungen führt; den sogenannten Advanced Glycation Endproducts (AGEs). AGE-Bildung verändert dabei die Eigenschaften von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren (Nawroth et al. 1999). Sie können z.B. in Gefäßwänden und intrazellulär in unterschiedlichen Gewebe akkumulieren. Dort stören sie durch zum Teil irreversible strukturelle Veränderungen die Funktion der betroffenen Zellen. AGEs funktionieren dabei z. B. in der Gentranskription involvierte intrazelluläre Proteine ebenso um, wie verschiedene im Blut zirkulierende Moleküle (Stirban, 2010). Sie induzieren pathologische Veränderungen an extrazellulären Matrixmolekülen und stören somit die Signalkette zwischen Zellen und Matrix, was dann letztendlich eine zelluläre Dysfunktion zur Folge hat. Darüber hinaus können AGEs an spezifische zelluläre Rezeptoren (RAGE) binden, was zur Aktivierung von oxidativem Stress mit Freisetzung von Sauerstoffradikalen, DNA-Schädigung und inflammatorischen Prozessen führt (Stirban, 2010). Gesicherte Ursachen der AGE-Bildung sind höheres Lebensalter, Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, sowie verschiedene Herz-Kreislauferkrankungen (Ludgers et al. 2006, Chabroux et al. 2011, Meerwaldt et al. 2005, Monami et al. 2008). In diesem Zusammenhang spielen AGEs gegenwärtig in der Aufklärung der Pathogenese unterschiedlicher metabolischer Erkrankungen und deren Folgekomplikationen eine immer größere Rolle. Nach bisherigen Erkenntnissen scheint die AGE-Bildung dabei ein negativer prognostischer Parameter für makro- und mikrovaskuläre Komplikationen des Diabetes mellitus und weiteren Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, sowie der Niere zu sein. Selbst in der Entstehung verschiedener Krebsformen sollen AGEs eine kausale Rolle spielen (Schupp et al. 2005, Sebekova et al. 2007).

Einen weiteren großen Stellenwert im Bereich der klinischen Forschung der letzten Jahre nimmt das Vitamin D ein. Eine PubMed-Suche im Juni 2016 ergab unter dem Stichwort „Vitamin D“ insgesamt 68186 Treffer. Grenzt man diese Suche auf das Jahr 2015 - dem Jahr unserer ersten Publikation zum möglichen Zusammenhang zwischen Vitamin D und AGE-Bildung - ein, fanden sich 4230 Arbeiten mit Vitamin D als keyword. Dabei sind Vitamin D-Effekte auf die Kalzium-/Phosphathomöostase und Knochenmineralisation sowie seine Rolle im Verlauf chronischer Nierenerkrankungen im Rahmen der der renalen Osteopathie sind seit langen bekannt. Die orale Gabe von

Vitamin D, bzw. Vitamin D-Abkömmlingen ist inzwischen klinischer Standard in der Therapie der Osteoporose, bzw. des renalen Hyperparathyreoidismus.

Neben dem ossären System exprimieren jedoch viele andere Gewebe und Zellen des menschlichen Körpers den Vitamin D-Rezeptor (VDR) und sind in der Lage, die primär zirkulierende Form von Vitamin D₃, das 25(OH)-Vitamin D₃ in das aktive 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ umzuwandeln. Auf diese Weise ist es möglich, dass Vitamin D zusätzliche nicht auf das Skelettsystem beschränkte Angriffspunkte und Wirkungsorte hat. Von großem klinischem Interesse ist dabei sein möglicher positiver Einfluss bzgl. Prävention verschiedener chronischer Erkrankungen im Bereich Autoimmun-System, systemischer Malignome, Infektionserkrankungen und insbesondere einer vorzeitigen Arteriosklerose (Holick M, 2007).

In diesem Zusammenhang wurde auch festgestellt, dass ein Vitamin D-Mangel eine deutlich höhere Prävalenz als bisher angenommen hat und dieser auch meist unerkannt bleibt. Weltweit weisen ca. eine Milliarde Menschen einen signifikanten Vitamin D-Mangel auf (Holick M, 2007). Eine Querschnittsstudie zur Abschätzung des Vitamin D-Status in der deutschen Bevölkerung, die sog. DEVID Studie (Kipshoven C, 2010) ergab in allen Altersgruppen zu etwa 50% pathologisch erniedrigte Vitamin D-Spiegel. Insbesondere mit zunehmendem Alter stieg der Anteil an Personen mit Vitamin D-Mangel an. Insbesondere bei den über 75-Jährigen waren es im Vergleich mit Jüngeren mehr als doppelt so viele, die eine Unterversorgung aufwiesen.

Die Gründe für einen Vitamin D-Mangel sind multifaktoriell. Neben der jahreszeitlich bedingten unterschiedlichen Sonnenexposition, der Abschirmung der Haut von der Sonne durch Kleidung und Cremes mit Lichtschutzfaktor, der geringen Zufuhr mit der Nahrung, scheinen auch die weltweit zunehmende Adipositas (Jacobo et al. 2000), sowie die im Alter abnehmende Hautdicke (Holick et al. 1989) eine wichtige Rolle zu spielen.

1.1 Grundlagen

1.1.1 Definition und Begriffserklärung der Advanced Glycation Endproducts

AGEs entstehen klassischerweise durch nichtenzymatische Glykierung, welche auch als Maillard- oder Bräunungsreaktion in der Literatur bekannt ist. Diese Glykierung kann neben komplexen Proteinen auch Nukleinsäuren, Lipide und Peptide betreffen und dabei deren physikochemische Eigenschaften verändern.

AGEs akkumulieren verstärkt mit zunehmendem Alter, bei Diabetes mellitus, bei Niereninsuffizienz und der Alzheimer- Demenz (Odetti et al. 1995). AGEs finden sich dabei beispielweise vermehrt innerhalb arteriosklerotischer Plaques, in senilen Plaques des Morbus Alzheimer, in der Niere des Diabetikers und in Amyloidablagerungen urämischer Patienten (Nawroth et al. 1999).

AGEs werden in drei Gruppen unterteilt (Stirban, 2010):

1. Fluoreszierende querverbundene AGEs: Pentosidin, Crossline
2. Nicht-fluoreszierende querverbundene AGEs: „Glyoxal lysine dimer“ (GOLD), „Methylglyoxal lysin dimer“ (MOLD)
3. Nicht-querverbundene AGEs: Pyrraline, N- Carboxymethyllysine (CML)

1.1.2 Entstehung der Advanced Glycation Endproducts (AGEs)

In der Nahrungsmittelchemie ist die chemische Reaktion die zur Bräunung von protein- und kohlenhydratreichen Nahrungsmitteln führt, seit langem bekannt. Sie wurde durch den französischen Chemiker Louis Caille Maillard bereits 1912 erstmals beschrieben und kann unter physiologischen Bedingungen auch im menschlichen Körper ablaufen (Ledl et al. 1990).

Dabei versteht man unter der sogenannten „Maillard-Reaktion“ den klassischen Weg zur AGE-Entstehung. Diese führt zunächst nicht-enzymatisch zu einer kovalenten Bindung zwischen einer freien n-terminalen und/oder ϵ -ständigen primären Aminogruppe von Proteinen mit einer Carbonylgruppe z.B. eines reduzierten Saccharids wie Glukose. So entsteht zunächst eine chemisch reversible Schiff'sche Base, die sich im weiteren Verlauf zu dem stabileren Ketoamin, dem sogenannten Amadori-Produkt, umlagert. Durch Dehydratations- und Kondensationsreaktionen reagiert das Amadori-Produkt letztendlich weiter zu den Endprodukten der Maillard-Reaktion, den sog. AGEs.

Neben diesem klassischen Weg, führt auch die Autooxidation von Glukose, oder die Bildung aus reaktiven Zwischenprodukten, welche auch als α -Dicarbonylverbindungen, oder Oxoaldehyde bekannt sind, zur Entstehung von AGEs (Thornalley, 1999).

Zusätzliche Wege, die zur Entstehung und langfristigen Akkumulation von AGEs führen können, sind vor allem im Rahmen von oxidativem Stress beschrieben. Auch hier sind reaktive Carbonyl-Verbindungen (RCC) wichtige Intermediärprodukte, die

durch Autooxidation von Kohlenhydraten und Glykolsäure-Zwischenprodukten, durch Peroxidation von Fettsäuren und oxidative Modifizierung von Nuklein- und Aminosäuren entstehen (Mulder, 2007).

Die enge Beziehung von AGE-Bildung und oxidativem Stress wird auch dadurch deutlich, dass bei der Oxidation von Glucose zu Dicarboxylzwischenprodukten Superoxidradikale entstehen, die zu Hydrogenperoxid disproportionieren können. Hydrogenperoxid kann dabei in Anwesenheit von katalysierenden Metallen das extrem reaktive Hydroxylradikal bilden (Nawroth et al. 1999).

Neben den beschriebenen endogenen Entstehungswegen können AGEs auch direkt aus der Umwelt (exogen) in den Organismus gelangen. Zigarettenrauch und Nahrungsmittel sind dabei die hauptsächliche Quelle. Der Konsum AGE-reicher Nahrungsmittel führte im Tierversuch zu erhöhten zirkulierenden und im Gewebe abgelagerten AGEs, zu verstärkter Arteriosklerose (Lin et al. 2003) und zur Nierenschädigung (Zheng et al. 2002). Die restriktive Zufuhr von AGE-haltigen Nahrungsmitteln verhinderte eine Progression der Arteriosklerose und eine weitere Verschlechterung der Nierenfunktion (Zengh et al. 2002) bei Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 (Peppia et al. 2003). Weitere bei verminderter exogener AGE-Zufuhr beobachteten günstige Effekte waren eine erhöhte Insulinsensitivität (Hoffman et al, 2005) und eine beschleunigte Wundheilung (Peppia et al. 2003). Eine lebenslange niedrige Nahrungs-AGE-Zufuhr war außerdem im gleichen Umfang, wie eine geringere Kalorienzufuhr, mit einer höheren Lebenserwartung vergesellschaftet (Palimeri et al. 2015).

Im Zusammenhang mit der exogenen Zufuhr von AGEs über die Nahrung konnte gezeigt werden, dass Fleisch und Fett im Vergleich zu Kohlenhydraten einen besonders hohen Gehalt an AGEs aufweisen, der dann noch durch unterschiedliche Zubereitungsmethoden (insbesondere Grillen und Braten) weiter erhöht wird (Uribarri et al. 2010).

1.1.3 Abbau der AGEs

Die wichtigsten Mechanismen für den Abbau von AGE-modifizierten Gewebs- und Zellstrukturen sind die extrazelluläre Proteolyse, sowie der AGE- Rezeptor vermittelte intrazelluläre Abbau; z.B. durch Gewebsmakrophagen. Die AGEs werden dabei durch Makrophagen zu niedermolekularen und damit löslichen Peptiden abgebaut, die über

die Niere ausgeschieden werden können. Abhängig von der Nierenfunktion werden 5-30 % der aufgenommenen AGEs über den Harn ausgeschieden. Somit hängt die AGE-Ausscheidung auch stark von der Nierenfunktion ab. Weiterhin wird vermutet, dass AGEs über Endozytose der AGE-modifizierten Proteine in den sinusoidalen Zellen der Leber (Kupffer-Zellen und Endothelzellen) abgebaut werden können (Smedsrod et al. 1997). Eine eingeschränkte Leber-Funktion führt daher unabhängig von der Nierenfunktion ebenso zu einer Akkumulation von AGEs. Insulin scheint dabei eine wichtige modifizierende Rolle bei der Aufnahme von AGEs in die Endothelzellen mittels „Scavenger“- Rezeptoren zu spielen (Sano et al. 1998).

1.2 Nachweis der Advanced Glycation Endproducts

Im Wesentlichen werden AGEs im menschlichen Organismus heute für große Untersuchungsserien in folgenden beiden Kompartimenten quantitativ detektiert:

1.2.1 Messung von Advanced Glycation Endproducts im Blut

Um den AGE-Gehalt im Serum zu messen wird häufig das nicht-querverbundene AGE, N-Carboxymethyl-Lysin (CML) bestimmt. Die Konzentration wird dabei mittels kompetitivem ELISA-System quantifiziert (Makita et al. 1991). In jüngerer Zeit neu entwickelte biochemische und immunochemische Tests messen sowohl fluoreszierende AGEs (z.B. Pentosidin), als auch nicht- fluoreszierende AGEs (z.B. N-Carboxymethyl-Lysin). Zeitaufwand, Kosten und geringe Reproduzierbarkeit beschränken allerdings die breite klinische Nutzung dieser Assays.

1.2.2 Hautautofluoreszenz (SAF)

Nach Anregung bei 370nm zeigen kollagen-verbundene AGEs der Haut ein für sie charakteristisches Fluoreszenzspektrum bei 440nm. Klassischerweise wurde dies genutzt, um die AGE-Akkumulation in Homogenaten aus Hautbiopsien zu bestimmen. Das hier am häufigsten untersuchte Haut-AGE ist Pentosidin, ein Cross-link zwischen Arginin und Lysin.

Dabei ist jedoch zu beachten, dass nicht alle AGEs fluoreszierende Eigenschaften aufweisen. Auf ELISA basierte Untersuchungen an Diabetikern haben einen gegenüber den fluoreszierenden AGEs zusätzlichen vorzeitigen Anstieg der nicht-fluoreszierenden AGEs gezeigt (Beiswenger et al. 1995).

Da verschiedene AGEs unterschiedliche fluoreszierende Eigenschaften aufweisen, kann man über die alleinige Messung der Hautfluoreszenz keine Aussagen zur Konzentration einzelner Verbindungen machen. Dennoch scheint die AGE-Hautfluoreszenz insgesamt in einem positiv korrelierenden Zusammenhang mit metabolischem Stress und dem Fortschreiten von Komplikationen verschiedener altersbedingter Erkrankungen zu stehen (Monnier et al. 1986).

Im Gegensatz zu dem auf einfachem Weg mittels ELISA aus Blut- und Urinproben gemessenem AGE-Gehalt, scheint nach aktueller Datenlage die Hautfluoreszenz-Messung insgesamt gesehen eine genauere Information über die AGE-Akkumulation im Gewebe und damit auch dem Risiko assoziierter Erkrankungen zu geben (Meerwaldt et al. 2005). Dabei dürfte auch eine nicht unwesentliche Rolle spielen, dass sie unabhängig von der aktuellen Nieren- und Leberfunktion bestimmt werden kann. Das Bestreben, auf diesem Weg eine einfache, schnelle und kostengünstige Messung der Hautgewebe-Fluoreszenz bei größeren Populationen vornehmen zu können, führte zur Entwicklung des in dieser Arbeit verwendeten AGE-Readers.

1.3 Entwicklung des AGE-Readers

Diagnostischer Goldstandard in der quantitativen Bestimmung der AGE-Ablagerung in der Haut ist die bioptische Probengewinnung und eine anschließende aufwendige immunochemische Untersuchung (Meerwaldt et al. 2008, Lutgers et al. 2006). Aufwand und Kosten schließen diese Methode leider für einen breiten klinischen Einsatz innerhalb großer Untersuchungs-Kollektive aus. Da jedoch zahlreichen Studien zur AGE-Akkumulation in der Haut deren gute positive Korrelation zu verschiedenen bereits genannten chronischen Folgeerkrankungen zeigten (Lutgers et al. 2006, Meerwaldt et al. 2005, Mulder et al. 2008), war die Entwicklung einer möglichst einfachen, genauen, gut reproduzierbaren und auch weitgehend automatisierbaren Messmethode eine logische Konsequenz.

Auf der Suche nach einer so charakterisierten Methode zur quantitativen Erfassung von AGE-Ablagerungen in der Haut, half eine eher zufällige Entdeckung in früheren Studien welche mit Natriumfluoreszin die Endotheldysfunktion diabetischer Patienten untersuchten. Mit diesem Marker gelang es die bei Diabetes mellitus häufig erhöhte vermehrte Kapillardurchlässigkeit und Diffusion ins Interstitium in verschiedensten Bereichen des Körpers im Rahmen der nichtinvasiven Fluoreszenzvideomikroskopie zu visualisieren. (Jager et al. 1997). Dabei fielen jedoch bereits vor der hierzu

notwendigen intravenösen Natriumfluoreszin-Injektion im Vergleich zu Kontrollpersonen bei Diabetikern erhöhte Werte an von der Haut ausgestrahltem fluoreszierendem Licht auf.

Diese endogen erzeugte Fluoreszenz wurde zunächst nur als Autofluoreszenz bezeichnet. Später konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Teil des emittierenden Lichts innerhalb bestimmter Wellenlängenbereiche auf fluoreszierende AGEs in den verschiedenen Hautschichten zurückgeführt werden kann (Mulder, 2007). Dieses Erkenntnis führte dann in einer Zusammenarbeit der Abteilung für Biomedical Engineering an der Universität Groningen (Niederlande) Medical Care mit der dort ansässigen Firma DiagnOptics zur Entwicklung und serienmäßigen Herstellung des in dieser Arbeit benutzten AGE-Readers.

1.4 Vitamin D

1.4.1 Terminologie Vitamin D

Der Begriff „Vitamin D“ wird im deutschen und angloamerikanischen Sprachraum biochemisch nicht ganz korrekt verwendet. Einerseits subsummiert er sowohl biologisch inaktive Hormon-Vorstufen, als auch das aktive Hormon $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 . Andererseits ist der historisch gewählte Vitamin-Begriff nicht ganz zutreffend, da unter Vitaminen im engeren Sinn lebensnotwendige Substanzen definiert sind, welche der Körper nicht selbst synthetisieren kann und daher von außen zugeführt werden müssen. Dies trifft jedoch beim Vitamin D nicht zu, da die Hormonvorstufe (siehe unten) in der Leber endogen gebildet wird. Somit wäre eine Bezeichnung wie z. B. Prohormon D_3 zutreffender.

Etwas verwirrend ist ferner die Tatsache, dass für die letztendlich biologisch aktive Substanz mit $1,25(\text{OH})_2$ -Cholecalciferol, $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 , $1,25$ -Dihydroxycholecalciferol, Calcitriol und Vitamin D-Hormon, insgesamt 5 unterschiedliche Bezeichnungen synonym verwendet werden. Davon zu unterscheiden sind wortverwandte Begriffe wie z.B. Alpha-Calcidiol, einem zur Therapie verwendeten synthetischen Metaboliten 1α -(OH)-Vitamin D_3 .

Weitere synthetische Substanzen mit über den Vitamin D Rezeptor vermittelten biologischen Wirkungen werden letztendlich noch als Vitamin D-Analoga bezeichnet (Jakob, 1999).

Zusätzlich ist noch der Begriff des Vitamin D-Rezeptor (VDR) im alltäglichen Sprachgebrauch vorhanden, obwohl es sich hierbei um den klassischen Rezeptor für das aktive 1,25(OH)₂-Vitamin D₃, dem Vitamin D-Hormon handelt.

1.4.2 Bildung und Aktivierung von Vitamin D

Die Bildung von Vitamin D₃ beginnt mit dem im Körper in der Regel ausreichend vorkommenden Provitamin 7-Dehydrocholesterol. Dieses ist ein Zwischenprodukt der Cholesterinbiosynthese und findet sich in seiner höchsten Konzentration im Stratum spinosum und Stratum basale der Haut. Unter Einwirkung von ultraviolettem Licht der Wellenlänge 290-315 nm wird eine photochemische Reaktion ausgelöst, in der sich Prävitamin D₃ bildet und durch thermische Isomerisierung zu Vitamin D₃ umgewandelt wird. *„Bei übermäßiger Sonneneinstrahlung entstehen unwirksame Nebenprodukte. Eine Hypervitaminose durch Sonneneinstrahlung kann also nicht entstehen“* (Jakob, 1999). Vitamin D₃ gelangt dann an das Vitamin D-bindende Protein gekoppelt über dem Blutweg zur Leber. Dort wird es unter dem Einfluss der Vitamin D-25 Hydroxylase weiter zu 25(OH)-Vitamin D (Calcidiol) hydroxyliert. Calcidiol ist noch biologisch inaktiv und wird in Muskel-, Leber- und Fettgewebe gespeichert. Die letztendliche Umwandlung zum aktiven 1,25(OH)₂ Vitamin D (Calcitriol) erfolgt zum überwiegenden Teil in den proximalen Tubuluszellen der Niere durch das Enzym 1 α -Hydroxylase. Die wichtigsten Faktoren, die zu einer Aktivierung dieses Schlüsselenzyms führen, sind ein Absinken des Serum-Calcium- und Phosphatspiegels mit Stimulation der Parathormonsekretion in der Nebenschilddrüse. 1,25-Dihydroxycholecalciferol hemmt wiederum seine eigene Synthese in einem negativen Rückkopplungsmechanismus mit verminderter PTH-Sekretion und einer gesteigerten Expression der 24-Hydroxylase, welche Calcitriol zur wasserlöslichen Calcitroinsäure abbaut, die anschließend bilär ausgeschieden wird.

1.4.2 Biologische Wirkungen von Vitamin D

1.4.2.1 Wirkung im Kalzium- und Knochenstoffwechsels

Aufgrund seiner vielfältigen Wirkungen im Organismus ist es erforderlich, dass die Serum-Calciumkonzentration sowohl kurzfristig (Muskel; Nerven, Blutgerinnung u.a.),

als auch langfristig (Knochen) in einem engen Bereich von 2,1-2,6 mmol/l gehalten wird. Hier besitzt Vitamin D₃ seine bekanntesten regulatorischen Effekte.

Es stimuliert die Differenzierung von Osteoblasten ebenso, wie deren spezifische Funktionen nach Ausreifung. Eine Reihe von Genen der Extrazellulärmatrix (Osteopontin, Osteocalcin, hCYR61, Typ1-Kollagen) wurden dabei als Vitamin D₃-responsiv beschrieben. Im Dünndarm fördert Calcitriol die enterale Kalziumaufnahme. Auch der aktive und passive Phosphattransport wird stimuliert. Dieses wiederum wird bei Kalziummangel vermehrt ausgeschüttet und stimuliert über eine vermehrte Expression der 1 α -Hydroxylase die Aktivierung von 25(OH)-Vitamin D zu 1,25(OH)₂-Vitamin D und damit indirekt die enterale Calciumresorption im terminalen Ileum.

An der Nebenschilddrüse inhibiert Vitamin D₃ die Sekretion des Osteoklasten-stimulierendem Parathormon.

Ein einseitig verstärkter Knochenabbau wird durch die Calcitriol-vermittelte Hemmung von Parathormon verhindert. Die Sekretion von Parathormon wird zusätzlich durch die vermehrte Kalziumresorption im Dünndarm unter dem Einfluss von 1,25(OH)₂-Vitamin D gehemmt (F. Jakob, 1999).

