

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin  
(Direktor Univ.-Prof. Dr. med. M. Nauck)

der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

# **Die Assoziation zwischen Vitamin D und chronischer Inflammation in der Allgemeinbevölkerung**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der Universitätsmedizin

der Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2014

vorgelegt von:

Liesa Mellenthin

geb. am 20.04.1990

in Greifswald

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Henri Wallaschowski

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Hans-Christof Schober

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum O 0.88 der Klinik für Innere Medizin B

Tag der Disputation: 18.04.2017

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	2
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1. Vitamin D Synthese .....	3
1.2. Bedeutung des Vitamin D .....	4
1.3. Vitamin D, Inflammation und kardiovaskuläre Erkrankungen.....	5
1.4. Herleitung der Fragestellung.....	6
<b>2. Methoden .....</b>	<b>7</b>
2.1. Studiendesign und Studienpopulation .....	7
2.2. Definitionen .....	8
2.3. Statistische Analysen .....	9
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>11</b>
3.1. Vitamin D Status.....	11
3.2. Vergleich Raucher / Nichtraucher .....	11
3.3. Assoziation zwischen der 25(OH)D Konzentration und den Inflammationsmarkern .....	12
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>14</b>
4.1. Assoziation zwischen 25(OH)D und hs-CRP.....	14
4.2. Assoziation zwischen 25(OH)D und Fibrinogen .....	15
4.3. Assoziation zwischen 25(OH)D und der Leukozytenzahl .....	16
4.4. Biologischer Zusammenhang zwischen 25(OH)D und chronischer Inflammation.....	17
4.5. Einordnung der Ergebnisse .....	18
4.6. Stärken und Schwächen .....	18
4.7. Schlußfolgerungen .....	19
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>20</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>21</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>27</b>
7.1. Wissenschaftliche Arbeit.....	27
7.2. Eidesstattliche Erklärung .....	35
7.3. Lebenslauf .....	36
7.4. Danksagung.....	37

## Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of Variance
BMI	Body Mass Index
CRP	c-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESCEO	European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis
ESTHER	Epidemiologische Studie zu Chancen der Verhütung, Früherkennung und optimierten Therapie chronischer Erkrankungen in der älteren Bevölkerung
HbA1c	Hämoglobin A1c
hs-CRP	hoch sensitives c-reaktives Protein
IL	Interleukin
IU	international unit
LURIC	Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
OR	Odds Ratio
SHIP	Study of health in Pomerania
TH	T-Helferzelle
UV-Licht	ultraviolettes Licht
1,25(OH)2D	1,25-dihydroxy Vitamin D (Calcitriol)
25(OH)D	25-hydroxy Vitamin D

# 1. Einleitung

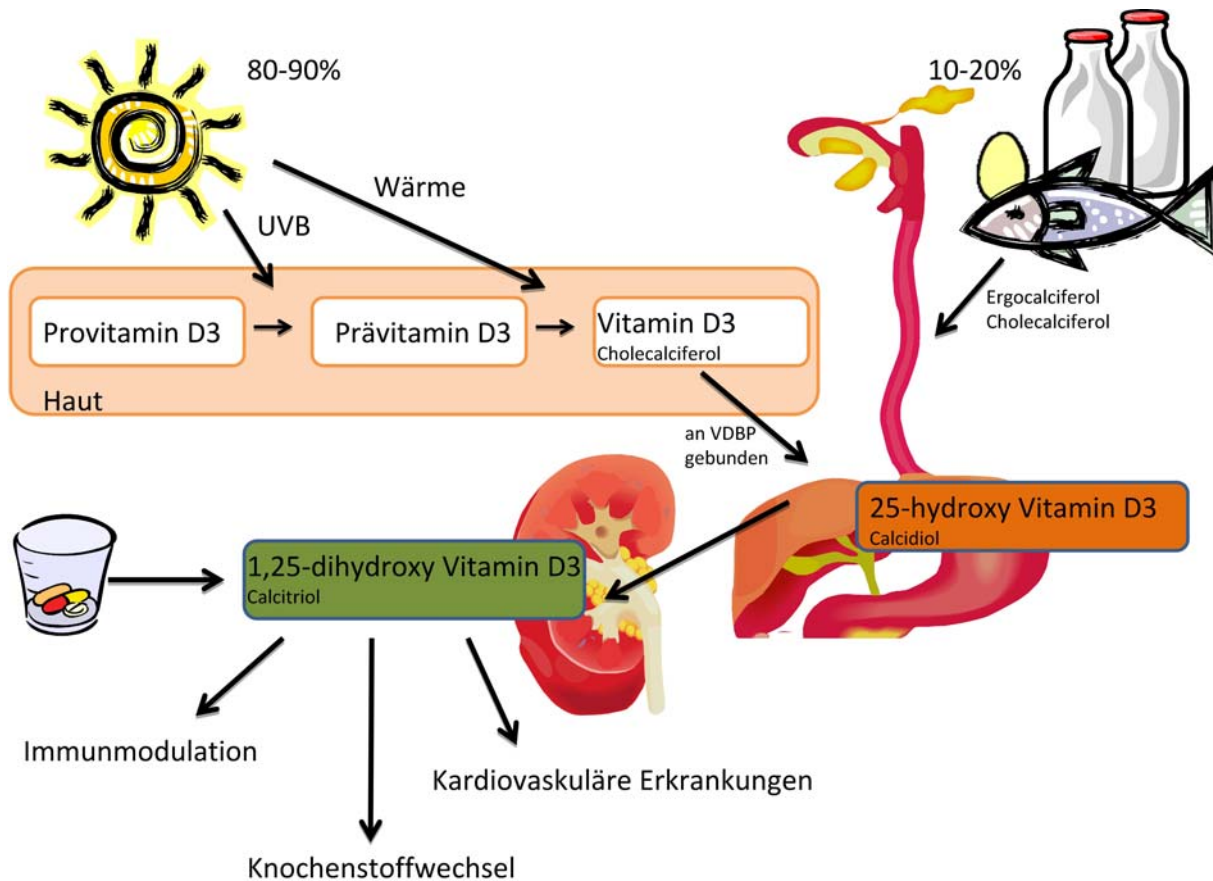
Im Jahr 2007 wurden die nichtklassischen positiven Effekte des Vitamin D vom amerikanischen Magazin „Time“ zu den zehn wichtigsten medizinischen Neuigkeiten des Jahres gezählt [1, 2]. Besonders hervorgehoben wurde dabei die Rolle des Vitamin D in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie Typ 1 Diabetes oder Multipler Sklerose und der Entwicklung von Krebserkrankungen wie dem Kolonkarzinom. Um maximal von der positiven Wirkung des Vitamin D zu profitieren, wurde eine tägliche Einnahme von 1000 IU empfohlen [1].

## 1.1. Vitamin D Synthese

Vitamin D ist ein fettlösliches Vitamin, dessen metabolisch aktive Form, das 1,25-dihydroxy Vitamin D [1,25(OH)<sub>2</sub>D, auch Calcitriol], als Steroidhormon agiert [3]. Vitamin D kann über die Nahrung als Vitamin D<sub>2</sub> oder D<sub>3</sub> aufgenommen, aber auch vom Körper selbst über die Haut produziert werden (Abbildung 1). Die Synthese des Vitamin D in der Haut beginnt mithilfe von UV-Licht, indem aus dem Provitamin 7-Dehydrocholesterol durch eine fotochemisch induzierte Reaktion der B-Ring aufgespalten wird und Prävitamin D<sub>3</sub> entsteht [4]. Dieses ist thermodynamisch instabil und reagiert sofort zu Vitamin D<sub>3</sub>. Anschließend gelangt es ins Blut und wird, überwiegend gebunden an das Vitamin-D-bindende-Protein, zur Leber transportiert. Schließlich wird es durch zwei Hydroxylierungen, erst in der Leber (25-Hydroxylase) und dann in der Niere (1 $\alpha$ -Hydroxylase) zum aktiven 1,25(OH)<sub>2</sub>D.

Regulatorisch kann 25-hydroxy Vitamin D [25(OH)D] in der Niere über die 24-Hydroxylase auch zum unwirksamen 24,25-dihydroxy Vitamin D umgewandelt werden. Die Bildung des aktiven 1,25(OH)<sub>2</sub>D in der Niere ist fein reguliert und wird über ein erhöhtes Parathormon, einen verringerten Kalziumspiegel im Blut und einen erniedrigten Phosphatspiegel getriggert. Calcitriol selbst hemmt die 1 $\alpha$ -Hydroxylase und aktiviert die 24-Hydroxylase. Calcitriol wirkt an den Zellen der Zielorgane, indem es an ein intrazelluläres Rezeptorprotein, den Vitamin-D-Rezeptor, bindet und in den Zellkern transportiert wird. Dort kommt es zur Bindung des Vitamin-Rezeptor-Komplexes an die DNA und dadurch zu einer veränderten Transkription verschiedener Gene und Beeinflussung der von ihnen kontrollierten Proteinbiosynthese [4, 5].

**Abbildung 1.** Vitamin D Synthese (modifiziert nach [2-4])



## 1.2. Bedeutung des Vitamin D

Vitamin D ist seit langem für seinen Einfluss auf den Kalzium- und Phosphatstoffwechsel und die Knochenhomöostase [3] sowie die Vitamin-D-Mangel-Erkrankungen Osteomalazie und Rachitis bekannt. Bei der Osteomalazie handelt es sich um eine Knochenstoffwechselstörung, die zur Demineralisation und damit zur Erweichung des Knochens führt [6]. Im Kindesalter wird diese Erkrankung als Rachitis bezeichnet.

Vor etwa 30 Jahren wurde ein Einfluss von Vitamin D auf die angeborene und erworbene Immunabwehr festgestellt [7] und seitdem zahlreich belegt [8-13]. In den letzten Jahren wurden einige weitere Funktionen dieses wichtigen Vitamins entdeckt. So ergab eine in den USA durchgeführte Studie, dass geringe 25(OH)D Spiegel bei Erwachsenen mit Hypertension, Hyperglykämie und dem metabolischen Syndrom assoziiert sind [8]. Außerdem zeigten verschiedene Studien einen Zusammenhang des 1,25(OH)<sub>2</sub>D und 25(OH)D Spiegels mit der Entwicklung von Depressionen [14], Multipler Sklerose [11], Typ 1 Diabetes [9], Asthma bronchiale [15] und rheumatoider Arthritis [10]. Auch eine

Assoziation zu verschiedenen Krebsarten, insbesondere dem kolorektalen Karzinom [12], konnte hergestellt werden. Allerdings bestätigten nicht alle Studien diesen positiven Effekt auf Tumorerkrankungen. So ergab die Womens Health Studie, dass eine Vitamin D Supplementation mit 400 IU Vitamin D pro Tag keinen positiven Effekt auf die Brustkrebsentwicklung hat [16].

Neben dem Einfluss von Vitamin D auf bestimmte Erkrankungen konnte auch eine Assoziation zur Gesamtsterblichkeit hergestellt werden. In der ESTHER Studie, die knapp 10000 Probanden aus dem Saarland einschloss, war die Sterblichkeitsrate in einer achtjährigen Beobachtungszeit bei Probanden mit sehr niedrigen (<12 ng/ml) 25(OH)D Spiegel 1,7-fach und bei Teilnehmern mit niedrigen (<20 ng/ml) Vitamin D Spiegel 1,2-fach erhöht [17]. Welcher Vitamin D Spiegel optimal ist, ist derzeit noch strittig. Die US-Gesundheitsbehörde Institute of Medicine untersuchte von 2008-2010 die bis dato aktuelle Literatur hinsichtlich Vitamin D und dessen Einfluss auf die Gesundheit [18]. Die Studie ergab, dass gesundheitliche Vorteile bei einem Vitamin D Spiegel >20 ng/ml umstritten sind. Daraufhin wurde der Tagesbedarf auf nicht mehr als 600 IU festgelegt und die maximale tägliche Dosis auf 4000 IU heraufgesetzt [18]. Die European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) empfiehlt einen 25(OH)D Spiegel von 20 ng/ml und damit verbunden eine zusätzliche Supplementation von 800-1000 IU täglich [19].

### **1.3. Vitamin D, Inflammation und kardiovaskuläre Erkrankungen**

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen zu den wichtigsten Todesursachen weltweit [20]. Neben gut erforschten Risikofaktoren wie Rauchen, Übergewicht oder Diabetes zeigen erhöhte Konzentrationen von Inflammationsmarkern, z.B. C-reaktives Protein (CRP), Fibrinogen oder die Leukozytenzahl ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen an [21]. So induziert CRP die Bildung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 1 (IL-1), die vermutlich die Entstehung arteriosklerotischer Plaques fördern und zu einer Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems führen [21, 22]. Verschiedene epidemiologische Studien konnten einen Zusammenhang zwischen erhöhten Inflammationsmarkern und einem daraus resultierenden höheren Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse feststellen [23-25].

