

Experimentelle Studien zum Einfluss von Vitamin D und Phosphor auf das kardiovaskuläre System im Mausmodell

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Ernährungswissenschaften (Dr. troph.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Agrar- und Ernährungswissenschaften,
Geowissenschaften und Informatik



der

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Frau Sarah Maria Grundmann
M. Sc. Ernährungswissenschaften
geboren am 30.09.1988 in Wiesbaden

Gutachter/in: Prof. Dr. Gabriele I. Stangl
Prof. Dr. Stefan Lorkowski

Verteidigung: 08. Juli 2019

'Life can multiply until all the phosphorus has gone and then there is an
inexorable halt which nothing can prevent' – Isaac Asimov, 1974

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	13
2.1 Studie I – Charakterisierung der Herzfunktion bei Vitamin D Rezeptor Defizienz	13
2.1.1 Studiendesign und Versuchsdiäten	13
2.1.2 Bestimmung der Bruttoenergie in den Versuchsdiäten	16
2.1.3 Blutdruckmessung und transthorakale Echokardiographie	16
2.1.4 Probenentnahme	18
2.1.5 Serumparameter	18
2.1.6 Histomorphologische Charakterisierung	20
2.1.6.1 Von Kossa Silberfärbung	20
2.1.6.2 Aufnahme und Auswertung der histologischen Färbung	21
2.1.7 Statistische Auswertung	21
2.2 Studie II – Einfluss von Phosphor und Vitamin D auf die Atherogenese	22
2.2.1 Studiendesign und Versuchsdiäten	22
2.2.2 Probenentnahme	25
2.2.3 Serumparameter	25
2.2.4 Histomorphologische Charakterisierung	26
2.2.4.1 Lipidfärbung der en face eröffneten Aorten	26
2.2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Aortenklappe	26
2.2.4.3 Lipidfärbung der Aortenklappe	27
2.2.4.4 Von Kossa Silberfärbung der Aortenklappe	27
2.2.4.5 Aufnahme und Auswertung der histologischen Färbungen	27

2.2.5	Analysen im Herzmuskelhomogenat.....	28
2.2.5.1	Erstellen des Proteinlysats.....	28
2.2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	28
2.2.5.3	Bestimmung der IGF1 Konzentration.....	28
2.2.5.4	Analyse mittels Western Blot.....	30
2.2.6	Analysen des Lebergewebes.....	32
2.2.6.1	Durchführung der Lipidextraktion.....	32
2.2.6.2	Bestimmung des Gesamtlipidanteils.....	32
2.2.6.3	Bestimmung der Triacylglycerol- und Cholesterolkonzentration im Leberlipidextrakt.....	32
2.2.7	Statistische Auswertung.....	33
3	Ergebnisse.....	35
3.1	<i>Studie I - Charakterisierung der Herzfunktion bei Vitamin D Rezeptor Defizienz.....</i>	35
3.1.1	Körperwachstum und Futteraufnahme.....	35
3.1.2	Ausgewählte Serumparameter der Calcium- und Phosphor- homöostase.....	36
3.1.3	Serumparameter Renin und BNP, sowie systolischer Blutdruck und Pulsfrequenz.....	38
3.1.4	Herzmorphologie und –funktion.....	39
3.1.5	Kalzifizierungen der Aortenklappe.....	41
3.2	<i>Studie II - Einfluss von Vitamin D und Phosphor auf die Atherogenese.....</i>	42
3.2.1	Futter-, Energieaufnahme und Entwicklung der Körpermasse.....	42
3.2.2	Ausgewählte Serumparameter der Calcium- und Phosphorhomöostase.....	43
3.2.3	Ausgewählte Parameter des Lipidstoffwechsels.....	45
3.2.4	Atherosklerotische Läsionen in der Aorta und Aortenklappe.....	46
3.2.5	Kalzifizierungen der Aortenklappe.....	49
3.2.6	Herzmorphologie.....	50
3.2.7	Ausgewählte Parameter des Glucosestoffwechsels.....	51

3.2.8	Proteinexpression ausgewählter Proteine der Insulin-IGF1-Kaskade im Herzgewebe	53
4	Diskussion.....	56
4.1	Studie I - Charakterisierung der Herzfunktion bei Vitamin D-Rezeptor-Defizienz	56
4.1.1	Phänotypische Ausprägungen des Vitamin D Rezeptor <i>knockouts</i>	56
4.1.2	Einfluss des Vitamin D Rezeptor Defizites auf den Blutdruck	57
4.1.3	Einfluss des Vitamin D Rezeptor Defizites auf die Herzmorphologie	60
4.1.4	Einfluss des Vitamin D Rezeptor Defizites auf die Herzfunktion	61
4.2	Studie II - Einfluss von Phosphor und Vitamin D auf die Herzmorphologie und Atherogenese.....	63
4.2.1	Einfluss einer exzessiven, alimentären Phosphorzufuhr auf Parameter der Calcium- und Phosphorhomöostase	63
4.2.2	Einfluss einer exzessiven, alimentären Phosphorzufuhr auf die Herzgröße unter Beteiligung der Insulin/IGF1-Kascade	65
4.2.3	Einfluss einer exzessiven, alimentären Phosphorzufuhr auf Insulin und IGF1	68
4.2.1	Einfluss einer exzessiven, alimentären Phosphorzufuhr auf die Kalzifizierung der Aortenklappe	69
4.2.1	Einfluss einer exzessiven, alimentären Phosphorzufuhr auf die Atherogenese	69
4.2.2	Wechselwirkungen zwischen alimentär zugeführtem Phosphor und Vitamin D	72
4.2.1	Einfluss einer alimentären Vitamin D Depletion	73
4.3	Mögliche Abhängigkeit des Phosphoreffektes vom Calciumgehalt der Diät.....	74
4.4	Schlussfolgerung.....	75
5	Zusammenfassung	80
	Summary	82
6	Literaturverzeichnis.....	84

Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) ₂ D	1α,25-Dihydroxycholecalciferol
25(OH)D	25-Hydroxycholecalciferol
Akt1	Proteinkinase B alpha
ApoE ^{-/-}	Apolipoprotein E <i>knockout</i>
<i>aqua dest</i>	destilliertes Wasser
Asc Ao V	Pulswellengeschwindigkeit aufsteigende Aorta
BMP2	Knochenmorphogenetisches Protein 2, <i>bone morphogenetic protein 2</i>
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid, <i>brain natriuretic peptide</i>
CKD	chronische Niereninsuffizienz, <i>chronic kidney disease</i>
d	Diastole
Desc Ao V	Pulswellengeschwindigkeit absteigende Aorta
EF	Ejektionsfraktion, <i>ejection fraction</i>
FGF23	Fibroblasten Wachstumsfaktor 23, <i>fibroblast growth factor 23</i>
FS	Verkürzungsfraction, <i>fractional shortening</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GH	Wachstumshormon, <i>growth hormon</i>
HbA1c	Hämoglobin A1c
HG/KG	Herz-zu-Körpergewicht-Verhältnis
HG/TL	Herzgewicht-zu-Tibialängen-Verhältnis
HMG CoA	Hydroxymethylglutaryl Coenzym A
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
iFGF23	intaktes FGF23
IGF1	insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1, <i>insulin-like growth factor 1</i>
IGF1R	IGF1 Rezeptor

Abkürzungsverzeichnis

iPTH	intaktes PTH
IR	Insulinrezeptor
IVS	interventrikuläre Septumdicke
LDL	Lipoprotein niederer Dichte, <i>low density lipoprotein</i>
Ldlr ^{-/-}	LDL Rezeptor <i>knockout</i>
LG/TL	Lungengewicht-zu-Tibialängen-Verhältnis
LV	linksventrikulär
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
LVID	linksventrikulärer Innendurchmesser
LVPW	linksventrikuläre posteriore Wanddicke
LVWT	linksventrikuläre Wandverdickung, <i>left ventricular wall thickening</i>
MW	Mittelwert
pAkt1	phosphoryliertes Akt1
PBS	Phosphat-gepufferter Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyde
pIGF1R	phosphorylierter IGF1R
pIR	phosphorylierter IR
PTH	Parathormon
PTHR	PTH Rezeptor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
s	Systole
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
STABW	Standardabweichung
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
Vdr	Vitamin D Rezeptor
Vdr ^{-/-}	Vdr <i>knockout</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation, <i>World Health Organisation</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Anzahl der Sterbefälle in Deutschland in den Jahren 2013-2015 gegliedert nach Todesursache. (Statistisches Bundesamt und Statista 2018).....	1
Abbildung 2:	Die PTH-Vitamin D-FGF23-Achse.....	8
Abbildung 3:	Schema zum Versuchsaufbau der Langzeitstudie I.....	13
Abbildung 4:	Schema zur Durchführung der manometrischen Blutdruckmessung mittels <i>tail cuff</i>	17
Abbildung 5:	Schema zum Versuchsaufbau von Langzeitstudie II	22
Abbildung 6:	Körpermassenentwicklung 8 Wochen alter männlicher Vitamin D Rezeptor <i>knockout</i> ($Vdr^{-/-}$) und $Vdr^{+/+}$ Mäuse über die Studiendauer von 26 Wochen.....	35
Abbildung 7:	Serumkonzentrationen von (A) ionischem Calcium, (B) anorganischem Phosphat, (C) intaktem Parathormon (iPTH) und (D) intaktem Fibroblasten Wachstumsfaktor 23 (iFGF23) 34 Wochen alter männlicher Vitamin D Rezeptor <i>knockout</i> ($Vdr^{-/-}$) und $Vdr^{+/+}$ Mäuse am Ende der Studiendauer von 26 Wochen.....	37
Abbildung 8:	(A) Reninkonzentration und (B) klassierte Konzentration des B-natriuretisches Peptids (BNP) im Serum 34 Wochen alter männlicher Vitamin D Rezeptor <i>knockout</i> ($Vdr^{-/-}$) und $Vdr^{+/+}$ Mäuse am Ende der Studiendauer von 26 Wochen, sowie deren (D) Pulsfrequenz und (D) systolischer Blutdruck (RR_{sys}) im Alter von 28 Wochen.....	38
Abbildung 9:	(A) Kalzifizierungsanteil der Aortenklappen, sowie (B) repräsentative Bilder der histologischen Präparate der Aortenklappen, die mittels von Kossa Silberfärbung gefärbt wurden, 34 Wochen alter männlicher Vitamin D Rezeptor <i>knockout</i> ($Vdr^{-/-}$) und $Vdr^{+/+}$ Mäuse am Ende der Studiendauer von 26 Wochen.....	41
Abbildung 10:	Entwicklung der Körpermasse 9 Wochen alter <i>low density lipoprotein receptor knockout</i> ($Ldlr^{-/-}$) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer <i>Western Diet</i> mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.....	42

- Abbildung 11: Serumkonzentrationen ausgewählter Parameter der Calcium- und Phosphorhomöostase 25 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout* (Ldlr^{-/-}) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.44
- Abbildung 12: 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)₂D₃) Konzentration im Serum 25 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout* (Ldlr^{-/-}) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.45
- Abbildung 13: Atherosklerotische Läsionen 25 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout* (Ldlr^{-/-}) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.....48
- Abbildung 14: Kalzifizierungsanteil der Aortenklappen 25 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout* (Ldlr^{-/-}) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.49
- Abbildung 15: Serumkonzentration an Bone morphogenetic protein 2 (BMP2) 25 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout* (Ldlr^{-/-}) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.50
- Abbildung 16: Parameter der Herzdimensionen 25 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout* (Ldlr^{-/-}) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.51

Abbildung 17:	Serumkonzentrationen ausgewählter Parameter des Glucosestoffwechsels 25 Wochen alter <i>low density lipoprotein receptor knockout</i> (Ldlr ^{-/-}) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer <i>Western Diet</i> mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.....	52
Abbildung 18:	Relative Proteinexpression ausgewählter Proteine der Insulinkaskade 25 Wochen alter <i>low density lipoprotein receptor knockout</i> (Ldlr ^{-/-}) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer <i>Western Diet</i> mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.....	54
Abbildung 19:	Konzentration des Insulinähnliche Wachstumsfaktoren 1 (IGF1) im Herzgewebe 25 Wochen alter <i>low density lipoprotein receptor knockout</i> (Ldlr ^{-/-}) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer <i>Western Diet</i> mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3%) oder exzessiven (1,5%) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.....	55
Abbildung 20:	Kardiale Effekte von Insulin	66
Abbildung 21:	Mögliche mechanistische Zusammenhänge zum Einfluss einer exzessiven Phosphoraufnahme auf das Herzgewicht, die Atherosklerose und die Kalzifizierung der Vaskulatur.	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht der Diätkomponenten der Versuchsdiät in Studie I	14
Tabelle 2:	Zusammensetzung des Mineralstoff-Vitamin-Mixes der Versuchsdiät in Studie I.....	15
Tabelle 3:	Übersicht über die in Studie I und II bestimmten Serumparameter und der verwendeten Testkits.	19
Tabelle 4:	Übersicht der Diätkomponenten der Versuchsdiät aus Studie II.....	23
Tabelle 5:	Zusammensetzung des Mineralstoff-Vitamin-Mixes der Versuchsdiät in Studie II.....	24
Tabelle 6:	Übersicht der in Studie II verwendeten Antikörper zur Detektion der Proteinexpression mittels <i>Western Blots</i>	29
Tabelle 7:	Zusammensetzung des 10 %igen SDS-Gels	30
Tabelle 8:	Übersicht über die in Studie II verwendeten Puffer in der <i>Western Blot</i> Detektion.....	31
Tabelle 9:	Mittlere Futter- und Energieaufnahme 34 Wochen alter männlicher Vitamin D Rezeptor <i>knockout</i> ($Vdr^{-/-}$) und $Vdr^{+/+}$ Mäuse am Ende der Studiendauer von 26 Wochen.....	36
Tabelle 10:	Normalisiertes Herz- und Lungengewicht 34 Wochen alter männlicher Vitamin D Rezeptor <i>knockout</i> ($Vdr^{-/-}$) und $Vdr^{+/+}$ Mäuse am Ende der Studiendauer von 26 Wochen, sowie echokardiographische Parameter der Herzdimensionen und der Herzfunktion im Alter von 30 Wochen.	40
Tabelle 11:	Mittlere Futteraufnahme 9 Wochen alter <i>low density lipoprotein receptor knockout</i> ($Ldlr^{-/-}$) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer <i>Western Diet</i> mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.....	43
Tabelle 12:	Parameter des Lipidstoffwechsels in der Leber 25 Wochen alter <i>low density lipoprotein receptor knockout</i> ($Ldlr^{-/-}$) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer <i>Western Diet</i> mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.	46

Tabelle 13: Proteinexpression ausgewählter Proteine der Insulinkaskade
25 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout*
(Ldlr^{-/-}) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer
Western Diet mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder
defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit
adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen
Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen..... 53

1 Einleitung

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems sind in den westlichen Industrienationen die häufigste Todesursache. Zahlen des statistischen Bundesamtes zeigen, dass in Deutschland rund 39 % der Todesursachen auf Krankheiten des Kreislaufsystems (ICD 10 I00-I99) zurückzuführen sind (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2017). Ähnliche Zahlen gelten für die Europäische Union (36 %) (Eurostat 2018) und die Vereinigten Staaten von Amerika (35 %) (Kochanek et al. 2017). Weltweit führt die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) 31% der Tode auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen zurück (World Health Organisation 2017).

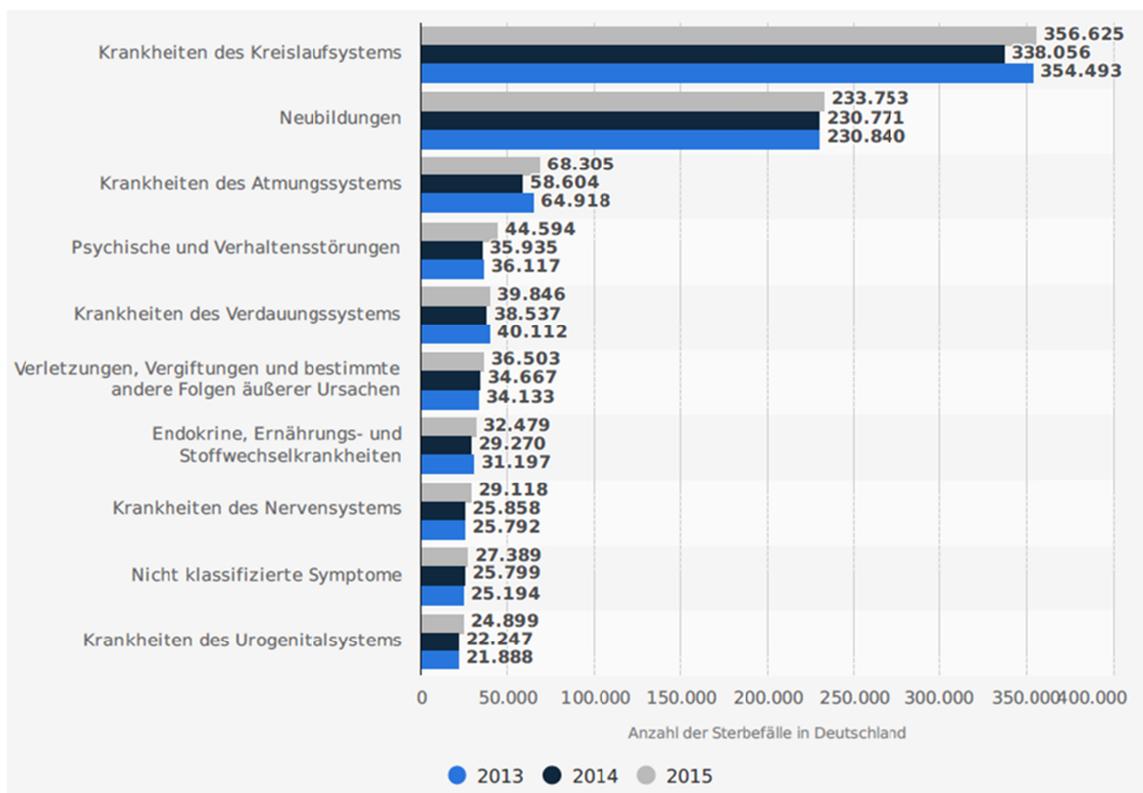


Abbildung 1: Anzahl der Sterbefälle in Deutschland in den Jahren 2013-2015 gegliedert nach Todesursache. (Statistisches Bundesamt und Statista 2018)

Neben den nicht beeinflussbaren Risikofaktoren Alter, Geschlecht und familiäre Vorbelastung, zählen vorrangig Rauchen, Adipositas, Hypercholesterinämie und Hypertonie zu den klassischen Risikofaktoren (He et al. 2001). Experimentelle und epidemiologische Studien am Menschen legen nahe, dass auch Vitamin D einen wichtigen Einfluss auf die kardiovaskuläre Gesundheit

besitzt. Aktuell stehen vor allem Daten aus epidemiologischen Studien zur Verfügung, die allerdings ein sehr inhomogenes Bild präsentieren. Metaanalysen haben gezeigt, dass ein niedriger 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)D) Spiegel mit einer höheren kardiovaskulären Mortalität assoziiert ist (Chowdhury et al. 2014; Schöttker et al. 2014). Kohortenstudien zeigten, dass beim Vergleich von Probanden mit einem ausgeprägten Vitamin D Mangel mit optimal versorgten Probanden das Mangelkollektiv ein höheres Risiko für einen Myokardinfarkt, einen Schlaganfall (Kühn et al. 2013) oder eine Herzinsuffizienz aufwies (Ford et al. 2014). Bei der Analyse des Gesamtkollektivs konnte jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Plasmakonzentration an 25(OH)D und kardiovaskulären Erkrankungen nachgewiesen werden. Eine Analyse der Daten aus der *Framingham Offspring* Studie zeigte, dass Probanden mittleren Alters ohne vorangegangene kardiovaskuläre Erkrankungen ein höheres Risiko für das Auftreten eines kardiovaskulären Ereignisses innerhalb von fünf Jahren aufweisen, wenn sie einen 25(OH)D Spiegel von $< 37,5$ nmol/l aufwiesen (Wang et al. 2008). Eine Metaanalyse randomisiert kontrollierter Studien zu den Effekten einer Vitamin D Supplementierung (gekoppelt mit oder ohne Calcium Gabe) auf die Inzidenz von Myokardinfarkten, Schlaganfällen, Krebs, Gesamtrfrakturen, Schenkelhalsfrakturen und Mortalität von Bolland et al. 2014a zeigte, laut Definition der Autoren, keine kardioprotektive Wirkung von Vitamin D. Aufgrund der von den Autoren konservativ gewählten Grenze für eine Risikoreduktion wird die Studie sehr kontrovers diskutiert, zeigt allerdings wie inhomogen die Datenlage im Bereich der Vitamin D Forschung und im Besonderen im Bereich der kardiovaskulären Gesundheit ist (Bolland et al. 2014b). Eine jüngst veröffentlichte Studie zum Einfluss einer Vitamin D Supplementierung auf das kardiovaskuläre Risiko zeigte ebenfalls keine kardioprotektive Wirkung (Manson et al. 2019). Zu dem fällt eine Beurteilung der kardioprotektiven Wirkung von Vitamin D schwer, da es nur eine geringe Anzahl randomisierter Interventionsstudien gibt. Zusätzlich ist es problematisch aus den bisher gewonnenen Daten einen alleinigen Vitamin D Effekt zu extrahieren. Oftmals geht ein guter Vitamin D Status mit dem Aufenthalt im Freien einher, dieser ist wiederum häufig mit einer körperlichen Aktivität verbunden, von der bekannt ist, dass sie das kardiovaskuläre Risiko senkt (Bijnen et al. 1998; Brock et al.

2010). Erschwerend kommt hinzu, dass Sonnenlicht möglicherweise eine von Vitamin D unabhängig blutdrucksenkende Wirkung besitzt (Liu et al. 2014; Rostand et al. 2016). Bisherige Assoziationen sind daher möglicherweise nicht auf einen alleinigen Vitamin D Effekt zurückzuführen. Des Weiteren ist die heterogene Datenlagen auch dem geschuldet, dass es große Diskrepanzen hinsichtlich der Stichprobengröße, der eingesetzten Vitamin D Dosen und der Ausgangsmerkmale der Probanden gibt (Jeong et al. 2017). Darüber hinaus stammen viele Erkenntnisse zum Zusammenhang eines Vitamin D Mangels und dem erhöhten Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen aus Studien mit Probanden mit chronischer Niereninsuffizienz (*chronic kidney disease*, CKD). Im Verlauf der CKD kommt es in den häufigsten Fällen zu einem starken Vitamin D Mangel (Kim und Kim 2014; Ngai et al. 2014). Vitamin D, auch Cholecalciferol genannt, muss vom Organismus zuerst in seine bioaktive Form $1\alpha,25\text{-Dihydroxycholecalciferol}$ ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$, Calcitriol) umgewandelt werden. Dies geschieht über zwei Hydroxylierungsschritte in Leber und Niere. In der Leber erfolgt die Hydroxylierung zu $25(\text{OH})\text{D}$ (Calcidiol) mittels Vitamin D-25-Hydroxylasen (z. B. CYP2R1) (Cheng et al. 2004). Von der mischfunktionelle Monooxygenase 1α -Hydroxylase (CYP27B1) wird es anschließend in der Niere zu Calcitriol umgesetzt. Bei CKD ist die Hydroxylierung in der Niere gestört, es fehlt die bioaktive Form Calcitriol. Zusätzlich weisen viele CKD Patienten einen $25(\text{OH})\text{D}$ Spiegel unter $< 75 \text{ nmol/l}$ auf (Kim und Kim 2014; Ngai et al. 2014). Laut dem *Institute of Medicine* ist eine Serumkonzentration von 50 nmol/l $25(\text{OH})\text{D}$ für die Allgemeinbevölkerung erstrebenswert (Ross et al. 2011). Die *International Osteoporosis Foundation* fordert allerdings eine Konzentration von 75 nmol/l , um eine optimale Knochengesundheit, auch im hohen Alter, gewährleisten zu können (Bischoff-Ferrari et al. 2006; Dawson-Hughes et al. 2010). Die hohe Prävalenz des Vitamin D Mangels bei CKD ist zum Teil der gestörten Vitamin D Synthese in der Haut, Störungen des Vitamin D Metabolismus in der Niere, sowie dem erhöhten Verlust an Vitamin D Metaboliten im Urin geschuldet (Sato et al. 1982; Jacob et al. 1984; Takemoto et al. 2003).

Nicht nur CKD Patienten weisen oftmals einen Vitamin D Mangel auf. Auch in der allgemeinen Bevölkerung ist ein Mangel weit verbreitet. Es wird geschätzt, dass etwa ein Drittel der Weltbevölkerungen einen $25(\text{OH})\text{D}$ Spiegel unterhalb

von 50 nmol/l aufweisen (Hilger et al. 2014). In Europa liegt der 25(OH)D Spiegel im Mittel bei nur 45 nmol/l (World Health Organisation 2008). Daten der EPIC-Deutschland Kohorte verdeutlichen, dass fast 60 % der 35- bis 64-Jährigen Studienteilnehmer einen 25(OH)D Spiegel unter 50 nmol/l aufweisen. Da der Vitamin D Status zudem noch einer starken saisonalen Abhängigkeit unterliegt, sind im Winterhalbjahr besonders viele Personen von einer unzureichenden Vitamin D Versorgung betroffen (Kühn et al. 2014).

Eine Vitamin D Bedarfsdeckung ist durch alimentäre Zufuhr kaum zu erreichen. Laut der Nationalen Verzehrsstudie II macht die Aufnahme von Vitamin D aus Lebensmitteln etwa einen Anteil von 13 % der Zufuhrempfehlung von 20 µg/Tag aus (Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel 2008; Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) et al. 2015). Als Vitamin D reiche Lebensmittel gelten vor allem Fische und Pilze (Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) 2011). Es können zwei Formen von Vitamin D unterschieden werden: das tierische Vitamin D₃ (Windaus et al. 1936) und das von Pilzen stammendem Vitamin D₂ (Askew et al. 1930). Vitamin D₂, auch Ergocalciferol genannt, unterliegt prinzipiell dem gleichen Stoffwechsel wie Vitamin D₃ (Tripkovic et al. 2012). Eine weitere Vitamin D₃ Quelle stellt die Eigensynthese in der Haut dar. Es kann unter dem Einfluss solarer Ultraviolet-B-Strahlung (290-315 nm) in der Epidermis aus 7-Dehydrocholesterol synthetisiert werden. Die Wirkung von 1,25(OH)₂D wird durch Bindung an den Vitamin D Rezeptor (Vdr) vermittelt. Der Vdr wird in vielen Geweben exprimiert. Vorwiegend in Geweben, die an der Regulation der Calcium- und Phosphorhomöostase beteiligt sind. Studien der letzten Dekaden haben jedoch deutlich gemacht, dass der Vdr auch in einer Vielzahl anderer Gewebe exprimiert wird. Dazu zählen unter anderem das Gehirn (Eyles et al. 2005), das Endothel (Merke et al. 1989; Ni et al. 2014), glatte Gefäßmuskelzellen (Cardús et al. 2006) und Kardiomyozyten (Tishkoff et al. 2008a). Auch konnte gezeigt werden, dass glatte Gefäßmuskelzellen die 1α-Hydroxylase exprimieren und so in der Lage sind eigenständig die bioaktive Form 1,25(OH)₂D zu bilden (Somjen et al. 2005; Chanakul et al. 2013). In den Kardiomyozyten konnte zwar die mRNA der 1α-Hydroxylase nachgewiesen werden, jedoch keine Proteinexpression (Anderson et al. 2008).

Es wird vermutet, dass einige Effekte der kardialen Vitamin D Wirkung auf eine Beteiligung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) zurückzuführen sind (Resnick et al. 1986; Burgess et al. 1990). 1,25(OH)₂D fungiert als ein negativer Regulator des RAAS. Das RAAS ist einer der Hauptregulatoren des Blutdrucks. Hinsichtlich der Wirkung von Vitamin D auf den Blutdruck existieren sehr widersprüchliche Daten (Beveridge et al. 2015). So zeigen einige Studien, dass eine Hypertonie durch Vitamin D Supplementation reduziert werden kann (Toxqui et al. 2013; Carrara et al. 2014; Dalbeni et al. 2014). Während andere Studien keinen positiven Einfluss einer Vitamin D Supplementation feststellten (Sollid et al. 2014; Strobel et al. 2014; Witham et al. 2014; Tomson et al. 2017). Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2017 kommt zu dem Schluss, dass eine Vitamin D Supplementation zur Behandlung eines Bluthochdrucks nicht generalisiert empfohlen werden kann (Jeong et al. 2017). Angesichts dieser Befunde und der inhomogenen Datenlage kommt der Aufklärung der Vitamin D Wirkung auf das kardiovaskuläre System eine besondere Bedeutung zu.

Ein gut geeignetes Tiermodell zur Untersuchung des Effektes eines Vitamin D Mangels auf das kardiovaskuläre System sind Vdr defiziente Mäuse (Vdr^{-/-}). Auf Grund des *knockouts* kann bei diesen Mäusen die Wirkung von 1,25(OH)₂D nicht mehr vermittelt werden (Li et al. 1997; Yoshizawa et al. 1997). Die Mäuse zeigen Symptome, die typisch für einen Vitamin D Mangel sind. Es kommt zu einer eingeschränkten Aufnahme von Calcium aus dem Darm und einer daraus resultierenden Hypocalcämie. Gleichzeitig entwickeln sie einen Hyperparathyreoidismus, welcher bei Fortschreiten in einer Hypophosphatämie resultiert. Mit voranschreitendem Alter entwickeln sie eine Rachitis bzw. Osteomalazie. Um dem entgegenzuwirken wird ihnen eine spezielle Diät, eine sogenannte *Rescue Diet*, verabreicht. Diese Diät enthält erhöhte Konzentrationen an Calcium, Phosphor und Laktose und soll die Calcium, Phosphat und PTH Spiegel im Serum normalisieren. In der Literatur wird beschrieben, dass Vdr^{-/-} Mäuse mit normalisierten Calciumspiegeln einen kardialen Phänotyp zeigen, der durch Myokardhypertrophie, erhöhte Kontraktilität und beeinträchtigte systolische Funktion gekennzeichnet ist (Li et al. 2002; Xiang et al. 2005; Simpson et al. 2007; Tishkoff et al. 2008a; Zhou et al. 2008; Pilz et al. 2011). Zusätzlich konnten Studien an diesem Tiermodell zeigen, dass die Mäuse bei Fütterung einer *Rescue Diet* auf Basis einer

Western Diet, mit erhöhten Saccharose- und Fettgehalten, eine erhöhte Kalzifizierung der Aortenklappe aufweisen. Es wird angenommen, dass diese Kalzifizierung durch eine vermehrte Expression von Osteoblasten-Differenzierungsfaktoren zustande kommt (Schmidt et al. 2012; Schmidt et al. 2014). Diese Beobachtungen decken sich mit Befunden bei Patienten mit CKD, die aufgrund der gestörten Calcitriolsynthese häufig von einer ausgeprägten Kalzifizierung im Bereich der arteriellen Gefäße betroffen sind (Lee et al. 2012). Auch eine 2008 publizierte Studie beschrieb eine inverse Beziehung zwischen den 25(OH)D Spiegel und dem Auftreten von Kalzifizierungen im Bereich der Aorta (Linhartová et al. 2008). Derzeit ist allerdings nicht klar, ob ein *Vdr knockout* tatsächlich die Herzmorphologie und -funktion beeinträchtigt. Vor allem Kalzifizierungen im Bereich der Aortenklappe und dem aufsteigenden Aortenbogen könnten zu einer eingeschränkten Herzfunktion führen. Die aufsteigende Aorta und der Aortenbogen bestehen hauptsächlich aus elastischen Fasern, die sich während der Systole dehnen und während der Diastole wieder zusammenziehen. Die Aorta kann so in der Systole Energie speichern, die sie in der Diastole wieder freisetzen kann und unterstützt so die Pumpleistung des Herzens. Ein möglicher Verlust der Aortenwandelastizität durch Kalzifizierungen kann zu einer systolischen Hypertonie führen. Diese wiederum zu einer linksventrikulären Hypertrophie (LVH), erhöhtem Sauerstoffbedarf, diastolischer Dysfunktion und Herzklappeninsuffizienz (Karwowski et al. 2012).

Neben Vitamin D wird in jüngster Zeit auch Phosphor als modifizierender Faktor in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen gebracht. So zeigen Daten, dass das Risiko für eine kardiovaskuläre Erkrankung mit einem erhöhten Phosphorspiegel steigt (Dhingra et al. 2007). Es wird geschätzt, dass die tägliche Phosphoraufnahme in den westlichen Industrienationen um das 2 bis 3 fache (Welch et al. 2009; Pietinen et al. 2010; Chang und Anderson 2017) über den empfohlenen Mengen von 700 mg/Tag für Erwachsene liegt (Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) et al. 2015). In der Regel liegt Phosphor als Phosphat, in anorganischen und organischen Verbindungen, vor. Phosphate werden oft als Lebensmittelzusatzstoffe eingesetzt, beispielsweise als Konservierungsmittel, Säuerungsmittel, Säureregulator, Trennmittel und Emulgator. Die alimentäre Aufnahme von Phosphor erfolgt vorwiegend aus

tierischen Produkten wie Milch/-produkte (21,0 %) und Fleisch/-produkten (25,2 %), aber auch Getreideprodukten (29,3%) (McClure et al. 2017). Eine durch alimentäre Phosphataufnahme erhöhte Serumkonzentration von anorganischem Phosphat führt zur vermehrten Freisetzung der phosphaturetischen Hormone Fibroblasten Wachstumsfaktor 23 (*fibroblast growth factor 23*, FGF23) und Parathormon (PTH). Diese führen zu einer vermehrten renalen Phosphatausscheidung (Baum et al. 2005; Biber et al. 2009; Bergwitz und Jüppner 2010). Der Phosphatstoffwechsel ist eng mit dem Vitamin D Stoffwechsel verknüpft. Im Gegensatz zu PTH, das in der Niere die Synthese von bioaktivem $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ stimuliert, hemmt FGF23 diese (Yoshida et al. 2002; Shimada et al. 2004; Murali et al. 2016). $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, PTH und FGF23 beeinflussen sich gegenseitig stark über positive und negative Rückkopplung (siehe Abbildung 2). Daten von Studien im Tiermodell und *in vitro* Experimenten zeigen, dass FGF23 die Synthese von PTH hemmt, ein Nachweis aus humanen Studien fehlt jedoch (Ben-Dov et al. 2007; Krajisnik et al. 2007).

Es wird angenommen, dass die kardiodestruktive Wirkung erhöhter Phosphatserumkonzentrationen zum Teil durch die erhöhten PTH und FGF23 Spiegel vermittelt wird. Beide werden mit einem erhöhten Risiko für Herz-Kreislauf Erkrankungen assoziiert. Eine erhöhte Konzentration von PTH im Blut, wie es bei einem primären oder sekundären Hyperparathyreoidismus auftritt, ist mit einer höheren Inzidenz von Hypertonie, LVH, Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen und Herzklappenerkrankungen verbunden, die zu einer höheren kardialen Morbidität und Mortalität beitragen können (Schlüter und Piper 1998; Andersson et al. 2004; Brown et al. 2017). Die Wirkung von PTH wird über PTH Rezeptoren (PTHR) vermittelt. Es werden zwei Formen unterschieden PTH1R und PTH2R. PTH1R ist auch in Kardiomyozyten zu finden (Philbrick et al. 1996; Qian et al. 2003). Durch Bindung von PTH wird die Calciumaufnahme in den Kardiomyozyten gefördert. Dies beeinflusst indirekt die Kontraktilität des Myokards (Smogorzewski et al. 1993).

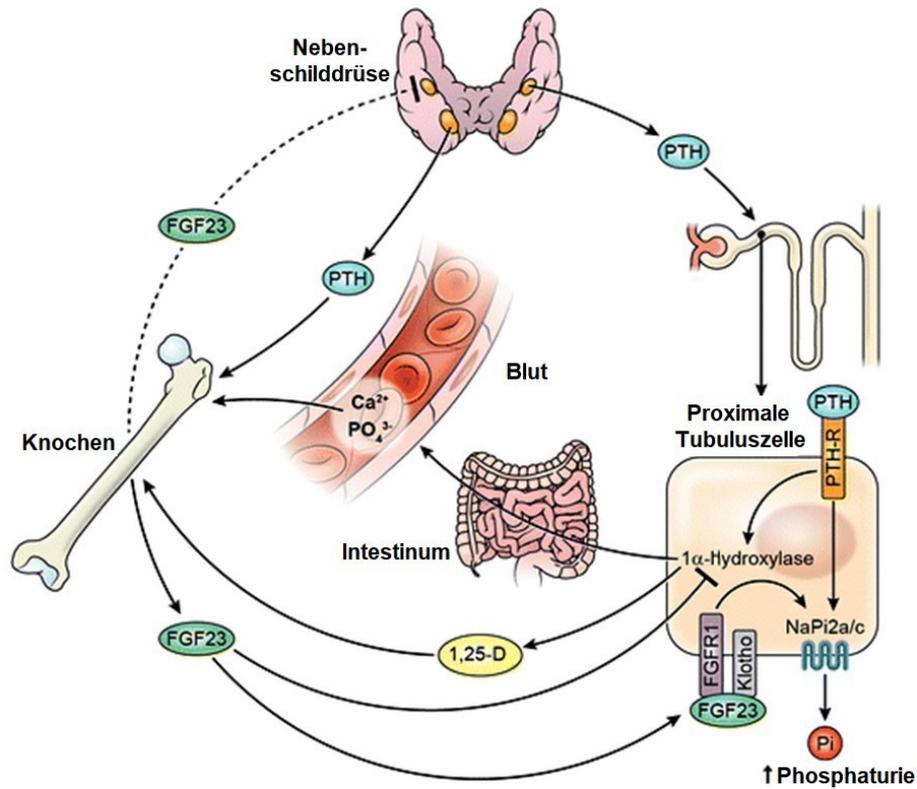


Abbildung 2: Die PTH-Vitamin D-FGF23-Achse.

Der von den Osteozyten sekretierte *fibroblast growth factor 23* (FGF23) bindet zusammen mit seinem Kofaktor Klotho an den *fibroblast growth factor receptor 1* (FGFR1) und hemmt so in den proximalen Tubuluszellen die Expression der Natrium-Phosphat-Co-Transporter (NaPi2a/c). Dies induziert eine vermehrte Ausscheidung von Phosphat (Phosphaturie), da die Rückresorption von Phosphat aus dem Urin reduziert wird. Das Parathormon (PTH) vermittelt seine phosphatretische Wirkung über den gleichen Mechanismus, bindet allerdings an den PTH-Rezeptor (PTH-R). Im Gegensatz zu PTH hemmt FGF23 die 1 α -Hydroxylase. Dieses Enzym vermittelt die Hydroxylierung von Calcidiol zum bioaktiven 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25-D). 1,25-D ist verantwortlich für eine erhöhte intestinale Calcium- (Ca^{2+}) und Phosphat- (PO_4^{3-}) Absorption und fördert die Knochenmineralisierung. Es gibt Hinweise aus Tiermodell und *in vitro* Studien darauf, dass FGF23 die PTH Sekretion aus der Nebenschilddrüse hemmt. (modifiziert nach Blau und Collins 2015)

Erhöhte FGF23 Spiegel werden ebenfalls mit einer LVH, Myokardfibrose und erhöhter kardiovaskulärer Mortalität assoziiert (Faul et al. 2011; Ärnlöv et al. 2013a, 2013b; Grabner et al. 2015; Hao et al. 2016). Besonders Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion und erhöhten FGF23 Spiegel im Blut weisen verstärkt LVH auf (Gutiérrez et al. 2009). Studien zeigten zudem, dass hohe FGF23 Spiegel auch das Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz erhöhen (Di Giuseppe et al. 2015). Andererseits zeigen Patienten mit FGF23 assoziierter hypophosphatämischer Rachitis, die durch chronisch erhöhte FGF23 Spiegel charakterisiert ist, nur bedingt eine kardiale Dysfunktion und Hypertrophie (Liu et al. 2014; Takashi et al. 2017). Ähnlich wie bei Untersuchungen zu Vitamin D und dessen kardiovaskulärer Wirkung basieren viele Erkenntnisse zum Thema FGF23 auf Studien an Patienten mit CKD. Dies

ist beispielsweise der deutlich höheren Prävalenz für LVH bei CKD geschuldet (Faul et al. 2011). Aufgrund der Verschlechterung der Nierenfunktion und der dadurch reduzierten Phosphatausscheidung steigen die FGF23 Serumspiegel bei CKD progressiv an (Gutierrez et al. 2005; Shimada et al. 2010; Isakova et al. 2011). Die Pathophysiologie der CKD ist jedoch komplex und durch zusätzliche Faktoren wie Elektrolytstörungen, Hypervolämie und Hypertonie gekennzeichnet.

