



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

**Bestimmung von Vitamin D:
Bedeutung für eine patientenspezifische Therapie**

verfasst von / submitted by

Christoph Strand

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2020 / Vienna, 2020

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr. Walter Jäger

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ. Prof. Mag. Dr. Walter Jäger, der mir die Durchführung dieser Arbeit am Department ermöglichte. Nicht weniger Dank gebührt Frau Mag. Dr. Alexandra Maier-Salamon für die geduldige Betreuung des Arbeitsprozesses.

Große Dankbarkeit gebührt auch meinen Eltern und Geschwistern für ihre bedingungslose Unterstützung bei der Entstehung der Arbeit.

Den Mitarbeitern der Schutzengel-Apotheke, meiner Familie und Florian Strasser sei für die Teilnahme an der praktischen Testreihe herzlich gedankt!

Großer Dank geht auch an Petra Köfinger für die Unterstützung bei der Suche meines Diplomarbeitsplatzes und zahlreichen Freunden, die mir während des Studiums und bei der Verfassung der Diplomarbeit zur Seite gestanden sind.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
1 Problemstellung	1
2 Vitamin D	4
2.1 Physiologie von Vitamin D	4
2.1.1 Endogene Synthese	5
2.1.2 Aufnahme über die Nahrung	8
2.1.3 Vitamin D und Knochen	10
2.1.4 Extraskelletale Wirkungen von Vitamin D	11
2.2 VD-Mangel und Toxikologie	12
2.2.1 Einflussfaktoren auf den VD-Spiegel	14
2.2.2 Kritik an Studien zu Vitamin D.....	14
2.2.3 Folgeerkrankungen.....	15
2.2.3.1 Knochenerkrankungen	16
2.2.3.2 Kardiovaskuläre Ereignisse.....	16
2.2.3.3 Infektionen	17
2.2.3.4 Autoimmunerkrankungen.....	18
2.2.3.5 Schwangerschaft.....	19
2.2.3.6 Depression	19
2.2.3.7 Diabetes mellitus Typ 2.....	20
2.2.3.8 Krebs	22
2.2.3.9 Gesamtsterblichkeit.....	23
2.2.4 Toxizität	23
2.3 Therapie des VD-Mangels	24
2.3.1 Zielwerte.....	24
2.3.2 Dosierungsschemata.....	25
3 Analytik	27
3.1 Was wird gemessen und warum?	27
3.2 Verschiedene Testmethoden	28

3.2.1	Competitive Protein Binding Assays	29
3.2.2	High Pressure Liquid Chromatography.....	30
3.2.3	Massenspektrometrie.....	31
3.2.4	Immunoassays	33
3.2.5	Biosensoren	35
3.3	Abwägungen.....	35
3.3.1	Störfaktoren	36
3.3.1.1	VDBP	36
3.3.1.2	Lipophilie	37
3.3.2	Kreuzreaktivitäten	37
3.3.3	Standardisierungsversuche der Testmethoden	40
3.3.4	Qualität der Messwerte.....	41
3.3.5	Kosten.....	41
3.3.6	Aufwand	41
4	Zusammenfassung.....	42
5	Abstract.....	43
	Literaturverzeichnis.....	44

Abkürzungsverzeichnis

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
CBPA	Competitive Protein Binding Assay
CLIA	Chemoluminiszenzimmunoassays
CMIA	Chemiluminescentmicroparticle-Immunoassays
ELISA	Enzyme-linked-Immunoassays
ESI	Elektrospray-Ionisation
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometer
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry
NNT	Numbers needed to treat
RIA	Radioimmunassays
VD	Vitamin D
VDBP	Vitamin-D-bindende Proteine
VDR RXR	Vitamin D receptor-retinoic acid x-receptor
VK	Variationskoeffizienten

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl der Publikationen zu VD oder VD-Supplementierung von 2003 bis 2017.....	1
Abbildung 2: Strukturen von $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3 (1,25D3) und $1\alpha,25$ - Dihydroxyvitamin D2 (1,25D2)	5
Abbildung 3: Fotochemie von Vitamin D3.....	6
Abbildung 4: Abhängigkeit der Fotochemie von Vitamin D3 von der Wellenlänge der UV-Strahlung	7
Abbildung 5: Vitamin-D-Rezeptor gebunden an DNA.....	11
Abbildung 6: Globale Übersicht über den Status der Vitamin-D-(Mangel)- Versorgung	12
Abbildung 7: Inverse Relation zwischen Vitamin-D-Status und Hamilton- Depressions-Skala bei Menschen mit Post-Schlaganfall-Depression	20
Abbildung 8: LC-MS/MS-Plot wichtiger VD-Metaboliten	31
Abbildung 9: Aufbau des 25-Hydroxyvitamins D2/D	32
Abbildung 10: Schlüsselschritte von kompetitiven und nicht kompetitiven Vitamin D-Assays.....	34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Vitamin-D-Gehalt verschiedener Lebensmittel)	9
Tabelle 2: Grenzwerte der Vitamin-D-Versorgung.....	25
Tabelle 3: Kreuzreaktivitäten der Testmethoden im Vergleich	39
Tabelle 4: Konzentrationen (ng/ml) der verschiedenen VD Metaboliten in 4 zertifizierten Standardlösungen	39
Tabelle 5: Vergleich der ermittelten VD-Gesamtkonzentration der 4 Standardlösungen durch 3 Methoden in ng/mL.....	39
Tabelle 6: Vergleich der angegebenen und gemessenen mittleren Kreuzreaktivitäten zweier Immunoassays	40

1 Problemstellung

Ein Mangel an Vitamin D (VD) korreliert nachgewiesenermaßen mit zahlreichen Erkrankungen. Darunter fallen nicht nur Knochenerkrankungen, die diesbezüglich lange Zeit im Fokus der Forschung standen, sondern beispielsweise auch Diabetes, verschiedene Infektionen, einige Ausprägungen von Depressionen und vieles mehr. Das dahin gehende Forschungsinteresse wurde insbesondere geweckt, da durch die Entdeckung von VD-Rezeptoren im gesamten Körper und die Beobachtung von Korrelationen niedriger VD-Spiegel mit zahlreichen Erkrankungen ein ganz praxisrelevanter Anhaltspunkt für weitere Forschung gegeben war. In den letzten 10 bis 15 Jahren ist nicht nur in der Populärmedizin, sondern auch im Bereich der wissenschaftlichen Publikationen ein regelrechter Boom des Themas Vitamin D zu beobachten, der sich unter anderem in immer mehr Supplementationsstudien widerspiegelt. Wie signifikant die Anzahl der Publikationen rund um das Thema Vitamin D seit 2003 gestiegen ist, zeigt die nachfolgende Abbildung 1.

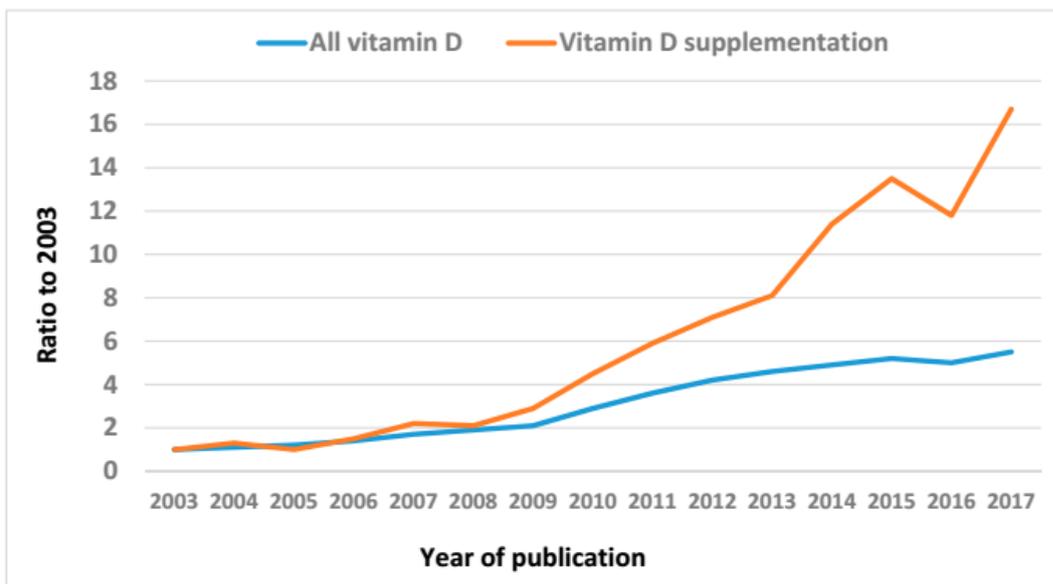


Abbildung 1: Anzahl der Publikationen zu VD oder VD-Supplementierung von 2003 bis 2017 (Scragg, 2018)

Ein zentraler Gesichtspunkt dieser Studien ist dabei nicht nur der Zusammenhang zwischen verabreichten VD-Dosierungen und den daraus resultierenden Effekten, sondern sind auch die tatsächlich erreichten Plasmakonzentrationen, d. h. die Effektivität und Wirksamkeit von supplementiertem Vitamin D (Scragg, 2018). Hierfür sind reproduzierbare, exakte und zuverlässige Messmethoden unabdingbar, die zudem effizient sein müssen, d. h. günstig, rasch und praktikabel in der Durchführung. Diese Erfolgsfaktoren von Messmethoden lassen sich auch außerhalb von wissenschaftlichen Studien für den persönlichen Bedarf

festhalten – auch wer den persönlichen VD-Status (ob aus Interesse oder medizinischer Notwendigkeit) regelmäßig überprüfen will, benötigt dafür zuverlässige und praktikable Lösungen. Es stellt sich die Frage, wieso die Überprüfung des VD-Spiegels überhaupt von Bedeutung ist – hierauf lässt sich schlicht entgegenen, dass dieser durchaus pharmakologische Aussagekraft besitzt, wie bereits angeklungen ist, weshalb die vorliegende Arbeit auch auf Zusammenhänge zwischen VD-Spiegel und pathologischen Zuständen eingehen wird (Kapitel 2.3).

In der Praxis stellen sich diesbezügliche Untersuchungen als herausfordernd dar, weil die Ermittlung der Plasmakonzentration alles andere als unkompliziert ist und große Unterschiede zwischen den Ergebnissen verschiedener Testmethoden bestehen. Die Heterogenität der Methoden geht so weit, dass eine Vergleichbarkeit vieler Studien kaum gegeben ist, was letztlich auch das Festlegen von Referenzwerten erschwert. Erfolgreiche Standardisierungen der Methoden waren lange Zeit nicht vorhanden, mittlerweile können erste Fortschritte verzeichnet werden. Ein bedeutender Grund für unterschiedliche Testergebnisse ist die Tatsache, dass der Begriff Vitamin D eigentlich keine spezifische Substanz, sondern ein Gemisch aus zahlreichen Metaboliten bezeichnet, die sich zumeist nur in geringem Maße unterscheiden. Dies führt einerseits dazu, dass die Messung einer spezifischen Substanz erschwert wird, andererseits wirft es die Frage auf, welche Metaboliten eigentlich gemessen werden sollen. Zudem erschweren individuelle Unterschiede in der Plasmaproteinbindung und andere Einflussfaktoren die VD-Analytik. Die heute gängigsten Methoden ebendieser sind Immunoassays, gefolgt von massenspektroskopischen sowie chromatografischen Methoden und Competitive Protein Binding Assays. Da die Testprinzipien sich wesentlich untereinander unterscheiden, stellt sich die Frage, ob daraus auch Unterschiede in den Messergebnissen resultieren und was deren Ursachen sind. Unbestritten ist, dass, vermutlich nicht zuletzt aus finanziellem Interesse, zahlreiche Bemühungen zur Verbesserung der Analytik bestehen.

Die vorliegende Arbeit möchte sich der Vielfalt der Messmethoden zur Bestimmung der Plasmakonzentration widmen und herausarbeiten, wie sich diese verschiedenen Methoden voneinander unterscheiden. Ziel ist es, auf Grundlage theoretischer Abhandlungen darzustellen, welche der Testmethoden am besten geeignet ist, um die Anforderungen an eine zuverlässige Bestimmung der VD-Konzentration zu erfüllen, indem die Vor- und Nachteile

der einzelnen Methoden gegenübergestellt werden. Neben umsetzungspraktischen Aspekten der einzelnen Testmethoden wird dabei auch auf die Kosten und die Durchsatzmenge der einzelnen Methoden eingegangen. Als empirischer Beitrag zum bestehenden Forschungsdesiderat wird zudem eine Testreihe initiiert, innerhalb derer verschiedene, in Apotheken frei erhältliche Testmethoden geprüft werden, wobei unter anderem deren Reproduzierbarkeit von großem Interesse ist. Um diesen forschungspraktischen Ausführungen eine fundierte theoretische Grundlage voranzustellen, wird die Arbeit sich zunächst der Physiologie von Vitamin D widmen und dessen Wirkung auf den menschlichen Körper darstellen. Außerdem wird veranschaulicht, welche Folgen ein Mangel an Vitamin D für den menschlichen Körper hat, woraus sich letztlich die Relevanz einer ausreichenden VD-Versorgung ergibt.

2 Vitamin D

Das nachfolgende Kapitel soll zunächst das Vitamin D als solches darstellen sowie auf dessen Physiologie eingehen. Anschließend wird die Wirkung von Vitamin D im menschlichen Körper untersucht sowie dargestellt, welche pathologischen Entwicklungen aus einem Mangel an Vitamin D resultieren können.

Was allgemeinsprachlich als *Vitamin D* bezeichnet wird, bezeichnet in der Biochemie eine zu den Secosteroiden gehörende Gruppe von fettlöslichen Vitaminen. Diese spielen vor allem für den Calciumstoffwechsel eine bedeutende Rolle, sind jedoch auch in anderen Körpervorgängen ganz maßgeblich beteiligt (Yin et al., 2019). Ob Vitamin D überhaupt als Vitamin im traditionellen Sinne bezeichnet werden kann, ist zumindest der ganz klassischen Definition nach umstritten – die Kategorisierung als Vitamin setzt voraus, dass der menschliche Organismus den entsprechenden Stoff nicht in ausreichender Menge, also bedarfsdeckend, selbst synthetisieren kann (Dilg, 2005). Die bedarfsdeckende Synthetisierung von Vitamin D ist jedoch durchaus möglich. So können die physiologisch wirksamsten Vertreter Calcitriol (Vitamin D₂) und Cholecalciferol (Vitamin D), deren Struktur in der nachfolgenden Abbildung 2 dargestellt ist, unter Einfluss von UV-B-Strahlung synthetisiert werden, worauf nachfolgend noch näher einzugehen sein wird.

2.1 Physiologie von Vitamin D

Hinsichtlich der Physiologie der D-Vitamine muss unterschieden werden zwischen Vitamin D₂, das vom menschlichen Organismus ausschließlich oral durch den Verzehr von Pflanzen und Pilzen aufgenommen wird, und Vitamin D₃, das in der Haut gebildet wird, aber ebenfalls oral aufgenommen werden kann. Der Mensch deckt seinen Bedarf an Calciferol, also der Gesamtheit der D-Vitamine, hauptsächlich durch kutan gebildetes Vitamin D₃ mit einem Anteil von bis zu 95 %.

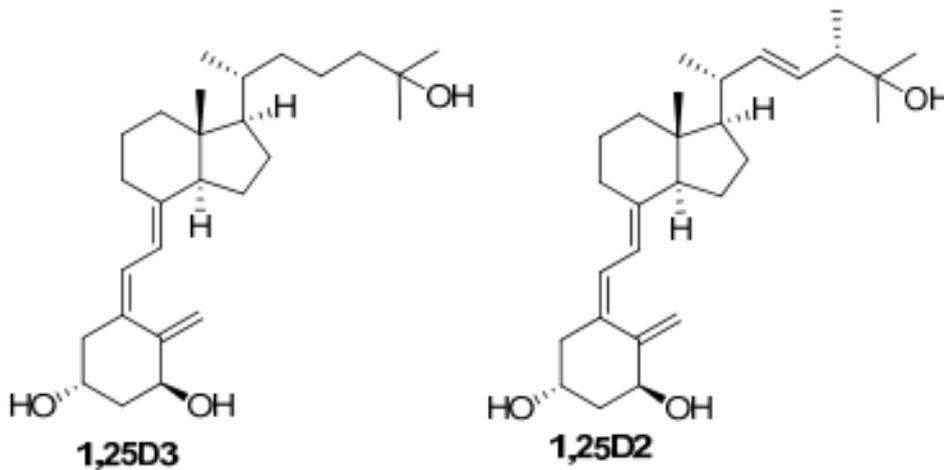


Abbildung 2: Strukturen von 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25D3) und 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D2 (1,25D2) (Nachliely et al., 2016)

2.1.1 Endogene Synthese

Die Synthese dieses kutan gebildeten Vitamin D3 wird in Gang gesetzt, indem UV-B-Strahlung mit einer Wellenlänge von 280 bis 320 nm auf die Haut trifft und die fotochemische Umwandlung von 7-Dehydrocholesterol, dem sogenannten Provitamin D3, in das chemisch instabile Prävitamin D3 in Gang setzt. Dieses wiederum isomerisiert in einer zeit- und temperaturabhängigen Reaktion zu Vitamin D3 (Holick, 2018). Die Umwandlung des 7-Dehydrocholesterol in Prävitamin D3 ist stark davon abhängig, wie die Wellenlänge der UV-Strahlung ausgestaltet ist, beruht also auf externen und durch den Menschen nicht beeinflussbaren Faktoren. Die nachfolgende Abbildung arbeitet die Fotochemie des Vitamin D3 grafisch auf.

