



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Auswirkung einer Vitamin-D-Supplementierung bei älteren Personen auf das Entzündungsgeschehen im Darm vor und nach einer Krafttrainingsintervention, gemessen im Rahmen der NutriAging D-Studie am Entzündungsmarker Calprotectin“

verfasst von / submitted by

Julia Dorninger BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2022 / Vienna, 2022

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

UA 066 838

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

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner

Mitbetreut von / Co-Supervisor:

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlichst bei meinem Betreuer, Herrn Uni.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner, und bei Herrn Ing. Patrick A. Zöhrer BSc BSc MSc für die kooperative und unkomplizierte Zusammenarbeit im Rahmen der „Nutri-Aging“-Studie, für die Bereitstellung eines interessanten Themas sowie für die Betreuung während des Verfassens meiner Masterarbeit bedanken. Weiters möchte ich Herrn Ing. Patrick A. Zöhrer BSc BSc MSc nochmals einen ganz besonderen Dank aussprechen für die inspirierende und freundliche Unterstützung und dafür, dass er stets ein offenes Ohr für alle Anliegen hatte, was ich sehr schätze. Vielen Dank für die Erfahrungen, die ich im Zuge dieser Forschungsarbeit sammeln konnte und für die wunderbare Zusammenarbeit in einem hochmotivierten, inspirierenden und zugleich menschlichen Arbeitsklima!

Im Sinne einer besseren Lesbarkeit wurde in dieser Arbeit auf geschlechtsspezifische Formulierungen verzichtet. Sofern nicht anders kenntlich gemacht, sind bei der Angabe der männlichen Formulierung stets beide Geschlechter gemeint. Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte und die Bilder ausfindig zu machen und entsprechend zu zitieren. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	5
II.	Abbildungsverzeichnis.....	8
III.	Tabellenverzeichnis.....	10
IV.	Abkürzungsverzeichnis.....	11
1	Einleitung	13
2	Literaturübersicht	15
2.1	Vitamin D	15
2.1.1	Versorgung in der Bevölkerung und Zufuhrempfehlungen	16
2.1.2	Supplemente	18
2.1.3	Faktoren welche die Resorption von Vitamin D beeinflussen	19
2.1.4	Chemische Struktur	20
2.1.5	Biosynthese und Metabolismus	21
2.1.6	Extrarenale Biosynthese von 1,25-Dihydroxycholecalciferol	23
2.1.7	Genomischer Wirkmechanismus	24
2.1.8	Nicht-genomischer Wirkmechanismus	25
2.2	Potenzielle Wirkmechanismen von Vitamin D zur Senkung der intestinalen Inflammation	26
2.2.1	Immunregulatorische Mechanismen	26
2.2.2	Einfluss von Vitamin D auf das Darm-Mikrobiom und die Darmbarriere	28
2.3	Vitamin D und entzündliche Darmerkrankungen	30
2.3.1	Niedriger Serumspiegel und Erkrankungshäufigkeit	30
2.3.2	Vitamin D und Calprotectin.....	32
2.4	Calprotectin	35
2.4.1	Diagnostische Grenzwerte	36
2.4.2	Variabilität der Konzentration von fäkalem Calprotectin	37

2.4.3	Körpergewicht und Lebensstil.....	41
2.4.4	Ernährung.....	42
2.4.5	Sport.....	43
3	Material und Methoden.....	44
3.1	„Nutri-Aging D“-Studie	45
3.1.1	Studienziel	45
3.1.2	Ablauf der Probandenrekrutierung.....	45
3.1.3	Ein- und Ausschlusskriterien	46
3.1.4	Studiendesign.....	47
3.1.5	Flow-Diagramm	49
3.2	Messung der fäkalen Calprotectin-Konzentration mittels ELISA (enzyme linked immuno assay).....	51
3.2.1	Testprinzip.....	51
3.2.2	Bestandteile der Calprotectin-ELISA-Kits.....	52
3.3	Eingesetzte Materialien für den Messvorgang	53
3.4	Durchführung des Calprotectin-ELISA	54
3.4.1	Probenentnahme	54
3.4.2	Aliquotierung.....	55
3.4.3	Stuhlprobenextraktion & Probenverdünnung	55
3.4.4	Probeninkubation.....	56
3.4.5	Erster Waschvorgang	57
3.4.6	Enzymkonjugat-Inkubation	57
3.4.7	Zweiter Waschvorgang.....	57
3.4.8	Substrat-Inkubation & Stopplösung.....	58
3.4.9	Photometrische Messung & quantitative Auswertung	58
3.4.10	Statistische Auswertung der Messergebnisse	59

4	Ergebnisse & Schlussbetrachtung	59
4.1	Messwiederholungen – Calprotectin	60
4.2	Deskriptive Statistik	61
4.3	Hypothesenprüfung und Schlussbetrachtung	66
5	Abstract	74
6	Zusammenfassung	75
7	Literaturverzeichnis	76

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wichtige Strukturen von Vitamin D (Barth, 2006)	20
Abbildung 2: Photolytische Umwandlung von 7-Dehydrocholesterin und Ergosterin in Vitamin D3 und Vitamin D2 (Rehner and Daniel, 2010)	22
Abbildung 3: Zellen die 1-Alphahydroxylase exprimieren. (*): geringe Produktion von 1,25(OH)2D3, (****): hohe Produktion von 1,25(OH)2D3. (Hewison et al., 2004).....	23
Abbildung 4: Darstellung einer Osteocalcin-Genaktivierung durch den 1,25-Dihydroxycholecalciferol-ligandierten VDR-RXT-Komplex. Die Nummerierung innerhalb der Kreise gibt die Reihenfolge der Schritte wieder. (Haussler et al. 2011).....	25
Abbildung 5: Die Assoziation zwischen einem Vitamin D-Mangel und dem Schweregrad einer gastro-intestinalen Inflammation gemessen an Calprotectin sowie anhand einer endoskopischen/histologischen Untersuchung. (Gubatan et al., 2019)	33
Abbildung 6: Ablauf der "Nutri-Aging D"-Studie.....	49
Abbildung 7: Flow-Diagramm der „Nutri-Aging D“-Studie	50
Abbildung 8: Verteilung des Body-Mass-Index der Studienpopulation vor Beginn der Intervention (T0) bei n = 72 Teilnehmern.....	62
Abbildung 9: Verteilung des Alters der Studienpopulation (Zeitpunkt T0) bei n = 72 Teilnehmern.	62
Abbildung 10: Serum Vitamin D-Spiegel vor der Intervention (T0) bei n = 72 Teilnehmern.	64
Abbildung 11: Serum Vitamin D-Spiegel nach der Intervention (T2) bei n = 72 Teilnehmern.	64
Abbildung 12: Balkendiagramm: Veränderung der fCal-Konzentration im Stuhl durch die Intervention mit täglich 500 IE Vitamin D (DL) bei n = 24 Teilnehmern.....	66
Abbildung 13: Balkendiagramm: Veränderung der fCal-Konzentration im Stuhl durch die Intervention mit monatlich 50.000 IE Vitamin D (DH) bei n = 27 Teilnehmern.....	66
Abbildung 14: Veränderung der Serum Vitamin D-Spiegel durch die Intervention in der DH (n = 27, I-J = 2,2 ng/ml, r = 2,2 ng/ml, p = 0,001*).	67
Abbildung 15: Korrelation (r = -0,093, p = 0,435) zwischen dem Vitamin D-Serumspiegel und der fCal-Konzentration zum Zeitpunkt T0 bei n = 72 Teilnehmern.	69

Abbildung 16: Korrelation zwischen der Ballaststoffaufnahme und der fäkalen Calprotectin-Konzentration zum Zeitpunkt T0 (n= 72, p = 0,012*, r = -0,296).....	71
Abbildung 17: Korrelation zwischen der Ballaststoffaufnahme und der fäkalen Calprotectin-Konzentration zum Zeitpunkt T2 (n=72, p = 0,004*, r = -0,335).	72
Abbildung 18: Korrelation zwischen dem BMI und der fCal-Konzentration zum Zeitpunkt T0 (n = 72, p = 0,047*, r = 0,235)	72
Abbildung 19: Korrelation zwischen dem BMI und der fCal-Konzentration zum Zeitpunkt T0 (n = 72, p = 0,036*, r = 0,248)	72

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Grenzwerte für Calprotectin nach Altersgruppen (adaptiert nach Manceau et al, 2017).....	39
Tabelle 2: Das Pipettierschema der Calprotectin-ELISA-Immuno-Assays.	56
Tabelle 3: Testversuche der Calprotectin-ELISA-Immunoassays	60
Tabelle 4: Merkmale der Studienpopulation (Alter, Altersgruppen, Geschlecht) zum Zeitpunkt T0. DL = Gruppe "Vitamin D täglich", DH = Gruppe "Vitamin D monatlich", K = Kontrollgruppe, N = alle Gruppen.	61
Tabelle 5: Body-Mass-Index und Ballaststoffaufnahme der Studienteilnehmer zu den Zeitpunkten T0 und T2. DL = Gruppe "Vitamin D täglich", DH = Gruppe "Vitamin D monatlich", K = Kontrollgruppe, N = alle Gruppen.	62
Tabelle 6: Vitamin D im Serum und fCal-Konzentration im Stuhl der Studienteilnehmer zu den Zeitpunkten T0 und T2. DL = Gruppe "Vitamin D täglich", DH = Gruppe "Vitamin D monatlich", K = Kontrollgruppe, N = alle Gruppen.	63
Tabelle 7: Bewertung der Vitamin D-Versorgung und der Entzündung (fCal) der Studienteilnehmer zum Zeitpunkt T0.	64
Tabelle 8: Bewertung der Vitamin D-Versorgung und der Entzündung (fCal) der Studienteilnehmer zum Zeitpunkt T1.	65
Tabelle 9: Bewertung der Vitamin D-Versorgung und der Entzündung (fCal) der Studienteilnehmer zum Zeitpunkt T2.	65

IV. Abkürzungsverzeichnis

CAMP-Gen – Cathelicidin-Gen

CCR8 - Chemokinrezeptor 8

CDED – Morbus Crohn Ausschlussdiät

CED – chronisch entzündliche Darmerkrankung

CRP – C-reaktives Protein

ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay

fCal – fäkales Calprotectin

IE – Internationale Einheiten

I-FABP – intestinales fettsäurebindendes Protein

IL-17 – Interleukin 17

IFN- γ – Interferon Gamma

IL-4 – Interleukin 4

IL-10 – Interleukin 10

IU – Internationale Units (Synonym für IE = internationale Einheiten)

LCA - Lithocolsäure

LPS – Lipopolysaccharide

NF- κ B – nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

NOD 2 Gen - nucleotid oligomerization domain-containing protein

NSAID - non-steroidal anti-inflammatory drug

NSAR – nichtsteroidale Antiphlogistika/Antirheumatika

p38 MAP-Kinasen – p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen

RCT – randomisierte kontrollierte Studie

RM – Repetition Maximum

RXR – Retinoid X-Rezeptor

TLR – Toll-like-Rezeptor

VDREs – Vitamin D Responsive Element

DBP – Vitamin D-bindendes Protein

VDR – Vitamin D-Rezeptor

VDS – Vitamin D-Serumspiegel

VSDP – Vitamin D Standardization Programme

1 Einleitung

In den letzten 10 Jahren haben sich entzündliche Darmerkrankungen global zu einer ernstzunehmenden Herausforderung für die öffentliche Gesundheit entwickelt. In Nordamerika und Europa leiden über 1,5 Millionen beziehungsweise 2 Millionen Menschen an entzündlichen Darmerkrankungen. (Burisch et al., 2013; Kaplan, 2015; Kaplan and Ng, 2017)

Gleichzeitig gibt es immer mehr Daten über die Wirkung von Vitamin D und mittlerweile steht fest, dass die Wirkung von Vitamin D weit über die Knochengesundheit hinausgeht. Zahlreiche Studien deuten auf eine anti-entzündliche und immunmodulierende Wirkung hin (Carlberg, 2014; Gubatan and Moss, 2018; Kahles, 2016). Dies eröffnet Frage, ob Vitamin D tatsächlich Entzündungen im Darm senken kann, beziehungsweise als therapeutisches Adjuvans anerkannt werden könnte.

Diese Arbeit ist Teil des EU-Co-finanzierten „SK-AT Interreg NutriAging“-Projekts, dessen Projektziele mitunter die Verbesserung der Lebensqualität im Alter und daher auch die Reduktion der Inzidenz von altersbedingten Erkrankungen ist. Durch die gewonnenen Erkenntnisse soll ein verbessertes Gesundheitsbewusstsein, sowohl für Einzel- als auch Fachpersonen ermöglicht werden, um so einen Betrag für die zur Verringerung der altersbedingten Kosten im Gesundheitssystem zu liefern. In diesem Projekt wurde die Auswirkung verschiedenster Nährstoffe auf Marker des physischen und psychischen Alterns untersucht. Die vorliegende Masterarbeit hat als Teil-Projekt das Ziel, den Zusammenhang der Vitamin D-Serumspiegel und Entzündungen im Darm von Probanden zu untersuchen.

Für die Messung von entzündlichen Vorgängen im Darm wurde die Konzentration des Markers Calprotectin im Stuhl ermittelt. Der Vergleich von der fäkalen Calprotectin-Konzentration mit der Höhe des Vitamin D im Serum soll die Frage über einen möglichen Zusammenhang beantworten. Darüber hinaus sollten die Ergebnisse mit weiteren potenziellen Einflussfaktoren auf die fCal-Konzentration verglichen werden (Alter, Body-Mass-Index, Ballaststoffaufnahme), um einen möglichen Einfluss dieser Faktoren auf die

erhobenen fCal-Konzentrationen zu ermitteln und um nähere Erkenntnisse zur Bewertung der therapeutischen Effektivität einer oralen Vitamin D-Gabe auf Entzündungen (fCal) im Darm zu generieren. Folgende Punkte wurden statistisch ausgewertet:

Ist die fäkale Calprotectin-Konzentration durch die Intervention verändert worden? Sind die Serum Vitamin D-Spiegel durch die Intervention gestiegen?

Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Vitamin D-Spiegeln im Serum und der fäkalen Calprotectin-Konzentration? Gibt es unterschiedliche Zusammenhänge hinsichtlich der Vitamin D-Serumspiegel und der fäkalen Calprotectin-Konzentration zwischen den einzelnen Interventionsgruppen?

Korreliert das fäkale Calprotectin mit anderen Faktoren wie dem Alter, dem Body-Mass-Index und der Ballaststoffaufnahme und könnten diese Faktoren die fCal-Messwerte beeinflussen?

2 Literaturübersicht

2.1 Vitamin D

Heute ist Vitamin D ein allseits bekannter Begriff. In der Umgangssprache spricht man auch oft vom „Sonnenvitamin“, weil es unter UV-Einfluss in der Haut des Menschen gebildet wird. Die Erfolgsgeschichte von Vitamin D begann mit der Erkenntnis, dass es als antirachitischer Faktor fungiert (Bartl, 2013). Rachitis ist eine Erkrankung, die durch eine unzureichenden Mineralstoffversorgung der Knochen verursacht wird, was sich als Deformation des Skelettsystems äußert. Vitamin D ist in Wirbeltieren für die Aufrechterhaltung normaler Calcium- und Phosphatspiegel im Blut verantwortlich und somit sowohl essenziell für die Erhaltung eines normalen Skeletts als auch wesentlich für die Muskelkontraktion sowie diverse Zellfunktionen im Körper. (Jones, 2018)

In den letzten Jahrzehnten erweiterten sich die Erkenntnisse über Vitamin D und seinen Stoffwechsel stetig. Die Entdeckung, dass der Vitamin D-Rezeptor sowie seine aktivierenden Enzyme in vielen anderen Zelltypen vorkommen, welche nicht an der klassischen Knochenhomöostase beteiligt sind, lässt eine weitaus differenziertere Rolle von Vitamin D vermuten als bisher angenommen. Insbesondere die Erkenntnis, dass der aktive Metabolit Calcitriol nicht nur in der Niere, sondern auch durch Zellen des Immunsystems des peripheren Gewebes synthetisiert wird, legt immunmodulierende sowie auch anti-inflammatorische Effekte des Vitamin D nahe. (Kahles, 2016)

2.1.1 Versorgung in der Bevölkerung und Zufuhrempfehlungen

Die Vitamin D-Spiegel werden üblicherweise in 4 Stufen kategorisiert: <10 ng/ml (schwerer Mangel), <20 ng/ml (Mangel), 20 bis 30 ng/ml (Suffizienz), ≥ 30 bis 80 ng/ml (optimaler Status) („Vitamin-D-Zufuhr und Vitamin-D-Status,” 2019). Daten zeigen, dass ein Serum Vitamin D-Spiegel von bis zu 80 ng/ml noch im Normalbereich liegt (Haines and Park, 2012). Es wird auch behauptet, dass Serumwerte bis zu 90 ng/ml in sonnigen Ländern noch normal sein können (Alshahrani and Aljohani, 2013). Ab einem Serum-Wert von über 100 ng/ml spricht man von einem Vitamin D-Überschuss, ab Serumwerten von 150 ng/ml wurden Vitamin D-Intoxikationen beobachtet (Alshahrani and Aljohani, 2013; Galior et al., 2018; Lim and Thadhani, 2020). Die Symptome einer Vitamin D-Intoxikation können vielfältig sein und hängen weitgehend mit einer Hyperkalzämie zusammen. Neuropsychiatrische, gastrointestinale, kardiovaskuläre Beschwerden sowie Nierenkomplikationen können bei einer Vitamin D-Intoxikation auftauchen (Lim and Thadhani, 2020).

Obwohl Vitamin D über das Sonnenlicht im Körper eigenständig synthetisiert wird, ist ein Mangel in der Bevölkerung weit verbreitet. So zeigt beispielsweise eine Studie des Robert-Koch-Institutes (n = 6.995 Personen), dass über 60 Prozent der deutschen Staatsbürger den wünschenswerten Serumspiegel von 30 ng/ml nicht erreichen. Die Studie wurde im Zeitraum von 2008 und 2011 durchgeführt. In den Sommermonaten hatten 50 Prozent der Probanden einen Serumspiegel von über 30 ng/ml. In dieser Untersuchung wurden bei Männern und bei Frauen Parameter wie eine niedrige sportliche Aktivität, ein hoher Body-Mass-Index sowie ein hoher Medienkonsum signifikant und unabhängig voneinander mit einem Vitamin D-Mangel assoziiert. (Rabenberg et al., 2015)

Eine europäische Studie verwendete VDSP-Protokolle („Vitamin D Standardization Programme“) von repräsentativen, europäischen Bevölkerungsgruppen im Kindes-/Jugendalter, Erwachsenenalter sowie Seniorenalter, um die Prävalenz eines Vitamin D-Mangels in Europa zu quantifizieren. Die verwendeten Daten umfassten 55.844 europäische Probanden von denen über 40 Prozent einen Serumspiegel von unter 30 ng/ml hatten. Im Schnitt wiesen 17 Prozent der Population einen durchschnittlichen Wert von 12 ng/ml

im Serum auf, was einem schweren Vitamin D-Mangel nahekommt. (Cashman et al., 2016)

Eine US-amerikanische Studie ermittelte den Serum Vitamin D-Spiegel von 26.010 Erwachsenen (>18 Jahren) im Zeitraum 2001 – 2010. Dabei wurde eine Prävalenz eines Vitamin D-Mangels bzw. einer Insuffizienz von 41 Prozent festgestellt. Eine höhere Prävalenz stellte man bei dunkelhäutigen Personen, bei sportlicher Inaktivität, einem niedrigerem Bildungslevel, einem niedrigeren durchschnittlichen Einkommen, Zigarettenkonsum und einem geringerem Milchkonsum fest. Übergewichtige Personen hatten in der Studie ein ca. 3-mal höheres Risiko für einen Vitamin D-Mangel. (Liu et al., 2018)

Es gibt auch klinisch bedingte Risikofaktoren. Beispielsweise besitzen Patienten mit einer krankheitsbedingten Fettmalabsorption (welche auch durch ein Inflammationsgeschehen im Darm hervorgerufen werden kann), einer bariatrischen Operation sowie durch die Einnahme von gewissen Medikamenten ein erhöhtes Risiko für einen Vitamin D-Mangel. (Cashman, 2020; Gubatan et al., 2019)

Mit zunehmendem Alter sinkt auch die Vitamin D-Synthesefähigkeit der Haut und es kommt auch zu einer eingeschränkten Umwandlung des Vitamin D in seine aktive Form (Holick, 2020). Eine weitere Studie aus Großbritannien zeigt einen Zusammenhang eines Vitamin D-Mangels mit einer krankheitsbedingten, nachlassenden Gehirnleistung im Alter auf (Busse et al., 2013).

2.1.1.1 Wie viel Vitamin D braucht der Mensch?

Der Referenzwert für die Zufuhr von Vitamin D bei fehlender körpereigener Synthese liegt bei 20 Mikrogramm (800 IE) pro Tag. Es handelt sich dabei um einen Schätzwert, der aus diversen Studien abgeleitet wurde und dieser gilt für jede Altersgruppe ab einem Lebensjahr. Diese Empfehlung bezieht sich jedoch nicht auf die Behebung eines Vitamin D-Mangels. (DACH-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, 2021)

2.1.2 Supplemente

Es existieren nur sehr wenige Studien über die Effizienz der Vitamin D-Supplementierung zur Behebung eines Mangels bei Kindern und Erwachsenen. Noch weniger Daten finden sich über die Wirksamkeit verschiedener Vitamin D-Dosierungen. Dabei gibt es Daten, die zeigen, dass niedrige Dosierungen von 200 – 600 IE beim Großteil der Vitamin D-Mangel-Patienten keinen signifikanten Anstieg des Serum Vitamin D-Spiegels bewirkt. (Marwaha and Dabas, 2019)

Eine weitere Studie ermittelte den Einfluss von drei verschiedenen Dosierungen Vitamin D (800 IE, 1.000 IE oder 2.000 IE pro Tag, sechs Monate lang) auf den Vitamin D-Spiegel von ein- bis elf-jährigen Vitamin D-Mangelpatienten (n = 216). Dabei stellte sich eine Dosis von täglich 1.000 IE als notwendig heraus, um nach 6 Monaten einen Vitamin D-Spiegel von >20 ng/ml bei über 97 Prozent der Probanden zu erreichen. In der Gruppe mit 2.000 IU erzielten 100 Prozent einen Serum Vitamin D-Spiegel von über 20 ng/ml (Marwaha et al., 2018). Eine tägliche Supplementierung von mindestens 1.500 IE, von November bis April, sei laut Forschern ausreichend, um den Serum Vitamin D-Spiegel bei Kindern, aus der Region Norditalien, über die Wintermonate aufrecht zu erhalten. Dabei betonen die Forscher, dass höhere Dosierungen noch effizienter sein könnten, insbesondere bei Erwachsenen sowie dunkelhäutigeren Personen. (Mazzoleni et al., 2019)

Eine Studie mit Kindern aus der nördlichen sowie der südlichen Region Schwedens untersuchte die Wirkung eines milchbasierten Vitamin D-Supplements (mit entweder 10 oder 25 Mikrogramm Vitamin D), welches über einen Zeitraum von 3 Monaten täglich eingenommen wurde. Dabei legten die Forscher die Hautpigmentierung mittels Fitzpatrick's Definition fest und unterteilten diese in jeweils „hell“ und „dunkel“. Kinder mit einem hellen Hautton benötigten mindestens 20 Mikrogramm (600 IE) Vitamin D um den Serumspiegel über die Wintermonate auf über 20 ng/ml zu halten. Wohingegen Personen mit einer höheren Hautpigmentierung 28 Mikrogramm (1120 IE) benötigten. (Öhlund et al., 2017)

2.1.3 Faktoren welche die Resorption von Vitamin D beeinflussen

Es ist wichtig zu beachten, dass Vitamin D fettlöslich ist, daher empfiehlt sich die Einnahme von Vitamin D mit über einen fetthaltigen Carrier oder mit einer fetthaltigen Nahrungsquelle. Eine Studie untersuchte den Anstieg des Serum Vitamin D-Spiegels bei Schulmädchen, die ein Jahr lang monatlich 60.000 IE in Form von Tabletten mit Wasser einnahmen. Dabei wurde nach einem Jahr ein minimaler Anstieg von 7,6 ng/ml verzeichnet (Kuchay et al., 2016). Eine weitere Studie erzielte durch eine Vitamin D-Supplementierung über einen fetthaltigen Carrier mit der gleichen Dosierung und Dauer bei Schulkindern einen Anstieg von 21,1 ng/ml sowie 23,7 ng/ml. (Marwaha et al., 2016)

Während eine Fettzugabe die Bioverfügbarkeit von Vitamin D signifikant erhöht, ist die Menge an Fett hierbei irrelevant. Auch die Essensmatrix scheint hinsichtlich der Bioverfügbarkeit nur eine geringfügige Bedeutung zu haben (Borel et al., 2015). Sucrose-Polyester, wie zum Beispiel der synthetische Fettersatzstoff „Olestra“ sowie der Lipasehemmer Tetrahydrolipstatin (Orlistat) können die Vitamin D-Aufnahme hemmen.

Das Altern soll laut Borel et al. kein mindernder Faktor für die Resorption sein ebenso wenig wie die Art und die Menge der täglich aufgenommenen Ballaststoffe. (Borel et al., 2015)

Eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung (CED) ist ein Risikofaktor für einen Vitamin D-Mangel durch beispielsweise eine verminderte Fettresorption. In einer Studie hatten 70 Prozent von 37 asymptomatischen CED-Patienten eine Vitamin D-Insuffizienz oder einen Vitamin D-Mangel (Farraye et al., 2011). In weiteren Abschnitten befindet sich nähere Literatur über diesen Zusammenhang.

