

**EINFLUSS EINER KOMBINIERTEN B-VITAMIN- UND ANTIOXIDANZIEN-
SUPPLEMENTIERUNG AUF DIE ADMA-PLASMAKONZENTRATION
BEI PERSONEN MIT ERHÖHTEM KARDIOVASKULÄREN RISIKO**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl. oec. troph. Birgit Trunz
geboren am 12.08.1975 in Nürnberg

2009

REFERENT: Prof. Dr. Andreas Hahn
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Ökotoxikologie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

KOREFERENT: Prof. Dr. Dirk O. Stichenothe
Institut für Klinische Pharmakologie
Medizinische Hochschule Hannover

TAG DER PROMOTION: 23.09.2009

Das Bewusste der Unmöglichkeit ist der Beginn aller Möglichkeiten.
Sri Aurobindo, indischer Politiker und Philosoph (1872-1950)

FÜR TIMO,
DER MICH STETS IN ALLEN MÖGLICHKEITEN UNTERSTÜTZT HAT.

KURZZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund und Fragestellung: Seit der Anfang der 1990er Jahre gemachten Entdeckung, dass asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) als endogener Inhibitor der NO-Synthase fungiert, war dessen proatherogenes Wirkpotenzial Gegenstand zahlreicher experimenteller und klinischer Arbeiten. Darauf aufbauend wird ADMA heute sowohl die Bedeutung eines integrativen Promotors als auch Markers zugeschrieben, über welchen kardiovaskuläre Risikofaktoren – darunter Hyperhomocysteinämie und Hypercholesterolämie – zu einer Dysfunktion des Endothels beitragen. Ausgehend von *In-vitro*-Studien, die auf einen redoxsensitiven Mechanismus einer Homocystein- und oxLDL-induzierten ADMA-Akkumulation hinweisen, sollte in der vorliegenden Arbeit erstmalig untersucht werden, inwieweit eine kombinierte, physiologisch-dosierte B-Vitamin- und Antioxidanzien-supplementierung a) zu einer Homocystein- und oxLDL-Reduktion bzw. Steigerung der antioxidativen Plasmakapazität *in vivo* führt und dies b) mit einem synergistischen Effekt hinsichtlich einer Senkung der ADMA-Plasmakonzentration bei Personen mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko verbunden ist.

Methodik: Insgesamt wurden 123 klinisch gesunde Frauen und Männer ab 40 Jahre, bei denen mindestens zwei kardiovaskuläre Risikofaktoren vorlagen, in einer randomisierten, placebo-kontrollierten, monozentrischen Doppelblind-Studie über einen Interventionszeitraum von sechs Monaten untersucht.

Ergebnisse und Diskussion: Durch die Nährstoffgabe ließ sich eine höchst signifikante und unter Berücksichtigung der bereits als präventiv wünschenswert zu erachtenden Basalwerte maximale Senkung der mittleren tHcy-Plasmakonzentration erzielen. Während in der Verumgruppe ein signifikanter, wenn auch aus klinischer Sicht sowie gegenüber Placebo nicht relevanter bzw. signifikanter Anstieg der antioxidativen Plasmakapazität im Verlauf der Intervention verzeichnet wurde, fielen die mittleren oxLDL-Serumwerte unabhängig von der Verum- bzw. Placebogabe auf höchst signifikantem Niveau ab. Demgegenüber waren für den Hauptzielparameter ADMA mit nahezu konstanten mittleren Plasmaspiegeln in den Subgruppen Verum und Placebo keine Veränderungen während der Intervention festzustellen. Auch ergaben sich bei Betrachtung ausgewählter Subkollektive sowie möglicher Korrelationen zwischen den unter Verumgabe ermittelten ADMA-Differenzen und den diesbezüglichen Veränderungen im Homocystein-/B-Vitamin- bzw. oxLDL-/Antioxidanzienstatus keine Anhaltspunkte für einen ADMA-modulierenden Effekt. Unsere Ergebnisse stehen damit in Einklang mit den bislang publizierten Humanstudien, die a) ebenfalls keine Auswirkungen einer isolierten B-Vitamingabe auf ADMA trotz z. T. deutlich höherer Homocystein-Senkung bei b) zugleich inkonsistenter Datenlage auf Assoziationsebene aufzeigen konnten bzw. c) im Fall eines potenziell ADMA-senkenden Effekts von Antioxidanzien, wie er

sich in niereninsuffizienten nicht jedoch nierengesunden Kollektiven andeutet, der Untermauerung durch methodisch hochwertige Studien bedürfen.

Fazit: Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgestellte Hypothese eines synergistischen Effekts einer kombinierten B-Vitamin- und Antioxidanzisupplementierung hinsichtlich einer Senkung der ADMA-Plasmakonzentration bei Personen mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko konnte nicht bestätigt werden. Gegenüber den *in vitro* erhobenen Befunden ist auf Basis der hier gezeigten Ergebnisse sowie unter Einbeziehung der bis dato vorliegenden Humanstudien kein eindeutiger Kausalzusammenhang zwischen dem ADMA-Status und a) Homocystein sowie b) oxLDL *in vivo* festzustellen.

Schlagwörter: Asymmetrisches Dimethylarginin, Homocystein, oxidiertes LDL, B-Vitamine, Antioxidanzien

ABSTRACT

Background and Aims: Since it has been shown that asymmetric dimethylarginine (ADMA) is an endogenous inhibitor of NO synthase in the beginning of the 1990s several experimental and clinical studies investigated its proatherogenic effects. Today, due to this research ADMA is seen as a significant integrative promoter as well as marker of the endothelial dysfunction along with other cardiovascular risk factors such as hyperhomocysteinemia and hypercholesterolemia. Based on *in vitro* studies indicating a redox sensitive mechanism of homocysteine and oxLDL induced ADMA accumulation the present thesis aims at investigating for the first time to what extent a combined B vitamin and antioxidant supplementation in physiological doses a) reduces homocysteine and oxLDL and increases the antioxidant capacity of plasma *in vivo* and b) if this is associated with a synergistic effect with regard to a reduction of ADMA plasma concentration in subjects with increased cardiovascular risk.

Methods: A total of 123 healthy women and men aged 40 years and with at least two prevalent cardiovascular risk factors were randomized in a placebo-controlled, monocentre double-blind study over a six month intervention period to receive either a combination of B vitamins and antioxidants or an identical placebo.

Results and Discussion: The intervention with the nutrient supplement led to a highly significant and - considering the already desirably low baseline concentrations – maximally achievable decrease of the mean tHcy plasma concentration. The antioxidant capacity of plasma increased significantly in the verum group although this increase cannot be estimated as clinically relevant or as statistically significant compared to the placebo group. The mean oxLDL serum concentrations decreased highly significantly in both the verum and the placebo group. In contrast, ADMA plasma concentrations as the primary endpoint remained nearly constant during the intervention in both groups. Moreover, the analysis of selected subgroups or of potential correlations between the observed ADMA differences in the verum group and the referring changes in homocysteine/B vitamin and oxLDL/antioxidant status, respectively, did not reveal evidence for any effect on ADMA. Hence, our data a) are consistent with the published findings from clinical studies, which also failed to show an effect of isolated B vitamin supplementation on ADMA despite in part a significantly higher homocysteine reduction and b) did not confirm an association of ADMA and homocysteine *in vivo* like some but not all studies. Our results further indicate that c) high methodical quality studies are required to clarify the possibly reducing effect of antioxidants on ADMA shown in patients with renal insufficiency but not in healthy subjects.

Conclusion: The hypothesis of the present study assuming a synergistic lowering effect of a combined supplementation of B vitamins and antioxidants on the ADMA plasma concentration in subjects with increased cardiovascular risk could not be confirmed. In contrast to the results from *in vitro* studies a causal relationship between the ADMA status and a) homocysteine or b) oxLDL *in vivo* cannot be proved on the basis of clinical studies in humans including the results of this study.

Key words: asymmetric dimethylarginine, homocysteine, oxidized LDL, B vitamins, antioxidants

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1 ENDOTHELIALE (DYS-)FUNKTION - BEDEUTUNG FÜR DIE ATHEROGENESE	3
2.1.1 Physiologische Funktionen des Endothels unter besonderer Berücksichtigung des L-Arginin-NO-Systems	4
2.1.1.1 Biochemie des endothelialen NO-Systems	5
2.1.1.2 Vasoprotektive Wirkmechanismen von NO	12
2.1.2 Endotheliale Dysfunktion	15
2.1.2.1 Definition und pathophysiologische Relevanz	15
2.1.2.2 Ätiologie und molekulare Aspekte einer verminderten NO- Verfügbarkeit.....	18
2.2 (PATHO-)PHYSIOLOGIE DES ADMA-NO-SYSTEMS	23
2.2.1 Methylierte L-Arginin-Analoga – Chemische Charakteristik und biologische Effekte.....	23
2.2.2 Biochemie des ADMA-Stoffwechsels.....	25
2.2.2.1 ADMA-Bildung	25
2.2.2.2 Wege der ADMA-Elimination.....	26
2.2.2.3 Intermediäre Verteilung.....	28
2.2.3 ADMA und Atherosklerose.....	29
2.2.3.1 ADMA und kardiovaskuläres Risiko – empirische Evidenz	30
2.2.3.2 Diskutierte Mechanismen einer durch kardiovaskuläre Risikofaktoren induzierten ADMA-Akkumulation.....	35
3 ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	42
4 EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....	44
4.1 MATERIAL UND METHODEN	44
4.1.1 Studienziel	44

4.1.2	Studiendesign	45
4.1.3	Studienablauf	46
4.1.4	Gewinnung, Screening und Auswahl der Probanden	48
4.1.4.1	Rekrutierung und Vorauswahl	48
4.1.4.2	Kriterien zur Studienteilnahme	49
4.1.4.3	Kriterien zur Aufnahme in die statistische Datenanalyse	51
4.1.5	Instrumente und Maßnahmen im Rahmen der Untersuchungs- und Interventionsphase.....	53
4.1.5.1	Erhebung anthropometrischer Daten, Blutdruckmessung	53
4.1.5.2	Probengewinnung, -aufbereitung und -analytik	54
4.1.5.3	Erhebung des Ernährungsverhaltens	57
4.1.5.4	Zusammensetzung und Dosierung der Studienpräparate.....	59
4.1.6	Statistische Verfahren.....	61
4.1.6.1	Fallzahlberechnung und biometrische Zielgrößen	61
4.1.6.2	Deskriptive und analytische Statistik	62
4.2	ERGEBNISSE	65
4.2.1	Das Studienkollektiv.....	65
4.2.1.1	Anzahl der Teilnehmer im Studienverlauf sowie der in die statistische Analyse aufgenommenen Probanden	65
4.2.1.2	Geschlechterverteilung, Alter und anthropometrische Daten.....	67
4.2.1.3	Charakteristik des kardiovaskulären Risikoprofils.....	69
4.2.1.4	Lebensstilfaktoren	74
4.2.1.5	Besonderheiten des Kollektivs	77
4.2.2	Homocystein und assoziierte B-Vitaminstatusparameter.....	79
4.2.2.1	Homocystein (tHcy).....	79
4.2.2.2	Folat (S-Folat/E-Folat).....	83
4.2.2.3	Cobalamin (Cbl)	85
4.2.2.4	Pyridoxalphosphat (PLP).....	86
4.2.2.5	Korrelationen und Interaktionen	87
4.2.2.6	Zusammenfassung.....	88
4.2.3	Oxidiertes LDL und assoziierte Antioxidanzienparameter.....	90
4.2.3.1	Oxidiertes LDL (oxLDL).....	90
4.2.3.2	Antioxidative Kapazität des Plasmas (TEAC).....	92
4.2.3.3	α -Tocopherol (AT).....	93
4.2.3.4	Korrelationen und Interaktionen	96
4.2.3.5	Zusammenfassung.....	97

4.2.4	Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)	99
4.2.4.1	Gesamtkollektiv-Analyse	99
4.2.4.2	Subkollektiv-Analyse	101
4.2.4.3	Korrelationen und Interaktionen	110
4.2.4.4	Zusammenfassung.....	112
4.2.5	Begleit- und Basisparameter.....	114
5	DISKUSSION.....	117
5.1	HOMOCYSTEIN UND ASSOZIIERTE B-VITAMINSTATUSPARAMETER	118
5.1.1	Effekt der Supplementierung auf den tHcy-Plasmaspiegel.....	120
5.1.2	Effekt der Supplementierung auf den B-Vitaminstatus.....	123
5.1.3	Bewertung des B-Vitaminversorgungsstatus vor der Supplementierung.....	124
5.1.4	Zusammenfassung und Zwischenfazit.....	127
5.2	OXIDIERTES LDL UND ASSOZIIERTE ANTIOXIDANZIENPARAMETER.....	128
5.2.1	Effekt der Supplementierung auf den oxLDL-Serumspiegel	129
5.2.2	Effekt der Supplementierung auf den antioxidativen Status.....	134
5.2.3	Bewertung des (anti-)oxidativen Status vor der Supplementierung	136
5.2.4	Zusammenfassung und Zwischenfazit.....	138
5.3	ASYMMETRISCHES DIMETHYLARGININ	139
5.3.1	Bewertung des Effekts der B-Vitaminsupplementierung.....	139
5.3.2	Bewertung des Effekts der Antioxidanzien-supplementierung	148
5.3.3	Bewertung des ADMA-Status vor der Supplementierung	157
5.3.4	Zusammenfassung und Zwischenfazit	160
6	ZUSAMMENFASSUNG UND FAZIT	162
7	SUMMARY AND CONCLUSION.....	167
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	172
9	ANHANG	198

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: L-Arginin-NO-Stoffwechselweg, L-Citrullin-NO-Zyklus und L-Arginin-Transportsysteme der Endothelzelle	6
Abb. 2: Bildung und vasodilatatorische Wirkung von NO	13
Abb. 3: Pathomechanismus der Atherosklerose - Bedeutung einer verminderten NO-Verfügbarkeit (vereinfachte Darstellung)	17
Abb. 4: Physiologische und pathophysiologische Determinanten der endothelialen NO-Bioverfügbarkeit (vereinfachte Darstellung)	22
Abb. 5: Strukturformeln von L-Arginin und der endogenen Methylarginin-Derivate L-NMMA, ADMA und SDMA	23
Abb. 6: Bildung, Abbau und Ausscheidung von ADMA	28
Abb. 7: Einfluss einer kombinierten B-Vitamin- und Antioxidanzien-supplementierung auf die ADMA-Plasmakonzentration bei Personen mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko – Arbeitshypothese und biochemische Rationale	43
Abb. 8: Zeitlicher Ablauf der Studie	48
Abb. 9: Anzahl der Probanden zu verschiedenen Studienzeitpunkten.....	66
Abb. 10: Altersverteilung im Gesamtkollektiv zu T0	68
Abb. 11: Summierte Prävalenz etablierter kardiovaskulärer Risikofaktoren im Gesamtkollektiv, differenziert nach Verum- und Placebogruppe	70
Abb. 12: Einzelprävalenz etablierter kardiovaskulärer Risikofaktoren im Gesamtkollektiv, differenziert nach Verum- und Placebogruppe.....	73
Abb. 13: Summierte Prävalenz der zur Diagnose eines metabolischen Syndroms nach AHA/NHLBI-Definition festgelegten Risikofaktoren im Gesamtkollektiv, differenziert nach Verum- und Placebogruppe	74
Abb. 14: Verteilung der Verum- und Placebogruppe auf die mittels FFQ ermittelten Ernährungsmuster-Kategorien	75
Abb. 15: Absolute T6-T0-Differenzen der tHcy-Plasmaspiegel im Gesamtkollektiv, differenziert nach Verum- und Placebogruppe (Mittelwert \pm SE)	81
Abb. 16: Korrelation zwischen den absoluten tHcy-Differenzen (T6-T0) und den tHcy-Plasmaspiegeln zu T0 in der Verumgruppe des Gesamtkollektivs	83
Abb. 17: Korrelation zwischen den absoluten oxLDL-Differenzen (T6-T0) und den oxLDL-Serumspiegeln zu T0 in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs	91

Abb. 18: Korrelation zwischen den absoluten AT-, AT/TC- bzw. AT/TC+TG-Differenzen (T6-T0) und den jeweiligen Plasmaspiegeln zu T0 in der Verumgruppe des Gesamtkollektivs	96
Abb. 19: Korrelation zwischen den absoluten ADMA-Differenzen (T6-T0) und den ADMA-Plasmaspiegeln zu T0 in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs	100
Abb. 20: Diskutierte Mechanismen einer Homocystein-induzierten ADMA-Akkumulation und deren Bedeutung für die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion	141

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Eigenschaften und enzymkinetische Merkmale der NOS-Isoformen	9
Tab. 2: Mit einer endothelialen Dysfunktion assoziierte Risikofaktoren	19
Tab. 3: ADMA-Plasmaspiegel [$\mu\text{mol/l}$] bei Probanden mit und ohne prävalente kardiovaskuläre Risikofaktoren – Ergebnisse aus Querschnittsstudien (Auswahl)	32
Tab. 4: Bedeutung von ADMA als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor – Ergebnisse aus prospektiven Kohortenstudien (Auswahl)	34
Tab. 5: Für die Aufnahme in die statistische Datenanalyse relevante und die Prävalenz kardiovaskulärer Risikofaktoren zugrunde gelegte Kriterien	52
Tab. 6: Probenmaterial, Labor und angewendetes Analyseverfahren der in der vorliegenden Arbeit berücksichtigten laborchemischen Parameter	56
Tab. 7: Zusammensetzung und Dosierung der über die Verumpräparate verabreichten Multinährstoffkombination im Vergleich zur empfohlenen Zufuhr	60
Tab. 8: Kriterien und Auswahl der verwendeten statistischen Prüfverfahren	63
Tab. 9: Beurteilungsgrundlage für die Stärke bivariater Zusammenhänge anhand des Korrelationskoeffizienten	64
Tab. 10: Anthropometrische Daten zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)	69
Tab. 11: Prävalenz des C677T-MTHFR-Polymorphismus im Gesamtkollektiv sowie in der Verum- und Placebogruppe	77
Tab. 12: tHcy-Plasmaspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)	80
Tab. 13: Prävalenz einer moderaten Hyperhomocysteinämie zu T0 und T6 in der Verum- und Placebogruppe auf Basis der für gesunde Erwachsene und Risikopersonen empfohlenen Obergrenzen	82
Tab. 14: S-Folat- und E-Folat-Spiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)	84
Tab. 15: Cbl-Serumspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)	85
Tab. 16: PLP-Plasmakonzentrationen zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)	86
Tab. 17: oxLDL-Serumspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)	91

Tab. 18: TEAC-Plasmawerte zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)	93
Tab. 19: α -Tocopherol-Serumspiegel (ohne/mit Lipidkorrektur) zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)	95
Tab. 20: ADMA-Plasmaspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)	100
Tab. 21: ADMA-Plasmaspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Subkollektivs „Höhe der ADMA-Plasmaspiegel“ (Mittelwert \pm SD)	102
Tab. 22: ADMA-Plasmaspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Subkollektivs „Moderate Hyperhomocysteinämie“ (Mittelwert \pm SD)	104
Tab. 23: ADMA-Plasmaspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Subkollektivs „Höhe der oxLDL-Serumspiegel“ (Mittelwert \pm SD)	106
Tab. 24: ADMA-Plasmaspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Subkollektivs „Höhe der antioxidativen Kapazität“ (Mittelwert \pm SD)	108
Tab. 25: ADMA-Plasmaspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Subkollektivs „(Nicht-)Raucher“ (Mittelwert \pm SD)	109
Tab. 26: ADMA-Plasmaspiegel zu T0 in Abhängigkeit von der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren im Gesamtkollektiv (Mittelwert \pm SD)	111
Tab. 27: SDMA-, L-Arg-Plasmaspiegel, Creatinin- und Harnsäure-Serumspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)	115
Tab. 28: Ergebnisse bisheriger Humanstudien zum Einfluss einer Antioxidanzien-supplementierung auf die oxLDL-Konzentration <i>in vivo</i>	132
Tab. 29: Ergebnisse bisheriger Humanstudien zum Einfluss einer B-Vitamin-supplementierung auf den ADMA-Plasmaspiegel	143

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADA	American Diabetes Association
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin (N ^ω ,N ^ω -Dimethyl-L-Arginin)
ADP	Adenosindiphosphat
AGEs	Advanced Glycosylation Endproducts
AHA	American Heart Association
AN(C)OVA	(Ko-)Varianzanalyse (Analysis of [Co]Variance)
(L-)Arg	(L-)Arginin
ASL	Argininosuccinat-Lyase
ASS	Argininosuccinat-Synthetase
AT	α-Tocopherol
ATP	Adenosintriphosphat
BAEC	Bovine aortale Endothelzelllinie (Bovine Aortic Endothelial Cells)
BAT	Broad Scope Transport Proteins
BFEL	Bundesanstalt für Ernährung und Landwirtschaft
BH ₄ (BH ₂)	Tetrahydrobiopterin (Dihydrobiopterin = oxidierte Form)
BMHT	Betain-Homocystein-Methyltransferase
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
CARDIAC	<i>Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (-Study)</i>
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	Cationic Amino Acid Transporters
Cbl	Cobalamin
CBS	Cystathionin-β-Synthetase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
(95 %-)CI	95 %-Konfidenzintervall
cNOS	konstitutive NO-Synthase (NOS-I)
Crea	Creatinin
CRF	Case Report Form
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag

DACH	Kurzbegriff für die Gesellschaften für Ernährung in Deutschland (DGE), Österreich (ÖGE) und der Schweiz (SGE/SVE) in Anlehnung an die international üblichen Länderkennzeichen („D-A-CH“).
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
DBD	Diastolischer Blutdruck
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DHA	Docosahexaensäure (C22:6 ω 3)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPT	Dimethylarginin-Pyruvat-Transferase
EAhy 926	Hybridzelllinie aus der Fusionierung von \rightarrow HUVEC und humanen Lungenkarzinomzellen (A549)
EC	Endothelzellen
ECV304	Spontan transformierte \rightarrow HUVEC
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-Folat	Erythrozyten-Folat
EGCG	Epigallocatechingallat
eNOS	endotheliale NO-Synthase (NOS-III)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPA	Eicosapentaensäure (C20:5 ω 3)
<i>EPIC</i>	<i>European Investigation into Cancer and Nutrition (-Study)</i>
EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESC	European Society of Cardiology
ESH	European Society of Hypertension
F _{2α} -ISP	F _{2α} -Isoprostane
FÄ	Folatäquivalent
Fa.	Firma
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FFQ	Food-Frequency-Questionnaire
FMD	Fluss-vermittelte Vasodilatation (Flow-Mediated Dilatation)
FMN	Flavinmononukleotid
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
GC-MS	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion

GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Glc	Glucose
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H ₀	Nullhypothese
H ₁	Alternativhypothese
HAMO	N ^ω -OH-L-Arginin-Monooxygenase
<i>HANNA</i>	<i>Hannoversche Nahrungsergänzungs-Studie</i>
HCAEC	Humane Endothelzelllinie der Koronararterie (Human Coronary Artery Endothelial Cells)
HDL	High Density Lipoprotein
HDX	L-Arginin-N ^ω -Hydroxylase
Hinf I	Endonuclease aus Haemophilus influenzae Rf
HMEC-1	Humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie (Human Microvascular Endothelial Cells)
hnRNP	Heterogenous Nuclear Ribonuclear Proteins
<i>HOPE-2</i>	<i>Heart Outcomes Prevention Evaluation-2 (-Study)</i>
HPLC-ESI-MS/MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Elektronenspray-Ionisation und Tandem-Massenspektrometrie
hsCRP	hochsensitives →CRP
HUVEC	Humane Endothelzelllinie der Nabelschnurvene (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, bei der die <i>in vitro</i> Hemmung des Enzyms 50 % beträgt
(s)ICAM-1	(soluble) Intercellular Adhesion Molecule-1
I.E.	Internationale Einheiten
IDF	International Diabetes Federation
IFG	Impaired Fasting Glucose
IMT	Intima-Media-Dicke (Intima Media Thickness)
iNOS	induzierbare NO-Synthase (NOS-II)
IL	Interleukin(e)
ISH	International Society of Hypertension
<i>iv</i>	Intravenous
K	Kontrollen
kDA	Kilodalton
KG	Körpergewicht

KHK	Koronare Herzkrankheit
K_m	Michaelis-Konstante; Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Geschwindigkeit erreicht wird
KORA	<i>Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg</i>
KS-Test	Kolmogorov-Smirnov-Test
(n)LDL	(natives) Low Density Lipoprotein
L-NAME	N ^ω -Nitro-L-Arginin-Methylester
L-NMMA	N ^ω -Monomethyl-L-Arginin
L-NNA	N ^ω -Nitro-L-Arginin
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPS	Lipopolysaccharide
m	Männlich
mAb	monoklonaler Antikörper
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MCSF-1	Monocyte Colony Stimulating Factor-1
MDA	Malondialdehyd
MetS	Metabolisches Syndrom
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MI	Myokardinfarkt
min	Minute(n)
mNOS	in Makrophagen exprimierte NO-Synthase (→iNOS bzw. NOS-II)
MLHB	Medizinisches Labor Bremen
MMA	Methylmalonsäure
MONICA	<i>Monotoring Trends and Determinantes in Cardiovascular Disease (-Study)</i>
mRNA	messenger →RNA
MS	Methionin-Synthase
MTHFR	5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase
<i>n</i>	Anzahl der Fälle
NCEP	National Cholesterol Education Program
NFκB	Nukleärer Transkriptionsfaktor κB (Nuclear Faktor κB)
NHLBI	National Heart, Lung, and Blood Institute
nNOS	neuronale NO-Synthase (NOS-I)
NO	Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide)
NYHA	New York Heart Association

oMBT	oraler Methionin-Belastungstest
OPA	Orthophthalaldehyd
OR	Odds Ratio
oxLDL	oxidiertes →LDL
P	Plasma
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCTA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
PDTC	Pyrollidin-Dithiocarbamat
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEG-SOD	Polyethylen-konjugierte →SOD
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PLP	Pyridoxalphosphat
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
<i>PROCAM</i>	<i>Prospective Cardiovascular Münster (-Study)</i>
PS(E)	Polysulfon-Membran (mit Vitamin-E-Coating)
Q(1-4)	Quartile (1-4)
r	Pearson-Korrelationskoeffizient
RBC	Erythrozyten (Red Blood Cells)
RCT	Randomisierte, kontrollierte Studie (Randomized Controlled Trial)
RFLP-PCR	Polymerase-Kettenreaktion mit Analyse des Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
RiLiBÄK	Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
RP-HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Umkehrphase (Reversed Phase)
r_s	Spearman-Korrelationskoeffizient
S	Serum
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SBD	Systolischer Blutdruck
SD	Standardabweichung

SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin (N ^ω ,N ^{ω'} -Dimethyl-L-Arginin)
SE	Standardfehler
S-Folat	Serum-Folat
SMC	glatte Gefäßmuskelzellen (Smooth Muscle Cells)
SOD	Superoxiddismutase
STZ	Streptozotocin
T(1-3)	Tertile (1-3)
T0	Zeitpunkt der Basisuntersuchung (November 2003)
T6	Zeitpunkt der Abschlussuntersuchung (Mai 2004)
TÄ	Tocopheroläquivalent
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TC	Gesamt-Cholesterol (Total Cholesterol)
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TG	Triglyceride
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
THF	Tetrahydrofolat
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
tHcy	Gesamt-Homocystein
TU	Taillenumfang
U	Units
UA	Harnsäure
V	Vollblut
(s)VCAM-1	(soluble) Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VISP	<i>Vitamin Intervention for Stroke Prevention (-Study)</i>
w	weiblich
WACS	<i>Women's Antioxidant Cardiovascular Disease Study</i>
WHO	World Health Organisation
ω	Omega

1 EINLEITUNG

Erkrankungen des atherosklerotischen Formenkreises, die neben der koronaren Herzkrankheit (KHK) auch zerebro- sowie peripher vaskuläre Ereignisse umfassen, zählen in den Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen im Erwachsenenalter. So ist in Deutschland etwa jeder fünfte Todesfall auf eine KHK zurückzuführen [LÖWEL 2006]. Bedingt durch die altersabhängige Inzidenz und die zunehmend älter werdende Bevölkerung ist in naher Zukunft mit einer Zunahme atherosklerotischer Erkrankungen, insbesondere der KHK, zu rechnen. Der für die kommenden Jahre prognostizierte Anstieg der Typ-2-Diabetes-Prävalenz könnte diesen Trend noch weiter forcieren [WILD et al. 2004; RIEDER 2004]. Vor dem Hintergrund der dieser Entwicklung innewohnenden sozioökonomischen Dimension sowie der Tatsache, dass bislang keine Konzepte zur kurativen Behandlung der KHK zur Verfügung stehen, gewinnen die Aufklärung der Ätiologie und eine darauf basierende Primärprävention an Gewicht. In diesem Zusammenhang wird der Ernährung ein zentraler Stellenwert eingeräumt [HU U. WILLETT 2002; SRINATH REDDY U. KATAN 2004; IGNARRO et al. 2007; MENTE et al. 2009].

Tatsächlich reicht die Erkenntnis, dass der atherosklerotische Prozess maßgeblich durch die Ernährung beeinflusst wird, bis an den Beginn des 20. Jahrhunderts und damit bereits auf eine längere Historie zurück: Ausgehend von der 1858 beschriebenen Entdeckung Virchows, wonach das menschliche Atherom Cholesterol enthält [VIRCHOW 1989], konnte durch Fütterungsversuche an Kaninchen gezeigt werden, dass eine cholesterolreiche Diät endotheliale Läsionen induziert, die makroskopisch den atherosklerotischen Läsionen des Menschen ähnlich sind [IGNATOWSKI 1909; ANITSCHKOW U. CHALATOV 1913]. Anknüpfend an diese Beobachtung ließ sich Jahrzehnte später durch groß angelegte Kohortenstudien – darunter der in diesem Zusammenhang populär gewordenen *Sieben-Länder-Studie* [KEYS 1980; KROMHOUT et al. 1995] – belegen, dass zwischen der Aufnahme an gesättigten Fettsäuren, der (LDL-)Cholesterol-Serumkonzentration und der KHK-Mortalität eine enge positive Assoziation besteht. Demgemäß rückte die auf die Arbeiten von BROWN U. GOLDSTEIN [1983] zurückgehende „Lipid-Hypothese“ Nahrungsfette und erhöhte LDL-Serumspiegel in den Mittelpunkt; eine Position, die sich heute zu *der* tragenden, wenn auch nicht unumstrittenen Säule der Ernährungsmedizin etabliert hat [RAVNSKOV 2002; WEINBERG 2004; LECERF 2009].

Durch den Fortgang der wissenschaftlichen Forschung wurde schließlich mehr und mehr deutlich, dass es sich bei der Atherosklerose um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung handelt. Entsprechend komplexer gestaltete sich die Vorstellung vom pathobiochemischen Prozess der Atherogenese, die heute in der Verknüpfung zweier sich ergänzender Modelle –

der „LDL-Oxidationshypothese“ [STEINBERG et al. 1989] und der „Response-to-injury-Hypothese“ [ROSS U. GLOMSET 1973; ROSS 1993] – ihren Niederschlag gefunden hat [BRIGELIUS-FLOHE´ 2002, S. 437]. Aus der Suche nach *dem* pathogenetisch relevanten Faktor resultierte hieraus nunmehr die Identifikation einer Vielzahl an Risikofaktoren; ein Umstand, der im Rahmen des KHK-Risikofaktorenkonzepts seine Berücksichtigung fand [ASSMANN et al. 1999; PEARSON 2002; HOHNLOSER 2008]. Die zunehmende Ausdifferenzierung der Risikofaktoren führte letztlich auch dazu, dass die Liste der „klassischen“, etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hyper-/Dyslipidämien, Hypertonie, Diabetes mellitus und Rauchen um eine Reihe „neuer“, potenzieller Risikofaktoren wie z. B. Hyperhomocysteinämie und erhöhtes C-reaktives Protein erweitert wurde [PEARSON 2002; LIAPIS et al. 2009].