Auch ein Vitamin D Mangel wird als potentieller Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen diskutiert [8, 13]. Der Zusammenhang zwischen 25(OH)D Spiegel und

kardiovaskulären Erkrankungen wurde bereits in diversen epidemiologischen Studien untersucht [26, 27]. In der Health Professionals Follow-Up Study [26] wurde bei 18.225 Männern frei von kardiovaskulären Vorerkrankungen gezeigt, dass ein niedriger 25(OH)D Spiegel mit einem doppelt so hohen Risiko für einen Myokardinfarkt einhergeht wie ein suffizienter 25(OH)D Spiegel. Auch die Framingham Heart Study bestätigte diesen Zusammenhang [27]. Probanden mit einem 25(OH)D Spiegel unter 15 ng/ml hatten im Vergleich zu Vitamin D suffizienten Probanden ein 60% höheres Risiko, eine kardiovaskuläre Erkrankung zu entwickeln [27].

#### **1.4. Herleitung der Fragestellung**

Der Zusammenhang zwischen Vitamin D Mangel und kardiovaskulären Erkrankungen könnte über chronische Inflammation vermittelt sein. So zeigen verschiedene Studien, dass ein geringerer Vitamin D Spiegel zu erhöhten Inflammationsmarkern und damit zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen führt [8, 13, 28, 29]. Diverse Studien fanden einen inversen Zusammenhang zwischen dem 25(OH)D oder dem 1,25(OH)2D Spiegel mit CRP oder hoch-sensitivem CRP (hs-CRP) [30-32]. Andere Studien konnten einen Zusammenhang nicht bestätigen [33-36]. So zeigte eine Studie mit 218 Patienten älter als 65 Jahre aus Helsinki keinen Zusammenhang zwischen dem 25(OH)D Spiegel und hs-CRP. Außerdem konnte keine Beeinflussung des hs-CRP- oder Fibrinogenspiegels durch die Gabe von Vitamin D festgestellt werden [33].

Die Mehrzahl der Studien zum Zusammenhang zwischen Vitamin D und chronischer Inflammation sind limitiert durch kleine Probandenkollektive [29, 37] oder die Auswahl von Probanden mit speziellen Krankheitsbildern wie z.B. Polyarthritits [30] oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen [31]. Gleichzeitig gibt es nur wenige Studien, die den Zusammenhang zwischen 25(OH)D und chronischer Inflammation in der Allgemeinbevölkerung betrachteten [32, 35]. Das Ziel dieser Arbeit war deshalb, die Assoziation zwischen 25(OH)D und den drei Inflammationsmarkern hs-CRP, Fibrinogen und der Leukozytenzahl in der Allgemeinbevölkerung im Nordosten Deutschlands näher zu untersuchen [38, 39].



## **2. Methoden**

### **2.1. Studiendesign und Studienpopulation**

Die der Arbeit zugrundeliegenden Daten stammen aus der ersten Follow-up Untersuchung der Study of Health in Pomerania (SHIP). SHIP ist eine altersstratifizierte, populationsbasierte Studie in Vorpommern [38, 39]. Zu den Zielen der Studie zählen die Ermittlung der Inzidenz und Prävalenz von Erkrankungen sowie die Erfassung des Zusammenhangs zwischen Risikofaktoren und Erkrankungen. Ein weiteres Ziel der Studie ist die Erfassung der Mortalität und Morbidität in Nordostdeutschland, um Vergleiche mit anderen Regionen Deutschlands, besonders vor dem Hintergrund der Veränderung der Lebensverhältnisse durch die Wiedervereinigung, durchzuführen. In einem zweistufigen Verfahren wurde eine randomisierte, repräsentative Stichprobe der Einwohner von Stralsund, Greifswald und den umgebenden Gemeinden gezogen. Von den 7008 gezogenen 20-79 jährigen Männern und Frauen nahmen 4308 Probanden an der Basisuntersuchung (SHIP-0) zwischen Oktober 1997 und Mai 2001 teil. Nach fünf Jahren wurden im Rahmen der ersten Follow-up Untersuchung (SHIP-1) alle Probanden erneut eingeladen. Es nahmen 3300 Männer und Frauen an den SHIP-1 Untersuchungen teil.

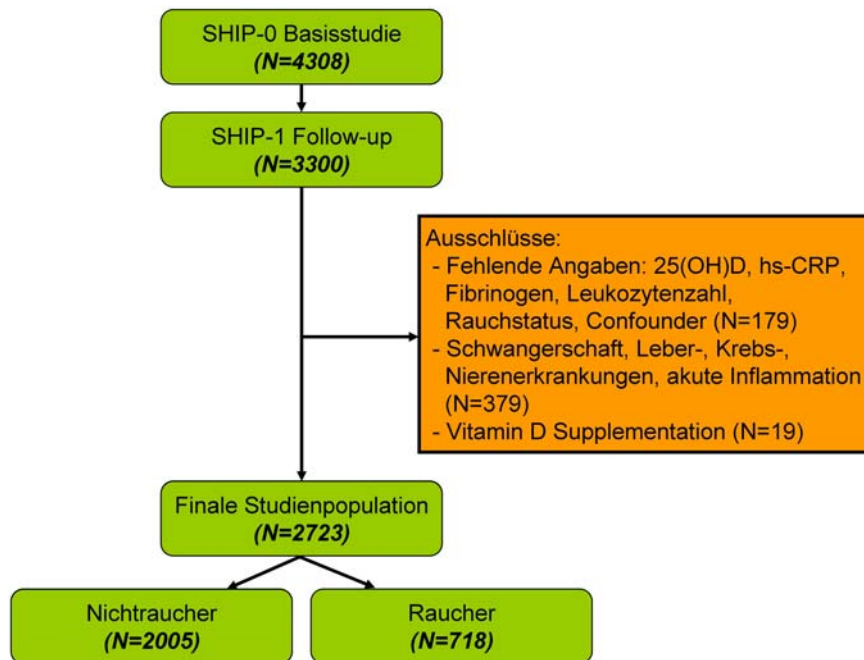
Die Untersuchungen umfassten neben einem umfangreichen persönlichen Interview eine Reihe von körperlichen Untersuchungen, einschließlich einer Blutentnahme, Blutdruckmessungen, Zahn-, Haut- und kardiometabolischen Untersuchungen sowie diverse Ultraschalluntersuchungen. Die Blutabnahme erfolgte ganztägig und über das Jahr verteilt. Aus den gewonnenen SHIP-1 Serumproben wurden die Konzentrationen des 25(OH)D sowie des hs-CRP bestimmt. Des Weiteren wurden im Zitratplasma die Fibrinogenkonzentration und im Vollblut die Leukozytenzahl bestimmt.

Für die vorliegende Studie wurden alle SHIP-1 Probanden ausgeschlossen, die eine Krebs-, Leber- oder Nierenerkrankung (n=223) oder eine akute Inflammation (hs-CRP Konzentrationen >10 mg/l, n=127) aufwiesen, alle schwangeren Frauen (n=12) sowie alle Probanden mit fehlenden Angaben zum 25(OH)D, den Inflammationsmarkern (n=170), dem Rauchstatus (n=2) und den Confoundern (n=9) sowie alle Probanden, die Vitamin D supplementierten (n=25). Es ergab sich eine finale Studienpopulation von 2723 Probanden, darunter 2005 Nichtraucher und 718 Raucher (Abbildung 1).

Alle Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme am Studienprogramm. Die Studie folgt den Prinzipien der Deklaration von Helsinki und wurde durch die

Ethikkommission der Ärztekammer Mecklenburg-Vorpommern an der Universität Greifswald bestätigt.

**Abbildung 2.** Selektion der Studienpopulation



## 2.2. Definitionen

Der Vitamin D Status wurde anhand des 25(OH)D Spiegels in Defizienz [25(OH)D: 0-9,9 ng/ml] und Insuffizienz [25(OH)D: 10-19,9 ng/ml] nach der ESCEO klassifiziert [19]. Höhere 25(OH)D Konzentrationen wurden als Suffizienz [25(OH)D: 20-29,9 ng/ml] und Vitamin D Zielbereich [25(OH)D  $\geq$ 30 ng/ml] definiert. Im Folgenden wird die 25(OH)D Konzentration in ng/ml angegeben, eine Umrechnung in nmol/l erfolgt mit dem Faktor 2,496. Der aktuelle Rauchstatus wurde anhand des persönlichen Interviews definiert. Probanden wurden als Diabetiker eingestuft, wenn sie eine entsprechende ärztliche Diagnose berichteten, antidiabetische Medikation einnahmen oder einen erhöhten HbA1c ( $\geq$ 6,5%) oder Blutzuckerspiegel ( $\geq$ 11,1 mmol/l) aufwiesen. Eine Dyslipidämie wurde definiert als ein Serum Triglyzerid Spiegel über  $\geq$ 2,3 mmol/l oder ein high-density Lipoproteinspiegel von  $<$ 1,0 mmol/l bei Männern oder  $<$ 1,3 mmol/l bei Frauen. Zusätzlich wurde die Einnahme von Lipidsenkern (ATC C10) als Dyslipidämie gewertet. Die Einnahme von Corticosteroiden (ATC D07, H02, S01BA-BB, S01CA-CB, S02B-C, S03B-C, A01AC, A07EA, R01AD,

R03BA) oder nicht-steroidalen Antiphlogistika (M01A, M02AA, S01BC, S01CC) wurde als antiinflammatorische Medikation gewertet.

### **2.3. Statistische Analysen**

Dichotome und ordinalskalierte Daten wurden in Prozent angegeben, kontinuierliche Daten als Median mit 1. und 3. Quartil. Gruppenunterschiede wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test auf statistische Signifikanz geprüft. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Beim Test auf Interaktion wurde ein p-Wert  $<0,10$  als statistisch signifikant angesehen. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm SAS 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt.

Die Assoziationen zwischen der 25(OH)D Konzentration (unabhängige Variable) und den Inflammationsmarkern (abhängige Variablen) wurden mit Varianzanalysen (ANOVA), linearen und logistischen Regressionsmodellen untersucht. Für die Varianzanalyse wurde die 25(OH)D Konzentration in Defizienz, Insuffizienz, Suffizienz und Zielbereich kategorisiert. Es wurden adjustierte Mittelwerte für die Konzentration der Inflammationsmarker in Abhängigkeit vom Vitamin D Status berichtet. Um mögliche nicht-lineare Assoziationen zwischen der 25(OH)D Konzentration und den Inflammationsmarkern zu detektieren, wurden kubische Splines im linearen Regressionsmodell eingesetzt. Es wurden drei Knoten am 5., 50. und 95. Perzentil festgelegt [40]. Damit ergibt sich eine zusätzliche Splinekomponente im Modell, die 25(OH)D' genannt wurde. Der Likelihood Ratio Test gab an, dass das Modell zum Zusammenhang zwischen 25(OH)D und hs-CRP mit Splinekomponente im Vergleich zum Modell ohne Splinekomponente signifikant besser war. Daher wurde dieses Modell gewählt. Im Unterschied dazu zeigte sich keine Modellverbesserung anhand des Likelihood Ratio Tests bei den Modellen für Fibrinogen und die Leukozytenzahl. Daher wurden die Modelle ohne Splinekomponente gewählt. Es wurden  $\beta$ -Koeffizienten mit Standardfehler und p-Wert angegeben. Die hs-CRP Konzentration wurde log-transformiert, bevor sie in der ANOVA bzw. den linearen Regressionsmodellen verwendet wurde. Es zeigte sich eine Interaktion zwischen der 25(OH)D Konzentration und dem Rauchstatus im linearen Regressionsmodell für die Leukozytenzahl ( $p=0,07$ ). Daher wurden alle Analysen zur Leukozytenzahl getrennt für Raucher und Nichtraucher gerechnet. Es zeigten sich keine Interaktionen ( $p>0,10$ ) zwischen der 25(OH)D Konzentration und dem Rauchstatus in den linearen Regressionsmodellen für die hs-CRP und die Fibrinogenkonzentration. In einer zusätzlichen Analyse wurde die ANOVA für die hs-CRP und die Fibrinogenkonzentration getrennt für Raucher und Nichtraucher berechnet.

