Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Immunologische Wirkung einer Einmalgabe von 100.000 I.E. Cholecalciferol (Vitamin D)“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Sophie Wylon

aus Köln

Datum der Promotion: 30.5.2015

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 1

Abstrakt / Abstract..... 2

1 EINLEITUNG 5

1.1 Physiologie und Stoffwechsel von Vitamin D 5

1.2 Mechanismen und Folgen des Vitamin D Mangels 8

1.3 Vitamin D in der Dermatologie 9

1.3.1 Vitamin D Mangel bei Allergien 11

1.3.2 Vitamin D Mangel bei Autoimmunerkrankungen..... 13

1.4 Vitamin D - vermittelte Wirkungen auf Immunzellen..... 13

1.4.1 Vitamin D - vermittelte Wirkungen auf B-Zellen..... 16

1.4.2 Vitamin D - vermittelte Wirkungen auf T-Zellen..... 16

1.5 Vitamin D Supplementierung..... 17

2 MATERIAL UND METHODEN 18

2.1 Studiendesign..... 18

2.1.1 Votum der Ethikkommission..... 19

2.1.2 Ein – und Ausschlusskriterien..... 19

2.1.3 Probanden und Untersuchungsmaterial 20

2.1.4 Randomisierung..... 21

2.1.5 Studienmedikation..... 21

2.2 Technische Geräte und Hilfsmittel..... 22

2.2.1 Chemikalien..... 23

2.2.2 Antikörper..... 24

2.2.3 Software..... 25

2.3 Labormethoden 25

2.3.1 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen 25

2.3.2 Zellzahlbestimmung 26

2.3.3 Färben von Oberflächenantigenen..... 27

2.3.4 Durchflusszytometrische Messungen 28

2.3.5 Absolute Zellzahl Messung..... 30

2.3.6 FACS Analyse und Datendarstellung..... 30

2.3.6.1 Gating-Strategie……..……31
2.3.7 25-Hydroxyvitamin D Messung……...34
2.3.7.1 Referenzwerte……..…34
2.4 Datenauswertung und statistische Methoden ……35

3 ERGEBNISSE.....36

3.1 Studienpopulation und statistische Vergleiche……...36
3.2 Sicherheit……...38
3.3 Verträglichkeit ……..41
3.4 Pharmakokinetische Analysen……..…42
3.5 Einfluss auf den B-Lymphozyten Phänotyp……45
3.6 Anteil im Blut zirkulierender Vitamin D-sensitiver $CD38^+$ B-Lymphozyten…..47
3.7 Einfluss auf den T-Lymphozyten Phänotyp……..…50
3.8 Einfluss auf den Monozyten Phänotyp……..52
3.9 Analyse der virusspezifischen humoralen IgG Antwort ……..……52
3.10 Einfluss des UV- Index auf die 25-(OH) Vitamin D Serumkonzentration…..54

4 DISKUSSION……56

4.1 Studienpopulation ……56
4.2 Sicherheit ……..57
4.3 Verträglichkeit ……..…57
4.4 Vitamin D Pharmakokinetik ……58
4.5 Vitamin D - vermittelte Wirkung auf Immunzellen ……..…60
4.6 Veränderungen der virusspezifischen humoralen IgG Antwort……64
4.7 Einfluss des UV - Index auf die 25-(OH) Vitamin D Serumkonzentration…..64
4.8 Zukünftige Anwendung ……...65

5 LITERATURVERZEICHNIS 67

6 TABELLARISCHER ANHANG 72

7 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG 89

8 LEBENSLAUF.....90

9 PUBLIKATIONSLISTE 91

10 DANKSAGUNG.....92

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin -Cy7 Konjugat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation (Unterscheidungsgruppen)
DU/ml	DRG Units = DU, DRG Diagnostics GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen (Klasse-II-Antigen)
HWZ	Halbwertszeit
I.E.	Internationale Einheiten
i.m.	intramuskulär
ml	Milliliter
nm	Nanometer
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrobilin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7 Konjugat
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a-Proteinkomplex
s.c	subkutan
VD	Vitamin D / Cholecalciferol
VDR	Vitamin D Rezeptor
VioBlu	Violet-Blue
vs.	versus
UVB	Ultraviolett B
µL	Mikroliter

ABSTRAKT

HINTERGRUND:

Vitamin D ist ein pleiotrop wirksames Hormon. Die physiologische Wirkung von Vitamin D ist die Aufrechterhaltung des Calcium-Phosphat Stoffwechsels. Daneben ist Vitamin D immunologisch wirksam und aktuelle Studien weisen darauf hin, dass Autoimmunerkrankungen mit einer Vitamin D-Defizienz assoziiert sind. Die vorliegende klinisch wissenschaftliche Untersuchung sollte die Frage klären, ob und in welchem Ausmaß eine einmalige Cholecalciferol Gabe mit 100.000 I.E. (intramuskulär vs. subkutan) zu einem Anstieg des 25-Hydroxyvitamin D Serumspiegels führt und ob sich assoziiert bestimmte immunologische Veränderungen (CD38 Expression, Frequenzen peripherer Blutzellen und humorale Immunparameter) nachweisen lassen.

METHODEN:

40 Vitamin D-defiziente Probanden erhielten randomisiert placebokontrolliert eine einmalige intramuskuläre oder subkutane Injektion mit Cholecalciferol (100.000 I.E.). Die zellulären Untersuchungen erfolgten mittels durchflusszytometrischer Analyse zu 4 verschiedenen Zeitpunkten (vor, 1 Woche nach, 1 Monat und 3 Monate nach Gabe). Eine Elektrochemilumineszenz-Immunoassay-Messung wurde zur Bestimmung des 25-Hydroxyvitamin D Serumspiegels durchgeführt. Mit Hilfe eines enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) wurde die Stabilität der humoralen Immunantwort gegen Epstein-Barr-Virus -, Cytomegalovirus -, und Varizella-Zoster-Antigen vor (Tag 0) und nach (Tag 28) der Vitamin D Supplementierung gemessen.

ERGEBNISSE:

Nach Vitamin D-Gabe stieg der 25-Hydroxyvitamin D Serumspiegel im Durchschnitt in der intramuskulär-verabreichten Verumgruppe um 40,0 nmol/l ± 20,8 nmol/l ($p < 0,03$) (Range: 28,6 nmol/l bis 100,9 nmol/l), in der subkutan-verabreicheten Verumgruppe 44,2 nmol/l ± 16,9 nmol/l ($p < 0,02$) (Range: 43,4 nmol/l bis 110,6 nmol/l) und in der Vergleichsgruppe um 0,6 nmol/l ± 9,11 nmol/l (Range: 16,6 nmol/l bis 42,2 nmol/l) an. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte einen signifikanten Anstieg von CD38+ Plasmazellen im peripheren Blut. Andere Immunzellen wie B- und T-Lymphozyten sowie Monozyten zeigten keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Frequenz mittels durchflusszytometrischer Analyse nach Gabe von Vitamin D. Die Sicherheitsparameter (Calcium und Phosphat) blieben während der Studie im physiologischen Bereich. Die IgG Serumkonzentrationen der Epstein-Barr-

Virus -, Cytomegalovirus -, und Varizella-Zoster Virus Antigene veränderten sich nicht nach Cholecalciferol Gabe.

SCHLUSSFOLGERUNG:

Der 25-Hydroxyvitamin D Serumspiegel stieg signifikant nach einmaliger Gabe von 100.000 I.E. Cholecalciferol an. Im Gruppenvergleich intramuskulärer und subkutaner Verabreichung von Vitamin D zeigten sich im Verlauf keine signifikanten Unterschiede. CD38+ Plasmazellen sind vermehrt im peripheren Blut nach Vitamin D Gabe nachweisbar, korrelieren jedoch nicht mit dem Vitamin D-Serumwert.

ABSTRACT

BACKGROUND/OBJECTIVES:

Vitamin D is a pleiotropic hormone. Its physiological role is the maintenance of the calcium-phosphate homeostasis. It mediates immune modulatory functions and recent clinical studies show that its deficiency is associated with an increased prevalence of autoimmune diseases. This clinical study is designed to obtain pharmacokinetics of vitamin D serum levels after a single dose of 100.000 I.U. cholecalciferol (intramuscular vs. subcutaneous) and to determine the impact of vitamin D on peripheral blood populations and antibody levels against common antigens.

SUBJECTS/METHODS:

40 vitamin D deficient individuals were randomized in a placebo controlled, double-blind setting and received an intramuscular or subcutaneous injection with cholecalciferol (100.000 I.U.) Immunomonitoring by fluorescence-activated cell sorting (FACS) was performed at 4 different time points throughout the pilot study (before, 1 week after, 1 month after and 3 months after the injection). 25-hydroxyvitamin D serum concentration was measured with an electrochemiluminescence -immunoassay. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to monitor the humoral immune response against Epstein-Barr-virus -, Cytomegalovirus -, and Varizella-Zoster-antigen before (day0) and after (day 28) vitamin D supplementation.

RESULTS:

Vitamin D supplementation increased the 25-hydroxyvitamin D serum concentration on average in the intramuscular-treated group to 40,0 nmol/l ± 20,8 nmol/l ($p < 0,03$)

(range: 28,6 nmol/l to 100,9 nmol/l) and in the subcutaneous-treated group to 44,2 nmol/l ± 16,9 nmol/l ($p < 0,02$) (range: 43,4 nmol/l to 110,6 nmol/l) whereas in the placebo group the levels remained low (0,6 nmol/l ± 9,11 nmol/l, range: 16,6 nmol/l bis 42,2 nmol/l). The increase of the 25-hydroxyvitamin D levels did not correlate with the increase of CD38 expression on B-cells but CD38+ plasma cells increased significantly one month after vitamin D supplementation.

Other immune cells like B – and T- lymphocytes and monocytes did not show significant alterations after vitamin D supplementation. Safety laboratory serum concentrations of calcium and phosphate were in the physiological range throughout the study. Antibody serum levels (IgG) to Epstein-Barr-virus -, Cytomegalovirus -, and Varizella-Zoster remained stable after cholecalciferol administration.

CONCLUSIONS:

25-hydroxyvitamin D serum concentration increased significantly after Vitamin D supplementation. There was no significant difference between the serum levels of the Vitamin D treated groups (intramuscular vs. subcutaneous). Immunomonitoring suggests peripheral CD38+ plasma cell induction by cholecalciferol.

1 EINLEITUNG

Calcitriol (1,25-Dihydroxyvitamin D3) ist die aktive Form des Vitamin D und reguliert die Kalzium- und Phosphat-Homöostase. Neben den Wirkungen auf den Knochenstoffwechsel, sind der Einfluss auf die Immunantwort sowie die Reifung und Differenzierung von Zellen bekannt[1]. Es wird ein Zusammenhang zwischen der Vitamin D - Defizienz und der Entstehung immunologischer und granulomatöser Erkrankungen, Karzinomen, neurologischen und Herzkreislauf Krankheiten und eine allgemein erhöhte Mortalität, vermutet[2].

1923 erfolgte die erste Charakterisierung des Vitamin D durch die britischen Wissenschaftler Goldblatt und Soames, die rachitische Ratten durch UV-Bestrahlung heilten[3]. Den Grundstein für die Entdeckung des Vitamin D legte Glisson in der Mitte des 17.Jahrhunderts, der die Rachitis erstmals beschrieb. Die immunregulatorische Funktion des Vitamin D ist noch relativ unbekannt und in den letzten drei Dekaden Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung[4].

In dieser Arbeit wird die Bestimmung des Anteils von Vitamin D-reagierenden Zellen (CD38+B-Zellen) im Blut im vorher-nachher Vergleich nach einmaliger intramuskulärer sowie subkutaner Applikation bei Probanden mit Vitamin D Mangel untersucht. Diese klinisch wissenschaftliche Untersuchung sollte darüber hinaus die Frage klären, ob sich bestimmte immunologische Parameter nach Vitamin D Gabe verändert nachweisen lassen. Diese beinhalten die Häufigkeit und Zellcharakteristik zirkulierender peripherer mononukleärer Zellen im Blut und IgG-Antikörper Konzentrationen gegenüber viraler Antigene.

1.1 Physiologie und Stoffwechsel von Vitamin

Vitamin D ist ein wichtiger Regulator des Kalzium – und Phosphatmetabolismus und somit des Knochenstoffwechsels. Sinkt der Kalziumwert im Serum, wird aus der inaktiven Vorstufe des Vitamin D das physiologisch aktive 1,25-Vitamin D (Calcitriol) umgewandelt [5].

1,25-Vitamin D fördert gemeinsam mit Parathormon (PTH) die Freisetzung von Kalzium aus Osteozyten sowie die Induktion der Kalziumresorption aus dem

Duodenum. Die PTH-Sekretionsrate wird in Abhängigkeit von der Serum-Kalzium-Konzentration durch eine negative Rückkopplung reguliert. Die maximale PTH-Sekretionsrate wird bei einer ionisiertem Serum-Kalzium-Konzentration von 1 mmol/l erreicht, ein Anstieg führt zu keiner weiteren Senkung der PTH-Sekretionsrate, somit wird die basale Sekretionsaktivität eingeschaltet [6].

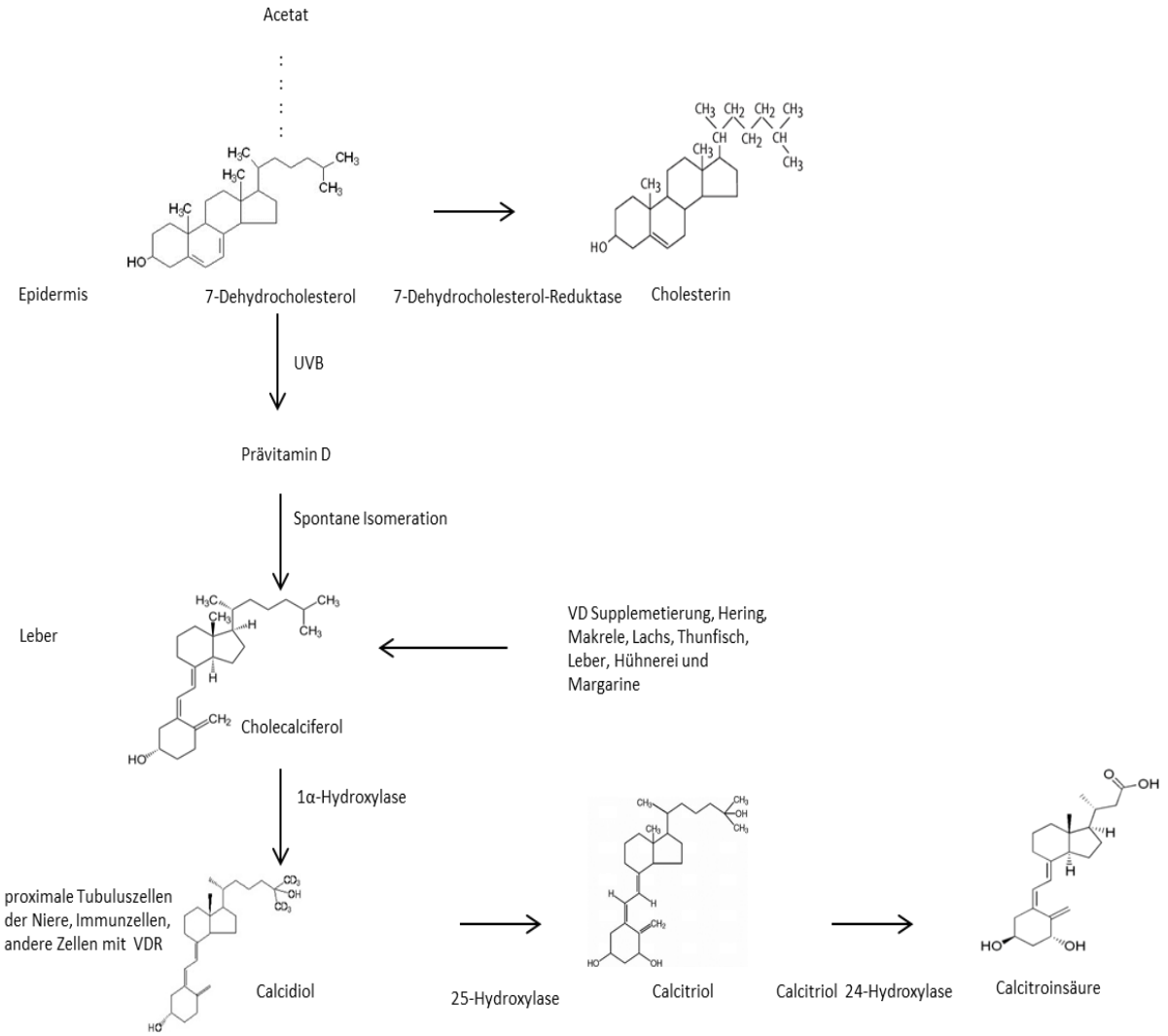

Abbildung 1. Vitamin D Metabolismus. Vitamin D wird in der Epidermis durch die photolytische Spaltung von 7-Dehydrocholesterol nach der Absorption von UVB-Strahlung synthetisiert oder nach Nahrungsaufnahme im Dünndarm resorbiert und über die Lymphe abgegeben.
Vitamin D wird mit Hilfe dem Vitamin D-bindenden-Protein zur Leber transportiert. Dort wird es zu Calcidiol (25-Hydroxyvitamin D) durch die 25-Hydroxylase (CYP27A1) metabolisiert und anschließend hautsächlich in der Niere durch die 1α-Hydroxylierung zur biologisch aktiven Form Calcitriol (1,25-Dihydroxyvitamin D) umgewandelt. Die Inaktivierung wird durch das Enzym 24-hydroxylase (CYP24A1) katalysiert[7].

Der erste Syntheseschritt des Vitamin D beginnt mit der Katalyse von Cholesterin in der Leber durch das Enzym 7-Dehydrocholesterol Dehydrogenase[8]. Bei dieser enzymatischen Reaktion entsteht das kutane Substrat für die Synthese von Cholecalciferol (Vitamin D3).

Die Erstbeschreibung von 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) erfolgte durch den deutschen Chemie Nobelpreisträger Adolf Windaus im Jahre 1928 in seiner Arbeit „Studien der Zusammensetzung von Sterolen und die Verbindung mit Vitaminen“[9]. Er entdeckte das Ergosterin, das von Pflanzen und Pilzen produziert wird. Es ist eine Vorstufe des Ergocalciferol (Vitamin D2), das zur aktiven Form des Vitamin D die gleichen Syntheseschritte wie das Calcitriol (1,25-Dihydroxyvitamin D3) durchläuft.

7-DHC wird durch Photolyse mit Ultraviolettstrahlung der Wellenlängen 290-315 nm im Stratum spinosum sowie im Stratum basale der Haut zunächst in Prävitamin D umgewandelt [10].

Wird das 7-DHC mit mindestens 18 mJ/cm² bestrahlt, wird durch eine fotochemisch induzierte 6-Elektronen-konrotatorische elektrozyklische Reaktion der B-Ring aufgebrochen und durch thermische Isomerisierung weiter in die inaktive Speicherform überführt, dessen Serumkonzentration der optimale Marker für den Vitamin D Status darstellt [11]. Alternativ wird während der Nahrungsaufnahme Vitamin D im Dünndarm resorbiert und über die Lymphe abgegeben. Das biologisch inaktive Vitamin D wird mit Hilfe dem Vitamin D-Bindungsprotein (DBP), das eine hohe Affinität zu den Vitamin D-Metaboliten aufweist (>99% gebunden), über das Plasma in die Hepatozyten transportiert [12]. Vitamin D-Bindungsproteine sind Polypeptide (α-Globuline, ca. 58 kDa), die als Transporterproteine und Kurzzeitspeicher des Vitamin D wirken. Der Langzeitspeicher von Vitamin D ist das Fettgewebe[13]. In den Hepatozyten wird das Vitamin D von dem mikrosomalen Enzym 25-Hydroxylase (CYP27A1, CYP2R1) zu Calcidiol hydroxyliert[14].

Eine zweite Hydroxylierung erfolgt durch die Umwandlung zum Steroidhormon Calcitriol mit Hilfe des transkriptionell regulierten Enzyms 1α-Hydroxylase (CYP27B1) in der C-1-Position. Calcitriol ist ein biologisch aktiver Vitamin D Metabolit, das von M.F. Holick identifiziert wurde[15]. Es reguliert nach Bindung an den nukleären Vitamin D Rezeptor (VDR) die Aktivierung spezifischer Zielgene. Durch eine Veränderung der Transkription werden verschiedene hormonsensitive Gene induziert oder gehemmt[16]. Calcitriol inhibiert die Synthese von Parathormon, die Proliferation der Glandulae parathyroideae und reguliert die renalen Kalzium – und Phosphatexkretion über den gesamten Tubulusapparat. Die Degradierung und somit Inaktivierung von

Calcitriol erfolgt durch das mitochondriale Enzym CYP24A1, das mit Hilfe der 24-Hydroxylierung die Seitenkette zu Calcitroinsäure katalysiert. Dieser wasserlösliche, physiologisch inaktive Vitamin D Metabolit wird über die Galle sowie den Urin ausgeschieden[17].

1.2 Mechanismen und Folgen des Vitamin D Mangels

Die zentralen Mechanismen eines Vitamin D Mangels sind die fehlende Zufuhr in der Nahrung oder mangelnde UV-B Bestrahlung der Haut. Mit zunehmendem Alter nimmt die Synthese des Vitamin D durch die Haut ab. Besonders bei Frauen im Klimakterium liegt nach der Hormonumstellung des Körpers oftmals ein Vitamin D Mangel vor[18]. Darüber hinaus wurden sehr niedrige Vitamin D Serumwerte bei Altersheimbewohnern gefunden[19]. Den Körper vollständig bedeckende Kleidung und Bekleidungsgewohnheiten, können trotz einer hohen UV Einstrahlung zu einer Defizienz führen. Eine starke melanozytäre Pigmentierung der Haut schützt die Epidermis vor UV Licht. Daher haben dunklere Hauttypen einen natürlichen Sonnenschutz sowie eine herabgesetzte durch UV- induzierte Vitamin D Synthese, aber normale oder sogar erhöhte Calcitriol Plasmaspiegel[20]. Ein anderer Faktor ist die Sequestrierung und Bioverfügbarkeit des Vitamin D bei adipösen Individuen. Das endogen und auch exogen aufgenommene Vitamin D wird in den Adipozyten gespeichert und nicht wie gewohnt mobilisiert, daher haben übergewichtige Patienten häufiger einen Vitamin D Mangel[21]. Zudem ist bekannt, dass jahreszeitliche Unterschiede und die geographische Lage des Lebensraumes einen Vitamin D Mangel fördern können[22].

Tabelle 1.2. Mögliche Mechanismen einer Vitamin D Defizienz nach Holick[22]

FAKTOR	**TRIGGER**
Reduzierte Synthese in der Haut	Alter, Lichtschutz, geringer UV Index
Verminderte Bioverfügbarkeit	Malabsorption, Adipositas (BMI > 30)
Erhöhter Vitamin D-Abbau	Medikamente z.B: Antikonvulsiva, Glukokortikoide

Reduzierte Absorption	Mukoviszidose, Zöliakie, Morbus Crohn, Magen-Bypass, Cholersterol-senkende Medikamente
Gesteigerter Katabolismus	Antikonvulsivum sowie Glukokortikoid Einnahme
Verminderte Calcitriol Synthese	Niereninsuffizienz
Erbkrankheiten	Pseudovitamin D-Mangel-Rachitis, Vitamin D - abhängige Rachitis Typ 3, Autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis, X-chromosomal assoziierte hypophosphatämische Rachitis
Erworbene Krankheiten	Tumorinduzierte Osteomalazie, primärer Hyperparathyreoidismus, granulomatöse Erkrankungen (Sarkoidose, Tuberkulose, einige Lymphome), Hyperthyreose
Stillen	ohne Vitamin D Supplementierung
Verminderte Calcidiol Synthese	Leberinsuffizienz

Die Folgen einer reduzierten Vitamin D Aufnahme sind komplex. Eine Supplementierung oder Prophylaxe ist zu empfehlen, da in der Literatur zunehmend Vitamin D - assoziierte Morbiditäten wie Rachitis[23], rheumatoide Arthritis[24], kutaner Lupus erythematodes[25], allergisches Asthma[26], atopische Dermatitis[27], kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes mellitus[28], maligne Erkrankungen[29] sowie neurologische Erkrankungen[30] beschrieben werden.

1.3 Vitamin D in der Dermatologie

In der Haut werden 80% des Vitamin D synthetisiert. Es verfügt über die Fähigkeit mit Hilfe eines photochemischen Prozesses aktives Calcitriol zu bilden. Einerseits ist das UV-B Licht für die Vitamin D Produktion in der Haut verantwortlich und

andererseits spielt UV-B Licht eine wichtige Rolle bei der Entstehung von malignen Hauterkrankungen und Photoaging (Hautalterung).

Niels Finsen erhielt 1903 den Nobelpreis der Medizin für seine Arbeiten zur UV-Bestrahlung und der konsekutiven Erhöhung des Vitamin D-Spiegels bei Patienten mit Lupus vulgaris, der durch den Erreger M. tuberculosis übertragen wird [31].

Daraufhin wurde eine Vielzahl von Studien über die Effekte des Vitamin D auf die Haut durchgeführt. Doch erst die Entdeckung des VDR in der Epidermis und anderen Organen durch die Injektion radioaktiven Calcidiol bei Mäusen trieb die Forschung voran[32]. Nicht nur der VDR, sondern auch beide Schlüsselenzyme der Vitamin D Aktivierung sind in der Epidermis vorhanden[33]. In den Keratinozyten fördert lokal produziertes Calcidiol die Differenzierung und hemmt oder induziert ihre Proliferation konzentrationsabhängig. VDR Expression tritt nur bei proliferierenden Zellen auf, daher ist im Stratum basale der VDR innerhalb der Epidermis am stärksten exprimiert. Die Variabilität der VDR Expression basiert auf der Proliferation und dem Differenzierungsstatus der Keratinozyten sowie der lokalen Zytokin Produktion[34]. Es ist anzunehmen, dass der Vitamin D Metabolismus im Sinne einer lokalen Immunmodulation positive Effekte bei Psoriasis vulgaris entwickeln kann[34].

Etwa 2% der Weltbevölkerung leiden an einer Psoriasis vulgaris. Sie ist durch eine verminderte Keratinozyten-Differenzierung, der Förderung der Proliferation unreifer Keratinozyten, einer T-Lymphozytenproliferation, der Sekretion proinflammatorischer Zytokine und der Migration neutrophiler Granulozyten in die Haut charakterisiert.

Das Vitamin D Derivat Calcipotriol ist ein entzündungshemmendes Molekül und wird im Rahmen der topischen Therapie der Psoriasis zur Hemmung dieser Zellprozesse eingesetzt[35].

Auch die Morphea (zirkumskripte Sklerodermie) ist eine entzündliche Hauterkrankung, allerdings des Bindegewebes. Klinisch ist sie durch eine Verdickung und Verhärtung der Haut gekennzeichnet. Die Ätiologie ist unbekannt. In einer experimentellen Studie wurde ein langanhaltender Rückgang der Läsionen nach Anwendung von topisch applizierten synthetischen Calcipotriol ohne Auftreten von Nebenwirkungen beobachtet[36]. Es wird diskutiert, dass Calcipotriol der pathologischen Hyperproliferation von Kollagen und Fibroblasten bei der Morphea entgegenwirkt, aktivierte T-Lymphozyten hemmt und somit T-Zell Infiltration verhindert[36].

Die Vitiligo ist eine Hautkrankheit unbekannter Genese, ihr liegt eine erworbene Depigmentierung der hereditären Hautfarbe zugrunde, die durch einen Untergang

der Melanozyten in der Haut und den Schleimhäuten entsteht. Es wird eine biochemische oder autoimmunologische Pathogenese diskutiert. Eine erbliche Disposition der Erkrankung besteht bei ca. 35% der Patienten. Es wurde gezeigt, dass zur Behandlung der Vitiligo Vitamin D Derivate und eine topische Dermatotherapie mit Glukokortikosteroiden einen synergistischen Effekt erzeugen können[37].

Ein weiteres potenzielles Vitamin D-responsives Krankheitsbild der Dermatologie ist die Alopecia areata, die durch kreisförmigen, lokal begrenzten krankhaften Haarausfall charakterisiert ist. In ersten Beschreibungen von Hippocrates wurde die Alopecia areata in Anlehnung an eine Fuchskrankheit, bei der das Fell fleckenförmig ausfiel, benannt. Eine Kasuistik berichtet über einen 7-jährigen Jungen mit einer reduzierten VDR Expression und daraus resultierender Alopecia areata, der mit topischem Calcipotriol behandelt wurde, zeigte völlige Abheilung des Hautbefundes[38].

Eine retrospektive Studie von 2010 zum therapeutischen Potential von Calcipotriol aus den USA zeigt, dass dies noch nicht ausgeschöpft ist und zukünftig eine größere Bedeutung bei der Therapie von dermatologischen Krankheitsbildern haben könnte[39].

Auch in anderen Bereichen der Dermatologie z.B. der Allergologie und der Autoimmunologie ist beschrieben, dass Vitamin D-vermittelte Wirkungen einen Einfluss auf die Entstehung und / oder den Verlauf verschiedener Krankheitsbilder haben kann[40].

1.3.1 Vitamin D Mangel bei Allergien

Eine Allergie ist eine überschießende Abwehrreaktion des Immunsystems auf harmlose Umwelteinflüsse. Häufige Erkrankungen des allergischen Formenkreises sind die allergische Rhinitis, die allergische Konjunktivitis, das Asthma bronchiale und die atopische Dermatitis[41].

