



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einfluss einer Gemüse und Pflanzenölintervention auf den Status von
Homocystein, Folsäure, Vitamin B₁₂ und die Erythrozytenindizes bei
Typ-II-Diabetikern

Verfasserin

Daniela Toferer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

A.o. Univ. Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei A.o. Univ. Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner für die Bereitstellung sowie für die Betreuung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Mag. Elisabeth Müllner.

Danke für deine Hilfe während der Analysen im Labor und für deine Unterstützung beim Auswerten der Ergebnisse sowie beim Schreiben der Diplomarbeit.

Auch allen Mitarbeitern des Instituts für Ernährungswissenschaften, insbesondere Gheorghe Mare und Mag. Günter Seiringer möchte ich für die Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft im Labor danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Ärzten der Diabetesambulanz der Wiener Gebietskrankenkasse, die die Rekrutierung der Probanden übernommen haben. An dieser Stelle sei auch allen Studienteilnehmern für ihr Interesse und für ihre Bereitschaft gedankt.

Meiner Kollegin Yvonne Millner danke ich für ihre Hilfe und Freundschaft während der gesamten Studienzeit sowie für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Zuletzt möchte ich mich bei den wichtigsten Personen bedanken.

Meiner Familie.

Danke für euer vieles Verständnis welches ihr während meiner Studienzeit aufgebracht habt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Literaturüberblick	2
2.1	Diabetes mellitus	2
2.1.1	Definition, Diagnostik und Klassifikation des Diabetes mellitus	2
2.1.2	Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus	4
2.1.3	Therapie des Typ II Diabetes mellitus	7
2.1.4	Epidemiologie des Diabetes mellitus	8
2.2	Diabetes mellitus und die Bedeutung von Homocystein, Folsäure und Vitamin B12	9
2.2.1	Homocystein	9
2.2.1.1	Stoffwechsel von Homocystein	10
2.2.2	Definition Hyperhomocysteinämie	11
2.2.3	Ursachen für eine erhöhte HCY-Konzentration	12
2.2.3.1	Alter und Geschlecht	12
2.2.3.2	Struktur, Funktion und Bedarf von Vitamin B12 und Folsäure	13
2.2.3.3	Ausgewählte genetische Determinanten	18
2.2.3.4	Einfluss des Lebensstils	20
2.2.4	Homocystein als unabhängiger Risikofaktor für Gefäßerkrankungen	21
2.3	Erythrozytenindizes bei Typ-II-Diabetikern- Anämieformen	25
2.3.1	Hyperchrome, makrozytäre Anämie	26
2.3.2	Hypochrome, mikrozytäre Anämie	27
2.4	Ausgewählte Studien bezüglich der Primär- und Sekundärprävention des Diabetes mellitus	28
3	Material und Methoden	31
3.1	Studiendesign	31
3.2	Probanden	32
3.2.1	Einschlusskriterien	32
3.2.2	Ausschlusskriterien	33
3.2.3	Zeitlicher Ablauf	34
3.2.4	Ernährungsintervention	34
3.3	Blutauarbeitung	36
3.3.1	Herstellung des isotonischen Phosphatpuffers	36
3.4	Bestimmung von Homocystein im Plasma	37
3.4.1	Prinzip der Methode	37
3.4.2	Reagenzien	37
3.4.3	Herstellung der Lösungen:	38
3.4.4	Geräte und Gegenstände	39

3.4.4.1	Geräteeinstellungen	39
3.4.5	Durchführung der Bestimmung von Homocystein im Plasma mittels HPLC	40
3.4.5.1	Herstellen der Standardgerade	40
3.4.5.2	Probenaufarbeitung	40
3.4.5.3	Messung der Proben	41
3.4.5.4	Auswertung	41
3.4.5.5	Qualitätskontrolle	41
3.5	Bestimmung von Folsäure in Erythrozyten mittels Radioimmunoassay	42
3.5.1	Prinzip der Methode	42
3.5.2	Geräte und Gegenstände	42
3.5.3	Reagenzien	42
3.5.4	Reagenzienvorbereitung	43
3.5.5	Probenvorbereitung	43
3.5.6	Durchführung der Bestimmung	43
3.5.7	Auswertung	44
3.5.8	Berechnung der Ergebnisse	44
3.6	Bestimmung der Erythrozytenindizes, Plasma-Folsäure und Plasma-Vitamin B12 ..	46
3.7	Statistische Auswertung	47
4	Ergebnisse und Diskussion	48
4.1	Veränderungen von Vitamin B12	48
4.1.1	Diskussion zu Plasma-Vitamin B12	50
4.2	Veränderungen der Plasma-Folsäure Konzentration	53
4.3	Folsäure in Erythrozyten	56
4.3.1	Diskussion zu Folsäure (Plasma- und Erythrozyten)	57
4.4	Veränderungen von Homocystein	60
4.4.1	Diskussion von Homocystein	62
4.5	Veränderungen von Eisen	66
4.6	Veränderungen von Ferritin	68
4.7	Veränderungen von Hämoglobin	70
4.8	Veränderungen von MCV, MCH, MCHC	72
4.9	Veränderung der Leukozyten	74
4.10	Veränderung des Hämatokrit	76
4.10.1	Diskussion zu den Erythrozytenindizes, Eisen, Ferritin und Hämoglobin	77
5	Schlussbetrachtung	79
6	Zusammenfassung	81
7	Summary	83
8	Literaturverzeichnis	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schätzungen der weltweiten Diabetesfälle im Jahr 2010 und 2030 (IDF Diabetes Atlas, 2009).....	8
Abbildung 2: Strukturformeln von Methionin, HCY und Cystein (Stanger 2003).....	9
Abbildung 3: Stoffwechsel von HCY (Stanger et al., 2003).....	10
Abbildung 4: Therapieschema bei erhöhtem HCY (Stanger et al., 2003).....	12
Abbildung 5: Strukturformel von Cyanocobalamin (Ebermann and Elmadfa, 2008).....	13
Abbildung 6: Strukturformel der Folsäure (Pteroylglutaminsäure) (Ebermann and Elmadfa, 2008).....	15
Abbildung 7: Zeitschema.....	34
Abbildung 8: Beispielchromatogramm einer Patientenprobe.....	41
Abbildung 9: Informationsgruppe: Vitamin B12 Konzentrationen (pmol/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention).....	49
Abbildung 10: Interventionsgruppe: Vitamin B12 Konzentrationen (pmol/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention).....	50
Abbildung 11: Informationsgruppe: Plasma-Folsäure Konzentrationen (nmol/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention).....	54
Abbildung 12: Interventionsgruppe: Plasma-Folsäure Konzentrationen (nmol/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention).....	55
Abbildung 13: Interventionsgruppe: Erythrozyten-Folsäure Konzentrationen (nmol/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention).....	57
Abbildung 14: HCY-Konzentration zum Zeitpunkt T0 (aufgeteilt nach Geschlecht);.....	60
Abbildung 15: Informationsgruppe: HCY-Konzentrationen (μmol/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention).....	61
Abbildung 16: Interventionsgruppe: HCY-Konzentrationen (μmol/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention).....	62
Abbildung 17: Interventionsgruppe: Korrelation nach Pearson zwischen Δ HCY und Δ Plasma-Folsäure: R = -0,329; p = 0,008.....	65
Abbildung 18: Gesamtkollektiv: Korrelation nach Pearson zwischen Δ HCY und Δ Vitamin B12: R = - 0,258; p = 0,015.....	65
Abbildung 19: Interventionsgruppe: Eisenkonzentration (ng/ml) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention).....	67
Abbildung 20: Informationsgruppe: Ferritinkonzentration (ng/ml) zu den Zeitpunkten T0	

(Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention);	69
Abbildung 21: Interventionsgruppe: Ferritinkonzentration (ng/ml) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention);	69
Abbildung 22: Hämoglobin Konzentration zum Zeitpunkt T0 (aufgeteilt nach Geschlecht);.....	70
Abbildung 23: Interventionsgruppe: Hämoglobinkonzentration (g/dl) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention).....	71
Abbildung 24: Informationsgruppe: Leukozytenkonzentration (G/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention);....	75
Abbildung 25: Interventionsgruppe: Leukozytenkonzentration (G/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention).....	75
Abbildung 26: Interventionsgruppe: Hämatokrit in % zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention).....	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über die Spätkomplikationen beim Typ-II-Diabetes (modifiziert nach Österreichischer Diabetesbericht, 2004).....	6
Tabelle 2: Interventionsstudien mit B-Vitaminen in der Sekundärprävention.....	22
Tabelle 3: Differenzierung der verschiedenen Anämieformen.....	25
Tabelle 4: Verteilung der Probanden auf die Gruppen.....	31
Tabelle 5: Einteilung der Probanden in die Gruppen.....	32
Tabelle 6: Gemüseprodukte von Iglo.....	35
Tabelle 7: FS- Zusammensetzung des Pflanzenöls.....	35
Tabelle 8: Chemikalien für die Herstellung des isotonischen Phosphatpuffers.....	36
Tabelle 9: Chemikalien für die Bestimmung von Homocystein im Plasma.....	37
Tabelle 10: Pipettierschema für die Herstellung der Standardlösungen.....	40
Tabelle 11: Folsäurebestimmung-Pipettierschema (modifiziert nach MP Biomedicals).....	44
Tabelle 12: Bestimmung der Erythrozytenindizes, Eisen, Ferritin, Hämatokrit, Hämoglobin, Erythrozytenzahl, Plasma-Folsäure und Plasma-Vitamin B12,	46
Tabelle 13: Korrelationen zwischen Vitamin B12 und Alter.....	52
Tabelle 14: Korrelation: Alter-Vitamin B12 und Metformin.....	52
Tabelle 15: Korrelation zwischen Alter und Homocystein.....	64
Tabelle 16: Veränderung der Konzentration an MVC (fl), MCH (pg) und MCHC (g/dl) (Erythrozytenindizes) während der Intervention (MW $\pm$ SD).....	73

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADA	American Diabetes Association
AGE	Advanced glycation endproducts
ANOVA	Analysis of Variance
ARIC	Atherosclerosis Risk in Communities
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
CBS	Cystathion- β -Synthase
DACH	Deutschland, Österreich, Schweiz
DCTT	Diabetes Control and Complications Trial
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP-IV-Hemmer	Dipeptidylpeptidase-IV-Hemmer
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EU	Europäische Union
FFQ	Food Frequency Questionnaire
GAD	Glutamat-Decarboxylase-Antikörper
GLP-1-Mimetika	Glucagon-like Peptide-1- Mimetika
Hb	Hämoglobin
HbA1c	Glykolisiertes Hämoglobin A (Adult) 1c
HCl	Salzsäure
HCY	Homocystein
HPLC	High Pressur Liquid Chromatography
HDL	High density lipoprotein
HOPE-2-Study	Heart Outcomes Prevention Evalutation-2-Study
IFG	Impaired fasting glucose
IGT	Impaired glucose tolerance
IDDM	Insulin dependent diabetes mellitus
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density lipoprotein
MCH	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	Mean corpuscular volume
MODY	Monogene genetische Defekte der β -Zellfunktion
MTHF	Methyltetrahydrofolat

MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
MUFA	Mono unsaturated fatty acids
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
Na ₂ -EDTA	Dinatriummethyldiamintetraacetat
NaOH	Natronlauge
NBZ	Nüchternblutzucker
NGSP	National Glycohemoglobin Standardization Program
NIDDM	Non insulin dependent diabetes mellitus
NORVIT	Norwegian Vitamin Study
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NYHA	New York Heart Association
ÖDG	Österreichische Diabetes Gesellschaft
ÖDV	Österreichische Diabetikervereinigung
OGGT	Oraler Glucosetoleranztest
PLP	Pyridoxal-5-phosphat
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
QLQ	Quality of Life Questionnaire
RNA	Ribonukleinsäure
SAM	S-Adenosylmethionin
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAHH	S-Adenosylhomocysteinhydrolyse
SBD-F	7-Fluorobenzofurazane-4-sulfonic acid Amonium salt
SD	Standardabweichung
SEARCH	Study of the Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol and Homocysteine
SFA	Saturated fatty acids
TBP	Tri-n-Butylphosphin
TCA	Trichloroacetic acid
THF	Tetrahydrofolat
VISP	Vitamin Intervention for Stroke Prevention
WAFACS	Women's Antioxidant and Folic Acid Cardiovascular Study
WGKK	Wiener Gebietskrankenkasse
WHO	World Health Organization

1 Einleitung und Fragestellung

Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung an der im Jahr 2010 zufolge der International Diabetes Federation weltweit 285 Millionen Menschen im Alter von 20 bis 79 Jahren litten. Für das Jahr 2030 wird ein Anstieg auf 439 Millionen Diabetikern erwartet. Laut einer erst vor kurzem veröffentlichten Studie von Danaei et al. belief sich die Anzahl der weltweiten Diabetesfälle im Jahr 2008 auf 347 Millionen Erwachsenen.

Besonders der Typ-II-Diabetes, die ernährungsabhängige Form, geht häufig mit Sekundärerkrankungen (Mikro- und Makroangiopathien) und in weiterer Folge mit kardiovaskulären Erkrankungen einher. Mikrovaskuläre Komplikationen manifestieren sich hauptsächlich im Herz-Kreislauf-System, makrovaskuläre hingegen betreffen Augen (Retinopathie), Nieren (Nephropathie) und das Nervensystem (Neuropathie). Die zuständigen Mechanismen die zu den Folgeerkrankungen des Diabetes führen sind komplex und betreffen Störungen im Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsel.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Auswirkung einer täglichen Zufuhr an Gemüse und hochwertigem Pflanzenöl auf den Status von Homocystein, Vitamin B₁₂, Folsäure und die Erythrozytenindizes. Aus epidemiologischen Studien ist bereits bekannt, dass sich eine optimale Fettsäurezusammensetzung, sowie die Senkung an Plasma-Homocystein durch die Supplementation von B-Vitaminen günstig auf die Entstehung von Gefäßerkrankungen auswirkt. In der Literatur sind bis dato jedoch nur wenige Interventionsstudien mit Gemüse und Öl zu finden.

Aus diesem Grund wurde am Institut für Ernährungswissenschaften das von der EU-geförderte, grenzüberschreitende Projekt (Bratislava-Wien) DIAPLANT durchgeführt.

2 Literaturüberblick

2.1 Diabetes mellitus

2.1.1 Definition, Diagnostik und Klassifikation des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus umfasst eine Gruppe von Stoffwechselstörungen, die durch Hyperglykämie gekennzeichnet sind. Ursache ist entweder eine gestörte Insulinsekretion, eine gestörte Insulinwirkung oder eine Kombination beider Faktoren. Die chronische Hyperglykämie führt zu langfristigen Schäden, insbesondere an Augen, Nieren, Nerven, Herz und Blutgefäßen und kann auch Ursache eines Organversagens sein (ADA, 2011).

Beim Gesunden wird in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas das Hormon Insulin gebildet, welches für die Blutzuckerregulierung verantwortlich ist. Die Steigerung des Glucosetransports in die Zellen, die Förderung glucoseverbrauchender Stoffwechselwege sowie die Hemmung der Lipolyse zählen in Bezug auf Diabetes zu den wichtigsten Funktionen von Insulin.

Zur **Diagnose des Diabetes mellitus** werden folgende Kriterien herangezogen:

- Glykosyliertes Hämoglobin A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$; das angewandte Testverfahren muss nach internationalen Standards zertifiziert sein (NGSP, National Glycohemoglobin Standardization Program od. DCCT, Diabetes Control and Complications Trial)
- eine Nüchternplasmagucose von ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l);
- 2-h-Plasma Glucose von ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) während eines oralen Glucosetoleranztests (OGGT); der OGGT sollte nach den Kriterien der World Health Organization (WHO) durchgeführt werden;
- Klassische Symptome wie Polyurie, Polydipsie, unerklärlicher Gewichtsverlust und eine Plasmagucose von ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) zu einer beliebigen Tageszeit (ohne Nahrungskarenz); (ADA 2011).

Die derzeitige **Klassifikation des Diabetes** stammt von den Empfehlungen der American Diabetes Association (ADA) und lautet wie folgt: (ADA, 2011)

- **Diabetes mellitus Typ 1**

ist eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung, welche zu einer Zerstörung der β -Zellen im Pankreas führt. Infolgedessen kommt es zu einem absoluten Insulinmangel, der entweder immunologisch oder idiopathisch bedingt sein kann. Der immunologisch vermittelte Diabetes ist durch das Vorhandensein inselspezifischer Autoantikörper, Autoantikörper gegen Insulin, Autoantikörper gegen Glutamat-Decarboxylase-Antikörper (GAD) und Autoantikörper gegen Tyrosinphosphatase (IA-2, IA-2 β) gekennzeichnet. Bei der idiopathischen Form sind hingegen keine Antikörper zu finden (ADA, 2011).

- **Diabetes mellitus Typ 2**

ist durch eine Kombination von Insulinresistenz und Insulinsekretionsstörung gekennzeichnet. Diese Form des Diabetes betrifft ungefähr 90-95% aller Diabetiker. Der Typ-II-Diabetes bleibt oftmals lange unbemerkt, da sich eine Hyperglykämie erst allmählich entwickelt und im Anfangsstadium noch keine typischen Symptome auftreten. Die meisten Typ-II-Diabetiker sind übergewichtig; diejenigen, die ein Normalgewicht aufweisen, haben häufig einen erhöhten Körperfettanteil sowie eine abdominale Körperfettverteilung (ADA, 2011).

- **Gestationsdiabetes**

ist eine erstmals während der Schwangerschaft auftretende und diagnostizierte Störung des Glucosestoffwechsels. Betroffen sind in etwa 7% (im Bereich von 1-14%, in Abhängigkeit der Studienpopulation) aller Schwangeren (ADA, 2011).

- **andere spezifische Diabetestypen**

Ursache dafür können **genetische Defekte der β -Zellfunktion** [z.B. monogene genetische Defekte der β -Zellfunktion (MODY)], **genetische Defekte in der**

Insulinwirkung, Erkrankungen des exokrinen Pankreas (Pankreatitis, Trauma/Pankreatektomie, Neoplasie, zystische Fibrose, Hämochromatose, fibrosierend verkalkende Pankreopathie), **Endokrinopathien** (Akromegalie, Cushing Syndrom, Glukagonom, Phäochromozytom, Hyperthyreose, Somatostatinom, Aldosteronom), **Medikamente oder Chemikalien** (z.B. Glucocorticoide, β -Interferon) **Infektionen** (z.B. kongenitale Rötelninfektion), **seltene Formen eines autoimmun-vermittelten Diabetes** (z.B. Stiff-Person-Syndrom) sowie andere genetische Syndrome, die mit einem Diabetes einhergehen (z.B. Down-Syndrom, Turner-Syndrom, Wolfram-Syndrom, Huntington chorea) (ADA, 2011).

Als Prädiabetes wird eine beginnende Störung des Kohlenhydratstoffwechsels bezeichnet. Entweder handelt es sich dabei um eine abnorme Nüchternglukosekonzentration (impaired fasting glucose, IFG) oder um eine gestörte Glucosetoleranz (impaired glucose tolerance, IGT) (Leitzmann et al., 2009).

Eine IFG besteht bei nüchtern-Plasma-Konzentrationen zwischen 100-125 mg/dl (5,6-6,9 mmol/l). Eine IGT liegt vor, wenn bei einem OGTT die 2-h-Glucosewerte im venösen Plasma zwischen 140-199 mg/dl (7,8-11,0 mmol/l) liegen (ADA, 2011).

Beide Formen des Prädiabetes stehen im Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom und erhöhen das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Leitzmann et al., 2009).

2.1.2 Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus

Akutkomplikationen, wie das Coma diabeticum und die Hypoglykämie, haben heutzutage nur noch einen untergeordneten Stellenwert (Leitzmann et al., 2009, Rieder et al., 2004). Die langfristigen Folgeerkrankungen (Tabelle 1) des Diabetes mellitus stehen im Vordergrund. Im Durchschnitt treten sie nach einer Krankheitsdauer von 10-15 Jahren auf. Bei den diabetischen Spätkomplikationen unterscheidet man zwischen der Makroangiopathie, einer

Erkrankung der großen Gefäße und der Mikroangiopathie, einer Erkrankung der kleinen Blutgefäße (Leitzmann et al., 2009).

Makrovaskuläre Komplikationen manifestieren sich vorwiegend im Herz-Kreislauf-System. Die Makroangiopathie unterscheidet sich weder histologisch noch histochemisch von der Atherosklerose. Man geht davon aus, dass es sich um eine zeitlich vorverlegte, besonders schwere Form der Atherosklerose handelt (Birrer, 2001). **Mikrovaskuläre Komplikationen** betreffen hauptsächlich die Augen (Retinopathie), die Nieren (Nephropathie) und das Nervensystem (Neuropathie). Der diabetische Fuß ist eine Mischform der genannten Spätkomplikationen. Neurologische Störungen kommen mit 64% am häufigsten vor, gefolgt von Retinopathien (17%), dem diabetischen Fußsyndrom (14%) und Nierenfunktionsstörungen (6%). Aufgrund des schleichenden Krankheitsverlaufes des Typ-II-Diabetes bestehen zur Zeit der Erstdiagnosen bereits schon häufig Spätkomplikationen (Rieder et al., 2004).

Diabetiker haben im Vergleich zu Gesunden ein 2-4-fach erhöhtes Risiko für koronare Herzerkrankungen (KHK). Ebenso ist das Risiko für periphere arterielle Verschlusskrankheiten und Demenz erhöht (Rieder et al., 2004).

Bei der **Entstehung der Makro- und der Mikroangiopathie** stellt die Hyperglykämie den wichtigsten pathogenetischen Faktor dar. Bei der Hyperglykämie kommt es einerseits zu einer vermehrten Ansammlung von irreversiblen Glykosylierungs-Endprodukten (AGEs) und andererseits zu einer Endothel-Dysfunktion. Die AGEs bilden sich aus Glucose und Matrixproteinen der Gefäßwand, den sogenannten Schiffschen Basen. Diese lagern sich an der Gefäßwand an und infolgedessen kommt es zu strukturellen und funktionellen Veränderungen der Gefäßwand (Birrer, 2001).

Tabelle 1: Überblick über die Spätkomplikationen beim Typ-II-Diabetes (modifiziert nach Österreichischer Diabetesbericht, 2004)

Spätkomplikation	Manifestation	Ursache(n)
Makroangiopathie	Koronare Herzerkrankung Schlaganfall Periphere Durchblutungsstörungen Gefäßverschluss der unteren Extremitäten	Atherosklerose
Mikroangiopathien		
Retinopathie und Makulopathie	Diffuse Augenverdickungen an Auge und Augenhintergrund, reduziertes Sehvermögen bis zur Erblindung	advanced glycosylation (end)products (z.B. HbA1c) → Schädigung extrazellulärer Proteine des Bindegewebes sowie intrazelluläre Strukturproteine (HbA1c hat größere Affinität zu O ₂ als normales Hb → reduzierte Sauerstoffabgabe ins Gewebe → Retinopathie) in Nierenglomeruli, Retina, Augenlinse und Nerven reagiert Glucose zu Sorbitol das zu Fructose weiterreagiert → Fructoseakkumulation führt zu osmotischen Stress → Gewebeschädigung oxidativer Stress → Aktivierung der Proteinkinase C → Gefäßanomalien an Retina, Nieren, Herz
Nephropathie (Glomerulosklerose)	Diffuse Augenverdickungen an Auge und Augenhintergrund, reduziertes Sehvermögen bis zur Erblindung	
Neuropathie	Erhöhung des intraglomerulären Filtrationsdrucks, Verdickung der Basalmembran, Mikroalbuminurie, Nephropathie mit Proteinurie, Hypertonie, Niereninsuffizienz	
Sensomotorische Neuropathie	Symmetrische Missempfindungen, Taubheitsgefühle und Schmerzen in den unteren Extremitäten	
Diffuse und motorische Polyneuropathie	Generalisierte Muskelatrophie und - schwäche, meist ohne Schmerzen und Sensibilitätsstörungen	
Autonome Nephropathie	Störungen der Organe, die vom autonomen Nervensystem innerviert werden: Herz, Gastrointestinaltrakt, Harnblase, männliche Geschlechtsorgane	
Diabetisches Fußsyndrom	Läsionen, Ulkusbildung, mangelndes Abheilen	
		Neuropathie und/oder periphere Durchblutungs- störungen

Furchgott und Zawadzki beschrieben erstmals 1980, dass das Endothel aktiv, durch sekretorische Leistungen an der Aufrechterhaltung der funktionellen und strukturellen Integrität der Arterienwand beteiligt ist (Furchgott and Zawadzki, 1980). Stickstoffmonoxid (NO) wird durch die NO-Synthase (NOS) aus der Vorstufe von L-Arginin gebildet, und stellt den wichtigsten endothelialen Faktor dar (Tripolt and Sourij, 2010). Eine verminderte Synthese von NO ist häufig die Ursache der endothelialen Dysfunktion. Aufgrund seiner vasodilatativen,

antithrombotischen und antiproliferativen Eigenschaften wirkt NO gefäßprotektiv (Rösen, 2002). Durch hohe Glucosespiegel bei Diabetikern wird die Aktivität der NO und die Bildung von Prostacyclin durch das Endothelium verhindert. Eine Ansammlung toxischer O_2 -Radikale, die bei einer Hyperglykämie vermehrt gebildet werden, wird als mögliche Ursache diskutiert (Birrer, 2001).

2.1.3 Therapie des Typ II Diabetes mellitus

Die Therapie des Diabetes mellitus besteht aus diätetischen und/oder medikamentösen Maßnahmen. Das Ziel besteht darin, normale Blutzuckerwerte (Nüchternblutzucker < 110 mg/dl, HbA1c $< 6,5\%$) zu erreichen. Dadurch können mikrovaskuläre und makrovaskuläre Komplikationen reduziert werden. Die ernährungsmedizinische Therapie zielt beim Typ-I-Diabetiker vorrangig darauf ab, die postprandialen Blutzuckerschwankungen durch eine an die Insulintherapie angepasste Nahrungszufuhr zu verringern. Bei adipösen Typ-II-Diabetikern steht eine Gewichtsreduktion, beispielsweise durch eine verbesserte Ernährung sowie durch eine erhöhte körperliche Aktivität im Vordergrund, um die Blutglucosewerte zu normalisieren. Bei den meisten Typ-II-Diabetikern könnte durch eine alleinige individuelle Ernährungstherapie der Diabetes ausreichend behandelt werden. Eine Änderung des Lebensstils erweist sich bei Personen mit Prädiabetes als wirksamste Möglichkeit, um einen Übergang von der gestörten Glucosetoleranz zum manifesten Diabetes mellitus zu verhindern (Leitzmann et al., 2009, Häring et al., 2011).

Eine Insulintherapie kommt beim Typ-II-Diabetiker zur Anwendung, wenn durch diätetische Maßnahmen und orale Antidiabetika das Therapieziel nicht erreicht wird oder wenn eine Kontraindikation gegenüber oralen Antidiabetika besteht. In Österreich stehen zur Insulintherapie ausschließlich humanes Insulin sowie Insulinanaloga zur Verfügung (ÖDG, 2009).

2.1.4 Epidemiologie des Diabetes mellitus

Schätzungen zufolge litten im Jahr 2010 weltweit 285 Millionen Menschen im Alter von 20-79 Jahren an Diabetes. Dies entspricht einer Prävalenz von 6,4% (Shaw et al., 2010).

In einer erst vor kurzem veröffentlichten Studie geht man von einer weit höheren Anzahl an Diabetikern aus. Laut Danaei et al. belief sich die Anzahl der weltweiten Diabetesfälle im Jahr 2008 auf 347 Millionen Erwachsenen (Danaei et al., 2011).