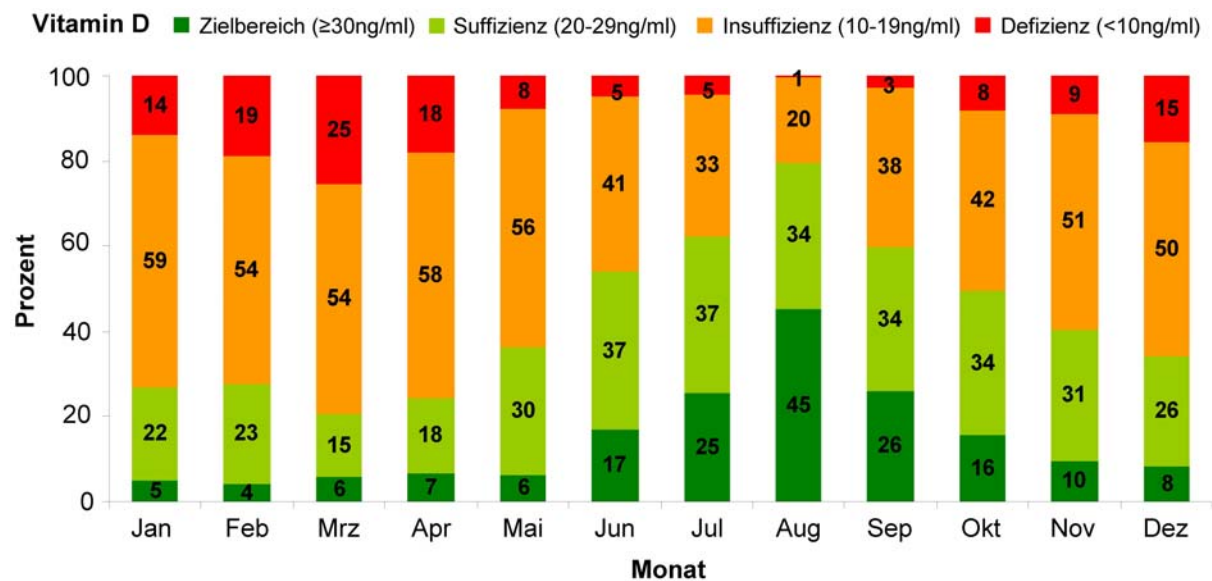
Für das logistische Regressionsmodell wurden die Inflammationsmarker in erhöhte ( $\geq 90.$  Perzentil) und normale ( $< 90.$  Perzentil) Konzentrationen kategorisiert. Es wurden Odds Ratios und die jeweiligen 95% Konfidenzintervalle berichtet. Alle Modelle wurden für Geschlecht, Alter, Taillenumfang, Diabetes Mellitus, Dyslipidämie, Einnahme von antiinflammatorischer Medikation und Monat der Blutabnahme adjustiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Vitamin D Status

Es zeigte sich eine deutliche Ausprägung der 25(OH)D Insuffizienz (11,8%) beziehungsweise Defizienz (47,8%) in der gesamten Studienpopulation. Außerdem wurde eine deutliche saisonale Abhängigkeit des Vitamin D Spiegels beobachtet (Abbildung 3). So waren im Zeitraum von Oktober bis Mai mehr als 50% der Probanden Vitamin D insuffizient oder defizient und nur in den Monaten Juni bis September erreichten über 50% der Probanden eine mindestens suffiziente 25(OH)D Konzentration. Besonders ausgeprägt zeigten sich die Vitamin D Insuffizienz und Defizienz in den Monaten März und April, in denen mehr als 75% der Probanden einen 25(OH)D Spiegel <20 ng/ml hatten. Im März bot jeder vierte Proband eine Vitamin D Defizienz.

**Abbildung 3.** Vitamin D Status nach Monat der Blutabnahme bei 2723 Probanden der Studienpopulation



#### 3.2. Vergleich Raucher / Nichtraucher

Die Studienpopulation umfasste 718 Raucher und 2005 Nichtraucher. Die Raucher waren im Durchschnitt jünger als die Nichtraucher (Durchschnittsalter: Raucher 45 Jahre, Nichtraucher 57 Jahre) und hatten einen geringeren mittleren Taillenumfang (Raucher 90,0 cm,

Nichtraucher 93,0 cm). Die Prävalenz der 25(OH)D Defizienz und Insuffizienz war bei Rauchern stärker ausgeprägt als bei Nichtrauchern. Gleichzeitig wurde bei den Rauchern eine im Durchschnitt höhere mittlere Leukozytenzahl ermittelt (7,2 Gpt/l) als bei den Nichtrauchern (6,4 Gpt/l). Die Konzentrationen des hs-CRP und Fibrinogen unterschieden sich nicht zwischen den beiden Gruppen.

### **3.3. Assoziation zwischen der 25(OH)D Konzentration und den Inflammationsmarkern**

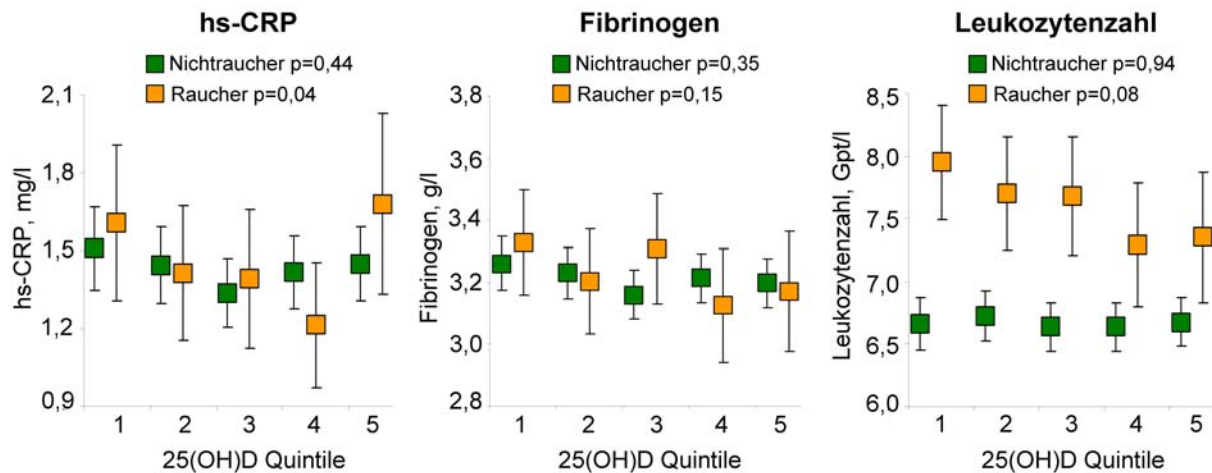
Der Zusammenhang zwischen dem 25(OH)D Spiegel und den drei Inflammationsmarkern (hs-CRP, Fibrinogen, Leukozytenzahl) wurde in der ANOVA getrennt nach Rauchstatus betrachtet. Es zeigte sich ein u-förmiger Zusammenhang zwischen 25(OH)D und hs-CRP bei Rauchern und Nichtrauchern (Abbildung 4). Da keine Interaktion zwischen dem Rauchstatus und dem 25(OH)D Spiegel im linearen Regressionsmodell für hs-CRP vorlag, wurden alle weiteren Analysen nicht nach Rauchstatus getrennt. Im linearen Regressionsmodell mit kubischen Splines wurde die u-förmige Assoziation zwischen 25(OH)D und hs-CRP bestätigt. Der hs-CRP Spiegel sank bis zu einem 25(OH)D Spiegel von 21 ng/ml. Ab einem 25(OH)D Spiegel von etwa 25 ng/ml kam es zu einem leichten Wiederanstieg des hs-CRP ( $\beta$ -Koeffizient 25(OH)D:  $-0,01498$ ,  $p < 0,01$ ;  $\beta$ -Koeffizient 25(OH)D':  $0,00003$ ,  $p < 0,01$ ).

Für die Assoziation zwischen dem 25(OH)D Spiegel und Fibrinogen zeigte sich in allen Analysen ein inverser Zusammenhang. Da auch hier keine signifikante Interaktion zwischen dem Rauchstatus und 25(OH)D im linearen Regressionsmodell festgestellt wurde, wurden Raucher und Nichtraucher zusammen betrachtet. Insgesamt ergab sich im linearen Regressionsmodell ein signifikanter, inverser Zusammenhang zwischen 25(OH)D und Fibrinogen ( $\beta$ -Koeffizient:  $-0,00458$ ,  $p < 0,01$ ). Weiterhin hatten Probanden mit einem 25(OH)D Spiegel im Zielbereich ein signifikant geringeres Odds Ratio für ein erhöhtes Fibrinogen (OR 0,50; 95% Konfidenzintervall: 0,28–0,91) im Vergleich zu Probanden mit einer 25(OH)D Defizienz.

Die Assoziation zwischen 25(OH)D und der Leukozytenzahl wurde sowohl in der ANOVA als auch in der linearen Regression getrennt nach Rauchstatus betrachtet, da sich eine signifikante Interaktion zwischen dem Rauchstatus und 25(OH)D bei diesem Inflammationsmarker zeigte. Für Raucher zeigte sich ein inverser Zusammenhang zwischen 25(OH)D Spiegel und der Leukozytenzahl in der ANOVA, der auch in der linearen Regression bestätigt wurde ( $\beta$ -Koeffizient:  $-0,02084$ ,  $p = 0,02$ ). Raucher mit einem geringen

25(OH)D Spiegel hatten deutlich höhere Leukozytenzahlen als Raucher mit höheren 25(OH)D Spiegeln. Für Nichtraucher ergab sich kein Zusammenhang zwischen 25(OH)D und der Leukozytenzahl.

**Abbildung 4.** Adjustierte Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervallen für hs-CRP, Fibrinogen und die Leukozytenzahl nach Quintilen des 25(OH)D für Raucher und Nichtraucher



Adjustierung für Geschlecht, Alter, Taillenumfang, Diabetes Mellitus, Dyslipidämie, Einnahme von antiinflammatorischer Medikation und Monat der Blutabnahme. Die hs-CRP Konzentration wurde für die ANOVA log-transformiert und für die Abbildung zurücktransformiert. 25(OH)D, 25-hydroxy Vitamin D

## **4. Diskussion**

### **4.1. Assoziation zwischen 25(OH)D und hs-CRP**

In der vorliegenden Querschnittstudie wurde eine u-förmige Assoziation zwischen 25(OH)D und hs-CRP festgestellt. Im 2001-2006 durchgeführten US-amerikanischen National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) wurde in einer Untersuchung mit 15167 Probanden eine lineare Abnahme des CRP Spiegels bis zu einem 25(OH)D Spiegel von 21 ng/ml festgestellt [32]. Diese Assoziation wurde im uni- und multivariaten linearen Regressionsmodell beobachtet. Bei 25(OH)D Spiegeln  $>21$  ng/ml wurde im univariaten Modell kein Zusammenhang zwischen 25(OH)D und CRP mehr festgestellt, während sich nach Adjustierung für kardiovaskuläre Risikofaktoren ein positiver Zusammenhang zwischen 25(OH)D und CRP ergab [32]. Dieses Ergebnis wurde in der vorliegenden Studie bestätigt. Es ergab sich ein u-förmiger Zusammenhang zwischen 25(OH)D und hs-CRP. Der hs-CRP Spiegel sank bis zu einem 25(OH)D Spiegel von 21 ng/ml. Ab einem 25(OH)D Spiegel von etwa 25 ng/ml kam es zu einem leichten Wiederanstieg des hs-CRP.

Darüber hinaus gibt es Studien, in denen ein inverser Zusammenhang zwischen 25(OH)D und hs-CRP beobachtet wurde [30, 31]. Eine Untersuchung an 206 Patienten mit rheumatischer Polyarthritid ergab, dass jede Zunahme des 25(OH)D Spiegels um 10 ng/ml zu einer Senkung des hs-CRP Spiegels um 26,2 % führt [30]. Ebenso wurde bei 2015 Probanden mit Koronarangiographie aus der Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) Studie ein inverser Zusammenhang zwischen 25(OH)D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D und hs-CRP sowie Neopterin beobachtet [31]. Im Gegensatz dazu gibt es auch Studien, die keinen Zusammenhang zwischen 25(OH)D und hs-CRP beziehungsweise CRP gefunden haben [33, 35, 36]. In der Framingham Offspring Studie mit 1381 Probanden [36] gab es zum Beispiel keine Assoziation zwischen 25(OH)D Spiegeln und CRP Spiegeln.

Auch Studien zum Einfluss der Vitamin D Supplementation auf die hs-CRP Spiegel ergaben unterschiedliche Ergebnisse [33, 34]. In einer Studie mit bettlägerigen älteren Patienten hatte die Einnahme von 400 oder 1200 IU 25(OH)D über sechs Monate keinen Einfluss auf die hs-CRP Spiegel [33]. In der Tromso Studie mit 928 Probanden bewirkte die Einnahme einer Hochdosis Vitamin D Supplementation mit 20000-40000 IU pro Woche bei Probanden ohne Vitamin D Defizienz sogar einen Anstieg des hs-CRP Spiegels um 0,07 ng/ml und einen Anstieg des HbA1c um 0,4 % [34].



Insgesamt gibt es sehr heterogene Studienergebnisse bezüglich des Zusammenhangs zwischen 25(OH)D und hs-CRP und es wird deutlich, dass höhere 25(OH)D Spiegel bei Vitamin D defizienten oder insuffizienten Probanden zu einer Verbesserung des Inflammationsprofils führen, während der Vorteil einer Vitamin D Supplementation bei 25(OH)D suffizienten Probanden umstritten ist und weitere Studien in der Allgemeinbevölkerung notwendig sind, um diesen Zusammenhang zu klären.