In einer Untersuchung ermittelte man bei gesunden, übergewichtigen Probanden (BMI ≥ 25 , Alter ≤ 30) die subkutane Vitamin D-Synthese 24 Stunden nach UVB-Bestrahlung und verglich diese mit den normalgewichtigen Kontrollen. Mittels Messung des Serum Vitamin D-Spiegels vor und nach der Bestrahlung, fand man bei den übergewichtigen Probanden einen um 57 Prozent reduzierten Anstieg von Vitamin D im Blut. Es war hie-

bei jedoch kein Unterschied bei der subkutanen Vorstufe 7-Dehydrocholecalciferol sowie beim Prävitamin D zwischen den normalen und übergewichtigen Personen feststellbar. Einen Monat später erhielten die Probanden 50.000 IE Vitamin D₂ als Einzeldosis. Dabei war der Anstieg des aktiven Vitamin D₃-Spiegels mit dem BMI signifikant negativ korreliert ($r = 0.56$, $p = 0.007$). Eine ähnliche Korrelation fand man einen Monat zuvor nach der UVB-Bestrahlung ($r = 0.55$, $p = 0.003$) (Wortsman et al., 2000). Übergewicht wurde bereits in anderen Studien mit einem Vitamin D-Mangel assoziiert (Maurya and Aggarwal, 2017).

2.1.4 Chemische Struktur

Unter dem Begriff Vitamin D finden sich eine Reihe von Seco-Steroiden, welche durch einen geöffneten B-Ring charakterisiert sind. Insgesamt 947 dieser Vitamin D-Strukturen werden im „Handbook Vitamin D“ von Milne und Delander (2007) beschrieben. Vitamin D kann sowohl von pflanzlichen als auch tierischen Organismen synthetisiert werden. Die wichtigsten Verbindungen sind in nachstehender Abbildung 1 angeführt. (Vitamin D Handbook, 2007)

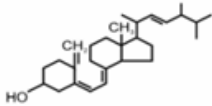
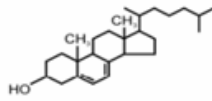
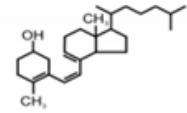
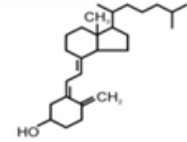
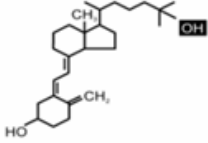
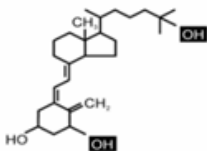
"pflanzliches" Vitamin D₂ (Ergocaliferol)	
Provitamin D₃ (7-Dehydrocholesterin)	
Prävitamin D₃	
Vitamin D₃ (Cholecalciferol)	
Calcidiol (25-Hydroxyvitamin D ₃)	
Calcitriol (1,25-Dihydroxyvitamin D ₃)	

Abbildung 1: Wichtige Strukturen von Vitamin D (Barth, 2006)

2.1.5 Biosynthese und Metabolismus

Die Vitamin D-Versorgung über die Nahrung spielt eine weitaus geringere Rolle als Eigensynthese über die Haut. Schätzungen zufolge soll die Sonnenlicht-Exposition 70 bis 90 Prozent der Versorgung ausmachen (Holick, 1996). Für die Produktion von Vitamin D₃ benötigt der Mensch Cholesterin als Grundsubstanz. In der Leber wird daraus 7-Dehydrocholesterin gebildet und dann im Anschluss zur Unterhaut transportiert. Durch Wärme und durch die UVB-Exposition der Haut geschieht die Umwandlung zu Cholecalciferol – dem eigentlichen Vitamin D₃. In dieser photochemischen Reaktion wird der B-Ring des 7-Dehydrocholesterols aufgebrochen und durch die anschließende Verschiebung der Doppelbindung das Cholecalciferol gebildet. Hierfür muss die UVB-Strahlung der Sonne im Wellenlängenbereich von 290 – 315 nm liegen. Die UVB-Strahlung ist jedoch abhängig von der geographischen Lage, der Seehöhe sowie der Tages- und Jahreszeit und kann daher nicht immer erreicht werden. Weiters kann ein hoher Melanin Gehalt der Haut sowie die Verwendung von Sonnenschutzcremes die Vitamin D-Syntheserate deutlich reduzieren. (Heber et al., 2017; Macdonald, 2013; Rehner and Daniel, 2010)

Das in pflanzlichen Organismen vorkommende Vitamin D₂ (Ergocalciferol) wird nicht von den Pflanzen selbst sondern von Hefen gebildet. Als Grundsubstanz dient hierfür Ergosterin, welches im Anschluss über die UVB-Strahlung zum Ergocalciferol umgebaut wird (Barth, 2006; Rehner and Daniel, 2010). Trotz der strukturellen Unterschiede zum Vitamin D₃ zeigen beide eine qualitativ sehr ähnliche biologische VDR-vermittelte Aktivität. (Jones, 2018)

Abbildung 2 zeigt die photolytische Umwandlung von Provitamin D₃ zu Vitamin D₃. Das in der Unterhaut gebildete oder oral über die Nahrung/Supplemente aufgenommene Vitamin D₃ (Cholecalciferol) ist biologisch noch nicht aktiv, es handelt sich um die hauptsächliche Speicherform. Erst durch weitere Hydroxylierungsschritte mittels sogenannter Cytochrom-P450-Enzyme in der Leber und in der Niere, wird dieses in die aktive Form überführt – dem Calcitriol (1,25-Dihydroxyvitamin D₃). Der erste Schritt geschieht in den Mikrosomen der Leber-Parenchymzellen am C25-Atom des Cholecalciferols durch die

25-Hydroxylase (CYP2R1, CYP27A1) – es entsteht das Zwischenprodukt Calcidiol (25-Hydroxycholecalciferol). Der zweite Hydroxylierungsschritt erfolgt in der Niere am C1-Atom durch die 1-Alpha-Hydroxylase (CYP27B1) – dadurch entsteht das Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol). Diese biologisch aktive Form dient als Ligand des nuklearen Vitamin D-Rezeptors (VDR). Der VDR kommt im gesamten Körper (in allen proliferativen Zelltypen) vor (außer in der Leber). (Bartl, 2013; Hewison et al., 2004; Jones, 2013)

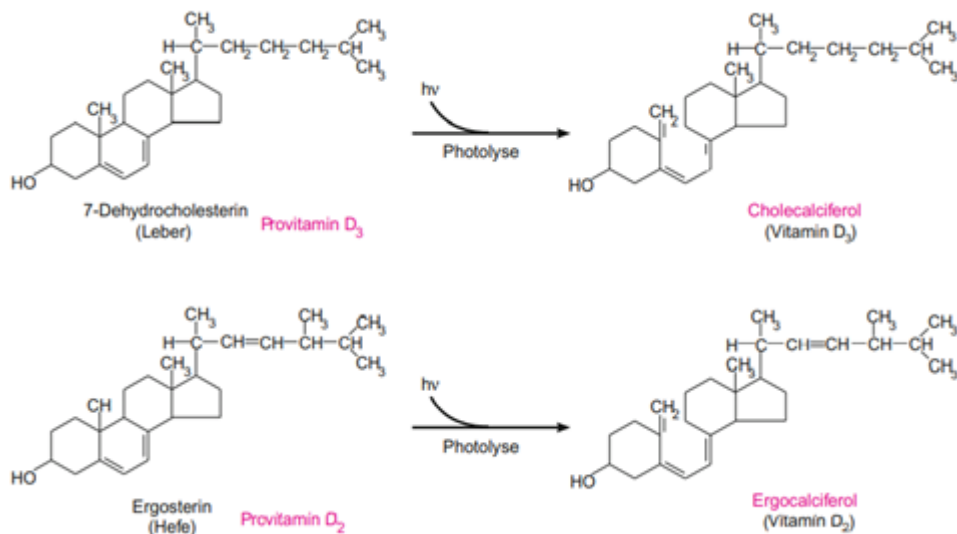


Abbildung 2: Photolytische Umwandlung von 7-Dehydrocholesterin und Ergosterin in Vitamin D₃ und Vitamin D₂ (Rehner and Daniel, 2010)

Der Körper hat Mechanismen um unerwünschtes Vitamin-D zu inaktivieren und es anschließend über die Galle auszuschcheiden. Sonnenlicht kann beispielsweise Prävitamin D und Vitamin D inaktivieren. Eine Vitamin-D-Intoxikation durch verstärktes Sonnenbaden ist daher nicht möglich. Eine Überdosierung ist durch oral zugeführtes Vitamin D jedoch möglich, allerdings ist hierbei der tolerierbare Rahmen groß. (Macdonald, 2013)

Die Konzentration des biologisch aktiven Calcitriols (1,25-Dihydroxycholecalciferol) im Serum ist über einen Rückkoppelungsmechanismus reguliert. Die Inaktivierung wird sowohl durch 1,25-Dihydroxycholecalciferol selbst induziert als auch über das Parathormon, Kalzium und verschiedene Zytokine (wie das Interferon- γ , Tumornekrosefaktor- α). Das inaktivierende Enzym ist die 24-Hydroxylase, welche das 1,25-Hydroxycholecalciferol am C24-Atom hydroxyliert – es entsteht die 24,25-Dihydroxycholecalciferol

sowie 1,24,25-Dihydroxycholecalciferol, welche biologisch nur schwach wirksam sind. Aktuell wird davon ausgegangen, dass das 1,25-Dihydroxycholecalciferol eine 100-1000-fach stärkere Wirksamkeit hat, als seine Metaboliten. (Lehmann et al., 2004; López-Muñoz et al., 2019; Trémezaygues and Reichrath, 2010)

2.1.6 Extrarenale Biosynthese von 1,25-Dihydroxycholecalciferol

Lange Zeit herrschte die Meinung, dass 25-Hydroxycholecalciferol ausschließlich in der Niere zum 1,25-Dihydroxycholecalciferol aktiviert werden kann. Diese Behauptung ist nun als widerlegt anzusehen. In-vitro-Studien sowie Untersuchungen an nephrektomierten Patienten zeigen, dass eine Vielzahl von Zellen außerhalb der Niere durch die Expression der 1α -Hydroxylase in der Lage sind, aus 25-Hydroxycholecalciferol das 1,25-Dihydroxycholecalciferol zu synthetisieren. Darunter befinden sich unter anderem Keratinozyten, Monozyten, Makrophagen, Prostata, Dickdarmzellen. (Trémezaygues and Reichrath, 2010)

Laut Hewison et al. können 1α -Hydroxylase exprimierende Gewebezellen in vier breite Kategorien unterteilt werden: 1) proximale Tubulusepithelzellen, 2) epitheliale Barrierezellen 3) Monozyten die ausschließlich 1α -Hydroxylase produzieren, jedoch kaum 1,25-Dihydroxycholecalciferol synthetisieren sowie 4) Antigenpräsentierende Zellen. (Hewison et al., 2004)

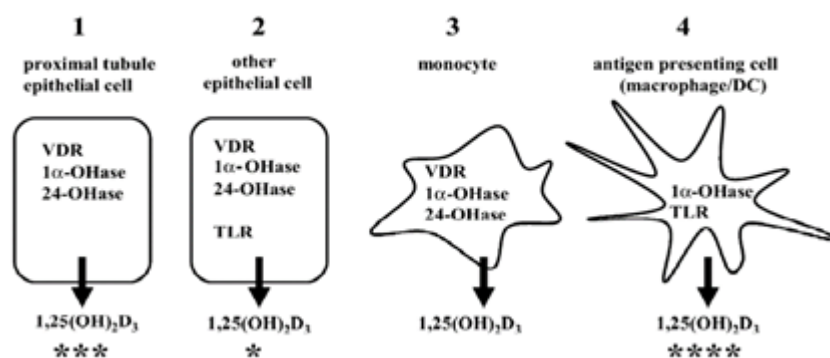


Abbildung 3: Zellen die 1-Alphahydroxylase exprimieren. (*): geringe Produktion von 1,25(OH)₂D₃, (***): hohe Produktion von 1,25(OH)₂D₃. (Hewison et al., 2004)

Die obige Unterteilung wird von zwei weiteren Schlüsselfaktoren bestimmt. Erstens, die Co-Expression von 24-Hydroxylase, was die Epithelzellen und die Monozyten betrifft, um die Synthese des 1,25-Dihydroxycholecalciferols einzugrenzen. Zweitens, die Fähigkeit 1,25-Dihydroxycholecalciferol als Reaktion einer TLR-vermittelte Immunantwort zu synthetisieren. (Hewison et al., 2004)

Der aktuellen Erkenntnislage zufolge wird das extrarenal gebildete 1,25-Dihydroxycholecalciferol weder in das Blut abgegeben noch für die Kalzium- und Knochenhomöostase verwendet. Vielmehr fungiert dieses als lokaler Mediator für die Zellproliferation und Differenzierung sowie für eine Vielzahl von gewebsspezifischen Mechanismen (Knochenmark, Immunsystem, Haut, Prostata-Epithelzellen, Muskel und Darm). (Trémezaygues and Reichrath, 2010)

2.1.7 Genomischer Wirkmechanismus

Das genomische Wirkspektrum von 1,25-Dihydroxycholecalciferol beruht auf seiner Rolle als Ligand des nuklearen Vitamin D-Rezeptors (VDR). Der VDR gehört zu den Steroidhormon-Kernrezeptoren und ist ebenso ein Transkriptionsfaktor, der an die DNA bindet. Er besteht aus drei Domänen: Erstens, der N-terminalen Bindungsdomäne mit zwei Zinkfingern, die an diskreten Stellen (VDREs) an die Rillen der DNA binden. Zweitens, einer C-terminalen (Liganden)-Bindungsdomäne, welche an 1,25-Dihydroxycholecalciferol bindet und Drittens eine Gelenkregion, die diese zwei Domänen verbindet. (Bikle, 2014).

Bei der Genaktivierung durch den VDR sind co-regulatorische Einheiten involviert, welche die genomische Aktivität induzieren (Haussler et al., 2011). Diese co-regulatorischen Einheiten können sowohl gen- als auch zellspezifisch sein, was den zellspezifischen Wirkmechanismus von 1,25-Dihydroxycholecalciferol ermöglicht. Das Profil der VDR-Bindungsstellen variiert von Zelltyp zu Zelltyp (Bikle, 2014).

Der mit 1,25-Dihydroxycholecalciferol besetzte VDR ist an der Regulation von Genen beteiligt, die einer hormonellen Kontrolle unterliegen. Tausende VDREs und hunderte VDR-regulierte Gene wurden bisher identifiziert. (Haussler et al., 2011)

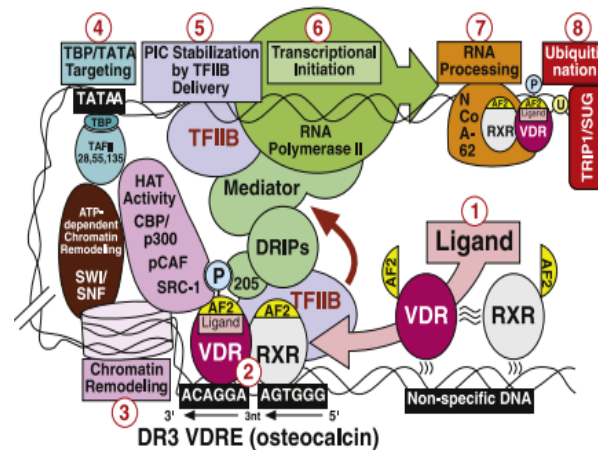


Abbildung 4: Darstellung einer Osteocalcin-Genaktivierung durch den 1,25-Dihydroxycholecalciferol-ligandierten VDR-RXT-Komplex. Die Nummerierung innerhalb der Kreise gibt die Reihenfolge der Schritte wieder. (Haussler et al. 2011)

Durch neuere Microarray-Techniken konnte gezeigt werden, dass sich die Zahl der VDR-Bindungsstellen durch die Gabe von Vitamin D bzw. 1,25-Dihydroxycholecalciferol erhöht werden kann. Beispielsweise stiegen VDR-Bindungsstellen in Osteoblasten von Mäusen von basal 1.200 VDR-Bindungsstellen auf 8000 (Bikle, 2014; Meyer et al., 2010). Bei Lymphoblasten fand man nach der Zugabe von 1,25-Dihydroxycholecalciferol insgesamt 2.776 VDR-Bindungsstellen, die für die Regulation von 229 Genen zuständig sind. (Ramagopalan et al., 2010)

VDR wurden in über 38 verschiedenen Geweben gefunden. Im Fachgebiet der Endokrinologie geht man davon aus, dass wenn eine Zelle einen Rezeptor für einen Liganden besitzt, diese auch die Mechanismen besitzt, bei Rezeptorbesetzung, eine entsprechende biologische Antwort zu generieren. (Haussler et al., 2011)

2.1.8 Nicht-genomischer Wirkmechanismus

Um einen besseren Einblick über das Wirkpotential von Vitamin D zu erhalten, wird eine kurze Einführung über die nicht-genomischen Eigenschaften von Vitamin D erläutert.

Vitamin D besitzt, neben seiner genregulatorischen Wirkung, auch sogenannte „Rapid-Response-Mechanismen“. Diese laufen, im Gegensatz zu den genomischen Mechanismen, relativ schnell ab (Sekunden bis Minuten). (Bikle, 2014)

Zu den Rapid-Response-Mechanismen zählt die Aktivierung von Signalmolekülen, Second-Messenger und Proteinkinasen (Hii and Ferrante, 2016). Bereits im Jahr 1994 wurde für die nicht-genomische Wirkung ein alternativer, membranständiger Vitamin D-Rezeptor an der Basalmembran von Hühner-Epithelzellen postuliert, auch „MARRS-bindendes Protein“ („membrane associated rapid response binding protein“) genannt (Nemere et al., 1994). Allerdings sind kaum Daten über Vitamin D und sein nicht-genomisches Wirkspektrum verfügbar.

2.2 Potenzielle Wirkmechanismen von Vitamin D zur Senkung der intestinalen Inflammation

Obwohl bereits zahlreiche Daten zu Vitamin D und seiner anti-inflammatorischen Wirkung existieren sind die exakten Wirkmechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt. Es finden sich ausschließlich Hinweise darüber, die sich womöglich eines Tages alle Hypothesen zu einem Gesamtbild zusammenfügen werden. Einige dieser Hinweise werden im Nachstehenden beleuchtet.

2.2.1 Immunregulatorische Mechanismen

Es konnte bereits in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass Vitamin D wichtige regulatorische Eigenschaften im angeborenen und erworbenen Immunsystem besitzt. Wie bereits erwähnt, entfaltet Vitamin D seine regulatorische Wirkung durch seine Bindung an den sogenannten Vitamin D-Rezeptor, der in einer Vielzahl von Geweben vorkommt, wie beispielsweise in der Darmschleimhaut und den Immunzellen (auch T-Zellen). (Jung and Park, 2020)

Es wurde bereits gezeigt, dass Vitamin D in Monozyten die Ausschüttung von entzündlichen Zytokinen, wie IL-6 vermindert, indem es die p38 MAP-Kinase hemmt (Miodovnik et al., 2012). Ebenso kann Vitamin D antiinflammatorische T-Zell-Signalwege fördern, um eine antimikrobielle Wirkung von Makrophagen zu stimulieren (Cantorna et al., 2015). Cantorna et al. zeigten, dass Vitamin D über anti-inflammatorische Mechanismen, wie die Reduktion von IL-17, IFN- γ bei gleichzeitiger Erhöhung von IL-4 und IL-10, die Erkrankungsschwere bei Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung mildern kann. (Cantorna et al., 2015)

D'Ambrosio et al. zeigten, dass Vitamin D die Produktion des inflammatorisch wirksamen Zytokins IL-12 senken kann, indem es NF- κ B herunterreguliert. IL-12 ist ein zentrales Interleukin für die Entwicklung einer Th1-spezifischen Immunantwort. (D'Ambrosio et al., 1998)

Sloka et al. untersuchten die Wirkung von Vitamin D auf die Immunverschiebung von Zellkulturen (mononuklearen Zellen aus menschlichem Blut sowie Splenozyten und Lymphknotenzellen von Mäusen). Vitamin D konnte über die Beeinflussung spezieller Transkriptionsfaktoren (GATA-3 und STAT-6) Entzündungen durch eine Th2-Verschiebung des Immunsystems vermindern. (Sloka et al., 2011)

Boonstra et al. entdeckten bei Maus-Zellkulturen ebenfalls eine Th2-Verschiebung und eine Hochregulierung des Th2-induzierenden Transkriptionsfaktors GATA-3 durch Vitamin D. Die von Vitamin D induzierte Th2-Verschiebung wurde größtenteils über IL-4 vermittelt, die Neutralisation von IL-4 hob die vermehrte Th2-Zellentwicklung nach Vitamin D-Gabe fast vollständig auf. (Boonstra et al., 2001)

Eine im Mai 2021 veröffentlichte Studie an humanen Zellkulturen zeigte, dass Vitamin D in Kombination mit Prostaglandin E2 eine Th2-ähnliche Reaktion mit dem Chemokinrezeptor CCR8-Expression fördert. Zwar modulierte Prostaglandin E2 ebenfalls die CCR8-Expression, in Kombination mit Vitamin D wurde jedoch die entsprechende Zytokinproduktion gehemmt (Fraga et al., 2021). Beim Menschen befindet sich CCR8 auf kutanen Gedächtnis-T-Zellen und auf wenigen zirkulierenden Gedächtniszellen. Es wurde auch

gezeigt, dass langlebige T-Gedächtniszellen von CCR8 definiert werden können. (McCully et al., 2018)

Vitamin D begünstigt auch die Produktion von antimikrobiellen Peptiden, welche mikrobiozide und chemotaxis-induzierende Wirkungen auf entzündlichen Immunzellen ausüben (Talsness et al., 2017).

Der VDR-Komplex stimuliert in Makrophagen (über das NOD2-Gen) die Produktion des antimikrobiellen Beta-Defensin-2 (Gisbert-Ferrándiz et al., 2018). In Darmkrebszellen und anderen Geweben bewirkte Vitamin D eine erhöhte Expression des humanen Cathelicidin-Genes (CAMP-Gen). Cathelicidine sind antimikrobiell wirksame Peptide. (Gombart et al., 2005; Wang et al., 2004)

Fritsche et al. zeigten, dass Vitamin D die Toll-like-Rezeptoren von Monozyten herunterregulieren und die durch LPS induzierte Fehlregulation des Immunsystems verringern kann (Fritsche et al., 2003). TLRs fungieren zur Bekämpfung von unerwünschten Mikroben durch die Auslösung einer entzündlichen Immunreaktion. Immer mehr Daten zeigen, dass eine Dysregulation der TLRs an der Entstehung und Pathogenese von entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt ist. (Lu et al., 2018)

Eine systematische Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2019 zeigt, dass eine Supplementierung mit Vitamin D die Zahl und die Funktion von regulatorischen T-Zellen erhöhen kann. Die Autoren betonen jedoch den weiteren Forschungsbedarf auf diesem Gebiet (Fisher et al., 2019). Regulatorische T-Zellen sind eine Untergruppe der T-Lymphozyten (meist CD4+ Zellen). Sie wirken einer übermäßigen Aktivierung des Immunsystems entgegen und Erhöhen die immunologische Selbsttoleranz, was einer Entstehung von Autoimmunkrankheiten vorbeugen kann (Sasidharan Nair and Elkord, 2018).

2.2.2 Einfluss von Vitamin D auf das Darm-Mikrobiom und die Darmbarriere

Mittlerweile gibt es einige Daten, die einen Zusammenhang zwischen der Vitamin D-Zufuhr und dem menschlichen Darm-Mikrobiom aufzeigen. Es ist bereits bekannt, dass

gewisse Darmbakterien in der Lage sind die Darmbarriere zu schützen und so Entzündungen der Darmschleimhaut entgegenwirken. (Luthold et al., 2017)

Eine verminderte Anzahl von Vitamin D-Rezeptoren sowie ein Mangel an Vitamin D wird mit einer intestinalen Dysbiose und einer erhöhten Anfälligkeit für entzündliche Darmerkrankungen assoziiert. (Bashir et al., 2016; Kong et al., 2008; Ooi et al., 2013)

Bei CED-Patienten stellten Forscher eine Abnahme wichtiger Bakterienstämme (Bacteroidetes und/oder Firmicutes) und eine Zunahme von pathogenen Proteobakterien fest. (Fakhoury et al., 2020)

Wang et al. zeigten bei Mäusen, dass sich durch zwei Polymorphismen am VDR die Zahl der pathogenen *Parabacteroides* stark erhöhte. (Wang et al., 2014)

In einer prospektiven Langzeitstudie wurde gezeigt, dass die Gabe von Vitamin D bereits nach einer Woche die Konzentration von gesundheitsfördernden Darmbakterien (wie *Alistipes* und *Roseburia*) bei CED-Patienten erhöhte. Bei den gesunden Kontrollen stellte sich keine Veränderung ein. (Schäffler et al., 2018)

Alistipes finegoldii wurde bei Mäusen, bei denen künstlich eine Colitis induziert wurde, als schützender Faktor identifiziert. *Roseburia genii* sind Teil der kommensalen Bakterien und diese Bakterien produzieren kurzkettige Fettsäuren (insbesondere Butyrat). Kurzkettige Fettsäuren wirken positiv auf die Darm-Motilität, sorgen für die Aufrechterhaltung der intestinalen Immunität und besitzen entzündungshemmende Eigenschaften. (Dziarski et al., 2016; Tamanai-Shacoori et al., 2017)

Vitamin D besitzt, neben seiner immunregulatorischen Funktion und seiner Wirkung auf das Darm-Mikrobiom, auch schützende Eigenschaften für die Darmbarriere (Gubatan and Moss, 2018). Stio et al. fanden in-vitro bei humanen Zellkulturen, dass Vitamin D die Expression von Claudin-2, Claudin-4, Claudin-7 und somit die Bildung von Tight-Junction-Proteinen reguliert (Stio et al., 2016).