Beim Asthma bronchiale findet sich pathogenetisch eine vermehrte Aktivität der T-Helfer-Lymphozyten (Th2-Zellen), die die IgE Produktion induzieren und eine eosinophile Atemwegs-Inflammation und Hyperaktivität hervorrufen. Bei einer

Exazerbation wird Il-17A freigesetzt, dessen Produktion durch Vitamin D gehemmt wird und dadurch die Symptome reduzieren kann[42].

Bereits während der Entwicklung des Menschen fördert Vitamin D *in utero* die Reifung und das Wachstum der Lunge des Föten. Postnatal hat der adäquate Vitamin D Status einen Einfluss auf die Entwicklung des Immunsystems, vornehmlich auf die Entwicklung von T-regulatorischen und dendritischen Zellen sowie die Suppression der IL-17 Produktion[40]. Auch ist bekannt, dass Vitamin D das angeborene Immunsystem beeinflusst; so hemmt es beispielsweise die initiale Inflammation nach einer RSV Infektion[40].

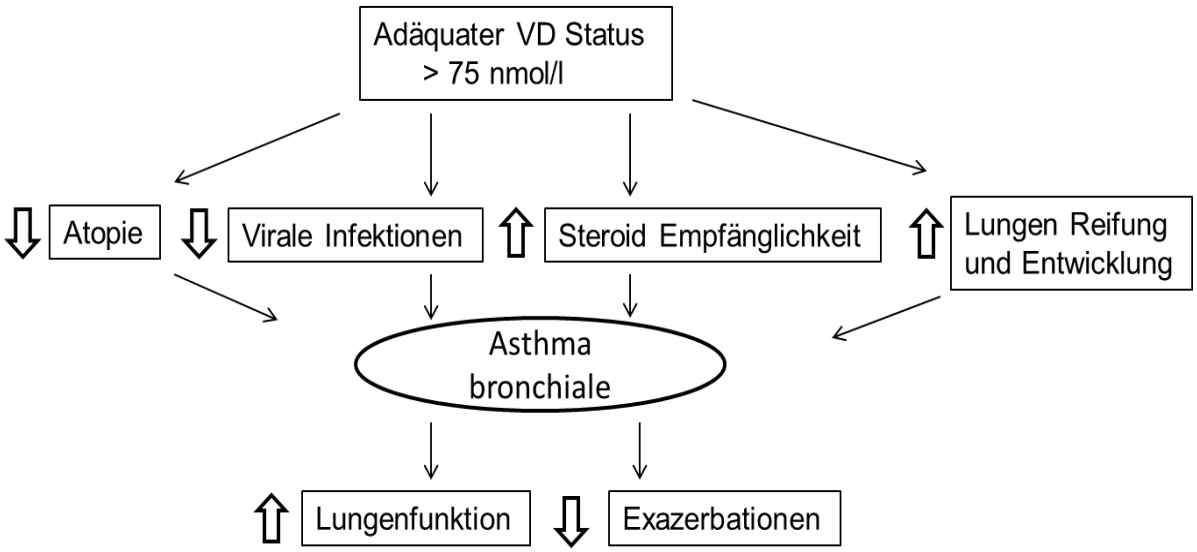

Abbildung 2. Potenziell protektive Mechanismen eines adäquaten Vitamin D Spiegels am Beispiel des Asthma bronchiale. Ein normwertiger 25-Hydroxyvitamin D Serumwert wirkt sich positiv auf die Entzündung, Reifung sowie Entwicklung der Lunge aus und kann in einer gesteigerten Steroid Empfänglichkeit und Lungenfunktion resultieren, die die Exazerbationsrate eines Asthmas bronchiale reduzieren kann[40].

Studien zeigen, dass Kinder mit Asthma bronchiale, allergischer Rhinitis, atopischer Dermatitis, akuter Urtikaria und Nahrungsmittelallergien eine Vitamin D-Defizienz aufwiesen[43]. Auch korrelieren die IgE-Werte asthmatischer Kinder mit einem reduzierten 25-Hydroxyvitamin D Serumspiegel[43].

1.3.2 Vitamin D Mangel bei Autoimmunerkrankungen

Der Mechanismus der Vitamin D Wirkung auf die Entstehung und das Fortschreiten einer Autoimmunerkrankung wird durch Umwelteinflüsse auf das Immunsystem beeinflusst. Aktuelle Studien legen nahe, dass Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I, multiple Sklerose, systemischer Lupus erythematodes sowie rheumatoide Arthritis mit einer Vitamin D-Defizienz assoziiert zu sein scheinen[44].
Calcitriol reguliert die Reifung dendritischer Zellen und die Differenzierung und Aktivität der CD4+ T-Zellen, um dem Verlust der Auto-Antigen-Toleranz entgegenzuwirken. Genetisch prädispositionierte Individuen mit einer Vitamin D-Defizienz besitzen die Tendenz einer Auto-Antikörper-Entwicklung. Um diesen circulus vitosus zu durchbrechen ist eine adäquate Vitamin D Supplementierung indiziert[44].

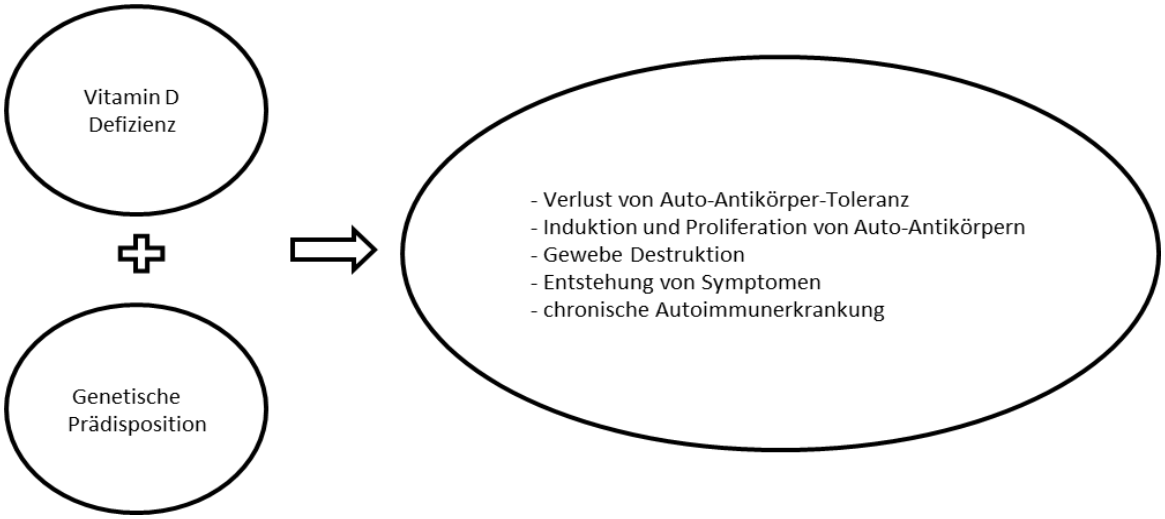

Abbildung 3. Hypothese zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen modifiziert nach[44]. Vitamin D-Defizienz in Kombination mit einer genetischen Prädisposition kann das Auftreten von Autoimmunerkrankungen begünstigen.

1.4 Vitamin D - vermittelte Wirkungen auf Immunzellen

Bereits 1986 belegten Rook et al. erstmals den Einfluss von Vitamin D auf das angeborene Immunsystem; die Zugabe von Calcitriol steigerte die antimikrobielle Aktivität humaner Makrophagen gegenüber Mycobacterium tuberculosis[45].

Erst im Jahre 2006 wurde durch Liu und Kollegen erstmalig ein Mechanismus beschrieben, der den Effekt von Vitamin D gegenüber Mycobacterium tuberculosis erklärt. So wurde die Aktivierung des Toll-like-Rezeptor 2 über Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) des Tuberkulose-Erregers gezeigt werden. Über das Enzym CYP27B1 kann Calcitriol gebildet werden und nach VDR-Aktivierung das antimikrobiell-wirksame Peptid Cathelicidin induzieren[46]. Dementsprechend bilden Makrophagen, wenn sie in einer Zellkultur mit Tuberkulosebakterien inkubiert werden, vermehrt Calcitriol. Das aktive Vitamin D induziert die Bildung von Cathelicidin, das Tuberkulosebakterien und andere Erreger abtöten kann[46]. Dies könnte erklären, warum Menschen mit einem Vitamin D Mangel anfälliger für bakterielle Erkrankungen wie die Tuberkulose sind. Auch virale Expositionen können besser von Personen mit ausreichenden Vitamin D Speicher abgewehrt werden[47]. Der saisonale Vitamin D Mangel durch ungenügende UV- Einstrahlung in den Wintermonaten begünstigt möglicherweise das Auftreten von Grippeepidemien in der kalten Jahreszeit[47].

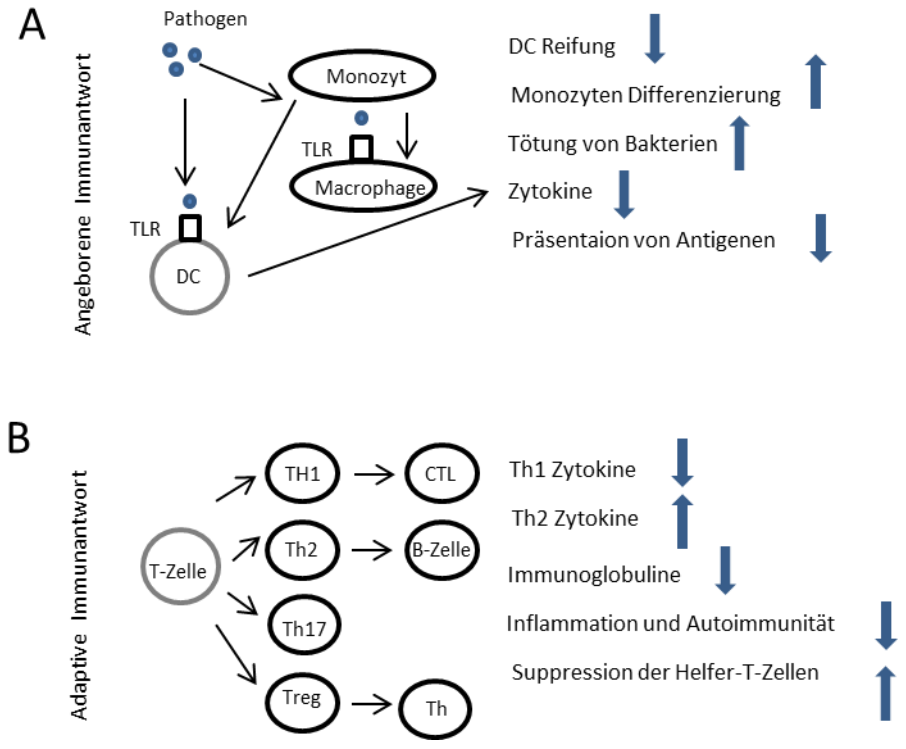

Abbildung 4. Vitamin D - vermittelte Wirkung auf das angeborene (A) und adaptive Immunsystem (B)[48]. Schematische Darstellung der Vitamin D-vermittelten immunologischen Wirkung[48]. Abkürzungen: DC = dendritische Zelle, CTL = cytotoxische T-Zelle.
(*A*) Vitamin D inhibiert die Produktion und die Proliferation von Th1 und Th0 Zellen, die Zytokin-Produktion wird gesenkt (IL-2, IFNγ, and TNFα). Vitamin D induziert die Produktion von T regulatorischen Zellen, das das tolerogene Zytokin Interleukin (IL)-10 produziert.
(*B*) Vitamin D induziert Th2-Zellen, die vermehrt IL-4, IL-5, und IL-10 produzieren. Vitamin D hemmt die Th17-Immunantwort und somit die IL-17 sowie IL-6 and IL-23 Ausschüttung.

Vitamin D hat eine Bedeutung bei immunologischen Prozessen. Es wurde gezeigt, dass der VDR unter anderen auch von B-Zellen, T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird. Diese Zellen haben das Potenzial biologisch aktives Calcitriol aus dem Vitamin D Präkursor zu synthetisieren, sodass es lokal sowie systemisch immunregulatorisch auf Zellen wirken kann[49].
Folgend ist eine Zusammenschau der immunregulativen Funktionen des Calcitriol auf Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen dargestellt:

Tabelle 1.4. Immunregulative Funktionen des aktiven Vitamin D auf antigenpräsentierenden Zelllen (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen)

Herunterregulierung des MHC Klasse II Moleküls[50]
Herunterregulierung der Oberflächenexpression des co-stimulierenden Rezeptors (CD40, CD80 und D86) sowie andere Reifungs-induzierten Proteine (CD1a, CD83)[51]
Induktion der chemotaktischen und phagozytischen Kapazität der Monozyten, Tumor Zellenmarkern und Tumorzell Zytotoxizität[52]
Hemmung der Reifung dendritischer Zellen[53]
Induktion des tolerogenen Zytokin IL-10 bei dendritischen Zellen, die T regulatorische Zellen induzieren[54]
Hemmung der IL-12 p70 Ausschüttung[55]
Inhibition der pro-inflammatorischen Zytokine, IL-1a, IL-1b, TNF-a in Monozyten und Makrophagen[56]

1.4.1 Vitamin D - vermittelte Wirkungen auf B-Zellen

Es wurde gezeigt, dass Calcitriol bei der B-Zell-Homöostase eine Rolle spielt. Es kann bei höherer Konzentration antiproliferativ wirken und eine Apoptose aktivierter B-Lymphozyten induzieren[1]. Darüber hinaus hemmt Calcitriol die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen. Diese Mechanismen können potentiell protektiv bei B-Zell-abhängigen Krankheiten wie systemischem Lupus erythematodes oder der rheumatoiden Arthritis wirken[57].
Im Kontext allergischer Erkrankungen sind frühere Befunde der AG Prof. Worm bedeutsam, die zeigen, dass der Isotypenklassenwechsel zu IgE sowie dessen Produktion durch direkte Wirkung von Calcitriol auf B-Zellen gehemmt wird[58]. Diese Beobachtungen konnten in einem tierexperimentellen Modell bestätigt werden. Dort wurde gezeigt, dass nach Behandlung von Mäusen mit einem nicht-hyperkalzämischen Vitamin D-Agonisten eine Reduktion des allergenspezifischen IgE nach einer Sensibilisierungsphase auftritt[59].
In dieser Arbeit wird die Anzahl von Vitamin D-reagierenden Zellen (CD38+ B-Zellen) im Blut untersucht. CD38 ist ein multifunktionaler Oberflächenmarker humaner Lymphozyten, der zur Familie der nukleotidmetabolisierenden Enzyme gehört und zugleich ein Marker der Zellaktivierung ist[60]. Ein Verlust der CD38 Expression wurde mit Krankheitsbildern wie der Leukämie oder multiplen Myelom aber auch Diabetes mellitus Typ II assoziiert. Calcitriol induziert die CD38 Expression auf B-Zellen[1], induziert die IL-10 Produktion[61] und fördert in terminal differenzierten Plasmablasten die CCR10 Produktion[62].

1.4.2 Vitamin D - vermittelte Wirkungen auf T-Zellen

Auch auf T-Zellen kann Vitamin D zahlreiche Wirkungen entfalten. Vitamin D aktiviert den VDR und den Enzymkomplex CYP27B der T-Zellen und hat somit einen Einfluss auf das adaptive Immunsystem, da es so T-Zell Proliferation – und Funktion hemmen kann. Dabei reduziert das biologisch aktive Calcitriol die Vermehrung von T-Helfer-Zellen[63]. Somit kommt es zu einer verminderten Zytokin-Produktion von IL-2, IL-17 und IFN-γ[64]. Da Calcitriol auch die Funktion und den Phänotyp von dendritischen

Zellen reguliert, kann es die Entstehung von T-regulatorischen Zellen, IL-4 sowie IL-10 fördern[65].

1.5 Vitamin D Supplementierung

Der tägliche Vitamin D Bedarf des menschlichen Körpers wird durch einen photochemischen Prozess unter dem Einfluss von Sonnenlicht in der Haut sichergestellt (>90% des Vitamin D Bedarfs). Zusätzlich kann Vitamin D durch die Aufnahme Vitamin D-reicher Nahrungsmittel wie Milchprodukte, Lebertran, Hering, Makrele, Lachs, Thunfisch, Leber, Hühnerei und Margarine oder auch durch die Substitution durch Vitamin D Präparate aufgenommen werden[66].

Die tägliche UV Exposition von 20 bis 30 Minuten auf das Gesicht sowie Vorderarme von März bis Oktober ist ausreichend einen adäquaten Vitamin D Spiegel aufzubauen. Im Winter reicht die Exposition in unseren Breitengraden zu einer ausreichenden Vitamin D Produktion nicht aus.

Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt eine tägliche Vitamin D Zufuhr bei Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen von 20 µg (800 IE) Vitamin D und bei Säuglingen von 10 µg (400 IE) Vitamin D[67]. Den Schwellenwert einer Vitamin D Suffizienz von 50 nmol/l erreichen nach Angaben der Ernährungsexperten 60 Prozent der Bevölkerung nicht[67]. In Deutschland nehmen Jugendliche und Erwachsene über die Ernährung täglich zwischen 2 und 4 µg (80 bis 160 IE) Vitamin D und Kinder 1 bis 2 µg (40 bis 80 IE) Vitamin D auf[67].

Vitamin D Präparate sind in Deutschland rezeptfrei (bis zu 1.000 IE) in der Apotheke in Tabletten- und Tropfenform oder rezeptpflichtig (100.000 IE) zur Injektion bei oral resistenter Hypovitaminose erhältlich. In dieser Pilotstudie wurde Vitamin D als Einmalinjektion mit 100.000 IE leitliniengerecht intramuskulär sowie exploratorisch subkutan verabreicht. Die intramuskuläre Substitution ist als Prophylaxe von Vitamin D Malabsorption durch chronische Darmerkrankungen, biliäre Leberzirrhose sowie nach ausgedehnter Magen-Darm-Resektionen bei oraler Vitamin D Resistenz zugelassen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiendesign

Die Probanden wurden für die vorliegende Studie in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité, Campus Mitte, Universitätsmedizin Berlin, rekrutiert.

Die Studienteilnehmer durchliefen eine randomisierte placebokontrollierte Studie in vier Parallelgruppen mit zwei Applikationswegen.

Das Pilotprojekt wurde prospektiv, doppelverblindet und monozentrisch durchgeführt (Kurzbezeichnung / Protokoll-Code: ViDImmun EudraCT Nummer: 2012-003217-33).

Die Untersuchungen der 40 Probanden wurden zwischen Februar und Mai 2013 ausgeführt.

Die Probanden wurden zufällig zu den Applikationswegen i.m. oder s.c. zugeordnet und innerhalb der jeweiligen Applikationsgruppe im Verhältnis von 2:1 in die VD- oder Placebo-Gruppe randomisiert.

Zu Beginn der Studie wurde eine Eingangsuntersuchung (Visite 0, Screening) durchgeführt um sicher zu stellen, dass die Ein – und Ausschlusskriterien erfüllt sind.

Darauf folgten 12 Visiten (Visite 1- 12) und eine Abschlussuntersuchung (Visite 13) wie in der Übersicht dargestellt.

Tabelle 2.1. Übersicht zu den Visiten und den erfolgten Maßnahmen.
Abkürzungen: V = Visite, T = Tag.

	V 0	***V 1***	***V 2***	***V 3***	***V 4***	***V 5***	***V 6***	***V 7***	***V 8***	***V 9***	***V 10***	***V 11***	***V 12***	***V 13***
Tage (T), Wochen (W)	bis -W4	T1	T2	T3	T4	T7±1 T	T14±1 T	T21±1 T	T28±1 T	T35±1 T	T42±1 T	T49±1 T	T56±1 T	T84±2 T
Probandenaufklärung	✓													
Einwilligungserklärung	✓													
Anamnese	✓													
Einschlusskriterien	✓	✓												
Ausschlusskriterien	✓	✓												
Randomisierung		✓												
Körpergröße/-gewicht	✓													
Körperl. Untersuchung	✓													
Vital-Parameter	✓	✓							✓				✓	✓
Schwangerschaftstes	✓													
Sicherheitslabor	✓								✓				✓	✓
Pharmakokinetik	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
BE Immunologie		✓				✓			✓					✓

Applikation der Studienmedikation		✓												
Verträglichkeit der Studienmedikation		✓												
Erfassung unerwünschter Ereignisse (AE)		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Medikamentenabfrage	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

2.1.1 Votum der Ethikkommission

Ein positives Votum der Ethikkommission der Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) und der Charité lag vor Beginn der Untersuchung vor (EudraCT Nummer: 2012-003217-33).
Die klinische Studie wurde nach den Richtlinien des European Good Clinical Practice (GCP) durchgeführt.
Alle Probanden wurden über die geplanten klinisch wissenschaftlichen Untersuchungen aufgeklärt und gaben schriftlich ihre Einwilligung zur Untersuchung.

2.1.2 Ein – und Ausschlusskriterien

Im Folgenden sind die Einschlusskriterien dargestellt. Sie umfassen:

- schriftliche Einwilligungserklärung
- Männer und Frauen im Alter von 18 - 60 Jahren
- 25-OH-VD Konzentration im Serum $\leq$ 50 nmol/l
- bei Frauen im gebärfähigen Alter: Anwendung einer effektiven Kontrazeption

Im Folgenden sind die Ausschlusskriterien dargestellt. Sie umfassen:

- 25-OH-VD Konzentration im Serum >55 nmol/l
- BMI < 18,5 oder >30 kg/m²

- Regelmäßige oder geplante UV-Exposition, z.B. Sonnenstudio >1x pro Woche, Reise an einen anderen Ort mit verstärkter UV-Exposition (UV-Index/Tag >5)
- Überempfindlichkeit gegen einen der Bestandteile von D3-Vicotrat® oder Vergleichspräparat
- Anamnestisch: Hyperkalzämie oder Hyperurie, Neigung zu Nierensteine, Niereninsuffizienz, Sarkoidose, Pseudohypoparathyreodismus
- Personen mit hereditärer Fructose-Intoleranz
- Einnahme von Glukokortikoiden
- Behandlung mit Vitamin A-Derivaten oder anderen Vitamin D-haltigen Präparaten
- Behandlung mit immunsuppressiv und/oder immunmodulatorisch wirksamen Medikamenten
- Behandlung mit Phenytoin, Barbiturate, Thiazid-Diuretika, Herzglykoside
- immobile Personen
- Kalzium, Phosphat oder Kreatinin im Serum mit Werten außerhalb des entsprechenden Referenzbereiches
- klinisch relevante Abweichungen der hämatologischen Werte (Differenzialblutbild)
- Unterbringung in einer Anstalt auf gerichtliche oder behördliche Anordnung
- (geplante) Schwangerschaft und Stillzeit
- bestehende Abhängigkeit zum Sponsor, bevollmächtigten Vertreterin des Sponsors, z.B. Verwandtschaft, Arbeitsverhältnis)
- gleichzeitige Teilnahme an einer anderen Interventionsstudie innerhalb 30 Tage vor und während der hier geplanten Studie
- sonstige Gründe, wie Drogen- und Alkoholabusus, fehlende Compliance

2.1.3 Probanden und Untersuchungsmaterial

Gesunde Männer und Frauen zwischen 18 und 60 Jahren wurden für die Studie rekrutiert (n = 40, Frauen = 28, Männer = 12).

Nach ausreichender Bedenkzeit und ausführlicher ärztlicher Aufklärung wurde die Einverständniserklärung unterschrieben.
Die gesunden Probanden wiesen gemäß den Einschlusskriterien einen relativen Vitamin D Mangel von unter 55 nmol/L und ein unauffälliges Sicherheitslabor auf. Bei Frauen im gebärfähigen Alter wurde vor Studienbeginn eine Schwangerschaft ausgeschlossen und zusätzlich eine Kontrazeption praktiziert.
Die Benutzung eines Solariums und auch Reisen an Orte mit verstärkter UV-Exposition (UV-Index / Tag > 5) während der Beobachtungszeit waren Ausschlusskriterien, um den bekannten positiven Effekt von UV-Licht-Exposition auf die 25-Hydroxyvitamin D Serumwerte auszuschließen. Bei jeder Visite wurde den Probanden peripheres Blut aus einer Armvene entnommen.
Das Monitoring dieser klinischen Studie wurde durch das KKS Charité (Koordinierungszentrum für Klinische Studien der Charité- KKS Charité Campus Virchow Klinikum - Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin) geleitet.

2.1.4 Randomisierung

Die Randomisierung erfolgte durch eine studienunabhängige Studienschwester des Allergie - Centrums der Charité.
Über die Apotheke der Charité (Studienabteilung, Frau Dr. Eberhardt) erfolgte hierbei eine geschlechtstratifizierte Blockrandomisierung mit Sechserblöcken.
Während der ersten Visite und nach Evaluation der Ein- und Ausschlusskriterien erfolgte nach Randomisierung die Applikation der Studienmedikation.

2.1.5 Studienmedikation

Die Studienmedikation D3-Vicotrat® wurde über die Firma HEYL bezogen (Zulassungsnummer: 6813051.00.00).
Eine Ampulle mit 1 ml Injektionslösung enthält 2,5 mg Cholecalciferol, das 100.000 I.E. Vitamin D entspricht. Andere Inhaltsstoffe sind: Natriumdihydrogenphosphat-

Dihydrat, Natriumhydroxid, Sorbitollösung 70 % (kristallisierend), Polysorbat 80, mittelkettige Triglyceride und Wasser für Injektionszwecke.
D3-Vicotrat® wird bei Hypovitaminose D zur Supplementierung besonders bei oral resistenter Therapie verabreicht. Hierbei ist besonders auf die akute Symptomatik einer Hyperkalzämie zu achten (Herzrhythmusstörungen, Übelkeit, Erbrechen, psychische Symptome, Bewusstseinsstörungen).
Für die Placebomedikation wurde 1 ml isotonische Natriumchlorid-Lösung (NaCl) 0,9% Injektionslösung von der Firma Braun appliziert (Zulassungsnummer: 6697366.00.00).
Die Studienmedikation wurde einmalig als Einzeldosis von einer entblindeten und studienunabhängigen Studienschwester des Allergie Centrums der Charité (intramuskulär /i.m. oder subkutan / s.c.) injiziert, so dass eine 100%-ige Compliance erreicht wurde.
Überschüssige Medikation wurde über die Apotheke der Charité vorschriftsmäßig entsorgt.

2.2 Technische Geräte und Hilfsmittel

Produkt	Hersteller
CASY® Technology Cell Counter Casy 1, Model TT Roche Innovatis AG	Schärfesystem GmbH, Reutlingen, D
Durchflusszytometer FACSCalibur™	BD Biosciences, Heidelberg, D
Durchflusszytometer MACSQuant®	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Freezer (-80°C) Hera Freeze	Heraeus Instruments, Hanau, D
Inkubator Heracell®	Heraeus Instruments, Hanau, D
Kühlschrank (4°C) TKF380	EUREKA, Emsdetten, D
Sterile Werkbank HeraSafe	Heraeus Instruments, Hanau, D

Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf Research, Hamburg, D
Vortex REAX 2000	Heidolph, München, D
Zentrifuge Varifuge RF	Heraeus Instruments, Hanaus, D
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanaus, D

2.2.1 Chemikalien

Produkt	Hersteller
autoMACS Rinsing Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
BSA (bovines Serumalbumin)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München, D
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Eigenherstellung
MACS buffer PBS/0.5% BSA/2mM EDTA	Eigenherstellung
FACS buffer PBS/1% BSA	Eigenherstellung
Dulbecco´s PBS without Ca2+/Mg2+, steril	PAA, Cölbe, D
Lymphozytenseperationsmedium Ficoll	PAA, Cölbe, D
Lysing Solution	BD, Heildelberg, D

2.2.2 Antikörper

Konjugat	Antigen	Hersteller	Klon
VioBlue	CD27	eBioscience	0323
FITC	CD21	ImmunoTools	LT21
PE	CCR10	R&D Systems	314305
PerCP	CD4	Miltenyi Biotec	VIT4
APC	IgD	Miltenyi Biotec	IgD26
PE-Cy7	CD38	BioLegend	HIT2
APC-Cy7	CD19	BioLegend	HIB19
VioBlue	CD197	eBioscience	TG8/CCR7
FITC	CD16	BD Pharmingen	2.4G2
PE	HLA-DR	Miltenyi Biotec	AC122
PerCP	CD4	Miltenyi Biotec	VIT4
APC	CD38	BioLegend	HIT2
PE-Cy7	CD45RA	BD Pharmingen	HI100
APC-Cy7	CD14	BD Pharmingen	MφP9
FITC	CD16	BD Pharmingen	2.4G2
PE	CD14	Miltenyi Biotec	TÜK4
PerCP	CD4	Miltenyi Biotec	VIT4
APC	CD19	DRFZ	-

2.2.3 Software

Software	Hersteller
CASY®measure 1.5	Schärfe System
Exel 2010	Microsoft Office
FlowJo 7.6.1	Tree Star, Inc.
MACSQuantify	Miltenyi Biotec
GraphPadPrism 7.0	GraphPad Software Inc.
R 3.0.2	R Development Core Team
SPSS Statistics 21	IBM
Word 2010	Microsoft Office

2.3 Labormethoden

2.3.1 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes sind einkernige Zellen des Blutes (Lymphozyten und Monozyten) und müssen vor der durchflusszytometrische Analyse von anderen Zellen im Blut separiert werden.
Für die Gewinnung der PBMCs wurde unter einer sterilen Sicherheitswerkbank gearbeitet.
Es wurden 10 ml Lymphozytenseparationsmedium (Ficoll, Dichte 1.077 g/ml) in ein 50 ml Falcongefäß überführt und mit 16 - 35 ml heparinisierten Vollblut mit einer Pipettierhilfe (Pipetboy) überschichtet.
Davon wurden 50 µL Vollblut für die True Count-Quantifizierung in den Heparinröhrchen belassen.