#### **4.2. Assoziation zwischen 25(OH)D und Fibrinogen**

In der untersuchten Studienpopulation stellte sich eine inverse Assoziation zwischen 25(OH)D und Fibrinogen heraus. Verschiedene vorherige Studien [29, 33, 35, 36, 41-43] zum Zusammenhang zwischen 25(OH)D und Fibrinogen berichteten wiederum unterschiedliche Ergebnisse. So wurde kein Zusammenhang [33, 35] oder ein inverser Zusammenhang zwischen 25(OH)D und Fibrinogen [29, 41, 42] festgestellt. Inverse Zusammenhänge zwischen 25(OH)D und Fibrinogen wurden in Studien mit 179 Patienten mit rheumatoider Arthritis [29] sowie bei 701 amerikanischen Erwachsenen [41] und 181 Frauen mit Lupus erythematodes [42] nachgewiesen. Da es sich bei diesen Studien um kleine, in einer bestimmten Probandengruppe durchgeführte Erhebungen handelt, ist die Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Querschnittsstudie limitiert. Es gibt jedoch auch eine große, in der Allgemeinbevölkerung durchgeführte Studie [35]. In dieser Studie mit 6538 Probanden der 1958'er Geburtenkohorte aus Großbritannien wurde ein inverser Zusammenhang zwischen 25(OH)D und Fibrinogen nach Adjustierung für das Geschlecht und den Monat der Blutabnahme festgestellt [35]. Diese Assoziation verschwand nach Adjustierung für Übergewicht, Lebensstil und soziale Charakteristika. In der vorliegenden Studie gab es keinen Einfluss des Übergewichts, repräsentiert durch den Taillenumfang. Die verschiedenen Ergebnisse der vorliegenden Studie und der 1958'er Geburtskohorte lassen sich möglicherweise durch die unterschiedlichen 25(OH)D Spiegel erklären. Während in der vorgestellten Studie 10,6% der Männer und 13,0% der Frauen eine 25(OH)D Defizienz zeigten, waren es in der Studie aus Großbritannien deutlich weniger (6,2% der Männer und 8,4% der Frauen) [35]. Es wäre möglich, dass der Zusammenhang zwischen 25(OH)D und den Inflammationsmarkern bei Individuen mit niedrigen 25(OH)D Spiegeln stärker hervortritt, als bei 25(OH)D suffizienten Probanden. Dadurch konnte in der vorliegenden Studie, im Gegensatz zur Studie aus Großbritannien, möglicherweise eine Assoziation erfasst werden. Weitere Gründe für die unterschiedlichen Studienergebnisse zum Zusammenhang

zwischen 25(OH)D und Fibrinogen liegen vermutlich im unterschiedlichen Studiendesign und der Probanden- bzw. Patientenauswahl [29, 41, 42].

Insgesamt bestätigt eine Vielzahl von Studien einen inversen Zusammenhang zwischen 25(OH)D und Fibrinogen. Bei 25(OH)D defizienten oder insuffizienten Probanden scheint ein höherer 25(OH)D Spiegel mit einem geringeren Fibrinogenspiegel einherzugehen, während sich bei 25(OH)D suffizienten Probanden zumindest kein negativer Effekt eines höheren 25(OH)D Spiegels auf den Fibrinogenspiegel zeigt. Ein positiver Effekt einer Vitamin D Supplementation bei 25(OH)D suffizienten Probanden bleibt umstritten.

#### **4.3. Assoziation zwischen 25(OH)D und der Leukozytenzahl**

In der SHIP-1 Studienpopulation zeigte sich ein inverser Zusammenhang zwischen 25(OH)D und der Leukozytenzahl bei Rauchern. Bei Nichtrauchern wurde kein Zusammenhang detektiert. Bisher gibt es nur wenige Studien, die den Zusammenhang zwischen 25(OH)D und der Leukozytenzahl betrachteten. Eine kürzlich erschienene Studie untersuchte den Zusammenhang zwischen 25(OH)D und der Leukozytenzahl bei einer großen Krankenhauspopulation, davon 340 Patienten mit und 1557 ohne chronische Nierenerkrankung [44]. Es ergab sich kein Zusammenhang zwischen 25(OH)D und der Leukozytenzahl [44]. Allerdings wurde der Rauchstatus in dieser Studie nicht berücksichtigt. Die vorliegende Studie zeigte, dass es wichtig ist den Rauchstatus zu erfassen und in den Analysen zu berücksichtigen. Es ist bereits länger bekannt, dass Raucher eine erhöhte Leukozytenzahl haben [45]. Die vorgestellten Daten lassen aber vermuten, dass die Leukozytenzahl bei Rauchern mit niedrigen 25(OH)D Spiegeln noch höher ist als bei Rauchern mit höheren 25(OH)D Spiegeln.

In einer weiteren Studie mit acht Probanden wurde der Einfluss einer täglichen 25(OH)D Supplementation von 400 oder 2000 IU über zwei Monate auf die Genexpression in den Leukozyten beobachtet [46]. Die 25(OH)D Supplementation war mit der Expression von 291 Genen verknüpft, wobei sich die Expression von 66 Genen bei Probanden mit 25(OH)D Spiegeln >20 ng/ml signifikant von den Probanden mit 25(OH)D Spiegeln <20 ng/ml unterschied. Nach Ende der 25(OH)D Supplementation glich sich die Expression dieser 66 Gene in beiden Gruppen an. Die beeinflussten Gene standen unter anderem mit der Entwicklung von Krebs-, Herz- Kreislauferkrankungen und der Immunmodulation im Zusammenhang [46].

Insgesamt lässt sich ein Einfluss des 25(OH)D auf die Leukozyten feststellen. Allerdings fehlen noch umfassende Studien in der Allgemeinbevölkerung, die diesen Zusammenhang weiter aufklären.

#### **4.4. Biologischer Zusammenhang zwischen 25(OH)D und chronischer Inflammation**

Der biologische Zusammenhang zwischen 25(OH)D und chronischer Inflammation ist in Zellkulturmodellen gut erforscht worden [28, 47-51]. So wurde zum Beispiel der Zusammenhang zwischen 25(OH)D und den T-Zellen dargestellt und es konnte gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von 1,25(OH)2D weniger proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-2, Interleukin-17 oder Interferon Gamma gebildet werden und die zytotoxische Wirkung von CD4 und CD8 positiven T-Zellen gemindert wird [47]. Außerdem kommt es unter Einfluss von 1,25(OH)2D zur vermehrten Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-4 oder Interleukin-10 [47]. Über die Modulation der verschiedenen Zytokine kommt es insgesamt zu einer Anregung der Bildung von antiinflammatorischen TH2 Zellen und zur Hemmung der Bildung proinflammatorischer TH1 Zellen [52]. Außerdem ist aus diesen Modellen bekannt, dass 1,25(OH)2D die Proliferation von dendritischen Zellen [48] und B-Zellen [49] beeinflusst. Aber auch die Proliferation der Monozyten wird über den Einfluss von 1,25(OH)2D angeregt und es kommt zur vermehrten Bildung von Interleukin-1 und Cathelicidin, einem antibakteriellem Peptid, durch die Makrophagen [47]. Die Tatsache, dass die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, Interleukin-23 oder Tumornekrosefaktor  $\alpha$  unter 1,25(OH)2D reduziert wird [28, 50] lässt vermuten, dass es bei einem Mangel an 1,25(OH)2D zu einem Anstieg dieser proinflammatorischen Zytokine [50] und dadurch auch zu einer vermehrten Bildung von Leukozyten kommt [51]. Zusätzlich ist es vorstellbar, dass die IL-6 getriggerte CRP Produktion in der Leber bei einem Mangel an 1,25(OH)2D gesteigert wird und in Zuständen einer 1,25(OH)2D Suffizienz eher gedrosselt wird. Als Konsequenz würde man eine inverse Assoziation zwischen 25(OH)D und den Inflammationsmarkern erwarten. Ein u-förmiger Zusammenhang zwischen 25(OH)D und hs-CRP lässt sich damit nicht erklären. Dennoch haben einige Studien in der letzten Zeit einen u-förmigen Zusammenhang zwischen 25(OH)D Spiegeln und der Mortalität [53-55] sowie kardiovaskulären und cerebrovaskulären Ereignissen bei herzkranken Patienten feststellen können [56]. Der in der vorgestellten Studie beobachtete Zusammenhang scheint also möglich, muss aber noch näher geklärt und in weiteren Studien und Zellkulturmodellen untersucht werden. Gleichzeitig könnte es sich bei der u-förmigen Assoziation zwischen 25(OH)D und hs-CRP auch um ein statistisches Artefakt handeln, bedingt durch die geringe

Anzahl an Probanden im 25(OH)D suffizienten Bereich. Die Mehrheit der Probanden in der Studienpopulation hat 25(OH)D Spiegel  $<25$  ng/ml: Ein Bereich, in dem es zu einem Absinken des hs-CRP Spiegels bei steigenden 25(OH)D Spiegeln kommt. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass Probanden mit hohen 25(OH)D Spiegeln Vitamin D Präparate einnahmen, dies aber nicht angaben und somit die Ergebnisse beeinflussten. Insgesamt gibt es keine umfassende Erklärung für den u-förmigen Zusammenhang zwischen 25(OH)D und hs-CRP und es wäre empfehlenswert diesen Zusammenhang in weiteren Studien zu untersuchen.

#### **4.5. Einordnung der Ergebnisse**

Die vorliegenden Daten zeigen, dass Männer und Frauen aus der Allgemeinbevölkerung bei einer Vitamin D Defizienz oder Insuffizienz erhöhte Inflammationswerte, einschließlich erhöhter hs-CRP und Fibrinogen Spiegel präsentieren. Außerdem haben Vitamin D defiziente oder insuffiziente Raucher erhöhte Leukozytenzahlen. Die vorgestellten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Vitamin D Defizienz oder Insuffizienz über einen Anstieg der Inflammationsmarker mit kardiovaskulären Ereignissen assoziiert sein könnten [8, 13]. Bei einem Anstieg des 25(OH)D Spiegels  $>25$  ng/ml kam es allerdings zu einer Änderung dieses Zusammenhanges im Bezug auf hs-CRP. Probanden mit 25(OH)D Spiegeln  $\geq 30$  ng/ml zeigten erhöhte hs-CRP Spiegel, während Fibrinogen und die Leukozytenzahl (bei Rauchern) bei einem Anstieg des 25(OH)D weiter abfielen. Ob diese Ergebnisse eine klinische Konsequenz haben, sollte in weiterführenden Studien untersucht werden. Besonders der Zusammenhang zwischen 25(OH)D und hs-CRP bei Probanden mit 25(OH)D Spiegeln  $>25$  ng/ml sollte dabei betrachtet werden.

#### **4.6. Stärken und Schwächen**

Die Stärken der vorliegenden Studie liegen in der umfangreichen Charakterisierung der Studienpopulation und der großen Zahl der untersuchten Probanden. Alle Untersuchungen und Labormessungen wurden von erfahrenen Mitarbeitern unter Beachtung standardisierter Protokolle durchgeführt, um eine exzellente Qualität der Daten zu sichern. Die Studie weist allerdings auch einige Schwächen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Eine wesentliche Schwäche ist die Durchführung als Querschnittstudie, weshalb es nicht möglich ist eine Kausalität zwischen den detektierten Zusammenhängen festzustellen. Eine weitere Limitation der Studie stellt die einmalige Messung der Biomarker dar. Es ist nicht sicher, ob die einmalige Messung das Inflammationsprofil eines Probanden

exakt wiedergeben kann. Außerdem war es nicht möglich, zwischen Vitamin D3 und Vitamin D2 zu unterscheiden, da entsprechende Daten nicht erhoben wurden.

#### **4.7. Schlußfolgerungen**

Insgesamt bestätigt die vorgestellte Studie die Wirkung und Bedeutung von 25(OH)D im Prozess der chronischen Inflammation. Dennoch sind die einzelnen Inflammationsmarker unterschiedlich mit 25(OH)D assoziiert. Positive Effekte eines 25(OH)D Anstiegs konnten im Bezug auf Fibrinogen und die Leukozytenzahl (nur Raucher) beobachtet werden. Auf der anderen Seite lässt die u-förmige Assoziation zwischen 25(OH)D und hs-CRP vermuten, dass erhöhte 25(OH)D Spiegel einen proinflammatorischen Effekt haben könnten.

## **5. Zusammenfassung und Ausblick**

In der vorliegenden Studie wurde der Zusammenhang zwischen 25(OH)D und den drei Inflammationsmarkern hs-CRP, Fibrinogen und der Leukozytenzahl in der Allgemeinbevölkerung im Nordosten Deutschlands untersucht.

Es ergab sich ein u-förmiger Zusammenhang zwischen 25(OH)D und hs-CRP. Der hs-CRP Spiegel sank bis zu einem 25(OH)D Spiegel von 21 ng/ml. Ab einem 25(OH)D Spiegel von etwa 25 ng/ml kam es zu einem leichten Wiederanstieg des hs-CRP Spiegels. Für die Assoziation zwischen den 25(OH)D und Fibrinogen Spiegeln wurde ein inverser Zusammenhang beobachtet. Die Assoziation zwischen dem 25(OH)D Spiegel und der Leukozytenzahl wurde getrennt nach Rauchstatus betrachtet. Für Raucher zeigte sich ein inverser Zusammenhang. Für Nichtraucher ergab sich kein Zusammenhang zwischen dem 25(OH)D Spiegel und der Leukozytenzahl.

Insgesamt wurde ein Zusammenhang zwischen 25(OH)D und den Inflammationsmarkern gefunden, wobei unterschiedliche Assoziationen detektiert wurden. Im Bereich einer 25(OH)D Defizienz oder Insuffizienz scheinen höhere 25(OH)D Spiegel zu einer Verbesserung des Inflammationsprofils und einem Abfall aller drei untersuchten Inflammationsmarker zu führen. Im Bereich einer 25(OH)D Suffizienz konnte ein Vorteil höherer 25(OH)D Spiegel bei Fibrinogen und der Leukozytenzahl (nur bei Rauchern) beobachtet werden. Die u-förmige Assoziation zwischen 25(OH)D und hs-CRP lässt jedoch vermuten, dass 25(OH)D suffiziente Probanden keinen Vorteil von einer 25(OH)D Supplementation haben und sehr hohe 25(OH)D Spiegel eine proinflammatorische Wirkung haben könnten.