Die Identifizierung des "L-Arginin-NO-Stoffwechselwegs" [MONCADA U. HIGGS 1993] und die damit in Zusammenhang stehende Isolierung, Klonierung und Charakterisierung der für die endotheliale NO-Synthese erforderlichen NO-Synthase (NOS) [BREDT U. SNYDER 1990; POLLOCK et al. 1991] stellte zu Beginn der 1990er Jahre schließlich einen neuen Meilenstein der Atheroskleroseforschung dar. So werden NO und seinem Präkursor L-Arginin inzwischen eine zentrale Stellung im atherosklerotischen Geschehen beigemessen. In den vergangenen Jahren hat sich das Forschungsinteresse daher zunehmend auf die Identifikation von Faktoren konzentriert, die einen Einfluss auf die Bildung und Verfügbarkeit von endotheliale NO ausüben [FÖRSTERMANN U. MÜNZEL 2006; YANG U. MING 2006]. Hierbei hat sich die Aufmerksamkeit insbesondere auf einen endogenen Inhibitor der NOS, das asymmetrische Dimethylarginin (ADMA), gerichtet. Obwohl bereits 1970 im menschlichen Urin nachgewiesen [KAKIMOTO U. AKAZAWA 1970], war die Bedeutung von ADMA im Rahmen der Atherogenese lange Zeit unbekannt. Zwischenzeitlich gilt ADMA jedoch als "globales kardiovaskuläres Risikomolekül" [FLISER 2005] bzw. als potenzieller kardiovaskulärer Risikofaktor [BÖGER 2003; COOKE 2005; KIELSTEIN U. ZOCCALI 2005]. Aus primärpräventiver Sicht erscheint dieser Umstand umso interessanter, da *In-vitro*-Befunden zufolge sowohl die Synthese als auch der Abbau von ADMA einen engen Bezug zu bekannten, einer diätetischen Therapie zugänglichen, proatherogenen Noxen wie Homocystein und oxidiertem LDL aufweist [ITO et al. 1999; BÖGER et al. 2000b; STÜHLINGER et al. 2001; JIANG et al. 2003; JIANG et al. 2006; TANG et al. 2006].

Handelt es sich bei ADMA also um das kleinste, aber zugleich zentrale Teilchen im großen „Atherosklerose-Puzzle“ und damit auch dem kleinsten gemeinsamen Nenner für eine ernährungsmedizinische Intervention? Zur Klärung dieser Frage soll die hier vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 ENDOTHELIALE (DYS-)FUNKTION - BEDEUTUNG FÜR DIE ATHEROGENESE

Obwohl zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahrzehnte zur Klärung der molekularen Pathomechanismen beigetragen haben, ist die Entstehung und Progression atherosklerotischer Erkrankungen bis heute noch nicht in allen Details erforscht. Als ein wesentlicher Schwerpunkt rückte hierbei zunehmend das Gefäßendothel in den Fokus, was sich u. a. an der erstmals 1973 von Ross und Glomset beschriebenen und später modifizierten „Response-to-injury-Hypothese“ zeigt [ROSS U. GLOMSET 1973; ROSS 1993]. Dieses zur Erklärung der Atherosklerose-Entstehung allgemein etablierte Modell beschreibt die Atherogenese als einen reaktiven, inflammatorischen Prozess („chronic low grade inflammation“), an dessen Anfang die Verletzung des Endothels durch verschiedene proatherogene und als kardiovaskuläre Risikofaktoren bekannte Noxen (z. B. Hyperlipidämie, Hypertonie, Nikotin und/oder Hyperhomocysteinämie) steht [BRIGELIUS-FLOHE´ 2002, S. 437; STOCKER U. KEANEY 2004]. Kennzeichen dieser initialen Phase, die der Entstehung atherosklerotischer Läsionen vorausgeht, ist eine Störung der physiologischen Endothelfunktion („endotheliale Dysfunktion“), die nach heutigem Kenntnisstand ein zentrales pathogenetisches Schlüsselereignis der Atherosklerose darstellt [HADI et al. 2005; YANG U. MING 2006; HAYOZ U. MAZZOLAI 2007]. Hiermit assoziierte Vorgänge wie die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen und das Rekrutieren von im Blut zirkulierenden Immunzellen (v. a. Monozyten) spiegeln dabei charakteristische Reparaturmechanismen im Sinne einer „Antwort auf Schaden“ wider, die durch überschießende Reaktion zu irreparablen Schäden und zu den für die Atherosklerose typischen Lipidablagerungen in der Gefäßwand führen [BRIGELIUS-FLOHE´ 2002, S. 437; STOCKER U. KEANEY 2004].

Angesichts der Bedeutung des Endothels als Dreh- und Angelpunkt des atherosklerotischen Geschehens wird nachfolgend zunächst auf die für die Gefäßintegrität elementaren Endothelfunktionen sowie die damit verbundene Rolle des L-Arginin-NO-Systems detaillierter eingegangen. Daran anschließend sollen die pathophysiologischen Konsequenzen sowie die einer endothelialen Dysfunktion zugrunde liegenden Ursachen näher betrachtet werden, die die biochemische Grundlage für das proatherogene Potenzial einer erhöhten ADMA-Plasmakonzentration bilden.

2.1.1 PHYSIOLOGISCHE FUNKTIONEN DES ENDOTHELIS UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES L-ARGININ-NO-SYSTEMS

Das Endothel, das den morphologischen Abschluss der Gefäßintima zur Lumenseite hin bildet, wurde lange Zeit als mehr oder weniger inerte Zellschicht angesehen, deren Funktion allein darin besteht, die ungehinderte Diffusion von Makromolekülen in tiefere Gefäßwand-schichten sowie das umgebende Interstitium zu verhindern. Inzwischen ist jedoch erwiesen, dass das Endothel vielfältige regulatorische Aufgaben wahrnimmt, die über die rein mecha-nische Funktion als „bloße Zellbarriere“ hinausgehen [SIMON et al. 1999; ESPER et al. 2006; STÜHLINGER 2007]. So moduliert das intakte Endothel zahlreiche, für die Gefäßhomöostase essenzielle Vorgänge, indem es

- eine zentrale Rolle bei der Regulation der Gefäßweite und damit des lokalen Gefäß-tonus (Blutdruck) einnimmt,
- die Monozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation hemmt und hierdurch einen antiadhäsiven und antithrombotischen Zustand aufrecht erhält [QUASCHNING et al. 2000; LÜSCHER et al. 1997; KELM U. RATH 2001],
- an der Vermittlung inflammatorischer Prozesse sowie der Kontrolle des koagulatorisch-fibrinolytischen Gleichgewichts beteiligt ist [CELERMAJER 1997; ESPER et al. 2006],
- vaskuläre Wachstumsprozesse steuert sowie die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen (SMC) aus der Media hemmt, wodurch es maßgeblichen Einfluss auf die Gefäßarchitektur ausübt [QUASCHNING et al. 2000; LÜSCHER et al. 1997; KELM U. STRAUER 1999] und
- den oxidativen Stress in der Gefäßwand durch Neutralisation reaktiver Sauerstoff-spezies (ROS) vermindert [CAI U. HARRISON 2000; ESPER et al. 2006].

Angesichts dieser Vielfalt an Funktionen stellt das Endothel ein hochaktives Gewebe dar, das die jeweiligen Regulationsvorgänge in seiner Eigenschaft als endo-, para- sowie auto-krinem Organ vermittelt [SIMON et al. 1999; HADI et al. 2005]. Bedingt durch seine ana-tomische Position zwischen Blutstrom und Gefäßwand, in der es den physiko-chemischen Stimuli beider Kompartimente ausgesetzt ist, reagiert das Endothel mit der Synthese und Sekretion einer Reihe vasoaktiver Verbindungen („endotheliale Autakoide“, vgl. Tab. A1, Anhang B), die sowohl agonistische als auch antagonistische Wirkungen entfalten. Dies wiederum ermöglicht eine an den aktuellen Bedarf ausgerichtete Anpassung der jeweiligen Gefäßfunktionen, deren Gesamtwirkung vom Gleichgewicht der vasoaktiven Substanzen und damit von der funktionellen Intaktheit des Endothels abhängig ist [SIMON et al. 1999; ESPER et al. 2006; HAYOZ U. MAZZOLAI 2007].

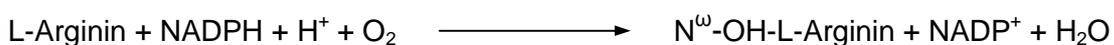
Einer der in diesem Zusammenhang zentralen und bis heute am besten charakterisierten endothelialen Mediatoren stellt Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide, NO), eine bis Mitte der 1980er Jahre als „Endothelium Derived Relaxing Factor“ (EDRF) bezeichnete Verbindung [FURCHGOTT 1984; PALMER et al. 1987], dar. Seine Entdeckung geht auf die Arbeiten von FURCHGOTT U. ZAWADZKI zurück, die 1980 erstmalig die Essentialität eines morphologisch intakten Endothels für die durch den endogenen Vasodilatator Acetylcholin *in vitro* vermittelte Gefäßrelaxation beschrieben. Dieser Effekt wurde auf eine von Endothelzellen (EC) synthetisierte, kurzlebige und diffusible Substanz zurückgeführt, die ihre Wirkung an glatten Gefäßmuskelzellen entfaltet [FURCHGOTT 1984]. Wenige Jahre später gelang IGNARRO und MONCADA unabhängig voneinander der Nachweis, dass EDRF pharmakologisch und chemisch identisch mit NO¹ bzw. einer mit NO verwandten Verbindung ist [IGNARRO et al. 1987; PALMER et al. 1987; MONCADA et al. 1988]. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die semi-essenzielle Aminosäure L-Arginin den Präkursor von NO darstellt [PALMER et al. 1988], was Anfang der 1990er Jahre zur Identifikation des für diese Reaktion notwendigen Enzyms NO-Synthase [BREDT U. SNYDER 1990; POLLOCK et al. 1991] und Aufklärung des nachfolgend dargestellten NO-Biosynthesewegs geführt hat.

2.1.1.1 Biochemie des endothelialen NO-Systems

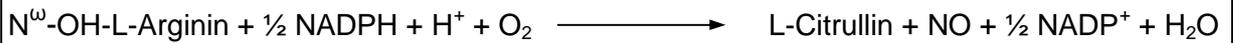
NO-Biosynthese: Der „L-Arginin-NO-Stoffwechselweg“

Die als „L-Arginin-NO-Stoffwechselweg“ bezeichnete [MONCADA U. HIGGS 1993] und durch das Enzym NO-Synthase (NOS, EC 1.14.13.39) katalysierte Biosynthese von NO erfolgt durch Oxidation und Abspaltung des terminalen L-Arginin-Guanidino-Stickstoffs (N^ω-Atom), wobei molekularer Sauerstoff (O₂) als Substrat für das NO-Sauerstoffatom fungiert. Neben NADPH in seiner Funktion als Elektronendonator benötigt die Reaktion eine Reihe von Cofaktoren, zu denen Tetrahydrobiopterin (BH₄), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavin-mononukleotid (FMN), Häm (Eisen-Protoporphyrin IX) sowie das Ca²⁺-bindende Regulatorprotein Calmodulin (CaM) zählen [KERWIN et al. 1995; TSCHUDI U. LÜSCHER 1996; VALLANCE U. HINGORANI 1999]. Die Katalyse selbst erfolgt in zwei Teilreaktionen, wobei die Bildung des stabilen Zwischenmetaboliten N^ω-Hydroxy-L-Arginin den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt [STUEHR 1999; BOUCHER et al. 1999; MANN et al. 2003]:

(1) L-Arginin-N^ω-Hydroxylase-Reaktion (HDX):



¹ Falls nicht explizit anders ausgewiesen, wird in den nachfolgenden Ausführung die Bezeichnung NO synonym für die eigentlich radikalisch wirksame NO^{*}-Verbindung verwendet.

(2) N^ω-OH-L-Arginin-Monooxygenase-Reaktion (HAMO):

L-Citrullin, das als äquimolares Nebenprodukt aus der Reaktion hervorgeht, kann durch einen intrazellulär lokalisierten und als „L-Citrullin-NO-Zyklus“ bezeichneten Stoffwechselweg zu L-Arginin reutilisiert und damit der NO-Synthese erneut zur Verfügung gestellt werden. Die Konversion beinhaltet eine zweistufige Reaktionsfolge, die den Argininosuccinat-Synthetase (ASS) und Argininosuccinat-Lyase (ASL) katalysierten Teilschritten des Harnstoffzyklus entspricht (vgl. Abb. 1) [MORI U. GOTOH 2000; ROMERO et al. 2006; MORI 2007]. Der weitere Anteil der für die NO-Synthese erforderlichen Substratbereitstellung entstammt hingegen dem extrazellulären L-Arginin, das über spezifische membranständige Transportproteine in die Zelle aufgenommen wird. In Endothelzellen erfüllt diese Funktion vornehmlich das γ^+ -System, ein Na^+ -unabhängiges Transportsystem, das der Familie der „Cationic Amino Acid Transporter“ (CAT) zugeordnet wird. Daneben existieren die für kationische Aminosäuren ebenfalls spezifischen Systeme γ^{L} , $b^{0,+}$ (Na^+ -unabhängig) bzw. $B^{0,+}$ (Na^+ -abhängig), welche zu den sog. „Broad Scope“-Transportern (BAT) zählen und den quantitativ geringeren Anteil des endothelialen L-Arginin-Imports vermitteln [SALA et al. 2002; ZANI U. BOHLEN 2005; MANN et al. 2003].

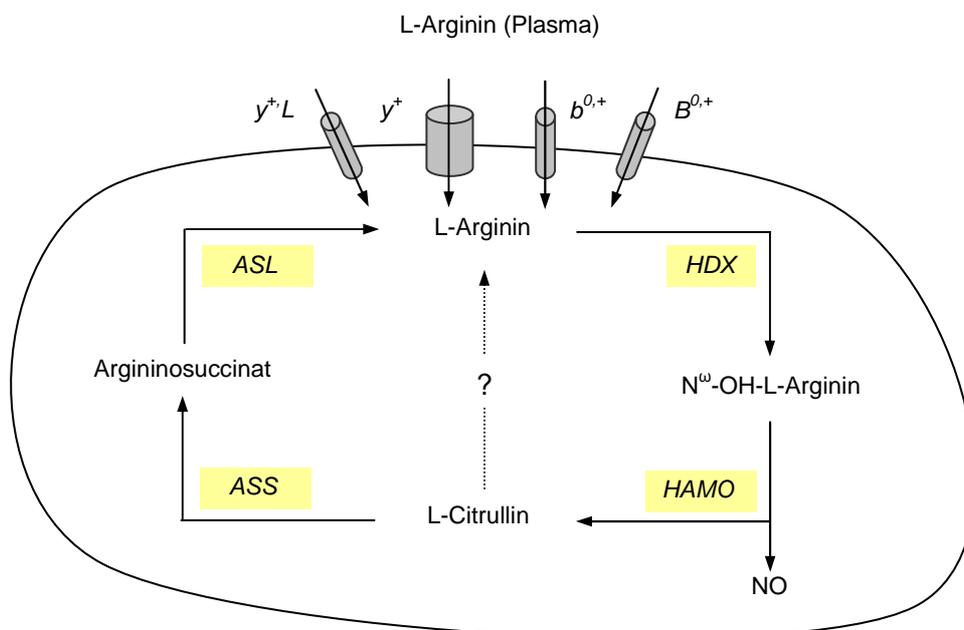


Abb. 1: L-Arginin-NO-Stoffwechselweg, L-Citrullin-NO-Zyklus und L-Arginin-Transportsysteme der Endothelzelle [modifiziert nach MANN et al. 2003]. ASL: Argininosuccinat-Lyase, ASS: Argininosuccinat-Synthetase, HAMO: N^ω-OH-L-Arginin-Monooxygenase, HDX: L-Arginin-N^ω-Hydroxylase.

Struktur, Isoformen und Regulation von NO-Synthasen (NOS)

Strukturell handelt es sich bei der katalytisch aktiven Form der NOS um ein Dimer aus zwei homologen, monomeren Untereinheiten [NAPOLI et al. 2006; FÖRSTERMANN U. MÜNDEL 2006], die sowohl sequenziell als auch funktionell in drei verschiedene Abschnitte unterteilt werden können (vgl. Abb. A1, Anhang A): N-terminale Oxygenase-Domäne, zentrale CaM-Bindungsdomäne sowie C-terminale Reduktase-Domäne [STUEHR 1999; BOUCHER et al. 1999]. Träger des aktiven Zentrums stellt die Kernregion der Oxygenase-Domäne dar, die ferner für das Anhaften von L-Arginin, molekularem Sauerstoff, BH₄ und Häm verantwortlich ist. Die Reduktase-Domäne verfügt demgegenüber über die für NADPH, FAD und FMN erforderlichen Bindungsstellen und weist damit eine hohe Sequenzhomologie zur NADPH-abhängigen Cytochrom-P₄₅₀-Reduktase auf [BOUCHER et al. 1999; KERWIN et al. 1995]. Der dabei von NADPH, über FAD und FMN stattfindende Elektronentransfer wird durch die Anlagerung von CaM an die zwischen der Oxygenase- und Reduktase-Domäne lokalisierte CaM-Bindungsdomäne erhöht, wodurch die Häm- und BH₄-vermittelte Reduktion von molekularem Sauerstoff an den initialen Oxidationsschritt der NO-Katalyse (L-Arginin-N^ω-Hydroxylase-Reaktion, s. o.) gekoppelt wird. Hierbei fungiert die Häm-Gruppe nicht nur als zentrales Bindeglied für den in Abb. A1 dargestellten Elektronentransfer zwischen beiden monomeren NOS-Polypeptidketten, sondern gilt zudem als essenzieller Faktor für die Ausbildung der aktiven Dimerstruktur, für deren physikalische Stabilität ferner die Gegenwart von BH₄ erforderlich ist [STUEHR 1999; FÖRSTERMANN U. MÜNDEL 2006; SCHMIDT U. ALP 2007].

Die Bildung von NO ist nicht allein auf Endothelzellen beschränkt, sondern findet in einer Vielzahl von Geweben und Körperzellen statt. So existieren je nach Expressionsort drei verschiedene NOS-Isoenzyme (vgl. Tab. 1), die ihrerseits in konstitutive, d. h. permanent exprimierte NOS (cNOS) sowie induzierbare NOS (iNOS) unterteilt werden² [KERWIN et al. 1995; BOUCHER et al. 1999]. Die Gruppe der **konstitutiven NOS** umfasst die hauptsächlich in neuronalen Zellen vorkommende NOS-I (nNOS) sowie die in Endothelzellen exprimierte NOS-III (eNOS). Beide Isoformen sind dadurch charakterisiert, dass sie kontinuierlich geringe NO-Mengen freisetzen und damit im Wesentlichen die unter physiologischen Bedingungen erforderlichen NO-(Botenstoff-)Funktionen innerhalb des neuronalen und kardiovaskulären Systems (vgl. Kap. 2.1.1.2) vermitteln [BAUER 1997; SCHMIDT et al. 1997; BILLIAR 1995]. Die vornehmlich in Makrophagen aber auch in vielen anderen Zellen vorkommende NOS-II (mNOS) stellt demgegenüber eine ausschließlich **induzierbare NOS-Form** dar, deren Expression durch proinflammatorische Zytokine (u. a. TNF- α , IL-1, Inter-

² Obwohl für die „konstitutiven“ NOS-Formen inzwischen auch auf Ebene der Genexpression verschiedene Regulationsmechanismen bekannt sind (vgl. Tab. 1), handelt es sich bei der Unterscheidung zwischen cNOS und iNOS um eine in der aktuellen Literatur weiterhin gebräuchliche Klassifizierung [BÖGER 2007].

feron- γ) und Endotoxine wie z. B. bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) stimuliert wird. Im Gegensatz zu den konstitutiv exprimierten NOS, deren NO-Wirkdauer sich auf Sekunden bis Minuten erstreckt, führt die Biosynthese des NOS-II-Proteins zu einer über Stunden bis Tage andauernden Bildung großer NO-Mengen, wobei ein zytotoxischer Konzentrationsbereich erreicht wird. Dieser Vorgang ist v. a. für die unspezifische Immunabwehr sowie zellapoptotische und -nekrotische Prozesse von zentraler Bedeutung [KERWIN et al. 1995; BAUER 1997; MURPHY 1999].

Die Regulation der NOS-Isoenzyme und damit die NO-Produktion unterliegt einer fein abgestimmten Steuerung, wobei zwei wesentliche Kontrollebenen zu unterscheiden sind: Während die NOS-II primär der **transkriptionalen Kontrolle** unterliegt, werden die konstitutiven Isoformen NOS-I und NOS-III vorwiegend posttranslational durch Veränderung der Enzymaktivität gesteuert. Eine für die **Aktivitätskontrolle** zentrale Regelgröße stellt dabei die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration dar, da ihr Anstieg zu einer reversiblen Bindung von CaM an das NOS-Homodimer und der damit verbundenen Aktivierung des Enzyms führt [BAUER 1997; ARNAL et al. 1999; FLEMING et al. 1997]. Auf diese Weise kann über verschiedene, den intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt erhöhende Effektoren die NO-Bildung aus den konstitutiven NOS-Formen gesteigert und an den physiologischen Bedarf angepasst werden (stimulierte NO-Freisetzung). In Endothelzellen erfolgt dies zum einen rezeptorvermittelt über Agonisten wie Acetylcholin, Histamin, Bradykinin, Adenosin sowie durch Substanzen, die aus aggregierten Thrombozyten freigesetzt werden (u. a. Serotonin, ADP/ATP, Thrombin). Zum anderen können rezeptorunabhängige Agonisten wie Calcium-Ionophore oder eine durch mechanische Einflüsse (Scher- und Dehnungskräfte, pulsatile Druckschwankungen) bedingte Änderung der Gefäßwandspannung die NO-Freisetzung durch Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms verstärken. Hierbei gelten letztere als die wahrscheinlich wesentlichen physiologischen Stimuli der endothelialen NO-Synthese [SHIMOKAWA 1999; TSCHUDI U. LÜSCHER 1996; ZAGO U. ZANESCO 2006]. Eine weitere, von der Ca^{2+} /CaM-Interaktion unabhängige Form der posttranslationalen Aktivitätsregulation stellt die Phosphorylierung von an der Oxygenase-Domäne lokalisierten Serin- und Threoninresten dar, welche ebenfalls sowohl durch chemische (z. B. Bradykinin) als auch hämodynamische Stimuli (z. B. Scherstress) induziert wird [FLEMING et al. 1997; MICHEL et al. 1993; CORSON et al. 1996]. Darüber hinaus kann die NOS-Aktivität durch die Bindung von NO an die Häm-Gruppe im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus reversibel gehemmt werden. Zu weiteren Faktoren, die die Enzymaktivität beeinflussen, zählen u. a. die Verfügbarkeit von L-Arginin und Cofaktoren wie BH_4 als auch die Präsenz methylierter L-Arginin-Analoga (vgl. Kap. 2.2.1), die als endogene Antagonisten eine kompetitive Hemmung der NOS bewirken [BAUER 1997; YANG U. MING 2006; STÜHLINGER 2007].

Tab. 1: Eigenschaften und enzymkinetische Merkmale der NOS-Isoformen [zusammengestellt nach KERWIN et al. 1995; BAUER 1997; HARRISON 1997; BOUCHER et al. 1999; ARNAL et al. 1999]

	NOS-I	NOS-II	NOS-III
Nomenklatur	NOS 1, nNOS, ncNOS, cNOS	NOS 2, mNOS, iNOS	NOS 3, eNOS, ecNOS, cNOS
Molekülmasse (Monomer)	160 kDa	130 kDa	135 kDa
K_{mL-Arg}	2-5 $\mu\text{mol/l}$	2-15 $\mu\text{mol/l}$	2-30 $\mu\text{mol/l}$
Genlokalisierung	Chromosom 12	Chromosom 17	Chromosom 7
Expressionsort	u. a.: Neurone (zentrales und peripheres NS), Endothelzellen, Macula densa Zellen (Niere), Inselzellen (Pancreas)	ubiquitär, u. a.: Makrophagen, SMC, Fibroblasten, Kardiomyozyten, Hepatozyten	Endothelzellen, Thrombozyten, Kardiomyozyten
zelluläre Lokalisation	Cytosol	Cytosol	Cytosol, Plasmamembran (Caveolae)
Expression	konstitutiv, induzierbar	induzierbar	konstitutiv, induzierbar
NO-Produktion	<u>basal:</u> niedrig <u>stimuliert:</u> gering (picomolar), transient	<u>basal:</u> keine <u>stimuliert:</u> hoch (nanomolar), langandauernd	<u>basal:</u> niedrig <u>stimuliert:</u> gering (picomolar), transient
NO-Funktion	Signalmolekül	zytotoxischer, zytostatischer und mutagener Effektor	Signalmolekül
transkriptionale Kontrolle	+ Östrogene	u. a.: + TNF- α , + IL-1, + Interferon- γ , + NF κ B, + bakterielle LPS, - NO, - Glucokortikoide	u. a.: + Scherstress, + Östrogene, + Statine, - Hypoxie, - oxLDL, - TNF- α
Aktivitätskontrolle	Ca ²⁺ /CaM-Interaktion, Dimerisierung, Phosphorylierung	Dimerisierung, Phosphorylierung	Ca ²⁺ /CaM-Interaktion, Dimerisierung, Phosphorylierung
Ca ²⁺ /CaM-Interaktion	erforderlich	nicht erforderlich (hohe CaM-Bindungsaffinität)	erforderlich

+ Induktion, - Repression, CaM: Calmodulin, IL-1: Interleukin-1, LPS: Lipopolysaccharide, NF κ B: nukleärer Transkriptionsfaktor κ B, SMC: glatte Gefäßmuskelzelle, TNF- α : Tumornekrosefaktor- α

NO - Chemische Charakteristik, Reaktivität und Metabolismus

NO ist ein ungeladenes, gasförmiges Molekül mit einer biologischen Halbwertszeit von wenigen Sekunden. Aufgrund seines freien, ungepaarten Elektrons ist es chemisch als freies Radikal (NO^{*}) einzustufen, das eine hohe Reaktivität mit anderen Radikalen und Biomolekülen, nicht jedoch mit sich selbst aufweist. Dabei kann NO sowohl als oxidierendes als auch reduzierendes Agens fungieren [BILLIAR 1995; ARCHER 1993]. Bedingt durch seinen hydrophoben Charakter und sein geringes Molekulargewicht besitzt NO zudem die Eigenschaft, biologische Membranen leicht zu passieren, wobei die transzelluläre Diffusion

schneller vollzogen ist als die intrazellulär stattfindenden Reaktionen. Dies ermöglicht, dass NO trotz seiner extremen Kurzlebigkeit neben autokrinen auch parakrine Wirkungen in angrenzenden sowie weiter entfernten Zellen entfalten kann [MURPHY 1999; DENNINGER U. MARLETTA 1999].

Das Wirkpotenzial von NO, das neben vielfältigen physiologischen auch potenziell pathobiochemisch relevante Funktionen umfasst, hängt einerseits von der Konzentration des reaktiven Radikals sowie andererseits von der Wechselwirkung mit einer Vielzahl von Reaktionspartnern ab [HELLWIG 1994]. Die hierbei wesentlichen Reaktionen bzw. Interaktionen umfassen:

(1) Die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (NO-cGMP-Signalweg): Die Stimulation der löslichen Guanylatzyklase, eines Häm-haltigen Enzyms, das die Synthese von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) katalysiert, stellt den wohl bedeutendsten molekularen Wirkmechanismus von NO dar (vgl. Kap. 2.1.1.2, Abb. 2). Voraussetzung für die Aktivierung ist die reversible Bindung von NO an die Häm-Gruppe, was zur Ausbildung von Nitrosyl-Häm-Addukten und nachfolgender Konformationsänderung des Enzyms führt [MÜLLER et al. 2002; DENNINGER U. MARLETTA 1999]. Dem hieraus resultierenden Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration ist die Aktivierung cGMP-regulierter Proteinkinasen, Phosphodiesterasen sowie Ionenkanäle nachgeschaltet, wodurch die eigentliche Zellantwort ausgelöst wird [IGNARRO et al. 1999; SCHMIDT et al. 1997].

(2) Die Reaktion mit Superoxidradikalen: Diese auch als $O_2^{\bullet-}$ -Scavenger-Funktion bezeichnete Reaktion, die wesentlich zur antioxidativen Wirkung von NO (vgl. Kap. 2.1.1.2) wie auch dessen prooxidativen Potenzial sowie Inaktivierung beiträgt, ist ein *in vivo* sehr schnell ablaufender Prozess, der zur Bildung des Zwischenprodukts Peroxynitrit ($ONOO^-$) führt. Peroxynitrit ist ein starkes, in alkalischer Lösung stabiles Oxidanz, das durch molekulare Umlagerung zu biologisch inaktivem Nitrat (NO_3^- , vgl. S. 11f) weiterreagiert bzw. nach Protonierung ($ONOOH$) und homolytischer Spaltung zu Hydroxylradikalen (OH^\bullet) und radikalischem Stickstoffdioxid (NO_2^\bullet) zerfällt [PRYOR U. SQUADRITO 1995; KERWIN et al. 1995]. Sein oxidatives Potenzial wie auch die radikalischen Zerfallsprodukte bewirken eine Reihe von Folgereaktionen, die u. a. die Initiierung der Lipidperoxidation, die Oxidation von LDL-Lipoproteinen, Thiolgruppen und DNA-Basen, die Nitrosylierung von Proteinen bzw. Thiolen (vgl. Reaktion 4) sowie eine gesteigerte Zytotoxizität im Rahmen unspezifischer Abwehrmechanismen umfassen [MÜLLER et al. 2002; HOGG U. KALYANARAMAN 1999; MURPHY 1999]. Vor dem Hintergrund dieser vorwiegend schädlichen Effekte wird eine gesteigerte Peroxynitrit-Bildung unter physiologischen Bedingungen durch die gleichzeitige Präsenz von Superoxiddismutasen (SOD) verhindert. So konkurriert die Bildung von Peroxynitrit mit der Bildung

von H_2O_2 durch Dismutation von $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikalen, die aufgrund des im Vergleich zu NO weit aus höheren intrazellulären SOD-Gehalts bevorzugt abläuft. Der Superoxid-Neutralisation durch SODs kommt damit eine wichtige „NO-konservierende“ Bedeutung zu, das hierdurch anderen Reaktionen zur Verfügung stehen kann [MÜLLER et al. 2002; CAI U. HARRISON 2000; TSIKAS 2005].

(3) Die Reaktion mit Lipidradikalen: Neben Superoxidradikalen kann NO direkt mit Lipid-Alkoxy(LO^{\cdot})- und Lipid-Peroxy-Radikalen (LOO^{\cdot}) reagieren und auf diese Weise die Kette autokatalytischer Reaktionen, wie sie z. B. im Rahmen der LDL-Oxidation auftreten, terminieren [CAI U. HARRISON 2000; HOGG U. KALYANARAMAN 1999].

(4) Die Nitrosylierung von Thiolgruppen (Bildung von S-Nitrosothiolen, R-SNO): Eine weitere, für die biologische Wirkung von NO wichtige Rolle spielt die kovalente Bindung von NO an SH-Gruppen in niedermolekularen Thiolverbindungen oder Proteinen. Diese führt zur Bildung verschiedener S-Nitrosotholderivate (u. a. S-Nitroso-Glutathion, S-Nitroso-Albumin, S-Nitroso-Cystein), in denen NO fixiert und durch Reduktion freigesetzt werden kann (endogene NO-Donatoren) [GIUSTARINI et al. 2003; KELM 1999; MURPHY 1999]. Dies wiederum bewirkt eine verlängerte Halbwertszeit sowie Stabilisierung des ansonsten sehr reaktiven NO-Radikals und ermöglicht dessen Speicherung sowie Transport im Plasma. Des Weiteren konnten für verschiedene S-Nitrosoverbindungen NO-mimetische Wirkungen (u. a. vasorelaxierende und antiaggregatorische Effekte, vgl. Kap. 2.1.1.2) nachgewiesen werden [HOGG 2002; GIUSTARINI et al. 2003; AL-SA'DONI U. FERRO 2004].

(5) Die Interaktion mit Häm-Gruppen: NO besitzt eine hohe Affinität für Häm-Gruppen, weshalb es sowohl in der Lage ist, mit verschiedenen Hämoglobin-Derivaten zu reagieren [KELM 1999; KERWIN et al. 1995], als auch zahlreiche enzymatische Prozesse zu modulieren [BAUER 1997]: Neben der negativen Feedback-Regulation der NO-Synthase und der eingangs beschriebenen Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase sind hierbei insbesondere Interaktionen mit Enzymen des Intermediärstoffwechsels (Glycolyse, Citratzyklus, mitochondriale Atmungskette) sowie des Nukleotidstoffwechsels (z. B. Ribonukleotid-Reduktase) zu nennen. Ein weiterer Effekt, der auf eine entsprechende Wechselwirkung zwischen NO und Häm-Proteinen zurückgeführt wird, stellt die Hemmung der Cyclooxygenase- bzw. Lipoxygenase-katalysierten Bildung von Prostanoiden und Leukotrienen aus Arachidonsäure dar [HOGG U. KALYANARAMAN 1999].