Für das Jahr 2030 wird ein Anstieg auf 439 Millionen Diabetikern bzw. eine Prävalenz von 7,1% erwartet. In den Entwicklungsländern rechnet man mit dem größten Zuwachs. Bis zum Jahr 2030 wird sich die Prävalenz der Diabetesfälle in Afrika, im Mittleren Osten und in Nordamerika fast verdoppeln (Abbildung 1) (IDF, 2009).

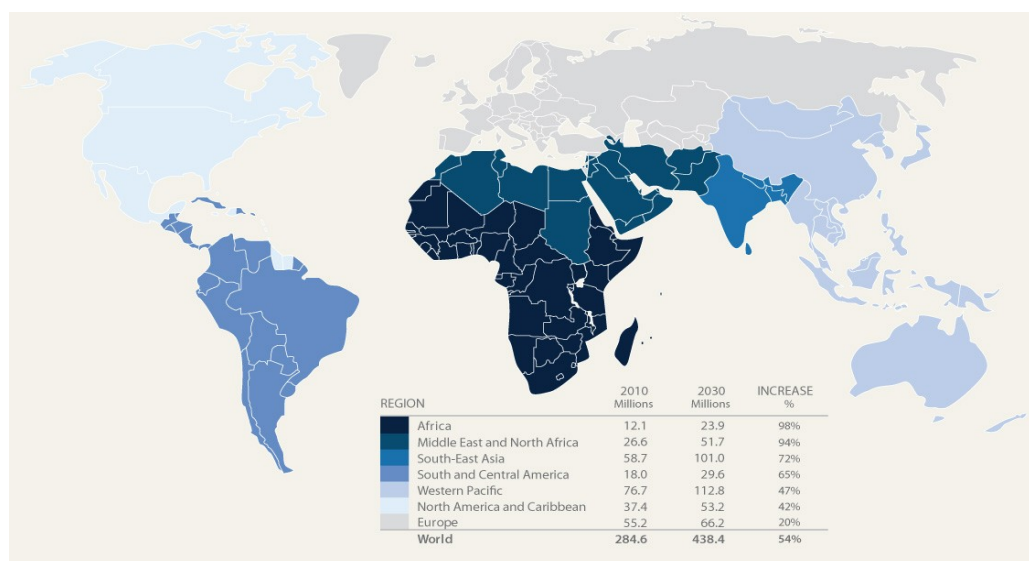


Abbildung 1: Schätzungen der weltweiten Diabetesfälle im Jahr 2010 und 2030 (IDF Diabetes Atlas, 2009)

Besonders kritisch wird der weltweite Anstieg an Typ-II-Diabetikern im Alter zwischen 20-44 Jahren betrachtet (Rieder et al., 2004).

In Europa leiden laut European Health Report 22,5 Millionen Erwachsene an Diabetes mellitus. 80-95% der Diabetiker sind Typ-II-Diabetiker, die restlichen

5-15% entfallen auf Typ-I-Diabetiker, vornehmlich im Kindes- oder Jugendalter (Rieder et al., 2004).

Für das Jahr 2000 gab die WHO eine Schätzung von 130 000 Diabetikern für Österreich an, was einer Prävalenz von 2,1% entspricht (Rieder et al., 2004). Die IDF hingegen schätzte, dass im Jahr 2007 11,1% der österreichischen Gesamtbevölkerung von Diabetes betroffen waren (IDF, 2009). Ursache für Schwankungen in den Prävalenzangaben des Typ-II-Diabetes sind die unterschiedlichen Schätzungen der nicht diagnostizierten Diabetesfälle (Rieder et al., 2004).

2.2 Diabetes mellitus und die Bedeutung von Homocystein, Folsäure und Vitamin B₁₂

2.2.1 Homocystein

Homocystein (HCY) ist eine schwefelhaltige Aminosäure des Methioninstoffwechsels, die nicht für die Proteinbiosynthese notwendig ist. Im Plasma liegt HCY in verschiedenen Formen vor. Ungefähr 70-90% des Plasma-HCY sind proteingebunden, der Rest liegt als HCY und HCY-Cystein vor. Nur 1-2% des HCY zirkulieren in reduzierter Form frei im Plasma (Herrmann, 2001).

In den Körperzellen eines Erwachsenen werden pro Tag circa 20 000 µmol HCY aus Methionin gebildet, dieses wird normalerweise unmittelbar nach Produktion weiter zu Cystathion transsulfuriert oder wieder zu Methionin remethyliert (Fortin and Genest, 1995).

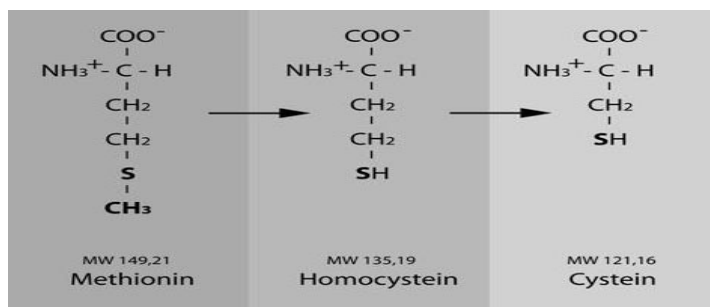


Abbildung 2: Strukturformeln von Methionin, HCY und Cystein (Stanger 2003)

2.2.1.1 Stoffwechsel von Homocystein

HCY kommt ausschließlich als Zwischenprodukt im Stoffwechsel der Aminosäure Methionin vor (Miner et al., 1997). Methionin wird über die Nahrung aufgenommen und reagiert im Körper zunächst mit Adenosintriphosphat (ATP) in Anwesenheit der Methionin-Adenosyltransferase zu S-Adenosylmethionin (SAM). SAM ist der wichtigste Methylgruppendonator bei zahlreichen biologischen Reaktionen (DNA, Proteine, Neurotransmitter, Hormone, Phospholipide). Etwa 100 Methylierungsreaktionen durch SAM sind beim Menschen bekannt (Chiang et al., 1996). Durch eine von Methyltransferasen katalysierte Reaktion wandelt sich SAM in S-Adenosylhomocystein (SAH) um. SAH wird durch die SAH-Hydrolyse (SAHH) in Adenosin und HCY hydrolysiert.

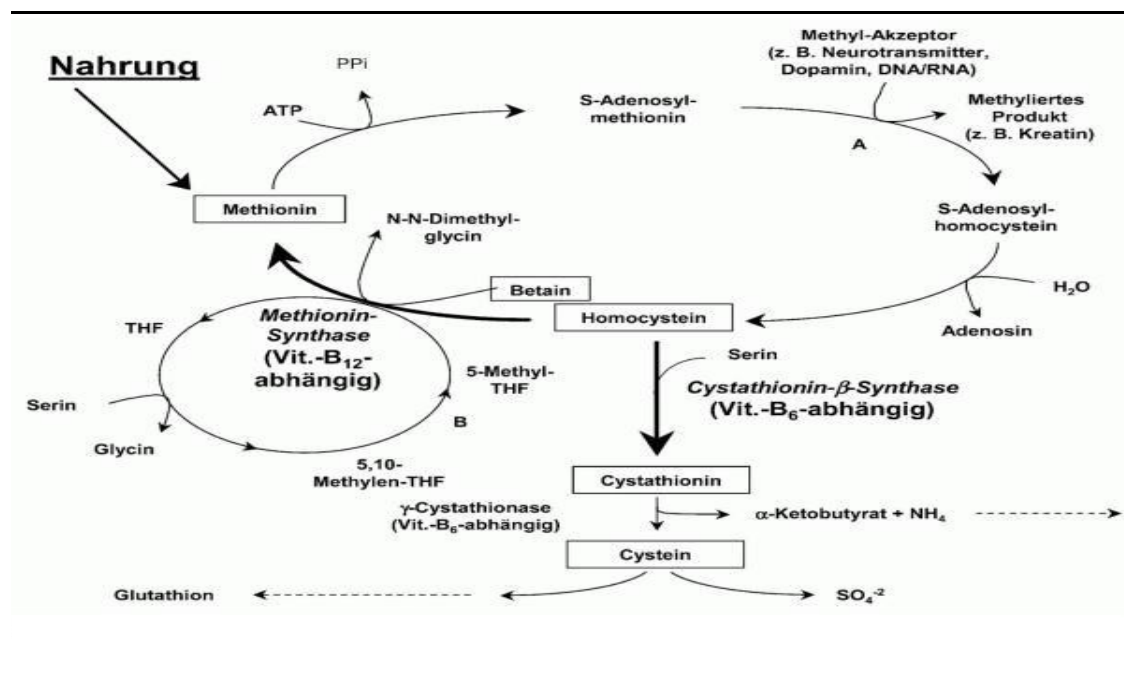


Abbildung 3: Stoffwechsel von HCY (Stanger et al., 2003)

Der Abbau von HCY erfolgt entweder über den **Remethylierungs-** oder den **Transsulfurierungsweg**. Bei der **Remethylierung** wird eine Methylgruppe von 5-Methyltetrahydrofolat (5-MTHF) auf HCY übertragen (Abbildung 3). Diese Reaktion kommt in allen Körperzellen vor und ist Vitamin B₁₂ abhängig. Alternativ kann die Methylgruppe auch von Betain geliefert werden. Diese

Reaktion spielt im HCY-Stoffwechsel jedoch eine untergeordnete Rolle, da diese Reaktion nur in der Leber stattfindet (Bostom and Lathrop, 1997). Beim **Transsulfurierungsweg** wird aus HCY und Serin Cystathionin gebildet. Diese Reaktion ist irreversibel und wird durch das Enzym Cystathion- β -Synthase (CBS), welches Pyridoxal-5-phosphat (PLP) enthält, katalysiert. Auf einem weiterführenden Weg wird Cystathionin zu Cystein und α -Ketobutyrat hydrolysiert. Beide Reaktionen benötigen als Cofaktor Vitamin B₆ (Bostom and Lathrop, 1997).

Der HCY-Stoffwechsel ist unter normalen physiologischen Bedingungen streng reguliert. Bei nicht ausreichender Versorgung mit den Vitaminen B₁₂, B₆ und Folat wird der HCY-Stoffwechsel behindert und infolgedessen kommt es zu einem Anstieg an HCY im Blut (Stanger et al., 2003).

2.2.2 Definition Hyperhomocysteinämie

Von verschiedenen Autoren werden unterschiedliche Grenzwerte für die Definition einer Hyperhomocysteinämie angegeben. Früher galten Konzentrationen von 16 $\mu\text{mol/l}$ als physiologische Obergrenze (Malinow, 1994). Dieser Wert wurde jedoch stetig nach unten korrigiert. Gegenwärtig liegt die akzeptierte Obergrenze bei 10-12 $\mu\text{mol/l}$. Ab einer Konzentration von über 12 $\mu\text{mol/l}$ wird von einer Erhöhung des atherosklerotischen Risikos gesprochen (Perry et al., 1995). Bei Patienten mit manifesten Gefäßerkrankungen bzw. Hochrisikopatienten sollte eine HCY-Konzentration von unter 10 $\mu\text{mol/l}$ angestrebt werden (Stanger et al., 2003). Die „DACH-Liga Homocystein“ schlägt bei einem erhöhten HCY-Spiegel folgendes Therapieschema (tägliche Einnahme von Vitaminsupplementen) vor (Abbildung 4):

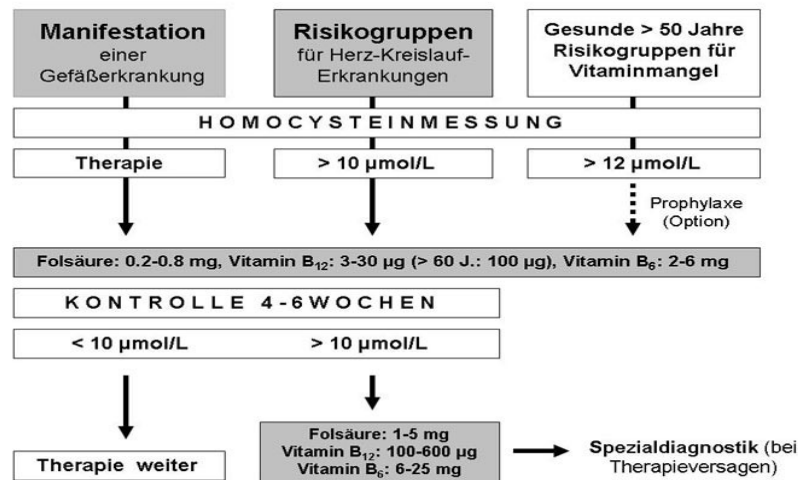


Abbildung 4: Therapieschema bei erhöhtem HCY (Stanger et al., 2003)

2.2.3 Ursachen für eine erhöhte HCY-Konzentration

Die HCY-Konzentration im Plasma ist von vielen modulierbaren sowie nicht modulierbaren Faktoren abhängig. Alter, Geschlecht, Vitaminmangel, gewisse Medikamente, angeborenen Störungen des HCY-Stoffwechsels, Beeinträchtigung der Nierenfunktion und der Lebensstil haben Einfluss auf die Höhe der Plasma-HCY-Konzentrationen.

2.2.3.1 Alter und Geschlecht

Mit zunehmendem Alter nimmt die HCY-Konzentration stetig zu, wobei Männer im jüngeren Alter normalerweise höhere Werte als Frauen haben. Etwa bis zum 40. Lebensjahr haben Frauen einen um 2 µmol/l niedrigeren HCY-Spiegel als Männer. Dies kann mit dem Östrogeneffekt erklärt werden und nimmt in der Menopause schnell ab. Weitere Gründe für diese Differenz sind unter anderem eine höhere Kreatinphosphatsynthese sowie eine größere Muskelmasse bei Männern. Die Abnahme der Nierenfunktion sowie die Abnahme der Vitamin B₁₂ Konzentration im Alter, bedingen einen Anstieg der Konzentration an HCY im Plasma. Bis zum 60-65 Lebensjahr verläuft der Anstieg an HCY weitgehend linear. Danach kann ein deutlich schnellerer Anstieg beobachtet werden, der

im Durchschnitt bei 1 $\mu\text{mol/l}$ pro Dekade liegt (Durand et al., 2001, De Bree et al., 2002). Diesen Anstieg konnten auch Jacques et al. beobachten. Personen unter 45 Jahren hatten im Vergleich zu Personen zwischen 45 und 54 Jahren um 0,5 $\mu\text{mol/l}$ erhöhte HCY-Spiegel. Personen jenseits des 65. Lebensjahres wiesen um 1 $\mu\text{mol/l}$ höhere Werte auf (Jacques et al., 2001).

2.2.3.2 Struktur, Funktion und Bedarf von Vitamin B₁₂ und Folsäure

Vitamin B₁₂ (Cobalamin)

- **Struktur**

Cobalamine sind durch ihren charakteristischen Aufbau gekennzeichnet. Das zentrale Cobaltatom ist von einem planaren Corrinring umgeben, dieser besteht wiederum aus vier Pyrrolringen (Abbildung 5). An das Cobaltatom oberhalb des Corrinrings können verschiedene Reste ($-\text{CH}_3$, $-\text{5-Desoxyadenosin}$, $-\text{OH}$, $-\text{H}_2\text{O}$, $-\text{CN}$) gebunden sein. Diese Substituenten sind für die Namensgebung der jeweiligen Cobalaminverbindung verantwortlich. Für den Menschen haben aber nur Methylcobalamin und 5-Desoxyadenosylcobalamin eine Coenzymwirksamkeit. Synthetisch hergestelltes Cyanocobalamin, welches man in Nährstoffpräparaten und in angereicherten Lebensmitteln findet, ist physiologisch nicht aktiv. Es kann jedoch im Organismus in aktives Cobalamin umgewandelt werden (Leitzmann et al., 2009).

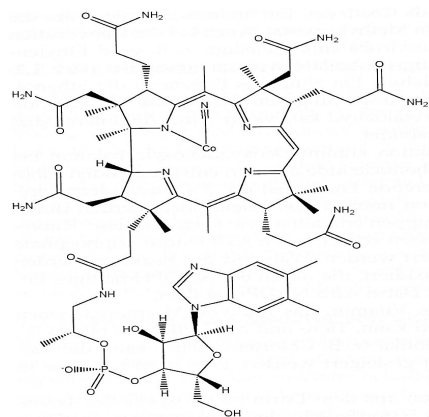


Abbildung 5: Strukturformel von Cyanocobalamin (Ebermann and Elmadfa, 2008)

- **Vorkommen**

Vitamin B₁₂ kommt nur in tierischen Lebensmitteln in nennenswerten Mengen vor. In Lebensmitteln liegt Vitamin B₁₂ meist als Adenosyl- und Hydroxycobalamin vor. Gute Cobalaminlieferanten sind Fleisch (besonders Innereien), Fisch, Muscheln, Eier, Milch- und Milchprodukte. Auch in vergorenen pflanzlichen Lebensmitteln, wie z.B. Sauerkraut, sind Spuren von Cobalamin zu finden, diese reichen allerdings nicht zur Bedarfsdeckung aus (Leitzmann et al., 2009, Stahl and Hesecker, 2007).

- **Bedarf**

Der Bedarf an Vitamin B₁₂ eines gesunden Erwachsenen beträgt 2 µg/d. Damit auch Risikogruppen ihren Bedarf sicher decken können wird eine Zufuhr von 3 µg/d empfohlen (DACH 2008). In Deutschland werden im Durchschnitt 5-6 µg/d Vitamin B₁₂ aufgenommen, demnach wird die Cobalaminversorgung von Gesunden, bei normalem Ernährungsverhalten als unproblematisch eingestuft (Leitzmann et al., 2009).

- **Hypovitaminose**

Eine Unterversorgung an Vitamin B₁₂ wird erst nach Jahren klinisch evident, da im Körper große Cobalaminspeicher bestehen. Der Vitamin B₁₂-Mangel entwickelt sich generell über verschiedene Stadien. Zuerst kommt es zur Speicherentleerung, danach treten metabolisch funktionelle Störungen auf und letztendlich kommt es zur klinischen Manifestation. Methylcobalamin ist Cofaktor der Methionin-Synthase. Bei der Synthese von Methionin überträgt dieses Enzym eine Methylgruppe des 5-MTHFs auf HCY. Daher kommt es bei intrazellulärem Vitamin B₁₂ Mangel zum Anstieg von Methylmalonsäure und von HCY im Plasma. Die Hyperhomocysteinämie bei gleichzeitigem Cobalaminmangel ist zusätzlich ein Zeichen für Hypomethylierung (DNA, RNA, Myelin, Phospholipiden oder Neurotransmittern), welche durch eine verminderte Bereitstellung von SAM bedingt ist (Herrmann and Obeid, 2008).

Ältere Menschen weisen häufig einen schlechten Vitamin B₁₂ Status auf. Grund dafür ist in der Regel atrophische Gastritis und ein dadurch bedingter Mangel

an Intrinsic-Faktor. Häufigste Ursache eines Vitamin B₁₂-Mangels ist Malabsorption (Andres et al., 2003).

2.2.3.2.1 Folate

- **Struktur**

Der Begriff Folat leitet sich von dem lateinischen Wort für „folium“ (Blatt) ab. Man differenziert zwischen den natürlichen Folaten und der synthetisch hergestellten Folsäure. Natürliche Folate bestehen aus einem Pteridin- und einem para-Aminobenzoessäurering, an dessen Carboxylende bis zu 8 Glutaminsäurereste gebunden sein können (Abbildung 6). Folsäure hingegen ist ein vollständig oxidiertes Pteroylglutamat mit nur einem Glutaminsäurerest. Die natürlich vorkommenden Folate unterscheiden sich durch die Anzahl ihrer Glutamylreste in der Seitenkette. 5,6,7,8-Tetrahydrofolat ist die biologisch aktive Form, sowie ihre C1 tragenden Derivate. Tetrahydrofolat (THF) und ihre Derivate sind Coenzyme für viele Stoffwechselvorgänge. Sie fungieren als Akzeptor und Überträger von C1-Resten, wie Hydroxymethyl- und Formylgruppen. Folsäure ist für die Remethylierung von HCY zu Methionin als Methylgruppendonator notwendig. Auf die HCY-Konzentration im Blut nimmt Folsäure im Vergleich zu Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ den stärksten Einfluss (Pietrzik and Bronstrup, 1997, Stanger et al., 2003, Leitzmann et al., 2009).

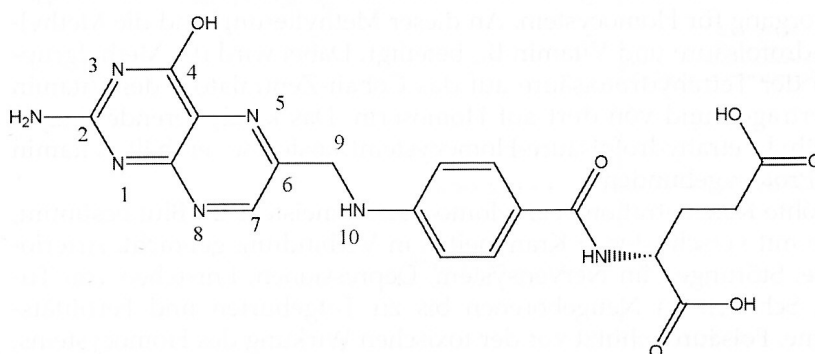


Abbildung 6: Strukturformel der Folsäure (Pteroylglutaminsäure) (Ebermann and Elmadfa, 2008)

Die Funktion der Folate hängt zum Teil eng mit der des Vitamins B₁₂ zusammen. Beide Vitamine sind an der Verstoffwechslung von HCY zu Methionin beteiligt, einem irreversiblen Stoffwechselweg, bei dem von 5-Methyl-THF eine Methylgruppe auf HCY übertragen wird. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Methylen-THF-Reduktase und der Methioninsynthase. Die Methioninsynthase benötigt als Cofaktor Vitamin B₁₂. Bei einem Mangel an Vitamin B₁₂ wird diese Reaktion blockiert und die Menge an reaktionsfähigem THF wird reduziert und steht für die Bildung von 5,10-Methylen-THF nicht mehr ausreichend zur Verfügung (Stanger et al., 2009).

- **Vorkommen**

Sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Lebensmitteln kommen Folate vor. Einen hohen Gehalt an Folat weisen Blattgemüse auf. Andere gute Folatquellen sind Weißkohl, Tomaten, Orangen, Leber und Getreide (Leitzmann et al., 2009).

In der Nahrung liegt Folat als Pteroylmonoglutamat und als Pteroylpolyglutamat vor. Monoglutamate werden nahezu vollständig absorbiert (> 90%). Polyglutamate müssen in der Mehrzahl vor der Absorption durch eine intestinale Konjugase zu Monoglutamatverbindungen reduziert werden. Somit ergibt sich eine Absorptionsrate von ca. 50% (DACH, 2008).

Synthetisch hergestellte Folsäure (Pteroylmonoglutaminsäure) wird nahezu quantitativ (> 90%) absorbiert. Sie ist die stabilste Form des Vitamins und wird in Supplementen und Medikamenten verwendet (DACH, 2008).

- **Bedarf**

Die empfohlene Zufuhr an Nahrungsfolat beträgt 400 µg-Folat-Äquivalent/Tag (1 µg Folat-Äquivalent = 1 µg Nahrungsfolat = 0,5 µg synthetische Folsäure) für einen gesunden Erwachsenen (DACH, 2008). Circa 80% der Männer und 90% der Frauen erreichen diese Empfehlung nicht. Ein zu geringer Gemüsekonsum ist der Hauptgrund (Leitzmann et al., 2009). In Bezug auf die Bioverfügbarkeit bestehen zum Teil große Unterschiede, da in vielen Nahrungsmitteln Inhibitoren enthalten sind, die die Konjugaseaktivität

herabsetzen (Biesalski et al., 2002).

- **Hypovitaminose**

Folsäuremangel ist in Europa der häufigste Vitaminmangel (Kleine-Gunk, 2003). Neben einer zu geringen Aufnahme über die Nahrung und einer herabgesetzten Verfügbarkeit können auch Krankheiten, die mit einer Malassimilation einhergehen, die Ursache für einen Folatmangel sein. Mangelsymptome treten zuerst in Geweben mit hoher Zellteilungsrate auf, da Folsäure an der DNA-Synthese beteiligt ist. Besonders betroffen sind blutbildende Gewebe im Knochenmark. Daher kann als erstes Symptom eine hyperchrome, makrozytäre Anämie beobachtet werden (Leitzmann et al., 2009). DNA-Schäden (Chromosomenstrangbrüche, gestörte Zellproliferation wie Hypomethylierung) sind weitere Folgen eines Folatmangels (Stanger et al., 2003).

2.2.3.2.2 Metformin

Metformin ist das am häufigsten verschriebene Medikament zur Regulierung des Insulinspiegels bei Typ-II-Diabetikern. Darüber hinaus, ist es eines der wenigen Antidiabetika welches mit einer Verbesserung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität verbunden ist. **In der United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)** wurden verschiedene Therapiemöglichkeiten bei Patienten mit neu diagnostiziertem Typ-II-Diabetes verglichen. Die Einnahme von Metformin, verglichen mit anderen Therapieansätzen war mit einer Verringerung des Risikos für Folgeschäden (diabetesbezogene Endpunkte; - 32%) assoziiert (N.N., 1998). Es gibt nur wenige Nachteile für den Einsatz von Metformin. Aus Studien geht hervor, dass Metformin mit einer Cobalaminmalabsorption, sowie mit einer erniedrigten Folatkonzentration assoziiert ist. Der verschlechterte Status der beiden Vitamine könnte wiederum mit einer Erhöhung des HCYs einhergehen (de Jager et al., 2010).

SAHIN et al. untersuchten in einer Studie mit 165 Probanden die Auswirkung zweier häufig eingesetzter Antidiabetika (Metformin und Rosiglitazon) auf den Status von Vitamin B₁₂ und Folsäure. Nach einer 6-wöchigen Behandlung

konnte in der Metformin-Gruppe ein Anstieg an HCY (+ 2,36 $\mu\text{mol/l}$) sowie ein verschlechterter Status an Vitamin B₁₂ (- 20,17 pg/ml) und Folsäure (- 1,04 ng/ml) festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde in der Rosiglitazon-Gruppe eine Abnahme an HCY (- 0,92 $\mu\text{mol/l}$) beobachtet. Der Vitaminstatus blieb unverändert (Sahin et al., 2007).

In einer Querschnittsstudie prüften Hoogeveen et al. den Effekt einer Metformingabe (500-2550 mg/d, mind. 6 Monate) bei nicht insulinpflichtigen Diabetikern (NIDDM, non insulin dependend Diabetes mellitus). Dazu wurden die Probanden in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe bestand aus 40 NIDDM-Diabetikern, welche mit Metformin behandelt wurden. Die zweite Gruppe setzte sich aus 71 NIDDM-Diabetikern zusammen, welche nicht mit Metformin behandelt wurden. Der durchschnittliche HCY-Wert in der Metformingruppe betrug 11,5 $\mu\text{mol/l}$. In der Kontrollgruppe konnte eine geringfügig niedrigere Konzentration an Homocystein gemessen werden (- 0,8 $\mu\text{mol/l}$). Keinen Einfluss auf die HCY-Konzentration hatte die Menge an verabreichtem Metformin. Die erwartete Dosis-Wirkungsbeziehung blieb aus (Hoogeveen et al., 1997). Dem durch Metformin induzierten HCY Anstieg kann durch eine Folsäuresupplementation entgegengesteuert werden (Aarsand and Carlsen, 1998).