Da es sich bei der vorliegenden Studie um eine Querschnittsstudie handelt und keine Kausalität zwischen den detektierten Zusammenhängen festgestellt werden kann, sind weitere Studien in der Allgemeinbevölkerung nötig, um den Zusammenhang zwischen 25(OH)D und den Inflammationsmarkern zu bewerten und Empfehlungen zu einem optimalen 25(OH)D Spiegel zu geben. Besonders die Assoziation zwischen dem 25(OH)D Spiegel und der Leukozytenzahl bedarf weiterer Forschung, um die wichtige Rolle des 25(OH)D auf die Genexpression und die damit verbundene Beeinflussung des menschlichen Organismus besser zu verstehen.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Guthrie, C. *Top 10 Medical Breakthroughs:#10. Benefits of vitamin D*. Time Magazine 2007 Sunday Dec 9. (Available at [http://www.time.com/time/specials/2007/article/0,28804,1686204\\_1686252\\_1690393,00.html](http://www.time.com/time/specials/2007/article/0,28804,1686204_1686252_1690393,00.html). last accessed october, 17<sup>th</sup>, 2014.)
- [2] Chun, R.F., Adams, J.S., Hewison, M. *Back to the future: a new look at 'old' vitamin D*. J Endocrinol 2008. **198**(2): p. 261-9.
- [3] Holick, M.F. *Vitamin D deficiency*. N Engl J Med 2007. **357**(3): p. 266-81.
- [4] Brown, A.J., Dusso, A., Slatopolsky, E. *Vitamin D*. Am J Physiol 1999. **277**(2): p. 157-75.
- [5] Dusso, A.S., Brown, A.J., Slatopolsky, E. *Vitamin D*. Am J Physiol Renal Physiol 2005. **289**(1): p. 8-28.
- [6] Berry, J.L., Davies, M., Mee, A.P. *Vitamin D metabolism, rickets, and osteomalacia*. Semin Musculoskelet Radiol 2002. **6**(3): p. 173-82.
- [7] Hewison, M. *Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme*. Rheum Dis Clin North Am 2012. **38**(1): p. 125-39.
- [8] Reis, J.P., von Muhlen, D., Miller, E.R., 3rd, et al. *Vitamin D status and cardiometabolic risk factors in the United States adolescent population*. Pediatrics 2009. **124**(3): p. e371-9.
- [9] Hypponen, E., Laara, E., Reunanen, A., et al. *Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study*. Lancet 2001. **358**(9292): p. 1500-3.
- [10] Merlino, L.A., Curtis, J., Mikuls, T.R., et al. *Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study*. Arthritis Rheum 2004. **50**(1): p. 72-7.
- [11] Munger, K.L., Zhang, S.M., O'Reilly, E., et al. *Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis*. Neurology 2004. **62**(1): p. 60-5.
- [12] Lappe, J.M., Travers-Gustafson, D., Davies, K.M., et al. *Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial*. Am J Clin Nutr 2007. **85**(6): p. 1586-91.

- [13] Zittermann, A., Schleithoff, S.S., Tenderich, G., et al. *Low vitamin D status: a contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure?* J Am Coll Cardiol 2003. **41**(1): p. 105-12.
- [14] Jorde, R., Sneve, M., Figenschau, Y., et al. *Effects of vitamin D supplementation on symptoms of depression in overweight and obese subjects: randomized double blind trial.* J Intern Med 2008. **264**(6): p. 599-609.
- [15] Luong, K., Nguyen, L.T. *The role of vitamin D in asthma.* Pulm Pharmacol Ther 2012. **25**(2): p. 137-43.
- [16] Chlebowski, R.T., Johnson, K.C., Kooperberg, C., et al. *Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of breast cancer.* J Natl Cancer Inst 2008. **100**(22): p. 1581-91.
- [17] Schottker, B., Haug, U., Schomburg, L., et al. *Strong associations of 25-hydroxyvitamin D concentrations with all-cause, cardiovascular, cancer, and respiratory disease mortality in a large cohort study.* Am J Clin Nutr 2013. **97**(4): p. 782-93.
- [18] Ross, A.C., Manson, J.E., Abrams, S.A., et al. *The 2011 Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D: what dietetics practitioners need to know.* J Am Diet Assoc 2011. **111**(4): p. 524-7.
- [19] Rizzoli, R., Boonen, S., Brandi, M.L., et al. *Vitamin D supplementation in elderly or postmenopausal women: a 2013 update of the 2008 recommendations from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO).* Curr Med Res Opin 2013. **29**(4): p. 305-13.
- [20] Araujo, F., Gouvinhas, C., Fontes, F., et al. *Trends in cardiovascular diseases and cancer mortality in 45 countries from five continents (1980-2010).* Eur J Prev Cardiol 2013. **21**(8): p. 1004-17.
- [21] Lowe, G.D. *The relationship between infection, inflammation, and cardiovascular disease: an overview.* Ann Periodontol 2001. **6**(1): p. 1-8.
- [22] Torjesen, I. *Viewpoint: inflammation in cardiovascular disease.* Circulation 2006. **114**(2): p. 105-6.



- [23] Zimmermann, J., Herrlinger, S., Pruy, A., et al. *Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients*. *Kidney Int* 1999. **55**(2): p. 648-58.
- [24] Murray, W.M. *Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease*. *N Engl J Med* 1997. **337**(6): p. 422-24.
- [25] Koenig, W., Sund, M., Frohlich, M., et al. *C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992*. *Circulation* 1999. **99**(2): p. 237-42.
- [26] Giovannucci, E., Liu, Y., Hollis, B.W., et al. *25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study*. *Arch Intern Med* 2008. **168**(11): p. 1174-80.
- [27] Wang, T.J., Pencina, M.J., Booth, S.L., et al. *Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease*. *Circulation* 2008. **117**(4): p. 503-11.
- [28] Guillot, X., Semerano, L., Saidenberg-Kermanac'h, N., et al. *Vitamin D and inflammation*. *Joint Bone Spine* 2010. **77**(6): p. 552-7.
- [29] Haque, U.J., Bathon, J.M., Giles, J.T. *Association of vitamin D with cardiometabolic risk factors in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012. **64**(10): p. 1497-504.
- [30] Patel, S., Farragher, T., Berry, J., et al. *Association between serum vitamin D metabolite levels and disease activity in patients with early inflammatory polyarthritis*. *Arthritis Rheum* 2007. **56**(7): p. 2143-9.
- [31] Murr, C., Pilz, S., Grammer, T.B., et al. *Vitamin D deficiency parallels inflammation and immune activation, the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study*. *Clin Chem Lab Med* 2012. **50**(12): p. 2205-12.
- [32] Amer, M., Qayyum, R. *Relation between serum 25-hydroxyvitamin D and C-reactive protein in asymptomatic adults (from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2006)*. *Am J Cardiol* 2012. **109**(2): p. 226-30.

- [33] Bjorkman, M.P., Sorva, A.J., Tilvis, R.S. *C-reactive protein and fibrinogen of bedridden older patients in a six-month vitamin D supplementation trial*. J Nutr Health Aging 2009. **13**(5): p. 435-9.
- [34] Jorde, R., Strand Hutchinson, M., Kjaergaard, M., et al. *Supplementation with High Doses of Vitamin D to Subjects without Vitamin D Deficiency May Have Negative Effects: Pooled Data from Four Intervention Trials in Tromso*. ISRN Endocrinol 2013. **2013**(3):p. 348705.
- [35] Hypponen, E., Berry, D., Cortina-Borja, M., et al. *25-Hydroxyvitamin D and pre-clinical alterations in inflammatory and hemostatic markers: a cross sectional analysis in the 1958 British Birth Cohort*. PLoS One 2010. **5**(5): p. e10801.
- [36] Shea, M.K., Booth, S.L., Massaro, J.M., et al. *Vitamin K and vitamin D status: associations with inflammatory markers in the Framingham Offspring Study*. Am J Epidemiol 2008. **167**(3): p. 313-20.
- [37] Jorgensen, S.P., Agnholt, J., Glerup, H., et al. *Clinical trial: vitamin D3 treatment in Crohn's disease - a randomized double-blind placebo-controlled study*. Aliment Pharmacol Ther 2010. **32**(3): p. 377-83.
- [38] John, U., Greiner, B., Hensel, E., et al. *Study of Health In Pomerania (SHIP): a health examination survey in an east German region: objectives and design*. Soz Praventivmed 2001. **46**(3): p. 186-94.
- [39] Volzke, H., Alte, D., Schmidt, C.O., et al. *Cohort profile: the study of health in Pomerania*. Int J Epidemiol 2011. **40**(2): p. 294-307.
- [40] Stone, C., Koo, C.Y. *Additive splines in statistics*. Proceedings of the Statistical Computing Section 1985. Washington, DC: American Statistical Association.
- [41] Parikh, S., Guo, D.H., Pollock, N.K., et al. *Circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations are correlated with cardiometabolic risk among American black and white adolescents living in a year-round sunny climate*. Diabetes Care 2012. **35**(5): p. 1133-8.
- [42] Wu, P.W., Rhew, E.Y., Dyer, A.R., et al. *25-hydroxyvitamin D and cardiovascular risk factors in women with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum 2009. **61**(10): p. 1387-95.

- [43] Yu, J.R., Lee, S.A., Lee, J.G., et al. *Serum vitamin d status and its relationship to metabolic parameters in patients with type 2 diabetes mellitus*. Chonnam Med J 2012. **48**(2): p. 108-15.
- [44] Yildirim, I., Hur, E., Kokturk, F. *Inflammatory Markers: C-Reactive Protein, Erythrocyte Sedimentation Rate, and Leukocyte Count in Vitamin D Deficient Patients with and without Chronic Kidney Disease*. Int J Endocrinol 2013. **2013**(6):p. 802165.
- [45] Hansen, L.K., Grimm, R.H., Jr., Neaton, J.D. *The relationship of white blood cell count to other cardiovascular risk factors*. Int J Epidemiol 1990. **19**(4): p. 881-8.
- [46] Hossein-nezhad, A., Spira, A., Holick, M.F. *Influence of vitamin D status and vitamin D3 supplementation on genome wide expression of white blood cells: a randomized double-blind clinical trial*. PLoS One 2013. **8**(3): p. e58725.
- [47] Mora, J.R., Iwata, M., von Andrian, U.H. *Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage*. Nat Rev Immunol 2008. **8**(9): p. 685-98.
- [48] Griffin, M.D., Lutz, W., Phan, V.A., et al. *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*. Proc Natl Acad Sci USA 2001. **98**(12): p. 6800-5.
- [49] Chen, S., Sims, G.P., Chen, X.X., et al. *Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation*. J Immunol 2007. **179**(3): p. 1634-47.
- [50] Dickie, L.J., Church, L.D., Coulthard, L.R., et al. *Vitamin D3 down-regulates intracellular Toll-like receptor 9 expression and Toll-like receptor 9-induced IL-6 production in human monocytes*. Rheumatology (Oxford) 2010. **49**(8): p. 1466-71.
- [51] van Leeuwen, M.A., van Rijswijk, M.H. *Acute phase proteins in the monitoring of inflammatory disorders*. Baillieres Clin Rheumatol 1994. **8**(3): p. 531-52.
- [52] van Etten, E., Mathieu, C. *Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts*. J Steroid Biochem Mol Biol 2005. **97**(1-2): p. 93-101.
- [53] Amrein, K., Quraishi, S.A., Litonjua, A.A., et al. *Evidence for a U-shaped relationship between prehospital vitamin D status and mortality: a cohort study*. J Clin Endocrinol Metab 2014. **99**(4): p. 1461-9.

- [54] Melamed, M.L., Michos, E.D., Post, W., et al. *25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population*. Arch Intern Med 2008. **168**(15): p. 1629-37.
- [55] Michaelsson, K., Baron, J.A., Snellman, G., et al. *Plasma vitamin D and mortality in older men: a community-based prospective cohort study*. Am J Clin Nutr 2010. **92**(4): p. 841-8.
- [56] Zittermann, A., Kuhn, J., Dreier, J., et al. *Vitamin D status and the risk of major adverse cardiac and cerebrovascular events in cardiac surgery*. Eur Heart J 2013. **34**(18): p. 1358-64.

## **7. Anhang**

### **7.1. Wissenschaftliche Arbeit**

#### **Association between serum vitamin D concentrations and inflammatory markers in the general adult population.**

Mellenthin L, Wallaschofski H, Grotevendt A, Völzke H, Nauck M, Hannemann A,

Metabolism Clinical and Experimental 2014; 63:1056-62.

Reproduced by permission from Elsevier.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

# Metabolism

[www.metabolismjournal.com](http://www.metabolismjournal.com)

## Association between serum vitamin D concentrations and inflammatory markers in the general adult population



Liesa Mellenthin<sup>a</sup>, Henri Wallaschofski<sup>a</sup>, Anne Grotevendt<sup>a</sup>, Henry Völzke<sup>b</sup>,  
Matthias Nauck<sup>a</sup>, Anke Hannemann<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany

<sup>b</sup> Institute for Community Medicine, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 December 2013

Accepted 4 May 2014

#### Keywords:

Epidemiology

Inflammation

C-reactive protein

Fibrinogen

White blood cell count

### ABSTRACT

**Objective.** In recent years links among vitamin D deficiency, inflammation and cardio-metabolic disease were proposed. As information regarding the associations between vitamin D and inflammatory markers in the general population is sparse, we investigated the associations of 25-hydroxy vitamin D [25(OH)D] with high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), fibrinogen and white blood cell count (WBC).