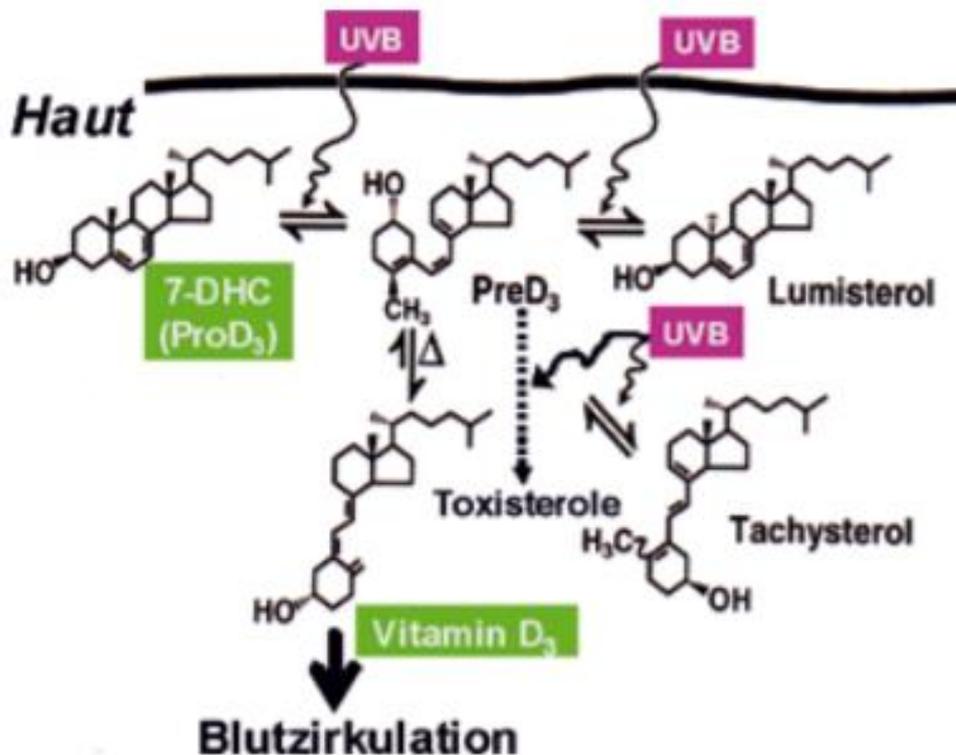


Abbildung 3: Fotochemie von Vitamin D₃ (Shah, 2018)

Für die starke Abhängigkeit der Bildung des Prävitamin D₃ von der Wellenlänge des UV-Lichts lassen sich grundsätzlich drei Einflussfaktoren herausarbeiten:

- (i) Die Fotolyse des 7-Dehydrocholesterol sinkt mit steigender Wellenlänge, da mit ebendieser auch die durch die UV-Strahlung entstehende Energie sinkt.
- (ii) Bei einer zu hohen Wellenlänge von über 300 nm findet sogar eine verminderte Synthese des Vitamins statt, da das Prävitamin D₃ stattdessen in Toxisterole umgewandelt wird.
- (iii) Auch kann es bei höheren Wellenlängen zu einer verminderten Syntheserate kommen, da hohe Wellenlängen die irreversible Fotolyse von Vitamin D₃ zu Suprasterol triggern.

Das Aktionsspektrum der Umwandlung weist dementsprechend ein maximales Potenzial im Bereich von etwa 298 nm auf, wie aus der nachfolgenden Abbildung zu entnehmen ist.

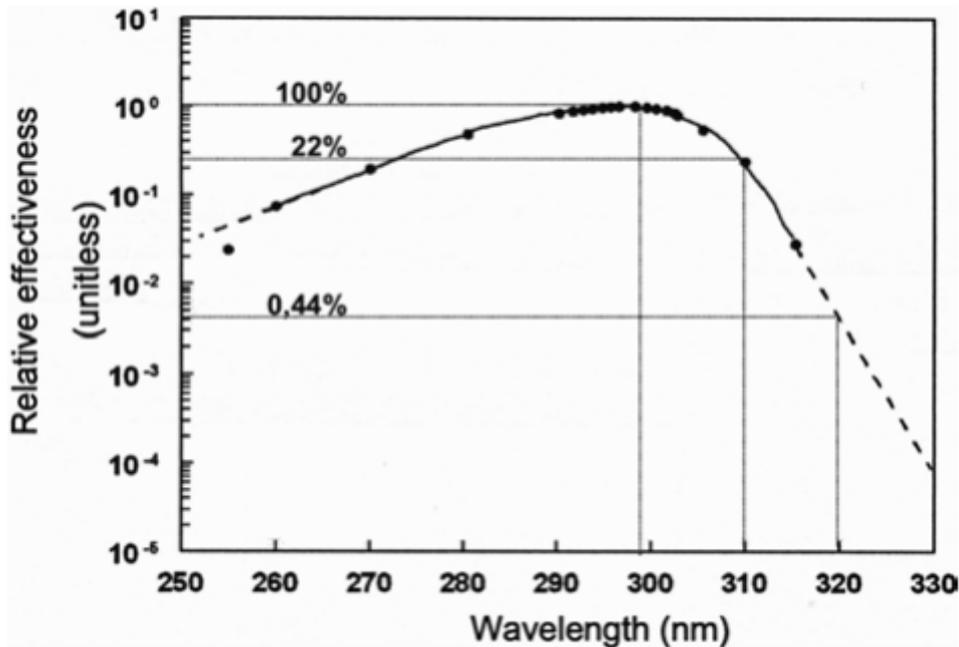


Abbildung 4: Abhängigkeit der Fotochemie von Vitamin D3 von der Wellenlänge der UV-Strahlung (Lehmann 2012)

Neben den äußeren Faktoren, die soeben bereits eingegrenzt wurden und die neben der Ausprägung der UV-Strahlung auch von der allgemeinen Wetterlage und der Bewölkung, dem Einfallswinkel der Sonne, dem Ozongehalt der Luft und etwaiger Luftverschmutzung beeinflusst werden, lassen sich auch individuelle Faktoren eruieren, die darauf einwirken, wie effizient die kutane Synthese von Vitamin D3 abläuft. Dazu gehören etwa die Körpertemperatur, der Hauttyp und das Alter, Körpergewicht und Kleidungsgewohnheit, der (Nicht-)Gebrauch von Sonnenschutzmitteln, aber auch die kutan bereits vorhandene Konzentration von 7-Dehydrocholesterol. Fraglich ist an dieser Stelle somit, woraus sich die kutane Konzentration von 7-Dehydrocholesterol ergibt, das schließlich die Ausgangssubstanz für die fotochemische Synthese darstellt und ohne das somit kein Vitamin D3 synthetisiert werden kann. Dieses wird auf Grundlage einer mehrstufigen Synthese direkt kutan gebildet.

Der gesamte Prozess findet in der Plasmamembran von Hautzellen statt, wovon das entstandene Vitamin D3 schließlich in den extrazellulären Raum wandert und an VDBP gebunden zur Leber transportiert wird und weiteren Reaktionen unterliegt (Karras et al., 2018).

Der Transport von 25(OH)VD im Blutplasma erfolgt größtenteils gebunden an VDBP, dem Vitamin-D-Binding-Protein. In weit geringerem Maße ist 25(OH)VD an Albumin gebunden. Nur 0,03 Prozent liegt in ungebundener Form vor. Das Protein hat auch Affinität zu 1,25-(OH)VD, die aber aufgrund der zweiten Hydroxy-Gruppe wesentlich geringer ist (Tsuprykov et al., 2018).

2.1.2 Aufnahme über die Nahrung

Wie bereits angeklungen ist, unterscheidet sich die Physiologie der D-Vitamine dahin gehend, dass Vitamin D3 kutan gebildet werden kann und dementsprechend nicht (ausschließlich) über die Nahrung zugeführt werden muss. Anders gestaltet es sich jedoch bei Vitamin D2, das vom menschlichen Organismus ausschließlich oral durch den Verzehr von Pflanzen und Pilzen aufgenommen wird.

Damit diese orale Aufnahme überhaupt möglich ist, muss natürlich zunächst Vitamin D2 in den zu verzehrenden Pflanzen und Pilzen enthalten sein. Die Vitamin-D2-Produktion funktioniert dort ähnlich wie beim Menschen, indem aus Ergosterol unter der Einwirkung von UV-B-Strahlung der Sonne das Vitamin gebildet wird. Wie bei der Bildung von Vitamin D3 wird erst der B-Ring des Ergosterols durch UV-Strahlung aufgebrochen, die – wie in Kapitel 2.1.1 bereits dargelegt – in einem bestimmten Längenbereich zu verorten sein muss. Das so entstandene Prävitamin D2 isomert unter Wärmeeinwirkung schließlich zu Vitamin D2 und wird vom Menschen über die Nahrung aufgenommen (Bikle, 2014).

Die nachfolgenden Erläuterungen beziehen sich sowohl auf Vitamin D3 als auch auf Vitamin D2, da diese sich hinsichtlich der Aufnahme über die Nahrung nur unwesentlich unterscheiden, insbesondere zunächst dadurch, dass Vitamin D2 eben nur über die Nahrung aufgenommen werden kann, Vitamin D3 jedoch nur supplementiert werden muss, wenn beispielsweise die in der Sonne verbrachte Zeit nicht ausreichend war für eine optimale Vitamin-D3-Synthese (Bikle, 2014).

Als Empfehlung für die Menge an oral aufgenommenem Vitamin D werden 10 bis 15 µg täglich für einen Erwachsenen veranschlagt, wobei diese Werte „auf der Annahme minimaler Sonneneinstrahlung und folglich begrenzter Mengen an vom Körper selbst gebildetem Vitamin D“ (efsa, 2016) basieren und anzupassend sind, sofern die entsprechende Person regelmäßig Zugang zu optimalen Sonnenbedingungen hat.

Die nachfolgende Tabelle gibt zunächst einleitend einen Überblick darüber, in welchen Lebensmitteln welche Menge an Vitamin D gefunden und aufgenommen werden kann.

Tabelle 1 Vitamin-D-Gehalt verschiedener Lebensmittel (Souci, 2016)

Nahrungsmittel	Vitamin-D-Gehalt in Mikrogramm pro 100 g
Hering	7,8–25
Lachs	16
Hühnereigelb	5,6
Makrele	4
Margarine	2,5–7,5
Pfifferlinge	2,5–7,5
Eierschwammerl	2,1
Champignons	1,9
Rinderleber	1,2
Lebertran	170

Die der Tabelle zu entnehmenden Daten machen deutlich, dass die Menge an Vitamin D in den einzelnen Lebensmitteln erheblich schwankt, je nach Ernährungsweise also keineswegs automatisch eine gute Versorgung mit ebendiesen Vitaminkomplexen sichergestellt ist – mit verheerenden Folgen für die Gesundheit, wie später noch dargestellt werden wird. So zeigt sich unter anderem, dass besonders Lebensmittel, die eben gerade nicht in großen Mengen verzehrt werden, hervorragende Vitamin-D-Lieferanten sind. So kann als idealtypischer Vitamin-D-Lieferant Lebertran angeführt werden – dieser wird aber üblicherweise nicht in größeren Mengen verzehrt, sodass sich die praktische Bedeutung dieses verhältnismäßig hohen Vitamin-D-Haushalts in Grenzen hält. Insbesondere Fisch, vor allem Arten, die sich durch einen hohen Fettgehalt auszeichnen, und vereinzelte Milchprodukte sowie Pilze sind dementsprechend Bestandteil einer Ernährung, die eine ausrei-

chende Versorgung mit Vitamin D sicherzustellen versucht. In den modernen Industriestaaten wird einem Vitamin-D-Mangel, der sich unter anderem durch vermehrten Aufenthalt in geschlossenen Räumen ergibt, aber auch durch supplementierte Lebensmittel begegnet. So gibt es beispielsweise Margarine oder verschiedene Milchgetränke, denen Vitamin D zugesetzt wird.

2.1.3 Vitamin D und Knochen

Im menschlichen Organismus spielt Vitamin D insbesondere eine Rolle für den Knochenstoffwechsel. In diesem kann beobachtet werden, dass bei einer sinkenden Calcium-Plasmakonzentration durch die Nebenschilddrüse Parathormon freigesetzt wird. Dieses Nebenschilddrüsenhormon ist vorrangig für die Verteilung bzw. Verlagerung von Calcium zuständig und kontrolliert die Calciumausscheidung. Eine Regulierung des Calciumhaushalts nach oben und unten findet also stets unter Einbezug von Parathormon statt. Sinkt die Calciumproduktion, stimuliert es die renale VD-Hydroxylase, was zu einer vermehrten 1,25(OH)₂-Produktion führt und den Calciumhaushalt wieder auf einem möglichst optimalen Niveau stabilisiert (Gallieni et al., 2009).

1,25(OH)₂VD führt durch Bindung in Intestinalzellen zur Expression von Calcium-Binding-Protein, das wiederum den Transport von Calcium aus dem Intestinalraum durch die Zelle Richtung Extrazellularraum reguliert und somit die Versorgung des Organismus mit Calcium verbessert (Audran, 1985). In den Osteoblasten stimuliert Vitamin D die Produktion von RANKL (Receptor Activator Nuclear Factor- κ B Ligand), welcher an den RANK-Rezeptor bindet und dadurch einerseits die Produktion von Osteoklasten, andererseits die Aktivierung von ruhenden Osteoklasten aktiviert. Diese sind wiederum gemeinsam mit Parathormon für die Bereitstellung von Calcium aus dem Knochen zuständig (Audran, 1985).

Ein funktionaler Knochenstoffwechsel ist im menschlichen Organismus insbesondere in den Wachstumsphasen der Kindheit und Jugend von hoher Bedeutung – funktioniert dieser nicht optimal, sind beispielsweise rachitische Knochenverformungen die Folge. Der Prozess des Aufbaus und Wachstums des menschlichen Skeletts bis ins Erwachsenenalter wird als Modeling bezeichnet. Darüber hinaus ist aber auch im Erwachsenenalter ein Knochenstoffwechsel aktiv, der sich nun dem Remodeling widmet, indem er etwa den Knochenmasseverlust verhindert, Brüche ausheilt und Ähnliches. Auch wenn Calcium als zent-

rales Mineral des menschlichen Körpers gewissermaßen die Hauptrolle im Knochenstoffwechsel spielt, wird ebendieser erst durch eine optimale Versorgung mit Vitamin D ermöglicht (Gallieni et al., 2009).

2.1.4 Extraskellettale Wirkungen von Vitamin D

Doch auch außerhalb des Knochen- bzw. Calciumstoffwechsels spielt Vitamin D eine entscheidende Rolle im menschlichen Organismus, was unter anderem die Vielzahl der toxiologischen Phänomene zeigt, die bei einem Vitamin-D-Mangel zu beobachten sind. Da auf diese in Kapitel 2.2 noch im Detail einzugehen sein wird, soll an dieser Stelle nur ein knapper Einblick in die extraskellettalen Wirkungen von Vitamin D gegeben werden.

Die nachfolgende Abbildung zeigt einen an DNA gebundenen Vitamin-D-Rezeptor, wobei die magentafarbene Struktur das Vitamin D darstellt.

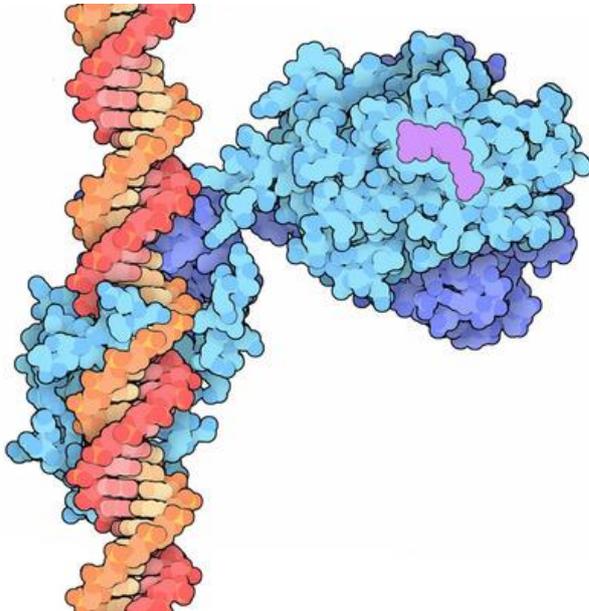


Abbildung 5: Vitamin-D-Rezeptor gebunden an DNA (Goodsell, 2012)

Die DNA dient als Träger aller Informationen im menschlichen Organismus – dass Vitamin-D-Rezeptoren an ebendiese gebunden sind, verdeutlicht dementsprechend, dass sie ubiquitär in den verschiedensten Geweben aufzufinden sind und keineswegs nur im Knochenstoffwechsel eine Rolle spielen. So ließen sich beispielsweise Wirkungen auf die Funktionsweise und das Gesunderhalten des Herzmuskels, die Immunzellen sowie Zellen, die für die kardiovaskuläre Homöostase mitverantwortlich sind, beobachten und auch innerhalb von Zellen, die an der sexuellen Produktion beteiligt sind, ließ sich die Einflusnahme von Vitamin D mittlerweile belegen (Bouillon, 2018).