Eine Erkrankung, die ein besonderes Risiko für die Entwicklung einer Niereninsuffizienz darstellt, ist die Atherosklerose. Atherosklerose ist die am häufigsten auftretende Form der Arteriosklerose. Als Arteriosklerose wird im Allgemeinen eine Verhärtung der Arterien, die über Jahre hinweg entsteht, bezeichnet. Bei der Form Atherosklerose kommt es zusätzlich zur Bildung von Ablagerungen, sogenannter Atherome, in den Arterien. Diese Läsionen sind auf die Einlagerung von Cholesterin und Lipiden, sowie Calciumphosphaten und Zellabbauprodukten in den Blutgefäßwänden zurückzuführen. Aufgrund dieser Läsionen wird die Oberfläche der inneren Gefäßwand unregelmäßig und die Blutzirkulation wird erschwert. Zusätzlich wird die Elastizität der Blutgefäße herabgesetzt. Im Jahre 1958 definierte die WHO Atherosklerose als eine „variable Kombination von Intimaveränderungen der Arterien [...], die aus fokalen Anhäufungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutprodukten, fibrösem Gewebe und Calciumablagerungen besteht und mit medialen Veränderungen assoziiert ist.“ (World Health Organization 1958). Kardiovaskuläre Erkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall, *Angina pectoris* und periphere arterielle Verschlusskrankheit sind oftmals eine Folge der Atherosklerose. Von den 39 % der Todesfälle, die in Deutschland auf eine kardiovaskuläre Erkrankung zurückzuführen sind, ist der Herzinfarkt die häufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2017).

Die Atherogenese ist ein chronischer multifaktorieller Prozess, der sich über einen langen Zeitraum entwickelt. Es werden dabei sechs Stadien bzw. Läsionstypen unterschieden. Zunächst kommt es zur endothelialen Dysfunktion und einer erhöhten Permeabilität für Plasmabestandteile, wie Lipoproteine mit geringer Dichte (*low density lipoprotein*, LDL). Das LDL wird durch Peroxidasen zu oxLDL oxidiert. Dieses besitzt eine starke proinflammatorische Wirkung und

es kommt zur vermehrten Akkumulation von Immunzellen, unter anderem auch von Monozyten (Läsionstyp I). Die akkumulierten Monozyten differenzieren zu Makrophagen, nehmen das oxLDL auf und speichern es. Durch eine massive Aufnahme entwickeln sich die Makrophagen zu sogenannten Schaumzellen. Es kommt zur fokalen Akkumulation von Lipiden (Läsionstyp II, *Fatty streaks*). Beim erstmaligen Auftreten von extrazellulären Lipidansammlungen wird von einem Präatherom gesprochen (Läsionstyp III). Aus dem Präatherom entwickelt sich durch weitere Akkumulation von Monozyten und Lipiden, über das Zwischenstadium dem Atherom (Läsionstyp IV), das Fibroatherom (Läsionstyp V). Bei dem Fibroatherom kommt es zur Migration von glatten Muskelzellen in den Subendothelialraum. Diese bilden eine fibröse Kappe. Durch weitere Migration von Monozyten vergrößert sich die Läsion. Es kommt zusätzlich zu einer Vergrößerung des nekrotischen Lipidkerns und der Druck auf die fibröse Kappe steigt. Durch den zunehmenden Druck kann es zu Ruptur der Läsion kommen (Läsionstyp VI - Fortgeschrittene, komplizierte Läsionen). Dies wiederum kann einen Herzinfarkt oder Schlaganfall zur Folge haben. Eine fortgeschrittene Atherosklerose wird oftmals von einer Kalzifizierung der Arterien begleitet. Eine Kalzifizierung der Gefäße kann jedoch auch unabhängig auftreten, beispielsweise bei Diabetes oder Nierenversagen (Block et al. 2005; Budoff et al. 2005). In den letzten Jahren wurde intensiv an intrazellulären Interaktionen und molekularen Prozessen, die der Kalzifizierung von Arterien zugrunde liegen, geforscht. Studien implizieren, dass sowohl Vitamin D als auch Phosphor einen Einfluss auf den Kalzifizierungsprozess der Gefäße besitzen (Gracioli et al. 2009; Schmidt et al. 2014). In einer Studie zeigte sich, dass Probanden der Allgemeinbevölkerung mit einem erhöhten Phosphorspiegel ein höheres Risiko für Kalzifizierungen der Koronararterien besitzen (Kendrick et al. 2011; Kendrick und Chonchol 2011).

Um den Einfluss von Vitamin D und Phosphor auf die Atherogenese und die Herzmorphologie untersuchen zu können, eignet sich ein Atherosklerose-Mausmodell. Mäuse entwickeln unter natürlichen Bedingungen keine Atherosklerose. Erst durch Deletion spezifischer Gene des Lipidstoffwechsels ist es möglich geworden eine Atherosklerose, die mit der humanen Atherosklerose vergleichbar ist, zu induzieren. Es haben sich vor allem zwei Mauslinien bewährt, Apolipoprotein E (ApoE^{-/-}) und LDL Rezeptor defiziente

(Ldlr^{-/-}) Mäuse. Ldlr^{-/-} Mäuse sind durch eine Hypercholesterinämie charakterisiert, welche durch die fehlende LDL Rezeptor vermittelte Aufnahme von LDL Cholesterol in die Leber entsteht (Goldstein et al. 1985; Brown und Goldstein 1986). Bei Fütterung einer fett- und cholesterolreichen Diät entwickeln diese Mäuse im Laufe mehrerer Wochen eine Atherosklerose, beginnend an der Aortenwurzel und mit anhaltender Dauer der Fütterung die Aorta voranschreitend. Sie werden daher in der kardiovaskulären Forschung zur Untersuchung der Atherogenese und Hypercholesterinämie herangezogen. Es ist hinreichend bekannt, dass eine Vitamin D Überversorgung die Entstehung einer Kalzifizierung im Rahmen der Atherosklerose begünstigt (Razzaque 2011; Drüeke und Massy 2012; Cirillo et al. 2016). So konnte auch bei Vorliegen eines Vitamin D Mangels in diesem Mausmodell nachgewiesen werden, dass der Kalzifizierungsanteil in der Aortenklappe steigt (Awan et al. 2011; Schmidt et al. 2014). Der Einfluss von Phosphor auf die Atherogenese wurde bisher lediglich bei ApoE^{-/-} Mäusen untersucht (Shiota et al. 2011). Bisher existieren keine Studien zum Einfluss von Phosphor und Vitamin D bzw. deren Wechselwirkungen auf die Atherogenese und die Herzmorphologie.

Auf Grund der heterogenen Datenlage zum Einfluss von Vitamin D auf das kardiovaskuläre System und der fehlenden Studien zum Einfluss von Phosphor und dessen Zusammenspiel mit Vitamin D, sollten im Rahmen der hier vorliegenden Studien folgende Fragen geklärt werden:

- I. Ist ein Vitamin D Mangel im Sinne eines Vdr *knockouts* mit einem veränderten Blutdruck, einer Einschränkung der Herzleistung oder der Herzfunktion verbunden?
- II. Welchen Einfluss besitzt alimentär zugeführter Phosphor auf das kardiovaskuläre System und ist ein möglicher Effekt vom Vitamin D Status abhängig?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden zwei Langzeitstudien an Modelltieren durchgeführt, in denen das kardiovaskuläre System in Abhängigkeit der Intervention morphologisch und molekularbiologisch näher charakterisiert wurde. Zur Simulation des Vitamin D Mangels wurden in Studie I Vdr^{-/-} Mäuse eingesetzt, bei denen die Wirkung des bioaktiven 1,25(OH)₂D nicht mehr vermittelt werden kann. Der Vdr wird ubiquitär in Geweben exprimiert, unter

anderem auch in der glatten Muskulatur der Gefäße, dem Endothel und den Kardiomyozyten (Wu-Wong 2007; Chen et al. 2008; Tishkoff et al. 2008b). Die zweite Studie unterlag einem zweifaktoriellen Versuchsdesign, um den Einfluss der beiden Faktoren Phosphor und Vitamin D, sowie ihrer Wechselwirkungen, auf die Atherogenese im $Ldlr^{-/}$ Tiermodell untersuchen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Studie I – Charakterisierung der Herzfunktion bei Vitamin D Rezeptor Defizienz

2.1.1 Studiendesign und Versuchsdiäten

Die tierexperimentelle Langzeitstudie I diente der Untersuchung der Herzfunktion von genetisch modifizierten $Vdr^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu deren Wildtypäquivalent $Vdr^{+/+}$.

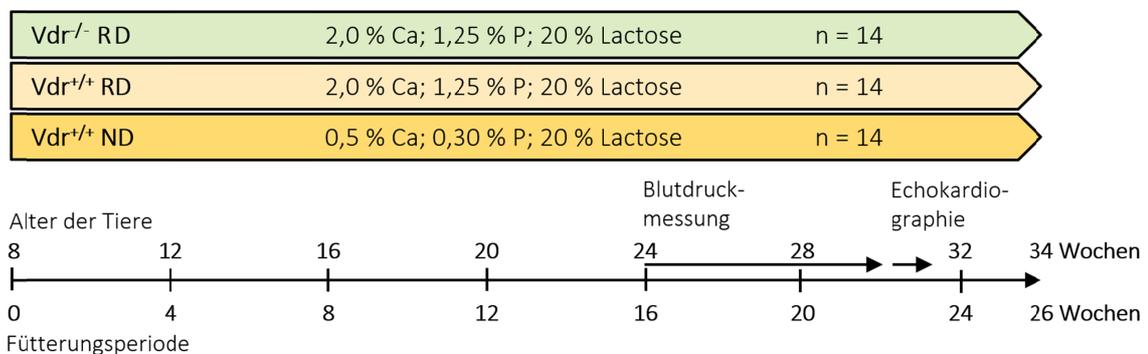


Abbildung 3: Schema zum Versuchsaufbau der Langzeitstudie I

14 männliche, 8 Wochen alte Vitamin D Rezeptor *knockout* Mäuse ($Vdr^{-/-}$) und 14 korrespondierende $Vdr^{+/+}$ Mäuse erhielten über einen Zeitraum von 26 Wochen eine semi-synthetische Diät mit erhöhten Calcium- (Ca 2,0 %) und Phosphor- (P 1,25 %) Konzentrationen (RD). Als Referenzgruppe erhielten weitere 14 $Vdr^{+/+}$ Mäuse eine Diät mit Calcium- (0,5 %) und Phosphat- (0,3 %) Konzentrationen entsprechend den AIN-93G-Empfehlungen (ND). Jede Versuchsdiät enthielt zudem 20 % Lactose. Zwischen der 16. und 22. Studienwoche erfolgte eine nicht-invasive Blutdruckmessung, daran schloss sich eine transthorakale Echokardiographie in der 22. Studienwoche an.

Hierzu wurden 14 männliche, 8 Wochen alte $Vdr^{-/-}$ sowie 28 korrespondierende $Vdr^{+/+}$ Mäuse eingesetzt. Sie erhielten eine semi-synthetische Diät entsprechend der AIN-93G-Empfehlungen (Reeves et al. 1993; Reeves 1997). Die Diät der $Vdr^{-/-}$ Mäuse ($Vdr^{-/-}$ RD) enthielt erhöhte Calcium- (2,0 %) und Phosphor- (1,25 %) Gehalte (*Rescue Diet*), um einem Hyperparathyreoidismus als Folge der Vdr Defizienz vorzubeugen (Li et al. 1998). Eine Kontrollgruppe mit $Vdr^{+/+}$ Mäusen (n = 14) erhielt ebenfalls diese *Rescue Diet* ($Vdr^{+/+}$ RD). Um feststellen zu können ob die *Rescue Diet* einen Einfluss auf die untersuchten Parameter besitzt wurde zusätzlich eine weitere $Vdr^{+/+}$ Kontrollgruppe (n = 14) in das Versuchsdesign aufgenommen, diese erhielt eine Diät mit normalen Calcium- (0,5 %) und Phosphor- (0,3 %) Konzentrationen entsprechend den

AIN-93G-Empfehlungen (Vdr^{+/+} ND) (Reeves et al. 1993; Reeves 1997). Jede Gruppe erhielt zudem 20 % Lactose über die Diät um die intestinale Calciumabsorption zu verbessern (Li et al. 1998). Die exakten Zusammensetzungen der Diäten sind Tabelle 1 und Tabelle 2 zu entnehmen. Die Diäten wurden insgesamt über einen Versuchszeitraum von 26 Wochen *ad libitum* gefüttert. Im Alter von 24 Wochen wurde bei allen Versuchstieren eine Blutdruckmessung durchgeführt. Daran schloss sich im Alter von 30 Wochen eine transthorakale Echokardiografie Untersuchung zur Bestimmung der Herzfunktion an.

Die homozygoten Vdr^{-/-} und Vdr^{+/+} Mäuse stammen aus der Verpaarung heterozygoter Mäuse der Linie B6.129S4-Vdr^{tm1Mbd}/J (The Jackson Laboratory, ME, USA). Bis zum Versuchsstart erhielten alle Mäuse eine kommerzielle *Rescue Diet* (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Die Haltung der Mäuse erfolgte paarweise, bei einer Temperatur von 22 ± 2 °C und einer Luftfeuchte von 50-60 %, bei einem Lichtregime von 12 Stunden dunkel und 12 Stunden hell. Die Haltungsbedingungen, der Umgang mit Versuchstieren, sowie alle angewandten Prozeduren, entsprachen dem geltenden Tierschutzrecht und wurden vom Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt genehmigt (42502-2-1403 MLU).

Tabelle 1: Übersicht der Diätkomponenten der Versuchsdiet in Studie I

Diätkomponenten	g/kg Diät
Stärke	273
Casein	200
Lactose	200
Saccharose	100
Vitamin-Mineralstoffmix ¹	105
Sojaöl	70,0
Cellulose	50,0
DL-Methionin	2,00
Summe	1000

¹Vitamine/Mineralien siehe Tabelle 2

Tabelle 2: Zusammensetzung des Mineralstoff-Vitamin-Mixes der Versuchsdiät in Studie I

	Empfehlung		Einwaage		errechneter Gehalt	
	mg/kg Diät		mg/kg Diät		mg/kg Diät	
	Normo Diät	Rescue Diet	Normo Diät	Rescue Diet	Normo Diät	Rescue Diet
Calcium	5000	20000	38,0%Ca	30191	5000	20000
Phosphor*	3000	12500	17,5%Ca 22,7%P	48726	1561*	11061*
Magnesium	507		50,0%Mg	1014		507
Kalium	3600		52,4%K	6870		3600
Natrium	1019		47,6%Cl	2592		4843
Eisen	35,0		60,7%Cl			1019
Zink	30,0		39,3%Na			35,0
Mangan	10,0		30,0%Fe	116,7		30,0
Kupfer	6,0		79,0%Zn	38,0		10,0
Selen	0,15		62,0%Mn	16,1		6,00
Jod	0,20		25,0%Cu	24,0		0,15
Schwefel	0,15		45,0%Se	0,33		0,20
Molybat	0,15		62,0%J	0,32		-
			wird über andere Quellen abgedeckt			0,15
			54,3%Md	0,28		
Vitamine						
Vitamin A (Retinol)	1,20		0,15%	800		1,20
Vitamin B1 (Thiamin)	5,00		100%	5,00		5,00
Vitamin B2 (Riboflavin)	6,00		98,0%	6,12		6,00
Vitamin B3 (Niacin, Nicotinsäure)	30,0		100%	30,0		30,0
Vitamin B5 (Pantothensäure)	15,0		100%	15,0		15,0
Vitamin B6 (Pyridoxin, -oxal, -axamin)	6,00		100%	6,00		6,00
Vitamin B7 (Biotin)	0,20		1,00%	20,0		0,20
Vitamin B9 (Folsäure)	2,00		100%	2,00		2,00
Vitamin B12 (Cobalamin)	0,03		0,96%	2,61		0,03
Cholinchlorid	2000		60,0%	3333		2000
Vitamin K (Phyllochinon, Menachinon)	0,75		51,0%	1,47		0,75
Vitamin D (Cholecalciferol)	0,03		100%	2,50		0,03
Vitamin E (Tocopherol)	75,0		1,00%	150		75,0
Zwischensumme g/kg Diät				Normo Diät	Rescue Diet	
Stärke g/kg Diät				31,9	99,8	
Summen g/kg Diät				73,1	5,2	
				105	105	

* 1439 mg werden über Casein eingetragen

2.1.2 Bestimmung der Bruttoenergie in den Versuchsdäten

Zur Bestimmung des Bruttoenergiegehaltes der semi-synthetischen Diät erfolgte eine bombenkalorimetrische Untersuchung, in Dreifachbestimmung (Calorimeter System C 7000 mit Cooler C 7002, Janke & Kunkel IKA Analysetechnik, Staufen, Deutschland). Es wurde je 1 g Probe eingewogen und im Bombenkalorimeter die freiwerdende Wärmeenergie bei Initialzündung unter 3000 kPa Druck gemessen. Anschließend wurde der Mittelwert der drei Einzelmessungen gebildet und zur Berechnung der Energieaufnahme der Mäuse genutzt.

2.1.3 Blutdruckmessung und transthorakale Echokardiographie

Die nicht invasive Messung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz erfolgte nach einer Fütterungsperiode von 16 Wochen. Die systolischen Blutdruckwerte wurden durch Schwanz-Manometrie mit Hilfe der sogenannten *tail cuff* Methode bestimmt (NIBP System, ADInstruments, Spechbach, Germany). Während der Untersuchung befanden sich die Mäuse in einer Fixiereinheit, um unnötige Bewegungen zu vermeiden (Restrainer ML5016, ADInstruments, Spechbach, Germany). Die Blutdruckmanschette und der Pulssensor wurden über den Mäuseschwanz bis zu dessen proximalen Ende gestülpt. Die Mäuse wurden anschließend in eine abgedunkelte Wärmekammer mit einer Arbeitstemperatur von $30 \pm 2^\circ\text{C}$ gesetzt, um die Durchblutung des Schwanzes anzuregen.

Die Blutdruckmessungen fanden immer im gleichen Zeitfenster von 8 bis 12 Uhr statt, um den Einfluss der circadianen Rhythmik auf die Messung zu minimieren. Da an einem Tag maximal 32 Mäuse untersucht werden konnten, wurden die Mäuse in zwei Messgruppen unterteilt. Jede Messgruppe wurde zunächst jeden zweiten Tag, ausgenommen an Wochenenden, für 20 Messtage an die Abläufe gewöhnt, dabei wurde die Trainingsdauer in 5 min Intervallen allmählich von 5 min auf 30 min gesteigert. Im Anschluss erfolgte die eigentliche Messung des Blutdruckes über 30 min an 10 Messtagen (siehe Abbildung 4).

		Trainingszeitraum																											
Messdauer [min]		5	10	15	/	/	15	20	25	/	/	30	30	30	/	/	30	30	30	/	/								
Messgruppe		1	2	1	2	1	/	/	2	1	2	1	2	1	2	1	/	/	2	1	2	1	2	/	/				
Messtag		1	2	3	4	5	/	/	6	7	8	9	10	/	/	11	12	13	14	15	/	/	16	17	18	19	20	/	/
Tag		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28

		Analysezeitraum											
Messdauer [min]		30	30	30	/	/	30	30	30				
Messgruppe		1	2	1	2	1	/	/	2	1	2	1	2
Messtag		21	22	23	24	25	/	/	26	27	28	29	30
Tag		29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40



Abbildung 4: Schema zur Durchführung der manometrischen Blutdruckmessung mittels tail cuff.

14 männliche, 8 Wochen alte Vitamin D Rezeptor *knockout* Mäuse ($Vdr^{-/-}$) und 14 korrespondierende $Vdr^{+/+}$ Mäuse erhielten über einen Zeitraum von 26 Wochen eine semi-synthetische Diät mit erhöhten Calcium- (2,0 %) und Phosphor- (1,25 %) Konzentrationen (RD). Als Referenzgruppe erhielten weitere 14 $Vdr^{+/+}$ Mäuse eine Diät mit Calcium- (0,5 %) und Phosphat- (0,3 %) Konzentrationen entsprechend den AIN-93G-Empfehlungen (ND). Jede Versuchsdiät enthielt zudem 20 % Lactose. Zwischen der 16. und 22. Studienwoche erfolgte eine nicht-invasive Blutdruckmessung. Die insgesamt 42 Mäuse wurden in zwei Messgruppen unterteilt. Die Blutdruckmessungen erfolgten jeden zweiten Tag, ausgenommen der Wochenenden. Die Adaptationsphase betrug 20 Trainingstage, daran schlossen sich 10 Messtage an. Die Messdauer wurde mit jedem neuen Messtag um 5 min gesteigert, bis die finale Messdauer von 30 min erreicht wurde.

Nach Abschluss der Blutdruckmessungen erfolgte die transthorakale Echokardiographie unter Verwendung eines hochauflösenden Bildgebungssystems für kleine Tiere (Vevo 2100, VisualSonics Inc., Kanada), ausgestattet mit einer Hochfrequenz-Ultraschallsonde (MS 550D). Die 30 Wochen alten Mäuse wurden mit 2,0 % Isofluran (O_2 , 1 l/min) anästhesiert. Das Herz wurde zuerst in der parasternalen Längsachse (PLAX) im zweidimensionalen Modus abgebildet. In dieser Ansicht erfolgte die Positionierung des M-Modus-Cursor senkrecht zu dem Ventrikelseptum und der linksventrikulären (LV) Hinterwand, im Anschluss daran wurden M-Modus-Bilder aufgenommen wurden. Die LV Dimensionen und Wanddicken (interventrikuläre Septumdicke (IVS), LV Innendurchmesser (LVID), LV posteriore Wanddicke (LVPW) jeweils in Systole (s) und Diastole (d) wurden aus parasternalen Langachsen-M-Modus-Bildern bestimmt.

Die Berechnung der LV Ejektionsfraktion (*ejection fraction*, EF), der LV Verkürzungsfraktion (*fractional shortening*, FS) und der LV Wandverdickung (LV wall thickening, LVWT) fand mittels der Verwendung der Vevo2100 Software statt. Die Strömungsgeschwindigkeit und der Gradient in der auf- und absteigenden Aorta wurden aus der Aortenbogenansicht (*aortic arch view*) im gepulsten Doppler-Wellen-Modus bestimmt. Die Spitzengeschwindigkeit in der auf- (Asc Ao V) und Aorta wurde ebenfalls mit der Software Vevo 2100 berechnet. Für jeden Parameter sind mindestens fünf Herzzyklen pro Tier bestimmt worden.

2.1.4 Probenentnahme

Nach der sechs monatigen Fütterungsperiode erfolgte die Probenentnahme. Die zuvor vier Stunden genücherten Mäuse wurden im Alter von 33 Wochen mit Ether betäubt und anschließend dekapitiert. Das Vollblut wurde in Serum-Röhrchen (Probengefäß 1,3 ml Z mit Gerinnungsaktivator, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen und nach 20 minütiger Koagulation für 10 min bei RT und 10.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum für spätere Analysen in neue Reaktionsgefäße aliquotiert. Im Rahmen dieses Versuchs wurde außerdem von allen Mäusen das Herz mit dem aufsteigenden Teil der Aorta präpariert, mit eiskalter 0,9 % iger NaCl Lösung gespült und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Des Weiteren ist die Tibia freigelegt und ihre Länge mit Hilfe eines Messschiebers bestimmt worden. Alle Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

2.1.5 Serumparameter

Im Serum wurden ionisches Calcium, anorganischen Phosphat, intaktes PTH (iPTH), intaktes FGF23 (iFGF23), Renin und B-Typ natriuretisches Peptid (*brain natriuretic peptide*, BNP) bestimmt. Die Durchführung der Testkits erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die Bezeichnung der Testkits, deren Hersteller und ggf. vorgenommene Modifikationen sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Übersicht über die in Studie I und II bestimmten Serumparameter und der verwendeten Testkits.

Serumparameter	Messprinzip	Testkit	Hersteller	Modifikationen	gemessen in	
					Studie I	Studie II
1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-Dihydroxycholecalciferol	1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA	IDS Deutschland GmbH, Frankfurt, Germany	Verdünnung, Einsatz 50 µl zur Immunextraktion		x
BMP2	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>	BMP2 Mouse ELISA Kit	Abcam®, Cambridge, UK	keine		x
BNP	Typ-B natriuretisches Peptid	RayBio® Human/Mouse/Rat BNP Enzyme Immunoassay Kit #EIA-BNP	RayBiotech, Inc., GA, USA	keine	x	
C-Peptid	<i>connecting peptide</i>	Mouse C-Peptide ELISA Kit #90050	Crystal Chem, Inc., IL, USA	keine		x
iFGF23	intakter Fibroblasten Wachstumsfaktor 23	Mouse/Rat FGF-23 (Intact) ELISA Kit #60-6800	Immutopics, Inc., CA, USA	Verdünnung	x	
IGF1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1	Quantikine® ELISA Mouse/Rat IGF-I Immunoassay #MG100	R&D Systems, Inc. MN, USA	keine		x
Insulin	Insulin	Merckodia Mouse Insulin ELISA #10-1247-01	Merckodia AB Uppsala Sweden	keine		x
iPTH	intaktes Parathormon	Mouse PTH 1-84 ELISA Kit #60-2305	Immutopics, Inc., CA, USA	Verdünnung	x	
Renin	Renin	ab193728 - Renin 1 Mouse ELISA kit	Abcam®, Cambridge, UK	keine	x	
Ca	ionisches Calcium	Fluitest® Ca CPC - Calcium	Analyticon®Biotechnologies AG, Lichtenfels, Germany	Volumina adaptiert für Microtiterplatte	x	x
Fructosamine	Fructosamine	Fluitest® FRUC – Fructosamine; Bio Cal® FRUC – Fructosamine Calibrator	Analyticon®Biotechnologies AG, Lichtenfels, Germany	Volumina adaptiert für Microtiterplatte, Verdünnung		x
P _i	anorganisches Phosphat	Fluitest® PHOS	Analyticon®Biotechnologies AG, Lichtenfels, Germany	Volumina adaptiert für Microtiterplatte	x	x

2.1.6 Histomorphologische Charakterisierung

Zur histologischen Untersuchung der Aortenwurzel wurden 12 µm dicke Gefrierschnitte (CM 1850 UV Mikrotom, Jung, Leica) angefertigt. Hierfür wurde das Herz mit der Herzspitze mit Gefrierschnittmedium (Neg-50, Thermo Scientific™ Richard-Allan Scientific™) bei -25°C auf einem Stempel festgefroren. Um ein Antauen der Präparate zu verhindern wurde zur Beschleunigung des Auffrierprozesses Gefrierspray (Ice-It™ Gefrierspray, Thermo Scientific™) eingesetzt. Das Herz wurde so platziert, dass die Schnitte aus Richtung der aufsteigenden Aorta hin zur Aortenwurzel angefertigt wurden. Als Startpunkt zur Aufnahme der Schnitte auf die Objektträger wurde das erstmalige Erscheinen aller drei Aortenklappentaschen definiert. Es wurden je drei aufeinanderfolgende Gefrierschnitte auf einem Objektträger platziert und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

2.1.6.1 Von Kossa Silberfärbung

Zur Visualisierung der Kalzifizierungen in der Aortenklappe wurde eine von Kossa Silberfärbung durchgeführt. Zunächst erfolgte die Fixierung der Schnitt mit einer 10 % igen Formol in Ethanol (v/v) Lösung. Darauf erfolgte eine einstündige Inkubation mit einer 5 % igen wässrigen Silbernitrat Lösung (w/v) im dunklen. Nach dreimaligem Spülen in destilliertem Wasser (*aqua dest.*) wurde das Silber mit einer 5 % igen Natriumcarbonat in 9,25 % igem Formaldehydlösung (w/v) für 2 min reduziert. Anschließend wurden die Schnitte 10 min unter indirekt fließendem Leitungswasser gespült und kurz in *aqua dest.* getaucht. Zur Fixierung wurde danach eine 5 % ige wässrige Natriumthiosulfat Lösung (w/v) für 5 min aufgetragen. Nach letztmaligem Waschen für 10 min unter indirekt laufendem Wasser und kurzem Tauchen in *aqua dest.* wurden die Schnitte mit 10 % Säurefuchsin-Ponceau (v/v) (entspricht Goldner 1; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) 2 min gegengefärbt. Nach dem Lufttrocknen erfolgte das Eindecken der histologischen Schnitte mit Eindeckmedium (Eukitt® *quick-hardening mounting medium*, Sigma-Aldrich, Schelldorf, Deutschland).

2.1.6.2 Aufnahme und Auswertung der histologischen Färbung

Die digitalen Aufnahmen zur Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte mit Hilfe von computergesteuerter Videotechnik am Axiovert 200 Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Das Mikroskop war mit einem 10er Objektiv und der AxioCam 503 color Kamera (Carl Zeiss) ausgestattet. Die softwaregestützte Auswertung erfolgte mit dem Programm AxioVision Rel. 4.9.1 Software und dem dort integrierten Messprogramm AutoMess (Carl Zeiss). Ausgewertet wurden die Aortenklappengesamtfläche, die Lumenfläche, sowie die Kalzifizierungsfläche. Die Differenz aus Aortenklappengesamtfläche und Lumenfläche bildete die Aortenklappengewebefläche. Die Kalzifizierungen wurden anschließend als prozentualer Anteil am Aortenklappengewebe berechnet. Für jedes Tier erfolgte die Berechnung des Mittelwertes aus den Messwerten der drei ausgewerteten Gewebeschnitte.

2.1.7 Statistische Auswertung

Alle Daten aus Studie I wurden mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung und durch den Levene-Test auf Varianzhomogenität getestet. Bei vorliegender Normalverteilung und Varianzhomogenität wurden die drei Gruppen durch eine einfache Varianzanalyse (*One-way ANOVA*) mit anschließendem Post-hoc Tukey-Test verglichen. Eine Welch-ANOVA, gekoppelt mit einem Post-hoc Games-Howell-Test, wurde eingesetzt, wenn Normalverteilung, aber keine Varianzhomogenität vorlag. Bei nicht normalverteilten Daten wurde ein Kruskal-Wallis-Test gekoppelt mit einem Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ein P-Wert von $< 0,05$ festgesetzt.

2.2 Studie II – Einfluss von Phosphor und Vitamin D auf die Atherogenese

2.2.1 Studiendesign und Versuchsdiäten

Die tierexperimentelle Langzeitstudie II diente dem Ziel herauszufinden, welchen Einfluss eine exzessive im Vergleich zu einer bedarfsgerechten Phosphorversorgung auf die Atherogenese von $Ldlr^{-/-}$ Mäusen besitzt und inwiefern sich Vitamin D und Phosphor dabei wechselseitig beeinflussen. Dazu wurde ein zweifaktorieller Versuch mit $Ldlr^{-/-}$ Mäusen als Atherosklerosemodell durchgeführt.

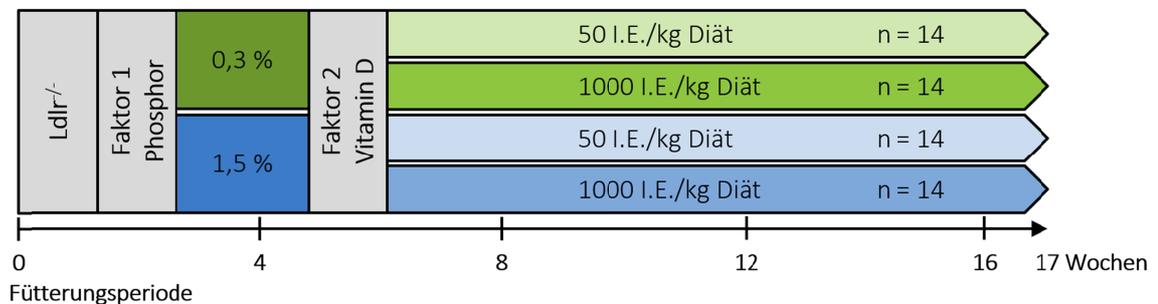


Abbildung 5: Schema zum Versuchsaufbau von Langzeitstudie II.

In diesem zweifaktoriellen Versuchsdesign wurden 56 männliche, 9 Wochen alte *low density lipoprotein receptor knockout* ($Ldlr^{-/-}$) Mäusen über einen Zeitraum von 17 Wochen mit einer semi-synthetische *Western Diet* mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor gekoppelt mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Mengen Vitamin D gefüttert.

In der zweiten Studie wurden 56 männliche, 9 Wochen alte $Ldlr^{-/-}$ (B6.129S7- $Ldlr^{tm1Her}/J$; The Jackson Laboratory, ME, USA) eingesetzt. In dieser Studie erhielten die Mäuse über einen Zeitraum von 17 Wochen entweder eine semi-synthetische Diät mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D Mengen, gekoppelt mit adäquaten (0,3 % P Diät) oder bedarfsüberschreitenden (1,5 % P Diät) Mengen Phosphor. Um die Atheroskleroseentwicklung zu unterstützen erhielten alle Tiere eine semisynthetische *Western Diet* mit erhöhten Mengen an Saccharose, gesättigten Fetten und Cholesterol. Phosphor wurde der Diät in Form von Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat zugesetzt. Durch den erhöhten Anteil von Phosphor in den 1,5 % P Diäten erhöhte sich gleichfalls der Anteil an Natrium. Um dies in den 0,3 % P Diäten auszugleichen wurden diesen Diäten Natriumcarbonat Decahydrat zugesetzt, so dass der Anteil von Natrium in allen

Diäten 1 % betrug. Die weiteren Vitamine (bis auf Vitamin D) und Mineralstoffe wurden entsprechend der AIN-93G-Empfehlungen (Reeves et al. 1993; Reeves 1997) zugesetzt. Vitamin D wurde in Sojaöl gelöst und den Diäten zugegeben. Hierzu wurden zwei Stammlösungen in den Konzentrationen 50 I.E./g Sojaöl und 1000 I.E./g Sojaöl angesetzt und jeweils 1 g/kg Diät zugesetzt. Die exakte Zusammensetzung der Diäten ist Tabelle 4 und Tabelle 5 zu entnehmen. Die Diäten wurden *ad libitum* gefüttert. Die Mäuse wurden paarweise gehalten, die Raumtemperatur lag bei $22 \pm 2^\circ\text{C}$, die Luftfeuchte betrug 50 – 60 % und es herrschte ein Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden am Tag. Die Haltungsbedingungen, der Umgang mit Versuchstieren, sowie alle angewandten Prozeduren, entsprachen dem geltenden Tierschutzrecht und wurden vom Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt genehmigt (42502-2-1403 MLU).

Tabelle 4: Übersicht der Diätkomponenten der Versuchsdiät aus Studie II

Diätkomponenten	g/kg Diät	
	50 I.E. Vitamin D ₃	1000 I.E. Vitamin D ₃
Vitamin D in Sojaöl gelöst	1,00 c = 50 I.E./g Öl	1,00 c = 1000 I.E./g Öl
Sojaöl		4,00
Schweineschmalz		210
Casein		200
Saccharose		200
Mineralstoff-Vitamin-Mix ¹		90,0
Cellulose		50,0
DL-Methionin		2,00
Cholesterol		1,50
Stärke		241,5
Summe		1000

¹Mineralstoff-Vitamin-Mix siehe Tabelle 5; Konzentration (c)

2.2.2 Probenentnahme

Im Alter von 26 Wochen wurden die Mäuse nach vierstündigem Nüchtern unter Etherbetäubung dekapitiert. Serum wurde gemäß der Beschreibung in Studie I (Absatz 2.1.4) gewonnen. Zur Präparation des Herzens und der Aorta wurde zunächst eiskalte 0,9 % ige NaCl Lösung solange in den linken Ventrikel injiziert, bis die Aorta und das Herz von Blut befreit waren. Anschließend wurde das Herz mit der angrenzenden Aorta entnommen, von anhaftendem Gewebe befreit, gewogen, die Herzspitze abgetrennt und in Stickstoff schockgefroren. Die Aorta wurde zwischen der Brachiozephalarterie und der Aortenbifurkation freipräpariert und von angrenzendem Fettgewebe befreit. Aus jeder Gruppe wurden sieben Aorten für 20 h in 4 % Paraformaldehyde (PFA) in Phosphat-gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS; 0,137 M NaCl, 0,01 M Na₂HPO₄, 2,68 mM KCl, 1,76 mM KH₂PO₄) fixiert und die andere Hälfte in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Desweiteren wurde die Tibia freigelegt und ihre Länge mit Hilfe eines Messschiebers bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Entnahme der Leber, diese wurde aliquotiert und ebenfalls schockgefroren. Alle Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

2.2.3 Serumparameter

Im Serum der Mäuse wurden ionisches Calcium, anorganisches Phosphat, iPTH, iFGF23, 1,25(OH)₂D, knochenmorphogenetisches Protein 2 (*bone morphogenetic protein 2*, BMP2), insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (*insulin-like growth factor 1*; IGF1), Insulin, C-Peptid, Glucose, Hämoglobin, Hämoglobin A1c (HbA1c) und Fructosamin bestimmt. Die Durchführung der Testkits erfolgte gemäß den Angaben der Hersteller. Die Bezeichnung der Testkits, deren Hersteller und ggf. vorgenommene Modifikationen, sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Da das Serum trotz des vierstündigen Nüchterns lipämisch war wurde es zum Einsatz für photometrische Messungen für 10 min bei 10.000 x g und 0°C zentrifugiert. Das klare Serum wurde in neue Reaktionsgefäße aliquotiert und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.4 Histomorphologische Charakterisierung

Die Anfertigung der histologischen Schnitte erfolgte gemäß der Beschreibung in Studie I, siehe Absatz 2.1.6.

2.2.4.1 Lipidfärbung der en face eröffneten Aorten

Aus jeder Gruppe wurde die abdominale Aorta von 7 Tieren für 20 h in 4 % PFA in 1x PBS (w/v) fixiert. Die Aorten wurden anschließend dreimalig mit 78 % igem Methanol gewaschen. Im Anschluss daran wurden die atherosklerotischen Läsionen der Aorten mit 0,2 % Ölrot O gelöst in einem Methanol-Natronlaugen-Gemisch (v/v; 1 mM Methanol, 35 mM NaOH) für 50 min gefärbt. Anschließend wurden die Aorten dreimalig mit 78 % igem Methanol gewaschen. Mit Hilfe eines Auflicht-Stereo-Mikroskops (Stemi 305 trino Body, Carl Zeiss) wurden außen an der Aorta haftende rot gefärbte Lipidreste entfernt, die Aorta longitudinal eröffnet und zwischen zwei Objektträgern fixiert. Zur Bildaufnahme wurden die Objektträger so auf einem Dokumentenscanner platziert, dass die Aorteninnenseite in Richtung Detektor gerichtet war und eine Ablichtung mit 600 dpi erstellt. Die Bestimmung der Aorteninnenfläche und der atherosklerotischen Läsionen erfolgte mit dem Messprogramm AutoMess der AxioVision Rel. 4.9.1 Software (Carl Zeiss). Die Fläche der atherosklerotischen Läsionen wurde anschließend auf die Aorteninnenfläche rechnerisch normalisiert.

2.2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Aortenklappe

Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung diente der Übersichtsfärbung. Zunächst erfolgte die Fixierung der Schnitte mit einer 10 % igen Formol in Ethanol Lösung (v/v). Bei dieser Färbung wurden alle sauren, beziehungsweise basophilen Strukturen, vor allem Zellkerne mit Hämalaun nach Harris (Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co. KG, Leipzig, Deutschland), 15 min angefärbt. Zur Differenzierung erfolgte anschließend ein 10 minütiger Waschschrift unter indirekt laufendem Leitungswasser. Nach kurzem Spülen in *aqua dest.* wurde die acidophilen bzw. basischen Strukturen, wie Zellplasmaproteine, Mitochondrien etc., mit einer 0,1 % igen Eosin in *aqua dest.* Lösung (w/v) (Dr. Hollborn & Söhne GmbH & Co.KG., Leipzig, Deutschland) 2 min gefärbt. Die Schnitte wurden anschließend ein weiteres Mal in *aqua dest.* gespült und nach

kurzem Lufttrocknen mit Eindeckmedium (Eukitt® *quick-hardening mounting medium*, Sigma-Aldrich) eingedeckt.