1.4.2.2 Wirkung an den Nieren

In der Niere stimuliert 1,25-Dihydroxycholecalciferol über eine vermehrte Expression der 24-Hydroxylase seinen eigenen Abbau. Zusätzlich fördert es hier die tubuläre Kalzium- und Phosphatrückresorption (F. Jakob, 1999).

1.4.2.3 Wirkung im Muskel

Vitamin D beeinflusst direkt und indirekt Muskelkraft und-Funktion über eine Steuerung der muskulären Proteinbiosynthese und des intrazellulären Kalziumstoffwechsels. Es wirkt insbesondere auch dem altersabhängigen Verlust von schnellwirksamen Typ 2-Fasern entgegen, welcher für die vermehrte Sturzneigung älterer Menschen in Zusammenhang gebracht wird (De Luca, 2004).

1.4.2.4 Wirkung auf die Haut

In der Haut wird, wie bereits beschrieben, das Vitamin-D-Prähormon mit Hilfe von UVB-Strahlen gebildet. Gleichzeitig besitzen viele Zellen der Haut, darunter Keratozyten, Melanozyten, Makrophagen und Sebozyten die Fähigkeit, aktives 1,25(OH)₂-D₃ aus 25(OH)-D₃ zu synthetisieren. Zudem ist die Haut selbst auch

Zielorgan, in dem Calcitriol das Wachstum und die Differenzierung von Keratinozyten, Talgdrüsen und anderer Zellen reguliert (Reichrath et al. 2007).

1.4.3 Vitamin D-Mangel und seine Bedeutung

Die bekannteste und in ihrer Kausalität gesicherte klinische Folge eines chronischen Vitamin D-Mangels ist ein sekundärer Hyperparathyreoidismus. Dieser wiederum induziert einen verstärkten Knochenumbau und gesteigerten Knochenmasseverlust, was letztendlich zu einem erhöhten Risiko für eine Osteoporose und pathologischen Knochenfrakturen führt.

Weiterhin wird ein chronischer Vitamin D-Mangel -meist ohne gesicherte Kausalität- insbesondere auf Grundlage epidemiologischer Studien mit einer Vielzahl weiterer biochemischer und klinischer Störungen in Verbindung gebracht:

Dies betrifft kardiovaskulären Erkrankungen (Wang et al. 2008), arterielle Hypertonie (Li et al. 2002, Scragg et al. 2007), kalzifizierende Arteriosklerose (Al Mheid et al. 2011), Koronarsklerose (Watson et al. 1997, De Boer et al. 2009), ischämischer Insult (Pilz et al. 2008), verschiedene Autoimmunerkrankungen (Typ 1-Diabetes, Multiple Sklerose und Rheumatoide Arthritis) (Holick, 2007), verminderte Infektabwehr (Gombart et al. 2005), Morbus Alzheimer (Bali et al. 2012), sowie Depression und Schizophrenie (Mc Grath et al. 2002).

Im Bereich des Glucosestoffwechsels wurde ein chronischer Vitamin D-Mangel mit einer gestörten Insulinsekretion aus den Beta-Zellen des Pankreas und einer Beeinträchtigung der Insulin-Sensitivität (Insulin-Resistenz) insulinabhängiger Gewebe (Norman et al. 1980, Harinarayan et al. 2014, Pittas et al. 2007, Badawi et al. 2014) in Verbindung gebracht. Aus diesen Befunden vermutet man einen möglichen Zusammenhang zwischen Vitamin D-Mangel und der Entwicklung einer gestörten Glucosetoleranz als Vorstufe und Wegbereiter zum Typ 2-Diabetes ab (Mattila et al. 2007).

Prospektive und retrospektive Untersuchungen beschreiben bei Vitamin-Mangel unter 20 ng/ml 25-OH-D₃ eine erhöhte Rate an Colon-, Prostata- und Brustkrebs, sowie eine erhöhte Mortalität bei Vorliegen der Krebserkrankung (Holick, 2007).

1.4.4 Vitamin D-Diagnostik

Die Diagnose eines Vitamin D- Mangels aufgrund mangelnder Zufuhr, ungenügender Sonneneinstrahlung, erhöhtem Stoffwechsel durch Aktivierung mikrosomaler P450-Enzyme oder Resorptionsstörung wird durch Bestimmung des 25(OH)-Vitamin D₃ im Serum gestellt. Die Konzentration von 25(OH)-Vitamin D₃ spiegelt dabei die Zufuhr von Vitamin D₃ mit der Nahrung und seine UV-Licht-abhängige Bildung aus seinen Prävitaminen wider. Bei Werten ≤ 12 ng/ml (≤ 30 nmol/l) liegt definitionsgemäß ein schwerer, bei Werten von 12 - 20 ng/ml (30 - 50 nmol/l) ein mittelgradiger und bei 20 - 30 ng/ml /l (51 -75 nmol/l) ein leichter Vitamin D-Mangel vor.

Ungeeignet zur Messung ist aktives 1,25(OH)₂-Vitamin D₃, da es bei niedrigen 25(OH)-Vitamin D₃-Spiegeln (bis etwa 7ng/ml) lange im Normbereich bleibt. Der Grund hierfür ist, dass jedenfalls bezüglich des Serum-1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Spiegels genügend Substrat für die 1 α -Hydroxylase zur Verfügung steht.

Kalzium, Phosphat und alkalische Phosphatase im Serum sind ebenfalls ungeeignet, um indirekt erniedrigte Calcitriolwerte zu erkennen, da sie sich trotz eklatantem Vitamin D-Mangels lange im Normbereich befinden.

Abhängig von der Dauer und dem Schweregrad kann reaktiv der Parathormon-Spiegel ansteigen und erhöhte Parameter des Knochenstoffwechsels gemessen werden.

Die Calcidiol-Bestimmung erfolgt heute im klinischen Routine-Labor automatisiert mittels Elektrochemilumineszenz-Enzymimmunoassay (ELISA).

1.5 Fragestellung und Ziele

Die vorliegende Arbeit versucht zu klären, ob Zusammenhänge zwischen dem Vitamin D Status und Parametern der Mikoinflammation, des oxidativen Stress, sowie einer AGE-Akkumulation in der Haut bestehen. Untersucht wurden hierzu gesunde Personen, Patienten mit ausschließlich arterieller Hypertonie, sowie Typ 1- und Typ 2-Diabetiker. Es interessierte dabei insbesondere, ob ein Vitamin D- Defizit mit einer messbaren Veränderung der genannten Parameter verbunden ist.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeines

Die Studie wurde vorab durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg begutachtet und genehmigt. Die Durchführung erfolgte entsprechend ethischer Richtlinien der Deklaration von Helsinki für wissenschaftlich-klinische Studien am Menschen. Alle Teilnehmer wurden mündlich und mittels Aufklärungsbogen über Umfang und Ziele der Studie aufgeklärt und unterschrieben die beigefügte Einverständniserklärung.

Die Ergebnisse wurden in zwei Originalarbeiten publiziert:

Šebeková, K., Stürmer, M., Fazeli, G., Bahner, U., Stäb, F., & Heidland, A. „Is vitamin D deficiency related to accumulation of advanced glycation end products, markers of inflammation, and oxidative stress in diabetic subjects?“ *BioMed research international*, 2015

Stürmer, M., Šebeková, K., Fazeli, G., Bahner, U., Stäb, F., & Heidland, A. „25-Hydroxyvitamin D and advanced glycation endproducts in healthy and hypertensive subjects: are there interactions?“ *Journal of Renal Nutrition*, 2015

Tabellen und Abbildungen in in der vorliegenden Arbeit entsprechen oder ähneln demnach denen der Orginalpublikationen.

2.2 Probanden

Die Studienteilnehmer wurden durch persönliche Ansprache in der Praxis für Innere Medizin, Gastroenterologie und Diabetologie von Dr. Werner Stürmer in Würzburg und im KfH Nierenzentrum Würzburg e.V. rekrutiert.

Es wurden dabei insgesamt vier unterschiedliche Gruppen untersucht:

1. Gesunde Kontrollpersonen (n=106)
2. Patienten mit arterieller Hypertonie ohne Diabetes (n=39)
3. Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 (n=43)

4. Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (n=233)

Als gesund wurde ein Proband für die Studie eingestuft, wenn folgende Bedingungen erfüllt waren:

- Keine bekannte akute, oder chronische Erkrankung
- Keinerlei Medikamenteneinnahme
- In standardisierter Blutdruckmessung RR<140/90 mm Hg
- HbA1c-Wert <6,1%

Patienten mit arterieller Hypertonie, jedoch ohne Diabetes mellitus hatten in ihrer Krankengeschichte in standardisierten Gelegenheitsmessungen dokumentierte Ruhe-Blutdruckwerte von >140/90 mm Hg, oder einen Mittelwert von >135/85 mm Hg in der 24h RR-Messung. Sie nahmen aus diesem Grund mindestens ein antihypertensiv wirksames Medikament ein. Ihr HbA1c lag ebenfalls unter 6,1%.

Typ 1 Diabetiker wiesen eine typische Anamnese auf und wurden alle entweder mit einer intensivierten konventionellen Insulintherapie (ICT), oder einer Insulin-Pumpentherapie seit mehr als einem Jahr behandelt. Bei Erkrankungsbeginn waren mindestens einer der drei Autoimmunparameter (ICA, GAD-AK; IA2-AK) pathologisch erhöht und es lag eine signifikante Ketonurie vor.

Alle Typ 2 Diabetiker zeigten ein, oder meist mehrere Kriterien des metabolischen Syndroms. Sie wiesen eine unterschiedlich hohe Insulineigensekretion (C-Peptid im kurzen Glucagon-Test, oder postprandial gemessen) auf und waren bei der Erstmanifestation von unter 55 Jahren stets Antikörper-negativ, bzw. ohne signifikante Ketonurie.

Alle untersuchten Probanden waren frei von Hauterkrankungen, Narben im Untersuchungsgebiet oder Pigmentstörungen (z.B. Vitiligo). Ausschlusskriterien waren darüber hinaus jegliche Art von akuten und nicht metabolischen chronischen Erkrankungen, aktive Malignome, eine Einschränkung der Nierenfunktion (MDRD-GFR <60ml/min/1,73m²), eine laufende orale Medikation mit Glukokortikoiden, Schwangerschaft, Stillzeit, Vitamin D Supplementation innerhalb der letzten sechs

Monate, regelmäßige Solarium-Besuche und die Benutzung von Selbstbräunern innerhalb der letzten 14 Tage.

Im ersten Studienarm wurden insgesamt 146 Probanden untersucht und dabei 107 Gesunde mit 39 Patienten verglichen, welche als einzige relevante internistische Erkrankung eine pharmakologisch behandelte arterielle Hypertonie aufwiesen.

Der zweite Studienarm umfasste 276 Diabetikern (233 mit Typ 2 und 43 mit Typ 1 Diabetes), denen 121 nicht diabetischen Vergleichspersonen gegenübergestellt wurden.

Um lediglich den Einfluss des Diabetes mellitus auf die erhobenen Parameter zu erkennen, wurden im zweiten Studienarm alle Raucher aus dem Kollektiv ausgeschlossen.

2.3 Methoden

2.3.1 AGE-Reader

Bei allem Studienteilnehmer wurde die Haut-Autofluoreszenz auf der volaren Seite des Unterarmes mit dem AGE-Reader (DiagnOptics, BV Groningen, Niederlande) untersucht.

Der AGE-Reader besteht aus einem Gehäuse, welches das Spektrometer und die UV-Lichtquelle zum Anregen der AGEs umschließt. In das Gehäuse ist ein Messfenster zur Belichtung und Detektion eingelassen. Auf der Gehäuse-Oberfläche befindet sich eine Gummimatte, in die eine Vertiefung zur Ablage der zu untersuchenden Unterarmseite eingearbeitet ist. Diese zur Reinigung abnehmbare Matte hat gleichzeitig den Zweck, das zu untersuchende Hautareal vom Umgebungslicht abzuschirmen. Der AGE-Reader ist zur Datenübertragung mittels USB-Kabel mit einem PC verbunden.

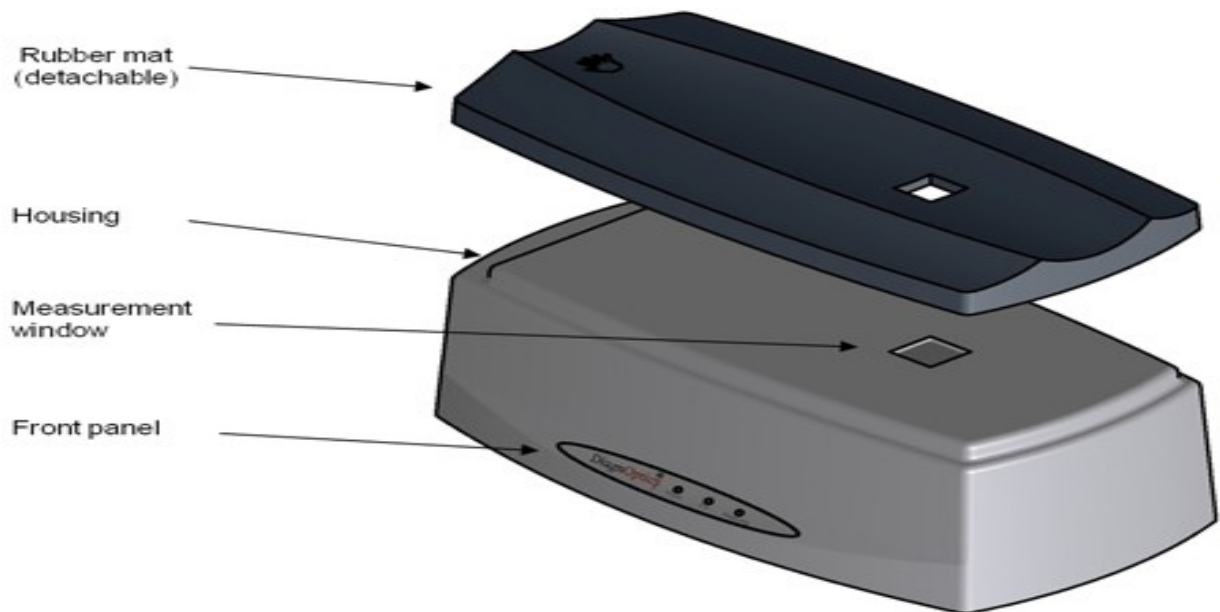


Abbildung 1: Aufbau des AGE Reader

Im Gegensatz zu Untersuchungen im Rahmen der Malignom-Diagnostik, welche zwischen lokalen Unterschieden in der Autofluoreszenz von Tumorgewebe und nicht tumorös verändertem Gewebe zu unterscheiden versucht, detektiert der in dieser Studie verwendete AGE-Reader Änderungen im normalen Gewebe, die möglicherweise mit dem Alterungsprozess und Systemerkrankungen zusammenhängen. Infolgedessen muss die Gewebsfläche, die von der Glasfaser erfasst wird, groß genug sein, um grobe Abweichungen der Messung, die auf Haarfollikel, Talgdrüsen, Kapillaren oder kleine Blutgefäße zurückzuführen sind, zu verhindern. Aus diesem Grund wurde die Glasfaser nicht direkt in Kontakt mit der Haut gebracht, sondern mit einigem Abstand zur Haut positioniert, was zu einer Integrationsfläche von ca. 4cm^2 führt. Eine schematische Darstellung zeigt die Abbildung 2.

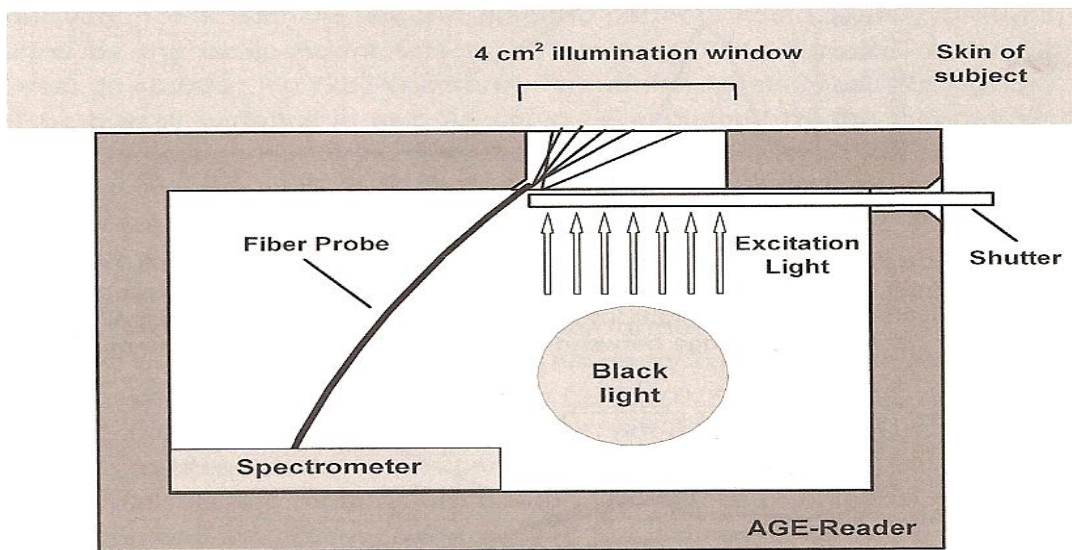


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktionsweise des AGE-Readers

In dieser Anordnung trifft das mittig ausgestrahlte Licht die Haut senkrecht über eine gesamte Detektionsfläche von 4 cm². Die Glasfasersonde wird hierbei in einem Winkel von 45° angebracht, um den Einfluss der gerichteten Reflexion zu beschränken.

Zur Belichtung wird eine Schwarzlichtlampe genutzt. Der Anregungsbereich liegt dabei zwischen 350 und 420nm (maximale Intensität bei 370nm). Dieses Licht stimuliert fluoreszierende Anteile im Gewebe, welche dann Licht mit einer veränderten Wellenlänge aussenden. Im verwendeten Wellenlängenbereich kommt der größte Teil der Fluoreszenz von fluoreszenten AGEs, hauptsächlich in Verbindung mit Kollagen, aber auch mit anderen Proteinen und Lipiden. Das Licht dieser Autofluoreszenz wird dann mit einem Spektrometer quantitativ erfasst.

Die AGE- Messung selbst besteht aus zwei Schritten. Dabei wird der eigentlichen Probanden-Messung jeweils eine zweistufige Kalibrierung bei geschlossenem Verschluss vorgeschaltet.

Erst findet die Dunkelstrommessung (Dunkelstrom ist die spontane Bildung von freien Ladungsträgern durch Wärme in einem lichtempfindlichen Halbleiter, hier dem Charged-Coupled-Device-Sensor) statt, um ein störendes Rauschen der CCD-Fotodetektoren zu verhindern.

Der zweite Schritt besteht in der Messung von 100% Reflexion durch einen weißen Reflexionsstandard, um die Unterschiede in der Hautabsorption und damit auch der Hautreflexion der verschiedenen Patienten zu korrigieren.

Nach abgeschlossener Kalibrierung wird nach Öffnung des Verschlusses die Messung am Patienten durchgeführt. Dabei wird das gesamte Licht im Wellenlängenbereich von 300-600 nm, welches nach Anregung mittels Schwarzlichtlampe von der Haut emittiert wird, über eine Glasfasersonde gesammelt und zu mehreren CCD-Fotodetektoren im eingebauten Spektrometer übertragen. Um eine bestmögliche Reproduzierbarkeit zu erreichen, besteht eine Messung aus dem Mittelwert von 50 automatisch hintereinander durchgeführten Einzelmessungen.

Die im Spektrometer detektierten Daten werden per USB- Kabel zur Informationsverarbeitung an einem Computer weitergeleitet und dort das gemessene Lichtspektrum, sowie der Hautautofluoreszenzwert graphisch dargestellt.

Die Höhe der Autofluoreszenz wird mit Hilfe einer speziellen Auswertesoftware durch die Formel $AF = I_{em}/I_{ex}$ errechnet, wobei I_{em} dem durchschnittlich emittierten Licht in nm im Bereich zwischen 420nm und 600nm und I_{ex} der mittleren Anregungslichtintensität im Bereich 300- 420nm entspricht. Das Ergebnis wird in AU (arbitrary units = willkürliche Einheit) angegeben. Da die Hautautofluoreszenz von Veränderungen im Bereich Hautabsorption und außerdem von der Lichtintensität beeinflusst werden kann, wird empfohlen, Hautautofluoreszenzwerte als relative Werte zu betrachten (Mulder, 2007).

Die vollautomatische Probanden-Messung dauert inklusive Auswertung weniger als eine Minute.

2.3.2 Laborchemische Bestimmungen

Bei allen Probanden wurde nüchtern Blut aus einer Kubitalvene entnommen. Davon wurden zwei Proben unmittelbar zentrifugiert und als Plasma bei -80 Grad zur späteren Analyse eingefroren. Weitere Serumproben wurden am gleichen Vormittag zur Bestimmung verschiedener Routineparameter (s.u.) in die örtliche Fachpraxis für Laboratoriumsmedizin (Dr. G. Hermann Würzburg) verschickt. Zusätzlich erfolgte eine kapilläre Blutentnahme zur Bestimmung von Blutglucose und HbA1c im Praxislabor Dr. W. Stürmer vor Ort. In einer Subgruppe von 61 Probanden (42 Patienten Gesunde und 19 Patienten mit Hypertonie, darunter 51 Nichtraucher und 10 Raucher mit einem Geschlechterverhältnis von 30 Männern zu 31 Frauen) wurden außerdem CML und Soluble Vascular Receptor Adhesion Protein-1 im kommerziell erhältlichen ELISA bestimmt. Diese Untersuchungen erfolgten in einem Labor der medizinischen Fakultät

an der Comenius Universität Bratislava in der Slowakei. Weitere Routine Parameter wie Serum-Kreatinin, Albumin im Urin wurden in der Praxis für Laboratoriumsmedizin (Dr. med. Gerhard Hermann; Würzburg) bestimmt. Die glomeruläre Filtration (GFR) wurde mittels MDRD-Formel berechnet.

Vitamin D

Elektrochemilumineszenz-Immunoassay; ECL-Immunoassay, Fa. Roche, Schweiz, Labor Limbach, Heidelberg

hoch sensitives C-reaktives-Protein C (hsCRP)

Nephelometrie; BN II Nephelometer, Fa. Siemens, Deutschland, Labor Limbach, Heidelberg

Advanced-Glycation-Endproducts-assoziierter-Fluoreszenz (AGE-Fl)

Die Analyse der Plasma AGE-FL erfolgte wie von Münch et al. 1997 beschrieben mittels kompetitivem ELISA und Fluoreszenzspektroskopie

Soluble-Vascular-Adhesion-Protein-1 (sVAP-1)

ELISA; Bender Med Systems Inc, Wien, Österreich

Advanced Oxidation Protein Products (AOPPs)

Spektrofotometrischer Assay (Witko-Sarsat et al. 1998)

Carboxymethyllysin (CML)

ELISA; Microcoat, Bernried, Deutschland

Soluble Receptor-of-Advanced-Glycation-Endproducts (sRAGE)

ELISA; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota

HbA1c

Hochdruck-Flüssigkeitschromatograph (ADAM, A1cHA-8180 FAST; Axonlab, Baden, Schweiz

2.3.3 Sonstige Bestimmungen

Die Handkraft der Probanden wurde mit Hilfe eines hydraulischen Handkraftmessers (Fabrication Enterprises Inc., White Plains, New York) ermittelt.

