

# Info!

Die im Vortrag gezeigten Laborbefunde dienen der Verdeutlichung der fachlichen Inhalte.

Wir weisen ausdrücklich darauf hin, dass entsprechende Laboranalysen auch von anderen Labors durchgeführt werden und dass die Indikationsstellung für Labordiagnostik ausschließlich durch den Behandler oder das Krankenhaus erfolgt.

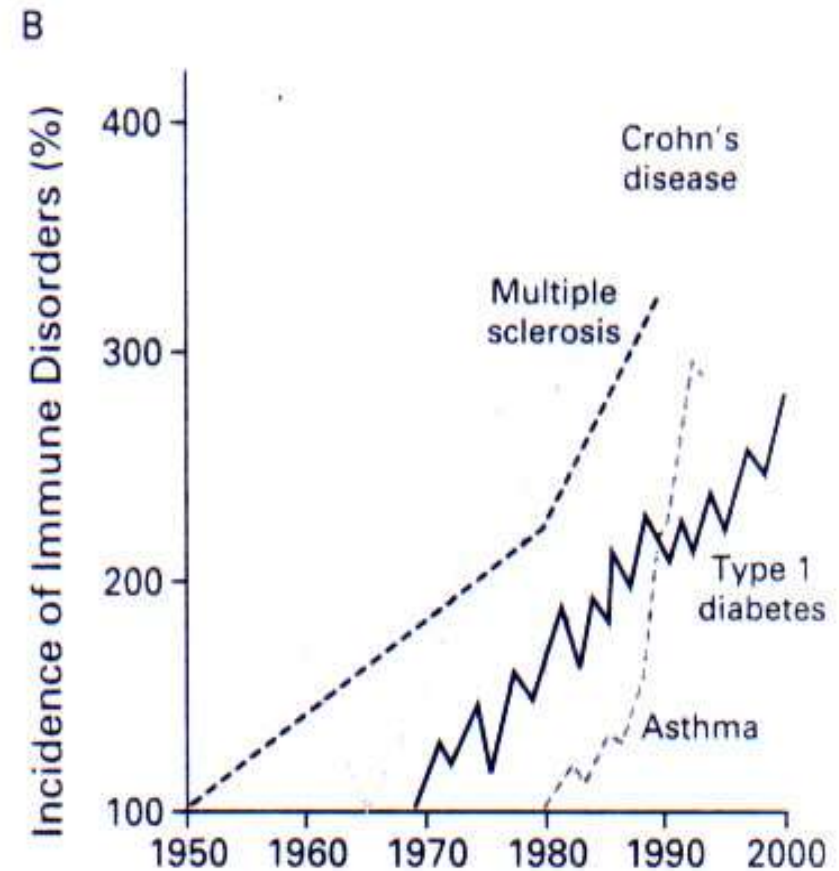
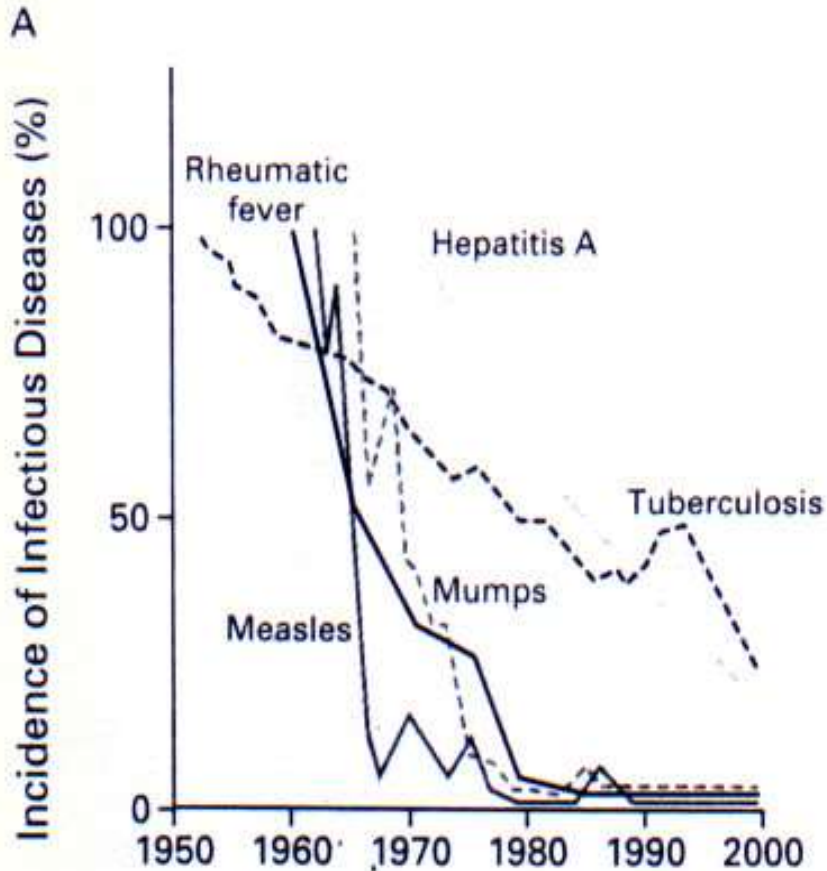


# Komplexe Labordiagnostik bei Vitamin D- und Vitamin K2-Mangel — Bewährte und neue Labormarker

Dr. med. Volker von Baehr

Institut für Medizinische Diagnostik Berlin  
[www.imd-berlin.de](http://www.imd-berlin.de)

# Chronische Entzündungserkrankungen – die Epidemie des 21. Jahrhunderts ?

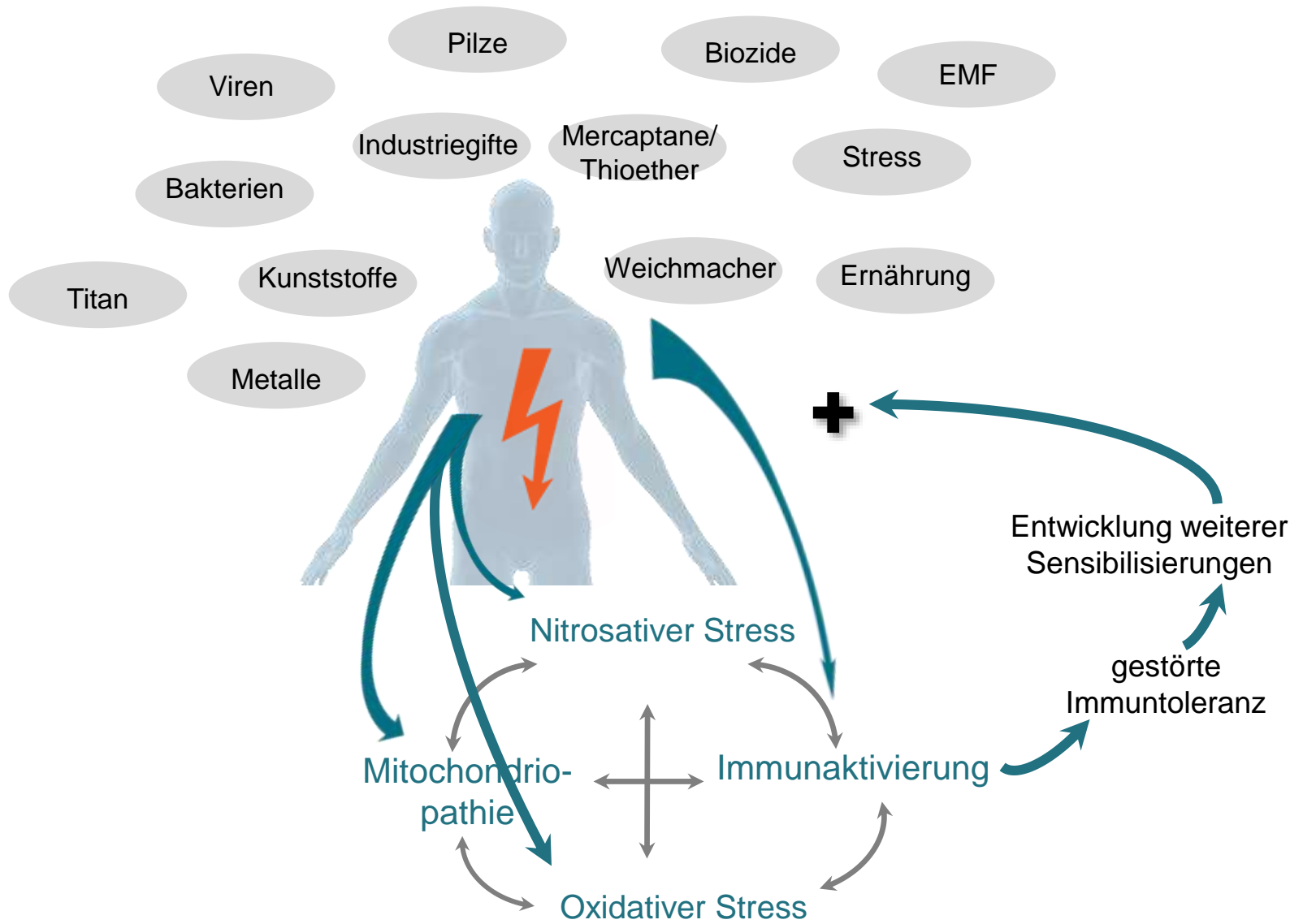


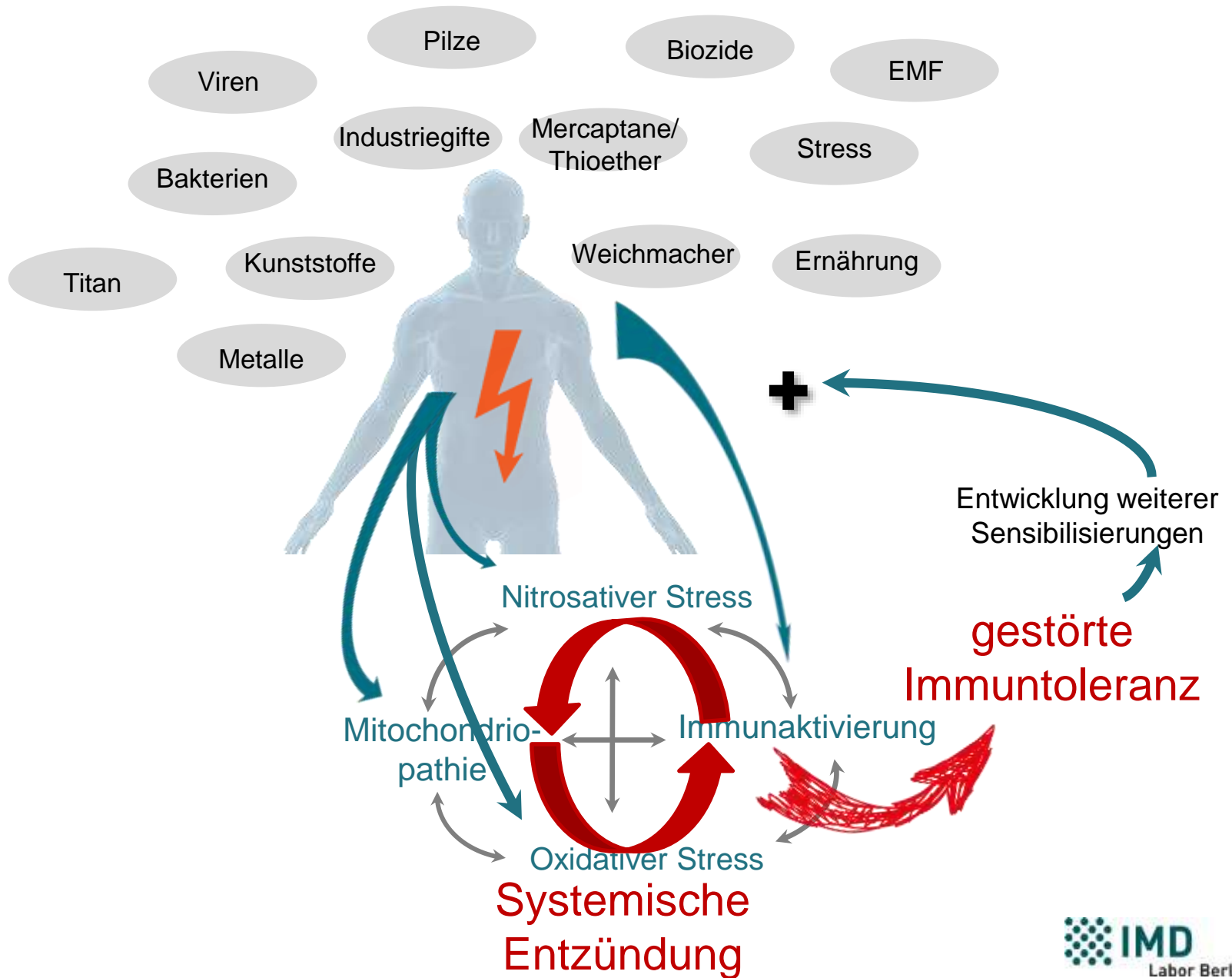
Chronisch entzündliche Erkrankungen beruhen auf dem Verlust der Immuntoleranz...