Die anschließende Dichtegradientenzentrifugation wurde bei 900 g für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit geringer Bremsleistung durchgeführt.
Anschließend wurde 2 x 1 ml die Plasmaphase mit einer Pipette abgenommen und für weitere Forschungsprojekte bei -80°C eingelagert.
Dann wurden die Leukozyten in der Interphase vorsichtig mit einer Einwegpipette abgesaugt und in einem 15 ml Falcon gesammelt und mit PBS (Phosphate buffered saline, pH 7.35) aufgefüllt.
Die Zellen wurden bei 400g für 10 min bei 4°C in einer Tischzentrifuge gewaschen.
Weiterhin wurde der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig resuspendiert.
Für jeden Probanden wurden jeweils zwei Aliquote mit 2,7 x / 10 7 Zellen ml Zellen in 2 ml mit Einfriermedium (50% RPMI 1640, 45% FBS, 5% DMSO) in einem Einfrierkonservierungsröhrchen gefüllt.
Danach wurden die Proben in ein Isopropanol Einfriergefäß transferiert und um 1°C pro Minute heruntergekühlt. Nach zwei Tagen Kühlung (-80°C) konnten die Proben in einen Gefrierschrank bei -120°C eingelagert werden, um Zellen für weitere Untersuchungen zu fixieren.

2.3.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit dem CASY 1 System von der Firma Schärfe bestimmt.
Zur Analyse diente ein Programm zur Zellzahlbestimmung isolierter peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC, umfassen Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten).
10 µl der Lymphozytensuspension wurden in 10 ml isotone Elektrolytenlösung (PBS) resuspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Messkapillare gesaugt. Das CASY 1 System verbindet eine Widerstandsmessung mit der modernen Signalauswertung, die Pulsflächenanalyse.
Hierbei wird über zwei Platinelektroden eine Spannung an der Kapillare erzeugt und der Widerstand gemessen. Beim Durchfluss von Zellen durch die Messkapillare entsteht eine Widerstandsänderung, die das Volumen der Zelle bestimmt. Zeitgleich werden konsekutiv elektrische Impulse gesendet. Diese Pulsflächenanalyse ermittelt mit Hilfe der Einzelmessungen das Integral der Messsignale. Auf diese Weise werden die Zellen ihrer Größenverteilung und Dichte nach differenziert.

Hierbei erfolgt die Einteilung in vitale Zellen, die größer sind und tote Zellen, die ein kleineres Zellvolumen haben.

2.3.3 Färben von Oberflächenantigenen

Zunächst wurde eine größere Menge eines Mastermixes der gewählten Antikörper erstellt. Dies diente zur homogenen Färbung der einzelnen Proben.
Für die Analyse der peripheren Blutzellen wurde in jeweils zwei 1,5 ml Rundbodenröhrchen die zu analysierende Zellsuspension pipettiert.
Anschließend wurde diese in einer Zentrifuge (600g) für 10 Minuten bei 4 Grad Celsius gewaschen.
Der Überstand wurde absaugt und jeweils 25 µl des Mastermixes hinzugefügt.
Anschließend wurde die Antikörper-Zellsuspension mit einem Vortexmixer gemischt und für 20 Minuten bei 37 Grad Celsius inkubiert.
Um die photochemische Inaktivierung der Fluoreszensfarbstoffe zu vermeiden wurden die Antikörper stets unter lichtarmen Verhältnissen behandelt.
Abschließend wurden die nichtgebundene Antikörper durch das Zentrifugieren mit
1 ml FACS-Puffer entfernt und bis zur Analyse mit dem Durchflusszytometer dunkel und gekühlt gelagert.
Für die absolute Zellzahlmessung wurden 50 µl des Vollblutes für die TruCOUNT™-Quantifizierung in dem Heparinröhrchen belassen.
30µl des heparinisierten Vollblutes wurde in TruCOUNT™Gefäß (BD Biosciences) pipettiert mit anschließend mit 4 µl des Mastermixes vermischt.
Dieser Färbeprozess wurde abgedunkelt bei Raumtemperatur über 20 Minuten durchgeführt.
Danach wurde das gefärbte Vollblut mit 300 µl einer Erythrozyten Lysing Solution lysiert. Sobald die Flüssigkeit sich zu entfärben begann wurde 300 µl PBS hinzugefügt um den Prozess zu stoppen. Die Proben wurden bis zur Messung im FACScalibur dunkel und bei Raumtemperatur gelagert.

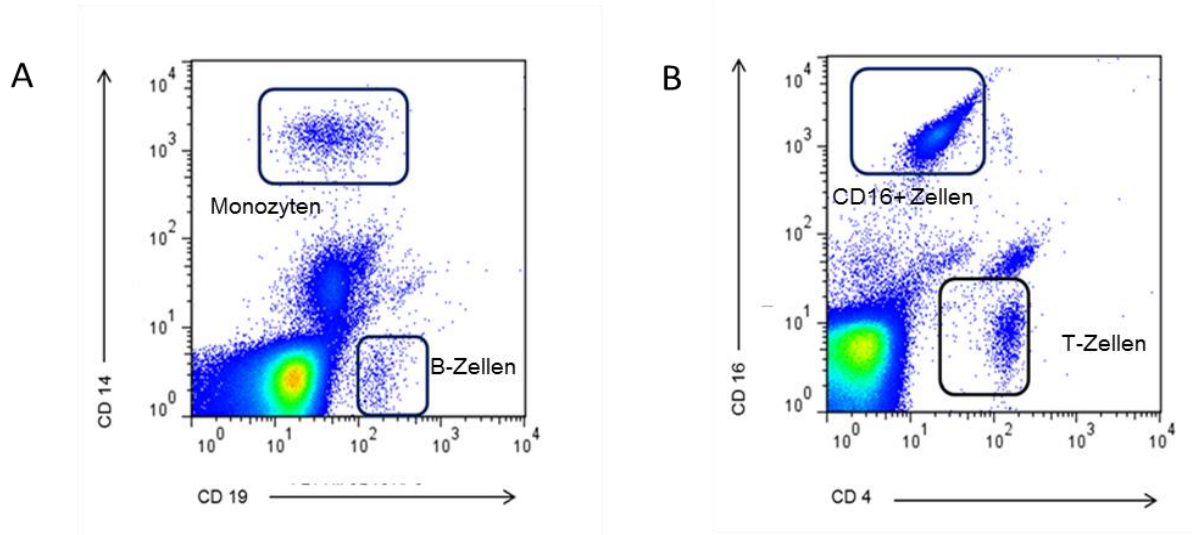

Abbildung 5. Gating-Strategie der TruCOUNTs zur Bestimmung der Gesamtzellzahl.
Insgesamt wurden 4 verschiede Zellpopulation mit Hilfe der TruCOUNTs gemessen. Diese dienen zur Berechnung der Gesamtzellzahl.
A In der linken Abbildung befinden sich CD14+ Monozyten und an der X-Achse CD19+ B-Zellen.
B In der rechten Abbildung CD4+ T-Zellen und CD16+ Zellen.

2.3.4 Durchflusszytometrische Messungen

Die durchflusszytometrische Analyse dient der Differenzierung und Charakterisierung von Zellen in der Zellsuspension.

Lymphozyten können mithilfe des durchflusszytometrischen Vorwärtsstreulichtes ihrer relativen Zellgröße und des Seitwärtsstreulichtes der Granularität (Refraktionsindex oder Plasma/Kern-Verhältnis) zugeordnet werden.

Zudem kann mit Hilfe fluoreszendierender spezifischer Oberflächenmarker von anderen Zellen des peripheren Blutes unterschieden werden.

Dieses Prinzip wird als fluorescence activated cell sorting (FACS) bezeichnet.

Die hier verwendeten Fluoreszenzmarker sind Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll-α-Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC).

Für die durchflusszytometrischen Messungen diente der MACS Quant der Firma Miltenyi Biotec.

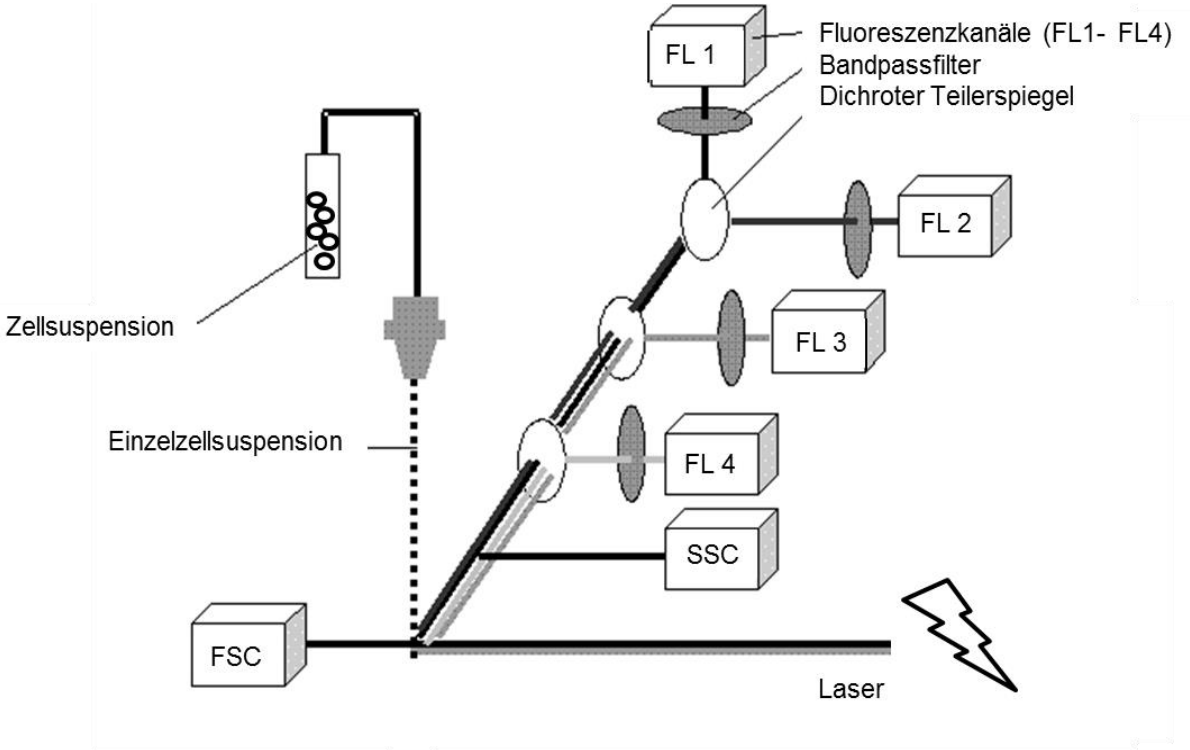

Abbildung 6. Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.
Das Prinzip wird als fluorescence activated cell sorting (FACS) bezeichnet. Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter), Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter), Fluoreszenzkanäle (FL1- FL4).
Die zu analysierenden Zellen der Trägerflüssigkeit werden durch die Messküvette gesaugt und durch Fluoreszenzkanäle geleitet. Dort werden die Zellen einzeln an einem Laser vorbeigeleitet, der aufgrund unterschiedlicher Größe, Granularität und Oberflächenmolekülen die Zellen unterscheidet.

Vor jeder Messung wurde, mit der Möglichkeit der Nachjustierung, das Gerät kalibriert und der Laser geprüft.

Die gefärbten mononukleären Zellen wurden aus einem Sammelröhrchen in den Mikrokanal einer hochpräzisen Küvette aufgesaugt.

Anschließend werden diese in zellgroße Tröpfchen hydrodynamisch fokussiert,

indem der langsam fließende Transportstrom einem schnell fließenden Probenstrom zugemischt wurde.

Die einzelnen fluoreszenz-markierten Zellen wurden an einem Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm bis 633 nm vorbeigeleitet und mehr als 1000 Zellen pro Sekunde verarbeitet.

Dabei wurde das Laserlicht von der Zelle reflektiert und von einem Detektorsystem aus Bildverstärkerröhren aufgenommen.

Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und bestimmt die Zellgröße und ihr Volumen. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter) dient zur Bestimmung der Granularität der Zellen und wurde mittels Brechung des Lichts im rechten Winkel bestimmt.
Die eingegangenen Signale wurden umgewandelt und mit der MACS Quant Software digital verarbeitet.
Die Messungen erfolgten mit Hilfe der Standardmaske und einem Kompensationsmuster.

2.3.5 Absolute Zellzahl Messung

Die Messung der absoluten Zellzahl mit dem FACSCalibur (BD Biosciences) diente zur Immunphänotypisierung der Zielpopulationen.
Nach Überprüfung der Photoelektronenvervielfacher wurde die Antikörper-gefärbte Zellsuspension (CD4, CD14, CD16, CD19) in einem TruCOUNT™ Röhrchen analysiert.
Diese beinhaltet eine bekannte Menge (variiert je nach Charge) fluoreszierender Partikel (Beads), die während der FACS-Analyse als eigene „Population“ gemessen werden.
Nach Aufnahme der Daten von insgesamt 70.000 Ereignissen wurde der prozentuale Anteil der Zellpopulation im Verhältnis zu den TruCOUNT™ Partikeln ermittelt.
Im Anschluss ließ sich daraus die absolute Zellzahl, der im MACSQuant analysierten Zellpopulation, berechnen.

Formel:

Zellzahl (absolut) / µl = Partikel (absolut) x gemessene Partikel Probenvolumen

2.3.6 FACS Analyse und Datendarstellung

Die generierten FACS-Daten wurden mit Hilfe der FlowJo Software 7.6.1 (Tree Star Inc., Ashland, USA) analysiert.

Während der Auswertung konnten die Zellen hinsichtlich spezifischer Charakteristika visualisiert werden.

Die 2-dimensionalen Punktewolkendiagramme (Dot-Plots) zeigten die Signalintensität der analysierten Parameter (Größen-, Granularitäts- und Fluoreszenzparameter).

Durch Einsetzen von Analysefenstern (Gates), Quadranten oder Kreuzen ließen sich die Zielzellen elektronisch selektieren. Im nächsten Schritt wurden dann in einem neuen Punktwolkendiagramm auf weitere Oberflächenmarker hin qualitativ und quantitativ untersucht bis die Zielpopulation fokussiert wurde.

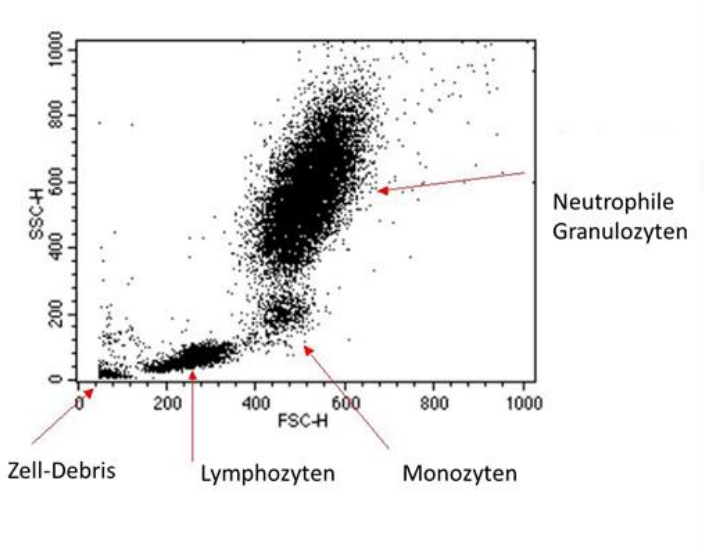

Abbildung 7. Punktewolkendiagramm.
Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) liegt auf der Y-Achse und bestimmt die Zellgröße und ihr Volumen. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter) dient zur Bestimmung der Granularität der Zellen und liegt auf der X-Achse.

2.3.6.1 Gating-Strategie

Es wurde der Einfluss auf die Häufigkeit zirkulierender Immunzellen im Blut durch exogene Vitamin D Zufuhr untersucht. Dafür wurden die Frequenzen der peripheren Blutzellpopulationen mittels der Durchflusszytometrie basierend auf ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) unterschieden.

Der Phänotyp der Immunzellen wurde durch die Kombination fluoreszierender Antikörper bestimmt. Dieses erfolgte durch die Oberflächenmarker mit spezifischen Subpopulationsmarkern auf $CD19^{+}$B-Zellen: naive B- Zellen (CD27-IgD+), Übergangs- B-Zellen (CD27+IgD+), B-Gedächtniszellen (CD27+IgD-).

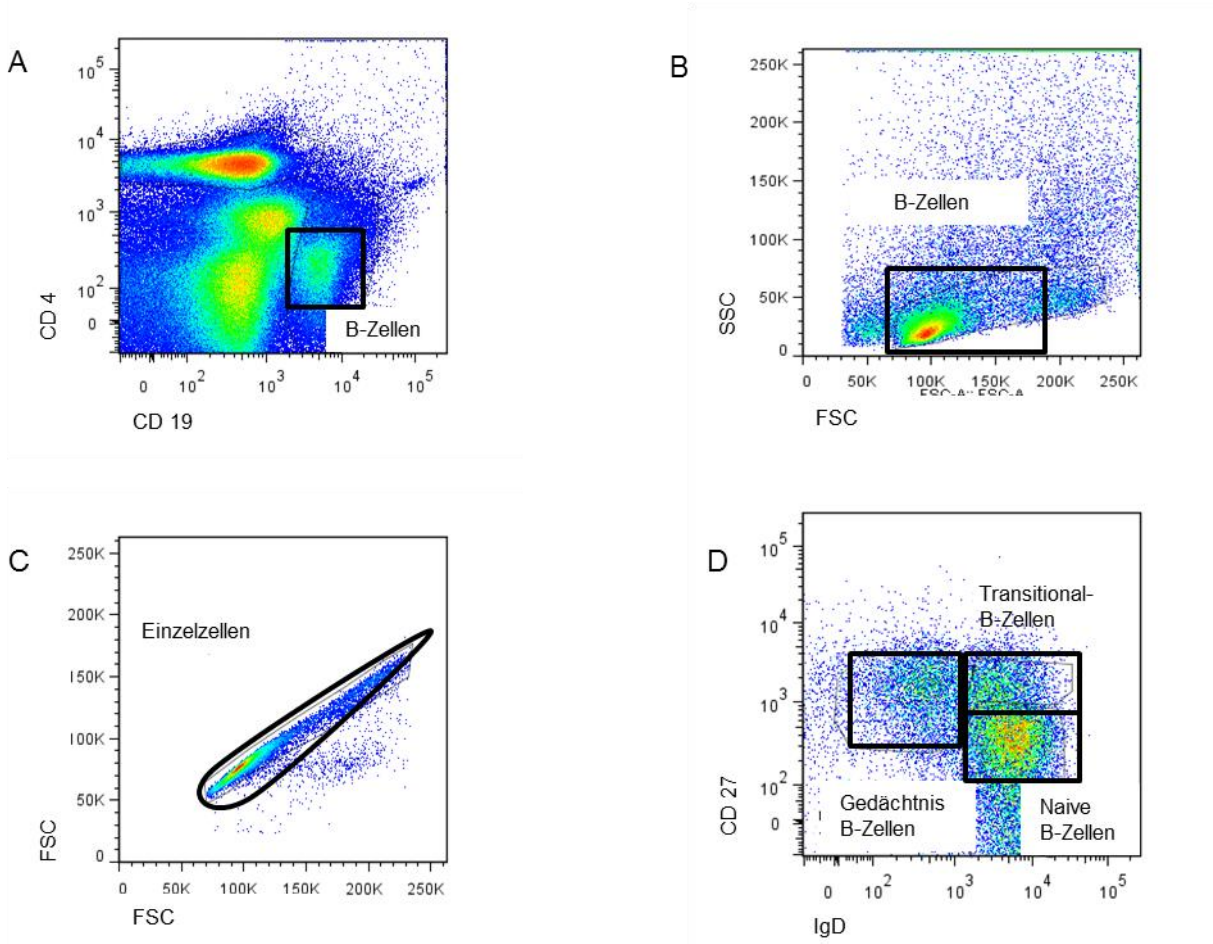

Abbildung 8. Gating-Strategie des B-Lymphozyten Panels.
Die B-Zell Populationen wurden mittels der Fluorochrome CD19, CD4, IgD sowie CD27 bestimmt.
A Zunächst wurde die CD19-Zellen inkludiert und T-Zellen (CD4) ausgegrenzt.
B Anschließend wurden die B-Zellen eingegrenzt.
C Die Einzelzellen wurden bestimmt.
D Mit Hilfe der B-Zell Oberflächenmarker CD 27 und IgD wurden die Zellpopulationen in naive B- Zellen (CD27-IgD+), transitional- B-Zellen (CD27+IgD+), B-Gedächtniszellen (CD27+IgD-). eingeordnet.

Der Phänotyp der T-Lymphozyten wurde durch die Kombination fluoreszierender Antikörper in naive T-Zellen (CD45RA+), zentrale T-Effektorzellen (CCR7+), zentrale T-Gedächtniszellen (CD45RA+CCR7+) eingeordnet.

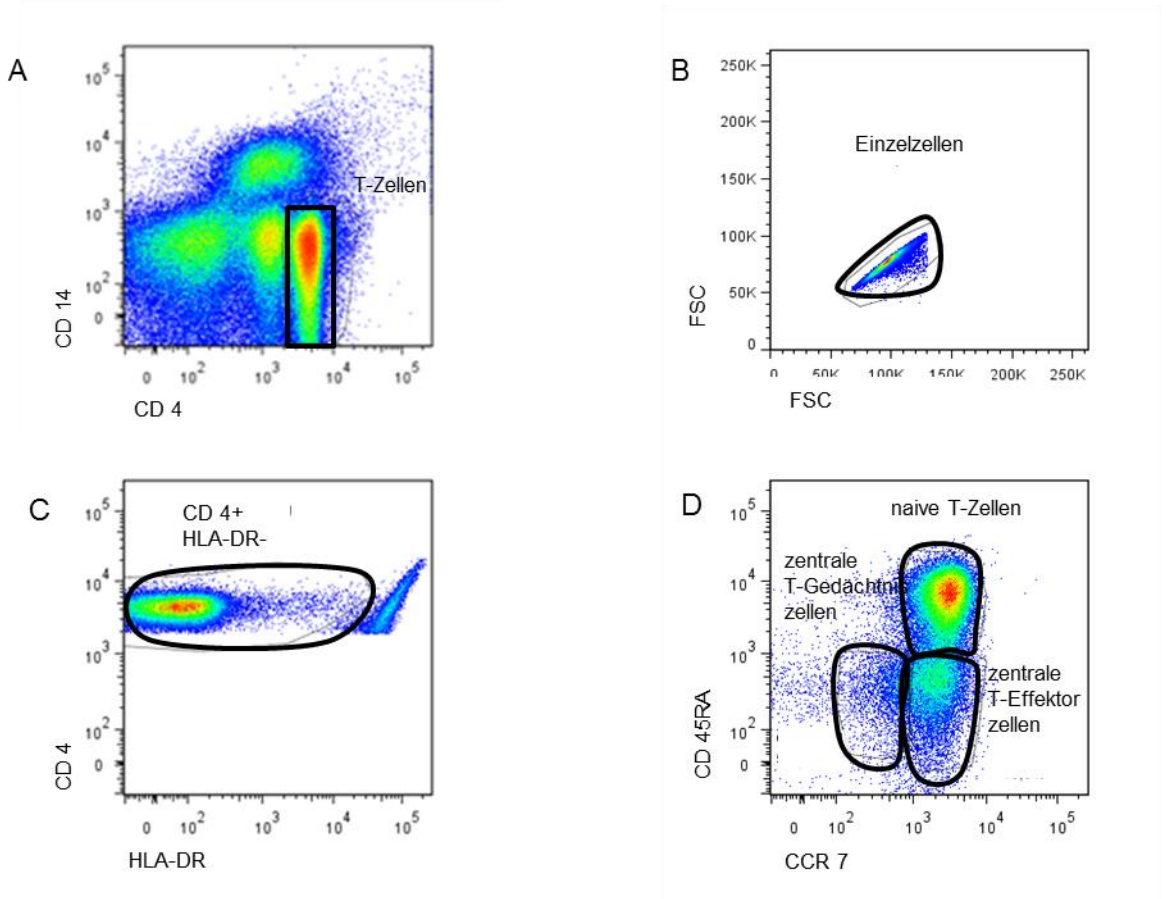

Abbildung 9. Gating Strategie des T-Lymphozyten Panels.
Die Flurochrome CD197, CD16, HLA-DR, CD4, CD38, CCR7, CD14 dienten zur Einordnung der verschiedenen Populationen.
A Zunächst wurden die T-Zellen eingeschlossen und der Zell-Debris ausgegrenzt.
B Anschließend wurden die Einzelzellen eingegrenzt.
C CD 4+ und HLA-DR- T-Zellen wurden eingeschlossen.
D Mittels der Oberflächenmarker CD45RA und CCR7 wurden naive T-Zellen (CD45RA+), zentrale T-Effektorzellen (CCR7+), zentrale T-Gedächtniszellen (CD45RA+CCR7+) bestimmt.

Die Flurochrome CD197, CD16, HLA-DR, CD4, CD38, CD45RA, CD14 dienten zur Einordnung der Monozyten. HLA-DR^{low}CD14^{+} Monozyten sowie CD16^{high}CD14^{+} Monozyten wurden somit bestimmt (nicht gezeigt).

2.3.7 25-Hydroxyvitamin D-Messung

Das entnommene periphere Blut wurde zunächst 30 Minuten zur Gerinnung bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde der Rotor mit den Röhrchen gleichmäßig beladen und 10 Minuten zwischen 1000 g und 1200 g zentrifugiert.
1 ml des Serums wurde in Eppendorf-Gefäße pipettiert und im Labor für Endokrinologie des Labor Berlin (Charité Vivantes GmbH, Laboratoriumsmedizin CVK) mittels Elektrochemilumineszenz-Immunoassay-Messung analysiert.

2.3.7.1 Referenzwerte

Der Vitamin D-Status wird über den Blutspiegel des 25-Hydroxycholecalciferol in nmol/l bestimmt. 7-Dehydrocholesterol wird zu mehr als 90 % an Vitamin-D-bindendes Protein transportiert und hat eine Plasmahalbwertszeit von 19 bis 25 Stunden.
Anschließend wird es entweder im Fettgewebe gelagert oder in der Leber zu Calcidiol hydroxyliert (Plasmahalbwertszeit beträgt 19 Tage) und nachfolgend wieder gebunden in das Plasma freigesetzt. Die Halbwertszeit von Calcidiol im Blut beträgt maxcimal 4 Monate bis es von den Zielzellen in seine aktive Form hydroxyliert wird.
Daher spiegelt der 25-Hydroxycholecalciferol eine Vitamin D-Versorgung der letzten 4 Monate wider.

CHOLCALCIFEROL IN NMOL/L	
<31	Schwerer Mangel
<50	Mangel
50-80	Defizit
80-250	Normalwert
135-225	Normal in sonnigen Ländern
>250	Hypervitaminose

Tabelle 2.2.7.1. Vitamin D-Referenzbereiche nach Holick[68]

2.4 Datenauswertung und statistische Methoden

Die Tests wurden unter Zuhilfenahme der Statistik-Software
SPSS Version Statistics 21 (IBM) und R Version 3.0.2 (R Development Core Team) durchgeführt. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte unter Verwendung von Graphpad Prism (GraphPad Software) und Microsoft Excel (Microsoft).
Der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test wurde zum Gruppenvergleich bei unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben und kleiner Gruppengröße benutzt. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit einem p-Wert * < 0,05 ** < 0,01 und *** < 0,001 definiert.
Die primären Enddaten wurden in der Summe nicht dem globalen Signifikanzniveau für einseitige Tests eingehalten. Da es sich um keine konfirmatorische Studie handelt, wurden die errechneten p-Werte nur explorativ betrachtet. In Abhängigkeit der Verteilung wurden Mittelwerte und Standardabweichung berechnet, sowie Häufigkeitstabellen erstellt.
Die sekundären Endpunkte wurden ebenfalls in Abhängigkeit der Verteilung (Mittelwert und Standardabweichung oder Median, sowie Min-/Maximalwerte und Quartile) zu jedem Untersuchungszeitpunkt ausgewertet. Außerdem wurden Häufigkeitstabellen erstellt. Um mögliche Zusammenhänge einzelner Variablen zu untersuchen wurde der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient genutzt.
Die statistische Auswertung wurde in enger Zusammenarbeit mit Institut für Medizinische Biometrie der Charité - Universitätsmedizin Berlin (Koordinierungszentrum Klinische Studien (KKS), Alexander Krannich) durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Studienpopulation und statistische Vergleiche

46 Probanden wurden für die Studie zu einem Screening gesehen, 6 von ihnen erfüllten nicht die Einschlusskriterien (5 der Probanden waren nicht Vitamin D - defizient und 1 Proband plante eine Reise mit verstärkter UV-Exposition (UV-Index/Tag >5)).
Abschließend wurden 40 Probanden randomisiert, davon erhielten 13 Probanden intramuskulär injiziert das Verum -, 14 subkutan sowie 13 Probanden die Placebogabe. Aus dem Probandenkollektiv wurden 2 Probanden nicht in die Analyse aufgenommen aufgrund von fehlender Adhärenz im Verlauf der Studie und eines fraglichen Fehlers durch die unverblindete Studienschwester (Verwechslung verum-Placebo).
Insgesamt haben 38 Probanden die Studie abgeschlossen, 25 Individuen erhielten eine subkutane oder intramuskuläre Injektion mit Cholecalciferol und
13 Probanden erhielten eine Placebo-Injektion mit 0,9 % Natriumchlorid. Kein Teilnehmer brach die Studie aufgrund von unerwünschten Ereignissen ab. Zur Berechnung der Daten per Protokoll werden n = 38 Probanden eingeschlossen (vgl. Tabelle 7.1).