Ohne auf die dargestellten Werte im Detail eingehen zu wollen, sei zunächst erwähnt, dass ein Vitamin-D-Wert von unter 50 nmol/l als Vitamin-D-Mangel bezeichnet werden kann – Näheres zu den Grenzwerten kann Kapitel 2.4 entnommen werden. In der Grafik ist dieser Bereich durch die schwarzen und dunkelgrauen Felder gekennzeichnet, deren prozentualer Anteil in nahezu jedem Land besorgniserregend hoch ist. Eine Unterversorgung kann bis zu einem Wert von 80 nmol/l angenommen werden, weshalb sich die Grafik dahin gehend als ungenau erweist – so können die hier als unproblematisch markierten hellgrauen Bereiche weiterhin Stichprobenanteile mit einer (leichten) Vitamin-D-Unterversorgung enthalten. Die Normal- und Optimalwerte sind im Bereich von 80 bis 150 nmol/l zu verorten, erlauben also schon eine relativ große Spannbreite an Werten, die dennoch von einem hohen Anteil der globalen Bevölkerung nicht erreicht wird (Palacios & Gonzalez, 2014).

Deutlich wird bei Betrachtung der Grafik auch, dass es insbesondere westliche Industriestaaten sind, deren Stichproben auf eine (drastische) Mangelversorgung mit Vitamin D hindeuten. Dies kann unter anderem damit begründet werden, dass viele Menschen in der modernen Arbeits- und Lebenswelt nicht mehr ausreichend Zeit im Freien verbringen, um ausreichend Vitamin D unter UV-B-Strahlung zu synthetisieren (Nair & Maseeh, 2012). Auch Sonnenstunden in den jeweiligen klimatischen Bedingungen spielen selbstverständlich eine Rolle. So wurde beispielsweise im Rahmen einer Studie in Deutschland gemessen, dass im Sommer ein Anteil von 8 % der Gesamtbevölkerung eine Vitamin-D-Konzentration im Blut von unter 12 ng/ml aufweist, was einer absoluten Mangelversorgung entspricht und, Bezug nehmend auf die Grafik, dem Bereich von unter 50 nmol/l zuzuordnen ist. Im Winter stieg der Anteil der drastisch mangelversorgten Personen jedoch auf 52 %, da eine ausreichende Sonneneinstrahlung nicht mehr gegeben ist und der Stellenwert einer ausgewogenen und Vitamin-D-reichen Ernährung dementsprechend zunimmt – wird diese Veränderung im Umfeld nicht in eine Veränderung der Ernährungsgewohnheiten überführt, tritt eine Mangelversorgung ein (Smollich, 2019).

Ähnlich erschreckende Werte zeigte auch eine rezente Studie im österreichischen Raum, bei der herausgefunden wurde, dass 14 % der erwachsenen Bevölkerung eine Vitamin-D-Konzentration im Blut von unter 10 ng/ml aufweisen und weitere immerhin 24 % bei einem Wert von bis zu 20 ng/ml zu verorten sind. Unter Seniorinnen und Senioren steigerten sich diese Werte sogar noch auf 22 bzw. 44 % (Empfehlungen Vorsorgeuntersuchung, 2019).

2.2.1 Einflussfaktoren auf den VD-Spiegel

Welche Faktoren den Vitamin-D-Spiegel im menschlichen Organismus beeinflussen, ist im Rahmen der Arbeit bereits angeklungen, soll an dieser Stelle jedoch noch einmal zusammengefasst werden, um anschließend zu möglichen Folgen einer Mangelernährung überleiten zu können.

Zum einen ist die **Quantität der UV-B-Exposition** als zentraler Einflussfaktor auf den Vitamin-D-Spiegel zu benennen. Auch diese lässt sich wieder auf eine Vielzahl verschiedener Faktoren zurückführen, bei denen an erster Stelle die persönlichen Lebensgewohnheiten des Individuums zu nennen sind, also etwa die Ernährung, eine weitgehende Verhüllung der Haut bei Aufenthalt im Freien, die Art der gewählten Kleidung (z. B. engmaschige Stoffe oder dunkle Kleidung, die UV-B-Strahlung in besonders hohem Maße blockiert) oder schlicht die Dauer des Aufenthalts im Freien. Auch Umweltfaktoren wie eine Höhenlage oder die klimatischen Bedingungen vor Ort nehmen Einfluss darauf, welchen Mengen an UV-B-Strahlung ein Mensch ausgesetzt ist (Azrielant & Shoenfeld, 2017).

Auch **körperliche Eigenschaften** beeinflussen den Vitamin-D-Spiegel signifikant. So korreliert etwa eine höhere Körpertemperatur mit einer erhöhten subkutanen Vitamin-D-Produktion. Ein hoher Körperfettanteil geht hingegen mit einem verringerten Versorgungsstatus einher. Auch diverse genetische Dispositionen, die vorliegend nicht im Detail ausgeführt werden können, vor allem aber Nieren- und Lebererkrankungen sowie granulomatöse Erkrankungen bedingen einen verringerten Vitamin-D-Status, da sie meist zu einer Malabsorption führen. Auch Alter und Geschlecht spielen eine zentrale Rolle bei der Vitamin-D-Versorgung (Tsiaras & Weinstock, 2011) – so tendieren etwa postmenopausale Frauen zu einem niedrigeren Status der Vitamin-D-Versorgung, ebenso wie Menschen während der Schwangerschaft (Gröber & Kisters, 2012). Nicht zuletzt konnte auch für eine dunklere Hautfarbe bewiesen werden, dass sie mit einer verminderten Vitamin-D-Korrelation korreliert (Azrielant & Shoenfeld, 2017).

2.2.2 Kritik an Studien zu Vitamin D

Der theoretische Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen einer Literaturdurchsicht erarbeitet, beruht also ausschließlich auf fremder Forschung. Umso wichtiger erscheint es, ebendiese kritisch einzuordnen. Im nachfolgenden Kapitel 2.2.3 soll darauf eingegangen werden, welche Folgeerkrankungen sich aus einer Mangelversorgung mit Vitamin D ergeben können. Um ebendiese Wechselwirkungen zwischen Vitamin-D-Haushalt

und dem Gesundheitszustand bewerten zu können, soll zunächst kurz dargestellt werden, welchen Limitationen Studien zur Vitamin-D-Versorgung und ihren Auswirkungen oftmals unterworfen sind.

So kann zunächst festgehalten werden, dass Studien über die Effekte einer Supplementierung mit Vitamin D zumeist von Beobachtungen hinsichtlich einer Korrelation eines verminderten Vitamin-D-Spiegels mit verschiedenen Erkrankungen inspiriert sind. Oft nur mangelhaft betrachtet wird dabei der Unterschied zwischen Kausalität und Korrelation (Jorde et al., 2016). Es ist beispielsweise möglich, dass gesunde Menschen nicht wegen des hohen Vitamin-D-Spiegels gesund sind, sondern wegen ihres gesunden Lebensstils einen hohen VD-Spiegel haben: Sportliche Menschen verbringen oft mehr Zeit in der Sonne, eine gesunde Ernährung enthält tendenziell mehr Vitamin D (Jorde et al., 2016). In umgekehrter Betrachtung gilt analog: Bei krankheitsbedingten Entzündungsprozessen kann es durch diese ebenso zur Abnahme der Vitamin-D-Werte kommen und dadurch der Eindruck eines kausalen Zusammenhangs zwischen VD und verschiedenen Erkrankungen entstehen, der jedoch nicht tatsächlich kausal sein muss (Autier et al., 2014; Macdonald et al., 2018). Letztlich zeigt diese Limitation auf, in welches komplexe Zusammenspiel im menschlichen Organismus sich Vitamin D einfügt.

Amrein (2019) beklagt auch die mangelnde Aussagekraft vieler Studien zu Vitamin-D-Mangel und Supplementierung und die dadurch sehr uneinheitlichen Schlüsse, die aus ebendiesen gezogen werden: Viele Studien seien Beobachtungsstudien und könnten daher keinen kausalen Zusammenhang feststellen. Ein Großteil der Interventionsstudien sei methodisch unzureichend und hätte zu wenige Menschen mit tatsächlichem Vitamin-D-Mangel eingeschlossen, oder die Studienteilnehmer wären nicht repräsentativ. Ebenso wären teilweise die Vitamin-D-Spiegel nicht ausreichend gemessen worden (Amrein, 2019). Zudem wäre zu bedenken, dass die verabreichten VD-Dosen oder die zeitliche Länge der Studien zu gering sein könnten, um tatsächlich legitime Schlüsse zu ziehen (Jorde et al., 2016). Nicht zuletzt kann eine mangelhafte Standardisierung der Vitamin-D-Testmethoden zu hohen Variationen führen (Macdonald et al., 2018).

2.2.3 Folgeerkrankungen

Nach dieser kritischen Einordnung der Studienlage zum Vitamin-D-Mangel soll nachfolgend auf die möglichen Folgeerkrankungen, die ein solcher nach sich ziehen kann, eingegangen werden. Vitamin-D-Mangel ist als solcher oft asymptomatisch, kann bei längeren

Mangelzuständen aber anhand einer typischen Symptomatik vermutet werden. Dazu zählen etwa Knochenbeschwerden, Muskelschmerzen, chronische Abgeschlagenheit, Arthritisneigung, Muskelschwäche und, vor allem bei älteren Frauen, Schmerzen im unteren Rücken (Bordelon, Ghetu, & Langan, 2009). Um die signifikanten Auswirkungen eines mangelhaften Vitamin-D-Status auf den menschlichen Körper zu verdeutlichen, werden die bekannten Symptompakete nachfolgend näher ausgeführt.

2.2.3.1 Knochenerkrankungen

Die Korrelation zwischen Vitamin-D-Status und muskuloskelettalen Beschwerden ist evident. Studien belegen den positiven Effekt einer Vitamin-D-Supplementierung auf Knochendichte und Osteomalazie bei Menschen mit einem klaren Vitamin-D-Mangel mit Werten bis zu 12 ng/ml. Die Sinnhaftigkeit einer Supplementierung bei höheren Werten ist umstritten (Macdonald et al., 2018).

Eine gängige Empfehlung zur Prävention von Stürzen und Hüftfrakturen ist die Gabe von 800 bis 1.000 IU pro Tag. Bei einer kritischen Betrachtung von vier Metaanalysen zum Thema wird festgestellt, dass diese Supplementierung bei älteren Personen ab einem Alter von 65 Jahren mit einem erhöhten Risiko für Vitamin-D-Mangel und Frakturen zu empfehlen ist. Diese kann auch per wöchentliche oder monatliche Bolusgabe erfolgen. Vor einer einmal jährlich gegebenen, hohen Bolusgabe wird gewarnt, da diese vermutlich das Fraktur- und Sturzrisiko sogar erhöht und keine gleichbleibend ausreichende Versorgung mit Vitamin D gewährleistet (Bischoff-Ferrari, 2019).

2.2.3.2 Kardiovaskuläre Ereignisse

Vitamin D leistet einen Beitrag zur kardiovaskulären Gesundheit: Es dämpft das Renin-Angiotensin-System, fördert die Freisetzung von endotheliale NO und senkt das Aufkommen von Entzündungsmarkern (Riek, Rajagopal, & Bernal-Mizrachi, 2018).

Vitamin-D-Mangel korreliert dementsprechend auch mit kardiovaskulären Risikofaktoren. Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2018 sieht eine Verbesserung von Faktoren wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie etc. bei ausreichender Versorgung mit Vitamin D und empfiehlt eine Tagesdosis von mindestens 4.000 IU, respektive einen Serumspiegel von mindestens 86 nmol/L (34,4 ng/ml), um kardiovaskulären Vorfällen vorzubeugen (Mirhosseini, Rainsbury, & Kimball, 2018).

Eine Studie mit über 25.000 Teilnehmern, die über 5 Jahre verfolgt wurden, konnte hingegen keinen Zusammenhang zwischen Vitamin-D-Supplementierung und dem Eintreten von drastischen kardiovaskulären Ereignissen wie Herzinfarkt, Schlaganfall und Herztod finden. Eine Metastudie, die 21 RCTs (inklusive der letztgenannten) mit über 83.000 Teilnehmern beurteilte, konnte ebenso keinen Effekt auf kardiovaskuläre Outcomes feststellen (Barbarawi et al., 2019). Auch hier muss dementsprechend zweifelsohne kritisch festgehalten werden, dass ein ausreichender Vitamin-D-Status zwar unterstützend auf die kardiovaskuläre Gesundheit einwirken kann bzw. Voraussetzung für ebendiese ist, ihm aber keine ‚Allheilwirkung‘ zugesprochen werden darf.

2.2.3.3 Infektionen

Ähnlich verhält es sich beim Zusammenspiel von Infektionen und einem ausgeglichenen Vitamin-D-Spiegel. Epidemiologische Beobachtungen zeigen einen Zusammenhang zwischen einem zu geringen Vitamin-D-Spiegel und Infektionen, insbesondere solchen des respiratorischen Systems. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass Vitamin D sowohl für das angeborene als auch das erworbene Immunsystem eine zentrale Rolle spielt: Es verbessert die Effektorzellantwort von T-Lymphozyten, hat immunsuppressive Effekte auf B-Lymphozyten, induziert eine Erregerelimination in den Makrophagen und hemmt NF- κ B (Kamen & Tangpricha, 2010).

Eine vietnamesische Studie konnte keinen Effekt von Vitamin-D-Supplementierung mit 14.000 IU pro Woche für 8 Monate auf die Inzidenz von Influenza, aber eine leichte Reduktion anderer viraler Infektionen bei Kindern feststellen. Der Anteil an Teilnehmern mit einem Vitamin-D-Spiegel unter 20 ng/ml lag jedoch bei unter 17 %, was Zweifel an der sinnvollen Zusammensetzung der Studiengruppe aufkommen lässt (Loeb et al., 2019).

In einer Metastudie von 25 RCTs wurde festgestellt, dass die Supplementierung mit 20 bis 50 μ g/d Vitamin D täglich oder entsprechend wöchentlich die Anfälligkeit für akute Infektionen des Respirationstraktes abhängig von der anfänglich gemessenen 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration signifikant verringert. Der deutlichste Effekt konnte bei der Gruppe beobachtet werden, die zu Beginn eine Vitamin-D-Konzentration von unter 10 ng/mL aufwies (NNT = 4). Bei Ausgangskonzentrationen von 10 bis 28 ng/ml wurde eine NNT von 15 festgestellt. Bei höheren Ausgangswerten konnte kein weiterer Effekt beobachtet werden (Martineau et al., 2017).

Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2019 arbeitete einen signifikant positiven Effekt von Vitamin-D-Supplementation auf Anfälligkeit und Schwere von akuten Infektionen des Respirationstrakts heraus. Der größte Effekt trete dabei bei Menschen mit einer Vitamin-D-Ausgangskonzentration von bis zu 15 ng/ml auf. Bei Ausgangskonzentrationen bis 24 ng/ml sei ein geringerer Effekt zu beobachten. Die Autoren beklagen eine hohe Heterogenität der miteinbezogenen Studien, auch aufgrund der Ungenauigkeit der verschiedenen Messmethoden, wie in Kapitel 2.2.2 bereits angeklungen ist (Pham et al., 2019).

2.2.3.4 Autoimmunerkrankungen

Ein Mangel an Vitamin D wird häufig bei Menschen mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen festgestellt, etwa beim Eintreten und Fortschreiten von Multipler Sklerose, Typ-1-Diabetes und rheumatoider Arthritis. Es werden verschiedene pathophysiologische Mechanismen postuliert, der genaue Zusammenhang ist letzten Endes unklar (Azrielant & Shoenfeld, 2017). Wie bereits erwähnt, ist das Herausarbeiten des Ursache-Wirkung-Zusammenhangs oft schwierig und es bleibt zumeist unklar, ob Vitamin-D-Mangel eine Folge der Autoimmunerkrankungen ist, weil diese etwa mit einer Malabsorption einhergeht, oder eine andersgeartete Korrelation oder Kausalität vorliegt.

So erschweren etwa Variationen der **Multiplen Sklerose** (MS) die Beurteilung der genauen Rolle von Vitamin D bei MS. Es gibt Studien, die einen positiven Effekt von Vitamin-D-Supplementation auf Symptome der MS zeigen, aber auch solche, die keinen positiven Effekt belegen konnten (Harrison, Li, Jeffery, Karim Raza, & Hewison, 2019). Eine Cochrane-Metastudie kommt diesbezüglich zum Schluss, dass trotz einiger epidemiologischer Studien, die einen Zusammenhang zwischen Vitamin-D-Spiegel und MS sehen, die Datenlage keine eindeutigen Indizien für die Wirksamkeit einer Supplementierung zeigt. Ob eine Supplementierung bei Vitamin-D-Mangel für Personen mit Autoimmunerkrankung sinnvoll (bzw. sinnvoller als ohnehin bei gesunden Personen schon) ist, konnte aufgrund unzureichender Studien nicht beurteilt werden (Jagannath et al., 2018).