... gegen:

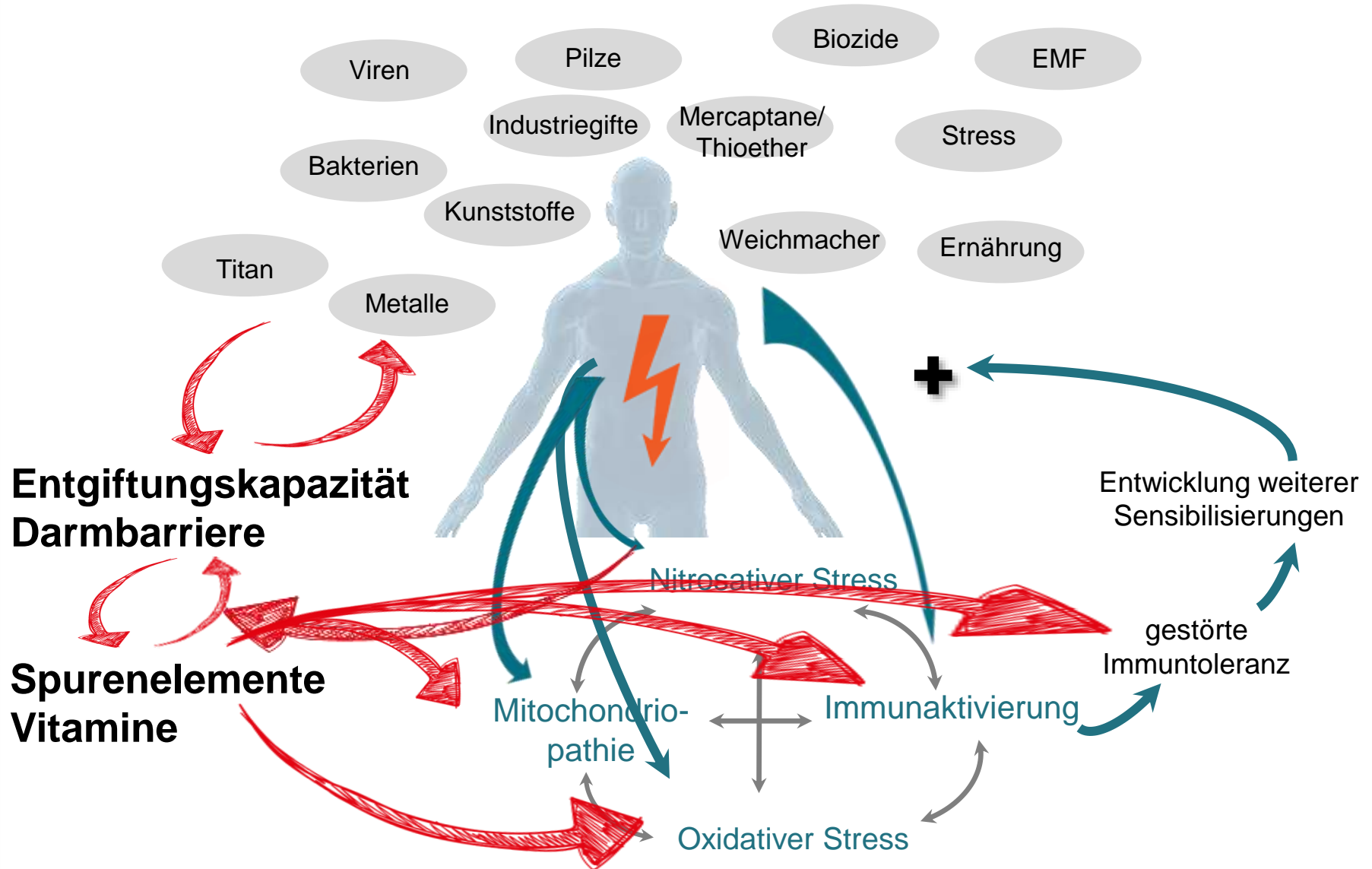
- **Fremdantigene (Allergene)**  
Heuschnupfen, Medikamenten-, Metallallergien u.a.
- **Selbstantigene (Autoantigene)**  
Diabetes Typ I, Hashimoto, Multiple Sklerose, Zöliakie, Colitis ulcerosa u.a.
- **latente (kommensale) Infektionserreger**  
Parodontitis, Morbus Crohn, Candidiasis, EBV?, CMV? u.a.

**Immuntoleranz?**

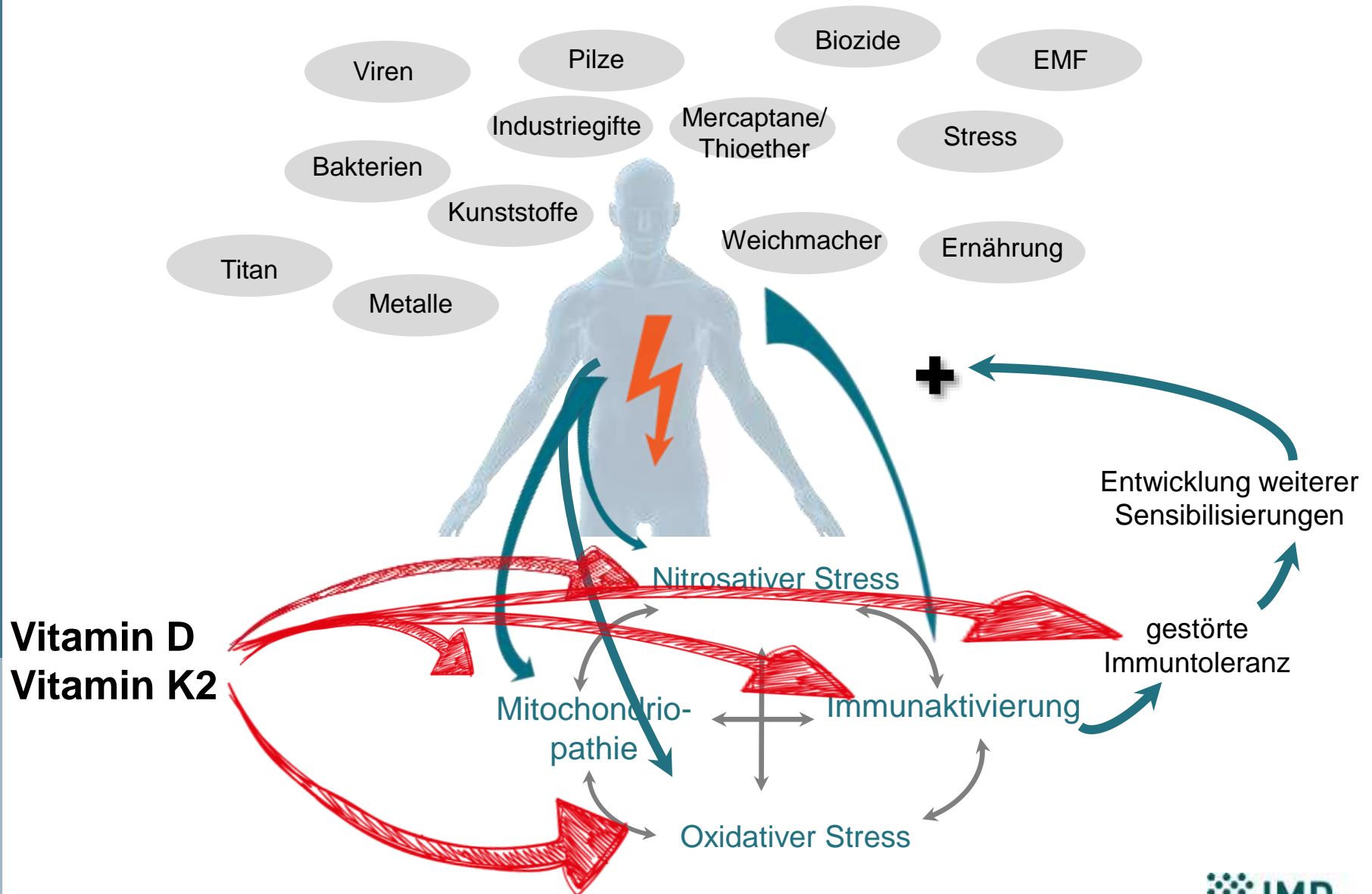




# Spurenelemente und Vitamine beeinflussen direkt und indirekt die Immuntoleranz



# Bedeutung von Vitamin D und Vitamin K2 für die Immuntoleranz



# Vitamin D

# Einfluss von Vitamin D auf das Immunsystem

## 1. Einfluss auf das unspezifische Immunsystem (Makrophagen)

- Antientzündliche Wirkung (Hemmung von NF $\kappa$ B durch Modulation der TLR-Expression)
- Induktion antimikrobieller Peptide in Makrophagen
- Aktivierung der 1 $\alpha$ -Hydroxylase über Aktivierung der Toll-like-Rezeptoren auf Makrophagen

## 2. Einfluss auf das spezifische Immunsystem

- Verbesserung der Effektorzellantwort von T-Lymphozyten nach erfolgter T-Zellaktivierung
- Hemmung der TH1-Immunantwort, Förderung von TH2
- Hemmung der IL2- und IL17-Sekretion in Helferzellen

## 3. Einfluss auf die Immuntoleranz

- Induktion von T<sub>reg</sub>-Zellen
- Hemmung der Reifung von Dendritischen Zellen

# Einfluss von Vitamin D auf das Immunsystem

## 1. Einfluss auf das unspezifische Immunsystem (Makrophagen)

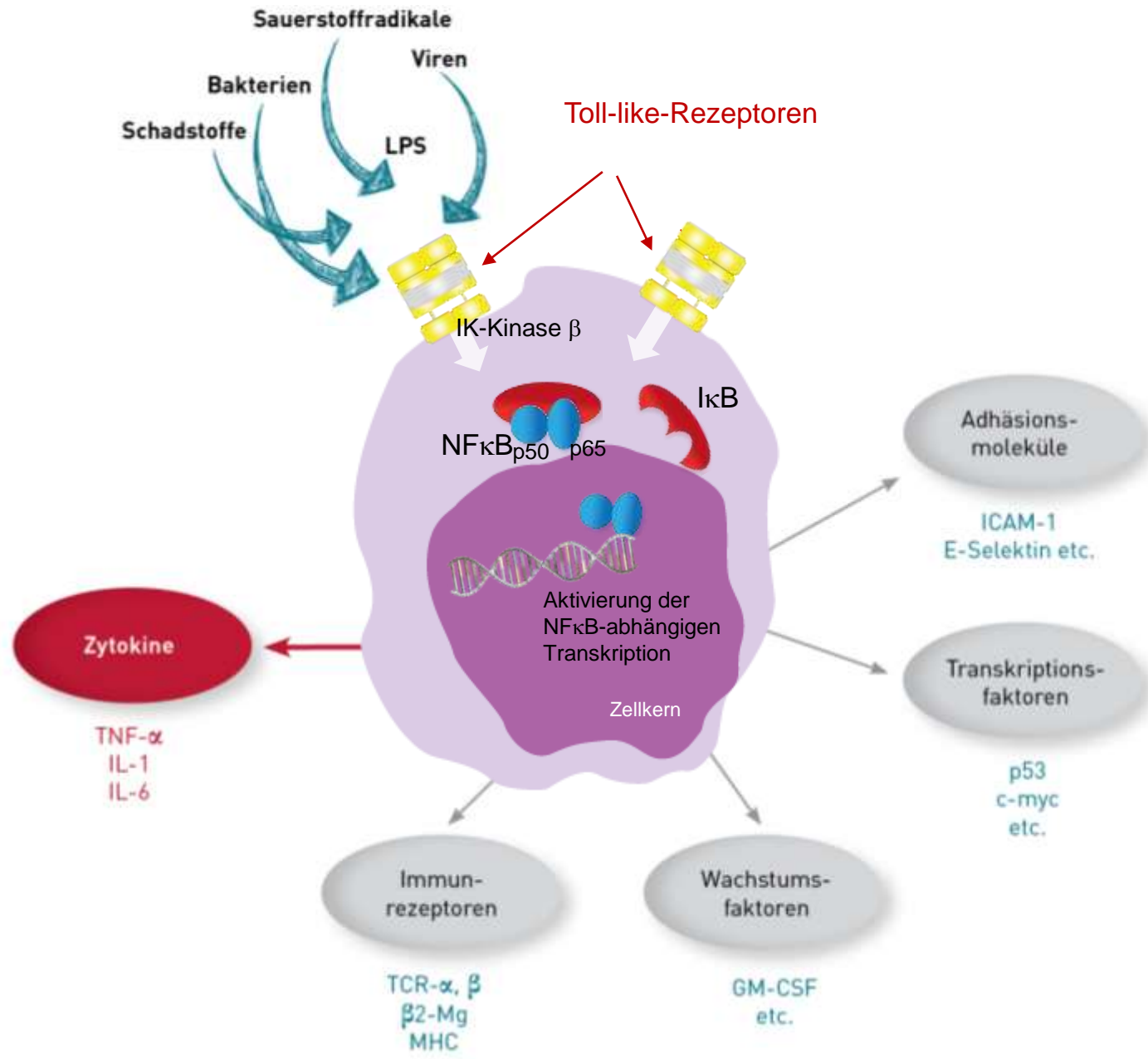
- **Antientzündliche Wirkung (Hemmung von NF $\kappa$ B durch Modulation der TLR-Expression)**
- Induktion antimikrobieller Peptide in Makrophagen
- Aktivierung der 1 $\alpha$ -Hydroxylase über Aktivierung der Toll-like-Rezeptoren auf Makrophagen