Es gibt ähnliche Studien, die betonen, dass ein Mangel an VDR zu einer Überfunktion von Claudin-2 führt. Eine Überexpression von Claudin-2 begünstigt eine löchrige Darmbarriere, was wiederum das Risiko für eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung erhöht. (Zhang et al., 2019)

Wie bei Gombert et al. und Wang et al. zeigten auch Guo et al., dass Vitamin D die Expression des Cathelicidin-Genes (CAMP-Gen) induziert. CAMP wird von den Immun- und Epithelzellen exprimiert und sorgt für eine verbesserte Darmbarrierefunktion. (Guo et al., 2014)

Vitamin D bindet an Lithocholsäure (LCA), eine sekundäre Gallensäure. LCA ist für Darmzellen toxisch und kann unter Umständen sogar Darmkrebs auslösen. Interessanterweise kann LCA an den VDR binden. Wenn Vitamin D den VDR aktiviert, induziert es die Expression von Cytochrom CYP3A, welches an der Entgiftung von LCA in Darm und Leber beteiligt ist. (Cheng et al., 2014; Makishima et al., 2002)

2.3 Vitamin D und entzündliche Darmerkrankungen

2.3.1 Niedriger Serumspiegel und Erkrankungshäufigkeit

Es gibt zahlreiche Studien und Meta-Analysen, die einen Zusammenhang zwischen einem niedrigen Vitamin D-Level und entzündlichen Darmerkrankungen aufzeigen. Eine Meta-Analyse von Del Pinto et al. untersuchte die Häufigkeit von inflammatorischen Darmerkrankungen und verglich dies mit den Vitamin D-Spiegel der Patienten. Es zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen der Erkrankungsrate und einem Vitamin D-Mangel. Diese Korrelation war bei den Patienten mit Colitis ulcerosa wesentlich höher (OR = 2,28) als bei den Patienten mit Morbus Crohn (OR = 1,63). Zu betonen ist, dass sich diese Meta-Analyse rein auf Beobachtungsstudien bezieht, was die Aussagekraft entsprechend limitiert. Von insgesamt 14 Studien mit 1891 Patienten wurden elf Studien mit erwachsenen Personen durchgeführt und 3 Studien mit Kindern. Bei den Daten der Kinderstudien konnte man keinen signifikanten Zusammenhang nachweisen, was womöglich durch die kleine Personenzahl bedingt sein kann. (Del Pinto et al., 2015)

Eine im Jahr 2018 veröffentlichte Meta-Analyse von der Forschergruppe von Li et al. analysierte RCTs, um die Effektivität einer Vitamin D-Supplementation bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen zu untersuchen. Diese Meta-Analyse basierte auf 18 RCTs mit insgesamt 908 Patienten. Es wurden die Vitamin D-Spiegel, der Inflammationssindex sowie entstehende Nebenwirkungen analysiert. Vitamin D bewirkte eine signifikant stärkere Reduktion der Erkrankungsrückfallrate, verglichen zur Kontrollgruppe. Eine Reduktion des CRP sowie der Erythrozyten-Sedimentationsrate konnte nicht nachgewiesen werden. (Li et al., 2018)

Eine systematische Übersichtsarbeit und Meta-Analyse von Gubatan et al. aus dem Jahr 2019 betont, dass Vitamin D möglicherweise eine therapeutische Wirkung bei entzündlichen Darmerkrankungen besitzen könnte. Insgesamt 27 Studien, mit 8316 IBD-Patienten (3115 Patienten mit Colitis ulcerosa, 5201 Patienten mit Morbus Chron), wurden hierfür analysiert. Die Qualität der einbezogenen Studien wurde anhand des Newcastle-Ottawa-Scores bewertet. Von den 27 Studien hatten 22 einen hohen Score (7-9) und 5 einen moderaten Score (4-6).

Die Ergebnisse von Gubatan et al. zeigen folgende Zusammenhänge: Erstens, ein Vitamin D Mangel erhöht das Risiko von Patienten eine aktive Erkrankungsphase durchmachen zu müssen. Zweitens, ein niedriger Vitamin D-Level erhöht bei Morbus-Chron-Patienten (n = 1089) das Risiko für eine intestinale Inflammation. Drittens, niedrige Vitamin D-Level erhöhen das Risiko für einen klinischen Erkrankungsrückfall bei allen Patienten. Die Forscher kamen in ihrer Arbeit zum Fazit, dass ein niedriger Vitamin D-Level ein Biomarker und Prädiktor für die Krankheitsaktivität sein kann. (Gubatan et al., 2019)

Gubatan et al. wiesen allerdings noch darauf hin, dass der Vitamin D-Mangel bei den Patienten durch die krankheitsbedingte Mangelernährung und Malresorption bedingt sein kann. Als weiteren Grund nannten die Forscher, dass Patienten mit einem aktiven Inflammationsgeschehen im Darm, möglicherweise weniger Zeit im Outdoor-Bereich verbringen und durch die daraus resultierende verminderte UV-Strahlung es verstärkt zu einem Vitamin D-Mangel kommen kann. Da die Meta-Analyse hauptsächlich aus Be-

obachtungsstudien besteht, kann keine direkte Kausalitätsbeziehung hergestellt werden. Subgruppenanalysen bezogen auf rein prospektive Studien, zeigen allerdings den Zusammenhang zwischen einem erniedrigten Vitamin D-Level (Ausgangswert) und einem erhöhten Risiko für einen aktiven Krankheitsverlauf sowie für einen Erkrankungsrückfall. (Gubatan et al., 2019)

Im Jahr 2020 wurde eine weitere Meta-Analyse veröffentlicht. Insgesamt 12 RCTs (n = 611) und vier Beobachtungsstudien (n = 359) wurden miteinbezogen. Durch die Gabe von Vitamin D wurde der Harvey Bradshaw Index um 1,49 Punkte verbessert (p = 0,004). Bei diesem Index handelt es sich um einen simplen Fragebogen, der die Schwere entzündlichen Darmerkrankungen erfasst. Das CRP-Level sank im Schnitt um 1,58 mg/L, dieser Wert war jedoch nicht signifikant (p = 0,02). (Guzman-Prado et al., 2020)

Alle zuvor genannten Meta-Analysen haben die mit Vitamin D zusammenhängende Reduktion der Erkrankungsrückfallrate sowie die Reduktion von subjektiv wahrgenommenen Erkrankungssymptomen gemeinsam. Allerdings gibt es hierbei keinen eindeutigen Nachweis einer Reduktion weiterer inflammatorischer Marker, wie beispielsweise CRP oder TNF-Alpha.

2.3.2 Vitamin D und Calprotectin

Die Meta-Analyse von Gubatan et al. ermittelte, über die Messung des fäkalen Biomarkers Calprotectin, das Risiko einer entzündeten Darmschleimhaut durch einen Vitamin D-Mangel. Die Subanalyse zeigte, je höher der Vitamin D-Spiegel der Patienten war, desto niedriger waren die fäkalen Calprotectin-Spiegel. Drei weitere Studien ermittelten die intestinale Inflammation anhand endoskopischer/histologischer Untersuchung, hier war ebenfalls eine signifikant negative Korrelation gegeben. Im Vergleich der beiden Untersuchungsmethoden (Calprotectin vs. endoskopische/histologische Untersuchung) ist hinsichtlich der Studienergebnisse kein signifikanter Unterschied feststellbar (p = 0,96). (Gubatan et al., 2019)

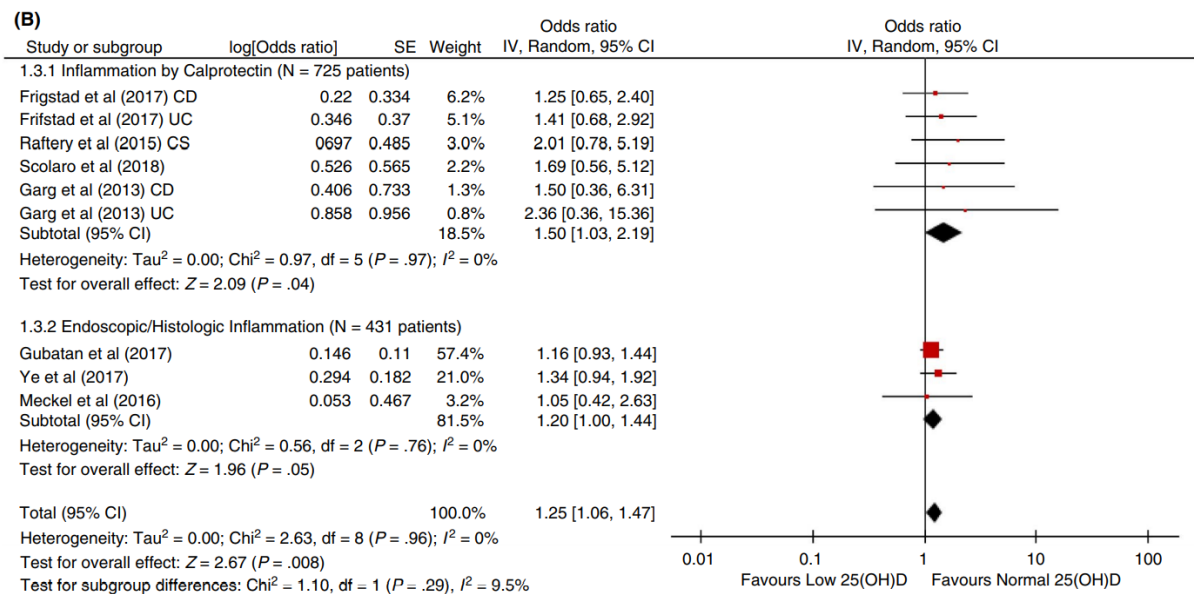


Abbildung 5: Die Assoziation zwischen einem Vitamin D-Mangel und dem Schweregrad einer gastro-intestinalen Inflammation gemessen an Calprotectin sowie anhand einer endoskopischen/histologischen Untersuchung. (Gubatan et al., 2019)

In einer Untersuchung von Garg et al. erhielten jeweils fünf Patienten mit Colitis ulcerosa und jeweils fünf Patienten mit Morbus Crohn in einer 12-wöchigen Zeitperiode ein orales Vitamin D-Supplement (10.000 U/Woche). In der Studie ließ sich feststellen, dass die Krankheitsaktivität signifikant abnahm, allerdings waren Calprotectin-Werte sowie andere Marker unverändert (Garg et al., 2018). Wenn man jeweils den Durchschnitt der Ausgangs- und Endwerte der Serumkonzentration ausrechnet, so ergibt sich, dass die Vitamin D-Konzentration der Patienten von 52,2 nmol/l auf 99,4 nmol/l gestiegen ist.

In einer früheren Untersuchung von Garg et al. wurden insgesamt 25 Patienten untersucht – 8 Patienten in der Kontrollgruppe, 9 Patienten mit inaktiver Colitis ulcerosa, 8 Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa. Die Konzentration des fäkalen Calprotectins konnte in der aktiven Colitis-ulcerosa-Gruppe von 275 auf 111 µg/g gesenkt werden ($p = 0,02$), jedoch war keine signifikante Reduktion in der Gruppe mit inaktiver Colitis ulcerosa ($p = 0,34$) sowie in der Kontrollgruppe ($p = 0,19$) bemerkbar. (Garg et al., 2017)

Im Jahr 2017 veröffentlichte das Forscherteam Bufatto et al. eine placebo-kontrollierte, prospektive Doppelblindstudie mit 42 teilnehmenden Personen, die in der Vergangenheit bereits mild oder moderat an Morbus Crohn erkrankt waren. In einem 8-wöchigen Interventionszeitraum erhielten Gruppe 1 2.000 IU, Gruppe 2 10.000 IU und Gruppe 3

50.000 IU Vitamin D pro Woche. In allen Interventionsgruppen stiegen nach 8 Wochen die Serumspiegel an, jedoch unterschiedlich stark. In Gruppe 1 stieg der Vitamin D-Spiegel von $19,5 \pm 5$ auf $26 \pm 6,7$ nmol/l, in Gruppe 2 von $19,1 \pm 4,1$ auf $26 \pm 6,7$ nmol/l und in Gruppe 3 von $19,5 \pm 6,4$ auf $46,4 \pm 12,7$ nmol/l. Ausschließlich die Gruppe 3 erzielte eine signifikante Reduktion von fCal (von 1014 ± 850 auf 483 ± 564 ; $p = 0.04$), verglichen mit Gruppe 2 (von 767 ± 751 auf 823 ± 535 ; $p = 0.2$) und Gruppe 1 (von 1101 ± 744 auf 1357 ± 819 ; $p = 0.4$). (Bafutto et al., 2017)

Eine retrospektive Langzeitstudie von López-Muñoz et al. zeigte ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Vitamin D-Versorgung und der Schwere der Erkrankung bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa feststellen. Die Teilnehmenden wurden anhand ihrer Vitamin D-Versorgung in drei Subgruppen unterteilt: „ausreichend versorgt“ (S) >30 ng/ml, „mittelschwerer Mangel“ (MD) = $15-30$ ng/ml und „schwerer Mangel“ (SD) <15 ng/ml. Zwischen den erwähnten Gruppen war der Unterschied der fäkalen Calprotectin-Konzentration signifikant ($p < 0.001$): S ($30 \mu\text{g/g}$), MD ($46 \mu\text{g/g}$) und SD ($345 \mu\text{g/g}$). (López-Muñoz et al., 2019)

Interessant ist, dass bei den oben erwähnten Untersuchungen der Vitamin D-Spiegel entscheidend sein könnte. Vergleicht man beispielsweise die beiden Studien von Garg et al. so lässt sich erkennen, dass die Studie mit dem geringeren Anstieg des Vitamin D-Serumspiegels (von $52,2$ auf $99,4$ nmol/l) keine signifikante Reduktion des Calprotectin-Wertes erreichte. In der vorhergehenden Studie (2017) von Garg et al. war die Reduktion des Biomarkers Calprotectin jedoch signifikant, gleichzeitig ist auch ein stärkerer Anstieg der Vitamin D-Serumkonzentration feststellbar (von 34 auf 111 nmol/l).

Unterstreicht wird diese Vermutung durch die Ergebnisse der Studie von Buffato et al., welche lediglich in der höchst-supplementierten Gruppe (50.000 Units/Woche) einen signifikanten Rückgang des Calprotectin-Wertes feststellte.

2.4 Calprotectin

Das Calprotectin ist ein (36-kDa schweres) calcium- und zinkbindendes Protein und zählt zur Familie der S100-Proteine. Es befindet sich hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten, welche ungefähr 60 Prozent der zytosolischen Proteine ausmachen. Calprotectin kommt auch in Monozyten, Makrophagen und Epithelzellen vor (Caviglia et al., 2018). Im obigen Kapitel „Extrarenale Biosynthese von 1,25-Dihydroxycholecalciferol“ wird darauf eingegangen, dass in diesen Zellen 1,25-Dihydroxycholecalciferol exprimiert wird (siehe auch Abbildung 3).

Die antimikrobielle Aktivität von Calprotectin beinhaltet eine Zn^{2+} -Sequestrierung, die zu einer Beeinträchtigung von zinkabhängigen Enzymen mit nachfolgender Hemmung des Bakterienwachstums führt. Calprotectin hat eine antimikrobielle Wirkung gegen *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus* sowie eine fungistatische Wirkung. (Manceau et al., 2017)

Verschiedene pathologische Einflüsse können eine Infektion und eine Läsionierung der Darmbarriere verursachen. Das führt zu einer verstärkten Ansammlung von Neutrophilen in der Darmschleimhaut. Diese Akkumulation ist ein Merkmal für eine Inflammation und führt zur Freisetzung von fäkalem Calprotectin. Insofern steht die fäkale Calprotectin-Konzentration (fCal) in einer direkten Relation zum intestinalen Inflamationsgrad (Caviglia et al., 2018; Johne et al., 1997)

Das Besondere am fäkalen Calprotectin ist, dass die Höhe der intestinalen Konzentration unabhängig von der systemischen Inflammation ist. Insofern eignet sich die Messung der fäkalen Calprotectin-Konzentration besonders zur lokalen Diagnose oder zum Ausschluss einer entzündlichen Darmerkrankung. (Ayling and Kok, 2018; Caviglia et al., 2018)

Die Messung von fäkalem Calprotectin kann ebenfalls nützlich sein, um eine Therapie entsprechend dem intestinalen Inflamationsgrad der Patienten anzupassen, da die fCal-Konzentration einen Erkrankungsrückfall oder auch eine Heilung der Darmschleim-

haut nachweisen kann. In der Praxis erfolgt die Messung via ELISA (enzyme linked immuno assay), die erste Extraktions- und Quantifizierungsmethode wurde bereits im Jahr 1992 von Røseth et al. entwickelt. (Ayling and Kok, 2018; Caviglia et al., 2018)

2.4.1 Diagnostische Grenzwerte

Die meisten Labore arbeiten mit einem Calprotectin-Grenzwert von 50 µg/g, Stuhl, um eine Entzündung zu diagnostizieren. Es existieren Annahmen, dass der Grenzwert von 100 µg/g eine bessere diagnostische Effizienz haben könnte als der gängige Grenzwert von 50 µg/g. Studien zeigen, dass bei ein und demselben Grenzwert die Sensitivität und Spezifität zwischen den Tests variiert. Es wurde auch gezeigt, dass die optimalen Grenzwerte sich zwischen den verschiedenen Immuno-Assays unterscheiden. (Pathirana et al., 2018)

Es sind eine Reihe von Calprotectin-Assays erhältlich mit deutlichen Leistungsunterschieden, derzeit existiert kein standardisiertes Referenzmaterial. (Ayling and Kok, 2018; Pathirana et al., 2018). Sofern es noch keine standardisierte Methodik und Tests gibt, ist es naheliegend sich an die Grenzwertangaben der jeweiligen Hersteller der Calprotectin-Assays zu halten.

Im Zuge dieser Arbeit wurden die Calprotectin-Assays von *EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG* verwendet und die von diesem Anbieter empfohlenen Grenzwerte zur Beurteilung der gastro-intestinalen Inflammation herangezogen:

- <50 µg/g = negativ
- 50-120 µg/g = grenzwertig
- >120 µg/g = positiv

(“Calprotectin-ELISA Arbeitsanleitung,” 2019)

2.4.2 Variabilität der Konzentration von fäkalem Calprotectin

Fäkales Calprotectin ist sehr resistent gegenüber dem bakteriellen und enzymatischen Abbau und man geht davon aus, dass sich seine Konzentration homogen im Stuhl verteilt. (Røseth et al., 1992)

Fäkales Calprotectin ist bis zu sieben Tage in Anwesenheit von Calcium stabil (Abraham and Kane, 2012; Kopylov et al., 2014; Lin et al., 2014). Jedoch können mehrere Faktoren dazu beitragen, dass die fCal-Konzentration erheblich variiert. Bekannte Einflussfaktoren sind die Tagesvariabilität, das Alter, die Ernährung sowie die Einnahme von Medikamenten. (Ayling and Kok, 2018; Joshi et al., 2010; Kolho et al., 2012; Lasson et al., 2014; Moum et al., 2010; Poullis et al., 2004)

2.4.2.1 Tagesvariabilität von Calprotectin

Die gemessene Konzentration im Stuhl kann sich innerhalb eines Tages verändern, abhängig vom Zeitpunkt der Defäkation (Lasson et al., 2014). Signifikant unterschiedliche Werte wurden ebenfalls von Tag zu Tag festgestellt (Moum et al., 2010; Naismith et al., 2013).

Der Zeitpunkt der Stuhlprobenentnahme scheint auch kein Garant für die Erzielung der höchsten und niedrigsten Tageswerte zu sein, das zeigt eine Untersuchung an 18 CED-Patienten. In der Früh hatten 33,3 Prozent der Probanden die höchste und 38,9 Prozent die niedrigste fCal-Konzentration im Stuhl (Calafat et al., 2015). Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt eine weitere Studie (Kristensen et al.) mit 50 Patienten, in welcher die Forscher die Zuverlässigkeit der morgendlichen Probenentnahme mit der Zuverlässigkeit der Probenentnahme von verschiedenen Stuhlgängen innerhalb eines Tages gleichstellen. Diese intraindividuelle Variabilität könnte unter Umständen Interpretationen, die auf einzelnen Messungen basieren, fehlleiten. Daher wäre es günstig die intraindividuelle Variabilität besser zu erfassen, beispielsweise durch die Erhebung zu mehreren Tageszeitpunkten. (Kristensen et al., 2016). Die meisten Studien die fCal erheben messen zu einem einzigen Tageszeitpunkt.

2.4.2.2 Variabilität innerhalb einer Stuhlprobe

Obwohl einige Autoren zeigen, dass fCal homogen über den Stuhl verteilt ist, beschreiben andere Studien beträchtliche Konzentrationsunterschiede innerhalb einer einzelnen Stuhlprobe. Forscher hegen die Vermutung, dass dies auf eine Ernährungsumstellung oder aufgrund von körperlicher Aktivität zurückführbar sei. (Gisbert and McNicholl, 2009)

Eine Studie mit 50 erwachsenen CED-Patienten zeigt eine Variabilität von 8 bis 23 Prozent des fCal innerhalb einer Stuhlprobe, abhängig vom Tageszeitpunkt und dem festgelegten Grenzwert (Du et al., 2018). Die Entnahme der morgendlichen Stuhlprobe scheint jedoch bei Einzelmessungen am geeignetsten zu sein, da der fCal-Wert mit der Zeit zwischen zwei Stuhlgängen steigt. (Lasson et al., 2015)

2.4.2.3 Lagerung der Stuhlproben

Die Stabilität von fäkalem Calprotectin aus unverarbeiteten Stuhlproben beträgt bei Raumtemperatur mindestens drei Tage. In einer Untersuchung fand man, dass fCal selbst nach sieben Tagen Lagerung bei Raumtemperatur noch stabil war (Røseth et al., 1992). Es gilt jedoch, dass die entnommenen Proben nicht länger als 3 Tage bei Raumtemperatur lagern sollen (Haisma et al., 2020; Tøn et al., 2000).

Die Studie von Ton et al. ermittelte die Stabilität von Calprotectin aus Stuhlproben, die Aufbereitung der Stuhlproben erfolgte anhand der Herstellerangaben (PhiCal ELISA). Fäkales Calprotectin aus Stuhlextrakten war 24 Stunden lange stabil. Die Konzentration von fäkalem Calprotectin in aufbereiteten Stuhlproben (50 – 100 mg Stuhl) war bei einer Lagerung von -20 Grad Celsius für 6 Monate stabil. Bei größeren Stuhlproben (10 – 20 g) erhöhte sich die Stabilität auf ein Jahr. Die Konzentration änderte sich vor und nach dem Auftauen nicht. Sogar bei den Stuhlextrakt-Proben, die bis zu viermal eingefroren und wieder aufgetaut wurden, war das fäkale Calprotectin sechs Monate lang stabil. (Tøn et al., 2000)

2.4.2.4 Altersbedingte Variabilität

Eine im Jahr 2017 veröffentlichte Studie zeigte, dass gesunde Kinder im Alter zwischen 0 bis 1 Jahren wesentlich höhere Konzentrationen an fäkalem Calprotectin hatten als gleichaltrige Kinder mit zystischer Fibrose. Dieser Trend blieb bis zum vierten Lebensjahr aufrecht. Bei den Kindern, im Alter zwischen 4 und 10 Jahren, war dieser Trend umgekehrt. (Garg et al., 2017)

Eine weitere Studie aus dem Jahr 2020 zeigte bei Kindern eine höhere Konzentration von fäkalem Calprotectin im Stuhl als bei Erwachsenen. (Velasco Rodríguez-Belvis et al., 2020)

Von älteren Probanden sind derzeit nur wenige Daten über die fäkale Calprotectin-Konzentration verfügbar. Mindemark et al. haben gezeigt, dass die Konzentration des fäkalen Calprotectins von über 65-jährigen Patienten meist über 100 µg/g beträgt (Mindemark and Larsson, 2012). Poullis et al. zeigten in einer Studie mit 50- bis 70-jährigen Probanden, dass das fäkale Calprotectin bei über 25 Prozent der Proben größer als 65 µg/g waren. Die Forscher untermauern, dass der Referenzwert für diese Alterskategorie bei 100 µg/g oder sogar höher liegen könne. (Poullis et al., 2004)

Da die Konzentration von fäkalem Calprotectin altersabhängig ist, wurden lt. Manceau et al. folgende altersspezifische Grenzwerte festgelegt:

Alter	Normale Calprotectin-Konzentration, µg/g
1 bis 6 Monate	<538
7 Monate bis 3 Jahre	<214
3 bis 4 Jahre	<75
4-49 Jahre	<50
50 bis 70 Jahre	>65
Über 70 Jahre	Keine Daten verfügbar – voraussichtlich höher als 100

Tabelle 1 Grenzwerte für Calprotectin nach Altersgruppen (adaptiert nach Manceau et al, 2017)

2.4.2.5 Einnahme von Medikamenten

Daten zeigen, dass die Einnahme von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) – auch nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAP) oder NSAID („non-steroidal anti-inflammatory drug“) die Konzentration des fäkalen Calprotectins erhöhen kann, durch die potenzielle Beeinträchtigung der Dünndarm-Mukosa.