2.2.4.3 Lipidfärbung der Aortenklappe

Die Präparate wurden zunächst für 10 min in einer 10 % igen Formalin in 1x PBS Lösung fixiert und anschließend dreimal in 1x PBS gewaschen. Zur Visualisierung der neutralen Lipide (Cholesterolester und Triacylglycerole) wurden die Schnitte mit 0,3 % Ölrot O (w/v) (Sigma) gelöst in einem Isopropanol-Wassergemisch (v/v, 3:2) für 20 min gefärbt. Die Objektträger wurden anschließend in *aqua dest.* gespült und mittels Hämalaun (Dr. Hollborn & Söhne GmbH & Co.KG.) 5 min gegengefärbt. Das Bläuen erfolgte für 10 min unter indirekt fließendem Leitungswasser. Nach kurzem Equilibrieren in *aqua dest.* wurden die Präparate an der Luft getrocknet und anschließend unter Verwendung von Glycerol-Gelatine eingedeckt. (Dr. Hollborn & Söhne GmbH & Co.KG).

2.2.4.4 Von Kossa Silberfärbung der Aortenklappe

Die von Kossa Silberfärbung zur Visualisierung der Kalzifizierungen in der Aortenklappe erfolgte adäquat zu der Beschreibung in Studie I, siehe Absatz 2.1.6.1.

2.2.4.5 Aufnahme und Auswertung der histologischen Färbungen

Die Aufnahme der Bilder der histologischen Schnitte erfolgte gemäß der Beschreibung aus Studie I, siehe Absatz 2.1.6.2. Die Auswertung erfolgte in Abhängigkeit der Färbemethode. Es wurde immer die Aortenklappengesamtfläche und Lumenfläche bestimmt. Die Differenz aus Aortenklappengesamtfläche und Lumenfläche bildete die Aortenklappengewebefläche. In den von Kossa gefärbten Schnitten wurde zusätzlich die Kalzifizierungsfläche bestimmt. Die Kalzifizierungen wurden anschließend als prozentualer Anteil am Aortenklappengewebe berechnet. Bei der Öl-Rot-O Färbung wurde zum einen der Läsionsanteil vermessen und der Anteil der Öl-Rot-O gefärbten Lipide im Aortenklappenquerschnitt bestimmt.

Für jedes Tier erfolgte die Berechnung des Mittelwertes aus den Messwerten der drei ausgewerteten Gewebeschnitte.

2.2.5 Analysen im Herzmuskelhomogenat

2.2.5.1 Erstellen des Proteinlysats

Die Hälfte einer Herzspitze wurde mit 250 µl *radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA)-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 % Trition-X-100, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % Natriumdodecylsulfat) versetzt. Dem RIPA-Puffer wurde ein Protease Inhibitor Cocktail (100X) #5871 (Cell Signaling Technology, MA, USA) in einer finalen Konzentration von 1x zugesetzt. Der Aufschluss erfolgte in einer Schwingmühle (MM 400 Retsch GmbH, Haan, Deutschland) mit einer Stahlkugel bei 17,5 Hz für 3 min. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 16.000 x g und 4°C für 10 min. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) nach den Vorgaben des Herstellers für die Mikrotiterplattenprozedur. Die Lysate wurden für die Analyse 1:75 mit Reinstwasser verdünnt.

2.2.5.3 Bestimmung der IGF1 Konzentration

Die Bestimmung der IGF1 Konzentration im Proteinlysate der Herzspitze erfolgt mittels Quantikine® ELISA Mouse/Rat IGF-I Immunoassay #MG100 (R&D Systems, Inc. MN, USA) gemäß den Angaben des Herstellers für Gewebekomogenate. Eine Kreuzreaktion mit RIPA wurde durch vorherige Tests ausgeschlossen. Die Proben wurden zur Analyse 1:8 verdünnt. Die ermittelten Konzentrationen wurden auf die eingesetzte Proteinmenge normalisiert.

Tabelle 6: Übersicht der in Studie II verwendeten Antikörper zur Detektion der Proteinexpression mittels Western Blots.

Protein	Bezeichnung ^{Hersteller}	UniProt Zugriffsschlüssel	Molekül- masse [kD]	Konzen- tration	Inkubation	Blockier- lösung	Transfer	Protein- menge [µg]
<i>Primär-Antikörper</i>								
IR	Insulinrezeptor Rabbit mAb #3025 ¹	B8Q3N4 (B8Q3N4_MOUSE)	95	1:1000 in 5% BSA in TBST	18 h, 4°C	5% MP in TBST	1,5 h, 250 mA, 4°C	20
IGF1R	IGF-1 Receptor β (D23H3) XP® Rabbit mAb #9750 ¹	Q60751 (IGF1R_MOUSE)	95	1:1000 in 5% BSA in TBST	18 h, 4°C	5% MP in TBST	1,5 h, 250 mA, 4°C	100
pIR-IGF1R	phosphorylierter insulin- like growth factor-1 receptor bzw. Insulinrezeptor (Tyr1150/1151) (19H7) ¹	Phospho-IGF-1 Receptor β (Tyr1135/1136)/ (B8Q3N4_MOUSE) bzw. Q60751(IGF1R_MOUSE)	95	1:1000 in 5% BSA in TBST	18 h, 4°C	5% MP in TBST	1,5 h, 250 mA, 4°C	100
Akt1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase #2938 ¹	AKT1 (C73H10) Rabbit mAb P31750 (AKT1_MOUSE)	60	1:1000 in 3% BSA in TBST	2 h, RT	3% BSA in TBST	45 min, 350 mA, RT	20
pAkt1	Phosphorylierte RAC- alpha serine/threonine- protein kinase (Akt1 Specific) #9018 ¹	Phospho-Akt1 (Ser473) (D7F10) XP® Rabbit mAb (AKT1_MOUSE)	60	1:1000 in 3% BSA in TBST	2 h, RT	3% BSA in TBST	45 min, 350 mA, RT	20
bAktin	Actin, cytoplasmic 1 [AC-15] (ab6276) ²	Anti-beta Actin antibody (ACTB_MOUSE)	42	1:2000 in 3% MP in TBST	1 h, RT	3% MP in TBST	45 min, 350 mA, RT	20
GAPDH	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	GAPDH (D16H11) XP® Rabbit mAb #5174 ¹	37	1:2000 in 3% MP in TBST	1 h, RT	3% MP in TBST	45 min, 350 mA, RT	20
<i>Sekundär-Antikörper</i>								
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074 ¹		-	-	1:2000 in TBST*	1 h, RT	-	-	-
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076 ¹		-	-	1:2000 in TBST	1 h, RT	-	-	-

*für IR, IGF1R, pIGF1R/pIR in Blockierlösung gelöst; Bovines Serumalbumin (BSA); Milchpulver (MP); Raumtemperatur (RT); Tris-buffered saline with Tween20 (TBST)

¹ Cell Signaling Technology Europe, B.V., Frankfurt, Deutschland, ² Abcam Plc, Cambridge, UK

2.2.5.4 Analyse mittels Western Blot

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Dazu wurde eine adäquate Menge der Probe mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben in Abhängigkeit der Proteingröße im 10-12 % SDS-Gel bei 130 V aufgetrennt (Zusammensetzung SDS-Gel, siehe Tabelle 7). Als Proteinstandard diente der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 170 kDa #26616* (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA).

Tabelle 7: Zusammensetzung des 10 %igen SDS-Gels

Reagenz in µl	Trenngel 10 %	Sammelgel 5 %
Acrylamid 40 %	3000	375
Puffer	2500	75,0
SDS 10 %	100	30,0
<i>Aqua dest.</i>	4296	1811
TEMED	4,00	4,00
APS 10 %	100	30,0
Summe	10000	3000

Ammoniumpersulfat (APS), Natriumdodecylsulfat (SDS), N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Für den Nachweis der spezifischen Proteine mittels entsprechender Antikörper wurden die aufgetrennten Proteine über das *Wet-Blot*-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham Protran 0.45 NC *nitrocellulose Western Blotting membranes* (0,45 µm Porengröße) GE *Healthcare Europe* GmbH, Freiburg, Deutschland) transferiert. Die Stromstärke und Zeit waren abhängig vom untersuchten Protein. Zur Visualisierung der Proteine wurde die Membran mit *PonceauS* (Carl Roth GmbH) angefärbt und die Nitrocellulose Membran oberhalb der 72 kDa und unterhalb der 55 kDa Markierung geschnitten, und zusätzlich oberhalb der 50 kDa und unterhalb der 35 kDa Markierung. Anschließend wurde die Membran zum Entfärben mit Wasser und 1x *Tris-buffered saline with Tween20* (TBST-Puffer) gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Membranen für 30 min bei RT mit 3-5 % Milchpulver (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) oder 3-5 % BSA (Sigma) in 1x TBST-Puffer geblockt. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit den spezifischen primären Antikörpern. Nach

dreimaligem Waschen (für 5, 10 und 5 min) in 1x TBST-Puffer erfolgte die Inkubation der Membranen mit den Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*; HRP) gekoppelten sekundären Antikörpern. Daran schloss sich wiederum ein dreimaliges Waschen der Membranen an. Die verwendeten Antikörper und Modifikationen des *Western Blots* sind Tabelle 6 zu entnehmen, alle verwendeten Lösungen Tabelle 8.

Tabelle 8: Übersicht über die in Studie II verwendeten Puffer in der *Western Blot* Detektion

Puffer	Zusammensetzung
RIPA-Puffer (pH 7,5)	150 mM NaCl 50,0 mM Tris-HCl 1,00 % Triton X-100 (w/v) 0,50 % Natriumdesoxycholat (w/v) 0,10 % Natriumdodecylsulfat (w/v)
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,50 M Tris-HCl
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	1,00 M Tris-HCl
Probenpuffer	4,00 % Glycerin (w/v) 2,30 % Natriumdodecylsulfat (w/v) 12,5 % Sammelgelpuffer (v/v) 5,00 % Mercaptoethanol (v/v) 0,04% Bromphenolblau (w/v)
Laufpuffer für SDS-PAGE (pH 8,3)	25,0 mM Tris-HCl 150 mM Glycin 1,00 % SDS (w/v)
Transferpuffer (pH 8,3)	25,0 mM Tris-HCl 150 mM Glycin 10,0 % Methanol (v/v)
PonceauS-Lösungen	0,10 % PonceauS (w/v) 5,00 % Essigsäure (v/v)
TBST-Puffer (pH 7,5)	1,00 mM Tris-HCl 200 mM NaCl 0,10 % Tween 20 (w/v)

Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA), *Tris-buffered saline with Tween20* (TBST)

Zur Detektion der Zielproteine wurden die Membranen mit dem GE Healthcare Amersham™ ECL™ Prime Western-Blot-Detektionsreagenz (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) behandelt und mit einer Chemilumineszenz-*I*mager-Kamera (G:BOX Chemi XT4, Syngene, Cambridge, UK) belichtet und die Aufnahmen mit der Software *GeneSys image acquisition software* angefertigt. Die relativen Proteinexpressionen wurden mit Hilfe des Programms *GeneTools analysis software* (Syngene) ermittelt und mit dem Referenzprotein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert.

2.2.6 Analysen des Lebergewebes

2.2.6.1 Durchführung der Lipidextraktion

Die Extraktion der Lipide aus dem Lebergewebe erfolgte nach der Methode von Hara und Radin, modifiziert nach Eder und Kirchgessner (Hara und Radin 1978; Eder und Kirchgessner 1994). Die Lipide wurden aus 80 mg Leber für 18 h bei RT mit 800 µl einer Hexan-Isopropanol-Lösung (v/v, 3:2) extrahiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Zentrifugation bei RT mit 1000 x g für 10 min und der lipidhaltige Überstand (Lipidextrakt) separiert.

2.2.6.2 Bestimmung des Gesamtlipidanteils

Für die Bestimmung der Gesamtlipide wurden 400 µl des Lipidextraktes in ein zuvor eingewogenes 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und das Hexan-Isopropanol-Extraktionsmittel bis zur Gewichtskonstanz verdampft. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße rückgewogen und die Differenz entsprach dem Gesamtlipidgehalt.

2.2.6.3 Bestimmung der Triacylglycerol- und Cholesterolkonzentration im Leberlipidextrakt

Für die Bestimmung der Triacylglycerolkonzentration wurden 30 µl des Lipidextraktes eingesetzt und für die Bestimmung des Cholesterolgehaltes 25 µl. Das Hexan-Isopropanol-Lösungsmittel wurde abgedampft und 20 µl eines Triton X-100-Chloroform-Gemisches (w/v, 1:1) dem Lipidpellet der Proben bzw. einem entsprechenden Standard zugegeben. Nach Resuspension wurde das Chloroform wiederum verdampft. Der Triacylglycerol- und Cholesterolgehalt wurde mit Hilfe kommerzieller Testkits (Triglyceride FS bzw. Cholesterin FS, DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Deutschland) bestimmt. Als

Standards dienten in Hexan gelöstes Cholesterol mit einer Konzentration von 25 µg/Ansatz oder Sonnenblumenöl mit einer Konzentration von 50 µg/Ansatz. Den Proben bzw. Standards wurden jeweils 1000 µl des Arbeitsreagenz zugesetzt. Nach einer entsprechenden Inkubationsphase wurden jeweils 200 µl auf eine Mikrotiterplatte überführt und die Extinktion bei 492 nm gemessen. Die Analytenkonzentrationen wurden gemäß folgender Formeln berechnet.

$$c_{Cholesterol} = \frac{\Delta E_{Probe}}{\Delta E_{Standard}} \cdot c_{Standard}$$

$$c_{Triacylglycerole} = \frac{\Delta E_{Probe}}{\Delta E_{Standard}} \cdot c_{Standard}$$

$c = \text{Konzentration}, E = \text{Extinktion}$

2.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte mit der Software SPSS 24 (IBM, Armonk, NY, USA). Alle Parameter wurden zunächst auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk getestet und zusätzlich die Quantil-Quantil-Diagramm (QQ-Plots) herangezogen, um die Verteilung auf Normalverteilung zu prüfen. Eine zweifaktorielle Varianzanalyse wurde angewandt, um die Auswirkungen der alimentären Phosphoraufnahme (0,3 % vs. 1,5 %), der Vitamin D Aufnahme (50 I.E. vs. 1000 I.E.) und ihre Wechselwirkungen zu vergleichen. Die Signifikanzgrenze wurde bei $P < 0,05$ gesetzt. Sofern eine signifikante Interaktion zwischen den beiden Faktoren auftrat wurde geprüft, ob es sich um eine ordinale, semidisordinale oder disordinale Wechselwirkung handelte. Bei einer ordinalen Interaktion sind die Haupteffekte beider Faktoren global interpretierbar. Beide Effekte weisen in der jeweilig anderen Faktorstufe den gleichen Trend der Mittelwertdifferenz zu ihrem Haupteffekt auf. Die Wechselwirkung wirkt demnach „verstärkend“ auf die Haupteffekte ein.

Die semidisordinale Interaktion ist eine Form der Interaktion, in welcher nur einer der beiden Haupteffekte global interpretierbar ist. Ein Effekt weist in der

anderen Faktorstufe einen entgegengesetzten Trend der Mittelwertdifferenz zu seinem Haupteffekt auf. Der disordinale Faktor darf nicht mehr interpretiert werden, da es keinen Haupteffekt gibt. Es kommt in diesem Fall auf die Kombination der Faktorstufen an. Der Haupteffekt des ordinalen Faktors darf weiterhin global interpretiert werden. Die disordinale Interaktion hat zur Folge, dass keiner der Haupteffekte der beiden Faktoren global interpretierbar ist. Beide Effekte weisen in der jeweilig anderen Faktorstufe einen entgegengesetzten Trend der Mittelwertdifferenz zu ihrem Haupteffekt auf. Beide Haupteffekte dürfen nicht interpretiert werden, da es keinen Haupteffekt gibt. Relevant sind nur die Faktorstufen in Kombination.

3 Ergebnisse

3.1 Studie I - Charakterisierung der Herzfunktion bei Vitamin D Rezeptor Defizienz

3.1.1 Körperwachstum und Futteraufnahme

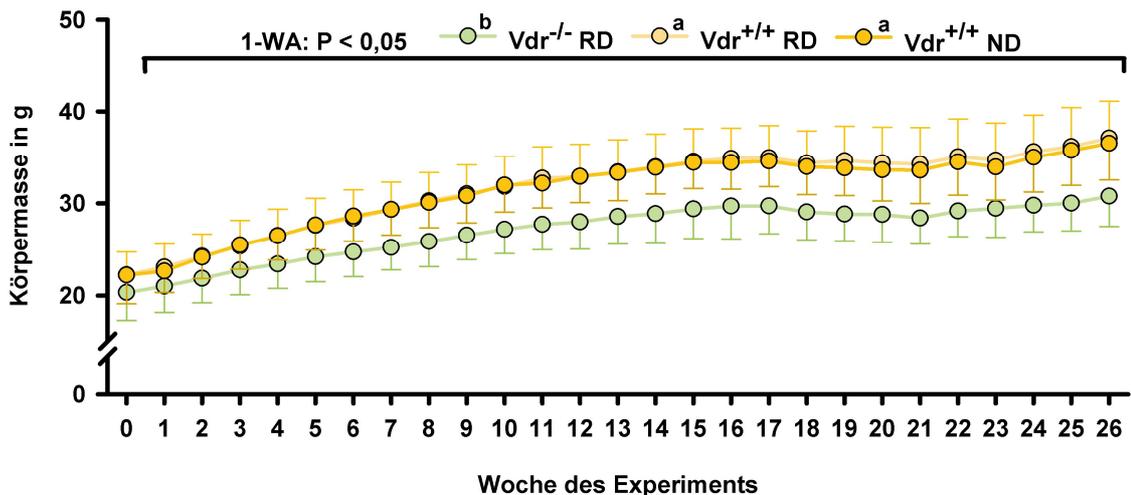


Abbildung 6: Körpermassenentwicklung 8 Wochen alter männlicher Vitamin D Rezeptor *knockout* (Vdr^{-/-}) und Vdr^{+/+} Mäuse über die Studiendauer von 26 Wochen.

Die Mäuse erhielten entweder eine *Rescue Diet* (RD) mit 2,0 % Calcium, 1,25 % Phosphor und 20 % Lactose oder eine Normo Diät (ND) mit 0,5 % Calcium, 0,3 % Phosphor und 20 % Lactose. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (STABW) (n = 14), zur besseren Übersicht wurden für die Gruppen Vdr^{-/-} RD und Vdr^{+/+} ND nur die negative STABW abgebildet und für Vdr^{+/+} RD nur der positive Wert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfacher Varianzanalyse (1-WA). Unterschiedliche Hochbuchstaben indizieren signifikante Unterschiede (P < 0,05).

Die Gruppen wiesen zu Versuchsbeginn keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich ihrer Körpermasse auf. Trotz der vergleichbaren Bruttoenergiezufuhr (siehe Tabelle 9) war die Körpermasse in der Vdr^{-/-} Gruppe bereits nach der ersten Versuchswoche signifikant verschieden von den beiden Vdr^{+/+} Gruppen. Dieser signifikante Unterschied blieb über den gesamten Fütterungszeitraum bestehen. Zu Versuchsende war die Vdr^{-/-} Gruppe mit 30,8 g rund 16 % leichter als die Vdr^{+/+} Gruppen mit 37,1 g (Vdr^{+/+} RD) und 36,5 g (Vdr^{+/+} ND). Beide Vdr^{+/+} Gruppen wiesen über den gesamten Zeitraum keine unterschiedlichen Körpermassen auf (siehe Abbildung 6). Die Futteraufnahme der Vdr^{-/-} Mäuse war im Mittel über den gesamten Studienzeitraum signifikant höher als in der Vdr^{+/+} ND Gruppe. Die Vdr^{+/+} RD Gruppe unterschied sich nicht signifikant von den beiden anderen Versuchsgruppen. Der Bruttoenergiegehalt der Diäten war

unterschiedlich (*Rescue Diet*: 16,7 kJ/100 g; Normo Diät: 18,6 kJ/100 g), daher war die Bruttoenergieaufnahme trotz unterschiedlicher Futteraufnahme vergleichbar (siehe Tabelle 9). Neben der Körpermasse war auch die Tibiallänge, als Indikator des Körperwachstums, der $Vdr^{-/-}$ Mäuse signifikant niedriger als die der $Vdr^{+/+}$ Mäuse (Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (STABW) in mm: $Vdr^{-/-}$ RD: $1,72 \pm 0,04^b$; $Vdr^{+/+}$ RD: $1,82 \pm 0,03^a$; $Vdr^{+/+}$ ND: $1,82 \pm 0,02^a$; $P < 0,01$).

Tabelle 9: Mittlere Futter- und Energieaufnahme 34 Wochen alter männlicher Vitamin D Rezeptor *knockout* ($Vdr^{-/-}$) und $Vdr^{+/+}$ Mäuse am Ende der Studiendauer von 26 Wochen.

Parameter	$Vdr^{-/-}$ RD	$Vdr^{+/+}$ RD	$Vdr^{+/+}$ ND	1-WA P-Wert
Mittlere Futteraufnahme in g/Tag pro Tier	$3,16 \pm 0,16^a$	$3,09 \pm 0,31^{ab}$	$2,76 \pm 0,31^b$	< 0,05
Mittlere Energieaufnahme in kJ/Tag pro Tier	$52,7 \pm 2,7$	$51,7 \pm 5,1$	$51,4 \pm 5,8$	ns

Die Mäuse erhielten entweder eine *Rescue Diet* (RD) mit 2,0 % Calcium, 1,25 % Phosphor und 20 % Lactose oder eine Normo Diät (ND) mit 0,5 % Calcium, 0,3 % Phosphor und 20 % Lactose. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 14). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfacher Varianzanalyse (1-WA). Unterschiedliche Hochbuchstaben indizieren signifikante Unterschiede ($P < 0,05$). Nicht signifikant (ns).

3.1.2 Ausgewählte Serumparameter der Calcium- und Phosphorhomöostase

Die Analyse ausgewählter Serumparameter des Calcium- und Phosphorhaushaltes zeigt, dass der Calciumspiegel der $Vdr^{-/-}$ Mäuse um fast 20 % niedriger war als der der $Vdr^{+/+}$ Mäuse, während die Konzentrationen von iPTH im Vergleich zu beiden $Vdr^{+/+}$ Gruppen um den Faktor 8 ($Vdr^{+/+}$ RD) bzw. 11 ($Vdr^{+/+}$ ND) höher waren. Die Serumkonzentration an anorganischem Phosphat war in der $Vdr^{+/+}$ RD Gruppe um 7 % erhöht im Vergleich zur $Vdr^{-/-}$ RD bzw. $Vdr^{+/+}$ ND Gruppe. Hier führte die *Rescue Diet* im Vergleich zur Normo Diät zu einem Anstieg der Serumkonzentration im $Vdr^{+/+}$ Modell. Die iFGF23 Serumkonzentration war in den zwei Gruppen, die die *Rescue Diet* mit hohem Phosphorgehalt erhielten, um rund 65 % ($Vdr^{+/+}$ RD) bzw. 50 % ($Vdr^{-/-}$ RD) im Vergleich zur $Vdr^{+/+}$ ND Gruppe reduziert, wobei die iFGF23 Konzentration im Serum der $Vdr^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu den beiden $Vdr^{+/+}$ Gruppen am geringsten war. Ein signifikanter Unterschied trat auch zwischen den beiden Gruppen auf, die eine *Rescue Diet* erhielten (siehe Abbildung 7). Auch der Parameter iFGF23 wurde im $Vdr^{+/+}$ Modell durch die *Rescue Diet* im

Ergebnisse

Vergleich zur Normo Diät signifikant reduziert. Bei den Parametern anorganisches Phosphat und iFGF23 zeigt die *Rescue Diet* im Vergleich zu Normo Diät einen signifikanten Einfluss im $Vdr^{+/+}$ Tiermodell.

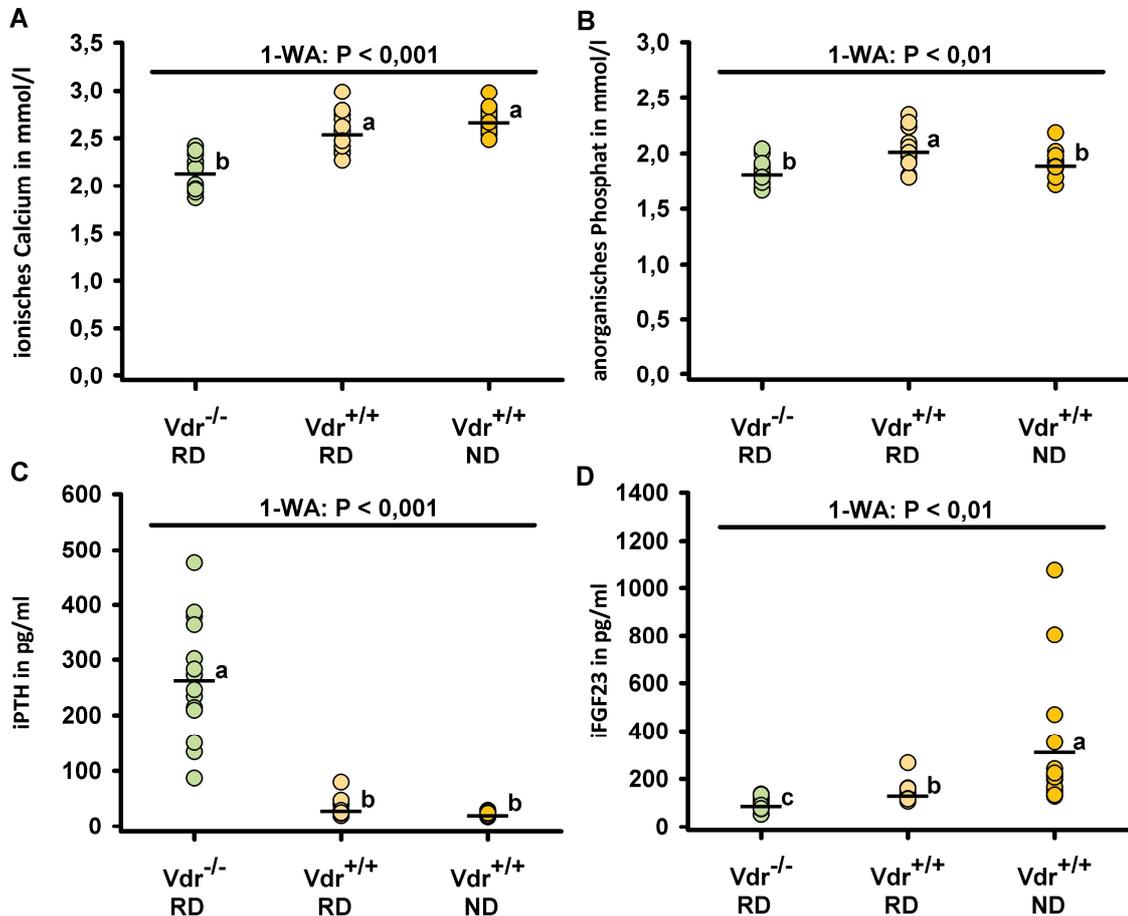


Abbildung 7: Serumkonzentrationen von (A) ionischem Calcium, (B) anorganischem Phosphat, (C) intaktem Parathormon (iPTH) und (D) intaktem Fibroblasten Wachstumsfaktor 23 (iFGF23) 34 Wochen alter männlicher Vitamin D Rezeptor *knockout* ($Vdr^{-/-}$) und $Vdr^{+/+}$ Mäuse am Ende der Studiendauer von 26 Wochen.

Die Mäuse erhielten entweder eine *Rescue Diet* (RD) mit 2,0 % Calcium, 1,25 % Phosphor und 20 % Lactose oder eine Normo Diät (ND) mit 0,5 % Calcium, 0,3 % Phosphor und 20 % Lactose. Dargestellt sind Einzel- (\circ) und Mittelwerte ($-$) ($n = 14$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer einfachen Varianzanalyse (1-WA). Unterschiedliche Hochbuchstaben indizieren signifikante Unterschiede ($P < 0,05$).

3.1.3 Serumparameter Renin und BNP, sowie systolischer Blutdruck und Pulsfrequenz

Die Bestimmung des Serumparameters Renin zeigte für die $Vdr^{-/-}$ RD Gruppe signifikant erhöhte Konzentrationen im Vergleich zu den beiden $Vdr^{+/+}$ Gruppen.

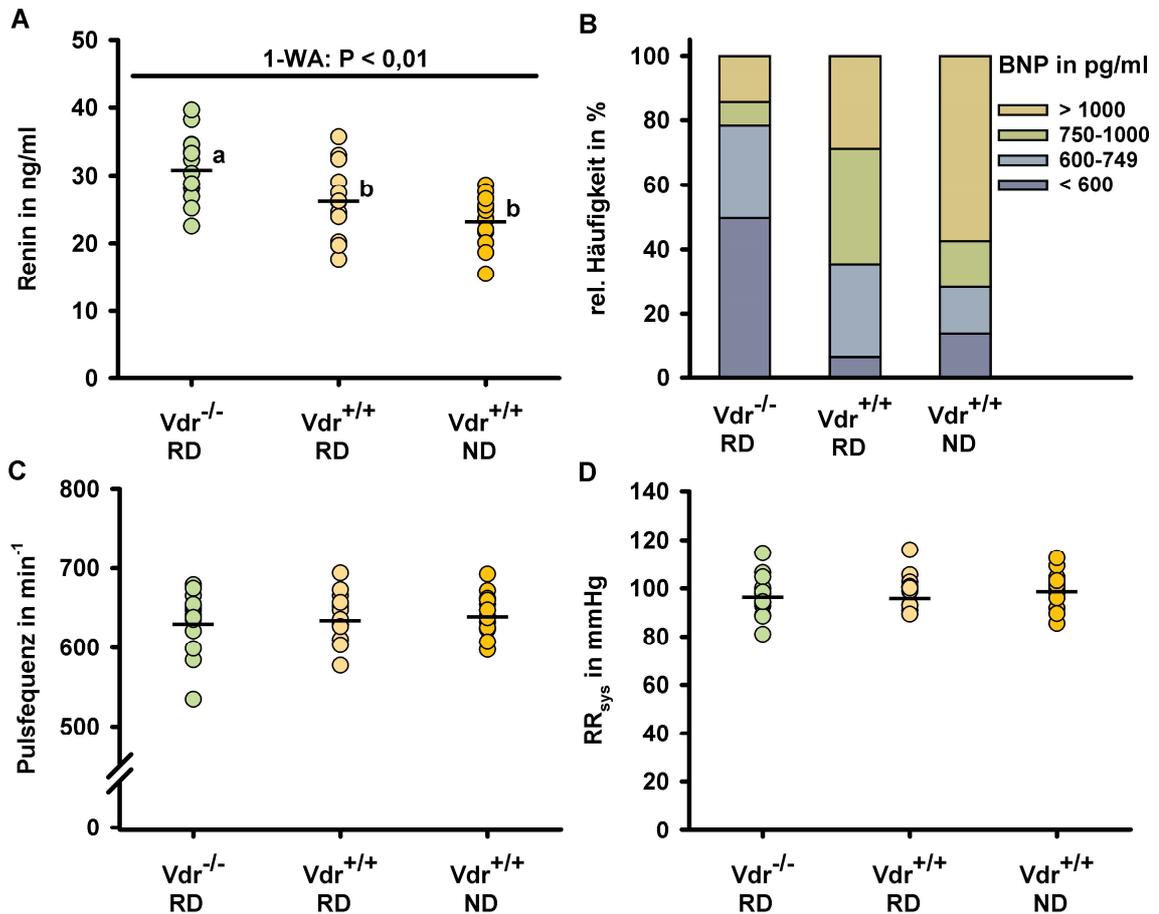


Abbildung 8: (A) Reninkonzentration und (B) klassierte Konzentration des B-natriuretisches Peptids (BNP) im Serum 34 Wochen alter männlicher Vitamin D Rezeptor *knockout* ($Vdr^{-/-}$) und $Vdr^{+/+}$ Mäuse am Ende der Studiendauer von 26 Wochen, sowie deren (C) Pulsfrequenz und (D) systolischer Blutdruck (RR_{sys}) im Alter von 28 Wochen.

Die Mäuse erhielten entweder eine *Rescue Diet* (RD) mit 2,0 % Calcium, 1,25 % Phosphor und 20 % Lactose oder eine Normo Diät (ND) mit 0,5 % Calcium, 0,3 % Phosphor und 20 % Lactose. Dargestellt sind Einzel- (o) und Mittelwerte (—) (n = 14). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer einfachen Varianzanalyse (1-WA). Unterschiedliche Hochbuchstaben indizieren signifikante Unterschiede (P < 0,05).

Aufgrund der teilweisen sehr hohen Konzentrationen an BNP, war die Spannweite der Standardreihe des Analyseverfahrens nicht ausreichend und die Daten ließen sich nur klassiert darstellen. Es wird jedoch deutlich, dass der Anteil mit BNP Spiegeln > 1000 pg/ml in der $Vdr^{+/+}$ ND Gruppe verglichen mit $Vdr^{-/-}$ RD und $Vdr^{+/+}$ RD mit über 50 % am höchsten ist. In der $Vdr^{-/-}$ RD Gruppe hingegen wiesen lediglich 15 % der Mäuse Werte auf die > 1000 pg/ml waren.

Der Anteil mit Werten < 600 pg/ml war in dieser Gruppe mit rund 50 % am höchsten. In der $Vdr^{+/+}$ RD Gruppe waren die Messwerte in den Klassen 600-749 pg/ml, 750-1000 pg/ml und > 1000 pg/ml gleichmäßig verteilt. Lediglich 7 % dieser Gruppe wiesen eine Serumkonzentration < 600 pg/ml auf. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ließen sich bezüglich des systolischen Blutdrucks und der Pulsfrequenz feststellen (siehe Abbildung 8). Der Blutdruck lag bei allen Versuchsgruppen bei etwa 100 mmHg und die Pulsfrequenz bei 638 Schlägen pro Minute.

3.1.4 Herzmorphologie und –funktion

Die Untersuchung des Herz- und Lungengewichts normalisiert auf die Tibialänge zeigte, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei untersuchten Gruppen gab. Lediglich das Herzgewicht normalisiert auf das Körpergewicht war in der $Vdr^{-/-}$ Gruppe im Vergleich zu den beiden $Vdr^{+/+}$ Gruppen signifikant höher. Auch die Analyse der Herzmorphologie mittels transthorakaler Echokardiographie hat ergeben, dass sich die $Vdr^{-/-}$ Mäuse nicht von den $Vdr^{+/+}$ Mäusen unterscheiden. Gleiches gilt für die Parameter der Herzfunktion: FS, EF und LVWT, auch hierin war die $Vdr^{-/-}$ Gruppe mit beiden $Vdr^{+/+}$ Gruppen vergleichbar. Bei der Analyse der gerichteten Blutströme in der auf- und absteigenden Aorta zeigte sich gleichfalls kein Einfluss des Vdr *knockouts* im Vergleich zu den $Vdr^{+/+}$ Gruppen. Auf alle genannten Parameter zeigte auch die *Rescue Diet* im Vergleich zur Normo Diät keinen Einfluss (siehe Tabelle 10).

Ergebnisse

Tabelle 10: Normalisiertes Herz- und Lungengewicht 34 Wochen alter männlicher Vitamin D Rezeptor *knockout* (Vdr^{-/-}) und Vdr^{+/+} Mäuse am Ende der Studiendauer von 26 Wochen, sowie echokardiographische Parameter der Herzdimensionen und der Herzfunktion im Alter von 30 Wochen.

Parameter	Vdr ^{-/-} RD	Vdr ^{+/+} RD	Vdr ^{+/+} ND	1-WA P-Wert
<i>in mg/g</i>				
Herz-/Körpergewicht	4,43 ± 0,36 ^a	3,83 ± 0,42 ^b	3,70 ± 0,43 ^b	< 0,001
<i>in mg/mm</i>				
Herzgewicht/Tibiallänge	7,87 ± 0,30	7,76 ± 0,95	7,37 ± 0,54	ns
Lungengewicht/Tibiallänge	8,31 ± 0,59	8,27 ± 0,66	7,88 ± 0,54	ns
<i>in mm</i>				
IVS;d	0,99 ± 0,31	1,03 ± 0,20	1,01 ± 0,18	ns
IVS;s	1,34 ± 0,29	1,40 ± 0,29	1,41 ± 0,23	ns
LVID;d	3,49 ± 0,44	3,47 ± 0,48	3,40 ± 0,44	ns
LVID;s	2,29 ± 0,42	2,19 ± 0,52	2,14 ± 0,41	ns
LVPW;d	1,00 ± 0,38	1,11 ± 0,34	1,05 ± 0,39	ns
LVPW;s	1,38 ± 0,36	1,49 ± 0,31	1,40 ± 0,36	ns
<i>in %</i>				
FS	34,6 ± 7,2	37,7 ± 7,7	37,4 ± 6,7	ns
EF	64,1 ± 9,3	68,1 ± 9,7	68,1 ± 8,2	ns
LVWT	45,7 ± 19,0	37,7 ± 15,1	41,0 ± 19,2	ns
<i>in mm/s</i>				
Asc Ao V	1410 ± 331	1273 ± 308	1167 ± 398	ns
Desc Ao V	-730 ± 173	-771 ± 246	-689 ± 182	ns

Die Mäuse erhielten entweder eine *Rescue Diet* (RD) mit 2,0 % Calcium, 1,25 % Phosphor und 20 % Lactose oder eine Normo Diät (ND) mit 0,5 % Calcium, 0,3 % Phosphor und 20 % Lactose. Angaben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 14). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer einfachen Varianzanalyse (1-WA) mit einem Signifikanzniveau von P < 0,05. Unterschiedliche Hochbuchstaben indizieren signifikante Unterschiede. Nicht signifikant (ns), interventrikuläre Septumdicke (IVS), linksventrikulärer Innendurchmesser (LVID), linksventrikuläre posteriore Wanddicke (LVPW) jeweils in Systole (s) und Diastole (d), Verkürzungsfraction (FS), Auswurfraction (EF), linksventrikuläre Wandverdickung (LVWT); Pulswellengeschwindigkeit in auf- (Asc Ao V) und absteigenden (Desc Ao V) Aorta.

3.1.5 Kalzifizierungen der Aortenklappe

Die histologische Untersuchung der Aortenklappe auf Kalzifizierungen zeigte, dass der Kalzifizierungsanteil im Aortenklappengewebe in der $Vdr^{-/-}$ RD Gruppe im Vergleich zu den beiden $Vdr^{+/+}$ Gruppen nicht signifikant verschieden war. Auch die unterschiedlichen gefütterten Diäten in den beiden Kontrollgruppen zeigten keinen Einfluss auf den Kalzifizierungsanteil (siehe Abbildung 9). Der Kalzifizierungsanteil lag im Mittel für alle Versuchsgruppen bei 1 %.