2.2.3.3 Ausgewählte genetische Determinanten

2.2.3.3.1 Methylenetetrahydrofolatreduktase (MTHFR)-Polymorphismus C677T

Kang et al. beschrieben 1988 erstmals die thermolabile Form der MTHFR (Kang et al., 1988). Das Enzym 5,10-Methylenetetrahydrofolat-Reduktase katalysiert die Reduktion von 5,10-Methylenetetrahydrofolat zu 5-Methylenetetrahydrofolat. Diese Reaktion ist NAD(P)H-abhängig. 5-Methylenetetrahydrofolat ist die Vorstufe von Folat und ein Kohlenstoff-Donator bei der Remethylierung (Frosst et al., 1995).

Diese autosomal rezessive Form ist durch eine verminderte spezifische Enzymaktivität bei 37°C und einer gesteigerten Thermolabilität nach Erwärmung von Lymphozytenextrakten über fünf Minuten bei 46°C

charakterisiert (Kang et al., 1988). Bei 37°C beträgt die Enzymaktivität der homozygoten Form (T/T) nur noch 25-45% im Vergleich zum normalen Genotyp (C/C). Durch eine Punktmutation kommt es zur Änderung der Enzymaktivität, welche auf einer Substitution von Cytosin durch Thymin am Nukleotid 677 (677 → C) beruht. Dies führt bei der Proteinbiosynthese zum Einbau der Aminosäure Valin anstelle von Alanin und dadurch entsteht die thermolabile Form des Enzyms (Frosst et al., 1995, Goyette et al., 1994). Es besteht eine Wechselwirkung zwischen dem MTHFR-Polymorphismus und der Folsäurezufuhr. Generell haben homozygote Träger einen höheren Folsäurebedarf. Wird dieser nicht gedeckt, kommt es zu besonders hohen Plasma-HCY-Werten (Frosst et al., 1995, Rozen, 2000). Homozygote Träger haben laut einer Metaanalyse von Wald et al. ein um etwa 15% erhöhtes Risiko für koronare Herzkrankheiten und ein um 25% erhöhtes Risiko für Schlaganfälle (Wald et al., 2002).

Im Hordalandkollektiv wurde von insgesamt 18043 Studienteilnehmern bei 67 Probanden eine Nüchtern-HCY-Konzentration von > 40 µmol/l gemessen. Von diesen 67 Probanden waren 49 Träger der homozygoten (T/T) und 13 Träger der heterozygoten (C/T) Variante. Betroffene hatten einen ausgesprochenen niedrigen Plasmafolatstatus (Median: 2,9) sowie einen schlechteren Cobalaminstatus (Guttormsen et al., 1996).

Jaques und seine Arbeitsgruppe kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Auch sie können den Zusammenhang zwischen einem niedrigen Folatstatus bei Trägern der homozygoten (T/T) Variante des Polymorphismus und den erhöhten HCY-Konzentrationen bestätigen. Die durchschnittlichen Nüchtern-HCY-Konzentrationen waren signifikant höher bei Trägern der homozygoten thermolabilen Form. Probanden, welche Träger der homozygoten Mutation waren und gleichzeitig einen niedrigen Folatstatus (< 15,4 nmol/l) aufwiesen, hatten um 24% höhere HCY-Werte. Der TT-Genotyp hat einen höheren Bedarf an Folsäure und reagiert sensibler auf eine Folsäurezufuhr (Jacques et al., 1996).

Klerk et al. verglichen im Rahmen einer Meta-Analyse die Ergebnisse von insgesamt 40 Studien und kamen zum Ergebnis, dass der TT-Genotyp ein

signifikant höheres Risiko hat, an einer Gefäßerkrankung zu leiden, insbesondere wenn der Folatstatus niedrig ist (Klerk et al., 2002).

2.2.3.3.2 β -Cystathion-Synthase (CBS)

Wie aus Abbildung 3 zu entnehmen ist, ist die CBS ein Enzym des Transsulfurierungsweges. Bei einem Enzymmangel ist die Cysteinkonzentration vermindert, während sich HCY und Methionin anreichern. Die homozygote Mutation tritt mit einer Prävalenz von 1 : 332 000 auf und führt meist schon in sehr jungen Jahren zum Tod (Malinow, 1994). Die heterozygote Form wird mit einer Häufigkeit von 0,3% in der Gesamtbevölkerung gefunden (Malinow, 1994). Ihre klinische Bedeutung ist jedoch umstritten, da die HCY-Werte im Nüchternblut nicht erhöht sind (lediglich postprandial oder nach oraler Methioningabe) (Kluijtmans et al., 1996).

Das Gen für CBS ist auf dem Chromosom 21 (21q22.3) lokalisiert. Bei der Trisomie 21 (Down Syndrom) kommt es zu einem 3-fachen Chromosomensatz, was zu einer höheren Aktivität (150%) dieses Enzyms führt. Infolgedessen kommt es beim Down Syndrom kaum zu atherosklerotischen Gefäßerkrankungen (Chadefaux et al., 1985). Da die CBS Vitamin B₆ abhängig ist, unterscheidet man in der Therapie zwischen Vitamin B₆ Respondern- und Nichtrespondern, je nachdem ob durch die Supplementierung des Vitamins eine Senkung der HCY-Konzentration möglich ist (Shih et al., 1995).

2.2.3.4 Einfluss des Lebensstils

Ebenso Einfluss auf die Homocysteinkonzentration im Plasma nimmt der Lebensstil. Rauchverhalten, Alkohol und Kaffeekonsum sind mit einer Erhöhung des HCY-Spiegels assoziiert (Refsum et al., 2006).

In der Hordaland-Studie wurde ein dosisabhängiger Zusammenhang zwischen Kaffeekonsum und der HCY-Konzentration gefunden, welcher eventuell mit dem Chlorogengehalt in Verbindung gebracht werden kann (Refsum et al., 2006).

Christensen et al. kamen zum Ergebnis, dass nach einer 6-wöchigen Kaffeeabstinenz die HCY-Konzentration um 1,08 $\mu\text{mol/l}$ sinkt. Ebenfalls konnte

eine Abnahme an Cholesterin ($-0,28$ nmol/l) beobachtet werden (Christensen et al., 2001).

In einer weiteren Studie betrug die Erhöhung des HCYs, nach einer 2-wöchigen Kaffeeintervention (1l/d), $1,5$ μ mol/l. Kein signifikanter Unterschied konnte in Bezug auf den Vitaminstatus (B_6 , B_{12} und Folsäure) zwischen der Interventions- und Kontrollgruppe beobachtet werden (Urgert et al., 2000).

2.2.4 Homocystein als unabhängiger Risikofaktor für Gefäßerkrankungen

McCully und Wilson formulierten erstmals 1975 die HCY-Theorie der Atherosklerose. Die beiden Wissenschaftler erkannten, dass erhöhte HCY-Konzentrationen mit Gefäßkrankheiten in Verbindung stehen (McCully and Wilson, 1975). 1991 wurde HCY zum ersten Mal als unabhängiger Risikofaktor für Gefäßkrankheiten angesehen (Clarke et al., 1991). Eine erhöhte HCY-Konzentration entspricht als Risikofaktor in etwa der des Rauchens oder einer Hyperlipidämie (Graham et al., 1997). Liegen zusätzliche Risikofaktoren vor, wie z.B. Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie kann sich das Gesamtrisiko einer Gefäßerkrankung synergistisch und überproportional steigern (Wald et al., 2002). Man geht davon aus, dass ein Anstieg der HCY-Konzentration im Plasma um 5 μ mol/l das Risiko einer koronaren Herzkrankheit gleichermaßen erhöht, wie ein Anstieg der Cholesterinkonzentration um 20 mg/dl ($0,5$ mmol) (Boushey et al., 1995). Im Gegensatz dazu ließe sich durch eine Senkung der HCY-Konzentration um 3 μ mol/l das Risiko einer ischämischen Herzkrankheit um 16% verringern. Weiters würde das Schlaganfallrisiko um 24% , und das tiefe Venenthromboserisiko um 25% gesenkt werden (Wald et al., 2002).

Nygard et al. untersuchten in einer prospektiven Studie mit 587 KHK-Patienten die Abhängigkeit der Sterblichkeit von HCY-Ausgangswerten. Nach 4 Jahren Beobachtung verstarben $24,7\%$ der Patienten mit einer HCY-Konzentration von > 15 μ mol/l. Im Vergleich dazu, verstarben nur $3,8\%$ der Patienten mit einer HCY-Konzentration von < 9 μ mol/l (Nygard et al., 1997).

Groß angelegte Interventionsstudien (HOPE 2, NORVIT, VISP) haben gezeigt, dass durch eine Supplementierung von B-Vitaminen das Risiko einer Herz-

Kreislauf-Erkrankung nicht gesenkt werden kann (Lonn et al., 2006, Bonna et al., 2006, Toole et al., 2004).

In der **Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Study** erhielten 5522 Patienten mit Diabetes mellitus oder einer manifesten Gefäßerkrankungen täglich, über einen Zeitraum von 5 Jahren, eine Kombination aus Folsäure (2,5 mg/d), Vitamin B₆ (50 mg/d) und Vitamin B₁₂ (1 mg/d) oder ein Placebo. Durch die Vitamingabe konnte eine Senkung des HCYs (- 2,4 µmol/l) erreicht werden. Allerdings hatte die Reduktion an HCY keine Auswirkung auf die Häufigkeit klinischer Ereignisse. In der Vitamingruppe, sowie in der Placebogruppe war die Rate für den primären kombinierten Endpunkt (kardiovaskulär bedingter Tod, Myokardinfarkt, Schlaganfall) nicht signifikant unterschiedlich (18,8% vs. 19,8%) (Lonn et al., 2006).

Tabelle 2: Interventionsstudien mit B-Vitaminen in der Sekundärprävention

Literaturquellen	n	Studienkollektiv	Mittelwert HCY (µmol/l)	Positiver Effekt
NORVIT; (Bonna et al., 2006);	2815	KHK oder 3 Risikofaktoren für KHK	13,1	nein
SEARCH; (Armitage et al., 2010);	12064	Myokardinfarkt	13,5	nein
Ebbing et al., 2008	3090	Nach perkutaner Koronarintervention	11,0	nein
Khandanpour et al., 2009	133	Periphere arterielle Verschlusskrankheit	13,3	ja
Carrero et al., 2005	60	Periphere arterielle Verschlusskrankheit	13,2	ja
Liem et al., 2004	283	KHK	12,1	nein
HOPE-2-Study; (Lonn et al., 2006);	5522	Gefäßerkrankung oder Diabetes mellitus	11,8	nein
VISP; (Toole et al., 2004);	3680	Schlaganfallpatienten	13,4	nein
WAFACS; (Albert et al., 2008);	5442	KHK oder 3 Risikofaktoren für KHK	12,3	nein

In der **Norwegian Vitamin (NORVIT)** Studie nahmen 3749 Patienten im Alter zwischen 38 und 84 Jahren teil. Diese Patienten wurden in 35 Krankenhäusern

in Norwegen nach einem akuten Myokardinfarkt rekrutiert. Die Teilnehmer wurden anschließend in 4 unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe bekam eine Kombination aus Folsäure (0,8 mg), Vitamin B₁₂ (0,4 mg) und Vitamin B₆ (40 mg), die zweite Folsäure (0,8 mg) mit Vitamin B₁₂ (0,4 mg), die dritte nur Vitamin B₆ (40 mg) und die vierte bekam ein Placebo verabreicht. In der ersten und zweiten Gruppe konnten die HCY-Konzentrationen um durchschnittlich 27% gesenkt werden. In der Vitamin B₆ und in der Placebogruppe blieben die HCY-Konzentrationen unverändert. Eine verminderte Rate des kombinierten primären Endpunktes (tödlicher und nicht tödlicher Myokardinfarkt und Insult) konnte nach einer Behandlungsdauer von 40 Monaten nicht gezeigt werden (Bonaa et al., 2006).

In der **Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP)** Studie wurden 3860 Schlaganfallpatienten zusätzlich zur medizinischen und chirurgischen Therapie mit einem niedrig (0,2 mg Vitamin B₆, 0,006 mg Vitamin B₁₂ und 0,02 mg Folsäure) bzw. hoch dosierten (25 mg Vitamin B₆, 0,4 mg Vitamin B₁₂ und 2,5 mg Folsäure) Präparat versorgt. Ziel dieser Studie war es, den Effekt einer HCY-Senkung auf verschiedene Endpunkte (erneuerter Schlaganfall, Herzinfarkt, koronare Herzkrankheit) zu untersuchen. Nach einer Studiendauer von 2 Jahren konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der genannten Endpunkte in den verschiedenen Behandlungsgruppen gefunden werden (Toole et al., 2004).

Albert et al. untersuchten in der **Women's Antioxidant and Folic Acid Cardiovascular Study (WAFACS)** inwiefern sich die tägliche Einnahme von Folsäure (2,5 mg/d), Vitamin B₆ (50 mg/d) und Vitamin B₁₂ (1 mg/d), über einen Zeitraum von etwa 7 Jahren, auf das kardiovaskuläre Risiko auswirkt. Insgesamt nahmen an der Studie 5542 Frauen teil, die entweder eine bestehende Herz-Kreislauf-Erkrankung hatten oder mindestens drei kardiovaskuläre Risikofaktoren aufwiesen. Wiederum konnte die HCY-Konzentration signifikant gesenkt werden, eine Senkung der kardiovaskulären Vorfälle blieb jedoch aus (Albert et al., 2008).

Armitage et al. untersuchten im Rahmen einer doppelblinden, randomisierten Interventionsstudie (Study of the Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol and Homocysteine; SEARCH) an 12064 Teilnehmern, ob sich eine

Supplementierung mit Vitamin B₁₂ (1 mg/d) und Folsäure (2 mg/d) günstig auf KHK-Erkrankungen in der Sekundärprävention auswirkt. Durch die Vitamineinnahme konnte die durchschnittliche HCY-Konzentration um 3,8 µmol/l (28%) gesenkt werden. Eine Reduktion der kardiovaskulären Ereignisse in der Interventionsgruppe konnte nicht beobachtet werden. Die Autoren schlussfolgern, dass eine Langzeitsenkung von HCY durch Vitamin B₁₂ und Folsäuresupplementation nicht mit einer Verringerung erneuter Gefäßerkrankungen assoziiert ist (Armitage et al., 2010).

Dr. David Wald äußerte auf dem Weltkongress zur Hyperhomocysteinämie 2007 erhebliche Zweifel an der VISP, NORVIT und HOPE-2-Studie. Gründe dafür sind, dass nicht Behandlung gegen Nichtbehandlung getestet wurde, sondern nur konventionelle Behandlung gegen konventionelle Behandlung plus Vitaminsupplemente. Der zusätzliche Effekt der Supplemente kann nur schwer beurteilt werden, da Herz-Kreislaufpatienten mehrere hochpotente Medikamente in ihrer Basismedikation einnehmen. Der zusätzliche Effekt durch die Vitaminsupplementation ist somit in diesen Studien gering (Wald, 2007). Berechnungen zeigen, dass selbst alle 3 Studien gemeinsam nicht genügend statistische Power haben, um eine Senkung des kardiovaskulären Risikos sicher belegen zu können.

Weder eine Hyperhomocysteinämie noch ein schlechter Vitaminstatus waren Einschlusskriterien der VISP-, NORVIT- und HOPE-2-Studie. Nur bei etwa 20% der HOPE-2-Studienteilnehmern wurde die HCY-Konzentration gemessen und die Patienten wiesen zudem keinen Mangel an Folat-, Vitamin B₁₂- oder Vitamin B₆ auf (Lonn et al., 2006, Toole et al., 2004, Bonaa et al., 2006).

Eine Nachauswertung der VISP-Studie ergab eine signifikante Reduktion (- 21%) der kombinierten Endpunkte (Schlaganfall, KHK, Tod). Ausschlusskriterien waren Vitamin B₁₂-Malabsorption, Vitamin B₁₂-Supplementation sowie Nierenfunktionsstörungen (Spence et al., 2005).

2.3 Erythrozytenindizes bei Typ-II-Diabetikern- Anämieformen

Erythrozytenindizes dienen zur Differenzierung der verschiedenen Anämieformen:

Tabelle 3: Differenzierung der verschiedenen Anämieformen

Anämieform	Kennzeichen	Ursache
Mikrozytäre, hypochrome Anämie	↓ MCV (mean corpuscular volume) ↓ MCH (mean corpuscular hemoglobin) ↓ Ferritin	Mangelzustand: z.B. Eisenmangel
Makrozytäre, hyperchrome Anämie	↑ MCV ↑ MCH ↓ Hb (Hämoglobin)	Mangelzustand: z.B. Vitamin B ₁₂ - oder Folsäuremangel
Normozytäre, normochrome Anämie	↓ Erythrozytenzahl MCV, MCH, Hb → normal	Zellverlust, Zellstörung: z.B. akute Blutung, Hämolyse, Aplasie

Als Anämie (Blutarmut) bezeichnet man einen Mangel an Erythrozyten oder Hämoglobin. Der Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid zwischen Blut und Gewebe ist gestört. Als mögliche Ursachen einer Anämie gelten:

- **Fehlernährung:** mangelnde Zufuhr an Eisen, Folsäure, Vitamin B₁₂, Vitamin B₆, Vitamin C, essentielle Aminosäuren, Cobalt, Nickel, Zink
- **erhöhter Bedarf an Nährstoffen:** Wachstum, Schwangerschaft, Stillzeit, Blutverlust, Medikamenteneinnahme
- **unzureichende Resorption der Nährstoffe:** Magenresektion, Malabsorption, Intrinsic-Faktor Mangel, Parasitenbefall
- **Genetische Defekte:** Störungen der Hämoglobinsynthese oder des Hämoglobinabbaus (Elmadfa and Leitzmann, 2004).

Bei Diabetespatienten ist die Anämie ein nicht selten diagnostizierter Befund. Häufig wird die Diagnose bei Patienten mit einer Niereninsuffizienz gestellt (Thomas, 2006).

Nephropathie, Retinopathie und makrovaskuläre Erkrankungen treten vermehrt bei Patienten mit einer Anämie auf. Häufig bleibt diese unentdeckt und wird demnach nicht behandelt (Thomas et al., 2006a).

Ein niedriger Hämoglobinspiegel wird laut wissenschaftlicher Literatur vermehrt bei Typ-II-Diabetikern beobachtet. Oftmals verbirgt sich dahinter eine Niereninsuffizienz. Auch atherosklerotische Schäden können mit einem niedrigen Hämoglobinspiegel einhergehen. Thomas und sein Team untersuchten im Rahmen einer prospektiven Kohortenstudie an 503 Typ-II-Diabetikern die Häufigkeit eines Hämoglobinmangels. Insgesamt wurde bei 25% der Studienteilnehmer ein Mangel an Hämoglobin festgestellt (Thomas et al., 2006b).

2.3.1 Hyperchrome, makrozytäre Anämie

Unter einer megaloblastären Anämie versteht man eine **hyperchrome, makrozytäre Anämie**. Häufigste Ursache einer megaloblastären Anämie ist ein Mangel an **Folsäure oder ein Mangel an Vitamin B₁₂** (Wehling, 2011). Megaloblastäre Veränderungen sind in allen Reifungsstadien der Erythrozyten (Erythropoese) zu finden (Andreesen and Heimpel, 2009). Diese Veränderungen führen zu den morphologisch typischen Veränderungen der Erythroblasten, die man als „megaloblastär“ bezeichnet (Böhm et al., 2009). Im Blutbild lässt sich eine megaloblastäre Anämie durch ein erhöhtes MCV und ein erhöhtes MCH erkennen. Häufig ist auch die Anzahl der Thrombozyten und der Leukozyten vermindert (Menche, 2008).

Als **perniziöse Anämie** bezeichnet man einen Mangel an Vitamin B₁₂ der durch ein Fehlen an Intrinsic-Faktor ausgelöst wird. Meist geht die perniziöse Anämie mit einer chronisch-atrophischen Gastritis einher. Die Atrophie der Magenschleimhaut liegt einem Autoimmunprozess zugrunde. Bei der Mehrzahl der Patienten lassen sich Autoantikörper gegen die Belegzellen und gegen den Intrinsic-Faktor nachweisen. In der Regel erkranken fast ausschließlich Personen im mittleren und höheren Lebensalter. Bei hellhäutigen und blauäugigen Individuen findet sich die Krankheit gehäuft (Andreesen and Heimpel, 2009).

Bei der perniziösen Anämie ist die Mitose und Differenzierung der Stammzellen im Knochenmark gestört. Infolgedessen kommt es zur Bildung von Megaloblasten nicht ausdifferenzierter Erythrozyten. Dies kann eine irreversible Degeneration des Rückenmarks auslösen, die unbehandelt zum Tod führen kann (Ebermann and Elmadfa, 2008).

Ein verminderter Vitamin B₁₂ Spiegel im Serum ($< 0,04 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$) sowie ein Anstieg der Methylmalonsäurekonzentration im Harn sind biochemische Anzeichen einer perniziösen Anämie (Ebermann and Elmadfa, 2008).

Folsäuremangelanämie löst die gleiche Symptomatik (makrozytäre hyperchrome Anämie) wie die perniziöse Anämie aus, da beide Vitamine in den C1-Stoffwechsel eingebunden sind (Lemmer and Brune, 2010). Die Folsäuremangelanämie beruht fast immer auf einer verminderten Zufuhr von Folsäure über die Nahrung (Andreesen and Heimpel, 2009).

2.3.2 Hypochrome, mikrozytäre Anämie

Die **hypochrome, mikrozytäre** Anämie ist die am häufigsten vorkommende Anämieform. Weltweit leiden ca. 600 Millionen Menschen an einer Eisenmangelanämie. Ursache einer Eisenmangelanämie kann eine unzureichende Zufuhr über die Nahrung, erhöhter Eisenverlust bei Blutungen oder ein Mehrbedarf infolge von Wachstum oder Schwangerschaft sein (Löffler, 2008).

Ein **erniedrigter Hämoglobinwert** (Mann: $< 13,5 \text{ g/dl}$; Frau: $< 12,0 \text{ g/dl}$) ist ein Zeichen für eine Eisenmangelanämie. Folgen einer Anämie sind Blässe, Leistungsschwäche und chronische Müdigkeit (Löffler, 2008).

Eisen, welches über die Nahrung zugeführt wird liegt zum größten Teil in dreiwertiger Form vor. Durch eine Ferrireduktase wird es in die zweiwertige Form reduziert. Das zweiwertige Eisen wird nach der Aufnahme an das intrazelluläre Transportprotein Mobilferrin gebunden. Bei einem gut gefüllten Eisenspeicher wird das Eisen des Mobilferrins durch das intrazelluläre Eisenspeicher-Protein **Ferritin** gebunden. Dafür muss es oxidiert werden, um wieder in der dreiwertigen Form vorzuliegen (Löffler, 2008).

Serumferritin ist der wichtigste Laborparameter zur Beurteilung des Eisenspeichers im Körper. Werte < 15 ng/ml geben Aufschluss über einen vorliegenden Eisenmangel. Werte > 100 ng/ml schließen einen Mangel an Eisen weitgehend aus. Als problematisch angesehen werden Konzentrationen zwischen 15 und 100 ng/ml, da es sich bei Ferritin um ein Akut-Phase-Protein handelt, wodurch es bei entzündlichen Prozessen zu falsch hohen Ergebnissen kommen kann (Böhm et al., 2009).

2.4 Ausgewählte Studien bezüglich der Primär- und Sekundärprävention des Diabetes mellitus

Primärprävention: Wang et al. konnten an 2909 Personen im Rahmen der **ARIC-Studie** (Atherosclerosis Risk in Communities) eine signifikante Assoziation während eines 9-jährigen Follow-ups zwischen der Diabetesinzidenz und dem Plasma Gehalt an gesättigten Fettsäuren (SFA, saturated fatty acids) feststellen (Wang et al., 2003).

In der **Health Professionals Follow-up Study** an 42504 gesunden Männern fand sich nach Adjustierung für den Body Mass Index hingegen kein signifikanter Zusammenhang bezüglich eines erhöhten Diabetesrisiko und einer SFA-Aufnahme. (van Dam et al., 2002).

Auch in der **Iowa Women's Study** fand sich kein Zusammenhang zwischen SFA und dem Risiko an Diabetes zu erkranken. Der Austausch von SFA durch mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA, polyunsaturated fatty acids) war jedoch mit einem signifikant niedrigeren Risiko assoziiert (Meyer et al., 2001). Der PUFA-Anteil im Serum war in der **Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study** kein signifikanter Marker für die Entstehung von Diabetes mellitus (Laaksonen et al., 2002).

Sekundärprävention: In einer finnischen Studie wurde an 661 Typ-II-Diabetikern untersucht ob es einen Zusammenhang bezüglich der Gesamtfettaufnahme und kardiovaskulären Erkrankungen gibt. Nach 7 Jahren Beobachtung zeigte sich bei den Männern kein signifikanter Unterschied. Hingegen wiesen Frauen mit einer kardiovaskulären Erkrankung eine

signifikant niedrigere Gesamtfettaufnahme als Frauen ohne Krankheit auf (Soinio et al., 2003).

In der **Nurses Health Study** wurden 5672 Frauen mit einem Typ-II-Diabetes über einen Zeitraum von 2 bis 18 Jahren beobachtet. 268 Frauen erlitten einen nicht letalen, 183 einen letalen Myokardinfarkt und bei 168 trat ein Schlaganfall auf. Die Gesamtfettaufnahme hatte auf diese Ereignisse keinen Einfluss, jedoch war eine höhere SFA und Cholesterol Aufnahme signifikant mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert. Transfettsäuren korrelierten nicht signifikant mit dem Risiko für Myokardinfarkt und Schlaganfall (Tanasescu et al., 2004).

In einer randomisierten Studie von Summers et al. wurde eine SFA-reiche Diät mit einer PUFA-reichen Diät hinsichtlich der Insulinsensitivität bei Typ-II-Diabetikern verglichen. Beide Diäten zeigten keinen signifikanten Einfluss (Summers et al., 2002).

Brehm et al. verglichen in einer randomisierten Studie die Effekte einer Diät reich an einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFAs, mono unsaturated fatty acids) mit einer kohlenhydratreichen Diät an 124 übergewichtigen Typ-II-Diabetikern. Die MUFA Gruppe sollte im Vergleich zur Kohlenhydratgruppe mehr Olivenöl, Rapsöl, Nüsse, Hülsenfrüchte und Bohnen verzehren. Zielgrößen waren die glykämische Kontrolle und das Körpergewicht. In beiden Gruppen konnte eine vergleichbare Gewichtsreduktion von circa 4% des ursprünglichen Gewichts festgestellt werden. Im Hinblick auf die Veränderungen des diastolischen Blutdrucks, HDL-Cholesterins, HbA1c und der Nüchtern-Glucose konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Beide Diäten waren effektiv, daher schlussfolgerten die Autoren, dass eine Diät reich an MUFAs eine Alternative zu einer kohlenhydratreichen Diät darstellt (Brehm et al., 2009).

In der **Nurses Health Study** war ein Austausch von Kohlenhydraten gegen MUFA nicht mit dem kardiovaskulären Risiko assoziiert (Tanasescu et al., 2004).

Norris et al. untersuchten in einer randomisierten, doppelblinden Studie den Effekt von konjugierter Linolsäure und Distelöl, auf die Körperzusammensetzung von 35 postmenopausalen Frauen mit Typ-II-

Diabetes. Während der Interventionsphase erhielten die Probanden täglich 8 g Öl über einen Zeitraum von 16 Wochen. Durch die Supplementation mit konjugierter Linolsäure konnte der BMI signifikant gesenkt werden. Dieser Effekt war nach 8 Wochen Intervention nachweisbar. Die Zufuhr an Distelöl bewirkte keine signifikante Veränderung bezüglich des BMI, jedoch konnte das Bauchfett reduziert werden und die Magermasse wurde erhöht. Auch die Nüchtern-glucose wurde signifikant gesenkt (Norris et al., 2009).