Obwohl die intermediär aus der Reaktion von NO und seinen Reaktionspartnern hervorgehenden Produkte sehr vielfältig sind, scheinen die meisten NO-Stoffwechselwege in die Bildung der biologisch inaktiven Endprodukte Nitrit (NO_2^-) bzw. Nitrat (NO_3^-) zu münden. So wird NO, das u. a. aus S-Nitrosoverbindungen freigesetzt wird, im wässrigen Milieu rasch zu

Nitrit autoxydiert, das – je nach Redoxbedingungen und Medium – nahezu quantitativ zu Nitrat umgesetzt und renal eliminiert wird. Eine unter physiologischen Bedingungen ebenfalls bedeutsame Form der NO-Inaktivierung stellt die Oxidation zu Nitrat in Anwesenheit von Oxy-Hämoglobin (HbO₂) dar [TSIKAS 2005; KELM 1999; MURPHY 1999]. Da sowohl der primäre Oxidationsmetabolit Nitrit als auch das Hauptabbauprodukt Nitrat eine hohe Stabilität in biologischen Materialien wie Plasma und Urin aufweisen, kann ihre quantitative Bestimmung als wichtiger *In-vivo*-Marker für die endogene NO-Bildung herangezogen werden. Die Nitrit-Plasmakonzentration gilt in diesem Zusammenhang als wesentlicher Indikator für kurzfristige Veränderungen der NO-Syntheserate, während die renale Nitrat-Exkretion bzw. die Ausscheidungsrate der inaktiven Oxidationsmetabolite Nitrat/Nitrit (Urin-NO_x-Ausscheidung) die systemische NO-Bildung sowie längerfristige Veränderungen reflektiert [TSIKAS 2004; TSIKAS 2005; SCHWEDHELM et al. 2007]. Ein ähnlich sensitives Maß der systemischen NO-Produktion stellt die renale cGMP-Ausscheidungsrate dar, die insbesondere Rückschlüsse auf biologisch aktives NO zulässt [ARCHER 1993; SCHWEDHELM et al. 2007].

Die im Rahmen dieses Abschnitts dargestellten (bio-)chemischen NO-Charakteristika, bilden die Grundlage für die vielfältigen physiologischen Effekte, die NO u. a. im Rahmen des kardiovaskulären Systems vermittelt. Diese, für die Gefäßintegrität essenziellen Funktionen, sollen im Folgenden näher erörtert werden.

2.1.1.2 Vasoprotektive Wirkmechanismen von NO

Endotheliales NO gilt nach gegenwärtigem Erkenntnisstand als eine der bedeutensten vasoaktiven Substanzen, da es nicht nur maßgeblich an der Vermittlung der für die Gefäßhomöostase grundlegenden Funktionen beteiligt ist, sondern über diese zugleich eine Reihe vasoprotektiver Effekte entfaltet. Zu diesen Wirkungen, die NO u. a. die Bezeichnung als „*endogenem, anti-atherosklerotischem Molekül* [COOKE u. DZAU 1997]“ verliehen haben, zählen [BODE-BÖGER et al. 1997; SHIMOKAWA 1999; BÖGER 2003; BÖGER et al. 2003]

- die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (vasodilatatorische Funktion),
- die Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation,
- die Hemmung der Monozytenadhäsion und -infiltration,
- die Abnahme der glattmuskulären Proliferation und Migration sowie
- die Herabsetzung des vaskulären oxidativen Stresses.

In Endothelzellen synthetisiertes NO wird sowohl nach luminal als auch nach abluminal sezerniert und gelangt über Diffusion zu den für das vaskuläre System relevanten Effektorzellen. Diese umfassen verschiedene Zelltypen wie z. B. Thrombozyten und Leukozyten auf

der Blutseite sowie Endothelzellen und SMC auf der Gefäßwandseite [TSCHUDI U. LÜSCHER 1996; SCHMIDT et al. 1997]. Das hierbei am besten untersuchte vaskuläre NO-Effektorsystem stellt die Aktivierung des NO-cGMP-Signalwegs in SMC dar, über die NO seinen **vasodilatatorischen Effekt** entfaltet. Die in der Literatur häufig mit dem Begriff der „endothelabhängigen Vasodilatation³“ gleichgesetzte Wirkung [QUASCHNING et al. 2000] trägt sowohl zur Aufrechterhaltung des Ruhetonus als auch zur Anpassung der Gefäßweite unter physischer Belastung bei, wobei sie insbesondere dem vasokonstriktorischem Einfluss des sympathischen Nervensystems, des Renin-Angiotensin-Systems sowie dem zahlreicher endothelialer Gegenspieler (vgl. Tab. A1, Anhang B) gegenübersteht [LÜSCHER et al. 1997; ZAGO U. ZANESCO 2006; LI U. FÖRSTERMANN 2000]. Ein auf molekularer Ebene wesentlicher Mechanismus der NO-cGMP induzierten Vasorelaxation beruht auf der Stimulation cGMP-abhängiger Proteinkinasen, welche die Phosphorylierung verschiedener Membranproteine des sarkoplasmatischen Retikulums induzieren. Die Folge daraus ist eine Absenkung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, was zu einer konsekutiven Hemmung der glattmuskulären Vasokonstriktion führt. Daneben bewirkt NO eine Hyperpolarisation der SMC-Zellmembran durch Öffnung Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle, die sowohl abhängig als auch unabhängig von der cGMP-Bildung erfolgen kann [CARVAJAL et al. 2000; HOFMANN et al. 2000; MÜLLER et al. 2002].

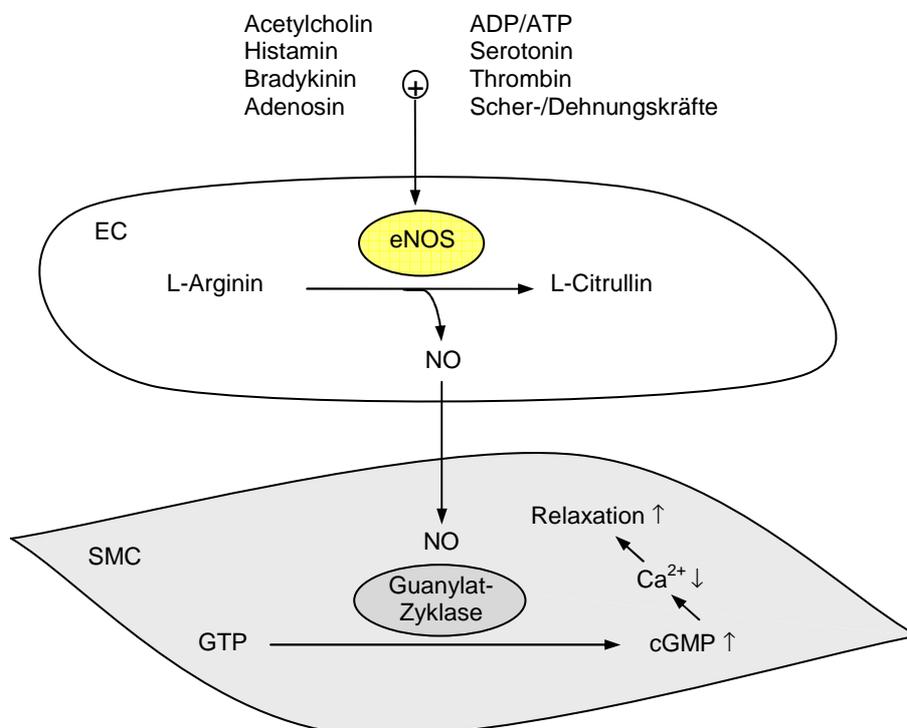


Abb. 2: Bildung und vasodilatatorische Wirkung von NO [eigene Darstellung]. ADP: Adenosindiphosphat, ATP: Adenosintriphosphat, cGMP: zyklisches Guanodinmonophosphat, EC: Endothelzelle, GTP: Guanodintriphosphat, SMC: glatte Gefäßmuskelzelle.

³ Diese umfasst im engeren Sinne auch die Wirkung weiterer vasodilatatorischer Mediatoren endothelialen Ursprungs wie z. B. PCl_2 oder EDHF (vgl. Tab. A1, Anhang B).

Eine weitere, durch den NO-cGMP-Signalweg induzierte Wirkung stellt die Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation dar, die analog zum vasodilatatorischen Effektormechanismus über die Aktivierung von Proteinkinasen und Modulation des freien Ca^{2+} -Gehalts gesteuert wird. Der plättcheninhibitorische und damit **antithrombotische Effekt** erfolgt im synergistischen Zusammenspiel mit Prostacyclin I_2 , das über einen cAMP-vermittelten Signalweg zur Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beiträgt [HOFMANN et al. 2000; BIRSCHMANN U. WALTER 2004]. Auf diese Weise wirkt NO nicht nur der Bildung von Thromben, sondern auch der sich aus der Plättchenaktivierung ableitenden Sekretion von Wachstumsfaktoren und hierdurch sekundär der SMC-Proliferation (s. u.) entgegen [CANNON 1998; LI U. FÖRSTERMANN 2000]. Andererseits führen aus aggregierten Thrombozyten sezernierte Substanzen wie z. B. ATP oder Serotonin zu einer stimulierten NO-Freisetzung, wodurch der proaggregatorische Prozess im Sinne einer negativen Rückkopplung abgeschwächt wird [LÜSCHER et al. 1997; QUASCHNING et al. 2000].

NO stellt zudem einen potenten Inhibitor der Monozytenadhäsion und -infiltration dar, wodurch es wesentliche **antientzündliche Wirkungen** entfaltet. Eine gesteigerte Leukozytenadhäsivität gilt als wichtiger pathogenetischer Faktor der initialen Atherogenese (vgl. Kap. 2.1.2.1), der sich auf eine verstärkte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle (z. B. VCAM-1, ICAM-1), Zytokine sowie chemotaktisch wirksamer Signalstoffe (u. a. MCP-1) zurückführen lässt. NO unterbindet diesen auch als „Endothelzellaktivierung“ [SIMON et al. 1999; HADI et al. 2005] bezeichneten Prozess, indem es den intrazellulären oxidativen Stress herabsetzt und hierdurch die Aktivierung des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{B}^4$, der u. a. für die Expression proinflammatorisch wirksamer Gene erforderlich ist, inhibiert [MAXWELL et al. 1998; LI U. FÖRSTERMANN 2000; CANNON 1998]. Die antiinflammatorischen Eigenschaften von NO sind damit eng mit den antioxidativen Wirkungen (s. u.) verzahnt, während ein cGMP-abhängiger Mechanismus in diesem Zusammenhang nicht beteiligt zu sein scheint [MÜLLER et al. 2002].

Eine für das fortgeschrittene atherosklerotische Geschehen relevante NO-Wirkung besteht in seiner **antiproliferativen Funktion**, die den u. a. durch Wachstumsfaktoren (z. B. PDGF, TGF- β) und Zytokine ausgelösten Proliferations-, Migrations- sowie Syntheseprozessen glatter Gefäßmuskelzellen entgegen wirkt [FÖRSTERMANN U. MÜNZEL 2006]. So besitzt NO einen inhibitorischen Einfluss auf die DNA-Synthese, Mitogenese und Proliferation von SMC, der ebenfalls über eine durch cGMP-induzierbare, komplexe Signaltransduktionskaskade

⁴ Die meisten der für endotheliale Proteine kodierenden Gene weisen in ihrer Promotorregion Bindungssequenzen für verschiedene Transkriptionsfaktoren - darunter $\text{NF}\kappa\text{B}$ - auf, deren Aktivität im Wesentlichen über Proteinkinase-abhängige Phosphorylierungsreaktionen sowie den intrazellulären Redoxstatus gesteuert wird [PIETTE et al. 1997; KABE et al. 2005].

mediert wird [HOFMANN et al. 2000; MÜLLER et al. 2002].

Die Bedeutung von NO als antiatherogenem Molekül lässt sich ferner auf seine **anti-oxidativen Eigenschaften** zurückführen, denen insbesondere im Zusammenhang mit dem für die Atherogenese zentralen Schlüsselereignis der LDL-Oxidation eine wichtige Protektivfunktion beigemessen wird. So zeigen verschiedene experimentelle Untersuchungen, dass NO einen potenten Inhibitor der LDL-Oxidation darstellt und dessen zytotoxische Wirkung auf Endothelzellen reduziert [SCHRÖDER 2004; HOGG U. KALYANARAMAN 1999]. Als wesentlich gilt hierbei die Fähigkeit von NO, die autokatalytische Kettenreaktion der Lipidperoxidation zu unterbrechen, sowie das Potenzial zur Neutralisation von Superoxidradikalen ($O_2^{\bullet-}$ -Scavenger-Funktion). Im letzteren Fall wird der antioxidative Beitrag aufgrund der potenziell prooxidativen Eigenschaften von Peroxynitrit – je nach Verfügbarkeit an SODs – allerdings unterschiedlich beurteilt [MAXWELL et al. 1998; MÜLLER et al. 2002]. Nach MÜLLER et al. [2002] ist hierbei von Bedeutung, dass NO die SOD-Expression zu steigern vermag, wodurch die SOD-katalysierte Umsetzung von Superoxid zu H_2O_2 zusätzlich begünstigt wird (vgl. S. 10f). Weitere antioxidative NO-Mechanismen schließen u. a. die Nitrosylierung und damit Inaktivierung ROS-generierender Enzyme (z. B. NAD(P)H-Oxidase, Xanthin-Oxidase) [MAXWELL et al. 1998; CAI U. HARRISON 2000; MULLER et al. 2007] sowie eine verstärkte Expression von endothelialeem Ferritin und Bindung freier Eisenionen⁵ mit ein [MÜLLER et al. 2002].

In Anbetracht der hier dargelegten vasoprotektiven Wirkungen erscheint es bereits aus biochemischer Sicht plausibel, dass Störungen des L-Arginin-NO-Stoffwechselwegs und dem damit verbundenen Verlust an endothelialeem NO eine tragende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose beizumessen ist. Die Dysfunktion dieses Systems bildet daher den Schwerpunkt des folgenden Kapitels.

2.1.2 ENDOTHELIALE DYSFUNKTION

2.1.2.1 Definition und pathophysiologische Relevanz

Inzwischen verdeutlicht eine Vielzahl an Untersuchungen, dass der atherosklerotische Prozess und die ihm zugrunde liegenden Risikofaktoren nicht nur die für die Atherosklerose charakteristischen, morphologischen Gefäßwandveränderungen hervorruft, sondern zugleich mit funktionellen Veränderungen des Endothelstoffwechsels einhergeht. Diese Störungen, für die sich die relativ unspezifische Bezeichnung der „endothelialen Dysfunktion“ etabliert

⁵ Übergangsmetalle wie Eisen katalysieren in freier Form die Bildung von Hydroxylradikalen (Fenton-Reaktion) und können darüber hinaus als Katalysatoren der Lipidperoxidation wirken [SIEMS et al. 1998; HOGG U. KALYANARAMAN 1999].

hat, spiegeln sich in einer Beeinträchtigung einer oder mehrerer physiologischer Endothelfunktionen wider. Da diese vornehmlich auf der Bioaktivität von NO basieren, wird der Begriff der „endothelialen Dysfunktion“ in der wissenschaftlichen Literatur vielfach auch als Synonym für Störungen des endothelialen L-Arginin-NO-Stoffwechsels bzw. eine verringerte NO-Bioverfügbarkeit verwendet [LÜSCHER et al. 1997; KELM U. RATH 2001].

Der Verlust an biologisch aktivem NO weist auf einen systemischen, in seinem klinischen Bild nur schwer fassbaren Endotheldefekt hin [KELM U. RATH 2001; HAYOZ U. MAZZOLAI 2007], dessen pathophysiologische Relevanz sich aus den unter Kap. 2.1.1.2 dargestellten vasoprotektiven NO-Wirkungen ergibt. So geht die Dysfunktion des Endothels zunächst mit einer Beeinträchtigung der NO-abhängigen Vasorelaxation einher, die das Kardinalsymptom einer herabgesetzten NO-Verfügbarkeit darstellt und sich *in vivo* durch funktionelle Messverfahren wie der Fluss-vermittelten Vasodilatation (Flow-Mediated Dilatation, FMD⁶) diagnostizieren lässt. Weitere, über laborchemische Surrogatparameter bestimmbare Kennzeichen umfassen eine erhöhte Thrombozytenaggregationsneigung, einen Überschuss prokoagulatorischer sowie vasokonstriktorischer Faktoren (z. B. Endothelin-1), eine Zunahme oxidativer und mitogener Prozesse sowie eine Ausweitung entzündlicher Reaktionen, die aus einer gesteigerten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion resultiert [KELM U. STRAUER 1999; SIMON et al. 1999; HADI et al. 2005; HAYOZ U. MAZZOLAI 2007].

In ihrer Summation umfasst die endotheliale Dysfunktion somit eine Reihe an Effekten, welche nach heutigem Verständnis maßgeblich zur Entstehung von Schaumzellen als morphologischem Korrelat einer atherosklerotischen Frühläsion („fatty streaks“) beitragen [CELERMAJER 1997; SIMON et al. 1999]. Ein hierfür zentraler Vorgang stellt die durch eine verstärkte Endothelzellaktivierung ausgelöste Adhäsion und Infiltration zirkulierender Monozyten in das Subendothel und deren durch Wachstumsfaktoren (z. B. MCSF-1) induzierte Transformation zu Makrophagen dar (vgl. Abb. 3) [CANNON 1998; SCHÄCHINGER U. ZEIHNER 2000]. Ausdifferenzierte Makrophagen dienen u. a. als Quelle von Superoxidradikalen, wodurch sie einerseits die Oxidation infiltrierter LDL-Partikel fördern und hierdurch deren Aufnahme über Scavenger-Rezeptoren fördern⁷. Da die Expression der Scavenger-Rezeptoren, die sich neben Makrophagen auch in Endothelzellen und SMC finden, nicht rückkoppelnd gehemmt wird, kann eine unkontrollierte Internalisierung modifizierter LDLs in die jeweiligen Zellen erfolgen, die daraufhin zu lipidbeladenen Schaumzellen konvertieren [REAVEN U. WITZTUM 1996; LUSIS 2000; STOCKER U. KEANEY 2004]. Andererseits führen Superoxid-

⁶ In der klinischen Praxis häufig verwendetes, nicht-invasives Ultraschallverfahren, bei dem die durch Scherkräfte induzierte, NO-abhängige Vasodilatation in Antwort auf eine an der Oberarmarterie (*A. brachialis*) kurzfristig ausgelöste Ischämie ermittelt wird [KELM U. STRAUER 1999; RAITAKARI U. CELERMAJER 2000].

⁷ zu weiteren Details vgl. die Ausführungen unter Kap. 5.2, Fußnote 73.

anionen, die den ausdifferenzierten Makrophagen entstammen, zu einer vermehrten Bildung von Peroxynitrit, welches vorwiegend prooxidative sowie zytotoxische Eigenschaften besitzt [CANNON 1998, SCHÄCHINGER U. ZEIHNER 2000] und hierdurch den atherosklerotischen Prozess im Sinne eines *circulus vitiosus* verstärkt. Das gleichzeitig auftretende funktionelle NO-Defizit unterstützt diesen Vorgang, indem die Monozyteninvasion durch Expression redoxsensitiver, proinflammatorischer Gene zunimmt, die Thrombozytenadhäsion erhöht sowie die Proliferation und Migration medialer Muskelzellen, welche den für die fortgeschrittene Läsion charakteristischen fibrösen Plaqueumbau einleiten, gefördert wird [CELERMAJER 1997; CANNON 1998; LUSIS 2000]. Der fehlende gefäßrelaxierende NO-Einfluss an SMC verursacht zudem das Auftreten von Vasospasmen, wodurch das Risiko für akute Ischämien erhöht wird. Dieser Effekt potenziert sich durch die zugleich stark vaso-konstriktorische Wirkung von Endothelin-1, dessen Synthese und Freisetzung durch Endothelzellen aufgrund des verminderten NO-Angebots ebenfalls verstärkt ist [LÜSCHER et al. 1997; CANNON 1998].

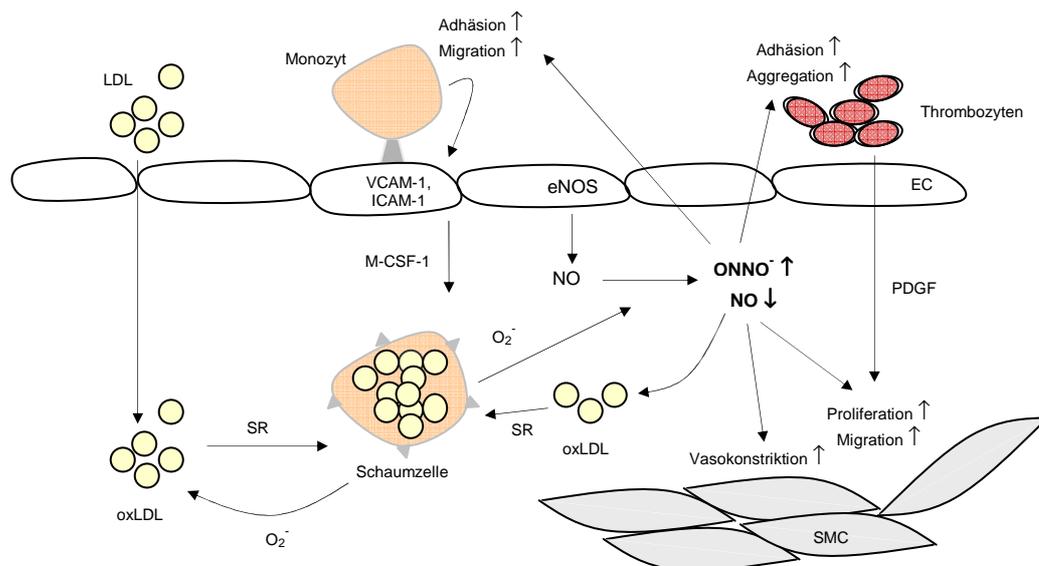


Abb. 3: Pathomechanismus der Atherosklerose - Bedeutung einer verminderten NO-Verfügbarkeit (vereinfachte Darstellung) [modifiziert nach QUASCHNING et al. 2000; LUSIS 2000]. EC: Endothelzelle, ICAM-1: Intracellular Adhesion Molecule-1, M-CSF-1: Monocyte Colony Stimulating Factor-1, PDGF: Platelet Derived Growth Factor, SMC: glatte Gefäßmuskelzelle, SR: Scavenger-Rezeptor, VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1.

Trotz dieser weitreichenden, hier nicht in allen Details dargelegten, Pathomechanismen galt lange Zeit als umstritten, ob die endotheliale Dysfunktion als kausal für die Atherogenese anzusehen ist oder lediglich ein Epiphänomen derselbigen darstellt [SCHMIDT et al. 1997; SIMON et al. 1999]. Zahlreiche experimentelle sowie klinische Befunde sprechen inzwischen jedoch dafür, dass Störungen des endothelialen L-Arginin-NO-Systems ursächlich zum atherosklerotischen Geschehen beitragen [STÜHLINGER 2007]. So lässt sich beispielsweise

im Tiermodell belegen, dass sowohl die Blockierung der endogenen NO-Synthese durch pharmakologische L-Arginin-Analoga⁸ als auch der durch eine fütterungsinduzierte Hypercholesterolämie hervorgerufene Verlust der NO-abhängigen Vasorelaxation mit einer akzelerierten Atherosklerose assoziiert ist [CAYATTE et al. 1994; CANDIPAN et al. 1996].

Daneben zeigen vielfältige Ergebnisse aus klinischen Studien, dass eine endotheliale Dysfunktion sowohl in atherosklerotisch veränderten Gefäßsegmenten [LUDMER et al. 1986; FÖRSTERMANN et al. 1988] als auch bei angiographisch unauffälligen Personen mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko [CELERMAJER et al. 1992; CELERMAJER et al. 1994; REDDY et al. 1994; QUYYUMI et al. 1995] nachweisbar ist. Diese Beobachtungen tragen zu der heute allgemein etablierten Auffassung bei, wonach die Endotheldysfunktion ein für die Progression und Initiation der Atherosklerose wesentliches Ereignis darstellt [HADI et al. 2005; NAPOLI et al. 2006; HAYOZ U. MAZZOLAI 2007], was inzwischen auch durch Befunde aus prospektiven Studien [u. a. SCHÄCHINGER et al. 2000; AL SUWAIDI et al. 2000; HALCOX et al. 2002; LERMAN U. ZEIHNER 2005] bestätigt wurde. Hierbei erwies sich die endotheliale Dysfunktion als unabhängiger Prädiktor für eine progrediente Atherosklerose sowie verschiedene kardiovaskuläre Endpunktereignisse.

2.1.2.2 Ätiologie und molekulare Aspekte einer verminderten NO-Verfügbarkeit

Bedingt durch seine anatomische Lage, entspricht das Endothel demjenigen Teil der Gefäßwand, der mechanischen Kräften sowie anderen exogenen Einflüssen gegenüber besonders vulnerabel ist. So unterliegt das äußere Erscheinungsbild von Endothelzellen bereits mit zunehmendem Alter unterschiedlichsten morphologischen Veränderungen, die mit einer Einschränkung NO-vermittelter Gefäßfunktionen einhergehen. Ein weitreichender Funktionsverlust, wie er durch die vollständige Ablösung der Endothelzellschicht hervorgerufen wird, ist demgegenüber erst für ein weit fortgeschrittenes Atherosklerose-Stadium kennzeichnend [LÜSCHER et al. 1997; QUASCHNING et al. 2000]. Gestützt durch die bereits erwähnte Beobachtung, wonach strukturelle Gefäßwandschädigungen funktionellen Störungen des Endothels jedoch nicht zwingend vorausgehen, besteht wissenschaftlicher Konsens darüber, dass die endotheliale Dysfunktion als frühes Ereignis - wenn nicht sogar als *das* Initialphänomen - der Atherogenese anzusehen ist [YANG U. MING 2006; HAYOZ U. MAZZOLAI 2007]. In Übereinstimmung zu der auf ROSS U. GLOMSET [1973] zurückgehenden „Response-to-injury-Hypothese“, wonach ein durch proatherogene Faktoren induzierter Verlust der Endothelintegrität den Beginn des pathogenetischen Geschehens markiert, findet sich

⁸ Die kompetitive Inhibierung der NO-Synthese durch sog. „falsche Substrate“ wie L-NMMA (N^ω-Monomethyl-L-Arginin, vgl. Kap. 2.2.1), L-NNA (N^ω-Nitro-L-Arginin) und L-NAME (N^ω-Nitro-L-Arginin-Methylester) entspricht einem pharmakologischen Modell, das mit der mechanischen Entfernung des Endothels zu vergleichen ist [LÜSCHER et al. 1997; SCHMIDT et al. 1997].

hierbei eine enge Assoziation zu einer Vielzahl an Faktoren, welche deckungsgleich mit den für die Atherosklerose etablierten bzw. diskutierten Risikofaktoren sind (vgl. Tab. 2). Diesen wiederum lassen sich verschiedene Primärnoxen zuordnen, die entweder direkt (z. B. hämodynamischer Stress, Nikotin) und/oder indirekt schädigend (z. B. Noxen mit zytotoxischem und prooxidativem Potenzial wie Homocystein) auf das Endothel einwirken. Für einen ätiologischen Zusammenhang spricht ferner, dass durch die Behandlung bzw. Minimierung einzelner Risikofaktoren, beispielsweise durch eine lipidsenkende Therapie oder Nikotinabstinenz, eine Wiederherstellung der NO-abhängigen Endothelfunktion erreicht werden kann [CELERMAJER 1997; BRITTEN et al. 1999; HADI et al. 2005]. Basierend auf diesen Beobachtungen ist das „Response-to-injury-Modell“ in den letzten zwei Jahrzehnten dahingehend erweitert worden, als dass der Verlust an biologisch aktivem NO als pathobiochemisches Bindeglied zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren und dem klinischen Bild der Atherosklerose angesehen wird [CELERMAJER 1997; MAXWELL et al. 1998; BÖGER et al. 2005].

Tab. 2: Mit einer endothelialen Dysfunktion assoziierte Risikofaktoren [modifiziert nach SIMON et al. 1999; BRITTEN et al. 1999; HADI et al. 2005]

Risikofaktor	Diskutierte Primärnoxen/Kausalzusammenhang
modifizierbar:	
Hyper-/Dyslipidämien	erhöhtes (ox)LDL, erniedrigtes HDL, erhöhtes Lipoprotein(a)
arterielle Hypertonie	durch Scherkräfte und Flussturbulenzen induzierter hämodynamischer Stress
Diabetes mellitus	Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, AGEs
Adipositas	Adipozytokine, sekundär: erhöhtes LDL, erniedrigtes HDL, Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, AGEs, hämodynamischer Stress
Rauchen	Nikotin, reaktive Sauerstoffspezies
Hyperhomocysteinämie	Homocystein
chronisch systemische Infektion	u. a. Chlamydia pneumoniae, Herpes-Viren, Helicobacter pylori
nicht-modifizierbar:	
männliches Geschlecht	endokriner Status
Alter	zelluläre Seneszenz, verminderte NO-Sensitivität
Genetik	variierender Phänotyp

Obwohl die molekularen Effekte, über welche die genannten Risikofaktoren zur Entstehung einer Endotheldysfunktion beitragen, noch nicht vollständig aufgeklärt sind, gilt als gesichert, dass Störungen des L-Arginin-NO-Systems auf einer multifaktoriellen Genese basieren, der verschiedene pathophysiologische Mechanismen zugrunde liegen [HARRISON 1997; YANG U. MING 2006; FÖRSTERMANN U. MÜNZEL 2006]. Nach YANG U. MING [2006] können hierbei drei

prinzipielle Effektebenen differenziert werden, über die die Verfügbarkeit an biologisch aktivem NO determiniert wird (vgl. Abb. 4): (1) die Ebene der eNOS-Genexpression, (2) die Ebene der eNOS-Aktivität und (3) die Ebene der NO-Inaktivierung. Als wesentliche molekulare Mechanismen für eine verminderte NO-Verfügbarkeit kommen dementsprechend in Frage:

(1) Die Down-Regulation der eNOS-Genexpression: Obwohl die eNOS als konstitutive NOS-Form vornehmlich der posttranslationalen Aktivitätskontrolle unterliegt, scheint die Abnahme der eNOS-Genexpression, wie sie *in vitro* durch verschiedene atherogene Stimuli (u. a. erhöhtes oxLDL, TNF- α) auf mRNA-Ebene induziert wird, *in vivo* insbesondere für den NO-Verlust in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen verantwortlich zu sein [HARRISON 1997; YANG U. MING 2006]. Weniger evident ist hingegen, inwieweit Mutationen des eNOS-Gens, wie der in der Promotorregion lokalisierte und mit einer verringerten transkriptionalen Aktivität assoziierte -786T/C-Polymorphismus, die eNOS-Genexpression *in vivo* beeinflussen [NAPOLI et al. 2006; YANG U. MING 2006].

(2a) Die Deregulation der eNOS-Enzymaktivität durch Substrat- und/oder Cofaktormangel („eNOS-uncoupling“): Ein für ein verringertes NO-Angebot zentraler und mit verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren wie z. B. Hypercholesterolämie, Diabetes mellitus, Hyperhomocysteinämie und Rauchen assoziierter Pathomechanismus beruht auf einer durch eine verminderte L-Arginin- und/oder BH₄-Bereitstellung induzierten „eNOS-Entkopplung“ [LI U. FÖRSTERMANN 2000; BÖGER et al. 2005; DAYAL U. LENTZ 2005; FÖRSTERMANN U. MÜNZEL 2006]. Kennzeichnend hierfür ist die Bildung von Superoxidanionen (O₂^{•-}) anstelle von NO, indem der in der Reduktase-Domäne stattfindene Elektronentransfer vom initialen Schritt der NO-Katalyse (L-Arginin-N^ω-Hydroxylase-Reaktion, vgl. Kap. 2.1.1.1) abgekoppelt und auf molekularen Sauerstoff umgeleitet wird. Die Entkopplungsreaktion, die einer Dysfunktion der eNOS-Enzymaktivität gleichkommt, führt somit nicht nur zu einer reduzierten NO-Freisetzung, sondern trägt über die nun gesteigerte Produktion von Superoxidradikalen zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses in der Gefäßwand bei [SYDOW U. MÜNZEL 2003; FÖRSTERMANN U. MÜNZEL 2006; SCHMIDT U. ALP 2007]. Für die eNOS-Entkopplung selbst ist dies insofern relevant, als dass BH₄ nun vermehrt zu BH₂⁹ oxidiert und hierdurch in seiner Cofaktor-Funktion weiter depletiert wird [YANG U. MING 2006; SCHMIDT U. ALP 2007].

⁹ Dihydrobiopterin (BH₂) besitzt keine Cofaktor-Aktivität und setzt die BH₄-Verfügbarkeit weiter herab, indem es mit noch vorhandenem BH₄ um die Bindungsstelle an der eNOS-Oxygenase-Domäne konkurriert [SCHMIDT U. ALP 2007].