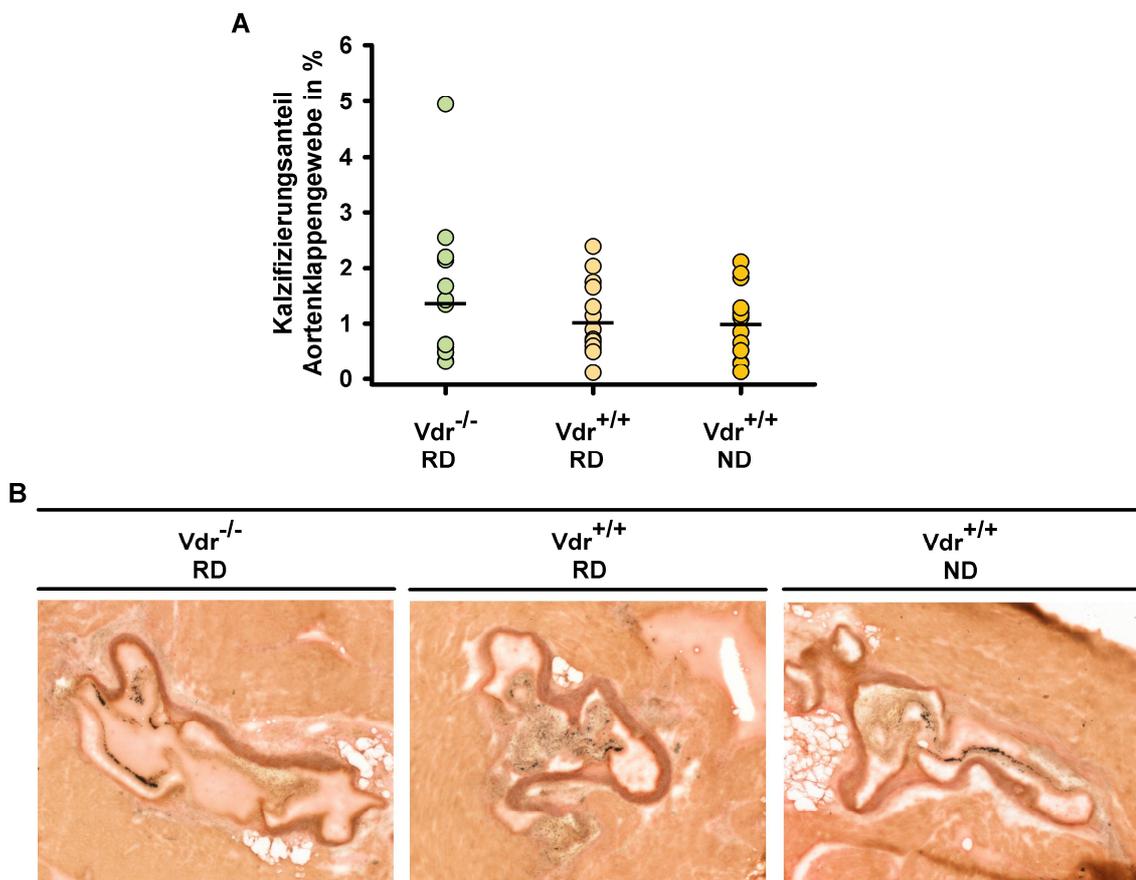


Abbildung 9: (A) Kalzifizierungsanteil der Aortenklappen, sowie (B) repräsentative Bilder der histologischen Präparate der Aortenklappen, die mittels von Kossa Silberfärbung gefärbt wurden, 34 Wochen alter männlicher Vitamin D Rezeptor *knockout* ($Vdr^{-/-}$) und $Vdr^{+/+}$ Mäuse am Ende der Studiendauer von 26 Wochen.

Die Mäuse erhielten entweder eine *Rescue Diet* (RD) mit 2,0 % Calcium, 1,25 % Phosphor und 20 % Lactose oder eine Normo Diät (ND) mit 0,5 % Calcium, 0,3 % Phosphor und 20 % Lactose. Dargestellt sind Einzel- (\circ) und Mittelwerte ($-$) ($n = 14$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer einfachen Varianzanalyse (1-WA) mit einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$.

3.2 Studie II - Einfluss von Vitamin D und Phosphor auf die Atherogenese

3.2.1 Futter-, Energieaufnahme und Entwicklung der Körpermasse

Die 17 wöchige Fütterung mit einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder bedarfsüberschreitenden (1,5 %) Mengen Phosphor führte in den exzessiv mit Phosphor versorgten Gruppen zu einem signifikant niedrigeren Körpergewicht ab der 11. Fütterungswoche (siehe Abbildung 10).

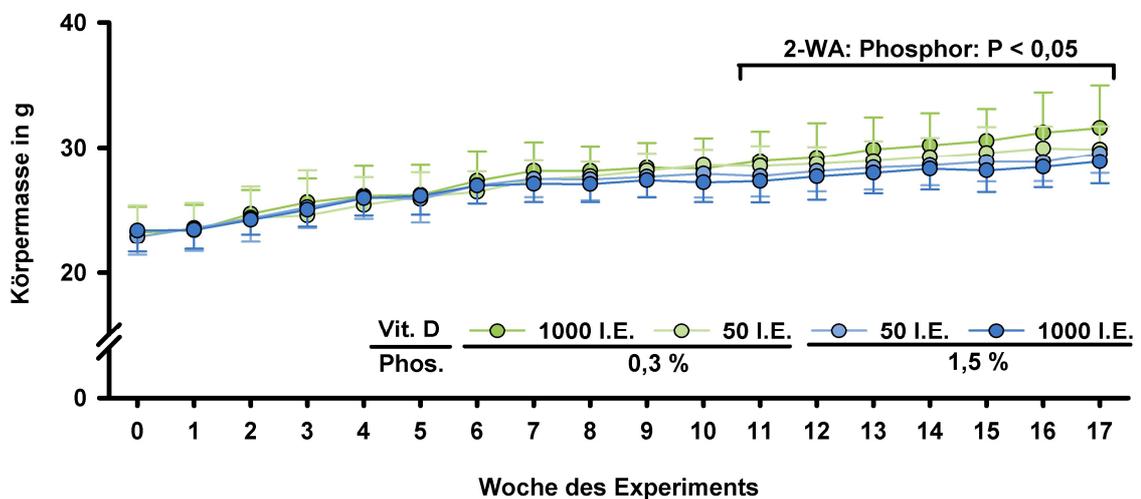


Abbildung 10: Entwicklung der Körpermasse 9 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout* (*Ldlr^{-/-}*) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.

Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (STABW), zur besseren Übersicht sind für die 0,3 % Phosphor Gruppen nur die positive STABW abgebildet und für die 1,5 % Phosphor Gruppen nur die negative STABW (n=14). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (2-WA) mit den Klassifikationsfaktoren Phosphor und Vitamin D sowie ihrer Wechselwirkung, mit einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$.

Die Tibialänge als Indikator für das Körperwachstum unterschied sich zwischen den untersuchten Gruppen nicht signifikant (MW \pm STABW in mm: 0,3 %: $17,8 \pm 0,3$ (50 I.E.); $17,9 \pm 0,3$ (1000 I.E.); 1,5 %: $18,0 \pm 0,3$ (50 I.E.); $18,0 \pm 0,3$ (1000 I.E.)). Die mittlere Futteraufnahme war über den Zeitraum von 17 Wochen bezogen auf den Faktor Phosphor in den 1,5 % P Gruppen signifikant niedriger als in der 0,3 % P Gruppen. Da der Phosphorgehalt in der Diät einen starken Einfluss auf die Konsistenz hatte, wurden in den letzten drei Studienwochen zusätzlich die Diätreste in der Einstreu ermittelt und die

mittlere Futteraufnahme um die Rückstände in der Einstreu korrigiert. Die Differenz in der mittleren Futteraufnahme für den Faktor Phosphor sinkt dadurch von 0,83 g auf 0,35 g/Tag pro Maus, bleibt aber weiterhin signifikant verschieden.

Tabelle 11: Mittlere Futteraufnahme 9 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout* (Ldlr^{-/-}) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.

Parameter	Phosphor				2-WA P-Wert		
	0,3 %		1,5 %		Phos.	Vit. D	Vit. D x Phos.
	Vitamin D						
	50 I.E.	1000 I.E.	50 I.E.	1000 I.E.			
Mittlere Futteraufnahme in g/Tag pro Tier	3,40 ± 0,19	3,29 ± 0,11	2,53 ± 0,10	2,51 ± 0,06	< 0,001	ns	ns
Korrigierte mittlere Futteraufnahme in g/Tag pro Tier	2,81 ± 0,31	2,84 ± 0,52	2,46 ± 0,41	2,49 ± 0,50	< 0,01	ns	ns

Angaben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 7). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (2-WA) (Signifikanzniveau P < 0,05) mit den Klassifikationsfaktoren Phosphor und Vitamin D sowie ihrer Wechselwirkung. nicht signifikant (ns).

3.2.2 Ausgewählte Serumparameter der Calcium- und Phosphorhomöostase

Hinsichtlich der Serumparameter der Calcium- und Phosphorhomöostase konnten deutlich signifikante Unterschiede für iPTH und iFGF23 nachgewiesen werden. Die iPTH Spiegel waren in den 1,5 % P Gruppen etwa dreifach höher als in den adäquat mit Phosphor versorgten Gruppen. Ähnliches gilt für die Serumkonzentration von iFGF23. Diese wurde durch die Fütterung der 1,5 % P Diäten im Vergleich zur Fütterung der 0,3 % P Diäten auf das 6,5 fache erhöht. Im Gegenzug wurde der Calciumspiegel durch die Fütterung der 1,5 % P Diäten signifikant reduziert. Unbeeinflusst blieben die Serumkonzentrationen des anorganischen Phosphats der Versuchstiere, hier lagen die Serumkonzentrationen im Mittel bei rund 2,00 mmol/l (siehe Abbildung 11).

Ergebnisse

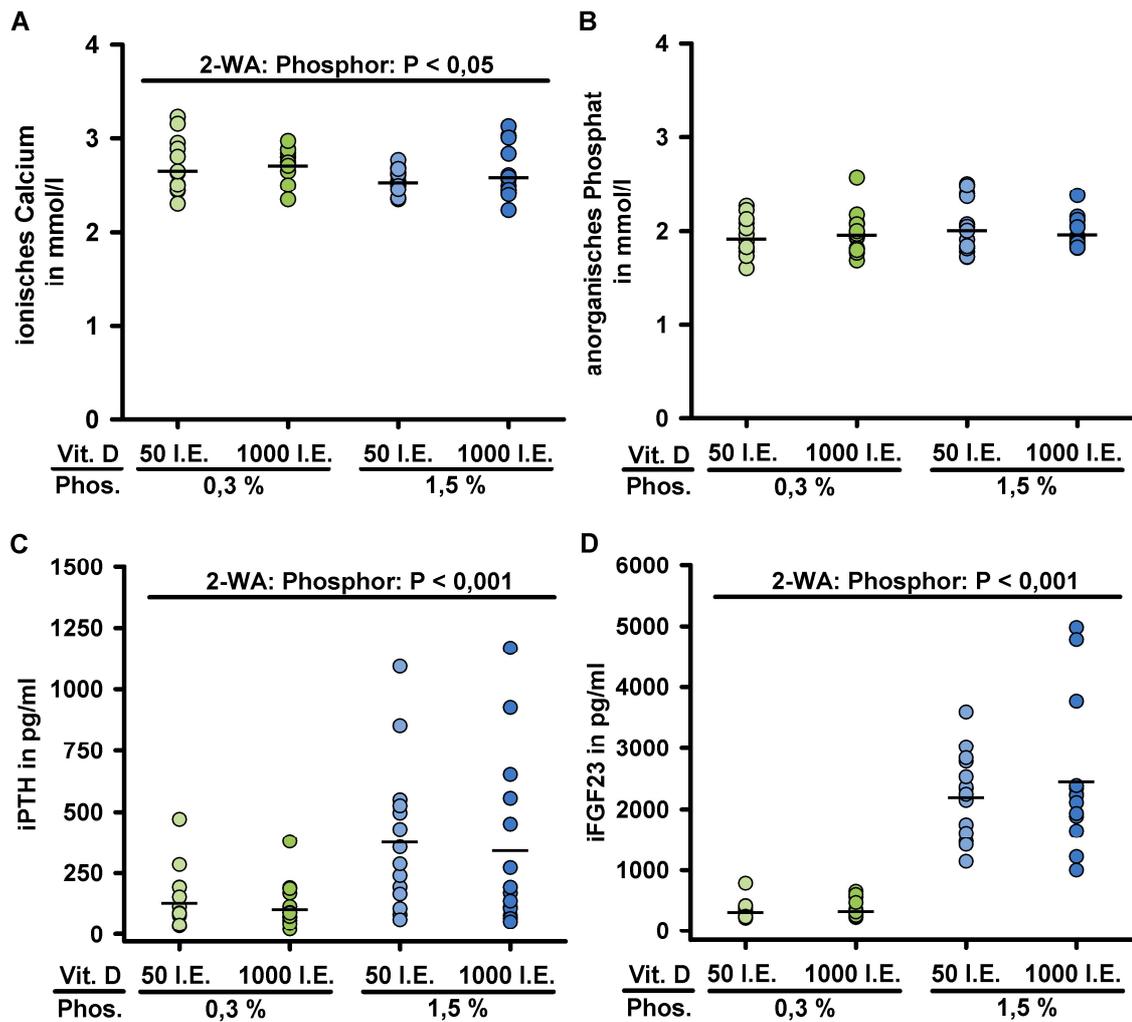


Abbildung 11: Serumkonzentrationen ausgewählter Parameter der Calcium- und Phosphorhomöostase 25 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout* (*Ldlr*^{-/-}) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.

Gezeigt sind (A) ionisches Calcium, (B) anorganisches Phosphat, (C) intaktes Parathormon (iPTH) und (D) intakter Fibroblasten Wachstumsfaktor 23 (iFGF23). Dargestellt sind Einzel- (○) und Mittelwerte (—) (n = 14). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (2-WA) (Signifikanzniveau P < 0,05) mit den Klassifikationsfaktoren Phosphor und Vitamin D sowie ihrer Wechselwirkung.

Da sowohl PTH als auch FGF23 die Bildung von biologisch aktivem Vitamin D beeinflussen, wurde die Serumkonzentration von 1,25(OH)₂D₃ bestimmt. Es konnten sowohl signifikante Effekte der Faktoren Phosphor und Vitamin D nachgewiesen werden wie auch einen ordinale Wechselwirkung beider Faktoren. Die defizitäre im Vergleich zur bedarfsbedeckenden Vitamin D Versorgung führte zu einem signifikant niedrigeren 1,25(OH)₂D₃ Spiegel sowohl bei der Fütterung der 0,3 % P Diät wie auch bei der Fütterung der 1,5 % P Diät. Eine exzessive Fütterung von Phosphor führte insgesamt zu höheren 1,25(OH)₂D₃ Serumkonzentrationen als bei Fütterung der 0,3 % P Diät. Auch

wurde der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erhöhende Effekt der bedarfsdeckenden Vitamin D Fütterung durch die 1,5 % P Diät deutlich verstärkt. In der 1000 I.E. Vit. D/1,5 % P Gruppe stiegen die Serumkonzentrationen auf das 2,4 fache der 1000 I.E. Vit. D.-0,3 % P Gruppe an (siehe Abbildung 12).

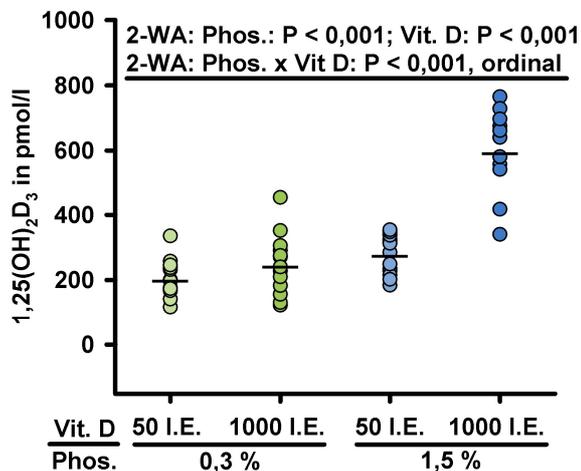


Abbildung 12: $1,25$ -Dihydroxycholecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) Konzentration im Serum 25 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout* ($\text{Ldlr}^{-/-}$) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.

Dargestellt sind Einzel- (\circ) und Mittelwerte ($-$) ($n = 14$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (Signifikanzniveau $P < 0,05$) mit den Klassifikationsfaktoren Phosphor und Vitamin D sowie ihrer Wechselwirkung.

3.2.3 Ausgewählte Parameter des Lipidstoffwechsels

Die Analyse der unterschiedlichen Parameter des Lipidstoffwechsels in der Leber zeigte, dass die 1,5 % P Diät im Vergleich zur 0,3 % P Diät den Anteil der Lipide in der Leber im Mittel um 13 % reduzierte. Die Reduktion der Triacylglycerole betrug im Mittel für den Faktor Phosphor rund 50 %. Bei beiden dieser Parameter kam es zu einer semidisordinalen Interaktion mit dem Faktor Vitamin D. Da der Phosphoreffekt hierbei unabhängig von der Stufe des Faktors Vitamin D immer zu einer Reduktion des Lipid- bzw. Triacylglycerolanteils in der Leber führte, bleibt der Haupteffekt von Phosphor interpretierbar. Der Effekt von Vitamin D ist jedoch abhängig von der Faktorstufe Phosphor. Verglichen mit der bedarfsdeckenden Diät, führt die Vitamin D defizitäre Diät in Kombination mit der 0,3 % igen Phosphorfaktorstufe zu einer Reduktion des Lipidanteils in der Leber. In Kombination mit der 1,5 % igen Phosphorfaktorstufe führte die Vitamin D defizitäre Diät zu einer Erhöhung des Lipidanteils. Der Haupteffekt von Vitamin D ist somit statistisch nicht mehr interpretierbar, da er Abhängig vom Faktor Phosphor ist.

Ergebnisse

Tabelle 12: Parameter des Lipidstoffwechsels in der Leber 25 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout* (Ldlr^{-/-}) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.

Parameter in mg/g Leber	Phosphor				2-WA P-Wert		
	0,3 %		1,5 %		Phos.	Vit. D	Vit. D x Phos.
	Vitamin D						
	50 I.E.	1000 I.E.	50 I.E.	1000 I.E.			
Lipide	105 ± 21	126 ± 30	104 ± 18	97 ± 8	< 0,01	ns	< 0,01 semi.
Triacylglycerole	29,5 ± 28,5	52,4 ± 39,9	25,1 ± 17,4	17,0 ± 7,3	< 0,05	ns	< 0,05 semi.
Cholesterol	13,9 ± 7,5	14,3 ± 5,3	9,6 ± 2,0	8,7 ± 1,8	< 0,01	ns	ns

Angaben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 14). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (2-WA) (Signifikanzniveau P < 0,05) mit den Klassifikationsfaktoren Phosphor (Phos.) und Vitamin D (Vit. D.) sowie ihrer Wechselwirkung. Nicht signifikant (ns), semidisordinal (semi)

3.2.4 Atherosklerotische Läsionen in der Aorta und Aortenklappe

Die Untersuchungen der atherosklerotischen Läsionen in der abdominalen Aorta und der Aortenklappe zeigten einen deutlichen Effekt von Phosphor auf die Entwicklung der Atherosklerose. Der Anteil an atherosklerotischen Läsionen in den *en face* eröffneten Aorten ist in den Gruppen, die exzessiv mit Phosphor versorgt wurden signifikant niedriger (6,3 % bzw. 5,5 %) als in den beiden Gruppen, die bedarfsdeckend mit Phosphor versorgt wurden (13,2 % bzw. 11,2 %).

Ein ähnlicher Effekt kann auch im histologischen Schnitt der Aortenklappen nachgewiesen werden. Es tritt jedoch zusätzlich zum Phosphoreffekt eine disordinale Interaktion von Vitamin D und Phosphor auf. Im Vergleich zu einer Vitamin D defizienten Versorgung führt eine adäquate Vitamin D Versorgung in Kombination mit einer adäquaten Phosphorversorgung zu einem höheren Läsionsanteil in der Aortenklappe, in Kombination mit einer Phosphorübersversorgung jedoch zu einem verringerten Läsionsanteil. Daher kann der Haupteffekt von Phosphor nicht mehr statistisch interpretiert werden. Ähnliches gilt für die Fütterung der Diät mit 50 I.E. Vitamin D, hier führte die 50 I.E. Vitamin D Diät in Kombination mit einer adäquaten Phosphor Versorgung zu einem geringeren Läsionsanteil und in Kombination mit einer Phosphorübersversorgung zu einer leichten Erhöhung des Läsionsanteils in der

Aortenklappe. Daher ist auch hier der Haupteffekt von Vitamin D nicht mehr statistisch interpretierbar.

Auch die Betrachtung der absoluten Läsionsfläche zeigte eine Wechselwirkung zwischen den Faktoren Phosphor und Vitamin D. Es handelt sich jedoch um eine semidisordinale Wechselwirkung, bei der Phosphoreffekt global interpretierbar bleibt, da die 1,5% ige P Diät unabhängig von der Vitamin D Faktorstufe immer zu einer Reduktion der Läsionsfläche in der Aortenklappe führt. Die Vitamin D Effekt ist jedoch global nicht interpretierbar, da dieser von der Faktorstufe von Phosphor abhängig ist (MW \pm STABW in mm: 0,3 %: $0,39 \pm 0,14$ (50 I.E.); $0,47 \pm 0,15$ (1000 I.E.); 1,5 %: $0,31 \pm 0,96$ (50 I.E.); $0,22 \pm 0,10$ (1000 I.E.)); Phosphor: $P < 0,001$; Phosphor x Vitamin D: $P < 0,01$, semidisordinal). Der Lipidanteil der atherosklerotischen Läsionen wurde weder durch alimentär zugeführten Phosphor noch durch Vitamin D beeinflusst und lag bei allen Gruppen bei fast 60 % (siehe Abbildung 13).

Ergebnisse

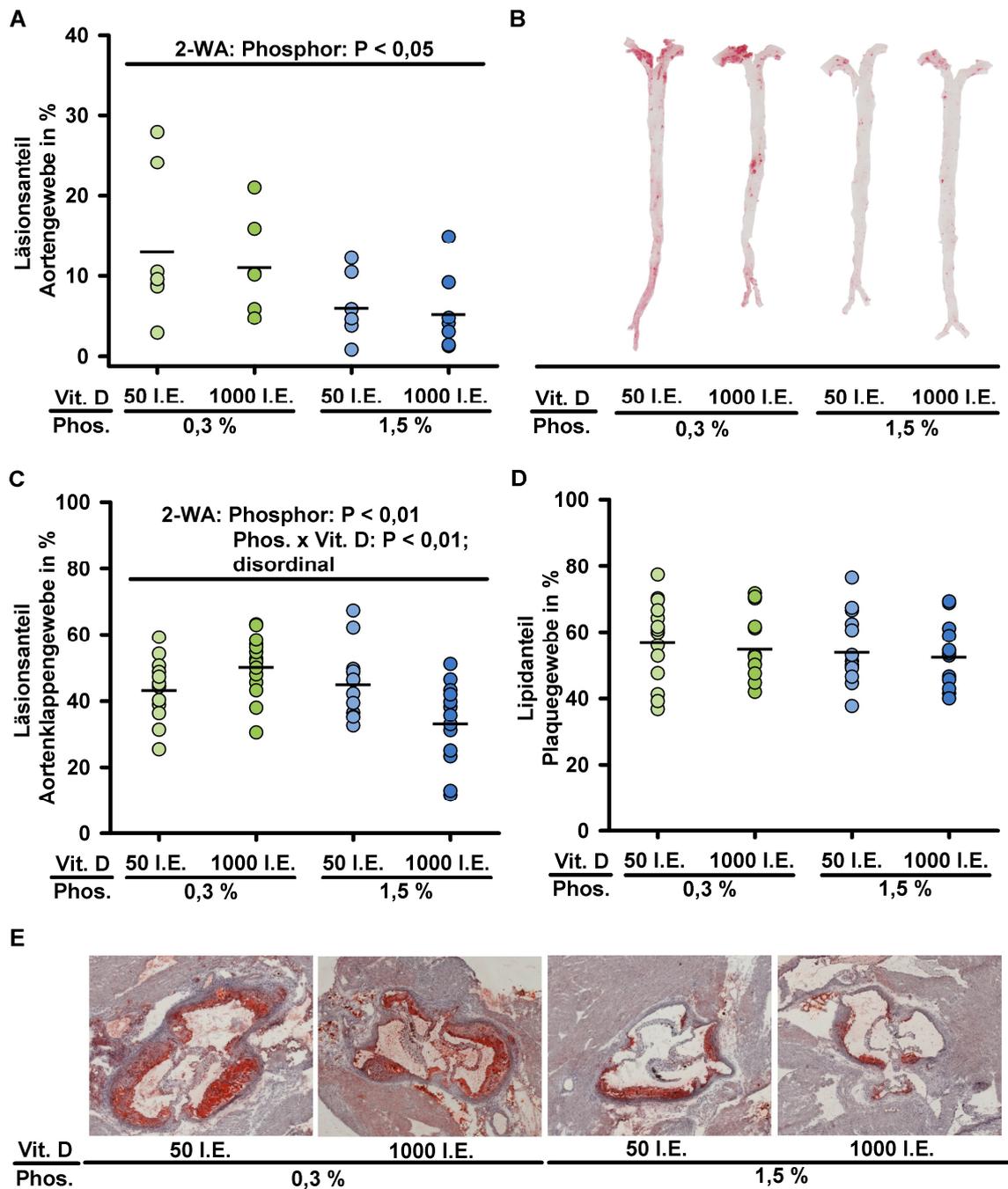


Abbildung 13: Atherosklerotische Läsionen 25 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout* (*Ldlr*^{-/-}) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.

Gezeigt sind (A) der Läsionsanteil des Aortengewebes *en face* eröffneter Aorten, (B) repräsentative Bilder *en face* eröffneter Aorten, deren Läsionen mittels Ölrot O angefärbt wurden, (C) Läsionsanteil des Aortenklappengewebes, (D) Lipidanteil der Läsionen innerhalb der Aortenklappe und (E) repräsentative Bilder der histologischen Schnitte in der Aortenklappenebene, die mittels Ölrot O gefärbt wurden. Dargestellt sind Einzel- (○) und Mittelwerte (–) ($n = 14$ bzw. $n = 7$ für (A)). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer zweifaktorieller Varianzanalyse (Signifikanzniveau $P < 0,05$) mit den Klassifikationsfaktoren Phosphor und Vitamin D sowie ihrer Wechselwirkung.

3.2.5 Kalzifizierungen der Aortenklappe

In der weiteren histologischen Untersuchung auf Kalzifizierungen der Aortenklappe konnte nachgewiesen werden, dass der Kalzifizierungsanteil im Aortenklappengewebe durch die alimentäre Gabe von 1,5 % Phosphor im Vergleich zu 0,3 % Phosphor im Mittel verdoppelt wurde. Dies geht mit einer erhöhten Anzahl der Kalzifizierungsspots $< 100 \mu\text{m}^2$ einher, nicht jedoch mit einem erhöhten Anteil von Kalzifizierungsspots $> 500 \mu\text{m}^2$. Die Serumkonzentration des mit Kalzifizierungsprozessen assoziierten BMP2 wurde durch die alimentäre Fütterung unterschiedlicher Phosphorkonzentrationen nicht signifikant beeinflusst.

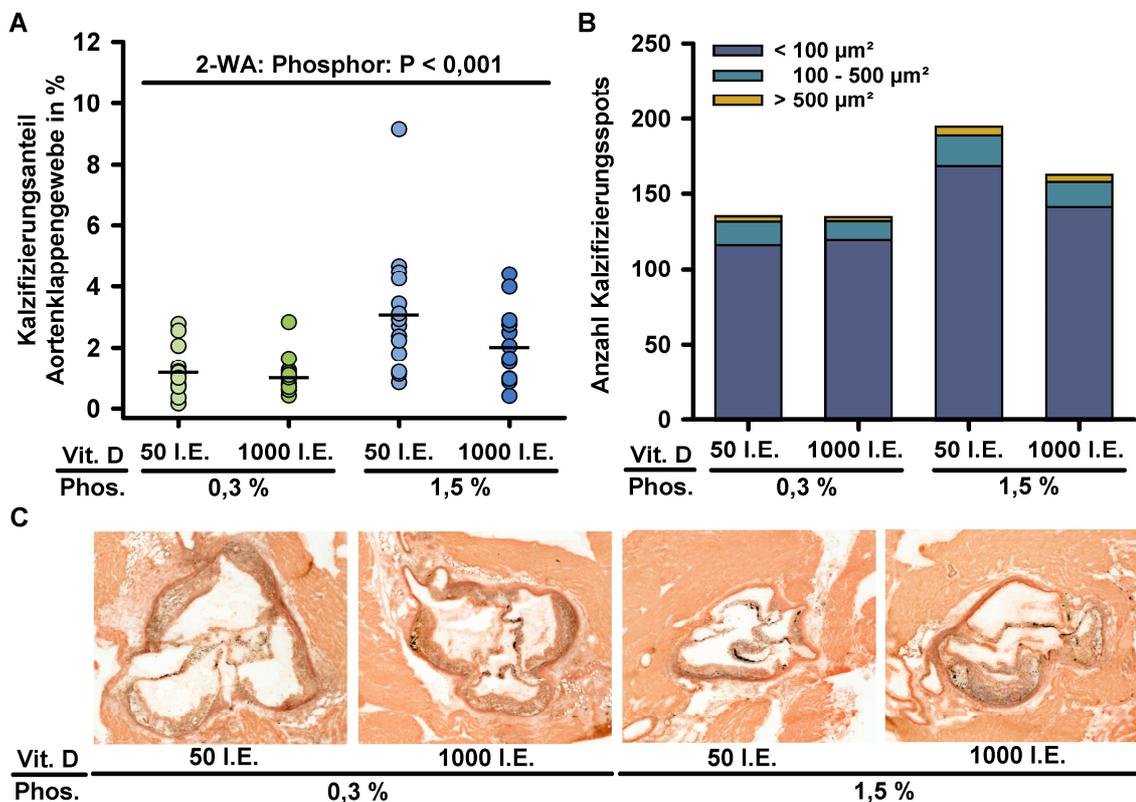
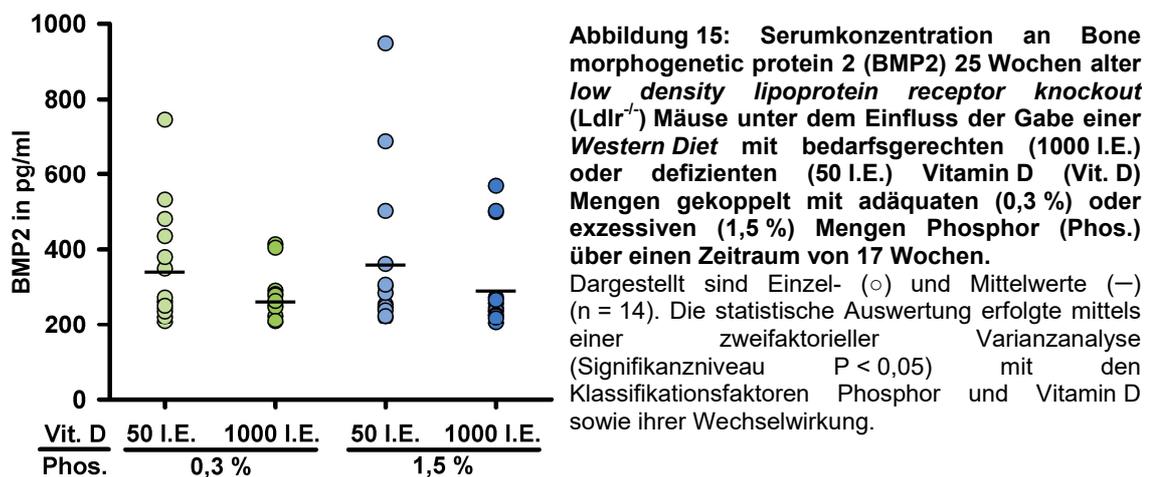


Abbildung 14: Kalzifizierungsanteil der Aortenklappen 25 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout* ($Ldlr^{-/-}$) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.

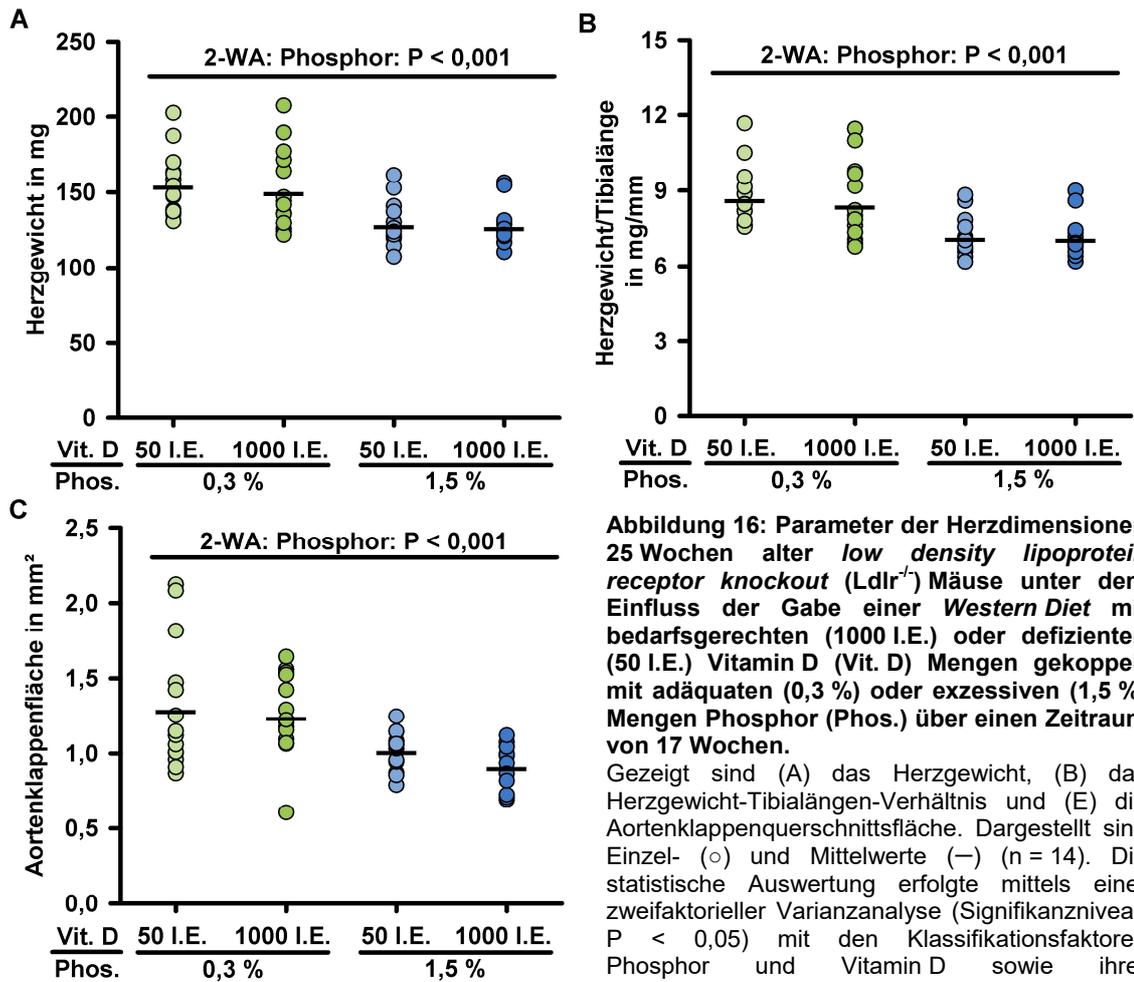
Gezeigt sind (A) der Kalzifizierungsanteil des Aortenklappengewebes, (B) Anzahl der Kalzifizierungsspots gruppiert nach Größe und (C) repräsentative Bilder der histologischen Schnitte in der Aortenklappenebene, die mittels von Kossa Silberfärbung gefärbt wurden. Dargestellt sind Einzel- (\circ) und Mittelwerte ($-$) ($n = 14$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer zweifaktorieller Varianzanalyse (Signifikanzniveau $P < 0,05$) mit den Klassifikationsfaktoren Phosphor und Vitamin D sowie ihrer Wechselwirkung.

Auch die Fütterungen unterschiedlicher Vitamin D Konzentrationen über die Diät hatte keinen signifikanten Einfluss auf BMP2 im Serum. Es zeigte sich jedoch eine statistische Tendenz ($P = 0,07$) dahingehend, dass eine adäquate Vitamin D Versorgung im Vergleich zur defizitären Versorgung die Serumkonzentration von BMP2 reduziert (siehe Abbildung 15).



3.2.6 Herzmorphologie

Die Analyse der Herzdimensionen zeigte, dass der Faktor Phosphor auch hier einen deutlich signifikanten Einfluss besitzt. Die Bestimmung des Herzgewichts hat ergeben, dass die Herzen in den Gruppen, die 1,5 % Phosphor erhielten um rund 16 % leichter waren als die der Gruppen, die 0,3 % Phosphor über die Diät erhielten. Dieser Effekt bleibt auch nach der Normalisierung des Herzgewichtes auf die Tibialänge bestehen (siehe Abbildung 16). Ein vergleichbarer Effekt konnte auch für die Aortenklappenquerschnittsfläche nachgewiesen werden, hier zeigt sich eine signifikante Abnahme der Fläche um knapp 28 % in den 1,5 % P Gruppen im Vergleich zu den beiden 0,3 % P Gruppen. Der Parameter Vitamin D zeigte keine signifikanten Einflüsse auf die Herz- oder die Aortenklappenmorphologie. Auch konnte keine Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren nachgewiesen werden.



3.2.7 Ausgewählte Parameter des Glucosestoffwechsels

Auch die Analysen verschiedener Serumparameter des Glucosestoffwechsels ergaben, dass diese durch alimentär zugeführten Phosphor signifikant beeinflusst wurden. Im Vergleich zu einer bedarfsgerechten Versorgung mit Phosphor wurden die Serumspiegel von Insulin und dem Spaltprodukt der Insulinsynthese, das C-Peptid beide durch eine exzessive Zufuhr von Phosphor im Mittel um über 50 % reduziert.

Ergebnisse

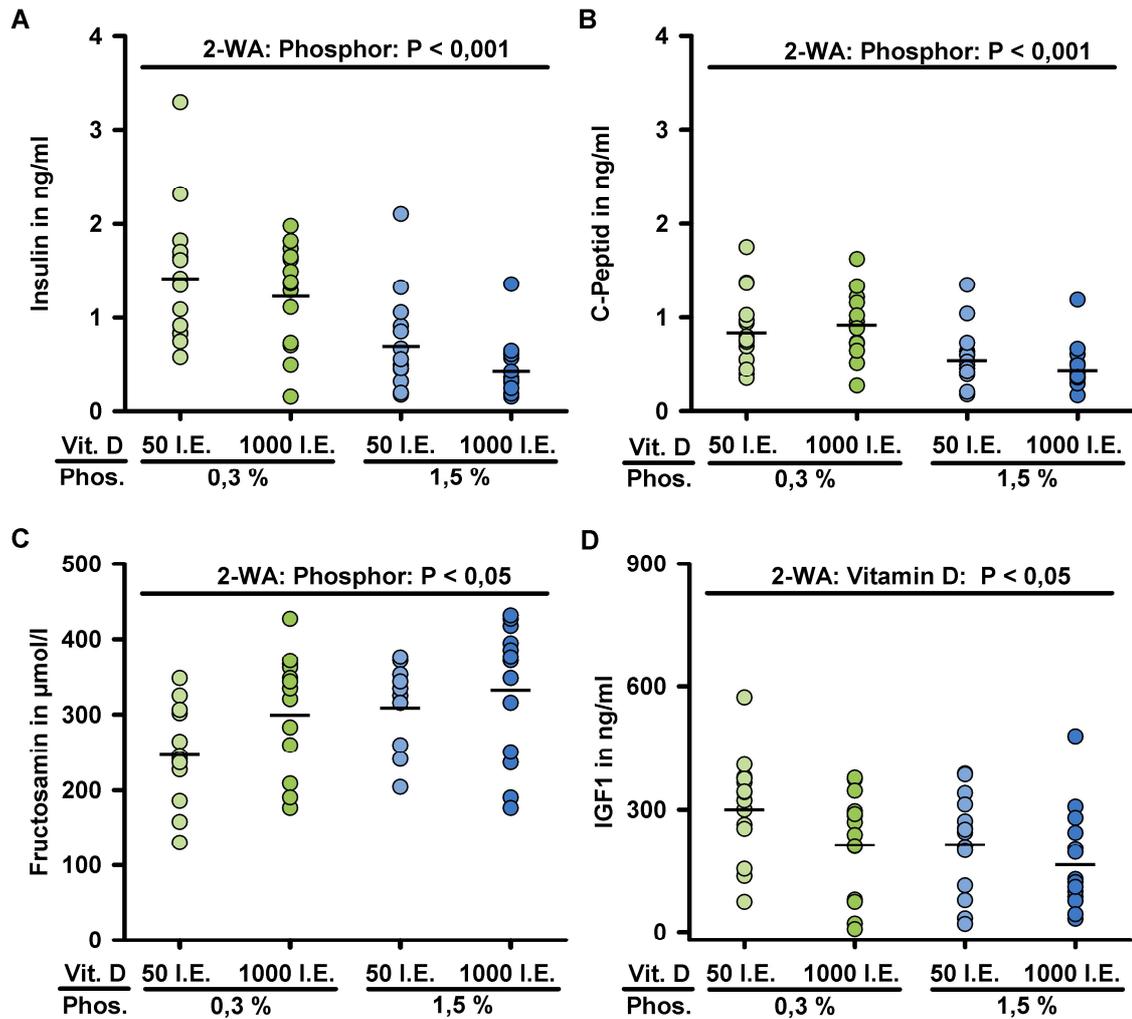


Abbildung 17: Serumkonzentrationen ausgewählter Parameter des Glucosestoffwechsels 25 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout* ($Ldlr^{-/-}$) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.