**Materials/Methods.** The study population comprised 2723 men and women aged 25–88 years from the first follow-up of the Study of Health in Pomerania. Analyses of variance, linear and logistic regressions were performed to assess the associations between 25(OH)D and the three inflammatory markers. The models were adjusted for age, sex, waist circumference, diabetes mellitus, dyslipidemia, anti-inflammatory medication and month of blood sampling. The association between 25(OH)D and WBC was assessed separately in smokers ( $n = 718$ ) and non-smokers ( $n = 2005$ ) as effect modification was observed.

**Results.** We detected a U-shaped association between 25(OH)D and hs-CRP with a nadir of 21–25 ng/ml in fully-adjusted linear regression models with restricted cubic splines ( $p < 0.01$ ;  $p' < 0.01$ ). We further detected an inverse association between 25(OH)D and fibrinogen ( $p < 0.01$ ). In addition, there was an inverse association between 25(OH)D and WBC in smokers ( $p = 0.02$ ) but no association in non-smokers ( $p = 0.73$ ).

**Conclusion.** Our study confirms a potential role of 25(OH)D in chronic inflammation. Yet, different inflammatory biomarkers are differently associated with 25(OH)D. Beneficial effects of increasing 25(OH)D were observed for fibrinogen and WBC (in smokers only). In contrast, the U-shaped association between 25(OH)D and hs-CRP indicates that ever-increasing 25(OH)D concentrations may also be related to proinflammatory states.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Abbreviations:** ATC, anatomical therapeutic chemical classification system; CI, confidence interval; eGFR, estimated glomerular filtration rate; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; NHANES, National Health and Nutrition Examination Survey; OR, odds ratio; SHIP, Study of Health in Pomerania; WBC, white blood cell count; 1,25(OH)<sub>2</sub>D, 1,25-dihydroxy vitamin D; 25(OH)D, 25-hydroxy vitamin D.

\* Corresponding author at: Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medicine Greifswald, Ferdinand-Sauerbruch-Straße NK D-17475 Greifswald; Germany. Tel.: +49 3834 19659; fax: +49 3834 865502.

E-mail address: [anke.hannemann@uni-greifswald.de](mailto:anke.hannemann@uni-greifswald.de) (A. Hannemann).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.05.002>

0026-0495/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Vitamin D is well known for its major impact on the regulation of calcium and phosphorus balance in the human body and thus in the regulation of bone homeostasis [1]. About thirty years ago further non-classical actions of vitamin D were recognized including its impact on the innate and adaptive immunity [2].

These initial findings have been approved by numerous studies ever since [3–8]. For instance, in U.S. adolescents, associations of low circulating 25-hydroxy vitamin D [25(OH)D] concentrations with hypertension, hyperglycemia and the metabolic syndrome were found [3]. Further studies demonstrated that low 25(OH)D concentrations may promote the pathogenesis of type 1 diabetes [4], rheumatoid arthritis [5], multiple sclerosis [6] or cancer [7] and that high 25(OH)D concentrations may protect against cardiovascular disease [8].

Cardiovascular disease represents one of the most important causes of death worldwide [9]. Next to well established risk markers like smoking, obesity or diabetes, high concentrations of inflammatory biomarkers, such as fibrinogen, white blood cell count (WBC) or C-reactive protein (CRP) are well known to predict cardio-metabolic disease risk [10]. Concurrently, former studies proposed that low 25(OH)D concentrations are associated with increased concentrations of inflammatory markers, thereby suggesting a link between 25(OH)D deficiency, inflammation and cardio-metabolic disease [3–8].

The relations between 25(OH)D concentrations and inflammatory markers have been investigated in several studies [11–23], with most of these studies based on small samples or specific patient groups [11,12], e.g. patients with inflammatory polyarthritis [14] or patients undergoing coronary angiography [15]. The majority of these studies [11,15–17] reported inverse associations between concentrations of 25(OH)D or 1,25-dihydroxy vitamin D [1,25(OH)2D] with CRP, high-sensitivity-CRP (hs-CRP) and neopterin [14,15,19]. Other studies demonstrated no relation between the measures [20–23]. Hs-CRP concentrations were, for example, not associated with 25(OH)D concentrations in 218 bedridden patients aged 65 or older from Helsinki [20], and there was no major effect of vitamin D supplementation on hs-CRP or fibrinogen concentrations. In contrast, only few studies from the general population, e.g. [19,22] assessed the relation between vitamin D and chronic inflammation. Therefore, we aimed to investigate the associations between the 25(OH)D concentration and three markers of inflammation; hs-CRP, fibrinogen and WBC, in a sample from the general population in northeast Germany [24,25].

## 2. Methods

### 2.1. Study population

All analyses are based on data from the first five-year follow-up of the population-based Study of Health in Pomerania (SHIP-1). For the baseline examination SHIP-0, 4308 men and women from a representative sample of 7008

subjects living in northeast Germany were examined between October 1997 and May 2001. Out of the 4308 SHIP-0 participants 3300 were re-examined in SHIP-1 between March 2003 and July 2005. All SHIP participants gave written informed consent. Further details on study design and sampling have been previously reported [24,25]. The study was reviewed by an external scientific review board and conformed to the principles of the Declaration of Helsinki as reflected by an a priori approval of the Ethics Committee of the Board of Physicians Mecklenburg-West Pomerania at the University of Greifswald.

All SHIP participants underwent standardized medical examinations including blood sampling and an extensive computer-aided personal interview. Data on socio-demographic characteristics, smoking status and medical histories were collected. Intake of medication was recorded and classified using the anatomical therapeutic chemical classification system (ATC). All subjects that reported intake of corticosteroids (ATC D07, H02, S01BA-BB, S01CA-CB, S02B-C, S03B-C, A01AC, A07EA, R01AD, R03BA) or non-steroidal anti-inflammatory drugs (M01A, M02AA, S01BC, S01CC), were defined as taking anti-inflammatory medication. During the physical examination waist circumference was measured midway between the lower rib margin and the iliac crest in the horizontal plane. Diabetes mellitus was defined as self-reported physician's diagnosis, intake of antidiabetic medication (ATC A10), HbA1c  $\geq 6.5\%$  or random serum glucose concentration  $\geq 11.1$  mmol/l. Dyslipidemia was defined as serum triglyceride concentration  $\geq 2.3$  mmol/l, serum high-density lipoprotein concentration  $< 1.0$  mmol/l in men or  $< 1.3$  mmol/l in women or intake of lipid modifying agents (ATC C10). Vitamin D deficiency [25(OH)D: 0–9.9 ng/ml] and insufficiency [25(OH)D: 10–19.9 ng/ml] were defined according to the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) [26]. Higher 25(OH)D concentrations were defined as vitamin D sufficiency [25(OH)D: 20–29.9 ng/ml] and as vitamin D target range [25(OH)D  $\geq 30$  ng/ml].

From the present analysis we excluded all SHIP-1 participants with 25(OH)D concentrations outside the measurement range of the assay ( $< 5$  ng/ml or  $> 140$  ng/ml) or with missing information in the 25(OH)D concentration, with hs-CRP concentrations below the measurement range of the assay ( $< 0.17$  g/l) or with missing information in any of the inflammatory biomarkers ( $n = 170$ ), all subjects with missing information in any of the confounders ( $n = 9$ ), missing information on smoking status ( $n = 2$ ), all subjects who were taking vitamin D preparations (ATC A11CC;  $n = 25$ ), all subjects with hs-CRP concentrations  $> 10$  mg/l ( $n = 127$ ), all pregnant women ( $n = 12$ ), all subjects with renal insufficiency defined as estimated glomerular filtration rate (eGFR)  $< 30$  ml/min/ $1.73$  m<sup>2</sup> or missing information of eGFR, ( $n = 9$ ) as well as all participants who reported cancer or liver disease ( $n = 223$ ). This resulted in a final study population of 2723 subjects, including 1321 men and 1402 women (aged 25–88 years). For a sensitivity analysis we included all subjects with 25(OH)D concentrations or hs-CRP concentrations outside the measurement range of the assays as well as all subjects with hs-CRP concentrations  $> 10$  mg/l. Sensitivity analyses were performed in a total of 2929 subjects.

## 2.2. Laboratory measurements

Blood samples were taken from the cubital vein of mostly non-fasting participants in the supine position. Serum aliquots were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . 25(OH)D concentrations were determined in serum with the IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D assay on the IDS-iSYS Multi-Discipline Automated Analyser (Immunodiagnostic Systems Limited, Frankfurt am Main, Germany). Three concentrations of control material were measured by skilled technical personnel. During the course of the study the coefficients of variation in control material were 16.8% at low concentrations, 13.9% at medium concentrations, and 12.0% at high concentrations, respectively. Hs-CRP concentrations were determined in serum using a Behring Nephelometer (Dade Behring Instrumentation Eschborn, Germany). The coefficients of variation were 3.1% at low concentrations and 2.9% at high concentrations of control material. Fibrinogen concentrations were determined in citrate plasma according to Clauss using an Electra 1600 analyzer (Instrumentation Laboratory, Barcelona, Spain). Coagulation time was measured and transferred in g/L by applying a reference curve calculated in the laboratory. The coefficients of variation were 4.6% at low concentrations and 1.8% at high concentrations of control material. White blood cell count was determined in EDTA whole blood samples using a Coulter MaxM (Coulter MaxM; Coulter Electronics, Miami, FL, USA). The coefficient of variation was below 1.7%.

## 2.3. Statistical analyses

Continuous data are expressed as median (1st–3rd quartile) and nominal data are expressed as percentage. Group differences were tested with Chi-Squared or Kruskal–Wallis tests. A  $p$ -value  $<0.05$  was considered statistically significant.

Analyses of variance, linear and logistic regression analyses were performed to assess the associations of 25(OH)D concentrations with hs-CRP, fibrinogen and WBC. Sex and smoking were considered being potential effect modifiers. There were no significant interactions between sex and 25(OH)D concentrations ( $p >0.10$  in all models) and there were no significant interactions between smoking and 25(OH)D concentrations in the models for hs-CRP or fibrinogen ( $p >0.10$  in both models). In contrast, we observed an interaction between smoking and 25(OH)D concentrations in the model for WBC ( $p = 0.07$ ). All analyses for WBC were thus performed separately in smokers and non-smokers, while the analyses for hs-CRP and fibrinogen were performed in the whole study population.

Hs-CRP concentrations, fibrinogen concentrations and the WBC were either used as continuous variables (analysis of variance and linear regression) or categorized in increased ( $\geq 90$ th percentile) and normal ( $<90$ th percentile) values (logistic regression). The hs-CRP concentration was log-transformed for the analyses of variance and linear regression to obtain normally distributed error terms. The 25(OH)D concentration entered the model either as continuous variable (linear regression) or categorized in vitamin D deficiency, insufficiency, sufficiency and target range (analysis of variance and logistic regression). We present adjusted means for the inflammatory biomarkers (hs-CRP was back-transformed to the

original scale) with 95% confidence intervals (CI) according to 25(OH)D categories from the analysis of variance models.

In the linear regression models restricted cubic splines were used to search for a possible non-linear dependency between the measures. Three knots were pre-specified located at the 5th, 50th and 95th percentile resulting in one component of the spline function [27], which was named 25(OH)D<sup>1</sup>. If the likelihood ratio test indicated that the fit of the model including the spline component was not significantly better than the fit of the linear model without the spline component, the simpler model was preferred. We report  $\beta$ -coefficients with standard errors and  $p$ -values from the linear regression models. From the logistic regression models we report odds ratios (OR) and their 95% CIs. If not stated otherwise all models were adjusted for age (in years), sex (male, female), waist circumference (in cm), presence of diabetes mellitus (yes, no), dyslipidemia (yes, no), intake of anti-inflammatory medication (yes, no) and month of blood sampling.

All statistical analyses were performed with SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

---

## 3. Results

The clinical characteristics of the study population stratified by smoking status are presented in Table 1. Smokers were younger and had a lower waist circumference than non-smokers but higher WBCs. In contrast, hs-CRP or fibrinogen concentrations were not different between smokers and non-smokers. Vitamin D deficiency (11.8%) and insufficiency (47.8%) were common in the study population. Overall, smokers had lower 25(OH)D concentrations and were more often vitamin D deficient (15.2%) or insufficient (50.7%) than non-smokers (deficient 10.6%, insufficient 46.7%).

Differences in mean adjusted hs-CRP concentrations were not statistically significant between the vitamin D categories (Fig. 1). Yet, the analysis of variance indicated a U-shaped relation between vitamin D status and the hs-CRP concentration. This U-shaped relation was confirmed in the linear regression model with restricted cubic splines (Fig. 1 and Table 2). The hs-CRP concentration decreased up to a 25(OH)D concentration of about 21 ng/ml and increased at 25(OH)D concentrations above 25 ng/ml. We further observed elevated, but non-significant, odds for increased hs-CRP concentrations in vitamin D deficiency, insufficiency or in the target range compared to vitamin D sufficiency (Table 3).