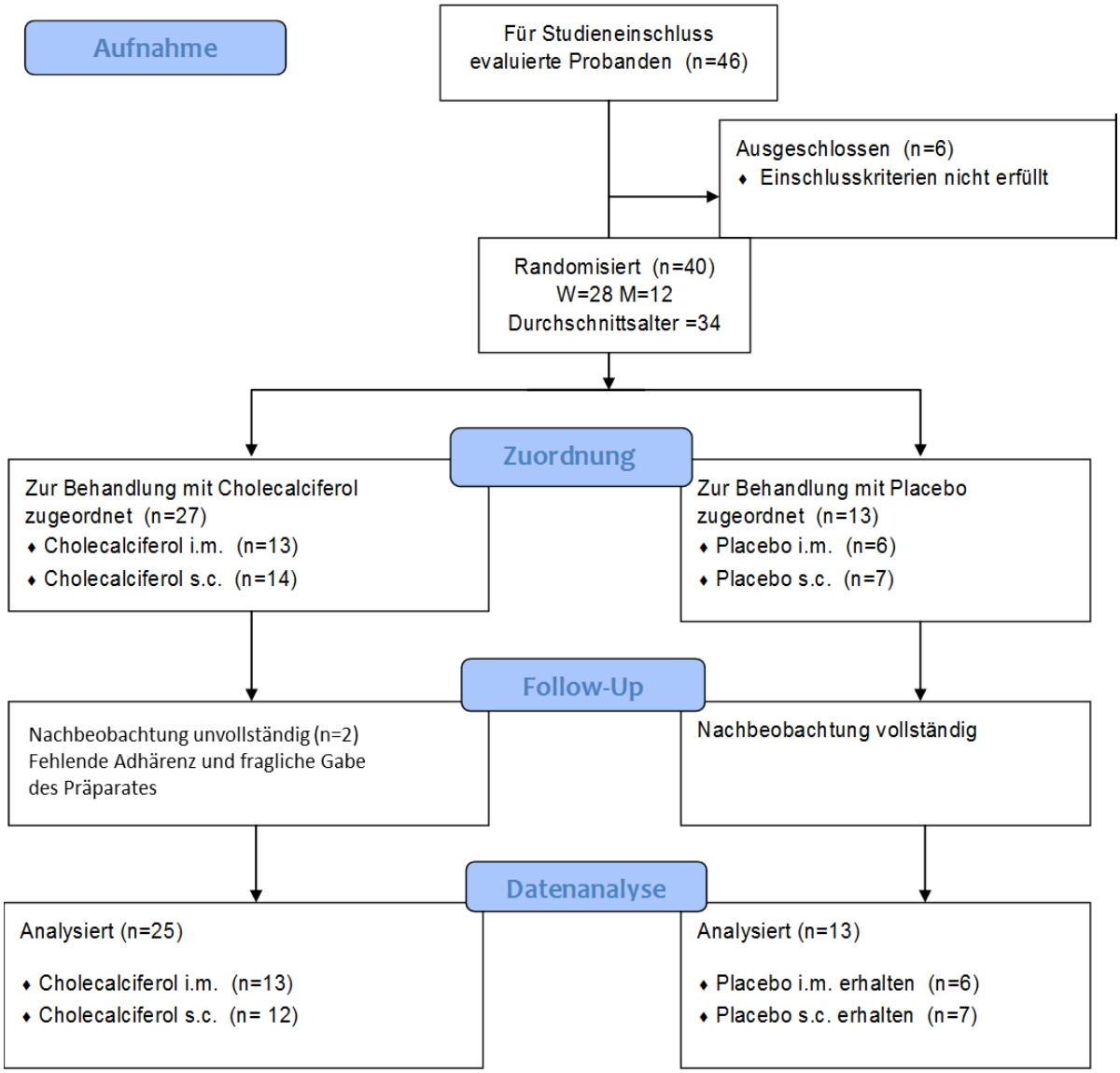

Abbildung 10. CONSORT Flussdiagramm der ViDImmun-Studie. Es wurden 46 Probanden rekrutiert. 40 waren Vitamin D-defizient und erfüllten alle Ein – und Ausschlusskriterien. 13 Probanden wurden intramuskulär injiziert das Verum -, 14 subkutan sowie 13 Probanden das Placebopräparat. Aus dem Probandenkollektiv wurden 2 Probanden nicht in die Analyse aufgenommen aufgrund von fehlender Adhärenz im Verlauf der Studie und fraglicher Gabe des Verum Präparates. Insgesamt haben 38 Probanden die Studie abgeschlossen.

VARIABLE	INTRAMUSKULÄRE INJEKTION (N=12)	SUBKUTANE INJEKTION (N=13)	PLACEBO (N=13)
Geschlecht (w/m)	8 / 4	9 / 4	9 / 4
Alter (Jahre)	34,9 ± 9,1	31,4 ± 9,4	36 ± 13
Körpergröße (cm)	172,9 ± 8,0	170,7 ± 8,3	172,1± 6,8
Körpergewicht (kg)	66,4 ± 9,6	65,7 ± 11,6	66,4 ± 12,7
Body Mass Index (BMI)	22,2 ± 3,2	22,4 ± 2,5	22,3 ± 3,6

Tabelle 3.1. Demografie der Studienpopulation. Die Angaben sind in Mittelwert und Standardabweichung angezeigt.

26 Frauen (68,4%) und 12 Männer (31,6%) nahmen an der Studie teil. Das Durchschnittsalter der Gesamtgruppe lag bei 34 Jahren (± 11 Jahre) mit einer Altersspanne zwischen 20 und 60 Jahren. Das durchschnittliche Alter der Frauen betrug 35 Jahre (± 10 Jahre), das der Männer 32 Jahre (± 11 Jahre). Die Zusammensetzung beider Gruppen bezüglich Alter, ethnischer Herkunft, Größe, Gewicht war vergleichbar ($p > 0,05$).
10 der Probanden wiesen medikamentös eingestellte Erkrankungen auf: 5 arterieller Hypertonus, 1 Asthma bronchiale, 1 Diabetes mellitus Typ II, 1 Depression, 1 Hypothyreoiditis, 1 Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHD).

3.2 Sicherheit

Bei der ersten Visite (Screening) wurde eine detaillierte und vollständige Anamnese des Probanden, körperliche Untersuchung und Vitalparameter
Erhoben.

Bei Frauen im gebärfähigen Alter wurde eine Schwangerschaft vor der Randomisierung ausgeschlossen.
Als Basislaborparameter wurden Serum-Kalzium, Serum-Phosphat, Serum-Kreatinin, Alanin-Aminotransferase (ALT), Gamma-Glutamyltransferase (GGT), Differentialblutbild und 25-Hydroxyvitamin D bestimmt.
Hierbei waren die paraklinischen Parameter wie Serum-Kalzium sowie Serum-Phosphat als Verlaufsparameter des Sicherheitslabors festgelegt (vgl. Tabelle 7.2.1., Tabelle 7.2.2). Alle Bestimmungen erfolgten durch das Zentrallabor der Charité.
Die Probanden wurden darauf hingewiesen bei Auftreten akuter Symptome nach der Gabe wie Herzrhythmusstörungen (Extrasystolen), Übelkeit, Erbrechen, psychischen Symptomen (Reizbarkeit, Depressionen und Psychosen) oder Bewusstseinsstörungen das Studienzentrum umgehend zu kontaktieren. Bei dem Verdacht auf das Vorliegen einer Vitamin D-vermittelten Toxizität lag ein Notfallplan vor, der es vorsah den Kalziumblutspiegel abzusenken. Durch die intravenöse Gabe von isotonischer Natriumchloridlösung (3-6 l/ Tag) sowie gegebenenfalls mit dem Zusatz von Furosemid hätte eine forcierte Diurese erfolgen können um die toxischen Metaboliten aus dem Körper auszuschwemmen.

Tabelle 3.2. Sicherheitsparameter der klinischen ViDImmun-Studie

- körperliche Untersuchung und Vitalparameter
- Sicherheitslabor: Serum-Kalzium, Serum-Phosphat, Serum-Kreatinin, Alanin-Aminotransferase (ALT), Gamma-Glutamyltransferase (GGT), Differentialblutbild, Serum 25-Hydroxyvitamin D
- Schwangerschaftstest (Frauen im gebärfähigen Alter)
- Dokumentation der Verträglichkeit der Injektion durch den Probanden und dem Prüfarzt
- Dokumentation (schwerwiegender) unerwünschter Ereignisse bei allen Visiten durch den Prüfarzt

Keine der Frauen im gebärfähigen Alter ist währen der Studie schwanger geworden.
Die Vitalparameter der Probanden waren jederzeit im Normbereich und die Blutbefunde zeigten sich im Wesentlichen unauffällig. Der normwertige Mittelwert des

Kalziums im peripheren Blut betrug 2,3 nmol/l ± 0,5 nmol/l und Serum-Phosphat lag bei 1,0 nmol/l ± 0,5 nmol/l.

Die Befunddiskrepanz außerhalb des Normbereiches war minimal und wies keine klinische Signifikanz auf.

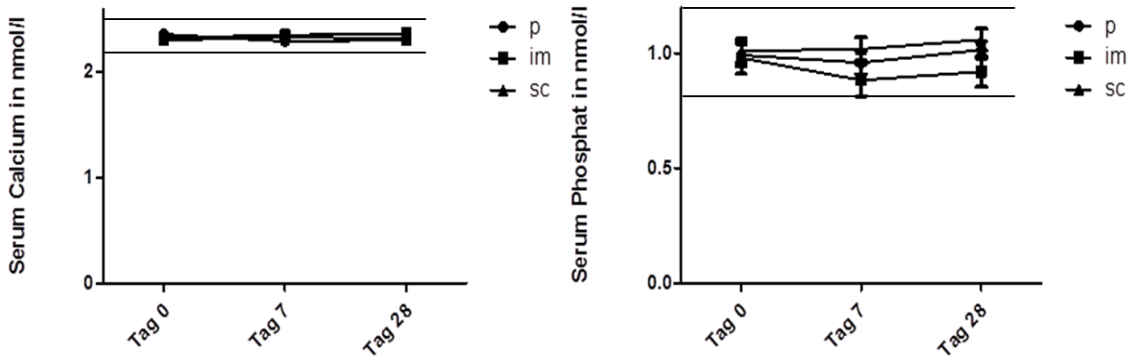

Abbildung 11. Calcium und Phosphat im Serum im Verlauf der Studie. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Sicherheitsparameter im Verlauf der Studie. Normwerte: Serum Calcium 2,15 - 2,5 nmol/l und Serum Phosphat 0,87 - 1,45 nmol/l.

Der Mittelwert des Calcium Wertes lag in dem Probandenkollektiv der subkutanen Verabreichung des Vitamin D bei 2,30 nmol/l und stieg um 0,05 nmol/l.

Nach intramuskulärer Gabe stieg das Serum-Calcium von 2,30 nmol/l um 0,01 nmol/l. In der Vergleichsgruppe fiel der Spiegel von 2,35 nmol/l um 0,05 nmol/l.

Der Mittelwert des Phosphat Wertes lag in dem Probandenkollektiv der subkutanen Verabreichung des Vitamin D initial bei 0,97 nmol/l und fiel um 0,05 nmol/l ab. Bei den Individuen, die intramuskulär behandelt wurden stieg der Phosphat-Wert von 1,01 nmol/l um 0,05 nmol/l an. In der Vergleichsgruppe fiel das Phosphat im Serum von 0,98 nmol/l um 0,04 nmol/l. Die Veränderung sämtlicher Parameter zeigten sich weder innerhalb noch zwischen den Gruppen signifikant.

Es wurden keine SAEs (serious adverse events) während dieser AMG-Studie verzeichnet.

Im Verlauf der Studie wurden 10 unerwünschte Ereignisse gemeldet, die keinen Zusammenhang mit der Studienmedikation aufwiesen. 7 Probanden erkrankten an einer Virusinfektion der oberen Atemwege, 2 Patienten infizierten sich mit dem Influenzavirus und einer erkrankte an einer Tonsillitis.

3.3 Verträglichkeit

Die Verträglichkeit der Injektionen sowie resultierende Lokalreaktionen wurden mit Hilfe einer subjektiven Verträglichkeitsskala 2, 6, 24, 48 und 72 Stunden nach Applikation der Studienmedikation durch die Prüfärztin erhoben (vgl. Tabelle 7.3).
Hierbei wurden Lokalreaktionen (rubor, calor und dolor) un d systemische Komplikationen zu einem Parameter zusammengefasst nach folgender Skala evaluiert:

VERTRÄGLICHKEIT	**SYMPTOME**
1 = sehr gut	keine
2 = gut	Lokalreaktion (< 2 cm)
3 = mäßig	Lokalreaktion (> 2 cm)
4 = schlecht	Milde systemische Komplikation z.B. Übelkeit, Erbrechen
5 = sehr schlecht	Schwere systemische Komplikation z.B. Extrasystolen, Bewusstseinsstörungen

Tabelle 3.3.1 Verträglichkeitsskala. Lokalreaktionen und Komplikationen wurden 2, 6, 24, 48 und 72 Stunden nach Applikation der Studienmedikation durch die Prüfärztin evaluiert.

Die Verträglichkeit war in den drei Verabreichungsgruppen zu allen Evaluationspunkten im Durchschnitt sehr gut. Probanden, die eine intramuskuläre Injektion erhielten gaben im Durchschnitt auf der Verträglichkeitsskala 2 Stunden nach Applikation 1,2 ± 0,6 (Range: 1 bis 3), nach 6 Stunden sowie nach 24 Stunden 1,4 ± 0,65 (Range: 1 bis 2), nach 2 und 3 Tagen 1,2 ± 0,44 (Range: 1 bis 2) an.
Probanden, die eine subkutane Injektion erhielten gaben im Durchschnitt auf der Verträglichkeitsskala 2 Stunden nach Applikation 1,5 ± 0,52 (Range: 1 bis 2), nach 6

Stunden 1,6 ± 0,51, nach 24 Stunden 1,5 ± 0,52 (Range: 1 bis 2), nach 2 Tagen 1,4 ± 0,51 und 3 Tagen 1,5 ± 0,52 (Range: 1 bis 2) an.

Probanden, die das Placebo erhielten gaben im Durchschnitt auf der Verträglichkeitsskala 2 Stunden nach Applikation 1,2 ± 0,44 (Range: 1 bis 2), nach 6 Stunden 1,5 ± 0,52, nach 24 Stunden 1,6 ± 0,77 (Range: 1 bis 3), nach 2 Tagen 1,4 ± 0,51 und 3 Tagen 1,3 ± 0,48 (Range: 1 bis 2) an. Es ließen sich zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen und Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede darstellen.

Somit wurde die Verträglichkeit der Injektion von der Prüfärztin mit gut bis sehr gut bewertet. Gering ausgeprägte Lokalreaktionen wurden erwartet und gelten nicht als unerwünschtes Ereignis (AE). Es gab keine unerwünschten Ereignisse sowie Nebenwirkungen.

BEHANDLUNGSGRUPPE	**2 STUNDEN**	**6 STUNDEN**	**24 STUNDEN**	**48 STUNDEN**	**72 STUNDEN**
Verum intramuskulär (n = 12)	1,2 ± 0,60	1,4 ± 0,65	1,4 ± 0,65	1,2 ± 0,44	1,2 ± 0,44
Verum subkutan (n = 13)	1,5 ± 0,52	1,6 ± 0,51	1,5 ± 0,52	1,4 ± 0,51	1,5 ± 0,52
Placebo (n=13)	1,2 ± 0,44	1,5 ± 0,52	1,6 ± 0,77	1,4 ± 0,51	1,3 ± 0,48

Tabelle 3.3.2 Auswertung der Verträglichkeit der Injektion. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardfehler der subjektiven Verträglichkeitsskala 2, 6, 24, 48 und 72 Stunden nach Applikation der Studienmedikation.

3.4 Pharmakokinetische Analysen

Die Pharmakokinetik der einmaligen Cholecalciferol Injektion (100.000 I.E.) wurde durch die 25-Hydroxyvitamin D Serumkonzentration der initial VD-defizienten Probanden in allen Behandlungsgruppen regelmäßig erfasst. Die Messungen wurden im Labor Berlin mit Hilfe eines Elektro-Chemilumineszenz-Immuno-Assays nach Abschluss und Entblindung der Studie analysiert (vgl. 3.3 Vitamin D-Messung).

Der Verlauf der 25-Hydroxyvitamin D Serumkonzentration wurde zu 4 Zeitpunkten gemessen (vgl. Tabelle 7.4).
Die Werte der Placebo-Subgruppen (intramuskulär und subkutan) wurden zusammengefasst.

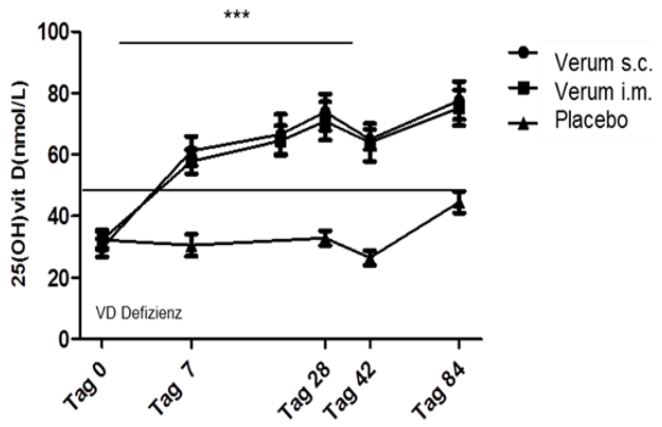

Abbildung 12. Verlauf des 25-Hydroxyvitamin D-Serumspiegels in den Behandlungsgruppen. Es werden Mittelwert und Standardfehler des Serum 25-Hydroxyvitamin D-Spiegels bei Vitamin D-defizienten Probanden (n = 38) nach einer einmaligen Dosis von 100.000 I.E. Cholecalciferol bzw. Placebo gezeigt. Die Verum-Injektion resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Serum 25-Hydroxyvitamin D Konzentrationen nach 7 Tagen ($p < 0,001$) und einen weiteren signifikanten Anstieg nach 28 Tagen ($p < 0,001$) (sekundäres Endziel der Studie). In der Placebogruppe zeigten sich stabil defiziente (< 50 nmol/l) Werte. Abkürzungen und Gesamtkohorte: Verum s.c. = Verum subkutan (n= 12), Verum i.m. = Verum intramuskulär (n=13) und Placebo (n=13).

Zu Beginn der Studie zeigten 21 Probanden (55 %) einen schwerem Vitamin D Mangel (< 31 nmol/L), 15 Probanden (40 %) einem Vitamin D Mangel (< 50 nmol/l) und 2 Probanden (5 %) eine Vitamin D Defizienz (50 nmol/l bis 55 nmol/l). Der Mittelwert und der Standardfehler des Serum 25-Hydroxyvitamin D Spiegels vor der Injektion waren homogen verteilt und zwischen den Gruppen in Bezug auf den Applikationsweg fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Der Mittelwert der initialen 25-Hydroxyvitamin D Serumkonzentration aller Probanden beträgt 31,0 nmol/l ± 10,9 nmol/l (Range: <12,5 nmol/l bis 55,1 nmol/l). In der Verum i.m. Gruppe lag er bei 31,3 nmol/l ± 16,9 nmol/l (Range: <12,5 nmol/l bis 49,7 nmol/l), in der Verum s.c. Gruppe bei 29,7 nmol/l ± 10,7 nmol/l (Range: 16,3 nmol/l bis 47,2

nmol/l) sowie in der Vergleichsgruppe bei 32,3 nmol/l ± 12,1 nmol/l (Range 17,8 nmol/l bis 55,1 nmol/l). An Tag 3 stieg die Serumkonzentration der Verum-Gruppen um 14,1 nmol/l. an. Der 25-Hydroxyvitamin D Serumwert 7 Tage nach der Injektion stieg in der Verum i.m. Gruppe auf 58,1 nmol/l ± 16,0 nmol/l, in der Verum s.c. Gruppe auf 61,2 nmol/l ± 17,2 nmol/l und blieb in der Placebo-Gruppe mit 33,1 nmol/l ± 9,5 nmol/l stabil.

Die 25-Hydroxyvitamin D Serum-Konzentration stieg in beiden Verum-Gruppen nach 28 Tagen (V8) signifikant. Zu diesem Zeitpunkt lag in der pharmakokinetischen Untersuchung der Maximalwert der 25-Hydroxyvitamin D Serumkonzentration. Im Vergleich zwischen der ersten Visite (Baseline, V1) und der Referenzvisite (Tag 28, V8) stieg der Vitamin D Spiegel im Durchschnitt um in der intramuskulär-verabreichten Verum-Gruppe um 40,0 nmol/l ± 20,8 nmol/l (p= < 0,03) (Range: 28,6 nmol/l bis 100,9 nmol/l), in der subkutan-verabreichten Verum-Gruppe 44,2 nmol/l ± 16,9 nmol/l (p= < 0,02) (Range: 43,4 nmol/l bis 110,6 nmol/l) und in der Placebo-Gruppe um 0,6 nmol/l ± 9,11 nmol/l (Range: 16,6 nmol/l bis 42,2 nmol/l) an.

Der 25-Hydroxyvitamin D Serumwert 2 Monate nach der Injektion fiel in der Verum i.m. Gruppe 58,0 nmol/l ± 21,6 nmol/l, in der Verum s.c. Gruppe 63,3 nmol/l ± 21,3 nmol/l sowie in der Placebo-Gruppe 26,4 nmol/l ± 6,6 nmol/l ab.

Die letzte Blutentnahme, 3 Monate nach der Injektion (Beginn der UV-reichen Monate), zeigte eine Zunahme in allen Gruppen des zirkulierenden Vitamin D im peripheren Blut. Der 25-Hydroxyvitamin D Serumwert stieg in der Verum i.m. Gruppe auf 73,4 nmol/l ± 22,5 nmol/l, in der Verum s.c. Gruppe auf 78,3 nmol/l ± 22,9 nmol/l und lag in der Placebo-Gruppe bei 44,5 nmol/l ± 12,6 nmol/l.

Der Verum Gruppenvergleich zwischen intramuskulärer und subkutaner Verabreichung von Vitamin D ergab zu keinem Zeitintervall signifikante Unterschiede.

Es zeigten sich keine Korrelationen zwischen Geschlecht, Alter oder BMI bezüglich der 25-Hydroxyvitamin D Serumwerte. Auch das Ausmaß des Anstiegs des UV-induzierten Vitamin D Serum Spiegels war unabhängig von diesen Parametern.

3.5 Einfluss auf den B-Lymphozyten Phänotyp

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss auf die Häufigkeit zirkulierender Vitamin D - sensitiver Immunzellen im Blut durch exogene Vitamin D-Zufuhr untersucht. Dafür wurden die Frequenzen der peripheren Blutzellpopulationen mittels der Durchflusszytometrie basierend auf ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) unterschieden.

Der Phänotyp Vitamin D-sensitiver B-Lymphozyten wurde durch die Kombination fluoreszierender Antikörper gegen bestimmte B-zellspezifische Antigene bestimmt. Dieses erfolgte durch die Vitamin D-abhängigen Marker mit spezifischen Subpopulationsmarkern auf $CD19^{+}$B-Zellen: naive B- Zellen (CD27-IgD+), Übergangs- B-Zellen (CD27+IgD+), B-Gedächtniszellen (CD27+IgD-).

Ferner wurden die Vitamin D-sensitiven B-Lymphozyten mittels des Vitamin D-induzierten Oberflächenmarkers CD38 wie folgt bestimmt: CD38+ naive B- Zellen (CD27-IgD+), CD38+ Übergangs- B-Zellen (CD27+IgD+), CD38+ B-Gedächtniszellen (CD27+IgD-) (vgl. Tabelle 7.5.1, Tabelle 7.5.2, Tabelle 7.5.3).

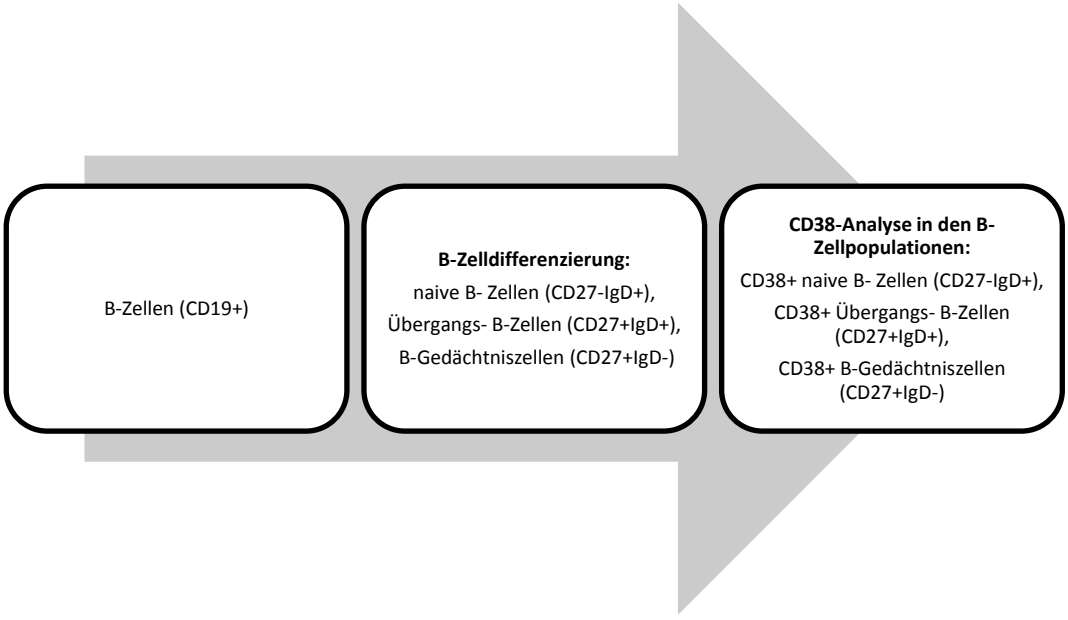

Abbildung 13. Übersicht zu den analysierten CD38+ B-Lymphozyten. Der Phänotyp der Vitamin D-sensitiven B-Lymphozyten wurde durch eine Kombination verschiedener fluoreszierender Antikörper bestimmt.

Die erste Visite (Tag 0) war der Ausgangswert und wird mit der fünften Visite (Tag 7) und im Verlauf mit der achten Visite (Tag 28) verglichen. Der nichtparametrische

Mann-Whitney-U-Test wurde zum Gruppenvergleich bei dieser Studie bei unabhängigen nicht normalverteilten Stichproben und kleiner Gruppengröße benutzt.

In Zusammenschau der Ergebnisse wies die Gesamtpopulation der CD19+ B-Zellen keine signifikanten Unterschiede in den verschieden Gruppen auf.
Die Daten zeigen, dass die Anzahl der CD27+-Gedächtnis-B-Zellen eine Woche nach Gabe von 100.000 I.E. Cholecalciferol um 0,58 % anstieg (von 1,29 % auf 1,87 %). Ein weiterer Anstieg von 1,37 % (auf 2,67 %) wurde 4 Wochen nach der Vitamin D Administration beobachtet. In der Kontrollgruppe erfolgte ebenfalls ein Anstieg der CD27+-Gedächtnis-B-Zellen um 1,60 % nach einer Woche (von 1,14%
auf 2,50 %) sowie nach 4 Wochen um 1,44% (auf 2,58 %).
Die B-Gedächtniszellen (CD27+IgD-) im Gruppenvergleich des prozentuallen Anstiegs von Visite 1 und Visite 8 waren vor der Injektion mit Vitamin D vergleichbar (Verum 17,47 % und Vergleichsgruppe 15,17 % der zirkulierenden Zellen im Blut). Zum Vergleichswert am Tag 28 Verum 21,92 % und Placebo 20,68 % sind die Frequenzen beider Gruppen nicht signifikant angestiegen. Im Vergleich zum Tag 7 ist die Anzahl der B-Gedächtniszellen in der Vergleichsgruppe um 4,26 % signifikant gestiegen (p = 0,04).
Die Frequenzen der naiven B- Zellen (CD27-IgD+) bei Visite 1 (Verum 63,37 % und Placebo 66,68 %) fallen im Verlauf bei der Placebo-Gruppe Visite 5 signifikant ab (Durchschnitt Delta Verum 1,67 % und Placebo -6,41 %) (p = 0,005).

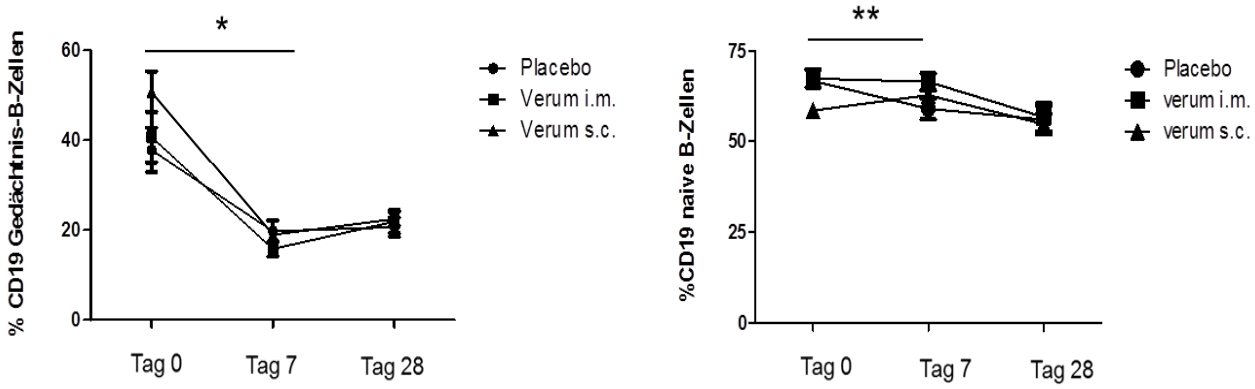

Abbildung 14. Anteil der B-Lymphozyten im Verlauf der Studie. Es werden Mittelwert und Standardfehler der zirkulierenden Immunzellen im peripheren Blut gezeigt. Verum intramuskulär n = 12, Verum subkutan n = 13, Placebo n = 13.