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Bei der Studie DIAPLANT handelt es sich um eine epidemiologische, randomisierte, prospektive Interventionsstudie, welche durch die Ethikkommission der Stadt Wien genehmigt wurde.

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte durch:

- drei Ärzte im Gesundheitszentrum Wien Süd
- eine Beilage in der Zeitschrift „Diabetes Info“ der Österreichischen Diabetikervereinigung (ÖDV)
- einen Vortrag beim „Wiener Diabetes Tag“

Interessierte Personen wurden zu einer Informationsveranstaltung eingeladen. Bei den Informationsveranstaltungen war immer ein Arzt anwesend. Den Teilnehmern wurde der Studienablauf, der Nutzen einer gesunden Ernährung, sowie die richtige Einnahme des Gemüse- und Pflanzenöls erklärt. Die Teilnehmer der Informationsveranstaltungen wurden über ihre Rechte und Pflichten aufgeklärt. Bei bestehendem Interesse an der Studie wurde eine Einverständniserklärung unterschrieben.

Tabelle 4: Verteilung der Probanden auf die Gruppen

Gruppe	Probanden (n)	Intervention	Information
NIDDM	40	29	11
IDDM	36	25	11
IFG	12	9	3
Gesund	11	5	6

NIDDM = non insulin dependent Diabetes mellitus; IDDM = independent Diabetes mellitus; IFG = impaired fasting glucose;

Die Probanden wurden der Interventions- oder Informationsgruppe randomisiert zugeteilt. Insgesamt bestand das Studienkollektiv aus 4 Gruppen:

- den NIDDM, den IDDM, den IFG und den Gesunden als Kontrollgruppe. Jede Gruppe wurde wiederum in eine Interventions- und Informationsgruppe unterteilt (Tabelle 4).

Ursprünglich waren nur die Gruppe der NIDDM, IDDM und der Gesunden geplant. Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass einige vermeintlich Gesunden einen erhöhten Nüchternblutzuckerwert aufwiesen. Somit wurde die Gruppe der IFG eingeführt.

3.2 Probanden

Unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien wurden insgesamt 111 Probanden in die Studie aufgenommen. Das Studienkollektiv setzte sich aus IDDM, NIDDM, IFG und Gesunden als Kontrolle zusammen. 99 Probanden beendeten die Studie erfolgreich. Mangelnde Compliance, Unverträglichkeiten des Pflanzenöls- oder des Gemüses und Krankenhausaufenthalte waren für den Ausfall von 12 Probanden (10,8%) verantwortlich.

Tabelle 5: Einteilung der Probanden in die Gruppen

Gruppe	Probanden (n)	männlich	weiblich	Alter in Jahren (MW ± SD)	BMI (kg/m ²)
IDDM	36	16	20	64,97 ± 7,68	33,83 ± 6,46
NIDDM	40	18	22	65,17 ± 7,38	33,31 ± 6,15
Gesund	11	1	10	61,00 ± 6,86	27,78 ± 4,14
IFG	12	6	6	63,83 ± 6,26	29,52 ± 3,42

3.2.1 Einschlusskriterien

- Männer und Frauen mit Typ-II-Diabetes
 - 40 - 80 Jahre
 - Behandlung mit oralen Antidiabetika oder Insulin
- seit mindestens 4 Wochen vor Studienbeginn:
 - gleichbleibende Medikation betreffend Glucose-, Fett- und Harnsäure-Stoffwechsel

- gleichbleibende Essgewohnheiten und körperliche Betätigung
- Konstantes Körpergewicht
- $\text{HbA1c} \leq 9,5\%$ (Schwankungen $< 10\%$)
- Gesamtcholesterin $< 300 \text{ mg/dl}$ (mit oder ohne Medikation)
- Serum-Triglyceride $< 500 \text{ mg/dl}$ (mit oder ohne Medikation)
- Kreatinin $< 2,5 \text{ mg/dl}$
- Medikation der Nicht-Insulin Gruppe: Metformin, DPP-IV-Hemmer, Sulfonylharnstoffe, GLP-1 Mimetika
- Medikation der Insulin Gruppe: Insulin oder Insulin und Metformin

3.2.2 Ausschlusskriterien

- Typ-I-Diabetiker
- Patienten jünger als 40 und älter als 80 Jahre
- Raucher
- Schwangere und stillende Frauen
- Teilnahme an anderen klinischen Studien
- Neue Medikation oder Änderung der Medikation bzgl. Glucose-, Fett- und Harnsäure-Stoffwechsel 4 Wochen vor Studienbeginn
- Einnahme von Fischölkapseln und anderen Fettsäuren
- Während oder vor Beginn der Studie Absichten zur Änderung
 - der Ernährungsgewohnheiten, der körperlichen Aktivität
 - des Körpergewichts
- Kardiovaskuläre Erkrankungen, definiert nach NYHA-Klassifikation $\geq \text{III}$
- Lebererkrankungen (Transaminase-Grenzwert $\geq 2,5$ -fach erhöht)
- Chronische Niereninsuffizienz (Dialysepatient oder Kreatinin $> 2,5 \text{ mg/dl}$)
- Organtransplantationen
- Gastrointestinale Malabsorption (Pankreasinsuffizienz, Steatorrhoe, Kurzdarmsyndrom)
- Systemische Steroide
- Drogen- und Alkoholmissbrauch ($\geq 80 \text{ g/d}$); Methadoneinnahme während der letzten 2 Jahre
- Krebs, HIV
- Glitazon-Einnahme

3.2.3 Zeitlicher Ablauf

Während der 8-wöchigen Intervention nahm jeder Proband täglich 300 g Gemüse und 25 g Pflanzenöl ein. Vor Beginn der Interventionsphase (T0) wurde den Probanden venöses Blut abgenommen und anthropometrische Messungen wurden durchgeführt. Weitere Blutabnahmen und anthropometrische Messungen erfolgten 4 Wochen (T1) und 8 Wochen (T2) nach Beginn der Intervention. Daraufhin folgten weitere 8-Wochen ohne aktive Intervention (T3) (Abbildung 7).

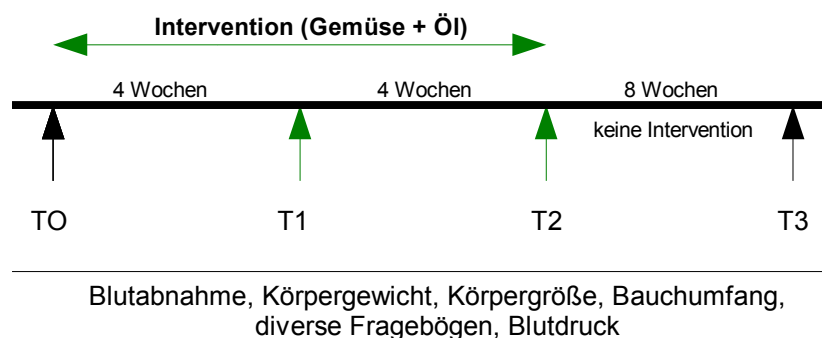


Abbildung 7: Zeitschema

T0 und T3: Blutabnahme vor bzw. nach Intervention

T1 und T2: Blutabnahme nach 4 bzw. 8 Wochen Intervention

Zusätzlich zu jeder Blutabnahme wurde ein 24h-Ernährungsprotokoll, ein QLQ (Quality of Life Questionnaire) und ein FFQ (Food Frequency Questionnaire) von allen Studienteilnehmern ausgefüllt. Insulinabhängige Probanden (IDDM) führten ein Insulinprotokoll, insulinunabhängige (NIDDM) und IDDM Diabetiker ein Blutzuckerprofil. Alle Probanden der Interventionsgruppe führten ein Ernährungstagebuch.

3.2.4 Ernährungsintervention

Wie bereits unter Punkt 3.2.3 beschrieben nahm jeder Proband in der Interventionsgruppe täglich 300 g Gemüse und 25 g Pflanzenöl zu sich. Die verschiedenen Gemüseprodukte und die genaue FS-Zusammensetzung des

Pflanzenöls sind in den unten stehenden Tabellen (Tabelle 6 und Tabelle 7) ersichtlich.

Tabelle 6: Gemüseprodukte von Iglo

Ernährungsintervention-Produkte	
Blattspinat Zwetschgerl	Buntes Gemüse Trio
Brokkoli	Suppengemüse
Junge Erbsen	Zarte Mischung
Junge Fisolen	Junges Sommergemüse
Kochsalat mit Erbsen	Cremespinat mit Mini-Rösti
Kohlsprossen	Röstgemüse Korsika
Spinat passiert	Karfiol Brokkoli Duo
Zarte Sojabohnen	Röstgemüse Gärtnerin

Tabelle 7: FS- Zusammensetzung des Pflanzenöls

FS-Gesamtgehalt (%)	Mittelwert ± SD
c16:0	7,28 ± 0,09
c18:0	2,06 ± 0,07
c18:1n9c	16,40 ± 0,99
c18:1n7c	0,950 ± 03
c18:2n6c	61,76 ± 1,00
c18:3n3	11,49 ± 0,43
Tocopherolgehalt (mg/100 g Öl)	Mittelwert ± SD
γ-Tocopherol	32,98 ± 1,82
α-Tocopherol	2,67 ± 0,14

3.3 Blutaufarbeitung

Den nüchternen Probanden wurde venöses Blut in Heparin-, EDTA- und in Serumzentrifugenröhrchen abgenommen und anschließend bei 3000 U/min zehn Minuten lang zentrifugiert. Danach wurde das Plasma abgenommen und in Cups aliquotiert, mit Stickstoff begast und bis zur weiteren Analyse bei - 80°C gelagert.

Für die Folsäurebestimmung wurden die Erythrozyten in den Heparin-Zentrifugenröhrchen, nach Plasmaabnahme, drei Mal mit einem isotonischen Phosphatpuffer gewaschen. Auch diese wurden in Cups aliquotiert und mit Stickstoff begast und bis zur weiteren Verwendung bei - 80°C gelagert.

3.3.1 Herstellung des isotonischen Phosphatpuffers

Tabelle 8: Chemikalien für die Herstellung des isotonischen Phosphatpuffers

Chemikalien	Firma
Natrium-EDTA	Riedel-de Haën
Natriumchlorid	Riedel-de Haën
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka

Herstellung des Puffers:

7,27 g NaCl, 1,42 g Dinatriumhydrogenphosphat und 0,19 g Natrium-EDTA werden in Aqua dest. gelöst. Mit Salzsäure (HCl, 1 N) wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, danach mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

3.4 Bestimmung von Homocystein im Plasma

3.4.1 Prinzip der Methode

HCY wird mit Tri-n-Butylphosphin (TBP) reduziert und aus dem Protein freigesetzt. Nach der Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure wird zentrifugiert, mit 7-Fluorobenzofurazane-4-sulfonic acid Amonium salt (SBD-F) derivatisiert und HCY danach mittels High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) mit Fluoreszenz Detektor bestimmt (Vester and Rasmussen, 1991).

3.4.2 Reagenzien

Tabelle 9: Chemikalien für die Bestimmung von Homocystein im Plasma

Reagenzien	Firma
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haën
Acetonitril p.a	Merck
Methanol p.a	Merck
ortho-Phosphorsäure 85 %	Riedel-de Haën
Trichloressigsäure	Riedel-de Haën
Etylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz-2-hydrat	Riedel-de Haën
Natriumhydroxidplättchen	Sigma-Aldrich
Natriumtetraborat-Decahydrat	Riedel-de Haën
Tri-n-Butylphosphin	Sigma-Aldrich
N,N-Dimethylformamid	Merck
7-Fluorobenzofurazane-4-sulfonic acid Amonium salt	Fluka
DL-Homocystein	Sigma-Aldrich
Clin Chek (Plasma Control)	Receipe
Aqua dest	

3.4.3 Herstellung der Lösungen:

- Kaliumdihydrogenphosphatpuffer (0,1 mol/l), enthaltend 4% Acetonitril:
13,609 g KH_2PO_4 in Aqua dest. lösen, 40 ml Acetonitril zugeben, auf pH-Wert von 1,54 mit ortho-Phosphorsäure einstellen und auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen.
- TCA (10 %), enthaltend 1 mmol/l Na_2EDTA :
10 g TCA in Aqua dest. lösen, 37,2 mg Na_2EDTA zugeben und auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen
- Natriumhydroxid-Lösung (1,55 mol/l):
6,2 g NaOH in Aqua dest. lösen und auf 100 ml auffüllen
- Natriumhydroxid-Lösung (1 n):
3,99 g Natriumhydroxidplättchen in Aqua dest. lösen und auf 100 ml auffüllen
- Boratpuffer (0,1 mol/l), enthaltend 2 mmol/l Na_2EDTA :
38,137 g Natriumtetraborat-Decahydrat in Aqua dest. lösen, 744 mg Na_2EDTA zugeben, mit 1n NaOH auf einen pH-Wert von 9,5 einstellen
- Boratpuffer (0,125 mol/l), enthaltend 4 mmol/l Na_2EDTA :
23,84 g Natriumtetraborat-Decahydrat in Aqua dest. lösen, 745 mg Na_2EDTA zugeben, mit 1n NaOH auf einen pH-Wert von 9,5 einstellen
- Tri-n-Butylphosphin (10%) in Dimethylformamid:
2,5 ml TBP mit 25 ml DMF mischen
- SBD-F-Lösung:
1 mg 7-Fluorobenzofurazane-4-sulfonic acid Amonium salt in 1 ml 0,125 mol/l Boratpuffer lösen

3.4.4 Geräte und Gegenstände

- Glaseprouvetten
- Vortex
- Wasserbad (60°C)
- Laborzentrifuge
- pH-Wert Messgerät
- LaChrom Merck Hitachi HPLC
- Pumpe L-7100
- Fluoreszenzdetektor F-1050
- Interface D-7000
- Analytische Säule LiChrospher 60 RP-Select B, 5µm, 125 * 4 mm (Merck)
- Hamilton-Spritze

3.4.4.1 Geräteeinstellungen

- Injektionsvolumen: 100 µl (5-faches Schleifenvolumen)
- Flow: 1,5 ml/min
- Emissionswellenlänge: 515 nm
- Excitationswellenlänge: 385 nm
- Mobile Phase: Kaliumdihydrogenphosphatpuffer, mit 4% Acetonitril

3.4.5 Durchführung der Bestimmung von Homocystein im Plasma mittels HPLC

3.4.5.1 Herstellen der Standardgerade

Jeden Analysetag werden für die Standardgerade folgende Verdünnungen frisch hergestellt:

Standardlösungen:

Stammlösung 1: 54,1 mg HCY in 0,1 mol/l Boratpuffer lösen und auf 100 ml mit dem gleichen Puffer auffüllen.

Stammlösung 2: 10 ml von der Stammlösung 1 entnehmen und auf 100 ml mit 0,1 mol/l Boratpuffer auffüllen.

Aus der Stammlösung 2 werden fünf verschiedene Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (4, 10, 15, 20, 40 µmol/l) hergestellt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Pipettierschema für die Herstellung der Standardlösungen

Reagenzien (ml)	Standard 1 (40 µmol/l)	Standard 2 (20 µmol/l)	Standard 3 (15 µmol/l)	Standard 4 (10 µmol/l)	Standard 5 (4 µmol/l)
Stamm-lösung 2	100 µl	50 µl	37,5 µl	25 µl	10 µl
Aqua dest.	900 µl	950 µl	962,5 µl	975 µl	990 µl

3.4.5.2 Probenaufarbeitung

150 µl Heparin-Plasma werden mit 15 µl TBP-Lösung (10%-ig) versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. Die Thiole werden aus den Proteinen und Disulfidbindungen freigesetzt. Nach dem Ausfällen der Proteine durch die Zugabe von 150 µl TCA (enthaltend 1 mmol/l Na₂EDTA, 10%-ig), werden die Proben 10 min bei 3500 U/min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation werden 50 µl vom klaren Überstand abgenommen und mit einer Lösung aus 125 µl Boratpuffer (0,125 mol/l, pH 9,5, 4 mmol/l Na₂EDTA), 50 µl SBD-F-Lösung und 10 µl NaOH (1,55 mol/l) versetzt. Danach stellt man die Proben für 60 min bei einer Temperatur von 60°C ins Wasserbad. Die Aufarbeitung der Standard-, der Referenz-, und Kontrollproben erfolgt analog zu den Probandenproben.

3.4.5.3 Messung der Proben

Nach der ein-stündigen Inkubation im Wasserbad werden circa 100 µl (4-5-faches Schleifenvolumen) des Extrakts mit einer Hamilton-Spritze auf die Säule aufgetragen.

3.4.5.4 Auswertung

Um die HCY-Konzentration in µmol/l im Plasma zu erhalten, benötigt man eine Standardgerade mit bekannten Konzentrationen ($r^2 = 0,997$). Die Peakfläche der Proben wurde in die Geradengleichung der Standardgerade eingesetzt, um die Konzentrationen der Probandenproben zu erhalten.

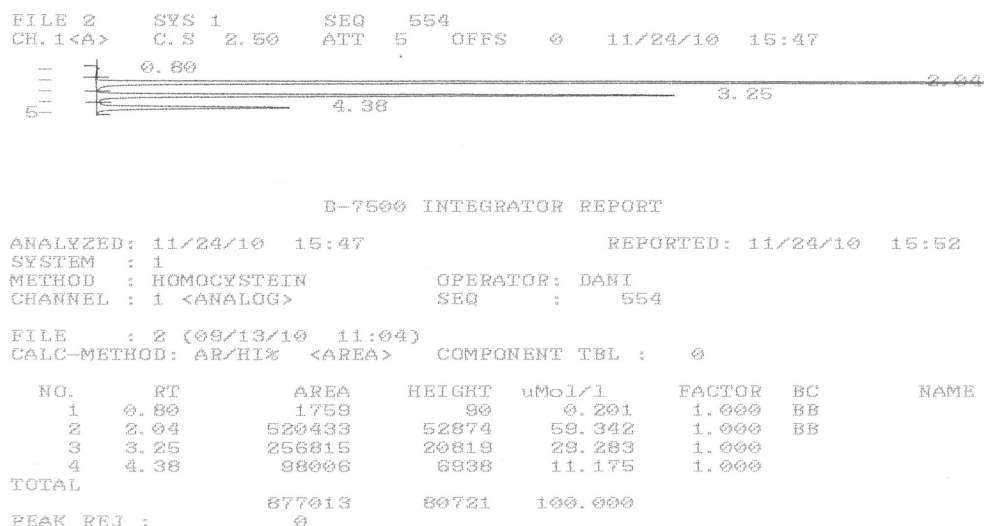


Abbildung 8: Beispielchromatogramm einer Patientenprobe

3.4.5.5 Qualitätskontrolle

Der Intra-VK der Methode betrug 5,2%. Zur Überprüfung der Messgenauigkeit wurde nach jeder vierten Patientenprobe eine Referenzprobe (Clin Chek) sowie eine Kontrollprobe (eigenes Plasma) analysiert. Der Inter-VK aus den Referenzproben und Kontrollproben betrug 6,4% bzw. 5,8%.

3.5 Bestimmung von Folsäure in Erythrozyten mittels Radioimmunoassay

3.5.1 Prinzip der Methode

Bei der verwendeten Methode handelt es sich um ein kompetitives Proteinbindungsassay. Das Bindungsprotein soll dabei die gleiche Affinität für den Standard als auch für den Analyten in der Patientenprobe haben. Die nicht-markierte Folsäure konkurriert mit dem entsprechenden Analogon um die begrenzte Anzahl an freien Bindungsstellen an dem spezifischen Bindungsprotein. Somit wird die Menge an gebundenen radioaktiven Folat reduziert. Die Radioaktivität wird am Ende im Präzipitat gegen die bekannten Konzentrationen der Standardgerade gemessen und daraus können die Konzentrationen der unbekannten Patientenproben bestimmt werden (MP-Biomedicals).

3.5.2 Geräte und Gegenstände

- Gamma-Counter: Berthold LB 2111
- LBIS-Software
- Plastikprouvetten
- Vortex
- Parafilm

3.5.3 Reagenzien

Zur Bestimmung der Folsäure-Konzentration in Erythrozyten wurde der Testkit von MP Biomedicals verwendet. Bestandteile dieses Testkits sind:

- SimulTRAC-SNB Dithiothreitol-Lösung (DTT):
enthält Dithiothreitol in Phosphatpuffer mit Stabilisator
- SimulTRAC-SNB Vitamin B₁₂/Folsäure-Tracer (¹²⁵I TRACER):
enthält < 1,5 µCi (55,5 kBq) [⁵⁷Co] Vitamin B₁₂ und < 3 µCi (111 kBq) [¹²⁵I] Folsäure in Boratpuffer mit humanen Serumalbumin, Dextran, Kaliumcyanid, Bindungsblocker (endogen), Farb- und Konservierungsstoffe

- SimulTRAC-SNB-Bindungsprotein (BINDER):
enthält gereinigtes Folsäure Bindungsprotein aus Kuhmilch und gereinigten Schweine-Intrinsic-Faktor (gebunden an festen Träger in Boratpuffer mit Natriumchlorid), Farb- und Konservierungsstoffe
- SimulTRAC-SNB Null-Reagenz (BLANK): enthält einen festen Träger ohne Bindungsprotein, in Boratpuffer mit Natriumchlorid, Farb- und Konservierungsstoffe
- SimulTRAC-SNB Vitamin B₁₂/Folsäure-Standards A-F:
enthält Vitamin B₁₂ (Cyano-Cobalamin) und Folsäure (PGS) in Boratpuffer mit humanem Serumalbumin, Natriumchlorid, Stabilisator- und Konservierungsstoffe

Zusätzlich zu diesem Testkit wird noch L-Ascorbinsäure und Aqua dest benötigt.

3.5.4 Reagenzienvorbereitung

Der Inhalt eines Fläschchens DDT wird zu einer Flasche Tracer gegeben und gut gemischt.

3.5.5 Probenvorbereitung

100 µl Erythrozytensuspension werden mit 2 ml Ascorbinsäurelösung (0,2%) gut vermischt (1:21 Verdünnung) und für 60-90 min im Dunklen stehen gelassen.

3.5.6 Durchführung der Bestimmung

Die 16 Standards sowie die Patientenproben werden laut Schema (Tabelle 11) pipettiert. Nach Zugabe von 200 µl Tracer wird für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den Röhrchen 3 bis 16 und zu allen Patientenproben werden 100 µl Extraktionsreagenz zugefügt. Anschließend wird für weitere 10 min bei

Raumtemperatur inkubiert. 1000 µl Nullreagenz wird zu den Röhrchen 3 und 4 gegeben. Zu den Röhrchen 5 bis 16, sowie zu allen Patientenproben werden 1000 µl Binder zugefügt. Danach werden die Ständer mit Parafilm abgedeckt und für 60 min bei Raumtemperatur an einen dunklen Ort gestellt. Die Röhrchen 3-16 und alle Patientenproben werden bei mindestens 1000*g für 10 min zentrifugiert.

Tabelle 11: Folsäurebestimmung-Pipettierschema (modifiziert nach MP Biomedicals)

Röhrchen	Standard oder Probe (µl)	Tracer Arbeits-Lösung (µl)	Inkubieren	Extraktions-reagenz (µl)	Inkubieren	Null-reagenz (µl)	Binder (µl)	Inkubieren	Zentri-fugieren
1,2	-----	200	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3,4	200 A	200	Alle Röhrchen bei Raumtemperatur (18-25°C) 15 min	100	Alle Röhrchen bei Raumtemperatur (18-25°C) 10 min	1000		Alle Röhrchen bei Raumtemperatur (18-25°C) 60 min	Alle Röhrchen außer 1+2 bei 1000 * g 10 min
5,6	200 A	200		100			1000		
7,8	200 B	200		100			1000		
9,10	200 C	200		100			1000		
11,12	200 D	200		100			1000		
13,14	200 E	200		100			1000		
15,16	200 F	200		100			1000		
Patienten-proben	200	200		100			1000		

Nach dem Zentrifugieren werden die Überstände dekantiert und die Radioaktivität wird im Präzipitat gemessen.

3.5.7 Auswertung

Die Radioaktivität wird im Präzipitat gegen die bekannten Konzentrationen der Standardgerade gemessen und daraus können die unbekannten Konzentrationen der Probanden ermittelt werden.

3.5.8 Berechnung der Ergebnisse

- Mittelwert der in Röhrchen 3 und 4 gefunden Impulse wird gebildet (= Unspezifische Bindung)
- USB-Wert wird von den Impulsen aller anderen Röhrchen abgezogen um damit die korrigierten Werte zu erhalten.

- Mittelwert der korrigierten Impulswerte von Röhrchen 1 und 2 wird bestimmt (=korrigierter Gesamtimpulswert).
- Mittelwert der korrigierten Impulswerte der Röhrchen 5 und 6 wird durch die korrigierte Gesamtimpulszahl dividiert (= Bindung in %).
- Korrigierter Impulswert für jedes Röhrchen wird durch die korrigierten Mittelwerte der Röhrchen 5 und 6 dividiert, um den Prozentanteil der Bindung (% B/B₀) zu erhalten.
- Folsäurekonzentration wird durch Interpolation aus der Standardkurve der prozentualen Bindung gegen pg/ml Folsäure bestimmt.
- **Qualitätskontrolle**
Der Intra-VK der Methode betrug 14,2%. Zur Überprüfung der Messgenauigkeit wurden an jedem Analysetag Kontrollproben analysiert, aus welchen der Inter-VK berechnet wurde. Dieser betrug 15,8%.

3.6 Bestimmung der Erythrozytenindizes, Plasma-Folsäure und Plasma-Vitamin B₁₂

Die Bestimmung der in Tabelle 12 aufgelisteten Parametern erfolgte an allen Blutabnahmetermen im Zentrallabor des Gesundheitszentrums Wien Süd. Dabei wurden folgende Geräte verwendet:

Tabelle 12: Bestimmung der Erythrozytenindizes, Eisen, Ferritin, Hämatokrit, Hämoglobin, Erythrozytenzahl, Plasma-Folsäure und Plasma-Vitamin B₁₂,

Parameter	Gerät
Folsäure (Plasma)	Immulite, Fa. Siemens
Vitamin B ₁₂ (Plasma)	Immulite, Fa. Siemens
Eisen (Serum)	ACS-Centaur, Firma Siemens
Ferritin (Serum)	ACS-Centaur, Firma Siemens
Hämatokrit (EDTA-Vollblut)	RUBY, Fa. Abbott
Hämoglobin (EDTA-Vollblut)	RUBY, Fa. Abbott
Erythrozytenzahl (EDTA-Vollblut)	RUBY, Fa. Abbott
Erythrozytenindizes	Berechnung
MCV (mean corpuscular volume)	Hämatokrit/Erythrozytenzahl
MCH (mean corpuscular hemoglobin)	Hämoglobin/Erythrozytenzahl
MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration)	Hämoglobin/Hämatokrit =MCH/MCV

3.7 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit der Statistiksoftware SPSS 17.0 (für Windows) ausgewertet.

Alle Parameter wurden aufreißerbereinigt und danach mit dem Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung geprüft. T0 Vergleiche wurde bei vorhandener Normalverteilung mittels T-Test bei unabhängigen Stichproben ausgewertet. Waren die Daten nicht normal verteilt, erfolgte eine Auswertung mittels Mann Whitney Test.

Die einfaktorielle ANOVA wurde verwendet um die einzelnen Gesundheitszustände (IDDM, NIDDM, IFG, Gesund) zum Zeitpunkt T0 zu vergleichen. Bei nicht normal verteilten Daten erfolgte die Auswertung mittels Kruskal-Wallis H Test.