Die Einnahme von dreimal täglich 50 mg Diclofenac erhöhte bei 30 gesunden Erwachsenen kurzfristig die fäkale Calprotectin-Konzentration. Das Arzneimittel wurde insgesamt 14 Tage verabreicht. Nach der Einnahmeperiode normalisierte sich die fäkale Calprotectin-Konzentration wieder bei den meisten Probanden. Zwei Wochen nach Ende der Diclofenac-Medikation war die fäkale Calprotectin-Konzentration bei allen Teilnehmern wieder im Normalbereich. (Rendek et al., 2016)

Indomethacin und Naproxen, beide Arzneimittel zählen zu den NSAR, erhöhten bei 18 Probanden nach sieben Tagen die fäkale Calprotectin-Konzentration. Lornoxicam hatte keinen Effekt auf die Konzentration der fäkalen Calprotectin-Konzentration (insgesamt 14 Patienten). (Meling et al., 1996)

In einer weiteren Studie erhielten 40 gesunde Probanden 14 Tage lange zweimal täglich 75 mg Diclofenac und 20 mg Omeprazol (ein Protonenpumpenhemmer zum Schutz des Magen-Darmtraktes). Diclofenac erhöhte bei 30 Teilnehmenden (75 Prozent der Teilnehmer) die fäkale Calprotectin-Konzentration über den normalen Grenzwert. Anhand einer endoskopischen Untersuchung stellte man bei 27 Teilnehmern (68 Prozent der Teilnehmer) neue pathologische Erscheinungen der Dünndarmschleimhaut fest. (Maiden et al., 2005)

Aspirin (Wirkstoff: Acetylsalicylsäure) hatte keinen signifikanten Effekt auf die fäkale Calprotectin-Konzentration bei n = 22 Patienten (verglichen zur Kontrollgruppe) (Montalto et al., 2006). In einer anderen Studie wurde bei zwanzig Probanden durch eine 14-tägige Gabe von einmal täglich 100 mg magensaftresistenter Acetylsalicylsäure die Konzentration des fäkalen Calprotectins signifikant erhöht (Smecuol et al., 2009).

Die oben genannten Daten zeigen, dass bei Erhebungen des fCal die Medikation der jeweiligen Teilnehmenden berücksichtigt werden muss.

2.4.3 Körpergewicht und Lebensstil

Ein Body-Mass-Index zwischen 18,5 und 24,9 kg/m² gilt für Erwachsene als normalgewichtig. Bei älteren Personen geht man davon aus, dass ein BMI zwischen 23 – 30 kg/m² im Normalbereich liegt. Eine Überschreitung der oberen Werte wird als Übergewicht klassifiziert bzw. eine Unterschreitung der unteren Werte als Untergewicht. (Matsuo et al., 2008; Spahillari et al., 2016)

Übergewicht und mangelnde Bewegung korrelierten signifikant mit der Erhöhung des fäkalen Calprotectins in einer Studie mit insgesamt 320 Darmkrebs-Risikopatienten (Poullis et al., 2004).

Eine weitere Studie verglich die fäkale Calprotectin-Konzentration zwischen normalgewichtigen Erwachsenen (n=20), übergewichtigen Erwachsenen (n=27), normalgewichtigen Kindern (n=14) und übergewichtigen Kindern (n=13). Die Forscher fanden lediglich eine signifikante Erhöhung der fäkalen Calprotectin-Konzentration bei den übergewichtigen Erwachsenen, verglichen mit den übergewichtigen Kindern. Im Vergleich zwischen allen weiteren Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. (Park and Kim, 2018)

Eine mögliche Erklärung für unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Korrelation des Körpergewichts mit der fäkalen Calprotectin-Konzentration könnte folgende Studie aufzeigen. Verdam et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen der mikrobiellen Darmbesiedelung und Calprotectin bei 28 Probanden welche einen BMI zwischen 18,6 und 60,3 kg/m² hatten. Dabei fanden die Forscher, dass eine erhöhte fäkale Calprotectin-Konzentration nur in übergewichtigen Probanden feststellbar war, sofern diese Probanden ein gewisses bakterielles Besiedlungsmuster im Darm aufwiesen, das mit Übergewicht assoziiert ist. (Verdam et al., 2013)

Ob die oben genannten Korrelationen tatsächlich durch das Darm-Mikrobiom erklärt werden können, muss in weiteren Studien geklärt werden. Genauso wie die Fragen, ob die fäkale Calprotectin-Konzentration durch Übergewicht erhöht wird oder durch übergewichtsfördernde Faktoren, wie beispielsweise durch ein mit Übergewicht assoziiertes Darm-Mikrobiom.

2.4.4 Ernährung

Um die intestinale Entzündung im Darm zu senken, wurde eine Morbus-Crohn-Ausschlussdiät (CDED) formuliert. Diese Diät besteht aus einer reduzierten Aufnahme von tierischem Fett bzw. gesättigtem Fett, Gluten, Emulgatoren und einer gesteigerten Aufnahme von Obst, Gemüse und Stärke (Schreiner et al., 2020). In einer weiteren Studie konnte sowohl die CDED in Kombination mit einer enteralen Ernährung, als auch die enterale Ernährung alleine die Konzentration des fäkalen Calprotectins senken (Levine et al., 2019)

In der systematischen Übersichtsarbeit fanden Forscher, dass ein hoher Fettanteil sowie eine hohe Aufnahme an PUFAs, Omega-6-Fettsäuren und Fleisch (aber nicht Protein allein) in der Ernährung mit einem erhöhten Risiko für chronische entzündliche Darmerkrankungen in Verbindung gebracht wird. Wohingegen eine erhöhte Aufnahme von Obst und Gemüse sowie Ballaststoffe mit einem verminderten Risiko assoziiert ist. (Hou et al., 2011)

Eine mediterrane Ernährung wurde bei 153 männlichen Pouchitis-Patienten mit einer signifikanten Reduktion des fäkalen Calprotectins in Verbindung gebracht. Die Patienten in der mediterranen Gruppe hatten eine deutlich höhere Ballaststoff- und Antioxidantien-Aufnahme. Zudem fanden die Forscher nach einem 8-jährigen Follow-up in einer Subanalyse, dass je konsequenter die Diät weiterhin eingehalten wurde, desto geringer war das Pouchitis-Risiko. (Godny et al., 2020)

2.4.5 Sport

In einer Studie brachte man 17 Läufer dazu, 90 Minuten an ihrer Leistungsgrenze zu trainieren. Dabei ermittelte man eine mögliche Auswirkung der sportlichen Belastung auf die fäkale Calprotectin-Konzentrationen über die Messung mittels ELISA. Man fand keine Auswirkung des Trainings auf die fäkale Calprotectin-Konzentration. Allerdings nahm die intestinale Permeabilität der Probanden zu. Das I-FABP erhöhte sich und bei den Läufern mit gastro-intestinalen Beschwerden war auch ein erhöhter LPS-Spiegel nachweisbar. (Karhu et al., 2017)

Eine prospektive Kohortenstudie (n = 12) untersuchte die Auswirkung eines intensiven Trainings auf die fäkale Calprotectin-Konzentration. Die Konzentration des fäkale Calprotectins wurde 24 Stunden vor, 24 Stunden nach sowie 1 Woche nach dem Training gemessen. In der Untersuchung wurde kein signifikanter Effekt auf fCal festgestellt. (Hassid et al., 2016)

Patienten mit einer inaktiven chronischen-entzündlichen Darmerkrankung (fCal < 100 µg/g) erhielten in einer Untersuchung ein personalisiertes Trainingsprogramm. Es wurde kein signifikanter Effekt des Trainingsprogrammes auf die fäkale Calprotectin-Konzentration gefunden. Das Training wirkte sich jedoch positiv auf die Lebensqualität und auf die Reduktion der Müdigkeit aus. (van Erp et al., 2021)

26 Personen mit überwiegend sitzender Tätigkeit erhielten in einer Studie entweder ein moderates Trainingsprogramm oder ein Sprint-Trainingsprogramm. In beiden Gruppen war das fäkale Calprotectin unverändert, wohingegen TNF-Alpha (systemisch) und das intestinale LPS zurück gingen. Der Sport konnte in beiden Gruppen eine Verbesserung der bakteriellen Besiedelung des Darmes erzielen. Während sich die essenziellen *Bacteroidetes*-Stämme vermehrten, gingen *Firmicutes* zurück. (Motiani et al., 2020)

In Summe zeigen die oben erwähnten Studien keinen direkten Effekt auf die fCal-Konzentrationen durch Sport. Moderater Sport oder ein personalisiertes Trainingsprogramm scheint sich laut den Ergebnissen jedoch positiv auf die Lebensqualität und die

Reduktion anderer inflammatorischer Marker auszuwirken und könnte laut Motiani et al. sogar einen positiven Einfluss auf die bakterielle Besiedelung des Darmes erzielen.

3 Material und Methoden

Diese Masterarbeit wurde im Zuge des EU-Co-finanzierten „SK-AT Interreg NutriAging“-Projekts verfasst. Die Durchführung der „Nutri-Aging“-Studie fand über die Forschungsplattform „Active Aging“ statt. Teilprojekte untersuchten die Wirkung von Makro- und Mikronährstoffen, wie Protein, Vitamin D und Omega-3-Fettsäuren einzeln sowie in Kombination mit einer Krafttrainingsintervention auf Seniorinnen und Senioren. Dieses Forschungsprojekt fand im Zeitraum 2017 – 2021 statt und geschah in Zusammenarbeit mit der Fakultät für Lebenswissenschaften, dem Zentrum für Sportwissenschaft, der Comenius Universität (Slowakei) sowie dem Kuratorium Wiener Pensionisten-Wohnhäuser.

Ziel des „SK-AT Interreg NutriAging“-Projekts ist mitunter die Verbesserung der Lebensqualität im Alter und daher auch die Reduktion der Inzidenz von altersbedingten Erkrankungen. Durch die gewonnenen Erkenntnisse soll ein verbessertes Gesundheitsbewusstsein, sowohl für Einzel- als auch Fachpersonen ermöglicht werden, um so einen Beitrag für die zur Verringerung der altersbedingten Kosten im Gesundheitssystem zu schaffen. In diesem Projekt wurde die Auswirkung verschiedenster Nährstoffe und Marker des physischen und psychischen Alterns untersucht. Die vorliegende Masterarbeit erhebt einen möglichen Zusammenhang der Vitamin D-Serumspiegel und der Entzündung im Darm bei Probanden der „Nutri-Aging D“-Studie.

3.1 „Nutri-Aging D“-Studie

3.1.1 Studienziel

Die „Nutri-Aging D“-Studie untersuchte die Auswirkung einer optimierten Ernährung, inklusive der Gabe von Vitamin D, mit und ohne Krafttraining, auf die Muskelmasse, die Leistungsfähigkeit sowie die allgemeine Gesundheit.

Verglichen wurde die monatliche Gabe von 50.000 IU Vitamin D mit der den allgemeinen Empfehlungen entsprechenden Gabe von täglich 800 IU und das entweder allein (4 Wochen) oder in Kombination mit 10 Wochen progressivem Krafttraining. Alle Interventionsgruppen (Kontrolle, Vitamin D täglich und Vitamin D monatlich) erhielten zusätzlich 400 mg Calcium täglich.

In der „Nutri-Aging D“-Studie wurden zahlreiche Parameter erhoben. Diese Masterarbeit beschränkt sich auf die Untersuchung, ob die fäkalen Calprotectin-Spiegel mit den Serum Vitamin-D-Spiegel der Studienteilnehmenden korrelieren und ob die Interventionsgruppe einen Einfluss hatte. Des Weiteren werden potenzielle Einflussfaktoren wie die Ballaststoffaufnahme (Ernährungsgewohnheiten – MNA, Ernährungsprotokoll), der Body-Mass-Index sowie das Alter analysiert.

3.1.2 Ablauf der Probandenrekrutierung

Im Rekrutierungszeitraum (Jänner 2019 bis März 2019) wurden Informationsunterlagen aufbereitet, Zeitungsinserate geschaltet, Informationsveranstaltungen in den Einrichtungen der Universität Wien gehalten sowie direkte Gespräche in Einrichtungen des gemeinnützigen Vereins Kuratorium Wiener Pensionisten-Wohnhäuser (KWP) aufgesucht. Die rekrutierten Personen stammen zu einem großen Teil aus Wien und Niederösterreich.

3.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Für die Studie wurden gesunde Frauen und Männer, im Alter zwischen 65 und 85 Jahren gesucht. Dabei durften keine schwerwiegenden Krankheiten vorhanden sein. Probanden, die Vitamin D bereits oral Einnahmen und/oder regelmäßig Krafttraining betrieben (z.B. im Fitnesscenter) wurden von der Studie ausgeschlossen, da diese Faktoren die Ergebnisse beeinflussen können.

Einschluss- sowie Ausschlusskriterien werden im nachstehenden zusammengefasst. Sofern nicht alle Einschlusskriterien erfüllt waren und bzw. oder mindestens ein Ausschlusskriterium zutraf, durfte die Interessentin bzw. der Interessent nicht an der Studie teilnehmen. Die Untersuchung dieser Kriterien wurde Ärztinnen und Ärzten der Karl-Landsteiner-Gesellschaft übernommen.

Einschlusskriterien:

- alter zwischen 65 und 85,1 Jahren
- gesunder körperlicher und geistiger Zustand
- Mini-Mental-Status-Test mit mindestens 23 Punkten
- unabhängig, im privaten Haushalt lebend
- ärztliche Freigabe nach erfolgtem Vorgespräch

Ausschlusskriterien:

- Antibiotika-Einnahme in den letzten sechs Monaten
- regelmäßiges Krafttraining, >1 x pro/Woche, seit mindestens sechs Monaten
- Vorhandensein von chronischen Erkrankungen, die mit einer medizinischen Trainingstherapie kontraindiziert sind
- manifestierte Osteoporose oder Osteopenie mit Vitamin D und oder Calciumsubstitution
- diabetische Retinopathie

- Vitamin D-Serumspiegel von $> 50 \text{ nmol/L}$

Zusätzlich wurde in dieser Masterarbeit folgende Bedingung ergänzt: Die fCal-Konzentration durfte zu keinen der genannten Messzeitpunkte den Wert von $\geq 329 \text{ } \mu\text{g/g}$ Stuhl übersteigen. Dieser wurde im Zuge der Ausreißeranalyse ermittelt.

3.1.4 Studiendesign

Die „Nutri-Aging D“-Studie ist eine prospektive, randomisierte, einfach-blinde und kontrollierte Interventionsstudie.

Vor Beginn der Studie erhielten die Probanden zunächst eine Eingangsuntersuchung, die mit dem Zeitpunkt T0 definiert wurde und folgendes beinhaltete:

- anthropometrische Parameter wie Körpergewicht – und Größe sowie Hüft- und Bauchumfang)
- Bioelektrische-Impedanz-Analyse (BIA)
- Abnahme von Serum, Stuhl und Harn
- Sportdiagnostische Testungen zur Feststellung der Leistungsfähigkeit
- Fragebögen zur Evaluierung der körperlichen Aktivität und des Gesundheitszustandes

Nach der Eingangstestung (T0) wurden die Probanden computerunterstützt zufällig in drei Gruppen eingeteilt: Kontrollgruppe (K), „Vitamin D täglich“ (DL) und „Vitamin D monatlich“ (DH). Alle drei Gruppen erhielten ein Calcium-Supplement zur täglichen Einnahme. Die Gruppe „DL“ erhielt, entsprechend den Empfehlungen, eine tägliche Vitamin D-Dosierung von 800 IU. Die Gruppe „DH“ erhielt eine Dosierung von monatlich bis zu 50.000 IU. Die Zuteilung der Gruppen erfolgte randomisiert und stratifiziert nach Alter und Geschlecht. Die Studie dauerte insgesamt 17 Wochen.

In den ersten vier Wochen erfolgte die Calcium-Einnahme (400 mg täglich) in allen Gruppen und die Vitamin D-Zufuhr in den zwei Interventionsgruppen „DL“ und DH“. Nach

Ende der vierwöchigen Interventionsperiode erfolgte in der fünften Woche eine Zwischentestung, die mit dem Zeitpunkt T1 definiert wurde. Bei dieser Testung wurde Blut, Faeces abgenommen und anthropometrische Daten erhoben und die Auswirkung der unterschiedlichen Vitamin D-Aufnahme untersucht. In den darauffolgenden 12 Wochen erhielten alle Gruppen (K, DL, DH), zusätzlich zur Supplementationsintervention, eine Trainingsintervention (Krafttraining), welche 2-mal wöchentlich unter sportwissenschaftlicher Betreuung durchgeführt wurde.

Die Inhalte des Trainingsprogrammes waren an die körperliche Verfassung der Teilnehmenden angepasst. Einem kurzen Aufwärmprogramm (10 min) folgten 35-40 Minuten Krafttraining. Beendet wurde die Trainingseinheit mit einem 10-minütigen Stretching.

Insgesamt verlief die Trainingsintervention progressiv in drei Stufen. Die Stufe 1 umfasste ein Gewöhnungstraining. Hierbei erfolgte das gezielte Erlernen der Trainingsbewegung. Mit insgesamt zwei Sätzen à 10-20 Wiederholungen trainierten die Probanden bei einer Intensität von 40 bis 60 Prozent des Maximalgewichtes (RM). Die Stufe 2 der Trainingsintervention erzielte eine Intensivierung des Trainingsprogrammes, hierbei trainierten die Probanden mit insgesamt zwei Sätzen à 10-15 Wiederholungen bei einer Intensität von 50 bis 70 Prozent des Maximalgewichtes (RM). Die Stufe 3 beinhaltete eine erneute Intensivierung. Die Probanden trainierten hierbei mit drei Sätzen à 8-12 Wiederholungen bei einer Trainingsintensität von 60 bis 80 Prozent des Maximalgewichtes. Nach Abschluss der Trainingsintervention erfolgte zum Zeitpunkt „T2“ die letzte Abnahme von Blut, Fäzes sowie anthropometrischen Daten, um die Auswirkung der unterschiedlichen Vitamin D-Aufnahme zu untersuchen. Abbildung 6 zeigt einen Überblick des gesamten Studienablaufes, inklusive der jeweiligen Interventionsphasen.

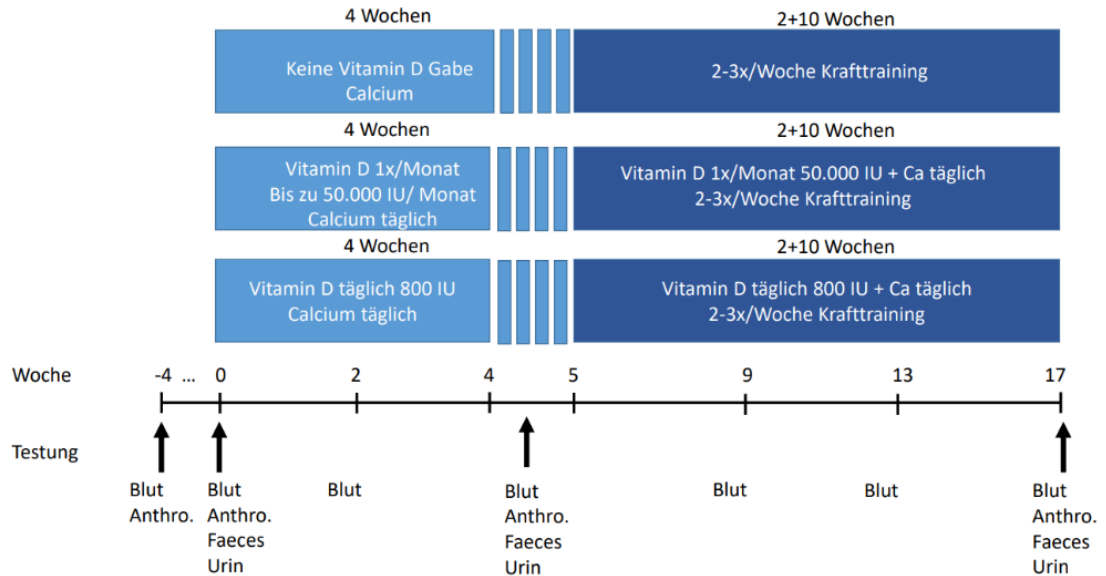


Abbildung 6: Ablauf der "Nutri-Aging D"-Studie.

3.1.5 Flow-Diagramm

Von insgesamt 378 Personen freiwilligen Personen, die an der Studienteilnahme interessiert waren, erhielten 231 Personen eine Eignungsuntersuchung. Von den 231 Interessenten wurden 131 Personen ausgeschlossen – 4 Personen lehnten eine weitere Teilnahme ab, 127 Personen mussten exkludiert werden, da sie die Teilnahmekriterien nicht erfüllten. Insofern wurden 100 Probanden randomisiert und den jeweiligen Gruppen (K, DL, DH) zugeteilt. Zum Zeitpunkt T0 wurden 33 Personen der Kontrollgruppe, 30 Personen der Gruppe „DL“ und 37 Personen der Gruppe „DH“ zugeordnet. Die in dieser Phase ermittelten Werte stellen die Basiswerte für die darauffolgenden statistischen Auswertungen dar. Die gesamte anschließende Supplementationsphase erfolgte ohne Drop-outs.

Das nachstehende Flow-Diagramm veranschaulicht den detaillierten Studienverlauf und gibt einen Überblick über die Probandenzahl inklusive der Drop-Outs wieder. Die im Zuge der nachträglich erfolgten Ausreißeranalyse exkludierten Personen sind in Abbildung 7 nicht inkludiert. Nach dem Ausschließen der Ausreißer blieben in der Kontrollgruppe (K) 21 Personen, in der Gruppe „Vitamin D täglich“ (DL) 24 Personen und in der

Gruppe „Vitamin D monatlich“ (DH) 27 Personen. Die Gesamtzahl der in dieser Masterarbeit analysierten Probanden beträgt daher 72 Teilnehmer.

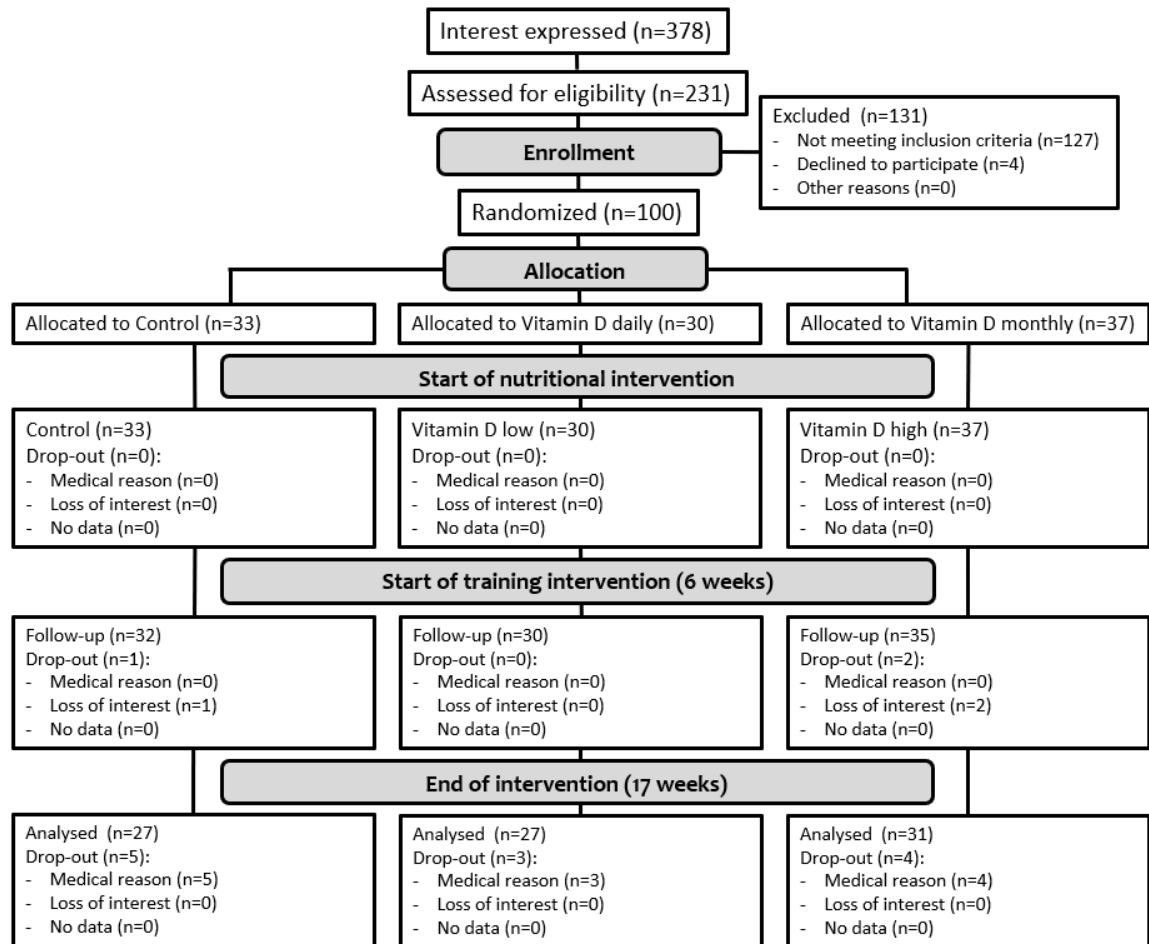


Abbildung 7: Flow-Diagramm der „Nutri-Aging D“-Studie

In der darauffolgenden sechswöchigen Trainingsintervention schieden mangels Interesses eine Person aus der Kontrollgruppe und zwei Personen aus der „DH“-Gruppe aus. In der Gruppe „DH“ wurden in dieser Phase keine Drop-outs verzeichnet.