## 2. Einfluss auf das spezifische Immunsystem

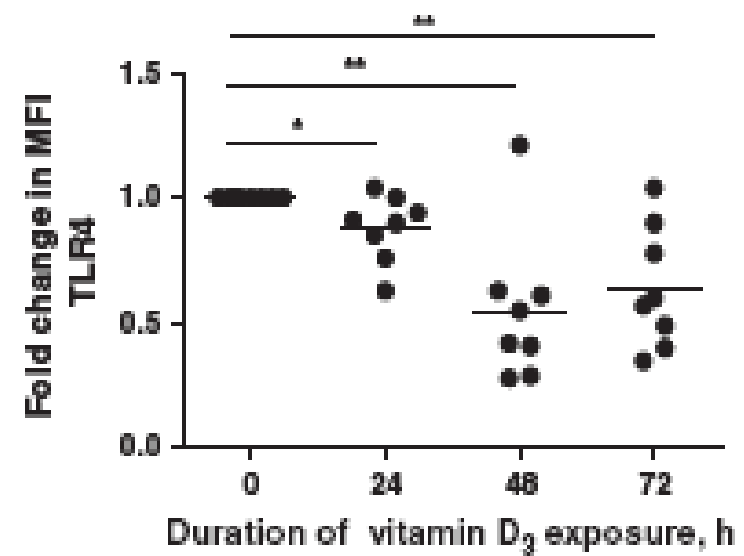
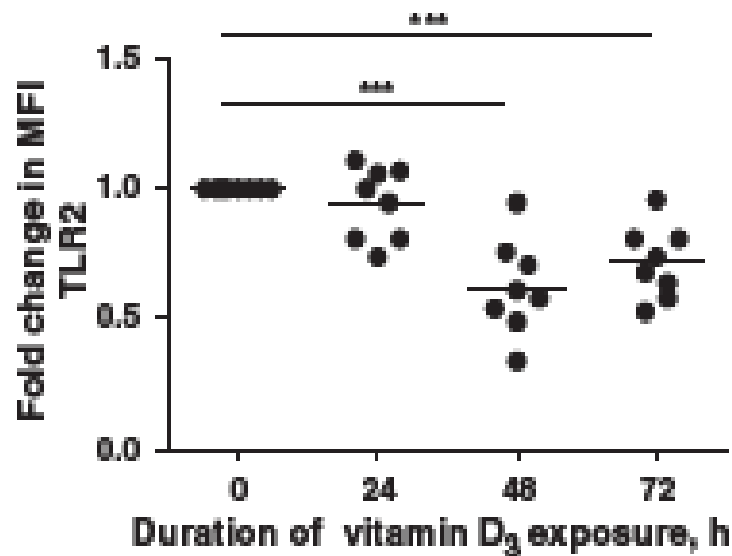
- Verbesserung der Effektorzellantwort von T-Lymphozyten nach erfolgter T-Zellaktivierung
- Hemmung der TH1-Immunantwort, Förderung von TH2
- Hemmung der IL2- und IL17-Sekretion in Helferzellen

## 3. Einfluss auf die Immuntoleranz

- Induktion von T<sub>reg</sub>-Zellen
- Hemmung der Reifung von Dendritischen Zellen



# Vitamin D vermindert die Expression der Toll-like-Rezeptoren 2 und 4 auf Makrophagen und hemmt darüber die Freisetzung von Entzündungszytokinen



Vitamin D<sub>3</sub> down-regulates intracellular Toll-like receptor 9 expression and Toll-like receptor 9-induced IL-6 production in human monocytes.

Dickie LJ et al. Rheumatology (Oxford). 2010 Aug;49(8):1466-71

# Einfluss von Vitamin D auf das Immunsystem

## 1. Einfluss auf das unspezifische Immunsystem (Makrophagen)

- Antientzündliche Wirkung (Hemmung von NF $\kappa$ B durch Modulation der TLR-Expression)
- Induktion antimikrobieller Peptide in Makrophagen
- Aktivierung der 1 $\alpha$ -Hydroxylase über Aktivierung der Toll-like-Rezeptoren auf Makrophagen

## 2. Einfluss auf das spezifische Immunsystem

- Verbesserung der Effektorzellantwort von T-Lymphozyten nach erfolgter T-Zellaktivierung
- **Hemmung der TH1-Immunantwort**, Förderung von TH2
- **Hemmung der IL2- und IL17-Sekretion in Helferzellen**

## 3. Einfluss auf die Immuntoleranz

- **Induktion von T<sub>reg</sub>-Zellen**
- Hemmung der Reifung von Dendritischen Zellen

# Vitamin D hat „bremsende“ Effekte auf die Lymphozyten

## **Vitamin D hemmt die Lymphozytenproliferation**

1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro.  
J Immunol. 1985;134:3032-5.

## **Vitamin D hemmt die Sekretion von TH1-Lymphozyten (IFN- $\gamma$ ) und stimuliert die Freisetzung von IL-4 aus TH2-Zellen**

Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: preferential inhibition of Th1 functions.  
J Nutr. 1995 ;125:1704-1708.

## **Vitamin D hemmt die Sekretion von IL-2 und IL-17**

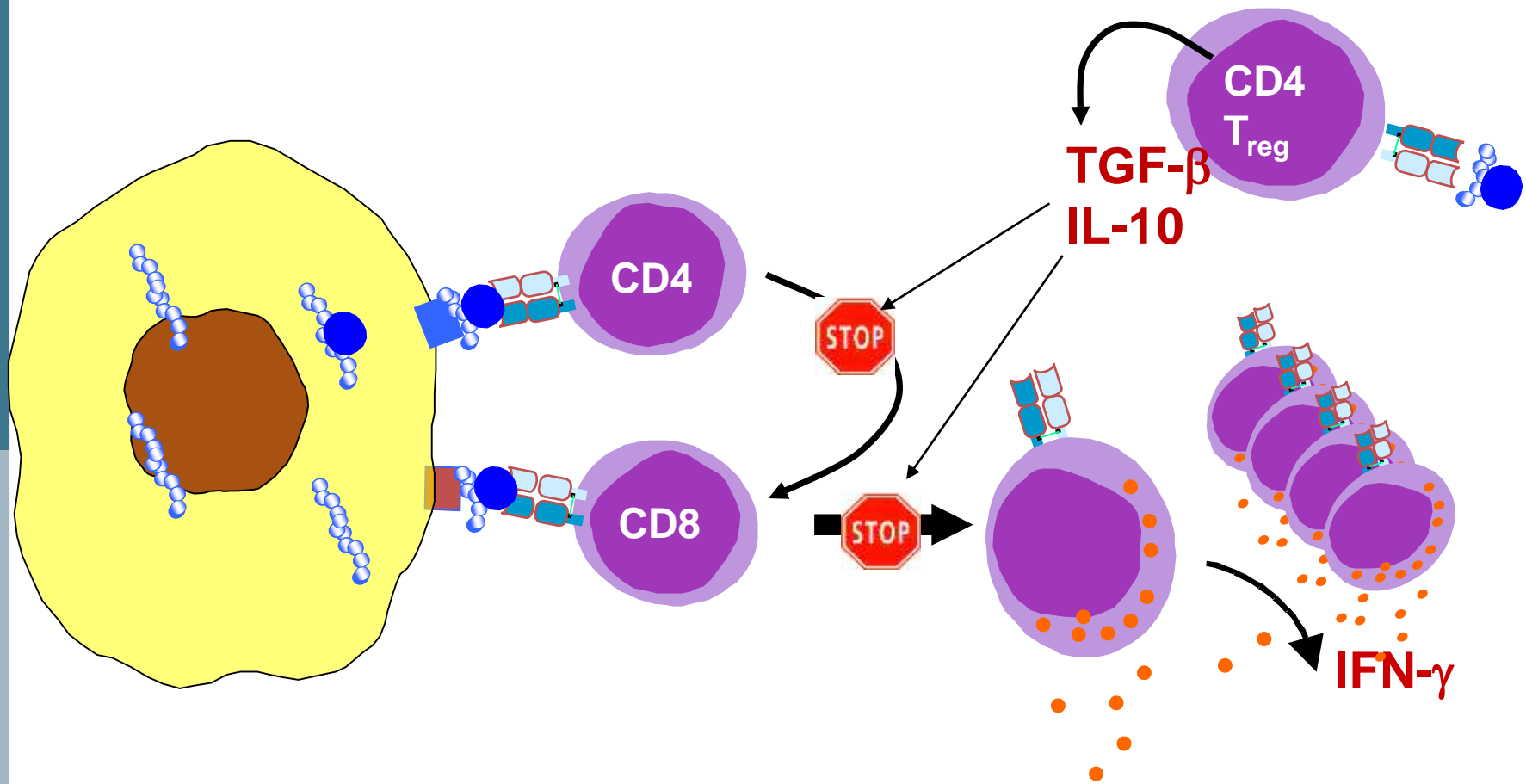
1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. Mol Cell Biol. 2011 ;31:3653-69

## **Vitamin hemmt die Immunglobulinsynthese in B-Lymphozyten**

1 alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells.  
J Clin Invest. 1984;74:657-61.

# Vitamin D fördert die Entwicklung von regulatorischen T-Lymphozyten (T<sub>reg</sub>)

1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. Jeffery LE, J Immunol. 2009 ;183:5458-67.



# Vitamin D-Gabe führt zum Anstieg der T<sub>reg</sub>-Zellen

<b>Leukozyten</b>	5780 / $\mu$ l	4000 - 10000		
<b>Lymphozyten</b>	1335 / $\mu$ l	1100 - 4000	23 %	20 - 40
<b>Monozyten</b>	566 / $\mu$ l	140 - 800	10 %	2 - 14
<b>Granulozyten</b>	3878 / $\mu$ l	2400 - 7400	67 %	42 - 75
<b>T-Zellen</b>	<b>898</b> / $\mu$ l	920 - 2580	67 %	61 - 84
<b>CD45RA+ naive T-Zellen</b>	405 / $\mu$ l	300 - 1300	45,1 %	30 - 63
<b>CD45RA- memory T-Zellen</b>	468 / $\mu$ l	300 - 1600	52,1 %	37 - 70
<b>CD4-Helfer</b>	<b>369</b> / $\mu$ l	550 - 1460	<b>28 %</b>	32 - 60
<b>CD45RA+ naive</b>			39 %	19 - 58
<b>CD31+</b>			59 %	> 49
<b>CD25++/CD127-Treg's</b>	58 / $\mu$ l	35 - 120	<b>15,8 %</b>	4 - 10
<b>CD8-Lymph.</b>	360 / $\mu$ l	280 - 930	27 %	23 - 40
<b>CD8+/CD28+ (zytotox.)</b>	195 / $\mu$ l	130 - 450	<b>54,1 %</b>	57 - 94

High-dose cholecalciferol supplementation significantly increases peripheral CD4+ Tregs in healthy adults without negatively affecting the frequency of other immune cells.