(2b) Die Deregulation der eNOS-Enzymaktivität durch endogene Inhibitoren: Eine für eine verringerte NO-Bildungsrate und für die zentrale Fragestellung dieser Arbeit relevante pathophysiologische Determinante stellt die kompetitive Hemmung der eNOS durch endogene L-Arginin-Analoga dar. Zu diesen in humanem Blutplasma und Urin nachweisbaren Inhibitoren zählen die an späterer Stelle noch genauer zu charakterisierenden Substanzen N^ω-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) sowie N^ω,N^ω-Dimethyl-L-Arginin (**asymmetrisches Dimethylarginin, ADMA**). Da ADMA den quantitativ bedeutsameren Vertreter (10-fach höhere Plasmakonzentration im Vergleich zu L-NMMA bei ähnlichem Intrazellulärgehalt) darstellt, gilt dieser als der *in vivo* hauptsächlich wirksame Metabolit [VALLANCE et al. 1992a; VALLANCE et al. 1992b; BÖGER 2003; BELTOWSKI U. KEDRA 2006]. Neben dem Mechanismus der Kompetition wird ferner eine mögliche Rolle von ADMA für die zuvor beschriebene eNOS-Entkopplung diskutiert, was sich biochemisch auf ein am aktiven Zentrum hervorgerufenen relatives L-Arginin-Defizit zurückführen lässt [SYDOW U. MÜNDEL 2003; DAYAL U. LENTZ 2005; FÖRSTERMANN U. MÜNDEL 2006]. Ein durch ADMA ausgelöster Substratmangel könnte zudem in der Konkurrenz mit L-Arginin um die zelluläre Aufnahme über das y⁺-Transportsystem (vgl. Abb. 1) begründet sein.

(3) Die verstärkte oxidative NO-Inaktivierung: Eine durch oxidative Inaktivierung herabgesetzte NO-Bioverfügbarkeit, und hierbei speziell die über die Bildung von Peroxynitrit führende Reaktion mit Superoxidanionen, gilt als gemeinsamer pathophysiologischer Nenner zwischen einer endothelialen Dysfunktion und einer Vielzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren [HAYOZ U. MAZZOLAI 2007; MULLER et al. 2007]. So wird beispielsweise ein wesentlicher proatherogener Effekt von Homocystein auf dessen Fähigkeit zur Bildung von Superoxidanionen und der damit u. a. verbundenen NO-Degradation zurückgeführt [STÜHLINGER et al. 2001; BÖGER et al. 2001; FARACI 2003]. Ein in der Literatur ebenfalls viel diskutierter Mechanismus ist eine durch kardiovaskuläre Risikofaktoren (z. B. Hypercholesterolämie, Hypertonie, Diabetes mellitus und Zigarettenrauch) induzierte Stimulation der u. a. in Endothelzellen und SMC lokalisierten Enzyme NAD(P)H- und Xanthin-Oxidase. Diese gelten neben ausdifferenzierten Makrophagen, oxLDL- sowie Schaumzellaggregaten als die unter pathophysiologischen Bedingungen in der Gefäßwand wesentlichen Superoxidradikal-Quellen [CAI U. HARRISON 2000; FÖRSTERMANN U. MÜNDEL 2006; MULLER et al. 2007]. Schließlich kann in der eNOS-Entkopplung eine Art „Verstärker“ der NO-Inaktivierung gesehen werden, da diese nicht nur zu einer verminderten NO-Syntheserate beiträgt, sondern zugleich die Superoxid-Akkumulation unterhält [NAPOLI et al. 2006; YANG U. MING 2006].

Abb. 4 zeigt die auf den drei Effektebenen dargestellten Determinanten einer verminderten NO-Verfügbarkeit und deren gegenseitigen Wechselbeziehungen in der zusammenfassenden Übersicht.

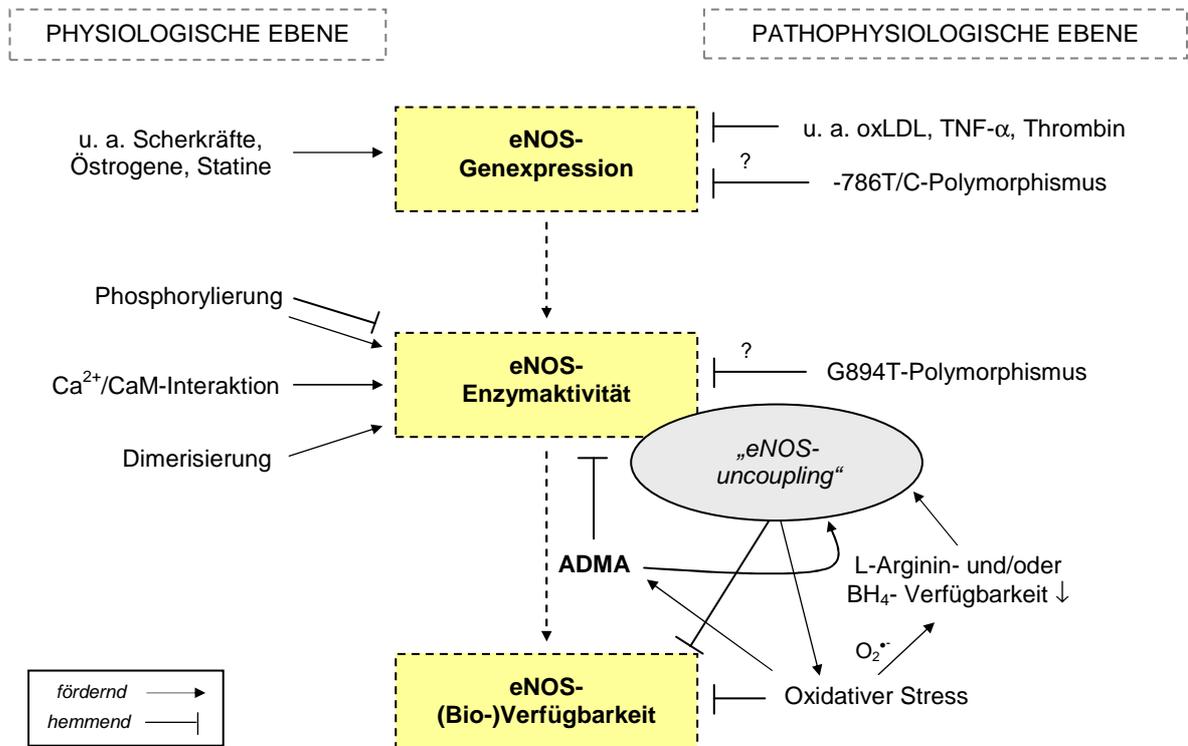


Abb. 4: Physiologische und pathophysiologische Determinanten der endothelialen NO-Bioverfügbarkeit (vereinfachte Darstellung) [modifiziert nach YANG U. MING 2006]. BH₄: Tetrahydrobiopterin, CaM: Calmodulin, TNF- α : Tumornekrosefaktor- α , -786T/C-Polymorphismus: in der Promotorregion lokalisierte eNOS-Genmutation (Einzelheiten siehe Text), G894T-Polymorphismus: Punktmutation, die durch einen Basentausch (G \rightarrow T-Transition) am Nukleotid 894 gekennzeichnet ist und phänotypisch in einer Änderung der Aminosäuresequenz (Glu \rightarrow Asp) mit vermutlich verringerter eNOS-Enzymaktivität resultiert.

2.2 (PATHO-)PHYSIOLOGIE DES ADMA-NO-SYSTEMS

Wie in Kap. 2.1.2.2 gezeigt worden ist, stellt ADMA als Hemmstoff der NOS eine wichtige determinierende Größe der endothelialen NO-Verfügbarkeit dar. Ausgehend von der Physiologie des ADMA-NO-Systems soll nachfolgend auf die pathophysiologische Relevanz erhöhter ADMA-Plasmawerte im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen eingegangen sowie die für eine ADMA-Akkumulation diskutierten molekularen Mechanismen dargestellt werden.

2.2.1 METHYLIERTE L-ARGININ-ANALOGA - CHEMISCHE CHARAKTERISTIK UND BIOLOGISCHE EFFEKTE

Die Methylierung von Aminosäuren stellt eine typische, in nahezu allen Zelltypen stattfindende Form der posttranslationalen Modifizierung von Proteinen dar, der u. a. eine zentrale Bedeutung bei der Regulation intrazellulärer Prozesse (z. B. Transkriptionskontrolle, RNA-Prozessierung, Protein-Targeting) beigemessen wird [TRAN et al. 2003; FLISER 2005; KIELSTEIN U. ZOCCALI 2005]. Die im Rahmen des Zellstoffwechsels stattfindende Proteolyse von entsprechend modifizierten, argininhaltigen Proteinen führt zur Bildung von freien, an der Guanidino-Gruppe substituierten Methylargininen, von denen in Eukaryonten bislang drei verschiedene Derivate identifiziert wurden (vgl. Abb. 5): die am terminalen Guanidino-Stickstoff mono- bzw. dimethylierten L-Arginin-Analoga **L-NMMA** (N^{ω} -Monomethyl-L-Arginin) und **ADMA** (N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-Arginin, asymmetrisches Dimethylarginin) sowie das an zwei Guanidino-Stickstoffatomen substituierte Strukturisomer¹⁰ **SDMA** ($N^{\omega},N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-Arginin, symmetrisches Dimethylarginin) [LEIPER U. VALLANCE 1999; BÖGER 2004; BULAU et al. 2007].

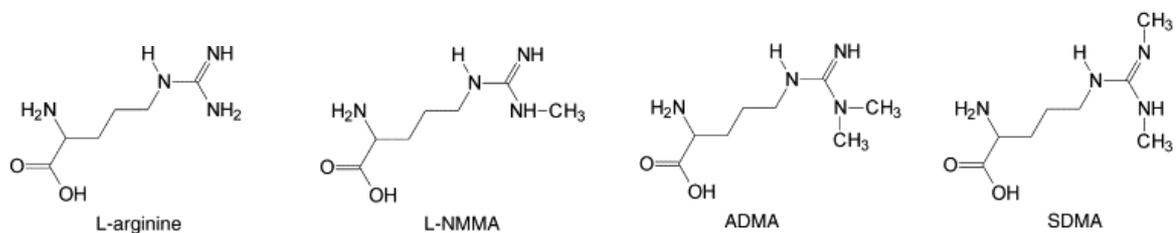


Abb. 5: Strukturformeln von L-Arginin und der endogenen Methylarginin-Derivate L-NMMA, ADMA und SDMA [nach MARTENS-LOBENHOFER U. BODE-BÖGER 2007]

¹⁰ Bei der Bezeichnung asymmetrisches bzw. symmetrisches Dimethylarginin handelt es sich um einen chemisch nicht korrekten Begriff, da weder ADMA ein chirales (asymmetrisches) Stickstoffatom noch SDMA ein Symmetriezentrum aufweist. Dementsprechend sind ADMA und SDMA den Strukturisomeren und nicht – wie häufig in der Literatur der Fall – den Stereoisomeren zuzuordnen.

Als endogene Metabolite wurden freie Methylarginine bereits 1970 aus menschlichen Urinproben isoliert [KAKIMOTO U. AKAZAWA 1970]. Grundlegende Erkenntnisse über ihre funktionelle Bedeutung gehen jedoch erst auf die später veröffentlichten Arbeiten von VALLANCE und Mitarbeitern zurück [VALLANCE et al. 1992a; VALLANCE et al. 1992b]. Hierbei konnte erstmals gezeigt werden, dass die ebenfalls in humanen Plasmaproben nachweisbaren Derivate L-NMMA und ADMA **kompetitive NOS-Hemmstoffe** darstellen, während SDMA keine inhibitorische Aktivität gegenüber der NOS besitzt. Wie bereits angeführt, wird ADMA als der unter *in vivo* Bedingungen relevantere Inhibitor angesehen (vgl. Kap. 2.1.2.2, S. 21), der in der Lage ist, alle drei NOS-Isoenzyme mit einer zu L-NMMA vergleichbaren Potenz (IC_{50} : ca. 2-10 $\mu\text{mol/l}$) zu hemmen [VALLANCE et al. 1992a; VALLANCE et al. 1992b; BÖGER 2003]. Dieser Effekt, der inzwischen durch eine Vielzahl an experimentellen Befunden untermauert wurde [Übersicht bei BÖGER 2004; FLISER 2005], ist sowohl von der Hemmstoff- als auch Substratkonzentration abhängig sowie durch exzessive L-Arginin-Zugaben¹¹ reversibel [VALLANCE et al. 1992a; VALLANCE U. LEIPER 2004; BULAU et al. 2007]. In Hinblick auf die Hemmstoffkonzentration ist dabei von Bedeutung, dass eine NOS-Inhibition, die mit einer verminderten NO-Bildung u. a. in kultivierten Endothelzellen und isolierten Gefäßsegmenten verbunden ist, bereits bei physiologischen ADMA-Plasmaspiegeln zu beobachten ist [FLISER 2005; BEŁTOWSKI U. KEDRA 2006] bzw. geringfügige Konzentrationsänderungen an zirkulierendem ADMA signifikante Auswirkungen auf die vaskuläre NO-Synthese haben [BÖGER et al. 2005; WILCKEN et al. 2007]. Dies wiederum unterstreicht die inzwischen etablierte Auffassung, wonach ADMA eine physiologische Funktion bei der Regulation der NO-Synthese zukommt, während eine Akkumulation des NOS-Inhibitors zur endothelialen Dysfunktion und den damit assoziierten negativen Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System führt [LEIPER U. VALLANCE 1999; LEIPER et al. 2002; BÖGER et al. 2005].

Ein weiterer, allen drei methylierten L-Arginin-Analoga gemeinsamer Effekt beruht auf dem **Antagonismus mit L-Arginin um das γ^+ -Transportsystem**, welches einen maßgeblichen Beitrag zur intrazellulären Substratbereitstellung der NOS leistet (vgl. Abb. 1). Wenngleich die hierfür erforderlichen Methylargininkonzentrationen weit über dem physiologischen Bereich angesiedelt sind, besteht auch für das inhibitorisch inaktive SDMA das Potenzial, die NOS-Aktivität hierdurch indirekt zu beeinflussen [CLOSS et al. 1997; WILCKEN et al. 2007; VALLANCE U. LEIPER 2004].

¹¹ Diese Beobachtung steht im Kontext mit dem sog. „L-Arginin-Paradoxon“, welches die biochemische Rationale für die antiatherogenen Effekte einer L-Arginin-Supplementierung bildet und u. a. auf die Existenz endogener NOS-Inhibitoren zurückgeführt wird. Das Paradoxon erklärt sich aus dem empirischen Zusammenhang, wonach die vermehrte Bereitstellung von exogenem L-Arginin zu einer Verbesserung NO-abhängiger Gefäßfunktionen *in vivo* führt, obwohl die Aktivität der isolierten eNOS *in vitro* ($K_{mL-Arg} \sim 3 \mu\text{mol/l}$) im Bereich der im Plasma bereits ohne Supplementierung vorhandenen L-Arginin-Konzentration ($\sim 40-100 \mu\text{mol/l}$) substratunabhängig ist [BÖGER 2004; BODE-BÖGER et al. 2007].

2.2.2 BIOCHEMIE DES ADMA-STOFFWECHSELS

2.2.2.1 ADMA-Bildung

Die endogene ADMA-Entstehung, die unter physiologischen Bedingungen auf täglich ca. 300 µmol geschätzt wird [ACHAN et al. 2003], unterliegt einem zweistufigen Prozess (vgl. Abb. 6):

Der initiale Schritt beinhaltet die durch Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) katalysierte **Methylierung von proteingebundenen L-Argininresten (*De-novo-Biosynthese*)**, während eine direkte Methylierung von freiem L-Arginin bislang nicht nachgewiesen werden konnte [BÖGER 2004; KIELSTEIN U. ZOCCALI 2005; MAAS 2005]. Die Familie der PRMTs, von denen bis dato neun Gene cloniert wurden (PRMT 1-9), umfasst zwei Enzymklassen, die sich durch unterschiedliche Substrat- und Produktspezifitäten auszeichnen: Die **PRMT Typ-I** (PRMT-I, „histone-specific enzyme“) mono- und dimethyliert asymmetrisch eine Vielzahl von nukleären Proteinen, darunter Histone, Zytokine sowie RNA-bindende Proteine (z. B. hnRNPs¹², Fibrillarin, Nucleolin), und führt zur konsekutiven Bildung von L-NMMA und ADMA. Im Gegensatz hierzu weist die **PRMT Typ-II** (PRMT-II, „myelin basic protein-specific enzyme“) eine hohe Substratspezifität für L-Argininreste innerhalb des basischen Myelinproteins¹³ auf, durch deren mono- und symmetrische Dimethylierung die Hydrolyseprodukte L-NMMA und SDMA entstehen. Demzufolge sind beide PRMT-Subtypen in der Lage, die Synthese von L-NMMA zu katalysieren, während die Dimethylarginine ADMA und SDMA Typ-I- bzw. Typ-II-spezifische Reaktionsprodukte darstellen; ihre Bildung erfolgt über den Zwischenschritt der Monomethylierung [LEIPER U. VALLANCE 1999; TANG et al. 2000; TRAN et al. 2003; JACOBI U. TSAO 2008]. Wie Abb. 6 verdeutlicht, werden die hierfür notwendigen Methylgruppen durch S-Adenosyl-Methionin (SAM), einem Zwischenmetaboliten bei der Demethylierung von Methionin zu Homocystein¹⁴ sowie potenter Methylgruppen-Donor für eine Vielzahl an biochemischen Reaktionen (u. a. DNA-Methylierung, Neurotransmitter-Bildung), bereitgestellt. Die Synthese von ADMA, die den Transfer von zwei Methylgruppen bzw. einen zweifachen Durchlauf der Methionin-Homocystein-Demethylierung erfordert, geht somit mit der Entstehung von zwei Äquivalenten S-Adenosyl-Homocystein (SAH) bzw. Homocystein einher [BÖGER et al. 2000b; MAAS 2005; DAYAL U. LENTZ 2005]. In Bezug auf das kardiovaskuläre System ist ferner von Bedeutung, dass sowohl Endothel- als auch glatte Gefäßmuskelzellen zur Expression der PRMT-I-Form und damit zur Synthese von ADMA befähigt sind [VALLANCE U. LEIPER 2004; WILCKEN et al. 2007]. So konnte gezeigt werden,

¹² In der für die mRNA-Stabilität und deren Transport ins Cytosol notwendigen nukleären Proteinfraction hnRNP sind bis zu 65% des zellulären ADMA-Gesamtanteils enthalten [TRAN et al. 2003].

¹³ Hauptbestandteil der neuronalen Myelinscheide [TRAN et al. 2003] und damit markhaltigen Nervenfasern.

¹⁴ vgl. hierzu auch die in Abb. A12, Anhang A, dargestellte Biochemie des Homocystein-Stoffwechsels.

dass regenerative Endothelzellen in Folge einer verstärkten Protein-Methylierungsrate höhere ADMA-Gehalte im Vergleich zu nicht-regenerativen aufweisen [AZUMA et al. 1995].

Der zweite Schritt der endogenen ADMA-Entstehung erfolgt im Zuge des Proteinkatabolismus und der damit verbundenen, bis auf Aminosäure-Ebene führenden **Proteolyse methylierter Proteine**. Anders als nicht-modifizierte (proteinogene) Aminosäuren werden freie Methylarginine im Rahmen der *De-novo*-Synthese von Proteinen nicht reutilisiert [TRAN et al. 2003; TEERLINK 2005]. Auch existieren keine Hinweise darauf, dass mit Methylgruppen substituierte L-Argininreste innerhalb von Proteinen demethyliert werden können. Neben dem Ausmaß der PRMT-abhängigen Methylierung ist die Menge an freigesetztem ADMA damit auch vom zellulären Protein-Turnover abhängig, welcher – je nach Zelltyp, Lokalisation und metabolischer Situation (z. B. im Fastenzustand) – große Unterschiede aufweist. So findet sich beispielsweise in Endothelzellen, die an Gefäßbifurkationen lokalisiert sind, ein vergleichsweise höherer Zell- und damit Proteinumsatz als in anderen Gefäßregionen [WILCKEN et al. 2007; VALLANCE U. LEIPER 2004; TRAN et al. 2003]. Experimentelle Untersuchungen der Gruppe um TEERLINK [2005] lassen jedoch insgesamt darauf schließen, dass Zellen über eine ausgeprägte proteolytische Kapazität verfügen, mit der methylierte Proteine in hohem Maße zu freien Methylargininen umgesetzt werden. Inwieweit hierbei eine relevante Verbindung zu bestimmten Proteinen besteht oder freies ADMA lediglich ein unvermeidliches Nebenprodukt des Proteinabbaus darstellt, ist noch nicht abschließend geklärt [TEERLINK 2005; VALLANCE U. LEIPER 2004].

2.2.2.2 Wege der ADMA-Elimination

Aus der Proteolyse methylierter Proteine freigesetztes ADMA, das zunächst ins Cytosol gelangt, kann auf zwei unterschiedlichen Wegen eliminiert werden: Neben der **renalen Exkretion**, die früheren Annahmen zu Folge als einzige Möglichkeit zur Elimination endogener Methylarginine galt und deren Übertritt in die Zirkulation voraussetzt, unterliegt intrazelluläres ADMA einer intensiven **Metabolisierung** [BÖGER 2004; KIELSTEIN U. ZOCCALI 2005; PALM et al. 2007]. Der in diesem Zusammenhang wesentliche Abbauweg, dessen Anteil bis zu 80-85% (ca. 250-260 $\mu\text{mol/d}$) an der ADMA-Gesamtelimination ausmacht [ACHAN et al. 2003], beruht auf der für ADMA sowie L-NMMA spezifischen Hydrolyse durch das Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) unter Bildung von L-Citrullin und Dimethylamin (vgl. Abb. 6) bzw. Monomethylamin. SDMA, das nahezu vollständig über die Nieren ausgeschieden wird, stellt demgegenüber kein Substrat der DDAH dar. Dies wiederum erklärt, weshalb Störungen der renalen Funktion (z. B. bei Niereninsuffizienz) mit einer deutlich stärkeren Erhöhung der SDMA-Plasmawerte im Vergleich zu ADMA einhergehen [TRAN et al. 2003; BÖGER U. ZOCCALI 2003]. Daneben können sowohl ADMA als auch SDMA und L-NMMA in einer Dimethylarginin-Pyruvat-Transferase(DPT)-katalysierten und

damit Vitamin-B₆-abhängigen Reaktion zu α -Ketosäuren abgebaut werden [OGAWA et al. 1990]; unter quantitativen Gesichtspunkten ist dieser in der Niere lokalisierte Stoffwechselweg jedoch von untergeordneter Bedeutung [COOKE 2000; FLISER 2005].

Die Aktivität der DDAH, die nahezu in allen Geweben präsent ist, wurde erstmals in Ratten [OGAWA et al. 1987; OGAWA et al. 1989] und später auch im menschlichen Organismus (u. a. in Herz, Gehirn, Placenta, Lunge, Niere und Leber) nachgewiesen [LEIPER et al. 1999; TRAN et al. 2000]. Bezüglich der humanen DDAH können zwei Isoformen differenziert werden, die durch ein weitgehend gewebespezifisches, sich teilweise jedoch auch überschneidendes Expressionsmuster charakterisiert sind. So findet sich die **DDAH-I** vorwiegend in Niere und Gehirn und damit in Geweben, die zugleich hohe nNOS-Aktivitäten aufweisen. Demgegenüber ist die **DDAH-II** hauptsächlich in Herz, Placenta oder auch Nieren vertreten. Da Herz und Placenta ausschließlich eNOS-exprimierende Organe darstellen, lässt sich für die DDAH-II ein mit der eNOS assoziiertes Verteilungsmuster ableiten [LEIPER et al. 1999]. Welches DDAH-Isoenzym oder Organ den *in vivo* größten Beitrag zur ADMA-Elimination leistet, ist derzeit allerdings noch ungeklärt. Neben den Nieren, die durch die Kombination aus Exkretion und Metabolisierung eine „eliminatorische Doppelfunktion“ innehaben, wird auf Organebene v. a. auch der Leber eine wichtige katabole Rolle zugewiesen [KIELSTEIN U. ZOCCALI 2005; MAAS 2005]. So ließ sich in tierexperimentellen Untersuchungen eine höhere hepatische ADMA-Netto-Clearance aus der Zirkulation im Vergleich zur renalen Eliminationsrate feststellen [NIJVELDT et al. 2003].

Wie die bislang vorliegenden Daten zur Bedeutung des katabolen DDAH-Stoffwechselwegs zeigen, kann diesem ein zentraler Stellenwert für die Regulation der ADMA-Konzentration in Plasma und Gewebe eingeräumt werden [BÖGER et al. 2005; BELTOWSKI U. KEDRA 2006]. Dies erschließt sich auch aus den kinetischen Eigenschaften des Enzyms, das – physiologische Bedingungen vorausgesetzt – aufgrund seines relativ hohen K_m -Werts ($\sim 180 \mu\text{mol/l}$ [OGAWA et al. 1989]) eine zur intrazellulären ADMA-Konzentration nahezu proportionale Abbaurate ermöglicht. Nach TEERLINK [2005] kann so einerseits der Akkumulation von ADMA vorgebeugt werden; andererseits stellt dies eine für die Regulation der NOS-Aktivität noch ausreichende Inhibitorkonzentration sicher [vgl. auch FLISER 2005; PALM et al. 2007]¹⁵. Vor diesem Hintergrund erscheint es somit plausibel, dass die Höhe des ADMA-Spiegels besonders sensitiv auf Veränderungen der DDAH-Expression und/oder -Aktivität anspricht – ein Aspekt, der in Kap. 2.2.3.2 näher thematisiert wird.

¹⁵ Eine für die NO-Homöostase zentrale Bedeutung des DDAH-ADMA-Systems erschließt sich ferner aus der Beobachtung, wonach die DDAH-Aktivität durch Bindung von NO an die im aktiven Zentrum der DDAH lokalisierte SH-Gruppe (vgl. Kap. 2.2.3.2) im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus inhibiert wird [VALLANCE U. LEIPER 2004; MAAS 2005].

Abb. 6 fasst die der endogenen ADMA-Entstehung und -Elimination zugrunde liegenden Mechanismen in der Übersicht zusammen.

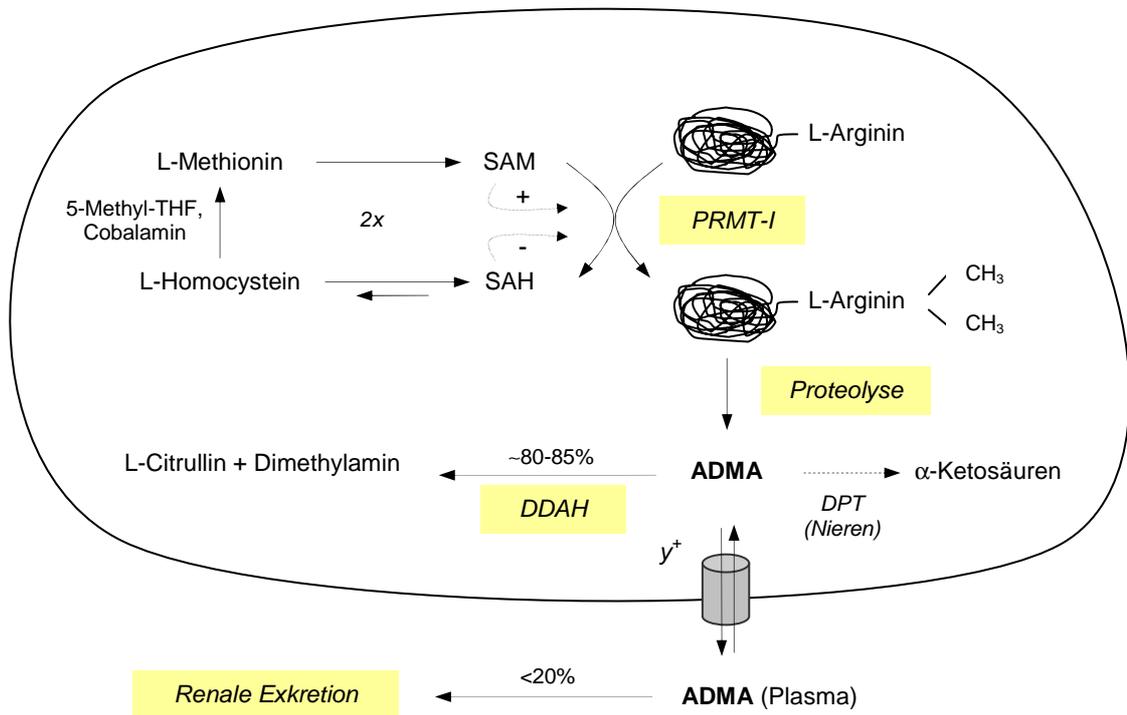


Abb. 6: Bildung, Abbau und Ausscheidung von ADMA [modifiziert nach TEERLINK 2005]. DDAH: Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase, DPT: Dimethylarginin-Pyruvat-Transferase, PRMT-I: Protein-Arginin-Methyltransferase-I, SAH: S-Adenosyl-Homocystein, SAM: S-Adenosyl-Methionin, THF: Tetrahydrofolat.

2.2.2.3 Intermediäre Verteilung

Obwohl bis heute keine verlässlichen Daten über die **intrazellulären** (und damit zur NOS-Hemmung relevanten) **Methylarginingehalte** vorliegen [KIELSTEIN U. ZOCCALI 2005; MAAS 2005], ist davon auszugehen, dass diese die Konzentrationen im Blutplasma um ein Vielfaches übersteigen. So wurden in kultivierten humanen Endothelzellen 8- bis 12-fach höhere ADMA-Konzentrationen als extrazellulär gefunden [BÖGER 2003]. Auch konnten BOGLE et al. [1995] in Versuchen an humanen Endothelzelllinien einen bis zu 5-fachen Anstieg der intrazellulären Methylarginingehalte nach Zugabe in das umgebende Medium nachweisen. Neben der intrazellulär stattfindenden ADMA-Bildung ist dies auf den beidseitig gerichteten Transport über das γ^+ -System zurückzuführen (vgl. Abb. 1), wobei der Methylarginin-Influx gegenüber dem Efflux überwiegt [BOGLE ET AL. 1995; CLOSS et al. 1997; WILCKEN et al. 2007]. Die enge Nachbarschaft zwischen dem γ^+ -Transporter und der eNOS, die beide in kryptenförmigen Einstülpungen der Zellmembran, den Caveolae, lokalisiert sind, legt eine Konzentrierung von Methylargininen innerhalb dieser Bereiche nahe [TEERLINK 2005]. Einigen Autoren zufolge spricht auch der K_m -Wert der DDAH ($K_{mADMA} \sim 180 \mu\text{mol/l}$) dafür, dass die intrazellulären ADMA-Gehalte unter bestimmten Bedingungen weit über dem in der

Literatur mit 5-10 µmol/l angegebenen Konzentrationsbereich liegen können [LEIPER U. VALLANCE 1999; TRAN et al. 2003].

In Hinblick auf die **extrazelluläre Verteilung** sind ADMA und SDMA die in humanem Blutplasma mengenmäßig dominierenden Methylarginine, wobei die jeweiligen Konzentrationen, die im (sub-)mikromolaren Bereich angesiedelt sind, in ihrer Größenordnung annähernd vergleichbar sind (s. u.). Für L-NMMA finden sich demgegenüber um den Faktor 10 geringere Plasmagehalte [TEERLINK 2007; MARTENS-LOBENHOFER U. BODE-BÖGER 2007]. Bezüglich der bei gesunden Personen vorliegenden ADMA-Plasmaspiegel, die einen Anhaltspunkt für Plasmakonzentrationen im Sinne von „Normal- bzw. Referenzwerten“ liefern, sind in der Literatur stark differierende Angaben zu finden, was sich zumeist auf analytisch-methodische Unterschiede (u. a. Art der Probenvorbereitung, Trenn- und Detektionsmethode) zurückführen lässt [KIELSTEIN U. ZOCCALI 2005; BÖGER et al. 2005; TEERLINK 2007]. Die hierzu von verschiedenen Arbeitsgruppen angeführten mittleren ADMA-Spiegel in Plasma oder Serum variieren zwischen 0,12-4,0 µmol/l [Übersicht bei HOROWITZ U. HERESZTYN 2007], wobei sich die „wahren“ ADMA-Plasmawerte¹⁶ einer methodenkritischen Review-Auswertung zufolge eher im unteren Konzentrationsbereich von 0,3-0,5 µmol/l [MARTENS-LOBENHOFER U. BODE-BÖGER 2006] bewegen dürften. Die von MARTENS-LOBENHOFER U. BODE-BÖGER [2007] speziell für Analyseverfahren mit massenspektrometrischer Detektion angegebenen physiologischen Plasmakonzentrationen liegen hierbei im Mittel bei 0,4 µmol/l (0,12-0,60 µmol/l) für ADMA und 0,5 µmol/l (0,16-0,69 µmol/l) für SDMA.