Die Frequenzen der naiven B- Zellen (CD27-IgD+) bei Visite 1 (Verum 63,37 % und Placebo 66,68 %) fallen im Verlauf bei der Placebo-Gruppe Visite 5 signifikant ab (Durchschnitt Delta Verum 1,67 % und Placebo - 6,41 %) ($p = 0,005$).
Die B-Gedächtniszellen sind im Vergleich zu Tag 7 ist die Anzahl in der Vergleichsgruppe um 4,26 % signifikant gestiegen ($p = 0,04$).

Es wurden CD27+ CCR10+ CD38+ Plasmablasten, CCR10+ CD38+ naive B-Zellen, CCR10+ CD38+ Gedächtnis-B-Zellen sowie CD27+ CCR10+ terminal differenzierte B- Zellen in der vorliegenden Studie analysiert. Die statistische Analyse wies weder signifikanten Unterschiede auf noch fand sich eine Korrelation mit dem 25-Hydroxyvitamin D Serumspiegel.

3.6 Anteil im Blut zirkulierender Vitamin D sensitiver CD38+ B-Lymphozyten

Das primäre Endziel dieser Studie war die Bestimmung des Anteils (in %) im peripheren Blut zirkulierender $CD38^+$ B-Zellen im vorher-nachher Vergleich (V1 und V8) nach intramuskulärer sowie subkutaner Vitamin D-Injektion, da dieser Marker nach Aktivierung des Vitamin D-Rezeptors (VDR) *in vitro* hochreguliert wird[67].
Die Frequenzen der peripheren B-Zellpopulationen wurden mittels Durchflusszytometrie basierend auf ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) unterschieden und ließen sich mittels des B-Zell Oberflächenmarkers CD27 und dem Vitamin D-sensitiven Antigen CD38 in CD38+ Gedächtnis-B-Zell -, CD38+ naive B-Zell - und CD38+ CD27+ Antikörper-sezernierende Zellpopulationen einordnen.
Gemäß Studienprotokoll wurde für die statistische Auswertung Visite 8 (Tag 28) als Vergleichsparameter gewählt, da der Vitamin D-Spiegel zu diesem Zeitpunkt seinen Maximalwert (Cmax) erreicht.
Die CD38 Frequenzen der Plasmazellen beider Verum-Gruppen korrelieren nicht mit dem 25-Hydroxyvitamin D Plasmaspiegel.
Mittels der Kovarianz-Analyse wurde ermittelt, dass in allen Gruppen der initiale 25-Hydroxyvitamin D Baseline-Wert keinen Einfluss auf den Endbefund hat. Die CD38+ B-Lymphozyten zeigen zu jedem Zeitpunkt und in allen Applikationsgruppen weder eine Korrelation, noch zeigen sie eine statistische Beziehung zu der Vitamin D Serum-Konzentration.

In der Kovariaten-Berechnung zeigte sich, dass nach der Gabe von Cholecalciferol Zellen stimuliert werden, jedoch hat die Höhe des Vitamin D Spiegels keinen Einfluss auf das Ausmaß der Zellaktivierung.

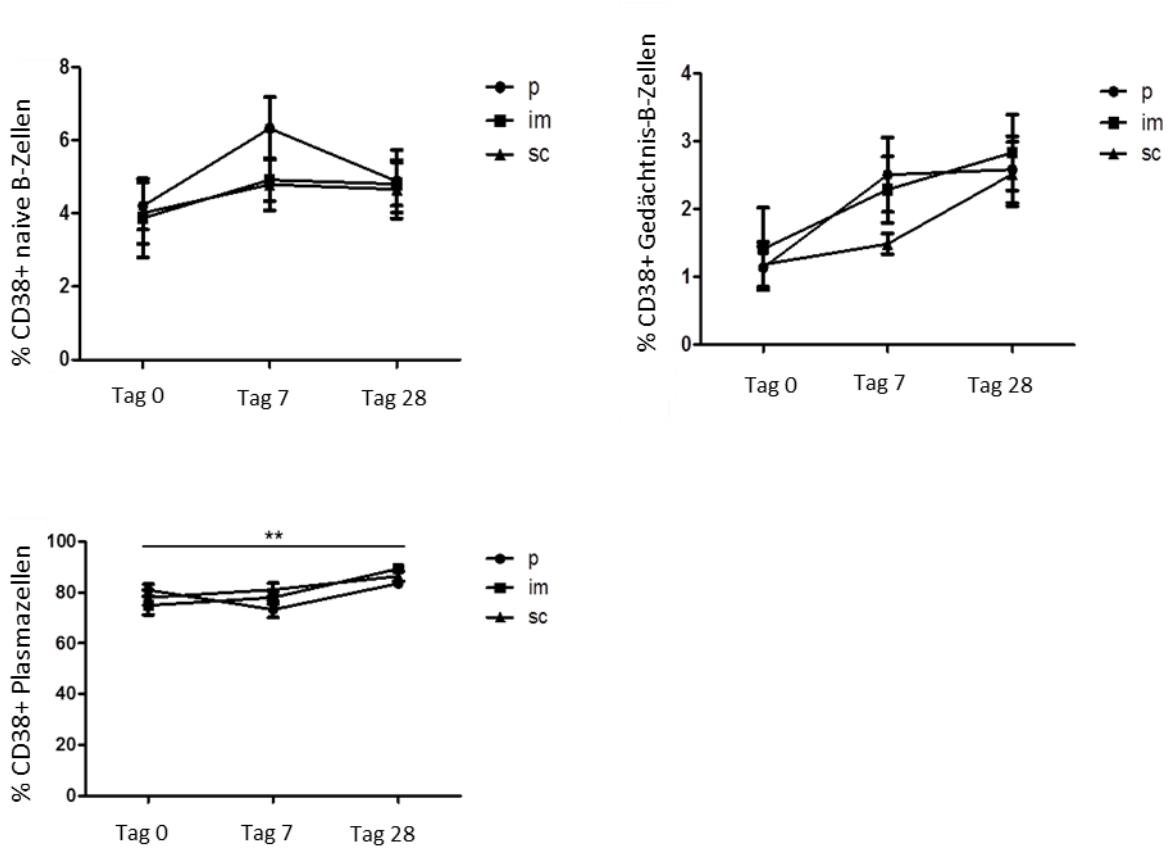

Abbildung 15. Gruppenvergleich der CD38+ B-Lymphozyten an Tag 0, Tag 7 und Tag 28. Es werden Mittelwert und Standardfehler von CD38+ naiven B-Zellen, CD38+ Gedächtnis-B-Zellen, -und CD38+ Antikörper-sezernierende Zellen im Verlauf vor und nach der Injektion dargestellt. Es wurden Zellpopulationen mittels Mann-Whitney-U-Test im Gruppenvergleich vor (Tag 0) und einen Monat (Tag 28) nach Vitamin D Gabe analysiert. Die CD38+ Plasmazellen steigen in der Verum-Gruppe signifikant an ($p < 0,01$). Verum intramuskulär n = 12, Verum subkutan n = 13, Placebo n = 13.

Parameter	**Verum-Gruppe**	**Kontrollgruppe**	**p-Wert**
CD38$^+$ Gedächtnis- B-Zellen	1,37 (2,21)	1,45 (2,07)	
i.m.	1,42 (2,67)		
s.c	1,33 (1,80)		
CD38$^+$ naive B-Zellen	0,78 (3,45)	0,67 (2,88)	
i.m.	0,93 (3,75)		

s.c.	0,65 (3,30)		
CD38$^+$ Plasmazellen	11,33 (9,91)	2,62 (9,11)	0,01
i.m.	14,48 (11,58)		0,01
s.c.	8,42 (7,37)		

Tabelle 3.5. Prozentueller Anstieg der CD38 Frequenzen in den B-Zellpopulationen an Tag 0 und Tag 28. Es werden Mittelwert und Standartabweichung mittels der Oberflächenmarker CD38+ Gedächtnis-B-Zell -, CD38+ naiven B-Zell und CD38+ CD27+ Antikörper-sezernierende Zellen dargestellt. Die CD38+ Plasma-Zellen steigen in der Verum Gruppe signifikant an ($p < 0,01$). Alle Angaben sind in %. Abkürzungen: i.m. = intramuskulär, s.c. = subkutan.

In Zusammenschau der Punktewolkendiagramme der einzelnen Patienten ist zu beobachten, dass der Anteil der Plasmazellen und der CD38+ B-Zellen verschiedene Verläufe in Unabhängigkeit der Vitamin D Gabe zeigen. Man kann im Verlauf der Studie bei einzelnen Probanden einen Anstieg oder Abfall der Frequenzen der CD38+ Zellen nach Vitamin D Gabe verzeichnen. Jedoch ist in der Placebo-Gruppe der Verlauf der Frequenzen der CD38+ Zellen variabel.

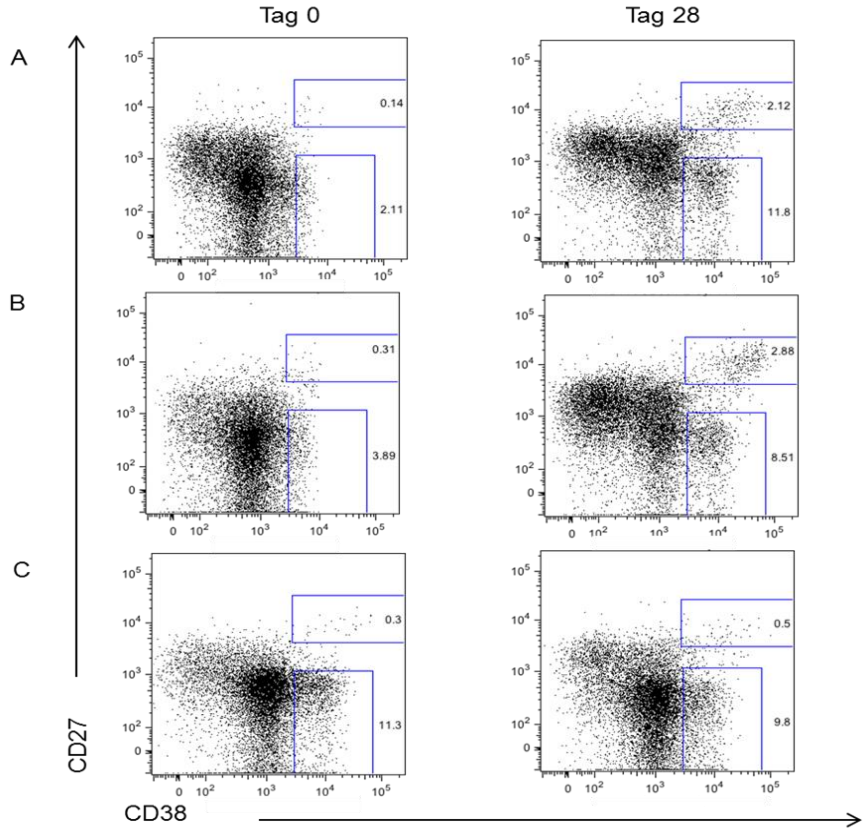

Abbildung 16. Frequenzen zirkulierender CD38+ B-Zellen im peripheren Blut im Verlauf. Die Frequenzen der peripheren B-Zellpopulationen wurden mittels Durchflusszytometrie basierend auf ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) unterschieden und ließen sich mittels dem B-Zell Oberflächenmarker CD 27 und dem VD-sensitiven Antigen CD38 in Zellpopulationen einordnen. Der obere Kasten in der Graphik zeigt die Plasmazellen und der untere zeigt den Gesamtanteil der CD38 + Zellen. Exemplarisch sind hier verschiedene Verläufe in Abhängigkeit der Vitamin D Gabe dargestellt.
A Verlauf der Frequenzen der CD38+ Zellen nach Vitamin D Gabe.
B Verlauf der Frequenzen der CD38+ Zellen ohne Vitamin D Gabe.
C Verlauf der Frequenzen der CD38+ Zellen nach Vitamin D Gabe.

3.7 Einfluss auf den T-Lymphozyten Phänotyp

Der Phänotyp der Vitamin D-sensitiven T-Zellen wurde auch hier durch eine Kombination multipler fluoreszierender Antikörper der verschiedenen Zellpopulationen zugeordnet. $CD4^+$ ist ein Oberflächenmarker, der T-Lymphozyten von anderen Zellen im peripheren Blut unterscheidet. Mittels der Marker CD45RA sowie CCR7 wurden Subpopulationen wie naive T-Zellen (CD45RA+), zentrale T-Effektorzellen (CCR7+) und zentrale T-Gedächtniszellen (CD45RA+, CCR7+) bestimmt. Des weitern wurden CD38+ naive T-Zellen (CD45RA+), CD38+ zentrale T-Effektorzellen (CCR7+) sowie
CD38+ zentrale T-Gedächtniszellen (CD45RA+CCR7+) analysiert (vgl. Tabelle 7.6.1, Tabelle 7.6.2, Tabelle 7.6.3).

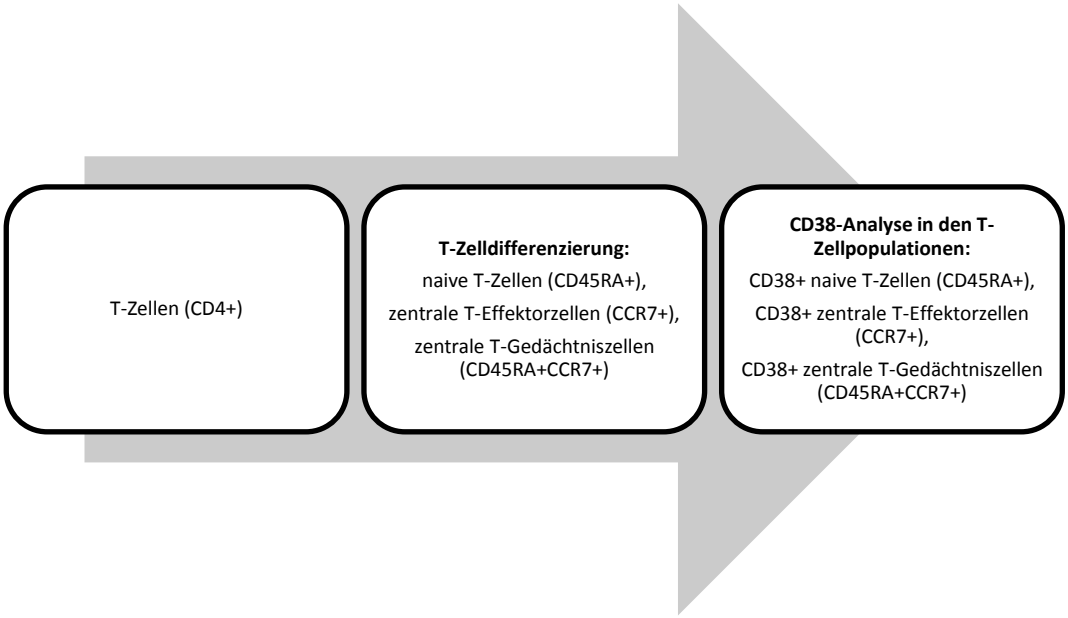

Abbildung 17. Übersicht zu den analysierten CD38+ T-Lymphozyten. Der Phänotyp der Vitamin D-sensitiven T-Lymphozyten wurde durch eine Kombination verschiedener fluoreszierender Antikörper bestimmt.

Die Frequenzen CD4+ der T- Zellen fielen in der ersten Woche in der Placebo-Gruppe (32,29 %) signifikant um 7,78 % ab (p= 0,003). In der Verum-Gruppe waren die CD 4+-Zellen im Verlauf stabil.

Die naiven T-Zellen (CD45RA+) in allen Gruppen und Sub-Grupppen blieben zu allen gemessenen Zeitpunkten stabil (initial Verum 60,6 % und Placebo 66,4 %).

Die Frequenzen der zentralen T-Effektorzellen (CCR7+) waren bei den Patienten, die VD erhalten haben eine Woche nach der Injektion um 6,43 % signifikant angestiegen (p= 0,04). Initial lag der Wert bei 1,75 % und stieg bei der konsekutiven Kontrolle auf 8,18 % an.

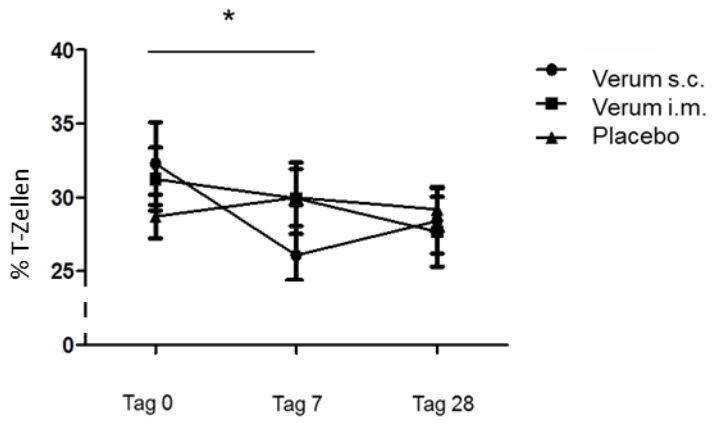

Abbildung 18. Anteil der T-Lymphozyten im Verlauf der Studie. Es werden Mittelwert und Standardfehler der zirkulierenden Immunzellen im peripheren Blut gezeigt. Verum intramuskulär n = 12, Verum subkutan n = 13, Placebo n = 13.
Die Die T- Zellen (CD 4+) fielen in der ersten Woche in der Placebo-Gruppe (32,29 %) signifikant um 7,78 % ab (p= 0,003).

3.8 Einfluss auf den Monozyten Phänotyp

CD14 ist ein Monozyten-spezifischer Oberflächenmarker. Mit Hilfe von CD16 wurden Monozytenpopulationen analysiert, die von Vitamin D aktiviert werden können. Dabei diente HLA-DR als Aktivierungsmarker. Es wurden CD16+ HLA-DR+, CD16+ HLA-DR-, CD16- HLA-DR+ sowie CD16- HLA-DR- Monozyten (CD14+) analysiert.
Die Monozyten und deren Oberflächenmarker wiesen keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Gruppen auf. Die Korrelation dieser Werte mit dem 25- Hydroxyvitamin D Spiegel zeigten keine signifikanten Veränderungen (vgl. Tabelle 7.7.1, Tabelle 7.7.2, Tabelle 7.7.3).

3.9 Analyse der virusspezifischen humoralen IgG-Antwort

Biologisch aktives Calcitriol hat eine direkte Auswirkung auf die B-Zell-Antwort, Plasmazelldifferenzierung und konsekutiv die Immunglobulin-Produktion[1]. Mit Hilfe eines ELISA wurde die Immunantwort gegen definierte Antigene vor (Tag 0) und nach (Tag 28) der Vitamin D-Supplementierung gemessen (vgl. Tabelle 7.8).
Es wurden Epstein-Barr-Virus -, Cytomegalovirus -, und Varizella-Zoster-Virus-Antikörper gewählt, die eine hohe Durchsäuchungsprävalenz in Deutschland besitzen.
In der Studienpopulation wurden bei >95 % der Probanden positive IgG- Epstein-Barr-Virus Werte (EBV, Human Herpesvirus-4, HHV-4) gemessen. In der Gruppe, die subkutan appliziertes Vitamin D bekamen, stiegen die Werte um 0,3 %, in der intramuskulären Gruppe fielen die Antikörper einen Monat nach Substitution um 0,4 %. In der Placebo-Gruppe blieben die Werte konstant.

Der Cytomegalovirus (CMV, HHV-5) hatte eine Latenz von 30% in der vorliegenden Studienkohorte. In der Verum stiegen die Titer 0,2 % an und in der Vergleichsgruppe zeigte sich eine abnehmende Tendenz der IgG-Werte.

90% der Probanden wiesen Varizella-Zoster-Virus (VZV, HHV-3) Antikörper auf. Diese stiegen bei den mit Vitamin D-behandelten Probanden um 0,1 % und blieben in der Vergleichsgruppe stabil.

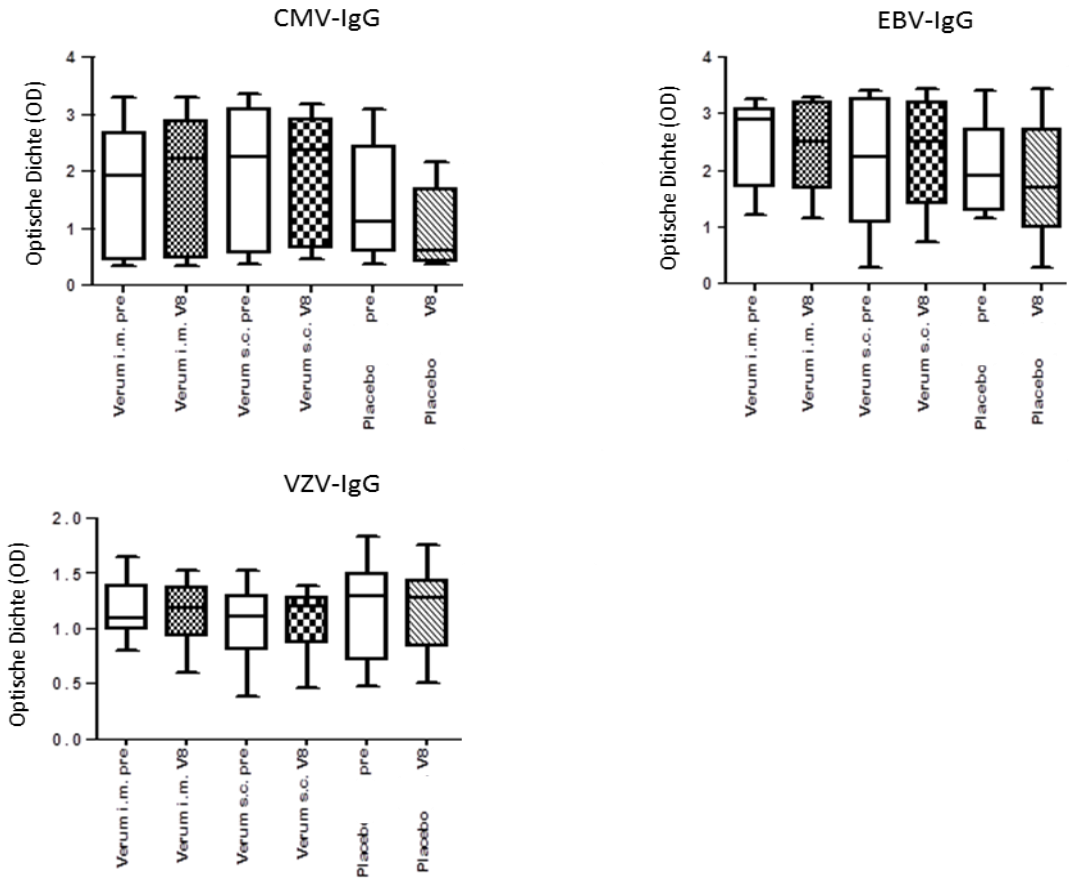

Abbildung 19. IgG gegenüber Epstein-Barr-Virus -, Cytomegalovirus -, und Varizella-Zoster-Virus am Tag (pre) der 25-Hydroxyvitamin D Supplementierung und nach 28 Tagen. Gezeigt wird der Mittelwert der optischen Dichte (OD) der drei verschiedenen Applikationsgruppen. Verum intramuskulär n = 12, Verum subkutan n = 13, Placebo n = 13. Die optische Deichte spezifischen Antikörper liegt auf der Y-Achse und ist im Verlauf der Studie stabil und statistisch nicht signifikant verschieden.

PARAMETER	CMV (DU/ML)	CMV (DU/ML)	EBV (DU/ML)	EBV (DU/ML)	VZV (DU/ML)	VZV (DU/ML)
Zeitpunkt	Tag 0	Tag 28	Tag 0	Tag 28	Tag 0	Tag 28

Median Verum i.m.	8310,2	9990,8	57,5	49,6	8,6	20,0
Median Verum s.c.	10000,0	10700,0	44,7	49,9	10,6	20,3
Median Placebo	3801,8	614,9	37,0	33,9	10,0	19,1

Tabelle 3.9. Virusspezifische humorale IgG-Antwort in DU/ml an Tag 0 und Tag 28. Es wird der Median in DU/ml dargestellt. Abkürzungen: i.m. = intramuskulär, s.c. = subkutan.

3.10 Einfluss des UV-Index auf die 25-Hydroxyvitamin D Serumkonzentration

Das Bundesamt für Strahlenschutz und das Umweltbundesamt messen seit 20 Jahren im Verbund mit weiteren Institutionen die solare UV-Einstrahlung in der Bundesrepublik Deutschland.

Der UV-Index (UVI) ist ein Maß für die UV-Strahlung, die bei ungeschützter Haut einen Sonnenbrand hervorrufen kann. Der UVI wird jeden Tag evaluiert und zeigt die UV-Strahlung (niedrig, mittel, hoch, extrem hoch und extrem hoch) an. In Abhängigkeit von der Sonnenexposition werden verschiedene Maßnahmen empfohlen, die von keinem Schutz mit gefahrlosem Aufenthalt über Schutz (in der Mittagszeit Schatten aufsuchen, T-Shirt anziehen, Sonnencreme tragen und Hut aufsetzen) und schließlich besonderen Schutz, der die Meidung der Sonnenexposition empfiehlt, reichen.

UV INDEX	**EINSTUFUNG**	**MAßNAHMEN**
1 – 2	Niedrig	Kein Schutz notwendig
2 – 5	Mittel	Kein Schutz notwendig
6 – 7	Hoch	Schutz notwendig
8 - 10	Sehr hoch	Besonderer Schutz notwendig
11 +	Extrem hoch	Besonderer Schutz notwendig

Abbildung 20. Der UV-Index. Der UVI wird jeden Tag evaluiert und zeigt die UV-Strahlung (niedrig, mittel, hoch, extrem hoch und extrem) an. Abhängig von Sonnenexposition wird empfohlen keinen Schutz, Schutz oder besonderen Schutz zu tragen.

Vom Bundesamt für Strahlenschutz konnte der UVI für jeden Tag der Studie abgerufen werden. Die zwei nächsten Messpunkte, Standort Lindenberg (715 km südlich von Berlin) und Standort Zingst (287 km nördlich von Berlin), dienten zur Datenanalyse (vgl. Tabelle 7.9). Diese wurden im Durchschnitt zusammengefasst und sind als repräsentativ für die Stadt Berlin einzuordnen.

Die Spannweite des UVI war im Laufe der Studie niedrig bis hoch (1 bis 6). Der UVI betrug im Februar 0,8 ± 0,4, im März 2,0 ± 0,7, im April 3,0 ± 1,2 und im Mai 4,0 ± 0,8.

Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der 25-Hydroxyvitamin D Serumkonzentration aller Behandlungsgruppen und dem Durchschnittswert des UVI der beiden Standorte.

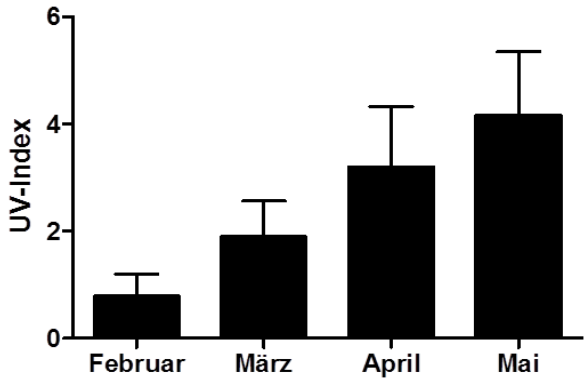

Abbildung 21. Der UV-Index von Februar bis Mai 2013 im Raum Berlin.
Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler der Daten des Standortes Lindenberg (715 km südlich von Berlin) und des Standortes Zingst (287 km nördlich von Berlin).

4 DISKUSSION

4.1 Studienpopulation

Die vorliegende Studie wurde von 38 Probanden abgeschlossen. Davon waren mehr als ein Drittel weiblichen Geschlechts und das Durchschnittsalter der Gesamtgruppe lag bei 34 Jahren (± 11 Jahre) mit einer Altersspanne zwischen 20 und 60 Jahren. Die Zusammensetzung beider Gruppen bezüglich des Alters, ethnischer Herkunft, Größe und Gewicht war vergleichbar. Dennoch ist die Geschlechterverteilung nicht ausgewogen und es sind nicht alle Altersgruppen vertreten. Gemäß des Studienprotokolls durften Männer und Frauen im Alter von 18 bis 60 Jahren eingeschlossen werden.

Frühere Studien belegen, dass Kleinkinder[69] und Menschen geriatrischen Alters[70] verstärkt an Vitamin D Mangel leiden. Im Umkehrschluss müsste man erwägen, dass es in der Studienkohorte prädispositionierte Gruppen (z.B. postmenopausale Frauen) geben könnte, die pharmakokinetisch sowie immunologisch verändert auf eine Vitamin D Substitution reagieren könnten.