Prietl B et al. Eur J Nutr. 2013

The effect of vitamin D supplementation on peripheral regulatory T cells and  $\beta$  cell function in healthy humans: a randomized controlled trial.

Bock G et al. Diabetes Metab Res Rev. 2011 ;27:942-5

# Vitamin D-Labordiagnostik

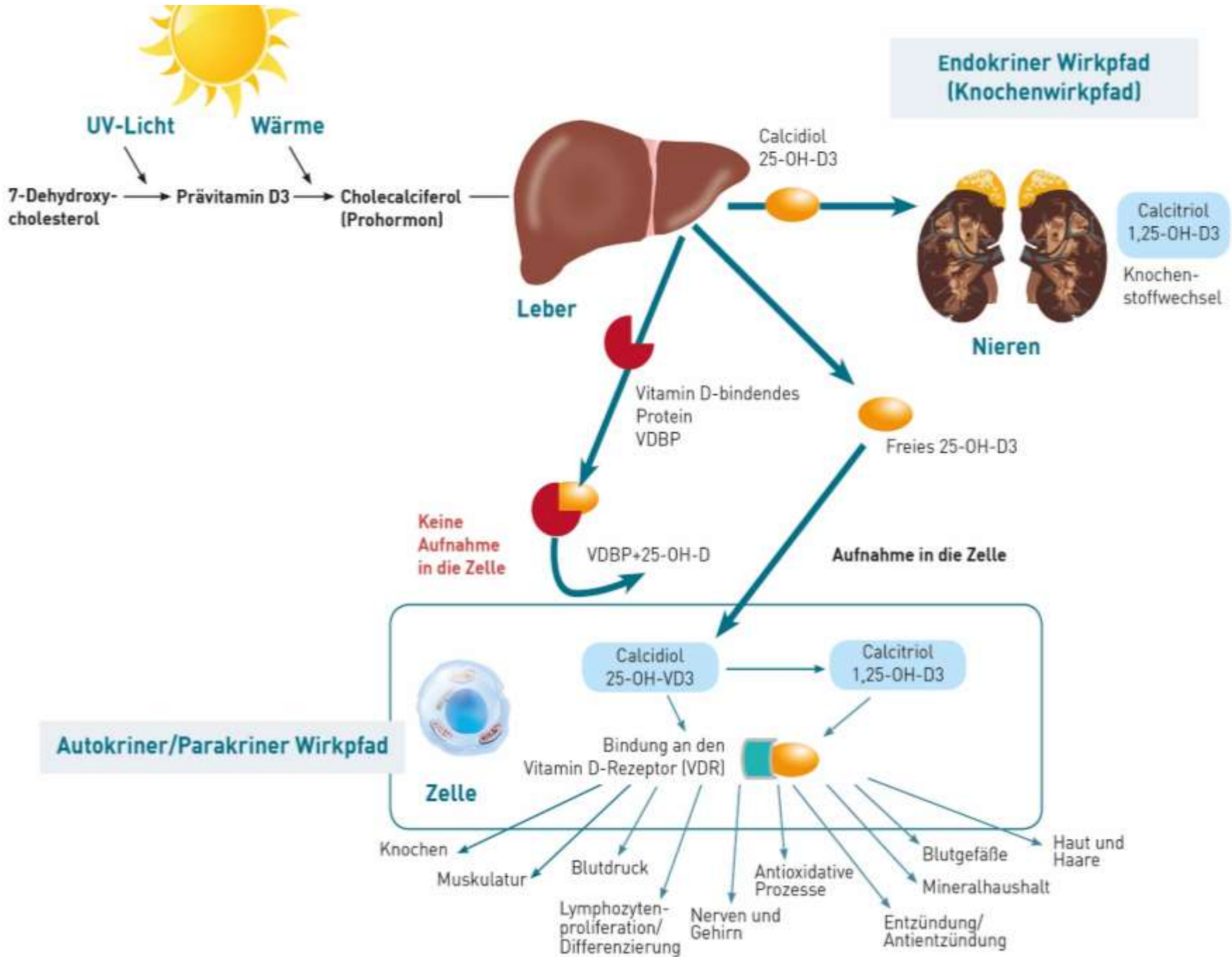
# Das 25-OH-Vitamin D spiegelt die „Versorgung“ wieder

Ärztlicher Befundbericht



Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
25-Hydroxy-Vitamin-D i.S. Kein Hinweis auf einen Vitamin D-Mangel	(ECLIA) 56	ng/ml	30 - 100

Da Hormone im Blut überwiegend an Proteine gebunden sind, korrelieren Mangelsymptome weniger zum Gesamtspiegel als vielmehr zum freien (verfügbaren) Anteil !



Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
25-Hydroxy-Vitamin-D i.S.	(ECLIA) 56	ng/ml	30 - 100
Freies 25 (OH)-Vitamin D	(ELISA) <b>2,22</b>	pg/ml	> 4.40

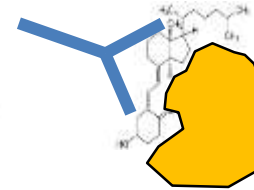
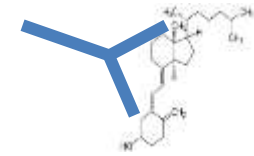
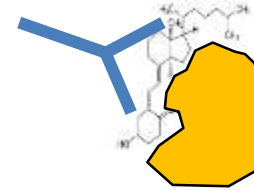
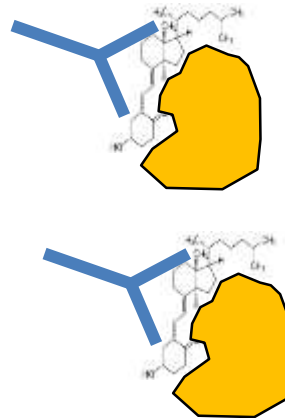
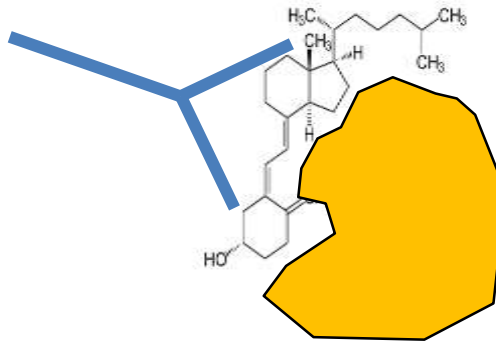
Nachweis eines erniedrigten freien Vitamin D trotz normalem Gesamt-25-OH-Vitamin D3

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
25-Hydroxy-Vitamin-D i.S.	(ECLIA) 43	pg/ml	30 - 100
Freies 25 (OH)-Vitamin D	(ELISA) 7.75	pg/ml	> 4.40

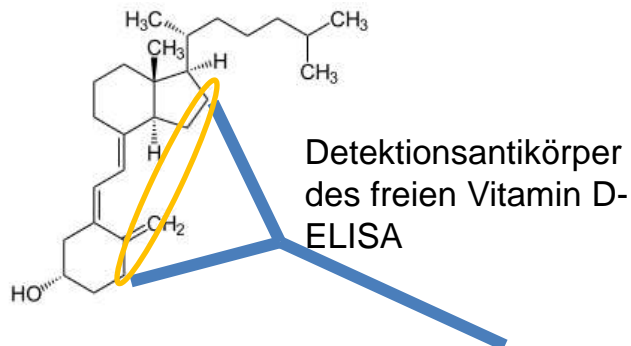
Nachweis eines normalen freien Vitamin D trotz grenzwertigem Gesamt-25-OH-Vitamin D3

# 25-OH-Vitamin D-ELISA

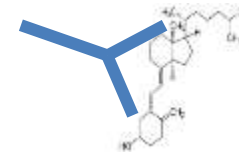
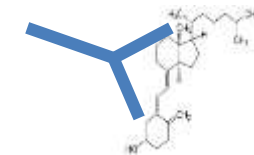
Detektionsantikörper  
des 25-OV-Vitamin D-ELISA



# Freies 25-OH-Vitamin D-ELISA



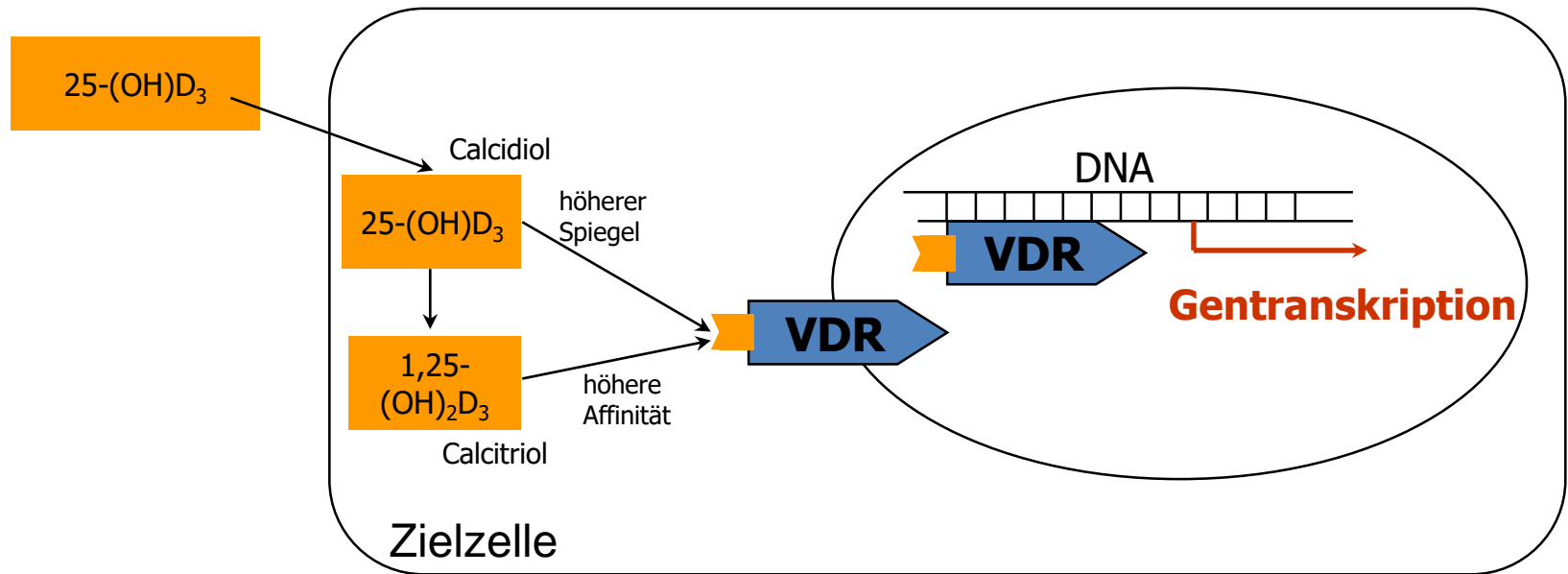
Bindungsstelle im  
VDBP-bindenden  
Bereich