Nach Ende der Intervention sind aus medizinischen Gründen weitere fünf Personen aus der Kontrollgruppe, drei Personen aus der Gruppe „DL“ und vier Personen aus der

Gruppe „DH“ ausgeschieden. Daher nahmen insgesamt 85 Personen bis zum Studienende teil, davon waren 27 Personen der Kontrollgruppe, 27 Personen der „DL“-Gruppe und 31 Personen der „DH“-Gruppe zugeordnet.

Im Zuge dieser Masterarbeit wurden vier weitere Personen exkludiert (in der Tabelle nicht enthalten). Die Berechnung dieser Ausreißer erfolgte mit dem Statistik-Programm IBM SPSS Statistics 26. Aus der Kontrollgruppe wurde eine Person und aus der Interventionsgruppe „Vitamin D täglich“ drei Personen exkludiert.

3.2 Messung der fäkalen Calprotectin-Konzentration mittels ELISA (enzyme linked immuno assay)

Die Ermittlung des fäkalen Calprotectins erfolgte mittels ELISA (enzyme linked immuno assay) das über die Firma EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG bezogen wurde. Die verwendeten ELISA-Kits stammen aus der Charge E101220BY mit dem Verfallsdatum 19.12.2019. Die Labordiagnostik fand im Zeitraum Juni – Oktober 2019 statt.

3.2.1 Testprinzip

Bei den verwendeten „Enzyme-Linked Immunosorbent Assays“ (ELISA) von EUROIMMUN handelt es sich um Polystyrol-Mikrotiterplatten, die 96 Reagenzgefäße eingesetzt haben, welche jeweils am Reagenzboden eine spezifische Antikörperbeschichtung besitzen. Mithilfe dieser Antikörper lässt sich eine enzymatische Farbreaktion in den Patientenproben nachweisen. Die Durchführung von ELISA kann manuell, teil- und vollautomatisiert erfolgen. Im ersten Schritt erfolgt eine Verdünnung bzw. Aufbereitung der Patientenproben gemäß Anleitung des ELISA-Herstellers. Im Anschluss werden die mit den monospezifischen Antikörpern beschichteten Reagenzgefäße der Mikrotiterplatte mit den verdünnten Patientenproben inkubiert. Sofern eine Patientenprobe entsprechende Antigene enthält, binden diese an die Antikörperbeschichtung mit Reagenzgefäß. In ei-

nem weiteren Schritt erfolgt die Zugabe eines Peroxidase-markierten Antikörper-Konjugats, der an ein anderes Epitop des Antigens bindet. Diese Peroxidase katalysiert mit dem daraufhin hinzugegebenen Peroxidase-Substrat „Tetramethyl-Benzidin“ (TMB) eine Farbreaktion. Die Intensität der entstehenden Farbe korreliert proportional zur Antigenkonzentration der Patientenprobe und kann mithilfe einer Kalibrationskurve, quantitativ bestimmt und somit in eine Konzentration umgerechnet werden.

(“EUROIMMUN-ELISA,” 2021)

3.2.2 Bestandteile der Calprotectin-ELISA-Kits

Im vom Hersteller zur Verfügung gestellten Testkit waren folgende Bestandteile enthalten:

- Antikörperbeschichtete Reagenzgefäße (12 Mikrotiterstreifen zu je 8 vereinzelbaren Reagenzgefäßen im Rahmen, gebrauchsfertig)
- Kalibrator 1, 0 µg/g Calprotectin, gebrauchsfertig
- Kalibrator 2, 15 µg/g Calprotectin, gebrauchsfertig
- Kalibrator 3, 60 µg/g Calprotectin, gebrauchsfertig
- Kalibrator 4, 240 µg/g Calprotectin, gebrauchsfertig
- Kalibrator 5, 960 µg/g Calprotectin, gebrauchsfertig
- Kalibrator 6, 2100 µg/g Calprotectin, gebrauchsfertig
- Kontrolle 1, Calprotectin gebrauchsfertig
- Kontrolle 2, Calprotectin gebrauchsfertig
- Enzymkonjugat (Peroxidase-markierter Anti-Calprotectin-Antikörper, gebrauchsfertig)
- Extraktionspuffer, 5-fach konzentriert
- Probenpuffer, gebrauchsfertig
- Waschpuffer, 10-fach konzentriert
- Chromogen/Substratlösung TMB/H₂O₂, gebrauchsfertig
- Stopplösung 0,5 M Schwefelsäure, gebrauchsfertig

Die Arbeitsanleitung mit weiteren Informationen des verwendeten Calprotectin-ELISA-Kits befindet sich im Abschnitt Anlagen.

3.3 Eingesetzte Materialien für den Messvorgang

Für die Durchführung des ELISA-Testverfahrens wurde folgendes Equipment verwendet.

Elektrisches Equipment & Zubehör:

- Waage (Mettler AT201)
- Vortex (Scientific Industries; Vortex-T Genie-2)
 - Multi-Tube Halter (SI-V525 Vertikal, für 50ml & 15 ml)
 - Microtubes (Vortex Genie 2, Scientific Industries)
- Zentrifuge: Heraeus Megafuge 40 Centrifuge
 - Zentrifugenröhrchen (15 ml): Falcon Tube
- Gefrierschrank zur Probenlagerung bei -70 Grad Celsius
- Kühlschrank zur Zwischenlagerung der Proben (ca. 7 Grad Celsius)
- Mikrotiterplatten-Lesegerät: FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech
- PC inkl. OPTIMA-Software: Software Version 2.20R2, Firmware Version 1.26, Serial Number 413-0513, © 2007-2008 BMG LABTECH

Pipetten & Pipettenzubehör:

- Elektrische Pipette 100-5000 µl: BioHit Proline P94083
- Elektrische Pipette: 1-50 ml Eppendorf Multipipette E3
- Elektrische Pipette BioHit Proline Single Channel Electronic Pipette 10-500 µL
- Pipettenspitze Biohit: Extra Long Pipette Tip 5000
- Finnpiquette 200-1000µl: Labsystems, H98540 4500
- Pipettenspitzen 1000 µl: TipOne, Blue, Graduated Tip
- Pipettenspitzen 200µl: TipOne, Yellow Tip,
- Finnpiquette Fixed 100µl: Labsystems, J43029 4501
- Finnpiquette Fixed 20 µl: Thermo Labsystems, N48400 4501

Weiteres Labor-Equipment:

- Handschuhe
- Mikroröhrchen: VWR North America Freestanding Micro Tube 1,5ml
- Kappe der Mikroröhrchen: VWR North America Universal Fit Screw Caps
- Kunststoff Zahnstocher: Healifty
- Bechergläser
- Vliespapier
- Messzylinder: Brand W-Germany Bistabil NS 29/32
- Bechergläser
- Entionisiertes Wasser: LaboStar, Evoqua Water Technologies

3.4 Durchführung des Calprotectin-ELISA

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere ELISAs durchgeführt und insgesamt 160 (80 Teilnehmende, 3 Termine) Patientenproben im Doppelansatz analysiert. Sofern nicht anders beschrieben, wurde der Testablauf gemäß Herstellerangaben durchgeführt ("Calprotectin-ELISA Arbeitsanleitung," 2019). Mit einem Testdurchgang wurden 40 Proben untersucht. Die Durchführung erfolgte manuell, wobei je nach Testschritt eine elektrische oder eine manuelle Pipette verwendet wurde.

3.4.1 Probenentnahme

Die Probanden entnahmen ihre Stuhlproben (Morgenstuhl) selbständig mithilfe eines Stuhlfängers und lagerten diese in einem zur Verfügung gestellten Stuhlbehälter. Die von den Probanden selbständige Entnahme und Übermittlung der Proben erfolgte zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2.

3.4.2 Aliquotierung

Die Stuhlproben wurden jeweils auf 100 mg in ein Zentrifugenröhrchen aliquotiert. Hierfür wurden Kunststoffzahnstocher verwendet, welche dann in der Probe blieben. In zuvor durchgeführten Messungen hatte das Beifügen des Zentrifugenröhrchens keinen Einfluss auf die Calprotectin-Konzentration.

3.4.3 Stuhlprobenextraktion & Probenverdünnung

Die Reagenzien des verwendeten Calprotectin-Assay-Testkits von EUROIMMUN wurden zunächst auf Raumtemperatur aufgewärmt. Von dem beiliegenden Extraktionspuffer-Konzentrat (1:5) wurden 5 ml zu 20 ml destilliertem Wasser in einen Messzylinder hinzugefügt. Daraufhin wurden mit einer elektrischen Pipette (100-5000 µl: Biohit Proline, 1-50 ml Eppendorf Multipipette E3) 4,9 ml des Extraktionspuffers zu jeweils einer Patientenprobe hinzugefügt. Diese entspricht der Herstellerangabe von einer 1:50 Verdünnung der Patientenprobe mit dem fertigen Extraktionspuffer. In dieser Berechnung entspricht 1 Gramm Stuhl 1 ml. Aufgrund technischen Versagens der ersten elektrischen Pipette (100-5000 µl: Biohit Proline) musste diese durch eine neue elektrische Pipette ersetzt werden (1-50 ml Eppendorf Multipipette E3).

Im nächsten Schritt wurden die Patientenproben dreimal kräftig durchgeschüttelt und mit einem Vortex eine Minute mit einer Geschwindigkeit von 10000 U/min homogenisiert. Sofern sich der Stuhl im Extraktionspuffer nicht vollständig aufgelöst hatte, wurde der Vorgang bei den entsprechenden Proben wiederholt. Neben der vollständigen Auflösung des Stuhls, wurden die Stuhlproben auch auf mögliche Hartbestandteile überprüft, die das Ergebnis beeinträchtigen können. Im Anschluss wurden die Proben zehn Minuten stehen gelassen, damit sich die festen Teilchen absetzen konnten. Daraufhin erfolgte eine Trennung der flüssigen und festen Bestandteile mittels Zentrifugierung – die homogenisierten Proben wurden 10 Minuten mit 2000 U/min zentrifugiert (Beschleunigung = 9, Bremsung = 9). Während die Proben im Zentrifugierungsprogram wa-

ren, erfolgte die Vorbereitung der darauffolgenden Probenverdünnung. Mit einer Pipette wurden 980 µl des im Testkit beiliegenden Probenpuffers entnommen und in jeweils ein Verdünnungsröhrchen (1,5 ml) (Finnpipette 200-1000µl) beigefügt. Nachdem die Zentrifugierung abgeschlossen war, wurden vom daraus resultierenden Extraktions-Überstand 20 µl (Finnpipette Fixed 20 µl) entnommen und in jeweils ein Verdünnungsröhrchen pipettiert. Das mehrmalige Auf- und Abziehen der Pipette gewährleitete dabei eine ordentliche Durchmischung des Überstandes mit dem Puffer.

3.4.4 Probeninkubation

Entsprechend dem Pipettierschema des Calprotectin-Testkits von EUROIMMUN wurden je 100 µl Kalibratoren, Kontrollen und die verdünnten Stuhlproben innerhalb von 10 Minuten in die einzelnen Reagenzgefäße im Doppelansatz pipettiert (Finnpipette Fixed 100 µl). Die Kontrollen dienten dabei als interne Prüfung für die Zuverlässigkeit des Testverlaufes. Das Pipettieren der Proben in die Reagenzgläser nahm 10-15 Minuten Zeit in Anspruch, im Schnitt wurden 12 Minuten gebraucht.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K1	K1	P1	P1	P9	P9	P17	P17	P25	P25	P33	P33
B	K2	K2	P2	P2	P10	P10	P18	P18	P26	P26	P34	P34
C	K3	K3	P3	P3	P11	P11	P19	P19	P27	P27	P35	P35
D	K4	K4	P4	P4	P12	P12	P20	P20	P28	P28	P36	P36
E	K5	K5	P5	P5	P13	P13	P21	P21	P29	P29	P37	P37
F	K6	K6	P6	P6	P14	P14	P22	P22	P30	P30	P38	P38
G	C1	C1	P7	P7	P15	P15	P23	P23	P31	P31	P39	P39
H	C2	C2	P8	P8	P16	P16	P24	P24	P32	P32	P40	P40

Tabelle 2: Das Pipettierschema der Calprotectin-ELISA-Immuno-Assays.

Um eine bessere Genauigkeit zu erzielen, wurde dieser Schritt ab der Hälfte der Test-Assays mit einer elektrischen Pipette ausgeführt (BioHit Proline Single Channel Electronic Pipette 10-500 µL). Im Anschluss erfolgte eine Inkubation der Reagenzgefäße mit den Proben mit 30 Minuten bei Raumtemperatur.

3.4.5 Erster Waschvorgang

Die Herstellung des Waschpuffers erfolgte vor der Stuhlprobenextraktion. Im Testkit des Herstellers befand sich eine 10-fach konzentrierte Waschlösung. Für die Herstellung der Gebrauchsfertigen Waschlösung wurden 63 Milliliter destilliertes Wasser in einen Messzylinder gefüllt, 7 Milliliter des Waschkonzentrates beigegeben und durch vorsichtiges Schwenken vermischt.

Ein Waschvorgang bestand aus drei Waschzyklen. Nach der Entleerung der Reagenzgefäße wurden 300 µl Waschlösung (Finnpipette 200-1000µl, BioHit Proline Single Channel Electronic Pipette 10-500 µL) in jedes Gefäß mit einer elektrischen Pipette hinzugefügt. Die Einwirkzeit der Waschlösung betrug 60 Sekunden. Nach der Einwirkzeit wurden die Reagenzgefäße wieder entleert und derselbe Waschzyklus wiederholte sich zweimal.

3.4.6 Enzymkonjugat-Inkubation

Jeweils 100 µl Enzymkonjugat wurden pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

3.4.7 Zweiter Waschvorgang

Der zweite Waschvorgang entsprach der Vorgangsweise wie beim ersten Waschvorgang.

3.4.8 Substrat-Inkubation & Stopplösung

Jeweils 100 µl von einer Chromogen/Substratlösung wurde in die Reagenzgefäße pipetiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur (vor Licht mittels Abdeckung geschützt) inkubiert. Im Anschluss wurde jeweils 100 µl der Stopplösung hinzugefügt, in der gleichen Reihenfolge und mit der gleichen Geschwindigkeit wie bei der Zugabe der Chromogen-Substratlösung (Finnpipette 100 µL, BioHit Proline Single Channel Electronic Pipette 10-500 µL).

3.4.9 Photometrische Messung & quantitative Auswertung

Die photometrische Auswertung wurde gleich im Anschluss ausgeführt. Laut Herstellerangaben sollte die Dauer zwischen der Zugabe der Stopplösung und der Messung nicht länger als eine halbe Stunde andauern. Fünfzehn Minuten nach der ersten Messung erfolgte eine Kontrollmessung. Der Photometer war bei allen Messungen auf eine Wellenlänge von 450 nm und eine Referenzwellenlänge zwischen 620 nm und 650 nm eingestellt.

Durch die Extinktions-Messung der sechs Kalibratoren gegen die entsprechenden Konzentrationen (linear/log) wurde eine Standardkurve ermittelt, anhand welcher sich die Calprotectin-Konzentration der einzelnen Proben berechnen ließ. Für die computergestützte Berechnung der Standardkurve wurde das Auswerteverfahren „5-parameter-fit“ gewählt. Aus den in Doppelbestimmung analysierten Proben errechnete sich jeweils ein Mittelwert und ein Variationskoeffizient. Bei einem Variationskoeffizient von höher als 10 wurde die Probe wiederholt untersucht. Proben von Drop-out-Patienten sind in der Datenanalyse nicht mitberücksichtigt worden.

Nach der photometrischen Erhebung der Messwerte erfolgte eine Korrektur durch die notierte Einwaage der jeweiligen Patienten-Stuhlproben. Die photometrische Messung berücksichtigt eine Standardmenge der Einwaage von 100 mg pro Patienten-Probe. Ist

die Einwaage beispielsweise kleiner als 100 mg, ist die tatsächliche Calprotectin-Konzentration entsprechend größer. Die Korrektur der Messwerte erfolgte anhand nachstehender Formel:

$$\text{Korrigierter Calprotectingehalt} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{Gemessener Calprotectingehalt} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right)}{\text{Einwaage (g)}} \times 100 \text{ (g)}$$

3.4.10 Statistische Auswertung der Messergebnisse

Die Daten wurden mithilfe einem Statistikprogramm (IBM SPSS Statistics 26) ausgewertet. Der erste Schritt umfasst die Beschreibung der Studienpopulation sowie der Vitamin D-Serumspiegel und die fäkalen Calprotectin-Konzentrationen zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 mittels deskriptiver Messmethoden, daneben wurde die Verteilung der Daten ermittelt (Kolmogorow-Smirnow-Test). Die Signifikanz der Messwertveränderung von fCal und Vitamin D über den Zeitraum T0-T2 wurde mittels des allgemeinen linearen Modells errechnet. Je nach Verteilung der jeweiligen Daten wurden die Korrelationsanalysen entweder mit der Pearson-Korrelation (normalverteilt) oder mit der Spearman-Korrelation (nicht normalverteilt) errechnet. Analysiert wurde die Korrelation von fCal und Vitamin D sowie von fCal und dem Alter, dem Body-Mass-Index und der Ballaststoffaufnahme. Mittels Kruskal-Wallis-Test wurde die Verteilung von Vitamin D über die fCal-Entzündungskategorien (negativ, grenzwertig, positiv) ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse & Schlussbetrachtung

Von insgesamt 101 Studienteilnehmern waren 21 Drop-out-Fälle zu verzeichnen, acht weitere Personen wurden aufgrund einer Ausreißer-Analyse exkludiert. In dieser Arbeit werden daher die Messwerte von insgesamt 72 Teilnehmerinnen und Teilnehmer der Studie analysiert.

4.1 Messwiederholungen – Calprotectin

Im Zuge der fCal-Messungen waren Gründe vorhanden, die dazu führten, dass sowohl einzelne Proben als auch ganze Testreihen nochmals durchgeführt wurden.

Folgende Gründe führten zu erneuten Messungen:

- Der Variationskoeffizient einer im Doppelansatz erhobenen Probe war größer als 10.
- Die Extinktionswerte der Kontrollen befanden sich nicht in dem vom Hersteller angegebenen Bereich.
- Die Extinktionswerte der Standardgerade über- oder unterschritt den vom Hersteller festgesetzten Bereich.

Testläufe	Getestet am	Wiederholt am
D001_T1 bis D040_T1	13.06.2019	20.09.2019
D041_T1 bis D080_T1	17.06.2019	-
D081_T1 bis D101_T1 + D001_T2 bis D020_T2	02.07.2019	01.10.2019
D021_T2 bis D060_T2	19.07.2019	-
D061_T2 bis D101_T2 + D002_T3 bis D006_T3	22.07.2019	03.10.2021
D007_T3 bis D057_T3	26.07.2019	
D058_T3 bis D101_T3	23.08.2019*	
Einzelne Messwiederholungen (Kontrollen)	Getestet am	Wiederholt am
D085_T2 und D101_T2		23.08.2019*
*Die Messungen fanden im Zuge desselben Testlaufes statt.		

Tabelle 3: Testversuche der Calprotectin-ELISA-Immunoassays

Tabelle 3 enthält die ausgeführten Testläufe sowie Einzelprobenmessungen mit Probenbezeichnung, Messzeitpunkten und Wiederholungen.

4.2 Deskriptive Statistik

Im Folgenden werden mittels deskriptiver Statistik die Merkmale der Studienpopulation sowie die Verteilung dieser Eigenschaften innerhalb der Interventionsgruppen erläutert.

		DL	DH	K	N
Probandenzahl (n)		24	27	21	72
Alter (Jahre)	Mittel $\pm$ SD	70,8 $\pm$ 4,7	71 $\pm$ 4,5	70,5	70,6 $\pm$ 4,7
	Median	69,5	69,3	68,2	68,9
	Min-Max	65-80,9	65,2-79,2	64,9-84,9	64,9-84,9
Alterskategorien (Häufigkeiten)	65-69,9 Jahre	13	15	14	42
	70-74,9 Jahre	5	7	4	16
	75-79,9 Jahre	6	3	2	11
	80-85 Jahre	-	2	1	3
Geschlecht (Häufigkeiten)	Männlich	10	6	8	24
	Weiblich	14	21	13	48

Tabelle 4: Merkmale der Studienpopulation (Alter, Altersgruppen, Geschlecht) zum Zeitpunkt T0. DL = Gruppe "Vitamin D täglich", DH = Gruppe "Vitamin D monatlich", K = Kontrollgruppe, N = alle Gruppen.

Tabelle 4 zeigt Geschlecht, Alter sowie die Häufigkeit in den Alterskategorien (Zeitpunkt T0), unterteilt nach Interventionsgruppen. Die Studienpopulation bestand zu ca. zwei Drittel aus männlichen Teilnehmern, Ausfälle in der Studienpopulation betrafen vermehrt bei Frauen. Der relative Männeranteil ist in der Interventionsgruppe „Vitamin D monatlich“ mit 21 von 27 Teilnehmenden am höchsten. Die Altersspanne reicht von 64,9 Jahre bis 84,9 Jahre. Wie in Abbildung 8 dargestellt, ist das Alter der Teilnehmenden nicht normalverteilt, da Studienteilnehmer ab 65 Jahren gesucht worden sind. Im Schnitt betrug das Alter 70,6 Jahre und der Median ca. 68,9 Jahre. Der BMI ist zum Zeitpunkt T0 aufgrund von Ausreißern im oberen BMI-Bereich nicht normalverteilt (Kolmogorow-Smirnow-Test: $p = 0,011$) und häuft sich um den Normalbereich für Seniorinnen und Senioren (24-29 kg/m^2). Die Höhe des Mittelwertes (26,8 kg/m^2) und des Medians (26,4 kg/m^2) sind insgesamt annähernd gleich.

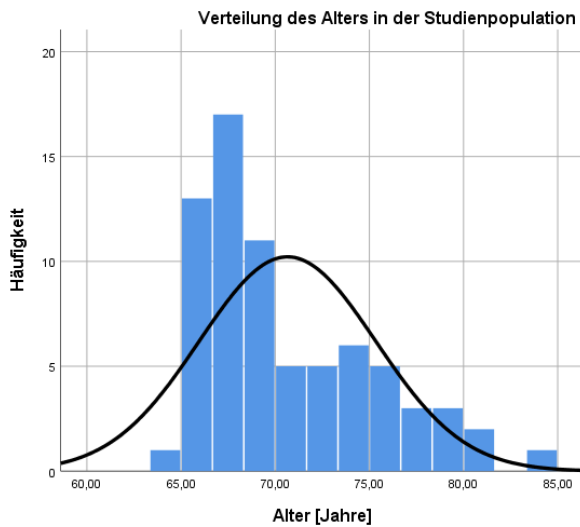


Abbildung 9: Verteilung des Alters in der Studienpopulation (Zeitpunkt T0) bei n = 72 Teilnehmern.

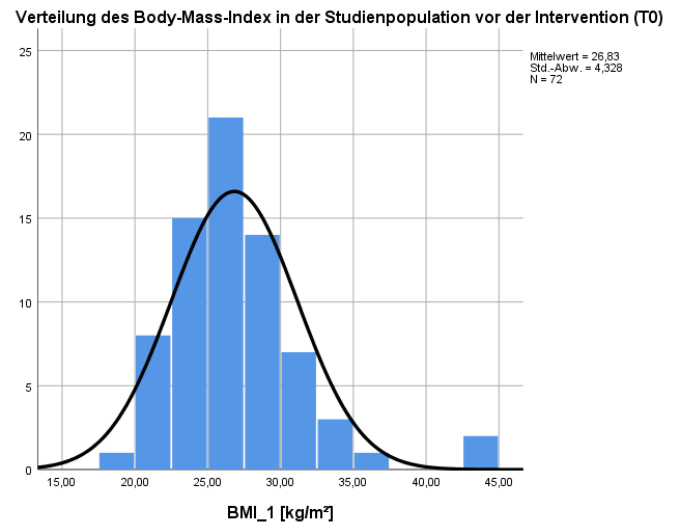


Abbildung 8: Verteilung des Body-Mass-Index in der Studienpopulation vor Beginn der Intervention (T0) bei n = 72 Teilnehmern.