Ähnlich gestaltet sich die Studienlage hinsichtlich **entzündlicher Darmerkrankungen**: Trotz einiger Studien, die sich mit dem Zusammenhang dieser mit der Vitamin-D-Versorgung widmen, ist nicht klar, ob nur eine Korrelation oder ein kausaler Zusammenhang von vermindertem Vitamin-D-Status und dem Auftreten von entzündlichen Darmerkrankungen besteht (Harrison et al., 2019).

Etwas eindeutiger Ergebnisse scheint es hinsichtlich der Diabetes Typ 1 zu geben. So konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass eine Supplementierung im ersten Lebensjahr das Risiko für ein späteres Auftreten von Typ-1-Diabetes verringern kann (Harris, 2004).

Auch bei rheumatoider Arthritis konnte festgestellt werden, dass diese mit einem Vitamin-D-Mangel zu korrelieren scheint. Unklar ist jedoch, inwiefern sich eine Supplementierung auf die Auftretenswahrscheinlichkeit oder eine potenzielle Verbesserung auswirkt (Harrison et al., 2019).

Grundsätzlich lässt sich hierzu anführen, dass insbesondere die Wirksamkeit einer Vitamin-D-Supplementierung bei Autoimmunkrankheiten an vielen Stellen bisher unklar ist. Da jedoch Vitamin D erst bei sehr hohen Konzentrationen gesundheitsschädliche Folgen für den menschlichen Körper haben kann und ansonsten einfach ohne Folgen abgebaut wird, wird die Supplementierung mit 800 bis 1.000 IU/d für Patienten mit Autoimmunerkrankungen aufgrund bestehender Hinweise auf die mögliche Wirksamkeit empfohlen (Azrielant & Shoenfeld, 2017).

2.2.3.5 Schwangerschaft

Die Korrelation zwischen Komplikationsrisiken während der Schwangerschaft und Entbindung und einem zu niedrigen Vitamin-D-Spiegel ist bereits länger bekannt. So kann eine Vitamin-D-Supplementierung bei mangelversorgten Personen die Wahrscheinlichkeit für Präeklampsie und Schwangerschaftsdiabetes signifikant verringern. Auch ein verringertes Risiko für starke Blutungen und ein geringes Geburtsgewicht des Kindes wird angenommen. Die Evidenzlage für genannte Wirkungen ist nicht hoch, aufgrund der hohen therapeutischen Breite von Vitamin D ist eine Supplementierung jedoch der sicherste Weg. Üblich ist in der Schwangerschaft eine Supplementierung mit 4.000 IU/d. Ein Nutzen von höheren Dosen ist nicht belegt (Palacios et al., 2019).

2.2.3.6 Depression

In einer Metaanalyse aus dem Jahr 2013 wird ein inverser Zusammenhang zwischen dem Vitamin-D-Spiegel und dem Risiko, (wieder) an einer Depression zu erkranken, festge-

stellt. Dieser Zusammenhang zeigte sich verstärkt bei älteren Menschen mit früherer diagnostizierter Depression (Ju, Lee & Jeong, 2013). Auch Gu et al. (2018) konnten einen solchen Zusammenhang mit besonderer Schwerpunktsetzung auf Post-Schlaganfall-Depressionen nachweisen, wie der nachfolgenden Abbildung zu entnehmen ist.

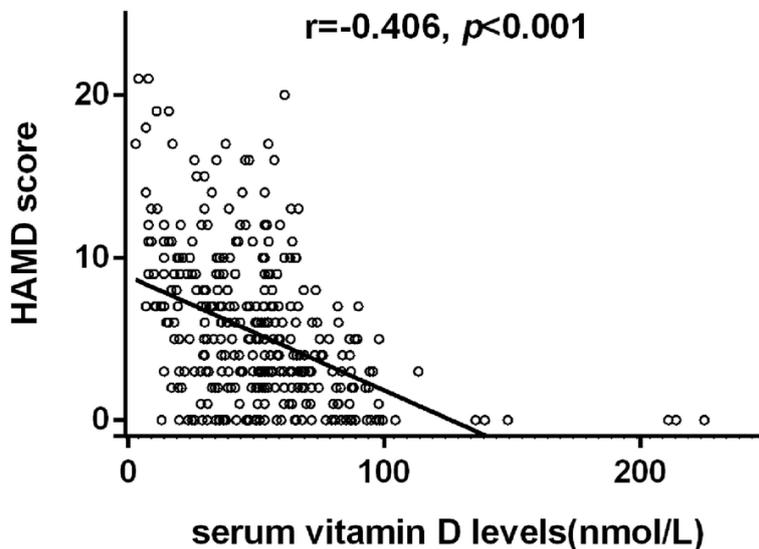


Abbildung 7: Inverse Relation zwischen VD-Status und Hamilton-Depressions-Skala bei Menschen mit Post-Schlaganfall-Depression (Gu et al., 2018)

In einer weiteren Studie, die den Zusammenhang zwischen VD-Status und der Inzidenz von Depressionen untersuchte, wurde eine Gruppe von annähernd 4.000 über 50-jährigen (selbstständig lebenden) Menschen überprüft und je nach ihrem Vitamin-D-Status in Gruppen eingeteilt. Als Mangel galt ein Vitamin-D-Spiegel von unter 12 ng/mL. Für die Mangel-Gruppe konnte ein signifikant höheres Risiko für Depression beobachtet werden (Briggs et al., 2019).

2.2.3.7 Diabetes mellitus Typ 2

Die inverse Korrelation zwischen Vitamin-D-Spiegel und Diabetes ist unumstritten. Als weniger gesichert gilt jedoch der diesbezügliche kausale Zusammenhang, obgleich es mehrere biochemische Mechanismen gibt, die diesen erklären könnten. Insbesondere die Hemmung oben genannter Vorgänge wirkt plausibel. Eine Schwierigkeit bei der Interpretation vieler Studien ist die Exklusion anderer Risikofaktoren, die selbst mit einem verringerten Vitamin-D-Spiegel einhergehen. Beispielsweise kann nicht immer ausgeschlossen werden, dass gewisse Ernährungsgewohnheiten sowohl der Grund für Diabetes als auch für Vitamin-D-Mangel sein könnten (Mathieu, 2015).

In den Insulin-produzierenden Beta-Zellen des Pankreas werden intrazellulär sowohl Vitamin-D-Rezeptoren als auch die 1-alpha-Hydroxylase exprimiert, wodurch sich ein direkter Effekt von Vitamin D auf die Zellen und ein indirekter Effekt durch die Hydroxylierung der Vorstufen dessen ergibt (Szymczak-Pajor & Śliwińska, 2019).

Vitamin D kann von der Blutbahn in die Beta-Zelle eindringen und dort den sogenannten VDR-RXR-Komplex (vitamin D receptor-retinoic acid x-receptor) aktivieren. Dies führt zu einer Verstärkung der transkriptionalen Aktivierung des Insulin-Gens und schließlich zur vermehrten Insulinsynthese. Des Weiteren scheint Vitamin D den Abbau von Beta-Zellen über die Hemmung apoptotischer Prozesse einzubremsen. Dies geschieht durch die Inaktivierung von Zytokinen und Hemmung der Zytokinbildung durch NF-kB. Auch die Regulation des intra- und extrazellulären Calciumspiegels und -austausches unterliegt dem Einfluss von Vitamin D, was für die calciumabhängige Depolarisation der Zelle und somit für die Insulin-Sekretion eine wichtige Rolle spielt (Szymczak-Pajor & Śliwińska, 2019).

Hinsichtlich der Frage, ob eine Diabetes-Prävention durch Vitamin-D-Supplementierung möglich ist, konnte eine Studie aus dem Jahr 2016 keine solche Wirkung feststellen. Verabreicht wurden im Rahmen der Studie 20.000 IU Cholecalciferol pro Woche über 5 Jahre. Die Studie bezog sich primär auf nicht defiziente Personen und forderte weitere Untersuchungen zur Wirkung der VD-Supplementierung bei Menschen mit VD-Mangel. Große Hoffnung setzten die Autoren dabei auf die folgende sogenannte D2D-Studie, von der sie sich aufgrund der hohen Teilnehmerzahl einen sichtbaren Effekt auf Patienten mit Vitamin-D-Mangel erhofften (Jorde et al., 2016).

Diese 2019 veröffentlichte US-amerikanische Studie mit 2.423 Teilnehmern ging der Frage nach, ob Vitamin-D-Supplementierung bei Hochrisikopatienten die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung von Typ-2-Diabetes verringert. Die Verabreichung von 4.000 IU Vitamin D3 täglich nach einer medianen Beobachtungszeit von 2,5 Jahren zeigte keine protektive Wirkung. Dabei muss beachtet werden, dass 8 von 10 Studienteilnehmern zu Beginn der Studie einen Vitamin-D-Blutspiegel von über 20 ng/ml hatten, welcher im Prinzip als ausreichend erachtet werden kann (Pittas et al., 2019).

Die protektive Wirkung in der Gruppe, die zu Beginn bei einem Vitamin-D-Wert von unter 12 ng/ml lag und damit als stark unterversorgt gelten konnte, war zwar vorhanden, aber letztlich zu gering, um signifikant zu sein. Studien mit deutlich mehr Teilnehmern in

dieser Gruppe wären erforderlich, um gegebenenfalls signifikante positive Effekte festzustellen. Insgesamt kann der potenzielle Nutzen einer Vitamin-D-Supplementierung in der Diabetes-Prävention damit als gering eingeschätzt werden (Wallace et al., 2019).

2.2.3.8 Krebs

Eine Anfang 2019 publizierte Metastudie beschäftigt sich mit Beziehung zwischen dem Vitamin-D-Status und der Entstehung und Progression verschiedener Krebserkrankungen. Festgestellt werden konnte, dass Vitamin D vermutlich eher bei der Progression als bei der Entstehung von Krebs von Bedeutung ist. Möglicherweise gibt es einen inversen Zusammenhang zwischen der Entstehung und Entwicklung von Kolorektaltumoren und Vitamin-D-Status. Dieser Zusammenhang wurde jedoch nur bei Frauen festgestellt. Bei anderen Krebsarten wurde beobachtet, dass ein erhöhter Vitamin-D-Spiegel einen positiven Einfluss auf die Überlebenschancen hatte. Darunter fallen Kolorektalkrebs, Prostatakrebs, Brustkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs und hämatologische Malignome (Heath et al., 2019). In einer weiteren Studie konnte ein protektiver Effekt von Vitamin D gegen Melanome festgestellt werden (Cattaruzza et al., 2019).

Auf zellulärer Ebene wurde beobachtet, dass Vitamin D in mehreren potenziell anticancerogenen Prozessen beteiligt ist. So konnten mehrere Mechanismen für den tumorprotektiven Effekt von Vitamin D verantwortlich gemacht werden: Es fördert die Zelldifferenzierung oder Zellspezialisierung sowie die Apoptose und den programmierten Zelltod. Zudem hemmt es die Zellproliferation und die Angiogenese. Auch fördert es die Expression DNS-reparierender Gene und hemmt dementsprechend Entzündungsprozesse (Cattaruzza et al., 2019).

In einer 2019 aktualisierten Metaanalyse, in die zehn verschiedene Studien einbezogen wurden, wurde kein Zusammenhang zwischen Vitamin-D-Supplementierung und Krebsinzidenz gefunden, sehr wohl aber eine Verringerung der Sterblichkeitsrate der an Krebs erkrankten Patienten. Diese Metastudie beinhaltete auch die groß angelegte VITAL-Studie, in der beobachtet wurde, dass die Einnahme von täglich 2.000 IU VD über mehrere Jahre die Krebssterblichkeit verringert (Keum et al., 2019).

Deutlich zögerlicher sind Studien, die einen Zusammenhang zwischen Vitamin-D-Status und der Prävention von Krebserkrankungen herstellen wollten. So können bisher keine klaren Empfehlungen diesbezüglich gegeben werden (Amrein, 2019).

2.2.3.9 Gesamtsterblichkeit

Eine 2017 veröffentlichte Metaanalyse untersuchte 9 Studien mit insgesamt 26.916 Teilnehmern auf einen Zusammenhang zwischen Vitamin-D-Plasmaspiegel und Gesamtmortalität. Die Autoren kamen zum Schluss, dass niedrige Vitamin-D-Konzentrationen mit erhöhter Gesamt- sowie kardiovaskulär bedingter Mortalität korrelieren, fanden aber keine Korrelation mit Krebsmortalität – diesbezüglich steht die Studie also im Widerspruch mit der von Keum et al. (2019). Beobachtbar war ein negativer Effekt vor allem bei der Gruppe mit einem Vitamin-D-Status von unter 16 ng/ml (Gaksch et al., 2017). Eine weitere Studie aus dem Jahr 2019 kommt zu dem Schluss, dass kein Zusammenhang zwischen Gesamtsterblichkeit und Vitamin-D-Supplementierung besteht, die Wahrscheinlichkeit, an Krebs zu versterben, aber um 16 Prozent verringert werden kann (Zhang et al., 2019).

2.2.4 Toxizität

Bereits angeklungen ist, dass Vitamin D im Prinzip für den menschlichen Körper ein zu vernachlässigendes Risiko birgt. Erst eine massive Überdosierung kann sich gesundheitlich nachteilig auswirken – üblicherweise wird nicht benötigtes Vitamin D einfach verstoffwechselt und ausgeschieden. Nichtsdestotrotz soll in knapper Form auf die Toxizität von Vitamin D eingegangen werden.

Problematisch kann Vitamin D für den menschlichen Organismus insbesondere werden, da es die Aufnahme von Calcium aus der Nahrung ermöglicht und befördert. Zu hohe, also toxische Dosen an Vitamin D können dementsprechend eine Hypervitaminose D ausbilden, aus der letztlich eine Hypercalcämie erwachsen kann. Als Grenze wird hierbei oftmals ein Wert von 150 ng/ml angegeben – in der Praxis tritt ein toxischer Vitamin-D-Status jedoch meist erst bei noch höheren Werten auf (Kumar Gupta, Jamwal & Malhotra, 2014).

Gefährliche Fälle von Hypervitaminose D sind sehr selten, können aber tödlich sein. Sowohl exogene als auch endogene Formen dieser können auftreten. Ab welchem Plasmaspiegel eine gefährliche Hypervitaminose D auftreten kann, ist nicht genau bekannt. Grund für einen gefährlich hohen Vitamin-D-Spiegel kann im Prinzip nur eine starke Überdosierung von Vitamin-D-Supplementen sein – die nötige Menge an Vitamin D über die Nahrung aufzunehmen, ist nicht möglich. Andere Risikofaktoren, die zu einer endogenen Überproduktion von $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ führen können, sind auch granulomatöse Erkrankungen, wie

Sarkoidose, Tuberkulose oder Lymphome, sowie eine verringerte Aktivität der 24-Hydroxylase oder eine vermehrte Aktivität der 1-alpha-Hydroxylase (Marcinowska-Suchowierska et al., 2018).

Genau wie eine nahrungsbedingte Aufnahme von Vitamin D in toxischen Mengen ist auch die Erlangung eines toxischen Vitamin-D-Spiegels durch Sonnenstrahlung ausgeschlossen (Holick, 1995). Laut Kumar Gupta et al. (2014) wurde die höchste jemals durch Sonnenstrahlung erreichte Vitamin-D-Plasmakonzentration bei einem puerto-ricanischen Bauern attestiert – diese betrug 225 nmol/g, also 90 ng/ml. Toxische Spiegel durch Supplementierung treten wahrscheinlich ab einer chronischen Supplementierung von 40.000 IU pro Tag auf. In welcher Menge eine einzige Gabe von Vitamin D bereits toxisch sein kann, ist nicht klar (Kumar Gupta et al., 2014).

2.3 Therapie des VD-Mangels

Nach dieser Darstellung der möglichen Folgen einer Vitamin-D-Unterversorgung und der Tatsache, dass eine ausreichende Versorgung mit Vitamin D über die Nahrung und den Aufenthalt im Freien eben gerade nicht erreicht werden kann (Kapitel 2.2), stellt sich die Frage, wie einem Vitamin-D-Mangel vorgebeugt werden kann. Hierfür bietet sich eine Supplementierung an, die ebenfalls bereits mehrfach angeklungen ist. Um diese im Detail zu besprechen, sollen nachfolgend zunächst noch einmal die Zielwerte des Vitamin-D-Spiegels aufgezeigt werden, um anschließend auf mögliche Präparate einzugehen und die Frage zu beantworten, wie diese anzuwenden sind.

2.3.1 Zielwerte

Dem Vitamin-D-Mangel werden heute oft epidemische Ausmaße zugesprochen – nicht ganz einheitlich ist jedoch die Definition dessen, was überhaupt als Vitamin-D-Mangel bezeichnet werden kann. Eine ausführliche Diskussion der verschiedenen Ansätze zur Ziehung von Grenzwerten wird an dieser Stelle nicht als zielführend erachtet. Ein Beispiel für gängige Referenzwerte bietet folgende Tabelle.

Tabelle 2: Grenzwerte der Vitamin-D-Versorgung (Schilling, 2012)

Referenzbereiche	25-OH Vitamin D-Serumkonzentration in ng/mL
toxisch	>100
optimal	31-60
suboptimal	21-30
mäßiger Mangel	11-20
schwerer Mangel	≤10

Die meisten Richtlinien erachten einen Vitamin-D-Spiegel von etwa 30 ng/ml als ausreichend bzw. optimal. Beachtet werden muss bei Betrachtung der Werte, dass die schwankenden Grenzen auch darauf zurückzuführen sind, dass die Mangeldefinition jeweils eine andere sein kann – so reichen beispielsweise 10 bis 12 ng/ml bereits, um eine schwere Rachitis zu verhindern, können aber dennoch nicht als Optimum an Vitamin D bezeichnet werden (Chakhtoura et al., 2019).