Detektion nur der Nicht-VDBP-gebundenen  
freien Vitamin D-Moleküle

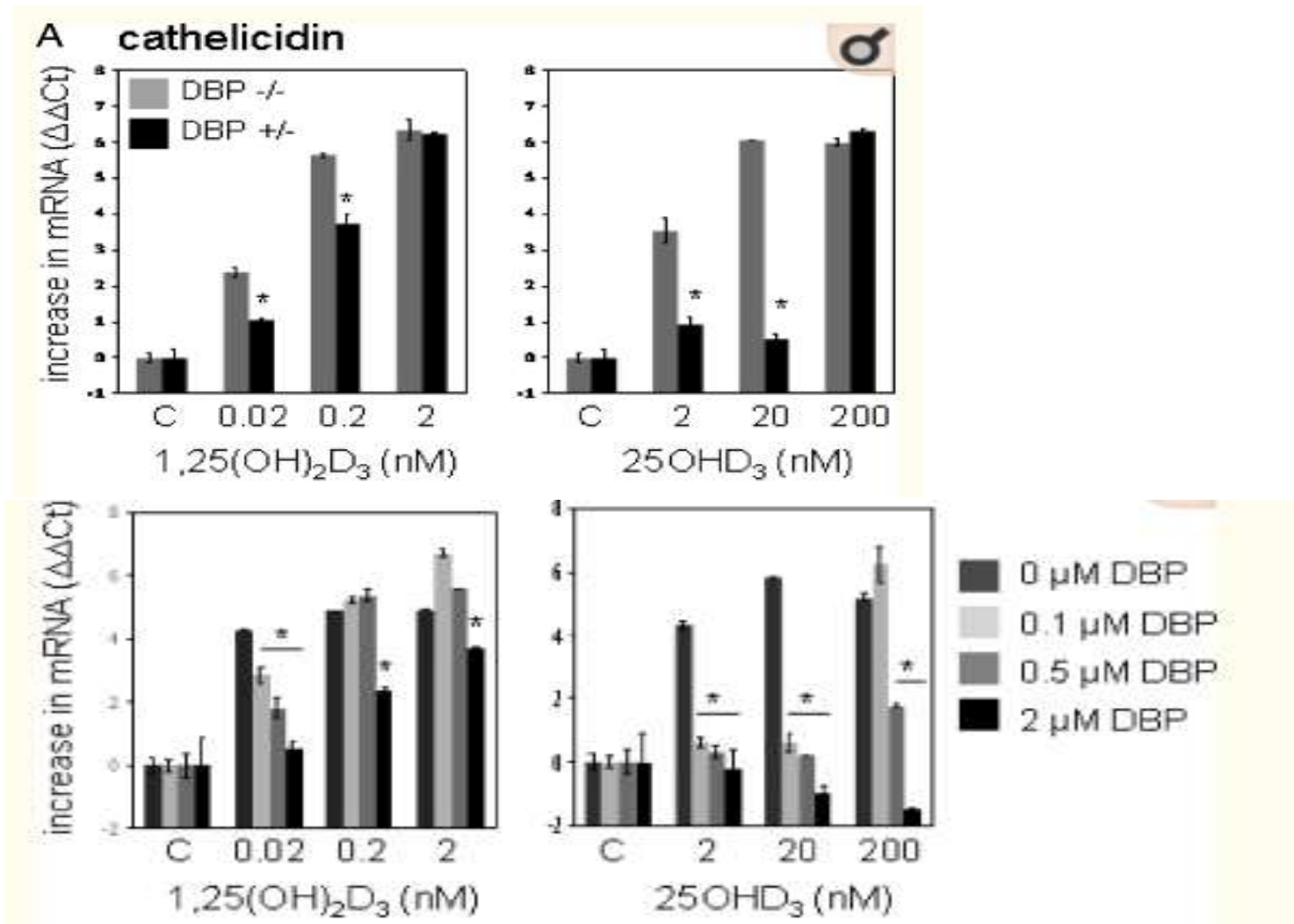
# Nur freies, nicht gebundenes Vitamin D3 kann in Zielzellen aufgenommen werden und ist biologisch aktiv

- intrazelluläre Umwandlung in 1,25-Vitamin D3
- Bindung an den Vitamin D-Rezeptor (Transkriptionsfaktor)



Das an Transportproteine gebundene Vitamin D gilt als inaktives – aber schnell verfügbares – Reservoir.

# VDBP hemmt dosisabhängig die intrazelluläre Aktivierung von Cathelicidin durch Vitamin D



Chun RF Vitamin D-Binding Protein Directs Monocyte Responses to 25-Hydroxy- and 1,25-Dihydroxyvitamin D J Clin Endocrinol Metab. 2010 95: 3368–76.

# Die Aussagekraft von freies Vitamin D ist durch Studien gut belegt

Freies Vitamin D korreliert besser zur Knochendichte als Gesamt 25-OH-Vitamin D3

Johnsen MS et al. Scand J Clin Lab Invest. 2014;74:177–183

Powe CE et al. J Bone Miner Res. 2011;26:1609–1616

Freies Vitamin D korreliert im Vergleich zum 25-OH-Vitamin D besser zum Calcium im Serum und invers zum Parathormonspiegel

Bhan I et al. Kidney Int. 2012;82:84–89.

Freies Vitamin D korreliert zur „arterial stiffness“ besser als 25-OH-Vitamin D3

Ashraf AP et al. PLoS ONE. 2014;9:e114689.

Schwangere haben ein niedrigeres freies Vitamin D durch Anstieg des Vitamin-D-bindenden proteins

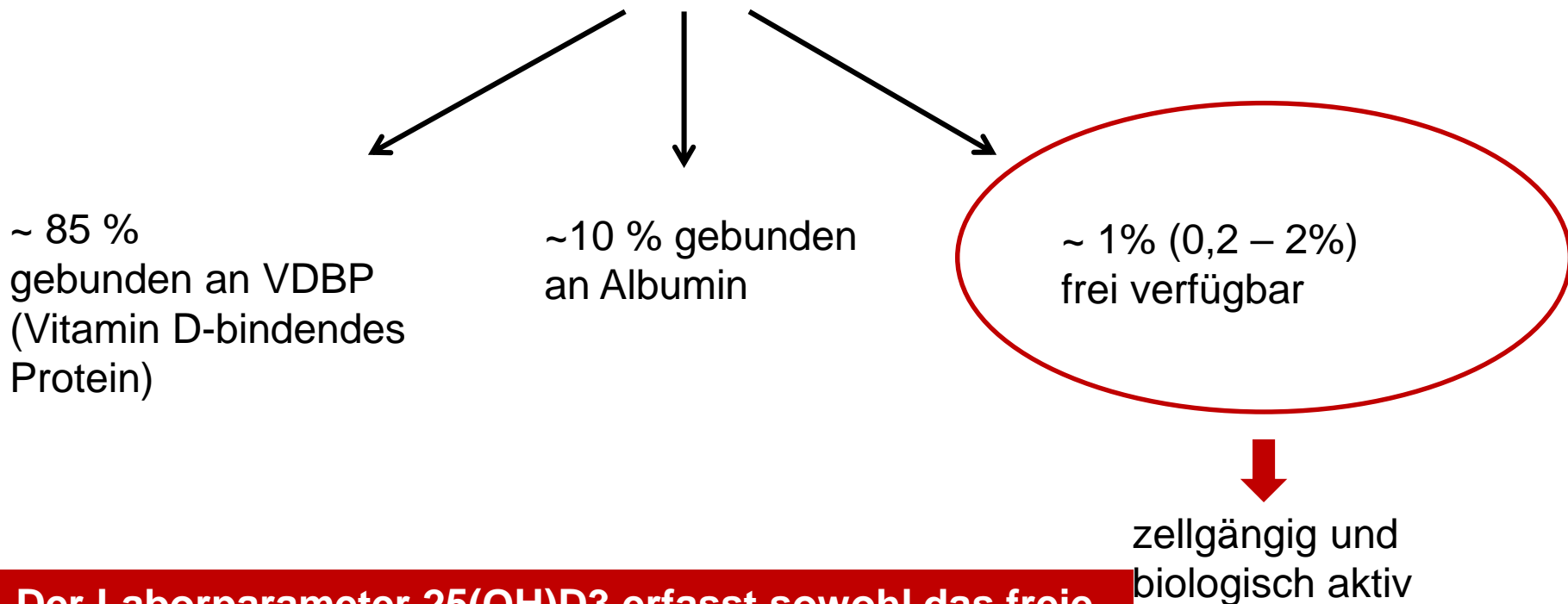
Bouillon R et al. J Clinical Investigation. 981;67:589–596.

Die Einnahme oraler Kontrazeptiva erhöht den Spiegel an Vitamin-D-bindendem Protein und senkt freies Vitamin D

Moller UK et al. Nutrients. 2013;5:3470–3480

Nur ca. 1 % des Gesamt-Vitamin D ist frei verfügbar  
(biologisch aktiv).

### Vitamin D3

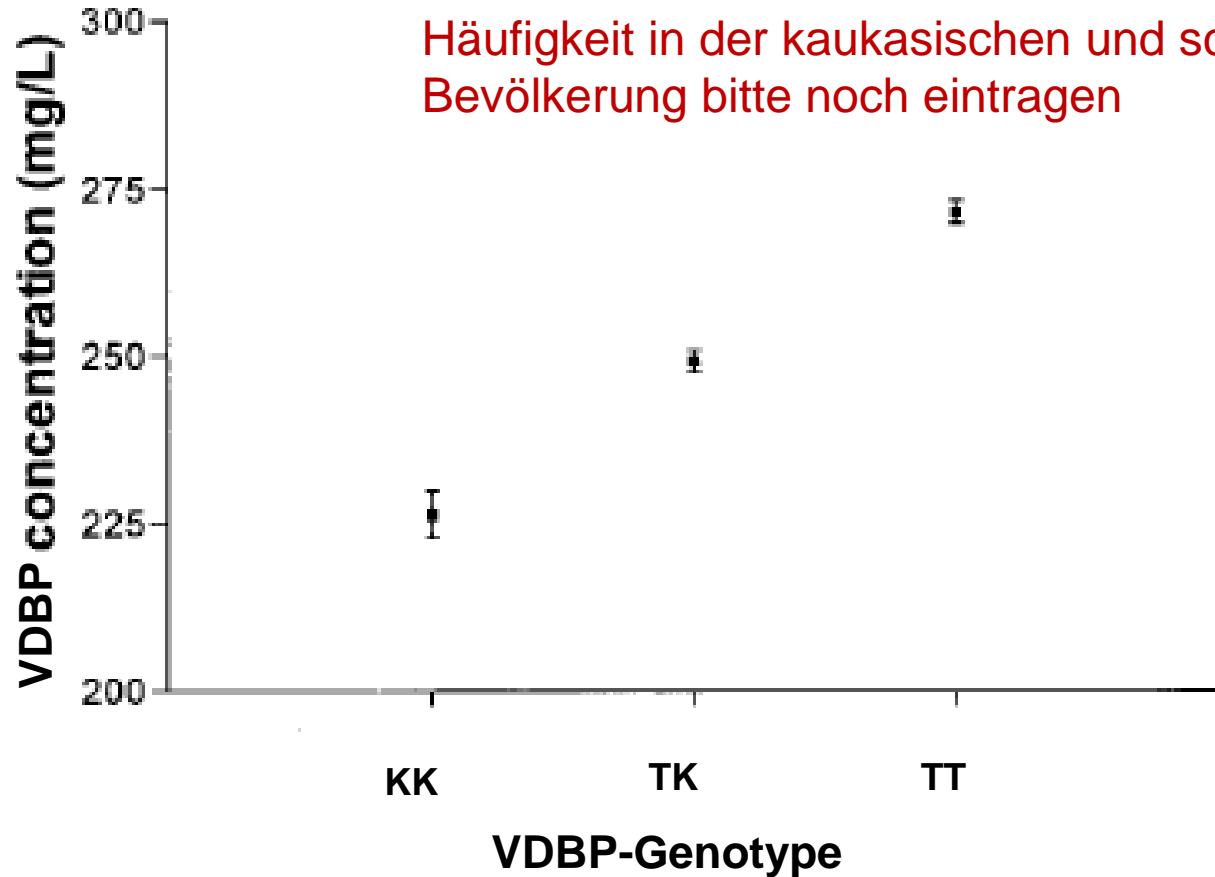


**Der Laborparameter 25(OH)D3 erfasst sowohl das freie als auch das gebundene Vitamin D3.**

# Vitamin D bindendes Protein (VDBP)

- polymorphes monomeres Serumprotein: 58 kDa
- beinahe ausschließlich in der Leber synthetisiert (in geringen Mengen auch in Niere, Testis und Fettgewebe)
- der Blutspiegel des VDBP ist nicht durch Vitamin-D-Metabolite selber reguliert.
- Verminderung bei Leberkrankheiten, Mangelernährung (verminderte Bildung) und bei nephrotischem Syndrom (vermehrte Ausscheidung in der Niere).
- Erhöhung bei Schwangerschaft, Östrogen(-hormon)therapie.
- VDBP-Gen liegt auf Chromosom 4 und umfasst 13 Exone
- der Polymorphismus T420K hat den größten Einfluss auf den VDBP-Spiegel und seine Bindungsaffinität

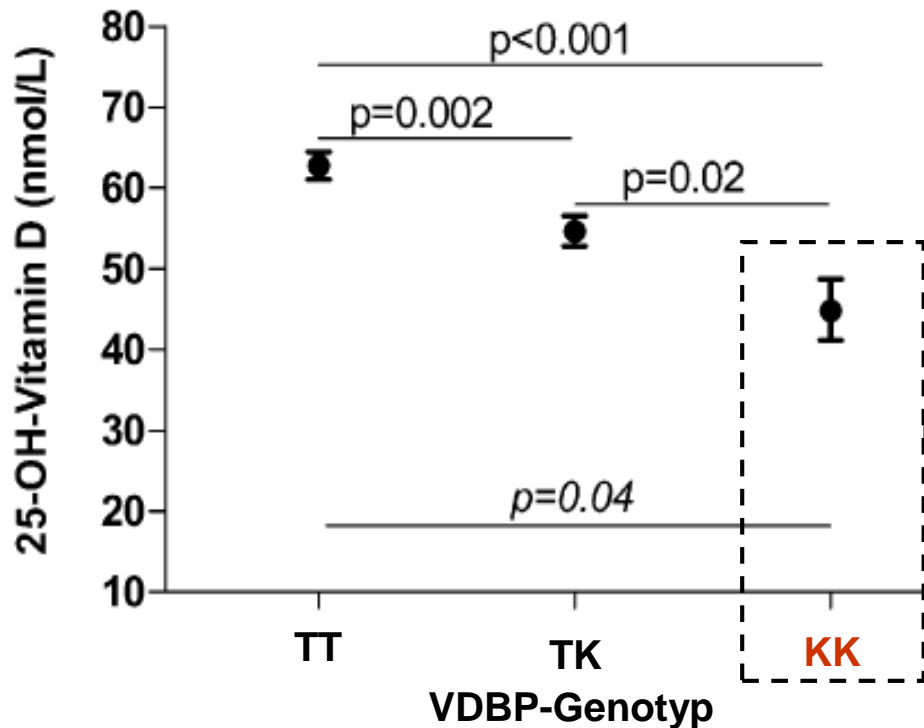
Der T420K-Polymorphismus im VDBP-Gen führt zu einem erniedrigten VDBP-Spiegel.