Gezeigt sind (A) Insulin, (B) C-Peptid, (C) Fructosamin, und (D) Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (IGF1). Dargestellt sind Einzel- (\circ) und Mittelwerte ($-$) ($n = 14$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (Signifikanzniveau $P < 0,05$) mit den Klassifikationsfaktoren Phosphor und Vitamin D sowie ihrer Wechselwirkung.

Umgekehrt verhält es sich mit dem Fructosamingehalt im Serum, dieser stieg bei einer Fütterung der 1,5 % P Diäten im Vergleich zu den 0,3 % P Diäten im Mittel um 17 % an. Während Vitamin D auf die zuvor genannten Parameter keinen signifikanten Einfluss hatte, zeigte sich bei der Serumanalyse von IGF1 eine deutliche Reduktion der Serumkonzentrationen unter Fütterung einer Vitamin D bedarfsdeckenden Diät im Vergleich zu einer Vitamin D defizitären Diät. Signifikante Wechselwirkungen von alimentär verabreichtem Vitamin D und Phosphor konnten für keinen dieser Parameter nachgewiesen werden.

3.2.8 Proteinexpression ausgewählter Proteine der Insulin-IGF1-Kaskade im Herzgewebe

Zusätzlich zu Insulin und IGF1 im Serum wurden im Herzgewebe außerdem Proteine der Insulin- bzw. IGF1-Kaskade mittels *Western Blot* analysiert. Es zeigten sich deutlich signifikante Einflüsse der exzessiven Phosphorzufuhr über die Nahrung. Vor allem die Proteinexpression der phosphorylierten Formen des Insulinrezeptors (pIR), des IGF1 Rezeptors (pIGF1R) und der Proteinkinase B alpha, auch bekannt als Akt1, (pAkt1) wurde durch die Fütterung der 1,5 % P Diät gegenüber der 0,3 % P Diät signifikant reduziert. Auf die Phosphorylierungen hatte das alimentär zugeführte Vitamin D keinen signifikanten Einfluss. Auf die unphosphorylierten Formen des Insulinrezeptors IR, IGF1R und Akt1 hatte weder das alimentär zugeführte Phosphor noch Vitamin D einen signifikanten Effekt (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Proteinexpression ausgewählter Proteine der Insulinkaskade 25 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout (Ldlr^{-/-})* Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.

rel. Protein- expression normalisiert auf GAPDH	Phosphor				2-WA P-Wert		
	0,3 %		1,5 %		Phos.	Vit. D	Vit. D x Phos.
	Vitamin D						
	50 I.E.	1000 I.E.	50 I.E.	1000 I.E.			
IR	0,92 ± 0,17	1,00 ± 0,24	1,06 ± 0,22	1,11 ± 0,27	ns	ns	ns
IGF1R	0,99 ± 0,25	1,01 ± 0,24	1,01 ± 0,39	1,08 ± 0,33	ns	ns	ns
IR+IGF1R	1,91 ± 0,37	2,01 ± 0,36	2,07 ± 0,48	2,19 ± 0,49	ns	ns	ns
pIR-IGF1R	1,24 ± 0,37	1,29 ± 0,47	0,82 ± 0,44	0,73 ± 0,28	< 0,001	ns	ns
Akt1	1,00 ± 0,13	0,95 ± 0,20	1,05 ± 0,12	1,06 ± 0,15	ns	ns	ns
pAkt1	1,27 ± 0,55	1,26 ± 0,68	0,77 ± 0,32	0,68 ± 0,29	< 0,001	ns	ns

Angaben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 14). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (2-WA) (Signifikanzniveau P < 0,05) mit den Klassifikationsfaktoren Phosphor (Phos.) und Vitamin D (Vit. D) sowie ihrer Wechselwirkung. nicht signifikant (ns), Insulinrezeptor (IR), insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 Rezeptor (IGF1R), phosphoryliert (p).

IR und IGF1R gehören beide zur Unterklasse II der Tyrosinkinase-Rezeptor-Superfamilie. Sie besitzen eine sehr homologe Form und sind als vorgeformte Dimere an der Zelloberfläche lokalisiert. Die Bildung der Liganden führt zu Aktivierung und somit phosphorylierten Form pIR und pIGF1R, diese unterscheiden sich in der phosphorylierten Domäne nicht, so dass der Antikörper nicht spezifisch für pIR oder pIGF1R detektiert, sondern beides

gleichermaßen bindet. Daher wurde statt des Verhältnisses von pIR/IR bzw. pIGF1R/IGF1R lediglich die Summe des Signals für IR und IGF1R mit dem Signal von pIR-IGF1R verrechnet.

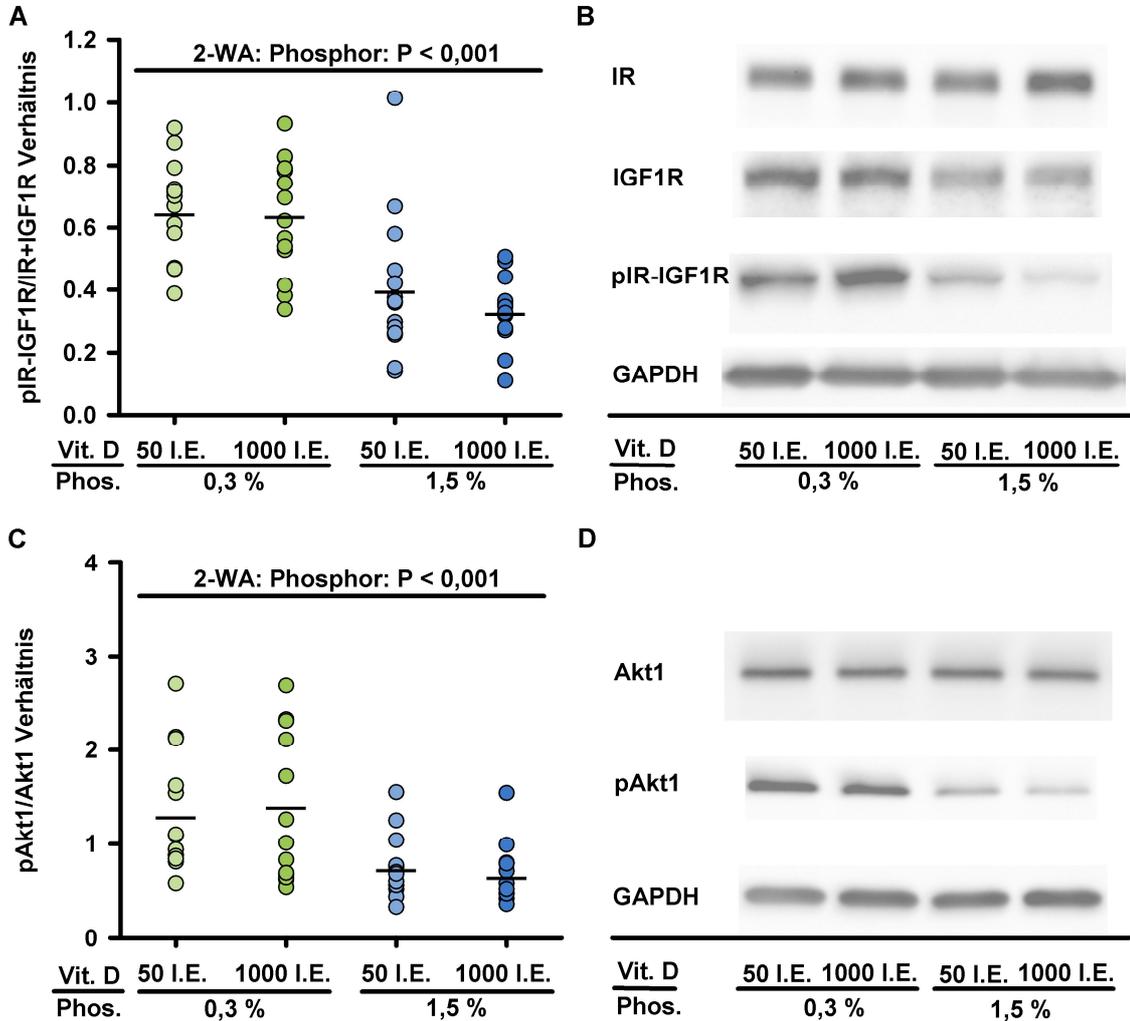


Abbildung 18: Relative Proteinexpression ausgewählter Proteine der Insulinkaskade 25 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout* (*Ldlr*^{-/-}) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3 %) oder exzessiven (1,5 %) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.

Gezeigt sind (A) das Verhältnis der Proteinexpression des phosphorylierten (p) Insulinrezeptors (IR) bzw. Insulinähnlichen Wachstumsfaktor Rezeptors (IGF1R) zur Summe des IR und IGF1R, (B) repräsentative Bilder der *Western Blot* Detektion der Proteine IR, IGF1R, pIR-IGF1R und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), (C) das Verhältnis der Expression der phosphorylierten Proteinkinase B (pAkt1) zur Akt1 Expression, sowie (D) repräsentative Bilder der *Western Blot* Detektion der Proteine Akt, pAkt1 und GAPDH. Dargestellt sind Einzel- (○) und Mittelwerte (—) (n = 14). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (Signifikanzniveau P < 0,05) mit den Klassifikationsfaktoren Phosphor und Vitamin D sowie ihrer Wechselwirkung.

Die Betrachtung des Verhältnisse der phosphorylierten Form zur unphosphorylierten Form verdeutlicht, dass sowohl das pIR-IGF1R/IR+IGF1R als auch das pAkt1/Akt1 Verhältnis durch die alimentäre Zufuhr der 1,5 % P Diät gegenüber der 0,3 %P Diät um über 50 % reduziert wurden (siehe Abbildung 18).

Zusätzlich wurde im Herzgewebe mittels ELISA auch IGF1 bestimmt. Der Gehalt von IGF1 im Herzgewebe wurde durch die Fütterung der 1,5 % P Diät im Vergleich zur adäquaten Phosphor Versorgung deutlich reduziert (siehe Abbildung 19.). Vitamin D hatte in diesem Fall keinen signifikanten Einfluss.

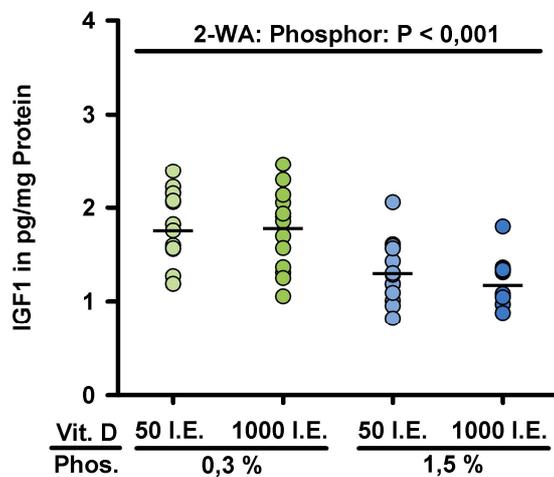


Abbildung 19: Konzentration des Insulinähnliche Wachstumsfaktoren 1 (IGF1) im Herzgewebe 25 Wochen alter *low density lipoprotein receptor knockout* (*Ldlr^{-/-}*) Mäuse unter dem Einfluss der Gabe einer *Western Diet* mit bedarfsgerechten (1000 I.E.) oder defizienten (50 I.E.) Vitamin D (Vit. D) Mengen gekoppelt mit adäquaten (0,3%) oder exzessiven (1,5%) Mengen Phosphor (Phos.) über einen Zeitraum von 17 Wochen.

Dargestellt sind Einzel- (○) und Mittelwerte (—) ($n = 14$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (Signifikanzniveau $P < 0,05$) mit den Klassifikationsfaktoren Phosphor und Vitamin D sowie ihrer Wechselwirkung.

4 Diskussion

4.1 Studie I - Charakterisierung der Herzfunktion bei Vitamin D-Rezeptor-Defizienz

Die kardioprotektive Wirkung von Vitamin D wird in letzten Jahren kontrovers diskutiert. Epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass Vitamin D eine wichtige Rolle im Erhalt der kardiovaskulären Gesundheit spielt (Kühn et al. 2013; Chowdhury et al. 2014). Im Gegenzug zeigen einige Interventionsstudien mit einer Vitamin D Supplementierung keinen kardiovaskulären Vorteil (Bolland et al. 2014a; Manson et al. 2019). Studie I wurde durchgeführt, um mögliche kausale Wirkungen von Vitamin D auf Blutdruck und Herzfunktion aufzuklären. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde eine tierexperimentelle Langzeitstudie mit $Vdr^{-/-}$ Mäusen durchgeführt. $Vdr^{-/-}$ Mäuse stellen ein gängiges Tiermodell zur Untersuchung eines Vitamin D Mangels dar.

4.1.1 Phänotypische Ausprägungen des Vitamin D Rezeptor *knockouts*

Zu den phänotypischen Ausprägungen des *Vdr knockouts* gehört eine gestörte Calcium- und Phosphorhomöostase. Um dem entgegenzuwirken erhielten die $Vdr^{-/-}$ Mäuse eine *Rescue Diet* mit erhöhten Calcium- und Phosphorgehalten. Einer korrespondierenden $Vdr^{+/+}$ Gruppen wurde ebenfalls diese *Rescue Diet* gefüttert. Um mögliche Effekte der *Rescue Diet* nachweisen zu können erhielt eine weitere $Vdr^{+/+}$ Kontrollgruppe eine Normo Diät mit Calcium- und Phosphorgehalten gemäß der AIN-93G Empfehlungen (Reeves et al. 1993; Reeves 1997). Trotz der Fütterung der *Rescue Diet* konnten die Calciumspiegel im Serum der $Vdr^{-/-}$ Mäuse nicht auf die der $Vdr^{+/+}$ Mäuse normalisiert werden. Der gestörte Calciumhaushalt der $Vdr^{-/-}$ Mäuse hatte einen deutlichen Anstieg der PTH Serumkonzentrationen zur Folge. Eine Studie an $Vdr^{-/-}$ Mäusen konnte zeigen, dass die *Rescue Diet* mit 2,0 % Calcium im Vergleich zu einer Diät gemäß den AIN-93G Empfehlungen mit 0,3 % Calcium (Reeves et al. 1993; Reeves 1997) nicht effektiver ist die PTH Spiegel zu normalisieren. Erst ein deutlich erhöhter Calciumgehalt von 4,0 % in der Diät kann die PTH Serumkonzentration auf das Niveau der $Vdr^{+/+}$ Vergleichsgruppe reduzieren. Jedoch führte die 4,0 % ige Calciumdiät zu stark erhöhten FGF23

Serumkonzentrationen (Grundmann et al. 2017). Da sowohl PTH als auch FGF23 weitreichende Wirkungen auf den Metabolismus besitzen, wurde in der hier vorliegenden Studie auf die Erhöhung des Calciumgehaltes auf 4,0 % verzichtet und die *Rescue Diet* mit 2,0 % Calcium eingesetzt. Zumal in den verfügbaren Studien zu kardiovaskulären Untersuchungen im $Vdr^{-/-}$ Tiermodell standardmäßig die klassische *Rescue Diet* eingesetzt wird und so die Vergleichbarkeit gewährleistet werden kann.

Im Gegensatz zu den Calciumserumkonzentrationen konnten die Serumkonzentrationen von anorganischem Phosphat in der $Vdr^{-/-}$ RD Gruppe durch die Fütterung der *Rescue Diet* auf die der $Vdr^{+/+}$ ND Referenzgruppe normalisiert werden. Allerdings wies die $Vdr^{+/+}$ Gruppe, die die *Rescue Diet* erhielt, signifikant höhere Werte auf. Die $Vdr^{-/-}$ Mäuse besitzen eine reduzierte Phosphorabsorption, so dass die erhöhte Zulage in der Diät lediglich dazu führt die Spiegel zu normalisieren. Die $Vdr^{+/+}$ Mäuse hingegen haben eine ungestörte Phosphorabsorption daher kann die erhöhte Phosphorzulage in der *Rescue Diet* zu den leicht erhöhten Phosphatspiegeln führen, die allerdings noch im physiologisch unbedenklichen Bereich von 2 mmol/l liegen (Otto et al. 2016). Die Serumkonzentrationen des FGF23, welches stark mit der Phosphorhomöostase verknüpft ist, war in der $Vdr^{-/-}$ Gruppe am geringsten. $Vdr^{-/-}$ Mäuse weisen generell niedrigere FGF23 Serumspiegel als $Vdr^{+/+}$ Mäuse auf, auch bei Fütterung einer Normo Diät (Grundmann et al. 2017). Auf die Serumkonzentrationen von FGF23 der $Vdr^{+/+}$ Mäuse besaß die *Rescue Diet* im Vergleich zur Normo Diät einen reduzierenden Effekt.

4.1.2 Einfluss des Vitamin D Rezeptor Defizites auf den Blutdruck

Ein Fokus von Studie I lag darauf welchen Einfluss der *Vdr knockout* auf den Blutdruck der Mäuse ausübt. Etliche Parameter beeinflussen das Herz-Kreislaufsystem. Ein besonders wichtiger Faktor ist das RAAS, welches eine zentrale Rolle in der Blutdruckregulation einnimmt. Das hormonähnliche Enzym Renin wird in den juxtaglomerulären Zellen der Niere produziert und setzt Angiotensinogen zu Angiotensin I um. Durch das Enzym *angiotensin-converting-enzyme*, wird es anschließend in Angiotensin II überführt. Angiotensin II besitzt eine vasokonstriktive Wirkung und regt die Ausschüttung

von Aldosteron aus der Nebenniere an. Aldosteron fördert wiederum die Retention von Natrium und Wasser in der Niere. Durch das Zusammenspiel dieser Faktoren kommt es zu einer Blutdruckerhöhung. Es ist bekannt, dass Vitamin D negativ mit der Reninkonzentration im Blut korreliert und als Inhibitor des RAAS fungiert (Resnick et al. 1986; Burgess et al. 1990; Li 2011). $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ hemmt rezeptorvermittelt die Synthese von Renin. Bei $\text{Vdr}^{-/-}$ Mäusen kann die hemmende Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ nicht mehr vermittelt werden, daher ist die Reninkonzentration im Serum bei diesen Mäusen erhöht (Li et al. 2002; Simpson et al. 2007). In der hier vorliegenden Studie konnte die beschriebene Wirkung eines Vdr *knockouts* auf die Reninsynthese bestätigt werden. Die $\text{Vdr}^{-/-}$ Mäuse wiesen deutlich erhöhte Reninkonzentrationen im Serum auf.

Zusätzlich zeigte eine Studie neben der erhöhten Reninkonzentration im Blut von $\text{Vdr}^{-/-}$ Mäusen auch eine Erhöhung des Blutdrucks um rund 20 mmHg (Li et al. 2002). Auch 1α -Hydroxylase *knockout* Mäuse, bei denen die Aktivierung von $25(\text{OH})\text{D}$ zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ gehemmt ist, zeigten eine erhöhte Reninkonzentration im Serum und einen erhöhten systolischen Blutdruck (Zhou et al. 2008). Simpson et al. 2007 konnten ebenfalls eine erhöhte Reninaktivität bei $\text{Vdr}^{-/-}$ Mäusen nachweisen. Im Gegensatz zu Li et al. konnte die Arbeitsgruppe allerdings keinen erhöhten Blutdruck nachweisen. Viel mehr zeigte sich bei $\text{Vdr}^{-/-}$ Mäusen ein signifikant geringerer systolischer Blutdruck. Dieser Effekt trat jedoch erst bei neun Monate alten Mäusen auf. Bei drei Monate alten Mäusen zeigte sich kein Effekt des *knockouts*. In einem Alter von sechs Monaten zeigte sich bereits eine Tendenz zu einem niedrigeren Blutdruck. Auch in der hier vorliegenden Studie wurde der systolische Blutdruck von neun Monate alten $\text{Vdr}^{-/-}$ Mäusen erhoben. Es konnte jedoch weder eine blutdrucksenkende noch eine blutdruckerhöhende Wirkung eines Vitamin D Mangels, im Sinne eines Vdr *knockouts* nachgewiesen werden. Die $\text{Vdr}^{-/-}$ Mäuse zeigten keinerlei Unterschiede im systolischen Blutdruck im Vergleich zu den beiden $\text{Vdr}^{+/+}$ Gruppen.

Die Diskrepanz zwischen den Studien von Li et al. und Simpson et al., sowie der hier vorliegenden Studie, können auf Veränderungen der Blutgefäße oder der Aortenklappe zurückzuführen sein. So führen vaskuläre Kalzifizierungen zu

einem Elastizitätsverlust der Gefäße und eine Kalzifizierung der Aortenklappe zu einer Einschränkung der mechanischen Bewegung. Eine starke Kalzifizierung der Aortenklappe kann zu einer Aortenklappenstenose oder Aortenklappeninsuffizienz führen. Bei der Aortenklappenstenose gelangt durch die Verengung der Aortenklappe weniger Blut in den Körper (Jackson et al. 2000). Es kann zu einer Hypotonie kommen, wie sie Simpson et al. beobachtet haben. Die Untersuchungen in Studie I zum Anteil der Kalzifizierungen in der Aortenklappe konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen $Vdr^{-/-}$ und $Vdr^{+/+}$ Mäusen nachweisen. Das Fehlen einer vermehrten Aortenklappenkalzifizierung der $Vdr^{-/-}$ Mäuse kann somit ein Grund für die fehlende Veränderung im systolischen Blutdruck dieser Tiere darstellen. Bei einer eingeschränkten Aortenklappenfunktion kann es außerdem zu einer erhöhten Schlagrate des Herzens kommen, da hierrüber die Arbeit des Herzmuskels gegen den konstant erhöhten Widerstand kompensiert werden soll (Jackson et al. 2000). Die Pulsfrequenz war bei den $Vdr^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu den $Vdr^{+/+}$ Mäusen in der hier vorliegenden Studie jedoch ebenfalls unbeeinflusst. Bei der Aortenklappeninsuffizienz kommt es zu einem Rückfluss des Blutes in den linken Ventrikel nach der Auswurfphase. Die echokardiographischen Untersuchungen lieferten jedoch keine Hinweise auf einen solchen Rückfluss in den linken Ventrikel.

Ein weiterer möglicher Einflussparameter, der die Entwicklung einer Hypertonie bei $Vdr^{-/-}$ Mäusen beeinflusst, ist der Calciumspiegel im Serum. Bei hypocalcämischen $Vdr^{-/-}$ Mäusen konnten Aihara et al. 2003 einen erhöhten Blutdruck nachweisen, während sie diesen Effekt bei normocalcämischen $Vdr^{-/-}$ Mäusen nicht nachweisen konnten. Auch in der hier vorliegenden Studie konnte der Calciumspiegel trotz Fütterung der *Rescue Diet* nicht auf den Spiegel der $Vdr^{+/+}$ Mäuse angehoben werden. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass bei Werten von 2,16 mmol/l von einer physiologisch relevanten Hypocalcämie gesprochen werden kann. Aus der Literatur sind Werte von gesunden Mäusen zwischen 1,2 und 2,7 mmol/l bekannt (Stringham et al. 1967; Tordoff et al. 2007; Lieben et al. 2012). Daher ist es möglich, dass der unveränderte Blutdruck der $Vdr^{-/-}$ Mäuse auf das Fehlen einer Hypocalcämie zurückzuführen ist.

Relevant für Veränderungen des Blutdrucks, kann zudem eine unterschiedlich lange Adaptationsphase bei den Blutdruckmessungen sein. Der Blutdruck ist ein Parameter, der sehr stark durch äußere Einflüsse beeinflusst werden kann. Auch Simpson et al. haben den systolischen Blutdruck mittels *tail cuff* Methode bestimmt. Die Arbeitsgruppe Simpson et al. 2007 beschreibt, dass die Mäuse an drei Tagen für jeweils 10-20 min an die Messung gewöhnt wurden. In der hier vorliegenden Studie wurden die Mäuse über einen Zeitraum von 20 Messtagen und unter streng kontrollierten Bedingungen an das Verfahren gewöhnt und die äußeren Einflüsse auf den Blutdruck so gering wie möglich gehalten. Im Besonderen wurde darauf geachtet, dass die Mäuse immer von den gleichen Personen untersucht wurden und die olfaktorischen, sowie auditiven Einflüsse wurden möglichst geringgehalten. Auch wurden die Mäuse schrittweise an die 30 minütige Messdauer gewöhnt. Es konnte während der gesamten Untersuchungsdauer, an knapp 30 Messtagen, deutlich beobachtet werden, dass die Mäuse fast 20 Messtage benötigten, um sich an die Prozedur zu gewöhnen. Zu Beginn der Messungen konnten kaum auswertbare Messwerte gewonnen werden, auch war die intraindividuelle Schwankung, von bis zu 17 %, (gemessen am Mittel des Variationskoeffizienten pro Messtag/Tier), an den ersten Trainingstagen sehr hoch. Erst gegen Ende der Trainingsphase konnten vergleichbare intraindividuelle Schwankungen verzeichnet werden. In die Analysen flossen daher nur die Daten aus diesem Zeitraum. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen war in der hier vorliegenden Studie die Anzahl der untersuchten Tiere mit $n = 14$ verhältnismäßig hoch (Simpson et al. 2007 ($n = 6$), Li et al. 2002 ($n = 8$)).

4.1.3 Einfluss des Vitamin D Rezeptor Defizites auf die Herzmorphologie

Die Kombination eines Vitamin D Mangels und eines erhöhten PTH Spiegels, wie sie in Studie I vorliegen, wird oftmals mit Hypertension und Herzhypertrophie assoziiert (Saleh 2003; Taylor et al. 2008; Wang et al. 2008; Anderson et al. 2011; Kestenbaum et al. 2011). Studien an $Vdr^{-/-}$ Mäusen konnten zeigen, dass diese eine Herzhypertrophie aufweisen (Li et al. 2002; Simpson et al. 2007). Diese Studien nutzen unter anderem das Herz-zu-Körpergewicht-Verhältnis (HG/KG) als Indikator für eine Herzhypertrophie. Auch in der hier vorliegenden Studie war das HG/KG bei den $Vdr^{-/-}$ Mäusen signifikant

erhöht. Das HG/KG ist jedoch nicht robust gegenüber Körpergewichtsschwankungen. Klassische phänotypische Ausprägungen des *Vdr knockouts* sind ein geringeres Körperwachstum bzw. ein geringeres Körpergewicht, sowie ein geringerer Anteil an Körperfett im Vergleich zu *Vdr^{+/+}* Mäusen (Yoshizawa et al. 1997; Song et al. 2003; Schutkowski et al. 2018). Auch in der hier vorliegenden Studie war das Körpergewicht der *Vdr^{-/-}* Mäuse zu Versuchsende signifikant niedriger als das der korrespondierenden *Vdr^{+/+}* Mäuse. Besonders der geringere Körperfettanteil der *Vdr^{-/-}* Mäuse macht es notwendig das Herzgewicht auf die Tibiallänge zu beziehen, da diese bei adulten Tieren konstant bleibt (Yin et al. 1982). Anders als in den bereits diskutierten Studien, wurde in der hier vorliegenden Studie zur Beurteilung des Vorliegens einer Herzhypertrophie daher das Herzgewicht-zu-Tibiallängen-Verhältnis (HG/TL) herangezogen. Die Analyse des HG/TLs zeigte, dass dieses zwischen den untersuchten Gruppen nicht verschieden war und weist somit nicht auf das Vorliegen einer Herzhypertrophie hin. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse der transthorakalen Echokardiographie gestützt. Um die Herzmorphologie näher untersuchen zu können wurde erstmals im *Vdr knockout* Mausmodell eine transthorakale Echokardiographie durchgeführt. Bei dieser Untersuchung konnte kein Effekt des *Vdr knockouts* auf die Herzdimensionen nachgewiesen werden. Weder das LV Septum, der LV Innendurchmesser noch die LV posteriore Wanddicke waren in der Systole oder Diastole bei den *Vdr^{-/-}* Mäusen im Vergleich zu den *Vdr^{+/+}* Mäusen verändert. Alle diese Parameter lagen im physiologischen Bereich für adulte Mäuse (Vinhas et al. 2013).

4.1.4 Einfluss des Vitamin D Rezeptor Defizites auf die Herzfunktion

Ein Vitamin D Mangel wird zusätzlich zu den bereits genannten kardiovaskulären Erkrankungen, wie Herzhypertrophie oder Hypertension mit einer eingeschränkten Herzfunktion in Verbindung gebracht (Ameri et al. 2010; Fall et al. 2012). Um überprüfen zu können, ob ein *Vdr knockout* möglicherweise zu einer eingeschränkten Herzfunktion führt, wurden die EF, FS und die gerichteten Ströme in der auf- und absteigenden Aorta bestimmt. Die EF gibt an wie viel Prozent des Blutvolumens, bei einem Herzschlag, in die Blutbahn gepumpt wird. Eine EF von etwa 60 % wird als physiologische normal

angesehen. Bei Werten von unter 55 % kann bereits von einer leichten Herzinsuffizienz gesprochen werden. Eine schwere Einschränkung der Herzfunktion liegt bei Werten kleiner 30 % vor. Die FS bezeichnet die prozentuale Verkürzung des Herzens während des Pumpvorganges, sie liegt im Regelfall bei rund 35 % (Stypmann 2007; Gao et al. 2011; Vinhas et al. 2013; Schnelle et al. 2018). Keiner dieser Parameter war bei Vorliegen eines *Vdr knockouts* verändert oder gab einen Hinweis darauf, dass eine gestörte Herzfunktion vorlag. Gestützt werden diese Befunde durch die zusätzlich erhobenen Parameter Lungengewicht-zu-Tibiallängen-Verhältnis (LG/TL) und die BNP Konzentration im Serum. Bei einer systolischen Herzinsuffizienz ist das LG/TL erhöht (Chen et al. 2002; van Nierop et al. 2013). Der *Vdr knockout* zeigte jedoch keinen Einfluss auf das LG/TL. Auch die BNP Serumspiegel sind bei Vorliegen einer Herzinsuffizienz erhöht. BNP wird in Kardiomyozyten aus ProBNP unter Abspaltung von NT-proBNP gebildet. Die Sekretion von BNP wird durch die Dehnung des Ventrikels angeregt und wirkt vasodilatierend (Palazzuoli et al. 2010). Ein Vitamin D Mangel wird in starken Zusammenhang mit dem Auftreten einer Herzinsuffizienz gebracht. Jedoch sind die in der Literatur gezeigten Daten sehr inhomogen. So zeigt eine randomisierte Studie, dass bei Patienten mit Herzinsuffizienz die BNP Serumspiegel mittels Vitamin D Supplementation gesenkt werden konnten (Witham et al. 2010), während andere Studien keinen Zusammenhang zwischen Vitamin D und BNP oder dessen Spaltnebenprodukt NT-ProBNP nachweisen konnten (Wetmore et al. 2011; Nunes 2013; Seirafian et al. 2014). Wiederum andere Studien konnten eine starke Korrelation von BNP und Vitamin D bei Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion (Obineche et al. 2008; van Ballegooijen et al. 2012) beobachten. Die in Studie I ermittelten Daten machen deutlich, dass der Anteil mit Tieren, die einen BNP Spiegel < 600 pg/ml aufweisen in der *Vdr^{-/-}* Gruppe mit rund 50 % am höchsten war. Während der Anteil in den *Vdr^{+/+}* Gruppen bei weniger als 15 % lag. Der hohe Anteil an Tieren mit niedrigen BNP Konzentration in der *Vdr^{-/-}* Gruppe weist darauf hin, dass keine Herzinsuffizienz vorliegt.

Die Studie I konnte deutlich zeigen, dass trotz großer Veränderungen von Parametern, wie PTH oder Renin im Serum, die laut Literatur die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen begünstigen, ein Vitamin D Mangel im Sinne

eines *Vdr knockouts* keinen nachweisbaren Effekt auf den systolischen Blutdruck, die Pulsfrequenz, die Herzmorphologie oder die Herzfunktion besitzt. Wichtig für Untersuchungen zum Herz-Kreislauf-System im *Vdr knockout* Modell, ist es die phänotypischen Unterschiede zwischen *Vdr^{-/-}* und *Vdr^{+/+}* Mäusen zu berücksichtigen. Insbesondere bei der Beurteilung einer möglichen Herzhypertrophie, muss berücksichtigt werden, dass *Vdr^{-/-}* Mäuse einen deutlich geringeren Körperfettanteil aufweisen als *Vdr^{+/+}* Mäuse und somit das HG/KG verzerrte Ergebnisse liefert. Auch muss beachtet werden, dass *Vdr^{-/-}* Mäuse andere Verhaltensmuster als *Vdr^{+/+}* Tiere aufweisen (Kalueff et al. 2004; Kalueff et al. 2005; Kalueff et al. 2006) und somit eine ausreichende Adaptation an Blutdruckmessungen im wachen Zustand besonders relevant ist.

4.2 Studie II - Einfluss von Phosphor und Vitamin D auf die Herzmorphologie und Atherogenese

Neben Vitamin D wird auch Phosphor in den letzten Jahren zunehmend als Einflussfaktor auf die kardiovaskuläre Gesundheit diskutiert. Phosphor besitzt ein sehr weitreichendes Wirkungsspektrum. Um der Frage nachgehen zu können, in wie fern Phosphor und Vitamin D die kardiovaskuläre Gesundheit bei Vorliegen eines kardiovaskulären Risikos beeinflussen, wurde eine zweite tierexperimentelle Langzeitstudie durchgeführt. In dieser Studie wurde *Ldlr^{-/-}* Mäusen eine Versuchsdiät mit einem defizienten oder bedarfsdeckenden Vitamin D Gehalt gekoppelt mit einer adäquaten oder exzessiven Menge an Phosphor gefüttert.

4.2.1 Einfluss einer exzessiven, alimentären Phosphorzufuhr auf Parameter der Calcium- und Phosphorhomöostase

Einen sehr deutlichen Effekt hatten die Hochphosphordiäten auf die Parameter der Calcium- und Phosphorhomöostase, hier vor allem auf PTH und FGF23. Beide Parameter sind durch die Fütterung der Hochphosphordiäten gemäß ihrer physiologischen Funktion stark angestiegen. Als phosphatretische Hormone reduzieren sie die Expression der Phosphattransporter NPT2a und NPT2c in den proximalen Nierentubuli und verringern so die Phosphatresorption und erhöhen die Exkretion (Gattineni et al. 2009; Bergwitz und Jüppner 2010; Jüppner 2011). Gleichzeitig reduziert FGF23 die

1,25(OH)₂D Synthese und in der Konsequenz die Phosphorabsorption im Gastrointestinaltrakt. Im Gegenzug wiederum erhöht PTH die 1,25(OH)₂D Spiegel, um die Calciumabsorption im Intestinum zu fördern und das Missverhältnis von Calcium zu Phosphor im Serum auszugleichen (Calvo et al. 1988; Kemi et al. 2010). In der hier vorliegenden Studie war die 1,25(OH)₂D Serumkonzentration bei Fütterung einer Hochphosphordiät gekoppelt mit einer adäquaten Menge Vitamin D am höchsten. Dies zeigt, dass die stimulierende Wirkung von PTH auf die 1-alpha-Hydroxylase, die hemmende Wirkung von FGF23 überlagert, sofern eine adäquate Menge Vitamin D verabreicht wird.

PTH, FGF23 und Vitamin D interagieren sehr stark miteinander und regulieren sich gegenseitig über positive oder negative Rückkopplung (Blau und Collins 2015). In den letzten Jahren ist deutlich geworden, dass PTH, FGF23 und Vitamin D eine zentrale Rolle auf das Herz-Kreislaufsystem ausüben. Vor allem Patienten mit CKD weisen eine deutliche Störung des Mineralstoffhaushaltes auf und zeigen einen veränderten PTH, FGF23 und Vitamin D Metabolismus (Kestenbaum und Belozeroff 2007). Besonders auffällig ist, dass CKD oft mit Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems einhergeht. In vorangeschrittenen Stadien der CKD weisen die Patienten oftmals eine Herzhypertrophie auf und das Risiko für das Auftreten einer Herzinsuffizienz steigt (Harnett et al. 1995; Go et al. 2004). Assoziationsstudien konnten zeigen, dass sowohl PTH, FGF23 und Vitamin D Risikofaktoren für eine kardiovaskuläre Erkrankung bei CKD darstellen. In der Literatur werden hohe PTH Serumkonzentrationen oftmals mit Herzhypertrophie, Bluthochdruck und Herzinsuffizienz assoziiert (Khouzam et al. 2006; Gruson et al. 2014; Tomaschitz et al. 2014; Wannamethee et al. 2014). Ähnliches gilt für FGF23. Patienten mit einer CKD weisen in der Regel deutlich erhöhte FGF23 Serumspiegel auf, diese konnten in mehreren Studien mit dem Vorliegen einer linksventrikulären Hypertrophie in Verbindung gebracht werden (Shimada et al. 2010; Faul et al. 2011; Smith et al. 2013). Auch *in vivo* und *in vitro* Studien zeigen, dass FGF23 die linksventrikuläre Hypertrophie fördert (Faul et al. 2011). Qin et al. 2017 konnten zeigen, dass FGF23 als Prädiktor für kardiovaskuläre Sterblichkeit dienen kann. Im Gegensatz dazu besagen jüngste Daten, dass ein erhöhter FGF23 Serumspiegel nur mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert ist, wenn gleichzeitig die Nierenfunktion eingeschränkt ist (Pastor-Arroyo et al. 2018). Weitere

Untersuchungen an Mäusen konnten ebenfalls keine elementare Rolle von FGF23 im Zusammenhang mit der Pathophysiologie einer durch Drucküberlastung hervorgerufenen Herzhypertrophie herstellen (Slavic et al. 2017).

4.2.2 Einfluss einer exzessiven, alimentären Phosphorzufuhr auf die Herzgröße unter Beteiligung der Insulin/IGF1-Kascade

Studie II diente unter anderem der Überprüfung der Hypothese, dass ein erhöhter Anteil von Phosphor in der Diät über erhöhte FGF23 und PTH Serumspiegel zu einer Herzhypertrophie führt. Trotz deutlich erhöhter Serumkonzentration von FGF23 und PTH kam es bei Fütterung einer Hochphosphordiät zu einer starken Reduktion des Herzgewichtes um rund 16 %. Laut Literatur gibt es keine Hinweise darauf, dass eine exzessive Phosphoraufnahme zu geringeren Herzgewichtigen führen kann. Studien an Ratten konnten zeigen, dass eine Hochphosphordiät tendenziell zu einem erhöhten HG/KG führt (Mizuno et al. 2016). In der hier vorliegenden Studie war jedoch sowohl das HG/KG, als auch das HG/TL durch die Hochphosphordiät signifikant verringert. Dies verdeutlicht, dass der Unterschied im Herzgewicht nicht auf ein verändertes Körperwachstum zurückzuführen ist. Zusätzlich war auch die Fläche des Aortenklappenquerschnitts durch die Fütterung der Hochphosphordiäten verringert. Dies deutet darauf hin, dass die Herzen insgesamt geringer entwickelt waren. Aus Studien mit $Ldlr^{-/-}$ Mäusen ist bekannt, dass diese bei Fütterung einer fettreichen Diät ein Herzgewicht bis zu 160 mg entwickeln (Drolet et al. 2006). Dies spricht dafür, dass in Studie II das Herzgewicht in den Hochphosphorgruppen verringert war und nicht das Herzgewicht in den Normophosphorgruppen erhöht.