2.2.3 ADMA UND ATHEROSKLEROSE

Dass ADMA in seiner Funktion als NOS-Inhibitor eine mögliche pathophysiologische Rolle im Rahmen der Atherogenese zugeschrieben werden kann, wurde erstmal vermutet, als VALLANCE et al. [1992b] eine deutliche Erhöhung der ADMA-Plasmaspiegel bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz beobachteten ($8,7 \pm 0,7$ vs. $1,2 \pm 0,1$ µmol/l bei gesunden Kontrollen). Sie postulierten, dass die vergleichsweise hohe Inzidenz atherosklerotischer Komplikationen in entsprechenden Patientenkollektiven, die sich durch klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypercholesterolämie, Diabetes mellitus oder Rauchen nur unzureichend erklären lässt, in einer aus der ADMA-Akkumulation resultierenden Störung des endothelialen L-Arginin-NO-Systems begründet ist. Diese Annahme wiederum deckt sich

¹⁶ Dieser aus aktuellen Publikationen mit analytischem Schwerpunkt abgeleitete „Normalwert“ liegt deutlich unter den in klinischen Studien – zumeist älteren Datums – für gesunde Kontrollen angegebenen ADMA-Plasmakonzentrationen, die sich in einer Größenordnung von ~1 µmol/l bewegen [MARTENS-LOBENHOFER U. BODE-BÖGER 2006] (vgl. auch Tab. 3, Kap. 2.2.3.1, sowie Tab. A2, Anhang B).

mit der Beobachtung, wonach die Dysfunktion NO-abhängiger Endothelfunktionen ein für niereninsuffiziente Patienten ohne manifeste Gefäßkrankung typisches Phänomen darstellt [KIELSTEIN et al. 2001; BÖGER U. ZOCCALI 2003].

Basierend auf einer Vielzahl experimenteller und klinischer Befunde, die Hinweise auf eine kardiovaskuläre Risikoerhöhung durch eine (vergleichsweise geringere) ADMA-Akkumulation bei nierengesunden Patienten geben, hat sich die Sichtweise inzwischen dahingehend gewandelt, als dass ADMA sich von einem ursprünglich rein „*urämischen Toxin*“ hin zu *einem globalen kardiovaskulären Risikomolekül* [FLISER 2005]“ entwickelt hat [BÖGER 2003; KIELSTEIN U. ZOCCALI 2005; STÜHLINGER 2007]. Ziel des folgenden Kapitels ist es, den gegenwärtigen Erkenntnisstand über die potenzielle Rolle von ADMA als neuem Atherosklerose-Risikofaktor darzulegen.

2.2.3.1 ADMA und kardiovaskuläres Risiko – empirische Evidenz

Experimentelle Befunde

Ausgehend von tierexperimentellen Studien, die Symptome einer Endotheldysfunktion sowie eine Reihe nachteiliger kardiovaskulärer Effekte nach exogener ADMA-Verabreichung aufzeigen [Übersicht bei KIELSTEIN U. ZOCCALI 2005], konnte ein entsprechend proatherogenes Wirkpotenzial einer ADMA-Akkumulation *in vivo* auch durch Untersuchungen am Menschen belegt werden. Die hierbei an gesunden Versuchsteilnehmern zu beobachtenden pathophysiologischen Effekte umfassen

- eine signifikante **Verringerung der endothelabhängigen Vasodilatation**, induziert durch eine lokale, intraarterielle (*A. brachialis*) ADMA-Infusion [VALLANCE et al. 1992b; CALVER et al. 1993],
- eine dosis-abhängige **Erhöhung des systemischen Gefäßwiderstands**, begleitet von einem **Anstieg des mittleren Blutdrucks**,
- sowie einen **Abfall der Herzfrequenz** und/oder **-leistung** nach einer ADMA-*iv*-Applikation, die zu systemischen ADMA-Plasmaspiegeln im Bereich von 2-10 µmol/l führte [ACHAN et al. 2003; KIELSTEIN et al. 2004].

Neben diesen klinisch messbaren Veränderungen konnten CHAN et al. [2000] in ihren Untersuchungen an Hypercholesterolemikern zeigen, dass das Ausmaß der *Ex-vivo-Adhäsion mononukleärer Zellen* (T-Lymphozyten, Monozyten) signifikant mit der Höhe der ADMA-Plasmakonzentration der Probanden korreliert war.

Befunde der deskriptiven und analytischen Epidemiologie

Weitere Anhaltspunkte für eine Assoziation zwischen einer endogenen ADMA-Akkumulation und einem gesteigerten Atherosklerose-Risiko ergeben sich ferner aus Beobachtungsstudien, in denen Personen mit prävalenten kardiovaskulären Risikofaktoren signifikant höhere ADMA-Plasmawerte als vergleichbare Kontrollkollektive aufwiesen. So fanden sich in verschiedenen **Querschnittsstudien** wiederholt deutlich erhöhte ADMA-Plasmawerte in Verbindung mit isolierten Risikofaktoren wie Hypercholesterolämie, Hypertonie, Hyperhomocysteinämie und Diabetes mellitus (1,2-2,4-fach gegenüber Kontrollen, vgl. Tab. 3). Wie die Untersuchungen von BÖGER et al. [1998] an Hypercholesterolämikern hierbei exemplarisch zeigen, bestand für die ADMA-Plasmawerte nicht nur eine signifikante Korrelation zur Höhe der Gesamt- ($r=0,372$) und LDL-Plasmaspiegel ($r=0,421$), sondern zugleich ein signifikant inverser Zusammenhang zur renalen Nitrat-Ausscheidung ($r=-0,534$) sowie NO-abhängigen Vasodilatation (FMD: $r=-0,762$, jeweils $p<0,01$) als funktionellem *In-vivo*-Marker¹⁷. Vergleichbare Assoziationen ließen sich auch bei Probanden mit essenzieller Hypertonie [SURDACKI et al. 1999] sowie Hyperhomocysteinämie [SYDOW et al. 2004] beobachten.

Neben diesen Befunden, die verdeutlichen, dass eine ADMA-Akkumulation ein zur endothelialen Dysfunktion analoges Phänomen darstellt, welches bereits in einem frühen Atherosklerose-Stadium nachweisbar ist, wurden Erhöhungen der ADMA-Plasmaspiegel auch bei Patienten mit manifeste Atherosklerose (u. a. KHK, Apoplex, pAVK, vgl. Tab. A2, Anhang B) beschrieben. So zeigt beispielsweise die von SCHULZE et al. [2006] vorgenommene Auswertung an einer Subkohorte der *CARDIAC-Study* mit über 800 Probanden¹⁸ eine rund 20%ige Erhöhung der ADMA-Plasmakonzentration bei Patienten mit gesicherter KHK (Fälle, $n=131$) im Vergleich zu Kontrollen ohne KHK ($n=131$, $p<0,001$). Interessant hierbei ist, dass sich in der Gesamtbetrachtung ein signifikanter Trend ($p<0,009$) für eine kontinuierliche ADMA-Erhöpfung mit steigender Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren ermitteln ließ. Wurde zudem die prädiktive Aussagekraft in Zusammenhang mit weiteren biochemisch-klinischen Variablen (LDL, HDL, Triglyceride, hsCRP, Creatinin, systolischer Blutdruck) überprüft, so erwies sich in der hierzu durchgeführten multivariaten Regressionsanalyse einzig der ADMA-Plasmaspiegel als signifikanter KHK-Prädiktor (OR: 2,59, 95%-CI: 1,61-4,17, $p<0,001$). Auch konnte ADMA (Tertil 3 $>0,72$ $\mu\text{mol/l}$) in einem zweiten Modell neben etablierten KHK-Risikofaktoren wie Hypercholesterolämie, Hypertonie, Diabetes mellitus und Rauchen als unabhängiger Prädiktor für eine bestehende KHK identifiziert werden (OR: 6,04, 95%-CI: 2,56-14,25, $p<0,01$ vs. Tertil 1 $<0,58$ $\mu\text{mol/l}$) [SCHULZE et al. 2006].

¹⁷ zur diagnostischen Relevanz der Nitrat- bzw. FMD-Messung vgl. auch die Ausführungen unter Kap. 2.1.1.1, S.11f und Kap. 2.1.2.1, S.16.

¹⁸ Das Design der multizentrischen *CARDIAC-Study* ist sowohl als Querschnitts- als auch prospektive Verlaufsuntersuchung mit einem Follow-up von 4 Jahren (*CARDIAC-PRO*, vgl. Tab. 4) angelegt.

Tab. 3: ADMA-Plasmaspiegel [$\mu\text{mol/l}$] bei Probanden mit und ohne prävalente kardiovaskuläre Risikofaktoren – Ergebnisse aus Querschnittsstudien (Auswahl)

Kardiovaskulärer Risikofaktor	Risikogruppe*	Kontrollgruppe*	Erhöhung**	Referenz
Hypercholesterolämie	2,17 \pm 0,15 n=49	1,03 \pm 0,09 n=31	2,1-fach $p < 0,05$	BÖGER et al. 1998b
	2,1 \pm 0,2 n=24	1,3 \pm 0,2 n=18	1,6-fach $p < 0,05$	CHAN et al. 2000
	1,64 (1,24-1,75) n=32	0,93 (0,71-1,10) n=20	1,8-fach $p < 0,001$	EID et al. 2003
	0,94 \pm 0,18 (n=32)	0,77 \pm 0,14 n=32	1,2-fach $p < 0,001$	JEHLIČKA et al. 2009
Hypertriglyceridämie	1,13 \pm 0,37 n=15	0,92 \pm 0,28 n=15	1,2-fach $p < 0,05$	LUNDMANN et al. 2001
	0,47 \pm 0,08 n=16	0,36 \pm 0,07 n=47	1,3-fach $p < 0,001$	MARTENS-LOBENHOFFER U. BODE-BÖGER 2004
Hypertonie	2,4 \pm 1,1 n=19	1,1 \pm 0,7 n=11	2,2-fach $p < 0,005$	SURDACKI et al. 1999
	0,24 \pm 0,03 n=31	0,10 \pm 0,07 n=9	2,4-fach $p < 0,05$	GOONASEKERA et al. 2000
Hyperhomocysteinämie	3,1 [#] n=21	1,6 [#] n=21	~2-fach $p < 0,001$	HOLVEN et al. 2002
	4,0 \pm 0,3 ^a n=27	2,6 \pm 0,3 n=27	1,5-fach $p < 0,05$	SYDOW et al. 2004
	0,57 (0,40-0,69) n=75	0,44 (0,34-0,56) n=85	1,3-fach $p < 0,001$	PARONI et al. 2005
	1,81 \pm 0,57 ^b n=38	0,82 \pm 0,29 n=31	2,2-fach $p < 0,001$	SIROKÁ et al. 2005
	1,60 \pm 0,56 ^c n=38	0,82 \pm 0,29 n=31	2,0-fach $p < 0,001$	SIROKÁ et al. 2005
Diabetes mellitus	1,34 (1,01-1,58) n=38	0,93 (0,71-1,10) n=20	1,4-fach $p < 0,001$	EID et al. 2003
	1,59 \pm 0,22 n=16	0,69 \pm 0,04 n=18	2,3-fach $p < 0,001$	ABBASI et al. 2001
Insulinresistenz	1,34 \pm 0,33 ^d n=8	0,70 \pm 0,18 n=8	1,9-fach $p < 0,001$	STÜHLINGER et al. 2002
Rauchen	1,10 \pm 0,54 n=12	0,61 \pm 0,13 n=10	1,8-fach $p = 0,01$	ZHANG et al. 2006

* Mittelwert \pm SD bzw. Median (25-75er Perzentil), ** Risiko- vs. Kontrollgruppe (gerundete Werte),

aus Abb. 1 abgeleiteter Mittelwert

^a pAVK-Patienten, Tertil 3 (tHcy >10,6 $\mu\text{mol/l}$) vs. Tertil 1 (tHcy <9,6 $\mu\text{mol/l}$)^b Hämodialyse-Patienten^c nierengesunde Probanden^d Subgruppe ohne Hypertonie

Wenngleich die bisher aufgezeigten Daten keine Rückschlüsse auf einen *ursächlichen* Zusammenhang zwischen einem Anstieg der ADMA-Plasmakonzentration und der Entstehung und Progression atherosklerotischer Gefäßläsionen ermöglichen, deuten Befunde zur Beziehung zwischen ADMA und der Intima-Media-Dicke (IMT)¹⁹ in diese Richtung. Wie MIYAZAKI et al. erstmals in einer 1999 publizierten Studie an 116 Probanden ohne Anzeichen einer koronaren oder peripheren arteriellen Gefäßerkrankung feststellen konnten, erwies sich die ADMA-Plasmakonzentration als unabhängiger Prädiktor für die IMT. Eine signifikant positive Assoziation zwischen ADMA und der IMT ließ sich ferner an einem Patientenkollektiv mit dialysepflichtiger Niereninsuffizienz ($n=90$) beobachten [ZOCALI et al. 2002]. In dieser Untersuchung, in der die IMT nach Ablauf von 15 Monaten erneut ermittelt wurde, stellten sich lediglich die ADMA- sowie CRP-Plasmaspiegel als miteinander assoziierte Vorhersagewerte für die Progression intimaler Läsionen bei initial normaler IMT ($\leq 0,95$ mm) heraus. Die Bedeutung von ADMA als unabhängiger IMT-Prädiktor bei gefäßgesunden Personen wurde zudem durch eine großangelegte Beobachtungsstudie ($n=712$) bestätigt [FURUKI et al. 2007]. U. a. ließ sich hierbei eine signifikante, lineare Beziehung zwischen der IMT und den Tertil-stratifizierten sowie Confounder-adjustierten ADMA-Plasmaspiegeln aufzeigen, wobei sich ein stärkerer Einfluss von ADMA auf die IMT mit steigender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren abzeichnete.

Dass ADMA eine kausale Rolle im Rahmen der Atherogenese zugewiesen werden kann, wird zunehmend auch durch Ergebnisse aus **prospektiven Kohortenstudien** untermauert, die auf ein erhöhtes Risiko für zukünftige kardiovaskuläre Komplikationen und/oder ein erhöhtes (kardiovaskuläres) Mortalitätsrisiko mit steigenden ADMA-Plasmaswerten hindeuten (vgl. Tab. 4). Exemplarisch sei an dieser Stelle die Studie von MEINITZER et al. [2007] (*The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study*) mit der bislang größten Kohorte, bestehend aus 2543 Probanden mit angiographisch gesicherter KHK sowie 695 Teilnehmern ohne KHK-Manifestation, angeführt. Nach einem mittleren Follow-Up von 5,45 Jahren wiesen Personen, die zu Studienbeginn dem höchsten ADMA-Quartil (Q4: $\geq 0,89$ $\mu\text{mol/l}$) zugeordnet werden konnten, ein 52 bzw. 60% höheres adjustiertes Risiko²⁰ hinsichtlich der kardiovaskulären bzw. allgemeinen Mortalität auf, als Probanden der niedrigsten ADMA-Quartile (Q1: $< 0,75$ $\mu\text{mol/l}$). Die hierbei mit jeder aufsteigenden Quartil-Kategorie verbundene Risikoerhöhung belief sich auf 1,16 (HR, 95%-CI: 1,05-1,29, $p < 0,01$) bzw. 1,18 (HR, 95%-CI: 1,09-1,29, $p < 0,001$).

¹⁹ Die nicht-invasive Messung der Intima-Media-Dicke der *A. carotis communis* gilt als etablierter Surrogatparameter einer initialen Atherosklerose sowie starker Prädiktor zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse [LORENZ et al. 2007].

²⁰ adjustiert nach Alter, Geschlecht, angiographisch nachweisbarer/nicht nachweisbarer KHK, BMI, Hypertonie, Typ-2-Diabetes, Rauchstatus, LDL, HDL, Triglyceride, CRP, Fibrinogen, GFR, Homocystein, Einnahme von Antihypertonika (ACE-Hemmer, Diuretika), Antikoagulanzen, Lipidsenkern.

Einschränkend war jedoch festzustellen, dass sich die prädiktive Aussagekraft von ADMA bei weiterer Differenzierung zwischen Probanden mit und ohne KHK lediglich für erstere Gruppe als statistisch signifikant erwies.

Tab. 4: Bedeutung von ADMA als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor – Ergebnisse aus prospektiven Kohortenstudien (Auswahl)

Kollektiv	Follow-Up	Primäre Endpunkte	ADMA [$\mu\text{mol/l}$]*	Adjust. Risikoerhöhung**	Referenz
Patienten mit Niereninsuffizienz ($n=225$)	33,4 Monate	kardiovask. Ereignisse	pro Einheit	1,17 (1,04-1,33) ^a $p<0,001$	ZOCCALI et al. 2001
		Gesamt-mortalität		1,26 (1,11-1,41) ^a $p<0,01$	
männliche Nicht-raucher mit ($n=70$) und ohne KHK ($n=80$)	7,7 Jahre	akute Koronarereignisse	Q4: >0,62	3,92 (1,25-12,3) ^b $p<0,05$ vs. Q1	VALKONEN et al. 2001
KHK-Patienten nach perkutaner Koronarintervention ($n=153$)	16 Monate	kardiovask. Ereignisse	T3: >0,62	5,26 (2,16-12,9) ^c $p<0,001$ vs. T1	LU et al. 2003b
		Tod + nicht-tödlicher MI		9,33 (1,09-79,7) ^c $p<0,05$ vs. T1	
KHK-Patienten ($n=1874$)	2,6 Jahre	kardiovask. Ereignisse	T3: >0,70	2,62 (1,52-4,51) ^a $p<0,001$ vs. T1	SCHNABEL et al. 2005 <i>AtheroGene-Study</i>
Patienten mit fortgeschrittener pAVK ($n=496$)	19 Monate	kardiovask. Ereignisse + Gesamt-Mortalität	Q4: \geq 0,64	1,70 (1,02-2,88) ^a $p<0,05$ vs. Q1	MITTERMAYER et al. 2006
Probanden mit ($n=2543$) und ohne KHK ($n=695$)	5,45 Jahre	kardiovask. Mortalität	Q4: \geq 0,89	1,52 (1,01-2,12) ^a $p<0,05$ vs. Q1	MEINITZER et al. 2007
		Gesamt-mortalität		1,60 (1,22-2,09) ^a $p=0,001$ vs. Q1	<i>The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study</i>
Typ-2-Diabetiker ($n=125$)	21 Monate	kardiovask. Ereignisse + Gesamt-Mortalität	T3: >0,63	2,37 (1,05-5,35) ^a $p<0,05$ vs. T1	KRZYKANOWSKA et al. 2007
gesunde männliche Nichtraucher ($n=256$)	6,2 Jahre	MI (tödlich, nicht-tödlich) + plötzlicher Herztod	T3: \geq 0,86	2,40 (1,14-5,08) ^a $p<0,05$ vs. T1	MAAS et al. 2007 <i>MONICA Augsburg</i>
Probanden mit und ohne KHK ($n=800$)	4 Jahre	kardiovask. Ereignisse + kardiovask. Mortalität	in der Auswertung [LENZEN 2008]		MÜGGE et al. 2003 <i>CARDIAC-PRO</i>

* Q(1-4)=Quartile (1-4), T(1-3)=Tertile (1-3), ** bei Angabe unterschiedlicher Modelle sind diejenigen mit der höchsten Anzahl an möglichen Adjustierungsvariablen dargestellt

^a Hazard Ratio (95%-CI)

^b Odds Ratio (95%-CI)

^c Relatives Risiko (95%-CI)

2.2.3.2 Diskutierte Mechanismen einer durch kardiovaskuläre Risikofaktoren induzierten ADMA-Akkumulation

Wie aus den in Kap. 2.2.3.1 aufgezeigten epidemiologischen und biochemischen Befunden hervorgeht, fungiert ADMA nicht nur als Marker sondern zugleich als Mediator eines erhöhten kardiovaskulären Risikos. Dass hierbei eine kausale Verknüpfung beider Ebenen besteht, wird u. a. durch Beobachtungen am Tiermodell gestützt, wonach experimentell induzierte kardiovaskuläre Risikofaktoren wie z. B. Hypercholesterolämie [BODE-BÖGER et al. 1996; BÖGER et al. 1997a] oder Hyperhomocysteinämie [BÖGER et al. 2000a] mit einem Anstieg der ADMA-Plasmakonzentration einhergehen. So wurde beispielsweise bei Kaninchen, die unter einer hypercholesterolämischen Diät gehalten wurden, eine 1,6-2-fache Erhöhung der ADMA-Plasmaspiegel gegenüber normocholesterolämisch ernährten Kontrolltieren festgestellt ($p < 0,05$). Die fütterungsinduzierte Hypercholesterolämie bewirkte zudem eine signifikante Reduktion der renalen Nitrat-Exkretion (~60% vs. Kontrollen) als *In-vivo*-Marker einer verminderten endogenen NO-Bildung [BODE-BÖGER et al. 1996; BÖGER et al. 1997a]. BÖGER et al. [2005] zufolge kann die durch ADMA verursachte NOS-Inhibition damit als wichtiger integrativer Mechanismus angesehen werden, über welchen kardiovaskuläre Risikofaktoren bzw. die den Risikofaktoren zuordbaren (Primär-)Noxen zur Dysfunktion des Endothels beitragen (vgl. Kap. 2.1.2.2, Tab. 2).

In Hinblick auf eine (patho-)physiologische Modulation des ADMA-Spiegels in Plasma und Gewebe lassen sich – ausgehend von der unter Kap. 2.2.2 dargestellten Biochemie des ADMA-Stoffwechsels – grundsätzlich vier determinierende Größen differenzieren [STÜHLINGER U. STANGER 2005; BELTOWSKI U. KEDRA 2006; JACOBI U. TSAO 2008]:

- (1) der Grad der PRMT-katalysierten Methylierung von proteingebundenen L-Argininresten,
- (2) die Proteolyserate methylargininhaltiger Proteine,
- (3) die Höhe der renalen ADMA-Clearance sowie
- (4) das Ausmaß des DDAH-abhängigen ADMA-Katabolismus.

Wenngleich der relative Beitrag der einzelnen Komponenten nicht genau bekannt ist und in Abhängigkeit von der pathophysiologischen Situation (z. B. in hyperkatabolen Stadien oder bei eingeschränkter Nierenfunktion) großen Schwankungen unterliegen kann, so zeigen die nachfolgend beschriebenen experimentellen Befunde, dass sowohl der anabole PRMT-Reaktionsweg als auch der DDAH-abhängige ADMA-Abbau als die zentralen Effektebenen anzusehen sind, welche durch verschiedene proatherogene Noxen in Richtung eines vermehrten ADMA-Anfalls moduliert werden.

Determinanten einer gesteigerten ADMA-Synthese infolge einer erhöhten PRMT-abhängigen Methylierungsaktivität

Über die PRMT-abhängige Methylierung und ihre Regulation existieren bislang nur unzureichende Kenntnisse [VALLANCE U. LEIPER 2004; BELTOWSKI U. KEDRA 2006]. Wie an humanen Endothelzellen nachgewiesen werden konnte, erhöht **moderater Scherstress** (15 dyne/cm^3)²¹ die PRMT-I-mRNA-Expression und damit einhergehend die endotheliale ADMA-Bildung [OSANAI et al. 2003]. Indessen ließ sich unter einer erhöhten Scherkraftintensität (25 dyne/cm^3) eine Abnahme der intrazellulären ADMA-Gehalte durch Stimulation der DDAH-Aktivität feststellen. Da Scherstress zugleich die eNOS-Aktivität steigert (vgl. Kap. 2.1.1.1, Tab. 1), folgerten die Autoren, dass die PRMT-abhängige Methylierung eine wichtige determinierende Größe der physiologischen ADMA-Konzentration und damit NO-Produktion darstellt. Des Weiteren beobachteten OSANAI et al. [2003], dass die durch Scherstress induzierte Steigerung der PRMT-I-Expression ebenso wie der damit assoziierte ADMA-Anstieg durch Blockade des NF κ B-Signalwegs aufgehoben wird, was eine **redoxsensitive Regulation** der PRMT-abhängigen ADMA-Synthese nahelegt.

Die Annahme einer redoxsensitiven Regulation wird auch durch experimentelle Befunde der Arbeitsgruppe um BÖGER et al. [2000b] gestützt, die in kultivierten Endothelzellen (HCAEC) eine 1,5-2,5-fache Erhöhung der PRMT-I-(mRNA-)Expression nach Inkubation mit nativem LDL (**nLDL**, 200 bzw. 300 mg/dl) sowie oxidiertem LDL (**oxLDL**, 10 bzw. 30 mg/dl) aufzeigen konnten. Die hieraus resultierende Steigerung der PRMT-I-spezifischen Methylierungsaktivität spiegelte sich in einer signifikanten und von der nLDL- (100-300 mg/dl) und oxLDL-Konzentration (3-30 mg/dl) abhängigen Zunahme der zellulären ADMA-Freisetzung wider, während sich in Hinblick auf SDMA keine signifikanten Veränderungen fanden. Für eine Beteiligung oxidativer Prozesse spricht dabei im Besonderen die Beobachtung, wonach die durch nLDL- und oxLDL-induzierten Effekte hinsichtlich der PRMT-I sowie ADMA in Gegenwart von Pyrollidin-Dithiocarbamat (PDTC, 1 $\mu\text{mol/l}$), einem synthetischen Antioxidanz, verhindert werden konnten [BÖGER et al. 2000b]. Zu vergleichbaren Ergebnissen gelangten JIANG et al. [2006] im Rahmen eines Versuchsansatzes, in dem Endothelzellen (HUVEC-12) mit **oxLDL** (10 mg/dl) bzw. Lysophosphatidylcholin²² (**LPC**, 0,5 mg/dl) inkubiert wurden. Hierbei zeigte sich, dass die Co-Inkubation mit PDTC (1 $\mu\text{mol/l}$) und Probuco²³ (2,5 bzw. 5,0 $\mu\text{mol/l}$) den unter oxLDL- und LPC-Exposition messbaren Anstieg der PRMT-I-Expression

²¹ Scherkraftintensität, die den unter physiologischen Bedingungen auf die Gefäßwand einwirkenden mechanischen Kräften entspricht [OSANAI et al. 2003].

²² Hauptkomponente in oxidierten LDL-Partikeln, welche u. a. eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten besitzt und die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sowie die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen induziert [KOUGIAS et al. 2006].

²³ Lipidsenker (Diphenyl-Dithioetherderivat) mit starken antioxidativen sowie antiinflammatorischen Eigenschaften [YAMAMOTO 2008].

bei zugleich signifikanter Erhöhung der ADMA- und Malondialdehyd(MDA)-Konzentration zu reprimieren vermochte. Auch wirkte sich die Zugabe beider Antioxidanzien positiv auf den NO_x -Gehalt des Mediums sowie die Aktivität der DDAH (vgl. S. 39) im Sinne einer Erhöhung (jeweils $p < 0,05$ vs. oxLDL- und LPC-Inkubation ohne PDTC- bzw. Probucol-Zusatz) aus.

Neben den für nLDL und oxLDL beschriebenen Befunden verzeichneten BÖGER et al. [2000b] in ihren *In-vitro*-Untersuchungen eine konzentrationsabhängige sowie durch die PRMT-Inhibitoren SAH, Adenosin-2,3-Dialdehyd und Cycloleucin hemmbare Steigerung der ADMA-Synthese unter dem Einfluss von **L-Methionin** und **DL-Homocystein**. Der durch Methionin hervorgerufene Effekt erreichte dabei ein vergleichsweise stärkeres Ausmaß als die durch Homocystein erzielte ADMA-Zunahme. Analog zu den für nLDL und oxLDL durchgeführten Inkubationsversuchen blieb der SDMA-Gehalt des Mediums hiervon unbeeinflusst. Unter Zugabe von Methionin, der Vorstufe des für die PRMT-abhängige Methylierung erforderlichen Methylgruppen-Donors SAM (vgl. Abb. 6), ließ sich zudem ein signifikanter Anstieg der Homocysteinkonzentration infolge einer erhöhten Methionin-Demethylierung feststellen [BÖGER et al. 2000b]. *In-vivo-Daten*, die eine signifikante und mit einer endothelialen Dysfunktion assoziierte Erhöhung der ADMA-Plasmakonzentration im Zusammenhang mit einer **Hyperhomocysteinämie nach oralem Methionin-Belastungstest** (oMBT, Methionin-Load: 100 mg/kg Körpergewicht) aufzeigen [BÖGER et al. 2000a; BÖGER et al. 2001, STÜHLINGER et al. 2003, ANTONIADES et al. 2006], stützen insgesamt die Hypothese, wonach eine erhöhte SAM-Verfügbarkeit bzw. eine Reduktion des SAH-/SAM-Quotienten als „Trigger“ der ADMA-Akkumulation fungiert. Anders dürfte sich die Situation hingegen bei einer **klinischen Hyperhomocysteinämie** darstellen, die mit einer Erhöhung des SAH-/SAM-Ratios, gleichbedeutend mit einer Verringerung der Methylierungsrate, einhergeht. Es ist daher anzunehmen, dass in diesem Fall das prooxidative Potenzial von Homocystein und damit verbunden eine Hochregulation der PRMT-Expression – ähnlich dem für Scherstress und (ox-)LDL gezeigten Mechanismus – den inhibitorischen Effekt von SAH auf die PRMT-Aktivität kompensiert [STÜHLINGER et al. 2001; JONASSON et al. 2003; LENTZ et al. 2003; DAYAL U. LENTZ 2005].

Determinanten eines verminderten ADMA-Katabolismus infolge einer reduzierten DDAH-Aktivität

Wie bereits im Zusammenhang mit den enzymkinetischen Besonderheiten des DDAH-abhängigen ADMA-Abbaus angesprochen (vgl. Kap. 2.2.2.2), stellt dieser eine kritische Stellgröße der intra- und extrazellulären ADMA-Konzentration dar. Angesichts dieses Sachverhalts sowie des vergleichsweise geringeren eliminatorischen Beitrags der renalen Exkretion, besteht wissenschaftlicher Konsens darüber, dass eine Deregulation des DDAH-ADMA-Systems als der für eine ADMA-Akkumulation wesentliche pathophysiologische

Mechanismus bei nierengesunden Personen anzusehen ist [TRAN et al. 2003; BÖGER et al. 2005; FLISER 2005; BEŁTOWSKI U. KEDRA 2006]. Wichtige Anhaltspunkte hierfür lieferten u. a. die von MACALLISTER et al. [1996] mit dem synthetischen DDAH-Hemmstoff 4124W²⁴ erhobenen *In-vitro*-Befunde. Demgemäß bewirkt eine pharmakologische Inhibition der DDAH nicht nur eine signifikante ADMA-Akkumulation in kultivierten Endothelzellen, sondern geht mit funktionellen Veränderungen wie z. B. einer Hemmung der Bradykinin-induzierten und damit NO-abhängigen Gefäßrelaxation in humanen Venen-Isolaten einher. In Übereinstimmung hierzu zeigen Untersuchungen an DDAH-transgenen Mäusen – einem *In-vivo*-Modell, das einer verstärkten DDAH-Aktivität infolge einer Überexpression des humanen DDAH-I-Gens entspricht – signifikant geringere ADMA-Plasmaspiegel (ca. 50%) im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren. Der hierbei zu beobachtende ADMA-Abfall war zudem mit einer 2-fach höheren Urin-NO_x-Ausscheidungsrate assoziiert. Zugleich wiesen die transgenen Versuchstiere eine Verbesserung der kardiovaskulären Hämodynamik, ersichtlich an den signifikant geringeren systolischen Blutdruckwerten (im Mittel 13 mmHg vs. Kontrollen) sowie anhand eines verminderten peripheren Gefäßwiderstands, auf [DAYOUB et al. 2003].

Neben diesen Hinweisen für eine Beeinflussbarkeit der NO-Synthese und damit assoziierten funktionellen Parametern durch eine Modulation der DDAH, deuten Strukturanalysen darauf hin, dass die Deregulation des DDAH-ADMA-Systems auf eine Aktivitätsänderung der DDAH zurückgeführt werden kann, die auf einer posttranslationalen Modifikation des Enzyms und nicht - wie im Fall der PRMT - auf einer erhöhten Expression beruht. So enthält das aktive Zentrum der DDAH eine für die Reaktion mit dem Substrat ADMA essenzielle und gegenüber oxidativen Stress empfindliche SH-Gruppe (Cystein-249), was auf eine **redoxsensitive Regulation** der Enzymaktivität schließen lässt [MURRAY-RUST et al. 2001; SYDOW U. MÜNZEL 2003; PALM et al. 2007]. Dementsprechend lässt sich die DDAH durch SH-Gruppenblockierende bzw. -oxidierende Agenzien (z. B. HgCl₂, p-Chlormercuribenzoat) inhibieren [OGAWA et al. 1987].