K - Lysin  
T - Threonin

Lauridsen et al. (2001): Mean serum concentration of vitamin D-binding protein is related to the Gc phenotype in women. Clin Chem 47(4):753

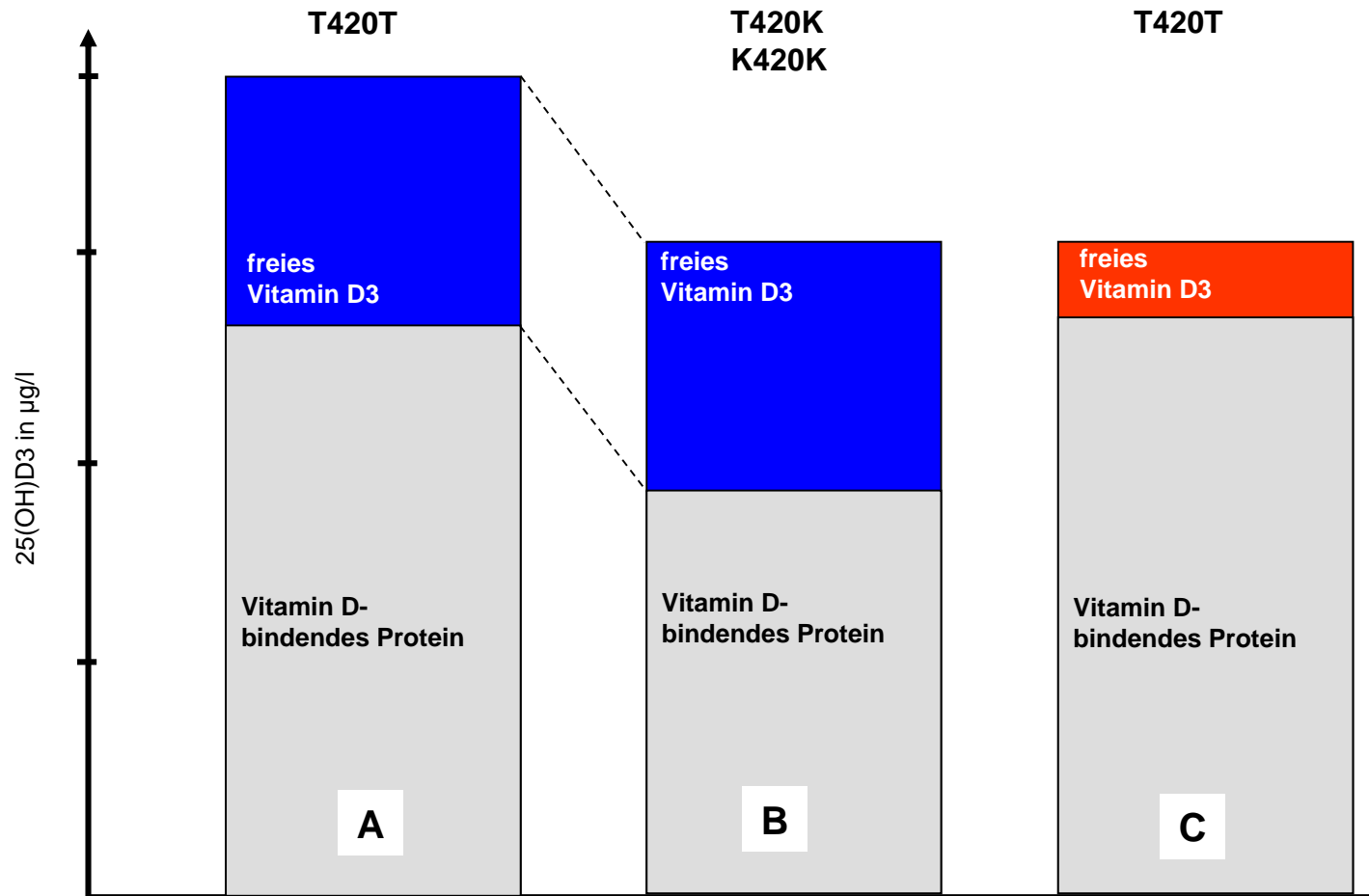
# Patienten mit T420K-Polymorphismus haben trotz niedriger 25-OH-Vitamin D-Spiegel keine klinischen Defektzeichen



- keine erhöhten PTH-Spiegel
- niedrigste Frequenz an premenopausalen Frakturen
- **Keine Zeichen eines Vitamin D-Mangels**

**Der T420K-Polymorphismus im VDBP-Gen ist signifikant assoziiert mit erniedrigten 25-OHD3-Spiegeln.**

Lauridsen et al. (2005): Calcif Tissue Int. 77(1):15-22.



25-Hydroxy-Vitamin-D i.S.

normal

vermindert

vermindert

Freies 25 (OH)-Vitamin D

normal

normal

vermindert

Substitution?

nein

nein

ja

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
25-Hydroxy-Vitamin-D i.S.	(ECLIA) 56	ng/ml	30 - 100
Freies 25 (OH)-Vitamin D	(ELISA) <b>2,22</b>	pg/ml	> 4.40
Vitamin-D-bindendes Protein i.S.	(ELISA) <b>743</b>	µg/ml	66 - 473

Nachweis eines erniedrigten freien Vitamin D , bedingt durch ein erhöhtes Vitamin-D-bindendes Protein bei normalem Gesamt-25-OH-Vitamin D3

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
25-Hydroxy-Vitamin-D i.S.	(ECLIA) 43	pg/ml	30 - 100
Freies 25 (OH)-Vitamin D	(ELISA) 7.75	pg/ml	> 4.40
Vitamin-D-bindendes Protein i.S.	(ELISA) <b>123</b>	µg/ml	66 - 473

Nachweis eines normalen freien Vitamin D trotz grenzwertigem Gesamt-25-OH-Vitamin D3, bedingt durch ein relativ niedriges Vitamin-D-bindendes Protein.

# Aber was ist hier los?

Ärztlicher Befundbericht



Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
25-Hydroxy-Vitamin-D i.S.	(ECLIA) 56	ng/ml	30 - 100
Freies 25 (OH)-Vitamin D	(ELISA) <b>2,22</b>	pg/ml	> 4.40
Vitamin-D-bindendes Protein i.S.	(ELISA) 454	µg/ml	66 - 473

Nachweis eines erniedrigten freien Vitamin D trotz normalem Gesamt-25-OH-Vitamin D3 und auch unauffälligem Vitamin-D-bindendem Protein

## Die direkte Messung des freien Vitamin D macht die aufwändige und fehleranfällige Berechnung überflüssig

	Comparison Group	Liver Disease	Pregnant Women	Normal Values
n	107	24	20	
Age, y	58 ± 16 <sup>a</sup>	57.1 ± 7.9	30.7 ± 6.9 <sup>c</sup>	
Calcium, mg/dL	9.5 ± 0.4	8.4 ± 0.5 <sup>~</sup>	9.1 ± 0.6 <sup>c</sup>	8.6–10.4
Calcium (corrected for albumin), g/dL	9.3 ± 0.4	9.5 ± 0.5	9.7 ± 0.5	8.6–10.4
DBP, µg/mL	218 ± 57	112.2 ± 64.0 <sup>c</sup>	460.3 ± 229.5 <sup>c</sup>	300–600
Total 25(OH)D, ng/mL	26.2 ± 11.4	14.0 ± 7.3 <sup>c</sup>	26.7 ± 10.0	25–80 <sup>d</sup>
Directly measured free 25(OH)D, pg/mL	4.5 ± 1.6	6.3 ± 3.2 <sup>c</sup>	4.0 ± 1.1	
Calculated free 25(OH)D, pg/mL <sup>e</sup>	7.6 ± 4.2	9.6 ± 4.9	5.7 ± 3.7	
Calculated free 25(OH)D, pg/mL <sup>f</sup>	7.7 ± 4.3	9.8 ± 5.1	5.8 ± 3.8	
iPTH, pg/mL	75.7 ± 39.2	51.1 ± 63.4	21.8 ± 18.0 <sup>c</sup>	14–72

**... Current algorithms to calculate free 25(OH)D may not be accurate. Further evaluation of directly measured free 25(OH)D levels to determine its role in research and clinical management of patients is needed.**

# Was zeigen unsere bisherigen Ergebnisse?

25-OH-Vitamin D: > 50 ng/ml

Freies Vitamin D in 100 % der Fälle normal

25-OH-Vitamin D: < 20 ng/ml

Freies Vitamin D in 100 % der Fälle erniedrigt

25-OH-Vitamin D: zwischen 20 und 30 ng/ml

Freies Vitamin erniedrigt **44%**

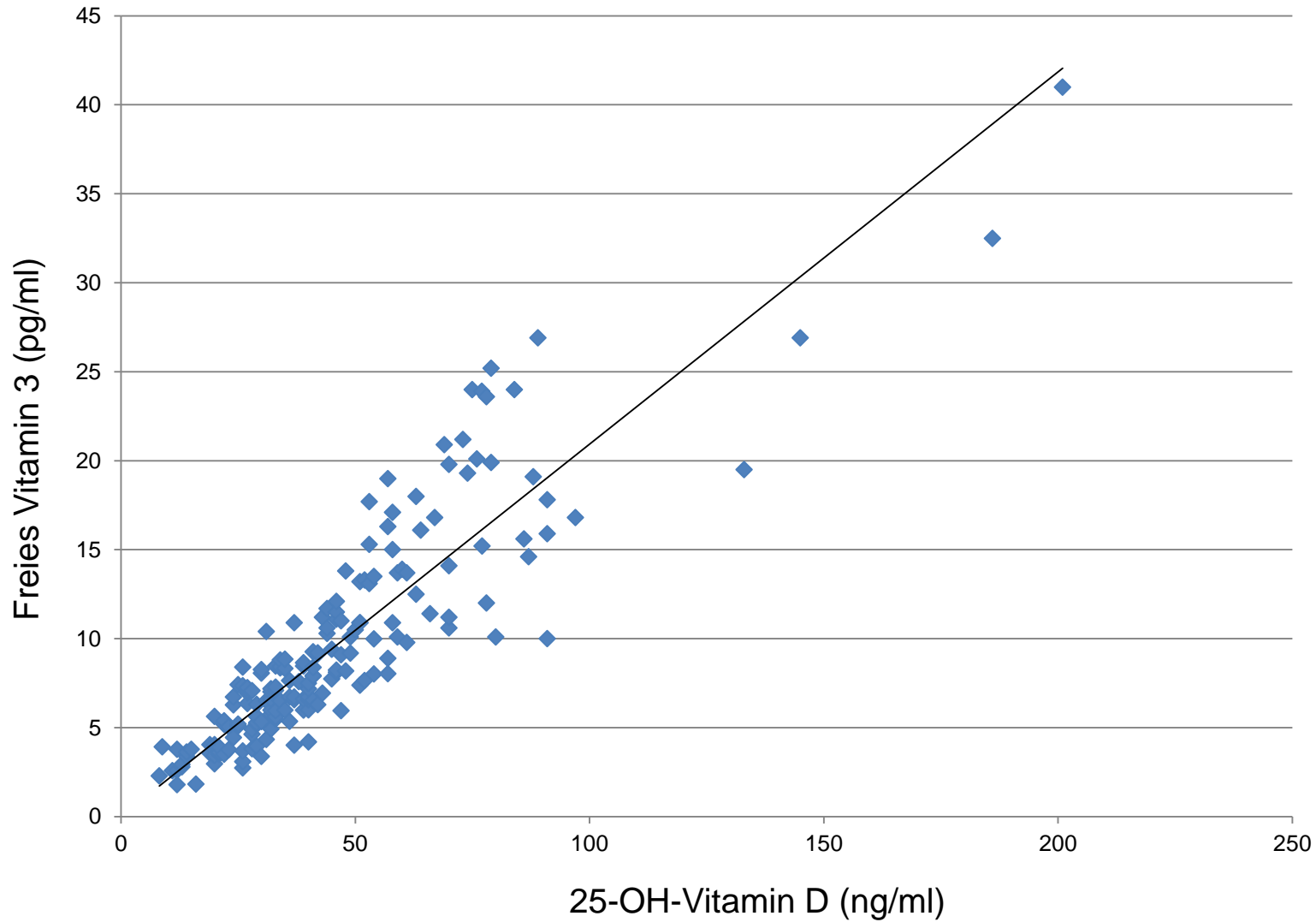
25-OH-Vitamin D: zwischen 30 und 40 ng/ml