Regarding fibrinogen, we observed an inverse association with 25(OH)D concentrations in all analyses. Adjusted mean fibrinogen concentrations were highest in vitamin D deficient subjects and lowest in those with vitamin D concentrations in the target range. The linear regression model confirmed the inverse association between 25(OH)D and fibrinogen concentrations. Moreover, subjects with vitamin D in the target range had significantly lower odds for increased fibrinogen concentrations than vitamin D deficient subjects.

The association between 25(OH)D concentrations and WBC was assessed separately in smokers ( $n = 718$ ) and non-smokers ( $n = 2005$ ) as effect modification was observed. In smokers an inverse association between 25(OH)D concentrations and WBC was revealed in the linear regression model.



**Table 1 – Characteristics of the study population.**

Characteristics	Smoker (N = 718)	Non-smoker (N = 2005)	p
Male/Female, %	52.4/47.6	47.1/52.9	0.02
Age, years	45.0 (37.0–54.0)	57.0 (44.0–67.0)	<0.01
Waist circumference, cm	90.0 (80.5–99.0)	93.0 (83.3–102.5)	<0.01
Diabetes mellitus, %	7.4	15.3	<0.01
Hyperlipidemia, %	59.9	63.0	0.13
Intake of antiinflammatory medication, %	11.3	15.8	<0.01
eGFR, ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	91.7 (80.0–105.0)	81.0 (70.0–93.5)	<0.01
25(OH)D, ng/ml	16.3 (11.7–22.6)	18.1 (12.9–25.0)	<0.01
Vitamin D status			<0.01
Deficiency, %	15.2	10.6	
Insufficiency, %	50.7	46.7	
Sufficiency, %	22.4	29.1	
Target Range, %	11.7	13.6	
Hs-CRP, mg/l	1.29 (0.65–2.69)	1.38 (0.71–2.94)	0.18
Fibrinogen, g/l	3.19 (2.63–3.70)	3.06 (2.65–3.60)	0.13
WBC, Gpt/l	7.20 (6.20–8.80)	6.40 (5.40–7.40)	<0.01
Summer/Winter, %	43.4/56.6	44.1/55.8	0.73

eGFR, estimated glomerular filtration rate; 25(OH)D, serum 25-hydroxy vitamin D concentration; hs-CRP, serum high-sensitivity C-reactive protein concentration; WBC, white blood cell count. Data are median (1st – 3rd quartile) or proportions. Sex differences were tested with Chi-Squared or Kruskal–Wallis tests. Vitamin D status: deficiency 0–9.9 ng/ml 25(OH)D; insufficiency 10–19.9 ng/ml 25(OH)D; sufficiency 20–29.9 ng/ml 25(OH)D; target range ≥30 ng/ml 25(OH)D. Summer was defined as May 1st–October 31st. To convert 25(OH)D from ng/ml to nmol/l multiply by 2.496.

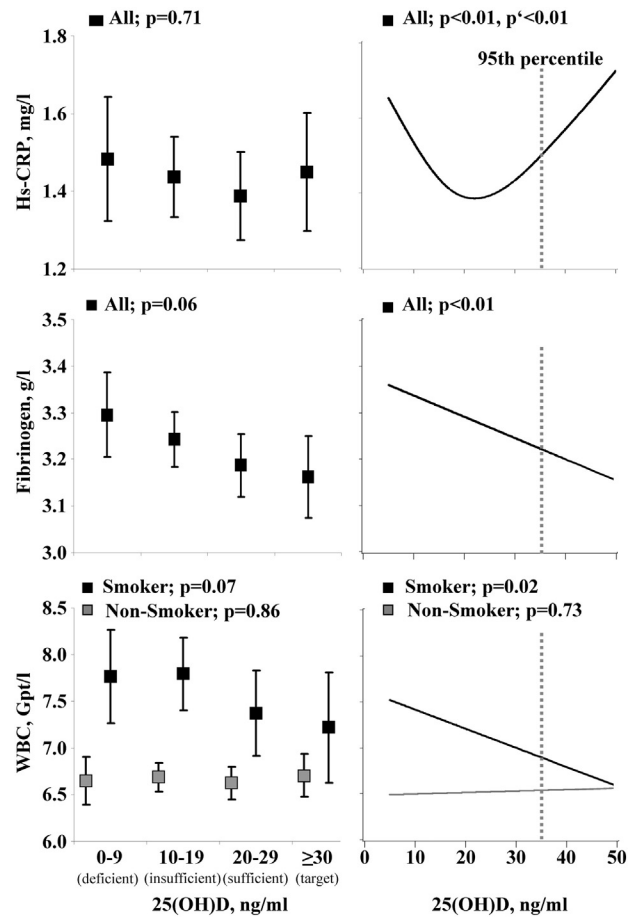
Smokers with low 25(OH)D concentrations had increased WBCs compared to smokers with higher 25(OH)D concentrations. In general, these results were supported by the analysis of variance. Mean adjusted WBCs fell with improving vitamin D status in smokers, yet, group differences were not statistically significant. In non-smokers 25(OH)D concentrations and WBC were not associated.

In a sensitivity analysis we recalculated the logistic regression models in 2929 subjects, including those with 25(OH)D or hs-CRP concentrations outside the measurement range of the assays or hs-CRP concentrations >10 mg/l. The inclusion of these subjects did not substantially change our results (data not shown).

#### 4. Discussion

In the present cross-sectional study, we detected a U-shaped association between 25(OH)D and hs-CRP concentrations and an inverse association between 25(OH)D and fibrinogen concentrations. Moreover, we detected an inverse association between 25(OH)D concentrations and WBC in smokers but no association in non-smokers.

Previously, inverse relations between 25(OH)D and hs-CRP concentrations were reported [14,15]. Among 206 patients with inflammatory polyarthritis, each 10 ng/ml increase in



**Fig. 1 – Associations between the 25-hydroxy vitamin D [25(OH)D] concentration with high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), fibrinogen or the white blood cell count (WBC). In the left panel adjusted mean serum hs-CRP concentrations, plasma fibrinogen concentrations and WBC with 95% confidence intervals according to vitamin D status are displayed. In the right panel expected serum hs-CRP concentrations, plasma fibrinogen concentrations and WBC for a 52 year-old woman with a waist circumference of 85 cm, without diabetes mellitus, without dyslipidemia, without intake of anti-inflammatory medication and with blood sampling in June are displayed. The hs-CRP concentration was log-transformed before being entered into the models and back-transformed for the illustrations.**

the 25(OH)D concentration was associated with a 26.2% decrease in the hs-CRP concentration [14]. Another study including 2015 patients referred to coronary angiography, reported inverse correlations of 25(OH)D and 1,25(OH)2D with neopterin and hs-CRP [15]. Yet, not all epidemiological studies reported linear inverse associations between the measures. In the 2001 to 2006 U.S. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) [19] a linear decrease in CRP concentrations up to 25(OH)D concentrations of 21 ng/ml was detected in 15,167 subjects. This decrease was observed in univariate and multivariable linear regression models. In addition, there was no significant association between 25(OH)D concentrations >21 ng/ml and CRP in the univariate model, but a positive association after adjustment for

**Table 2 – Associations of serum 25-hydroxy vitamin D concentration [25(OH)D] with serum high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), plasma fibrinogen and white blood cell count (WBC).**

Model	Smoking Status	Independent Variable	$\beta$ coefficient	standard error	p-value
Hs-CRP	Smoker and non-smoker	25(OH)D	-0.01498	0.00541	<0.01
		25(OH)D'	0.00003	0.00001	<0.01
Fibrinogen	Smoker and non-smoker	25(OH)D	-0.00458	0.00163	<0.01
WBC	Smoker	25(OH)D	-0.02084	0.00894	0.02
	Non-Smoker	25(OH)D	0.00159	0.00459	0.73

$\beta$ -coefficients, standard errors, and p-values from fully-adjusted multivariable linear regression analyses. Full adjustment for age, sex, waist circumference, diabetes mellitus, dyslipidemia, intake of anti-inflammatory medication and month of blood sampling.

The serum hs-CRP concentration was log-transformed before entering the model. The likelihood ratio test indicated that the fit of the models assessing the relation between the serum 25(OH)D concentration and the serum hs-CRP concentration was significantly better ( $p < 0.05$ ) when restricted cubic splines (3 knots) were included compared to the simple linear model. Therefore the spline component 25(OH)D' was included in the model.

traditional cardiovascular risk factors [19]. The present study supports these results. Our data, also obtained from the general population, revealed a similar relation; a U-shaped association between 25(OH)D and hs-CRP concentrations with a nadir of 21–25 ng/ml. In contrast to our results, several studies [20,22,23] found no association between 25(OH)D and CRP or hs-CRP. There was no association between 25(OH)D and CRP concentrations in 1381 participants from the Framingham Offspring study [20,22,23], and there was no major effect of vitamin D supplementation on hs-CRP concentrations in bedridden older patients [20].

As with CRP, previous studies revealed conflicting results regarding the association between 25(OH)D and fibrinogen [11,20,22,23,28,29]. The conflicting results are probably due to differences in study design and the selection of specific

patient groups [11,28,29]. Next to the studies that reported no association between the measures [20,23], several studies reported an inverse relation between 25(OH)D and fibrinogen concentrations, for example in 179 patients with rheumatoid arthritis [11], in 701 U.S. American adolescents [29] or in 181 women with systemic lupus erythematosus [28]. Moreover, a large study including 6538 individuals from the 1958 British Birth Cohort [22] found an inverse association between 25(OH)D and fibrinogen in analyses adjusted for sex and month of blood drawn. Yet, these associations vanished after additional adjustment for obesity, lifestyle and social characteristics [22]. In the present analyses the associations between 25(OH)D and fibrinogen were independent of obesity as assessed by waist circumference. The diverging results obtained in our study and the 1958 British Birth Cohort [22] might partly be explained by differences in 25(OH)D concentrations, as the associations between the 25(OH)D concentration and the inflammatory markers might be stronger in 25(OH)D deficiency than in vitamin D replete states. While in our study 10.6% of men and 13.0% of women were vitamin D deficient, these proportions were markedly lower in the British study (6.2% in men and 8.4% in women).

Studies investigating the relationship between 25(OH)D and WBC are sparse. One recent study [30] examined the relationship between the two measures in a large hospital population including 1557 adult subjects without chronic kidney disease and 340 adult patients with chronic kidney disease. There was no associations between 25(OH)D and WBC, either in adults with chronic kidney disease or in adults without chronic kidney disease [30]. Yet, smoking status was not assessed in this study [30]. Our results suggest that it is crucial to perform analyses stratified by smoking status, as 25(OH)D concentrations and WBC were only related in smokers but not in non-smokers. While it is long known that smoking is associated with increased WBCs [31], our data now suggest that smoking accompanied by low 25(OH)D concentrations is associated with even higher WBCs than smoking with higher 25(OH)D concentrations.

Although the results from studies investigating the associations between the 25(OH)D concentration with hs-CRP or fibrinogen concentrations are conflicting and studies on the association between the 25(OH)D concentrations and WBC are rare, the biological background of a general association

**Table 3 – Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) from multivariable logistic regression models for the association between vitamin D status with increased inflammatory biomarker concentrations ( $\geq 90$ th percentile).**

Vitamin D status	OR (95% CI)			
	Hs-CRP	Fibrinogen	WBC	
			Smoker	Non-smoker
Deficiency (n = 322)	1.40 (0.88–2.22)	Reference	Reference	Reference
Insufficiency (n = 1301)	1.27 (0.91–1.78)	0.75 (0.51–1.09)	0.92 (0.52–1.61)	0.69 (0.39–1.22)
Sufficiency (n = 744)	Reference	0.69 (0.44–1.06)	0.59 (0.29–1.17)	0.79 (0.43–1.45)
Target Range (n = 356)	1.18 (0.72–1.95)	0.50 (0.28–0.91)	0.57 (0.24–1.35)	0.51 (0.24–1.11)

hs-CRP, serum high-sensitivity C-reactive protein concentration; WBC, white blood cell count; 25(OH)D, 25-hydroxy vitamin D.

90th percentile of hs-CRP: 5.62 mg/l; fibrinogen: 4.29 g/l; WBC: 9.2 Gpt/l. Vitamin D status: deficiency 0–9.9 ng/ml 25(OH)D; insufficiency 10–19.9 ng/ml 25(OH)D; sufficiency 20–29.9 ng/ml 25(OH)D; target range  $\geq 30$  ng/ml 25(OH)D.