Recht einig ist die Forschung sich dahin gehend, dass eine präventive Vitamin-D-Supplementierung nicht zielführend und dementsprechend nicht notwendig ist. Eine Über-supplementierung, die zum Zeitpunkt der Einnahme vom menschlichen Organismus nicht tatsächlich nachgefragt wird, wird schlicht ausgeschieden, kann demnach also nicht für spätere Mangelzustände gespeichert werden (Smollich, 2019). Dass eine (massive) Über-supplementierung darüber hinaus sogar schädlich sein kann, wurde in Kapitel 2.3 angesprochen.

2.3.2 Dosierungsschemata

Abschließend stellt sich die Frage, wie die soeben dargestellten Präparate dosiert werden müssen, um durch die Supplementierung einen ausreichend hohen Vitamin-D-Spiegel zu erzeugen. Um die notwendige Konzentration von Vitamin D im Blut zu berechnen, werden (je nach Einheit) folgende Formeln herangezogen:

$$\Delta \text{ 25-Hydroxyvitamin D} = 0,025 \times (\text{Dosis pro kg Körpergewicht}) \text{ für nmol/L}$$

$$\Delta \text{ 25-Hydroxyvitamin D} = 0,01 \times (\text{Dosis pro kg Körpergewicht}) \text{ für ng/ml}$$

Die entsprechende Tagesdosis kann ermittelt werden, indem durch die Zahl der Tage dividiert wird, die zur Aufdosierung erwünscht sind (Ebeling et al., 2018).

Um den gewünschten Zielwert zu erreichen, kann durchaus zunächst auch mit hohen Initialdosen gearbeitet werden. Sinnvoll ist beispielsweise die Einnahme von 25.000 IU pro Woche, da die Einnahme zu geringer Mengen bei unterversorgten Personen dazu führen würde, dass der Zielwert erst nach Monaten erreicht wird (Van Groningen et al., 2010).

3 Analytik

Nach diesem theoretischen Einblick in die Thematik der Vitamin-D-Versorgung und der möglichen Folgen einer Mangelversorgung soll sich der nächste Abschnitt der vorliegenden Arbeit mit der für das Projekt durchgeführten Analytik beschäftigen.

3.1 Was wird gemessen und warum?

Heute sind mehr als 40 verschiedene Metaboliten von Vitamin D bekannt. Darunter sind drei, deren Messung sich als am klinisch relevantesten erwiesen hat: 25(OH)VD, 1,25(OH)VD und 24,25(OH)VD. Die Messung der durch Nahrung aufgenommenen oder mithilfe von UV-B-Strahlung hergestellten Vorstufen von Vitamin D₂ und Vitamin D₃ ergibt wenig Sinn, da diese entweder in den Adipozyten gespeichert oder rasch in die hydroxylierten Metaboliten umgewandelt werden und starken Konzentrationsschwankungen unterliegen (Galior et al., 2018).

Obwohl der wirksamste Vitamin-D-Metabolit das 1,25-Dihydroxyvitamin D ist, basieren gängige Vitamin-D-Tests meistens auf der Blutkonzentration von 25-Hydroxyvitamin D, welches als zuverlässigster Indikator für die Erfassung eines Vitamin-D-Mangels und die Überwachung des Therapieerfolgs einer Supplementierung gilt (Van den Ouweland, 2016). Dieses besitzt eine Halbwertszeit von etwa drei Wochen, während diese bei Calcitriol nur etwa einen Tag beträgt. 25(OH)VD wird in der Leber hydroxyliert, wohingegen 1,25(OH)₂VD zusätzlich in der Niere hydroxyliert wird und mehreren anderen körpereigenen Regulationsmechanismen unterliegt. Daher kann die dem Körper zur Verfügung stehende Vitamin-D-Konzentration besser über den 25(OH)VD-Wert bestimmt werden (Gaksch et al., 2017).

Für eine Bevorzugung des 25(OH)VD spricht auch, dass dieses bereits bei minimalen Konzentrationen in 1,25-Dihydroxyvitamin D umgewandelt wird. Für gewöhnlich verringert sich die Serumkonzentration von 1,25(OH)₂VD erst ab einer 25(OH)VD-Konzentration von unter 4 ng/ml. Darüber steht der 1,25(OH)₂VD-Spiegel normalerweise bei 22 bis 65 ng/ml und zeigt wenig Fluktuation (Galior et al., 2018).

Zu beachten ist allerdings, dass die Tatsache, dass 25(OH)VD im Gegensatz zu 1,25(OH)VD weitaus weniger durch Feedback-Regulationen beeinflusst ist, auch bedeutet, dass durch die 25(OH)VD-Bestimmung nicht mit letzter Sicherheit beurteilt werden kann, wie viele der wirksamen 1,25(OH)-Metaboliten zur Verfügung stehen (Kraenzlin & Meier,

2015). Sollte daher Verdacht auf eine von der Norm abweichende Umwandlung von 25(OH)VD in 1,25(OH)2VD bestehen, ist ein Test auf Letzteres angezeigt.

Für eine solche Abweichung können mehrere Faktoren verantwortlich sein: Einer ist das Bestehen eines CYP24A1-Mangels. Da 25(OH)VD von der durch CYP24A1 katalysierten Hydroxylase zu 24,25(OH)2VD metabolisiert wird, lässt sich durch Bestimmung beider Metaboliten ein Verhältnis zueinander errechnen, welches Auskunft über das Vorhandensein eines CYP24A1-Mangels gibt. Von diesem wird bei einem Verhältnis von 25(OH)VD/24,25(OH) von über 99 ausgegangen (Galior et al., 2018). Die Messung von 25(OH)VD bedeutet für gewöhnlich die vollständige Messung von gebundenem und ungebundenem 25(OH)VD aus dem Serum. Dies betrifft nicht nur den freien und Albumin-gebundenen, sondern auch den an VDBP-gebundenen Anteil.

Wie beschrieben, zählt Letzterer nicht zum bioverfügbaren Anteil, kann aber von Mensch zu Mensch und unter bestimmten Bedingungen variieren, wodurch diese Messungen an Aussagekraft verlieren können (Chun, 2012). Insbesondere Menschen mit Leber-, Nieren-, Tumor- und allergischen Erkrankungen sowie Schwangere tendieren zu deutlichen Abweichungen von den Normwerten des VDBP, weswegen eine Messung des bioverfügbaren 25(OH)VD sinnvoll wäre, aber aktuell noch kein Standardvorgang ist und mit analytischen Herausforderungen einhergeht (Tsuprykov et al., 2018).

3.2 Verschiedene Testmethoden

In Verwendung befinden sich derzeit chromatografische und massenspektrometrische Methoden sowie Immunoassays und Competitive Protein Binding Assays. Unter dem Begriff der Immunoassays sind meistens automatisierte Methoden zu verstehen. Biosensoren sind aktuell noch ein eher randständiges Thema, da sie zur Vitamin-D-Bestimmung nicht praxistauglich sind. Die Messmethoden werden teilweise auch in Gruppen wie chromatografische und nicht chromatografische Methoden eingeteilt (Garg, 2018). Im Folgenden soll ein Überblick über die Gruppen der Messmethoden und Beispiele für diese gegeben werden. Darauf folgt ein Vergleich der Methoden, der mit einer kritischen Bewertung ihrer Tauglichkeit einhergeht.

3.2.1 Competitive Protein Binding Assays

In den 1970er-Jahren wurde der erste Competitive Protein Binding Assay (CPBA) zur Messung des Vitamin-D-Status entwickelt. Diesem wurde nach der Extraktion und Vorreinigung der Probe per High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) eine bekannte Menge Tritium-markiertes 25(OH)D₂ zugefügt, welches mit dem extrahierten 25(OH)D₂ um Bindungsstellen am Vitamin-D-Binding-Protein (aus Rattenserum) konkurrierte. Nach mehreren Tagen konnte durch die Detektion der gebundenen Tritium-Metaboliten die Vitamin-D-Konzentration berechnet werden (Fraser & Milan, 2013). Das Ziel war es, die Methode zu vereinfachen und die aufwendige Aufreinigung per HPLC zu umgehen, was letztlich auch gelang. Jedoch führte die mangelnde Spezifität der Methode zur Überschätzung der Resultate, was letztlich dafür sorgte, dass die Durchführung der Methode eingestellt wurde (Shah et al., 2018).

Zurzeit sind CPBA zur VD-Analytik die Ausnahme. Mit dem Elecsys Vitamin D Total II Assay bietet die Firma Roche seit 2017 einen neuen entwickelten CPBA-Assay an (Carter & Card, 2019). Das vom natürlichen VDBP befreite 25(OH)VD bindet hier an einem mit einem Rutheniumkomplex-markierten VDBP. Die VDB-Proteine, die nicht vom aus dem Serum stammenden 25(OH)VD besetzt werden, werden von biotinylierten 25(OH)VD besetzt und interagieren mit hinzugefügten Streptavidin-umhüllten Mikrokapseln. Diese werden dann magnetisch zu einer Elektrodenoberfläche gezogen. Durch Anlegung einer Spannung entstehen schließlich Chemilumineszenz-Emissionen, die gemessen werden können (Asif et al., 2019).

Im Vergleich zur Referenzmethode der Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) wurde festgestellt, dass bei Werten bis zu 10 ng/ml ($n = 9$) eine mittlere positive Abweichung von 2,6 ng/ml bestand. Eine solche Abweichung würde dazu führen, dass bei einem Schwellenwert von 12 ng/ml eine Person mit einem tatsächlichen Wert von 10 ng/ml nicht mehr als schwer defizitär eingestuft werden würde. Das bei einem gängigen unteren Referenzwert zum schweren VD-Mangel dazu führen kann, dass Testpersonen irrtümlicherweise aus der Risikogruppe ausscheiden. In dieser Studie befanden sich unter 79 Proben nur zwei, die zu einer unrichtigen Einschätzung führten: Bei einer handelte es sich um eine Abweichung von 17 ng/ml (MS) gegenüber 24 ng/ml und einmal von 27 ng/ml (MS) gegenüber 18 ng/ml. Es ist anzumerken, dass sich die Abweichungen gegenüber LC-MS/MS in der Praxis erhöhten (Asif et al., 2019).

Zusammenfassend lassen sich als Vorteile der CPBA-Methode ein hoher Durchsatz an Tests sowie eine recht simple Durchführung im Vergleich zu anderen Methoden festhalten. Als Nachteil kann benannt werden, dass eine hohe Kreuzreaktivität zu anderen Metaboliten festgestellt wurde (Rezayi et al., 2018).

3.2.2 High Pressure Liquid Chromatography

Die High Pressure Liquid Chromatography galt für einige Jahre als Goldstandard für die Messung des Vitamin-D-Status (Serteser, 2012). Erstmals publiziert wurde über HPLC als Methode zur Vitamin-D-Bestimmung bereits im Jahr 1977 (Eisman, Shepard & DeLuca, 1977). Seitdem wurden zahlreiche Variationen mit verschiedenen Standards und unterschiedlichen Abläufen der einzelnen Extraktionsschritte entwickelt. Die Detektion erfolgt meistens per UV-VIS, es wurden jedoch auch HPLC-Verfahren mit coulometrischem Elektroden-Array-Detektor entwickelt (Nurmi et al., 2013).

Grundsätzlich ist Vitamin D aufgrund der vorhandenen Trien-Struktur photospektrometrisch gut detektierbar, allerdings ist ebendiese in mehreren Vitamin-D-Metaboliten vorhanden, was eine genaue Zuordnung der Messergebnisse erschwert (Heureux, 2017). Zudem kann der sogenannte Matrixeffekt bei der HPLC die Präzision der Ergebnisse negativ beeinflussen, weswegen intensive Vorbehandlungen der Probe vonnöten sind. Die Sensitivität der Methode für Vitamin-D-Metaboliten ist im Vergleich zur massenspektrometrischen Auswertung gering, weswegen die Methode eher für die Vitamin-D-Detektion in Arzneimitteln, Supplementen oder Nahrungsmitteln verwendet wird (Yin et al., 2019).

Zusammenfassend lassen sich als Vorteile von HPLC-Verfahren die gute Korrelation mit LC-MS/MS sowie eine relativ geringe Anfälligkeit für Matrixeffekte bei korrekter Vorbehandlung anführen. Auch kann recht gut zwischen Metaboliten unterschieden werden und eine hohe Reproduzierbarkeit ist gegeben. Als nachteilig erweist sich, dass recht große Mengen an Probenmaterial notwendig sind und die Vermeidung von Matrixeffekten die bereits angesprochene intensive Vorbehandlung der Proben voraussetzt. Auch ist verglichen mit automatisierten Immunoassays bei der HPLC ein hoher Grad an Expertise vonnöten (Vázquez-Lorente et al., 2019).

3.2.3 Massenspektrometrie

Unter den massenspektrometrischen Methoden zur Vitamin-D-Bestimmung finden sich einige Variationen, die an dieser Stelle nicht in ihrer Gesamtheit dargestellt werden können, aber zumindest Erwähnung finden sollen. Zumeist werden zur Ionisation die Methoden der chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) oder der Elektrospray-Ionisation (ESI) verwendet (Yin et al., 2019). Mit APCI ist es möglich, niedrigere Konzentrationen von Vitamin D als mit der ESI zu detektieren. Zudem besitzt die ESI eine höhere Störanfälligkeit für Matrixeffekte.

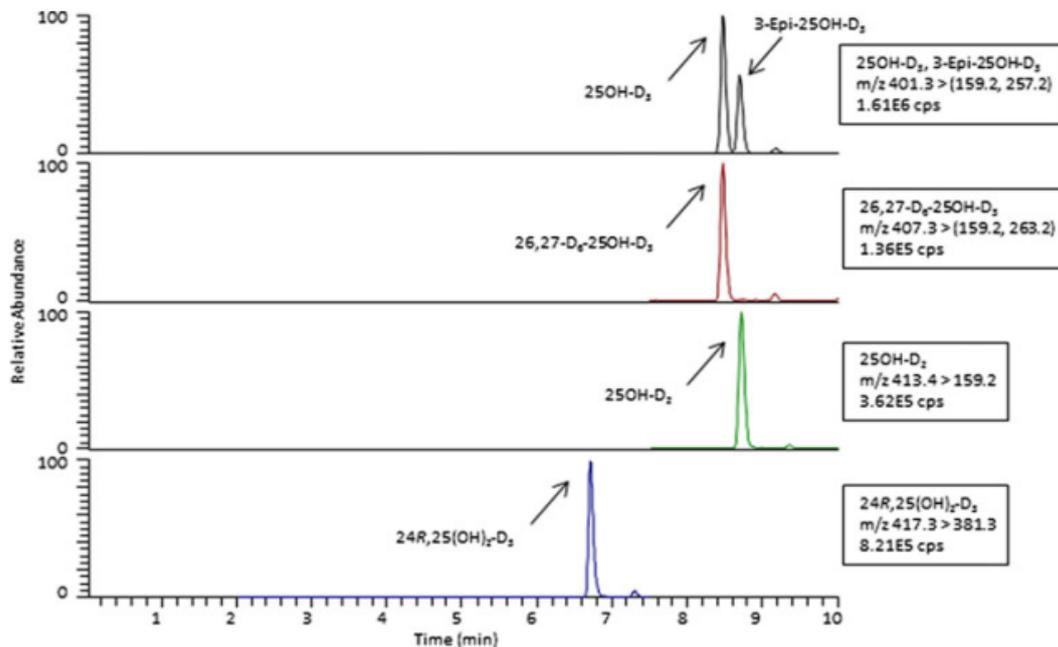


Abbildung 8: LC-MS/MS-Plot wichtiger VD-Metaboliten (Van den Ouweland, 2016)

Ein Nachteil, welcher der Massenspektrometrie inhärent ist, ist die mangelnde Unterscheidung zwischen isobaren Molekülen, spezifisch 3-epi-25-OHVD3 und 25(OH)VD3. Um zu vermeiden, dass dadurch eine Überschätzung des 25(OH)VD stattfindet, muss eine zeitaufwendige chromatografische Trennung in Kauf genommen werden (Carter & Card, 2019).