Freies Vitamin erniedrigt **21%**

25-OH-Vitamin D: zwischen 40 und 50 ng/ml

Freies Vitamin erniedrigt **11%**

# Was zeigen unsere bisherigen Ergebnisse?



# Empfehlung Vitamin D-Versorgungsstatus

## Messung von freiem Vitamin D und 25-OH-Vitamin D

Alternativ: Messung von 25-OH-Vitamin D und bei Werten zwischen 30 und 60 ng/ml freies Vitamin D nachfordern

Normales freies Vitamin D → Keine Substitution

Niedriges freies Vitamin D → Substitution

Normales freies Vitamin D trotz erniedrigtem 25-OH-Vitamin D → ggf. Abklärung

## Bestimmung des Vitamin-D-bindenden Proteins

VDBP erhöht = Konstellation erklärbar → Abklärung Ursachen wie Hormontherapie etc.

VDBP nicht erhöht ?

## Nachweis des T420K-Polymorphismus

Bei nachweisbarem T420K- oder K420K-Allel = Konstellation erklärbar

→ Keine Substitution trotz erniedrigtem 25-OH-Vitamin D3

# Vitamin K(2)

Vitamin K1 = Phyllochinon, Vorkommen in grünem Gemüse

Vitamin K2 = Menachinon, Vorkommen in Fleisch und Käse,

Synthese durch die Darmflora (E.coli, L.acetophilus)

Vitamin-K ist essentiell für die Aktivierung von Proteinen, die mit  $\text{Ca}^{2+}$  interagieren

- Gerinnungsfaktoren -> Blutgerinnung
- Osteocalcin -> Knochenstoffwechsel
- Matrix-Gla -> Schutz vor Gefäßverkalkung

# Die Spiegelbestimmung von Vitamin K2 ist ungeeignet

Ärztlicher Befundbericht



Vitamin K1 i.S.° nüchtern: 0.13 - 1.19 µg/l	(HPLC)	1.01	µg/l	
Vitamin K2 (MK-4) i.S.°	(HPLC)	<b>0.06</b>	µg/l	0.10 - 0.86
Vitamin K2 (MK-7) i.S.°	(HPLC)	<b>0.01</b>	µg/l	0.10 - 0.82

Ärztlicher Befundbericht



Vitamin K1 i.S.° nüchtern: 0.13 - 1.19 µg/l	(HPLC)	<b>0,88</b>	µg/l	
Vitamin K2 (MK-4) i.S.°	(HPLC)	<b>0,34</b>	µg/l	0.10 - 0.86
Vitamin K2 (MK-7) i.S.°	(HPLC)	<b>0,21</b>	µg/l	0.10 - 0.82

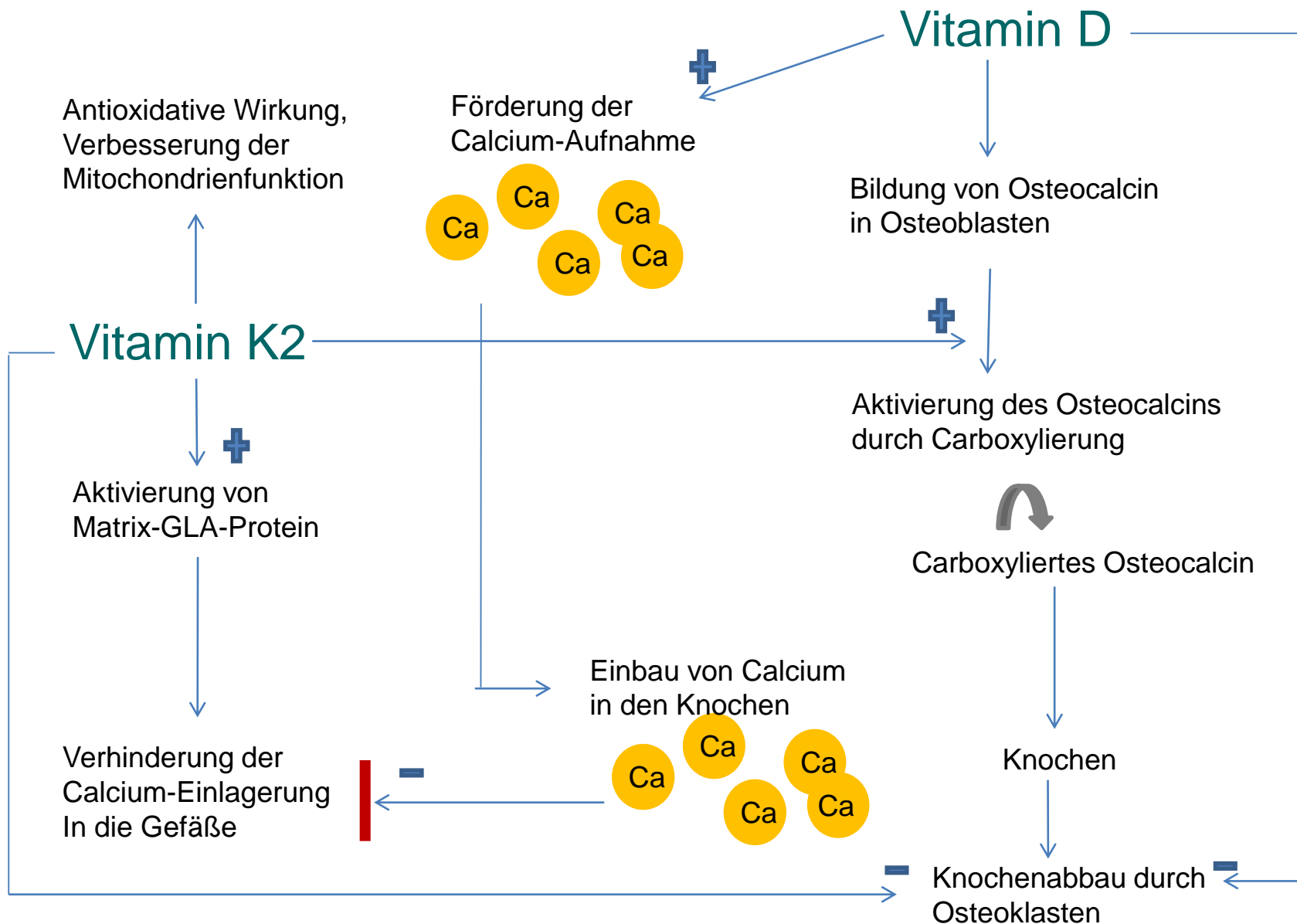
## Nachteile der Blutspiegelanalyse von Vitamin K2

Fettlösliches Vitamin ! - Blutspiegel erfasst nur die tagesaktuelle Zufuhr, nicht den Speicher im Gewebe

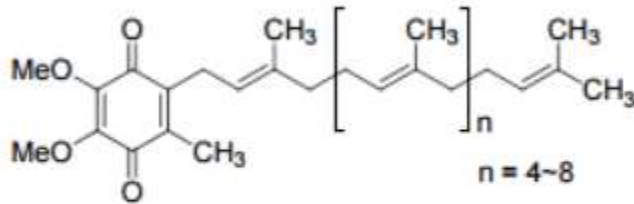
es werden in der Routine nur MK4 und MK7 gemessen.

Instabiles Molekül → schwierige Präanalytik, Das Blut muss in der Praxis zentrifugiert und eingefroren ins Labor gesendet werden.

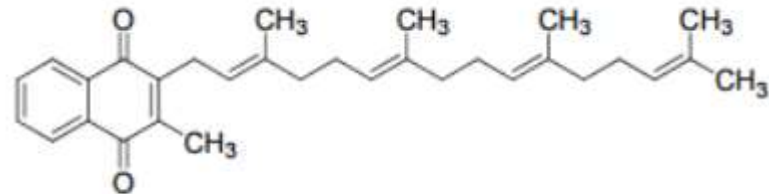
Starke Spiegelschwankungen wegen der kurzen biologischen Halbwertszeit von MK4 (1 h, MK7 ca. 72h).



## Vitamin K2 zeigt strukturelle und funktionelle Homologie zum Coenzym Q10



Ubiquinone (i.e. n = 8; Q<sub>10</sub>)



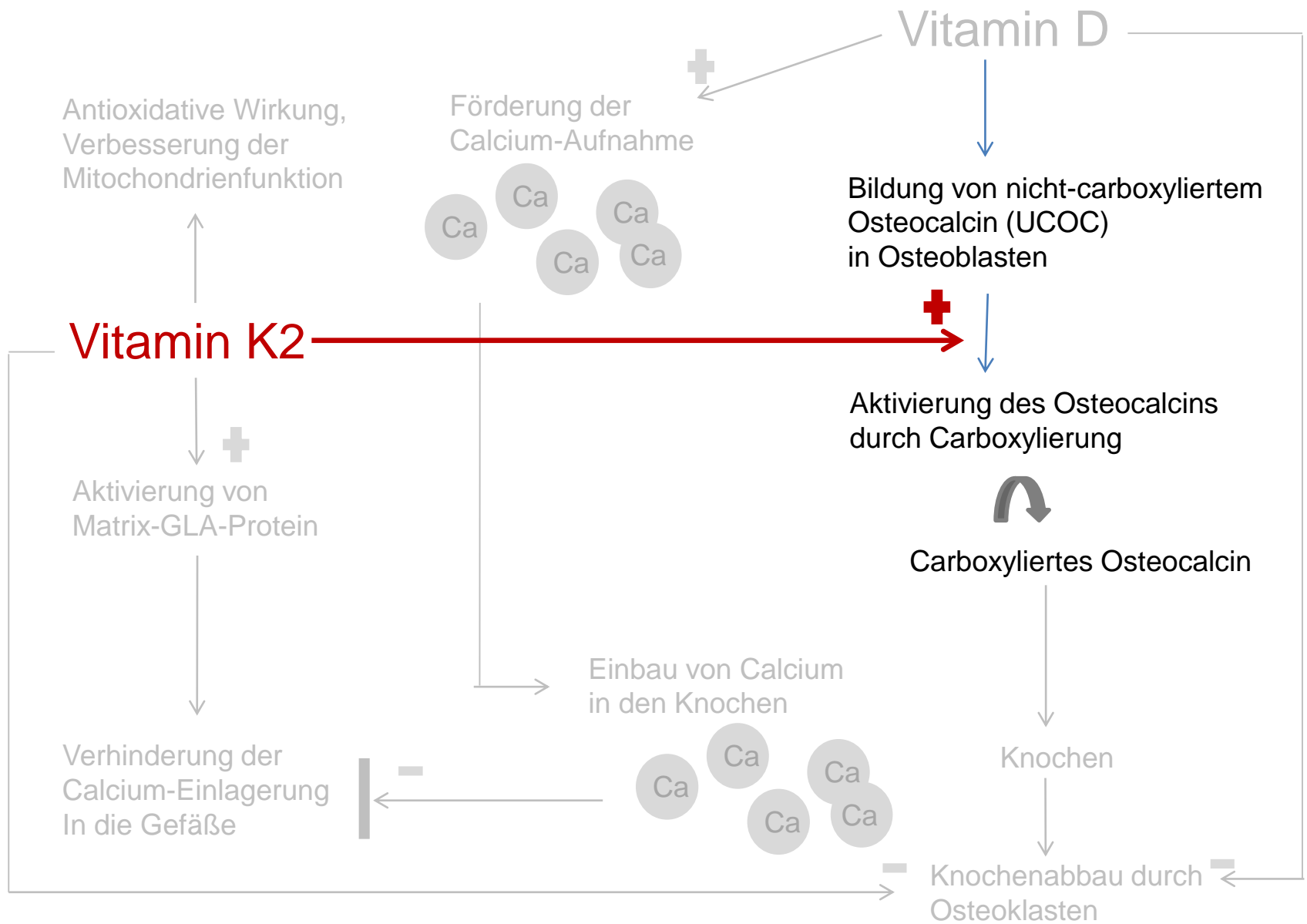
Vitamin K<sub>2</sub> (menatetrenone, MK-4)