Zur Bestimmung des Body Maß Index (BMI) wurden aktuelles Körpergewicht und Größe am Untersuchungstag aktuell gemessen.

Anamnestische Daten bzgl. Vorliegen der Ein- und Ausschlussfaktoren, sowie zu Rauchergewohnheiten und Lebensalter wurden den elektronischen Patientenakten in der Praxis Dr. W. Stürmer und im KfH Würzburg entnommen.

2.4 Statistik

Die verschiedenen Daten und Laborparameter wurden zunächst in einer Excel-Tabelle gesammelt und anschließend zur statistischen Analyse in SPSS der Version 16 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) importiert.

Unterstützend bei der statistischen Analyse wirkte Frau Dr. med. Katarína Sebeková (Comenius Universität, Medizinische Fakultät, Bratislava, Slowakei) mit.

Bei der Erfassung von Häufigkeiten wurden deskriptive Verfahren, wie Mittelwert und Median verwendet.

Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mittels zweiseitigem T-Test untersucht. Bei drei Gruppen erfolgte eine Varianzanalyse (ANOVA) mittels Scheffe-Post-Hoc-Test.

Zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich von Häufigkeiten wurde der χ^2 -Test verwendet. Pearson-Korrelationskoeffizienten wurden berechnet. Der p-Wert für statistische Signifikanz war mit 0,05 festgelegt. Multivariante Analysen wurden mittels generalisiertem linearem Modell (GLM) durchgeführt.

Zusätzlich wurde eine Diskriminanzanalyse durchgeführt (OPLS-DA, Simca Version 13, Umetrics, Umea, Schweden), um die unabhängigen Variablen zu identifizieren, die zur Aufteilung in Probanden mit normwertigen und solchen mit erniedrigten Vitamin D-Spiegeln beitragen.

3 Ergebnisse

3.1 Demographische und laborchemische Ergebnisse (Gesunde und Hypertoniker)

	Alle	Untergruppe zur Bestimmung von sVAP-1, CML und sRAGE	Übrige	p
n	146	61	85	
M/F (n; %)	73/73 (50%/50%)	30/31 (49%/51%)	43/42 (51%/49%)	0.87 ^{chl}
Alter (Jahre)	57.0 ± 15.5	57.9 ± 15.0	56.3 ± 15.7	0.53
BMI (kg/m ²)	27.0 ± 3.6	26.7 ± 3.9	27.2 ± 3.3	0.49
eGFR (ml/min/1.73m ²)	85 ± 16	85 ± 17	85 ± 15	0.96
HbA _{1c} (%)	5.4 ± 0.3	5.5 ± 0.4	5.4 ± 0.3	0.28
Vitamin D ₃ (ng/ml)	22.5 ± 8.9	22.1 ± 8.0	22.7 ± 9.6	0.71
SAF (AU)	2.3 ± 0.5	2.4 ± 0.6	2.3 ± 0.5	0.10
Fl-AGEs (AU)	285 ± 70	307 ± 81	268 ± 57	0.002
CML (ng/ml)	NA	1066 ± 374	NA	NA
sRAGE (pg/ml)	NA	999 ± 352	NA	NA
hsCRP (mg/l)	2.0 ± 2.2	2.0 ± 2.3	1.9 ± 2.1	0.81
sVAP-1 (ng/ml)	NA	399 ± 162	NA	NA
AOPPs (µmol/l)	175 ± 118	203 ± 170	155 ± 47	0.036
Arterielle Hypertonie (Nein/Ja; %)	106/40 (73%/27%)	42/19 (69%/31%)	64/21 (75%/25%)	0.65 ^{chl}

Raucher (Nein/Ja;%)	124/22 (85%/15%)	51/10 (84%/16%)	73/12 (86%/14%)	0.70 ^{chl}
Handkraft (Pfund)	84 ± 30	83 ± 28	85 ± 15	0.91

Tabelle 1: Demographische und laborchemische Ergebnisse Gesunde und Hypertoniker, NA = nicht ermittelt

Die 146 Patienten im ersten Studienarm waren im Alter zwischen 14 bis 96 Jahren. 73% waren frei von bekannten Erkrankungen, wohingegen 27% eine arterielle Hypertonie aufwiesen. 15% der Teilnehmer waren aktive Raucher. Die Geschlechterverteilung lag bei 73 Frauen zu 73 Männern. Die Probanden wiesen einen leicht erhöhten durchschnittlichen BMI von $27 \pm 3,6 \text{ kg/m}^2$ auf. Mit einer durchschnittlichen glomerulären Filtrationsrate von $85 \pm 16 \text{ ml/min/1,73m}^2$ zeigten die Teilnehmer eine normale bis allenfalls gering eingeschränkte Nierenfunktion. Der HbA1c-Wert betrug $5,4 \pm 0,3\%$ und lag wie in den Einschlusskriterien gefordert, bei jedem Probanden unter 6,1%. Die Untergruppe (n=61), in der zusätzliche Parameter bestimmt wurden, unterschied sich bis auf höhere Plasma AGE-FI ($p = 0,002$) und AOPPs ($p = 0,036$) nicht signifikant vom übrigen Probandenpool.

3.2 Ergebnisse zur Hautautofluoreszenz (SAF) und AGE assoziierter Fluoreszenz im Plasma (AGE-FI) (Gesunde und Hypertoniker)

In der Gesamtgruppe zeigte sich nur zwischen SAF und Alter ($r = 0,223$; $p = 0,037$) eine signifikante lineare Korrelation. SAF und eGFR zeigten keinen signifikanten Zusammenhang ($r = -0,151$; $p = 0,16$).

Multivariate Analysen mit Alter, Body-Mass-Index, eGFR, hsCRP, AGE-FI, AOPPs, Raucherstatus und arterielle Hypertonie als unabhängige Variablen ermittelten das Alter und Rauchen als SAF beeinflussende Faktoren (Korrigiertes Modell: $p=0,011$; Alter: $p < 0,001$; Rauchen: $p = 0,011$; $R^2: 27\%$).

Ein Gruppenvergleich zeigte keinen signifikanten Unterschied von SAF zwischen Rauchern und Nichtrauchern ($2,4 \pm 0,7$ vs. $2,3 \pm 0,5 \text{ AU}$; $p = 0,57$). Die untersuchten Raucher waren jedoch signifikant jünger als die Nichtraucher ($45,8 \pm 12,1$ vs. $58,9 \pm 15,1 \text{ Jahre}$; $p < 0,001$). Außerdem wiesen sie eine höhere eGFR (94 ± 16 vs. 83 ± 16

ml/min/1,73m²; $p < 0,02$) und niedrigere HbA1c-Werte ($5,3 \pm 0,3$ vs. $5,5 \pm 0,3$, $p < 0,012$) auf.

Wurden beide Gruppen (Raucher/Nichtraucher) separat untersucht konnte bis auf für das Alter keine signifikante Beziehung zur SAF ermittelt werden (Abbildung 3). Es zeigte sich auch kein signifikanter Zusammenhang zwischen AGE-assoziiierter Fluoreszenz (AGE-FI) im Plasma und Alter (Abbildung 4).

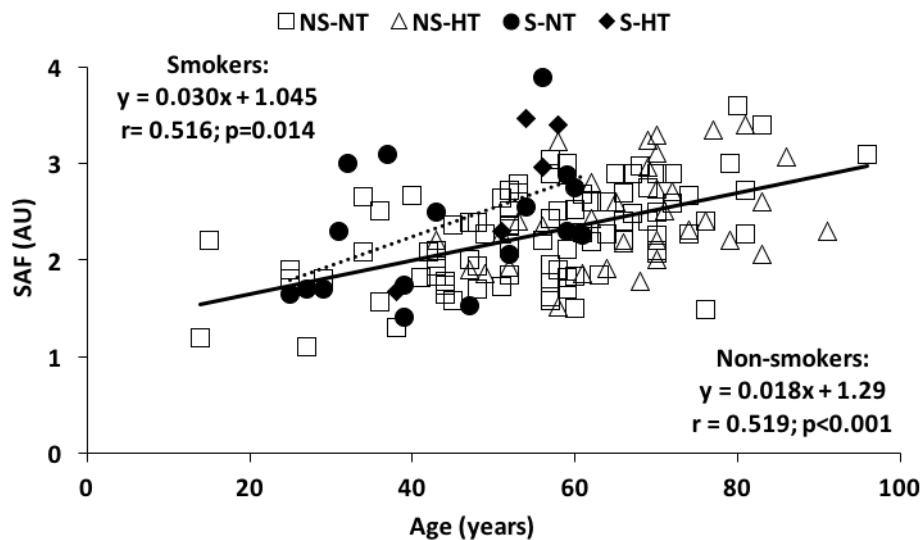


Abbildung 3: Korrelation zwischen Hautautofluoreszenz (SAF) und Alter (Jahre), (NS-NT = normotensive Nichtraucher, NS-HT = hypertensive Nichtraucher, S-NT = normotensive Raucher, S-HT = hypertensive Raucher), gestrichelte Linie = Regressionsgerade Raucher, durchgezogene Linie = Regressionsgerade Nichtraucher

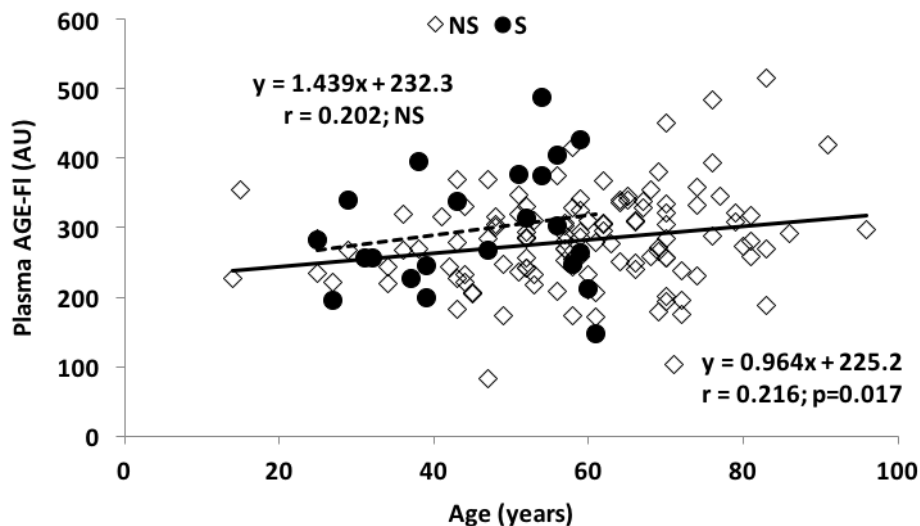


Abbildung 4: Korrelation zwischen Alter und Plasma-AGE assoziierter Fluoreszenz (AGE-FI), (NS = Nichtraucher, S = Raucher), gestrichelte Linie = Regressionsgerade Raucher, durchgezogene Linie = Regressionsgerade Nichtraucher

3.3 Ergebnisse - normotensive Probanden und hypertensive Patienten

	Normotensive gesunde Probanden	Hypertensive Patienten	p
n*	107	39	
M/F (n; %)	50/57 (47%/53%)	23/16 (59%/41%)	0.19 ^{chi}
Alter (Jahre)	54.0 ± 15.5	64.8 ± 12.2	<0.001
Vitamin D ₃ (ng/ml)	22.1 ± 8.4	21.8 ± 10.3	0.59
Skin AF (AU)	2.3 ± 0.5	2.5 ± 0.5	0.018
AGE-FI (AU)	273 ± 60	315 ± 86	0.007
CML (ng/ml)	1128 ± 403	929 ± 256	0.054
sRAGE (pg/ml)	1008 ± 341	980 ± 384	0.78
hs-CRP (mg/l)	1.8 ± 2.0	2.4 ± 2.7	0.15
sVAP-1 (ng/ml)	397 ± 184	402 ± 104	0.92

AOPPs (µmol/l)	175 ± 110	176 ± 140	0.51
Raucher (Nein/Ja; %)	90/17 (84%/16%)	34/5 (87%/13%)	0.65 ^{chi}
Handkraft (Pfund)	84 ± 31	82 ± 25	0.73

Tabelle 2: Ergebnisse bei gesunden normotensiven Probanden und hypertensiven Patienten

Hypertensive Patienten zeigten im Vergleich zu normotensiven gesunden Probanden höhere SAF und Plasma AGE-FI ($2,5 \pm 0,5$ vs. $2,3 \pm 0,5$; $p = 0,018$ bzw. 315 ± 86 vs. 273 ± 60 AU; $p = 0,007$), waren aber auch signifikant älter ($64,8 \pm 12,2$ Jahre vs. $54,0 \pm 15,5$ Jahre; $p < 0,001$) (Tabelle 2). Die übrigen ermittelten Variablen unterschieden sich in diesem Vergleich nicht signifikant voneinander.

Unter der Voraussetzung, dass ein Vitamin D-Spiegel < 20 ng/ml als schwerer Mangel, Werte von 20 bis 29 ng/ml als leichter Mangel und Werte > 30 ng/ml als normwertige Vitamin D-Spiegel betrachtet werden, zeigten sich im Gesamt-Kollektiv (gesunde normotensive Probanden und Hypertoniker) folgende Ergebnisse:

	Vit. D ₃ < 20 ng/ml	Vit. D ₃ : 20-29 ng/ml	Vit. D ₃ > 30 ng/ml	P (ANOVA)
n	63	54	29	--
M/F (n)	32/31	26/28	15/14	0.94 ^{chi}
Alter (Jahre)	57.1 ± 16.5	54.2 ± 13.9	59.9 ± 15.1	0.44
Vitamin D ₃ (ng/ml)	14.6 ± 4.0	24.5 ± 2.6*	35.9 ± 4.9* ⁺	<0.001
Skin AF (AU)	2.4 ± 0.6	2.3 ± 0.5	2.3 ± 0.5	0.55
AGE-FI (AU)	286 ± 87	281 ± 59	283 ± 49	0.86
CML (ng/l)	1046 ± 369	1083 ± 315	976 ± 384	0.58
sRAGE (pg/ml)	1023 ± 379	942 ± 329	1022 ± 387	0.99
hs-CRP (mg/l)	2.2 ± 2.5	2.0 ± 2.2	1.6 ± 1.3	0.92
sVAP-1 (ng/ml)	417 ± 138	386 ± 169	410 ± 201	0.91
AOPPs(µmol/l)	189 ± 132	146 ± 76	200 ± 145	0.68
Hypertonie (Nein/Ja)	44/19	42/12	21/8	0.62 ^{chi}

Current smokers (Nein/Ja)	53/10	46/8	25/4	0.97 ^{chi}
Handkraft (Pfund)	82±30	87±31	80±25	0,75

Tabelle 3: Demographische und laborchemische Daten in Abhängigkeit vom Vitamin D-Status

Die mittlere Vitamin D₃-Konzentration lag in der Gesamtgruppe bei $22,5 \pm 8,9$ ng/ml (Tabelle 1). Männer und Frauen zeigten keinen signifikanten Unterschied ($22,6 \pm 9,1$ ng/ml vs. $22,3 \pm 8,8$ ng/ml; $p = 0,84$). 43% aller Teilnehmer wiesen einen Vitamin D₃-Mangel (Konzentrationen < 20 ng/ml) und 37% ein Vitamin D₃-Defizit (Konzentration 20-29 ng/ml) auf. Nur bei 20% fand sich ein regelrechter Vitamin D₃-Status (Konzentration > 30 ng/ml). Bei einer solchen Unterteilung ergaben sich für keinen der verschiedenen dargestellten Parameter signifikante Unterschiede (Tabelle 3).

In der Gesamtgruppe (Gesunde und Hypertoniker) zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen Vitamin D₃ und SAF (Abbildung 5). Auch hinsichtlich der übrigen Variablen konnte dies nicht beobachtet werden. Auch multivariante Analyseverfahren konnten keinen unabhängigen, signifikanten Kontributor ermitteln.

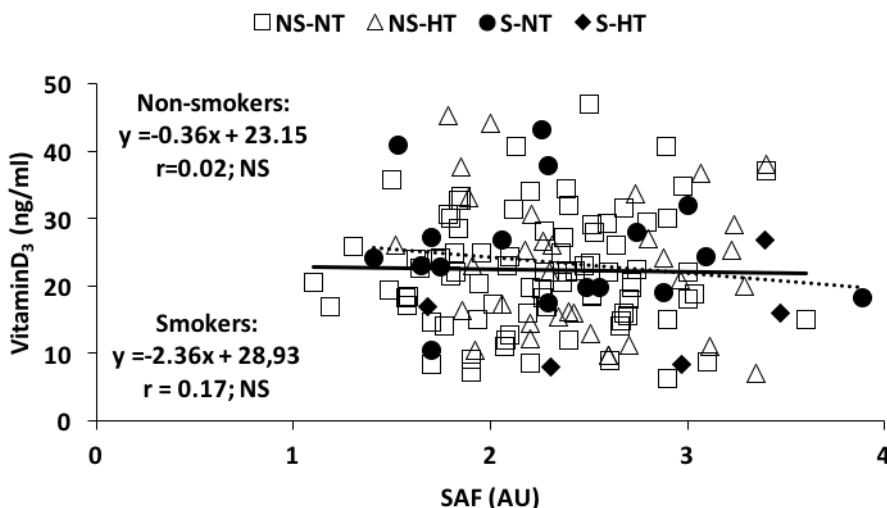


Abbildung 5: Beziehung zwischen Haut-Autofluoreszenz (SAF) und Plasma Vitamin D Konzentration in der Gesamtgruppe (NS-NT = normotensiver Nichtraucher, NS-HT = hypertensiver Nichtraucher, S-NT = normotensiver Raucher, S-HT = hypertensiver Raucher), gestrichelte Linie = Regressionsgerade Raucher, durchgezogene Linie = Regressionsgerade Nichtraucher

Die durchschnittlich gemessene Vitamin D-Konzentration unterschied sich bei Rauchern und Nichtrauchern nicht ($23,3 \pm 9,4$ vs. $22,3 \pm 8,9$ ng/ml, $p = 0,66$). Bei Rauchern konnte jedoch eine statistisch signifikante inverse Beziehung zwischen Vitamin D₃ Konzentration und AGE-FI im Plasma beobachtet werden ($r = -0,551$; $p = 0,008$) (Abbildung 6). Auch bei sVAP-1 und AGE-FI im Plasma ($r = 0,633$; $p = 0,049$) (Abbildung 7a) und bei sVAP-1 und Vitamin D₃ ($r = -0,696$; $p = 0,026$) (Abbildung 7b) zeigte sich eine solche Beziehung.

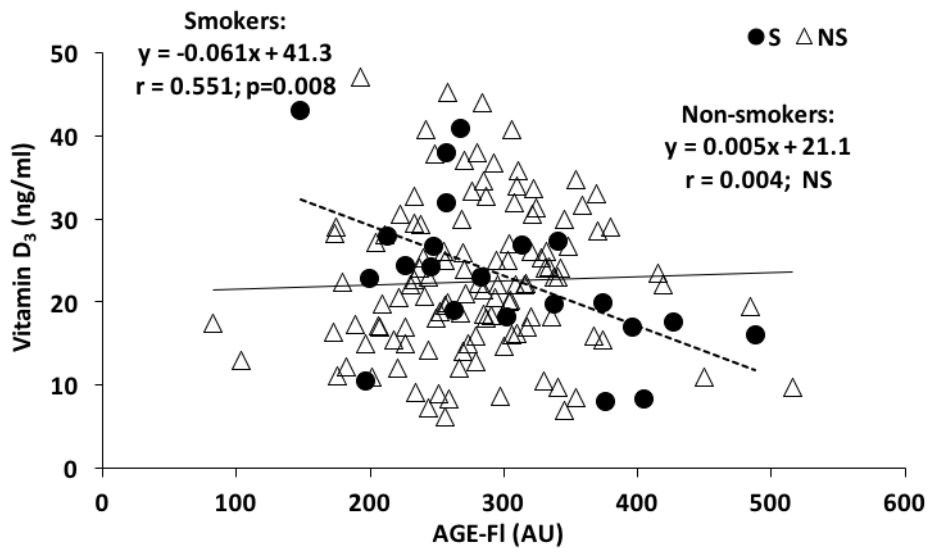


Abbildung 6: Beziehung zwischen Plasma AGE assoziierter Fluoreszenz (AGE-FI) und Vitamin D-Konzentration (S = Raucher, NS = Nichtraucher), gestrichelte Linie = Regressionsgerade Raucher, durchgezogene Linie = Regressionsgerade Nichtraucher

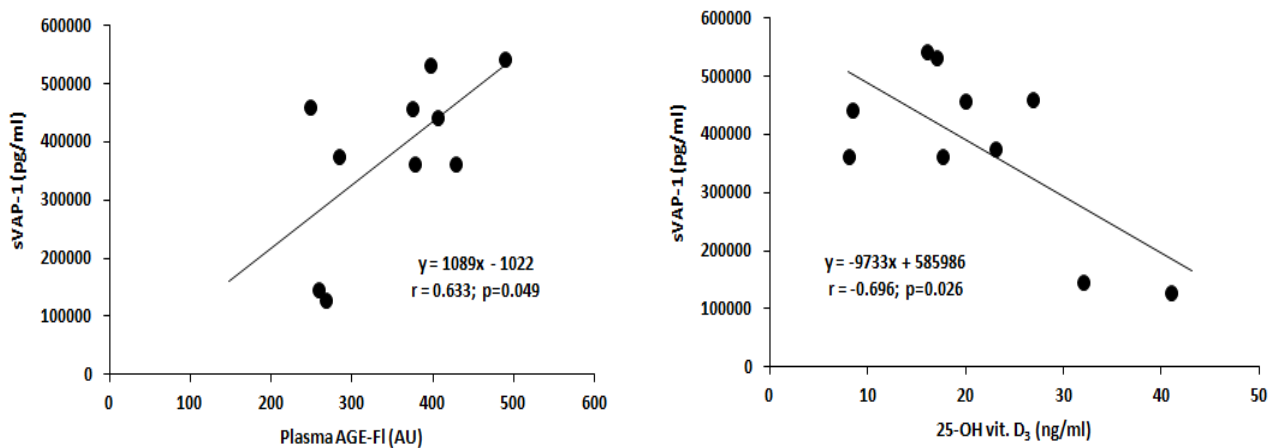


Abbildung 7: (a) Korrelation zwischen Plasma AGE assoziierter Fluoreszenz (AGE-FI) und Konzentration von soluble vascular adhesion protein-1 (sVAP-1) und (b) inverse Korrelation zwischen Vitamin D₃ und sVAP-1 bei Rauchern mit Regressionsgeraden

3.4 Ergebnisse - Diabetiker und nicht diabetische Kontrollen

Es wurden insgesamt im zweiten Studienarm 276 Diabetiker (Alter 16 - 94 Jahre, 43 Typ 1 Diabetiker und 233 Typ 2-Diabetiker) mit 121 nichtdiabetischen Kontrollen verglichen. In der Gesamtgruppe der Diabetiker (Typ 1 und Typ 2) ergab sich ein Geschlechtsverhältnis von 160 zu 116 (m/w 58% / 42%) mit leichten Überwiegen der Männer. Das Durchschnittsalter der Diabetiker betrug aufgrund des hohen Anteils von Typ 2 Diabetiker $65,0 \pm 13,4$ Jahre. Im Durchschnitt waren sie $15,1 \pm 10,7$ Jahre an Diabetes mellitus erkrankt. Die Therapie der Erkrankung erfolgte nach leitliniengerechten Therapieschemata mittels oralen Antidiabetika oder Insulin. Der durchschnittliche HbA1c-Wert lag bei $7,1 \pm 1,1$ %. Somit wiesen die Patienten insgesamt eine relativ gute Blutzuckereinstellung auf. Die Untergruppe, in der zusätzliche Parameter (sVAP-1, CML und sRAGE) bestimmt wurden, unterschied sich bis auf höhere Plasma AGE-FI ($p = 0,002$) und AOPPs ($p = 0,036$) nicht signifikant vom übrigen Probandenpool.