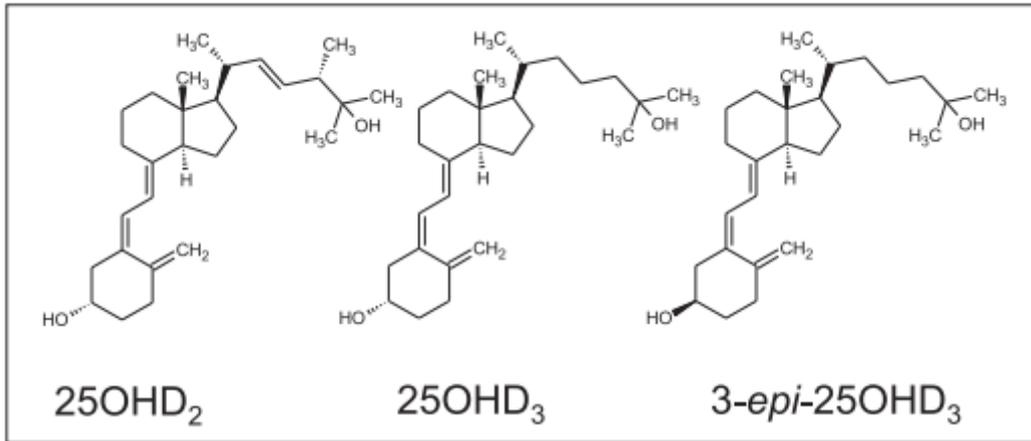


Abbildung 9: Aufbau des 25-Hydroxyvitamins D₂/D₃ (Van den Ouweland, 2016)

Vor der Entwicklung besserer Methoden wurde für einige Jahre GC-MS zur Vitamin-D-Bestimmung genutzt (Rezayi et al., 2018), heute wird dafür stattdessen die LC-MS/MS verwendet. Aufgrund ihrer hohen Spezifität, Empfindlichkeit und Auflösung gilt die Messung des Vitamin-D-Spiegels per LC-MS/MS heute als Goldstandard in Laboratorien (Avenell, Bolland, & Grey, 2019; Lee et al., 2015). Hier werden zuerst gewünschte Analyten ausgewählt und gemessen, woraufhin eine Fragmentierung stattfindet und die entstandenen Fragmente erneut gemessen werden. Mit dieser Methode können gleichzeitig viele Arten von 25-Hydroxy-VD sowie andere Vitamin-D-Metaboliten parallel detektiert werden. Dies kann in relativ kurzer Zeit erfolgen, wenn auch nicht so schnell wie mit Immunoassays (Le Goff et al., 2015). Zu beachten ist, dass Methoden der LC-MS/MS offiziellen Referenzmethoden entsprechen müssen, d. h., dass verwendete Reagenzien und Gerätschaften übereinstimmen müssen. Ansonsten können auch hier deutliche Unterschiede zwischen Ergebnissen entstehen (Erdman et al., 2019).

Zusammenfassend lassen sich als Vorteile massenspektrometrischer Methoden festhalten, dass es sich hierbei um die akkurateste Testmethode handelt und diverse Metaboliten damit messbar sind. Die Genauigkeit der Methode bedingt eine hohe Empfindlichkeit, zudem kann ihr eine hohe Reproduzierbarkeit attestiert werden. Die Nachteile lassen sich insbesondere in ökonomischer Hinsicht finden. Die Massenspektrometrie fordert hohe Beschaffungskosten, ist auch in der Wartung der nötigen Geräte jetzt kostenintensiv und generiert zudem hohe Personalkosten aufgrund der komplexeren Bedienung des Verfahrens. Außerdem ist, wie auch schon für die HPLC festgehalten, auch hier eine Vorbehandlung der Probe nötig, die erneut als Kostentreiber gesehen werden kann (Heureux, 2017).

3.2.4 Immunoassays

Obwohl die LC-MS/MS, wie bereits erwähnt, als Goldstandard gilt, sind Immunoassays weit häufiger in Verwendung und stellen etwa 90 % der Routinetests dar. Dies liegt nicht nur in den geringeren Beschaffungs- und Wartungskosten, sondern auch im hohen Automatisierungsgrad und dem hohen Durchsatz begründet (Galior et al., 2018).

In den letzten Jahrzehnten wurde eine Reihe von Immunoassays zur Vitamin-D-Bestimmung entwickelt. Diese spielen in der Praxis die größte Rolle der Testmethoden zur Vitamin-D-Bestimmung. Dazu gehören Radioimmunoassays (RIA), Chemoluminiszenzimmunoassays (CLIA), Chemiluminescentmicroparticle-Immunoassays (CMIA) sowie Enzyme-linked-Immunoassays (ELISA) (Arneson & Arneson, 2013).

Lange Zeit waren RIA die häufigste Methode zur Vitamin-D-Bestimmung. Diese waren jedoch verhältnismäßig aufwendig und der steigende Bedarf an Vitamin-D-Tests, auch aufgrund der Absenkung der Referenzwerte, führte zur Entwicklung von weniger aufwendigen, automatisierten Immunoassays, welche ohne nennenswerte Vorbehandlung funktionierten. Erwähnt werden muss hierbei jedoch, dass die fehlende Vorbehandlung auch damit einhergeht, dass eine erhöhte Anfälligkeit für Matrixeffekte gegeben ist (Yin et al., 2019).

Immunoassays bedienen sich der Tatsache, dass Antikörper die Fähigkeit besitzen, spezifisch auf eine Testsubstanz zu reagieren. Dies befähigt diesen Test, mit kleinsten Mengen des Analyten quantitative Tests durchzuführen. Bei gängigen Vitamin-D-Immunoassays handelt es sich fast ausschließlich um kompetitive Methoden (Galior et al., 2018). Dabei konkurriert Vitamin D aus dem zu untersuchenden Medium mit markiertem Vitamin D, dessen Menge bekannt ist. Die Serumkonzentration kann dann durch Konzentrationsmessung des markierten Vitamins D indirekt bestimmt werden. Im Gegensatz dazu korreliert der gemessene Wert bei nicht kompetitiven Immunoassays, auch Sandwich-Assay genannt, direkt proportional mit der Vitamin-D-Konzentration. Es reagiert 25(OH)VD mit einem Antikörper, wonach der entstandene Komplex an einem weiteren Antikörper bindet, der schließlich gemessen wird, wie der nachfolgenden Abbildung zu entnehmen ist (Shah et al., 2018).

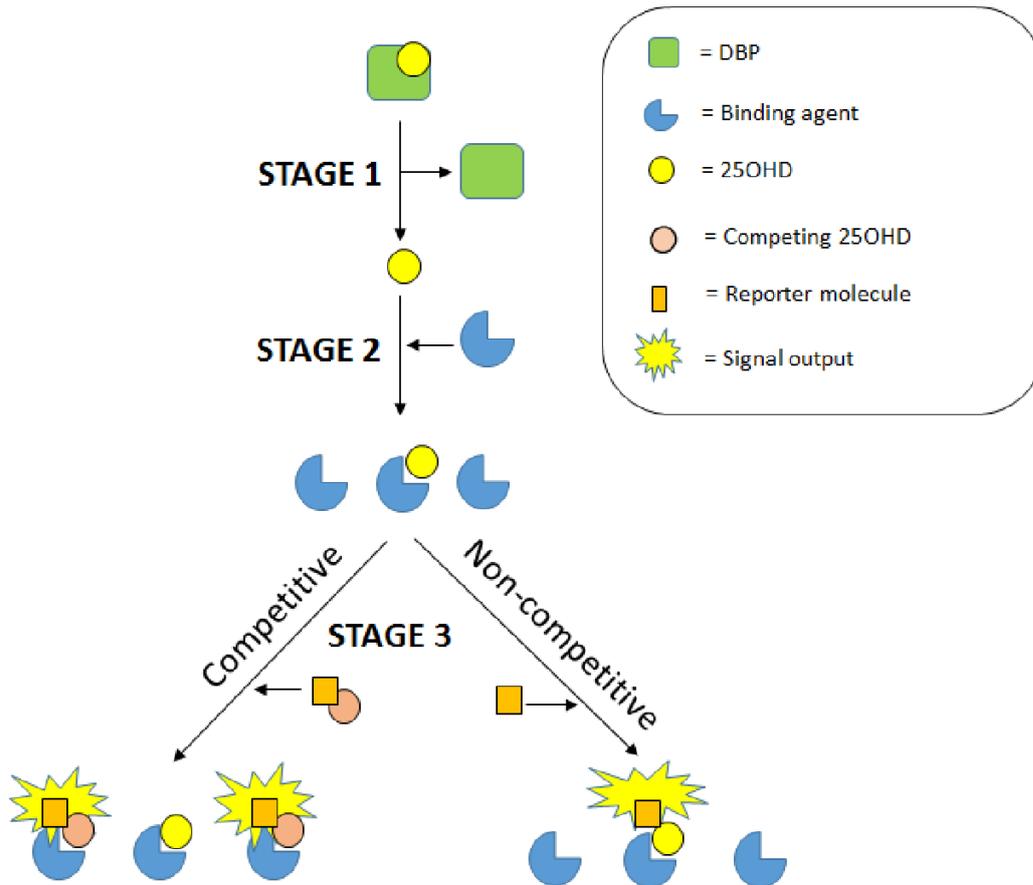


Abbildung 10: Schlüsselschritte von kompetitiven und nicht kompetitiven-Vitamin D-Assays (Shah et al., 2018)

Probleme tauchen auf, wenn die Spezifität der Antikörper nicht im gewünschten Ausmaß gegeben ist. Dies tritt bei IA sehr häufig auf und ist der bedeutendste Grund für Abweichungen im Ergebnis dieser Testmethoden (Sempos et al., 2018). Da verschiedene Immunoassays verschiedene Antikörper nutzen, führen auch die unterschiedlichen Eigenschaften dieser zu Abweichungen der Testergebnisse. Bei einem Vergleich gängiger Immunoassays und LC-MS/MS-Methoden wurde untersucht, ob diese den festgelegten Anforderungen von einem Variationskoeffizienten (VK) von bis zu 10 Prozent und einem Bias von bis zu 5 Prozent entsprachen. Nur die Hälfte der Immunoassays wies einen Variationskoeffizient unter 10 % aus. Außerdem erfüllten nur 3 von 8 Immunoassays die Anforderung des maximalen Bias von 5 % (Galior et al., 2018).

Zusammenfassend können als Vorteile von Immunoassays insbesondere der hohe Durchlauf und die größtenteils automatische Verarbeitung der Probe angeführt werden. Insgesamt sind für die Durchführung kaum manuelle Tätigkeiten vonnöten, was sie zeit- und kosten-

technisch sparsam gestaltet (Galior et al., 2018a). Zudem gibt es meist keine Kreuzreaktivität mit 3-epi-25(OH)VD₃, eine gute Korrelation mit Referenzmethoden bei Patienten mit Werten im gesunden Normbereich (Dirks et al., 2018).

Demgegenüber stehen jedoch recht gewichtige Nachteile der Methode. So kommt es beispielsweise oft zu einer Über- oder Unterschätzung bei hohen bzw. niedrigen Werten sowie zu einer hohen Varianz der Ergebnisse (Galior et al., 2018a). Zudem ist keine qualitative Unterscheidung zwischen 25(OH)D₃ und 25(OH)D₂ möglich (Zelzer et al., 2018). Bevor die quantitative Bestimmung durchgeführt werden kann, muss das Vitamin D zudem vom VDBP getrennt werden. Danach muss das Protein entweder aus der Probe entfernt oder vollständig inaktiviert werden. Bereits kleinste Konzentrationen von VDBP in der Probe können die Ergebnisse verzerren (Ofenloch-Haehnle, 2012). Als signifikanter Nachteil muss zudem Erwähnung finden, dass Immunoassays sich für eine Vielzahl von Patienten nicht als Testmethode eignen, da etwa bei Schwangeren oder Intensivpatienten, bei denen ein Leberversagen vorliegt, keine genauen Ergebnisse verzeichnet werden können. Ebenso verhält es sich bei Hämodialyse- und Osteoporosepatienten (Ofenloch-Haehnle, 2012).

3.2.5 Biosensoren

Biosensoren sind für gewöhnlich in der Lage, schnell und unkompliziert Werte abzuliefern. Im Bereich der VD-Analytik steckt diese Technik noch in Kinderschuhen (Rezayi et al., 2018). Seit einigen Jahren wird an der Entwicklung von Biosensoren zur VD-Bestimmung gearbeitet. In der Literatur werden meistens elektrochemische (Chauhan, Kumar, Panda, & Solanki, 2019), aber auch ein optischer Mikrokavitätssensor als Transducer genutzt (Chan et al., 2015). Trotz dieser Bemühungen stellen Biosensoren derzeit keinen vollwertigen Ersatz für gängige Testmethoden dar. Sie sind gekennzeichnet durch hohe Anfälligkeit für Interferenzen und schlechte Reproduzierbarkeit, mangelhafte Selektivität und Sensitivität (Yin et al., 2019).

3.3 Abwägungen

Nach dieser Vorstellung der verschiedenen Messmethoden sollen diese nachfolgend noch kritisch vergleichen und eingeordnet werden. Die gebräuchlichsten Methoden sind momentan automatisierte Immunoassays, gefolgt von Methoden der LC-MS/MS. In weitaus geringerem Ausmaß werden manuelle Immunoassays und HPLC-Methoden verwendet. Pa-

parallel zur Entwicklung verschiedener Methoden wurden in den letzten Jahren etliche Studien publiziert, die einerseits Vergleiche zwischen Immunoassays, andererseits Vergleiche von IA insbesondere mit Referenzmethoden untersuchen. Das nachfolgende Kapitel beschäftigt sich dementsprechend damit, zu untersuchen, inwiefern diese quantitative Verteilung bzw. ‚Beliebtheit‘ der einzelnen Messmethoden gerechtfertigt ist bzw. womit sie sich ggf. begründen lässt.

3.3.1 Störfaktoren

Zunächst sei auf mögliche Störfaktoren bei der Messung eingegangen.

3.3.1.1 VDBP

Bevor die quantitative Bestimmung durchgeführt werden kann, muss das Vitamin D zunächst vom VDBP getrennt werden. Danach muss das Protein entweder aus der Probe entfernt oder vollständig inaktiviert werden. Bereits kleinste Konzentrationen von VDBP in der Probe können dabei jedoch die Ergebnisse verzerren (Ofenloch-Haehnle, 2012). 25(OH)VD liegt durch seine Hydrophobie stark am Vitamin-D-Binding-Protein und in einem geringeren Maße an Albumin gebunden vor (Romagnoli, Pepe, Piemonte, Cipriani, & Minisola, 2013). Dies kann zu falschen Einstufungen von Menschen mit hohen oder niedrigen Konzentrationen von VDBP führen, besonders bei Schwangeren oder Personen mit Leberversagen (Sempos et al., 2018). Die Trennung vom VDBP wird mit entsprechend höherem Aufwand per Lösungsmittlextraktion vorgenommen und stellt danach etwa bei der LC-MS/MS kein Problem dar (Kocak et al., 2015). In vielen automatisierten Immunoassays wird 25(OH)VD nicht ausreichend aus dem VDBP freigegeben, da hier keine starken organischen Lösungsmittel (wie Methanol oder Acetonitril) eingesetzt werden können (Zelzer et al., 2018).

Die folgenden Ergebnisse einer Studie zeigen den Einfluss von VDBP auf Messergebnisse: Vorgabe beruhend auf biologischer Variation: durchschnittlicher Bias unter 15,8, Imprecision unter 9,1 % (verglichen mit 2 LC-MS/MS-Methoden)

Liaison: AI: bias: +6,4 %; CCC 0,95; Bias bei Werten unter 8 ng/ml: +35 %

Diasorin RIA: +10 %; 0,99; +10 %

IDS AI: +14 %; CCC 0,90 m; +1 7 %

Roche: -6.9 %; CCC 0,66 (schlechte CCC); +35 %

Abbot: +41 % (schlecht) CCC 0,85; 105 %

Siemens: +27 (schlecht); 0,85 (unzureichend); 118 %

Der automatisierte Immunoassay von Liaison verwendete den gleichen Antikörper wie der nicht automatisierte Diasorin-Radioimmunoassay. Bei diesem RIA fand eine intensive Extraktion statt, die das gesamte an VDBP gebundene 25OH freisetzte und weitere Störfaktoren beseitigte, was wahrscheinlich stark dazu beigetragen hat, dass die Ergebnisse des RIA stärker mit jenen der LC-MS/MS korrelierten. Festgestellt wurde in dieser Studie auch, dass die meisten der Immunoassays bei niedrigen VD-Werten eine prozentuell hohe systematische Abweichung vorwiesen (Farrell et al., 2012).

3.3.1.2 Lipophilie

Aufgrund der hohen Lipophilie von VD (einem Cholesterin-Metaboliten) sind die in biologischen Flüssigkeiten vorkommenden Lipide potenzielle Störfaktoren für die Messung. Da die meisten Immunoassays VD im wässrigen Milieu bestimmen, kann es zu Unterschätzungen der Werte kommen, wenn es in stärker lipophilem Serum oder Plasma vorliegt. Chromatografischen Methoden steht eine effiziente Abtrennung durch organische Lösungsmittel zur Verfügung. Automatisierte Immunoassays mit hohem Durchsatz haben diese Option nicht. Daher wird versucht, dem Problem mit verschiedenen Emulsionsbildern entgegenzuwirken, um die Auftrennung in lipophile und hydrophile Phasen zu minimieren (Saida, Yuan, & Yuan, n. d.).

Zudem muss bedacht werden, dass in der menschlichen Probe auch andere, endogene lipophile Stoffe vorliegen, die die Tests potenziell verfälschen (sogenannte Matrixeffekte) (Romagnoli et al., 2013).