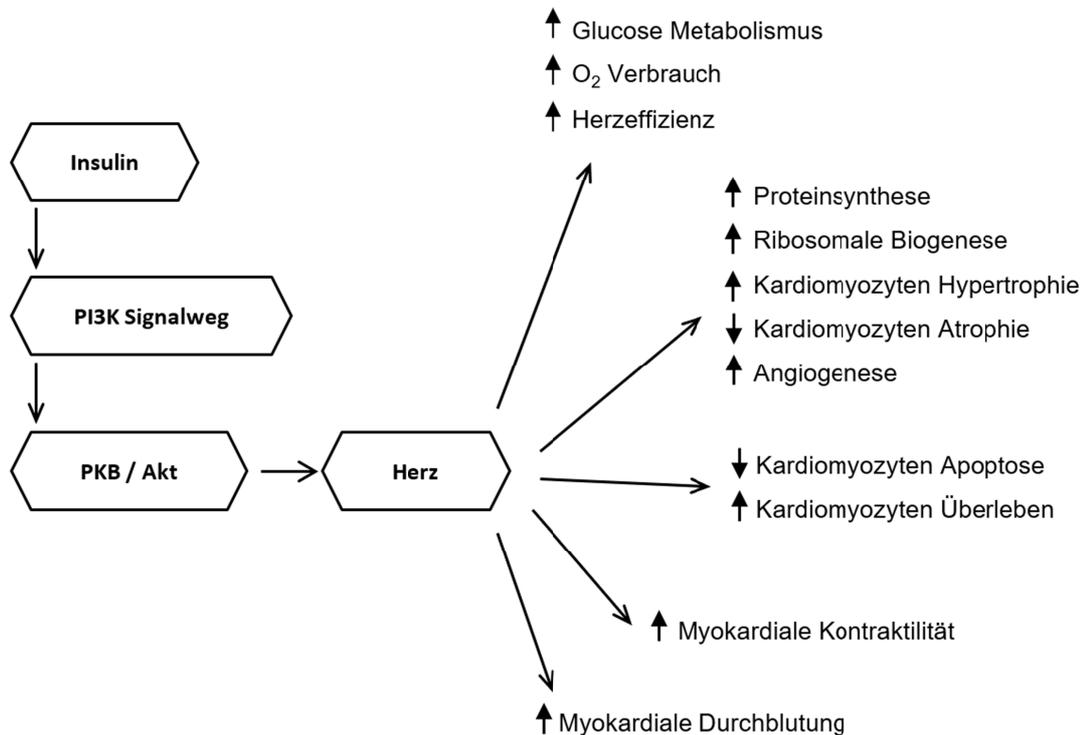


Abbildung 20: Kardiale Effekte von Insulin.

(modifiziert nach Iliadis et al. 2011), Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), Proteinkinase B (PKB/Akt), Sauerstoff (O₂)

Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen kann auf eine veränderte Synthese von Parametern des Insulinstoffwechsels zurückzuführen sein. Neben seinen klassischen Funktionen wie die Regulation des Blutglukosespiegels, die Hemmung der Lipolyse, sowie die Regulation von Zellwachstum und Proliferation, scheint Insulin auch einen Einfluss auf den Phosphormetabolismus auszuüben (Stadie 1944; Allon 1992). Darüber hinaus zeigt Insulin auch einen Einfluss auf das kardiovaskuläre System. Zum einen wird Insulin eine kardioprotektive Wirkung zugeschrieben, z.B. bei einer Dysfunktion des Myokards (Klein und Visser 2010), zum anderen bestehen Assoziationen zwischen Diabetes Mellitus Typ 2 und Herzinsuffizienz (Riehle und Abel 2016). Es ist auch bekannt, dass Mäuse mit einem Kardiomyozyten-selektiven Insulinrezeptor *knockout* ein geringeres Herzgewicht aufweisen (Belke et al. 2002). Untersuchungen in der hier vorliegenden Studie ergaben, dass Insulin durch die Fütterung der Hochphosphordiäten deutlich reduziert wurde. Auch das Spaltprodukt der Insulinsynthese, das C-Peptid wurde durch die Hochphosphatdiäten stark verringert. Dies spricht dafür, dass die geringen Insulinspiegel nicht auf einen vermehrten Abbau, sondern eine verringerte

Synthese zurückzuführen sind. Diese Ergebnisse werden durch die Analyse des Fructosamingehaltes im Serum gestützt, der in den Gruppen erhöht war, die eine Hochphosphordiät erhielten. Fructosamine sind Aminosucker der Fructose, die vermehrt entstehen, wenn der Fructosegehalt im Blut steigt. Dies ist eine Konsequenz der verringerten Insulinspiegel. Der Fructosaminspiegel kann eine Aussage über den Blutzuckerspiegel der letzte 1-3 Wochen geben.

Die verringerten Insulinspiegel im Serum korrelierten positiv mit der Herzgröße. Insulin vermittelt seine Wirkung durch binden an den IR, dieser wird anschließend durch Autophosphorylierung aktiviert und wirkt in dieser Form unter anderem auf den Phosphoinositid-3-Kinasen/Proteinkinase B (Akt1) Stoffwechselweg (Chitnis et al. 2008). Der Signalweg wird neben Insulin auch von IGF1 beeinflusst. IGF1 besitzt eine zu 50 % homologe Struktur zu Insulin und bindet an den IGF1R. Dieser wiederum stimuliert verschiedenen Phosphorylierungskaskaden und reguliert so zahlreiche biologische Systeme (LeRoith et al. 1995; Patti und Kahn 1998). Der IR und IGF1R liegen als Dimere an der Zelloberfläche vor (Butler und LeRoith 2001). Genau wie Insulin stimuliert die Bindung von IGF1 an den IGF1R über verschiedene Zwischenschritte die Phosphorylierung von Akt1 zu pAkt1 (Chitnis et al. 2008). Dieser Signalweg ist stark mit dem Zellmetabolismus, Zellwachstum und Apoptose verknüpft. Für Akt1 ist beschrieben, dass hohe Spiegel mit einer Herzhypertrophie einhergehen (Matsui et al. 2003). Mäuse mit Akt1 Defizienz weisen z.B. ein leicht reduziertes Körperwachstum auf (Chen et al. 2001). DeBosch und Muslin 2008 konnten zeigen, dass Akt1 *knockout* Mäuse keine Herzhypertrophie entwickeln. *In vivo* und *in vitro* Studien zeigen, dass eine Überexpression von IGF1R zu einer Herzhypertrophie führt und dies ebenfalls über den Akt1 Stoffwechselweg vermittelt wird (Reiss et al. 1996; McMullen et al. 2004). In dem hier vorliegenden Versuch war die IGF1 Konzentration durch die Hochphosphordiäten im Herzgewebe unabhängig von dem Serumspiegel reduziert. Die Reduktion von Insulin und IGF1 führte im Herzgewebe dazu, dass die Phosphorylierung des IR und IGF1R zu pIR-IGF1R reduziert war und in der Konsequenz auch die Aktivierung von Akt1 zu pAkt1 zurückging. Dies kann ein Mechanismus sein der maßgeblich an der Reduktion des Herzgewichtes beteiligt ist.

4.2.3 Einfluss einer exzessiven, alimentären Phosphorzufuhr auf Insulin und IGF1

Über welchen Mechanismus Phosphor die Insulinsynthese beeinflusst ist zum jetzigen Kenntnisstand unklar. Es ist jedoch erwiesen, dass Insulin die Phosphatexkretion in der Niere hemmt bzw. ein Mangel an Insulin die Ausscheidung von Phosphor erhöht (Ginsburg 1972; DeFronzo et al. 1975; Corman et al. 1978; Roy und Seely 1981; Allon 1992). Es ist zudem bekannt, dass bei CKD Patienten mit einer Hyperparathyreose die Insulinsekretion sinkt und durch Korrektur der Hyperparathyreose die Insulinsekretion steigt (Mak et al. 1983; Mak et al. 1985; Mak 2008). Eine hohe Phosphorzufuhr führt zu einer erhöhten PTH Sekretion. Es ist daher möglich, dass eine Insulinsekretion-hemmende Wirkung von Phosphor durch PTH vermittelt wird. Zusätzlich ist beschrieben, dass eine Diät mit niedrigem Phosphatgehalt zu einer erhöhten Insulinsensitivität und Reduktion der Blutglukosespiegel führt (Lin et al. 2018). Ob Phosphor einen direkten Einfluss auf die Insulinsekretion besitzt ist bislang kaum untersucht. Eine *in vitro* Untersuchung von Nguyen et al. 2015 zum Einfluss einer erhöhten extrazellulären Phosphatkonzentration auf pankreatischen β -Zellen von Ratten zeigt, dass ein erhöhter extrazellulärer Phosphatspiegel einen mitochondrialen oxidativen Stress verursacht. Ein solcher Stress führte zu einem verringerten Insulingehalt, einer fehlerhaften Insulinsekretion und Zytotoxizität. Zusätzlich kann auch eine Beteiligung von FGF23 nicht ausgeschlossen werden. Studien zeigen, dass hohe FGF23 Spiegel mit niedrigen Insulinspiegeln einhergehen (Wojcik et al. 2012). Auch konnte gezeigt werden, dass Insulin die Sekretion von FGF23 hemmt (Bär et al. 2018). Inwiefern es auch eine Regulation von FGF23 auf die Insulinsekretion gibt, bleibt zu klären.

Neben Insulin war auch IGF1 durch die Fütterung der Hochphosphordiät beeinflusst. Diese Wirkung von Phosphor auf IGF1 Konzentration im Herzen kann ebenfalls PTH vermittelt sein. Die Freisetzung von IGF1 wird durch das Wachstumshormon (*growth hormon*, GH) induziert. Es ist beschrieben, dass GH die PTH Synthese beeinflusst und es besteht die Theorie, dass PTH umgekehrt auch die GH Synthese im Sinne einer Hemmung beeinflusst (Coiro

et al. 2004). Dies stellt einen möglichen Mechanismus zur Reduktion der IGF1 Konzentrationen im Herzgewebe durch alimentär zugeführten Phosphor dar.

4.2.1 Einfluss einer exzessiven, alimentären Phosphorzufuhr auf die Kalzifizierung der Aortenklappe

In Studie II konnte ein weiterer Effekt des Phosphors festgestellt werden. Die histologische Untersuchung der Aortenklappe der Ldlr^{-/-} Mäuse hat ergeben, dass der Kalzifizierungsanteil in der Aortenklappe durch die Fütterung der Hochphosphordiäten signifikant stieg. Dies ist nicht auf eine Zunahme in der Größe der Kalzifizierungsspotts zurückzuführen, sondern auf eine vermehrte Anzahl an Kalzifizierungsspotts. Die Assoziation von Phosphoraufnahme und Kalzifizierung wird auch in der Literatur beschrieben (Román-García et al. 2010). Es wird angenommen, dass dieser Effekt sowohl direkt durch Phosphor vermittelt wird, als auch indirekt z.B. durch die mit einer Hyperphosphatämie assoziierten erhöhten PTH Spiegel (Carrillo-López et al. 2018). *In vitro* Experimente mit glatten Gefäßmuskelzellen konnten zeigen, dass anorganisches Phosphat zudem in der Lage ist glatte Gefäßmuskelzellen in kalzifizierende osteoblasten-ähnliche Zellen umzuwandeln (Jono et al. 2000; Giachelli et al. 2001; Chen et al. 2002).

4.2.1 Einfluss einer exzessiven, alimentären Phosphorzufuhr auf die Atherogenese

Die histologische Untersuchung der abdominalen Aorta hat ergeben, dass die Fütterung der Hochphosphordiäten den Anteil der atherosklerotischen Läsionen in der gesamten Aorta reduzierte. Auch die weiteren Untersuchungen der Aortenklappe haben ergeben, dass die absolute Läsionsfläche durch die Fütterung der Hochphosphordiäten signifikant kleiner wird. Lediglich eine weitere Studie hat sich in einem Atherosklerose Mausmodell mit dem Einfluss von Phosphor auf die Atherogenese beschäftigt (Shiota et al. 2011). Auch Shiota et al. 2011 konnten feststellen, dass der Anteil der atherosklerotischen Läsionen in der Aorta bei Fütterung einer 1,8 % igen Phosphordiät bei ApoE^{-/-} Mäusen um fast 30 % sinkt.

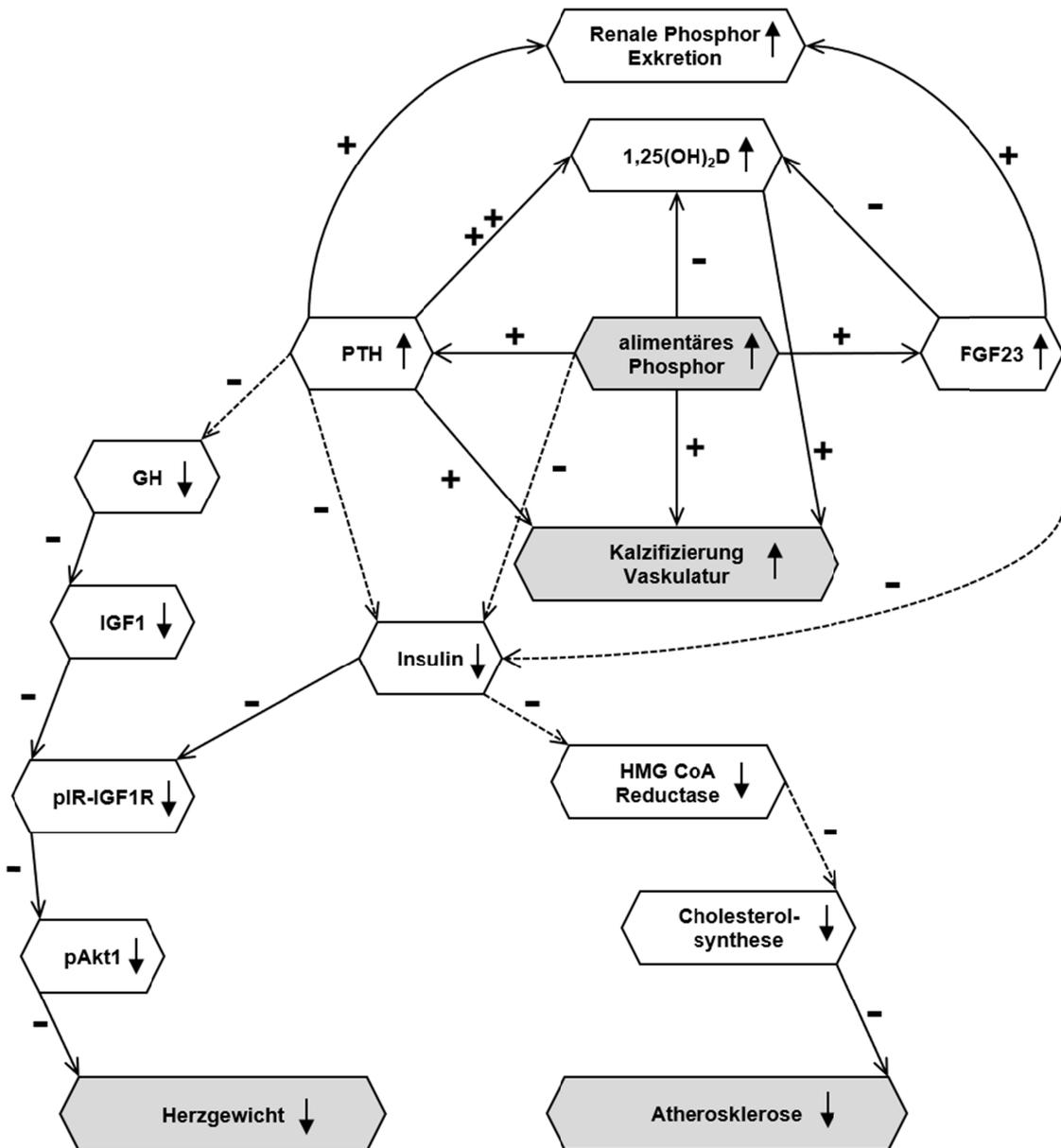


Abbildung 21: Mögliche mechanistische Zusammenhänge zum Einfluss einer exzessiven Phosphoraufnahme auf das Herzgewicht, die Atherosklerose und die Kalzifizierung der Vaskulatur.

Durch eine exzessive alimentäre Phosphoraufnahme verringern sich das Herzgewicht und der Anteil der atherosklerotischen Läsionen in der Vaskulatur, bei gleichzeitiger Erhöhung der Kalzifizierungen. Eine exzessive alimentäre Phosphoraufnahme erhöht die phosphatretischen Hormone Parathormon (PTH) und Fibroblasten Wachstumsfaktor 23 (FGF23). Der auf die 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)₂D) Synthese stimulierende Effekt von PTH überwiegt den hemmenden Effekt von FGF23, so dass die 1,25(OH)₂D Spiegel im Serum ansteigen. PTH, FGF23 und 1,25(OH)₂D stimulieren die Kalzifizierung der Vaskulatur. Gleichzeitig kommt es zu einer verringerten Insulinsekretion. Möglicherweise wird die Insulinsynthese durch die vermehrte Sekretion von PTH, FGF23 und eine exzessive alimentäre Phosphorzufuhr gehemmt. Auch die Konzentration des Insulinähnlichen Wachstumsfaktors 1 (IGF1) im Herzgewebe sinkt durch die exzessive Phosphorzufuhr. Ein möglicher Mechanismus ist eine durch die hohen PTH Spiegel vermittelt Hemmung der Wachstumshormon (GH) Sekretion, die wiederum zu einer Reduktion der IGF1 Konzentrationen führt. Insulin und IGF1 wirken beide auf den Phosphatidylinositol 3-kinase/Proteinkinase B (Akt1) Weg. Dies deutet darauf hin, dass eine Hemmung dieses Signalweges durch eine verringerte Phosphorylierung von Akt1 (pAkt1), in Konsequenz der geringeren Insulinrezeptor (IR) und IGF1 Rezeptor (IGF1R) Aktivierung zu pIR-IGF1R, zur Reduktion des Herzgewichts führt. Der verringerte Atheroskleroseanteil ist möglicherweise, einer durch die geringere Insulinsekretion verursachten Reduktion der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG CoA) Reduktase geschuldet, die zu Reduktion der Cholesterolsynthese führt.

Sie konnten zudem zeigen, dass die Fütterung zu einer Reduktion der Makrophagen in der Peripherie führt und vermuteten, dass es dadurch zu einer geringeren Ausschüttung von inflammatorischen Faktoren wie Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1, *monocyte chemoattractant protein-1* und Tumornekrosefaktor- α kommt, die maßgeblich an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind (Shiota et al. 2011). Neben dem von Shiota et al. vermuteten Makrophagen-vermittelten Phosphoreffekt, könnte auch in diesem Fall die Reduktion der Insulinserumspiegel einen Einfluss auf die Atherogenese besitzen. Insulin erhöht die Expression der Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A (HMG CoA) Synthase und die Aktivität der HMG CoA Reduktase in Leberzellen und Keratinozyten (Ingebritsen et al. 1979; Harris et al. 2000). HMG CoA Synthase und Reduktase sind beide an der Synthese von Cholesteroll beteiligt. In der Medizin werden Statine eingesetzt, um die HMG CoA Reduktase zu hemmen und so der Entstehung atherosklerotischer Läsionen entgegenzuwirken. Ein möglicher Mechanismus für die Reduktion der atherosklerotischen Läsionen bei Fütterung einer Hochphosphordiät könnte demnach wie folgt funktionieren: Die Reduktion des Insulinspiegels führt zu einer geringeren Aktivität der HMG CoA Reduktase und somit zu einer reduzierten Cholesterolsynthese. Die geringeren Cholesterolspiegel führen in der Konsequenz zu einer verringerten Atherogenese. Für eine Beeinflussung der HMG CoA Reduktase spricht zu dem die Analyse der Leberlipide und im Besonderen des Cholesterolgehaltes. Sowohl der Gesamtlipid-, Triacylglycerol- und Cholesterolanteil des Lebergewebes wurden durch die Fütterung der Hochphosphordiäten deutlich reduziert. Besonders hervorzuheben ist die Reduktion des Cholesterolanteils in der Leber, dieser wurde sogar um rund 35 % reduziert. Ein Einfluss von Phosphor auf den Cholesterollmetabolismus wird auch in der Literatur beschrieben. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Phosphatrestriktion zu einer Erhöhung der Leberlipide und des Cholesterolanteils führte (Tanaka et al. 2013). Dies soll auf einen regulatorischen Effekt von Phosphor auf Gene des Lipidmetabolismus zurückzuführen sein. Die Arbeitsgruppe schließt auch eine Beteiligung von Vitamin D nicht aus. Sie vermuten, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ aufgrund der Phosphor Restriktion vermehrt synthetisiert wird und so die CYP7A1 Expression inhibiert wird was zu einer cholesterollinduzierten Fettleber führen soll.

Zusätzlich zum Phosphoreffekt trat eine disordinale Wechselwirkung mit dem Faktor Vitamin D auf, jedoch nur wenn der Läsionsanteil auf die Gewebefläche der Aortenklappe normalisiert wurde. In diesem Fall war der Haupteffekt von Phosphor nicht mehr interpretierbar, denn er ist abhängig von der Faktorstufe von Vitamin D. Die Daten machen jedoch deutlich, dass eine adäquate Versorgung mit Vitamin D und Phosphor zum höchsten Anteil an atherosklerotischen Läsionen in der Aortenklappe führte. Ähnliche Effekte konnten interessanterweise bei einigen Parametern, die mit dem Lipidmetabolismus assoziiert sind, nachgewiesen werden. Es zeigt sich, dass die Gruppe, die eine adäquate Menge Vitamin D und Phosphor erhielt, die höchsten Konzentrationen an Lipiden und Triacylglycerolen in der Leber aufwies. Dass Vitamin D den Lipidstoffwechsel beeinflusst ist bekannt. So ist beispielsweise ein höherer Lipidserumspiegel bei Mädchen mit einem höheren 25(OH)D Spiegel assoziiert, bei Jungen jedoch nicht (Delvin et al. 2010). Zum anderen zeigten Studien, dass eine Vitamin D Supplementation die LDL Serumkonzentrationen erhöhen kann während der Gesamtcholesterolspiegel unbeeinflusst blieb. Gleiches gilt für die Triacylglycerole im Serum (Wang et al. 2012). Der Vitamin D Effekt trat nur in Kombination mit der Normophosphordiäten auf. Diese Diät unterschied sich von den Hochphosphordiäten neben dem Phosphorgehalt auch durch einen deutlich höheren Anteil an Natriumcarbonat. Ein Carbonateffekt auf den Vitamin D Metabolismus ist bisher nicht beschrieben, kann jedoch nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden.

4.2.2 Wechselwirkungen zwischen alimentär zugeführtem Phosphor und Vitamin D

Die Ergebnisse der Studie II zeigten ein sehr homogenes Bild. Die meisten der gemessenen Parameter wurden deutlich durch alimentär zugeführten Phosphor beeinflusst während Vitamin D in dem meisten Fällen keine oder eine sehr geringe Wirkung aufwies. Neben dem Anteil der atherosklerotischen Läsionen in der Aortenklappe wurden nur die 1,25(OH)D Spiegel im Serum sowohl durch Phosphor als auch durch Vitamin D beeinflusst. Eine alimentäre Vitamin D Depletion führte zu einer signifikanten Reduktion des 1,25(OH)D Spiegels im Serum. Dies entspricht der physiologischen Reaktion auf einen alimentären Vitamin D Mangel und ist bereits mehrfach in der Literatur beschrieben worden.

Die Wechselwirkung mit dem Faktor Phosphor führt dazu, dass die $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ Serumkonzentration bei Fütterung einer Hochphosphordiät gekoppelt mit einer adäquaten Menge Vitamin D am höchsten war.

4.2.1 Einfluss einer alimentären Vitamin D Depletion

Ein alleiniger Einfluss des Faktors Vitamin D bestand lediglich in Zusammenhang mit dem Parameter IGF1 im Serum der $\text{Ldlr}^{-/-}$ Mäuse. Anders als im Herzen wurden die Serumspiegel von IGF1 durch die Hochphosphordiäten nicht beeinflusst. Stattdessen bestand ein deutlicher Vitamin D Effekt. Dieser steht jedoch im starken Kontrast zu den Daten, die in der Literatur beschrieben werden. Literaturdaten besagen, dass eine Supplementation mit Vitamin D den IGF1 Spiegel erhöht (Ameri et al. 2013a). Auch wird gezeigt, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ Spiegel positiv mit dem IGF1 Spiegel korrelieren (Trummer et al. 2017). Klinische Studien konnten zeigen, dass Vitamin D die Synthese und Aktivität von IGF1 beeinflusst (Ameri et al. 2013b). In der hier vorliegenden Studie ließ sich dieser Effekt jedoch nicht bestätigen. So wiesen die Tiere der Vitamin D defizienten Gruppe höhere IGF1 Konzentrationen auf als die adäquat versorgten Gruppen. Zum jetzigen Wissensstand gibt es keine Erklärung für dieses Phänomen. Dass sich die Konzentration von IGF1 im Serum von der Expression im Herzen unterscheidet, ist hingegen darauf zurückzuführen, dass IGF1 nicht nur in der Leber synthetisiert wird, sondern auch in anderen Geweben wie Lunge, Muskulatur, Herz und Fettgewebe, so dass die Gewebeexpression unabhängig von den Serumkonzentrationen verändert sein kann (D'Ercole et al. 1984).

Wie in Studie I konnte auch in Studie II kein Effekt eines Vitamin D Defizites auf die Kalzifizierung nachgewiesen werden. Auch BMP2, ein Faktor von dem angenommen wird, dass er an Kalzifizierungsprozessen beteiligt ist, in dem er die Umwandlung von glatten Gefäßmuskelzellen zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen begünstigt (Hruska et al. 2005; Li et al. 2008; Schmidt et al. 2012), wurden nicht durch Vitamin D beeinflusst. Es zeigt sich jedoch eine Tendenz zu erhöhten Werten bei Fütterung der Vitamin D defizienten Diät. Aufgrund der großen interindividuellen Schwankungen ist dieser Effekt jedoch nicht signifikant.

4.3 Mögliche Abhängigkeit des Phosphoreffektes vom Calciumgehalt der Diät

In Studie II wurden keine Untersuchungen zu den funktionellen Parametern des Herzens angestellt. Auch wenn die Studie I nicht darauf ausgelegt war ermöglicht sie dennoch den Vergleich der Fütterung einer Diät mit einem Phosphorgehalt von 0,3 % (Normo Diät) versus 1,25 % (*Rescue Diet*) im *Vdr^{+/+}* Tiermodell, die genomisch und physiologisch den klassischen C57BL/6 Mäusen entsprechen. Limitiert wird dieser Vergleich durch die zusätzlichen Unterschiede in der Calciumkonzentration der Diäten (0,5 % vs. 2,0 %). Es kann jedoch abgeleitet werden, dass eine 0,3 %ige Phosphordiät gekoppelt mit 0,5 % Calcium im Vergleich zu einer 1,25 % igen Phosphordiät gekoppelt mit 2,0 % Calcium, den Blutdruck, die Pulsfrequenz und die analysierten Parameter der Herzfunktion, sowie die Herzdimension nicht beeinflusst.

Die Betrachtung der Serumparameter *iPTH* und *iFGF23* in Studie I und II verdeutlicht, dass eine exzessive Phosphorzufuhr gekoppelt mit einer exzessiven Calciumzufuhr nicht den gleichen Effekt besitzt wie eine alleinige exzessive Phosphorzufuhr. Während die *iPTH* Spiegel in Studie II durch die Hochphosphordiät im Mittel um rund 245 pg/ml im Vergleich zu Normophosphordiät angehoben wurden, so liegen sie in Studie I bei Fütterung der *Rescue Diet* lediglich bei 32 pg/ml. Gravierender war dieser Effekt bezüglich der *iFGF23* Serumkonzentrationen. In Studie I führte die *Rescue Diet* im Vergleich zur Normo Diät zu einer signifikanten Reduktion der *iFGF23* Spiegel um rund 180 pg/ml, im Gegenzug führte in Studie II die Fütterung der Hochphosphordiät zu einer Erhöhung der Serumkonzentration um fast 2000 pg/ml im Vergleich zur Normophosphordiät. Dieser Vergleich macht deutlich, dass für die *iPTH*- und *iFGF23*-erhöhende Wirkung einer Hochphosphordiät auch der Gehalt an Calcium in der Diät relevant ist.

4.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse aus Studie I und II verdeutlichen, dass die Wirkung von Vitamin D auf das kardiovaskuläre System in den hier durchgeführten Studien sehr gering ist. Der Faktor mit den physiologisch weitreichenderen Effekten auf das kardiovaskuläre System war Phosphor. Studie I zeigte, dass ein Vitamin D Mangel im Sinne eines *Vdr knockouts* keinen Effekt auf den Blutdruck, die Herzdimensionen und die Herzfunktion hatte. Vorteile der Studie I waren die lange Studiendauer von sechs Monaten, sowie eine adäquate Gruppengröße. Ebenso das Einbeziehen zweier *Vdr^{+/+}* Kontrollgruppen, um einen Effekt der *Rescue Diet* im Vergleich zur Normo Diät ausschließen zu können. Außerdem die Reduktion der äußeren Einflüsse bei der Blutdruckmessung mittels *tail cuff*, durch streng kontrollierte Bedingungen und eine ausreichend lange Adaptationsphase. Nachteilig in Studie I war, dass die *Rescue Diet* nicht effizient war die Serumkonzentrationen von Calcium und PTH auf die der Kontrollgruppen zu normalisieren. Auch ist die Echokardiographie, eine Methode die geringe Unterschiede nicht verifizieren kann. Eine Magnetresonanztomografie mit einer höheren Sensitivität stellt eine mögliche Methode dar, um morphologische Unterschiede des Herzens effizienter zu verifizieren. Ob solche Unterschiede jedoch physiologische Auswirkungen hätten bleibt zu klären. Des Weiteren muss angemerkt werden, dass Studie I lediglich ein *Vdr* Defizit untersuchte und nicht einen alimentär induzierten Vitamin D Mangel. Es besteht der Verdacht, dass Vitamin D neben einer rezeptorvermittelten Wirkung auch ein nicht rezeptorabhängiges Wirkungsspektrum besitzt (Hii und Ferrante 2016). In der hier durchgeführten Studie kann dies nicht ausgeschlossen werden.

Auch in Studie II mit *Ldlr^{-/-}* Mäusen, in der unter anderem ein alimentärer Vitamin D Mangel untersucht wurde, besaß der Faktor Vitamin D in den meisten Fällen keine oder eine sehr geringe Wirkung, obgleich die *Ldlr^{-/-}* Mäuse zusätzlich ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko aufweisen. Einen relevanten Einfluss hatte der Faktor Vitamin D auf die Atherogenese. Hier führte eine adäquate Vitamin D Versorgung zu einer Steigerung des Anteils an atherosklerotischen Läsionen in der Aortenklappe, der physiologische Mechanismus ist jedoch noch unklar. Die meisten der analysierten Parameter wurden hingegen sehr stark durch den alimentär zugeführten Phosphor

beeinflusst. Eine Wechselwirkung von Vitamin D und Phosphor trat lediglich im Zusammenhang mit den atherosklerotischen Läsionen, dem Lipidmetabolismus und $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ auf. In Studie II zeigte die exzessive Zufuhr von Phosphor einen starken Einfluss auf die Herzmorphologie, die Atherogenese, sowie den Lipid- und Mineralstoffwechsel. Eine exzessive Phosphorzufuhr führt trotz eines enormen Anstiegs der phosphatretischen Hormone PTH und FGF23, die beide mit einer Herzhypertrophie assoziiert werden, zu einer Reduktion des Herzgewichtes. Des Weiteren führte die exzessive Phosphorzulage in den Diäten zu einem geringen Anteil der atherosklerotischen Läsionen in der Aorta, bei gleichzeitiger Erhöhung der Kalzifizierungen in der Aortenklappe. Auffällig war, dass die PTH und FGF23 erhöhende Wirkung einer Hochphosphordiät höchstwahrscheinlich auch vom Calciumgehalt der Diät abhängig ist. Sind sowohl der Phosphor- als auch Calciumanteil in der Diät erhöht, ist der Anstieg von PTH und FGF23 weniger extrem als bei alleiniger Erhöhung des Phosphoranteils. Viele der Effekte von Phosphor werden indirekt durch PTH und FGF23 vermittelt. Es ist anzunehmen, dass sowohl PTH, FGF23 und vermutlich auch Phosphor direkt, über die verringerte Insulin- und IGF1 Sekretion, das Herzwachstum beeinflussen. Die hier gezeigten Daten lassen den Schluss zu, dass dies auf die verminderte Aktivierung des IR und des IGF1R und der dadurch bedingten Inhibierung des Akt1 Signalweges zurückzuführen ist. Dieser ist stark mit dem Wachstum des Herzens assoziiert. Ferner konnte gezeigt werden, dass Phosphor einen deutlichen Effekt auf den Lipidmetabolismus in der Leber besitzt. Auch in diesem Zusammenhang kann dies auf die verringerten Insulinspiegel bei exzessiver Phosphorzufuhr zurückzuführen sein. Es ist anzunehmen, dass sich dieser Einfluss auf den Lipid- bzw. Cholesterolmetabolismus auch in der Reduktion der atherosklerotischen Läsionen widerspiegelt.

Eine Herausforderung bei Untersuchungen mit Modifikationen der Versuchsdiäten stellt das Ausbalancieren der Versuchsdiät mit der Kontrolldiät dar. Ein Vorteil der hier durchgeführten Studien ist der Einsatz einer klar charakterisierten und definierten Basaldiät. Ein besonderer Fokus, bei der Erstellung der Versuchsdiäten in Studie II lag darauf, dass sich die Diäten möglichst nicht in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. Da durch den Zusatz von Phosphor, in Form eines Phosphates, immer auch ein Kation mit in die Diät

eingetragen wird, wurde dies in der Vergleichsdiät kompensiert. Zum Ausgleich des Natriumphosphates ist Natriumcarbonat eingesetzt worden. Zwar unterscheiden sich die Diäten dadurch in ihrem Carbonatgehalt, es ist jedoch davon auszugehen, dass ein Unterschied im Carbonatgehalt geringere kardiovaskuläre Folgen besitzt als ein Unterschied im Natriumgehalt. Von Natrium ist erweisen, dass es eine Rolle in der Regulation des kardiovaskulären Systems spielt. Es ist jedoch nicht völlig auszuschließen, dass das Carbonat einen Einfluss auf die untersuchten Parameter besitzt. So gibt es Hinweise aus *in vitro* Studien, dass Bikarbonat einen Einfluss auf die Insulinfreisetzung *in vitro* besitzt (Henquin und Lambert 1976). Ein Nachteil der eingesetzten Diäten, war deren Unterschied hinsichtlich der Konsistenz. Ein möglicher Einflussfaktor auf die Atherogenese kann daher auch die Futtermittelaufnahme sein. Während der Versuchslaufzeit unterschied sich die Futtermittelaufnahme im Mittel um 0,83 g/Tag pro Tier signifikant zwischen den Hoch- und Normophosphorgruppen. Auf Grund der unterschiedlichen Konsistenz der Diäten ist die Aussage dieses Parameters jedoch limitiert. Eine Analyse des ausgesiebten Futteranteils der Einstreu hat ergeben, dass rund 55 % der Differenz in der Futtermittelaufnahme auf den höheren Anteil von Futterresten in der Einstreu zurückzuführen sind. Zwar entwickelten die Normophosphorgruppen ab der 11. Fütterungswoche ein höheres Körpergewicht als die Hochphosphorgruppen, es muss jedoch betont werden, dass der Unterschied im Körpergewicht für den Faktor Phosphor im Mittel lediglich 1,5 g betrug und die unterschiedliche Futtermittelaufnahme keinen Effekt auf das Körperwachstum hatte. Die Tibialänge war zwischen den untersuchten Gruppen nicht verschieden. Die unterschiedliche Futtermittelaufnahme als Einflussfaktor auf den Anteil der atherosklerotischen Läsionen ist somit sehr unwahrscheinlich. Wie in Studie I gehört auch in Studie II die lange Versuchsdauer und die Gruppengröße zu den Stärken des Studiendesigns.

Wie einleitend erwähnt zählen Herz-Kreislaufkrankungen weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Die hier durchgeführten Studien machen deutlich, dass alimentäre Faktoren weitreichende Effekte auf die Entwicklung kardiovaskulärer Risikofaktoren besitzen können. In den letzten Jahren hat Phosphor in der kardiovaskulären Forschung an Bedeutung gewonnen. Die hier gezeigten Ergebnisse veranschaulichen, dass Phosphor umfangreiche physiologische Wirkungen besitzt. Insbesondere, die in Studie II gezeigte

Wirkung von Phosphor auf den Insulin- und Lipidstoffwechsel, das Herzwachstum, sowie die Atherogenese veranschaulichen welche Relevanz alimentär aufgenommener Phosphor bezüglich der kardialen Funktion besitzt. Außerdem veranschaulichen die Daten, dass der Einfluss von Phosphor weit über die Regulation der Mineralstoffhomöostase hinausgeht. Zum Teil ist noch unklar über welche Mechanismen die Phosphorwirkung genau vermittelt wird. Daten der letzten Jahrzehnte und auch diese Studie zeigen jedoch eine starke Verknüpfung mit PTH und FGF23, die beide weitreichende physiologische Eigenschaften besitzen. Daher ist weitere Forschung zur Aufklärung der Wirkmechanismen besonders wichtig, zumal die Phosphorzufuhrempfehlung in den westlichen Industrienationen um ein Vielfaches überschritten wird und es noch unklar ist welche Konsequenzen dies für den Organismus nach sich zieht. Zu berücksichtigen ist außerdem, dass, ähnlich wie bei Vitamin D, die meisten Erkenntnisse zu gesundheitlichen Risiken einer erhöhten Phosphoraufnahme aus Untersuchungen mit CKD Patienten stammen. Bei diesen ist eine Hyperphosphatämie mit kardiovaskulärer Mortalität und Gesamtmortalität verbunden. Wichtig für eine Bewertung des Risikos einer exzessiven Phosphoraufnahme ist, ob solche epidemiologischen Zusammenhänge auch für die Allgemeinbevölkerung gelten. Akkurate Aussagen zu Assoziationen zwischen der Phosphoraufnahme und Erkrankungen zu treffen ist beim gesunden Menschen schwer, da es bei uneingeschränkter Nierenfunktion nicht zu einer Hyperphosphatämie kommt (Uribarri und Calvo 2014). Dies macht weitere Untersuchungen des Phosphorstoffwechsels damit assoziierter Stoffwechselwege ausgesprochen wichtig, auch um aus Assoziationen tatsächliche Kausalitäten ableiten zu können.

Gleiches gilt bezüglich des untersuchten Faktors Vitamin D. Zwar besaß Vitamin D in den hier durchgeführten Studien keine weitreichenden Effekte auf das kardiovaskuläre System, dennoch zeigen Daten aus epidemiologischen Studien einen Zusammenhang zwischen einem Vitamin D Defizit und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Die Daten hinsichtlich des Einflusses auf die kardiovaskuläre Gesundheit sind und bleiben inkonsistent. Es muss festgehalten werden, wie elementar es ist die tatsächlichen Vitamin D Effekte nachweisen zu können. Daher müssen prospektive epidemiologische Studien mit einer detaillierten Erfassung der Vitamin D Versorgung durchgeführt

werden. Zusätzlich bedarf es weiterer tierexperimenteller Studien, um einen isolierten Vitamin D Mangel untersuchen zu können. Diese sollten Tieren mit und ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren einbeziehen. Wie Daten der CKD Studien zeigen hat Vitamin D deutliche Effekte auf die kardiovaskuläre Gesundheit, wenn eine Vorerkrankung vorliegt. Im gesunden Organismus ist der Vitamin D Einfluss auf das Herz-Kreislauf-System unter Umständen weniger weitreichend.