Um den Effekt der Intervention beurteilen zu können wurde eine Varianzanalyse mit Messwiederholung durchgeführt. Waren die Residuen nicht normal verteilt, wurden die Werte logarithmiert.

Zusätzlich wurden bivariate Korrelationen durchgeführt. Bei normalverteilten Daten erfolgte die Auswertung nach Pearson und bei nicht normalverteilten nach Spearman.

Das Signifikanzniveau lag bei:

- * $p < 0,05$ signifikant
- ** $p < 0,01$ hoch signifikant
- *** $p < 0,001$ höchst signifikant

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Veränderungen von Vitamin B₁₂

- **Unterschied in den Gesundheitsgruppen**

Die Vitamin B₁₂ Konzentrationen unterschieden sich zum Zeitpunkt T0 (Ausgangswert) zwischen der Gruppe der NIDDM und den Gesunden signifikant voneinander. Gesunde waren signifikant besser mit Vitamin B₁₂ versorgt als NIDDM [Gesund: 458 ± 159 pmol/l; NIDDM: 288 ± 131 pmol/l]. Innerhalb der **Kontroll- und Informationsgruppe** konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Ausgangskonzentration festgestellt werden [Informationsgruppe: Informationsgruppe: Mittelwert: 338 ± 150 pmol/l (Median: 49,2); Interventionsgruppe: Mittelwert: 326 ± 145 pmol/l (Median: 45,3)].

- **Geschlechtsspezifischer Unterschied**

Zwischen den Geschlechtern konnte zum Zeitpunkt T0 kein signifikanter Unterschied bezüglich der Vitamin B₁₂ Konzentration beobachtet werden [Männer: 320 ± 146 pmol/l; Frauen: 336 ± 147 pmol/l].

- **Zeitlicher Verlauf**

In der **Informationsgruppe** veränderte sich die Konzentration an Vitamin B₁₂ während der Studie nicht. Es zeigte sich, dass der Gesundheitszustand einen signifikanten Einfluss auf die Vitamin B₁₂ Konzentration nimmt.

Die Gruppe der IDDM zeigte zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 einen signifikant niedrigeren Status an Vitamin B₁₂ im Vergleich zu den gesunden Studienteilnehmern. [Gesund: T0: 473 ± 191 pmol/l; T1: 471 ± 146 pmol/l; T2: 459 ± 138 pmol/l; IDDM: T0: 254 ± 73,0 pmol/l; T1: 280 ± 69,6 pmol/l; T2: 250 ± 57,0 pmol/l]. Für die Gruppe der NIDDM gibt es hierfür eine Tendenz. Die Konzentration nach der 8-wöchigen Interventionspause (T3) unterschied sich nicht signifikant zu T0.

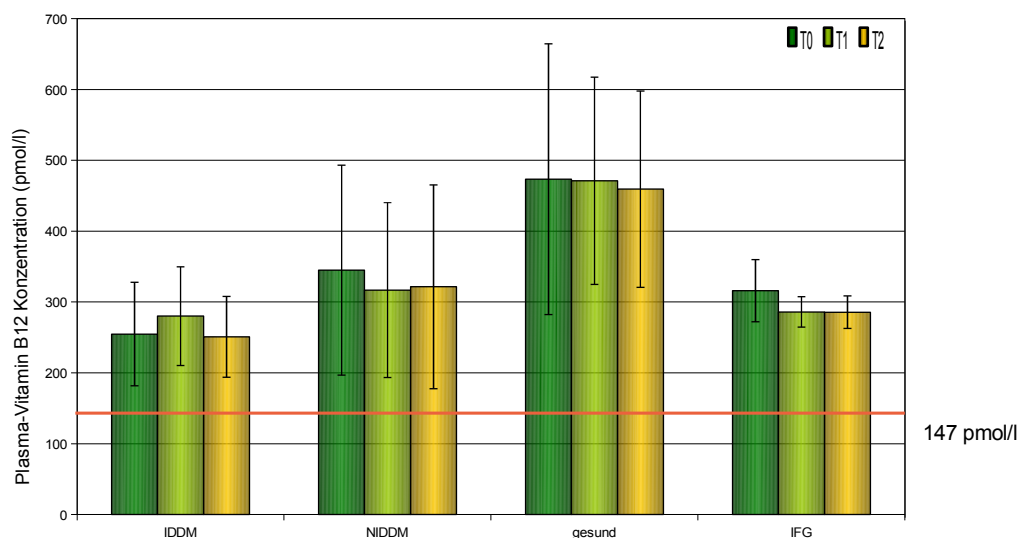


Abbildung 9: Informationsgruppe: Vitamin B₁₂ Konzentrationen (pmol/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention)

Referenzbereich: Labor-WGKK: 147-540 pmol/l

Gesamtkollektiv: Informationsgruppe: T0 > T2, $p < 0,05$;

Gesamt-Gesund > Gesamt-IDDM, $p < 0,05$

In der **Interventionsgruppe** konnte festgestellt werden, dass die Vitamin B₁₂ Konzentration während der 8-wöchigen Intervention signifikant zwischen T0 und T1 (- 6%) sowie zwischen T0 und T2 (- 9%) sinkt. Die Reduktion war in allen Gruppen, mit Ausnahme der NIDDM (IDDM, Gesund, und IFG) zu beobachten [Interventionsgruppe: T0: 324 ± 138 pmol/l; T1: 305 ± 130 pmol/l; T2: 294 ± 124 pmol/l].

Hinsichtlich der T3 Konzentration fand sich innerhalb der Interventionsgruppe eine tendenzielle Senkung der Vitamin B₁₂ Konzentration im Vergleich zu T0 [T0: 329 ± 147 pmol/l; T3: 314 ± 149 pmol/l].

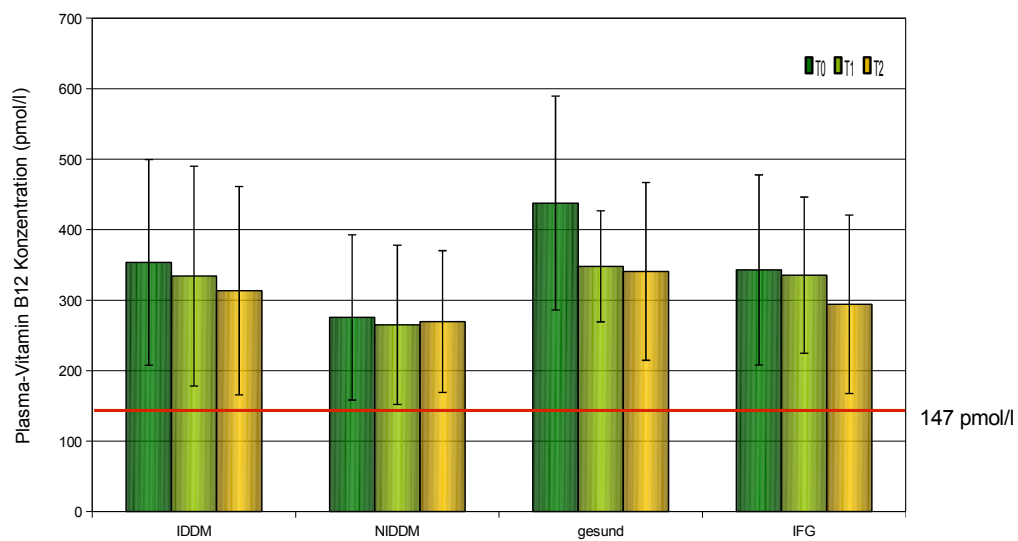


Abbildung 10: Interventionsgruppe: Vitamin B₁₂ Konzentrationen (pmol/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention)

Referenzbereich: Labor-WGKK: 147-540 pmol/l

Gesamtkollektiv: Interventionsgruppe: T0 > T2, $p < 0,001$; T1 > T2, $p < 0,05$

4.1.1 Diskussion zu Plasma-Vitamin B₁₂

Im Gesamtkollektiv betrug die durchschnittliche Vitamin B₁₂ Konzentration 330 ± 146 pmol/l. Der geringst gemessene Wert lag bei 129 pmol/l, der höchst gemessene bei 715 pmol/l. Eine unzureichende Versorgung wird ab einer Plasma-Konzentration von < 147 pmol/l angenommen (Labor-WGKK).

Zum Zeitpunkt T0 waren im Gesamtkollektiv demnach 96,7% aller Studienteilnehmer ausreichend mit Vitamin B₁₂ versorgt. Nur 3,3% wiesen einen Vitamin B₁₂ Mangel auf. 8,1% der Probanden nahmen regelmäßig oder zum Zeitpunkt T0 B-Vitamine in Form von Supplementen zu sich. Weiters supplementierten 16,1% der Studienteilnehmer mit Multivitaminpräparaten. Dies könnte ein möglicher Grund für die gute Versorgung mit Vitamin B₁₂ sein.

Auch ein hoher Fleischkonsum der Probanden könnte eine weitere Erklärung für die gute Versorgung mit Vitamin B₁₂ sein. Nach der 8-wöchigen Ernährungsintervention (T2) waren 7,4% der Probanden nicht ausreichend mit Cobalamin versorgt.

Ein möglicher Grund für die Zunahme der Unterversorgung (+ 4,1%) ist der „Verdrängungseffekt“ im Sinne eines geringeren Verzehrs an tierischen Lebensmitteln im Austausch zu pflanzlichen Lebensmitteln im Zuge der Ernährungsintervention (Boeing et al., 2007).

Diese Abnahme war in der Gruppe der Gesunden am stärksten ausgeprägt.

Probanden, welche Metformin zur Regulierung des Insulinspiegels einnahmen, wiesen einen tendenziell niedrigeren Status an Cobalamin auf. Dennoch befanden sich die Konzentrationen im Normal- bzw. im Referenzbereich.

Pflipsen et al. untersuchten in einer Querschnittsstudie die Häufigkeit eines Cobalaminmangels bei Typ-II-Diabetikern. 22% aller Studienteilnehmer wiesen einen Cobalaminmangel auf. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem Vitamin B₁₂ Mangel und einer Metformin-Therapie festgestellt werden (Pflipsen, Oh et al. 2009).

Die Arbeitsgruppe rund um de Jager untersuchte an 390 Typ-II-Diabetikern den Zusammenhang einer Metformingabe und einem Mangel an Vitamin B₁₂, Folsäure sowie einer Erhöhung der Homocysteinkonzentration. Nach einer Beobachtungszeit von 4,3 Jahren konnte ein verschlechterter Status an Vitamin B₁₂ (- 19%), eine Senkung der Folsäurekonzentration (- 5%) sowie eine Erhöhung des Homocysteinspiegels (+ 5%) verzeichnet werden. Nach einer Adjustierung für den Body Mass Index konnte kein Zusammenhang zwischen einem erniedrigten Folatstatus und Metformin gefunden werden. Die Autoren schlussfolgern, dass die Langzeiteinnahme von Metformin mit einem verschlechterten Status an Vitamin B₁₂ assoziiert ist und mit einer Erhöhung an Homocystein einhergeht. Die Autoren empfehlen deshalb eine regelmäßige Überprüfung des Vitamin B₁₂ Status bei Diabetikern (de Jager, Kooy et al. 2010).

Wie bereits in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben weisen ältere Menschen häufig einen schlechten Vitamin B₁₂ Status auf. Grund dafür können atrophische Gastritiden und ein dadurch bedingter Mangel an Intrinsic-Faktor sein. Häufigste Ursache eines Vitamin B₁₂-Mangels ist eine Malabsorption (Andres et al., 2003).

Fabian et al. untersuchten in einer Studie den Zusammenhang bezüglich Vitaminstatus und Medikamenteneinnahme an 102 Probanden im Alter von 70 bis

90 Jahren. Insgesamt wurde bei 33% der Probanden eine unzureichende Versorgung an Cobalamin festgestellt. Die Anzahl an eingenommenen Medikamenten hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Status an Vitamin B₁₂ (Fabian et al., 2011).

In der Gruppe der NIDDM fand sich zum Zeitpunkt T0 eine besonders starke signifikante negative Korrelation zwischen dem Status an Vitamin B₁₂ und dem Alter. Im Gesamtkollektiv, sowie in der Gruppe der IFG gibt es hierfür eine Tendenz (Tabelle 13).

Tabelle 13: Korrelationen zwischen Vitamin B₁₂ und Alter

Gruppe	p	R	n
Gesamtkollektiv	0,060	- 0,191	92
IDDM	0,793	0,048	33
NIDDM	0,012	- 0,405*	38
Gesund	0,283	0,356	11
IFG	0,139	- 0,503	10

Eine signifikant negative Korrelation zwischen Alter und Vitamin B₁₂ konnte in der Gruppe der Probanden welche Metformin einnehmen gefunden werden (Tabelle 14).

Tabelle 14: Korrelation: Alter-Vitamin B₁₂ und Metformin

		p	R
Metformin	ja	0,028	- 0,314*
Metformin	nein	0,453	- 0,117

4.2 Veränderungen der Plasma-Folsäure Konzentration

- **Unterschied in den Gesundheitsgruppen**

Innerhalb der einzelnen Gesundheitszustände (IDDM, NIDDM, IFG, Gesund) gab es zum Zeitpunkt T0 keinen signifikanten Unterschied [IDDM: $20,37 \pm 10,05$ nmol/l ; NIDDM: $18,52 \pm 7,96$ nmol/l; Gesund: $23,24 \pm 6,78$ nmol/l; IFG: $18,81 \pm 7,71$ nmol/l]. Auch innerhalb der **Informationsgruppe und der Interventionsgruppe** konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Folsäurekonzentration gefunden werden [Informationsgruppe: $18,06 \pm 8,37$ nmol/l; Interventionsgruppe: $20,54 \pm 8,71$ nmol/l]

- **Geschlechtsspezifischer Unterschied**

Zwischen Männern und Frauen konnte zum Zeitpunkt T0 kein signifikanter Unterschied bezüglich der Folsäurekonzentration im Plasma festgestellt werden [Männer: $19,57 \pm 7,79$ nmol/l; Frauen: $19,92 \pm 9,27$ nmol/l].

- **Zeitlicher Verlauf**

In der Informationsgruppe veränderte sich die Konzentration an Plasma-Folsäure während des Studienverlaufes nicht.

Es zeigte sich im Verlauf der Studie, dass der Gesundheitszustand einen signifikanten Einfluss auf die Plasma-Folsäure nimmt. NIDDM waren zu den Zeitpunkten T0, T1, und T2 signifikant schlechter mit Folsäure versorgt als die Gesunden. Auch bei den IFG zeigte sich eine tendenziell schlechtere Folsäureversorgung im Vergleich zu den Gesunden Studienteilnehmern.

T3 unterschied sich nicht signifikant von T0.

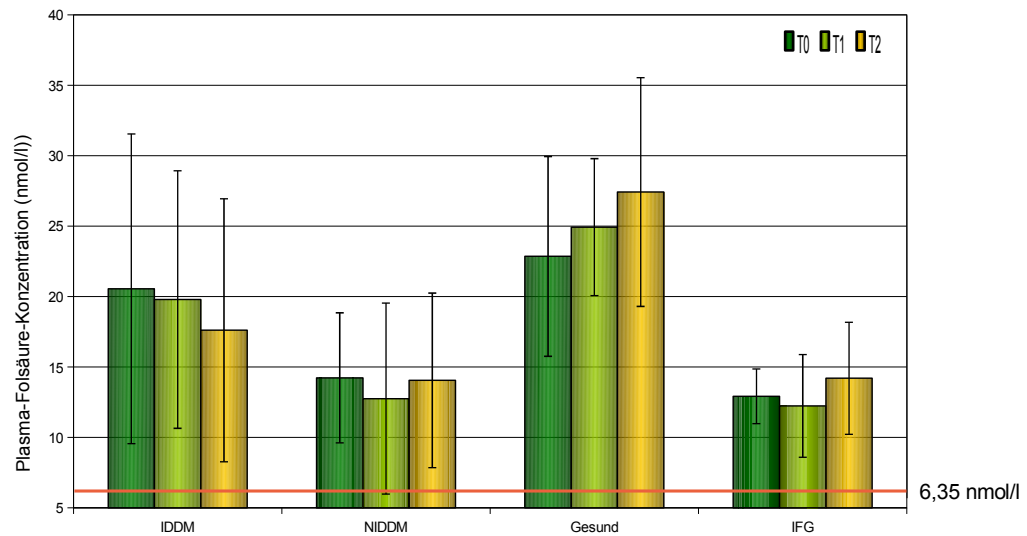


Abbildung 11: Informationsgruppe: Plasma-Folsäure Konzentrationen (nmol/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention)

Referenzbereich: Labor-WGKK: 6,35-30,59 nmol/l

Informationsgruppe: Gesamt-Gesund > Gesamt-NIDDM, $p < 0,05$

Nach 4 bzw. 8-wöchiger (T0-T1/T0-T2) Ernährungsintervention konnte in der **Interventionsgruppe** ein signifikanter Anstieg der Folsäurekonzentration im Plasma verzeichnet werden. Von T0 auf T1 und T2 stieg die Folsäurekonzentration signifikant um etwa 13,50% und 14,10%. Diese Veränderung war in allen Gruppen mit unterschiedlichem Gesundheitszustand zu beobachten [Interventionsgruppe: T0: $19,93 \pm 8,11$ nmol/l; T1: $22,62 \pm 8,97$ nmol/l; T2: $22,74 \pm 9,07$ nmol/l].

Hinsichtlich der T3 Konzentration fand sich innerhalb der Interventionsgruppe eine signifikante Erhöhung der Plasma-Folsäure-Konzentration im Vergleich zu T0 [T0: $20,64 \pm 8,75$ nmol/l; T3: $22,15 \pm 8,10$ nmol/l].

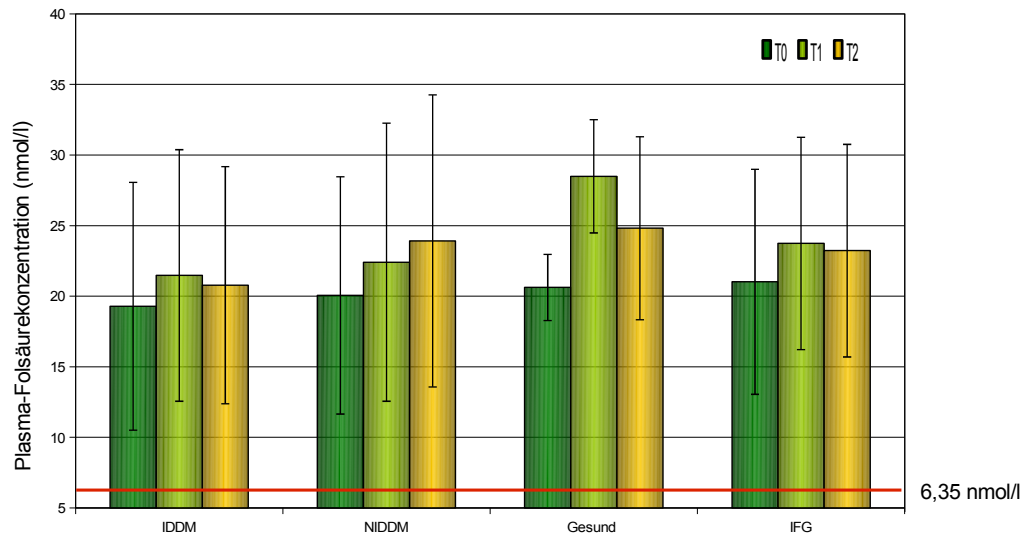


Abbildung 12: Interventionsgruppe: Plasma-Folsäure Konzentrationen (nmol/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention)

Referenzbereich: Labor-WGKK: 6,35-30,59 nmol/l

Gesamtkollektiv: Interventionsgruppe: $T0 < T1$, $p < 0,01$; $T0-T2$, $p < 0,05$

4.3 Folsäure in Erythrozyten

- **Unterschied in den Gesundheitsgruppen**

Zwischen den einzelnen Gesundheitszuständen (IDDM, NIDDM, IFG, Gesund) gab es zum Zeitpunkt T0 keinen signifikanten Unterschied [IDDM: 163 ± 124 nmol/l ; NIDDM: $144 \pm 79,0$ nmol/l ; Gesund: $140 \pm 61,4$ nmol/l; IFG: $132 \pm 68,7$ nmol/l]. Innerhalb der **Informations- und Interventionsgruppe** konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied bezüglich der Erythrozyten-Folsäure-Konzentration gefunden werden [Informationsgruppe: Mittelwert: 318 ± 174 nmol/l (Median: 40,4); Interventionsgruppe: Mittelwert: 347 ± 231 nmol/l (Median: 45,2)].

- **Geschlechtsspezifischer Unterschied**

Zum Zeitpunkt T0 unterschieden sich die beiden Geschlechter hinsichtlich der Erythrozyten-Folsäure-Konzentration nicht signifikant voneinander [Männer: 354 ± 275 nmol/l; Frauen: 324 ± 153 nmol/l].

- **Zeitlicher Verlauf**

In der **Informationsgruppe** konnten keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Erythrozyten-Folsäure-Konzentration gefunden werden.

Hingegen fand sich in der **Interventionsgruppe** nach 4-wöchiger Ernährungsintervention zwischen T0 und T1 eine signifikante Erhöhung der Erythrozyten-Folsäure-Konzentration. Zwischen T0 und T2 wurde eine tendenzielle Erhöhung festgestellt [T0: 347 ± 231 nmol/l; T1: 424 ± 293 nmol/l; T2: 409 ± 262 nmol/l].

Der Gesundheitszustand der Probanden hat keinen signifikanten Einfluss auf die Veränderung der Folsäure-Konzentration während der Studie.

Weder in der Informationsgruppe noch in der Interventionsgruppe unterschied sich T3 signifikant zu T0.

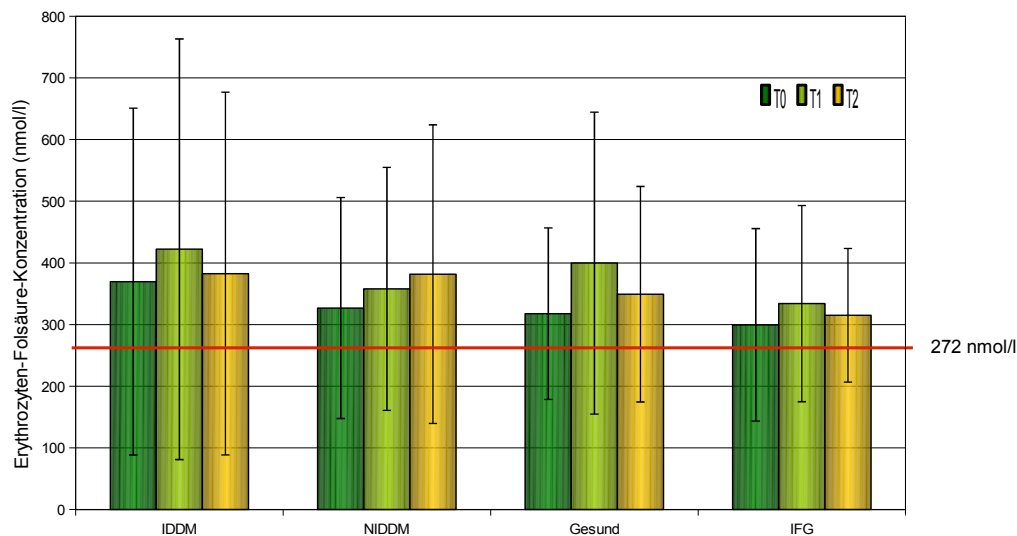


Abbildung 13: Interventionsgruppe: Erythrozyten-Folsäure Konzentrationen (nmol/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention)

Referenzwert: 272 nmol/l; SimulTrac-Broschüre (Anleitung zur Bestimmung von Folsäure aus Erythrozyten)

Gesamtkollektiv: Interventionsgruppe: $T0 < T1$, $p < 0,01$

4.3.1 Diskussion zu Folsäure (Plasma- und Erythrozyten)

Folsäurekonzentrationen können in Erythrozyten und im Plasma gemessen werden. Die Folsäurekonzentrationen in den Erythrozyten liegen um den Faktor 20 bis 30 über denen des Plasmas. Folsäurekonzentrationen im Plasma spiegeln die kurzfristige Versorgungslage wider, Erythrozytenwerte reflektieren hingegen die Langzeitversorgung. Die beiden Werte müssen daher unterschiedlich interpretiert werden (Bayer).

Zum Zeitpunkt T0 lag die durchschnittliche Plasma-Folsäurekonzentration bei $19,77 \pm 8,64$ nmol/l (Schwankungsbreite von 3,40 nmol/l bis 45,55 nmol/l). Die durchschnittliche Erythrozyten-Folsäure-Konzentration im Gesamtkollektiv betrug 337 ± 212 nmol/l (Schwankungsbreite von 91,8 nmol/l bis 1653 nmol/l).

Als Referenzbereich für Plasma-Folsäure wird von der WGKK eine Konzentration von 6,35-30,59 nmol/l angegeben. Eine Erythrozyten-Folsäure-Konzentration von < 272 nmol/l wird als unzureichend angesehen (MP-Biomedicals).

- **Plasma-Folsäurekonzentration**

Zum Zeitpunkt T0 wiesen nur 1,1% aller Probanden einen Mangel an Plasma-Folsäure auf. 98,9% waren laut Referenzbereich ausreichend mit Folsäure versorgt. Durch die 8-wöchige Ernährungsintervention konnte dieser Wert auf 100% gesteigert werden.

In der Interventionsgruppe wurde ein signifikanter Anstieg der Folsäurekonzentration zwischen T0 und T1, sowie zwischen T0 und T2 verzeichnet. Dies war zu erwarten, da als Interventionsgemüse besonders grünes bzw. folsäurereiches Gemüse verabreicht wurde.

- **Erythrozytenfolat**

Erythrozytenfolat spiegelt die Langzeitversorgung wider. Zum Zeitpunkt T0 konnte bei 41,1% der Probanden in der Interventionsgruppe eine nicht ausreichende Versorgung mit Folsäure beobachtet werden. Nach der 8-wöchigen Intervention wurde ein signifikanter Rückgang des Folsäuremangels bei 7,8% der Probanden festgestellt. Zum Zeitpunkt T2 waren somit noch 33,3% Studienteilnehmer mit Folsäure unterversorgt. Durch eine alleinige Ernährungsintervention war es möglich einen Rückgang des Mangels um knapp 10% zu bewirken.

Bei Folatverbindungen handelt es sich um wasserlösliche, lichtempfindliche und hitzelabile Verbindungen. Bei der Zubereitung der Lebensmittel muss mit einem Verlust der Monoglutamate von bis zu 70%, bei Polyglutamaten von bis zu 50% gerechnet werden. Der Mittelwert für die Verluste bei der Zubereitung wird von 50% auf 35% gesenkt, da insgesamt über 60% der gesamten Folatzufuhr aus Lebensmitteln stammt, die ohne weitere Zubereitung verzehrt werden (DACH, 2008).

In einer Ernährungsinterventionsstudie von Bermejo et al. versuchte man auf zwei unterschiedliche Arten den Folsäurestatus bei älteren Personen zu verbessern. 6 Monate lang wurden entweder 3 Portionen Gemüse pro Tag oder eine mit Folsäure angereicherte Margarine (200 µg/10 g) verzehrt. Signifikant höhere Folsäurewerte (Plasma und Erythrozyten) konnten unter der Diät mit der angereicherten Margarine verzeichnet werden. Der Anstieg an Folsäure unter der Gemüseinnahme war nur sehr gering (Bermejo et al., 2009).