Die Kohorten-Charakteristika sind in Tabelle 4 dargestellt. Das Verhältnis zwischen Männern und Frauen, CML und sRAGE zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Diabetiker waren signifikant älter ($p < 0,001$) und zeigten einen höheren BMI ($p < 0,001$), HbA1c ($p < 0,001$), SAF ($p < 0,001$), hsCRP ($p = 0,001$), AGE assoziierte Fluoreszenz ($p < 0,001$) und sVAP-1 ($p = 0,049$). Zudem wiesen sie häufiger Komorbiditäten, eine niedrigere glomeruläre Filtration ($p < 0,001$) und niedrigere Werte für Handkraft ($p = 0,026$) im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Um mögliche unabhängige Effekte des Alters und Diabetes festzustellen, wurden für die statistische Analyse generalisierte lineare Modelle (GLM) genutzt. Die ausgewählten Variablen beeinflussten die CML-Werte jedoch nicht signifikant (Tabelle 5).

	Nicht diabetische Kontrollen	Diabetiker gesamt	p	DM1	DM2	p
N (%)	121	276		43 (16%)	233 (84%)	
Männer/Frauen (n; %)	60/61 (50%/50%)	160/116 (58%/42%)	0.12 ^{chi}	23/20 (53%/47%)	137/96 (59%/41%)	0.52 ^{chi}
Alter (Jahre)	58.6 ± 15.1	65.0 ± 13.4	<0.001	48.6 ± 1.8	68.0 ± 9.6	<0.001
Diabetesdauer (Jahre)	--	15.1 ± 10.7	--	19.5 ± 13.2	15.0 ± 10.1	0.10
BMI (kg/m ²)	27.2 ± 3.3	30.5 ± 6.1	<0.001	25.4 ± 3.7	31.4 ± 6.0	<0.001
Gesamtprotein (g/l)	72 ± 7	72 ± 7	0.71	71 ± 5	72 ± 7	0.24
eGFR (ml/min/1.73m ²)	84 ± 16	71 ± 25	<0.001	83 ± 26	69 ± 24	<0.001
HbA _{1c} (%)	5.5 ± 0.3	7.1 ± 1.1	<0.001	7.1 ± 1.1	7.1 ± 1.1	0.98
FI-AGEs (AU)	281 ± 67	341 ± 112	<0.001	289 ± 104	350 ± 111	<0.001
SAF (AU)	2.3 ± 0.5	2.8 ± 0.7	<0.001	2.5 ± 0.7	2.9 ± 0.7	<0.001
CML (ng/ml)	1045 ± 368	1023 ± 393	0.71	1125 ± 940	1008 ± 385	0.12
sRAGE (pg/ml)	989 ± 376	936 ± 497	0.23	1133 ± 638	922 ± 474	0.30
sVAP-1 (ng/ml)	409 ± 166	462 ± 172	0.049	415 ± 138	469 ± 176	0.16
hsCRP (mg/l)	2.0 ± 2.0	2.7 ± 2.4	0.001	1.9 ± 1.9	2.9 ± 2.4	0.004
Handkraft (Pfund)	84 ± 31	75 ± 25	0.026	85 ± 32	74 ± 23	0.09
*Albumin im Urin (mg/l)	< 10	127 ± 318	NA	131 ± 306	126 ± 321	0.97
**Arterielle Hypertonie (Nein/Ja; %)	88/33 (73%/27%)	96/167 (37%/63%)	<0.001^{chi}	23/13 (53%/47%)	73/154 (32%/68%)	<0.001^{chi}
**pAVK (Nein/Ja; %)	119/2 (98%/2%)	220/44 (83%/17%)	<0.001^{chi}	34/2 (94%/6%)	186/42 (82%/18%)	0.054 ^{chi}
**KHK (Nein/Ja; %)	117/4 (97%/3%)	213/51 (81%/19%)	<0.001^{chi}	33/3 (92%/8%)	180/48 (79%/21%)	0.07 ^{chi}
**Gesamt- komorbiditäten (Nein/Ja; %)	87/34 (72%/28%)	74/190 (28%/72%)	<0.001^{chi}	22/114 (61%/39%)	52/176 (23%/77%)	<0.001^{chi}

Tabelle 4: Demographische und laborchemische Ergebnisse bei nicht-diabetischen Kontrollen im Vergleich zu Diabetikern

	<i>25(OH)D</i>	<i>HbA_{1c}</i>	<i>AGE-FI</i>	<i>CML</i>	<i>SAF</i>	<i>sVAP-1</i>	<i>sRAGE</i>	<i>hsCRP</i>	<i>Grips</i>
Corr. m.	0.84	0.001	0.001	0.93	0.001	0.045	0.019	0.001	0.001
Intercept	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.011	0.001
<i>Alter</i>	0.83	0.06	0.001	0.90	0.001	0.23	0.006	0.002	0.001
DM st.	0.62	0.001	0.001	0.69	0.001	0.10	0.20	0.007	0.94
R ²	-0.01	0.35	0.15	-0.01	0.31	0.01	0.03	0.05	0.17

Tabelle 5: Multiple Regression, Effekt von Alter und Anwesenheit/Abwesenheit von Diabetes mellitus auf die unabhängigen Variablen

3.5 Einfluss des Diabetestyps

Die in dieser Studie untersuchten Typ 1-Diabetiker waren wie der Pathogenese nach zu erwarten jünger ($p < 0,001$) als die Typ 2-Diabetiker (Tab. 4). Der HbA1c war jedoch in beiden Gruppen gleich ($p = 0,98$) und die Diabetesdauer ebenfalls vergleichbar lang ($p = 0,10$). Typ 1 und 2-Diabetiker wiesen keine signifikanten Unterschiede bzgl. CML, sRAGE und Höhe der sVAP-1- Werte auf. Auch in der Handkraft unterschieden sich beide Gruppen nicht. Im Gegensatz zum Typ 2-Diabetes wiesen Typ 1-Diabetiker niedrigere Werte des BMI, AGE-spezifischer Fluoreszenz im Plasma, SAF ($p < 0,001$) und hsCRP ($p = 0,004$) auf. Die GFR ($p < 0,001$) war im Gegensatz hierzu höher in der Gruppe der Typ 1-Diabetiker. Der potentielle Einfluss des Diabetestyps, des Probandenalter und der Erkrankungsdauer auf die erhobenen Parameter wurden mittels Nutzung des generalisierten linearen Modells abgeschätzt. In keinem Setting wurde der Diabetestyp als signifikanter unabhängiger Kontributor ermittelt (Tab. 6). Die Diabetesdauer beeinflusste hingegen signifikant und unabhängig die GFR, AGE-FI, SAF, sVAP-1 und Handkraft. Höheres Lebensalter perse ging signifikant mit einer Reduktion der GFR und einem Anstieg von AGE-FI und SAF einher.

	<i>25(OH)D</i>	eGFR	<i>AGE-FI</i>	<i>CML</i>	<i>SAF</i>	<i>sVAP-1</i>	<i>sRAGE</i>	<i>hsCRP</i>	<i>Handkra</i>
Corr. M.	0.75	0.001	0.001	0.049	0.001	0.002	0.004	0.016	0.001
Intercept	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.44	0.001
<i>Diabetesdauer.</i>	0.92	0.001	0.001	0.42	0.003	0.027	0.008	0.89	0.001
<i>Alter</i>	0.28	0.001	0.001	0.09	0.001	0.09	0.29	0.28	0.08

Diabetestyp	0.52	0.84	0.24	0.60	0.71	0.28	0.38	0.07	0.47
R ²	-0.01	0.27	0.20	0.03	0.24	0.06	0.05	0.03	0.17

Tabelle 6: Multiple Regression, Effekt von Alter und Diabetesdauer auf die unabhängigen Variablen

3.6 Einfluss des Vitamin D-Status (Diabetiker und Nicht-Diabetiker)

Die Vitamin D-Werte lagen in allen Vergleichsgruppen (Kontrollen, Typ 1- und Typ 2-Diabetiker) durchschnittlich an der unteren Grenze zum Vitamin D-Mangel (20ng/ml) und unterschieden sich in den verschiedenen Gruppen kaum (Abb. 8). Das Alter, der Diabetestyp und die Diabetesdauer zeigten keinen signifikanten Einfluss hierauf (Tab. 5 und 6).

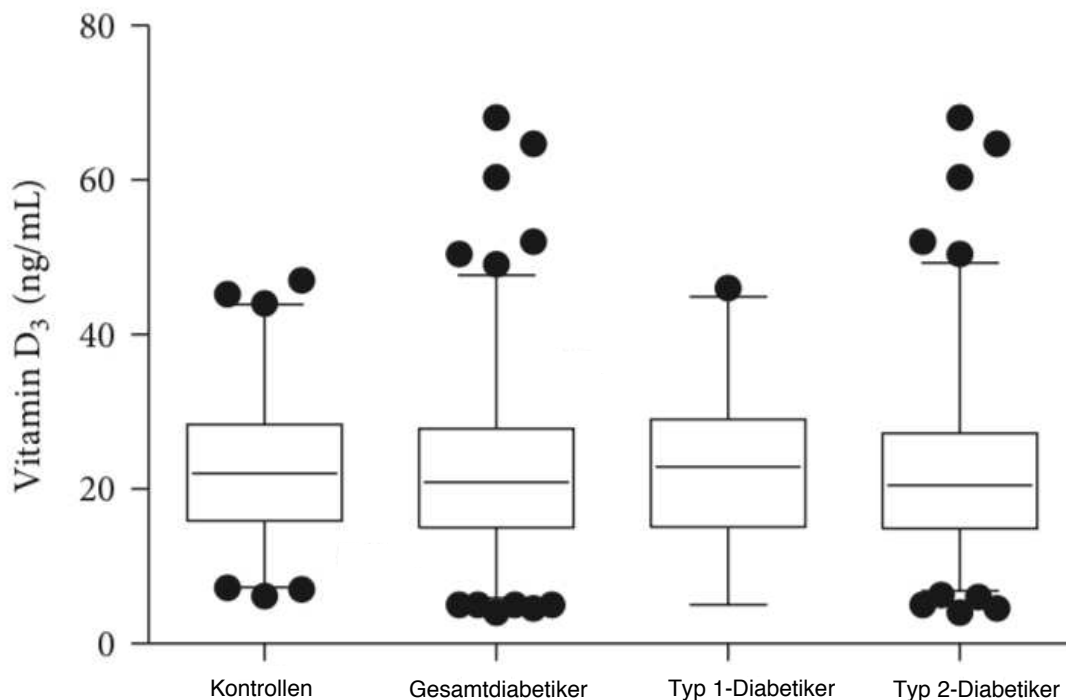


Abbildung 8: Vitamin D-Konzentration bei Kontrollen, Gesamtdiabetiker, Typ1- und Typ2-Diabetiker (Median, Interquartilsabstand, 95% Konfidenzintervall, Punkte repräsentieren Ausreißer)

In der Kontrollgruppe konnte kein Einfluss des Vitamin D-Spiegels auf die getesteten Variablen nachgewiesen werden (Tabelle 7). In der Gesamtgruppe der Diabetiker zeigten das HbA1c, CML und sVAP-1 eine negative und die Handkraft eine positive Korrelation mit Vitamin D. Vergleichbar mit unseren Beobachtungen im Gesamtkollektiv der Diabetiker ließen sich signifikante Zusammenhänge von Vitamin

D mit HbA_{1c}, CML, sVAP-1 und Handkraft bei den Typ 2-Diabetikern nachweisen, wohingegen bei den Typ 1-Diabetikern sich nur eine signifikante Korrelation mit CML und Handkraft zeigte (Tabelle 7).

	Kontrollen		Diabetiker		DM1		DM2	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Ln Alter	0.107	0.24	-0.065	0.28	-0.097	0.54	-0.077	0.24
Ln Diabetesdauer	NA	NA	NA	NA	0.201	0.20	-0.057	0.39
BMI	0.049	0.65	-0.073	0.23	0.085	0.59	-0.105	0.11
eGFR	0.082	0.50	0.051	0.42	0.028	0.87	0.066	0.34
Ln HbA _{1c}	0.060	0.62	-0.122	0.043	-0.025	0.087	-0.135	0.039
Ln FI-AGEs	0.072	0.44	0.099	0.10	0.087	0.58	0.104	0.12
Ln CML	-0.185	0.20	-0.197	0.006	-0.444	0.026	-0.177	0.020
Ln sRAGE	-0.062	0.67	-0.027	0.71	-0.319	0.12	-0.007	0.92
sVAP-1	0.040	0.79	-0.199	0.005	0.263	0.20	-0.184	0.016
Ln hsCRP	0.004	0.97	-0.019	0.76	0.150	0.35	-0.059	0.39
Ln Handkraft	0.112	0.30	0.196	0.002	0.506	0.003	0.141	0.037
*Ln Albumin im Urin	NA	NA	-0.136	0.13	-0.560	0.07	-0.086	0.37

Tabelle 7: Pearson Korrelation unabhängiger Variablen mit Vitamin D

Zwischen Vitamin D und SAF konnte weder in der Gruppe der Typ 1- und Typ 2-Diabetiker (Abb. 9) noch bei den Kontrollen (Abb. 10) ein Zusammenhang nachgewiesen werden.

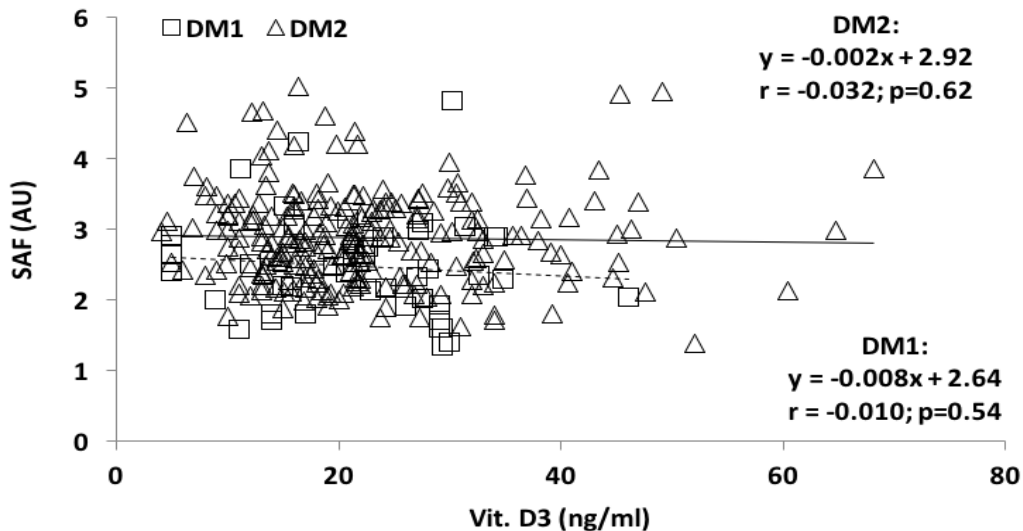


Abbildung 9: Verhalten von Vitamin D und SAF (Haut-Autofluoreszenz) bei Typ 1- und 2-Diabetikern, durchgezogene Linie = Regressionsgerade Typ 2-Diabetiker, durchgezogene Linie = Regressionsgerade Typ 1-Diabetiker

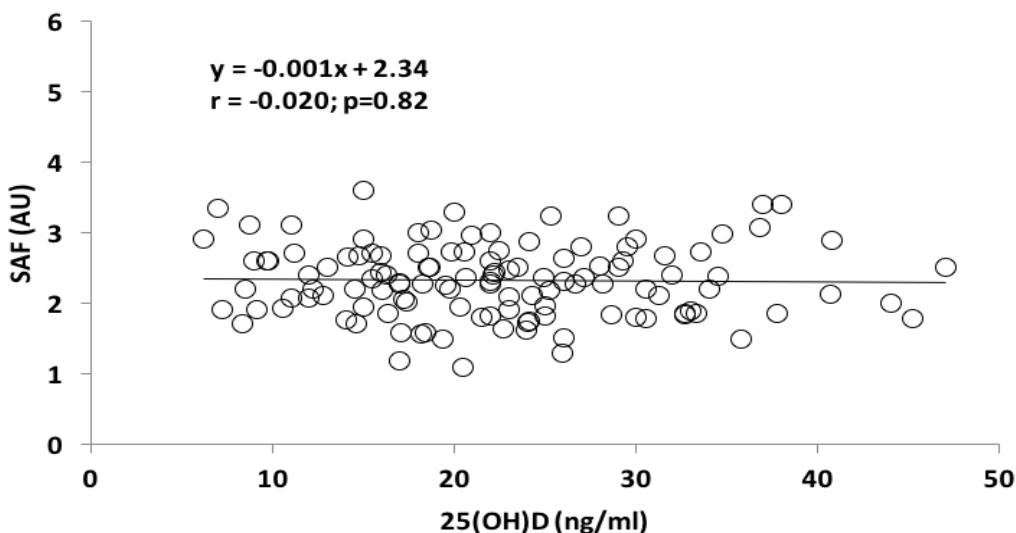


Abbildung 10: Verhalten von Vitamin D und SAF (Haut-Autofluoreszenz) bei Kontrollen mit Regressionsgerade

Die Häufigkeit eines absoluten (47% vs. 44%) und relativen Vitamin D-Mangels (32 vs. 35%) sowie das Vorliegen optimaler Spiegel (21% vs. 21%) war in beiden Gruppen (Diabetiker/Kontrollen) nahezu gleich verteilt ($p_{\text{chi}} = 0,76$).

Mit Hilfe eines multivariaten Analyseverfahrens (OPLS-DA Modell) versuchten wir für die beiden Gruppen (Diabetiker und Nicht- Diabetiker) getrennt herauszufiltern, welche Variablen zur Unterteilung der Probanden mit Vitamin D-Mangel und solchen mit suffizienten Vitamin D-Spiegeln beitragen.

Innerhalb der Kontrollgruppe konnte damit eine zufriedenstellende Trennschärfe für verschiedene Parameter erreicht werden (Abb. 11). Das errechnete Modell beschrieb 76% der Variabilität (r^2) mit einer akzeptablen Prädiktivität ($q^2 = 0,65$).

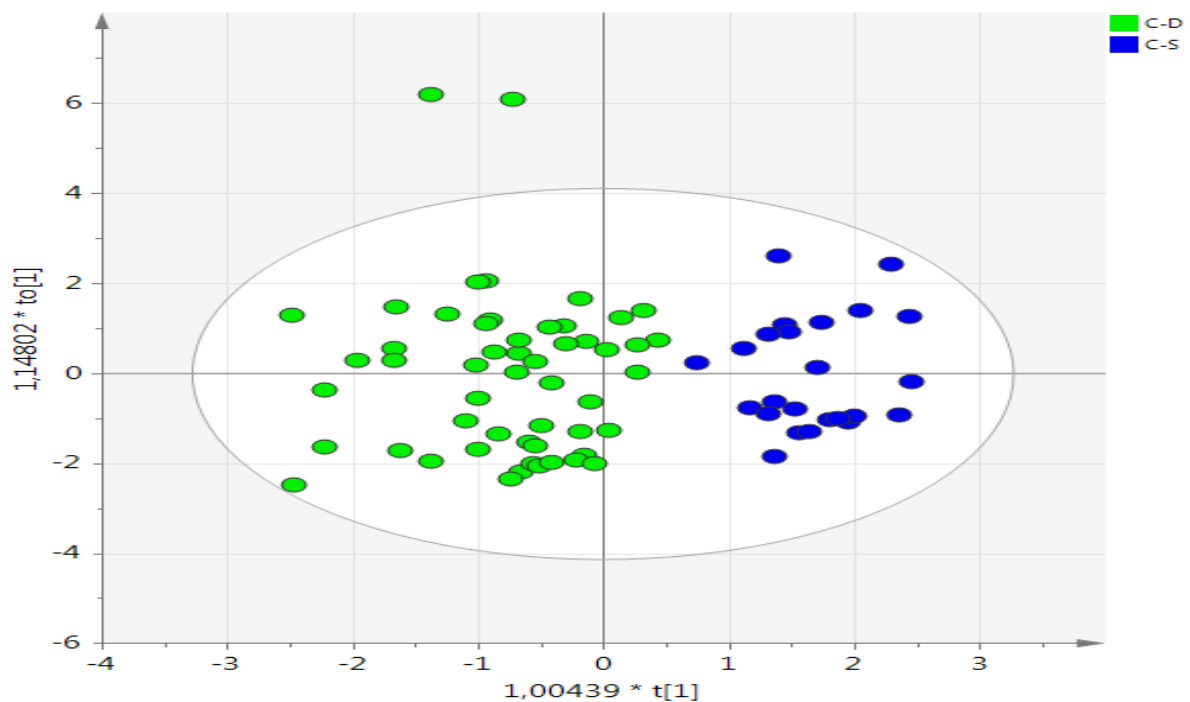


Abbildung 11: Score Scatter Plot von Kontrollen mit insuffizienten vs. suffizienten Vitamin D-Spiegeln im OPLS-DA-Modell, (grün = VitD-insuff. Kontrollen, blau = VitD-suff. Kontrollen)

Der loading-scatter-plot (Abb. 12) und VIP-plot (Variables important for Projection, Abb. 13) suggerieren, dass Kontrollen mit Mangel an Vitamin D niedrigere Werte für Gesamtprotein (VIP = 2,1) und sVAP (VIP = 1,1) und höhere Werte für CML (VIP = 1,0) aufweisen. AGE-FI, sRAGE (vermindert bei Probanden mit Vitamin D-Mangel) und BMI (erhöht bei Vitamin D-Mangel, VIP zwischen 0,7 und 0,5) scheinen Variablen zu sein, die zur Unterscheidung beider Gruppen beitragen. Außerdem scheint das weibliche Geschlecht in der Gruppe mit Vitamin D-Mangel stärker vertreten zu sein. Alle Variablen rechts des BMI im VIP-plot aufgelistet (VIP < 0,5, Abb. 13) und sich in der Nähe des Kreuzungsbereichs der x-, y- und 0-y-Achse des loading-scatter-plots (Abb. 12) befindend, weisen in diesem Modell keine hohe Trennschärfe auf.