Eine aktuelle Studie aus Italien zeigt, dass mehr als 30 % der Kleinkinder einen Vitamin D Mangel aufweisen[69]. Besonders adipöse Neugeborene haben eine verstärkte Prädisposition (fast 50 %) eine Hypovitaminose zu entwickeln. Es ist anzunehmen, dass in unseren Breitengraden eine höhere Defizienz vorliegt. Hier wäre für die weitere Forschung interessant, wie die pädiatrische und geriatrische Kohorte auf eine Cholecalciferol Substitution pharmakokinetisch und immunologisch reagieren würde.

In die Studienkohorte wurden 10 Probanden mit therapiepflichtigen chronischen Krankheiten wie arteriellen Hypertonus, Asthma bronchiale, Diabetes mellitus Typ II und Hypothyreoiditis eingeschlossen. Es ist bekannt, dass Patienten mit chronischen Krankheiten eine Prädisposition zu einer Hypovitaminose D aufweisen können und somit nicht mit der gesunden Kohorte verglichen werden können[71]. Für weitere Untersuchungen wäre die Rekrutierung einer Studienpopulation mit größerer Vergleichbarkeit hinsichtlich des Alters, Geschlechts und Morbidität sinnvoll um einen stärkere Homogenität des Untersuchungskollektivs zu gewährleisten.

4.2 Sicherheit

Bei der ersten Visite wurde eine detaillierte und vollständige Anamnese der Probanden, eine körperliche Untersuchung durchgeführt und die Vitalparameter erhoben, um potenzielle Gefährdung des Patienten sowie mögliche Protokollverletzungen zu vermeiden.
Die klinische Sicherheit wurde durch Laborparameter wie Serum-Kalzium, Serum-Phosphat, Serum-Kreatinin, Alanin-Aminotransferase (ALT), Gamma-Glutamyltransferase (GGT) und Differentialblutbild überprüft.
Die Pharmakokinetik wurde mittels der 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration überwacht, die in einem späteren Kapitel diskutiert wird (vgl. 4.4 Vitamin D Pharmakokinetik). Bei Frauen im gebärfähigen Alter wurde eine Schwangerschaft vor der Randomisierung ausgeschlossen, da das Präparat ist in der Gravidität kontraindiziert ist.
Die Probanden wurden darauf hingewiesen bei akuten Symptomen wie Herzrhythmusstörungen (z.B. Extrasystolen), Übelkeit, Erbrechen, psychischen Symptomen (Reizbarkeit, Depressionen und Psychosen) oder Bewusstseinsstörungen das Studienzentrum umgehend zu kontaktieren. Bei dem Verdacht auf das Vorliegen einer Vitamin D-vermittelten Toxizität lag ein Notfallplan vor.
Alle Laborwerte waren bei Einschluss und im Verlauf der Studie normwertig oder klinisch nicht signifikant. Es wurden keine unerwünschten Ereignisse beobachtet.

4.3 Verträglichkeit

Die Verträglichkeit der Injektionen sowie resultierende Lokalreaktionen wurden mit Hilfe einer subjektiven Verträglichkeitsskala 2, 6, 24, 48 und 72 Stunden nach Applikation der Studienmedikation erhoben. Es wurden subjektives Wohlbefinden, Lokalreaktionen und systemische Reaktionen zu einem Parameter zusammengefasst und durch die Prüfärztin bewertet. Die Verträglichkeit war im Durchschnitt in allen Applikationsgruppen sehr gut. Als kritisch zu betrachten ist die gemeinsame Evaluation des Fragebogens. Eine genauere Beurteilung könnte man

mit einer objektiven Bewertung der Lokalreaktion oder systemischen Reaktion durch den Mediziner und eine subjektive Bewertung des Befindens durch den Probanden mit zwei verschiedenen und unabhängigen Fragebögen schaffen.
Erfahrungsgemäß unterscheidet sich die Verträglichkeit der beiden Applikationswege, da die tiefe intramuskuläre Injektion subjektiv ein höheres Schmerzempfinden hervorruft. Auch sind die möglichen Komplikationen einer intramuskulären Gabe wie Muskelfibrose, aseptische Muskelnekrose, Lungenembolie sowie zerebrale Mikroembolie schwerwiegender als bei der subkutanen Verabreichung.

4.4 Vitamin D Pharmakokinetik

Cholecalciferol ist ein fettlösliches Prohormon. Es wird in der Haut aus 7-Dehydrocholesterol durch UVB-Strahlung induziert oder in geringen Mengen mit der Nahrung aufgenommen. Über die Lymphe gelangt es in das Blutsystem. Im peripheren Blut wird es bis zu >90 % an das Vitamin D-bindende Protein gebunden transportiert und hat eine Halbwertszeit von 19 bis zu 25 Stunden. Es wird in den Adipozyten gelagert oder in der Leber zu Calcidiol hydroxyliert und wird anschließend im Blut erneut an das Vitamin D-Bindungsprotein geknüpft. Dort hat es eine Halbwertszeit von 19 Tagen bis zu 4 Monaten.
In den Zielgeweben wird es zu seiner aktiven Form, dem Calcitriol, hydroxiliert und hat eine Halbwärtszeit von 3 bis 5 Tagen bis es zur wasserlöslichen Calcitroinsäure über die Galle ausgeschieden wird.
Cholecalciferol ist die Vorstufe des aktiven Vitamin D und wird als Monopräparat zur Prävention und Behandlung eines Vitamin D-Mangels eingesetzt.
Der Vitamin D-Status wird über den Blutspiegel des 25-Hydroxycholecalciferol in nmol/l bestimmt. Ein Vitamin D-Mangel ist durch Cholecalciferol Serumkonzentrationen unter 50 nmol/l definiert und entsteht bei unzureichender UV-Exposition sowie durch mangelnde Vitamin D Nahrungsaufnahme[22].
Die Vitamin D-Insuffizienz hat multiple Ätiologien und Risikofaktoren. Die therapeutische Gabe von oralen Vitamin D Präparaten wird bei Knochenstoffwechselstörungen[72], Autoimmunkrankheiten[73], Karzinomen[74] sowie Herzkreislauf Krankheiten[75] empfohlen. Andere prädisponierte Patientengruppen

sind ältere Menschen, Patienten mit UV-Expositionskarenz oder einer chronischen Störung des Immunsystems. Daher ist es wichtig für diese Patienten eine adäquate Vitamin D Substitution zu gewährleisten. Es gibt zahlreiche Vitamin D Präparate in verschiedenen Darreichungsformen z.B. oral oder zur Injektion. Die First-Line Therapie in Deutschland wird als orale Gabe empfohlen. Die intramuskuläre Injektion von Vitamin D ist indiziert z.B. bei Malabsorption, Verdauungsstörungen, chronischen Darmerkrankungen, biliärer Leberzirrhose sowie nach Magen - oder Darmresektion.
In der vorliegenden Studie wurde den Vitamin D-Insuffizienten gesunden Probanden 100.000 I.E. Cholecalciferol intramuskulär appliziert. Diese Darreichungsform ist in Deutschland seit 40 Jahren zugelassen und wird bei Bedarf alle 3 Monate wiederholt injiziert. Die Pharmakokinetik der Patientenkohorte, die eine tiefe intramuskuläre Injektion erhielten, wies eine rasche Anflutung der 25-Hydroxyvitamin D Serumkonzentration auf. Bereits vor dem 7. Tag nach der Applikation befand sich der durchschnittliche 25-Hydroxycholecalciferol Serumspiegel über der Defizienzgrenze von 50 nmol/l. Im weiteren Verlauf zeigte sich, dass die Höchstkonzentration (Cmax) am Tag 28 erreicht wurde (58,1 nmol/l ± 16,0 nmol/l) und anschließend stetig fiel.
In der der subkutanen Cholecalciferol Injektionsgruppe wurde am Tag 28 im Durchschnitt eine höhere 25-Hydroxyvitamin D Serumkonzentrationen erreicht (61,2 nmol/l ± 17,2 nmol/l) bei einem niedrigerem Ausgangswert (i.m. Gruppe 31,3 nmol/l ± 16,9 nmol/l, Range: <12,5 nmol/l bis 49,7 nmol/l und s.c. Gruppe 29,7 nmol/l ± 10,7 nmol/l, Range: 16,3 nmol/l bis 47,2 nmol/l). Die Vitamin D Serumkonzentration der Probanden, die eine subkutane Injektion erhalten haben, sind im Durchschnitt 3,1 nmol/l mehr angestiegen als die intramuskuläre Verum-Vergleichsgruppe.
Die Verträglichkeit der beiden Applikationswege unterscheidet sich initial, da die tiefe intramuskuläre Injektion subjektiv höheres Schmerzempfinden hervorrief. Auch sind die möglichen Komplikationen wie Muskelfibrose, aseptische Muskelnekrose, Lungenembolie sowie zerebrale Mikroembolie schwerwiegender als die der subkutanen Verabreichung. Genaue Kenntnisse zur Pharmakokinetik eines Medikamentes sind ein essentieller Teil für die Zulassung eines neuen Applikationswegs. Entsprechende Daten wurden in den letzten Jahrzehnten zu dem vorliegenden Vitamin D Präparat in den jeweiligen Phasen der Entwicklung des Supplements durch Studien und klinische Erfahrungsberichte gewonnen[76]. Prozesse der Liberation, Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion beeinflussen die Pharmakokinetik[77]. Die analytische Bestimmung der Arzneimittelkonzentration im peripheren Blut (therapeutic drug monitoring) wird in der Therapie mit Arzneistoffen

angewendet, um die genaue Dosierung zu ermitteln und die Therapie zu verfolgen[78]. Von Relevanz ist dies bei der Zulassung von Generika oder neuer Darreichungsformen. Der Hersteller ist verpflichtet die Bioäquivalenz zu demonstrieren, also die Vergleichbarkeit der Bioverfügbarkeit des jeweiligen Präparates mit dem Originalprodukt darzustellen. In diesem Fall ist die Bioverfügbarkeit der subkutanen Darreichungsform im Vergleich zu der zugelassenen intramuskulären um 17,5 % gesteigert. Aufgrund der multiplen Vorteile wie potenzierte Bioverfügbarkeit, reduziertes subjektives Schmerzempfinden und geringeres Risiko für Komplikationen wird eine Zulassung für die subkutane Verabreichung des Vitamin D Präparats derzeit beantragt.

4.5 Vitamin D - vermittelte Wirkung auf Immunzellen

Das biologisch aktive Calcitriol zeigt immunmodulatorische Effekte auf Zellen des angeborenen- und des adaptiven Immunsystems. Die Funktionalität und Aktivierung von T- und B-Lymphozyten durch Calcitriol wird von dem VDR und dem Enzymkomplex CYP27B beeinflusst[79]. Die endogene Calcitriol-Synthese wird nach Aktivierung des Immunsystems bei suffizientem 25-Hydroxyvitamin D Spiegel initiiert.

In dieser Arbeit wurde der Anteil von CD38+ Vitamin D-reagierenden B-Lymphozyten im peripheren Blut im vorher-nachher Vergleich nach einmaliger intramuskulärer sowie subkutaner Applikation von 100.000 I.E. Cholecalciferol bei Probanden mit Vitamin D Mangel untersucht. Die Kernfragen dieser Arbeit beschäftigen sich mit der Häufigkeit zirkulieren Vitamin D-reagierender Immunzellen im peripheren Blut, der Zellcharakteristik und dem Einfluss von Vitamin D auf die humorale Immunität.

In der vorliegenden Studie war die Vitamin D Supplementation unter der genannten Therapie erfolgreich. Alle Probanden, die Cholecalciferol erhielten, wiesen einen Anstieg des 25-Hydroxyvitamin D Plasmaspiegels auf.

Der Oberflächenmarker CD38 wird nach Aktivierung des Vitamin D-Rezeptors (VDR) *in vitro* hochreguliert und diente in dieser Studie zur Identifizierung der Vitamin D-responsiven B-Lymphozyten[80]. CD38 wird auch auf der Zelloberfläche T-Zellen[81] sowie Plasmazellen[82] exprimiert.

Mittels einer randomisierten placebokontrollierten AMG-Studie wurde das periphere Blut von Vitamin D-defizienten gesunden Probanden gewonnen.

Die peripheren B-Zellpopulationen wurden mittels Durchflusszytometrie basierend auf ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) unterschieden und ihre Frequenzen ließen sich mittels dem B-Zell Oberflächenmarker CD 27 und dem Vitamin D-sensitiven Antigen CD38 in CD38+ Gedächtnis-B-Zell -, CD38 naive B-Zell - und CD38+ CD27+ Antikörper-sezernierende Zellpopulationen differenzieren.

In der Literatur zeigt die Analyse der CD19+ B-Zellen signifikant erhöhte Frequenzen der CD38+ CD27- B-Lymphozyten nach adäquater Supplementation mit Vitamin D[1].

Dies zeigte sich ebenfalls in der vorliegenden Studie bei einigen Probanden, bestätige sich allerdings in der statistischen Analyse unter Berücksichtigung aller Probanden als nicht signifikant. In Zusammenschau der Punktewolkendiagramme (vgl. Abbildung 15) der einzelnen Patienten ist zu beobachten, dass der Anteil der Plasmazellen und der CD38+ B-Zellen verschiedene Verläufe unabhängig der Vitamin D Gabe zeigen. Man kann im Verlauf der Studie bei einzelnen Probanden einen Anstieg oder Abfall der Frequenzen der CD38+ Zellen nach Vitamin D Gabe verzeichnen. Auch in der Placebo-Gruppe ist der Verlauf der Frequenzen der CD38+ Zellen nicht stabil.

Hier könnten biologische Parameter wie Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Ausmaß körperlicher Aktivität, Blutfluss, Organgröße z.B. die Milz sowie Atmung einen Einfluss haben. Die Studienpopulation ist durch die Ein – und Ausschlusskriterien relativ homogen verteilt und Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Ernährung, Ausmaß körperlicher Aktivität sowie anatomische Abmessungen beachtet. Auch könnten physikalisch-chemische Parameter wie die metabolische Umsatzrate, Löslichkeit sowie Proteinbindungskonstante die Ergebnisse beeinträchtigen. Ein anderer wichtiger Faktor für die geringe CD38 Induktion bei den B-Lymphozyten könnte an einem zu niedrigen 25-Hydroxyvitamin D Spiegel liegen. Im Vergleich mit der ersten Visite (vor Vitamin D Gabe) zur Referenzvisite (1 Monat nach Gabe) steigt der Vitamin D Spiegel im Durchschnitt in der intramuskulär-verabreichten Verumgruppe um 40,0 nmol/l ± 20,8 nmol/l ($p < 0,03$) (Range: 33,3 nmol/l bis 100,9 nmol/l) und in der subkutan-verabreicheten Verumgruppe 44,2 nmol/l ± 16,9 nmol/l ($p < 0,02$) (Range: 43,4 nmol/l bis 110,6 nmol/l) an. Im Rückschluss würde diese Beobachtung heißen, dass 50 % der Probanden beider Applikationswege nach der einmaligen

Cholecalciferol Gabe einen Plasmaspiegel unter 75 nmol/l aufwiesen und somit unzureichend supplementiert wurden.

In einer aktuellen Studie mit vergleichbarer Teilnehmeranzahl wurde die Wirkung von 20.000 I.U. Cholecalciferol pro Tag für 12 Wochen auf CD19+ CD38+ B-Lymphozyten bei Patienten mit einer Autoimmunerkrankung (Multiple Sklerose) analysiert[83]. Hier wurde ebenfalls kein signifikanter Anstieg der Frequenzen der CD19+ CD38+ B-Zellen beobachtet, obwohl die Supplementation ausreichend (> 75 nmol/l) war. Es stellt sich die Frage, ob die Patienten der vorliegenden Studie Morbiditäten aufwiesen, die nicht kommuniziert oder nicht diagnostiziert wurden. Die erfassten Begleiterkrankungen der Probanden waren Asthma bronchiale, Hypothyreose, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus sowie Hyperaktivitätsstörung. Auch die Erfassung der unerwarteten Ereignisse während des Studienverlaufs zeigte, dass die Probanden in den beiden Behandlungsarmen gleichverteilt saisonale Infekte aufwiesen. Studien implizieren, dass ein potenzieller Zusammenhang zwischen einem Vitamin D-Mangel und der Infektion mit Influenzaviren besteht[84].

Ein weiterer Faktor, der zu erwägen ist, ist das Vorkommen von „non responder“ Probanden und potenzielle genetische Polymorphismen. Diese Patienten sprechen auf die Therapie nicht oder nicht wie erwartet an. Potentielle Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) der Vitamin D-metabolisierenden Enzyme wie CYP27B1 oder CYP24A1 könnten Mutationen bewirken und somit den Vitamin D-Stoffwechsel beeinflussen[85]. In einer europäischen Studie mit fast 34.000 Probanden wurden Gensequenzen der Enzyme des Vitamin D-Metabolismus wie 1 α Hydroxylase, 25- und 27-Hydroxylase sowie das Vitamin D-Bindungsprotein, die für die Cholesterolsynthese, Hydroxylierung und den Vitamin D-Transport verantwortlich sind, analysiert[86]. Es zeigte sich, dass mit Hilfe der Identifikation der genetischen Variationen bestimmte Loci bestimmt werden konnten und Individuen identifiziert wurden, die ein potentiell erhöhtes Risiko für ein Vitamin D-Defizit haben.

In der vorliegenden Studie erfolgte nach einer Woche ein statistisch signifikanter Anstieg der CD38+ CD27+ Antikörper-sezernierenden Zellen im peripheren Blut von 3,10 % ($p < 0,005$). Die Frequenzen der Vergleichsgruppe fielen um 6,32 % ab und im weiteren Verlauf stiegen die Plasmazellen von 11,33 % innerhalb eines Monats an ($p < 0,01$). In beiden Subgruppen, der intramuskulären sowie subkutanen Gruppe stiegen die Frequenzen der Plasmazellen signifikant an. In der Placebo-Gruppe

fielen diese tendenziell ab. Es ist anzunehmen, wie bereits in anderen klinischen Studien impliziert, dass CD38+ CD27+ Antikörper-sezernierende Zellen im peripheren Blut nach Vitamin D Substitution vermehrt zu finden sind. Shirakawa et al. zeigten, dass der Plasmazellen-spezifische Oberflächenmarker CCR10 bei Zellen zu finden ist, die eine Differenzierung terminaler Plasmablasten durchlaufen[62]. Eine verstärkte Induktion von Plasmazellen könnte durch die Vitamin D-abhängige Induktion von CCR10 und die konsekutive Vermehrung der CCR10+ CD27+ CD38+ Antikörper-sezernierenden Zellen erklärt werden.

Die Analyse der CCR10+ CD38+ Gedächtnis-B-Zellen, CCR10+ CD38+ naiven B-Zellen, CCR10+ CD27+ terminal differenzierter B- Zellen sowie CCR10+ CD27+ CD38+ Plasmablasten wiesen jedoch keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Behandlungsgruppen während der Studienphase auf.

Die Frequenzen der naiven B- Zellen (CD27-IgD+) fielen eine Woche nach der Injektion mit Placebo signifikant ab ($p = 0,005$). Die B-Gedächtniszellen (CD27+IgD+) stiegen in der Vergleichsgruppe um 4,26 % signifikant an ($p = 0,04$). Der Gesamtanteil der T-Lymphozyten (CD 4+) fiel in der ersten Woche in der Placebo-Gruppe signifikant um 7,78 % ab ($p = 0,003$). In der Verum-Gruppe waren die CD 4+-Zellen im Verlauf stabil.

Bei diesen Beobachtungen stellt sich die Frage der statistischen und der biologischen Signifikanz. Als statistisch signifikant wird der Unterschied zwischen Messgrößen definiert, wenn die Wahrscheinlichkeit, dass sie durch Zufall zustande kommen würden, nicht über einer gewissen Schwelle liegt und somit statistische Ergebnisse über die erhobene Stichprobe hinaus auf eine Grundgesamtheit generalisieren lassen.

Eine weitere Erklärung für die Abweichung der vorliegenden Daten könnte ein Messfehler bei der durchflusszytometrischen Analyse des Gesamtanteils der B-Lymphozyten vor der Vitamin D Injektion sein. Hier könnte eine ungenaue Gating-Strategie angewandt worden sein, welches ausgeschlossen wurde. Wahrscheinlicher ist es, dass ein Fluoreszenzmarker vertauscht oder nicht appliziert wurde.

4.6 Veränderungen der virusspezifischen humoralen IgG Antwort

Biologisch aktives Calcitriol hat eine direkte Auswirkung auf die B-Zell-Antwort, Plasmazelldifferenzierung und konsekutiv die Immunglobulin-Produktion[1]. Mit Hilfe von ELISA‘s wurde die Stabilität der Immunantwort gegen den Epstein-Barr-Virus -, Cytomegalovirus -, und Varizella-Zoster-Virus vor (Tag 0, pre) und nach (Tag 28) der Vitamin D-Supplementierung gemessen. In der Studienpopulation wurden bei > 95 % der Probanden positive IgG- Epstein-Barr-Virus Werte gemessen. IgG gegenüber Cytomegalovirus fand sich bei 30% und 90% der Probanden wiesen Varizella-Zoster-Virus Antikörper auf.
Zusammenfassend zeigte die Auswertung der Ergebnisse, dass sich die IgG-Werte nach Cholecalciferol Gabe minimal unterscheiden (Anstieg der Werte bis zu 0,3 % bzw. ein Abfall der Werte bis zu 0,4 %), sich aber keine signifikanten Veränderungen nachwiesen ließen.
In einer Arbeit von Heine et al. erhielten Probanden eine täglich Dosis von 2.000 I.E. Vitamin D über 10 Wochen mit anschließender Tetanus Auffrischungsimpfung[87].
Die spezifischen Tetanus IgG-Werte der Vitamin D Behandlungsgruppe waren im Vergleich zur Placebogruppe erhöht. Diese Studie legt nahe dass die sekundäre Immunantwort nach Immunisierung nicht gehemmt wird, sondern möglicherweise gefördert wird.

4.7 Einfluss des UV-Index auf die 25-Hydroxyvitamin D Serumkonzentration

Der UV-Index (UVI) ist ein Maß für die UV-Strahlung, die bei ungeschützter Haut einen Sonnenbrand hervorrufen könnte und von dem Bundesamt für Strahlenschutz und dem Umweltbundesamt seit 20 Jahren evaluiert wird. In Abhängigkeit von der Sonnenexposition wird keinen Schutz, der gefahrlosen Aufenthalt gewährt, besonderen Schutz oder die Meidung der Sonnenexposition empfohlen.
Das Bundesamt für Strahlenschutz hat den UVI für jeden Tag der Studie zur Verfügung gestellt. Die zwei nächsten Messpunkte, Standort Lindenberg (715 km südlich von Berlin) und Standort Zingst (287 km nördlich von Berlin), dienten zur Datenanalyse. Kritisch ist zu betrachten, dass keine Daten aus Berlin zur Verfügung

standen und der durchschnittliche UVI der zwei nächsten Standorte für die Analyse genutzt wurde.

4.8 Zukünftige Anwendung

Die Vitamin D-Insuffizienz, das heißt ein 25-Hydroxyvitamin D Serumwert < 75 nmol/l, ist weltweit verbreitet und wird immer häufiger diagnostiziert[88]. Sie tritt als Folge einer inadäquaten physiologischen Vitamin D-Bildung in der Epidermis in Kombination mit einer Vitamin D-armen Ernährung auf. Akute Mangelerscheinungen wirken sich primär auf das Skelett- sowie das Nervensystem aus. Eine Hypovitaminose D äußert sich symptomatisch in einer Hypokalzämie im Sinne von epileptischen Anfällen, Herzrhythmusstörungen, eine Neigung zur Tetanie und allgemeine motorische Entwicklungsverzögerung. Daten weisen darauf hin, dass eine andauernde Vitamin D-Defizienz eine direkte Verbindung zwischen einem niedrigen 25-Hydroxyvitamin D Serumspiegel und immunvermittelten Erkrankungen einschließlich allergischem Asthma, atopischer Dermatitis sowie systemischen Lupus erythematodes bestehen könnte[44]. Es wird ein Zusammenhang zwischen der Vitamin D-Defizienz, der Entstehung immunologischer und granulomatöser Erkrankungen, Karzinomen, neurologischen und Herzkreislauf-Krankheiten sowie eine allgemein erhöhte Mortalität, assoziiert[2]. Auch zeigt das biologisch aktive Vitamin D Calcitriol immunmodulatorische Effekte auf Zellen des angeborenen- sowie des adaptiven Immunsystems[79]. Auf Grund der derzeitigen Datenlage ist die Vitamin D Substitution besonders bei Säuglingen, Kindern, Patienten geriatrischen Alters und Kranken indiziert[22]. In einer aktuellen Studie wurde gezeigt, dass das allgemeine Wohlbefinden, die Entwicklung von Krankheiten und die durchschnittliche Verweildauer in Krankenhäusern (3 Tage) höher ist als bei ausreichend supplementierten Individuen gleichen Alters[70].

In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass alle Probanden, die eine Cholecalciferol Injektion mit 100.000 I.E. erhielten einen signifikanten Anstieg des 25-Hydroxyvitamin D Serumspiegels vorwiesen. Auch Faktoren wie Compliance der Probanden, Liberation, Absorption und Distribution des Vitamin D Präparates sind von Vorteil bei der Administration in Form einer Injektion gegenüber der oralen Gabe. Ferner spricht

für eine Cholecalciferol Supplementation, dass bei bestehendem Vitamin D Mangel eine vermehrte Sonnenexposition empfohlen wird, die die Entstehung von UV-induzierten Hautkrankheiten wie aktinische Keratosen, Basalzellkarzinome sowie letale maligne Melanome fördern könnte.

Die vorliegende Studie zeigte einen Abfall des 25-Hydroxyvitamin D Serumspiegels in der Verumgruppe nach einem Monat. Hier wäre eine Folgestudie interessant, wo eine weitere Injektion mit z.B. 100.00 I.E. Cholecalciferol appliziert und die Pharmakokinetik untersucht werden würde. Eine Studie mit Vitamin D-defizienten Kindern zeigte, dass die prophylaktische Supplementierung im Winter einmalig mit 150.000 I.E. Cholecalciferol zu adäquaten 25-Hydroxyvitamin D Serumwerten führte und keine Nebenwirkungen auftraten[89].

Ein anderer Ansatz zur Sicherung einer ausreichenden Vitamin D Zufuhr ist die Anreicherung von Vitamin D in Lebensmitteln oder Leitungswasser. Dies würde die Zugänglichkeit für die gesamte Bevölkerung fördern. Die Gruppe der Milchprodukte zählt zu den Vitamin D-reichen Nahrungsmitteln. Da bei der Wärmebehandlung sowie dem Entzug des Milchfetts das Vitamin D aus der Milch gelößt wird, werden diese in Amerika mit Vitamin D angereichert.

Weiterhin kann diskutiert werden, ob präventiv eine Vitamin D Substitution empfohlen werden sollte. In der Rekrutierungsphase der vorliegenden Studie wiesen mehr als 90 % der gescreenten Probanden eine saisonal bedingte Vitamin D Defizienz auf. Hier ist zu überlegen, ob auch gesunde Individuen mit Risikofaktoren eine Vitamin D-Insuffizienz eine Prophylaxe betreiben sollten bzw. ob es notwendig ist bei diesen Patienten einen 25-Hydroxyvitamin D Spiegel zu bestimmen und eine empfehlungsgerechte Substitution einzuleiten.

Die vorliegenden Daten sind eine Grundlage für zukünftige Untersuchungen der optimalen Cholecalciferol-Supplementation. Es sind jedoch weitere experimentelle und klinische Studien zur Erörterung und Klärung der Fragen notwendig.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. Journal of immunology 2007;179:1634-47.
2. Schottker B, Saum KU, Perna L, Ordonez-Mena JM, Holleczek B, Brenner H. Is vitamin D deficiency a cause of increased morbidity and mortality at older age or simply an indicator of poor health? European journal of epidemiology 2014.
3. Goldblatt H, Soames KM. The Supplementary Value of Light Rays to a Diet Graded in its Content of Fat-Soluble Organic Factor. The Biochemical journal 1923;17:622-9.
4. Rajakumar K. Vitamin D, cod-liver oil, sunlight, and rickets: a historical perspective. Pediatrics 2003;112:e132-5.
5. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. The American journal of clinical nutrition 2004;80:1689S-96S.
6. Popovtzer MM, Robinette JB, DeLuca HF, Holick MF. The acute effect of 25-hydroxycholecalciferol on renal handling of phosphorus. Evidence for a parathyroid hormone-dependent mechanism. The Journal of clinical investigation 1974;53:913-21.
7. Rolf L, Muris AH, Hupperts R, Damoiseaux J. Vitamin D effects on B cell function in autoimmunity. Annals of the New York Academy of Sciences 2014;1317:84-91.
8. Glover M, Glover J, Morton RA. Provitamin D3 in tissues and the conversion of cholesterol to 7-dehydrocholesterol in vivo. The Biochemical journal 1952;51:1-9.
9. Wolf G. The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus. The Journal of nutrition 2004;134:1299-302.
10. Hollis BW. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. The Journal of nutrition 2005;135:317-22.
11. Vieth R. What is the optimal vitamin D status for health? Progress in biophysics and molecular biology 2006;92:26-32.
12. Bouillon R, Van Baelen H. Transport of vitamin D: significance of free and total concentrations of the vitamin D metabolites. Calcified tissue international 1981;33:451-3.
13. Haddad JG, Matsuoka LY, Hollis BW, Hu YZ, Wortsman J. Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. The Journal of clinical investigation 1993;91:2552-5.
14. Shinkyo R, Sakaki T, Kamakura M, Ohta M, Inouye K. Metabolism of vitamin D by human microsomal CYP2R1. Biochemical and biophysical research communications 2004;324:451-7.
15. Holick MF, Schnoes HK, DeLuca HF, Suda T, Cousins RJ. Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine. Biochemistry 1971;10:2799-804.
16. Kreutz M, Andreesen R, Krause SW, Szabo A, Ritz E, Reichel H. 1,25-dihydroxyvitamin D3 production and vitamin D3 receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. Blood 1993;82:1300-7.
17. Zimmerman DR, Reinhardt TA, Kremer R, Beitz DC, Reddy GS, Horst RL. Calcitroic acid is a major catabolic metabolite in the metabolism of 1 alpha-dihydroxyvitamin D(2). Archives of biochemistry and biophysics 2001;392:14-22.