In einer Studie von Aparicio et al. konnte hingegen ein höheres Erythrozytenfolat sowie ein höheres Plasmafolat nach einem Verzehr von 400 g Gemüse und Obst in einem Studienkollektiv von 180 Personen im höheren Lebensalter beobachtet werden (Aparicio et al., 2010).

In einer Studie von Cuskelly et al. konnte durch die 3-monatige Einnahme von folathaltigen natürlichen Lebensmitteln (400 µg/d) die Folsäurekonzentration in Erythrozyten nicht effektiv erhöht werden. Die Einnahme von Folsäuresupplementen (400 µg/d) und der Verzehr von Folsäure angereicherten Lebensmitteln (400 µg/d) führte hingegen nicht zu einer Erhöhung des Erythrozytenfolats (Cuskelly et al., 1996)

Broekmans et al. verglichen im Rahmen einer Interventionsstudie die Auswirkungen eines hohen bzw. niedrigen Obst- und Gemüseverzehrs auf den Status von ausgewählten Vitaminen. 47 Probanden wurden der Gruppe randomisiert zugeteilt. Die erste Gruppe erhielt täglich über einen Zeitraum von 4 Wochen 500 g, die zweite Gruppe 100 g Obst und Gemüse verabreicht. In der hoch dosierten Gruppe konnte eine signifikante Zunahme des Plasmafolats (+ 15%) sowie eine signifikante Abnahme an HCY (- 11%) beobachtet werden (Broekmans et al., 2000).

4.4 Veränderungen von Homocystein

- **Unterschied in den Gesundheitsgruppen**

Innerhalb der einzelnen Gesundheitszustände (IDDM, NIDDM, IFG, Gesund) gab es zum Zeitpunkt T0 keinen signifikanten Unterschied [IDDM: $12,28 \pm 2,74$ $\mu\text{mol/l}$; NIDDM: $12,84 \pm 3,02$ $\mu\text{mol/l}$; Gesund: $11,50 \pm 1,84$ $\mu\text{mol/l}$; IFG: $13,13 \pm 3,98$ $\mu\text{mol/l}$]. Innerhalb der **Informations- und Interventionsgruppe** konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die HCY-Konzentration im Plasma beobachtet werden [Informationsgruppe: $13,08 \pm 3,27$ $\mu\text{mol/l}$; Interventionsgruppe: $12,27 \pm 2,77$ $\mu\text{mol/l}$].

- **Geschlechtsspezifischer Unterschied**

Die HCY-Konzentrationen unterschieden sich zum Zeitpunkt T0 signifikant zwischen Männern und Frauen. Männer wiesen signifikant höhere Plasma-Homocysteinspiegel als Frauen auf (Abbildung 14) [Männer: $13,37 \pm 2,70$ $\mu\text{mol/l}$; Frauen: $11,92 \pm 2,98$ $\mu\text{mol/l}$].

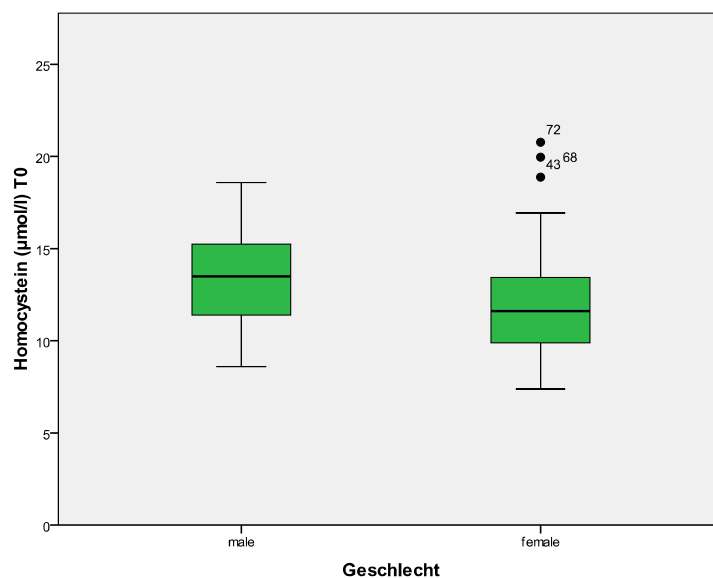


Abbildung 14: HCY-Konzentration zum Zeitpunkt T0 (aufgeteilt nach Geschlecht); Männer > Frauen, $p < 0,05$

• Zeitlicher Verlauf

Im Verlauf der Ernährungsintervention konnten keine signifikanten Veränderungen in der Informationsgruppe festgestellt werden.

Es zeigte sich im Verlauf der Intervention, dass der Gesundheitszustand einen signifikanten Einfluss auf die HCY-Konzentration nimmt. Die Gruppe der IFG zeigte zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 höhere HCY-Spiegel als die Gruppe der IDDM-, NIDDM und der Gesunden. Im Verlauf der Ernährungsintervention konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

In der **Interventionsgruppe** konnten keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Homocysteinkonzentration gefunden werden.

In beiden Gruppen unterschied sich T3 nicht signifikant zu T0.

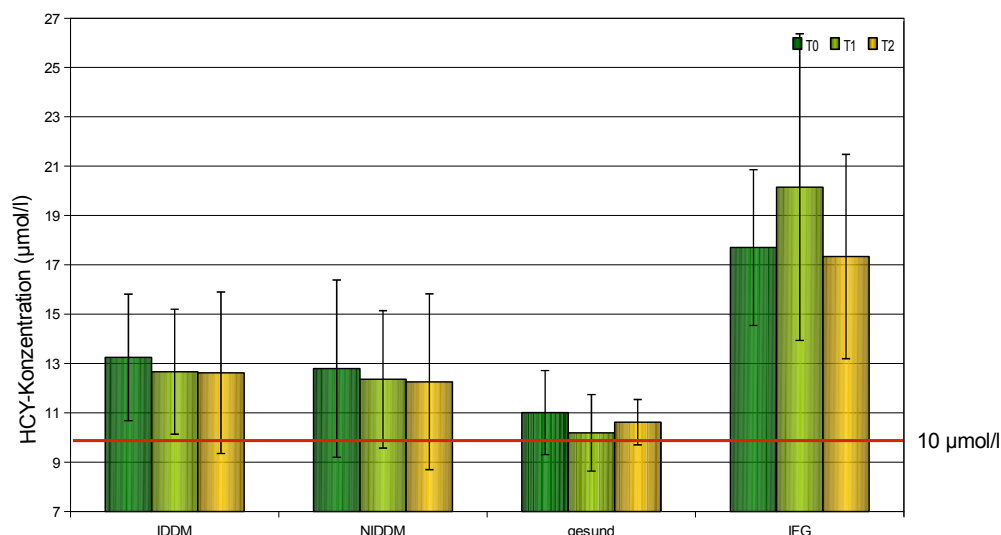


Abbildung 15: Informationsgruppe: HCY-Konzentrationen (µmol/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention)

Empfohlener Grenzwert (Hochrisikopatienten): < 10 µmol/l (Stanger 2003)

Informationsgruppe: Gesamt-IFG > Gesamt-IDDM, $p < 0,05$; Gesamt-IFG > Gesamt-NIDDM, $p < 0,05$; Gesamt-IFG > Gesamt-Gesund, $p < 0,01$

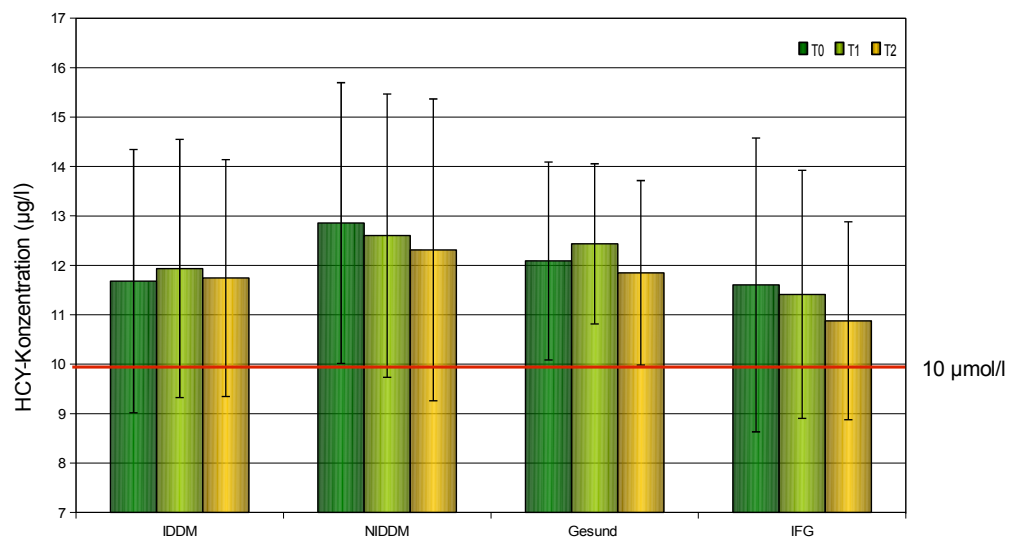


Abbildung 16: Interventionsgruppe: HCY-Konzentrationen (µmol/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention)

Empfohlener Grenzwert (Hochrisikopatienten): < 10 µmol/l (Stanger 2003)

4.4.1 Diskussion von Homocystein

Im Gesamtkollektiv betrug zum Zeitpunkt T0 die durchschnittliche HCY-Konzentration im Plasma $12,52 \pm 2,94$ µmol/l. Der niedrigst gemessene Wert lag bei 7,39 µmol/l, der höchste bei 20,77 µmol/l. Stanger et al. empfiehlt bei Personen mit manifesten Gefäßerkrankungen sowie bei Hochrisikopatienten eine Plasma-HCY-Konzentration von < 10 µmol/l (Stanger et al., 2003). Gegenwärtig liegt die akzeptierte Obergrenze bei 10-12 µmol/l.

Im Kollektiv der Studie DIAPLANT konnte weder in der Informations- noch in der Interventionsgruppe eine signifikante Senkung an HCY erzielt werden. Als möglicher Grund kann die gute Versorgungslage der Probanden mit Folsäure (Plasma) und Vitamin B₁₂ (Plasma) angesehen werden. Betrachtet man die T0-Konzentrationen der beiden Vitamine, so liegen die Mittelwerte des Gesamtkollektivs im Referenzbereich.

Zum Zeitpunkt T0 wiesen 98,1% der Probanden laut Referenzbereich einen ausreichenden Status an Folsäure (Plasma) auf. Folsäure wird in der Literatur, neben Vitamin B₁₂ und B₆ als wichtigster Determinant im HCY-Stoffwechsel angesehen (Kleine-Gunk, 2003).

HCY-Konzentrationen können durch den Verzehr von Folsäure angereicherten Lebensmitteln beeinflusst werden. In vielen Sekundärpräventionsstudien konnte durch die Supplementierung von B-Vitaminen eine HCY-Senkung bewirkt werden. Dabei wurde allerdings synthetische Folsäure, zum Teil in sehr hoher Konzentration, eingesetzt (Toole et al., 2004, Khandanpour et al., 2009, Ebbing et al., 2008).

In der Literatur sind nur wenige Ernährungsinterventionsstudien mit Gemüse in Bezug auf die Senkung des Plasma-HCYs zu finden. Diese wenigen Studien liefern zum Teil keine einheitlichen Ergebnisse.

In einer Studie von Broekmans et al. konnte durch die Zufuhr von 500 g Gemüse und Obst pro Tag über einen Zeitraum von 4 Wochen die HCY-Ausgangskonzentration um 11% gesenkt werden (Broekmans et al., 2000). Der Verzehr von 150 g Obst und Gemüse pro Tag ist laut einer Metaanalyse mit einem verminderten KHK-Mortalitätsrisiko (-16%) assoziiert (van't Veer et al., 2000).

In einer erst vor kurzem veröffentlichten Studie von Garcia-Alonso und Jorge Vidal konnte durch die Einnahme eines mit n-3-PUFAS angereicherten Tomatensafts (500 ml/d) über einen Zeitraum von 2 Wochen die HCY-Ausgangskonzentration von $10,86 \pm 0,61$ auf $8,42 \pm 0,42$ µg/l signifikant gesenkt werden. Folsäurewerte blieben unverändert. Als Grund für die Abnahme an HCY wird die enzymregulierende Aktivität der n-3-PUFAS im HCY-Stoffwechsel angegeben (Garcia-Alonso et al., 2011).

In einer weiteren Ernährungsinterventionsstudie wurden 118 Probanden über einen Zeitraum von 8 Wochen mit verschiedenen Diäten interveniert, welche in einer eigenen Versuchsküche zubereitet wurden: 1: Diät reich an Obst und Gemüse; 2: fettreduzierte Diät, ebenfalls reich an Obst und Gemüse; 3: Kontrolldiät: Diät mit wenig Obst und Gemüse. Eine signifikante Senkung der Plasma-HCY-Konzentration ($-0,34$ µmol/l) konnte in Gruppe 2 (Kombinationsdiät) verzeichnet werden (Appel et al., 2000).

Hingegen fanden Ubbink et al. keinen signifikanten Zusammenhang bezüglich einer folsäurereichen Ernährung und einer Reduktion an Plasma-HCY (Ubbink et al., 1993).

Im DIAPLANT-Kollektiv konnte eine signifikant positive Korrelation bezüglich

der HCY-Konzentration und dem Alter gefunden werden. Die Zunahme an HCY im Alter ist auch in anderen wissenschaftlichen Studien zu finden (Durand et al., 2001, Jacques et al., 2001).

Zum Zeitpunkt T0 wurde im Gesamtkollektiv und in der Gruppe der NIDDM eine signifikant positive Korrelation bezüglich HCY-Konzentration und Alter gefunden. Besonders stark ausgeprägt war diese Korrelation in der Gruppe der NIDDM, aber auch in der Gruppe der IDDM gibt es hierfür eine Tendenz.

Tabelle 15: Korrelation zwischen Alter und Homocystein

Gruppe	p	R	n
Gesamtkollektiv	0,021	0,232*	99
IDDM	0,156	0,241	36
NIDDM	0,016	0,378*	40
Gesund	0,499	- 0,217	12
IFG	0,919	0,039	11

Des weiteren wurde, um den Effekt der Intervention besser beurteilen zu können, eine Korrelation zwischen der „Veränderung der HCY-Konzentration“ (T1-T0) und der „Veränderung der Plasma-Folsäure-Konzentration“ (T1-T0) in der Interventionsgruppe durchgeführt. Dabei konnte in der Interventionsgruppe eine signifikant negative Korrelation festgestellt werden (Abbildung 17).

Im Gesamtkollektiv wurde eine signifikant negative Korrelation bezüglich der „Veränderung der HCY-Konzentration (T1-T0) und der „Veränderung der Vitamin B₁₂-Konzentration“ gefunden (Abbildung 18).

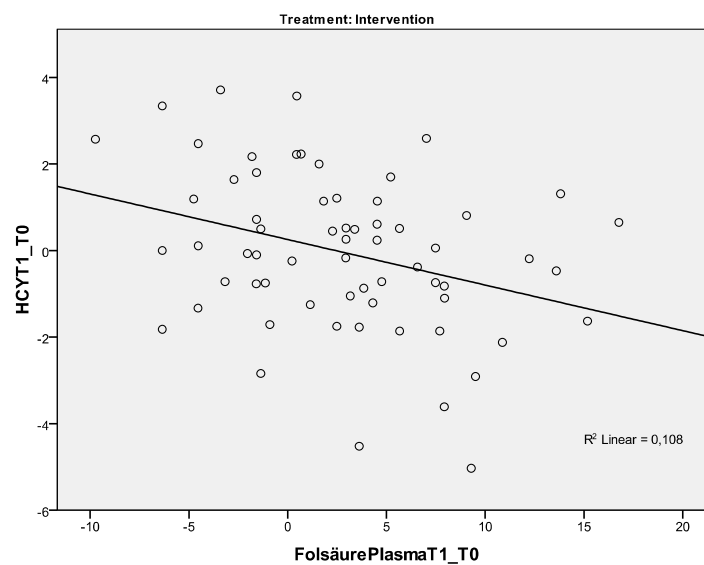


Abbildung 17: Interventionsgruppe: Korrelation nach Pearson zwischen Δ HCY und Δ Plasma-Folsäure: $R = -0,329$; $p = 0,008$

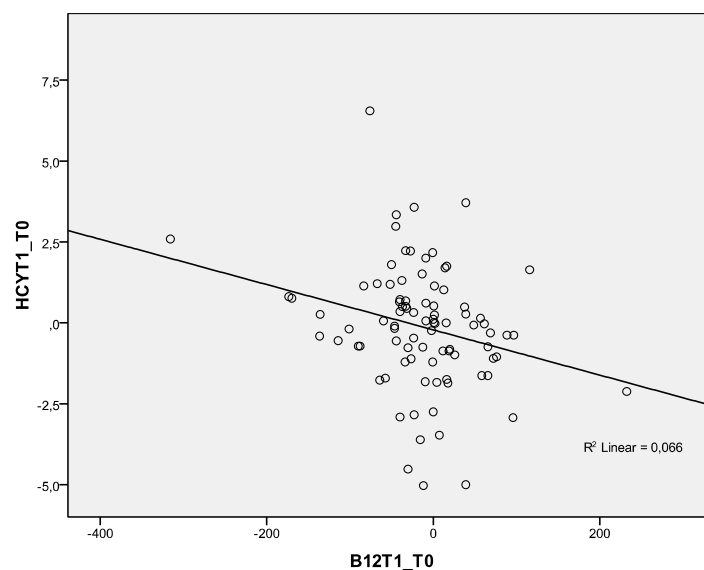


Abbildung 18: Gesamtkollektiv: Korrelation nach Pearson zwischen Δ HCY und Δ Vitamin B₁₂: $R = -0,258$; $p = 0,015$

4.5 Veränderungen von Eisen

• Unterschied in den Gesundheitsgruppen

Innerhalb der einzelnen Gesundheitszustände (IDDM, NIDDM, IFG, Gesund) gab es zum Zeitpunkt T0 keinen signifikanten Unterschied. Auch innerhalb der Behandlungsgruppen (Informationsgruppe und Interventionsgruppe) konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Eisenkonzentration gefunden werden [Informationsgruppe: $74,61 \pm 25,83 \mu\text{g/dl}$; Interventionsgruppe: $82,83 \pm 37,41 \mu\text{g/dl}$].

• Geschlechtsspezifischer Unterschied

Zum Zeitpunkt T0 konnte ein tendenzieller Unterschied bezüglich der Eisenkonzentration im Serum zwischen Männern und Frauen festgestellt werden [Männer: $87,22 \pm 30,44 \mu\text{g/dl}$; Frauen: $75,10 \pm 36,17 \mu\text{g/dl}$].

• Zeitlicher Verlauf

In der **Informationsgruppe** konnten keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Eisenkonzentration gefunden werden.

Zum Zeitpunkt T3 wurde eine tendenzielle Erhöhung der Eisenkonzentration im Vergleich zu T0 beobachtet [T0: $74,61 \pm 25,83 \mu\text{g/dl}$; T3: $78,77 \pm 32,15 \mu\text{g/dl}$].

In der **Interventionsgruppe** konnte während der Intervention eine signifikante Abnahme zwischen T0 und T2 (- 13%) sowie zwischen T1 und T2 (- 12%) beobachtet werden [T0: $82,63 \pm 37,41 \mu\text{g/dl}$; T1: $82,01 \pm 34,87 \mu\text{g/dl}$; T2: $72,00 \pm 28,45 \mu\text{g/dl}$].

Gesunde waren während der Intervention signifikant besser mit Eisen versorgt als die Gruppe der NIDDM und IDDM. Für die Gruppe der IFG konnte hierfür eine Tendenz gefunden werden [Gesund: T0: $130,40 \pm 67,53 \mu\text{g/dl}$; T1: $123,00 \pm 49,78 \mu\text{g/dl}$; T2: $82,20 \pm 16,33 \mu\text{g/dl}$; NIDDM: T0: $79,69 \pm 33,50 \mu\text{g/dl}$; T1: $74,79 \pm 26,71 \mu\text{g/dl}$; T2: $67,10 \pm 25,67 \mu\text{g/dl}$; IDDM: T0: $70,00 \pm 22,13 \mu\text{g/dl}$; T1: $76,52 \pm 32,52 \mu\text{g/dl}$; T2: $70,16 \pm 28,86 \mu\text{g/dl}$].

Zum Zeitpunkt T3 unterschied sich die Konzentration nicht signifikant zu T0.

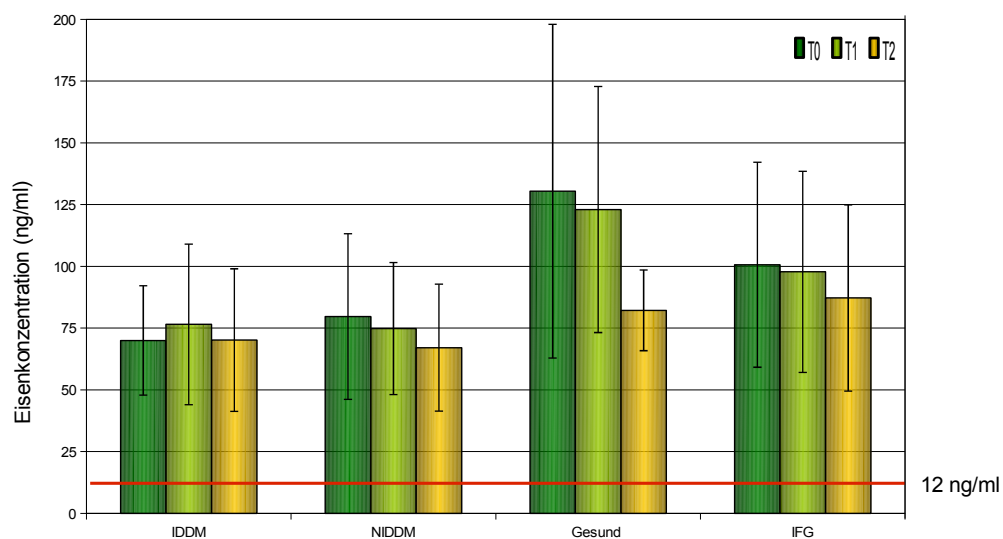


Abbildung 19: Interventionsgruppe: Eisenkonzentration (ng/ml) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention)

Referenzbereich: Labor-WGKK: Eisenmangel: < 12 ng/ml; Eisenüberladung: > 400 ng/ml

Gesamtkollektiv: Interventionsgruppe: T0 > T2, $p < 0,01$; T1 > T2, $p < 0,01$;

Gesamt-Gesund > Gesamt-IDDM, $p < 0,05$; Gesamt-Gesund > Gesamt-NIDDM, $p < 0,05$

4.6 Veränderungen von Ferritin

• Unterschied in den Gesundheitsgruppen

Zum Zeitpunkt T0 gab es innerhalb der einzelnen Gesundheitszustände keinen signifikanten Unterschied [IDDM: $84,5 \pm 75,8$ ng/ml; NIDDM: 112 ± 142 ng/ml; Gesund: $109 \pm 65,3$ ng/ml; IFG: 159 ± 133 ng/ml]. Auch innerhalb der Behandlungsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden [Informationsgruppe: Mittelwert: 135 ± 163 ng/ml (Median: 55,5); Interventionsgruppe: Mittelwert: $94,9 \pm 81,5$ ng/ml (Median: 47,5)].

• Geschlechtsspezifischer Unterschied

Zwischen Männern und Frauen konnte zum Zeitpunkt T0 ein signifikanter Unterschied beobachtet werden [Männer: Mittelwert: $129 \pm 99,2$ ng/ml (Median: 58,8; Frauen: Mittelwert: $92,4 \pm 122$ ng/ml (Median: 43,8)].

• Zeitlicher Verlauf

In der **Informationsgruppe** konnte im Verlauf der Studie eine signifikante Abnahme an Ferritin zwischen T0 und T1 (- 11,5%) beobachtet werden (Abbildung 20). In der **Interventionsgruppe** konnte ebenfalls eine signifikante Abnahme zwischen T0 und T2 (- 14,4%) sowie zwischen T1 und T2 (- 8,3%) festgestellt werden. Zwischen den einzelnen Gesundheitszuständen konnte für die Gruppe der IFG eine tendenziell höhere Ferritinkonzentration zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 als in der Gruppe der NIDDM und der IDDM beobachtet werden [IFG: T0: $152,70 \pm 143,24$ ng/ml; T1: $160,62 \pm 147,96$ ng/ml; T2: $134,06 \pm 123,07$ ng/ml ; NIDDM: T0: $86,10 \pm 58,96$ ng/ml; T1: $74,55 \pm 54,73$ ng/ml; T2: $71,47 \pm 60,05$ ng/ml; IDDM: T0: $76,48 \pm 74,66$ ng/ml; T1: $73,93 \pm 69,75$ ng/ml; T2: $69,56 \pm 66,28$ ng/ml].

In beiden Gruppen unterschied sich T3 signifikant zu T0 [Informationsgruppe: T0: $135,98 \pm 163,71$ ng/ml; T3: $105,28 \pm 123,81$ ng/ml; Interventionsgruppe: T0: $95,28 \pm 82,02$ ng/ml; T3: $80,13 \pm 81,07$ ng/ml].

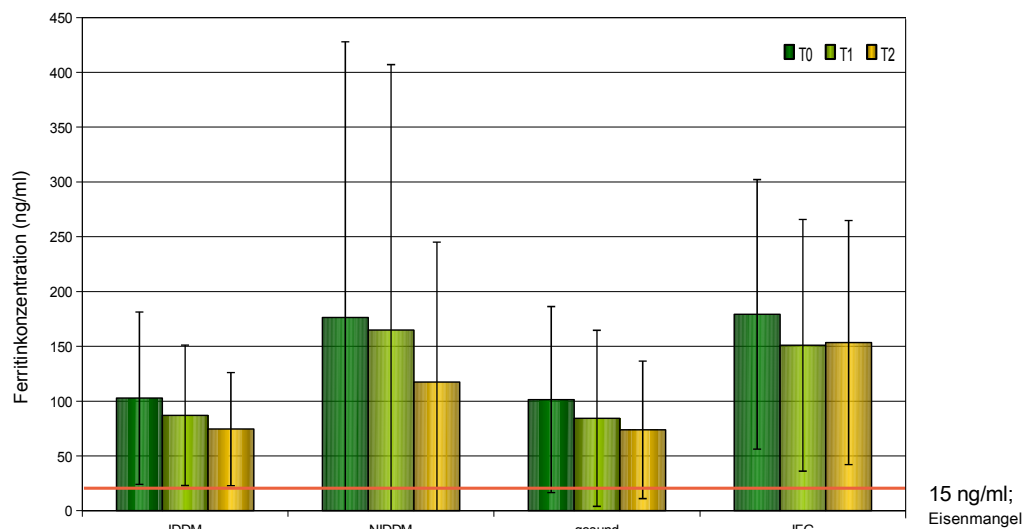


Abbildung 20: Informationsgruppe: Ferritinkonzentration (ng/ml) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention);

Referenzbereich: Männer: 35-440 ng/ml; Frauen: 20-300 ng/ml (Hallbach, 2006)

Gesamtkollektiv: Informationsgruppe: $T0 > T1$, $p < 0,001$

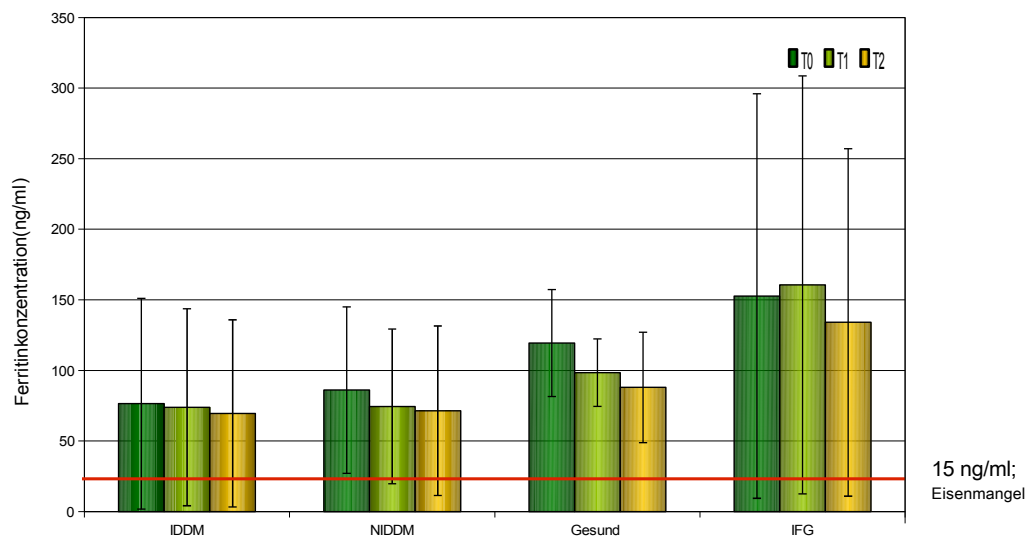


Abbildung 21: Interventionsgruppe: Ferritinkonzentration (ng/ml) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention);

Referenzbereich: Männer: 35-440 ng/ml; Frauen: 20-300 ng/ml (Hallbach, 2006)

Gesamtkollektiv: Interventionsgruppe: $T0 > T1$, $p < 0,001$; $T1 > T2$, $p < 0,05$

4.7 Veränderungen von Hämoglobin

• Unterschied in den Gesundheitsgruppen

Innerhalb der einzelnen Gesundheitszustände, sowie in den einzelnen Behandlungsgruppen konnte zum Zeitpunkt T0 kein signifikanter Unterschied beobachtet werden [IDDM: $13,57 \pm 1,66$ g/dl; NIDDM: $13,75 \pm 1,46$ g/dl; Gesund: $13,95 \pm 0,99$ g/dl; IFG: $14,69 \pm 1,75$ g/dl].