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass eine hohe Phosphoraufnahme aus der Nahrung ein Einflussfaktor der kardiovaskulären Gesundheit darstellt. Der erhöhte kumulative Einsatz von Phosphor in der Lebensmittelverarbeitung macht weitere Untersuchungen notwendig. Im Hinblick auf den Einfluss von Vitamin D auf das kardiovaskuläre Risiko liefert diese Studie Hinweise darauf, dass die kardiovaskuläre Wirkung von Phosphor weitestgehend unabhängig von Vitamin D vermittelt wird. Außerdem lässt sich ableiten, dass ein Vitamin D Mangel weniger weitreichende kardiale Effekte besitzt, als teilweise angenommen.

5 Zusammenfassung

Fast 40 % aller Todesfälle in Deutschland lassen sich auf eine Erkrankung des kardiovaskulären Systems zurückführen. Zu den klassischen Risikofaktoren zählen Alter, Geschlecht, Rauchen, Adipositas und Hypercholesterinämie. Allerdings werden in den letzten Jahren auch Vitamin D und in jüngster Zeit auch Phosphor als solche diskutiert. Es wird geschätzt, dass etwa ein Drittel der Weltbevölkerung eine unzureichende Vitamin D Versorgung aufweist, während die Phosphoraufnahme meist um das 2 bis 3 fache überschritten wird. Ein Vitamin D Mangel wird mit einer höheren kardiovaskulären Mortalität assoziiert. Gleiches gilt für einen erhöhten Anteil von Phosphor im Serum. Dies wird jedoch kontrovers diskutiert. Die Stoffwechselwege von Vitamin D und Phosphor sind eng miteinander verknüpft. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, PTH und FGF23 beeinflussen sich gegenseitig über positive und negative Rückkopplung. Viele der Vitamin D und Phosphor zugeschriebenen kardiovaskulären Effekte werden durch PTH und FGF23 vermittelt. Beide werden mit einer höheren Inzidenz von Hypertonie, LVH, Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen und Herzklappenerkrankungen verbunden, die zu einer höheren kardialen Morbidität und Mortalität beitragen können. Zur näheren Untersuchung des kardialen Einflusses von Vitamin D und Phosphor wurden zwei Langzeitstudien an Modelltieren durchgeführt, in denen das kardiovaskuläre System morphologisch und molekularbiologisch näher charakterisiert wurde. Die erste Studie untersucht den Einfluss einer Vdr Defizienz auf den Blutdruck, die Herzfunktion und -morphologie. Die zweite Studie, an dem Ldlr^{-/-} Atherosklerose Mausmodell, untersuchte den Einfluss von Vitamin D und Phosphor.

Beide Studien verdeutlichen, dass Vitamin D im Vergleich zu Phosphor nur einen geringen Effekt auf die untersuchten Parameter besaß. Die Analysen zum Einfluss des Vdr *knockouts* auf die Herzfunktion haben gezeigt, dass obwohl der Vdr *knockout* die Parameter Renin und PTH im Serum stark erhöht, der *knockout* keinen messbaren Einfluss auf den systolischen Blutdruck oder die Pulsfrequenz besaß. Auch bezüglich der Herzdimensionen konnten keine Unterschiede zwischen Vdr^{-/-} und Vdr^{+/+} Tieren nachgewiesen werden. Untermauert werden diese Befunde durch die Ergebnisse der transthorakalen Echokardiographie, auch hier konnte kein Einfluss des Vdr *knockouts* auf die

Herzdimensionen oder die Herzfunktion nachgewiesen werden. In der zweiten Studie hatte eine bedarfsdeckende Vitamin D Versorgung gegenüber einer defizitären Versorgung ebenfalls geringe Auswirkungen auf die gemessenen Parameter. Zu relevanten Wechselwirkungen mit dem Faktor Phosphor kam es kaum. Der alimentär zugeführte Phosphor war der Faktor, der den weitaus größeren Einfluss besaß. In der zweifaktoriellen Langzeitstudie II führte die exzessive Phosphorzufuhr zu einer deutlichen Erhöhung der phosphaturischen Hormone PTH und FGF23. Diese werden beide positiv mit dem Auftreten einer Herzhypertrophie assoziiert. Das Herzgewicht war bei Fütterung der Hochphosphordiäten jedoch stark verringert und das trotz der deutlichen Erhöhung von PTH und FGF23. Es ist jedoch möglich, dass ein Effekt von Phosphor auf den Insulin- und IGF1-Stoffwechsel die Effekte von PTH und FGF23 konterkariert hat. Die Studie II konnte einen deutlichen Zusammenhang zwischen der exzessiven Fütterung von Phosphor und einer Reduktion der Insulinspiegel, der IGF1 Konzentration im Herzgewebe, sowie der Phosphorylierung des IR und des IGF1R nachweisen. In der Konsequenz kam es zu einer reduzierten Phosphorylierung von Akt1. Der Akt1 Signalweg ist maßgeblich an der Entwicklung der Muskulatur und dem Wachstum beteiligt. Eine Hemmung dieses Stoffwechselweges im Herzen kann somit eine relevante Ursache der Herzgewichtsreduktion sein. Des Weiteren führte die exzessive Phosphorzufuhr zu einer Reduktion des Anteils der atherosklerotischen Läsionen bei gleichzeitiger Erhöhung des Kalzifizierungsanteils in der Aorta bzw. Aortenklappe. Ein weiterer Einfluss bestand in der Reduktion des Lipid- und Cholesterolanteils in der Leber, dieser Effekt kann ebenfalls auf die Modulation des Insulinstoffwechsels zurückzuführen sein und kann mitursächlich für die Reduktion der atherosklerotischen Läsionen sein.

Gerade die Ergebnisse aus der Langzeitstudie II haben deutlich gemacht, dass Phosphor eine weitreichende Wirkung auf das kardiovaskuläre System besitzt und viele hochinteressante Forschungsfragen eröffnet. Viele Mechanismen sind noch nicht ausreichend untersucht und verstanden worden. Gerade die Komplexität des Zusammenwirkens von Phosphor, Vitamin D, PTH und FGF23 machen die Forschung auf diesem Gebiet besonders relevant, denn jeder dieser Faktoren hat tiefgreifende Einflüsse auf den Metabolismus und die Gesundheit des Menschen.

Summary

Almost 40% of deaths in Germany are attributed to a disease of the cardiovascular system. The classic risk factors include age, gender, smoking, obesity and hypercholesterolemia. In recent years, vitamin D and, more recently, phosphorus have also been discussed in this context. It is estimated that about one third of the world population has a vitamin D deficiency, while the phosphorus uptake is usually exceeded by 2-3 times. Vitamin D deficiency is associated with higher cardiovascular mortality. The same applies to an increased concentration of phosphorus in the serum. There is, however, some controversy surrounding this topic. The metabolic pathways of vitamin D and phosphorus are closely linked. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, PTH and FGF23 strongly influence each other via positive and negative feedback. PTH and FGF23 mediate many effects of vitamin D and phosphorus attributed to cardiovascular problems. Both are associated with a higher incidence of hypertension, left ventricular hypertrophy, cardiac insufficiency, cardiac arrhythmias and valvular heart disease, which may contribute to higher cardiac morbidity and mortality. To further investigate the cardiac effects of vitamin D and phosphorus, two long-term animal studies were conducted. The cardiovascular system was characterized more detailed morphologically and molecular biologically, depending on the study. The first study investigated the influence of a Vdr knockout on the blood pressure, the heart function and morphology using $\text{Vdr}^{-/-}$ mice and their corresponding $\text{Vdr}^{+/+}$ mice. The second study on the $\text{Ldlr}^{-/-}$ atherosclerosis mouse model was carried out in a two-factorial experimental design with the influencing factors vitamin D and phosphorus.

Both studies made clear that vitamin D had small effects on the investigated parameters of the cardiovascular system compared to phosphorus. Analyses of Vdr knockout effects on cardiac function have shown that although the Vdr knockout significantly increases the serum renin and PTH concentrations, the knockout had no measurable effect on systolic blood pressure or heart rate. Also, with respect to the heart dimensions, no differences between $\text{Vdr}^{-/-}$ and $\text{Vdr}^{+/+}$ animals could be detected. These findings are supported by the results of the transthoracic echocardiography. Here, too, no influence of the Vdr knockout on the cardiac dimensions or cardiac function could be demonstrated. In the

second study too, a sufficient vitamin D supply had little effect on the measured parameters compared to a deficient supply. Furthermore, there were hardly any relevant interactions with the factor phosphorus. Alimentary phosphorus was the factor of much stronger influence. In the long-term study II, excessive phosphorus intake led to a marked increase in the phosphaturic hormones PTH and FGF23, both positively associated with the onset of cardiac hypertrophy. When high-phosphorus diets were fed, the heart weight was significantly reduced, despite the marked increase in PTH and FGF23. However, it is possible that another effect of phosphorus on the insulin and IGF1 metabolism has counteracted the effect of PTH and FGF23. Study II demonstrated a strong association between excessive phosphorus feeding and a reduction in insulin levels, IGF1 concentration in heart tissue, and phosphorylation of IR and IGF1R. Therefore, a reduced phosphorylation of Akt1 occurred. The Akt1 signaling pathway is involved in muscle development and growth. Thus, inhibition of this metabolic pathway in the heart may be a relevant cause of the heart weight reduction. Furthermore, the excessive dietary intake of phosphorus led to a reduction in the proportion of atherosclerotic lesions with a simultaneous increase in the proportion of calcification in the aorta or aortic valve. Another effect was the reduction of the lipid and cholesterol concentration in the liver. This effect may also be due to the modulation of insulin metabolism and may be responsible for the reduction of atherosclerotic lesions.

The unexpected results of the long-term study II made clear that phosphorus has a far-reaching effect on the cardiovascular system and opens up many exciting research questions. Many mechanisms have not been sufficiently investigated and understood. It is precisely the complexity of the interaction between phosphorus, vitamin D, PTH and FGF23 that makes research in this area particularly relevant, as each of these factors has a severe influence on human metabolism and health.

6 Literaturverzeichnis

- Aihara, K; Akaike, M; Azuma, H; Matsumoto, T; Yoshimura, K; Kato, S (2003): Vitamin D receptor is a regulator of vasorelaxation factor gene expression 2P-0506. Posterpräsentation. In: *Atheroscler Suppl* 4 (2), S. 151. DOI: 10.1016/S1567-5688(03)90647-7.
- Allon, M (1992): Effects of insulin and glucose on renal phosphate reabsorption. Interactions with dietary phosphate. In: *J Am Soc Nephrol* 2 (11), S. 1593–1600.
- Ameri, P; Giusti, A; Boschetti, M; Bovio, M; Teti, C; Leoncini, G; Ferone, D; Murialdo, G; Minuto, F (2013a): Vitamin D increases circulating IGF1 in adults. Potential implication for the treatment of GH deficiency. In: *Eur J Endocrinol* 169 (6), S. 767–772. DOI: 10.1530/EJE-13-0510.
- Ameri, P; Giusti, A; Boschetti, M; Murialdo, G; Minuto, F; Ferone, D (2013b): Interactions between vitamin D and IGF-I. From physiology to clinical practice. In: *Clin Endocrinol* 79 (4), S. 457–463. DOI: 10.1111/cen.12268.
- Ameri, P; Ronco, D; Casu, M; Denegri, A; Bovio, M; Menoni, S; Ferone, D; Murialdo, G (2010): High prevalence of vitamin D deficiency and its association with left ventricular dilation. An echocardiography study in elderly patients with chronic heart failure. In: *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20 (9), S. 633–640. DOI: 10.1016/j.numecd.2010.01.002.
- Anderson, JL; Vanwoerkom, RC; Horne, BD; Bair, TL; May, HT; Lappé, DL; Muhlestein, JB (2011): Parathyroid hormone, vitamin D, renal dysfunction, and cardiovascular disease. Dependent or independent risk factors? In: *Am Heart J* 162 (2), 331-339. DOI: 10.1016/j.ahj.2011.05.005.
- Anderson, PH; Hendrix, I; Sawyer, RK; Zarrinkalam, R; Manavis, J; Sarvestani, GT; May, BK; Morris, HA (2008): Co-expression of CYP27B1 enzyme with the 1.5kb CYP27B1 promoter-luciferase transgene in the mouse. In: *Mol Cell Endocrinol* 285 (1-2), S. 1–9. DOI: 10.1016/j.mce.2007.12.018.
- Andersson, P; Rydberg, E; Willenheimer, R (2004): Primary hyperparathyroidism and heart disease--a review. In: *Eur Heart J* 25 (20), S. 1776–1787. DOI: 10.1016/j.ehj.2004.07.010.
- Ärnlöv, J; Carlsson, AC; Sundström, J; Ingelsson, E; Larsson, A; Lind, L; Larsson, TE (2013a): Higher fibroblast growth factor-23 increases the risk of all-cause and cardiovascular mortality in the community. In: *Kidney Int* 83 (1), S. 160–166. DOI: 10.1038/ki.2012.327.
- Ärnlöv, J; Carlsson, AC; Sundström, J; Ingelsson, E; Larsson, A; Lind, L; Larsson, TE (2013b): Serum FGF23 and Risk of Cardiovascular Events in Relation to Mineral Metabolism and Cardiovascular Pathology. In: *Clin J Am Soc Nephrol* 8 (5), S. 781–786. DOI: 10.2215/CJN.09570912.

- Askew, FA; Bourdillon, RB; Bruce, HM; Jenkins, RGC; Webster, TA (1930): The Distillation of Vitamin D. In: *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 107 (748), S. 76–90. DOI: 10.1098/rspb.1930.0054.
- Awan, Z; Denis, M; Bailey, D; Giaid, A; Prat, A; Goltzman, D; Seidah, NG; Genest, J (2011): The LDLR deficient mouse as a model for aortic calcification and quantification by micro-computed tomography. In: *Atherosclerosis* 219 (2), S. 455–462. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.08.035.
- Bär, L; Feger, M; Fajol, A; Klotz, L-O; Zeng, S; Lang, F; Hocher, B; Föller, M (2018): Insulin suppresses the production of fibroblast growth factor 23 (FGF23). In: *Proc Natl Acad Sci USA* 115 (22), S. 5804–5809. DOI: 10.1073/pnas.1800160115.
- Baum, M; Schiavi, S; Dwarakanath, V; Quigley, R (2005): Effect of fibroblast growth factor-23 on phosphate transport in proximal tubules. In: *Kidney Int* 68 (3), S. 1148–1153. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00506.x.
- Belke, DD; Betuing, S; Tuttle, MJ; Graveleau, C; Young, ME; Pham, M; Zhang, D; Cooksey, RC; McClain, DA; Litwin, SE; Taegtmeier, H; Severson, D; Kahn, CR; Abel, ED (2002): Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. In: *J Clin Invest* 109 (5), S. 629–639. DOI: 10.1172/JCI200213946.
- Ben-Dov, IZ; Galitzer, H; Lavi-Moshayoff, V; Goetz, R; Kuro-O, M; Mohammadi, M; Sirkis, R; Naveh-Many, T; Silver, J (2007): The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. In: *J Clin Invest* 117 (12), S. 4003–4008. DOI: 10.1172/JCI32409.
- Bergwitz, C; Jüppner, H (2010): Regulation of Phosphate Homeostasis by PTH, Vitamin D, and FGF23. In: *Annu Rev Med* 61, S. 91–104. DOI: 10.1146/annurev.med.051308.111339.
- Beveridge, LA; Struthers, AD; Khan, F; Jorde, R; Scragg, R; Macdonald, HM; Alvarez, JA; Boxer, RS; Dalbeni, A; Gepner, AD; Isbel, NM; Larsen, T; Nagpal, J; Petchey, WG; Stricker, H; Strobel, F; Tangpricha, V; Toxqui, L; Vaquero, MP; Wamberg, L; Zittermann, A; Witham, MD (2015): Effect of Vitamin D Supplementation on Blood Pressure. A Systematic Review and Meta-analysis Incorporating Individual Patient Data. In: *JAMA Intern Med* 175 (5), S. 745–754. DOI: 10.1001/jamainternmed.2015.0237.
- Biber, J; Hernando, N; Forster, I; Murer, H (2009): Regulation of phosphate transport in proximal tubules. In: *Pflugers Arch* 458 (1), S. 39–52. DOI: 10.1007/s00424-008-0580-8.
- Bijnen, FC; Caspersen, CJ; Feskens, EJ; Saris, WH; Mosterd, WL; Kromhout, D (1998): Physical activity and 10-year mortality from cardiovascular diseases and all causes. The Zutphen Elderly Study. In: *Arch Intern Med* 158 (14), S. 1499–1505. DOI: 10.1001/archinte.158.14.1499.

- Bischoff-Ferrari, HA; Giovannucci, E; Willett, WC; Dietrich, T; Dawson-Hughes, B (2006): Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. In: *Am J Clin Nutr* 84 (1), S. 18–28. DOI: 10.1093/ajcn/84.1.18.
- Blau, JE; Collins, MT (2015): The PTH-Vitamin D-FGF23 axis. In: *Rev Endocr Metab Disord* 16 (2), S. 165–174. DOI: 10.1007/s11154-015-9318-z.
- Block, GA; Spiegel, DM; Ehrlich, J; Mehta, R; Lindbergh, J; Dreisbach, A; Raggi, P (2005): Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis. In: *Kidney Int* 68 (4), S. 1815–1824. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00600.x.
- Bolland, MJ; Grey, A; Gamble, GD; Reid, IR (2014a): The effect of vitamin D supplementation on skeletal, vascular, or cancer outcomes. A trial sequential meta-analysis. In: *Lancet Diabetes Endocrinol* 2 (4), S. 307–320. DOI: 10.1016/S2213-8587(13)70212-2.
- Bolland, MJ; Grey, A; Gamble, GD; Reid, IR (2014b): The effect of vitamin D supplementation on skeletal, vascular, or cancer outcomes – Authors' reply. In: *Lancet Diabetes Endocrinol* 2 (5), S. 364–365. DOI: 10.1016/S2213-8587(14)70100-7.
- Brock, K; Huang, W-Y; Fraser, DR; Ke, L; Tseng, M; Stolzenberg-Solomon, R; Peters, U; Ahn, J; Purdue, M; Mason, RS; McCarty, C; Ziegler, RG; Graubard, B (2010): Low vitamin D status is associated with physical inactivity, obesity and low vitamin D intake in a large US sample of healthy middle-aged men and women. In: *J Steroid Biochem Mol Biol* 121 (1-2), S. 462–466. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.03.091.
- Brown, MS; Goldstein, JL (1986): A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. In: *Science* 232 (4746), S. 34–47. DOI: 10.1126/science.3513311.
- Brown, SJ; Ruppe, MD; Tabatabai, LS (2017): The Parathyroid Gland and Heart Disease. In: *Methodist Deakey Cardiovasc J* 13 (2), S. 49–54. DOI: 10.14797/mdcj-13-2-49.
- Budoff, MJ; Yu, D; Nasir, K; Mehrotra, R; Chen, L; Takasu, J; Agrawal, N; Liu, ST; Blumenthal, RS (2005): Diabetes and progression of coronary calcium under the influence of statin therapy. In: *Am Heart J* 149 (4), S. 695–700. DOI: 10.1016/j.ahj.2004.07.034.
- Burgess, ED; Hawkins, RG; Watanabe, M (1990): Interaction of 1,25-dihydroxyvitamin D and plasma renin activity in high renin essential hypertension. In: *Am J Hypertens* 3 (12), S. 903–905. DOI: 10.1093/ajh/3.12.903.
- Butler, AA; LeRoith, D (2001): Minireview. Tissue-specific versus generalized gene targeting of the igf1 and igf1r genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. In: *Endocrinology* 142 (5), S. 1685–1688. DOI: 10.1210/endo.142.5.8148.

- Calvo, MS; Kumar, R; Heath, H (1988): Elevated secretion and action of serum parathyroid hormone in young adults consuming high phosphorus, low calcium diets assembled from common foods. In: *J Clin Endocrinol Metab* 66 (4), S. 823–829. DOI: 10.1210/jcem-66-4-823.
- Cardús, A; Parisi, E; Gallego, C; Aldea, M; Fernández, E; Valdivielso, JM (2006): 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. In: *Kidney Int* 69 (8), S. 1377–1384. DOI: 10.1038/sj.ki.5000304.
- Carrara, D; Bernini, M; Bacca, A; Rugani, I; Duranti, E; Virdis, A; Ghiadoni, L; Taddei, S; Bernini, G (2014): Cholecalciferol administration blunts the systemic renin-angiotensin system in essential hypertensives with hypovitaminosis D. In: *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 15 (1), S. 82–87. DOI: 10.1177/1470320312471149.
- Carrillo-López, N; Panizo, S; Alonso-Montes, C; Martínez-Arias, L; Avello, N; Sosa, P; Dusso, AS; Cannata-Andía, JB; Naves-Díaz, M (2018): High-serum phosphate and parathyroid hormone distinctly regulate bone loss and vascular calcification in experimental chronic kidney disease. In: *Nephrol Dial Transplant* (1), S. 1–8. DOI: 10.1093/ndt/gfy287.
- Chanakul, A; Zhang, MYH; Louw, A; Armbrecht, HJ; Miller, WL; Portale, AA; Perwad, F (2013): FGF-23 regulates CYP27B1 transcription in the kidney and in extra-renal tissues. In: *PloS one* 8 (9), S. 1–11. DOI: 10.1371/journal.pone.0072816.
- Chang, AR; Anderson, C (2017): Dietary Phosphorus Intake and the Kidney. In: *Annu Rev Nutr* 37, S. 321–346. DOI: 10.1146/annurev-nutr-071816-064607.
- Chen, NX; O'Neill, KD; Duan, D; Moe, SM (2002): Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. In: *Kidney Int* 62 (5), S. 1724–1731. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00625.x.
- Chen, S; Glenn, DJ; Ni, W; Grigsby, CL; Olsen, K; Nishimoto, M; Law, CS; Gardner, DG (2008): Expression of the vitamin d receptor is increased in the hypertrophic heart. In: *Hypertension* 52 (6), S. 1106–1112. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.119602.
- Chen, WS; Xu, PZ; Gottlob, K; Chen, ML; Sokol, K; Shiyanova, T; Roninson, I; Weng, W; Suzuki, R; Tobe, K; Kadowaki, T; Hay, N (2001): Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. In: *Genes Dev* 15 (17), S. 2203–2208. DOI: 10.1101/gad.913901.
- Cheng, JB; Levine, MA; Bell, NH; Mangelsdorf, DJ; Russell, DW (2004): Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (20), S. 7711–7715. DOI: 10.1073/pnas.0402490101.

- Chitnis, MM; Yuen, JSP; Protheroe, AS; Pollak, M; Macaulay, VM (2008): The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. In: *Clin Cancer Res* 14 (20), S. 6364–6370. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4879.
- Chowdhury, R; Kunutsor, S; Vitezova, A; Oliver-Williams, C; Chowdhury, S; Kiefte-de-Jong, JC; Khan, H; Baena, CP; Prabhakaran, D; Hoshen, MB; Feldman, BS; Pan, A; Johnson, L; Crowe, F; Hu, FB; Franco, OH (2014): Vitamin D and risk of cause specific death. Systematic review and meta-analysis of observational cohort and randomised intervention studies. In: *BMJ* 348, S. 1–13. DOI: 10.1136/bmj.g1903.
- Cirillo, M; Bilancio, G; Cirillo, C (2016): Reversible vascular calcifications associated with hypervitaminosis D. In: *J Nephrol* 29 (1), S. 129–131. DOI: 10.1007/s40620-015-0228-7.
- Coiro, V; Volpi, R; Capretti, L; Finardi, L; Magotti, M-G; Manfredi, G; Chiodera, P; Sacconi Jotti, G (2004): Inhibition of growth hormone secretion in mild primary hyperparathyroidism. In: *Horm Res* 62 (2), S. 88–91. DOI: 10.1159/000079613.
- Corman, B; Touvay, C; Poujeol, P; Rouffignac, C de (1978): Glucose-mediated inhibition of phosphate reabsorption in rat kidney. In: *Am J Physiol Renal Physiol* 235 (5), S. 430–439. DOI: 10.1152/ajprenal.1978.235.5.F430.
- Dalbeni, A; Scaturro, G; Degan, M; Minuz, P; Delva, P (2014): Effects of six months of vitamin D supplementation in patients with heart failure. A randomized double-blind controlled trial. In: *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 24 (8), S. 861–868. DOI: 10.1016/j.numecd.2014.02.015.
- Dawson-Hughes, B; Mithal, A; Bonjour, J-P; Boonen, S; Burckhardt, P; Fuleihan, GE-H; Josse, RG; Lips, P; Morales-Torres, J; Yoshimura, N (2010): IOF position statement. Vitamin D recommendations for older adults. In: *Osteoporos Int* 21 (7), S. 1151–1154. DOI: 10.1007/s00198-010-1285-3.
- DeBosch, BJ; Muslin, AJ (2008): Insulin signaling pathways and cardiac growth. In: *J Mol Cell Cardiol* 44 (5), S. 855–864. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2008.03.008.
- DeFronzo, RA; Cooke, CR; Andres, R; Faloona, GR; Davis, PJ (1975): The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. In: *J Clin Invest* 55 (4), S. 845–855. DOI: 10.1172/JCI107996.
- Delvin, EE; Lambert, M; Levy, E; O'Loughlin, J; Mark, S; Gray-Donald, K; Paradis, G (2010): Vitamin D status is modestly associated with glycemia and indicators of lipid metabolism in French-Canadian children and adolescents. In: *J Nutr* 140 (5), S. 987–991. DOI: 10.3945/jn.109.112250.
- D'Ercole, AJ; Stiles, AD; Underwood, LE (1984): Tissue concentrations of somatomedin C. Further evidence for multiple sites of synthesis and

- paracrine or autocrine mechanisms of action. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (3), S. 935–939. DOI: 10.1073/pnas.81.3.935.
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) (Hg.) (2011): Vitamin D und Prävention ausgewählter chronischer Krankheiten - Stellungnahme. Unter Mitarbeit von Jakob Linseisen, Angela Bechthold, Heike A. Bischoff-Ferrari, Birte Hintzpeter, Eva Leschik-Bonnet, Jörg Reichrath et al.
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE); Österreichische Gesellschaft für Ernährung (ÖGE); Schweizerische Gesellschaft für Ernährung (SGE) (Hg.) (2015): D-A-CH-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Deutsche Gesellschaft für Ernährung; Österreichische Gesellschaft für Ernährung; Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung. 2. Aufl. Neustadt an der Weinstraße: Neuer Umschau Buchverl. Online verfügbar unter <https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/phosphor/>.
- Dhingra, R; Sullivan, LM; Fox, CS; Wang, TJ; D'Agostino, RB; Gaziano, JM; Vasan, RS (2007): Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of cardiovascular disease in the community. In: *Arch Intern Med* 167 (9), S. 879–885. DOI: 10.1001/archinte.167.9.879.
- Di Giuseppe, R; Kühn, T; Hirche, F; Buijsse, B; Dierkes, J; Fritsche, A; Kaaks, R; Boeing, H; Stangl, GI; Weikert, C (2015): Plasma fibroblast growth factor 23 and risk of cardiovascular disease. Results from the EPIC-Germany case-cohort study. In: *Eur J Epidemiol* 30 (2), S. 131–141. DOI: 10.1007/s10654-014-9982-4.
- Drolet, M-C; Roussel, E; Deshaies, Y; Couet, J; Arsenault, M (2006): A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice. In: *J Am Coll Cardiol* 47 (4), S. 850–855. DOI: 10.1016/j.jacc.2005.09.049.
- Drüeke, TB; Massy, ZA (2012): Role of vitamin D in vascular calcification. Bad guy or good guy? In: *Nephrol Dial Transplant* 27 (5), S. 1704–1707. DOI: 10.1093/ndt/gfs046.
- Eder, K; Kirchgessner, M (1994): Dietary fat influences the effect of zinc deficiency on liver lipids and fatty acids in rats force-fed equal quantities of diet. In: *J Nutr* 124 (10), S. 1917–1926. DOI: 10.1093/jn/124.10.1917.
- Eurostat (2018): Todesursachen - absolute Zahl im Berichtsland und für Einwohner. Europäische Union (derzeitige Zusammensetzung) 2014, S. 1–456, zuletzt geprüft am 20.07.2018.
- Eyles, DW; Smith, S; Kinobe, R; Hewison, M; McGrath, JJ (2005): Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. In: *J Chem Neuroanat* 29 (1), S. 21–30. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2004.08.006.
- Fall, T; Shiue, I; Bergeå af Geijerstam, P; Sundström, J; Ärnlöv, J; Larsson, A; Melhus, H; Lind, L; Ingelsson, E (2012): Relations of circulating vitamin D concentrations with left ventricular geometry and function. In: *Eur J Heart Fail* 14 (9), S. 985–991. DOI: 10.1093/eurjhf/hfs091.

- Faul, C; Amaral, AP; Oskouei, B; Hu, M-C; Sloan, A; Isakova, T; Gutiérrez, OM; Aguillon-Prada, R; Lincoln, J; Hare, JM; Mundel, P; Morales, A; Scialla, J; Fischer, M; Soliman, EZ; Chen, J; Go, AS; Rosas, SE; Nessel, L; Townsend, RR; Feldman, HI; St John Sutton, M; Ojo, A; Gadegbeku, C; Di Marco, GS; Reuter, S; Kentrup, D; Tiemann, K; Brand, M; Hill, JA; Moe, OW; Kuro-O, M; Kusek, JW; Keane, MG; Wolf, M (2011): FGF23 induces left ventricular hypertrophy. In: *J Clin Invest* 121 (11), S. 4393–4408. DOI: 10.1172/JCI46122.
- Ford, JA; MacLennan, GS; Avenell, A; Bolland, M; Grey, A; Witham, M (2014): Cardiovascular disease and vitamin D supplementation. Trial analysis, systematic review, and meta-analysis. In: *Am J Clin Nutr* 100 (3), S. 746–755. DOI: 10.3945/ajcn.113.082602.
- Gao, S; Ho, D; Vatner, DE; Vatner, SF (2011): Echocardiography in Mice. In: *Curr Protoc Mouse Biol* 1 (1), S. 71–83. DOI: 10.1002/9780470942390.mo100130.
- Gattineni, J; Bates, C; Twombly, K; Dwarakanath, V; Robinson, ML; Goetz, R; Mohammadi, M; Baum, M (2009): FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. In: *Am J Physiol Renal Physiol* 297 (2), S. 282–291. DOI: 10.1152/ajprenal.90742.2008.
- Giachelli, CM; Jono, S; Shioi, A; Nishizawa, Y; Mori, K; Morii, H (2001): Vascular calcification and inorganic phosphate. In: *Am J Kidney Dis* 38 (4), S. 34–37. DOI: 10.1053/ajkd.2001.27394.
- Ginsburg, JM (1972): Effect of glucose and free fatty acid on phosphate transport in dog kidney. In: *Am J Physiol* 222 (5), S. 1153–1160. DOI: 10.1152/ajplegacy.1972.222.5.1153.
- Go, AS; Chertow, GM; Fan, D; McCulloch, CE; Hsu, C-Y (2004): Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. In: *N Engl J Med* 351 (13), S. 1296–1305. DOI: 10.1056/NEJMoa041031.
- Goldstein, JL; Brown, MS; Anderson, RG; Russell, DW; Schneider, WJ (1985): Receptor-mediated endocytosis. Concepts emerging from the LDL receptor system. In: *Annu Rev Cell Biol* 1, S. 1–39. DOI: 10.1146/annurev.cb.01.110185.000245.
- Grabner, A; Amaral, AP; Schramm, K; Singh, S; Sloan, A; Yanucil, C; Li, J; Shehadeh, LA; Hare, JM; David, V; Martin, A; Fornoni, A; Di Marco, GS; Kentrup, D; Reuter, S; Mayer, AB; Pavenstädt, H; Stypmann, J; Kuhn, C; Hille, S; Frey, N; Leifheit-Nestler, M; Richter, B; Haffner, D; Abraham, R; Bange, J; Sperl, B; Ullrich, A; Brand, M; Wolf, M; Faul, C (2015): Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. In: *Cell Metab* 22 (6), S. 1020–1032. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.09.002.

- Gracioli, FG; Neves, KR; dos Reis, LM; Gracioli, RG; Noronha, IL; Moysés, RMA; Jorgetti, V (2009): Phosphorus overload and PTH induce aortic expression of Runx2 in experimental uraemia. In: *Nephrol Dial Transplant* 24 (5), S. 1416–1421. DOI: 10.1093/ndt/gfn686.
- Grundmann, SM; Brandsch, C; Rottstädt, D; Kühne, H; Stangl, GI (2017): The High Calcium, High Phosphorus Rescue Diet Is Not Suitable to Prevent Secondary Hyperparathyroidism in Vitamin D Receptor Deficient Mice. In: *Front Physiol* 8, S. 1–6. DOI: 10.3389/fphys.2017.00212.
- Gruson, D; Buglioni, A; Burnett, JC (2014): PTH. Potential role in management of heart failure. In: *Clin Chim Acta* 433, S. 290–296. DOI: 10.1016/j.cca.2014.03.029.
- Gutierrez, O; Isakova, T; Rhee, E; Shah, A; Holmes, J; Collerone, G; Jüppner, H; Wolf, M (2005): Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. In: *J Am Soc Nephrol* 16 (7), S. 2205–2215. DOI: 10.1681/ASN.2005010052.
- Gutiérrez, OM; Januzzi, JL; Isakova, T; Laliberte, K; Smith, K; Collerone, G; Sarwar, A; Hoffmann, U; Coglianese, E; Christenson, R; Wang, TJ; deFilippi, C; Wolf, M (2009): Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. In: *Circulation* 119 (19), S. 2545–2552. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.844506.
- Hao, H; Li, X; Li, Q; Lin, H; Chen, Z; Xie, J; Xuan, W; Liao, W; Bin, J; Huang, X; Kitakaze, M; Liao, Y (2016): FGF23 promotes myocardial fibrosis in mice through activation of β -catenin. In: *Oncotarget* 7 (40), S. 64649–64664. DOI: 10.18632/oncotarget.11623.
- Hara, A; Radin, NS (1978): Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. In: *Anal Biochem* 90 (1), S. 420–426. DOI: 10.1016/0003-2697(78)90046-5.
- Harnett, JD; Foley, RN; Kent, GM; Barre, PE; Murray, D; Parfrey, PS (1995): Congestive heart failure in dialysis patients. Prevalence, incidence, prognosis and risk factors. In: *Kidney Int* 47 (3), S. 884–890. DOI: 10.1038/ki.1995.132.
- Harris, IR; Höppner, H; Siefken, W; Farrell, AM; Wittern, KP (2000): Regulation of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase by insulin and epidermal growth factor in HaCaT keratinocytes. In: *J Invest Dermatol* 114 (1), S. 83–87. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00822.x.
- He, J; Ogden, LG; Bazzano, LA; Vupputuri, S; Loria, C; Whelton, PK (2001): Risk Factors for Congestive Heart Failure in US Men and Women. In: *Arch Intern Med* 161 (7), S. 996–1002. DOI: 10.1001/archinte.161.7.996.
- Henquin, JC; Lambert, AE (1976): Bicarbonate modulation of glucose-induced biphasic insulin release by rat islets. In: *Am J Physiol* 231 (3), S. 713–721.

- Hii, CS; Ferrante, A (2016): The Non-Genomic Actions of Vitamin D. In: *Nutrients* 8 (3), S. 135. DOI: 10.3390/nu8030135.
- Hilger, J; Friedel, A; Herr, R; Rausch, T; Roos, F; Wahl, DA; Pierroz, DD; Weber, P; Hoffmann, K (2014): A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. In: *Br J Nutr* 111 (1), S. 23–45. DOI: 10.1017/S0007114513001840.
- Hruska, KA; Mathew, S; Saab, G (2005): Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. In: *Circ Res* 97 (2), S. 105–114. DOI: 10.1161/01.RES.00000175571.53833.6c.
- Iliadis, F; Kadoglou, N; Didangelos, T (2011): Insulin and the heart. In: *Diabetes Res Clin Pract* 93, S. 86–91. DOI: 10.1016/S0168-8227(11)70019-5.
- Ingebritsen, TS; Geelen, MJ; Parker, RA; Evenson, KJ; Gibson, DM (1979): Modulation of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase activity, reductase kinase activity, and cholesterol synthesis in rat hepatocytes in response to insulin and glucagon. In: *J Biol Chem* 254 (20), S. 9986–9989.
- Isakova, T; Wahl, P; Vargas, GS; Gutierrez, OM; Scialla, J; Xie, H; Appleby, D; Nessel, L; Bellovich, K; Chen, J; Hamm, L; Gadegbeku, C; Horwitz, E; Townsend, RR; Anderson, CAM; Lash, JP; Hsu, C-Y; Leonard, MB; Wolf, M (2011): Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. In: *Kidney Int* 79 (12), S. 1370–1378. DOI: 10.1038/ki.2011.47.
- Jackson, G; Gibbs, CR; Davies, MK; Lip, GYH (2000): ABC of heart failure Pathophysiology. In: *BMJ* 320 (7228), S. 167–170.
- Jacob, AI; Sallman, A; Santiz, Z; Hollis, BW (1984): Defective photoproduction of cholecalciferol in normal and uremic humans. In: *J Nutr* 114 (7), S. 1313–1319. DOI: 10.1093/jn/114.7.1313.
- Jeong, HY; Park, KM; Lee, MJ; Yang, DH; Kim, SH; Lee, S-Y (2017): Vitamin D and Hypertension. In: *Electrolyte Blood Press* 15 (1), S. 1–11. DOI: 10.5049/EBP.2017.15.1.1.
- Jono, S; McKee, MD; Murry, CE; Shioi, A; Nishizawa, Y; Mori, K; Morii, H; Giachelli, CM (2000): Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. In: *Circ Res* 87 (7), S. 10–17. DOI: 10.1161/01.RES.87.7.e10.
- Jüppner, H (2011): Phosphate and FGF-23. In: *Kidney Int* 79, S. 24–27. DOI: 10.1038/ki.2011.27.
- Kalueff, AV; Keisala, T; Minasyan, A; Kuuslahti, M; Miettinen, S; Tuohimaa, P (2006): Behavioural anomalies in mice evoked by "Tokyo" disruption of the Vitamin D receptor gene. In: *Neurosci Res* 54 (4), S. 254–260. DOI: 10.1016/j.neures.2005.12.008.