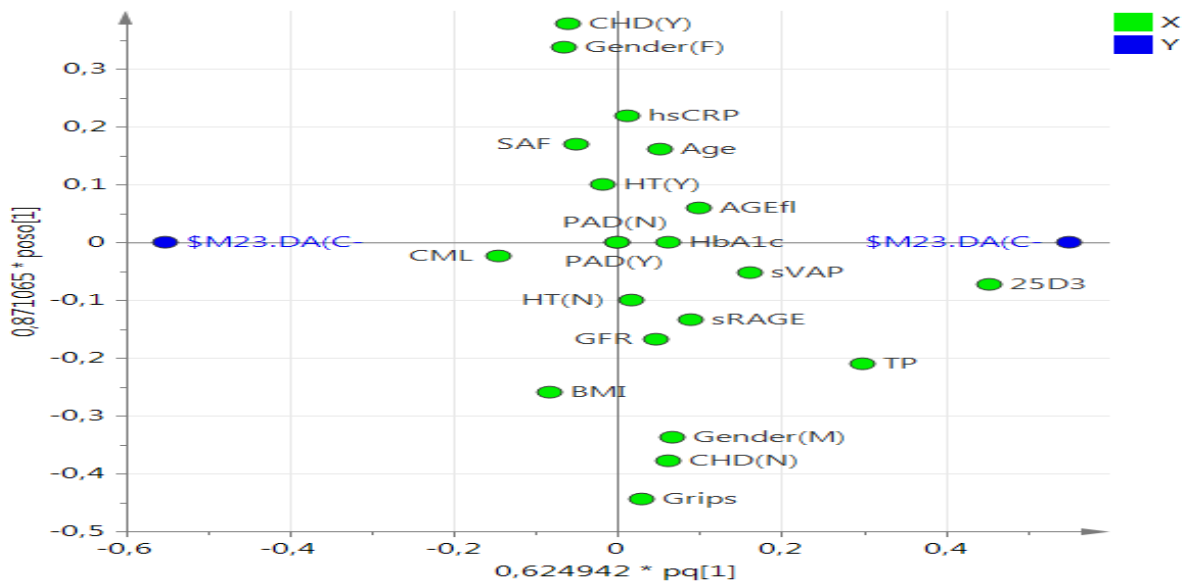


Abbildung 12: Loading Scatter Plot von Kontrollen mit insuffizienten vs. suffizienten Vitamin D-Spiegeln, insuffiziente Probanden sind links, suffiziente Probanden rechts aufgeführt.

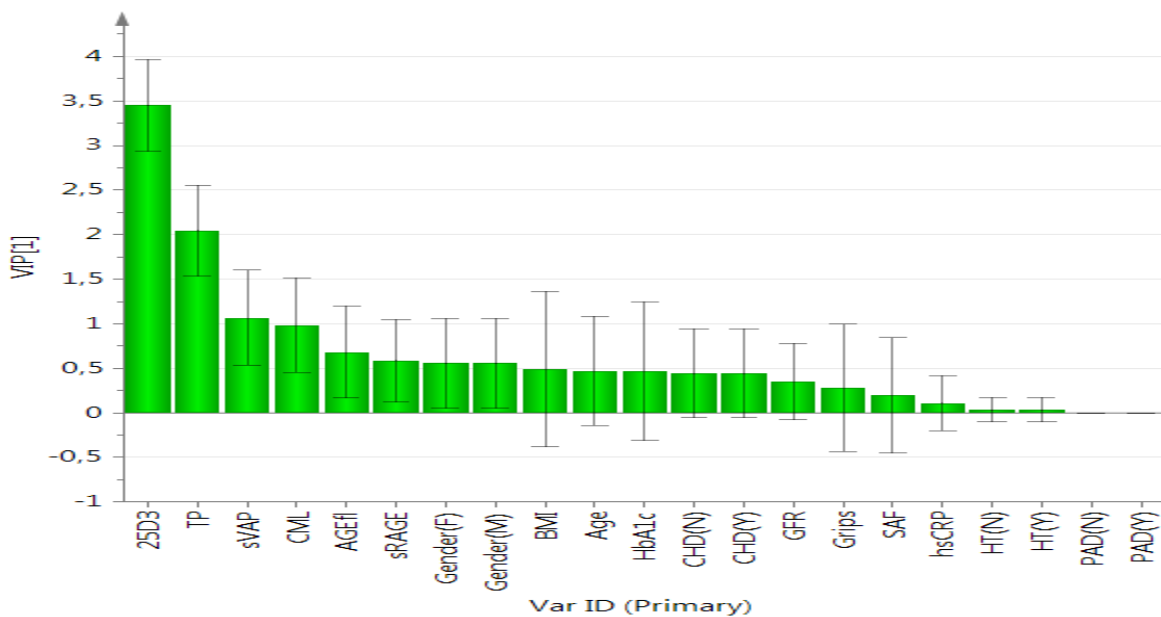


Abbildung 13: VIP Plot von Kontrollen

Mit Ausnahme für Vitamin D-Werte zeigt der T-test jedoch für keine der erhobenen Variablen eine statistische Signifikanz (Tab. 8).

Auch in der Diabetesgruppe konnte mit $r^2 = 0,71$ und $q^2 = 0,64$ eine zufriedenstellende Trennung zwischen Probanden mit Vitamin D-Mangel und solchen mit suffizienten Werten gezeigt werden (Abb. 14). Loading-scatter-plot (Abb. 15) und VIP-plot (Abb. 16) lassen vermuten, dass Diabetiker mit Vitamin D-Mangel höhere Werte für CML, Gesamtprotein und eine verminderte Handkraft aufweisen (VIP=1,0). Die Werte von

sVAP-1 (VIP = 0,9) und AGE-FI (VIP = 0,7) repräsentieren Variablen, die potentiell zur Unterscheidung beitragen. Diabetiker mit einem Mangel an 25(OH)D sind eher weiblich und seltener an einer KHK erkrankt im Vergleich zu denen mit suffizienten Spiegeln. HbA1c, BMI, GFR, sRAGE, Alter, arterielle Hypertonie und pAVK zeigten keine hohe Trennschärfe (Abb. 15 und 16).

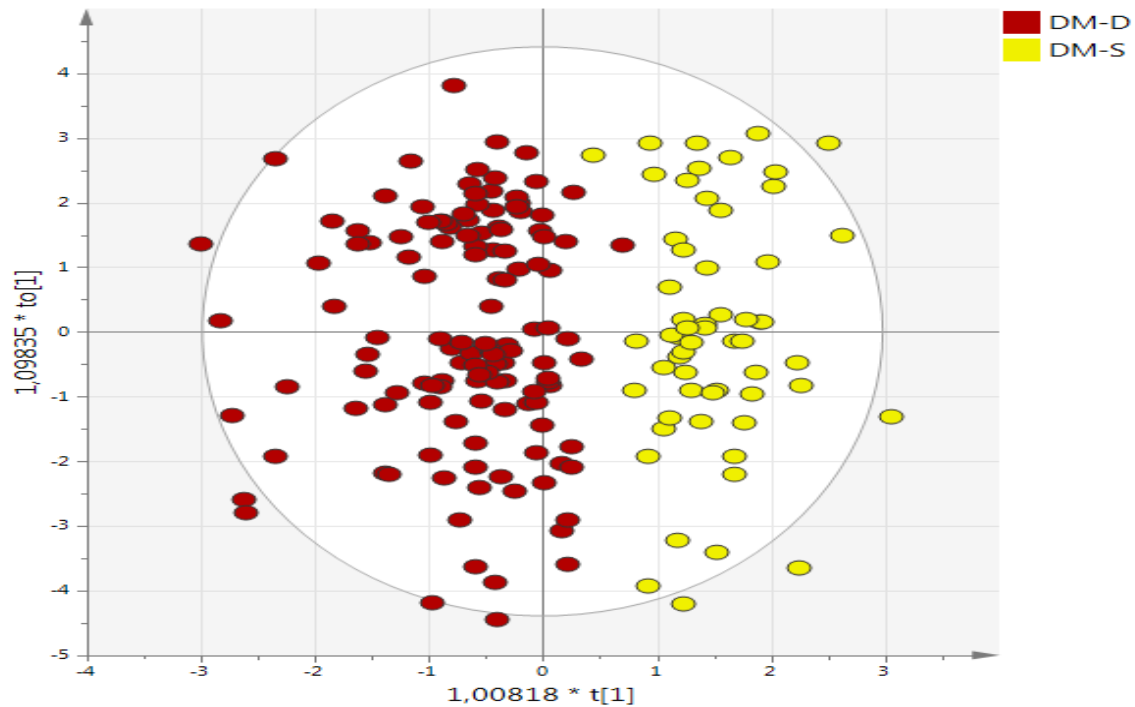


Abbildung 14: Score Scatter Plot von Diabetikern mit Vitamin D –Mangel (ROT) und mit suffizienten Spiegeln (GELB)

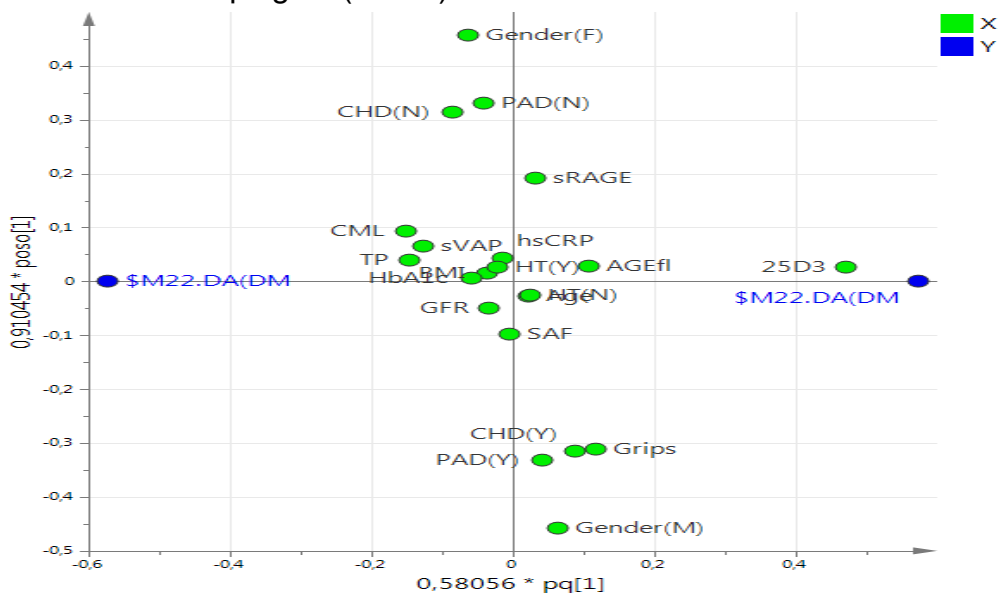


Abbildung 15: Loading Scatter Plot von Diabetikern mit Vitamin D –Mangel und mit suffizienten Spiegeln

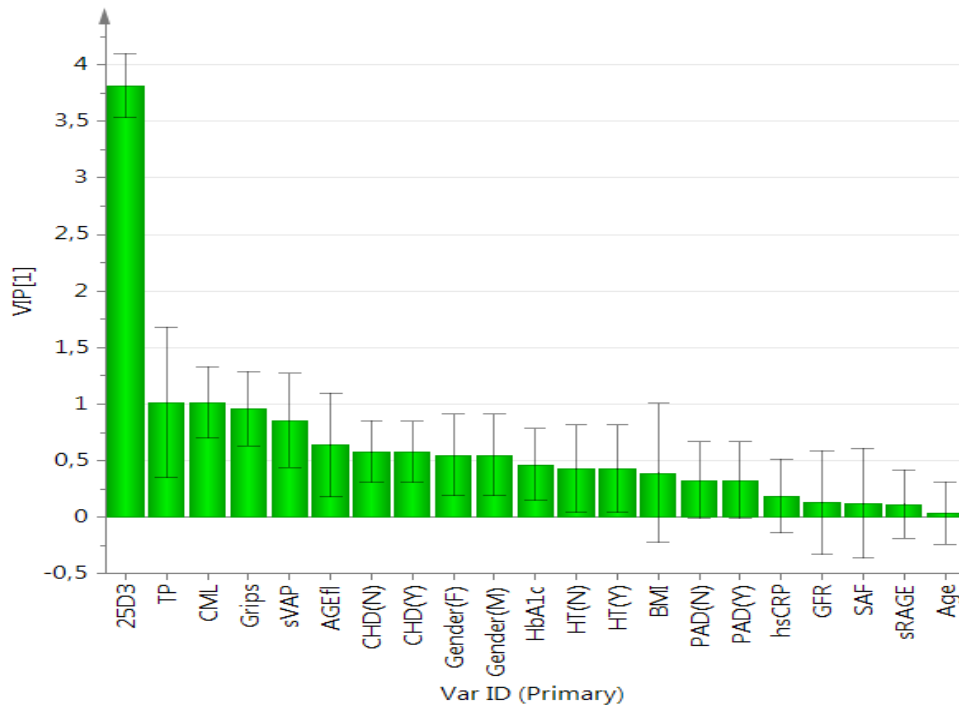


Abbildung 16: VIP Plot von Diabetikern

Gruppenvergleiche mittels T-Test bestätigten die in den multivariaten Analysen angedeuteten Ergebnisse, erreichen jedoch nur für erhöhtes Gesamtprotein, erniedrigte AGE-FL und Handkraft statistische Signifikanz.

Diabetiker mit Vitamin D-Mangel weisen höherer Werte für CML, sVAP-1, Gesamtprotein und niedrigere Werte für AGE-FI und Handkraft sowie eine niedrigere Prävalenz für KHK auf (Tab. 8). Einen signifikanten Einfluss des Vitamin D-Spiegels auf die Inflammation und SAF konnte weder in der Kontrollgruppe noch bei den Diabetikern ermittelt werden (Abb. 17 und 18). Jedoch zeigte sich eine inverse Korrelation für $\ln(sVAP-1 / SAF)$ bei den Diabetikern ($y = -0,006x - 0,006$, $r = 0,148$, $p = 0,040$); vor allem auf Seiten der Typ-2 Diabetiker. (Abb. 15). Bei den Typ 1-Diabetikern und in der Kontrollgruppe wurde kein Signifikanzniveau erreicht (Abb. 19 und 20).

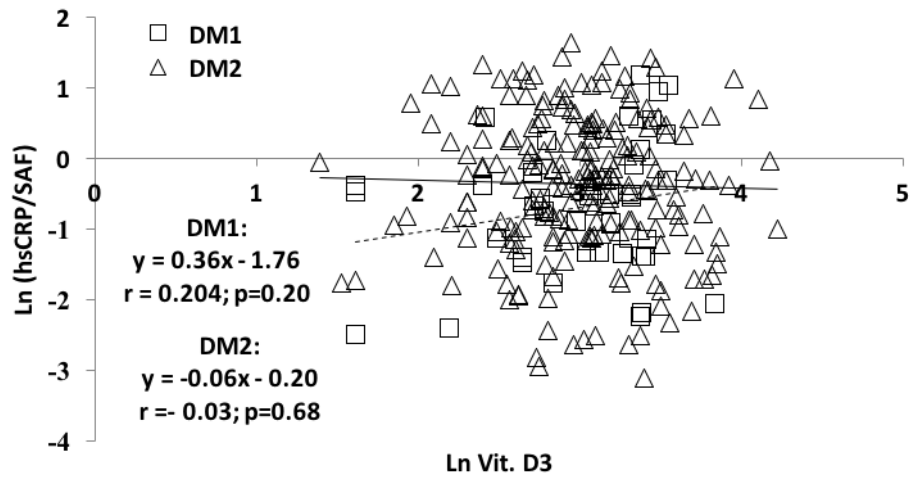


Abbildung 17: Regressionsanalyse von Ln(hsCRP/SAF) über 25(OH)D bei Typ 1- und 2-Diabetikern

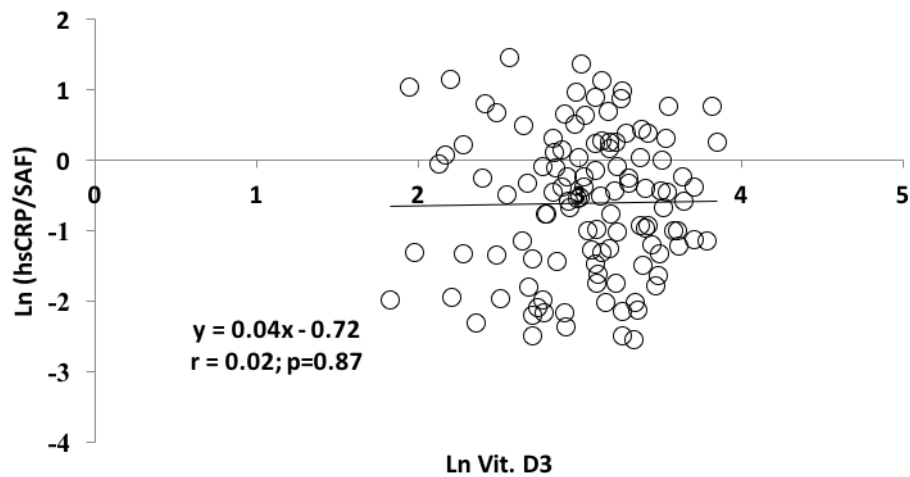


Abbildung 18: Regressionsanalyse von Ln(hsCRP/SAF) über 25(OH)D bei Kontrollen

	Kontrollen			Diabetiker		
	25(OH)D <20 ng/ml	25(OH)D >30 ng/ml	p	25(OH)D <20 ng/ml	25(OH)D >30 ng/ml	p
N	53	25	NA	130	58	NA
M/F (n; %)	23/30 (43%/57%)	15/10 (60%/40%)	0.17 ^{chi}	71/59 (55%/45%)	39/19 (67%/33%)	0.10 ^{chi}
Alter (Jahre)	58.5 ± 17.1	62.6 ± 13.5	0.23	65.9 ± 13.3	65.5 ± 11.1	0.94
Diabetesdauer (Jahre)	NA	NA		15.5 ± 10.7	14.7 ± 10.6	0.63
BMI (kg/m ²)	27.6 ± 3.6	28.6 ± 3.5	0.33	31.2 ± 7.1	29.7 ± 4.6	0.18
Gesamtprotein (g/l)	74 ± 8	70 ± 6	0.17	74 ± 7	70 ± 7	0.015
eGFR (ml/min/1.73m ²)	83 ± 12	84 ± 12	0.71	70 ± 26	69 ± 23	0.70
25(OH)D ₃ (ng/ml)	14.4 ± 3.9	35.5 ± 4.8	<0.001	13.9 ± 3.9	38.4 ± 8.7	<0.001
HbA _{1c} (%)	5.5 ± 0.3	5.5 ± 0.3	0.53	7.2 ± 1.2	6.9 ± 1.0	0.17
FI-AGEs (AU)	272 ± 181	291 ± 344	0.06	329 ± 108	368 ± 139	0.05
SAF (AU)	2.3 ± 0.5	2.3 ± 0.5	0.85	2.9 ± 0.7	2.8 ± 0.8	0.16
CML (ng/ml)	1098 ± 398	930 ± 391	0.27	1090 ± 433	899 ± 236	0.130
sRAGE (pg/ml)	988 ± 400	1070 ± 404	0.53	947 ± 550	949 ± 493	0.89
hsCRP (mg/l)	2.1 ± 2.4	1.6 ± 1.4	0.85	2.8 ± 2.6	2.5 ± 2.0	0.59
sVAP-1 (ng/ml)	406 ± 152	419 ± 177	0.38	488 ± 174	430 ± 181	0.040
Handkraft (Pfund)	81 ± 33	84 ± 26	0.50	70 ± 22	80 ± 23	0.007
*Albumin im Urin (mg/l)	< 10	< 10	NA	172 ± 417	58 ± 60	0.38
**Arterielle Hypertonie (Nein/Ja; %)	38/15 (72%/28%)	17/8 (68%/32%)	0.74 ^{chi}	39/84 (32%/68%)	23/33 (41%/59%)	0.22 ^{chi}

**pAVK (Nein/Ja; %)	53/0 (100%/0%)	24/1 (96%/4%)	0.70 ^{chi}	108/15 (88%/12%)	46/10 (82%/18%)	0.31 ^{chi}
**KHK(Nein/Ja; %)	51/2 (96%/4%)	24/1 (96%/4%)	0.56 ^{chi}	102/21 (83%/17%)	40/16 (71%/29%)	0.08 ^{chi}
**Gesamtkomorbiditäten (Nein/Ja; %)	38/15 (72%/28%)	17/8 (68%/32%)	0.74 ^{chi}	34/89 (28%/72%)	18/40 (29%/71%)	0.64 ^{chi}

Tabelle 8: Ergebnisse nach Probanden mit suffizienten und insuffizienten Vitamin D-Spiegeln gruppiert

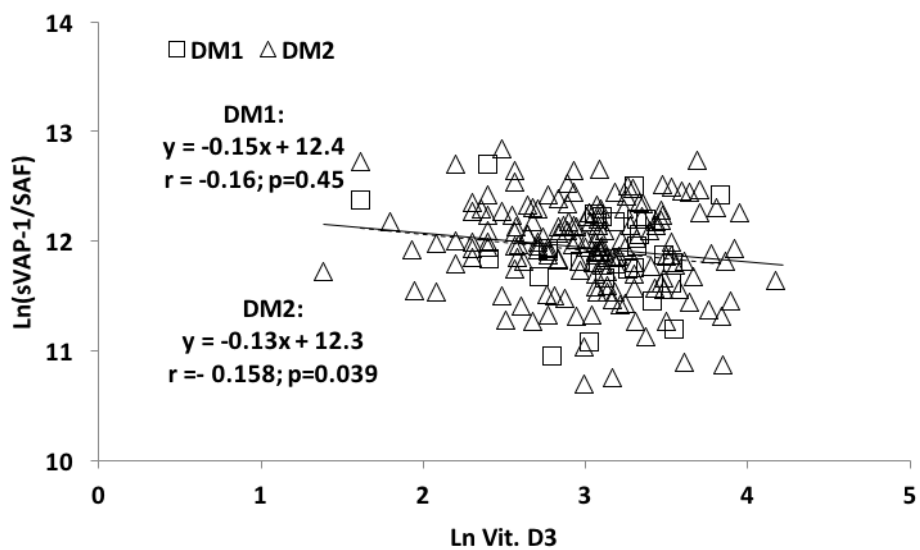


Abbildung 19: Regression von Ln(sVAP-1/SAF) über 25(OH)D bei Typ1- und 2-Diabetikern

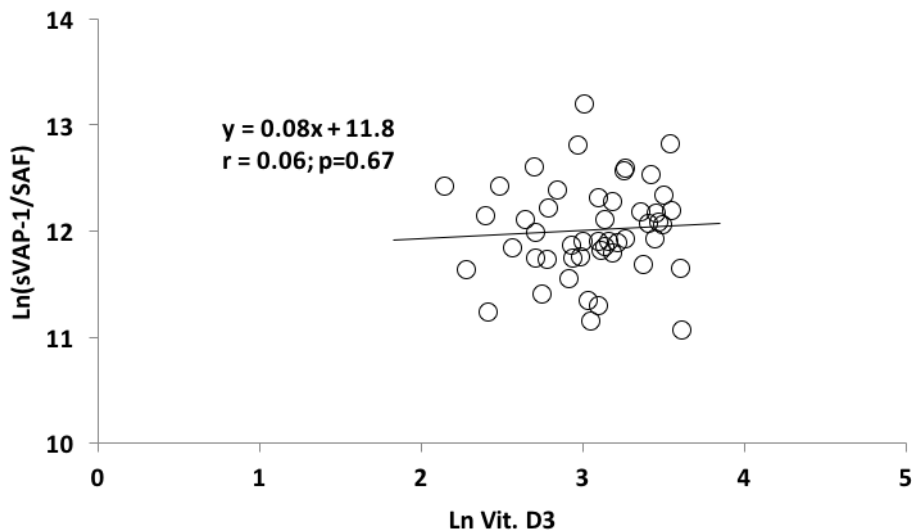


Abbildung 20: Regression von Ln(sVAP-1/SAF) über 25(OH)D bei nicht diabetischen Kontrollen

3.7 SAF und AGE-FI bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern

Bei Typ 1- und 2-Diabetikern zeigte sich ein altersabhängiger Anstieg der AGE-assoziierten Fluoreszenz im Plasma (AGE-FI) mit nahezu an parallel verlaufenden Geraden in beiden Gruppen ($y = 3,6 \times \text{Alter} + 113$, $r = 0,636$, $p < 0,001$ und $y = 3,2 \times \text{Alter} + 132$, $r = 0,272$, $p < 0,001$) (Abb. 21). Bei SAF verliefen diese sogar vollständig parallel ($y = 0,027 \times \text{Alter} + 1,17$, $r = 0,671$, $p < 0,001$ und $y = 0,027 \times \text{Alter} + 1,03$, $r = 0,397$, $p < 0,001$) (Abb. 23). Mittels generalisiertem linearem Model (GLM), einer Unterform der Regressionsanalyse für nicht Normalverteilte konnte ein signifikanter Einfluss von Alter und Diabetesdauer auf SAF und AGE-FI ermittelt werden. Der Diabetestyp scheint jedoch keinen Einfluss zu haben (Tab. 6).