• Geschlechtsspezifischer Unterschied

Männer wiesen zum Zeitpunkt T0 signifikant höhere Hämoglobinkonzentrationen als Frauen auf [Männer: $14,70 \pm 1,51$ g/dl; Frauen: $13,20 \pm 1,25$ g/dl].

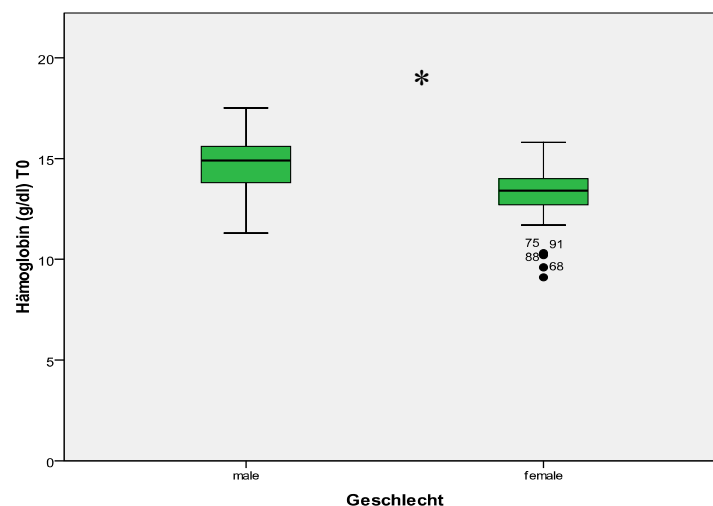


Abbildung 22: Hämoglobin Konzentration zum Zeitpunkt T0 (aufgeteilt nach Geschlecht);

Männer > Frauen, $p < 0,001$

• Zeitlicher Verlauf

In der **Informationsgruppe** konnten im Verlauf der Studie keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden. Hingegen verzeichnete sich in der **Interventionsgruppe** eine signifikante Veränderung zwischen T0 und T2 (- 1,37%), und T1 und T2 (+ 0,36%) [Interventionsgruppe: T0: $13,84 \pm 1,57$ g/dl; T1: $13,89 \pm 1,46$ g/dl; T2: $13,65 \pm 1,53$ g/dl].

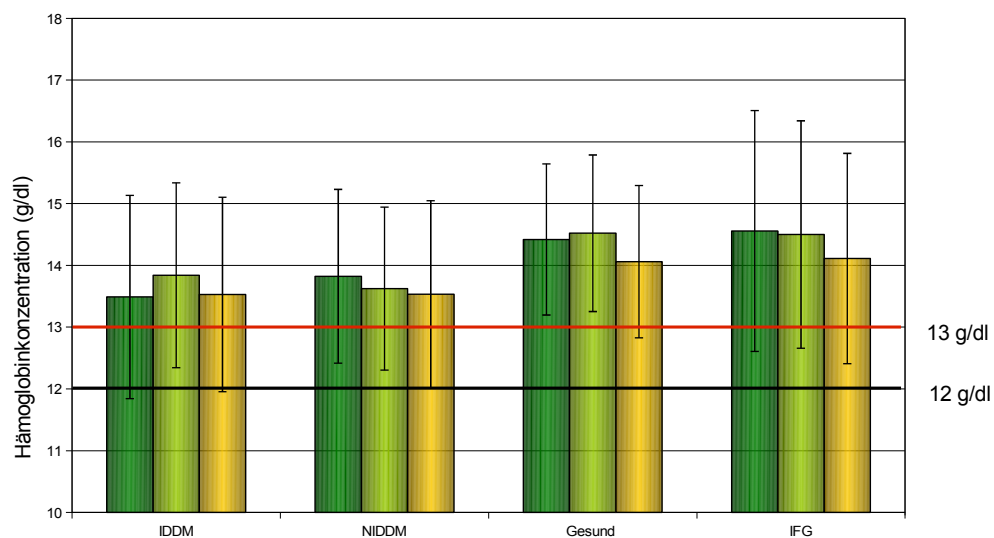


Abbildung 23: Interventionsgruppe: Hämoglobinkonzentration (g/dl) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention)

Referenzbereich: Labor-WGKK: Männer: 13-18 g/dl; Frauen: 12-16 g/dl

Gesamtkollektiv: Interventionsgruppe: T0 > T2, $p < 0,05$; T1 > T2, $p < 0,01$

4.8 Veränderungen von MCV, MCH, MCHC

- **Unterschied in den Gesundheitsgruppen**

Innerhalb der einzelnen Gesundheitszustände, sowie auch innerhalb der Behandlungsgruppen gab es zum Zeitpunkt T0 hinsichtlich des MCVs, MCHs und der MCHC keine signifikanten Unterschiede [MCV: IDDM: $87,61 \pm 5,73$ fl; NIDDM: $88,55 \pm 3,98$ fl; Gesund: $86,27 \pm 3,26$ fl; IFG: $88,33 \pm 3,08$ fl; MCH: IDDM: $29,31 \pm 2,88$ pg; NIDDM: $29,88 \pm 1,79$ pg; Gesund: $29,18 \pm 1,72$ pg; IFG: $30,00 \pm 1,86$ pg; MCHC: IDDM: $33,19 \pm 1,74$ g/dl; NIDDM: $33,65 \pm 1,41$ g/dl; Gesund: $34,00 \pm 1,00$ g/dl; IFG: $33,92 \pm 1,08$ g/dl].

- **Geschlechtsspezifischer Unterschied**

Männer wiesen zum Zeitpunkt T0 signifikant höhere MCV, MCH und MCHC-Werte im Vergleich zu Frauen auf [MCV: Männer: $89,54 \pm 3,78$ fl; Frauen: $86,79 \pm 4,73$ fl; MCH: Männer: Mittelwert: $30,56 \pm 1,70$ pg (Median: 63,48); Frauen: Mittelwert: $28,93 \pm 2,32$ pg (Median: 40,47); MCHC: Männer: Mittelwert: $34,07 \pm 1,21$ g/dl (Median: 59,63); Frauen: Mittelwert: $33,19 \pm 1,55$ g/dl (Median: 43,19)].

- **Zeitlicher Verlauf**

In der **Informationsgruppe** konnte im Verlauf der Studie kein signifikanter Unterschied des MCVs, MCHs und der MCHC beobachtet werden. In der **Interventionsgruppe** fand sich während der Ernährungsintervention bezüglich dem MCV ebenfalls kein Unterschied. Bezüglich den Parametern MCH und MCHC konnte während der Intervention (T0-T1 und T1-T2) eine signifikante Veränderung beobachtet werden (Tabelle 16).

Innerhalb der Informations- und Interventionsgruppe unterschied sich T3 hinsichtlich der Erythrozytenindizes (MCV, MCH, MCHC) nicht signifikant von T0.

Tabelle 16: Veränderung der Konzentration an MVC (fl), MCH (pg) und MCHC (g/dl) (Erythrozytenindizes) während der Intervention (MW $\pm$ SD)

Parameter	T0	T1	T2
MCV (fl)	88,29 $\pm$ 4,83	88,01 $\pm$ 5,12	88,37 $\pm$ 4,99
MCH* (pg)	29,65 $\pm$ 2,27	30,10 $\pm$ 2,09	29,72 $\pm$ 2,11
MCHC* (g/dl)	33,43 $\pm$ 1,48	34,07 $\pm$ 1,15	33,72 $\pm$ 1,30

Referenzbereich: Labor-WGKK: MCV (80-100 fl), MCH (27-35 pg), MCHC (32-36 g/dl)

MCH: T0-T1: $p < 0,05$; T1-T2: $p < 0,05$

MCHC: T0-T1: $p < 0,01$; T1-T2: $p < 0,05$

4.9 Veränderung der Leukozyten

- **Unterschied in den Gesundheitsgruppen**

IDDM und NIDDM wiesen zum Zeitpunkt T0 signifikant höhere Leukozyten-Konzentrationen im Vergleich zur Gruppe der Gesunden auf [IDDM: $7,23 \pm 1,48$ G/l; NIDDM: $7,24 \pm 1,56$ G/l; Gesund: $5,65 \pm 1,62$ G/l; IFG: $6,35 \pm 1,50$ G/l].

Innerhalb der Behandlungsgruppen (Informations- und Interventionsgruppe) fand sich kein Unterschied [Informationsgruppe: $6,95 \pm 1,74$ G/l; Interventionsgruppe: $6,96 \pm 1,55$ G/l].

- **Geschlechtsspezifischer Unterschied**

Zwischen Männern und Frauen konnte zum Zeitpunkt T0 ein signifikanter Unterschied beobachtet werden [Männer: $6,95 \pm 1,59$ G/l; Frauen: $6,95 \pm 1,63$ G/l].

- **Zeitlicher Verlauf**

In der **Informationsgruppe** wiesen die Gesunden signifikant niedrigere Leukozyten-Konzentrationen im Vergleich zu den IDDM auf [Gesund: T0: $5,42 \pm 1,77$ G/l; T1: $5,68 \pm 1,20$ G/l; T2: $5,27 \pm 0,68$ G/l; IDDM: T0: $7,68 \pm 1,76$ G/l; T1: $7,59 \pm 1,46$ G/l; T2: $7,96 \pm 1,25$ G/l].

Innerhalb der **Interventionsgruppe** fand sich im Verlauf Intervention keine signifikante Veränderung [T0: $6,96 \pm 1,55$ G/l; T1: $6,84 \pm 1,68$ G/l; T2: $7,13 \pm 1,66$ G/l].

Die Konzentration zum Zeitpunkt T3 unterschied sich nicht signifikant von T0.

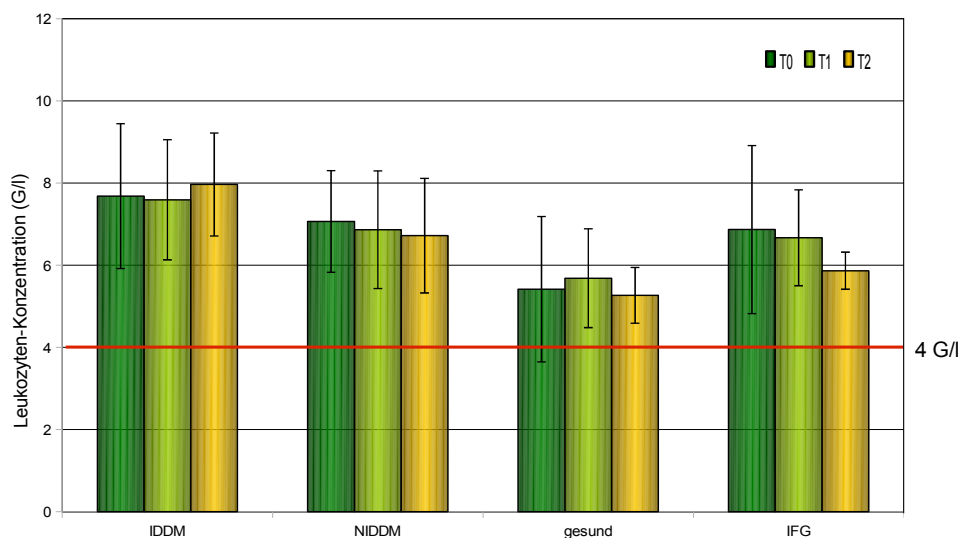


Abbildung 24: Informationsgruppe: Leukozytenkonzentration (G/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention);

Referenzbereich: Labor-WGKK: 4-10 G/l

Informationsgruppe: Gesamt-IDDM > Gesamt-Gesund, $p < 0,001$

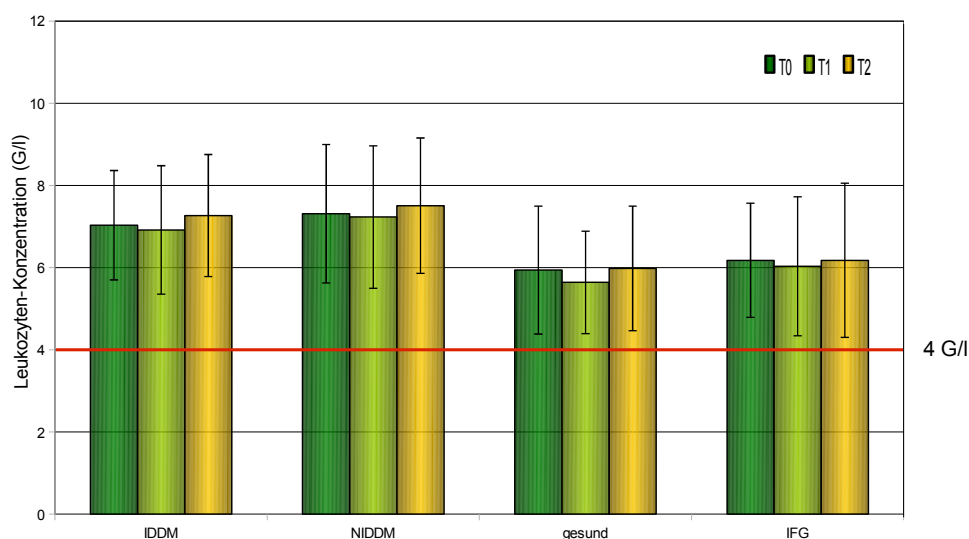


Abbildung 25: Interventionsgruppe: Leukozytenkonzentration (G/l) zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention)

Referenzbereich: Labor-WGKK: 4-10 G/l

4.10 Veränderung des Hämatokrit

- **Unterschied in den Gesundheitsgruppen**

Innerhalb der einzelnen Gesundheitszustände, sowie auch innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen fand sich zum Zeitpunkt T0 kein signifikanter Unterschied [IDDM: $40,67 \pm 3,63\%$; NIDDM: $40,68 \pm 3,77\%$; Gesund: $41,18 \pm 2,75\%$; IFG: $43,17 \pm 4,61\%$].

- **Geschlechtsspezifischer Unterschied**

Männer wiesen zum Zeitpunkt T0 einen signifikant höheren Hämatokrit im Vergleich zu Frauen auf [Männer: $42,98 \pm 4,03\%$; Frauen: $39,66 \pm 2,89\%$].

- **Zeitlicher Verlauf**

Weder in der Informations- noch in der Interventionsgruppe veränderte sich der Hämatokrit im Verlauf der Interventionsphase [Informationsgruppe: T0: $40,68 \pm 3,59\%$; T1: $40,58 \pm 4,30\%$; T2: $40,39 \pm 3,95\%$; Interventionsgruppe: T0: $41,19 \pm 3,86\%$; T1: $40,72 \pm 3,96\%$; T2: $40,53 \pm 4,12\%$].

In beiden Gruppen unterschied sich T3 nicht signifikant von T0.

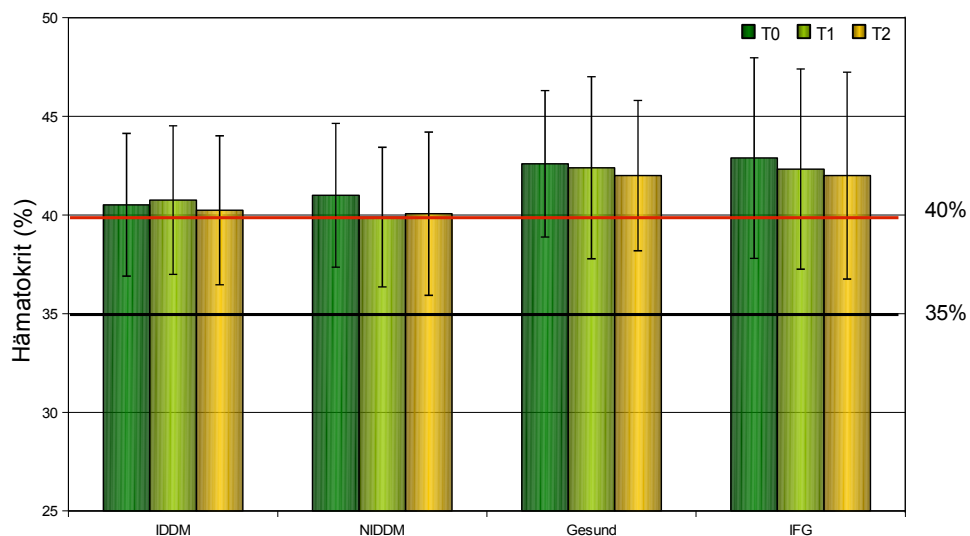


Abbildung 26: Interventionsgruppe: Hämatokrit in % zu den Zeitpunkten T0 (Ausgangswert), T1 (nach 4-wöchiger Intervention) und T2 (nach 8-wöchiger Intervention)

Referenzbereich: Labor-WGKK: Männer: 40-50%; Frauen: 35-45%

4.10.1 Diskussion zu den Erythrozytenindizes, Eisen, Ferritin und Hämoglobin

Eine **Anämie** ist ein häufiger diagnostizierter Befund bei Patienten mit Diabetes mellitus, insbesondere bei jenen, die an einer Niereninsuffizienz leiden. Wie bereits in Kapitel 2.3 erwähnt, stellt die Anämie einen erhöhten Risikofaktor für mikro- sowie makrovaskuläre Komplikationen dar (Thomas, 2007).

Im Gesamtkollektiv betrug die durchschnittliche **Eisenkonzentration** im Serum $79,82 \pm 32,88$ ng/ml. Diese Werte entsprechen den Normalwerten eines Gesunden. Ein Eisenmangel besteht bei einer Konzentration von < 12 ng/ml, eine Überladung wird ab einem Wert von > 400 ng/ml angenommen (Labor WGKK). 100% der Probanden waren zum Zeitpunkt T0 ausreichend mit Eisen versorgt.

In der Gruppe der Gesunden konnte im Vergleich zu den anderen Gesundheitszuständen ein höherer Eisenstatus festgestellt werden. Jedoch kam es in der Gruppe der Gesunden im Verlauf der Intervention zu einem starken, aber nicht signifikanten Abfall der Eisenkonzentration. Vergleicht man diese Werte mit jenen des Cobalamins, so kann dieser Rückgang ebenfalls mit dem „Verdrängungseffekt“ im Sinne eines erhöhten Konsums an pflanzlichen Lebensmitteln, im Austausch zu tierischen Produkten, erklärt werden.

In einer Studie von Jiang et al. wurde der Zusammenhang zwischen einer vermehrten Eisenspeicherung und dem Diabetesrisiko untersucht. Durch eine vermehrte Eisenspeicherung kann es zu einer Ablagerung in den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse kommen. Dies führt zu einer Insulinresistenz sowie zu einer verminderten Insulinsekretion. Dadurch kann sich das Diabetesrisiko steigern. Das Studienkollektiv wurde nach ihren Ferritinkonzentrationen in Quintile unterteilt (eine Eisenüberladung wird durch hohe Ferritinkonzentrationen im Plasma angezeigt). Frauen im obersten Quintil (höchste Ferritinkonzentrationen) wiesen ein fast 3-mal so hohes Risiko für die Entwicklung eines Typ-II-Diabetes, im Vergleich zu Frauen im untersten Quintil, auf (Jiang et al., 2004).

In einer weiteren Studie war ebenfalls eine erhöhte Serum-Ferritin-Konzentration mit einer erhöhten Diabetes-Prävalenz verbunden (Ford and Cogswell, 1999).

Im Gesamtkollektiv betrug zum Zeitpunkt T0 die durchschnittliche **Ferritinkonzentration** 107 ± 114 ng/ml. Bei einer Konzentration von < 15 ng/ml spricht man von einem Eisenmangel (Böhm et al., 2009). 6,1% der Probanden liegen unter diesem Bereich.

Hohe Ferritinkonzentrationen sind im Gegensatz dazu positiv mit Insulinresistenz und mit einer Lebersteatose assoziiert. Insulinresistenz und Lebersteatose gelten als kardiovaskuläre Risikofaktoren. In einer Studie von Hermans et al. wurde paradoxerweise gezeigt, dass Männer mit hohen Ferritinkonzentrationen (oberstes Quartil: MW $\pm$ SD: 480 ± 228 ng/ml) eine deutlich verminderte Prävalenz an makrovaskulären Komplikationen aufweisen (25% vs. 43%) (Hermans et al., 2010).

Außerordentlich erhöhte Ferritinkonzentrationen fanden Wissenschaftler bei neu diagnostizierten Diabetikern. Probanden mit hohen Ferritinkonzentrationen hatten ebenso erhöhte HbA1c und Blutzuckerwerte sowie erhöhte Insulinkonzentrationen (Ren et al., 2004).

Im Kollektiv der Studie DIAPLANT betrug die durchschnittliche **Hämoglobinkonzentration** der Männer $14,70 \pm 1,51$ g/dl, die der Frauen $13,20 \pm 1,25$ g/dl. Diese Werte liegen im Referenzbereich (Männer: 13-18 g/dl; Frauen: 12-16 g/dl).

Dennoch fand sich bei 13,8% der Frauen und bei 12,2% der Männer ein Mangel an Hämoglobin. Diese Werte entsprechen jenen von Thomas et al. . 503 Diabetiker wurden über einen Zeitraum von 5 Jahren beobachtet. Zu Beginn der Studien wiesen 12% der Patienten einen Mangel an Hämoglobin auf. 13% entwickelten in den weiteren 5 Jahren eine Anämie. Die Autoren empfehlen bei Patienten mit Typ-II-Diabetes mit eingeschränkter Nierenfunktion, höherem Alter oder bei Vorliegen einer Herz-Kreislaufkrankung regelmäßig ein Anämiescreening durchzuführen (Thomas et al., 2006b).

5 Schlussbetrachtung

Im Vergleich zur Gesunden Bevölkerung weisen Diabetiker ein 2-4-fach erhöhtes Atheroskleroserisiko auf. Im Rahmen der Studie DIAPLANT wurde der Einfluss einer Gemüse und Pflanzenölaufuhr auf den Status von Homocystein, Vitamin B₁₂, Folsäure und Erythrozytenindizes zu untersucht.

Die Hypothese, dass sich durch eine Ernährungsintervention der kardiovaskuläre Risikoparameter Homocystein senken lässt, konnte im Rahmen der Studie nicht bestätigt werden.

Die Vitamin B₁₂ Konzentration lag in der Interventionsgruppe, sowohl als auch in der Informationsgruppe über dem Referenzwert. Der Mittelwert im Gesamtkollektiv betrug 330 ± 146 pmol/l. Der geringst gemessene Wert lag bei 129 pmol/l, der höchst gemessene bei 715 pmol/l. Zum Zeitpunkt T0 waren im Gesamtkollektiv demnach 96,7% aller Studienteilnehmer ausreichend mit Vitamin B₁₂ versorgt. Nur 3,3% wiesen einen Vitamin B₁₂ Mangel auf. Nach der 8-wöchigen Ernährungsintervention (T2) waren 7,4% der Probanden nicht ausreichend mit Cobalamin versorgt. Ein möglicher Grund für die Abnahme an Cobalamin könnte der Verdrängungseffekt im Sinne eines Mehrverzehr an pflanzlichen Lebensmittel im Austausch zu tierischen sein.

Die durchgeführten Analysen zeigten auch einen zufriedenstellenden Status an Plasma-Folsäure. Zum Zeitpunkt T0 wiesen 98,9% der Probanden im Gesamtkollektiv einen ausreichenden Status an Folsäure auf. Nach der 8-wöchigen Ernährungsintervention steigerte sich dieser Wert auf 100%.

Auch die Erythrozyten-Folsäure, welche den Langzeitversorgungsstatus an Folsäure reflektiert, konnte zwischen T0 und T1 um knapp 10% erhöht werden. Hinsichtlich der Erythrozytenindizes konnten keine Abweichungen zu Gesunden festgestellt werden. Alle Werte lagen im Referenzbereich.

Im Gesamtkollektiv betrug die durchschnittliche Eisenkonzentration im Serum $79,82 \pm 32,88$ ng/ml. Die Eisenkonzentration nahm im Verlauf der Intervention in der Interventionsgruppe signifikant ab. Die Gruppe der Gesunden wies zudem eine signifikant höhere Eisenkonzentration im Vergleich zur Gruppe der IDDM und NIDDM auf.

Auch die Ferritinkonzentration und die Hämoglobinkonzentration nahmen im Verlauf der Intervention signifikant ab. Diese Abnahme ist wiederum auf den Verdrängungseffekt zurückzuführen. Die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen bewegten sich alle im Referenzbereich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Probanden der DIAPLANT-Studie gut mit den analysierten Vitaminen versorgt sind. Eine Homocysteinsenkung wurde nicht festgestellt. Ein möglicher Grund dafür könnte der gute Ausgangsstatus an Vitamin B₁₂ und Plasma-Folsäure sein.

6 Zusammenfassung

Die Zahl der Diabetiker steigt weltweit drastisch an. Für das Jahr 2030 wird ein Anstieg auf 439 Millionen prognostiziert. Zudem weisen Typ-II-Diabetiker ein 2-4 fach erhöhtes Atherosklerose-Risiko auf. Die Ernährung nimmt sowohl in der Entstehung als auch in der Behandlung des Typ-II-Diabetes und dessen Folgeerkrankungen einen wichtigen Stellenwert ein.

Das Ziel dieser Interventionsstudie war, den Effekt einer Ernährungsintervention auf den Stoffwechsel von Typ-II-Diabetikern zu untersuchen. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde der Einfluss der Intervention auf den Status von Homocystein, Vitamin B₁₂, Folsäure und die Erythrozytenindizes untersucht.