18. Asadi M, Jouyandeh Z, Nayebzadeh F, Qorbani M. Does aging increase vitamin D serum level in healthy postmenopausal women? Acta medica Iranica 2013;51:701-4.
19. Janssen HC, Samson MM, Verhaar HJ. Vitamin D deficiency, muscle function, and falls in elderly people. The American journal of clinical nutrition 2002;75:611-5.
20. Shin YH, Shin HJ, Lee YJ. Vitamin D status and childhood health. Korean journal of pediatrics 2013;56:417-23.
21. Vilarrasa N, Maravall J, Estepa A, et al. Low 25-hydroxyvitamin D concentrations in obese women: their clinical significance and relationship with anthropometric and body composition variables. Journal of endocrinological investigation 2007;30:653-8.
22. Holick MF. Vitamin D deficiency. The New England journal of medicine 2007;357:266-81.
23. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. The Journal of clinical investigation 2006;116:2062-72.
24. Peterlik M, Cross HS. Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. European journal of clinical investigation 2005;35:290-304.
25. Heine G, Lahl A, Muller C, Worm M. Vitamin D deficiency in patients with cutaneous lupus erythematosus is prevalent throughout the year. The British journal of dermatology 2010;163:863-5.
26. Brehm JM, Celedon JC, Soto-Quiros ME, et al. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. American journal of respiratory and critical care medicine 2009;179:765-71.
27. Sidbury R, Sullivan AF, Thadhani RI, Camargo CA, Jr. Randomized controlled trial of vitamin D supplementation for winter-related atopic dermatitis in Boston: a pilot study. The British journal of dermatology 2008;159:245-7.
28. Ku YC, Liu ME, Ku CS, Liu TY, Lin SL. Relationship between vitamin D deficiency and cardiovascular disease. World journal of cardiology 2013;5:337-46.
29. Stubbins RE, Hakeem A, Nunez NP. Using components of the vitamin D pathway to prevent and treat colon cancer. Nutrition reviews 2012;70:721-9.
30. Nimitphong H, Holick MF. Vitamin D, neurocognitive functioning and immunocompetence. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care 2011;14:7-14.
31. Grzybowski A, Pietrzak K. From patient to discoverer--Niels Ryberg Finsen (1860-1904) --the founder of phototherapy in dermatology. Clinics in dermatology 2012;30:451-5.
32. Stumpf WE, Sar M, Reid FA, Tanaka Y, DeLuca HF. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. Science 1979;206:1188-90.
33. Bikle DD. Vitamin D metabolism and function in the skin. Molecular and cellular endocrinology 2011;347:80-9.
34. Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3): implications in cell growth and differentiation. Endocrine reviews 2002;23:763-86.
35. Morimoto S, Yoshikawa K. Psoriasis and vitamin D3. A review of our experience. Archives of dermatology 1989;125:231-4.
36. Tay YK. Topical calcipotriol ointment in the treatment of morphea. The Journal of dermatological treatment 2003;14:219-21.
37. Hossani-Madani A, Halder R. Treatment of vitiligo: advantages and disadvantages, indications for use and outcomes. Giornale italiano di dermatologia e venereologia : organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia 2011;146:373-95.

38. Kim DH, Lee JW, Kim IS, et al. Successful treatment of alopecia areata with topical calcipotriol. Annals of dermatology 2012;24:341-4.
39. Ahn CS, Awadalla F, Huang KE, Yentzer B, Dabade TS, Feldman SR. Patterns of vitamin d analog use for the treatment of psoriasis. Journal of drugs in dermatology : JDD 2013;12:906-10.
40. Litonjua AA. Vitamin D deficiency as a risk factor for childhood allergic disease and asthma. Current opinion in allergy and clinical immunology 2012;12:179-85.
41. Mesquita Kde C, Igreja AC, Costa IM. Atopic dermatitis and vitamin D: facts and controversies. Anais brasileiros de dermatologia 2013;88:945-53.
42. Nanzer AM, Chambers ES, Ryanna K, et al. Enhanced production of IL-17A in patients with severe asthma is inhibited by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in a glucocorticoid-independent fashion. The Journal of allergy and clinical immunology 2013;132:297-304 e3.
43. Ehlayel MS, Bener A, Sabbah A. Is high prevalence of vitamin D deficiency evidence for asthma and allergy risks? European annals of allergy and clinical immunology 2011;43:81-8.
44. Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. Journal of molecular medicine 2010;88:441-50.
45. Rook GA, Steele J, Fraher L, et al. Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes. Immunology 1986;57:159-63.
46. Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. Science 2006;311:1770-3.
47. Cannell JJ, Vieth R, Umhau JC, et al. Epidemic influenza and vitamin D. Epidemiology and infection 2006;134:1129-40.
48. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. Endocrinology and metabolism clinics of North America 2010;39:365-79, table of contents.
49. Aranow C. Vitamin D and the immune system. Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research 2011;59:881-6.
50. Berer A, Stockl J, Majdic O, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro. Experimental hematology 2000;28:575-83.
51. Xu H, Soruri A, Gieseler RK, Peters JH. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. Scandinavian journal of immunology 1993;38:535-40.
52. Tokuda N, Levy RB. 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine 1996;211:244-50.
53. Griffin MD, Lutz W, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R. Dendritic cell modulation by 1alpha,25 dihydroxyvitamin D3 and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2001;98:6800-5.
54. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. The Journal of experimental medicine 2002;195:603-16.

55. Verstuyf A, Segaert S, Verlinden L, Bouillon R, Mathieu C. Recent developments in the use of vitamin D analogues. Expert opinion on investigational drugs 2000;9:443-55.
56. Muller K, Haahr PM, Diamant M, Rieneck K, Kharazmi A, Bendtzen K. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits cytokine production by human blood monocytes at the post-transcriptional level. Cytokine 1992;4:506-12.
57. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. Nature clinical practice Rheumatology 2008;4:404-12.
58. Heine G, Anton K, Henz BM, Worm M. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits anti-CD40 plus IL-4-mediated IgE production in vitro. European journal of immunology 2002;32:3395-404.
59. Hartmann B, Riedel R, Jorss K, et al. Vitamin D receptor activation improves allergen-triggered eczema in mice. The Journal of investigative dermatology 2012;132:330-6.
60. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. Physiological reviews 2008;88:841-86.
61. Heine G, Niesner U, Chang HD, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. European journal of immunology 2008;38:2210-8.
62. Shirakawa AK, Nagakubo D, Hieshima K, Nakayama T, Jin Z, Yoshie O. 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces CCR10 expression in terminally differentiating human B cells. Journal of immunology 2008;180:2786-95.
63. Lemire JM, Adams JS, Kermani-Arab V, Bakke AC, Sakai R, Jordan SC. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. Journal of immunology 1985;134:3032-5.
64. Adorini L. Intervention in autoimmunity: the potential of vitamin D receptor agonists. Cellular immunology 2005;233:115-24.
65. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. Nature reviews Immunology 2008;8:685-98.
66. Lips P, van Schoor NM, de Jongh RT. Diet, sun, and lifestyle as determinants of vitamin D status. Annals of the New York Academy of Sciences 2014;1317:92-8.
67. German Nutrition S. New reference values for vitamin D. Annals of nutrition & metabolism 2012;60:241-6.
68. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. Annals of epidemiology 2009;19:73-8.
69. Bellone S, Esposito S, Giglione E, et al. Vitamin D levels in a paediatric population of normal weight and obese subjects. Journal of endocrinological investigation 2014.
70. Helard L, Mateus-Hamdan L, Beauchet O, Annweiler C. Hypovitaminosis D in geriatric acute care unit: a biomarker of longer length of stay. Disease markers 2013;35:525-9.
71. Grober U, Spitz J, Reichrath J, Kisters K, Holick MF. Vitamin D: Update 2013: From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. Dermato-endocrinology 2013;5:331-47.
72. Flodin L, Saaf M, Cederholm T, et al. Additive effects of nutritional supplementation, together with bisphosphonates, on bone mineral density after hip fracture: a 12-month randomized controlled study. Clinical interventions in aging 2014;9:1043-50.
73. Schneider L, Dos Santos AS, Santos M, da Silva Chakr RM, Monticielo OA. Vitamin D and systemic lupus erythematosus: state of the art. Clinical rheumatology 2014;33:1033-8.

74. DeMille DM, Piscitelli M, Ocker A, Vuong C, Hartner L, Lynch MP. Vitamin D deficiency in the oncology setting. The Journal of community and supportive oncology 2014;12:13-9.
75. Welles CC, Whooley MA, Karumanchi SA, et al. Vitamin D deficiency and cardiovascular events in patients with coronary heart disease: data from the Heart and Soul Study. American journal of epidemiology 2014;179:1279-87.
76. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. The American journal of clinical nutrition 2008;88:582S-6S.
77. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. The American journal of clinical nutrition 2000;72:690-3.
78. Kang JS, Lee MH. Overview of therapeutic drug monitoring. The Korean journal of internal medicine 2009;24:1-10.
79. Geldmeyer-Hilt K, Heine G, Hartmann B, Baumgrass R, Radbruch A, Worm M. 1,25-dihydroxyvitamin D3 impairs NF-kappaB activation in human naive B cells. Biochemical and biophysical research communications 2011;407:699-702.
80. Liu YJ, Arpin C. Germinal center development. Immunological reviews 1997;156:111-26.
81. Morra M, Zubiaur M, Terhorst C, Sancho J, Malavasi F. CD38 is functionally dependent on the TCR/CD3 complex in human T cells. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 1998;12:581-92.
82. Mei HE, Yoshida T, Sime W, et al. Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. Blood 2009;113:2461-9.
83. Knippenberg S, Smolders J, Thewissen M, et al. Effect of vitamin D(3) supplementation on peripheral B cell differentiation and isotype switching in patients with multiple sclerosis. Multiple sclerosis 2011;17:1418-23.
84. Sundaram ME, Coleman LA. Vitamin D and influenza. Advances in nutrition 2012;3:517-25.
85. Berry DJ, Vimaleswaran KS, Whittaker JC, Hingorani AD, Hypponen E. Evaluation of genetic markers as instruments for Mendelian randomization studies on vitamin D. PloS one 2012;7:e37465.
86. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. Lancet 2010;376:180-8.
87. Heine G, Drozdenko G, Lahl A, et al. Efficient tetanus toxoid immunization on vitamin D supplementation. European journal of clinical nutrition 2011;65:329-34.
88. Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. The American journal of clinical nutrition 1999;69:842-56.
89. Oliveri B, Cassinelli H, Mautalen C, Ayala M. Vitamin D prophylaxis in children with a single dose of 150000 IU of vitamin D. European journal of clinical nutrition 1996;50:807-10.

6 TABELLARISCHER ANHANG

Tabelle 6.1.1. Demographische Daten der Probanden (Teil 1)

Scr.Nr.	Behandlungs-gruppe	Screening-Visite	Alter in Jahren	Geschlecht	Größe in cm	Gewicht in kg
1	Verum i.m.	05.02.2013	27	W	156	73
2	Verum i.m.	05.02.2013	28	W	178	60
3	Verum s.c.	05.02.2013	28	W	162	50
4	Verum s.c.	05.02.2013	26	W	163	50
5	Placebo i.m.	05.02.2013	29	W	171	62
6	Verum i.m.	05.02.2013	33	M	176	72
7	Placebo s.c.	05.02.2013	30	W	170	60
8	Verum s.c.	05.02.2013	20	M	170	75
9	Placebo i.m.	05.02.2013	36	M	183	75
10	Verum i.m.	05.02.2013	29	W	176	69
11	Verum s.c.	05.02.2013	45	W	165	62
13	Verum i.m.	05.02.2013	30	W	165	60
14	Verum i.m.	05.02.2013	29	W	165	50
15	Verum s.c.	05.02.2013	25	M	192	86
18	Placebo i.m.	05.02.2013	58	W	157	53
19	Placebo s.c.	06.02.2013	42	W	165	62
20	Verum s.c.	06.02.2013	30	W	173	69
21	Verum i.m.	06.02.2013	38	M	178	69
22	Verum i.m.	06.02.2013	26	W	164	62
23	Placebo s.c.	06.02.2013	55	W	170	86
24	Verum i.m.	06.02.2013	55	W	168	64
25	Placebo s.c.	06.02.2013	21	M	176	73
27	Verum s.c.	06.02.2013	36	W	173	68
28	Verum i.m.	06.02.2013	29	W	172	55
29	Verum s.c.	06.02.2013	26	W	168	56
30	Placebo i.m.	06.02.2013	28	W	167	53
31	Verum s.c.	06.02.2013	48	W	164	65
32	Verum i.m.	06.02.2013	30	M	182	69
33	Verum s.c.	07.02.2013	44	W	163	58
34	Placebo s.c.	07.02.2013	29	W	173	68
35	Verum i.m.	07.02.2013	47	W	176	69
36	Placebo s.c.	07.02.2013	27	M	172	58
38	Verum s.c.	07.02.2013	26	M	175	75
39	Placebo i.m.	08.02.2013	26	W	160	48
41	Verum s.c.	08.02.2013	24	W	183	60
43	Verum i.m.	11.02.2013	20	M	173	58
44	Placebo i.m.	13.02.2013	44	M	183	87
45	Placebo s.c.	13.02.2013	61	M	179	97

46	Verum s.c.	13.02.2013	34,0	W	171	56
47	Gruppe	14.02.2013	34	W	178	83

Tabelle 6.1.2. Demographische Daten der Probanden (Teil 2)

Scr.Nr.	Behandlungs-gruppe	Ethnische Gruppe	Begleit-medikation	Begleit-krankheiten	Schwangerschafts-test	Letzte Visite
1	Verum i.m.	kaukasisch	Ja	Ja	negativ	06.05.2013
2	Verum i.m.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	07.05.2013
3	Verum s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	06.05.2013
4	Verum s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	06.05.2013
5	Placebo i.m.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	06.05.2013
6	Verum i.m.	kaukasisch	Nein	Nein	n/a	06.05.2013
7	Placebo s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	06.05.2013
8	Verum s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	n/a	06.05.2013
9	Placebo i.m.	kaukasisch	Nein	Nein	n/a	07.05.2013
10	Verum i.m.	indisch	Nein	Nein	negativ	06.05.2013
11	Verum s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	07.05.2013
13	Verum i.m.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	07.05.2013
14	Verum i.m.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	06.05.2013
15	Verum s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	n/a	15.05.2013
18	Placebo i.m.	kaukasisch	Nein	Nein	n/a	07.05.2013
19	Placebo s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	07.05.2013
20	Verum s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	04.05.2013
21	Verum i.m.	kaukasisch	Nein	Nein	n/a	14.05.2013
22	Verum i.m.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	14.05.2013
23	Placebo s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	13.05.2013
24	Verum i.m.	kaukasisch	Nein	Nein	n/a	13.05.2013
25	Placebo s.c.	kaukasisch	Ja	Ja	n/a	07.05.2013
27	Verum s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	14.05.2013
28	Verum i.m.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	13.05.2013
29	Verum s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	13.05.2013
30	Placebo i.m.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	13.05.2013
31	Verum s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	06.05.2013
32	Verum i.m.	kaukasisch	Nein	Nein	n/a	07.05.2013
33	Verum s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	14.05.2013
34	Placebo s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	14.05.2013
35	Verum i.m.	kaukasisch	Ja	Ja	negativ	14.05.2013
36	Placebo s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	n/a	07.05.2013
38	Verum s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	n/a	06.05.2013
41	Placebo i.m.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	13.05.2013
43	Verum s.c.	kaukasisch	Ja	Ja	n/a	13.05.2013
44	Verum i.m.	kaukasisch	Nein	Nein	n/a	14.05.2013
45	Placebo i.m.	kaukasisch	Ja	Ja	n/a	13.05.2013

46	Placebo s.c.	kaukasisch	Nein	Nein	negativ	07.05.2013
47	Verum s.c.	kaukasisch	Ja	Ja	negativ	13.05.2013

Tabelle 6.2.1 Individuelle Auflistung der Calcium Serumkonzentration im Verlauf der Studie (in nmol/l). Norm: 2,15-2,5 nmol/l.

Scr.No.	Behandlungs-gruppe	Tag 0	Tag 28	Tag 48	Tag 64
1	Verum i.m.	2,32	2,3	2,3	2,33
2	Verum i.m.	2,37	2,34	2,44	2,4
3	Verum s.c.	2,09	2,2	2,2	2,24
4	Verum s.c.	2,35	2,39	2,34	2,42
5	Placebo i.m.	-	2,34	2,48	2,33
6	Verum i.m.	2,46	2,47	2,42	2,25
7	Placebo s.c.	2,38	2,3	2,45	2,4
8	Verum s.c.	2,47	2,42	-	2,41
9	Placebo i.m.	2,35	2,28	2,33	2,28
10	Verum i.m.	2,24	2,35	2,32	2,21
11	Verum s.c.	2,33	2,35	2,35	2,39
13	Verum i.m.	2,32	2,25	2,37	2,29
14	Verum i.m.	2,37	2,47	2,53	2,36
15	Verum s.c.	2,45	2,5	-	2,41
18	Placebo i.m.	2,45	2,29	2,29	2,33
19	Placebo s.c.	2,35	2,28	2,24	2,25
20	Verum s.c.	2,24	2,34	2,25	2,03
21	Verum i.m.	-	2,31	-	2,35
22	Verum i.m.	2,11	2,27	2,24	2,22
23	Placebo s.c.	2,25	2,2	2,21	2,31
24	Verum i.m.	2,3	2,41	2,33	2,36
25	Placebo s.c.	2,39	2,27	2,21	2,33
27	Verum s.c.	2,2	2,32	2,21	2,19
28	Verum i.m.	2,29	2,31	-	2,21
29	Verum s.c.	2,3	2,33	2,23	2,28
30	Placebo i.m.	2,41	2,37	2,25	2,22
31	Verum s.c.	2,22	2,25	2,41	2,34
32	Verum i.m.	2,34	2,25	2,32	2,36
33	Verum s.c.	2,19	2,28	2,36	2,2
34	Placebo s.c.	2,16	2,19	2,19	2,2
35	Verum i.m.	2,22	2,32	2,31	2,29
36	Placebo s.c.	2,4	2,35	2,43	-
38	Verum s.c.	2,23	2,29	2,35	2,24
41	Placebo i.m.	2,41	2,34	2,36	2,28
43	Verum s.c.	2,3	2,37	2,28	2,36
44	Verum i.m.	2,47	2,34	2,23	2,32

45	Placebo i.m.	2,24	2,17	2,23	2,35
46	Placebo s.c.	2,38	2,29	2,33	2,38
47	Verum s.c.	2,38	2,29	2,33	2,38

Tabelle 6.2.1 Individuelle Auflistung der Phosphat Serumkonzentration im Verlauf der Studie (in nmol/l). Norm: 0,87-1,45.

Scr.No.	Behandlungs-gruppe	Pat.No.	Tag 0	Tag 28	Tag 48	Tag 64
1	Verum i.m.	F03	0,91	1	1,12	1,07
2	Verum i.m.	F11	1,03	0,97	0,99	0,82
3	Verum s.c.	F06	0,78	1,29	1,14	1,28
4	Verum s.c.	F07	1	1,01	1,21	1,47
5	Placebo i.m.	F04	1,1	1,22	1,04	1,17
6	Verum i.m.	3	0,61	0,36	0,55	0,76
7	Placebo s.c.	F05	1,07	1,16	1,16	1,22
8	Verum s.c.	1	1,09	0,95	-	0,75
9	Placebo i.m.	4	0,65	0,66	0,86	0,76
10	Verum i.m.	F02	0,6	0,82	0,93	0,59
11	Verum s.c.	F09	1,16	1,13	1,29	1,29
13	Verum i.m.	F12	1,2	0,87	1,09	1,04
14	Verum i.m.	F13	96	1,12	1,27	1,17
15	Verum s.c.	9	1,08	0,96	-	0,94
18	Placebo i.m.	F08	1,13	0,89	1,03	1,2
19	Placebo s.c.	F10	0,83	1	0,98	0,77
20	Verum s.c.	F14	0,83	1,06	0,98	1,17
21	Verum i.m.	2	-	0,83	-	0,97
22	Verum i.m.	F15	0,88	1	0,87	0,89
23	Placebo s.c.	F16	1,21	0,9	0,96	1,03
24	Verum i.m.	F17	0,9	0,76	0,8	0,75
25	Placebo s.c.	8	1,13	0,95	1,07	0,7
27	Verum s.c.	F18	1	1,17	0,96	1,12
28	Verum i.m.	F19	1,39	1,16	-	1,14
29	Verum s.c.	F20	1,08	1,2	1,15	1,08
30	Placebo i.m.	F21	1,12	1,19	1,27	0,9
31	Verum s.c.	F01	0,8	0,67	1,2	1,19
32	Verum i.m.	7	1,16	0,61	0,73	0,53
33	Verum s.c.	F22	1,37	1,19	1,12	1,09
34	Placebo s.c.	F23	0,93	0,8	0,85	0,72
35	Verum i.m.	F24	0,96	1,22	0,91	1,08
36	Placebo s.c.	6	0,78	0,78	0,86	-
38	Verum s.c.	5	1,2	1,02	0,93	1,13
41	Placebo i.m.	F26	0,7	0,77	0,79	0,77
43	Verum s.c.	10	1,07	0,88	0,81	1

44	Verum i.m.	11	0,95	0,89	1,08	0,9
45	Placebo i.m.	12	0,82	0,82	0,9	1,07
46	Placebo s.c.	F27	1,05	0,82	0,88	1,02
47	Verum s.c.	F28	0,91	1	1,12	1,07

Tabelle 6.3 Individuelle Auflistung der Verträglichkeit der Injektion

Scr.No.	Behandlungs-gruppe	2 Stunden	6 Stunden	24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden
1	Verum i.m.	2	3	3	2	2
2	Verum i.m.	1	1	1	1	1
3	Verum s.c.	2	2	2		2
4	Verum s.c.	1	2	2	2	2
5	Placebo i.m.	1	1	1	1	1
6	Verum i.m.	1	1	1	1	1
7	Placebo s.c.	1	2	2	2	2
8	Verum s.c.	1	1	1	1	1
9	Placebo i.m.	1	1	1	1	1
10	Verum i.m.	1	2	2	2	1
11	Verum s.c.	1	1	1	1	1
13	Verum i.m.	1	1	1	1	1
14	Verum i.m.	1	1	1	1	1
15	Verum s.c.	2	2	2	2	2
18	Placebo i.m.	1	1	1	1	1
19	Placebo s.c.	1	1	1	1	1
20	Verum s.c.	2	2	2	2	2
21	Verum i.m.	1	1	1	1	1
22	Verum i.m.	2	2	1	1	1
23	Placebo s.c.	3	2	2	2	2
24	Verum i.m.	1	2	3	1	2
25	Placebo s.c.	1	1	1	1	1
27	Verum s.c.	2	2	2	2	2
28	Verum i.m.	1	1	1	1	1
29	Verum s.c.	1	2	2	1	2
30	Placebo i.m.	2	2	2	1	1
31	Verum s.c.	1	2	2	2	2
32	Verum i.m.	1	1	1	1	1
33	Verum s.c.	1	1	1	1	1
34	Placebo s.c.	1	2	2	2	2
35	Verum i.m.	2	2	3	2	1
36	Placebo s.c.	1	1	1	1	1
38	Verum s.c.	1	1	1	1	1
41	Placebo i.m.	2	2	1	1	1

43	Verum s.c.	1	2	2	1	2
44	Verum i.m.	1	1	1	1	1
45	Placebo i.m.	1	1	2	2	1
46	Placebo s.c.	1	1	1	1	1
47	Verum s.c.	2	1	1	1	1

Tabelle 6.4 Individuelle Auflistung der 25-Hydroxyvitamin D Serumkonzentration im Verlauf der Studie

Scr.No.	Behandlungs-gruppe	Tag 0	Tag 7	Tag 28	Tag 42	Tag 84
1	Verum i.m.	24,4	-	54,8	44,2	57,8
2	Verum i.m.	36,6	62	72	55	82,9
3	Verum s.c.	27,7	61,1	81,7	64,2	92
4	Verum s.c.	35	62,7	77,5	71,7	87,8
5	Placebo i.m.	45,9	51,4	44,2	37,9	55,6
6	Verum i.m.	27,3	57,1	92,8	80,3	67,9
7	Placebo s.c.	25	31,6	24,4	21	32,8
8	Verum s.c.	31,5	63,4	82,7	-	92,9
9	Placebo i.m.	38,3	37,6	36,5	40,3	52,2
10	Verum i.m.	12,5	22,7	33,3	28,3	33
11	Verum s.c.	47,2	70,6	83,1	77,7	114,1
13	Verum i.m.	40,9	64	100,9	73,8	102,5
14	Verum i.m.	27,9	73,7	89,1	65,6	-
15	Verum s.c.	33,6	71,2	89,5	-	55,5
18	Placebo i.m.	38,1	44,4	43	41,7	56,5
19	Placebo s.c.	27,6	30	34,7	26,9	46,9
20	Verum s.c.	21,8	47,5	61,1	51,4	58,1
21	Verum i.m.	32	45,5	55,5	52,9	79
22	Verum i.m.	31,5	35,9	28,6	28,3	43,8
23	Placebo s.c.	14,7	22	21,1	16,6	34
24	Verum i.m.	39,4	66,2	77,1	69,6	95,6
25	Placebo s.c.	17,8	21,9	26,1	19,4	33,3
27	Verum s.c.	23,6	51,8	56,9	50,1	68,7
28	Verum i.m.	49,7	80	86,7	-	84,1
29	Verum s.c.	24,5	42,7	57,9	42	56,5
30	Placebo i.m.	41	34,9	31,3	23,8	53,1
31	Verum s.c.	16	38,9	43,4	37,5	57,1
32	Verum i.m.	36,5	69,7	80,1	67,8	104,4
33	Verum s.c.	23,7	55,8	62,7	62,3	62,3
34	Placebo s.c.	23,8	28	20,1	18	66,1
35	Verum i.m.	17,1	48,9	70,3	67,9	75
36	Placebo s.c.	18,9	24,5	34,9	23,5	22,6
38	Verum s.c.	54	97,8	110,6	103,4	105,6

41	Placebo i.m.	38,8	27,2	26,1	21,3	31,9
43	Verum s.c.	21,6	86,3	107,7	92,3	104,3
44	Verum i.m.	24	49,6	43,1	32,7	51,3
45	Placebo i.m.	55,1	43,4	41	30,9	48,8
46	Placebo s.c.	34,4	0	43,7	22,5	45,4
47	Verum s.c.	25,8	45,4	45,4	43,9	54,4

Tabelle 6.5.1 Individuelle Auflistung des prozentuellen Anteils der CD38+ naiven B-Lymphozyten im Verlauf der Studie (%)

Scr.Nr.	Behandlungs-gruppe	Tag 0	Tag 7	Tag 28	Tag 84
1	Verum i.m.	1,41	2,35	8,29	1,22
2	Verum i.m.	1,14	2,73	2,55	1,29
3	Verum s.c.	1,02	1,25	2,29	2,48
4	Verum s.c.	2,01	3,48	3,91	2,38
5	Placebo i.m.	1,64	5,78	3,44	2,88
6	Verum i.m.	1,4	4,9	6,11	4,64
7	Placebo s.c.	2,14	-	5,59	5,28
8	Verum s.c.	1,73	3,55	2,33	1,98
9	Placebo i.m.	1,6	2,61	1,93	1,04
10	Verum i.m.	0,369	3,27	1,93	2,27
11	Verum s.c.	1,91	3,33	2,74	1,75
13	Verum i.m.	3,63	8	6,75	2,11
14	Verum i.m.	3,18	6,03	5,03	6
15	Verum s.c.	4,41	3,99	3,23	5,22
18	Placebo i.m.	2,77	4,1	2,47	3,01
19	Placebo s.c.	2,31	6,95	4,77	1,79
20	Verum s.c.	3,79	4,21	4,84	6,64
21	Verum i.m.	2,16	4,14	4,1	7,77
22	Verum i.m.	2,11	1,82	0,969	3,31
23	Placebo s.c.	5,95	5,87	3,04	7,93
24	Verum i.m.	5,8	4,78	4,14	5,84
25	Placebo s.c.	3,16	8,8	9,44	4,19
27	Verum s.c.	11,6	10,7	9,12	12,1
28	Verum i.m.	6,79	7,07	6,49	5,5
29	Verum s.c.	3,76	4,37	3,7	3,66
30	Placebo i.m.	5,65	-	4,87	9,22
31	Verum s.c.	1,37	4,5	3,66	3,94
32	Verum i.m.	3,43	5,11	4,69	4,23
33	Verum s.c.	4,35	5,01	4,03	5,43
34	Placebo s.c.	8,67	9,49	5,92	-
35	Verum i.m.	3,13	2,69	1,72	2,62
36	Placebo s.c.	8,07	10,6	12,7	2,45
38	Verum s.c.	3,11	9,44	12,2	9,38

41	Placebo i.m.	3,67	2,81	2,22	2,99
43	Verum s.c.	4,53	5,71	5,6	7,77
44	Verum i.m.	14,1	8	5,88	-
45	Placebo i.m.	4,23	6,28	4,31	4,71
46	Placebo s.c.	4,85	-	2,82	2,39
47	Verum s.c.	8,66	2,85	2,99	2,55