3.3.2 Kreuzreaktivitäten

Große Schwierigkeiten in der VD-Analytik stellen neben diesen Störfaktoren auch Kreuzreaktivitäten der Messmethoden dar. Im Laufe der Jahre konnten durch Verbesserung der Technologien deutliche Fortschritte verbucht werden, gelöst ist das Problem aber nicht. Es gibt einige VD-Metaboliten, die nur minimale strukturelle Unterschiede aufweisen, was es insbesondere für die in Immunoassays benutzten Antikörper schwierig macht, ausschließlich die gewünschten Metaboliten zu erfassen. In der VD-Analytik sind das meistens 25(OH)D₂ und 25(OH)D₃. Diese sollten im Idealfall gleichwertig erkannt werden, also eine Kreuzreaktivität von 100 Prozent aufweisen, ohne Störungen durch andere Metaboliten in Kauf nehmen zu müssen. Dies ist meistens nicht der Fall (Garnett et al., 2019), demm

3-epi-25(OH)D₃ unterscheidet sich in seiner Masse nicht vom normalen 25(OH)D₃. Folglich sind diese massenspektrometrisch nicht unterscheidbar, wenn nicht zuvor eine ausreichende chromatografische Trennung vorgenommen wird. Da die beiden Epimere eine ähnliche Affinität zu den meisten LC-Säulen haben, ist nicht jede gängige LC-MS/MS-Methode geeignet, um diese korrekt zu unterscheiden. Letztlich verkompliziert die Anwesenheit von 3-epi-25(OH)D₃ die Analyse per LC-MS/MS und kann zu längeren Analysezeiten führen. Verzichtet man auf den Trennungsschritt, führt dies potenziell zu erhöhten Messwerten bei MS-Verfahren (Dirks et al., 2018a).

Die bei Immunoassays verwendeten Antikörper weisen für gewöhnlich eine nur geringe Kreuzreaktivität mit 3-epi-25(OH)D₃ auf (Carter & Card, 2019). Bei einem neueren Competitive Protein Binding Assay wurde eine hohe Kreuzreaktivität mit 3-epi-25(OH)D₃ festgestellt (Lee, Choi, Kweon, & Park, 2015).

- 24,25-Dihydroxyvitamin D

Im Blut liegen auch andere Formen von VD vor: Das Derivat 24,25(OH)₂VD macht etwa 10–15 Prozent der VD-Metaboliten aus und muss bei vielen Immunoassays herausgerechnet werden. Dieses Herausrechnen kann aber bei hohen oder niedrigen VD-Werten das Ergebnis verfälschen (Romagnoli et al., 2013). Die meisten Immunoassays können diesen Metaboliten kaum von 25(OH)VD unterscheiden. Die Serumkonzentration dieses Metaboliten liegt zwischen 2 % und 20 % (woanders andere Werte!) der Gesamtkonzentration der Hydroxy-VD-Metaboliten. Aufgrund der hohen Variation der 24,25(OH)₂VD-Serumwerte zwischen verschiedenen Testpersonen ist es kaum möglich, die tatsächliche Konzentration von 25(OH)VD durch rechnerische Korrekturen zu ermitteln (French, 2018).

- 25-Hydroxyvitamin D₂ und 25-Hydroxyvitamin D₃

Von höchster Bedeutung ist die mangelhafte Unterscheidung der Immunoassays zwischen 25(OH)VD₂ und 25(OH)VD₃. Das Verhältnis der beiden Metaboliten kann aber stark schwanken. Dies ist zum Beispiel bei Supplementierung mit einem der beiden der Fall. Folglich kann es zu wesentlichen Unter- oder Überschätzungen des Gesamtwertes der 25(OH)VD kommen (Couchman & Moniz, 2017).

Im Folgenden soll die Problematik der Kreuzreaktivitäten dargestellt werden: In einer Studie wurden zwei IA (Immunoassays) und ein CPBA (Competitive Protein Binding Assay) miteinander verglichen. Deren jeweilige Spezifität auf drei VD-Metaboliten war bekannt:

Tabelle 3: Kreuzreaktivitäten der Testmethoden im Vergleich (Lee 2015)

Metaboliten	IA 1	IA 2	CPBA
25(OH)VD2	106,2 %	82 %	92,0 %
25(OH)VD3	97,4 %	105,0 %	100 %
3-epi-25(OH)VD3	1,0 %	2,7 %	91,0 %

Zum Vergleich der 3 Vitamin D-Testmethoden wurden 4 zertifizierte Standards mit unterschiedlichen Anteilen der VD-Metaboliten verwendet, welche in folgender Tabelle angegeben sind.

Tabelle 4: Konzentrationen (ng/ml) der verschiedenen VD Metaboliten in 4 zertifizierten Standardlösungen (Lee 2015)

Standard	VD gesamt	VD2	VD3	EPI-VD
1	28,8		28,8	1,84
2	18,9	0,81	18,1	1,29
3	33,1	13,3	19,8	
4	29,4		29,4	26,4

Diese 4 Standards wurden anhand der 3 verschiedenen Testmethoden auf die Gesamtkonzentration von VD getestet:

Tabelle 5: Vergleich der ermittelten VD-Gesamtkonzentration der 4 Standardlösungen durch 3 Methoden in ng/mL (Lee 2015)

Standard	IA 1	IA 2	CPBA
1	29	35,4	35,4
2	18,7	21,6	18,9
3	36,7	30,2	31,1
4	28,7	36,3	51

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt interpretieren:

Immunoassay 1 nimmt VD3 schwächer und VD2 stärker wahr als die beiden anderen Testmethoden. Dies korreliert mit den Ergebnissen mit Standard 1 und 3.

Dies zeigt sich auch am Standard 4. Dieser unterscheidet sich aber von Standard 1 durch den hohen Gehalt an 3-epi-25(OH)VD3. Der CPBA besitzt eine hohe Kreuzreaktivität mit 3-epi-(OH)VD3 und detektiert daher wesentlich mehr 25(OH)VD (Lee et al., 2015).

Man kann also sehen, dass die vorhandenen Kreuzreaktivitäten einen erheblichen Einfluss auf die Messwerte haben.

Zu beachten ist auch, dass die vom Produzenten angegebenen Kreuzreaktivitäten in der Praxis deutlich abweichen können. Zu sehen ist das anhand zweier Immunoassays:

Tabelle 6: Vergleich der angegebenen und gemessenen mittleren Kreuzreaktivitäten zweier Immunoassays (Garnett et al., 2019)

	25-OH-D2	25-OH-D2	25-OH-D3	25-OH-D3
	angegeben	gemessen	angegeben	gemessen
Architect	82 %	37 %	105 %	85 %
Cobas	92 %	67 %	100 %	87 %

3.3.3 Standardisierungsversuche der Testmethoden

Bei einem Vergleich mehrerer Testmethoden wurden Abweichungen in den Serumkonzentrationen von bis zu 35 Prozent festgestellt (Kraenzlin & Meier, 2015). Die mangelhafte Inter-Assay-Korrelation ist ein Grund für widersprüchliche Ergebnisse von VD-bezogenen Studien. Das Festlegen allgemeingültiger Guidelines von Insuffizienz oder Toxizität wird heute auch durch die Abweichungen der Testergebnisse verschiedener Testmethoden erschwert. Auch wird Probanden irrtümlich ein ausreichender oder mangelhafter VD-Status attestiert. Daher gibt es nationale und internationale Bemühungen zur Standardisierung der VD-Resultate (Binkley & Carter, 2017).

Die Alternative, in sämtlichen Laboratorien einfach die Referenzmethode (LC-MS/MS) einzuführen, ist meistens aus Kostengründen keine Alternative. Zudem gibt es auch innerhalb verschiedener LC-MS/MS-Methoden Unterschiede. 2010 wurde das Vitamin D Standardization Program (VDSP) eingeführt, welches auf internationaler Ebene operiert und das Ziel hat, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten (Sempos et al., 2017). Daher nutzt man heute zertifizierte Referenzproben, deren Gehalt an verschiedenen VD-Metaboliten bekannt ist (Lee et al., 2015). Laboratorien, die sich der LC-MS/MS bedienen, können die Validität der Messergebnisse durch Anwendung standardisierter Referenzproben ermitteln. Standardisierungsprogramme können heute schon Fortschritte verzeichnen. Viele Laboratorien nahmen bisher jedoch nicht teil und unter den Teilnehmern sind weiterhin Verbesserungen möglich (Carter et al., 2019).

3.3.4 Qualität der Messwerte

In einer Reihe von Studien wird LC-MS/MS-Verfahren die höchste Qualität zugeschrieben. Bei akkurater Anwendung sind sie den anderen überlegen, sollten aber unbedingt standardisierten Regeln folgen. Ansonsten kann es auch innerhalb dieser Gruppe zu großen Abweichungen kommen (Garg, 2018). Die LC-MS/MS ist der HPLC und anderen Methoden in Sensitivität und Spezifität voraus (Dirks et al., 2018b). Insbesondere Immunoassays zeigen teilweise starke Abweichungen von Ergebnissen der Standardmethode LC-MS/MS. Häufig unterschätzen die IA die 25(OH)D₂-Konzentrationen und haben höhere Variationskoeffizienten (Kaufmann, Sepiashvili, & Singh, 2018). Ein Nachteil der automatisierten Immunoassays ist, dass sie teilweise irreführende Ergebnisse zeigen, da der systematische Fehler von Probe zu Probe stärker variiert als bei HPLC oder LC-MS/MS (Carter et al., 2018)

3.3.5 Kosten

Hinsichtlich der Beschaffungs- und Erhaltungskosten sind automatisierte Immunoassays und CBPA die günstigsten Methoden. Die Kosten sind bei Radioimmunoassays und HPLC-Verfahren weitaus höher und werden von Verfahren der LC-MS/MS noch deutlich übertroffen.

3.3.6 Aufwand

Naturgemäß sind automatisierte Methoden nicht aufwendig. Radioimmunoassays verlangen einen angemessenen Umgang mit radioaktiven Materialien. Auch HPLCs sind für gewöhnlich aufwendiger als gängige automatisierte Methoden und verlangen geeignetes Personal. Die höchste Expertise wird für die Bedienung der LC-MS/MS-Verfahren benötigt (Keyfi et al., 2018).

4 Zusammenfassung

Zentrales Thema der vorliegenden Arbeit ist die Vitamin-D-Analytik, wobei auch auf die Abweichungen der Ergebnisse bei Anwendung verschiedener Methoden eingegangen werden sollte. Deutlich wurde dabei, dass es Forschung und Praxis aktuell noch an nachvollziehbaren Standardisierungen mangelt: Es liegen etliche Standardisierungsprogramme vor, die teilweise bereits Verbesserungen in der Korrelation zu Referenzmethoden brachten. Zudem verringerten sie die systematischen Abweichungen der teilnehmenden Methoden. Allerdings werden die Standardisierungsmethoden häufig nicht angewendet (Bjerg, Halgreen, Hansen, Morris, & Jørgensen, 2019).

Die bei Weitem am häufigsten verwendete Gruppe sind automatisierte Immunoassays. Ihren Vorteilen der unkomplizierten Handhabung, des hohen Durchsatzes und des geringen Preises stehen die Nachteile der mangelhaften Vorreinigung und Probleme mit der Spezifität der verwendeten Antikörper gegenüber (Bjerg et al., 2019). Sie haben den Vorteil, viele Proben in kurzer Zeit abfertigen zu können. Jedoch gibt es Fortschritte in der Entwicklung von voll automatisierten LC-MS/MS-Verfahren, welche zu erheblicher Beschleunigung des Analyseprozesses führen (G. Carter & Card, 2019).

Es besteht heute Konsens, dass standardisierte LC-MS/MS-Methoden die leistungsfähigste Alternative in der VD-Analytik darstellen. Diese kombinieren die Trennung der Analyten durch vorgeschaltete chromatografische Prozeduren mit den Vorteilen der Massenspektroskopie und weisen die höchste Spezifität und Sensitivität auf (Dirks et al., 2018a).

Ein wesentlicher Vorteil der MS gegenüber Ligandenbindungsassays ist die tadellose separate Detektion von 25(OH)VD₂ und 25(OH)VD₃. Ein Nachteil der MS ist die fehlende Unterscheidung von 3-epi-25-OHVD₃ und 25(OH)VD. Dem kann mithilfe aufwendigerer Vortrennungen entgegengewirkt werden (Garg, 2018).

Größte Nachteile der LC-MS/MS sind Beschaffungs- und Wartungskosten sowie die Notwendigkeit entsprechend qualifizierten Personals (Galunska, 2014)

Diese Arbeit bringt eine differenzierte Betrachtung der Analysemethoden von Vitamin D. Entscheidend scheint für die Wahl der Methode durch die Labore in der Praxis sind meist der finanzielle Faktor und der Durchsatz der Methode. Sollte eine wissenschaftlich korrekte Abbildung der Werte erforderlich sein, wird empfohlen, kommerzielle Kriterien zu vernachlässigen.

5 Abstract

The central topic of the present work is vitamin D analysis, whereby the deviations of the results when using different methods should also be discussed. It became clear that research and practice are currently still lacking comprehensible standardizations: There are a number of standardization programs, some of which have already improved the correlation with reference methods. In addition, they reduced the systematic deviations of the participating methods. However, the standardization methods are often not used (Bjerg, Halgreen, Hansen, Morris, & Jørgensen, 2019).

By far the most widely used group are automated immunoassays. Their advantages of uncomplicated handling, high throughput and low price are opposed by the disadvantages of inadequate pre-cleaning and problems with the specificity of the antibodies used (Bjerg et al., 2019). There is the advantage of being able to process many samples in a short time. However, there are advances in the development of fully automated LC-MS / MS methods, which lead to a considerable acceleration of the analysis process (G. Carter & Card, 2019). Today there is consensus that standardized LC-MS / MS methods represent the most powerful alternative in VD analysis. These combine the separation of the analytes by upstream chromatographic procedures with the advantages of mass spectroscopy and have the highest specificity and sensitivity (Dirks et al., 2018a).

A major advantage of MS over ligand binding assays is the flawless separate detection of 25 (OH) VD₂ and 25 (OH) VD₃. A disadvantage of MS is the lack of a distinction between 3-epi-25-OHVD₃ and 25 (OH) VD. This can be counteracted with the help of more complex pre-separations (Garg, 2018).

The greatest disadvantages of LC-MS / MS are procurement and maintenance costs as well as the need for appropriately qualified personnel (Galunska, 2014)

This work brings a differentiated consideration of the analytical methods of vitamin D. The decisive factors for the choice of the method by the laboratories in practice are mostly the financial factor and the throughput of the method. If a scientifically correct representation of the values is required, it is recommended to neglect commercial criteria.

Literaturverzeichnis

- Amrein, K. (2019). Vitamin-D-Mangel - Aktuelle Diagnostik und Prophylaxe in Fallbeispielen. 2. Auflage, Bremen UNI-MED, 24-40
- Arneson, W. L., & Arneson, D. L. (2013). Current Methods for Routine Clinical Laboratory Testing of Vitamin D Levels. *Laboratory Medicine*, 44(1), 38–42.
- Asif, M., Groboske, S. E., Leung, E. K. Y., Yeo, K.-T. J., & van Wijk, X. M. R. (2019). Evaluation of a New Generation Automated Assay for 25-Hydroxy Vitamin D Based on Competitive Protein Binding. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, 4(2), 247–253.
- Audran, M., & Kumar, R. (1985). The Physiology and Pathophysiology of Vitamin D. *Mayo Clinic Proceedings*, 60(12), 851-866.
- Autier, P., Boniol, M., Pizot, C., & Mullie, P. (2014). Vitamin D status and ill health: A systematic review. *Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2(1), 76-89.
- Bolland, M. J., Grey, A., & Avenell, A. (2018). Effects of vitamin D supplementation on musculoskeletal health: a systematic review, meta-analysis, and trial sequential analysis. *Lancet Diabetes & Endocrinology*, 6(11), 847–858.
- Azrielant, S., & Shoenfeld, Y. (2017). Vitamin D and autoimmune diseases. *Indian Journal of Rheumatology*, 12(4), 219
- Barbarawi M, Kheiri B, Zayed Y, et al. Vitamin D Supplementation and Cardiovascular Disease Risks in More Than 83 000 Individuals in 21 Randomized Clinical Trials: A Meta-analysis. *JAMA Cardiology*, 2019; 4(8), 765–776.
- Bikle, D. (2014). Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chemistry & Biology*, 21(3), 319-329.
- Bischoff-Ferrari, H. A. (2019). Should vitamin D administration for fracture prevention be continued? Sollte die Frakturprävention mit Vitamin D fortgesetzt werden? *Zeitschrift Für Gerontologie und Geriatrie*, 52(5), 428–432.
- Bordelon, P., Ghetu, M. V., & Langan, R. (2009, October 15). Recognition and management of vitamin D deficiency. *American Family Physician*, 80, 841–846.
- Bouillon, R. (2018). Extra-Skeletal Effects of Vitamin D. *Frontiers of Hormone Research*, 50,