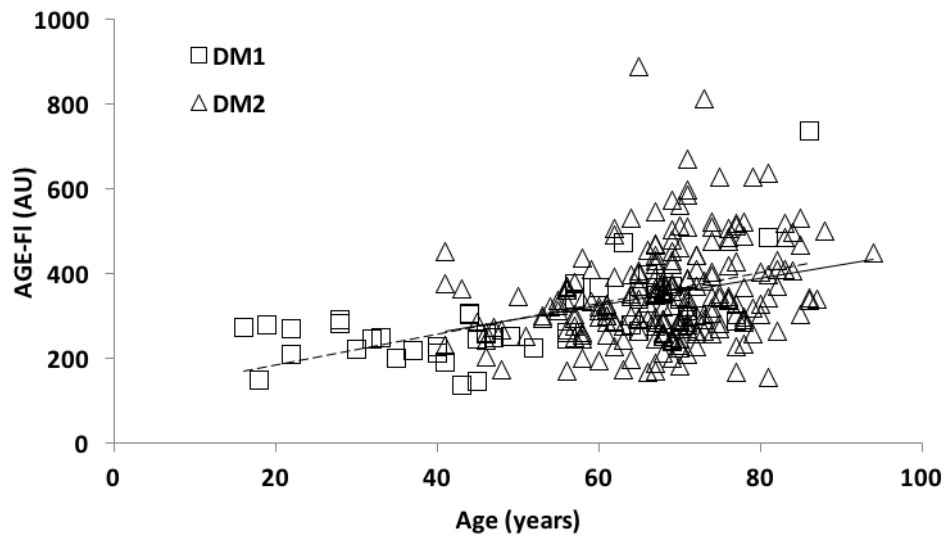


Abbildung 21: Altersabhängiger Anstieg der AGE-FI bei Typ 1 und 2-Diabetikern

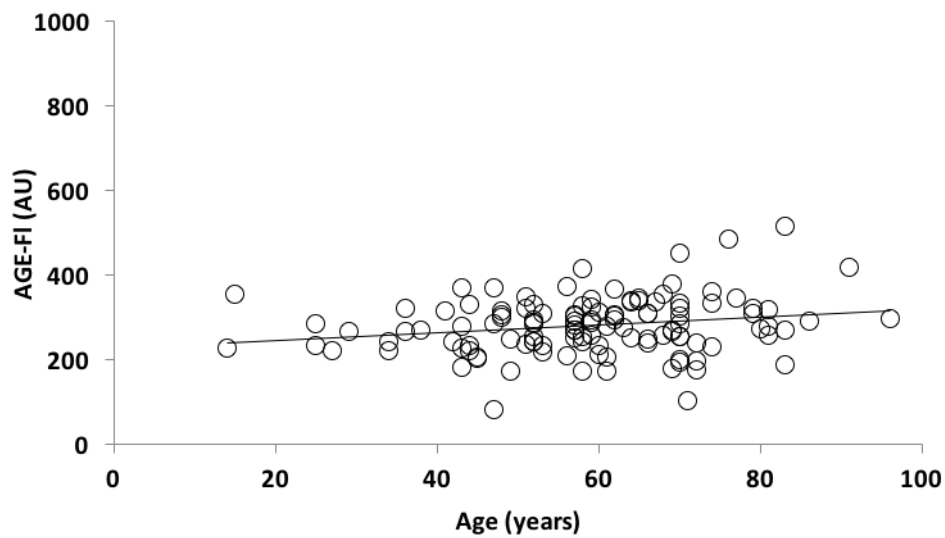


Abbildung 22: Altersabhängiger Anstieg der AGE-FI bei nicht diabetischen Kontrollen

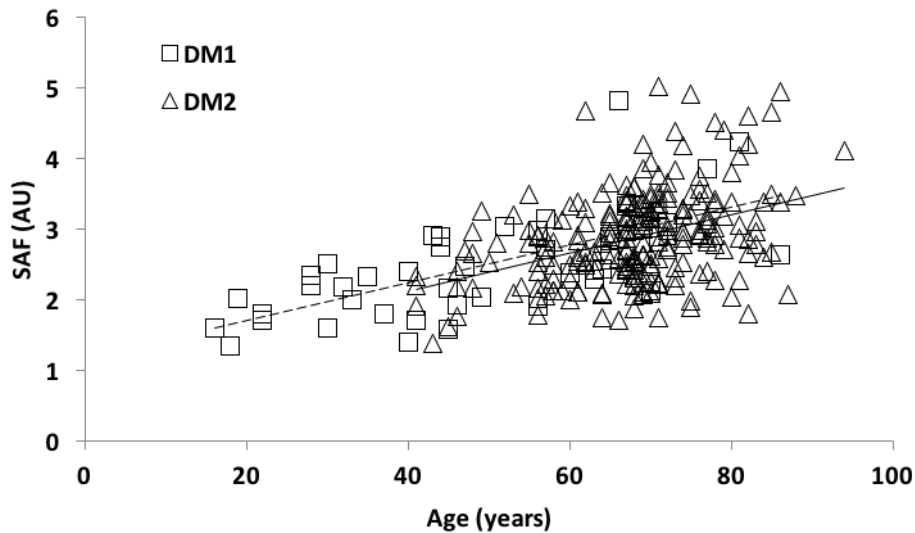


Abbildung 23: Altersabhängiger Anstieg von SAF bei Typ 1 und 2-Diabetikern

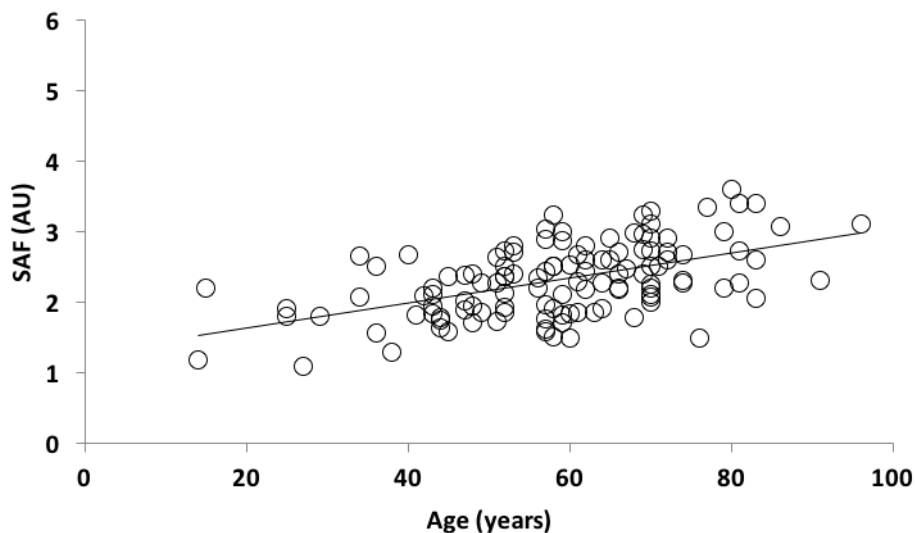


Abbildung 24: Altersabhängiger Anstieg von SAF bei nicht diabetischen Kontrollen

Multivariate Analysen bei Typ 1-Diabetikern mit Alter, BMI, GFR, HbA1c, hsCRP, SAF, CML, sRAGE, sVAP-1 und Diabetesdauer als Variablen konnten nur sVAP-1 als signifikanten unabhängigen Kontributor auf AGE-FI ermitteln (korrigiertes Modell, $p = 0,005$, $r^2: 78\%$, $p_{\text{sVAP-1}} = 0,028$, $\beta = -0,51$, $SE = 0,19$). Bei Typ-2-Diabetikern war dies die GFR (korrigiertes Modell $p < 0,001$, $r^2: 38\%$, $p_{\text{GFR}} < 0,001$, $\beta = -0,006$, $SE = 0,001$). In einem vergleichbaren Setting für SAF ermittelte GLM das Alter ($p_{\text{Alter}} = 0,019$, $\beta = 0,90$, $SE = 0,31$), sVAP ($p = 0,047$, $\beta = 0,99$, $SE = 0,41$) und sRAGE ($p = 0,001$, $\beta = -1,13$, $SE = 0,20$, korrigiertes Modell $p = 0,006$, $r^2: 84\%$) als signifikante Faktoren bei Typ-1-Diabetikern. Bei Typ-2-Diabetikern scheint das Alter ($p = 0,006$, $\beta = 1,01$, $SE = 0,36$), die GFR ($p = 0,022$, $\beta = -0,005$, $SE = 0,002$), sRAGE ($p = 0,016$, $\beta = -0,23$, SE

= 0,09), sVAP-1 ($p = 0,014$, $\beta = 0,27$, $SE = 0,11$) und CML ($p = 0,05$, $\beta = -0,21$, $SE = 0,11$) unabhängig mit SAF assoziiert zu sein (korrigiertes Modell $p < 0,001$, r^2 : 37%). Im Vergleich zu den Diabetikern zeigte sich bei den Kontrollen der altersabhängige Anstieg der SAF ($y = 0,018 \times \text{Alter} + 1,28$, $r = 0,520$, $p < 0,001$) und von AGE-FI ($y = 0,9 \times \text{Alter} + 228$, $r = 0,202$, $p = 0,028$) geringer ausgeprägt (Abb. 22, 24).

4. Diskussion

25-Hydroxyvitamin D und AGE's bei Gesunden und Patienten mit arterieller Hypertonie

In unserer Querschnittsstudie erfolgte zur weitgehenden Eliminierung der jahreszeitlichen Schwankungen der Vitamin D-Spiegel die Rekrutierung der Probanden und die anschließende Datenerhebung gleichmäßig verteilt über einen Zeitraum von 12 Monaten.

Dabei stellten wir bei gesunden Probanden und Patienten, welche als einzige Erkrankung eine medikamentös behandelte arterielle Hypertonie aufwiesen, eine leichte durchschnittliche Verminderung des Vitamin D-Spiegels auf 22,1 ng/ml bei den Gesunden auf 21,8 ng/ml bei den Hypertonikern fest, sofern man den allgemein zwischen 25 und 30 ng/ml angenommenen Normbereich zugrunde legt. Diese Befunde decken sich mit der Vielzahl anderer Untersuchungen (Holick 2007, Holick und Chen 2008). Sie entsprechen den Studiendaten an Zentral-Europäern mit durchschnittlichen Vitamin D-Werten zwischen 17 bis 33 ng/ml auf gleicher geographischer Höhe mit Würzburg (Pludowski et al 2014). Diese Vitamin D-Spiegel lagen im Durchschnitt jedoch etwas höher, als die in einer anderen Studie an orthopädischen Patienten in Deutschland erhobenen Werte (18,8 ng/ml im Sommer und 16,1 ng/ml im Winter) (Maier et al 2013).

Konform mit früheren Untersuchungen konnten wir einen signifikanten altersabhängigen Anstieg der SAF und AGE-FI im Plasma aufzeigen (Mulder et al. 2006, Meerwaldt et al. 2004, Koetsier et al. 2010, Klenovics et al. 2014). Dabei war der SAF-Anstieg bei Hypertonikern etwas stärker ausgeprägt (2,3 vs 2,5).

Weiterhin zeigten aktive Raucher höhere Werte für SAF und AGE-FI im Plasma, was mit Beobachtungen anderer Studien in Einklang steht (Koetsier et al. 2010, Klenovics

et al. 2014, Yue et al. 2014). Bei Rauchern konnten wir auch eine direkte Beziehung zwischen Plasma-AGE-FI und sVAP-1 ermitteln. Endotheliales sVAP-1 ist ein Adhäsionsmolekül mit der Enzymaktivität einer semicarbiziden Aminooxidase, die in der Lage ist, primäre Amine in ihre korrespondierenden Aldehyde unter Bildung von Hydrogenperoxid und Ammoniak abzubauen (Cerami et al, 1997). Reaktive Aldehyde sind potente glykierende Agenzien, wohingegen Hydrogenperoxid zu oxidativem Stress und hierdurch zur beschleunigten Bildung von AGEs beitragen. Eine hyperglykämie-induzierte, vermehrte Zirkulation von sVAP-1 beim Menschen korreliert direkt mit der AGE-FI-Konzentration im Plasma und sVAP-1. Ein Anstieg von sVAP-1 wird mit einer hyperglykämie-induzierten Atherosklerose und einer hiermit verbundenen erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität in Verbindung gebracht (Li et al. 2009). Weiterhin wurde bereits früher gezeigt, dass Tabakrauch reaktive Glykierungsprodukte enthält, welche mit Proteinen reagieren und zur Bildung von AGEs führen können (Cerami et al. 1997).

Im Gegensatz zu vielen anderen Studien (Chabroux et al. 2010, Meerwald et al. 2005, Gerrits et al. 2008) konnte in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen SAF und Nierenfunktion gezeigt werden. Der fehlende Zusammenhang zwischen SAF und eGFR erklären wir damit, dass in dieser Untersuchung lediglich Probanden mit normaler, oder leicht reduzierter Nierenfunktion eingeschlossen wurden und eine moderate bis schwere Nierenfunktionseinschränkung ein Ausschlusskriterium darstellte.

Entzündungsparameter und Marker für oxidativen Stress (hs-CRP und AOPPs, welche durch oxidative Freisetzung von Phagozyten über die Myeloperoxidase-Reaktion entstehen) zeigten keine Korrelation mit SAF. Dies lässt vermuten, dass die AGE-Akkumulation vorzugsweise durch das Alter und weniger durch Inflammation und oxidativen Stress bedingt sind.

Potenzielle Einflussfaktoren zur Beurteilung der möglichen biochemischen Konsequenzen einer AGE-Akkumulation waren bei Hypertonikern deren Behandlung mit verschiedenen Antihypertensiva wie Angiotensin II-Blocker und ACE-Hemmern. Wie in vitro und in vivo Studien zeigen konnten, haben diese antioxidative und antiinflammatorische Effekte, welche die AGE-Bildung beeinflussen können (Makita et

al. 1991, Forbes et al. 2002). Zusätzlich senken Calciumkanalblocker und Angiotensin II-Rezeptorblocker die Menge an AGEs (Nangaku et al. 2003, Sebekova et al. 2003). Ferner weisen auch einige Statine die Eigenschaft auf, sowohl die Mikroinflammation als auch die AGE-Bildung - teilweise durch Erhöhung der sRAGE-Spiegel- zu reduzieren (Quade-Lyssy et al. 2013).

Insgesamt war jedoch die Anzahl der in dieser Studie untersuchten Hypertoniker zu gering, um zu diesen verschiedenen Arzneimittel-induzierten Veränderungen detaillierter Stellung nehmen zu können.

Überraschender Weise führte das Vorliegen eines Vitamin D-Mangels (<20 ng/ml) in unserer Untersuchung nicht zu einer vermehrten AGE-Bildung - gemessen im Blut und über die Hautfluoreszenz (SAF). Im Umkehrschluss waren auch bei Probanden mit den höchsten SAF-Werten die Vitamin D-Spiegel nicht erniedrigt. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Akkumulation von AGEs in der Haut die kutane Bildung von Vitamin D nicht einschränkt und ein Vitamin D-Mangel wiederum nicht zu einer vermehrten AGE- Bildung beiträgt.

Ein Vitamin D-Mangel war auch nicht mit erhöhten Konzentrationen an Markern für oxidativen Stress und Inflammation verbunden. Lediglich ein Trend zu erhöhten hsCRP-Spiegeln konnte bei Probanden mit manifestem Vitamin D-Mangel nachgewiesen werden.

In einer kleinen Untergruppe von Rauchern bestand ein differentes Verhalten. Hier zeigte sich eine inverse Beziehung zwischen Plasma-AGE-FI und Vitamin D3 (Abb. 6). Außerdem war die sVAP-1- Konzentration bei rauchenden Probanden mit Vitamin D-Mangel signifikant erhöht (Abb. 7b). Diese Ergebnisse führen zur Vermutung, dass niedrige Vitamin D-Spiegel bei Rauchern die toxische Wirkung von Tabakrauch verschlimmern.

Weil eine Unterversorgung mit Vitamin D häufig mit einer Sarkopenie und damit einhergehenden Kraftverlust verbunden wird (Holick, 2007) wurden unsererseits Messungen der Muskelkraft mittels eines hydraulischen Handkraftmessers durchgeführt. In Übereinstimmung mit den unveränderten Markern für Inflammation, zeigte sich kein wesentlicher Unterschied bei Probanden mit normalen oder verminderten Vitamin D-Spiegeln.

Die Tatsache, dass in unserer Kohorte die Marker für Inflammation und oxidativen Stress trotz Vitamin D-Mangels im Normalbereich lagen, lässt vermuten, dass die bei

verschiedensten Krankheiten beobachteten Erhöhungen zumindest im Falle einer arteriellen Hypertonie nicht direkt durch einen Vitamin D-Mangel verursacht werden. Eine solche Vermutung würde auch im Einklang mit den Ergebnisse verschiedenster kontrollierter Studien stehen, in denen die Gabe von Vitamin D nicht zu einer positiven Beeinflussung von Mikroinflammation und oxidativen Stress geführt haben (Autier et al. 2014) und die u.a. zu der Empfehlung der „US Preventative Service Task Force“ aus dem Jahre 2014 geführt haben, bei gesunden Erwachsenen wegen fehlendem Nachweis einer kausalen pathologischen Rolle eines Vitamin D-Mangels keine routinemäßigen Bestimmungen vorzunehmen.

25-Hydroxyvitamin D und AGE's bei Gesunden und Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2

Der zweite Teil unserer Arbeit ist eine der wenigen Studien, die eine mögliche Beziehung zwischen Vitamin D-Status, AGE-Akkumulation im Plasma und der Haut, sowie AGE-assoziierten Biomarkern von Mikroinflammation und oxidativem Stress bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 im Vergleich zu Nicht-Diabetikern untersucht hat.

Vitamin D-Status:

In beiden Gruppen (Diabetiker und gesunde Kontrollen) war der Vitaminspiegel gleich stark reduziert und lag mit durchschnittlichen Werten von 22,3 ng/ml im leicht defizitären Bereich unterhalb von 25 ng/ml. Dabei unterschied sich auch der prozentuale Anteil von Probanden mit Werten im Normbereich zwischen Nicht-Diabetiker (60%) und Diabetikern (67%) nicht. Dies steht im Kontrast zu bisherigen Studien, welche bei Diabetikern eine signifikant höhere Prävalenz von Vitamin D-Mangelzuständen beschrieben haben (Mitri 2011, Forouhi 2012, Gradinaru 2012, Song 2013). Diese Studien postulierten auch einen Zusammenhang zwischen verminderten Vitamin D-Spiegeln und der Entwicklung, sowie dem Fortschreiten eines Diabetes mellitus. Diese Annahme bezog sich dabei auf verschiedenen experimentellen und klinischen Untersuchungen, die einen Anstieg der Insulinresistenz, sowie eine verminderte Insulinausschüttung aus den Betazellen des Pankreas bei einem Vitamin D-Mangel beobachteten (Palomer 2008). Übereinstimmend mit Ergebnissen der Tromsø Studie (Hutchinson et al. 2011) und

Untersuchungen von Zoppini et al. 2013 fanden wir zwar innerhalb unserer Diabetikergruppe auch eine inverse Beziehung zwischen Vitamin D und HbA1c. Hierbei dürfte es sich jedoch um keinen kausalen Zusammenhang handeln, da Meta-Analysen zahlreicher Studien keinen positiven Effekt einer Vitamin D-Supplementation auf einen gestörten Glukosestoffwechsel zeigen konnten (Seida et al. 2014). Auch in einem im Lancet veröffentlichten systematischem Review wurde kein Zusammenhang zwischen Vitamin D-Mangel und Diabetes mellitus festgestellt (Autier et al. 2014).