Eine durch prooxidative Stimuli induzierte ADMA-Akkumulation, die aus einer verminderten DDAH-Aktivität resultiert, konnte inzwischen auch durch verschiedene experimentelle Beobachtungen untermauert werden. Den ersten Beleg hierfür erbrachten die von ITO et al. [1999] durchgeführten Zellkulturversuche (ECV304), in denen eine signifikante Zunahme der endothelialen ADMA-Freisetzung unter Inkubation mit 10 mg/dl **oxLDL** und **TNF-α** (250 U/ml) nachgewiesen wurde (6- bzw. 8-facher Anstieg vs. Kontrollen). Dieser Effekt war mit einem signifikanten Abfall der DDAH-Aktivität auf jeweils 63% des Ausgangsniveaus bei zugleich unveränderten DDAH-Proteinspiegeln assoziiert. Des Weiteren ließ sich eine nicht

²⁴ S-2-Amino-4-(3-Methylguanidino)Butansäure

signifikante Verdopplung der ADMA-Konzentration nach Zusatz von 10 mg/dl **nLDL** und 3 mg/dl oxLDL aufzeigen, was auf einen für oxLDL vergleichsweise stärkeren ADMA-akkumulativen Effekt hinweist. Ähnliche Ergebnisse erbrachten Untersuchungen der Arbeitsgruppe um JIANG et al. [2003], die ausschließlich nach Inkubation mit oxLDL, nicht jedoch nLDL, eine Erhöhung der ADMA-Konzentration bei gleichzeitiger Abnahme der endothelialen DDAH-Aktivität feststellten. Gemäß der Annahme eines redoxsensitiven Mechanismus gelang wenige Jahre später der Nachweis, dass die unter dem Einfluss von oxLDL beobachteten Effekte in Gegenwart antioxidativer Substanzen reversibel sind. Dabei setzten TANG et al. [2006] Endothelzellen (HUVEC) zunächst einer Inkubation mit oxLDL (10 mg/dl) aus, welche zu einem signifikanten Anstieg der ADMA-, TNF- α und MDA-Konzentration, einem reduzierten NO_x-Gehalt sowie zu einer signifikanten Abnahme der DDAH-Aktivität führte. Wurde demgegenüber mit Epigallocatechingallat (EGCG, 99%²⁵) co-inkubiert, so ließ sich eine signifikante Inhibition aller zuvor genannten Effekte erreichen. Die Autoren schlussfolgerten hieraus, dass EGCG eine ADMA-Senkung durch Stimulation der DDAH-Aktivität bewirkt, indem es Lipidperoxidations- sowie Inflammationsprozesse, jeweils angezeigt durch verringertes MDA bzw. TNF- α , zu hemmen vermag. Wie bereits in Bezug auf die PRMT dargelegt, konnten analoge Resultate unter Verwendung von PDTTC und Probucol in einer Versuchsanordnung mit oxLDL und LPC demonstriert werden [JIANG et al. 2006].

Des Weiteren zeigte sich in einer früheren Untersuchung, dass eine Inkubation mit DL-**Homocystein** vergleichbare Effekte auf das DDAH-ADMA-System in kultivierten Endothelzellen humanen (ECV304) und bovinen Ursprungs (BAEC) ausübt [STÜHLINGER et al. 2001]. So bewirkte diese eine dosisabhängige Steigerung der ADMA-Freisetzung in das umgebende Medium, wobei die für einen signifikanten Anstieg (~1,6-fach vs. Kontrollen) minimal erforderliche Konzentration 10 μ mol/l (BAEC) bzw. 30 μ mol/l (ECV304) Homocystein betrug. Parallel konnte eine von der Homocysteinkonzentration abhängige Abnahme der zellulären DDAH-Aktivität beobachtet werden, während die DDAH-Expressionsrate wie auch die SDMA-Konzentration nicht beeinflusst wurden. In Übereinstimmung zu den für oxLDL gemachten Befunden ließ sich durch gleichzeitige Inkubation mit PDTTC (100 μ mol/l) sowohl der ADMA-akkumulative Effekt als auch die inhibitorische Wirkung auf die DDAH-Aktivität unterdrücken. Eine konzentrationsabhängige und durch PDTTC reversible Hemmung der Enzymaktivität bestätigte sich ferner in einem zellfreien Versuchsansatz, bei dem rekombinante humane DDAH-I einer entsprechenden Homocystein-Inkubation ausgesetzt wurde. Wie STÜHLINGER et al. [2001] anhand eines immunologischen Bindungs-Assays nachweisen

²⁵ In der Publikation von TANG et al. [2006] werden unterschiedliche EGCG-Mengen angegeben (1 und 10 mg/dl bzw. 1 und 10 g/dl), so dass keine Aussage über die tatsächlich eingesetzte Dosierung möglich ist.

konnten, beruhte dieser Effekt auf einer direkten Interaktion zwischen Homocystein und der rekombinanten DDAH, was die Autoren auf eine durch reduzierende Substanzen wie PDTC reversible Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen Homocystein und der im aktiven Zentrum lokalisierten SH-Gruppe (s. o.) zurückführten. Die von STÜHLINGER et al. [2001] unter Inkubation mit Homocystein und PTDC beschriebenen Befunde ließen sich kurze Zeit später auch in kultivierten neuronalen Zellen reproduzieren [SELLEY 2004].

Basierend auf den für oxLDL und Homocystein gezeigten Daten überprüften LIN et al. [2002] die Hypothese, wonach einer durch eine **Hyperglykämie** induzierten ADMA-Akkumulation ebenfalls eine durch oxidativen Stress hervorgerufene Beeinträchtigung der DDAH-Aktivität zugrunde liegt. Sie beobachteten, dass humane Endothelzellen (HMEC-1), die in einem Medium mit hohem Glucosegehalt (25,5 mmol/l) kultiviert wurden, eine um ca. 20% geringere DDAH-Aktivität aufwiesen als Zellen, die normoglykämischen Bedingungen (5,5 mmol/l Glucose) ausgesetzt wurden ($p < 0,05$). Zugleich war festzustellen, dass eine hyperglykämische Glucose-Exposition (15-30 mmol/l) eine signifikante, dosisabhängige Zunahme der ADMA-Konzentration sowie eine signifikante Reduktion der endothelialen cGMP-Freisetzung gegenüber den normoglykämischen Kontrollen bewirkte. Wie erwartet, führte die gleichzeitige Inkubation mit dem Antioxidanz Polyethylen-konjugierte Superoxid-dismutase (PEG-SOD, 22 U/ml) zu einer vollständigen Aufhebung der durch die Hyperglykämie induzierten Effekte, wobei sich auch hier keinerlei Einfluss auf die SDMA-Konzentration des Mediums aufzeigen ließ. Eine weitere Bestätigung für ihre Hypothese fanden LIN et al. [2002] in einem *In-vivo*-Experiment, das sie an Ratten mit Streptozotocin (STZ)²⁶-induziertem Diabetes mellitus (Plasma-Glucose: 23 vs. 9,4 mmol/l in unbehandelten Kontrollen, $p < 0,05$) durchführten. So wiesen mit STZ behandelte Versuchstiere signifikant höhere ADMA-Plasmaspiegel (2,8-fach) im Vergleich zu Tieren ohne STZ-Behandlung auf. Weiterhin konnte für die STZ-Ratten eine signifikante und mit der Höhe der ADMA-Plasmakonzentration invers korrelierte ($r = -0,82$, $p < 0,01$) Reduktion der DDAH-Aktivität um 45%, gemessen an der Enzymaktivität der unbehandelten Kontrolltiere, verzeichnet werden. Hinsichtlich der DDAH-Expressionsrate ließen sich demgegenüber keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsgruppen ermitteln.

Zusammenfassend lässt sich auf Basis der im Rahmen dieses Abschnitts dargelegten *In-vitro*- und *In-vivo*-Befunde feststellen, dass die redoxensitive Stimulation der PRMT-abhängigen ADMA-Synthese und/oder Inhibition des DDAH-katalysierten ADMA-Abbaus als die wesentlichen molekularen Mechanismen angesehen werden können, welche eine durch

²⁶ Zur Induktion eines Diabetes mellitus in Versuchstieren üblicherweise verwendetes Zytostatikum mit selektiv toxischer Wirkung auf die β -Zellen des Pancreas [LIN et al. 2002; REES U. ALCOLADO 2005].

kardiovaskuläre Risikofaktoren induzierte ADMA-Akkumulation erklären [SYDOW U. MÜNZEL 2003; COOKE 2005].

3 ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

(1) Theoretischer Hintergrund/Rationale: Eine erhöhte ADMA-Plasmakonzentration gilt als potenzieller Risikofaktor für eine endotheliale Dysfunktion/Atherosklerose, wobei der durch ADMA induzierte Verlust an biologisch aktivem NO als pathobiochemisches Bindeglied zwischen etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren und der Initiation und Progression atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen angesehen wird. Demgemäß ist ein Anstieg an zirkulierendem ADMA mit dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen wie auch verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren – darunter Hypercholesterolemie und Hyperhomocysteinämie – assoziiert. Dieser Sachverhalt steht Befunden auf biochemischer Ebene gegenüber, die eine redox-sensitive und durch antioxidativ wirksame Substanzen reversible Modulation des ADMA-Stoffwechsels durch verschiedene proatherogene Noxen demonstrieren. Hierbei konnten insbesondere oxLDL und Homocystein, welche *in vitro* sowohl eine Hochregulation der PRMT-I-abhängigen ADMA-Synthese als auch Inhibition des DDAH-abhängigen ADMA-Katabolismus bewirken, als die für eine ADMA-Akkumulation wesentlichen Determinanten identifiziert werden.

(2) Basishypothese: Eine Erhöhung des oxidativen Stresses stellt den gemeinsamen pathophysiologischen Nenner für einen durch Homocystein- und oxLDL-induzierten Anstieg der ADMA-Plasmaspiegel bei Personen mit erhöhtem Atherosklerose-Risiko dar. Vor diesem Hintergrund ist davon auszugehen, dass sich durch die Behandlung bzw. Minimierung der jeweiligen Faktoren eine Senkung der ADMA-Plasmakonzentration in dieser Personengruppe erreichen lässt.

(3) Fragestellung: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit eine kombinierte Supplementierung mit B-Vitaminen (Folsäure, Vitamin B₁₂, Vitamin B₆) und antioxidativ wirksamen Mikronährstoffen (Vitamin E, Vitamin C, Zink, Selen, Coenzym Q₁₀, Carotinoide, Lycopin, Polyphenole)

(a) zu einer Reduktion der Homocystein- und oxLDL-Konzentration im Plasma/Serum bzw. Erhöhung der antioxidativen Plasmakapazität führt und

(b) sich hieraus synergistische Effekte in Hinblick auf eine Senkung der ADMA-Plasmaspiegel²⁷ bei Personen mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko gemäß den in Abb. 7

²⁷ Bedingt durch ihre antiinflammatorischen und lipidsenkenden Eigenschaften ist in diesem Zusammenhang ferner ein potenzieller Einfluss der über die Multinährstoffmischung verabreichten ω -3-Fettsäuren (vgl. Tab. 7) denkbar. Es sei darauf hingewiesen, dass auf eine Darstellung der mit der ω -3-Fettsäure-Supplementierung verbundenen Effekte zur Eingrenzung der Fragestellung im Rahmen der vorliegenden Arbeit explizit verzichtet wurde. Zum Einfluss der ω -3-Fettsäure-Gabe auf inflammatorische und weitere kardiovaskuläre Risikomarker sei auf die Dissertation von Gaby Kressel [KRESSEL 2009] verwiesen.

dargestellten biochemischen Zusammenhängen ergeben.

(c) In diesem Zusammenhang war auch die Frage zu beantworten, inwieweit die *in vitro* gemachten Befunde (s. o.) die Verhältnisse *in vivo* adäquat widerspiegeln.

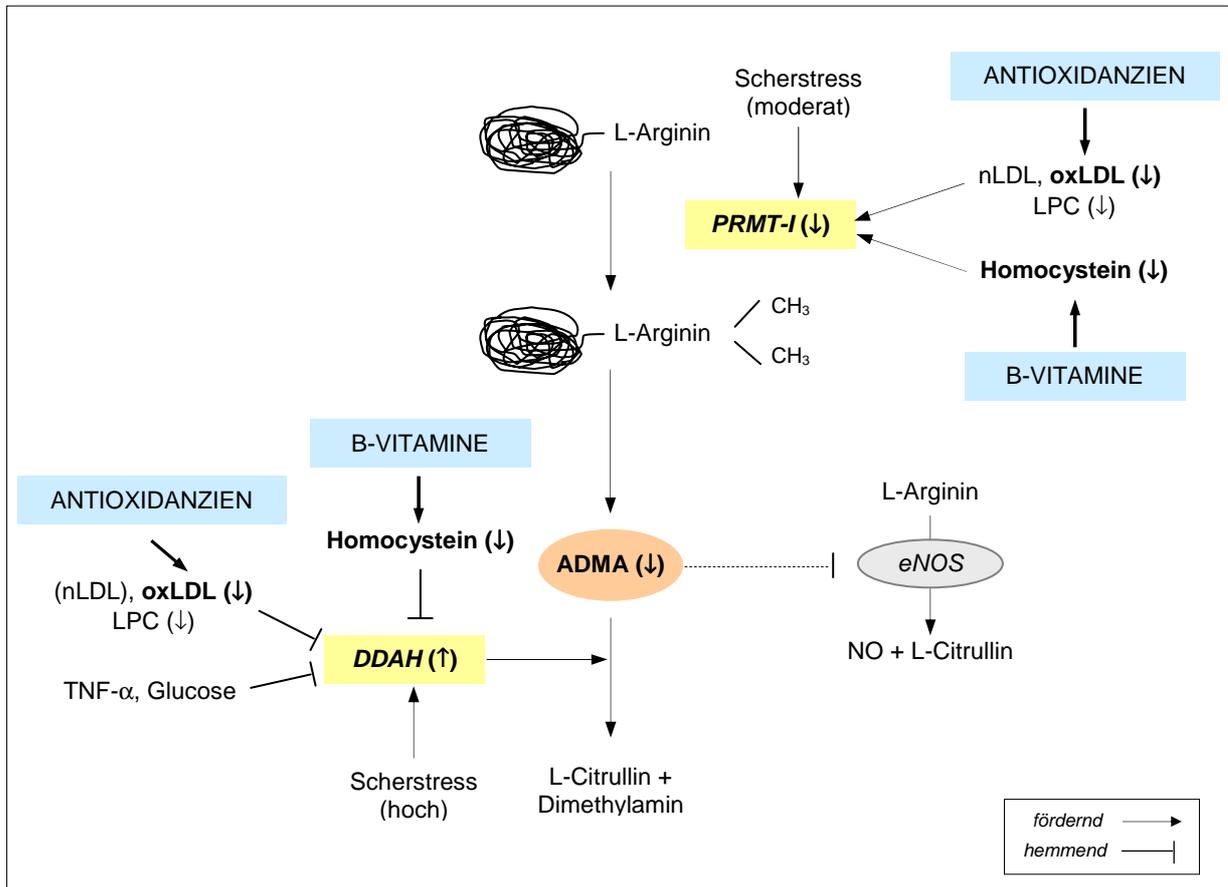


Abb. 7: Einfluss einer kombinierten B-Vitamin- und Antioxidanzien-supplementierung auf die ADMA-Plasmakonzentration bei Personen mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko – Arbeitshypothese und biochemische Rationale [eigene Darstellung]. DDAH: Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase, LPC: Lysophosphatidylcholin, nLDL: natives LDL, oxLDL: oxidiertes LDL, PRMT-I: Protein-Arginin-Methyltransferase-I, TNF- α : Tumornekrosefaktor- α .

4 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

4.1 MATERIAL UND METHODEN

4.1.1 STUDIENZIEL

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im Rahmen der Studie „*Effekte einer Nährstoff-supplementierung auf ausgewählte kardiovaskuläre Risikoparameter*“ am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Ökotrophologie, Leibniz Universität Hannover, durchgeführt.

Ziel der Interventionsstudie war es, die Auswirkungen einer physiologisch dosierten Multi-nährstoffformulierung mit Vitaminen, Mineralstoffen, Omega(ω)-3-Fettsäuren sowie sekundären Pflanzenstoffen auf definierte Blutparameter bei Personen mit erhöhtem Atherosklerose-Risiko zu untersuchen. Ein weiteres Ziel der Studie war es, Daten zum allgemeinen Gesundheits- und Ernährungsstatus dieser Personengruppe zu erheben.

Die Beurteilung der durch die Nährstoffsupplementierung induzierten Effekte erfolgte anhand von ausgewählten laborchemischen Zielgrößen. Diese beinhaltete die Bestimmung von verschiedenen **funktionell-mechanistischen Markern** hinsichtlich der für das kardio-vaskuläre Risiko relevanten Bereiche

- endotheliale Dysfunktion / NO-Stoffwechsel,
- Lipidperoxidation und antioxidative Kapazität sowie
- vaskuläre Inflammation und Adhäsion.

Des Weiteren sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Nährstoffgabe auf diverse **Basis- und Risikoparameter** in Hinblick auf

- die Versorgung der verabreichten Vitamine und Spurenelemente sowie
- das Lipidprofil und den Gerinnungsstatus (Hämostase)

ausübte²⁸. Um Einflüsse genetischer, mit den Zielparametern assoziierter Determinanten zu bestimmen, wurde zudem die Prävalenz ausgewählter Polymorphismen, u. a. der des C667T-MTHFR-Genotyps, miterfasst.

²⁸ Die entsprechenden Teilergebnisse sind Gegenstand weiterer Dissertationen [KRESSEL 2009; HÜLSMANN 2009] sowie von Diplom- bzw. Examensarbeiten [TRIEBEL 2004; MITTENDORF 2005].

Darüber hinaus wurden anthropometrische Messgrößen sowie Blutdruck- und Pulswerte ermittelt und Daten zum allgemeinen Gesundheitszustand, Lebensstil (Ernährungsgewohnheiten, Rauchverhalten, körperliche Aktivität) sowie sozioökonomischen Status mit Hilfe von Fragebögen erhoben.

4.1.2 STUDIENDESIGN

Die Untersuchung wurde als **monozentrische, randomisierte, placebo-kontrollierte Doppelblind-Studie** (randomized controlled trial, RCT) über einen Interventionszeitraum von sechs Monaten an klinisch gesunden Frauen und Männern²⁹ durchgeführt. Die Überprüfung der Effektivität der Nährstoffgabe erfolgte als Parallel-Gruppenvergleich, d. h. die Teilnehmer erhielten je nach Gruppenzugehörigkeit entweder die dem Prüf- bzw. Verumpräparat entsprechende Nährstoffmischung (Verumgruppe) oder das Kontroll- bzw. Placebopräparat (Placebogruppe)³⁰.

Die **Interventionsdauer** wurde auf sechs Monate festgelegt, um einerseits eine ausreichende Zeitspanne zu gewährleisten, in der sich durch die Nährstoffsupplementierung bedingte Veränderungen in Erythrozyten³¹ als Untersuchungsmedium widerspiegeln, was in der vorliegenden Arbeit für die Analyse der erythrozytären Folatgehalte und damit für die adäquate Beurteilung der langfristigen Folatversorgung von Relevanz war (vgl. Kap. 4.2.2.2). Zum anderen sollte sichergestellt werden, dass ggf. durch die Studienteilnahme kurzfristig ausgelöste Veränderungen der Ernährungs- und/oder Lebensgewohnheiten wieder durch die sonst alltäglichen Gewohnheiten der Probanden im Verlauf des längeren Interventionszeitraumes ersetzt wurden.

Zur Bestimmung der Zielgrößen wurden zwei **Messzeitpunkte** festgesetzt: Die Basisuntersuchung vor Beginn der Interventionsphase (T0) diente hierbei zur Erfassung des Ist-Zustands in Hinblick auf das kardiovaskuläre Risikoprofil sowie den Ernährungs- und allgemeinen Gesundheitsstatus der Teilnehmer. Die Abschlussuntersuchung (T6) erfolgte nach Interventionsende, um die Auswirkung der eingesetzten Nährstoffkombination auf die entsprechenden Zielparameter zu evaluieren.

²⁹ Falls nicht explizit ausgewiesen, wird in der vorliegenden Arbeit aus Gründen der besseren Lesbarkeit nur die männliche Form verwendet.

³⁰ In den nachfolgenden Ausführungen wird zwischen den Begriffen „Subgruppe“ (Verum- und Placebogruppe) und „Subkollektiv“ (z. B. Raucher/Nichtraucher) differenziert.

³¹ durchschnittliche Lebensdauer: 120 Tage [PSCHYREMBEL 2002, S. 489]

Um vergleichbare Vorbedingungen im Studienkollektiv zu schaffen und gleichzeitig sicher zu stellen, dass Änderungen der zu untersuchenden Blutparameter auf das Nährstoffpräparat zurückgeführt werden konnten, wurden die Probanden angewiesen, mindestens acht Wochen vor Interventionsbeginn sämtliche Vitamin- und Mineralstoffpräparate, Fischölkapseln sowie Multivitaminsäfte und mit Vitaminen angereicherte Getränke und Lebensmittel abzusetzen (**Depletionsphase**) und während des gesamten Interventionszeitraumes darauf zu verzichten. Des Weiteren wurden die Teilnehmer zur Beibehaltung ihrer sonst üblichen Ernährungs- und Lebensgewohnheiten angehalten.

Sowohl die **Verblindung** der Studienpräparate als auch die per Losverfahren durchgeführte Zuordnung der Probanden zur Verum- und Placebogruppe (**Randomisierung**) wurden vor Beginn der Intervention durch an der Studie nicht beteiligte Dritte vorgenommen. Die **Decodierung** der Gruppenzugehörigkeit erfolgte nach Beendigung der Intervention sowie doppelter Kontrolle aller in die Datenbank eingegebenen Studiendaten durch die Prüfer.

Bei der Studie handelte es sich um eine **ernährungsphysiologische Untersuchung**, die in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und in Anlehnung an die Standards zur Durchführung klinischer Prüfungen nach Good Clinical Practice (GCP) konzipiert und durchgeführt wurde. Letztere entsprechen den für Arzneimittel rechtsverbindlichen Anforderungen der „Guten Klinischen Praxis“, die u. a. eine Genehmigung des Prüfplans einschließlich der Berechnung der für die Fragestellung erforderlichen Fallzahl durch eine unabhängige Ethikkommission vorsehen³². Die Begutachtung erfolgte durch die Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH), die in der Sitzung vom 08. Juli 2003 ihre Zustimmung zur Durchführung der Studie erteilt hat.

4.1.3 STUDIENABLAUF

Nachdem ein positives Votum der Ethikkommission vorlag, wurde Ende Juli/Anfang August 2003 mit der **Rekrutierung** der Studienteilnehmer begonnen. Die Überprüfung der Teilnahme-kriterien erfolgte durch ein umfangreiches **Screening** der Studieninteressenten, das unter Kap. 4.1.4 detailliert erörtert wird. Für geeignet befundene Personen wurden in das Studienkollektiv eingeschlossen und der Verum- bzw. Placebogruppe zugeteilt (**Randomisierung**). Die Einladung zur weiteren Teilnahme an der Studie (Studienzusage) erfolgte vor Beginn der **Depletionsphase** Anfang September 2003, mit der die Probanden zum

³² Das zugrundeliegende Anforderungsprofil basiert auf den harmonisierten ICH-Leitlinien für die EU, Japan und die USA (CPMP/ICH/135/95), die den aktuellen internationalen Kenntnisstand zur ethischen, wissenschaftlichen, biometrischen und technischen Qualität klinischer Prüfungen und damit die Glaubwürdigkeit der erhobenen und ausgewerteten Daten sicherstellt [SCHWARZ 2000, S. 17f].

sofortigen Verzicht auf entsprechende Nährstoffpräparate sowie vitaminisierte Lebensmittel und Getränke (vgl. Kap. 4.1.2) bis zum Ende der Intervention angehalten wurden.

Im Anschluss an die Depletionsphase, in der Zeit vom 03.-13. November 2003, fand die **Basisuntersuchung T0** statt, zu der die Studienteilnehmer früh morgens nüchtern (Nahrungskarenz: mind. zehn möglichst jedoch zwölf Stunden) in das Institut für Lebensmittelwissenschaft und Ökotrophologie gebeten wurden. Nach Aufklärung über den weiteren Ablauf der Studie erfolgte zunächst die Erfassung der Körpergröße, des Körpergewichts und des Taillenumfangs durch Mitarbeiter des Instituts sowie die Entnahme der Nüchternblutproben durch eine approbierte Ärztin. Anschließend wurde die Messung von Blutdruck und Puls durchgeführt und mittels eines Fragebogens (*Probandendokumentationsbogen CRF T0*) weitere Daten ermittelt, die zur Charakterisierung des Studienkollektivs dienten. Hierbei handelte es sich insbesondere um Fragen zum derzeitigen Gesundheitszustand, zum Ernährungsverhalten (im *CRF T0* integrierter *Food-Frequency-Fragebogen*, vgl. Kap. 4.1.5.3) sowie um Fragen sozioökonomischer Art. Darüber hinaus wurde die bereits im Rahmen des Screenings erhobene Medikamenteneinnahme aktualisiert. Nach Beendigung der Untersuchungen wurden die für die Gesamtdauer der Intervention vorbereiteten Studienpräparate ausgehändigt, denen eine Anleitung zur korrekten Einnahme sowie ein Studienkalender zur Dokumentation vergessener Einnahmen beigelegt waren.

Die sechsmonatige **Interventionsphase** endete mit der **Abschlussuntersuchung T6**, die vom 03.-12. Mai 2004 durchgeführt wurde und deren Ablauf im Wesentlichen dem Schema der Basisuntersuchung entsprach. Zur Überprüfung der Compliance³³ wurden die Teilnehmer gebeten, die nach der Intervention übriggebliebenen Präparate zusammen mit dem zur Basisuntersuchung ausgehändigten Studienkalender zurückzugeben. Alle während der Interventionsphase beobachteten subjektiv wahrgenommenen Veränderungen (u. a. Häufigkeit von grippalen Infekten, allgemeines Wohlbefinden) wie auch Probleme bei der Einnahme der Studienpräparate wurden am Untersuchungstag selbst mit Hilfe eines *Abschlussfragebogens (CRF T6)* erhoben.

Abb. 8 gibt eine Übersicht über den zeitlichen Ablauf sowie die in der Studie eingesetzten Erhebungsinstrumente.

³³ Von einer regelmäßigen Einnahme wurde ausgegangen, wenn die Anzahl vergessener Einnahmen, gemessen an der Gesamtdauer der Interventionsphase, nicht mehr als 10 % betrug.

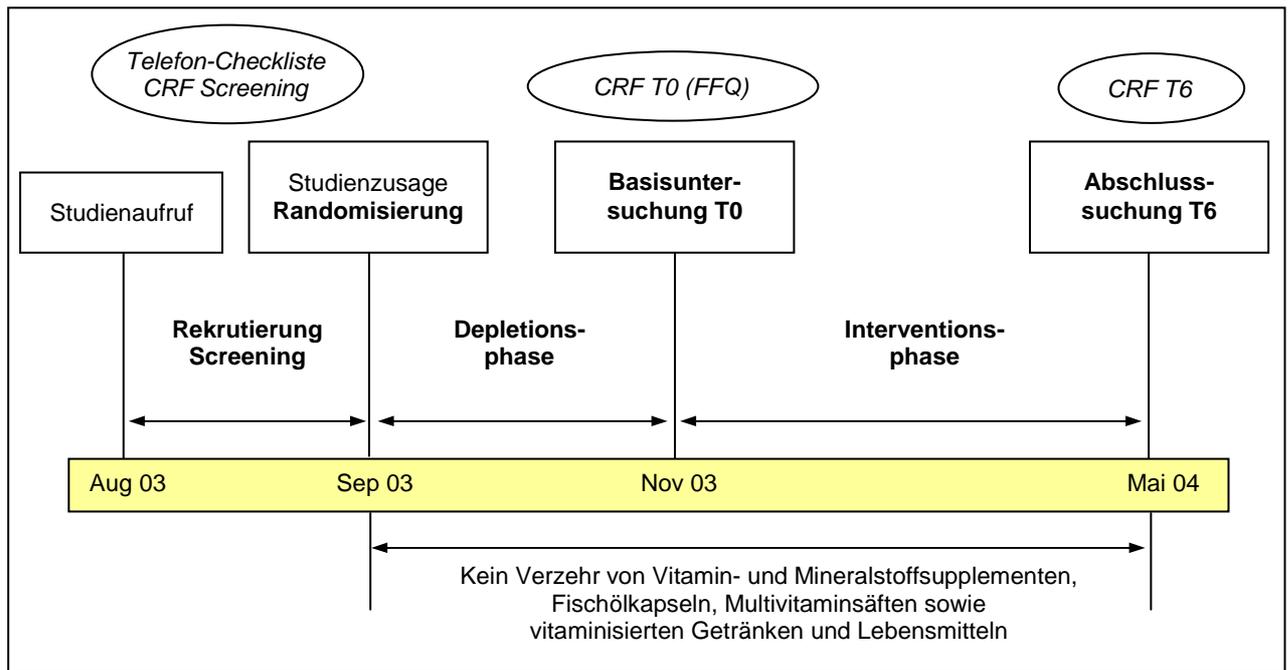


Abb. 8: Zeitlicher Ablauf der Studie

4.1.4 GEWINNUNG, SCREENING UND AUSWAHL DER PROBANDEN

4.1.4.1 Rekrutierung und Vorauswahl

Um ein ausreichend großes Kollektiv für die Studienteilnahme gewinnen zu können (Rekrutierungsziel $n=150$), wurden mehrfach Pressemitteilungen in lokalen Tages- und Werbezeitungen veröffentlicht sowie ein Aufruf über einen in Hannover ansässigen Radiosender getätigt. Interessenten, die hierauf telefonisch mit dem Institut in Kontakt getreten sind, wurden zunächst über die Inhalte und den Ablauf sowie die Teilnahmebedingungen der Studie informiert. Dieser Erstkontakt diente ferner dazu, bereits eine grobe Vorauswahl potenziell geeigneter Probanden anhand einer *Telefon-Checkliste* zu treffen. Entsprechend geeignete Interessenten wurden in eine Datenbank aufgenommen und erhielten einen Screening-Fragebogen (*CRF Screening*) zur schriftlichen Überprüfung der nachfolgend für die Studienteilnahme näher erörterten Ein- und Ausschlusskriterien (Kap. 4.1.4.2). Des Weiteren wurde diesem Schreiben eine Probandeninformation sowie eine Einwilligungs- und Datenschutzerklärung beigelegt, mit der sich die potenziellen Kandidaten in schriftlicher Form mit den Studienbedingungen einschließlich der Blutabnahmen einverstanden erklärten.

4.1.4.2 Kriterien zur Studienteilnahme

Die Zielsetzung der Studie sah voraus, klinisch gesunde Männer und Frauen zu rekrutieren, die das 40. Lebensjahr vollendet hatten und ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko aufzeigten. Die Studieninteressenten wurden daher zunächst auf ihre Eignung hinsichtlich des Vorhandenseins von Risikofaktoren überprüft, die – ausgehend von den Ergebnissen groß angelegter prospektiver Kohortenstudien (*Framingham-Study* [WILSON et al. 1998], *PROCAM-Study* [ASSMANN et al. 2002]) – mit einem erhöhten Atherosklerose-Risiko assoziiert sind. Hierzu zählten im Einzelnen folgende, durch den Prüfplan festgelegte **Einschlusskriterien**:

- Bekannte Hyper-/Dyslipidämien (Hypercholesterolämien, Hypertriglyceridämien)
- Arterielle Hypertonie
- Typ-2-Diabetes
- Positive Familienanamnese
- BMI ≥ 30 in Verbindung mit einem anderen Risikofaktor wie z. B. Rauchen

Um dabei einen möglichst repräsentativen Querschnitt von Personen mit entsprechender Disposition zu erhalten, wurde unter Berücksichtigung des Mindestalters und der schriftlichen Einwilligung der Interessenten die **Erfüllung von mindestens zwei** der zuvor genannten **Kriterien als Voraussetzung für die Studienteilnahme** definiert. In Abgrenzung zu den für die Aufnahme in die statistische Datenanalyse geltenden Kriterien (vgl. Kap. 4.1.4.3), wurden hierbei die in Tab. A3, Anhang B, aufgeführten Bedingungen³⁴ zugrunde gelegt. Wie hieraus ersichtlich wird, war im Fall des Kriteriums „Hyper-/Dyslipoproteinämie“ eine Zuordnung bei Nichteinnahme von Lipidsenkern nur anhand der subjektiven Angaben der Interessenten bzw. eines entsprechenden Laborbefunds möglich. Aus diesem Grund wurden hier im Sinne eines „Sicherheitszuschlags“ höhere Gesamtcholesterol(TC)- und LDL-Konzentrationen veranschlagt, als die in der klinischen Praxis allgemein üblichen Grenzwerte³⁵. Durch diese Vorgehensweise sollte insbesondere Unsicherheiten entgegengewirkt werden, die bei der Beurteilung von Einzelmesswerten bestehen (z. B. hohe TC-Serumkonzentrationen aufgrund

³⁴ Die Hauptgrundlage für die Definition der Eignungskriterien einschließlich der zugehörigen Grenzwerte bildeten die aus den Daten der *Framingham-* und *PROCAM-Studie* erstellten Risikovariablen [WILSON et al. 1998; ASSMANN et al. 2002] der zur Abschätzung des prospektiven KHK-Risikos (Myokardinfarkt, KHK-Mortalität innerhalb der nächsten zehn Jahre) entwickelten Algorithmen [<http://www.nhlbi.nih.gov/about/framingham/>; <http://www.chd-taskforce.com>].