Tabelle 6.5.2 Individuelle Auflistung des prozentuellen Anteils der CD38+ Gedächtnis-B-Lymphozyten im Verlauf der Studie (%)

Scr.Nr.	Behandlungs-gruppe	Tag 0	Tag 7	Tag 28	Tag 84
1	Verum i.m.	0,586	1,4	3,6	2,65
2	Verum i.m.	0,018	2,2	1,7	4,45
3	Verum s.c.	0,084	2	2,6	7,06
4	Verum s.c.	0	1,8	2,3	1,79
5	Placebo i.m.	0,108	6,5	2,3	3,04
6	Verum i.m.	0	1,7	2,6	1,64
7	Placebo s.c.	0,094		2,2	2,47
8	Verum s.c.	0	1,3	2,6	1,43
9	Placebo i.m.	0,506	1,8	2,5	1,53
10	Verum i.m.	0	1,1	1,4	1,23
11	Verum s.c.	0,009	0,9	1	0,73
13	Verum i.m.	0,035	3,4	3,1	4,63
14	Verum i.m.	0,127	1,4	1,5	3
15	Verum s.c.	1,39	0,8	2	2,44
18	Placebo i.m.	0,061	3	1,8	2,04
19	Placebo s.c.	0,016	1,9	0,7	0,58
20	Verum s.c.	2,51	1,6	1,6	3,43
21	Verum i.m.	0	1,1	1,1	2
22	Verum i.m.	1,88	1,5	1,7	1,91
23	Placebo s.c.	1,67	2	1,1	1,93
24	Verum i.m.	3,87	2,9	6,9	10,2
25	Placebo s.c.	0,092	4,5	3,6	2,15
27	Verum s.c.	2,96	2,7	7,3	4,25
28	Verum i.m.	2,01	0,8	1,4	2,46
29	Verum s.c.	0,754	0,7	1,5	2,62
30	Placebo i.m.	2,34	-	2,2	7,38
31	Verum s.c.	0,308	1,5	1,2	2,14
32	Verum i.m.	0,112	7	6,4	4,12
33	Verum s.c.	2,84	1,6	1,7	5,61
34	Placebo s.c.	2,63	1,4	1,5	-
35	Verum i.m.	4,4	2,6	2,7	1,92
36	Placebo s.c.	0,753	1,3	7,2	7,35
38	Verum s.c.	0,087	1,1	4,4	2,7

41	Placebo i.m.	1,94	1,5	4,3	2,31
43	Verum s.c.	2,32	2	3,1	6,24
44	Verum i.m.	5,8	1,7	1,6	-
45	Placebo i.m.	1,26	1,1	0,7	2,15
46	Placebo s.c.	3,28		3,3	6,23
47	Verum s.c.	2,1	1,5	1,5	2,21

Tabelle 6.5.3 Individuelle Auflistung des prozentuellen Anteils der CD38+ Plasmazellen im Verlauf der Studie (%)

Scr.Nr.	Behandlungs-gruppe	Tag 0	Tag 7	Tag 28	Tag 84
1	Verum i.m.	59,5	77,9	89,4	87,7
2	Verum i.m.	56,2	58,6	78,6	86,2
3	Verum s.c.	69,9	77	83,5	79,1
4	Verum s.c.	83,7	85,6	87	88
5	Placebo i.m.	82,7	85,3	91,4	92
6	Verum i.m.	60,9	82,2	88,9	90,2
7	Placebo s.c.	79,5	-	85,4	86,8
8	Verum s.c.	60	69,2	84,9	91,8
9	Placebo i.m.	83,3	69,8	78,9	97
10	Verum i.m.	56,3	67,9	89,1	80,8
11	Verum s.c.	55,3	60	68	57
13	Verum i.m.	81,6	79,1	85,6	91,8
14	Verum i.m.	83,8	78,8	91,2	84,6
15	Verum s.c.	84,8	82,8	92,8	85
18	Placebo i.m.	82,9	76,5	87,9	91,6
19	Placebo s.c.	69,4	62,4	85,6	96
20	Verum s.c.	80,1	84,9	85,6	87,3
21	Verum i.m.	86,7	73,3	94,2	89,1
22	Verum i.m.	51,5	53,3	63,6	61
23	Placebo s.c.	77,6	76,7	77,5	89,1
24	Verum i.m.	79,4	86	97,6	98,2
25	Placebo s.c.	82,9	68,1	84,9	80,4
27	Verum s.c.	86,8	90	83,9	74,7
28	Verum i.m.	80,3	88,1	93,2	86,6
29	Verum s.c.	79,1	74,4	82,9	92,5
30	Placebo i.m.	87,3	-	90,5	94,2
31	Verum s.c.	75,4	89,5	88,8	94,6
32	Verum i.m.	83	85,6	90,2	88,7
33	Verum s.c.	79,6	79,4	95,1	93,7
34	Placebo s.c.	70,3	67,2	78,1	-
35	Verum i.m.	80,4	77,6	87,2	77,4
36	Placebo s.c.	97,6	94,4	85,7	95,9
38	Verum s.c.	82,5	85,7	83,4	92,3

41	Placebo i.m.	66,5	69,7	84,3	83,3
43	Verum s.c.	88,9	92	95	95
44	Verum i.m.	91,1	81,2	87,7	-
45	Placebo i.m.	83,3	63,2	76,9	71,6
46	Placebo s.c.	88,9	-	79,2	95
47	Verum s.c.	88,5	84,5	93,2	89,4

Tabelle 6.6.1 Individuelle Auflistung des prozentuellen Anteils der CD38+ naiven T-Lymphozyten im Verlauf der Studie (%)

Scr.Nr.	Behandlungs-gruppe	Tag 0	Tag 7	Tag 64
1	Verum i.m.	3,29	11,7	1,49
2	Verum i.m.	3,55	10,4	6,7
3	Verum s.c.	11	13,7	16,5
4	Verum s.c.	11,4	13,4	14
5	Placebo i.m.	5,12	8,26	7,35
6	Verum i.m.	8,93	11,4	8,45
7	Placebo s.c.	5,97	-	11,6
8	Verum s.c.	4,8	13,2	8,53
9	Placebo i.m.	12,4	7,01	8,79
10	Verum i.m.	11,5	20,2	7,63
11	Verum s.c.	11,3	5,98	9,61
13	Verum i.m.	6,6	8,98	7,37
14	Verum i.m.	9,32	8,36	8,03
15	Verum s.c.	4,2	19,1	14,2
18	Placebo i.m.	10,7	8,39	5,13
19	Placebo s.c.	16,8	11,2	12
20	Verum s.c.	1,2	26,4	7,44
21	Verum i.m.	5,38	16,9	13,2
22	Verum i.m.	6,01	21,9	15,3
23	Placebo s.c.	2,97	17,8	9,83
24	Verum i.m.	3,84	19,8	14,2
25	Placebo s.c.	4,48	17,7	5,06
27	Verum s.c.	5,75	22,8	13,6
28	Verum i.m.	6,38	30,2	20,7
29	Verum s.c.	9,54	22,1	14,3
30	Placebo i.m.	2,32	-	9,91
31	Verum s.c.	19,5	4,25	17,9
32	Verum i.m.	16,9	16,8	7,04
33	Verum s.c.	3,55	17,1	7,08
34	Placebo s.c.	2,5	22,5	6,65
35	Verum i.m.	3,41	19,9	14,4
36	Placebo s.c.	8,34	17,8	10,8
38	Verum s.c.	9,16	28,3	8,1

41	Placebo i.m.	2,27	28,9	3,37
43	Verum s.c.	3,85	24	12,3
44	Verum i.m.	6,23	23,6	19,2
45	Placebo i.m.	3,39	19,6	14,9
46	Placebo s.c.	2,61	-	4,52
47	Verum s.c.	1,78	9,89	9,14

Tabelle 6.6.2 Individuelle Auflistung des prozentuellen Anteils der CD38+ zentralen-T-Efferktorzellen im Verlauf der Studie (%)

Scr.Nr.	Behandlungs-gruppe	Tag 0	Tag 7	Tag 64
1	Verum i.m.	17,7	0,372	14,6
2	Verum i.m.	20,4	1,48	20,7
3	Verum s.c.	26,8	0,318	24,4
4	Verum s.c.	19,2	0,625	15,3
5	Placebo i.m.	17,9	0,383	16,2
6	Verum i.m.	45,1	1,16	43,5
7	Placebo s.c.	20,8	-	23,1
8	Verum s.c.	17,1	1,57	22,4
9	Placebo i.m.	36,1	1,16	46,8
10	Verum i.m.	32,3	0,769	30,2
11	Verum s.c.	38,1	0,495	43,4
13	Verum i.m.	27,3	0,689	28,3
14	Verum i.m.	30,7	0,648	29,3
15	Verum s.c.	28,1	2,81	34,3
18	Placebo i.m.	24,7	1,03	22,6
19	Placebo s.c.	36,1	2,1	36,2
20	Verum s.c.	17,8	6,46	22,2
21	Verum i.m.	38,3	2,27	31
22	Verum i.m.	24,5	4,62	25
23	Placebo s.c.	49,6	9,08	49,3
24	Verum i.m.	29,4	5,11	32,4
25	Placebo s.c.	20,1	2,07	16,2
27	Verum s.c.	21,6	10,8	15,6
28	Verum i.m.	29	5,14	27,8
29	Verum s.c.	35,7	3,33	32,3
30	Placebo i.m.	20,9	-	21
31	Verum s.c.	23	0,353	23,5
32	Verum i.m.	38	1,99	26,8
33	Verum s.c.	33,2	6,12	42,6
34	Placebo s.c.	27,4	4,04	26,5
35	Verum i.m.	16,9	3,89	21,5
36	Placebo s.c.	26,5	2,96	39,4
38	Verum s.c.	34,6	2,22	33,8

41	Placebo i.m.	12,5	3,99	12,9
43	Verum s.c.	26	8,03	17,9
44	Verum i.m.	28,1	4,69	26,6
45	Placebo i.m.	47,7	6,41	29,5
46	Placebo s.c.	17,7	-	18,5
47	Verum s.c.	20,5	4,89	22

Tabelle 6.6.3 Individuelle Auflistung des prozentuellen Anteils der CD38+ Gedächtnis-T-Lymphozyten im Verlauf der Studie (%)

Scr.Nr.	Behandlungs-gruppe	Tag 0	Tag 7	Tag 64
1	Verum i.m.	25,6	0,55	58
2	Verum i.m.	24,6	4,47	14,6
3	Verum s.c.	21,7	0,499	29,2
4	Verum s.c.	17,6	3,27	16,8
5	Placebo i.m.	12,5	0,969	17,3
6	Verum i.m.	14,4	0,924	13,7
7	Placebo s.c.	23,9	-	14,3
8	Verum s.c.	38,7	2,33	22,4
9	Placebo i.m.	11,2	1,03	5,72
10	Verum i.m.	23,3	2,25	19,2
11	Verum s.c.	18,2	0,451	5,04
13	Verum i.m.	25,2	1,18	13,7
14	Verum i.m.	21,8	0,789	17,6
15	Verum s.c.	18,8	7,27	24,4
18	Placebo i.m.	29,7	2,5	11,6
19	Placebo s.c.	24,2	3,21	7,95
20	Verum s.c.	19,3	11,7	36,3
21	Verum i.m.	32,1	3,08	37,3
22	Verum i.m.	14,2	7,74	21,2
23	Placebo s.c.	19,7	6,55	22,3
24	Verum i.m.	18,3	10,7	26,3
25	Placebo s.c.	21,4	6,29	15,5
27	Verum s.c.	34,4	12,5	35,2
28	Verum i.m.	31,9	11	27
29	Verum s.c.	7,7	5,54	16,8
30	Placebo i.m.	22,4	-	39,3
31	Verum s.c.	9,11	1,21	10
32	Verum i.m.	13,7	4,56	16,2
33	Verum s.c.	13,8	6,31	24,9
34	Placebo s.c.	20,8	10,3	25,9
35	Verum i.m.	17,5	7,84	24
36	Placebo s.c.	32	5,77	9,56
38	Verum s.c.	23,1	2,64	26,9

41	Placebo i.m.	28,3	12,6	51,6
43	Verum s.c.	17,3	11,7	39,4
44	Verum i.m.	18	8,57	23,3
45	Placebo i.m.	18,9	5,67	19,9
46	Placebo s.c.	27	-	17,4
47	Verum s.c.	8,87	7,88	23,4

Tabelle 6.7.1 Individuelle Auflistung des prozentuellen Anteils der CD14+ und CD16+ HLA-DR+ Monozyten im Verlauf der Studie (%)

Scr.Nr.	**Behandlungs-gruppe**	**Tag 0**	**Tag 7**	**Tag 28**	**Tag 84**	**Tag 0**	**Tag 7**	**Tag 28**	**Tag 84**
		CD14+				**CD16+ HLA-DR+**			
1	Verum i.m.	6,53	8,61	10,9	5,9	2,18	6,79	8,07	2,17
2	Verum i.m.	14,5	27,2	12,6	21,5	0,367	1,09	1,67	1,77
3	Verum s.c.	13	14,4	11,7	4,01	0,996	3	3,47	2,43
4	Verum s.c.	6,94	7,75	6,53	5,41	2,41	4,88	4,07	3,71
5	Placebo i.m.	6,77	5,26	9,93	9,5	0,992	4,37	2,48	2,9
6	Verum i.m.	9,51	11,9	2,65	9,66	2,41	4,45	14,5	4,54
7	Placebo s.c.	10,2	-	20,4	16,5	2,62	-	3,25	6,39
8	Verum s.c.	11,4	11,3	28,6	15,3	0,925	3,22	2,23	4,12
9	Placebo i.m.	11,2	12,5	30	17,2	2,22	4,74	3,47	2,72
10	Verum i.m.	7,44	7,53	12,3	7,6	1,32	2,94	2,02	4,63
11	Verum s.c.	13,7	20,4	12,8	6,54	2,3	1,51	2,44	3,47
13	Verum i.m.	8,97	14,7	14,1	11,6	3,85	1,99	2,98	3,56
14	Verum i.m.	6,24	17,8	9,98	5,26	1,27	2,46	2,4	9,86
15	Verum s.c.	16,8	6,46	12,7	10,8	1,55	2,99	2,81	5,65
18	Placebo i.m.	6,81	11,4	9,49	19,9	1,87	2,93	3,12	2,31
19	Placebo s.c.	9,89	22,1	20,4	12,7	2,76	3	2,29	5,96
20	Verum s.c.	10,2	11,3	14,8	17,5	0,266	4,41	1,9	5,4
21	Verum i.m.	8,64	19,2	19,8	14,1	1,14	1,87	2,35	2,45
22	Verum i.m.	13,8	13,5	32,6	11,4	0,196	1,93	0,708	2,16
23	Placebo s.c.	10,7	26,2	17,7	14,8	1,58	12,4	3,97	4,86
24	Verum i.m.	9,78	13,4	16,7	13,8	2,58	2,31	1,91	2,72
25	Placebo s.c.	11	23,9	14	13,4	1,29	0,835	1,35	1,55
27	Verum s.c.	30	13	15,3	13,2	1,66	3,45	3,48	5
28	Verum i.m.	9,39	10,3	15,5	9,55	1,8	5,85	4,6	4,32
29	Verum s.c.	8,74	8,18	14,8	15,5	2,75	4,69	3,27	4,56
30	Placebo i.m.	12,6	-	21	16,8	1,16	-	3,45	2,42
31	Verum s.c.	9,5	9,99	13,9	9,97	3,07	3,48	2,11	4,03
32	Verum i.m.	7,67	29,8	17,9	12,6	1,44	2,36	3,97	2,02
33	Verum s.c.	26,6	24,3	23,3	22,4	0,166	1,9	1,28	1,99
34	Placebo s.c.	11,8	9,52	11,1	6,88	0,173	2,32	1,73	1,7
35	Verum i.m.	11,8	15,6	11	12,5	1,73	4,65	5,11	5,97

36	Placebo s.c.	6,08	15,9	12,9	25,5	3,96	2,15	2,17	5,69
38	Verum s.c.	10,7	13,3	11,4	8,98	1,71	1,06	3,37	2,88
41	Placebo i.m.	7,58	7,09	16,6	6,7	1,98	4,65	3,07	4
43	Verum s.c.	8,04	16,9	20,1	13,1	3,56	3,92	1,5	4,36
44	Verum i.m.	13,1	14,9	8,58	17,1	1,1	7,11	3,96	2,77
45	Placebo i.m.	13,6	10,4	19,3	23,8	1,37	3,89	1,53	2,85
46	Placebo s.c.	5,85	-	23,9	9,67	0,792	-	7,82	2,81
47	Verum s.c.	21,4	17,7	22,5	17,5	0,628	2,25	0,98	2,95

Tabelle 6.7.2. Individuelle Auflistung des prozentuellen Anteils der CD16-+HLA-DR- und CD16- HLA-DR+ Monozyten im Verlauf der Studie (%)

Scr.Nr.	**Behandlungs-gruppe**	**Tag 0**	**Tag 7**	**Tag 28**	**Tag 84**	**Tag 0**	**Tag 7**	**Tag 28**	**Tag 84**
		CD16-+HLA-DR-				**CD16- HLA-DR+**			
1	Verum i.m.	7,07	6,82	8,26	5,36	7,08	6,02	7,91	5,21
2	Verum i.m.	2,38	5,04	1,36	5,24	1,04	3,97	2,11	2,57
3	Verum s.c.	4,6	9,4	8,02	8,44	4,58	3,62	6,37	6,78
4	Verum s.c.	7,15	11,1	10,7	6,04	8,19	11,6	6,43	7,74
5	Placebo i.m.	14,5	9,89	4,63	6,85	3,46	3,53	3,73	4,33
6	Verum i.m.	20,3	10,2	10	6,82	3,44	2,9	8,34	4,93
7	Placebo s.c.	8,16	-	6,75	4,72	5,86	-	3,95	8,12
8	Verum s.c.	12	11	4,93	5,39	4,48	5,94	6,28	6,91
9	Placebo i.m.	1,74	2,88	3,36	10,5	5,46	6,08	4,89	3,16
10	Verum i.m.	9,36	5,46	6,77	8,82	2,88	4,54	2,58	4,33
11	Verum s.c.	16,9	6,83	2,81	7,37	3,62	3,42	4,17	4,11
13	Verum i.m.	35,3	7,79	9,84	1,71	3,73	7,19	4,58	6,71
14	Verum i.m.	16,3	14,2	7,95	11,6	2,65	3,41	2,79	8,12
15	Verum s.c.	3,15	2,14	4,75	1,4	4,76	6,65	2,29	7,14
18	Placebo i.m.	1,81	2,27	2,46	6,7	4,15	5,23	3,91	4,42
19	Placebo s.c.	8,32	4,11	4,33	18,8	5,74	4,49	2,41	5,34
20	Verum s.c.	2,61	26,3	11,7	12,6	2,75	2,26	2,32	5,13
21	Verum i.m.	7,13	4,13	4,79	4,43	4,19	3,15	5,31	4,74
22	Verum i.m.	1,57	3,08	6,18	7,31	2,33	3,02	1,39	5,1
23	Placebo s.c.	4,5	35,1	47,3	39,2	3,12	3,11	1,2	1,69
24	Verum i.m.	5	2,8	4,92	5,48	5,11	4,57	5,86	3,63
25	Placebo s.c.	10,4	2,83	5,66	10,5	2,72	3,89	1,89	4,14
27	Verum s.c.	3,53	4,54	3,98	2,36	6,14	3,26	5,12	7,33
28	Verum i.m.	2,51	13,6	6,95	4,9	4,74	7,07	9,55	11
29	Verum s.c.	9,01	12,3	4,99	11,6	4,09	5,99	7,87	5,59
30	Placebo i.m.	2,24	-	7,37	4,69	3,16		7,61	4,33
31	Verum s.c.	8,92	22,3	4,46	3,5	10,6	3,54	5,29	6,03
32	Verum i.m.	24,5	8,94	12,3	8,81	2,17	6,78	5,15	5,58
33	Verum s.c.	0,952	1,24	2,82	2,06	2,1	3,07	2,09	3,63
34	Placebo s.c.	1,55	2,7	2,88	5,62	3,74	4,93	6,63	4,96

35	Verum i.m.	8,22	6,97	6,94	15,6	3,32	4,89	4,87	4,99
36	Placebo s.c.	14,4	7,5	2,11	35,6	7,75	5,8	7,06	1,6
38	Verum s.c.	11,2	3,76	7,99	7,39	6,81	4,69	7,19	4,97
41	Placebo i.m.	3,22	2,3	6,18	1,79	2,12	3,11	8,33	10,5
43	Verum s.c.	24,8	7,69	4,62	18,1	3,53	5,65	7,07	3,96
44	Verum i.m.	2,27	21,7	3,99	4,56	6,52	5,22	3,59	5,27
45	Placebo i.m.	2,06	1,95	1,41	2,35	8,16	10,4	3,99	7,31
46	Placebo s.c.	6,17	-	7,5	10,6	1,18	-	14,9	2,99
47	Verum s.c.	4,83	5,46	4,65	7,72	2,16	3,77	4,87	5,64

Tabelle 6.7.3. Individuelle Auflistung des prozentuellen Anteils der CD16- HLA-DR- Monozyten im Verlauf der Studie (%)

Scr.Nr.	Behandlungs-gruppe	Tag 0	Tag 7	Tag 28	Tag 84
1	Verum i.m.	83,7	80,4	75,8	87,3
2	Verum i.m.	96,2	89,9	94,9	90,4
3	Verum s.c.	89,8	84	82,1	82,3
4	Verum s.c.	82,2	72,4	78,8	82,5
5	Placebo i.m.	81	82,2	89,2	85,9
6	Verum i.m.	73,8	82,4	67,1	83,7
7	Placebo s.c.	83,4	-	86,1	80,8
8	Verum s.c.	82,6	79,9	86,6	83,6
9	Placebo i.m.	90,6	86,3	88,3	83,6
10	Verum i.m.	86,4	86,5	88,6	82,2
11	Verum s.c.	77,2	88,2	90,6	85
13	Verum i.m.	57,1	83	82,6	88
14	Verum i.m.	79,8	79,9	86,9	70,4
15	Verum s.c.	90,5	88,2	90,2	85,8
18	Placebo i.m.	92,2	89,6	90,5	86,6
19	Placebo s.c.	83,2	88,4	91	69,9
20	Verum s.c.	94,4	67,1	84,1	76,8
21	Verum i.m.	87,5	90,8	87,6	88,4
22	Verum i.m.	95,9	92	91,7	85,4
23	Placebo s.c.	90,8	49,4	47,6	54,3
24	Verum i.m.	87,3	90,3	87,3	88,2
25	Placebo s.c.	85,6	92,4	91,1	83,8
27	Verum s.c.	88,7	88,7	87,4	85,3
28	Verum i.m.	90,9	73,5	78,9	79,8
29	Verum s.c.	84,2	77	83,9	78,2
30	Placebo i.m.	93,4	-	81,6	88,6
31	Verum s.c.	77,4	70,7	88,1	86,4
32	Verum i.m.	71,9	81,9	78,5	83,6
33	Verum s.c.	96,8	93,8	93,8	92,3
34	Placebo s.c.	94,5	90	88,8	87,7

35	Verum i.m.	86,7	83,5	83,1	73,5
36	Placebo s.c.	73,9	81,9	88,7	57,1
38	Verum s.c.	80,2	90,5	81,4	84,8
41	Placebo i.m.	92,7	89,9	82,4	83,8
43	Verum s.c.	68,1	82,7	86,8	73,6
44	Verum i.m.	90,1	65,9	88,5	87,4
45	Placebo i.m.	88,4	83,7	93,1	87,5
46	Placebo s.c.	91,9	-	69,8	83,5
47	Verum s.c.	92,4	88,5	89,5	83,7

Tabelle 6.8. Individuelle Auflistung der humoralen Immunantwort vor (Tag 0) und nach (Tag 28) der Behandlung

		CMV (OD)		CMV (DU/ml)		EBV		VZV	
Scr.Nr.	**Behandlungs-gruppe**	**Tag 0**	**Tag 28**	**Tag 0**	**Tag 28**	**Tag 0**	**Tag 28**	**Tag 0**	**Tag 28**
1	Verum i.m.	0,4	0,4	0	56	3,2	3,3	1,7	1,5
3	Verum i.m.	3,2	3,1	15400	14700	3,4	3,4	1,4	1,4
4	Verum s.c.	2,1	2,1	9223	9179	3,2	3,1	1,3	1,3
5	Verum s.c.	1,6	1,5	6351	6115	2,0	1,8	0,5	0,5
6	Placebo i.m.	0,3	0,3	0	0	2,9	2,5	1,4	1,5
7	Verum i.m.	0,4	0,5	0	158	0,4	0,3	0,9	1,0
8	Placebo s.c.	2,2	2,7	9777	12300	2,2	2,5	1,2	1,3
9	Verum s.c.	0,4	0,4	0	0	3,4	3,4	1,8	1,8
10	Placebo i.m.	2,7	2,6	12400	12300	1,6	1,6	1,0	1,0
11	Verum i.m.	3,0	3,1	14300	14700	2,0	2,3	1,0	0,8
14	Verum s.c.	0,5	0,5	460	373	2,6	2,5	1,1	0,9
15	Verum i.m.	0,7	0,8	1269	2011	0,7	0,7	0,4	0,5
18	Verum i.m.	3,1	0,5	14600	408	1,8	0,3	0,8	0,9
20	Verum s.c.	2,2	2,4	10000	10700	2,7	2,9	1,0	1,2
21	Placebo i.m.	2,8	2,9	13100	13500	3,1	3,0	1,2	1,2
22	Placebo s.c.	2,4	2,9	11100	13600	3,0	3,2	1,1	1,3
23	Verum s.c.	0,4	0,8	0	1958	0,5	0,5	0,6	0,7
24	Verum i.m.	0,4	0,4	3	0	1,7	1,7	0,9	0,6
25	Verum i.m.	0,5	0,5	533	300	1,9	2,0	1,3	1,3
27	Placebo s.c.	2,5	2,8	11400	12900	3,4	3,4	0,7	0,9
28	Verum i.m.	2,2	2,3	9710	10500	3,1	3,3	1,1	1,2
29	Placebo s.c.	2,5	2,6	11700	12000	2,6	2,6	1,3	1,2
30	Verum s.c.	0,7	0,7	1252	1593	1,1	1,2	1,2	1,3
31	Verum i.m.	3,1	3,2	14900	15200	1,7	1,8	0,7	0,8
32	Verum s.c.	1,9	2,2	8310	9991	2,7	2,4	1,4	1,4
33	Placebo i.m.	3,4	0,6	16200	1027	1,2	2,2	0,8	1,1
34	Verum s.c.	0,4	0,4	0	0	3,3	3,3	1,0	0,9
35	Verum i.m.	3,3	3,3	15800	15800	1,2	1,2	1,0	0,9
36	Verum s.c.	0,8	0,6	2308	1081	0,3	0,3	1,2	1,5

38	Placebo s.c.	0,4	0,7	0	1266	0,3	0,9	1,1	1,2
41	Verum i.m.	0,6	0,4	1174	0	2,5	2,5	1,4	1,3
43	Placebo s.c.	0,4	0,4	24	71	3,3	3,3	1,5	1,0
44	Verum s.c.	1,8	2,1	7801	9054	2,9	3,1	0,8	1,0
45	Placebo i.m.	2,2	2,2	9799	9594	1,3	1,6	1,4	1,3
46	Verum s.c.	0,3	0,3	0	0	2,6	2,7	0,9	0,9
47	Verum i.m.	0,4	0,4	0	135	0,9	1,0	1,3	1,3

Tabelle 6.9. UV Index von Februar bis Mai 2013 vom Standort Lindenberg (715 km südlich von Berlin) und vom Standort Zingst (287 km nördlich von Berlin) im Durchschnitt.

Tag	Februar	März	April	Mai
1	0	2	2	5
2	0	2	2	3
3	1	2	2	4
4	0	2	3	5
5	1	2	1	5
6	1	2	3	4
7	1	2	3	4
8	1	1	3	3
9	1	1	3	4
10	1	0	2	4
11	1	1	2	4
12	1	2	2	5
13	1	2	2	5
14	1	2	3	5
15	1	2	4	6
16	0	2	3	-
17	0	2	4	-
18	1	-	5	-
19	1	1	3	-
20	1	2	4	-
21	1	2	4	-
22	1	2	3	-
23	1	3	5	-
24	1	3	5	-
25	1	3	6	-
26	0	3	3	-
27	1	2	3	-
28	1	2	4	-
29	-	1	3	-
30	-	2	4	-
31	-	2	-	-

7 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Katharina Sophie Wylon, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Immunologische Wirkung einer Einmalgabe von 100.000 I.E. Cholecalciferol (Vitamin D)“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.
Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.
Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum Katharina Sophie Wylon

8 LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 PUBLIKATIONSLISTE

1. Wylon K, Hompes S, Worm M. Exercise-induced anaphylaxis Hautarzt. 2013 Feb;64(2):97-101. doi: 10.1007/s00105-012-2451-7

10 DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. med. Worm danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. rer. nat. Drozdenko und Herrn Dr. med. Heine die mir zum Verständnis vieler Quellen verhalfen und mir wichtige sachliche Hinweise gaben.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Worm, die mich auf dem Weg zur Promotion begleitet und unterstützt haben.

Ohne die Liebe, Unterstützung, die immerwährende Ermunterung, Rat und Beistand meiner Eltern wäre diese Arbeit ebenso wenig möglich gewesen, wie meine gesamte Ausbildung.