- Kalueff, AV; Lou, YR; Laaksi, I; Tuohimaa, P (2005): Abnormal behavioral organization of grooming in mice lacking the vitamin D receptor gene. In: *J Neurogenet* 19 (1), S. 1–24. DOI: 10.1080/01677060590949683.
- Kalueff, AV; Lou, Y-R; Laaksi, I; Tuohimaa, P (2004): Increased grooming behavior in mice lacking vitamin D receptors. In: *Physiol Behav* 82 (2-3), S. 405–409. DOI: 10.1016/j.physbeh.2004.04.010.
- Karwowski, W; Naumnik, B; Szczepański, M; Myśliwiec, M (2012): The mechanism of vascular calcification – a systematic review. In: *Med Sci Monit* 18 (1), S. 1–11. DOI: 10.12659/MSM.882181.
- Kemi, VE; Kärkkäinen, MUM; Rita, HJ; Laaksonen, MML; Outila, TA; Lamberg-Allardt, CJE (2010): Low calcium:phosphorus ratio in habitual diets affects serum parathyroid hormone concentration and calcium metabolism in healthy women with adequate calcium intake. In: *Br J Nutr* 103 (4), S. 561–568. DOI: 10.1017/S0007114509992121.
- Kendrick, J; Chonchol, M (2011): The role of phosphorus in the development and progression of vascular calcification. In: *Am J Kidney Dis* 58 (5), S. 826–834. DOI: 10.1053/j.ajkd.2011.07.020.
- Kendrick, J; Kestenbaum, B; Chonchol, M (2011): Phosphate and cardiovascular disease. In: *Adv Chronic Kidney Dis* 18 (2), S. 113–119. DOI: 10.1053/j.ackd.2010.12.003.
- Kestenbaum, B; Belozeroff, V (2007): Mineral metabolism disturbances in patients with chronic kidney disease. In: *Eur J Clin Invest* 37 (8), S. 607–622. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2007.01840.x.
- Kestenbaum, B; Katz, R; Boer, I de; Hoofnagle, A; Sarnak, MJ; Shlipak, MG; Jenny, NS; Siscovick, DS (2011): Vitamin D, parathyroid hormone, and cardiovascular events among older adults. In: *J Am Coll Cardiol* 58 (14), S. 1433–1441. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.03.069.
- Khouzam, RN; Weber, KT; Flax, SD; Dishmon, DA; Farah, V; Carbone, LD (2006): Secondary Hyperparathyroidism in Patients with Untreated and Treated Congestive Heart Failure. In: *Am J Med Sci* 331 (1), S. 30–34. DOI: 10.1097/00000441-200601000-00009.
- Kim, CS; Kim, SW (2014): Vitamin D and chronic kidney disease. In: *Korean J Intern Med* 29 (4), S. 416–427. DOI: 10.3904/kjim.2014.29.4.416.
- Klein, LJ; Visser, FC (2010): The effect of insulin on the heart. Part 1: Effects on metabolism and function. In: *Neth Heart J* 18 (4), S. 197–201.
- Kochanek, KD; Murphy, SL; Xu, J; Arias, E (2017): Mortality in the United States, 2016. In: *National Center for Health Statistics - Data Brief* (293), S. 1–8.
- Krajisnik, T; Björklund, P; Marsell, R; Ljunggren, O; Akerström, G; Jonsson, KB; Westin, G; Larsson, TE (2007): Fibroblast growth factor-23 regulates

- parathyroid hormone and 1 α -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. In: *J Endocrinol* 195 (1), S. 125–131. DOI: 10.1677/JOE-07-0267.
- Kühn, T; Kaaks, R; Teucher, B; Hirche, F; Dierkes, J; Weikert, C; Katzke, V; Boeing, H; Stangl, GI; Buijsse, B (2013): Plasma 25-hydroxyvitamin D and its genetic determinants in relation to incident myocardial infarction and stroke in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)-Germany study. In: *PloS one* 8 (7), S. 1–12. DOI: 10.1371/journal.pone.0069080.
- Kühn, T; Kaaks, R; Teucher, B; Hirche, F; Dierkes, J; Weikert, C; Katzke, V; Boeing, H; Stangl, GI; Buijsse, B (2014): Dietary, lifestyle, and genetic determinants of vitamin D status. A cross-sectional analysis from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Germany study. In: *Eur J Nutr* 53 (3), S. 731–741. DOI: 10.1007/s00394-013-0577-8.
- Laemmli, UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lee, T; Safdar, N; Mistry, MJ; Wang, Y; Chauhan, V; Campos, B; Munda, R; Cornea, V; Roy-Chaudhury, P (2012): Preexisting Venous Calcification Prior to Dialysis Vascular Access Surgery. In: *Semin Dial* 25 (5), S. 592–595. DOI: 10.1111/j.1525-139X.2012.01063.x.
- LeRoith, D; Werner, H; Beitner-Johnson, D; Roberts, CT (1995): Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. In: *Endocr Rev* 16 (2), S. 143–163. DOI: 10.1210/edrv-16-2-143.
- Li, X; Yang, H-Y; Giachelli, CM (2008): BMP-2 Promotes Phosphate Uptake, Phenotypic Modulation, and Calcification of Human Vascular Smooth Muscle Cells. In: *Atherosclerosis* 199 (2), S. 271–277. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.11.031.
- Li, YC (2011): Molecular mechanism of vitamin D in the cardiovascular system. In: *J Investig Med* 59 (6), S. 868–871. DOI: 10.2310/JIM.0b013e31820ee448.
- Li, YC; Amling, M; Pirro, AE; Priemel, M; Meuse, J; Baron, R; Delling, G; Demay, MB (1998): Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. In: *Endocrinology* 139 (10), S. 4391–4396. DOI: 10.1210/endo.139.10.6262.
- Li, YC; Kong, J; Wei, M; Chen, Z-F; Liu, SQ; Cao, L-P (2002): 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. In: *J Clin Invest* 110 (2), S. 229–238. DOI: 10.1172/JCI200215219.

- Li, YC; Pirro, AE; Amling, M; Dellng, G; Baron, R; Bronson, R; Demay, MB (1997): Targeted ablation of the vitamin D receptor. An animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (18), S. 9831–9835. DOI: 10.1073/pnas.94.18.9831.
- Lieben, L; Masuyama, R; Torrekens, S; van Looveren, R; Schrooten, J; Baatsen, P; Lafage-Proust, M-H; Dresselaers, T; Feng, JQ; Bonewald, LF; Meyer, MB; Pike, JW; Bouillon, R; Carmeliet, G (2012): Normocalcemia is maintained in mice under conditions of calcium malabsorption by vitamin D-induced inhibition of bone mineralization. In: *J Clin Invest* 122 (5), S. 1803–1815. DOI: 10.1172/JCI45890.
- Lin, Y; Berger, L; Sun, Z (2018): Regulation of Insulin Sensitivity by Phosphorus. In: *Diabetes* 67 (Supplement 1), S. 1772. DOI: 10.2337/db18-1772-P.
- Linhartová, K; Veselka, J; Sterbáková, G; Racek, J; Topolcan, O; Cerbák, R (2008): Parathyroid Hormone and Vitamin D Levels are Independently Associated With Calcific Aortic Stenosis. In: *Circ J* 72 (2), S. 245–250. DOI: 10.1253/circj.72.245.
- Liu, D; Fernandez, BO; Hamilton, A; Lang, NN; Gallagher, JMC; Newby, DE; Feelisch, M; Weller, RB (2014): UVA irradiation of human skin vasodilates arterial vasculature and lowers blood pressure independently of nitric oxide synthase. In: *J Invest Dermatol* 134 (7), S. 1839–1846. DOI: 10.1038/jid.2014.27.
- Mak, RH (2008): Insulin and its role in chronic kidney disease. In: *Pediatr Nephrol* 23 (3), S. 355–362. DOI: 10.1007/s00467-007-0611-2.
- Mak, RH; Bettinelli, A; Turner, C; Haycock, GB; Chantler, C (1985): The influence of hyperparathyroidism on glucose metabolism in uremia. In: *J Clin Endocrinol Metab* 60 (2), S. 229–233. DOI: 10.1210/jcem-60-2-229.
- Mak, RH; Haycock, GB; Chantler, C (1983): Glucose intolerance in children with chronic renal failure. In: *Kidney Int Suppl* 15, S. 22–26.
- Manson, JE; Cook, NR; Lee, I-M; Christen, W; Bassuk, SS; Mora, S; Gibson, H; Gordon, D; Copeland, T; D'Agostino, D; Friedenberg, G; Ridge, C; Bubes, V; Giovannucci, EL; Willett, WC; Buring, JE (2019): Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease. In: *N Engl J Med* 380 (1), S. 33–44. DOI: 10.1056/NEJMoa1809944.
- Matsui, T; Nagoshi, T; Rosenzweig, A (2003): Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival. In: *Cell Cycle* 2 (3), S. 220–223. DOI: 10.4161/cc.2.3.381.
- Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel (Hg.) (2008): Nationale Verzehrsstudie II - Ergebnisbericht Teil 2.
- McClure, ST; Chang, AR; Selvin, E; Rebholz, CM; Appel, LJ (2017): Dietary Sources of Phosphorus among Adults in the United States. Results from

- NHANES 2001–2014. In: *Nutrients* 9 (2), S. 1–10. DOI: 10.3390/nu9020095.
- McMullen, JR; Shioi, T; Huang, W-Y; Zhang, L; Tarnavski, O; Bisping, E; Schinke, M; Kong, S; Sherwood, MC; Brown, J; Riggi, L; Kang, PM; Izumo, S (2004): The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. In: *J Biol Chem* 279 (6), S. 4782–4793. DOI: 10.1074/jbc.M310405200.
- Merke, J; Milde, P; Lewicka, S; Hugel, U; Klaus, G; Mangelsdorf, DJ; Haussler, MR; Rauterberg, EW; Ritz, E (1989): Identification and regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor activity and biosynthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Studies in cultured bovine aortic endothelial cells and human dermal capillaries. In: *J Clin Invest* 83 (6), S. 1903–1915. DOI: 10.1172/JCI114097.
- Mizuno, M; Mitchell, JH; Crawford, S; Huang, C-L; Maalouf, N; Hu, M-C; Moe, OW; Smith, SA; Vongpatanasin, W (2016): High dietary phosphate intake induces hypertension and augments exercise pressor reflex function in rats. In: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 311 (1), S. 39–48. DOI: 10.1152/ajpregu.00124.2016.
- Murali, SK; Roschger, P; Zeitz, U; Klaushofer, K; Andrukhova, O; Erben, RG (2016): FGF23 Regulates Bone Mineralization in a 1,25(OH)₂ D₃ and Klotho-Independent Manner. In: *J Bone Miner Res* 31 (1), S. 129–142. DOI: 10.1002/jbmr.2606.
- Ngai, M; Lin, V; Wong, HC; Vathsala, A; How, P (2014): Vitamin D status and its association with mineral and bone disorder in a multi-ethnic chronic kidney disease population. In: *Clin Nephrol* 82 (4), S. 231–239. DOI: 10.5414/CN108182.
- Nguyen, TT; Quan, X; Hwang, K-H; Xu, S; Das, R; Choi, S-K; Wiederkehr, A; Wollheim, CB; Cha, S-K; Park, K-S (2015): Mitochondrial oxidative stress mediates high-phosphate-induced secretory defects and apoptosis in insulin-secreting cells. In: *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308 (11), S. 933–941. DOI: 10.1152/ajpendo.00009.2015.
- Ni, W; Watts, SW; Ng, M; Chen, S; Glenn, DJ; Gardner, DG (2014): Elimination of vitamin D receptor in vascular endothelial cells alters vascular function. In: *Hypertension* 64 (6), S. 1290–1298. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03971.
- Nunes, JPL (2013): Troponin I, but not BNP, is associated with phosphorus, calcium and vitamin D in stable coronary artery disease. In: *Kidney Blood Press Res* 37 (1), S. 43–47. DOI: 10.1159/000343399.
- Obineche, EN; Saadi, H; Benedict, S; Pathan, JY; Frampton, CM; Nicholls, MG (2008): Interrelationships between B-type natriuretic peptides and vitamin D in patients on maintenance peritoneal dialysis. In: *Perit Dial Int* 28 (6), S. 617–621. DOI: 10.1053/j.ajkd.2008.02.200.

- Otto, GP; Rathkolb, B; Oestereich, MA; Lengger, CJ; Moerth, C; Micklich, K; Fuchs, H; Gailus-Durner, V; Wolf, E; Angelis, MH de (2016): Clinical Chemistry Reference Intervals for C57BL/6J, C57BL/6N, and C3HeB/FeJ Mice (*Mus musculus*). In: *J Am Assoc Lab Anim Sci* 55 (4), S. 375–386.
- Palazzuoli, A; Gallotta, M; Quatrini, I; Nuti, R (2010): Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP). Measurement and relevance in heart failure. In: *Vasc Health Risk Manag* 6, S. 411–418.
- Pastor-Arroyo, E-M; Gehring, N; Krudewig, C; Costantino, S; Bettoni, C; Knöpfel, T; Sabrautzki, S; Lorenz-Depiereux, B; Pastor, J; Strom, TM; Hrabě de Angelis, M; Camici, GG; Paneni, F; Wagner, CA; Rubio-Aliaga, I (2018): The elevation of circulating fibroblast growth factor 23 without kidney disease does not increase cardiovascular disease risk. In: *Kidney Int* 94 (1), S. 49–59. DOI: 10.1016/j.kint.2018.02.017.
- Patti, ME; Kahn, CR (1998): The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. In: *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9 (2-4), S. 89–109. DOI: 10.1515/jbcpp.1998.9.2-4.89.
- Philbrick, WM; Wysolmerski, JJ; Galbraith, S; Holt, E; Orloff, JJ; Yang, KH; Vasavada, RC; Weir, EC; Broadus, AE; Stewart, AF (1996): Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. In: *Physiol Rev* 76 (1), S. 127–173. DOI: 10.1152/physrev.1996.76.1.127.
- Pietinen, P; Paturi, M; Reinivuo, H; Tapanainen, H; Valsta, LM (2010): FINDIET 2007 Survey: energy and nutrient intakes. In: *Public health nutrition* 13 (6A), S. 920–924. DOI: 10.1017/S1368980010001102.
- Pilz, S; Tomaschitz, A; Drechsler, C; Boer, RA de (2011): Vitamin D deficiency and heart disease. In: *Kidney Int Suppl* 1 (4), S. 111–115. DOI: 10.1038/kisup.2011.26.
- Qian, J; Colbert, MC; Witte, D; Kuan, C-Y; Gruenstein, E; Osinska, H; Lanske, B; Kronenberg, HM; Clemens, TL (2003): Midgestational lethality in mice lacking the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor is associated with abrupt cardiomyocyte death. In: *Endocrinology* 144 (3), S. 1053–1061. DOI: 10.1210/en.2002-220993.
- Qin, Z; Liu, X; Song, M; Zhou, Q; Yu, J; Zhou, B; Wu, Y; He, Y; Huang, L (2017): Fibroblast growth factor 23 as a predictor of cardiovascular and all-cause mortality in prospective studies. In: *Atherosclerosis* 261, S. 1–11. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.042.
- Razzaque, MS (2011): The dualistic role of vitamin D in vascular calcifications. In: *Kidney Int* 79 (7), S. 708–714. DOI: 10.1038/ki.2010.432.
- Reeves, PG (1997): Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. In: *J Nutr* 127 (5 Suppl), S. 838–841. DOI: 10.1093/jn/127.5.838S.

- Reeves, PG; Nielsen, FH; Fahey, GC (1993): AIN-93 purified diets for laboratory rodents. Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. In: *J Nutr* 123 (11), S. 1939–1951. DOI: 10.1093/jn/123.11.1939.
- Reiss, K; Cheng, W; Ferber, A; Kajstura, J; Li, P; Li, B; Olivetti, G; Homcy, CJ; Baserga, R; Anversa, P (1996): Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (16), S. 8630–8635. DOI: 10.1073/pnas.93.16.8630.
- Resnick, LM; Müller, FB; Laragh, JH (1986): Calcium-regulating hormones in essential hypertension. Relation to plasma renin activity and sodium metabolism. In: *Ann Intern Med* 105 (5), S. 649–654. DOI: 10.7326/0003-4819-105-5-649.
- Riehle, C; Abel, ED (2016): Insulin Signaling and Heart Failure. In: *Circ Res* 118 (7), S. 1151–1169. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306206.
- Román-García, P; Carrillo-López, N; Fernández-Martín, JL; Naves-Díaz, M; Ruiz-Torres, MP; Cannata-Andía, JB (2010): High phosphorus diet induces vascular calcification, a related decrease in bone mass and changes in the aortic gene expression. In: *Bone* 46 (1), S. 121–128. DOI: 10.1016/j.bone.2009.09.006.
- Ross, AC; Taylor, CL; Yaktine, AL; Del Valle, HB (Hg.) (2011): Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. National Academies Press (US). Washington (DC) (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health).
- Rostand, SG; McClure, LA; Kent, ST; Judd, SE; Gutiérrez, OM (2016): Associations of blood pressure, sunlight, and vitamin D in community-dwelling adults. In: *J Hypertens* 34 (9), S. 1704–1710. DOI: 10.1097/HJH.0000000000001018.
- Roy, DR; Seely, JF (1981): Effect of glucose on renal excretion of electrolytes in the rat. In: *Am J Physiol* 240 (1), S. 17–24. DOI: 10.1152/ajprenal.1981.240.1.F17.
- Saleh, F (2003): Parathyroid hormone and left ventricular hypertrophy. In: *Eur Heart J* 24 (22), S. 2054–2060. DOI: 10.1016/j.ehj.2003.09.010.
- Sato, KA; Gray, RW; Lemann, J (1982): Urinary excretion of 25-hydroxyvitamin D in health and the nephrotic syndrome. In: *J Lab Clin Med* 99 (3), S. 325–330.
- Schlüter, K-D; Piper, HM (1998): Cardiovascular actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. In: *Cardiovasc Res* 37 (1), S. 34–41. DOI: 10.1016/S0008-6363(97)00194-6.
- Schmidt, N; Brandsch, C; Kühne, H; Thiele, A; Hirche, F; Stangl, GI; Kocher, O (2012): Vitamin D Receptor Deficiency and Low Vitamin D Diet Stimulate

- Aortic Calcification and Osteogenic Key Factor Expression in Mice. In: *PloS one* 7 (4), S. 1–8. DOI: 10.1371/journal.pone.0035316.
- Schmidt, N; Brandsch, C; Schutkowski, A; Hirche, F; Stangl, GI (2014): Dietary Vitamin D Inadequacy Accelerates Calcification and Osteoblast-Like Cell Formation in the Vascular System of LDL Receptor Knockout and Wild-Type Mice. In: *J Nutr* 144 (5), S. 638–646. DOI: 10.3945/jn.113.189118.
- Schnelle, M; Catibog, N; Zhang, M; Nabeebaccus, AA; Anderson, G; Richards, DA; Sawyer, G; Zhang, X; Toischer, K; Hasenfuss, G; Monaghan, MJ; Shah, AM (2018): Echocardiographic evaluation of diastolic function in mouse models of heart disease. In: *J Mol Cell Cardiol* 114, S. 20–28. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2017.10.006.
- Schöttker, B; Jorde, R; Peasey, A; Thorand, B; Jansen, EHJM; Groot, Ld; Streppel, M; Gardiner, J; Ordóñez-Mena, JM; Perna, L; Wilsgaard, T; Rathmann, W; Feskens, E; Kampman, E; Siganos, G; Njølstad, I; Mathiesen, EB; Kubínová, R; Pająk, A; Topor-Madry, R; Tamosiunas, A; Hughes, M; Kee, F; Bobak, M; Trichopoulou, A; Boffetta, P; Brenner, H (2014): Vitamin D and mortality. Meta-analysis of individual participant data from a large consortium of cohort studies from Europe and the United States. In: *BMJ* 348, S. 1–15. DOI: 10.1136/bmj.g3656.
- Schutkowski, A; Max, D; Bönn, M; Brandsch, C; Grundmann, SM; Hirche, F; Staeger, MS; Stangl, GI (2018): Vitamin D Does Not Play a Functional Role in Adipose Tissue Development in Rodent Models. In: *Mol Nutr Food Res* 62 (4), S. 1–9. DOI: 10.1002/mnfr.201700726.
- Seirafian, S; Haghdarsaheli, Y; Mortazavi, M; Hosseini, M; Moeinzadeh, F (2014): The effect of oral vitamin D on serum level of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide. In: *Adv Biomed Res* 3, S. 1–6. DOI: 10.4103/2277-9175.148234.
- Shimada, T; Kakitani, M; Yamazaki, Y; Hasegawa, H; Takeuchi, Y; Fujita, T; Fukumoto, S; Tomizuka, K; Yamashita, T (2004): Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. In: *J Clin Invest* 113 (4), S. 561–568. DOI: 10.1172/JCI19081.
- Shimada, T; Urakawa, I; Isakova, T; Yamazaki, Y; Epstein, M; Wesseling-Perry, K; Wolf, M; Salusky, IB; Jüppner, H (2010): Circulating fibroblast growth factor 23 in patients with end-stage renal disease treated by peritoneal dialysis is intact and biologically active. In: *J Clin Endocrinol Metab* 95 (2), S. 578–585. DOI: 10.1210/jc.2009-1603.
- Shiota, A; Taketani, Y; Maekawa, Y; Yasutomo, K; Sata, M; Sakai, T; Mizuno, R; Isshiki, M; Yamamoto, H; Takeda, E (2011): High phosphate diet reduces atherosclerosis formation in apolipoprotein E-deficient mice. In: *J Clin Biochem Nutr* 49 (2), S. 109–114. DOI: 10.3164/jc.10-150.
- Simpson, RU; Hershey, SH; Nibbelink, KA (2007): Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. In: *J*

- Steroid Biochem Mol Biol* 103 (3-5), S. 521–524. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2006.12.098.
- Slavic, S; Ford, K; Modert, M; Becirovic, A; Handschuh, S; Baierl, A; Katica, N; Zeitz, U; Erben, RG; Andrukhova, O (2017): Genetic Ablation of Fgf23 or Klotho Does not Modulate Experimental Heart Hypertrophy Induced by Pressure Overload. In: *Sci Rep* 7 (1), S. 1–12. DOI: 10.1038/s41598-017-10140-4.
- Smith, K; deFilippi, C; Isakova, T; Gutiérrez, OM; Laliberte, K; Seliger, S; Kelley, W; Duh, S-H; Hise, M; Christenson, R; Wolf, M; Januzzi, J (2013): Fibroblast growth factor 23, high-sensitivity cardiac troponin, and left ventricular hypertrophy in CKD. In: *Am J Kidney Dis* 61 (1), S. 67–73. DOI: 10.1053/j.ajkd.2012.06.022.
- Smogorzewski, M; Zayed, M; Zhang, YB; Roe, J; Massry, SG (1993): Parathyroid hormone increases cytosolic calcium concentration in adult rat cardiac myocytes. In: *Am J Physiol* 264 (6), S. 1998–2006. DOI: 10.1152/ajpheart.1993.264.6.H1998.
- Sollid, ST; Hutchinson, MYS; Fuskevåg, OM; Figenschau, Y; Joakimsen, RM; Schirmer, H; Njølstad, I; Svartberg, J; Kamycheva, E; Jorde, R (2014): No effect of high-dose vitamin D supplementation on glycemic status or cardiovascular risk factors in subjects with prediabetes. In: *Diabetes care* 37 (8), S. 2123–2131. DOI: 10.2337/dc14-0218.
- Somjen, D; Weisman, Y; Kohen, F; Gayer, B; Limor, R; Sharon, O; Jaccard, N; Knoll, E; Stern, N (2005): 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. In: *Circulation* 111 (13), S. 1666–1671. DOI: 10.1161/01.CIR.0000160353.27927.70.
- Song, Y; Kato, S; Fleet, JC (2003): Vitamin D receptor (VDR) knockout mice reveal VDR-independent regulation of intestinal calcium absorption and ECaC2 and calbindin D9k mRNA. In: *J Nutr* 133 (2), S. 374–380. DOI: 10.1093/jn/133.2.374.
- Stadie, WC (1944): The Relation of Insulin to Phosphate Metabolism *. In: *Yale J Biol Med* 16 (5), S. 539–559.
- Statistisches Bundesamt; Statista (2018): Anzahl der Sterbefälle in Deutschland in den Jahren 2013-2015 gegliedert nach Todesursache. Online verfügbar unter <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/158441/umfrage/anzahl-der-todesfaelle-nach-todesursachen/>, zuletzt geprüft am 24.10.2018.
- Statistisches Bundesamt (Destatis) (2017): Todesursachen in Deutschland - 2015 Fachserie 12 Reihe 4 - 2015. In: *Fachserie 12* (4), S. 1–51.
- Stringham, RM; Bonilla, CA; Lytle, IM (1967): Normal serum calcium levels in albino mice. In: *Comp Biochem Physiol* 22 (1), S. 325–326. DOI: 10.1016/0010-406X(67)90194-6.

- Strobel, F; Reusch, J; Penna-Martinez, M; Ramos-Lopez, E; Klahold, E; Klepzig, C; Wehrle, J; Kahles, H; Badenhoop, K (2014): Effect of a randomised controlled vitamin D trial on insulin resistance and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. In: *Horm Metab Res* 46 (1), S. 54–58. DOI: 10.1055/s-0033-1358453.
- Stypmann, J (2007): Doppler ultrasound in mice. In: *Echocardiography* 24 (1), S. 97–112. DOI: 10.1111/j.1540-8175.2006.00358.x.
- Takashi, Y; Kinoshita, Y; Hori, M; Ito, N; Taguchi, M; Fukumoto, S (2017): Patients with FGF23-related hypophosphatemic rickets/osteomalacia do not present with left ventricular hypertrophy. In: *Endocr Res* 42 (2), S. 132–137. DOI: 10.1080/07435800.2016.1242604.
- Takemoto, F; Shinki, T; Yokoyama, K; Inokami, T; Hara, S; Yamada, A; Kurokawa, K; Uchida, S (2003): Gene expression of vitamin D hydroxylase and megalin in the remnant kidney of nephrectomized rats. In: *Kidney Int* 64 (2), S. 414–420. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00114.x.
- Tanaka, S; Yamamoto, H; Nakahashi, O; Kagawa, T; Ishiguro, M; Masuda, M; Kozai, M; Ikeda, S; Taketani, Y; Takeda, E (2013): Dietary phosphate restriction induces hepatic lipid accumulation through dysregulation of cholesterol metabolism in mice. In: *Nutr Res* 33 (7), S. 586–593. DOI: 10.1016/j.nutres.2013.05.004.
- Taylor, EN; Curhan, GC; Forman, JP (2008): Parathyroid hormone and the risk of incident hypertension. In: *J Hypertens* 26 (7), S. 1390–1394. DOI: 10.1097/HJH.0b013e3282ffb43b.
- Tishkoff, DX; Nibbelink, KA; Holmberg, KH; Dandu, L; Simpson, RU (2008a): Functional vitamin D receptor (VDR) in the t-tubules of cardiac myocytes. VDR knockout cardiomyocyte contractility. In: *Endocrinology* 149 (2), S. 558–564. DOI: 10.1210/en.2007-0805.
- Tishkoff, DX; Nibbelink, KA; Holmberg, KH; Dandu, L; Simpson, RU (2008b): Functional vitamin D receptor (VDR) in the t-tubules of cardiac myocytes. VDR knockout cardiomyocyte contractility. In: *Endocrinology* 149 (2), S. 558–564. DOI: 10.1210/en.2007-0805.
- Tomaschitz, A; Ritz, E; Pieske, B; Rus-Machan, J; Kienreich, K; Verheyen, N; Gaksch, M; Grübler, M; Fahrleitner-Pammer, A; Mrak, P; Toplak, H; Kraigher-Krainer, E; März, W; Pilz, S (2014): Aldosterone and parathyroid hormone interactions as mediators of metabolic and cardiovascular disease. In: *Metabolism* 63 (1), S. 20–31. DOI: 10.1016/j.metabol.2013.08.016.
- Tomson, J; Hin, H; Emberson, J; Kurien, R; Lay, M; Cox, J; Hill, M; Arnold, L; Leeson, P; Armitage, J; Clarke, R (2017): Effects of Vitamin D on Blood Pressure, Arterial Stiffness, and Cardiac Function in Older People After 1 Year. BEST-D (Biochemical Efficacy and Safety Trial of Vitamin D). In: *J Am Heart Assoc* 6 (10), S. 1–9. DOI: 10.1161/JAHA.117.005707.

- Tordoff, MG; Bachmanov, AA; Reed, DR (2007): Forty mouse strain survey of voluntary calcium intake, blood calcium, and bone mineral content. In: *Physiol Behav* 91 (5), S. 632–643. DOI: 10.1016/j.physbeh.2007.03.027.
- Toxqui, L; Blanco-Rojo, R; Wright, I; Pérez-Granados, AM; Vaquero, MP (2013): Changes in blood pressure and lipid levels in young women consuming a vitamin D-fortified skimmed milk. A randomised controlled trial. In: *Nutrients* 5 (12), S. 4966–4977. DOI: 10.3390/nu5124966.
- Tripkovic, L; Lambert, H; Hart, K; Smith, CP; Bucca, G; Penson, S; Chope, G; Hyppönen, E; Berry, J; Vieth, R; Lanham-New, S (2012): Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status. A systematic review and meta-analysis. In: *Am J Clin Nutr* 95 (6), S. 1357–1364. DOI: 10.3945/ajcn.111.031070.
- Trummer, C; Schwetz, V; Pandis, M; Grübler, MR; Verheyen, N; Gaksch, M; Zittermann, A; März, W; Aberer, F; Lang, A; Friedl, C; Tomaschitz, A; Obermayer-Pietsch, B; Pieber, TR; Pilz, S; Treiber, G (2017): Effects of Vitamin D Supplementation on IGF-1 and Calcitriol. A Randomized-Controlled Trial. In: *Nutrients* 9 (6), S. 1–10. DOI: 10.3390/nu9060623.
- Uribarri, J; Calvo, MS (2014): Dietary phosphorus intake and health1-3. In: *Am J Clin Nutr* 99 (2), S. 247–248. DOI: 10.3945/ajcn.113.080259.
- van Ballegooijen, AJ; Visser, M; Snijder, MB; Dekker, JM; Nijpels, G; Stehouwer, CDA; Diamant, M; Brouwer, IA (2012): Serum 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone in relation to plasma B-type natriuretic peptide. The Hoorn Study. In: *Endocr Connect* 1 (1), S. 48–57. DOI: 10.1530/EC-12-0033.
- van Nierop, BJ; van Assen, HC; van Deel, ED; Niesen, LBP; Duncker, DJ; Strijkers, GJ; Nicolay, K (2013): Phenotyping of left and right ventricular function in mouse models of compensated hypertrophy and heart failure with cardiac MRI. In: *PloS one* 8 (2), S. 1–9. DOI: 10.1371/journal.pone.0055424.
- Vinhas, M; Araújo, AC; Ribeiro, S; Rosário, LB; Belo, JA (2013): Transthoracic echocardiography reference values in juvenile and adult 129/Sv mice. In: *Cardiovasc Ultrasound* 11, S. 1–10. DOI: 10.1186/1476-7120-11-12.
- Wang, H; Xia, N; Yang, Y; Peng, D-Q (2012): Influence of vitamin D supplementation on plasma lipid profiles: a meta-analysis of randomized controlled trials. In: *Lipids Health Dis* 11, S. 42. DOI: 10.1186/1476-511X-11-42.
- Wang, TJ; Pencina, MJ; Booth, SL; Jacques, PF; Ingelsson, E; Lanier, K; Benjamin, EJ; D'Agostino, RB; Wolf, M; Vasan, RS (2008): Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. In: *Circulation* 117 (4), S. 503–511. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.706127.
- Wannamethee, SG; Welsh, P; Papacosta, O; Lennon, L; Whincup, PH; Sattar, N (2014): Elevated parathyroid hormone, but not vitamin D deficiency, is

- associated with increased risk of heart failure in older men with and without cardiovascular disease. In: *Circ Heart Fail* 7 (5), S. 732–739. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001272.
- Welch, AA; Fransen, H; Jenab, M; Boutron-Ruault, MC; Tumino, R; Agnoli, C; Ericson, U; Johansson, I; Ferrari, P; Engeset, D; Lund, E; Lentjes, M; Key, T; Touvier, M; Niravong, M; Larrañaga, N; Rodríguez, L; Ocké, MC; Peeters, PHM; Tjønneland, A; Bjerregaard, L; Vasilopoulou, E; Dilis, V; Linseisen, J; Nöthlings, U; Riboli, E; Slimani, N; Bingham, S (2009): Variation in intakes of calcium, phosphorus, magnesium, iron and potassium in 10 countries in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. In: *Eur J Clin Nutr* 63 (S4), S. 101–121. DOI: 10.1038/ejcn.2009.77.
- Wetmore, JB; Gadi, R; Lee, JH; O'Keefe, JH; Chan, PS; Tang, F; Spertus, JA (2011): Association of 25-hydroxyvitamin D deficiency with NT-pro BNP levels in patients with acute myocardial infarction. A cross-sectional analysis. In: *BMC Res Notes* 4, S. 1–9. DOI: 10.1186/1756-0500-4-542.
- Windaus, A; Schenck, F; Werder, FT (1936): Über das antirachitisch wirksame Bestrahlungsprodukt ans 7-Dehydro-cholesterin. In: *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 241 (1-3), S. 100–103. DOI: 10.1515/bchm2.1936.241.1-3.100.
- Witham, MD; Crighton, LJ; Gillespie, ND; Struthers, AD; McMurdo, MET (2010): The effects of vitamin D supplementation on physical function and quality of life in older patients with heart failure. A randomized controlled trial. In: *Circ Heart Fail* 3 (2), S. 195–201. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.907899.
- Witham, MD; Ireland, S; Houston, JG; Gandy, SJ; Waugh, S; Macdonald, TM; Mackenzie, IS; Struthers, AD (2014): Vitamin D therapy to reduce blood pressure and left ventricular hypertrophy in resistant hypertension. Randomized, controlled trial. In: *Hypertension* 63 (4), S. 706–712. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02177.
- Wojcik, M; Janus, D; Dolezal-Oltarzewska, K; Drozd, D; Sztefko, K; Starzyk, JB (2012): The association of FGF23 levels in obese adolescents with insulin sensitivity. In: *J Pediatr Endocrinol Metab* 25 (7-8), S. 687–690. DOI: 10.1515/jpem-2012-0064.
- World Health Organisation (2008): Vitamin D and Cancer. a report of the IARC Working Group on Vitamin D. Paris: International Agency for Research on Cancer (IARC working group reports, v. 5).
- World Health Organisation (2017): Cardiovascular diseases (CVDs) - Key facts. Fact sheets. Online verfügbar unter [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)), zuletzt geprüft am 24.10.2018.
- World Health Organization (1958): Classification of atherosclerotic lesions. Report of a study group [meeting held in Washington, D.C. from 7 to 11

- October 1957]. Geneva: World Health Organization (Technical report series / World Health Organization, no. 143).
- Wu-Wong, JR (2007): Vitamin D receptor. A highly versatile nuclear receptor. In: *Kidney Int* 72 (3), S. 237–239. DOI: 10.1038/sj.ki.5002428.
- Xiang, W; Kong, J; Chen, S; Cao, L-P; Qiao, G; Zheng, W; Liu, W; Li, X; Gardner, DG; Li, YC (2005): Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice. Role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. In: *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288 (1), S. 125–132. DOI: 10.1152/ajpendo.00224.2004.
- Yin, FC; Spurgeon, HA; Rakusan, K; Weisfeldt, ML; Lakatta, EG (1982): Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. Application in the aging rat. In: *Am J Physiol* 243 (6), S. 941–947. DOI: 10.1152/ajpheart.1982.243.6.H941.
- Yoshida, T; Fujimori, T; Nabeshima, Y-I (2002): Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1 α -hydroxylase gene. In: *Endocrinology* 143 (2), S. 683–689. DOI: 10.1210/endo.143.2.8657.
- Yoshizawa, T; Handa, Y; Uematsu, Y; Takeda, S; Sekine, K; Yoshihara, Y; Kawakami, T; Arioka, K; Sato, H; Uchiyama, Y; Masushige, S; Fukamizu, A; Matsumoto, T; Kato, S (1997): Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. In: *Nat Genet* 16 (4), S. 391–396. DOI: 10.1038/ng0897-391.
- Zhou, C; Lu, F; Cao, K; Di Xu; Goltzman, D; Miao, D (2008): Calcium-independent and 1,25(OH)₂D₃-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1 α -hydroxylase knockout mice. In: *Kidney Int* 74 (2), S. 170–179. DOI: 10.1038/ki.2008.101.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Sarah Maria Grundmann



Ausbildung

- | | |
|-------------------|--|
| Seit 01.2015 | Promotion im Rahmen des Kompetenzclusters für Ernährung und kardiovaskuläre Gesundheit nutriCARD
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema der Dissertation: „Experimentelle Studien zum Einfluss von Vitamin D und Phosphor auf das kardiovaskuläre System im Mausmodell“ |
| 04.2014 – 09.2017 | Stipendium zur Promotion
nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt |
| 10.2012 – 12.2014 | Masterstudium der Ernährungswissenschaften
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema der Masterarbeit: „Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf die mRNA-Expression von intestinalen tight junction Proteinen im Mausmodell“ |
| 10.2008 – 12.2011 | Bachelorstudium der Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Thema der Bachelorarbeit: „Bedeutung der Glucocorticoide im Fettgewebe“ |
| 03.2007 | Abitur
Gymnasium Nieder-Olm |

Publikationen

- 02.2018 **Vitamin D Does Not Play a Functional Role in Adipose Tissue Development in Rodent Models**
A Schutkowski, D Max, M Bönn, C Brandsch, SM Grundmann, F Hirche, MS Staeger, GI Stangl
Molecular nutrition & food research; 62(4). doi: 10.1002/mnfr.201700726.
- 04.2017 **The High Calcium, High Phosphorus Rescue Diet Is Not Suitable to Prevent Secondary Hyperparathyroidism in Vitamin D Receptor Deficient Mice.**
SM Grundmann, C Brandsch, D Rottstädt, H Kühne, GI Stangl
Frontiers in Physiology; 8: 212. doi: 10.3389/fphys.2017.00212
- 02.2016 **Vitamin D receptor *knockout* mice exhibit elongated intestinal microvilli and increased ezrin expression.**
H Kühne, G Hause, SM Grundmann, A Schutkowski, C Brandsch, GI Stangl
Nutrition Research; 36(2):184-92. doi: 10.1016/j.nutres.2015.10.005

Präsentationen

- 03.2018 **Kardiale und vaskuläre Effekte von Vitamin D und Phosphat im Mausmodell** (Vortrag), Symposium der Kompetenzcluster der Ernährungsforschung, Freising
SM Grundmann, B König, B Schreier, G Ramos, S Rabe, U Hofmann, M Gekle, G Stangl
- 03.2018 **Kardiofunktionelle Studien zum Einfluss von Vitamin D im Mausmodell** (Vortrag), 55.
Wissenschaftlicher Kongress der „Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V.“, Hohenheim
SM Grundmann, B König, B Schreier, G Ramos, S Rabe, U Hofmann, M Gekle, G Stangl
- 04.2017 **Kardiofunktionelle Studien zum Einfluss von Vitamin D im Mausmodell** (Vortrag), nutriCARD
Clustervollversammlung, Jena
- 03.2016 **Calciumstatus Vitamin-D-Rezeptor-defizienter Mäuse in Abhängigkeit des Calciumgehaltes der Diät** (Poster), 53. Wissenschaftlicher Kongress der „Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V.“, Fulda
SM Grundmann, D Rottstädt, C Brandsch, H Kühne, GI Stangl

Gießen, 09.07.19

Ort, Datum



Sarah Maria Grundmann

Eidesstattliche Erklärung/Declaration under Oath

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

I declare under penalty of perjury that this thesis is my own work entirely and has been written without any help from other people. I used only the sources mentioned and included all the citations correctly both in word or content.

Gießen, 09.07.19
Ort, Datum



Sarah Maria Grundmann

Erklärung über bestehende Vorstrafen und anhängige Ermittlungsverfahren

Hiermit erkläre ich, dass ich weder vorbestraft bin noch, dass gegen mich Ermittlungsverfahren anhängig sind.

Gießen, 09.07.19
Ort, Datum



Sarah Maria Grundmann

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Gabriele I. Stangl gilt mein aufrichtiger Dank für die Vergabe des interessanten Themas, die Gewährung der Forschungsmöglichkeiten am Institut für Ernährungswissenschaften, die Betreuung während meiner gesamten Doktorandenzeit, die konstruktiven Gespräche und Hilfestellungen, sowie die Anregungen zur Dissertationsschrift.

Frau PD Dr. Bettina König gilt mein besonderer Dank für die Betreuung, die konstruktiven Gespräch, das entgegengebrachte Vertrauen und der ständigen Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und deren Abschluss. Ein besonderer Dank geht auch an Frau Dr. Corinna Brandsch für die Unterstützung beim Lösen analytischer Probleme und Adaptation von Laboranalysen, sowie der enormen Hilfe bei der Versuchsdurchführung und Probenentnahmen. Frau Dr. Alexandra Schutkowski danke ich für die Zusammenarbeit bei der Erstellung der Publikationsschriften und ihre Unterstützung bei der Durchführung der abschließenden Analysen.

Ferner gilt mein herzlicher Dank allen technischen und nicht technischen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Ernährungswissenschaften, die durch ihre kollegiale Art ein angenehmes Arbeitsumfeld geschaffen haben. Insbesondere danke ich Frau Heike Giese, die stets eine große und zuverlässige Hilfe bei der Durchführung der unterschiedlichsten Analysen war.

Ausdrücklich möchte ich mich außerdem bei Frau Anja Christina Baur und Frau Dr. Julia Kühn bedanken, die neben fachlichen Anregungen und Diskussionen stets seelisch und moralische Unterstützer waren.

Außerdem danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung und dem DLR Projektträger für die Förderung und Finanzierung des Forschungsprojektes im Rahmen des "Kompetenzcluster für Ernährung und kardiovaskuläre Gesundheit" nutriCARD.

Der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt danke ich für die zweieinhalbjährige Gewährung des Graduiertenstipendiums.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt und motiviert haben.