³⁵ Als präventiv erstrebenswert gelten demnach bereits Gesamtcholesterol- und LDL-Konzentrationen von <200 mg/dl (5,2 mmol/l) und <135 mg/dl ($<3,5$ mmol/l) [INTERNATIONAL TASK FORCE FOR PREVENTION OF CORONARY HEART DISEASE 1998] bzw. weitaus niedrigere LDL-Grenzwerte (<100 mg/dl [$<2,6$ mmol/l]), wie sie in den international anerkannten Leitlinien des National Cholesterol Education Program (NCEP) für Personen mit einem „moderat erhöhten Risiko“ empfohlen werden [GRUNDY et al. 2004].

von hohen HDL-Werten bei Frauen), wobei unstimmige oder unvollständige Angaben durch telefonische Rücksprache mit den Interessenten zusätzlich auf Plausibilität geprüft wurden.

Unabhängig von der Eignung eines Interessenten in Bezug auf die zuvor dargestellten Eignungskriterien, war eine Studienteilnahme nur dann möglich, wenn das Vorliegen einer bereits klinisch manifesten Atherosklerose ausgeschlossen werden konnte. Demgemäß führten folgende Kriterien zum **Ausschluss** des Interessenten an der Teilnahme:

- Diagnostizierte akute Koronarsyndrome (Angina pectoris, Myokardinfarkt), Herzinsuffizienz, medikamentös behandelte Arrhythmien sowie sonstige Erkrankungen des Herzens (Herzfehler, Myokarditis etc.)
- Jeglicher Zustand nach einem operativen Eingriff am Herzen (Bypass-OP, PCTA)
- Zustand nach Apoplex
- Bekannte Verschlusskrankheiten der peripheren Arterien (pAVK)
- Diagnostizierte Niereninsuffizienz

Mit dem Ziel, eine normale Absorption der verabreichten Nährstoffkombination zu gewährleisten und ein ansonsten gesundes und möglichst homogenes Kollektiv zu rekrutieren, wurden folgende Zustände als weitere Ausschlusskriterien definiert:

- Chronische Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Zöliakie) sowie Zustand nach operativen Eingriffen am Gastrointestinaltrakt
- Regelmäßige Einnahme von Laxanzien
- Verwendung von Antikonvulsiva
- Bekannte Allergie oder Unverträglichkeit gegen Fisch
- Diagnostizierte Gerinnungsstörung und/oder Einnahme gerinnungshemmender Medikamente (Ausnahme: Acetylsalicylsäure)
- Typ-1-Diabetes
- Tumorerkrankungen innerhalb der letzten fünf Jahre
- Ausgeprägter Leberschaden oder andere schwerwiegende internistische Erkrankungen, insbesondere Malignome
- Alkohol-, Drogenabhängigkeit und/oder Medikamentenabhängigkeit
- Schwangerschaft oder Stillzeit

Des Weiteren wurde bei Interessenten von einer Aufnahme in das Kollektiv abgesehen, falls sie gleichzeitig bzw. innerhalb der vergangenen 30 Tage an einer anderen klinischen Studie teilnahmen. Gleiches traf bei Verweigerung bzw. Rücknahme der Einwilligung durch den Probanden zu.

4.1.4.3 Kriterien zur Aufnahme in die statistische Datenanalyse

Im Unterschied zu den für die Studienteilnahme definierten Einschlusskriterien, die auf den z. T. subjektiven Angaben der Studieninteressenten im Screening-Fragebogen basierten, sollten für die Aufnahme der Probanden in die nachfolgende statistische Auswertung besser zu objektivierende Kriterien hinsichtlich der Prävalenz eines erhöhten kardiovaskulären Risikos zugrunde gelegt werden. Daher wurden zu den bereits im Screening überprüften, „harten“ Eignungskriterien (manifeste Typ-2-Diabetes, familiäre Disposition, Rauchen sowie die mit dem kardiovaskulären Risiko assoziierte und für T0 gültige Medikation) zusätzlich zur Basisuntersuchung erhobene Daten (laborchemische Basisparameter, Blutdruckwerte, anthropometrische Größen) für eine entsprechende Beurteilung herangezogen.

Die sich hieraus auf Basis von Empfehlungen anerkannter internationaler Fachgremien ableitenden Eignungskriterien sind in Tab. 5 dargestellt. Wie das Beispiel des Risikofaktors „Typ-2-Diabetes“ verdeutlicht, wurden durch diese Vorgehensweise sowohl Probanden erfasst, die aufgrund einer ärztlichen Diagnose bzw. medikamentösen Therapie in die Studie aufgenommen wurden, als auch solche, die - unabhängig von den für das Screening geltenden Kriterien - aufgrund pathologisch erhöhter Nüchternblutglucosewerte zu T0 als Diabetiker identifiziert werden konnten. Um auch hier von der maßgebenden Grundvoraussetzung eines erhöhten kardiovaskulären Risikos ausgehen zu können, wurde das **Vorhandensein von mindestens zwei der sechs nach diesem Beurteilungsschema ermittelten kardiovaskulären Risikofaktoren als Bedingung für die Aufnahme in die statistische Datenanalyse** definiert. Probanden, die diese Voraussetzung nicht erfüllten, wurden durch ein nachträgliches Ausschlussverfahren ermittelt (vgl. Kap. 4.2.1.1) und von den Auswertungen im Rahmen des Ergebnisteils ausgenommen.

Tab. 5: Für die Aufnahme in die statistische Datenanalyse relevante und die Prävalenz kardiovaskulärer Risikofaktoren zugrunde gelegte Kriterien

Einschlusskriterien/ Risikofaktoren	Beurteilungskriterien
Hyper-/Dyslipoproteinämie	<ul style="list-style-type: none"> - atherogener Index (TC_T0/HDL_T0) >5,0^a - und/oder Triglyceride (TG_T0) 1,7-4,5 mmol/l (150-400 mg/dl)^b - und/oder hypolipidämische Medikation
Arterielle Hypertonie	<ul style="list-style-type: none"> - Blutdruck: systolisch (SBD_T0) ≥140 mmHg und/oder diastolisch (DBD_T0) ≥90 mmHg^c - und/oder antihypertensive Medikation
Typ-2-Diabetes	<ul style="list-style-type: none"> - ärztliche Diagnose zum Zeitpunkt des Screenings - und/oder Nüchtern-glucose (Glucose_T0) ≥7,0 mmol/l (126 mg/dl)^d - und/oder antiglykämische Medikation
Familiäre Disposition	<ul style="list-style-type: none"> - Myokardinfarkt, Schlaganfall oder pAVK im 1. Verwandtschaftsgrad vor Erreichen des 60. Lebensjahres^e
(Viszerale) Adipositas	<ul style="list-style-type: none"> - BMI_T0 ≥30 kg/m^{2f} - und TU_T0: w: ≥80 cm m: ≥94 cm^g
Rauchen	<ul style="list-style-type: none"> - regelmäßiger Zigaretten-, Zigarillo- und/oder Pfeifenkonsum - oder Aufgabe des Rauchens innerhalb der letzten 12 Monate^h

^a aussagekräftigster Prädiktor des KHK-Risikos in Bezug auf das pro- bzw. antiatherogene Potenzial der LDL- bzw. HDL-Fraktion [CASTELLI et al. 1992; KEIL et al. 2001, S. 630; INTERNATIONAL TASK FORCE FOR PREVENTION OF CORONARY HEART DISEASE 1998]

^b nach den Kriterien der INTERNATIONAL TASK FORCE FOR PREVENTION OF CORONARY HEART DISEASE [1998], wonach Triglyceridwerte >4,5 mmol/l mit dem Vorhandensein größerer, jedoch weniger atherogener Lipoproteinpartikel assoziiert sind

^c nach den Leitlinien der WHO/ISH [1999], den Empfehlungen des US-amerikanischen Joint-National Committee [CHOBANIAN et al. 2003] sowie den europäischen Gesellschaften für Hypertonie (ESH) und Kardiologie (ESC) [CIFKOVA et al. 2003]

^d eigenständiges Diabetes-Diagnosekriterium nach WHO [1999], ADA [2005] und den evidenzbasierten Leitlinien der DDG [KERNER et al. 2004] unter Voraussetzung einer 8-stündigen Nahrungskarenz

^e im PROCAM-Risk-Score berücksichtigte Variable (vgl. Kap. 4.1.4.2 sowie Tab. A3, Anhang B)

^{f,g} Grenzwerte nach WHO-Klassifikation [2000, S. 9ff], die mit einem jeweils erhöhten Komorbiditätsrisiko assoziiert sind³⁶

^h im Framingham-Risk-Score berücksichtigte Variable (vgl. Kap. 4.1.4.2 sowie Tab. A3, Anhang B)

³⁶ zur Begründung beider Kriterien vgl. auch Kap. 4.1.5.1.

4.1.5 INSTRUMENTE UND MAßNAHMEN IM RAHMEN DER UNTERSUCHUNGS- UND INTERVENTIONSPHASE

4.1.5.1 Erhebung anthropometrischer Daten, Blutdruckmessung

Die Bestimmung der anthropometrischen Daten erfolgte im Rahmen der Basis- und Abschlussuntersuchung und wurde zu beiden Zeitpunkten ausschließlich durch eine damit beauftragte Person durchgeführt. Zur Ermittlung des **Körpergewichts** wurden die Probanden im leicht bekleideten Zustand, jedoch ohne Schuhe, auf einer geeichten Waage gewogen. Die **Körpergröße** wurde abermals ohne Schuhe mit Hilfe einer Messlatte in aufrecht stehender Haltung gemessen. Anhand beider Parameter wurde der **Body Mass Index** (BMI [kg/m^2]) berechnet.

Da die BMI-Gewichtsklassifizierung mit dem Nachteil behaftet ist, Personen mit erhöhter Muskelmasse falsch-positiv als übergewichtig einzustufen [WIRTH 2000, S. 7], wurde der **Taillenumfang** (TU) als weitere anthropometrische Größe erfasst. Dieser gilt als einfaches Maß zur Beurteilung des Fettverteilungsmusters (speziell androider, viszeraler Fettakkumulation), das eine engere Korrelation mit dem intraabdominalen Fettdepot und dem adipositas-assoziierten kardiovaskulären Risiko zeigt, als der in der Vergangenheit allgemein verwendete Waist-to-Hip-Ratio [WIRTH 2000, S. 9f; HAUNER 2004, S. 246]. Die Umfangsmessung selbst wurde am aufrecht stehenden Probanden in der Mitte zwischen oberem Beckenkamm und unterem Rippenbogen bei abgespreizten Armen und leichter Expiration am freien Oberkörper durchgeführt.

Pro Proband und Untersuchungstag wurde eine dreimalige Messung der **Blutdruckwerte** durch ein geeichtes digitales Messgerät (*TENSOVAL Comfort*, Fa. Paul Hartmann AG, Heidenheim) vorgenommen. Die Messungen erfolgten in entspannter Sitzposition mit einer an den Oberarmumfang angepassten Manschette auf Herzhöhe des linken Oberarms. Zwischen den Wiederholungsmessungen wurde eine Ruhephase von je drei Minuten bei entlasteter Druckmanschette eingehalten, wodurch Verfälschungen der Messwerte durch Ischämie und Anpassung der Gefäßweite auf den vom Gerät ausgeübten Aufpumpdruck weitgehend ausgeschlossen werden sollten. Um größeren, durch die Aufregung der Studienteilnehmer hervorgerufenen Blutdruckschwankungen entgegenzuwirken, wurden die Messungen nach Entnahme der Blutproben durchgeführt und der jeweils erste Messwert zur Berechnung der mittleren Blutdruckwerte verworfen.

4.1.5.2 Probengewinnung, -aufbereitung und -analytik

Für die Bestimmung der laborchemischen Parameter wurde an beiden Untersuchungstagen eine Gesamtmenge von jeweils ca. 45 ml Nüchternblut (inkl. Rückstellproben) entnommen. Die **Blutabnahmen** erfolgten durch eine approbierte Ärztin am liegenden, leicht aufrecht gelagerten Probanden. Zur Gewinnung der Blutproben wurden geschlossene Entnahmesysteme aus *S-Monovetten*[®] und *Multifly-Kanülen*[®] (Ø 0,8 bzw. 0,9 mm) eingesetzt, die vom Hersteller (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) speziell für die Anwendung bei schlechten Venenverhältnissen empfohlen werden.

Unmittelbar nach der Entnahme wurden die mit Blut befüllten Monovetten vorsichtig gekippt und in einem lichtundurchlässigen und mit Eis befüllten Isolierbehälter in das institutseigene Labor gebracht, wo sie für die extern durchgeführten Analysen **präanalytisch aufbereitet** wurden. Für die Gewinnung von **Serum** (S) wurde das in die entsprechenden Monovetten (Zusatz: Gerinnungsaktivator) entnommene Vollblut nach einer 20-30 minütigen Gerinnungszeit für 10 min zentrifugiert (2000 x g, 19°C). Der gewonnene Überstand wurde in Eppendorf-Gefäße überführt und für die Bestimmung von Serum-Folat (S-Folat), Cobalamin (Cbl), oxidiertem LDL (oxLDL), α -Tocopherol (AT) sowie diversen Basisparametern (vgl. Tab. 6) aliquotiert. Die für die Analyse von oxLDL³⁷ bestimmten Probengefäße wurden unmittelbar vor dem Verschließen zusätzlich mit Stickstoff abgeblasen, um einer Oxidation durch Luft-sauerstoff vorzubeugen.

Das zur Gewinnung von **Plasma** (P) in K-EDTA-Monovetten entnommene Blut wurde ebenfalls durch Zentrifugation (10 min, 2000 x g, 19°C) aufbereitet und für die Aminosäure-Analytik (ADMA, SDMA, L-Arginin), die Bestimmung von Homocystein (tHcy) und Pyridoxal-phosphat (PLP) sowie der antioxidativen Kapazität (TEAC) eingesetzt. Um verfahrensbedingte, d. h. durch unterschiedliche Stehzeiten fortgeschrittene erythrozytäre Abbau-prozesse als mögliche Fehlerquelle bei der Quantifizierung der Dimethylarginine weitgehend ausschließen zu können, wurden die hierfür vorgesehenen Proben in konstanten Zeitintervallen (standardisiert auf jeweils 10 min nach der Blutentnahme) zu Plasma aufbereitet. Blutproben, die für die Bestimmung von Homocystein vorgesehen waren, wurden bis zur Aufbereitung kontinuierlich auf Eis gelagert, um einen Konzentrationsanstieg (10-20% bei nicht ausreichend gekühlten Proben [UELAND U. REFSUM 1989]) durch erythrozytäre Synthese möglichst gering zu halten.

³⁷ Die Bestimmung von oxLDL wurde aus organisatorischen Gründen an einer kleineren Gesamtstichprobe ($n=102$, nachfolgend als „Teilstichprobe“ bezeichnet) durchgeführt.

Dem für die Analyse von Erythrozyten-Folat (E-Folat) benötigten EDTA-**Vollblut** (V) wurde ein Aliquot (300 µl) zur **Extraktion von Erythrozyten-DNA** entnommen, das bis zur Herstellung einer stabilen, bei Raumtemperatur lagerfähigen Zell-Lysat-Lösung institutsintern aufbereitet wurde (*GenomicPrep Blood DNA Isolation Kit*, Nr. 27-5236-01, Fa. Amersham Biosciences, Freiberg). Hierzu wurden die Proben zunächst für 10 min mit 900 µl RBC Lyse-Reagenz versetzt, zentrifugiert und der nach Entnahme des Überstands verbleibende weiße Zelniederschlag mit 10-20 µl Restüberstand erneut in Lösung gebracht. Mittels Zusatz von 300 µl Zell-Lyse-Reagenz wurde anschließend das stabile Zell-Lysat gewonnen, aus dem in weiteren, extern durchgeführten Verarbeitungsschritten die zur molekulargenetischen Analyse des C677T-MTHFR-Polymorphismus erforderliche DNA extrahiert wurde (vgl. Anhang C).

Nach der präanalytischen Aufbereitung wurden alle Probengefäße zunächst kühl (+4°C) und dunkel zwischengelagert. Proben, die durch das vor Ort ansässige Institut für Klinische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover, analysiert wurden, wurden noch am Tag der Entnahme im gekühlten Zustand weitergeleitet. Mit Ausnahme der für die DNA-Isolation stabilisierten Zell-Lysat-Proben (Lagerung und Transport bei +8 C) wurden alle weiteren Proben bis zu ihrer Bestimmung durch auswärtige Labore bei -70°C tiefgefroren und auf Trockeneis durch einen Laborkurierdienst versandt. Zugleich wurden Rückstellproben bei -70°C eingefroren.

Eine Übersicht der in der Arbeit berücksichtigten Untersuchungsgrößen und zugehörigen **Analysemethoden** gibt Tab. 6. Details zu den verwendeten Analysemethoden, bei denen es sich um etablierte, validierte Standardverfahren – größtenteils unter Verwendung klinisch-chemischer Analysegeräte und kommerziell erhältlicher *In-vitro*-Diagnostika – sind in Anhang C aufgeführt.

Tab. 6: Probenmaterial, Labor und angewendetes Analyseverfahren der in der vorliegenden Arbeit berücksichtigten laborchemischen Parameter

Parameter	Probe	Labor	Analysemethode
Aminosäuren			
Dimethylarginine (ADMA, SDMA)	P	MLHB ^a	HPLC-ESI-MS/MS
L-Arginin (L-Arg)	P	MLHB	HPLC-ESI-MS/MS
B-Vitaminstatus			
Homocystein (tHcy)	P	MHH ^b	Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay; <i>AxSYM® Homocystein</i> , Abbott Laboratories, Wiesbaden
Serum-/Erythrozyten-Folat (S-/E-Folat)	S/V	MHH	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay; <i>Folate Elecsys®-Test</i> , Roche Diagnostics, Mannheim
Cobalamin (Cbl, Vitamin B ₁₂)	S	MHH	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay; <i>Vitamin B₁₂ Elecsys®-Test</i> , Roche Diagnostics, Mannheim
Pyridoxalphosphat (PLP, Vitamin B ₆)	P	MHH	RP-HPLC, Fluoreszenz-Detektion
Oxidationsmarker/Antioxidanzienstatus			
Oxidiertes LDL (oxLDL)	S	MLHB	Kompetitiver ELISA; <i>Mercodia Oxidized LDL Competitive ELISA</i> , Mercodia AB, Uppsala
Antioxidative Kapazität	P	BFEL ^c	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)
α-Tocopherol (AT, Vitamin E)	S	MLHB	RP-HPLC, UV-VIS-Detektion
Begleit-/Basisparameter			
Creatinin	S	MHH	Enzym. Farbttest (Sarcosin-Test); <i>CREA plus</i> , Roche Diagnostics, Mannheim
Harnsäure	S	MHH	Enzym. Farbttest; <i>UA plus</i> , Roche Diagnostics, Mannheim
Cholesterol, gesamt (TC)	S	MHH	Enzym. Farbttest (CHOD-PAP); <i>CHOL</i> , Roche Diagnostics, Mannheim
HDL-Cholesterol (HDL)	S	MHH	Enzym. Farbttest nach Immuno-inhibition; <i>HDL-C L-Type</i> , Wako Chemicals, Neuss
LDL-Cholesterol (LDL)	S	MHH	Enzym Farbttest nach selektiver Maskierung; <i>LDL-C L-Type</i> , Wako Chemicals, Neuss
Triglyceride (TG)	S	MHH	Enzym. Farbttest (GPO-PAP); <i>TG</i> , Roche Diagnostics, Mannheim
Glucose	S	MHH	Enzym. Farbttest (Hexokinase-Test); <i>Gluco-quant®</i> , Roche Diagnostics, Mannheim
5,10-Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Polymorphismus (C677T-MTHFR)	V	BFEL	RFLP-PCR, Endonuclease Hinf I Digestion

^a Medizinisches Labor Bremen, Kooperationspartner: Prof. Dr. W.N. Kühn-Velten^b Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Klinische Chemie, Kooperationspartner: Prof. Dr. R. Lichtinghagen^c Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Landwirtschaft, Institut für Ernährungsphysiologie, Kooperationspartner: Dr. A. Bub

Die Analyseergebnisse³⁸ wurden gemäß den ICH-Leitlinien zur „Guten Klinischen Praxis“ (CPMP/ICH/135/95) sowie den in der „Richtlinie der Bundesärztekammer zur **Qualitätssicherung** quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen“ [RiLiBÄK 2001; 2003] festgelegten Verfahrenskontrollen durch die kooperierenden Labore unterzogen. Diese sehen die laborinterne Überprüfung qualitätsspezifischer Zuverlässigkeitskriterien (Präzision, Richtigkeit, analytische Sensitivität [Nachweisgrenze], Spezifität) anhand von Kontrollprobensystemen vor, welche für die hier erhobenen Analyte mit Erfolg durchgeführt wurden.

Für die in der Routinediagnostik verwendeten Analyseverfahren wurden darüber hinaus externe Qualitätskontrollen im Rahmen von Ringversuchen durchgeführt. Letztere dienen zur Überprüfung der Ergebnisqualität unter Beteiligung sog. Referenz- und Sollwertlaboratorien, die Zielwerte zur sachgemäßen Durchführung von Ringversuchen erarbeiten und sich durch besondere Kompetenzen im Bereich der Qualitätssicherung und Methodenprüfung auszeichnen. Unter den an der Studie beteiligten Laboren wurden diese besonderen Voraussetzungen durch das Medizinische Labor Bremen (MLHB, akkreditiertes Prüflabor nach DIN EN ISO 15189) und das Institut für Klinische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover, erfüllt (ausgewiesene Referenz- und Sollwertlaboratorien gemäß RiLiBÄK 2001; 2003).

4.1.5.3 Erhebung des Ernährungsverhaltens

Um Aufschluss über die allgemeinen Ernährungsgewohnheiten des Kollektivs zu erhalten, wurde vor Beginn der Intervention eine Befragung zum Verzehr ausgewählter Lebensmittelgruppen mit Hilfe eines validierten *Food-Frequency-Fragebogens* (FFQ) durchgeführt. Primäres Ziel dieser Erhebung war es, eine qualitative Beurteilung des Ernährungsverhaltens anhand von Ernährungsmustern vornehmen zu können, wobei die Risikocharakteristik des Studienkollektivs spezielle Berücksichtigung finden sollte. Des Weiteren war es Ziel zu eruieren, ob vor Untersuchungsbeginn unterschiedliche Verzehrsgewohnheiten in der Verum- und Placebogruppe bestanden haben, die ggf. zur Erklärung bei eventuell zu beobachtenden Unterschieden bezüglich der initialen Nährstoffversorgung beider Subgruppen herangezogen werden konnten.

³⁸ Mit Ausnahme von oxLDL erfolgen alle in der Arbeit verwendeten Konzentrationsangaben in der Stoffmengenkonzentration (SI-Einheit). Zur Vergleichbarkeit mit Daten aus anderen Studien/Publikationen wurden die jeweiligen Angaben ebenfalls in die Stoffmengenkonzentration unter Verwendung der in Anhang D dargestellten Faktoren umgerechnet. Zur Verwendung der Einheit U/l in Zusammenhang mit der oxLDL-Bestimmung vgl. die Ausführungen zur Methodenbeschreibung unter Anhang C.

Der eingesetzte FFQ wurde von WINKLER U. DÖRING [1995] mit dem Ziel entwickelt und validiert³⁹, eine in Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen günstige bzw. ungünstige Ernährungsweise auf Basis eines Punkindex („Ernährungsmusterindex“) abzubilden. Hierbei werden folgende **Ernährungsmuster-Kategorien** unterschieden:

- optimales „günstiges“ Ernährungsmuster
- mittleres „normales“ Ernährungsmuster
- abweichendes „ungünstiges“ Ernährungsmuster

Der an die Probanden ausgehändigte und geringfügig modifizierte⁴⁰ FFQ (vgl. Abb. A2, Anhang A) beinhaltet 19 Lebensmittelgruppen, deren Verzehrshäufigkeit für die ab dem Zeitpunkt T0 zurückliegenden zwölf Monate mit Hilfe einer sechsstufigen Häufigkeitsskala retrospektiv erfasst wurde.

Zur **Bildung des Ernährungsmusterindex**, wurden die Verzehrshäufigkeiten von 15 der insgesamt 19 abgefragten Lebensmittelgruppen anhand einer dreistufigen Punkteskala (0-2 Punkte) bewertet. Die Zuordnung von Punktwerten erfolgte gemäß des in Tab. A4, Anhang B, dargestellten Bewertungsschemas, wobei Punktwerte vorrangig für solche Lebensmittelgruppen vergeben wurden, die gemäß den allgemein anerkannten Empfehlungen zur Atherosklerose-Prävention eindeutig „positiv“ oder „negativ“ beurteilt werden können⁴¹. So wurde z. B. ein täglicher Verzehr der Gruppe „Gemüse (roh) oder Salat“ mit zwei Punkten (= optimale, „günstige“ Verzehrshäufigkeit) bewertet, ein Verzehr von 2-3 mal wöchentlich erhielt einen Punkt (= mittlere, „normale“ Verzehrshäufigkeit), während alle anderen Häufigkeits-Kategorien mit null Punkten (= abweichende, „ungünstige“ Verzehrshäufigkeit) in den Index einberechnet wurden. Die endgültige Zuordnung eines Probanden zu einer der drei Ernährungsmuster-Kategorien erfolgte durch die abschließende Summation aller der für die insgesamt 15 Lebensmittelgruppen nach dieser Verfahrensweise zu vergebenden Punktwerte.

³⁹ Die Validierung erfolgte im Rahmen der *MONICA-Studie Augsburg* durch den Vergleich mit detaillierten 7-Tage-Ernährungsprotokollen als Referenzmethode [WINKLER U. DÖRING 1995; 1998].

⁴⁰ Die Anzahl der erhobenen Lebensmittelgruppen wurde für weiterführende Analysen von 15 auf insgesamt 19 Gruppen erweitert, wobei die zusätzlichen Items nicht in den Punkindex einberechnet wurden.

⁴¹ Das von WINKLER U. DÖRING [1995] entwickelte Bewertungsschema orientiert sich hierbei im Wesentlichen an den DGE-Verzehrempfehlungen, die im Rahmen der Primärprävention als gesund erhaltende Ernährungsweise empfohlen wird.

4.1.5.4 Zusammensetzung und Dosierung der Studienpräparate

In Abhängigkeit von der Zuordnung zur Verum- bzw. Placebogruppe erhielten die Probanden identisch aussehende Weichgelatinekapselfüllgüter, mit der Vorgabe, **täglich 2 x 2 Kapseln** mit ausreichend Flüssigkeit jeweils zu einer Mahlzeit einzunehmen. Die Einnahme sollte am Folgetag der Basisuntersuchung beginnen und bis einschließlich zum Vortag der Abschlussuntersuchung fortgesetzt werden. Des Weiteren wurden die Studienteilnehmer angewiesen, die Präparate weder zu öffnen noch zu zerkauen oder in anderer Weise zu zerkleinern.

Bei den Prüfpräparaten (**Verumkapseln**) handelte es sich um eine komplexe Multivitamin-/Mineralstoffformulierung, die neben ausgewählten B-Vitaminen sowie antioxidativ wirksamen Mikronährstoffen einen hohen Anteil an langkettigen ω -3-Fettsäuren enthielt. Eine Detailübersicht hinsichtlich Zusammensetzung und Dosierung der über die Verumpräparate verabreichten Nährstoffe in Gegenüberstellung zu den jeweiligen DACH-Referenzwerten für die Nährstoffzufuhr (Altersgruppe 51 bis <65 Jahre) gibt Tab. 7. Neben den hierbei aufgeführten Substanzen wurden dem Kapselfüllgut geringe Mengen Sojaöl, Soja- und Butterfett, Bienenwachs sowie Lecithin zu technologischen und galenischen Zwecken beigefügt. Das Hüllmaterial bestand aus Gelatine, Glycerin, Wasser und Eisenoxid rot (E 172).

Die Kontrollpräparate (**Placebokapseln**) enthielten ausschließlich Sojaöl (1140 mg pro Kapsel) als lipophile Trägersubstanz. Das Hüllmaterial setzte sich analog zu den Verumkapseln aus Gelatine, Glycerin, Wasser und Eisenoxid rot (E 172) zusammen.

Tab. 7: Zusammensetzung und Dosierung der über die Verumpräparate verabreichten Multinährstoffkombination im Vergleich zur empfohlenen Zufuhr [DGE et al. 2000, S. 230ff]

Nährstoff	Substanz	Tagesdosierung (4 Kapseln)	DACH- Referenzwerte ^a
Vitamin E	RRR- α -Tocopherol	80 mg ^b	12-13 mg ^b
Vitamin C	L-Ascorbinsäure	500 mg	100 mg
Vitamin B ₁	Thiaminmononitrat	4 mg	1,0-1,1 mg
Vitamin B ₂	Riboflavin	5 mg	1,2-1,3 mg
Vitamin B ₆	Pyridoxinhydrochlorid	6 mg	1,2-1,5 mg
Vitamin B ₁₂	Cyanocobalamin	20 μ g	3 μ g
Folsäure	Pteroylglutaminsäure	800 μ g	400 μ g ^c
Niacin	Nicotinamid	40 mg	13-15 mg
Magnesium	Magnesiumcitrat	250 mg	300-350 mg
Zink	Zinkgluconat	15 mg	7-10 mg
Selen	Natriumselenat	80 μ g	30-70 μ g
Kupfer	Kupfergluconat	1 mg	1,0-1,5 mg
Chrom	Chrom-(III)-chlorid	60 μ g	30-100 μ g
Jod	Kaliumjodid	150 μ g	150-180 μ g
Coenzym Q ₁₀	--	30 mg	--
natürliche Carotinoide	α - und β -carotinhaltiger Palmfruchtextrakt	3 mg ^d	2-4 mg
Lycopin	Tomatenextrakt	2 mg	--
Polyphenole	Traubenextrakt	50 mg	--
ω -3-Fettsäuren	Triglyceride	1098 mg	1100-1300 mg ^e
- davon EPA (C20:5 ω 3)		540 mg	
- davon DHA (C22:6 ω 3)		378 mg	

^a Empfehlungen und Schätzwerte für eine angemessene tägliche Zufuhr, zusammengefasst für Männer und Frauen der Altersgruppe 51 - <65 Jahre

^b angegeben als Tocopheroläquivalent (TÄ): 1 mg RRR- α -TÄ = 1 mg RRR- α -Tocopherol = 1,49 IE

^c angegeben als Folat-Äquivalent (FÄ): 1 μ g FÄ = 1 μ g Nahrungsfolat, entspricht 0,5 μ g synthetischer Folsäure (Pteroylmonoglutaminsäure)

^d β -Carotin <2 mg

^e 0,5% der Gesamtenergie in Form von α -Linolensäure bei einer mittleren Energiezufuhr von 2000 (w) bzw. 2500 (m) kcal/d [DGE et al. 2000, S. 31]

4.1.6 STATISTISCHE VERFAHREN

4.1.6.1 Fallzahlberechnung und biometrische Zielgrößen

Die für die Hauptuntersuchung erforderliche **Fallzahlschätzung** wurde durch Herrn Prof. Dr. Hecker, Institut für Biometrie, Medizinische Hochschule Hannover, durchgeführt und mit Hilfe des Programms nQuery Advisor 5.0 berechnet. Der hierbei ermittelte Stichprobenumfang, basierend auf den nachfolgend dargestellten biometrischen Überlegungen, betrug $n=134$ mit jeweils 67 Probanden pro Interventionsgruppe. Unter Berücksichtigung eines 10%-igen Drop-outs während der Interventionszeit, wurde die für die Rekrutierung zum Zeitpunkt T0 anzustrebende Teilnehmerzahl auf $n=150$ festgesetzt.