All logistic regression models were adjusted for age, sex, waist circumference, diabetes mellitus, dyslipidemia, intake of anti-inflammatory medication and month of blood sampling.

between vitamin D and inflammatory processes is well investigated in cell culture models [32–37]. From these models it is known that 1,25(OH)<sub>2</sub>D impairs the proliferation of dendritic cells [33] and B-cells [34] and decreases proinflammatory cytokines like IL-6, IL-23 or tumor necrosis factor [35,36]. This suggests that under conditions of 1,25(OH)<sub>2</sub>D deficiency proinflammatory markers like IL-6 increase [36], which in turn may result in an increased number of leukocytes [37]. Moreover, the IL-6 induced CRP production in the liver might be increased in 1,25(OH)<sub>2</sub>D deficiency and decreased in 1,25(OH)<sub>2</sub>D sufficiency. In consequence, inverse associations between 25(OH)D and the inflammatory markers would be expected, while the U-shaped association between 25(OH)D and hs-CRP seems counterintuitive. Yet, previous studies reported U-shaped associations between 25(OH)D and mortality [38–40], or major cardiac and cerebrovascular events in cardiac surgical patients [41]. Therefore, the observed association appears possible, although the underlying mechanisms still need to be discovered. On the other hand, the U-shaped association may be an artifact, determined by the small proportion of subjects with 25(OH)D in the target range [25(OH)D ≥30 ng/ml: 13.1% of subjects; 25(OH)D ≥40 ng/ml; 3.0% of subjects]. The majority of our study population (76.3%) had 25(OH)D concentrations <25 ng/ml, a range in which hs-CRP decreased with increasing 25(OH)D. Additionally, we cannot exclude that subjects with high 25(OH)D concentrations had not acknowledged taking vitamin D supplements in the SHIP examination, which might have biased the analyses. Overall, there is no final explanation for the U-shaped association between 25(OH)D and hs-CRP in our study population and we suggest assessing it in future studies.

Our study demonstrates that adult men and women from the general population who are vitamin D deficient or insufficient have increased inflammatory biomarker profiles, including increased hs-CRP and fibrinogen. Moreover, vitamin D deficient or insufficient smokers have increased WBCs. Our results thus support the hypothesis that vitamin D deficiency or insufficiency and cardio-metabolic disease may be linked by chronic inflammation [3,8]. Yet, when 25(OH)D concentrations increased above 25 ng/ml, the association with hs-CRP changed. Subjects with 25(OH)D concentrations in the target range (≥30 ng/ml) had increasing hs-CRP concentration, while fibrinogen concentrations and WBCs (in smokers) continued to decrease. Whether these observations have any clinical meaning, needs to be further evaluated in randomized clinical trials. Especially potential effects of vitamin D supplementation on hs-CRP concentrations in subjects with 25(OH)D concentrations >25 ng/ml need further investigation, with respect to clinically relevant elevations.

Our study has several strengths and potential limitations that need to be considered. Major strengths are the large number of subjects analyzed and the population-based study design. In addition, all examinations and laboratory measurements were performed by certified examiners following standardised protocols, assuring excellent quality of data. Limitations arise from the cross-sectional study design, which prohibits detecting any causality in the investigated associations. Moreover, our analyses are based on single-occasion biomarker measurements, which might not adequately represent the participant's inflammatory status. Additionally, we

were unable to assess differences between vitamin D<sub>2</sub> and vitamin D<sub>3</sub> as the respective data were not available in SHIP.

In summary, our study confirms a potential role of 25(OH)D in chronic inflammation. Yet, different inflammatory biomarkers are differently associated with the 25(OH)D concentration. Beneficial effects of increasing 25(OH)D concentrations were observed for fibrinogen and for WBC (in smokers only). In contrast, the U-shaped association between 25(OH)D and hs-CRP concentrations indicates that ever-increasing 25(OH)D concentrations may also be related to proinflammatory states.

---

### Author contributions

Study design, study conduct, data collection, data analysis and data interpretation: LM, HW, AG, HV, MN, and AH. Drafting manuscript and revising manuscript content: LM, HW, HV, and AH. Approving final version of manuscript: LM, HW, AG, HV, MN, and AH.

---

### Funding

This work was funded by grants from the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF, Grants 01ZZ0403, 01ZZ0103, 01GI0883), the Ministry for Education, Research and Cultural Affairs as well as the Ministry of Social Affairs of the Federal State of Mecklenburg-West Pomerania. This work is also part of the research project Greifswald Approach to Individualized Medicine (GANI\_MED). The GANI\_MED consortium is funded by the Federal Ministry of Education and Research and the Ministry of Cultural Affairs of the Federal State of Mecklenburg-West Pomerania (03IS2061A). Furthermore, we received an independent research grant for determination of serum samples from Immunodiagnostic Systems.

---

### Disclosure statement

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

---

### REFERENCES

- [1] Holick MF. Vitamin D, deficiency. *N Engl J Med* 2007;357(3):266–81.
- [2] Hewison M. Vitamin D, and the immune system: new perspectives on an old theme. *Rheum Dis Clin North Am* 2012;38(1):125–39.
- [3] Reis JP, von Muhlen D, Miller III ER, et al. Vitamin D status and cardiometabolic risk factors in the United States adolescent population. *Pediatrics* 2009;124(3):e371–9.
- [4] Hypponen E, Laara E, Reunanen A, et al. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001;358(9292):1500–3.
- [5] Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, et al. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from

- the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum* 2004;50(1):72–7.
- [6] Munger KL, Levin LI, Hollis BW, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2006;296(23):2832–8.
- [7] Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, et al. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 2007;85(6):1586–91.
- [8] Zittermann A, Schleithoff SS, Tenderich G, et al. Low vitamin D status: a contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure? *J Am Coll Cardiol* 2003;41(1):105–12.
- [9] Araujo F, Gouvinhas C, Fontes F, et al. Trends in cardiovascular diseases and cancer mortality in 45 countries from five continents (1980–2010). *Eur J Prev Cardiol* 2013 [Epub ahead of print].
- [10] Lowe GD. The relationship between infection, inflammation, and cardiovascular disease: an overview. *Ann Periodontol* 2001;6(1):1–8.
- [11] Haque UJ, Bathon JM, Giles JT. Association of vitamin D with cardiometabolic risk factors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64(10):1497–504.
- [12] Jorgensen SP, Agnholt J, Glerup H, et al. Clinical trial: vitamin D3 treatment in Crohn's disease — a randomized double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;32(3):377–83.
- [13] Barnes MS, Horigan G, Cashman KD, et al. Maintenance of wintertime vitamin D status with cholecalciferol supplementation is not associated with alterations in serum cytokine concentrations among apparently healthy younger or older adults. *J Nutr* 2011;141(3):476–81.
- [14] Patel S, Farragher T, Berry J, et al. Association between serum vitamin D metabolite levels and disease activity in patients with early inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56(7):2143–9.
- [15] Murr C, Pilz S, Grammer TB, et al. Vitamin D deficiency parallels inflammation and immune activation, the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Clin Chem Lab Med* 2012;50(12):2205–12.
- [16] Kim M, Na W, Sohn C. Correlation between vitamin D and cardiovascular disease predictors in overweight and obese Koreans. *J Clin Biochem Nutr* 2013;52(2):167–71.
- [17] Ngo DT, Sverdlov AL, McNeil JJ, et al. Does vitamin D modulate asymmetric dimethylarginine and C-reactive protein concentrations? *Am J Med* 2010;123(4):335–41.
- [18] Michos ED, Streeten EA, Ryan KA, et al. Serum 25-hydroxyvitamin d levels are not associated with subclinical vascular disease or C-reactive protein in the old order Amish. *Calcif Tissue Int* 2009;84(3):195–202.
- [19] Amer M, Qayyum R. Relation between serum 25-hydroxyvitamin D and C-reactive protein in asymptomatic adults (from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2006). *Am J Cardiol* 2012;109(2):226–30.
- [20] Bjorkman MP, Sorva AJ, Tilvis RS. C-reactive protein and fibrinogen of bedridden older patients in a six-month vitamin D supplementation trial. *J Nutr Health Aging* 2009;13(5):435–9.
- [21] Jorde R, Strand Hutchinson M, Kjaergaard M, et al. Supplementation with high doses of vitamin d to subjects without vitamin D deficiency may have negative effects: pooled data from four intervention trials in Tromsø. *ISRN Endocrinol* 2013;2013:1–7 [348705].
- [22] Hypponen E, Berry D, Cortina-Borja M, et al. 25-Hydroxyvitamin D and pre-clinical alterations in inflammatory and hemostatic markers: a cross sectional analysis in the 1958 British Birth Cohort. *PLoS One* 2010;5(5):1–8 [e10801].
- [23] Shea MK, Booth SL, Massaro JM, et al. Vitamin K and vitamin D status: associations with inflammatory markers in the Framingham Offspring Study. *Am J Epidemiol* 2008;167(3):313–20.
- [24] John U, Greiner B, Hensel E, et al. Study of Health In Pomerania (SHIP): a health examination survey in an east German region: objectives and design. *Soz Praventivmed* 2001;46(3):186–94.
- [25] Volzke H, Alte D, Schmidt CO, et al. Cohort profile: the study of health in Pomerania. *Int J Epidemiol* 2010;40(2):294–307.
- [26] Rizzoli R, Boonen S, Brandi ML, et al. Vitamin D supplementation in elderly or postmenopausal women: a 2013 update of the 2008 recommendations from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Curr Med Res Opin* 2013;29(4):305–13.
- [27] Stone C, Koo CY. Additive splines in statistics. Proceedings of the statistical computing section. Washington, DC: American Statistical Association; 1985.
- [28] Wu PW, Rhew EY, Dyer AR, et al. 25-Hydroxyvitamin D and cardiovascular risk factors in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009;61(10):1387–95.
- [29] Parikh S, Guo DH, Pollock NK, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations are correlated with cardiometabolic risk among American black and white adolescents living in a year-round sunny climate. *Diabetes Care* 2012;35(5):1133–8.
- [30] Yildirim I, Hur E, Kokturk F. Inflammatory markers: C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, and leukocyte count in vitamin D deficient patients with and without chronic kidney disease. *Int J Endocrinol* 2013;2013:1–6 [802165].
- [31] Hansen LK, Grimm Jr RH, Neaton JD. The relationship of white blood cell count to other cardiovascular risk factors. *Int J Epidemiol* 1990;19(4):881–8.
- [32] Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol* 2008;8(9):685–98.
- [33] Griffin MD, Lutz W, Phan VA, et al. Dendritic cell modulation by 1 $\alpha$ ,25 dihydroxyvitamin D3 and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(12):6800–5.
- [34] Chen S, Sims GP, Chen XX, et al. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol* 2007;179(3):1634–47.
- [35] Guillot X, Semerano L, Saldenber-Kermanac'h N, et al. Vitamin D and inflammation. *Joint Bone Spine* 2010;77(6):552–7.
- [36] Dickie LJ, Church LD, Coulthard LR, et al. Vitamin D3 down-regulates intracellular Toll-like receptor 9 expression and Toll-like receptor 9-induced IL-6 production in human monocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49(8):1466–71.
- [37] van Leeuwen MA, van Rijswijk MH. Acute phase proteins in the monitoring of inflammatory disorders. *Baillieres Clin Rheumatol* 1994;8(3):531–52.
- [38] Amrein K, Quraishi SA, Litonjua AA, et al. Evidence for a U-shaped relationship between pre-hospital vitamin D status and mortality: a cohort study. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(4):1461–9.
- [39] Melamed ML, Michos ED, Post W, et al. 25-Hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med* 2008;168(15):1629–37.
- [40] Michaelsson K, Baron JA, Snellman G, et al. Plasma vitamin D and mortality in older men: a community-based prospective cohort study. *Am J Clin Nutr* 2010;92(4):841–8.
- [41] Zittermann A, Kuhn J, Dreier J, et al. Vitamin D status and the risk of major adverse cardiac and cerebrovascular events in cardiac surgery. *Eur Heart J* 2013;34(18):1358–64.

## **7.2. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Diese Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und, dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, den

---

Liesa Mellenthin

### **7.3. Lebenslauf**

#### **Zur Person**

Name: Liesa Mellenthin  
Anschrift: Burgstraße 10  
17489 Greifswald  
Geburtsdatum: 20. April 1990  
Geburtsort: Greifswald  
Familienstand: ledig, kinderlos

#### **Schulische Ausbildung**

1996 – 2000 Verbundene Haupt- und Realschule mit Grundschulteil Lüssow  
2000 – 2009 John-Brinckman-Gymnasium Güstrow

#### **Studium**

ab 10/2009 Studium der Humanmedizin, „Ernst-Moritz-Arndt- Universität“  
Greifswald, 4. Studienjahr  
Physikum, Prädikat „gut“

#### **Praktika**

Krankenpflege: Intensivstation (Güstrow), Kardiologie (Güstrow), Kardiologie  
(Greifswald)  
Famulaturen: Urologie (Greifswald), Anästhesie (Greifswald), Pädiatrie (Greifswald)

#### **Sonstiges**

01-07/2007 Fairmount High School Kapstadt (Südafrika)

Greifswald, den

---

Liesa Mellenthin

#### **7.4. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich für die Unterstützung bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt meinem engagierten Doktorvater Dr. med. H. Wallaschofski für die Auswahl dieses spannenden Themas sowie die dauerhafte Unterstützung und Hilfeleistung bei der Bearbeitung und seinen konstruktiven Anregungen. Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. re r. med. A. Hannemann für ihre Geduld und Hilfe bei der Ausarbeitung der Arbeit und der biomathematische Auswertung der verwendeten Daten bedanken. Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. H. Völzke und Herrn Prof. Dr. med. M. Nauck für die Nutzung der SHIP-Daten sowie den einzelnen Mitarbeitern der verschiedenen Fachgebiete in der Community Medicine und den Mitarbeitern des Instituts der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin bedanken. Vielen Dank auch allen Koautoren für die freundliche Zusammenarbeit. Ein herzlicher Dank geht auch an meine Familie und meinen Freund, für die liebevolle Unterstützung und die Korrektur der hoffentlich letzten Rechtschreibfehler.