		DL	DH	K	N
Probandenzahl (n)		24	27	21	72
Body-Mass-Index (kg/m ²)	T0 (Mittel ± SD)	27,5 ± 3,9	27 ± 4,2	25,8 ± 4,9	26,8 ± 4,3
	Median	26,5	26,7	25,4	26,4
	Min-Max	21,1-37	20,6-42,5	19,3-42,6	19,3-42,6
	T2 (Mittel ± SD)	24,4 ± 3,9	26,9 ± 4,3	25,8 ± 4,8	26,7 ± 4,3
	Median	26,6	26,8	25,5	26,1
	Min-Max	20,8-36,6	20,3-42,8	19,5-42,1	19,5-42,8
Ballaststoff-Aufnahme (g/Tag)	T0 (Mittel ± SD)	20 ± 10,8	21,3 ± 10,5	17,6 ± 11,4	19,8 ± 10,8
	Median	16,5	21	14	17,5
	Min-Max	9-39	2-44	4-57	2-58
	T2 (Mittel ± SD)	19,8 ± 7,6	19,9 ± 7,8	19,1 ± 9,6	19,4 ± 8,2
	Median	19	18	16	17
	Min-Max	6-58	8-41	8-45	8-45

Tabelle 5: Body-Mass-Index und Ballaststoffaufnahme der Studienteilnehmer zu den Zeitpunkten T0 und T2. DL = Gruppe "Vitamin D täglich", DH = Gruppe "Vitamin D monatlich", K = Kontrollgruppe, N = alle Gruppen.

Tabelle 5 zeigt den Body-Mass-Index (BMI) und die Ballaststoffaufnahme in den Interventionsgruppen zu den Zeitpunkten T0 bis T2. In der Tabelle sind die Mittelwerte des BMI in den Gruppen DL und DH zum Zeitpunkt T2 niedriger als zum Zeitpunkt T0, diese Reduktion ist jedoch nicht signifikant. Der Body-Mass-Index ist, im Gegensatz zu T0, nach der Intervention (T2) normalverteilt (Kolmogorow-Smirnow-Test: $p = 0,200^*$). Eventuell könnten Ausreißer im oberen BMI-Bereich zum Zeitpunkt T0 der Grund hierfür sein. Die Ballaststoffaufnahme ist weder zum Zeitpunkt T0 noch zum Zeitpunkt T2 normalverteilt

(Kolmogorow-Smirnow-Test: T0: $p = 0,010$, T2: $0,004$). Bei der Ballaststoffaufnahme lassen sich Schwankungen zwischen den einzelnen Studienteilnehmern erkennen (T0: 2-58 g/Tag, T2: 8-45 g/Tag).

		DL	DH	K	N
Probandenzahl (n)		24	27	21	72
Vitamin D im Serum (ng/ml)	T0 (Mittel $\pm$ SD)	24,3 $\pm$ 5,1	23,4 $\pm$ 4,6	22,5 $\pm$ 5,5	23,4 $\pm$ 5
	Median	25,7	23,1	23,5	24,9
	Min-Max	11,9-30	13-29,8	11,8-29,3	11,8-30
	T1 (Mittel $\pm$ SD)	23,5 $\pm$ 7,3	23,6 $\pm$ 9,3	20,5 $\pm$ 5,7	22,7 $\pm$ 7,7
	Median	22,6	23,6	21,2	22,3
	Min-Max	11,4-42,4	9,9-47	9,9-32,4	9,9-47
	T2 (Mittel $\pm$ SD)	25,1 $\pm$ 5,8	25,6 $\pm$ 4,6	22 $\pm$ 5,6	24,4 $\pm$ 5,5
	Median	26,2	24,4	22,1	24,3
	Min-Max	13,55-36,3	15,7-32,8	11,9-34	11,9-36,3
Calprotectin-Konzentration im Stuhl (μ g/g)	T0 (Mittel $\pm$ SD)	53 $\pm$ 54,4	55,2 $\pm$ 63,7	58,2 $\pm$ 64,1	55,4 $\pm$ 60,1
	Median	33,1	34,6	38,8	35,2
	Min-Max	10,8-193,85	2,71-322,2	7,45-271,9	2,71-322,2
	T1 (Mittel $\pm$ SD)	47,2 $\pm$ 53,1	43 $\pm$ 45,1	48,2 $\pm$ 56,7	45,9 $\pm$ 50,7
	Median	25,8	23,3	23,1	24
	Min-Max	6,6-195,3	4,2-165,8	6,8-211,6	4,2-211,6
	T2 (Mittel $\pm$ SD)	65,9 $\pm$ 85,2	49,3 $\pm$ 48,6	44 $\pm$ 51,7	53,3 $\pm$ 63,7
	Median	22,4	31,8	19,7	24,3
	Min-Max	5,1-277	4,2-158,8	8,9-196,9	4,2-277

Tabelle 6: Vitamin D im Serum und fCal-Konzentration im Stuhl der Studienteilnehmer zu den Zeitpunkten T0 und T2. DL = Gruppe "Vitamin D täglich", DH = Gruppe "Vitamin D monatlich", K = Kontrollgruppe, N = alle Gruppen.

Tabelle 6 zeigt die Konzentration von Vitamin D im Serum und von fCal im Stuhl der Studienteilnehmer zu den Zeitpunkten T0, T1, und T2. Es lässt sich in der Tabelle erkennen, dass die Mittelwerte von Vitamin D bei den Gruppen DL und DH nach Ende der Intervention größer geworden sind (im Gegensatz zur Kontrollgruppe). Nach der Anwendung des Kolmogorow-Smirnow-Tests zeigt sich zum Zeitpunkt T2 bei Vitamin D eine Normalverteilung ($p = 0,200^*$), jedoch nicht zu den Zeitpunkten T0 ($p = 0,004$) und T1 ($p = 0,084$). Bei den fCal-Konzentrationen ist zu keinem der Messzeitpunkte eine Normalverteilung feststellbar, der Kolmogorow-Smirnow-Test zeigt bei allen drei Messzeitpunkten einen p-Value von $p = 0,000$. Zu erwähnen sind bei den fCal-Konzentrationen

auch die hohen Standardabweichungen und die Spannweite der Messergebnisse (T0: 4,2-211,6 µg/g, T2: 4,2-277 µg/g).

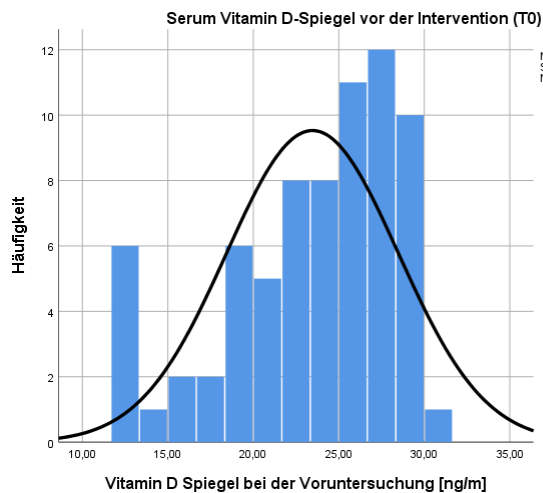


Abbildung 10: Serum Vitamin D-Spiegel vor der Intervention (T0) bei n = 72 Teilnehmern.

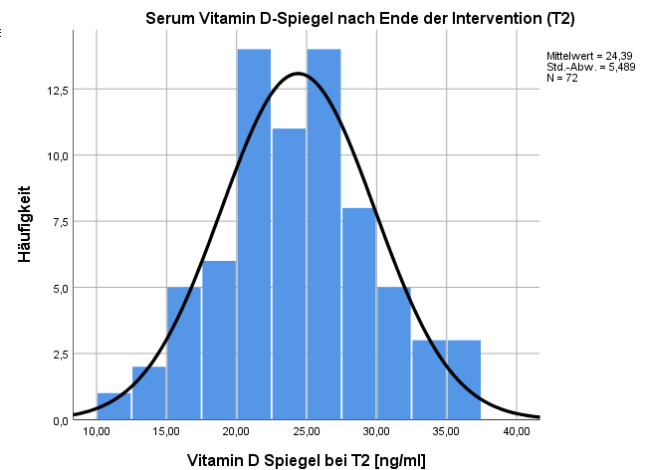


Abbildung 11: Serum Vitamin D-Spiegel nach der Intervention (T2) bei n = 72 Teilnehmern.

Die Tabellen 7-9 geben einen Überblick über die Bewertung der Vitamin D-Versorgung und dem fCal-Entzündungsgrad der Studienteilnehmer zu den jeweiligen Zeitpunkten (T0, T1, T2), unterteilt nach Interventionsgruppen.

Zeitpunkt T0	Vitamin D Status					Status fäkales Calprotectin				
	Interventionsgruppe:	1	2	3	Alle	Interventionsgruppe:	1	2	3	Alle
	Optimaler Staus: 30 bis 80 ng/ml (Häufigkeit)	0	1	0	1	Negativ: <50 µg/g (Häufigkeit)	15	15	16	46
	Suffizienz: 20 bis 30 ng/ml (Häufigkeit)	16	18	20	54	Grenzwertig: 50-120 µg/g (Häufigkeit)	4	6	9	19
	Mangel: <20 ng/ml (Häufigkeit)	5	5	7	17	Positiv: >120 µg/g (Häufigkeit)	2	3	2	7
	Schwerer Mangel: <10 ng/ml (Häufigkeit)	0	0	0	0	-	-			
	Gesamt (Häufigkeit)	21	24	27	72	Gesamt (Häufigkeit)	21	24	27	72

1 = Kontrollgruppe (K); 2 = „Vitamin D täglich“ (DL); 3 = „Vitamin D monatlich“ (DH)

Tabelle 7: Bewertung der Vitamin D-Versorgung und der Entzündung (fCal) der Studienteilnehmer zum Zeitpunkt T0.

Zeitpunkt T1	Vitamin D Status					Status fäkales Calprotectin				
	Interventionsgruppe:	1	2	3	Alle	Interventionsgruppe:	1	2	3	Alle
	Optimaler Staus: 30 bis 80 ng/ml (Häufigkeit)	1	4	4	9	Negativ: <50 µg/g (Häufigkeit)	16	17	19	52
	Suffizienz: 20 bis 30 ng/ml (Häufigkeit)	12	12	13	37	Grenzwertig: 50-120 µg/g (Häufigkeit)	3	3	5	11
	Mangel: <20 ng/ml (Häufigkeit)	8	8	10	26	Positiv: >120 µg/g (Häufigkeit)	2	4	3	9
	Schwerer Mangel: <10 ng/ml (Häufigkeit)	0	0	0	0	-				
	Gesamt (Häufigkeit)	21	24	27	72	Gesamt (Häufigkeit)	21	24	27	72

1 = Kontrollgruppe (K); 2 = „Vitamin D täglich“ (DL); 3 = „Vitamin D monatlich“ (DH)

Tabelle 8: Bewertung der Vitamin D-Versorgung und der Entzündung (fCal) der Studienteilnehmer zum Zeitpunkt T1.

Zeitpunkt T2	Vitamin D Status					Status fäkales Calprotectin				
	Interventionsgruppe:	1	2	3	Alle	Interventionsgruppe:	1	2	3	Alle
	Optimaler Staus: 30 bis 80 ng/ml (Häufigkeit)	2	4	5	11	Negativ: <50 µg/g (Häufigkeit)	15	17	18	50
	Suffizienz: 20 bis 30 ng/ml (Häufigkeit)	11	16	20	47	Grenzwertig: 50-120 µg/g (Häufigkeit)	4	1	5	10
	Mangel: <20 ng/ml (Häufigkeit)	8	4	2	14	Positiv: >120 µg/g (Häufigkeit)	2	6	4	12
	Schwerer Mangel: <10 ng/ml (Häufigkeit)	0	0	0	0	-				
	Gesamt (Häufigkeit)	21	24	27	72	Gesamt (Häufigkeit)	21	24	27	72

1 = Kontrollgruppe (K); 2 = „Vitamin D täglich“ (DL); 3 = „Vitamin D monatlich“ (DH)

Tabelle 9: Bewertung der Vitamin D-Versorgung und der Entzündung (fCal) der Studienteilnehmer zum Zeitpunkt T2.

Die Vitamin D-Versorgung der Studienteilnehmer häuft Großteiles im Bereich „Suffizienz“ bis „Mangel“, schwere Mängel sowie ein optimaler Status (ab 30 ng/ml) kommt relativ gesehen seltener vor. Die fäkale Calprotectin-Konzentration befindet bei den meisten Teilnehmern im negativen bis grenzwertigen Bereich.

4.3 Hypothesenprüfung und Schlussbetrachtung

Fragestellung 1: Ist die fäkale Calprotectin-Konzentration durch die Intervention signifikant gesunken?

Mittels ANOVA (Messwiederholung) und paarweisem Vergleich wurde keine signifikante Reduktion von Calprotectin durch die Intervention festgestellt. Die Mittlere Differenz (I-J) beträgt zwischen T2 (I) und T0 (J) in der Gruppe DL („Vitamin D täglich) 12,9 $\mu\text{g/g}$ ($n = 24$, $p = 1,000$), in der Gruppe DH („Vitamin D monatlich) -5,9 $\mu\text{g/g}$ ($n = 27$, $p = 1,000$) und in der Kontrollgruppe -14, 2 $\mu\text{g/g}$ ($n = 21$, $p = 0,950$).

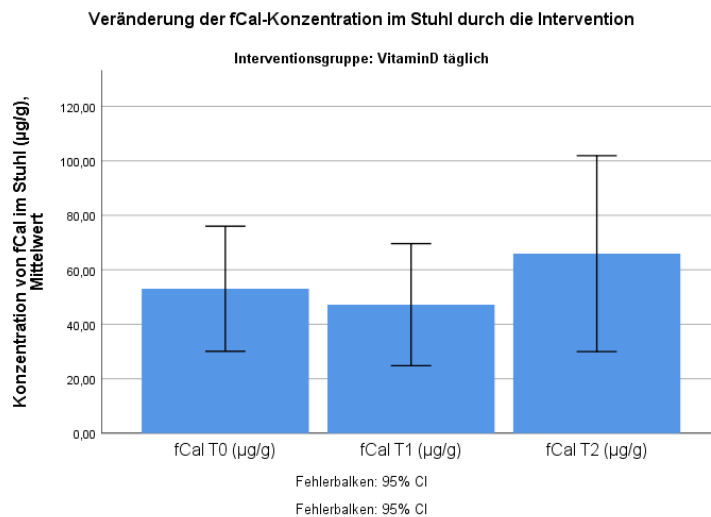


Abbildung 13: Veränderung der fCal-Konzentration im Stuhl durch die Intervention mit täglich 500 IE Vitamin D (DL) bei $n = 24$ Teilnehmern.

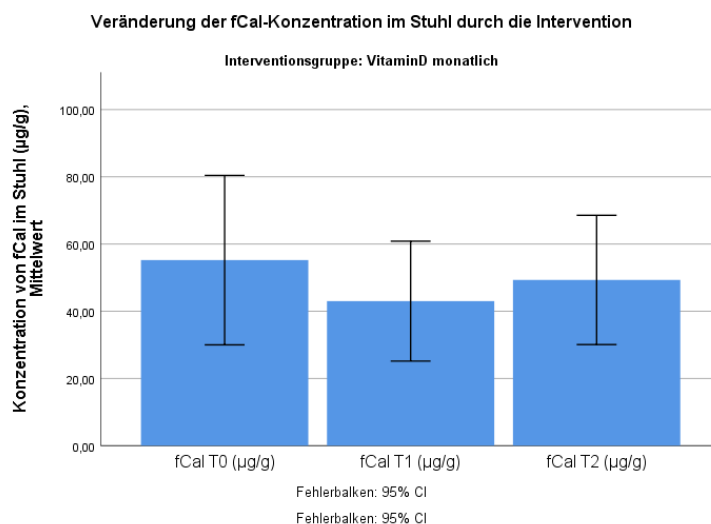


Abbildung 12: Veränderung der fCal-Konzentration im Stuhl durch die Intervention mit monatlich 50.000 IE Vitamin D (DH) bei $n = 27$ Teilnehmern.

Es wäre interessant herauszufinden, ob ein Mindestwert von Vitamin D im Serum notwendig ist, um einen reduzierenden Effekt auf den Entzündungsmarker fCal zu erzielen, hierfür war die Zahl innerhalb der einzelnen Vitamin D-Kategorien (schwerer Mangel, Mangel, Suffizienz, optimaler Status) zu niedrig, um weitere Analysen durchzuführen. **Schlussfolgerung:** Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen keine Reduktion der fäkalen Calprotectin-Konzentration durch die Intervention.

Fragestellung 2: Sind die Serum Vitamin D-Spiegel durch die Intervention signifikant gestiegen?

Mittels ANOVA (Messwiederholung) und paarweisem Vergleich wurde eine signifikante Erhöhung der Serum Vitamin D-Spiegel in der Gruppe DH („Vitamin D monatlich“) gefunden ($p = 0,001^*$), jedoch nicht in der Gruppe DL. Die Mittlere Differenz (I-J) beträgt zwischen T2 (I) und T0 (J) in der Gruppe DL 0,8 ng/ml ($n = 24$, $p = 1,000$), in der Gruppe DH von 2,2 ng/ml ($n = 27$, $p = 0,001^*$) und in der Kontrollgruppe -0,5 ng/ml ($n = 21$, $p = 1,000$).

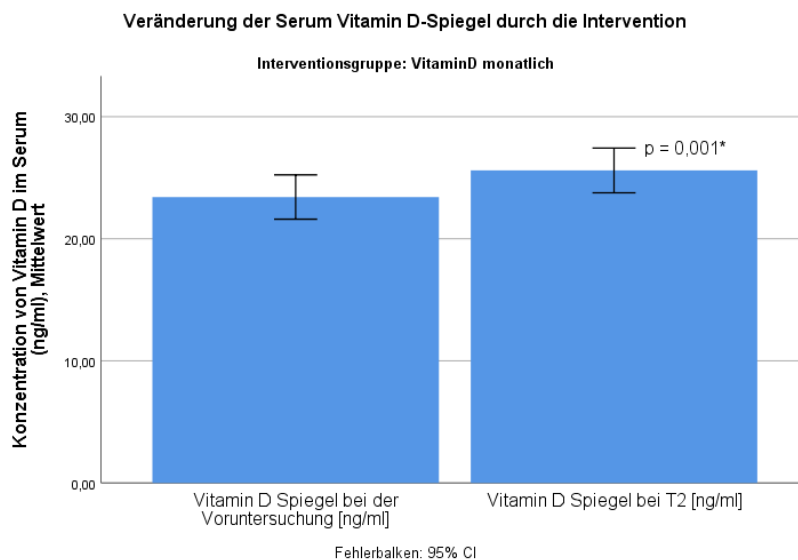


Abbildung 14: Veränderung der Serum Vitamin D-Spiegel durch die Intervention in der Gruppe DH ($n = 27$, $I-J = 2,2$ ng/ml, $p = 0,001^*$).

Es gibt sehr wenige Studien über die Effizienz verschiedener Dosierungen von Vitamin D zur Steigerung der Serum Vitamin D-Spiegel. Daten zeigen, dass niedrige Dosierungen (200 IE bis 600 IE täglich) bei einem Vitamin D-Mangel kaum einen Anstieg der Serumlevel bewirken (Marwaha and Dabas, 2019). Es zeigte sich in einer Studie, dass eine Dosierung von täglich 1.000 IE Vitamin D notwendig ist, um bei den Probanden nach 6 Monaten einen Serumspegel von über 20 ng/ml zu erreichen (Marwaha et al., 2018). Eventuell wäre eine längere Dauer der Vitamin D-Supplementierung für einen stärkeren Anstieg der Serum Vitamin D-Spiegel notwendig gewesen. Vitamin D ist fettlöslich und somit ist ein gewisser Fettanteil in der umgebenden Matrix notwendig, damit dieses gut aufgenommen wird. Die Praktikabilität monatlich einmal Vitamin D zu sich zu nehmen, versus der täglichen Einnahme, könnte ebenso ein Einflussfaktor hinsichtlich der Compliance sein.

Schlussfolgerung: Die Gabe einmal monatlich 50.000 IE Vitamin D war in der Lage die Vitamin D-Serumspiegel der Probanden signifikant zu erhöhen, was verdeutlicht, dass die Art der Dosierung ein Einflussfaktor für die Effektivität der Supplementierung sein kann. Obwohl dieses Ergebnis signifikant ist, sind Einflussfaktoren beispielsweise die Compliance bei der täglichen Einnahme von Vitamin D zu berücksichtigen. Weitere Untersuchungen wären für eine Bekräftigung dieser Ergebnisse notwendig.

Fragestellung 3: Gibt es zum Zeitpunkt T0 eine Korrelation zwischen dem Vitamin D-Spiegel im Serum und der fäkalen Calprotectin-Konzentration (n = 72)?

Zum Zeitpunkt T0 konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem Vitamin D-Spiegel und dem fäkalen Calprotectin ($r = -0,093$, $p = 0,435$) gefunden werden.

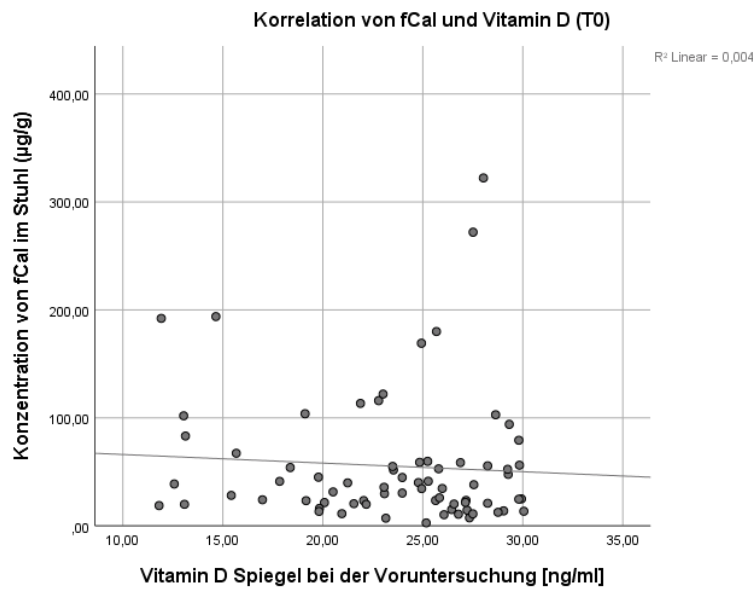


Abbildung 15: Korrelation ($r = -0,093$, $p = 0,435$) zwischen dem Vitamin D-Serumspiegel und der fCal-Konzentration zum Zeitpunkt T0 bei n = 72 Teilnehmern.

Fragestellung 4: Gibt zum Zeitpunkt T2 eine Korrelation zwischen dem Vitamin D-Spiegel im Serum und der fäkalen Calprotectin-Konzentration (n = 72)?

Weder in DL (n = 24, $r = 0,017$, $p = 0,936$), noch in DH (n = 27, $r = 0,22$, $p = 0,265$) oder in der Kontrollgruppe (n = 21, $r = 0,081$, $p = 0,729$) konnte eine signifikante Korrelation zwischen der fäkalen Calprotectin-Konzentration und den Serum Vitamin D-Spiegeln nachgewiesen werden.

Bei der Erarbeitung der Ergebnisse ist aufgefallen, dass bei einzelnen Personen die fCal-Konzentrationen zwischen den einzelnen Zeitpunkten erheblich schwanken. Zum einen können Einflussfaktoren wie eine veränderte Ernährung, Lebensstil oder eine Medikamenten-Einnahme die Werte beeinflussen. Zum anderen vereinzelte Analyseprobleme im Labor, trotz gewissenhafter Überprüfung und Arbeit, nicht ausgeschlossen werden. Gewisse Versuchsreihen mussten erneut durchgeführt werden, da die Extinktionswerte

der Calprotectin-ELISA-Immuno-Assays nicht hoch genug waren (siehe 6.1. – Messwiederholungen Calprotectin).

Schlussfolgerung: In dieser Arbeit konnte keine Korrelation zwischen dem Vitamin D-Serumspiegel und der fCal-Konzentration gefunden werden. Weitere Versuche sind notwendig, um die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse über den Zusammenhang zwischen dem Vitamin D im Serum und der fCal-Konzentrationen zu bestätigen.

Fragestellung 5: Gibt es einen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Vitamin D-Serumspiegel über die fCal-Entzündungsgrade (negativ, grenzwertig, positiv) zwischen den Interventionsgruppen (Zeitpunkt T2)?

Laut Kruskal-Wallis-Test gibt es zwischen den Interventionsgruppen keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Vitamin D-Serumspiegel (Zeitpunkt T2) innerhalb der fCal-Entzündungsgrade (negativ, grenzwertig, positiv): DL ($n = 24$, $p = 0,861$), DH ($n = 27$, $p = 0,111$) Kontrollgruppe ($n = 21$, $p = 0,752$).

Da die Stichprobengröße der einzelnen Interventionsgruppen zu niedrig für eine Varianzanalyse ist, wurde der Kruskal-Wallis-Test für die Berechnung herangezogen.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse bestätigen die vorherigen Korrelationsanalysen zu fCal und Vitamin D in dieser Arbeit und zeigen, dass es keinen Zusammenhang zwischen fCal und Vitamin D gefunden werden konnte und dass die Intervention (Vitamin D monatlich, Vitamin D täglich) keinen Einfluss auf den Entzündungsgrad (fCal) hatte.

Fragestellung 6: Korreliert das Alter mit der fäkalen Calprotectin-Konzentration?

Die Korrelationsanalyse nach Spearman hat ergeben, dass das Alter der Teilnehmer zum Zeitpunkt T0 nicht signifikant mit der fCal-Konzentration korreliert ($n = 72$, $r = 0,077$, $p = 0,518$). Zum Zeitpunkt T2 kann ebenso keine signifikante Korrelation ($n = 72$, $r = 0,260$, $p = 0,130$) zwischen der fCal-Konzentration und dem Alter gefunden werden.