- Briggs, R., McCarroll, K., O'Halloran, A., Healy, M., Kenny, R. A., & Laird, E. (2019). Vitamin D Deficiency Is Associated With an Increased Likelihood of Incident Depression In Community-Dwelling Older Adults. *Journal of the American Medical Directors Association*, 20(5), 517–523.
- Carter, G. D., Berry, J., Durazo-Arvizu, R., Gunter, E., Jones, G., Jones, J et al (2018, March 1). Hydroxyvitamin D assays: An historical perspective from DEQAS. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 177, 30–35.
- Carter, G., & Card, D. J. (2019). *Methods for assessment of Vitamin D. Laboratory Assessment of Vitamin Status*. London, Academic Press, 49-77.
- Cattaruzza, M. S., Pisani, D., Fidanza, L., Gandini, S., Marmo, G., Narcisi, A. et al. (2019). 25-Hydroxyvitamin D serum levels and melanoma risk: a case-control study and evidence synthesis of clinical epidemiological studies. *European Journal of Cancer Prevention*, 28(3), 203–211.
- Chakhtoura, M., Chamoun, N., Rahme, M., & El-Hajj Fuleihan, G. (2019). Impact of Vitamin D Supplementation on Falls and Fractures – a Critical Appraisal of the Quality of the Evidence and an Overview of the available guidelines. *Bone*, 131, 115112.
- Chan, J., Thiessen, T., Lane, S., West, P., Gardner, K., François, A., & Meldrum, A. (2015). Microfluidic detection of vitamin D compounds using a cylindrical optical microcavity. *IEEE Sensors Journal*, 15(6), 3467–3474.
- Chauhan, D., Kumar, R., Panda, A. K., & Solanki, P. R. (2019). An efficient electrochemical biosensor for Vitamin-D3 detection based on aspartic acid functionalized gadolinium oxide nanorods. *Journal of Materials Research and Technology*, 8(6), 5490-5503.
- Chun, R. F. (2012). New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell Biochemistry and Function*, 30, 445–456.
- Couchman, L., & Moniz, C. F. (2017, April 1). Analytical considerations for the biochemical assessment of vitamin D status. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 9, 97–104.
- Dilg, P. (2005): *Vitaminforschung*. In: Werner E. Gerabek u. a. *Enzyklopädie Medizingeschichte*. Berlin/New York, De Gruyter, 1451.
- Dirks, N. F., Ackermans, M. T., Lips, P., de Jongh, R. T., Vervloet, M. G., de Jonge, R., & Heijboer, A. C. (2018). The When, What & How of Measuring Vitamin D Metabolism

- in Clinical Medicine. *Nutrients*, 10, 482.
- Ebeling, P. R., Adler, R. A., Jones, G., Liberman, U. A., Mazziotti, G., Minisola, S. et al (2018). Management of endocrine disease: Therapeutics of Vitamin D. *European Journal of Endocrinology*, 179(5), 239–259.
- efsa [European Food Safety Authority] (2016): Vitamin D: EFSA legt Referenzwerte für Aufnahme fest. Abgerufen unter <https://www.efsa.europa.eu/de/press/news/161028> [15.03.2020].
- Eisman, J. A., Shepard, R. M., & DeLuca, H. F. (1977). Determination of 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3 in human plasma using high-pressure liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 80(1), 298–305.
- Erdman, P., Palmer-Toy, D. E., Horowitz, G., & Hoofnagle, A. (2019). Accuracy-Based Vitamin D Survey: Six Years of Quality Improvement Guided by Proficiency Testing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 143(12), 1531-1538.
- Empfehlungen Vorsorgeuntersuchung 2020. (2019). Abgerufen unter: <http://www.hauptverband.at/cdscontent/load?contentid=10008.673513&version=1549356521> [2.12.2019]
- Farrell, C.-J. L., Martin, S., McWhinney, B., Straub, I., Williams, P., & Herrmann, M. (2012). State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *Clinical Chemistry*, 58(3), 531–542.
- Fraser, W. D., & Milan, A. M. (2013). Vitamin D assays: Past and present debates, difficulties, and developments. *Calcified Tissue International*, 92(2), 118–127.
- French, D. (2018). The (Sun)Light and Dark of 25-Hydroxyvitamin D Testing. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, 3(3), 460-473.
- Gaksch, M., Jorde, R., Grimnes, G., Joakimsen, R., Schirmer, H., Wilsgaard, T, Pilz, S. et al. (2017). Vitamin D and mortality: Individual participant data meta-analysis of standardized 25-hydroxyvitamin D in 26916 individuals from a European consortium. *PLoS ONE*, 12(2), e0170791.
- Galior, K., Ketha, H., Grebe, S., & Singh, R. J. (2018). 10 years of 25-hydroxyvitamin-D testing by LC-MS/MS-trends in vitamin-D deficiency and sufficiency. *Bone Reports*, 8, 268–273.
- Gallieni, M., Cozzolino, M., Fallabrino, G., Pasho, S., Olivi, L., & Brancaccio, D. (2009).

- Vitamin D: Physiology and pathophysiology. *International Journal of Artificial Organs*, 32, 87–94.
- Galunska, B., Gerova, D., Boncheva, M., & Svinarov, D. (2014). HPLC method for measuring the circulating levels of 25-hydroxy vitamin D : Validation and comparison with ID LC / MS / MS and immunoassay. *Integrative Food, Nutrition and Metabolism*, 1(2), 119–123.
- Garg, U. (2018). 25-Hydroxyvitamin D Testing: Immunoassays Versus Tandem Mass Spectrometry. *Clinics in Laboratory Medicine*, 38, 439–453.
- Garnett, E., Li, J., Rajapakshe, D., Tam, E., Meng, Q. H., & Devaraj, S. (2019). Efficacy of two vitamin D immunoassays to detect 25-OH vitamin D2 and D3. *Practical Laboratory Medicine*, 17, e00130.
- Goodsell, D. S. (2012). Vitamin D Receptor. RCSB Protein Data Bank. Abgerufen unter: https://doi.org/10.2210/rcsb_pdb/mom_2012_11 [17.August, 2020]
- Gröber, U., & Kisters, K. (2012, April). Influence of drugs on vitamin D and calcium metabolism. *Dermato-Endocrinology*, 4, 158–166.
- Gu, Y., Luan, X., Ren, W., Zhu, L., & He, J. (2018). Impact of seasons on stroke-related depression, mediated by vitamin D status. *BMC Psychiatry*, 18(1), 359
- Harris, S. S. (2004). Vitamin D and type 1 diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 889–890.
- Harrison, S. R., Li, D., Jeffery, L. E., Raza, K., & Hewison, M. (2019). Vitamin D, Autoimmune Disease and Rheumatoid Arthritis. *Calcified Tissue International*, 106(1), 58-75.
- Heath, A. K., Kim, I. Y., Hodge, A. M., English, D. R., & Muller, D. C. (2019, February 1). Vitamin D status and mortality: A systematic review of observational studies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(3), 383
- Heureux, N. (2017). Vitamin D Testing—Where Are We and What Is on the Horizon? *Advances in Clinical Chemistry*, 78, 59–101
- Holick, M. F. (1995). Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61(3), 638-645.

- Jagannath, V. A., Filippini, G., Di Pietrantonj, C., Asokan, G. V., Robak, E. W., Whamond, L., & Robinson, S. A. (2018, September 24). Vitamin D for the management of multiple sclerosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd.
- Jorde, R., Sollid, S. T., Svartberg, J., Schirmer, H., Joakimsen, R. M., Njølstad, I. et al. (2016). Vitamin D 20 000 IU per week for five years does not prevent progression from prediabetes to diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(4), 1647–1655.
- Ju, S., Lee, Y. -, & Jeong, S. (2012). Serum 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of depression: A systematic review and meta-analysis. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 17(5), 447-455.
- Kamen, D. L., & Tangpricha, V. (2010). Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *Journal of Molecular Medicine*, 88(5), 441-450
- Karras, S. N., Koufakis, T., Fakhoury, H., & Kotsa, K. (2018). Deconvoluting the Biological Roles of Vitamin D-Binding Protein During Pregnancy: A Both Clinical and Theoretical Challenge. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 259
- Kaufmann, M., Sepiashvili, L., & Singh, R. J. (2018). Mass Spectrometry Assays of Vitamin D Metabolites. *Vitamin D: Fourth Edition*. London, Academic Press, 1, 909–923.
- Keum, N., Lee, D., Greenwood, D., Manson, J., & Giovannucci, E. (2019). Vitamin D supplementation and total cancer incidence and mortality: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of Oncology*, 30(5), 733-743.
- Keyfi, F., Nahid, S., Mokhtariye, A., Nayerabadi, S., Alaei, A., & Varasteh, A.-R. (2018). Evaluation of 25-OH vitamin D by high performance liquid chromatography: validation and comparison with electrochemiluminescence. *Journal of Analytical Science and Technology*, 9(1), 25, 1-6
- Kocak, F. E., Ozturk, B., Isiklar, O. O., Genc, O., Unlu, A., & Altuntas, I. (2015). A comparison between two different automated total 25-hydroxyvitamin D immunoassay methods using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biochimica Medica*, 25(3), 430–438.

- Kraenzlin, M. E., & Meier, C. (2015). Sinn und Unsinn der Vitamin-D- Bestimmung. *Osteologie*, 24(04), 225–230.
- Kumar Gupta, A., Jamwal, V., & Malhotra, P. (2014). Hypervitaminosis D and Systemic Manifestations: A Comprehensive Review *Journal International Medical Sciences Academy*, 27, 236–237.
- Lee, J. H., Choi, J., Kweon, O. J., & Park, A. J. (2015). Discrepancy between Vitamin D Total Immunoassays due to Various Cross-reactivities. *Journal of Bone Metabolism*, 22(3), 107-112.
- Le Goff, C., Cavalier, E., Souberbielle, J. C., González-Antuña, A., & Delvin, E. (2015, August 1). Measurement of circulating 25-hydroxyvitamin D: A historical review. *Practical Laboratory Medicine*, 2, 1–14.
- Lehmann, B. (2012). Zur Physiologie von Vitamin. *Vitamin D Update 2012: Von der Rachitisprophylaxe zur allgemeinen Gesundheitsvorsorge*. Deisenhofen, Dustri-Verlag, 1-12
- Loeb, M., Dang, A. D., Thiem, V. D., Thanabalan, V., Wang, B., Nguyen, N. B., ... Pulenayegum, E. (2019). Effect of Vitamin D supplementation to reduce respiratory infections in children and adolescents in Vietnam: A randomized controlled trial. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 13(2), 176–183.
- Macdonald, H. M., Reid, I. R., Gamble, G. D., Fraser, W. D., Tang, J. C., & Wood, A. D. (2018). 25-Hydroxyvitamin D Threshold for the Effects of Vitamin D Supplements on Bone Density: Secondary Analysis of a Randomized Controlled Trial. *Journal of Bone and Mineral Research*, 33(8), 1464–1469.
- Marcinowska-Suchowierska, E., Kupisz-Urbanska, M., Lukaszkiwicz, J., Pludowski, P., & Jones, G. (2018, September 20). Vitamin D Toxicity a clinical perspective. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 550
- Martineau, A. R., Jolliffe, D. A., Hooper, R. L., Greenberg, L., Aloia, J. F., Bergman, P., ... Camargo, C. A. (2017). Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: Systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ*; 356:i6583
- Mirhosseini, N., Rainsbury, J., & Kimball, S. M. (2018). Vitamin D Supplementation, Serum 25(OH)D Concentrations and Cardiovascular Disease Risk Factors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5, 87

- Nachliely, M., Sharony, E., Bolla, N. R., Kutner, A., & Danilenko, M. (2016). Prodifferentiation activity of novel vitamin D2 analogs PRI-1916 and PRI-1917 and their combinations with a plant polyphenol in acute myeloid leukemia cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1068.
- Nair, R., & Maseeh, A. (2012). Vitamin D: The sunshine vitamin. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 3, 118–126
- Nurmi, T., Tuomainen, T. P., Virtanen, J., Mursu, J., & Voutilainen, S. (2013). High-performance liquid chromatography and coulometric electrode array detector in serum 25-hydroxyvitamin D 3 and 25-hydroxyvitamin D 2 analyses. *Analytical Biochemistry*, 435(1), 1–9.
- Ofenloch-Haehnle, B. (2012). Approaches to measurement of Vitamin D concentrations - Immunoassays. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 72(SUPPL. 243), 50–53.
- Palacios, C., & Gonzalez, L. (2014). Is vitamin D deficiency a major global public health problem? *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 144, 138–145.
- Palacios C, Trak-Fellermeier MA, Martinez RX, Lopez-Perez L, Lips P, Salisi JA et al. Regimens of vitamin D supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Pham, H., Rahman, A., Majidi, A., Waterhouse, M., & Neale, R. E. (2019, September 1). Acute respiratory tract infection and 25-hydroxyvitamin D concentration: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, 3020
- Pittas, A. G., Dawson-Hughes, B., Sheehan, P., Ware, J. H., Knowler, W. C., Aroda, V. R., ... D2d Research Group. (2019). Vitamin D Supplementation and Prevention of Type 2 Diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 381(6), 520–530.
- Rezayi, M., Ghayour-Mobarhan, M., Tavakoly Sany, S. B., Fani, M., Avan, A., Pasdar, Z., ... Amiri, I. S. (2018, December 21). A comparison of analytical methods for measuring concentrations of 25-hydroxy vitamin D in biological samples. *Analytical Methods*, 10, 5599–5612.
- Riek, A. E., Rajagopal, R., & Bernal-Mizrachi, C. (2018). *Vitamin D and the Cardiovascular System. Vitamin D: Fourth Edition*, London, Academic Press, 1, 545–562.

- Romagnoli, E., Pepe, J., Piemonte, S., Cipriani, C., & Minisola, S. (2013). MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Value and limitations of assessing vitamin D nutritional status and advised levels of vitamin D supplementation. *European Journal of Endocrinology*, 169(4), 59-69.
- Saida, F. B., Yuan, ; Chong, & Yuan, C. (n.d.). Vitamin D Testing in Clinical Settings: Methodologies, Accuracy and Standardization Vitamin D Deficiency: Causes & Treatments. Abgerufen unter www.openaccessebooks.com
- Schilling, S. (2012). Epidemischer Vitamin-D-Mangel bei patienten einer geriatrischen reha-bilitationsklinik. *Deutsches Arzteblatt International*, 109(3), 33–38.
- Scragg, R. (2018, May 1). Emerging evidence of thresholds for beneficial effects from vitamin D supplementation. *Nutrients*, 10(5), 561
- Sempos, C. T., Carter, G. D., & Binkley, N. C. (2017). 25-Hydroxyvitamin D Assays: Standardization Guidelines, Problems, and Interpretation. *Vitamin D: Fourth Edition*, London, Academic Press, 1, 939–957.
- Sempos CT, Heijboer AC, Bikle DD, Bollerslev J, Bouillon R, Brannon PM, et al. (2018, October 1). Vitamin D assays and the definition of hypovitaminosis D: results from the First International Conference on Controversies in Vitamin D. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84, 2194–2207.
- Serteser, M., Coskun, A., Inal, T. C., & Unsal, I. (2012). Challenges in vitamin D analysis / Izazovi u analizi vitamina D. *Journal of Medical Biochemistry*, 31(4), 326-332.
- Shah, I., Akhtar, M. K., Hisaindee, S., Rauf, M. A., Sadig, M., & Ashraf, S. S. (2018). Clinical diagnostic tools for vitamin D assessment. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 180, 105–117.
- Smollich, M., & Podlogar, J. (2019). VItamin-D-Status in Deutschland: Supplementierung. *PHARMAKON*, 7(2), 98-105.
- Souci, S. W., Fachmann, W., Kraut, H., & Kirchhoff, E. (2016). Die Zusammensetzung der Lebensmittel Nährwert-Tabellen. Stuttgart, MedPharm Scientific Publishers, 18
- Szymczak-Pajor, I., & Śliwińska, A. (2019). Analysis of Association between Vitamin D Deficiency and Insulin Resistance. *Nutrients*, 11(4), 794.
- Tsiaras, W. G., & Weinstock, M. A. (2011, March). Factors influencing vitamin d status. *Acta*

Dermato-Venereologica, 91, 115–124.

- Tsuprykov, O., Chen, X., Hocher, C. F., Skoblo, R., Lianghong Yin, & Hocher, B. (2018, June 1). Why should we measure free 25(OH) vitamin D? *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 180, 87–104.
- Van den Ouweland, J. M. W. (2016, November 1). Analysis of vitamin D metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 84, 117–130.
- Van Groningen, L., Opdenoordt, S., Van Sorge, A., Telting, D., Giesen, A., & De Boer, H. (2010). Cholecalciferol loading dose guideline for vitamin D-deficient adults. *European Journal of Endocrinology*, 162(4), 805–811.
- Vázquez-Lorente, H., Herrera-Quintana, L., Molina-López, J., Quintero-Osso, B., & Planells, E. (2019). Current trends in the analytical determination of vitamin D/Tendencias actuales en la determinación analítica de vitamina D. *Nutricion Hospitalaria*.; 36(6):1418-1423
- Wallace, H. J., Holmes, L., Ennis, C. N., Cardwell, C. R., Woodside, J. V, Young, I. S, et al. (2019). Effect of vitamin D3 supplementation on insulin resistance and β -cell function in prediabetes: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 110(5), 1138-1147.
- Yin, S., Yang, Y., Wu, L., Li, Y., & Sun, C. (2019, January 1). Recent advances in sample preparation and analysis methods for vitamin D and its analogues in different matrices. - *Trends in Analytical Chemistry*, 110, 204–220.
- Zelzer, S., Goessler, W., & Herrmann, M. (2018). Measurement of vitamin D metabolites by mass spectrometry, an analytical challenge. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*, 3, 99.
- Zhang, Y., Fang, F., Tang, J., Jia, L., Feng, Y., Xu, P., & Faramand, A. (2019). Association between vitamin D supplementation and mortality: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 366, l4673