Vitamin D-Status und BMI:

Cholecalciferol liegt vor allem im weißen Fettgewebe verteilt vor (Mawer et al. 1972). Es konnte in der Vergangenheit eine signifikant positive Korrelation zwischen der 25(OH)D-Konzentration im subkutanen weißen Fettgewebe und im Serum nachgewiesen werden (Piccolo et al. 2013). Eine Metaanalyse von 21 Studien ergab, dass jeder Anstieg des BMIs um eine Einheit (kg/m^2) mit einer um 1,15% verminderten Konzentration von Vitamin D im Plasma einhergeht. Weitere Studien haben jedoch gezeigt, dass eine Reduktion des Körpergewichts und der Fettmasse bei übergewichtigen und fettleibigen Personen zu keiner signifikanten Änderungen der Vitamin D Konzentration im weißen Fettgewebe und im Blute führt (Piccolo et al. 2013). Unsere Daten zeigten zwar keine signifikante Beziehung zwischen Vitamin D und BMI; weder bei Diabetikern noch in der Kontrollgruppe. Jedoch lassen unsere multivariaten Analysen vermuten, dass bei Nichtdiabetikern ein erhöhter BMI möglicherweise invers mit Vitamin D korreliert.

Advanced Glcation Endproducts:

In unserer Kontrollgruppe korrespondierte der altersabhängige SAF- Anstieg gut mit Daten von der holländischen Bevölkerung (Koetsier et al, 2010). Auch der bei unseren Diabetikern beobachtete deutlichere Anstieg ist in Übereinstimmung mit entsprechenden Befunden aus den Niederlanden (Meerwaldt 2005, Gerrits 2008) und der Tschechischen Republik (Skraha et al. 2013). In einer groß angelegten australischen Studie zeigten sich jedoch nur tendenziell und nicht signifikant erhöhte SAF-Werten bei Vorliegen einer diabetischen Stoffwechsellage (Moran et al. 2013). Gründe für solch differente Beobachtungen könnten einerseits unterschiedliche Charakteristika in der Kontrollgruppe (Alter, Komorbiditäten) und bei den Diabetikern

(Diabetesdauer, Behandlungsart, Anwesenheit von Komorbiditäten und Komplikationen) sein.

Interessanterweise war der altersabhängige Anstieg der SAF in beiden Gruppen unserer Typ -1 und Typ-2 Diabetiker gleich stark ausgeprägt und korrelierte direkt mit der Diabetesdauer. Eine Beziehung zum HbA1c fand sich jedoch nicht.

Auch die Plasma AGE-FI zeigte einen altersabhängigen Anstieg in unserer Kontroll- und Diabetikergruppe, was mit Daten von Kalousová et al. in Einklang steht (Kalousová et al. 2002).

Interaktion von Vitamin D und AGE's:

Da verschiedene in-vitro- und Tierstudien eine Verminderung der toxischen Effekte von AGEs und deren Formation durch Vitamin D-Applikation zeigten (Talmor 2008, Salum 2013), waren wir besonders an möglichen Zusammenhängen zwischen diesen beiden Parametern interessiert. Wir erwarteten dabei eine vermehrte AGE-Formation bei niedrigen und eine geringere AGE-Konzentration bei suffizienten Vitamin D-Spiegeln. Überraschenderweise konnten wir jedoch keinerlei Zusammenhang zwischen Vitamin D und SAF finden.

Auch die Plasma AGE-FI korrelierte nicht mit der Höhe des Vitamin D-Spiegels. Jedoch lassen die Daten multivariater Analysen mittels OPLS-DA Modell vermuten, dass Probanden mit Vitamin D-Mangel zu niedriger AGE-assoziiertes Fluoreszenz im Plasma tendieren, unabhängig davon, ob ein Diabetes vorliegt oder nicht. In der Literatur findet sich hierzu lediglich eine Studie, welche bei älteren Typ 2-Diabetikern ebenfalls keine Beziehung zwischen Vitamin D₃ und der Plasmakonzentration an AGE-FI zeigen konnte (Gradinaru et al. 2012).

Diese Ergebnisse sprechen gegen die Möglichkeit, dass eine kutane AGE-Akkumulation die Photokonversion von Provitamin D zu Vitamin D₃ behindert. Dieser Vermutung entsprechen auch Studienergebnisse von Ala-Houhala et al., die bei Dialysepatienten trotz der hohen Haut-AGEs einen starken Anstieg der Vitamin D-Spiegel durch Bestrahlung mit UVB erreichen konnten (Ala-Houhala et al. 2012).

Marker von Inflammation und oxidativem Stress:

In der Gesamtkohorte der Diabetiker waren die Werte für hsCRP und sVAP-1 signifikant erhöht. Hauptsächlich gingen die hohen Werte allerdings auf das Konto der Typ 2- und nicht der Typ 1-Diabetiker. Dies ist überraschend, vor allem hinsichtlich

eines im Durchschnitt gleichen HbA1c-Wertes in beiden Gruppen. Möglicherweise lässt sich dies durch die unterschiedliche Ätiologie und Pathophysiologie der beiden Diabetesarten erklären. Zum gleichen Schluss kommen Kalousova et al. in ihrer Arbeit (Kalousová et al. 2002). Der Typ 1-Diabetes ist eine autoimmunologische Erkrankung und charakterisiert durch mangelnde Funktion der pankreatischen Betazellen. Er entsteht in der Regel in einem frühen Lebensalter und ist durch das Fehlen von Übergewicht, Insulinresistenz und Hypertonus charakterisiert. Im Gegensatz hierzu zeigt der Typ 2-Diabetes eine Insulinresistenz; er manifestiert sich zumeist bei einem metabolischen Syndrom im mittleren oder höheren Lebensalter. Stammfettsucht fördert zudem die Entwicklung einer Dyslipidämie, Mikroinflammation, oxidativen Stress (Lumeng 2007, Mazzone 2010) sowie arterieller Hypertonie (Chandra et al. 2014). Korrespondierend hierzu wiesen unsere Typ 2-Diabetiker einen höheren BMI und eine 1,4-fach höhere Hypertonie- Inzidenz als die Typ 1-Diabetiker auf. Die in diesem Zusammenhang sicherlich interessanten Parameter des Bauchumfanges, bzw. der Hüft-Taillen-Relation wurden von uns leider nicht erhoben.

Die sVAP-1-Werte waren bei Vitamin D-Mangel erhöht und zeigten eine unabhängige inverse Korrelation mit der Vitamin D-Konzentration in beiden Diabetesgruppen. Die erhöhten sVAP1-Werte mögen zum Teil den Einfluss von oxidativem Stress und/oder Mikroinflammation bei der AGE-Akkumulation widerspiegeln. sVAP-1, eine semicarbazid-sensitive Aminooxidase (SSAO), ist ein Molekül mit dualer Funktion. Es begünstigt zum einem die Lymphozytenadhäsion an geschädigtem Endothel und spielt zum andern eine Rolle bei der Eliminierung von Monoaminen durch die Metabolisierung primärer Amine in ihre korrespondierenden Aldehyde unter Entstehung von H_2O_2 und Ammoniak (Deng et al, 1999). Eine erhöhte SSAO-Aktivität bei Diabetes mellitus könnte von einer erhöhten Konzentration an SSAO-Substraten wie Methylamin oder Aminoaceton herrühren.

Es bleibt unklar, ob die festgestellte Korrelation von verminderten Vitamin D_3 - und erhöhten sVAP-Spiegeln ein zufälliger Befund ist, oder ein kausaler Zusammenhang mit den proinflammatorischen Auswirkungen eines Vitamin D-Mangels besteht. Im letzten Fall könnte der Anstieg von sVAP-1 durch die Freisetzung aus Endothelzellen, oder durch Induktion der VAP-1/SSAO-Genexpression bedingt sein. Bei Diabetikern zeigt sich durch SSAO eine gesteigerte Umwandlung von Aminoaceton in Methylglyoxal. Dies wird mit der Entwicklung einer Insulinresistenz und diabetischen Folgekomplikationen in Zusammenhang gebracht (Boomsma 1999, Nigro 2014, Fiory

2011). Der hyperglykämie-bedingte Anstieg an zirkulierendem sVAP-1 im menschlichen Körper korrelierte dabei direkt mit der AGE-Plasmakonzentration (Li et al. 2009). sVAP-1 wird außerdem mit einer subklinischen Atherosklerose-Manifestation und einem hiermit verbundenen erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität in Verbindung gebracht (Aalto et al. 2014).

Muskelkraft:

Nachdem in früheren Untersuchungen sowohl eine AGE-Akkumulation (Momma et al. 2011), als auch ein Vitamin D-Mangel (Gallagher et al. 2012, Holick 2007) mit einer verminderten Muskelkraft assoziiert waren, untersuchten wir in beiden Gruppen der Diabetiker und Nichtdiabetiker die Handkraft. Einen Zusammenhang zwischen erhöhten AGEs und verminderter Muskelkraft konnten wir weder in der Kontrollgruppe, noch bei den Diabetikern feststellen. Jedoch zeigte sich bei Vorliegen erniedrigter Vitamin D-Spiegel bei den Diabetikern im Unterschied zu den Kontrollen eine verminderte Handkraft.

Die zum Teil unerwarteten und überraschenden Ergebnisse unserer Untersuchungen bezüglich AGE's und Vitamin D-Mangel können möglicherweise durch folgende spezifische Bedingungen innerhalb der von uns untersuchten Probanden-Gruppen verursacht worden sein:

Zunächst wiesen die untersuchten Diabetiker mit einem durchschnittlichen HbA1c-Wert von 7,1 % eine gute Blutzuckereinstellung auf. Fast alle Typ-2 Diabetikern wurde dabei langjährig Metformin verabreicht. Dies ist ein Medikament mit nachgewiesenen stark antiinflammatorischen Eigenschaften (Bailey 2008, Isoda 2006). Alle Patienten mit arterieller Hypertonie wurden entsprechend der offiziellen Leitlinien primär mit ACE-Hemmern oder Angiotensin-II-Rezeptorblockern behandelt. Diese Substanzen zeigen sowohl in vitro, als auch im Tierversuch und beim Menschen ebenfalls antiinflammatorische, antioxidative und anti-AGE-formierende Effekte (Forbes et al 2002, Nangaku et al 2003, Sebeková et al 2003). Auch die häufig bei unseren Diabetikern zur Sekundär- und teilweise auch zu Primärprävention verabreichten Statinpräparate reduzieren ebenfalls Mikroinflammation und oxidativen Stress (Albert 2001, Landmesser 2005, Antoniades 2011), sowie die Bildung von AGE's (Jinnouchi et al. 2006); letzteres durch Erhöhung von soluble RAGE (Quade-Lyssy et al. 2013). Interessanterweise sollen Simvastatin und Atorvastatin (die mit Abstand am häufigsten

eingesetzten Präparate) die Bildung von Vitamin D₃ fördern (Sathyapalan et al. 2013), was den fehlenden Unterschied zwischen den Vitamin D-Spiegeln unserer Kontrollen und Diabetikern zumindest teilweise erklären könnte.

Dass ein erniedrigter Vitamin-Spiegel in unserer Diabetikergruppe nicht mit Markern für Mikroinflammation und oxidativen Stress assoziiert war, könnte entweder bedeuten, dass die postulierte antiinflammatorische Wirkung von Vitamin D geringer ist als angenommen, oder unter gewissen Bedingungen sogar gar nicht vorhanden ist. Tatsächlich konnten Untersuchungen an Patienten mit unterschiedlichen Entzündungszuständen (elektive Implantation einer Knieendoprothese (Reid et al. 2011), sowie bei intensivpflichtigen Patienten (Lee et al. 2009)) einen Vitamin D-Mangel nicht als Ursache, sondern lediglich als Folge der Erkrankung ermitteln. Korrespondierend hierzu zeigten zahlreiche kontrollierte Studien, dass eine Vitamin D-Supplementierung keinen Einfluss auf oxidativen Stress und Mikroinflammation hatte (Autier et al, 2014).

5. Zusammenfassung

Beim Vergleich von gesunden Probanden und Patienten mit ausschließlich primärer arterieller Hypertonie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der gemessenen Vitamin D-Spiegel. Diese befanden sich durchschnittlich im leicht erniedrigtem Bereich von 22,5 ng/ml (normal: ≥ 30 ng/ml). Die AGEs gemessen als Plasma AGE-Fluoreszenz (AGE-FI) und als Hautfluoreszenz (SAF) zeigten in beiden Gruppen einen altersabhängigen Anstieg auf, welcher bei den Hypertonikern etwas ausgeprägter war. Die gemessenen Parameter der Mikroinflammation und des oxidativen Stress lagen jeweils im Normbereich, egal ob sich der Vitamin D-Spiegel im Normbereich befand, oder leicht erniedrigt war. Lediglich in der Subgruppe der Raucher bestand eine inverse Beziehung zwischen Vitamin D und der Plasma-AGE-FI. Nur in dieser Gruppe konnte auch eine direkte Beziehung zwischen Plasma-AGE-FI und sVAP-1, einem löslichen vaskulärem Adhäsionsprotein festgestellt werden.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass bei gesunden Probanden und Patienten mit primärer arterieller Hypertonie eine leichte Unterversorgung mit Vitamin D zu keiner verstärkten Mikroinflammation und AGE-Akkumulation führt. Vorstellbar ist eine solche Konstellation bei Rauchern, wozu jedoch eine Wiederholung mit größerer Probandenzahl wünschenswert wäre.

Beim Vergleich von Patienten mit Diabetes mellitus mit relativ guter Diabetes-Einstellungsgüte (mittlerer HbAc: 7,1 %) mit nichtdiabetischen Kontrollen lag der mittlere Vitamin D-Spiegel ebenfalls jeweils im leicht erniedrigten Bereich von 23,2 ng/ml. Hier konnten wir für Diabetiker höhere Werte von SAF und AGE-FI zeigen. Diese korrelierten mit Alter und Diabetesdauer. Bei Typ 2 Diabetiker, jedoch nicht bei Typ 1-Diabetiker korreliert der altersabhängige Anstieg der SAF direkt mit hsCRP und sVAP. Eine Beziehung zwischen Vitamin D und den untersuchten Parametern konnte mit Ausnahme für sVAP-1 nicht nachgewiesen werden.

Somit scheint bei Diabetikern zumindest bei moderatem Vitamin D-Mangel kein Zusammenhang mit einer AGE-Akkumulation und Markern für Mikroinflammation und oxidativen Stress (mit Ausnahme für sVAP-1) zu bestehen.

Zu überprüfen wäre dies in zukünftigen Studien für einen schweren Vitamin D-Mangel und bei Patienten mit stärker ausgeprägter chronischer Hyperglykämie (z.B. HbA1c-Werten >8%)

6. Literatur-, Abbildungs- und Abkürzungsverzeichnis

1. Aalto, K, et al. "Soluble vascular adhesion protein-1 predicts incident major adverse cardiovascular events and improves reclassification in a Finnish prospective cohort study." *Circulation: Cardiovascular Genetics: CIRCGENETICS*-113, 2014
2. Ahonen MH, Tenkanen L, Hakama M, Tuphima P, Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). *Cancer Causes Control*; 11:847-52, 2000
3. Al Mheid, et al. "Vitamin D status is associated with arterial stiffness and vascular dysfunction in healthy humans." *Journal of the American College of Cardiology* 58.2: 186-192, 2011
4. Ala-Houhala MJ, Vahavihu K, Hasan T, et al. "Narrow-band ultraviolet B exposure increases serum vitamin D levels in haemodialysis patients." *Nephrol Dial Transplant.*;27:2435-2440, 2012
5. Ala-Houhala, MJ, et al. "A narrow-band ultraviolet B course improves vitamin D balance and alters cutaneous CYP27A1 and CYP27B1 mRNA expression levels in haemodialysis patients supplemented with oral vitamin D." *Nephron Clinical Practice* 124.1-2: 17-22, 2013
6. Albert, MA, et al. "Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study." *Jama* 286.1: 64-70, 2001
7. Antoniades, C, et al. "Rapid, direct effects of statin treatment on arterial redox state and nitric oxide bioavailability in human atherosclerosis via tetrahydrobiopterin-mediated endothelial nitric oxide synthase coupling." *Circulation* 124.3: 335-345, 2011
8. Autier, P, et al. "Vitamin D status and ill health: a systematic review." *The Lancet Diabetes & endocrinology* 2.1: 76-89, 2014
9. Badawi, et al. "Relationship between insulin resistance and plasma vitamin D in adults." *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy* 7: 297, 2014
10. Bailey, CJ, "Metformin: effects on micro and macrovascular complications in type 2 diabetes." *Cardiovascular drugs and therapy* 22.3: 215-224, 2008

11. Bali, J, et al. "Role of genes linked to sporadic Alzheimer's disease risk in the production of β -amyloid peptides." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.38: 15307-15311, 2012
12. Beiswenger et al., Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes, *Diabetes*, 44, 824-829, 1995
13. Bischoff-Ferrari, HA, Giovannucci, E, Willett, WC, et al. "Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes." *Am J Clin Nutr*; 84:18-28. [Erratum, *Am J Clin Nutr*; 84:1253, 2006
14. Boomsma, F, et al. "Circulating semicarbazide-sensitive amine oxidase is raised both in type I (insulin-dependent), in type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and even in childhood type I diabetes at first clinical diagnosis." *Diabetologia* 42.2: 233-237, 1999
15. Borissova, A.M., Tankova, T, Kirilov, G, et al. "The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients." *International Journal of Clinical Practice*, **57**, 258–261, 2003
16. Cerami C, Founds H, Nicholl I, et al. "Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products." *Proc Natl Acad Sci USA*; 94:13915-13920, 1997
17. Chabroux, S, et al. "Advanced glycation end products assessed by skin autofluorescence in type 1 diabetics are associated with nephropathy, but not retinopathy." *Diabetes & metabolism* 36.2: 152-157, 2010
18. Chandra, A, et al. "The relationship of body mass and fat distribution with incident hypertension: observations from the Dallas Heart Study." *Journal of the American College of Cardiology* 64.10: 997-1002, 2014
19. Chiu, K.C., Chu, A, et al. "Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and β cell dysfunction." *American Journal of Clinical Nutrition*, **79**, 820–825, 2004
20. Colas, C, Garabedian, M, Fontbonne, A, et al. "Insulin secretion and plasma 1,25(OH)₂D after UV-B irradiation in healthy adults." *Hormone and Metabolic Research*, **21**, 154–155, 1988
21. De Boer, IH, et al. "25-hydroxyvitamin D levels inversely associate with risk for developing coronary artery calcification." *Journal of the American Society of Nephrology* 20.8: 1805-1812, 2009

22. DeLuca HF. "Overview of general physiologic features and functions of vitamin D." *Am J Clin Nutr.* 80(6 Suppl): 1689S–96S, 2004
23. Deng, Y, et al. "Assessment of the deamination of aminoacetone, an endogenous substrate for semicarbazide-sensitive amine oxidase." *Analytical biochemistry* 270.1: 97-102, 1999
24. Fiory, F, et al. "Methylglyoxal impairs insulin signalling and insulin action on glucose-induced insulin secretion in the pancreatic beta cell line INS-1E." *Diabetologia* 54.11: 2941, 2011
25. Forbes, JM, et al. "Reduction of the accumulation of advanced glycation end products by ACE inhibition in experimental diabetic nephropathy." *Diabetes* 51.11: 3274-3282, 2002
26. Forouhi, N. G., et al. "Circulating 25-hydroxyvitamin D concentration and the risk of type 2 diabetes: results from the European Prospective Investigation into Cancer (EPIC)-Norfolk cohort and updated meta-analysis of prospective studies." *Diabetologia* 55.8: 2173-2182, 2012
27. Freskanich D, Ma J, Fuchs CS, et al. „Plasma vitamin D metabolites and risk of colorectal cancer in women." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13:1502-8, 2004
28. Gerrits, EG, et al. "Skin Autofluorescence." *Diabetes care* 31.3: 517-521, 2008
29. Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, et al. „Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men." *J Natl Cancer Inst*; 98:451-9, 2006
30. Girgis, CM, et al. "The roles of vitamin D in skeletal muscle: form, function, and metabolism." *Endocrine reviews* 34.1: 33-83, 2012
31. Girgis, CM, et al. "Vitamin D signaling regulates proliferation, differentiation, and myotube size in C2C12 skeletal muscle cells." *Endocrinology* 155.2: 347-357, 2013
32. Goldberg, T, et al. "Advanced Glycation End Products in Commonly Consumed Foods." *Journal of the American Dietetic Association, J Am Diet Assoc.*, 105(4):647, 2005
33. Gombart, AF, Borregaard, N, Koeffler HP, "Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D3." *The FASEB journal* 19.9: 1067-1077, 2005

34. Gorham, ED, Garland, CF, Garland, FC, et al. „Vitamin D and prevention in colorectal cancer.” *J Steroid Biochem Mol Bio*; 97:179-94, 2005
35. Gradinaru, D, et al. "Vitamin D status and oxidative stress markers in the elderly with impaired fasting glucose and type 2 diabetes mellitus." *Aging clinical and experimental research* 24.6: 595-602, 2012
36. Harinarayan, CV, "Vitamin D and diabetes mellitus." *Hormones (Athens)* 13.2: 163-181, 2014
37. Hart, GR, Furniss, JL, Laurie, D, et al. „Measurement of Vitamin D Status: background, clinical use and methodologies.” *Clin Lab*, 52(7-8):335-343, 2006
38. Hoffman, SM, et al. “Improved insulin sensivity is associated with resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotoxin intake.” *Diabetes*, 2005
39. Holick, M, “Calcium plus vitamin D and the risk of colorectal cancer.” *N Engl J Med*; 354:2287-8, 2006
40. Holick, M, “Vitamin Deficiency” *N Engl J Med* 357:266-281, 2007
41. Holick, M, Chen TC, “Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences.” *Am J Clin Nutr.*;87:1080S-1086S, 2008
42. Holick, M, et al. “Age Vitamin D and solar ultraviolet.” *Lancet*; 2:1104-110, 1989
43. Hutchinson, MS, et al. "Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels in Subjects with Reduced Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes—The Tromsø OGTT-Study." *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 81.5: 317, 2011
44. Hypponen, E, Laara, E, Reunanen, A, et al. „Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birthcohort study.” *Lancet*; 358:1500-3, 2001
45. Ishii, H, Suzuli, H, Baba, T, et al. “Seasonal variation of glycemic control in type 2 diabetic patients.” *Diabetes Care*, **24**, 1503, 2001
46. Isoda, K, et al. "Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor- κ B in human vascular wall cells." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26.3: 611-617, 2006
47. Jackson RD, LaCroix AZ, Gass M, et al. “Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures.” *N Engl J Med*; 354:669-83, 2006
48. Jager, J, Oomen, P.H.N, Sluiter, W.J., et al. “Improved Reproducibility of the ‘Large-Window’ Method of Assessing Transcapillary and Interstitial