Ca. 58 Prozent der Teilnehmenden befinden sich in der jüngsten Altersklasse „65 bis 69,9 Jahre“. Die Verteilung in den anderen Alterskategorien ist wesentlich kleiner („70-74,9 Jahre“ = 25 Prozent, „75 – 79,9 Jahre“ = 15 Prozent, 80 – 85 Jahre“ = 4 Prozent). Möglicherweise ist die Verteilung in den höheren Alterskategorien zu klein, um die fCal-Werte zu beeinflussen. **Schlussfolgerung:** In dieser Arbeit konnte nicht gezeigt werden, dass das Alter die Konzentration des fäkalen Calprotectins beeinflusst hat.

Fragestellung 7: Gibt es einen signifikanten Effekt der Ballaststoffaufnahme auf die fäkale Calprotectin-Konzentration?

Die Korrelationsanalyse nach Spearman hat ergeben, dass die Ballaststoffaufnahme zum Zeitpunkt T0, mit einem von $p = 0,012^*$, signifikant negativ mit der fCal-Konzentration korreliert ($n = 72$, $r = -0,296$). Zum Zeitpunkt T2 korreliert die Ballaststoffaufnahme ebenso signifikant ($n = 72$, $p = 0,004^*$) negativ ($r = -0,335$) mit der fCal-Konzentration.

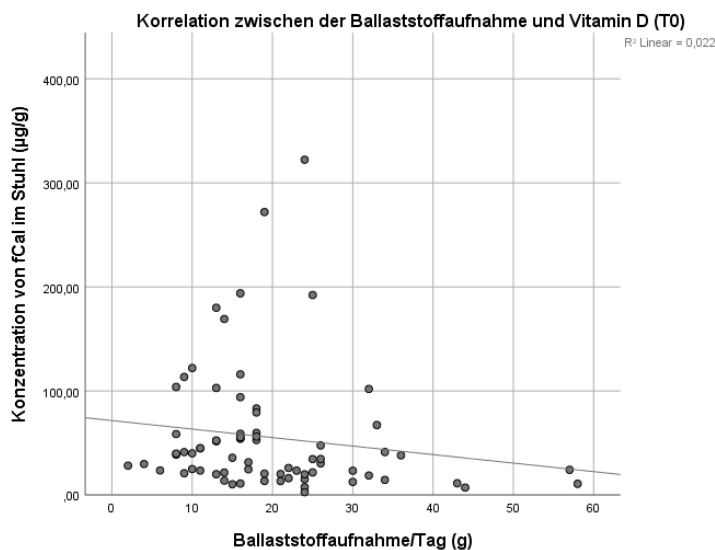


Abbildung 16: Korrelation zwischen der Ballaststoffaufnahme und der fäkalen Calprotectin-Konzentration zum Zeitpunkt T0 ($n = 72$, $p = 0,012^*$, $r = -0,296$)

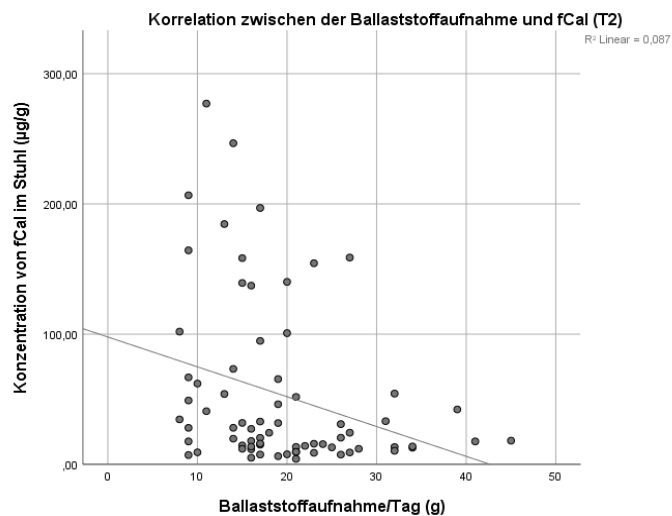


Abbildung 17: Korrelation zwischen der Ballaststoffaufnahme und der fäkalen Calprotectin-Konzentration zum Zeitpunkt T2 ($n=72$, $p=0,004^*$, $r=-0,335$).

Die Höhe der Korrelationskoeffizienten zeigt einen schwachen bis mäßig linearen Zusammenhang zwischen der Ballaststoffaufnahme und der fCal-Konzentration. Es gibt zahlreiche Daten, die eine reduzierende Wirkung der Ballaststoffe auf die Entzündung im Darm belegen. Es finden sich zudem zahlreiche Studien, die einen positiven Effekt der Ballaststoffaufnahme auf das Darm-Mikrobiom zeigen, und die Bedeutung eines gesunden Darm-Mikrobioms auf die Reduktion von Entzündungen im Darm nahelegen (Liu et al., n.d.; Zhang et al., 2021). Daher könnte die Ballaststoffaufnahme der Probanden das Darm-Mikrobiom eventuell indirekt beeinflusst haben, dies wurde in dieser Arbeit jedoch nicht gemessen. Interessant ist, dass ein Zusammenhang zwischen der Ballaststoffaufnahme und der fCal-Konzentration gefunden wurde und kein Zusammenhang zwischen dem Vitamin D im Serum und der fCal-Konzentration ermittelt werden konnte. Eine Erhöhung einer zu niedrigen Ballaststoffzufuhr zur Reduktion der fCal-Konzentration könnte daher empfehlenswerter sein als die orale Vitamin D-Therapie.

Schlussfolgerung: Es gibt einen Zusammenhang zwischen der Ballaststoffaufnahme und der fCal-Konzentration der Probanden. Die Erhöhung der Ballaststoffaufnahme zur Reduktion der fCal-Konzentration könnte als eine empfehlenswerte Maßnahme zur Reduktion von fäkalem Calprotectin betrachtet werden.

Fragestellung 8: Korreliert der Body-Mass-Index signifikant mit der Konzentration des fäkalen Calprotectins?

Zum Zeitpunkt T0 errechnet sich ein Korrelationskoeffizient von 0,235 mit einer Signifikanz von $p = 0,047^*$. Zum Zeitpunkt T2 errechnet sich ein Korrelationskoeffizient von 0,248 mit einer Signifikanz von $p = 0,036^*$. Interessant ist, dass ein Zusammenhang zwischen dem Body-Mass-Index und der fCal-Konzentration gefunden wurde und kein Zusammenhang zwischen dem Vitamin D im Serum und der fCal-Konzentration ermittelt werden konnte. Es gibt es Daten, die Übergewicht als Risikofaktor für Entzündungen im Darm und erhöhten fCal-Konzentrationen aufzeigen (Park and Kim, 2018; Poullis et al., 2004). Daher scheint die Reduktion eines zu hohen BMI womöglich therapeutisch effektiver sein, als die Einnahme eines Vitamin D-Supplements, um die die fCal-Konzentration im Darm zu reduzieren.

Schlussfolgerung: Es gibt einen Zusammenhang zwischen dem Body-Mass-Index und der Höhe der fCal-Konzentration. Eine Reduktion eines zu hohen BMI zur Reduktion der fCal-Konzentration könnte als eine empfehlenswerte Maßnahme zur Reduktion von fäkalem Calprotectin betrachtet werden.

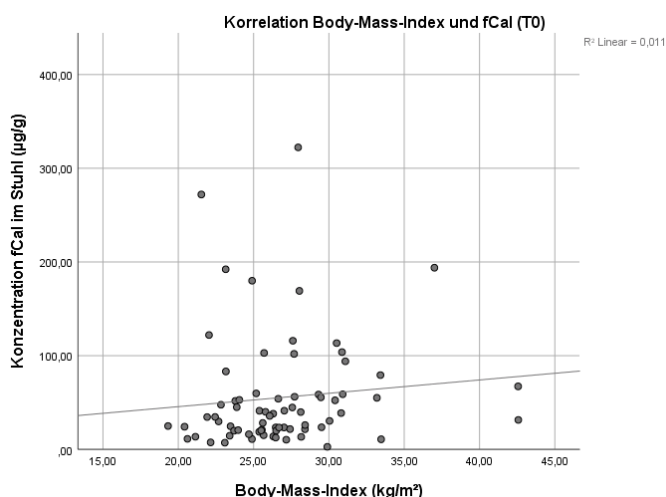


Abbildung 18: Korrelation zwischen dem BMI und der fCal-Konzentration zum Zeitpunkt T0 ($n = 72$, $p = 0,047^*$, $r = 0,235$).

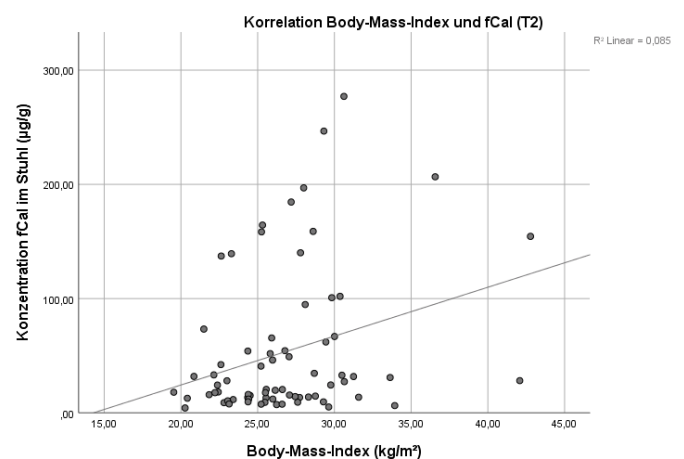


Abbildung 19: Korrelation zwischen dem BMI und der fCal-Konzentration zum Zeitpunkt T2 ($n = 72$, $p = 0,036^*$, $r = 0,248$).

5 Abstract

Inflammatory bowel diseases are a serious global public health challenge. At the same time, there is increasing data showing that vitamin D has anti-inflammatory and immune-modulating effects. The present work assesses whether there is a potential link between serum vitamin D (VDS) and the intestinal, fecal inflammatory marker calprotectin (fCal) and whether other factors (age, body mass index, fiber intake) might influence the concentration of fCal. In the course of the „SK-AT Interreg NutriAging“-project (co-financed by the EU), 72 seniors (65 - 85 years) received either 800 IU of vitamin D (DL) per day, 50,000 IU of vitamin D (DH) per month or no vitamin D (K) for 15 weeks. In addition to the nutritional intervention (T0 - T1), the subjects completed a training program (T1 - T2). FCal was determined by ELISA and evaluated in respect to serum vitamin D levels, age, body mass index (BMI) and dietary fiber intake.

No significant reduction of fCal through the intervention could be determined in DL (I-J = 12,9 $\mu\text{g/g}$, $p = 1,000$), in DH (I-J = -5,9 $\mu\text{g/g}$, $p = 1,000$) and in K (I-J = -14,2 $\mu\text{g/g}$, $p = 0,950$) and no correlation between VDS and fCal has been observed at T0 ($r = -0.093$, $p = 0.435$) and at T2 in DL ($r = 0,017$, $p = 0,936$), in DH ($r = 0,220$, $p = 0,265$) and in K ($r = 0,081$, $p = 0,729$). The association of VDS and fCal was not significantly different among the groups DL ($p = 0.861$), DH ($p = 0.752$), and K ($p = 0.111$). Only in the DH (I-J = 2.2 ng/mL^* , $p = 0.001$) there was a significant increase in VDS (T0 - T2) detectable. Age (T0: $r = -0.077$, $p = 0.518$; T2: $r = 0,260$, $p = 0,130$) did not significantly correlate with fCal. Body mass index was positively correlated with fCal at T0 ($r = 0.235$, $p = 0.047^*$) and at T2 ($r = 0.248$, $p = 0.036^*$). Fiber intake was negatively correlated with fCal at T0 ($r = -0.296$, $p = 0.012^*$) and at T2 ($r = -0.335$, $p = 0.004^*$). Within this work, no association was found between vitamin D and fCal (before and after the intervention). The oral administration of Vitamin D could slightly increase serum Vitamin D with higher doses (50.000 IU). FCal was negatively correlated with fiber intake and positively correlated with BMI. Optimizing the BMI or increasing the intake of dietary fiber could be a better recommendation for the prevention therapy of inflammatory bowel diseases than vitamin D administration.

6 Zusammenfassung

Entzündliche Darmerkrankungen stellen global eine ernstzunehmende Herausforderung für die öffentliche Gesundheit dar. Gleichzeitig gibt es immer mehr Daten, die eine anti-entzündliche und immunmodulierende Wirkung von Vitamin D aufzeigen. Die vorliegende Arbeit untersucht daher, ob es einen potenziellen Zusammenhang zwischen dem Vitamin D im Serum (VDS) und dem intestinalen, fäkalen Entzündungsmarker Calprotectin (fCal) gibt und ob weitere Faktoren (Alter, Body-Mass-Index, Ballaststoffaufnahme) mit der fCal-Konzentration im Zusammenhang stehen. Im Zuge des EU-Co-finanzierten „SK-AT Interreg NutriAging“-Projekts erhielten 72 Seniorinnen und Senioren (65 - 85 Jahre) 15 Wochen entweder täglich 800 IU Vitamin D (DL), monatlich 50.000 IU Vitamin D (DH) oder kein Vitamin D (K) und neben der Ernährungsintervention (T0 – T1) auch ein Trainingsprogramm (T1 – T2). fCal wurde mittels ELISA gemessen und hinsichtlich der Serum Vitamin D-Spiegel, dem Alter, dem BMI und der Ballaststoffaufnahme bewertet.

Es konnte keine signifikante Reduktion von fCal durch die Intervention in DL (I-J = 12,9 µg/g, $p = 1,000$), in DH (I-J = -5,9 µg/g, $p = 1,000$) und in K (I-J = -14,2 µg/g, $p = 0,950$) nachgewiesen werden. Weder zu T0 ($r = -0,093$, $p = 0,435$) noch zu T2 wurde in DL ($r = 0,017$, $p = 0,936$), in DH ($r = 0,220$, $p = 0,265$) und in K ($r = 0,08$, $p = 0,729$) eine signifikante Korrelation zwischen den VDS und der fCal-Konzentration festgestellt. Der Zusammenhang von VDS mit fCal unterschied sich nicht signifikant zwischen DL ($p = 0,861$), DH ($p = 0,752$), und K ($p = 0,111$). Der Anstieg der VDS war nur in DH signifikant (I-J = 2,2 ng/ml, $p = 0,001^*$). Das Alter (T0: $r = -0,077$, $p = 0,518$; T2: $r = 0,260$, $p = 0,130$) korrelierte nicht signifikant mit fCal. Der Body-Mass-Index war zum Zeitpunkt T0 ($r = 0,235$, $p = 0,047^*$) und zum Zeitpunkt T2 ($r = 0,248$, $p = 0,036^*$) positiv mit fCal korreliert. Die Ballaststoffaufnahme korrelierte zum Zeitpunkt T0 ($r = -0,296$, $p = 0,012^*$) und zum Zeitpunkt T2 ($r = -0,335$, $p = 0,004^*$) negativ mit fCal. In dieser Arbeit wurde kein Zusammenhang zwischen Vitamin D und fCal gefunden (vor und nach der Intervention). In DH zeigte sich ein geringer Effekt der oralen Vitamin D-Gabe auf die Serum Vitamin D-Spiegel. Das fCal ist negativ mit der Ballaststoffaufnahme und positiv mit dem BMI korreliert. Die Optimierung des BMI oder die Erhöhung der Ballaststoffaufnahme, könnten zur Prävention bzw. zur begleitenden Therapie bei entzündlichen Darmerkrankungen, empfehlenswerter sein als die Vitamin D-Ergänzung.

7 Literaturverzeichnis

- Abraham, B.P., Kane, S., 2012. Fecal markers: calprotectin and lactoferrin. *Gastroenterol Clin North Am* 41, 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2012.01.007>
- Alshahrani, F., Aljohani, N., 2013. Vitamin D: Deficiency, Sufficiency and Toxicity. *Nutrients* 5, 3605–3616. <https://doi.org/10.3390/nu5093605>
- Ayling, R.M., Kok, K., 2018. Chapter Six - Fecal Calprotectin, in: Makowski, G.S. (Ed.), *Advances in Clinical Chemistry, Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 161–190. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.07.005>
- Bafutto, M., Oliveira, E., Costa, M., Silva, K., Costa, J., Bafutto, E., Bafutto, A., Filho, J.R., 2017. P-112 Evaluation of Vitamin D Supplementation in Moderate to Severe Crohn's Disease Patients Using Anti-TNF: Replacement or Immunomodulation? *Inflammatory Bowel Diseases* 23. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000512631.47465.0e>
- Barth, D., 2006. Wirkung von künstlicher UV-Strahlung auf den Knochenstoffwechsel bei Altersheimbewohnern (Text.PhDThesis). Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Bartl, R., 2013. Vitamin D — ein unterschätztes Hormon mit vielfältiger Wirkung. *Orthop. Rheuma* 16, 36–44. <https://doi.org/10.1007/s15002-013-0042-3>
- Bashir, M., Prietl, B., Tauschmann, M., Mautner, S.I., Kump, P.K., Treiber, G., Wurm, P., Gorkiewicz, G., Högenauer, C., Pieber, T.R., 2016. Effects of high doses of vitamin D3 on mucosa-associated gut microbiome vary between regions of the human gastrointestinal tract. *Eur J Nutr* 55, 1479–1489. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0966-2>
- Bikle, D.D., 2014. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chemistry & Biology* 21, 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.chem-biol.2013.12.016>
- Boonstra, A., Barrat, F.J., Crain, C., Heath, V.L., Savelkoul, H.F., O'Garra, A., 2001. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 167, 4974–4980. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.9.4974>
- Borel, P., Caillaud, D., Cano, N.J., 2015. Vitamin D Bioavailability: State of the Art. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55, 1193–1205. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.688897>
- Burisch, J., Jess, T., Martinato, M., Lakatos, P.L., ECCO -EpiCom, 2013. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis* 7, 322–337. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.01.010>
- Busse, B., Bale, H.A., Zimmermann, E.A., Panganiban, B., Barth, H.D., Carriero, A., Vettorazzi, E., Zustin, J., Hahn, M., Ager, J.W., Püschel, K., Amling, M., Ritchie, R.O., 2013. Vitamin D deficiency induces early signs of aging in human bone, increasing the risk of fracture. *Sci Transl Med* 5, 193ra88. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006286>

- Calafat, M., Cabré, E., Mañosa, M., Lobatón, T., Marín, L., Domènech, E., 2015. High Within-day Variability of Fecal Calprotectin Levels in Patients with Active Ulcerative Colitis: What Is the Best Timing for Stool Sampling? *Inflammatory Bowel Diseases* 21, 1072–1076. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000349>
- Calprotectin-ELISA Arbeitsanleitung, 2019.
- Cantorna, M.T., Snyder, L., Lin, Y.-D., Yang, L., 2015. Vitamin D and 1,25(OH)₂D Regulation of T cells. *Nutrients* 7, 3011–3021. <https://doi.org/10.3390/nu7043011>
- Carlberg, C., 2014. The physiology of vitamin D—far more than calcium and bone. *Front. Physiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00335>
- Carlberg, C., Seuter, S., Heikkinen, S., 2012. The first genome-wide view of vitamin D receptor locations and their mechanistic implications. *Anticancer Res* 32, 271–282.
- Cashman, K.D., 2020. Vitamin D Deficiency: Defining, Prevalence, Causes, and Strategies of Addressing. *Calcif Tissue Int* 106, 14–29. <https://doi.org/10.1007/s00223-019-00559-4>
- Cashman, K.D., Dowling, K.G., Škrabáková, Z., Gonzalez-Gross, M., Valtueña, J., De Henauw, S., Moreno, L., Damsgaard, C.T., Michaelsen, K.F., Mølgaard, C., Jorde, R., Grimnes, G., Moschonis, G., Mavrogianni, C., Manios, Y., Thamm, M., Mensink, G.B., Rabenbergh, M., Busch, M.A., Cox, L., Meadows, S., Goldberg, G., Prentice, A., Dekker, J.M., Nijpels, G., Pilz, S., Swart, K.M., van Schoor, N.M., Lips, P., Eiriksdottir, G., Gudnason, V., Cotch, M.F., Koskinen, S., Lamberg-Allardt, C., Durazo-Arvizu, R.A., Sempos, C.T., Kiely, M., 2016. Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *Am J Clin Nutr* 103, 1033–1044. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.120873>
- Caviglia, G.P., Ribaldone, D.G., Rosso, C., Saracco, G.M., Astegiano, M., Pellicano, R., 2018. Fecal calprotectin: beyond intestinal organic diseases. *Panminerva Medica*. <https://doi.org/10.23736/S0031-0808.18.03405-5>
- Cheng, J., Fang, Z.-Z., Kim, J.-H., Krausz, K.W., Tanaka, N., Chiang, J.Y.L., Gonzalez, F.J., 2014. Intestinal CYP3A4 protects against lithocholic acid-induced hepatotoxicity in intestine-specific VDR-deficient mice. *J Lipid Res* 55, 455–465. <https://doi.org/10.1194/jlr.M044420>
- DACH-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, 2. Auflage, 7. aktualisierte Ausgabe. ed, 2021.
- D'Ambrosio, D., Cippitelli, M., Cocciolo, M.G., Mazzeo, D., Lucia, P.D., Lang, R., Sinigaglia, F., Panina-Bordignon, P., 1998. Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J Clin Invest* 101, 252–262. <https://doi.org/10.1172/JCI1050>
- Del Pinto, R., Pietropaoli, D., Chandar, A.K., Ferri, C., Cominelli, F., 2015. Association Between Inflammatory Bowel Disease and Vitamin D Deficiency: A Systematic Review and Meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 21, 2708–2717. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000546>
- Du, L., Foshaug, R., Huang, V.W., Kroeker, K.I., Dieleman, L.A., Halloran, B.P., Wong, K., Fedorak, R.N., 2018. Within-Stool and Within-Day Sample Variability of Fecal Calprotectin in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Clinical*

- Gastroenterology 52, 235–240.
<https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000776>
- Dziarski, R., Park, S.Y., Kashyap, D.R., Dowd, S.E., Gupta, D., 2016. Pglyrp-Regulated Gut Microflora *Prevotella falsenii*, *Parabacteroides distasonis* and *Bacteroides eggerthii* Enhance and *Alistipes finegoldii* Attenuates Colitis in Mice. *PLoS One* 11, e0146162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146162>
- EUROIMMUN-ELISA [WWW Document], 2021. . EUROIMMUN AG. URL <https://www.euroimmun.de/de/produkte/nachweismethoden/elisa/> (accessed 9.26.21).
- Fakhoury, H.M.A., Kvietys, P.R., AlKattan, W., Anouti, F.A., Elahi, M.A., Karras, S.N., Grant, W.B., 2020. Vitamin D and intestinal homeostasis: Barrier, microbiota, and immune modulation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 200, 105663.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105663>
- Farraye, F.A., Nimitphong, H., Stucchi, A., Dendrinis, K., Boulanger, A.B., Vijjeswarapu, A., Tanennbaum, A., Biancuzzo, R., Chen, T.C., Holick, M.F., 2011. Use of a novel vitamin D bioavailability test demonstrates that vitamin D absorption is decreased in patients with quiescent Crohn’s disease. *Inflamm Bowel Dis* 17, 2116–2121. <https://doi.org/10.1002/ibd.21595>
- Fisher, S.A., Rahimzadeh, M., Brierley, C., Gration, B., Doree, C., Kimber, C.E., Plaza Cajide, A., Lamikanra, A.A., Roberts, D.J., 2019. The role of vitamin D in increasing circulating T regulatory cell numbers and modulating T regulatory cell phenotypes in patients with inflammatory disease or in healthy volunteers: A systematic review. *PLoS One* 14, e0222313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222313>
- Fraga, M., Yáñez, M., Sherman, M., Llerena, F., Hernandez, M., Nourdin, G., Álvarez, F., Urrizola, J., Rivera, C., Lamperti, L., Nova, L., Castro, S., Zambrano, O., Cifuentes, A., Campos, L., Moya, S., Pastor, J., Nuñez, M., Gatica, J., Figueroa, J., Zúñiga, F., Salomón, C., Cerda, G., Puentes, R., Labarca, G., Vidal, M., McGregor, R., Nova-Lamperti, E., 2021. Immunomodulation of T Helper Cells by Tumor Microenvironment in Oral Cancer Is Associated With CCR8 Expression and Rapid Membrane Vitamin D Signaling Pathway. *Front Immunol* 12, 643298.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.643298>
- Fritsche, J., Mondal, K., Ehrnsperger, A., Andreesen, R., Kreutz, M., 2003. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 by human dendritic cells. *Blood* 102, 3314–3316.
<https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3521>
- Galior, K., Grebe, S., Singh, R., 2018. Development of Vitamin D Toxicity from Overcorrection of Vitamin D Deficiency: A Review of Case Reports. *Nutrients* 10, 953.
<https://doi.org/10.3390/nu10080953>
- Garg, M., Leach, S.T., Coffey, M.J., Katz, T., Strachan, R., Pang, T., Needham, B., Lui, K., Ali, F., Day, A.S., Appleton, L., Moeeni, V., Jaffe, A., Ooi, C.Y., 2017. Age-dependent variation of fecal calprotectin in cystic fibrosis and healthy children. *Journal of Cystic Fibrosis* 16, 631–636. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.03.010>
- Garg, M., Rosella, O., Rosella, G., Wu, Y., Lubel, J.S., Gibson, P.R., 2018. Evaluation of a 12-week targeted vitamin D supplementation regimen in patients with active