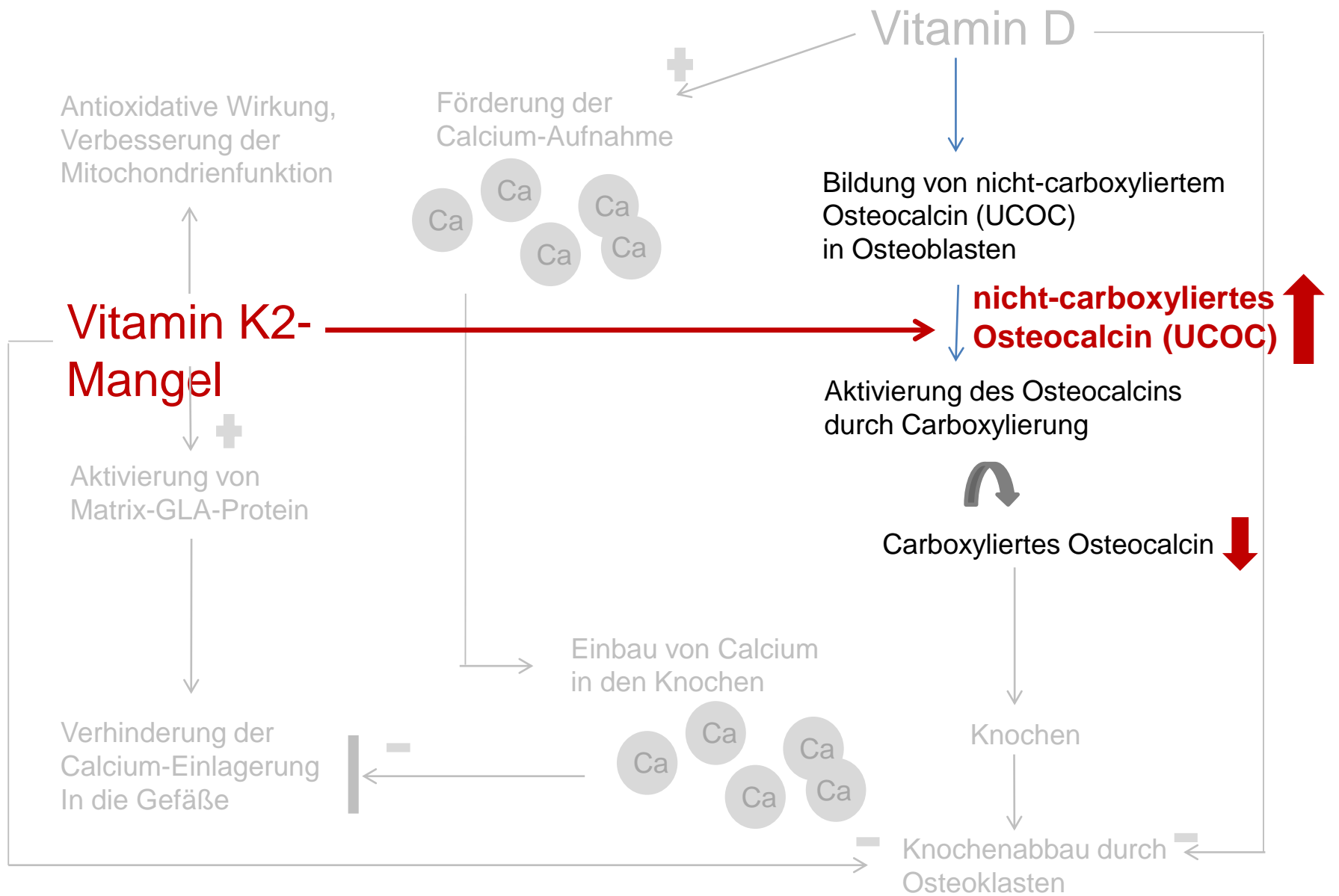
## Vitamin K2 hat eine essenzielle Funktion als Elektronentransporter in den Mitochondrien eukaryontischer Zellen

M. Vos et al. Vitamin K2 Is a Mitochondrial Electron Carrier That Rescues Pink1 Deficiency. *Science*. 336, 2012, S. 1306–1310

## Vitamin K2-Substitution verbessert die Herzfunktion

McFarlin BK Oral Consumption of Vitamin K2 for 8 Weeks Associated With Increased Maximal Cardiac Output During Exercise. *Altern Ther Health Med*. 2017;23:26-32



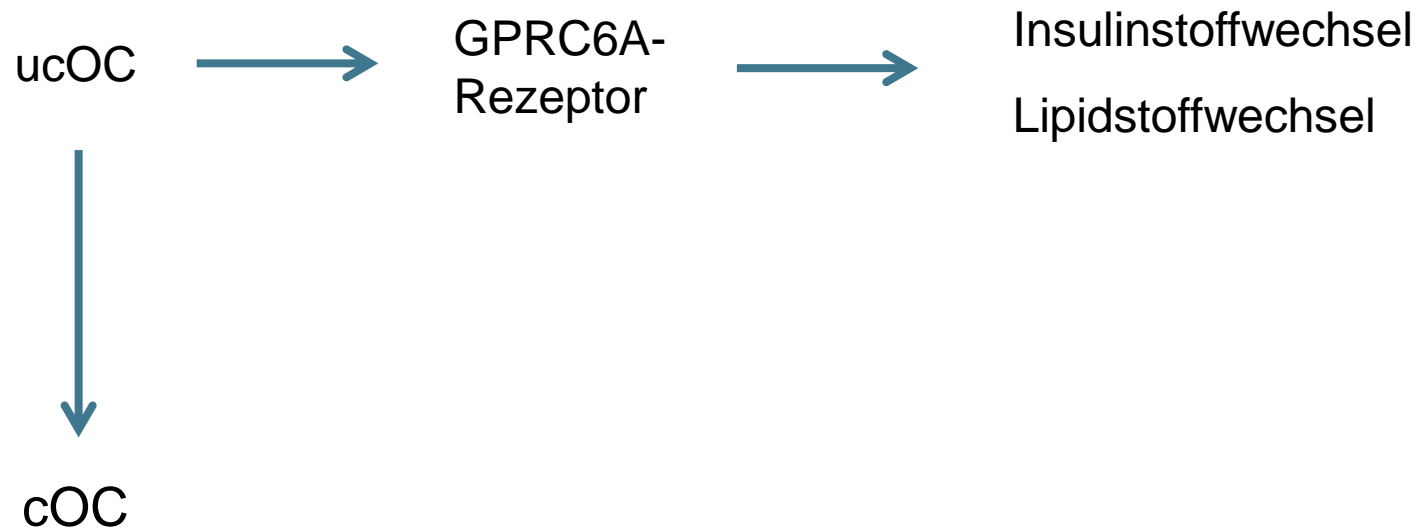


# Die Aussagekraft von untercarboxyliertem Osteocalcin ist in Studien nachgewiesen

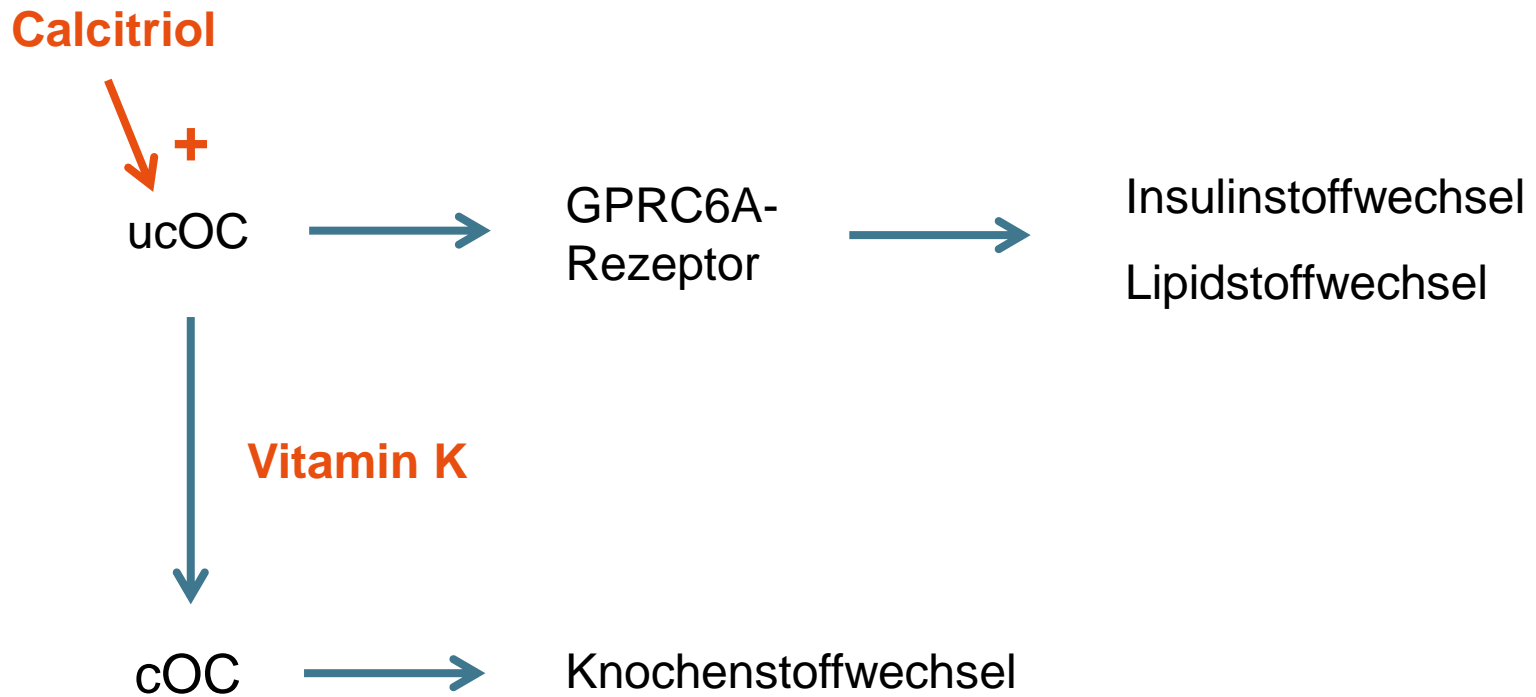
Untercarboxyliertes Osteocalcin korreliert mit geringer Knochendichte und erhöhtem Frakturrisiko

Suzuki Y. Exp Ther Med. 2017;13: 1937–1943.

# ucOC hat eigene physiologische Funktionen



# Knochen als endokrines Organ, unter Einfluss von Vitamin D und K?



# Zusammenfassung

## Vitamin D

- Zur Statusbestimmung sollte das freie Vitamin D bestimmt werden.

Cave: obligat im 25-OH-Vitamin D-Bereich zwischen 30 und 45 ng/ml

- Bei auffälligen Befundkonstellationen können das Vitamin-D-bindende Protein (VDBP) und der genetische Nachweis des T420K-Polymorphismus hilfreich sein

## Vitamin K2

- Undercarboxyliertes Osteocalcin ist ein Biomarker der Vitamin K2-Aktivität- und der Bioverfügbarkeit im Organismus
- Die Vitamin K2- Spiegelbestimmung im Blut ist zur Statusanalyse ungeeignet