Alle Studienteilnehmer (Durchschnittsalter der Probanden: 64,47 ± 7,32 Jahre) wurden über die möglichen positiven Effekte einer gesunden Ernährung informiert. Danach wurden sie randomisiert der Kontroll- bzw. Interventionsgruppe zugeteilt. Die Interventionsgruppe nahm täglich 300 g Gemüse und 25 g Pflanzenöl, welches reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren war, zu sich. Die Interventionsphase dauerte insgesamt 8 Wochen, wobei vor der Intervention, nach 4 Wochen und nach 8 Wochen Blut abgenommen wurde. 8 Wochen nach der Intervention fand die letzte Blutabnahme statt.

An der Studie nahmen insgesamt 99 Probanden teil. Das Studienkollektiv setzte sich aus 36 IDDM, 40 NIDDM, 12 IFG-Probanden und 11 Gesunden Probanden zusammen.

Der Status an Vitamin B₁₂ und Plasma-Folsäure im Gesamtkollektiv kann als gut bewertet werden. Beide Vitamine gelten im Alter als Risikonährstoffe. Ein möglicher Grund für diese gute Versorgung könnte sein, dass rund 25% der Probanden regelmäßig Vitaminsupplemente zu sich nahmen. Hinsichtlich der Plasma-Folsäure konnte durch die Ernährungsintervention von T0 auf T2 ein signifikanter Anstieg der Ausgangskonzentrationen (+ 14%) beobachtet werden, wohingegen die Vitamin B₁₂ Konzentrationen in der Interventionsgruppe signifikant sanken (- 9%).

Die Homocystein-Konzentrationen konnten im Rahmen dieser Studie nicht signifikant gesenkt werden. Betrachtet man die Ausgangskonzentrationen der Vitamine, so könnte der ausreichende Status als möglicher Grund dafür angesehen werden. Bezüglich der Erythrozytenindizes wurden keine Auffälligkeiten bzw. Anämien beobachtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Studienteilnehmer (Diabetiker) ausreichend mit Vitamin B₁₂ und Folsäure versorgt waren. Durch die Intervention konnte zusätzlicher Anstieg der Plasma-Folsäure-Konzentration verzeichnet werden, wohingegen Homocystein unverändert blieb.

7 Summary

The number of people suffering from diabetes is rising dramatically worldwide. For 2030 a steady rise up to 439 million people is predicted. Furthermore, people with type-II-diabetes have a 2-4 times higher risk of atherosclerosis. The diet plays an important role in the development as well as in the treatment of type-II-diabetes and its secondary complications.

The aim of this intervention study was to examine the effects of a dietary intervention on the metabolism of type-II-diabetics. Within this diploma theses the influence of vegetables and a vegetable oil on plasma homocysteine, vitamin B₁₂, folic acid and erythrocytes indices was examined.

All participants in this study were informed about the possible beneficial effects of a healthy diet. Thereafter they were randomly assigned to the control- or intervention-group. The intervention-group was daily supplied with 300 g of vegetables and 25 g of PUFA rich vegetable oil. The intervention phase lasted 8 weeks. Blood samples were taken before the intervention, after 4 and 8 weeks. 8 weeks after the intervention (return to usual diet) the last blood samples were taken.

Altogether 99 subjects participated in the study. The study group consisted of 36 IDDM, 40 NIDDM, 12 IFG and 11 healthy subjects.

The levels of plasma vitamin B₁₂ and folic acid in the total subjects was satisfactory. Both vitamins are often found in low concentrations in subjects of this age group (average age $64,47 \pm 7,32$ years). A possible explanation for the good vitamin status could be the fact that approximately 25% of the participants were regularly taking vitamin supplements. During the intervention with oil and vegetables plasma folic acid significantly increased (T0-T2: + 14%) while vitamin B₁₂ significantly decreased (T0-T2: - 9%).

Levels of homocysteine were not significantly reduced within the intervention period probably because of satisfactory plasma concentrations of folic acid and vitamin B₁₂ at baseline. Concerning the erythrocytes indices or the presence of anaemia there were no changes within the intervention period.

In conclusion, levels of vitamin B₁₂ and folic acid were satisfactory in type-II-diabetes subjects. Folic acid could be further improved by dietary intervention, whereas levels of homocysteine remained unchanged.

8 Literaturverzeichnis

- AARSAND, A. K. & CARLSEN, S. M. 1998. Folate administration reduces circulating homocysteine levels in NIDDM patients on long-term metformin treatment. *J Intern Med*, 244, 169-74.
- ADA 2011. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 34 Suppl 1, S62-9.
- ALBERT, C. M., COOK, N. R., GAZIANO, J. M., ZAHARRIS, E., MACFADYEN, J., DANIELSON, E., BURING, J. E. & MANSON, J. E. 2008. Effect of folic acid and B vitamins on risk of cardiovascular events and total mortality among women at high risk for cardiovascular disease: a randomized trial. *JAMA*, 299, 2027-36.
- ANDREESEN, R. & HEIMPEL, H. 2009. *Klinische Hämatologie*, München, Urban & Fischer.
- ANDRES, E., PERRIN, A. E., DEMANGEAT, C., KURTZ, J. E., VINZIO, S., GRUNENBERGER, F., GOICHOT, B. & SCHLIENGER, J. L. 2003. The syndrome of food-cobalamin malabsorption revisited in a department of internal medicine. A monocentric cohort study of 80 patients. *Eur J Intern Med*, 14, 221-226.
- APARICIO, A., ANDRES, P., PEREA, J. M., LOPEZ-SOBALER, A. M. & ORTEGA, R. M. 2010. Influence of the consumption of fruits and vegetables on the nutritional status of a group of institutionalized elderly persons in the Madrid region. *J Nutr Health Aging*, 14, 615-20.
- APPEL, L. J., MILLER, E. R., 3RD, JEE, S. H., STOLZENBERG-SOLOMON, R., LIN, P. H., ERLINGER, T., NADEAU, M. R. & SELHUB, J. 2000. Effect of dietary patterns on serum homocysteine: results of a randomized, controlled feeding study. *Circulation*, 102, 852-7.
- ARMITAGE, J. M., BOWMAN, L., CLARKE, R. J., WALLENDZUS, K., BULBULIA, R., RAHIMI, K., HAYNES, R., PARISH, S., SLEIGHT, P., PETO, R. & COLLINS, R. 2010. Effects of homocysteine-lowering with folic acid plus vitamin B12 vs placebo on mortality and major morbidity in myocardial infarction survivors: a randomized trial. *JAMA*, 303, 2486-94.
- BAYER Laboratorium für spektralanalytische und biologische Untersuchungen; Folsäure-Portrait eines Vitamins; Internet: http://www.labor-bayer.de/laborinformationen/6_Info_folsaeure.pdf [Stand: 12.07.2011].

- BERMEJO, L. M., APARICIO, A., RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, E., LOPEZ-SOBALER, M., ANDRES, P. & ORTEGA, R. M. 2009. Dietary strategies for improving folate status in institutionalized elderly persons. *Br J Nutr*, 101, 1611-5.
- BIESALSKI, H. K., KÖHRLE, J. & SCHÜHMANN, K. 2002. Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe. Prävention und Therapie mit Mikronährstoffen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- BIRNER, M. 2001. Makroangiopathie bei Diabetes mellitus. *Journal of Vascular Diseases*, 30, 168-174.
- BOEING, H., BERCHTHOLD, A., BUB, A., ELLINGER, S., HALLER, D., KROKE, A., LESCHIK-BONNET, E., MÜLLER, M. J., OBERRITTER, H., SCHULZE, M., STEHLE, P. & WATZL, B. 2007. Stellungnahme der deutschen Gesellschaft für Ernährung; Obst und Gemüse in der Prävention chronischer Erkrankungen.
- BÖHM, M., HALLEK, M. & SCHMIEGEL, W. 2009. Innere Medizin, München, Urban & Fischer.
- BONAA, K. H., NJOLSTAD, I., UELAND, P. M., SCHIRMER, H., TVERDAL, A., STEIGEN, T., WANG, H., NORDREHAUG, J. E., ARNESEN, E. & RASMUSSEN, K. 2006. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 354, 1578-88.
- BOSTOM, A. G. & LATHROP, L. 1997. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int*, 52, 10-20.
- BOUSHEY, C. J., BERESFORD, S. A., OMENN, G. S. & MOTULSKY, A. G. 1995. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*, 274, 1049-57.
- BREHM, B. J., LATTIN, B. L., SUMMER, S. S., BOBACK, J. A., GILCHRIST, G. M., JANDACEK, R. J. & D'ALESSIO, D. A. 2009. One-year comparison of a high-monounsaturated fat diet with a high-carbohydrate diet in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 32, 215-20.
- BROEKMANS, W. M., KLOPPING-KETELAARS, I. A., SCHUURMAN, C. R., VERHAGEN, H., VAN DEN BERG, H., KOK, F. J. & VAN POPPEL, G. 2000. Fruits and vegetables increase plasma carotenoids and vitamins and decrease homocysteine in humans. *J Nutr*, 130, 1578-83.
- CARRERO, J. J., LOPEZ-HUERTAS, E., SALMERON, L. M., BARO, L. & ROS, E. 2005. Daily supplementation with (n-3) PUFAs, oleic acid, folic acid, and

- vitamins B-6 and E increases pain-free walking distance and improves risk factors in men with peripheral vascular disease. *J Nutr*, 135, 1393-9.
- CHADEFAUX, B., RETHORE, M. O., RAOUL, O., CEBALLOS, I., POISSONNIER, M., GILGENKRANZ, S. & ALLARD, D. 1985. Cystathionine beta synthase: gene dosage effect in trisomy 21. *Biochem Biophys Res Commun*, 128, 40-4.
- CHIANG, P. K., GORDON, R. K., TAL, J., ZENG, G. C., DOCTOR, B. P., PARDHASARADHI, K. & MCCANN, P. P. 1996. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J*, 10, 471-80.
- CHRISTENSEN, B., MOSDOL, A., RETTERSTOL, L., LANDAAS, S. & THELLE, D. S. 2001. Abstention from filtered coffee reduces the concentrations of plasma homocysteine and serum cholesterol--a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 74, 302-7.
- CLARKE, R., DALY, L., ROBINSON, K., NAUGHTEN, E., CAHALANE, S., FOWLER, B. & GRAHAM, I. 1991. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*, 324, 1149-55.
- CUSKELLY, G. J., MCNULTY, H. & SCOTT, J. M. 1996. Effect of increasing dietary folate on red-cell folate: implications for prevention of neural tube defects. *Lancet*, 347, 657-9.
- DACH 2008. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Frankfurt am Main, Umschau Braus Verlag.
- DANAEI, G., FINUCANE, M. M., LU, Y., SINGH, G. M., COWAN, M. J., PACIOREK, C. J., LIN, J. K., FARZADFAR, F., KHANG, Y. H., STEVENS, G. A., RAO, M., ALI, M. K., RILEY, L. M., ROBINSON, C. A. & EZZATI, M. 2011. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*, 378, 31-40.
- DE BREE, A., VERSCHUREN, W. M., KROMHOUT, D., KLUIJTMANS, L. A. & BLOM, H. J. 2002. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev*, 54, 599-618.
- DE JAGER, J., KOOY, A., LEHERT, P., WULFFELE, M. G., VAN DER KOLK, J., BETS, D., VERBURG, J., DONKER, A. J. & STEHOUWER, C. D. 2010. Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomised placebo controlled trial. *BMJ*, 340, c2181.

- DURAND, P., PROST, M., LOREAU, N., LUSSIER-CACAN, S. & BLACHE, D. 2001. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest*, 81, 645-72.
- EBBING, M., BLEIE, O., UELAND, P. M., NORDREHAUG, J. E., NILSEN, D. W., VOLLSET, S. E., REFSUM, H., PEDERSEN, E. K. & NYGARD, O. 2008. Mortality and cardiovascular events in patients treated with homocysteine-lowering B vitamins after coronary angiography: a randomized controlled trial. *JAMA*, 300, 795-804.
- EBERMANN, R. & ELMADFA, I. 2008. *Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung*, Wien New York, Springer.
- ELMADFA, I. & LEITZMANN, C. 2004. *Ernährung des Menschen*, Stuttgart, Eugen Ulmer.
- FABIAN, E., BOGNER, M., KICKINGER, A., WAGNER, K. H. & ELMADFA, I. 2011. Intake of medication and vitamin status in the elderly. *Ann Nutr Metab*, 58, 118-25.
- FORD, E. S. & COGSWELL, M. E. 1999. Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care*, 22, 1978-83.
- FORTIN, L. J. & GENEST, J., JR. 1995. Measurement of homocyst(e)ine in the prediction of arteriosclerosis. *Clin Biochem*, 28, 155-62.
- FROSST, P., BLOM, H. J., MILOS, R., GOYETTE, P., SHEPPARD, C. A., MATTHEWS, R. G., BOERS, G. J., DEN HEIJER, M., KLUIJTMANS, L. A., VAN DEN HEUVEL, L. P. & ET AL. 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*, 10, 111-3.
- FURCHGOTT, R. F. & ZAWADZKI, J. V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-6.
- GARCIA-ALONSO, F. J., JORGE-VIDAL, V., ROS, G. & PERIAGO, M. J. 2011. Effect of consumption of tomato juice enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids on the lipid profile, antioxidant biomarker status, and cardiovascular disease risk in healthy women. *Eur J Nutr*.
- GOYETTE, P., SUMNER, J. S., MILOS, R., DUNCAN, A. M., ROSENBLATT, D. S., MATTHEWS, R. G. & ROZEN, R. 1994. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification. *Nat Genet*, 7, 551.

- GRAHAM, I. M., DALY, L. E., REFSUM, H. M., ROBINSON, K., BRATTSTROM, L. E., UELAND, P. M., PALMA-REIS, R. J., BOERS, G. H., SHEAHAN, R. G., ISRAELSSON, B., UITERWAAL, C. S., MELEADY, R., MCMASTER, D., VERHOEF, P., WITTEMAN, J., RUBBA, P., BELLET, H., WAUTRECHT, J. C., DE VALK, H. W., SALES LUIS, A. C., PARROT-ROULAND, F. M., TAN, K. S., HIGGINS, I., GARCON, D., ANDRIA, G. & ET AL. 1997. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA*, 277, 1775-81.
- GUTTORMSEN, A. B., UELAND, P. M., NESTHUS, I., NYGARD, O., SCHNEEDE, J., VOLLSET, S. E. & REFSUM, H. 1996. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia ($>$ or $=$ 40 micromol/liter). The Hordaland Homocysteine Study. *J Clin Invest*, 98, 2174-83.
- HALLBACH, J. 2006. *Klinische Chemie und Hämatologie*, Thieme.
- HÄRING, H.-U., GALLWITZ, B., MÜLLER-WIELAND, D., USADEL, K.-H. & MEHNERT, H. 2011. *Diabetologie in Klinik und Praxis*, Stuttgart, Thieme.
- HERMANS, M. P., AHN, S. A., AMOUSSOU-GUENOU, K. D., BALDE, N. M. & ROUSSEAU, M. F. 2010. Do high ferritin levels confer lower cardiovascular risk in men with Type 2 diabetes? *Diabet Med*, 27, 417-22.
- HERRMANN, W. 2001. The importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for diseases: an overview. *Clin Chem Lab Med*, 39, 666-74.
- HERRMANN, W. & OBEID, R. 2008. Causes and early diagnosis of vitamin B12 deficiency. *Dtsch Arztebl Int*, 105, 680-5.
- HOOGEVEEN, E. K., KOSTENSE, P. J., JAKOBS, C., BOUTER, L. M., HEINE, R. J. & STEHOUWER, C. D. 1997. Does metformin increase the serum total homocysteine level in non-insulin-dependent diabetes mellitus? *J Intern Med*, 242, 389-94.
- IDF 2009. *International Diabetes Federation-Diabetes and Impaired Glucose Tolerance*. 4th edition.
- JACQUES, P. F., BOSTOM, A. G., WILLIAMS, R. R., ELLISON, R. C., ECKFELDT, J. H., ROSENBERG, I. H., SELHUB, J. & ROZEN, R. 1996. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*, 93, 7-9.

- JACQUES, P. F., BOSTOM, A. G., WILSON, P. W., RICH, S., ROSENBERG, I. H. & SELHUB, J. 2001. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr*, 73, 613-21.
- JIANG, R., MANSON, J. E., MEIGS, J. B., MA, J., RIFAI, N. & HU, F. B. 2004. Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *JAMA*, 291, 711-7.
- KANG, S. S., ZHOU, J., WONG, P. W., KOWALISYN, J. & STROKOSCH, G. 1988. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet*, 43, 414-21.
- KHANDANPOUR, N., ARMON, M. P., JENNINGS, B., FINGLAS, P. M., WILLIS, G., CLARK, A. & MEYER, F. J. 2009. Randomized clinical trial of folate supplementation in patients with peripheral arterial disease. *Br J Surg*, 96, 990-8.
- KLEINE-GUNK, B. 2003. Die vergessenen Vitamine: Folsäure, Vitamin B12 und B6 zur Senkung des kardiovaskulären Erkrankungsrisikos. *Blickpunkt DER MANN*, 1 (4), 38-40.
- KLERK, M., VERHOEF, P., CLARKE, R., BLOM, H. J., KOK, F. J. & SCHOUTEN, E. G. 2002. MTHFR 677C → T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA*, 288, 2023-31.
- KLUIJTMANS, L. A., VAN DEN HEUVEL, L. P., BOERS, G. H., FROSST, P., STEVENS, E. M., VAN OOST, B. A., DEN HEIJER, M., TRIJBELS, F. J., ROZEN, R. & BLOM, H. J. 1996. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet*, 58, 35-41.
- LAAKSONEN, D. E., LAKKA, T. A., LAKKA, H. M., NYSSONEN, K., RISSANEN, T., NISKANEN, L. K. & SALONEN, J. T. 2002. Serum fatty acid composition predicts development of impaired fasting glycaemia and diabetes in middle-aged men. *Diabet Med*, 19, 456-64.
- LEITZMANN, C., MÜLLER, C., MICHEL, P., HAHN, A. & LAUBE, H. 2009. Ernährung in Prävention und Therapie. In: STUTTGART, H. V. (ed.).
- LEMMER, B. & BRUNE, K. 2010. Pharmakotherapie: Klinische Pharmakologie, Berlin, Springer.
- LIEM, A. H., VAN BOVEN, A. J., VEEGER, N. J., WITHAGEN, A. J., ROBLES DE MEDINA, R. M., TIJSSEN, J. G. & VAN VELDHUISEN, D. J. 2004. Efficacy of

folic acid when added to statin therapy in patients with hypercholesterolemia following acute myocardial infarction: a randomised pilot trial. *Int J Cardiol*, 93, 175-9.

LÖFFLER, G. 2008. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, Heidelberg, Springer.

LONN, E., YUSUF, S., ARNOLD, M. J., SHERIDAN, P., POGUE, J., MICKS, M., MCQUEEN, M. J., PROBSTFIELD, J., FODOR, G., HELD, C. & GENEST, J., JR. 2006. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med*, 354, 1567-77.

MALINOW, M. R. 1994. Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases. *J Intern Med*, 236, 603-17.

MCCULLY, K. S. & WILSON, R. B. 1975. Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis*, 22, 215-27.

MENCHE, N. 2008. *Innere Medizin*, Urban & Fischer Verlag.

MEYER, K. A., KUSHI, L. H., JACOBS, D. R., JR. & FOLSOM, A. R. 2001. Dietary fat and incidence of type 2 diabetes in older Iowa women. *Diabetes Care*, 24, 1528-35.

MINER, S. E., EVROVSKI, J. & COLE, D. E. 1997. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem*, 30, 189-201.

MP-BIOMEDICALS Anleitungsbroschüre zur Bestimmung der Folsäure aus Erythrozyten.

N.N. 1998. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*, 352, 854-65.

NORRIS, L. E., COLLENE, A. L., ASP, M. L., HSU, J. C., LIU, L. F., RICHARDSON, J. R., LI, D., BELL, D., OSEI, K., JACKSON, R. D. & BELURY, M. A. 2009. Comparison of dietary conjugated linoleic acid with safflower oil on body composition in obese postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*, 90, 468-76.

NYGARD, O., NORDREHAUG, J. E., REFSUM, H., UELAND, P. M., FARSTAD, M. & VOLLSET, S. E. 1997. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*, 337, 230-6.

ÖDG 2009. Österreichische Diabetesgesellschaft: Diabetes mellitus-Leitlinien für die Praxis.

- PERRY, I. J., REFSUM, H., MORRIS, R. W., EBRAHIM, S. B., UELAND, P. M. & SHAPER, A. G. 1995. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet*, 346, 1395-8.
- PIETRZIK, K. & BRONSTRUP, A. 1997. Causes and consequences of hyperhomocyst(e)inemia. *Int J Vitam Nutr Res*, 67, 389-95.
- REFSUM, H., NURK, E., SMITH, A. D., UELAND, P. M., GJESDAL, C. G., BJELLAND, I., TVERDAL, A., TELL, G. S., NYGARD, O. & VOLLSET, S. E. 2006. The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *J Nutr*, 136, 1731S-1740S.
- REN, Y., TIAN, H., LI, X., LIANG, J. & ZHAO, G. 2004. Elevated serum ferritin concentrations in a glucose-impaired population and in normal glucose tolerant first-degree relatives in familial type 2 diabetic pedigrees. *Diabetes Care*, 27, 622-3.
- RIEDER, A., RATHMANNER, T., KIEFER, I., DORNER, T. & KUNZER, M. 2004. Österreichischer Diabetesbericht.
- RÖSEN, P. 2002. Endothelial Dysfunction: A Synonym for Functional Atherosclerosis. *Journal of Cardiology*, 9 (12), 556-562.
- ROZEN, R. 2000. Genetic modulation of homocysteinemia. *Semin Thromb Hemost*, 26, 255-61.
- SAHIN, M., TUTUNCU, N. B., ERTUGRUL, D., TANACI, N. & GUVENER, N. D. 2007. Effects of metformin or rosiglitazone on serum concentrations of homocysteine, folate, and vitamin B12 in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*, 21, 118-23.
- SHAW, J. E., SICREE, R. A. & ZIMMET, P. Z. 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*, 87, 4-14.
- SHIH, V. E., FRINGER, J. M., MANDELL, R., KRAUS, J. P., BERRY, G. T., HEIDENREICH, R. A., KORSON, M. S., LEVY, H. L. & RAMESH, V. 1995. A missense mutation (I278T) in the cystathionine beta-synthase gene prevalent in pyridoxine-responsive homocystinuria and associated with mild clinical phenotype. *Am J Hum Genet*, 57, 34-9.
- SOINIO, M., LAAKSO, M., LEHTO, S., HAKALA, P. & RONNEMAA, T. 2003. Dietary fat predicts coronary heart disease events in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 26, 619-24.

- SPENCE, J. D., BANG, H., CHAMBLESS, L. E. & STAMPFER, M. J. 2005. Vitamin Intervention For Stroke Prevention trial: an efficacy analysis. *Stroke*, 36, 2404-9.
- STAHL, A. & HESEKER, H. Vitamin B12 (Cobalamine). *Ernährungs Umschau*, 10/07.
- STANGER, O., FOWLER, B., PIERTZIK, K., HUEMER, M., HASCHKE-BECHER, E., SEMMLER, A., LORENZL, S. & LINNEBANK, M. 2009. Homocysteine, folate and vitamin B12 in neuropsychiatric diseases: review and treatment recommendations. *Expert Rev Neurother*, 9, 1393-412.
- STANGER, O., HERRMANN, W., PIETRZIK, K., FOWLER, B., GEISEL, J., DIERKES, J. & WEGER, M. 2003. DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med*, 41, 1392-403.
- SUMMERS, L. K., FIELDING, B. A., BRADSHAW, H. A., ILIC, V., BEYSEN, C., CLARK, M. L., MOORE, N. R. & FRAYN, K. N. 2002. Substituting dietary saturated fat with polyunsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity. *Diabetologia*, 45, 369-77.
- TANASESCU, M., CHO, E., MANSON, J. E. & HU, F. B. 2004. Dietary fat and cholesterol and the risk of cardiovascular disease among women with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*, 79, 999-1005.
- THOMAS, M. C. 2006. The high prevalence of anemia in diabetes is linked to functional erythropoietin deficiency. *Semin Nephrol*, 26, 275-82.
- THOMAS, M. C. 2007. Anemia in diabetes: marker or mediator of microvascular disease? *Nat Clin Pract Nephrol*, 3, 20-30.
- THOMAS, M. C., COOPER, M. E., ROSSING, K. & PARVING, H. H. 2006a. Anaemia in diabetes: Is there a rationale to TREAT? *Diabetologia*, 49, 1151-7.
- THOMAS, M. C., TSALAMANDRIS, C., MACISAAC, R. J. & JERUMS, G. 2006b. The epidemiology of hemoglobin levels in patients with type 2 diabetes. *Am J Kidney Dis*, 48, 537-45.
- TOOLE, J. F., MALINOW, M. R., CHAMBLESS, L. E., SPENCE, J. D., PETTIGREW, L. C., HOWARD, V. J., SIDES, E. G., WANG, C. H. & STAMPFER, M. 2004. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA*, 291, 565-75.

- TRIPOLT, N. & SOURIJ, H. 2010. Diabetes mellitus und endotheliale Dysfunktion. *Journal für Endokrinologie und Stoffwechsel*, 3 (2), 20-24.
- UBBINK, J. B., VAN DER MERWE, A., VERMAAK, W. J. & DELPORT, R. 1993. Hyperhomocysteinemia and the response to vitamin supplementation. *Clin Investig*, 71, 993-8.
- URGERT, R., VAN VLIET, T., ZOCK, P. L. & KATAN, M. B. 2000. Heavy coffee consumption and plasma homocysteine: a randomized controlled trial in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr*, 72, 1107-10.
- VAN'T VEER, P., JANSEN, M. C., KLERK, M. & KOK, F. J. 2000. Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. *Public Health Nutr*, 3, 103-7.
- VESTER, B. & RASMUSSEN, K. 1991. High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 29, 549-54.
- WALD, D. S. 2007. Folic acid, homocysteine and cardiovascular disease - judging causality in the face of inconclusive trial evidence. *World Congress on Hyperhomocysteinemia. Clin. Cem. Lab. Med.* , 45.
- WALD, D. S., LAW, M. & MORRIS, J. K. 2002. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ*, 325, 1202.
- WANG, L., FOLSOM, A. R., ZHENG, Z. J., PANKOW, J. S. & ECKFELDT, J. H. 2003. Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr*, 78, 91-8.
- WEHLING, M. 2011. *Klinische Pharmakologie*, Stuttgart, Thieme

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Daniela Toferer
Geburtsdatum	09.08.1984
E-Mail	daniela_toferer@hotmail.com

AUSBILDUNG

seit 10/2004	Studium der Ernährungswissenschaften in Wien Schwerpunkt: Lebensmittelproduktion und -technologie
--------------	---

BERUFSBEZOGENE PRAKTIKA

10/2011	Ernährungsaufklärung im Rahmen der ÖGE-Tagung in Wien (Unilever)
02/2010-01/2011	Vitamin B ₁₂ , Folsäure-, und Homocysteinbestimmung (HPLC u. RIA) im Rahmen der Diplomarbeit (Projekt DIAPLANT)
09/2010	Ernährungsaufklärung am Pädiaterkongress in Linz (Unilever)
07/2009	Praktikum am Department für Ernährungswissenschaften; Labortätigkeiten: Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, Brennwert- und Aschebestimmung von Fertiggerichten (Projekt Double Fresh)
05/2009	Gestaltung und Durchführung eines zwei- tägigen Ernährungsworkshops mit KundInnen von Jugend am Werk