- inflammatory bowel disease. *Clin Nutr* 37, 1375–1382.
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.06.011>
- Gisbert, J.P., McNicholl, A.G., 2009. Questions and answers on the role of faecal calprotectin as a biological marker in inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease* 41, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2008.05.008>
- Gisbert-Ferrándiz, L., Salvador, P., Ortiz-Masiá, D., Macías-Ceja, D.C., Orden, S., Espluques, J.V., Calatayud, S., Hinojosa, J., Barrachina, M.D., Hernández, C., 2018. A Single Nucleotide Polymorphism in the Vitamin D Receptor Gene Is Associated With Decreased Levels of the Protein and a Penetrating Pattern in Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 24, 1462–1470. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy094>
- Godny, L., Reshef, L., Pfeffer-Gik, T., Goren, I., Yanai, H., Tulchinsky, H., Gophna, U., Dotan, I., 2020. Adherence to the Mediterranean diet is associated with decreased fecal calprotectin in patients with ulcerative colitis after pouch surgery. *Eur J Nutr* 59, 3183–3190. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02158-3>
- Gombart, A.F., Borregaard, N., Koeffler, H.P., 2005. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *The FASEB Journal* 19, 1067–1077. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3284com>
- Gubatan, J., Chou, N.D., Nielsen, O.H., Moss, A.C., 2019. Systematic review with meta-analysis: association of vitamin D status with clinical outcomes in adult patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 50, 1146–1158. <https://doi.org/10.1111/apt.15506>
- Gubatan, J., Moss, A.C., 2018. Vitamin D in inflammatory bowel disease: more than just a supplement. *Current Opinion in Gastroenterology* 34, 217–225.
<https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000449>
- Guo, C., Sinnott, B., Niu, B., Lowry, M.B., Fantacone, M.L., Gombart, A.F., 2014. Synergistic induction of human cathelicidin antimicrobial peptide gene expression by vitamin D and stilbenoids. *Mol Nutr Food Res* 58, 528–536.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201300266>
- Guzman-Prado, Y., Samson, O., Segal, J.P., Limdi, J.K., Hayee, B., 2020. Vitamin D Therapy in Adults With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Inflamm Bowel Dis* 26, 1819–1830.
<https://doi.org/10.1093/ibd/izaa087>
- Haines, S.T., Park, S.K., 2012. Vitamin D Supplementation: What's Known, What to Do, and What's Needed. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 32, 354–382. <https://doi.org/10.1002/phar.1037>
- Haisma, S.-M., Rheenen, P.F. van, Wagenmakers, L., Kobold, A.M., 2020. Calprotectin instability may lead to undertreatment in children with IBD. *Archives of Disease in Childhood* 105, 996–998. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2018-316584>
- Hassid, B., Lamere, B., Kattah, M., Mahadevan, U., 2016. Effect of Intense Exercise on Inflammatory Bowel Disease Activity: 686. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG* 111, S312.
- Haussler, M.R., Jurutka, P.W., Mizwicki, M., Norman, A.W., 2011. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH)₂vitamin D₃: Genomic and non-genomic mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*,

- Vitamin D: Classical and Novel Actions 25, 543–559.
<https://doi.org/10.1016/j.beem.2011.05.010>
- Heber, D., Kolter, T., Gredel, S., 2017. Calcitriol.
- Hewison, M., Zehnder, D., Chakraverty, R., Adams, J.S., 2004. Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 α -hydroxylase. *Molecular and Cellular Endocrinology, Proceedings of the Serono Foundation for the Advancement of Medical Science Workshop on Molecular Steroidogenesis* 215, 31–38.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.11.017>
- Hii, C.S., Ferrante, A., 2016. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients* 8, 135.
<http://dx-doi-org.uaccess.univie.ac.at/10.3390/nu8030135>
- Holick, M.F., 2020. Sunlight, UV Radiation, Vitamin D, and Skin Cancer: How Much Sunlight Do We Need? *Adv Exp Med Biol* 1268, 19–36.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-46227-7_2
- Holick, M.F., 1996. Vitamin D and Bone Health. *The Journal of Nutrition* 126, 1159S–1164S. https://doi.org/10.1093/jn/126.suppl_4.1159S
- Hou, J.K., Abraham, B., El-Serag, H., 2011. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol* 106, 563–573. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.44>
- Johne, B., Fagerhol, M.K., Lyberg, T., Prydz, H., Brandtzaeg, P., Naess-Andresen, C.F., Dale, I., 1997. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol* 50, 113–123. <https://doi.org/10.1136/mp.50.3.113>
- Jones, G., 2018. The discovery and synthesis of the nutritional factor vitamin D. *International Journal of Paleopathology, Vitamin D deficiency in bioarchaeology and beyond: The study of rickets and osteomalacia in the past* 23, 96–99.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2018.01.002>
- Jones, G., 2013. Extrarenal Vitamin D Activation and Interactions Between Vitamin D2, Vitamin D3, and Vitamin D Analogs. *Annu. Rev. Nutr.* 33, 23–44.
<https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161203>
- Joshi, S., Lewis, S.J., Creanor, S., Ayling, R.M., 2010. Age-related faecal calprotectin, lactoferrin and tumour M2-PK concentrations in healthy volunteers. *Ann Clin Biochem* 47, 259–263. <https://doi.org/10.1258/acb.2009.009061>
- Jung, J.H., Park, S.H., 2020. Correlation between Fecal Calprotectin Levels in Meconium and Vitamin D Levels in Cord Blood: Association with Intestinal Distress. *Journal of Clinical Medicine* 9, 4089. <https://doi.org/10.3390/jcm9124089>
- Kahles, H., 2016. Immunmodulierende Wirkung von Vitamin D und Typ-1-Diabetes. *Diabetologie* 12, 232–239. <https://doi.org/10.1007/s11428-016-0096-3>
- Kaplan, G.G., 2015. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12, 720–727. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.150>
- Kaplan, G.G., Ng, S.C., 2017. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 152, 313–321.e2.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.020>
- Karhu, E., Forsgård, R.A., Link to external site, this link will open in a new window, Alanko, L., Alfthan, H., Pussinen, P., Hämäläinen, E., Korpela, R., 2017. Exercise and gastrointestinal symptoms: running-induced changes in intestinal permea-

- bility and markers of gastrointestinal function in asymptomatic and symptomatic runners. *European Journal of Applied Physiology*; Heidelberg 117, 2519–2526. <http://dx-doi-org.uaccess.univie.ac.at/10.1007/s00421-017-3739-1>
- Kolho, K.-L., Alfthan, H., Hämmäläinen, E., 2012. Effect of bowel cleansing for colonoscopy on fecal calprotectin levels in pediatric patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 55, 751–753. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31825f4c77>
- Kong, J., Zhang, Z., Musch, M.W., Ning, G., Sun, J., Hart, J., Bissonnette, M., Li, Y.C., 2008. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 294, G208–G216. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00398.2007>
- Kopylov, U., Rosenfeld, G., Bressler, B., Seidman, E., 2014. Clinical utility of fecal biomarkers for the diagnosis and management of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 20, 742–756. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000442681.85545.31>
- Kristensen, V., Malmstrøm, G.H., Skar, V., Røseth, A., Moum, B., 2016. Clinical importance of faecal calprotectin variability in inflammatory bowel disease: intra-individual variability and standardisation of sampling procedure. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 51, 548–555. <https://doi.org/10.3109/00365521.2015.1117650>
- Kuchay, M.S., Jevalikar, G.S., Mithal, A., Mishra, S.K., Dang, N., 2016. Efficacy and safety of a single monthly dose of cholecalciferol in healthy school children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 29, 413–416. <https://doi.org/10.1515/jpem-2015-0187>
- Lasson, A., Stotzer, P.-O., Öhman, L., Isaksson, S., Sapnara, M., Strid, H., 2015. The intra-individual variability of faecal calprotectin: a prospective study in patients with active ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 9, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2014.06.002>
- Lasson, A., Stotzer, P.-O., Öhman, L., Isaksson, S., Sapnara, M., Strid, H., 2014. The intra-individual variability of faecal calprotectin: A prospective study in patients with active ulcerative colitis. *Journal of Crohn's and Colitis* S1873994614001858. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2014.06.002>
- Lehmann, B., Querings, K., Reichrath, J., 2004. Neue Aspekte zur Bedeutung des Vitamin-D3-Stoffwechsels in der Haut. *Hautarzt* 55, 446–452. <https://doi.org/10.1007/s00105-004-0727-2>
- Levine, A., Wine, E., Assa, A., Sigall Boneh, R., Shaoul, R., Kori, M., Cohen, S., Peleg, S., Shamaly, H., On, A., Millman, P., Abramas, L., Ziv-Baran, T., Grant, S., Abitbol, G., Dunn, K.A., Bielawski, J.P., Van Limbergen, J., 2019. Crohn's Disease Exclusion Diet Plus Partial Enteral Nutrition Induces Sustained Remission in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* 157, 440-450.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.04.021>
- Li, J., Chen, N., Wang, D., Zhang, J., Gong, X., 2018. Efficacy of vitamin D in treatment of inflammatory bowel disease. *Medicine (Baltimore)* 97. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012662>
- Lim, K., Thadhani, R., 2020. Vitamin D Toxicity. *J Bras Nefrol* 42, 238–244. <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2019-0192>

- Lin, J.-F., Chen, J.-M., Zuo, J.-H., Yu, A., Xiao, Z.-J., Deng, F.-H., Nie, B., Jiang, B., 2014. Meta-analysis: Fecal Calprotectin for Assessment of Inflammatory Bowel Disease Activity. *Inflammatory Bowel Diseases* 20, 1407–1415. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000057>
- Liu, T., Wang, C., Wang, Y., Wang, L., Ojo, O., Feng, Q., Jiang, X., Wang, X.-H., n.d. Effect of dietary fiber on gut barrier function, gut microbiota, short-chain fatty acids, inflammation, and clinical outcomes in critically ill patients: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* n/a. <https://doi.org/10.1002/jpen.2319>
- Liu, X., Baylin, A., Levy, P.D., 2018. Vitamin D deficiency and insufficiency among US adults: prevalence, predictors and clinical implications. *British Journal of Nutrition* 119, 928–936. <https://doi.org/10.1017/S0007114518000491>
- López-Muñoz, P., Beltrán, B., Sáez-González, E., Alba, A., Nos, P., Iborra, M., 2019. Influence of Vitamin D Deficiency on Inflammatory Markers and Clinical Disease Activity in IBD Patients. *Nutrients* 11. <https://doi.org/10.3390/nu11051059>
- Lu, Y., Li, X., Liu, S., Zhang, Y., Zhang, D., 2018. Toll-like Receptors and Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol* 9, 72. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00072>
- Luthold, R.V., Fernandes, G.R., Franco-de-Moraes, A.C., Folchetti, L.G.D., Ferreira, S.R.G., 2017. Gut microbiota interactions with the immunomodulatory role of vitamin D in normal individuals. *Metabolism* 69, 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.01.007>
- Macdonald, H.M., 2013. Contributions of Sunlight and Diet to Vitamin D Status. *Calcif Tissue Int* 92, 163–176. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9634-1>
- Maiden, L., Thjodleifsson, B., Theodors, A., Gonzalez, J., Bjarnason, I., 2005. A Quantitative Analysis of NSAID-Induced Small Bowel Pathology by Capsule Enteroscopy. *Gastroenterology* 128, 1172–1178. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.03.020>
- Makishima, M., Lu, T.T., Xie, W., Whitfield, G.K., Domoto, H., Evans, R.M., Haussler, M.R., Mangelsdorf, D.J., 2002. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 296, 1313–1316. <https://doi.org/10.1126/science.1070477>
- Manceau, H., Chicha-Cattoir, V., Puy, H., Peoc'h, K., 2017. Fecal calprotectin in inflammatory bowel diseases: update and perspectives. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 55, 474–483. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0522>
- Marwaha, R.K., Dabas, A., 2019. Interventions for Prevention and Control of Epidemic of Vitamin D Deficiency. *Indian J Pediatr* 86, 532–537. <https://doi.org/10.1007/s12098-019-02857-z>
- Marwaha, R.K., Mithal, A., Bhari, N., Sethuraman, G., Gupta, S., Shukla, M., Narang, A., Chadda, A., Gupta, N., Sreenivas, V., Ganie, M.A., 2018. Supplementation with Three Different Daily Doses of Vitamin D3 in Healthy Pre-pubertal School Girls: A Cluster Randomized Trial. *Indian Pediatr* 55, 951–956.
- Marwaha, R.K., Yenamandra, V.K., Ganie, M.A., Sethuraman, G., Sreenivas, V., Ramakrishnan, L., Mathur, S.K., Sharma, V.K., Mithal, A., 2016. Efficacy of micellized vs. fat-soluble vitamin D3 supplementation in healthy school children from

- Northern India. *J Pediatr Endocrinol Metab* 29, 1373–1377.
<https://doi.org/10.1515/jpem-2016-0191>
- Matsuo, T., Sairenchi, T., Iso, H., Irie, F., Tanaka, K., Fukasawa, N., Ota, H., Muto, T., 2008. Age- and Gender-specific BMI in Terms of the Lowest Mortality in Japanese General Population. *Obesity* 16, 2348–2355.
<https://doi.org/10.1038/oby.2008.342>
- Maurya, V.K., Aggarwal, M., 2017. Factors influencing the absorption of vitamin D in GIT: an overview. *J Food Sci Technol* 54, 3753–3765.
<https://doi.org/10.1007/s13197-017-2840-0>
- Mazzoleni, S., Magni, G., Toderini, D., 2019. Effect of vitamin D3 seasonal supplementation with 1500 IU/day in north Italian children (DINOS study). *Ital J Pediatr* 45, 18. <https://doi.org/10.1186/s13052-018-0590-x>
- McCully, M.L., Ladell, K., Andrews, R., Jones, R.E., Miners, K.L., Roger, L., Baird, D.M., Cameron, M.J., Jessop, Z.M., Whitaker, I.S., Davies, E.L., Price, D.A., Moser, B., 2018. CCR8 Expression Defines Tissue-Resident Memory T Cells in Human Skin. *J Immunol* 200, 1639–1650. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701377>
- Meling, T.R., Aabakken, L., Røseth, A., Osnes, M., 1996. Faecal Calprotectin Shedding after Short-Term Treatment with Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 31, 339–344.
<https://doi.org/10.3109/00365529609006407>
- Meyer, M.B., Goetsch, P.D., Pike, J.W., 2010. A Downstream Intergenic Cluster of Regulatory Enhancers Contributes to the Induction of CYP24A1 Expression by $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3*. *Journal of Biological Chemistry* 285, 15599–15610.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.119958>
- Mindemark, M., Larsson, A., 2012. Ruling out IBD: estimation of the possible economic effects of pre-endoscopic screening with F-calprotectin. *Clin Biochem* 45, 552–555. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.10.015>
- Miodovnik, M., Koren, R., Ziv, E., Ravid, A., 2012. The inflammatory response of keratinocytes and its modulation by vitamin D: the role of MAPK signaling pathways. *J Cell Physiol* 227, 2175–2183. <https://doi.org/10.1002/jcp.22951>
- Montalto, M., Curigliano, V., Santoro, L., Lombardi, M., Covino, M., Cammarota, G., Dalvai, S., D’Onofrio, F., Gasbarrini, A., Gasbarrini, G., 2006. Prophylactic aspirin therapy does not increase faecal calprotectin concentrations. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 18, 965–967.
<https://doi.org/10.1097/01.meg.0000230080.59135.e1>
- Motiani, K.K., Collado, M.C., Eskelinen, J.-J., Virtanen, K.A., Löyttyniemi, E., Salminen, S., Nuutila, P., Kalliokoski, K.K., Hannukainen, J.C., 2020. Exercise Training Modulates Gut Microbiota Profile and Improves Endotoxemia. *Med Sci Sports Exerc* 52, 94–104. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000002112>
- Moum, B., Jahnsen, J., Bernklev, T., 2010. Faecal calprotectin variability in Crohn’s disease. *Inflamm Bowel Dis* 16, 1091–1092. <https://doi.org/10.1002/ibd.21136>
- Naismith, G.D., Smith, L.A., Barry, S.J.E., Munro, J.I., Laird, S., Rankin, K., Morris, A.J., Winter, J.W., Gaya, D.R., 2013. A prospective single-centre evaluation of the in-

- tra-individual variability of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 37, 613–621.
<https://doi.org/10.1111/apt.12221>
- Nemere, I., Dormanen, M.C., Hammond, M.W., Okamura, W.H., Norman, A.W., 1994. Identification of a specific binding protein for 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia. *J Biol Chem* 269, 23750–23756.
- Öhlund, I., Lind, T., Hernell, O., Silfverdal, S.-A., Karlsland Åkeson, P., 2017. Increased vitamin D intake differentiated according to skin color is needed to meet requirements in young Swedish children during winter: a double-blind randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 106, 105–112.
<https://doi.org/10.3945/ajcn.116.147108>
- Ooi, J.H., Li, Y., Rogers, C.J., Cantorna, M.T., 2013. Vitamin D Regulates the Gut Microbiome and Protects Mice from Dextran Sodium Sulfate–Induced Colitis. *The Journal of Nutrition* 143, 1679–1686. <https://doi.org/10.3945/jn.113.180794>
- Park, S.Y., Kim, W.J., 2018. A Study of Fecal Calprotectin in Obese Children and Adults. *J Obes Metab Syndr* 27, 233–237. <https://doi.org/10.7570/jomes.2018.27.4.233>
- Pathirana, W.G.W., Chubb, S.P., Gillett, M.J., Vasikaran, S.D., 2018. Faecal Calprotectin. *Clin Biochem Rev* 39, 77–90.
- Poullis, A., Foster, R., Shetty, A., Fagerhol, M.K., Mendall, M.A., 2004. Bowel inflammation as measured by fecal calprotectin: a link between lifestyle factors and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 279–284.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-03-0160>
- Rabenberg, M., Scheidt-Nave, C., Busch, M.A., Rieckmann, N., Hintzpeter, B., Mensink, G.B.M., 2015. Vitamin D status among adults in Germany – results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *BMC Public Health* 15, 641. <https://doi.org/10.1186/s12889-015-2016-7>
- Ramagopalan, S.V., Heger, A., Berlanga, A.J., Maugeri, N.J., Lincoln, M.R., Burrell, A., Handunnetthi, L., Handel, A.E., Disanto, G., Orton, S.-M., Watson, C.T., Morahan, J.M., Giovannoni, G., Ponting, C.P., Ebers, G.C., Knight, J.C., 2010. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: Associations with disease and evolution. *Genome Res* 20, 1352–1360.
<https://doi.org/10.1101/gr.107920.110>
- Rehner, G., Daniel, H., 2010. Die Nährstoffe, in: Rehner, G., Daniel, H. (Eds.), *Biochemie der Ernährung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp. 217–274.
https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2217-0_4
- Rendek, Z., Falk, M., Grodzinsky, E., Wahlin, K., Kechagias, S., Svernlöv, R., Hjortswang, H., 2016. Effect of oral diclofenac intake on faecal calprotectin. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 51, 28–32.
<https://doi.org/10.3109/00365521.2015.1066421>
- Røseth, A.G., Fagerhol, M.K., Aadland, E., Schjønsby, H., 1992. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. *Scand J Gastroenterol* 27, 793–798. <https://doi.org/10.3109/00365529209011186>

- Røseth, A.G., Fagerhol, M.K., Aadland, E., Schjønby, H., 1992. Assessment of the Neutrophil Dominating Protein Calprotectin in Feces: A Methodologic Study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 27, 793–798.
<https://doi.org/10.3109/00365529209011186>
- Sasidharan Nair, V., Elkord, E., 2018. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: a focus on T-regulatory cells. *Immunol Cell Biol* 96, 21–33.
<https://doi.org/10.1111/imcb.1003>
- Schäffler, H., Herlemann, D.P., Klinitzke, P., Berlin, P., Kreikemeyer, B., Jaster, R., Lamprecht, G., 2018. Vitamin D administration leads to a shift of the intestinal bacterial composition in Crohn's disease patients, but not in healthy controls. *Journal of Digestive Diseases* 19, 225–234. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12591>
- Schreiner, P., Martinho-Grueber, M., Studerus, D., Vavricka, S.R., Tilg, H., Biedermann, L., für das Swiss IBDnet, eine offizielle A. der S.G. f G., 2020. Ernährung bei entzündlichen Darmerkrankungen. *KAI* 2, 96–103.
<https://doi.org/10.1159/000509482>
- Sloka, S., Silva, C., Wang, J., Yong, V.W., 2011. Predominance of Th2 polarization by Vitamin D through a STAT6-dependent mechanism. *J Neuroinflammation* 8, 56.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-56>
- Smecuol, E., Pinto Sanchez, M.I., Suarez, A., Argonz, J.E., Sugai, E., Vazquez, H., Litwin, N., Piazzuelo, E., Meddings, J.B., Bai, J.C., Lanás, A., 2009. Low-Dose Aspirin Affects the Small Bowel Mucosa: Results of a Pilot Study With a Multidimensional Assessment. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 7, 524–529.
<https://doi.org/10.1016/j.cgh.2008.12.019>
- Spahillari, A., Mukamal, K., DeFilippi, C., Kizer, J.R., Gottdiener, J.S., Djoussé, L., Lyles, M.F., Bartz, T.M., Murthy, V.L., Shah, R.V., 2016. The association of lean and fat mass with all-cause mortality in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 26, 1039–1047. <https://doi.org/10.1016/j.nu-mecd.2016.06.011>
- Stio, M., Retico, L., Annese, V., Bonanomi, A.G., 2016. Vitamin D regulates the tight-junction protein expression in active ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 51, 1193–1199. <https://doi.org/10.1080/00365521.2016.1185463>
- Talsness, C.E., Penders, J., Jansen, E.H.J.M., Damoiseaux, J., Thijs, C., Mommers, M., 2017. Influence of vitamin D on key bacterial taxa in infant microbiota in the KOALA Birth Cohort Study. *PLoS One* 12, e0188011.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188011>
- Tamanai-Shacoori, Z., Smida, I., Bousarghin, L., Loreal, O., Meuric, V., Fong, S.B., Bonnaure-Mallet, M., Jolivet-Gougeon, A., 2017. Roseburia spp.: a marker of health? *Future Microbiol* 12, 157–170. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0130>
- Tøn, H., Brandsnes, Ø., Dale, S., Holtlund, J., Skuibina, E., Schjønby, H., Johne, B., 2000. Improved assay for fecal calprotectin. *Clinica Chimica Acta* 292, 41–54.
[https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(99\)00206-5](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(99)00206-5)
- Trémezaygues, L., Reichrath, J., 2010. Zur Bedeutung des Vitamin-D-Stoffwechsels in der humanen Haut. *Hautarzt* 61, 478–486. <https://doi.org/10.1007/s00105-009-1893-z>

- van Erp, L.W., Roosenboom, B., Komdeur, P., Dijkstra-Heida, W., Wisse, J., Horjus Talabur Horje, C.S., Liem, C.S., van Cingel, R.E.H., Wahab, P.J., Groenen, M.J.M., 2021. Improvement of Fatigue and Quality of Life in Patients with Quiescent Inflammatory Bowel Disease Following a Personalized Exercise Program. *Dig Dis Sci* 66, 597–604. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06222-5>
- Velasco Rodríguez-Belvís, M., Viada Bris, J.F., Plata Fernández, C., García-Salido, A., Asensio Antón, J., Domínguez Ortega, G., Muñoz Codoceo, R.A., 2020. Normal fecal calprotectin levels in healthy children are higher than in adults and decrease with age. *Paediatr Child Health* 25, 286–292. <https://doi.org/10.1093/pch/pxz070>
- Verdam, F.J., Fuentes, S., de Jonge, C., Zoetendal, E.G., Erbil, R., Greve, J.W., Buurman, W.A., de Vos, W.M., Rensen, S.S., 2013. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. *Obesity (Silver Spring)* 21, E607-615. <https://doi.org/10.1002/oby.20466>
- Vitamin D Handbook, 1st ed, 2007. . John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470238165>
- Vitamin-D-Zufuhr und Vitamin-D-Status, 2019. . *Paediatr. Paedolog.* 54, 44–45. <https://doi.org/10.1007/s00608-019-0645-2>
- Wang, L., Wang, Z.T., Hu, J.J., Fan, R., Zhou, J., Zhong, J., 2014. Polymorphisms of the vitamin D receptor gene and the risk of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Genet Mol Res* 13, 2598–2610. <https://doi.org/10.4238/2014.April.8.2>
- Wang, T.-T., Nestel, F.P., Bourdeau, V., Nagai, Y., Wang, Q., Liao, J., Tavera-Mendoza, L., Lin, R., Hanrahan, J.W., Mader, S., White, J.H., 2004. Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression. *The Journal of Immunology* 173, 2909–2912. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.2909>
- Wortsman, J., Matsuoka, L.Y., Chen, T.C., Lu, Z., Holick, M.F., 2000. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 72, 690–693. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.3.690>
- Zhang, X.-F., Guan, X.-X., Tang, Y.-J., Sun, J.-F., Wang, X.-K., Wang, W.-D., Fan, J.-M., 2021. Clinical effects and gut microbiota changes of using probiotics, prebiotics or synbiotics in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Nutr* 60, 2855–2875. <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02503-5>
- Zhang, Y., Lu, R., Xia, Y., Zhou, D., Petrof, E., Claud, E.C., Sun, J., 2019. Lack of Vitamin D Receptor Leads to Hyperfunction of Claudin-2 in Intestinal Inflammatory Responses. *Inflammatory Bowel Diseases* 25, 97–110. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy292>