- Fluorescein Diffusion in the Skin in Healthy Subjects and in Subjects with Insulin-Dependent Diabetes mellitus." *Int J Microcirc*; 17:150–158, 1997
49. Jakob, F. "1, 25 (OH) 2-Vitamin D3 Das Vitamin D-Hormon." *Der Internist* 40.4: 414-430, 1999
50. Jinnouchi, Y., et al. "Atorvastatin decreases serum levels of advanced glycation end products (AGEs) in patients with type 2 diabetes." *Clinical and experimental medicine* 6.4: 191-193, 2006
51. Kalousova, M, Skrha, J, Zima, T, "Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus." *Physiological Research* 51.6: 597-604, 2002
52. Kipshoven, C, "Querschnittsstudie zur Abschätzung des Vitamin-D-Status in der Bevölkerung in Deutschland (DEVID-Studie)." *Köln, Univ., Diss* 2010
53. Klenovics KS, Kollarova R, Sebekova K, et al. "Reference values of skin autofluorescence as an estimation of tissue accumulation of advanced glycation end products in a general Slovak population." *Diabet Med.* 31:581-58, 2014
54. Koetsier, M, et al. "Reference values of skin autofluorescence." *Diabetes technology & therapeutics* 12.5: 399-403, 2010
55. Kramer CK, Swaminathan B, Hanley AJ, et al. "Prospective associations of Vitamin D status with beta-cell function, insulin sensitivity and glycemia: the impact of parathyroid hormone status." *Diabetes.* 2014
56. Krause R, Bühring M, Hopfenmuller W, et al. "Ultraviolet B and blood pressure." *Lancet*; 352:709-10, 1998
57. Landmesser, U, et al. "Simvastatin versus ezetimibe." *Circulation* 111.18: 2356-2363, 2005
58. Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, et al. "Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial." *Am J Clin Nutr.*; 85(6):1586–91, 2007
59. Ledl F, Schleicher E. "Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper–neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin." *Angewandte Chemie* 102.6: 597-626, 1990
60. Lee, P, Eisman, JA, Center, JR, "Vitamin D deficiency in critically ill patients." *New England Journal of Medicine* 360.18: 1912-1914, 2009

61. Lee, YT, et al. "Comparison between calcitriol and calcitriol plus low-dose cinacalcet for the treatment of moderate to severe secondary hyperparathyroidism in chronic dialysis patients." *Nutrients* 5.4: 1336-1348, 2013
62. Li HY, Lin MS, Wei JN, et al. „Change of serum vascular adhesion protein-1 after glucose loading correlates to carotid intima-medial thickness in non-diabetic subjects." *Clin Chim Acta.*; 403:97-101, 2009
63. Li, YC, et al. "1, 25-Dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system." *The Journal of clinical investigation* 110.2: 229, 2002
64. Lin, RY, et al. "Dietary glycotoxins promote diabetic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Atherosclerosis* 168.2: 213-220, 2003
65. Lumeng, CN, Bodzin, JL, Saltiel, AR, "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization." *Journal of Clinical Investigation* 117.1: 175, 2007
66. Lutgers, HL, et al. "Skin autofluorescence as a noninvasive marker of vascular damage in patients with type 2 diabetes." *Diabetes care* 29.12: 2654-2659, 2006
67. Lyles, GA, Chalmers, J, "The metabolism of aminoacetone to methyl- glyoxal by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery." *Biochem Pharmacol.* 43: 1409-1414, 1992
68. Maier, GS, et al. "Is there an epidemic vitamin D deficiency in German orthopaedic patients?" *Clinical Orthopaedics and Related Research*® 471.9: 3029-3035, 2013
69. Makita, Z, Radoff, S, Rayfield, EJ, et al. "Advanced glycation end products in diabetic nephropathy." *New Eng J Med* 325: 836-842, 1991
70. Massry, S, "Parathyroid hormone as uremic toxin." Massry and Glassock's *Textbook of Nephrology*. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 1221-1244, 2001
71. Mattila, C, et al. "Serum 25-hydroxyvitamin D concentration and subsequent risk of type 2 diabetes." *Diabetes care* 30.10: 2569-2570, 2007
72. Mawer, EB, et al. "The distribution and storage of vitamin D and its metabolites in human tissues." *Clinical science* 43.3: 413-431, 1972

73. Mazzone, T, "Intensive Glucose Lowering and Cardiovascular Disease Prevention in Diabetes." *Circulation* 122.21: 2201-2211, 2010
74. McGrath J, Selten JP, Chant D, "Longterm trends in sunshine duration and its association with schizophrenia birth rates and age at first registration – data from Australia and the Netherlands." *Schizophr Res* 54:199-212, 2002
75. Meerwaldt, et al. "Skin Autofluorescence and Advanced glycation endproducts, The Autofluorescence Reader and its clinical evaluation" 2005
76. Meerwaldt, R, et al. "Increased accumulation of skin advanced glycation end-products precedes and correlates with clinical manifestation of diabetic neuropathy." *Diabetologia* 48.8: 1637-1644, 2005
77. Meerwaldt, R, et al. "Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes." *Diabetes care* 30.1: 107-112, 2007
78. Meerwaldt, R, Graaff, R, Oomen, PHN, et al. „Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation." *Diabetologia*. 47:1324-1330, 2004
79. Meerwaldt, R, et al. "The clinical relevance of assessing Advanced Glycation Endproducts Accumulation in Diabetes." *Cardiovascular Diabetology* 7.1:20, 2008
80. Meerwaldt, R, et al. "Skin Autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients." *Journal of the American Society of Nephrology* 16.12: 3687-3693, 2005
81. Mitri, J., Muraru, MD, Pittas, AG, "Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review." *European journal of clinical nutrition* 65.9: 1005, 2011
82. Miyata T, Sada T, et al. „Anti-hypertensive agents inhibit in vivo the formation of advanced glycation end products and improve renal damage in a type 2 diabetic nephropathy rat model." *J Am Soc Nephrol.*;14:1212-122, 2003
83. Momma, H, et al. "Skin advanced glycation end product accumulation and muscle strength among adult men." *European journal of applied physiology* 111.7: 1545-1552, 2011
84. Monami, M, et al. "Skin autofluorescence in type 2 diabetes: beyond blood glucose." *Diabetes research and clinical practice* 79.1: 56-60, 2008
85. Monnier, et al. "Relation between complications of type 1 diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence." *N. Eng. J. Med.*, 314, 403-408, 1986

86. Moran, C, et al. "Brain Atrophy in Type 2 Diabetes." *Diabetes care* 36.12: 4036-4042, 2013
87. Mosekilde, L, "Vitamin D and the elderly." *Clin Endocrinol (Oxf)* 62(3):265–81, 2005
88. Mulder, DJ, et al. "Skin autofluorescence is elevated in patients with stable coronary artery disease and is associated with serum levels of neopterin and the soluble receptor for advanced glycation end products." *Atherosclerosis* 197.1: 217-223, 2008
89. Mulder, DJ, Van de Water, T, Lutgers, HL, et al. „Skin autofluorescence, a novel marker for glycemc and oxidative stress-derived advanced glycation endproducts: an overview of current clinical studies, evidence, and limitations." *Diabetes Technol Ther.* 8:523-535, 2006
90. Mulder, DJ, "Skin autofluorescence in cardiovascular disease: a non-invasive approach for assessing inflammatory and oxidative stress." Diss. University of Groningen, 2007
91. Münch G, Keis, R, Wessels, A, et al. „Determination of advanced glycation end products in Serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA." *Eur J Clin Chem Biochem.*; 35(9):669-77, 1997
92. Nangaku, M, et al. "Anti-hypertensive agents inhibit in vivo the formation of advanced glycation end products and improve renal damage in a type 2 diabetic nephropathy rat model." *Journal of the American Society of Nephrology* 14.5: 1212-1222, 2003
93. Nangaku, M, Miyata, T, Sada, T, et al. „Anti-hypertensive agents inhibit in vivo the formation of advanced glycation end products and improve renal damage in a type 2 diabetic nephropathy rat model." *J Am Soc Nephrol.*; 14:1212-122, 2003
94. Nawroth, et al. „Nichtenzymatische Glykierung und oxidativer Stress bei chronischen Erkrankungen und Diabetes mellitus." *Medizinische Klinik*; 94: 29–38, 1999
95. Nigro, C, et al. "Methylglyoxal impairs endothelial insulin sensitivity both in vitro and in vivo." *Diabetologia* 57.7: 1485-1494, 2014
96. Norman, AW, et al. "Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin." *Science* 209.4458: 823-825, 1980

97. Odetti, P, et al. "Plasma advanced glycosylation end-products in maintenance haemodialysis patients." *Nephrology Dialysis Transplantation* 10.11: 2110-2113, 1995
98. Palimeri, S, et al. "Current perspectives on the health risks associated with the consumption of advanced glycation end products: recommendations for dietary management." *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 8, 415, 2015
99. Palomer, X, et al. "Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus." *Diabetes, Obesity and Metabolism* 10.3: 185-197, 2008
100. Pepe, J, Romagnoli, E, Nofroni, I, et al. "Vitamin D status as the major factor determining the circulating levels of parathyroid hormone: a study in normal subjects." *Osteoporos Int.* 16:805-812., 2005
101. Peppia, M, et al. "Adverse effects of dietary glycotoxins on wound healing in genetically diabetic mice." *Diabetes* 52.11: 2805-2813, 2003
102. Peppia, M, et al. "Fetal or neonatal low-glycotxin environment prevents autoimmune diabetes in NOD mice." *Diabetes* 52.6: 1441-1448, 2003
103. Piccolo, BD, et al. "Association between subcutaneous white adipose tissue and serum 25-hydroxyvitamin D in overweight and obese adults." *Nutrients* 5.9: 3352-3366, 2013
104. Pilz, S, et al. "Low vitamin D levels predict stroke in patients referred to coronary angiography." *Stroke* 39.9: 2611-2613, 2008
105. Pittas, AG, et al. "The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92.6: 2017-2029, 2007
106. Pludowski, P, et al. "Vitamin D status in central Europe." *International Journal of Endocrinology* 2014
107. Quade-Lyssy, P, Kanarek, AM, Baiersdorfer, M, et al. "Statins stimulate the production of a soluble form of the receptor for advanced glycation end products." *J Lipid Res.*; 54:3052-3061, 2013
108. Reichrath J. "Vitamin D and the skin: an ancient friend, revisited." *Exp Dermatol.*; 16(7):618–25, 2007
109. Reid, D, et al. "The relation between acute changes in the systemic inflammatory response and plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations after

- elective knee arthroplasty." *The American journal of clinical nutrition* 93.5: 1006-1011, 2011
110. Rostand, SG. "Ultraviolet light may contribute to geographic and racial blood pressure differences." *Hypertension*; 30:150-6, 1997
 111. Salum, E, et al. "Vitamin D reduces deposition of advanced glycation end-products in the aortic wall and systemic oxidative stress in diabetic rats." *Diabetes research and clinical practice* 100.2: 243-249, 2013
 112. Sandu, O, et al. "Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotxin intake." *Diabetes* 54.8 (2005): 2314-2319.
 113. Sano, H, et al. "Insulin enhances macrophage scavenger receptor-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products." *Journal of Biological Chemistry* 273.15: 8630-8637, 1998
 114. Sathyapalan, T, et al. "The effect of atorvastatin in patients with polycystic ovary syndrome: a randomized double-blind placebo-controlled study." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94.1: 103-108, 2009
 115. Schupp, N, et al. "Genotoxicity of advanced glycation end products: involvement of oxidative stress and of angiotensin II type 1 receptors." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043.1: 685-695, 2005
 116. Scragg, R, Khaw, KT, Murphy, S, "Effect of winter oral vitamin D3 supplementation on cardiovascular risk factors in elderly adults." *European Journal of Clinical Nutrition*, 49, 640–646, 1995
 117. Scragg, R, Sowers, MF, Bell, C, "Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey." *American journal of hypertension* 20.7: 713-719, 2007
 118. Sebekova, K, Gazdikova, K, Syrova, D, et al. "Effects of ramipril in nondiabetic nephropathy: improved parameters of oxidative stress and potential modulation of advanced glycation end products." *J Hum Hypertens.*;17:265-270, 2003
 119. Šebeková, K, et al. "Genomic damage and malignancy in end-stage renal failure: do advanced glycation end products contribute?" *Kidney and Blood Pressure Research* 30.1: 56-66, 2007
 120. Seida, JC, et al. "Clinical review: effect of vitamin D3 supplementation on improving glucose homeostasis and preventing diabetes: a systematic review

- and meta-analysis." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 99.10: 3551, 2014
121. Škrha, J, et al. "Skin autofluorescence relates to soluble receptor for advanced glycation end-products and albuminuria in diabetes mellitus." *Journal of diabetes research* 2013
 122. Smedsrod, B, Melkko, J, Araki, N, et al. "Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells." *Biochem J.*; 322(Pt 2): 567–573, 1997
 123. Song, Y, et al. "Blood 25-hydroxy vitamin D levels and incident type 2 diabetes." *Diabetes care* 36.5 (2013): 1422-1428, 2013
 124. Stirban, A, „Die Bedeutung von AGE und ROS bei Atherosklerose.“ *Herz*; 35: 170-180. 8, 2010
 125. Talmor, Y, et al. "Calcitriol blunts the deleterious impact of advanced glycation end products on endothelial cells." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 294.5: F1059-F1064, 2008
 126. Thomas, L, „Labor und Diagnose – Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik.“ 5. Auflage, TH-Books
 127. Thornalley, PJ, "Formation of Glyoxal, methylglyoxal and 3- DG in the Glycation of Proteins." *Biochem J*; 344: 109-116, 1999
 128. Uribarri, J, et al. "Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet." *Journal of the American Dietetic Association* 110.6: 911-916, 2010
 129. Wang, Thomas J., et al. "Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease." *Circulation* 117.4: 503-511, 2008
 130. Watson, KE, et al. "Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification." *Circulation* 96.6: 1755-1760, 1997
 131. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen hoa T, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol.*; 161 (5):2524-2532, 1998
 132. Witko-Sarsat, V, Friedlander, M, Nguyen KT, et al. „Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure.“ *J Immunol.*; 161:2524-2532, 1998

133. Wortsman, et al. "Decreased bioavailability of Vitamin D in obesity." *Am J Clin Nutr*, 72:690-3, 2000
134. Yue, X, Hu, H, Koetsier, M, et al. "Reference values for the Chinese population of skin autofluorescence as a marker of advanced glycation end products accumulated in tissue." *Diabet Med.*; 28:818-823, 2011
135. Zheng, F, et al. "Prevention of diabetic nephropathy in mice by a diet low in glycoxidation products." *Diabetes/metabolism research and reviews* 18.3: 224-237, 2002
136. Zittermann, A, "Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease." *Prog Biophys Mol Biol*; 92-48, 2006
137. Zittermann, A, Schleithoff, SS, Tenderich, G, et al. "Low vitamin D status: a contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure?" *J Am Coll Cardiol*; 41:105-12, 2003
138. Zoppini, G, et al. "Glycated haemoglobin is inversely related to serum vitamin D levels in type 2 diabetic patients." *Plos one* 8.12: e82733, 2013

Abbildung 1: Aufbau AGE Reader.....	15
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktionsweise des AGE-Readers	16
Abbildung 3: Korrelation zwischen Hautautofluoreszenz (SAF) und Alter (Jahre), (NS-NT = normotensiver Nichtraucher, NS-HT = hypertensiver Nichtraucher, S-NT = normotensiver Raucher, S-HT = hypertensiver Raucher).....	22
Abbildung 4: Korrelation zwischen Alter und Plasma-AGE assoziierter Fluoreszenz (AGE-FI), (NS = Nichtraucher, S = Raucher).....	23
Abbildung 5: Beziehung zwischen Haut-Autofluoreszenz (SAF) und Plasma Vitamin D Konzentration in der Gesamtgruppe (NS-NT = normotensiver Nichtraucher, NS-HT = hypertensiver Nichtraucher, S-NT = normotensiver Raucher, S-HT = hypertensiver Raucher)	25
Abbildung 6: Beziehung zwischen Plasma AGE assoziierter Fluoreszenz (AGE-FI) und Vitamin D-Konzentration (S = Raucher, NS = Nichtraucher).....	26
Abbildung 7: (a) Korrelation zwischen Plasma AGE assoziierter Fluoreszenz (AGE-FI) und Konzentration von soluble vascular protein-1 (sVAP-1) und (b) inverse Korrelation zwischen Vitamin D3 und sVAP-1 bei Rauchern	26

Abbildung 8: Vitamin D-Konzentration bei Kontrollen, Gesamtdiabetiker, Typ1- und Typ2-Diabetiker (Median, Interquartilsabstand, 95% Konfidenzintervall, Punkte repräsentieren Ausreißer)	30
Abbildung 9: Verhalten von SAF und Vitamin D bei Typ 1- und 2-Diabetikern	32
Abbildung 10: Verhalten von Vitamin D und SAF bei Kontrollen.....	32
Abbildung 11: Score Scatter Plot von Kontrollen mit insuffizienten vs. suffizienten Vitamin D-Siegeln im OPLS-DA-Modell, (grün = VitD-suff. Kontrollen, blau = VitD-insuff. Kontrollen).....	33
Abbildung 12: Loading Scatter Plot von Kontrollen mit insuffizienten vs. suffizienten Vitamin D-Spiegeln, suffiziente Probanden sind links, insuffiziente Probanden rechts aufgeführt.....	34
Abbildung 13: VIP Plot von Kontrollen	34
Abbildung 14: Score Scatter Plot von Diabetikern mit Vitamin D –Mangel (ROT) und mit suffizienten Spiegeln (GELB).....	35
Abbildung 15: Loading Scatter Plot von Diabetikern mit Vitamin D –Mangel und mit suffizienten Spiegeln.....	35
Abbildung 16: VIP Plot von Diabetikern	36
Abbildung 17: Regressionsanalyse von $\ln(\text{hsCRP}/\text{SAF})$ über 25(OH)D bei Typ 1- und 2-Diabetikern	37
Abbildung 18: Regressionsanalyse von $\ln(\text{hsCRP}/\text{SAF})$ über 25(OH)D bei Kontrollen	37
Abbildung 19: Regression von $\ln(\text{sVAP-1}/\text{SAF})$ über 25(OH)D bei Typ1- und 2-Diabetikern.....	39
Abbildung 20: Regression von $\ln(\text{sVAP-1}/\text{SAF})$ über 25(OH)D bei Kontrollen	40
Abbildung 21: Altersabhängiger Anstieg von AGE-FI bei Typ 1 und 2-Diabetikern ..	41
Abbildung 22: Altersabhängiger Anstieg von AGE-FI bei Kontrollen.....	41
Abbildung 23: Altersabhängiger Anstieg von SAF Diabetikern	42
Abbildung 24: Altersabhängiger Anstieg von SAF bei Kontrollen	42

Abb. 1: Mulder, DJ, Van de Water, T, Lutgers, HL, et al. „Skin autofluorescence, a novel marker for glycemc and oxidative stress-derived advanced glycation endproducts: an overview of current clinical studies, evidence, and limitations.“ Diabetes Technol Ther. 8:523-535, 2006

Abb. 2: Bedienungsanleitung des AGE-Reader, Firma Diagnoptics - Groningen

Abb. 3 - 7: Stürmer, M., Šebeková, K., Fazeli, G., Bahner, U., Stäb, F., & Heidland, A. „25-Hydroxyvitamin D and advanced glycation endproducts in healthy and hypertensive subjects: are there interactions?“ Journal of Renal Nutrition, 2015

Abb. 8 - 24: Šebeková, K., Stürmer, M., Fazeli, G., Bahner, U., Stäb, F., & Heidland, A. „Is vitamin D deficiency related to accumulation of advanced glycation end products, markers of inflammation, and oxidative stress in diabetic subjects?“ BioMed research international, 2015

25(OH)D:	25-Hydroxyvitamin D (Calcidiol)
AGEs:	Advanced Glycation Endproducts
AGE-FI:	Advanced Glycation Endproducts assoziierte Fluoreszenz
ANOVA:	Analysis of Variance
AOPPs:	Advanced Oxidation Protein Products
AU:	Arbitrary Units
BMI:	Body Mass Index
CML:	N-Carboxymethyllysin
GLM:	Generalisiertes Lineares Modell
HbA1c:	Hämoglobin A1c
GFR:	Glomeruläre Filtrationsrate
hs-CRP:	Hoch sensitives C-reaktives Protein
KHK:	Koronare Herzkrankheit
Ln:	Logarithmus
NF-κB:	Nuclear Factor Kappa-B
OPLS-DA:	Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis
pAVK:	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
RAGE:	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
sRAGE:	Soluble Receptor for Advanced Glycation Endproducts
SAF:	Skin Advanced Glycation Endproducts associated Fluorescence
sVAP-1:	Soluble Vascular Adhesion Protein-1
TGF-β-1:	Transforming Growth Factor-β-1
VIP:	Variables Importance for the Projection

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Udo Bahner für die Überlassung des Themas, sowie die wissenschaftliche Begleitung bei der Durchführung der Studie.

Weiterhin möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. August Heidland für viele gute wissenschaftliche Ratschläge danken.

Frau Professor Katharina Sebekova von der Komenius Universität in Bratislava bin ich für die Durchführung verschiedener blutchemischer Untersuchungen sowie die spezielle statistische Berechnung und Abbildung 11 dankbar.

Den technischen Assistenten der Praxis Dr. Werner Stürmer bin ich wegen ihrer praktischen Mithilfe bei der Durchführung dieser Studie ebenfalls zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt auch den früheren Wegbereitern des AGE-Reader Projektes aus der Dermatologischen Universitätshautklinik Würzburg, Herrn Professor Peter Friedl, jetzt Medical Center Nijmegen und der früheren Direktorin, Frau Prof. Eva-Bettina Bröcker.

Schlussendlich möchte ich meiner Familie danken, die mir mit ihrer Liebe und Unterstützung die Fertigstellung dieser Dissertation ermöglicht hat.

LEBENS LAUF

Zur Person

Michael Stürmer

Geboren am 25.11.1982

in Würzburg

Arbeitsstellen:

Seit Januar 2019 Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie in der Klinik für Unfallchirurgie/Orthopädie am Alfried-Krupp-Krankenhaus

Seit September 2015 Assistenzarzt in der Weiterbildung zum Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie in der Klinik für Unfallchirurgie/Orthopädie am Alfried-Krupp-Krankenhaus in Essen

2012 - 2015 Assistenzarzt in der Weiterbildung zum Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie in der Klinik für Unfallchirurgie/Orthopädie am Universitätsklinikum in Essen

Studium:

2005-2011 Studium der Humanmedizin an der Universität Duisburg- Essen mit Erteilung der Approbation im Januar 2012

Schulische und berufliche Ausbildung:

Schulbildung:

1999 – 2003 Röntgen Gymnasium Würzburg mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

1995 – 1999 Wolffskeel Realschule mit Abschluss der mittleren Reife

1989 – 1995 Grund- und Teilhauptschule Lengfeld