Zur Formulierung der für die Versuchsplanung zugrunde gelegten Primärhypothesen wurde zwischen biometrischen Haupt- und Nebenzielgrößen differenziert. Als **Hauptzielgrößen** (*confirmative Beweisführung*) wurden die Plasma- bzw. Serumkonzentration für Homocystein und sVCAM-1 definiert, für die ein signifikantes Absinken unter Einnahme der Verumpräparate gegenüber Placebo erwartet wurde. Die in diesem Zusammenhang zu überprüfenden primären Alternativhypothesen H_1 lauteten: Durch die Gabe der Nährstoffformulierung vermindern sich die jeweiligen Blutkonzentrationen an Homocystein und s-VCAM-1 in der Verumgruppe stärker als in der Placebogruppe. Dementsprechend lauteten die zu widerlegenden primären Nullhypothesen H_0 :

(A)	$H_0 =$	$\frac{\text{tHcy zu T0} - \text{tHcy zu T6 (Verumgruppe)}}{\text{tHcy zu T0} - \text{tHcy zu T6 (Placebogruppe)}} = 1$	
(B)	$H_0 =$	$\frac{\text{sVCAM-1 zu T0} - \text{sVCAM-1 zu T6 (Verumgruppe)}}{\text{sVCAM-1 zu T0} - \text{sVCAM-1 zu T6 (Placebogruppe)}} = 1$	

Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwieweit die zu erwartenden Veränderungen für beide Hauptzielparameter in der Verumgruppe als signifikant anzusehen sind. Die hierfür im Rahmen der Primärhypothesenformulierung zu widerlegenden Nullhypothesen H_0 lauteten:

(C)	$H_0 =$	$\frac{\text{tHcy zu T0 (Verumgruppe)}}{\text{tHcy zu T6 (Verumgruppe)}} = 1$	
(D)	$H_0 =$	$\frac{\text{sVCAM-1 zu T0 (Verumgruppe)}}{\text{sVCAM-1 zu T6 (Verumgruppe)}} = 1$	

In Hinblick auf die hierbei zu erwartende Effektgröße, die anhand von aus der Literatur bekannten Mittelwerts-Differenzen geschätzt wurde [WOLTERS et al. 2005; BRÖNSTRUP et al. 1998; MILES et al. 2001]⁴², wurde eine **Power** von 90% durch einseitiges Testen auf dem **Fehlerniveau** $\alpha=0,05$ festgelegt.

Die Effektivität der Intervention auf alle weiteren und hierbei im Speziellen für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit relevanten Parameter (**Nebenzielgrößen**) erfolgte durch Einzelhypothesenprüfung auf dem Fehlerniveau $\alpha=0,05$ im Sinne einer *explorativen Beweisführung*.

4.1.6.2 Deskriptive und analytische Statistik

Die **Auswertung** der Daten wurde mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows, Version 13.0 und 14.0 (SPSS Inc., Chicago, Illionois, USA) durchgeführt.

Die **Überprüfung der Verteilungsannahme** erfolgte für jede zu untersuchende Stichprobe zunächst mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Test bei einer Stichprobe (KS-Test, Testverteilung: Normal). Im Falle einer errechneten Irrtumswahrscheinlichkeit von $>5\%$ wurde von einer Normalverteilung, andernfalls von einer Schiefverteilung der Daten (Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 5\%$) ausgegangen [BÜHL U. ZÖFEL 2005, S. 313]. Da für die Mehrzahl der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Messgrößen eine Normalverteilung vorlag, wurden zur einheitlichen Darstellung von **Lage- und Streuungsmaßen** das arithmetische Mittel (Mean) und die Standardabweichung (SD) als Tabellenwerte angegeben. Die graphische Darstellung der Mittelwerts-Differenzen (T6-T0) erfolgte anhand von Fehlerbalken-Diagrammen unter Auswahl des einfachen Standardfehlers (SE).

Die Anwendung der für die Überprüfung von Hypothesen erforderlichen **statistischen Testverfahren** erfolgte gemäß der in Tab. 8 aufgeführten Kriterien. Da der t-Test für abhängige Stichproben relativ stark durch schiefe Verteilungen in den Differenzen der Variablen beeinflusst wird, wurde für seine Verwendung die Normalverteilung der Differenzen (T6-T0) vorausgesetzt [ZÖFEL 2002, S. 94f; HECKER 1997]. Im Fall nicht-normalverteilter Differenzen kam der Wilcoxon-Test zur Anwendung. Die Gültigkeit der Varianzhomogenität, die sowohl Voraussetzung für die Anwendbarkeit des t-Tests für unabhängige Stichproben als auch für

⁴² Aus Interventionsstudien mit vergleichbaren Dosierungen an B-Vitaminen bzw. ω -3-Fettsäuren wurde für die Veränderung der tHcy-Plasmakonzentration eine Differenz von 10-15 % zugrunde gelegt [WOLTERS et al. 2005; BRÖNSTRUP et al. 1998], für die Serumkonzentration der sVCAM-1 eine Variabilität von 10-20 % [MILES et al. 2001]. Die in den jeweiligen Studien beobachteten Mittelwerts-Differenzen betragen $1,60 \pm 1,77 \mu\text{mol/l}$ für die Homocystein-Senkung [WOLTERS et al. 2005] bzw. $188 \pm 136 \text{ ng/ml}$ für die Abnahme von sVCAM-1 in der Untersuchung von MILES et al. [2001]. Basierend auf den Berechnungen einer Metaanalyse [HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION 1998], in der eine Risikoreduktion für kardiovaskuläre Erkrankungen bei einer dauerhaften Senkung der tHcy-Plasmakonzentration unter den beobachteten $1,60 \mu\text{mol/l}$ ermittelt wurde, sollten bereits tHcy-Differenzen von $1,00 \mu\text{mol/l}$ als signifikant angesehen werden.

die Varianzanalyse (s. u.) ist, wurde mit Hilfe des Levene-Tests überprüft. Wurde hierbei die Annahme gleicher Varianzen abgelehnt ($p \leq 0,05$), so wurde das t-Test-Ergebnis bei Varianzheterogenität zur Interpretation herangezogen [BÜHL U. ZÖFEL 2005, S. 281].

Die Nullhypothese (H_0 = die beobachteten Unterschiede bewegen sich im Rahmen zufälliger Schwankungen) wurde für die jeweiligen Testverfahren abgelehnt, wenn die **Irrtumswahrscheinlichkeit** gemäß Festlegung für die Fallzahlberechnung $\leq 5\%$ betrug (vgl. Kap. 4.1.6.1). Zur näheren Charakterisierung wurde hierbei zwischen statistisch signifikanten ($p \leq 0,05$), hoch signifikanten ($p \leq 0,01$) sowie höchst signifikanten Unterschieden ($p \leq 0,001$) differenziert. Errechnete Irrtumswahrscheinlichkeiten im Bereich $>5\%$ bis $\leq 7\%$ wurden als Trend zur Signifikanz gewertet.

Tab. 8: Kriterien und Auswahl der verwendeten statistischen Prüfverfahren

zu vergleichende Stichproben		Skala	Normalverteilung	Testverfahren
Anzahl	Abhängigkeit			
2	unabhängig	metrisch	ja	t-Test für unabhängige Stichproben
2	unabhängig	metrisch/ ordinal	nein	Mann-Whitney-U-Test
2	abhängig	metrisch	ja ^a	t-Test für abhängige Stichproben
2	abhängig	metrisch	nein ^a	Wilcoxon-Test
2	unabhängig	nominal	--	<u>2-3 Merkmalsausprägungen:</u> Chi ² nach Pearson / Exakter Test nach Fisher (2-seitig) ^b <u>≥4 Merkmalsausprägungen:</u> Mann-Whitney-U-Test
≥3	unabhängig	metrisch	ja	Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) ^c

^a Differenzen zusammengehöriger Messwertpaare

^b bei einem Anteil an Zellen über 20% mit Erwartungshäufigkeiten <5 bei 2x2 Kreuztabellen

^c die Post-Hoc-Testung entfiel in der vorliegenden Arbeit aufgrund des Fehlens signifikanter Unterschiede

Um den Einfluss von unabhängigen, metrisch-skalierten Störfaktoren (Kovariate) bei der Testung auf Signifikanzunterschiede zwischen der Verum- und Placebogruppe hinsichtlich der Mittelwertsdifferenzen (T6-T0) einer abhängigen Variable kontrollieren zu können, wurde zusätzlich eine **Kovarianzanalyse (ANCOVA)** durchgeführt. Unterschieden sich beispielsweise die Subgruppen Verum und Placebo bereits in den Ausgangswerten der zu untersuchenden abhängigen Variable signifikant, so wurden die entsprechenden T0-Werte als Kovariate in das Testverfahren aufgenommen. Im Zusammenhang mit den T6-T0-Differenzen der tHcy- und SDMA-Plasmakonzentration bzw. der im Plasma bestimmten TEAC fanden zudem die Veränderungen der Störgrößen Creatinin (Creatinin_T6-T0) und Harnsäure

(Harnsäure_T6-T0) als weitere Kovariate Berücksichtigung. Die Berechnung der Modelle⁴³ erfolgte unter Annahme der Normalverteilung sowie Varianzhomogenität der abhängigen Variablen [BÜHL U. ZÖFEL 2005, S. 402 f, 412 ff]. Selbige Annahmen wurden bei der Durchführung der **einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA)** im Rahmen von Kap. 4.2.4.3 (→ Abhängigkeit des initialen ADMA-Status von der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren) zugrunde gelegt.

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen zwei Variablen (**bivariate Korrelationsanalyse**) kamen unterschiedliche Korrelationsmaße zur Anwendung: Bei normalverteilten, metrischen Daten wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient (r) bestimmt, bei nicht-normalverteilten, metrischen oder ordinal-skalierten Daten der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s). Die Stärke des Zusammenhangs, die durch den Betrag des jeweiligen Korrelationskoeffizienten beschrieben wird, wurde gemäß der in Tab. 9 dargelegten Abstufung interpretiert.

Tab. 9: Beurteilungsgrundlage für die Stärke bivariater Zusammenhänge anhand des Korrelationskoeffizienten [nach BÜHL U. ZÖFEL 2005, S 322]

Stärke des Zusammenhangs	Betrag des Korrelationskoeffizienten (r/r_s)
sehr geringe Korrelation	$\leq 0,2$
geringe Korrelation	$>0,2 - \leq 0,5$
mittlere Korrelation	$>0,5 - \leq 0,7$
hohe Korrelation	$>0,7 - \leq 0,9$
sehr hohe Korrelation	$>0,9$

Sollte eine durch eine dritte Messgröße bedingte Assoziation zwischen zwei Variablen ausgeschlossen werden, wurde eine **partielle Korrelation** durchgeführt. Diese erfolgte unter Voraussetzung der Normalverteilung sowie der im Vorfeld geprüften, signifikanten Interkorrelation aller in die Korrelationsanalyse einbezogenen Variablen. Im Fall nicht-normalverteilter Daten wurden die log-transformierten Werte der entsprechenden Variablen verwendet.

⁴³ Die in den Ergebnistabellen für die Kovarianzanalyse aufgeführten p -Werte sind im Fall nicht signifikanter Modelle im Klammern gesetzt.

4.2 ERGEBNISSE

4.2.1 DAS STUDIENKOLLEKTIV

4.2.1.1 Anzahl der Teilnehmer im Studienverlauf sowie der in die statistische Analyse aufgenommenen Probanden

Auf den Studienaufruf meldeten sich ca. 800 Personen, die einem telefonischen Vor-screening unterzogen wurden. Hiervon konnten 448 potenziell geeignete Interessenten identifiziert werden, die daraufhin einen Screening-Fragebogen zur schriftlichen Überprüfung der Teilnahme-kriterien erhielten. Aus einem Rücklauf von insgesamt 289 ausgefüllten Fragebögen (Rücklaufquote: 64,5%) verblieben 156 geeignete Interessenten, die in das Studienkollektiv aufgenommen und durch Randomisierung der entsprechenden Interventionsgruppe zugeteilt wurden. Die übrigen Personen mussten ausgeschlossen werden, da sie entweder die Eignung hinsichtlich des Vorhandenseins kardiovaskulärer Risikofaktoren nicht (mit Sicherheit) erfüllten⁴⁴ und/oder Ausschlusskriterien trotz telefonischer Vorauswahl auf sie zu- trafen. Während der Depletionsphase traten insgesamt 15 Personen zurück oder wurden aufgrund anderer Ursachen (Erkrankungen, regelmäßiger Konsum von Nährstoffpräparaten oder Multivitamin-säften, etc.) von der weiteren Teilnahme ausgeschlossen. Zur **Basis-untersuchung T0** verblieben damit insgesamt 141 Probanden, von denen 72 der Verum- und 69 Personen der Placebogruppe zugeordnet waren.

Während des **Interventionszeitraumes** brachen zwölf weitere Probanden (Drop-out-Quote: 8,5%) die Teilnahme auf eigenen Wunsch ab oder mussten aufgrund des Auftretens zum Ausschluss führender Kriterien (u. a. kardiovaskuläres Ereignis, mangelnde Compliance) aus dem Studienkollektiv ausgeschlossen werden. Unter den zwölf Drop-out-Fällen gehörte der Großteil ($n=9$) der Placebogruppe an.

An der **Abschlussuntersuchung T6** nahmen insgesamt 129 Probanden teil, wobei einer Teilnehmerin aus der Verumgruppe trotz wiederholtem Erscheinen kein Blut entnommen werden konnte ($n=128$ Blutentnahmen). Ein weiterer Proband der Placebogruppe musste ebenfalls nachträglich ausgeschlossen werden, da dieser angab, während der Interventionsphase regelmäßig Nahrungsergänzungsmittel eingenommen zu haben.

⁴⁴ z. B. grenzwertige Laborbefunde hinsichtlich der Lipidwerte

Nach ersten Auswertungen der zu T0 erhobenen Daten wurde das verbliebene Kollektiv ($n=127$) um vier weitere Probanden (jeweils zwei Probanden aus der Verum- bzw. Placebo-Gruppe) bereinigt, da diese lediglich einen kardiovaskulären Risikofaktor aufwiesen und damit die für die Aufnahme in die statistische Analyse erforderlichen Bedingungen (vgl. Kap. 4.1.4.3, Tab. 5) nicht erfüllten. Für die nachfolgende **statistische Endauswertung** verblieb somit ein Gesamtkollektiv von insgesamt 123 Teilnehmern, wobei 66 Probanden der Verum- und 57 der Placebogruppe angehörten.

Abb. 9 stellt die jeweiligen Teilnehmerzahlen während der verschiedenen Studienphasen in der Übersicht dar.

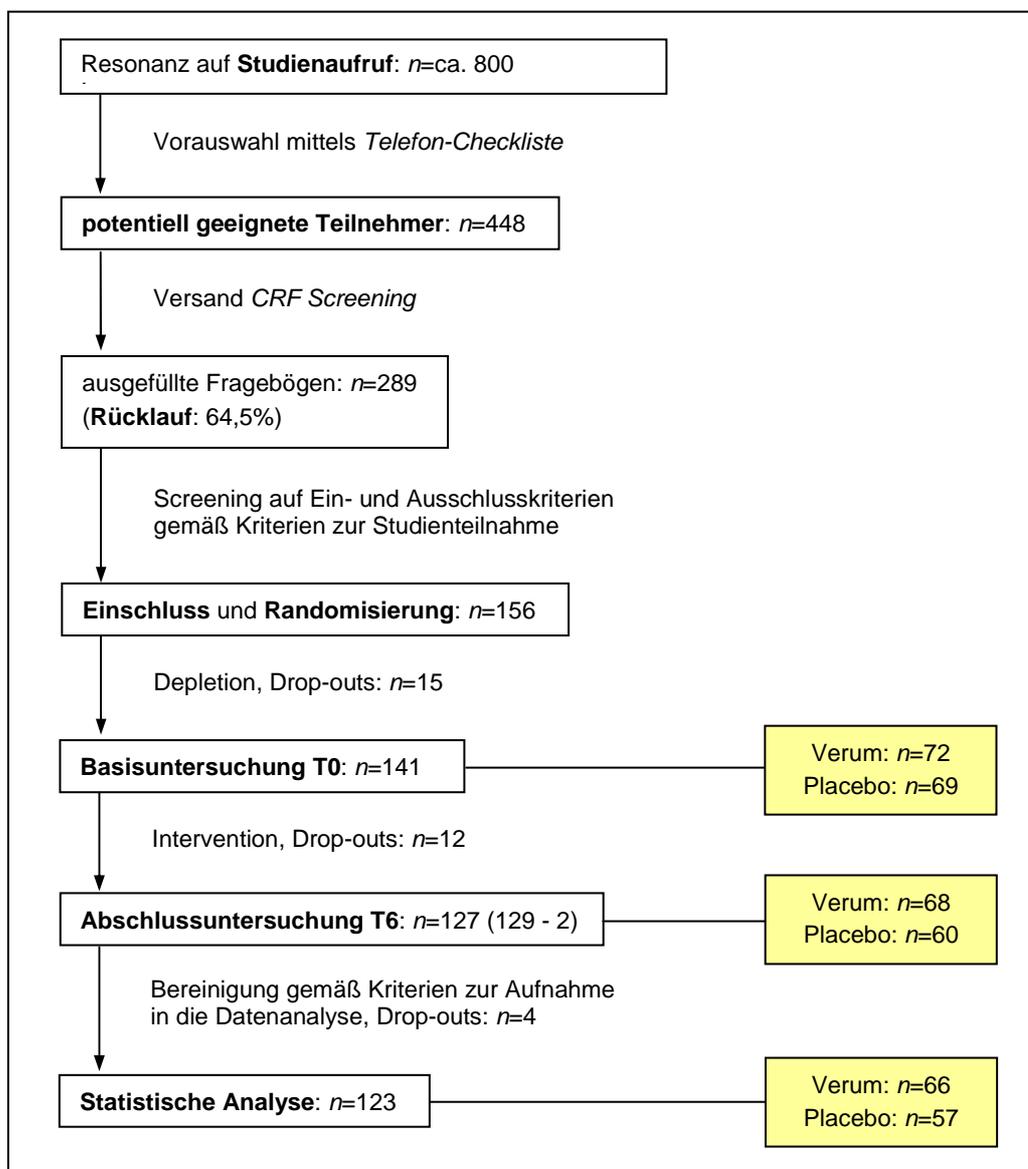


Abb. 9: Anzahl der Probanden zu verschiedenen Studienzeitpunkten

Da bei einigen Probanden keine ausreichenden Blutvolumina entnommen werden konnten und vereinzelt analytische Probleme auftraten, konnten nicht für alle in die Endauswertung aufgenommenen Teilnehmer komplette Datensätze gewonnen werden. Die Anzahl der in die statistischen Einzelanalysen einbezogenen Fälle unterscheidet sich daher geringfügig und ist in den jeweiligen Ergebnistabellen und -abbildungen ausgewiesen.

Um mögliche Effekte einer hypolipidämischen Medikation auf die Veränderungen der untersuchten Lipidparameter (oxLDL⁴⁵, TC, LDL, HDL, TG) ausschließen zu können, wurde in diesen Fällen der um die Anzahl an Probanden mit entsprechender Medikamenteneinnahme ($n=37$) reduzierte Datensatz verwendet. In analoger Weise wurde mit der Auswertung der Glucose-Serumspiegel während der Intervention und Teilnehmern unter antiglykämischer Medikation ($n=22$) verfahren⁴⁶.

4.2.1.2 Geschlechterverteilung, Alter und anthropometrische Daten

Im untersuchten Kollektiv waren Männer mit einem Anteil von 54,5% ($n=67$) häufiger vertreten als Frauen mit 45,5% ($n=56$). Die **Geschlechterverteilung** in den Interventionsgruppen war mit 36 (54,5%) männlichen und 30 (45,5%) weiblichen Probanden in der Verumgruppe gegenüber 31 Männern (54,4%) bzw. 26 Frauen (45,6%) in der Placebogruppe nahezu identisch ($p=0,986$; Chi²-Test).

Das Mindestalter für die Studienteilnahme betrug 40 Jahre, während ein maximal zulässiges Höchstalter nicht festgelegt wurde. Folglich wiesen die Probanden im Mittel ein höheres Lebensalter auf: Das **Durchschnittsalter**⁴⁷ des Gesamtkollektivs lag bei $58,3 \pm 8,12$ Jahren mit einer Spannweite von 42,0 bis 77,5 Jahren (Altersverteilung, vgl. Abb. 10). Mit einem mittleren Alter von $58,1 \pm 8,19$ Jahren in der Verumgruppe und $58,6 \pm 8,12$ Jahren in der Placebogruppe waren auch hier übereinstimmende Bedingungen für beide Untersuchungsgruppen festzustellen ($p=0,757$; t-Test für unabhängige Stichproben).

⁴⁵ Da die oxLDL-Serumwerte an einer Teilstichprobe ($n=102$, vgl. Fußnote 37) bestimmt wurden, findet sich hier eine niedrigere Fallzahl ($n=73$) als bei den restlichen Lipidparametern ($n=86$).

⁴⁶ zur Einnahmehäufigkeit der jeweiligen Medikamentengruppe vgl. Kap. 4.2.1.5.

⁴⁷ Der Bezugszeitpunkt entspricht dem ersten Tag der Basisuntersuchung T0 (03.11.2003).

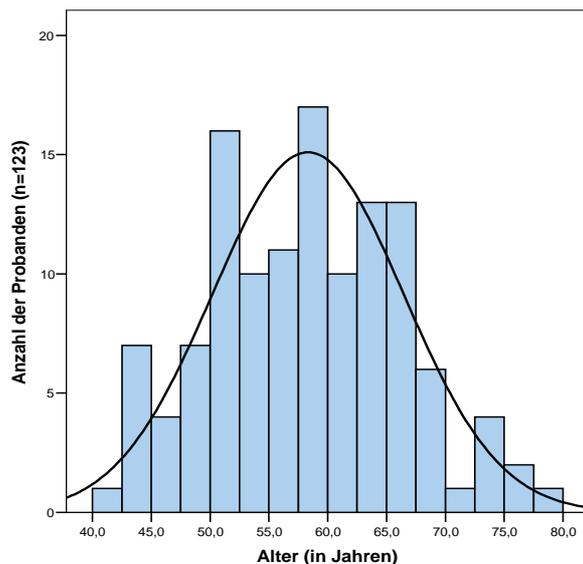


Abb. 10: Altersverteilung im Gesamtkollektiv zu T0

Die zu beiden Messzeitpunkten erhobenen anthropometrischen Daten (**Körpergröße, Körpergewicht, Body Mass Index, Taillenumfang**⁴⁸) sind Tab. 10 zu entnehmen. Wie hieraus ersichtlich wird, bestanden zwischen den jeweiligen Statuswerten der Verum- und Placebogruppe weder zur Basis- noch zur Abschlussuntersuchung signifikante Unterschiede. Wurden hingegen die über den Zeitraum der Intervention zu beobachtenden Veränderungen betrachtet, so zeigten sich hinsichtlich der Variable Körpergewicht und dem damit assoziierten Body Mass Index im Mittel gegenläufige Entwicklungen in beiden Interventionsgruppen: Während innerhalb der Verumgruppe eine leichte, nicht signifikante Gewichts- ($\Delta: -0,55 \pm 3,41$ kg) bzw. BMI-Reduktion ($\Delta: -0,23 \pm 1,16$ kg/m²) verzeichnet wurde, kam es in der Placebogruppe zu einem geringfügigen, nicht signifikanten Anstieg beider Kenngrößen ($\Delta: 0,34 \pm 2,47$ kg, $\Delta: 0,12 \pm 0,82$ kg/m²). Wenngleich den absoluten Veränderungen nur eine geringe klinische Relevanz beizumessen war, ergab sich im Fall der BMI-Werte ein Trend zu einem signifikanten Unterschied zwischen der Verum- und Placebogruppe ($p=0,053$). Demgegenüber erwiesen sich zwischen beiden Subgruppen weder die Gewichtsveränderungen ($p=0,095$) noch die absoluten T6-T0-Differenzen des Taillenumfangs ($p=0,627$) als signifikant verschieden.

⁴⁸ Die Auswertung der BMI- und TU-Werte in Hinblick auf die Klassifikation der vizeralen Adipositas erfolgt im Zusammenhang mit der in Kap. 4.2.1.3 dargestellten Risikocharakteristik der Studienteilnehmer.

Tab. 10: Anthropometrische Daten zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)

	Gesamtkollektiv	Verum	Placebo	p^a
Größe_T0 [m]	1,71 \pm 0,10 (n=123)	1,71 \pm 0,09 (n=66)	1,71 \pm 0,10 (n=57)	0,710
Gewicht_T0 [kg]	93,4 \pm 17,3 (n=123)	94,5 \pm 17,7 (n=66)	92,1 \pm 17,0 (n=57)	0,432
Gewicht_T6 [kg]	93,3 \pm 17,7 (n=123)	94,0 \pm 18,3 (n=66)	92,4 \pm 17,1 (n=57)	0,624
p^b	0,614	0,192	0,301	
Gewicht_T6-T0 [kg] ⁴⁹	-0,14 \pm 3,03 (n=123)	-0,55 \pm 3,41 (n=66)	0,34 \pm 2,47 (n=57)	0,095
BMI_T0 [kg/m ²]	32,0 \pm 5,11 (n=123)	32,5 \pm 5,65 (n=66)	31,3 \pm 4,34 (n=57)	0,189
BMI_T6 [kg/m ²]	31,9 \pm 5,10 (n=123)	32,3 \pm 5,65 (n=66)	31,4 \pm 4,39 (n=57)	0,351
p^b	0,473	0,113	0,268	
BMI_T6-T0 [kg/m ²]	-0,07 \pm 1,03 (n=123)	-0,23 \pm 1,16 (n=66)	0,12 \pm 0,82 (n=57)	0,053
TU_T0 [cm]	106 \pm 13,3 (n=123)	108 \pm 13,4 (n=66)	105 \pm 13,2 (n=57)	0,251
TU_T6 [cm]	106 \pm 12,9 (n=122)	108 \pm 13,3 (n=65)	105 \pm 12,5 (n=57)	0,403
p^b	0,477	0,852	0,409	
TU_T6-T0 [cm]	0,24 \pm 3,68 (n=122)	0,08 \pm 3,65 (n=65)	0,41 \pm 3,74 (n=57)	0,627

^a t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

4.2.1.3 Charakteristik des kardiovaskulären Risikoprofils

Zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos der Studienteilnehmer wurde zunächst eine Analyse bezüglich des Auftretens etablierter kardiovaskulärer Risikofaktoren, basierend auf den für den Einschluss in die statistische Datenanalyse definierten Kriterien (vgl. Kap. 4.1.4.3), durchgeführt. Um die Risikoabschätzung auf eine weitere Beurteilungsgrundlage stützen zu können, erfolgte eine zusätzliche Auswertung zur Prävalenz des metabolischen Syndroms (MetS), das als Multisymptomkomplex mit einer Erhöhung des kardiovaskulären Risikos assoziiert ist [ECKEL et al. 2005; VITARIUS 2005; SARTI U. GALLAGHER 2006]. Für die Erkennung eines prävalenten Syndroms wurden die von der American Heart Association (AHA) und des National Heart, Lung, and Blood Instituts (NHLBI) festgelegten Diagnose-

⁴⁹ Bei dieser sowie für alle weiteren Tabellen gebräuchlichen Darstellung handelt es sich um gemittelte Einzeldifferenzen, die von der Differenz aus den mittleren T6- und T0-Werten aufgrund von Rundungsfehlern abweichen können.

kriterien gewählt [GRUNDY 2005; GRUNDY et al. 2005], wonach drei von fünf der in Tab. A5 (Anhang B) dargestellten metabolischen Risikofaktoren zutreffend sein mussten. Im Vergleich zu den in der Literatur ebenfalls häufig angeführten Prävalenz-Kriterien der International Diabetes Federation (IDF, [ALBERTI et al. 2005]), die neben der Erfüllung von zwei Faktoren eine Erhöhung des Taillenumfangs bei vergleichsweise niedrigeren Grenzwerten (w: ≥ 80 cm, m: ≥ 94 cm) als zwingend erforderlich ansehen, wurde das hier gewählte Modell vorgezogen, da es die mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziierten Faktoren mit gleicher Gewichtung berücksichtigt.

Prävalenz etablierter kardiovaskulärer Risikofaktoren

Gemäß den in Tab. 5, Kap. 4.1.4.3, aufgeführten Kriterien wiesen zwei Drittel (66,7%) des Studienkollektivs zwei ($n=36$) bzw. drei ($n=46$) etablierte Risikofaktoren und damit ein **moderat erhöhtes kardiovaskuläres Risiko** auf. Ein **erhöhtes Risiko** mit vier prävalenten Faktoren zeigte sich für 23,6% ($n=29$) der Teilnehmer, während 9,8% ($n=12$) ein **hohes kardiovaskuläres Risiko** mit fünf von insgesamt sechs möglichen Risikofaktoren aufzeigten. Wie aus Abb. 11 ersichtlich wird, ließ sich hierbei eine annähernd gleiche Verteilung der Subgruppen Verum und Placebo ermitteln ($p=0,661$; Mann-Whitney-U-Test).

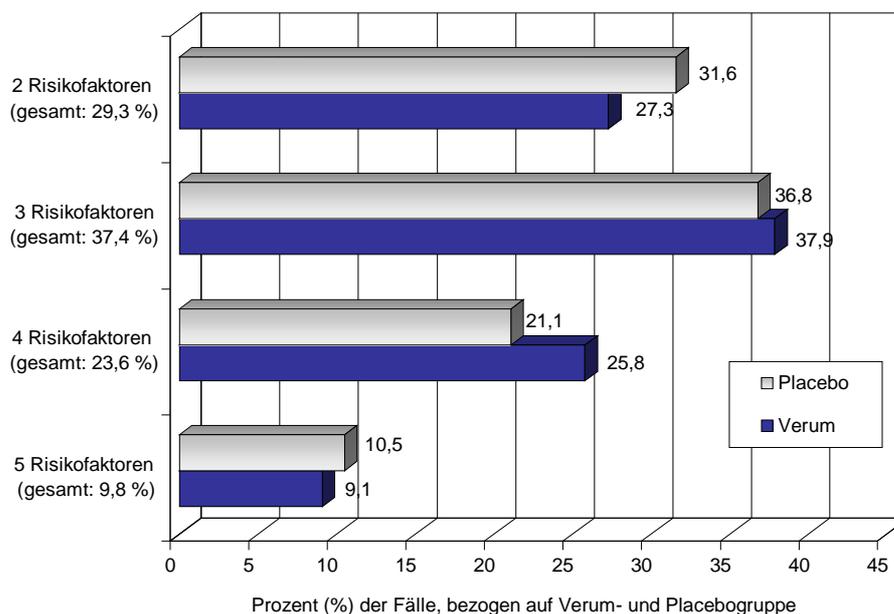


Abb. 11: Summierte Prävalenz etablierter kardiovaskulärer Risikofaktoren im Gesamtkollektiv, differenziert nach Verum- und Placebogruppe

Die Analyse der Einzelfaktoren, zu der ergänzende und weiterführende Details im Anhang aufgeführt sind, ergab mit 95,1% die höchste Prävalenz für eine **Hypertonie** mit 102 medikamentös therapierten⁵⁰ sowie 15 nicht-therapierten, hypertensiven Probanden (vgl. Abb. A3, Anhang A). Hierbei zeigte sich, dass mit 15,7% ($n=16$) lediglich ein kleiner Anteil der medikamentös behandelten Teilnehmer mit Blutdruckwerten innerhalb des Normbereichs (SBD <140 mmHg bzw. DBD <90 mmHg) gut auf die antihypertensive Medikation ansprach. Demzufolge lag der zu T0 gemessene mittlere Blutdruck des Gesamtkollektivs ($n=121$) mit $151 \pm 19,9$ mmHg systolisch zu 94 ± 10 mmHg diastolisch deutlich über dem Grenzwert für eine manifeste Hypertonie und damit im Wertebereich eines milden Hypertonie-Stadiums (Schweregrad 1: 140-159/90-99 mmHg [WHO/ISH 1999; CHOBANIAN et al. 2003; CIFKOVA et al. 2003]). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Verum- und Placebogruppe waren diesbezüglich nicht feststellbar (vgl. Tab. A6, Anhang B).

Die Prävalenz-Kriterien einer **Hyper-/Dyslipoproteinämie** erfüllten 71,5% ($n=88$) der Probanden; mit 42,0% ($n=37$) befand sich weniger als die Hälfte davon unter hypolipidämischer Medikation (vgl. Abb. A4, Anhang A). Von den insgesamt 71 hyperlipidämischen Fällen wiesen 31,0% ($n=22$) eine besonders ungünstige Risikokonstellation, bedingt durch eine Erhöhung des TC/HDL-Quotienten mit Werten >5 bei gleichzeitig erhöhten TG-Serumwerten (1,7-4,5 mmol/l), auf. Eine alleinige Erhöhung des atherogenen Index war hingegen weniger häufig vorzufinden ($n=11$, 15,5%) als das Vorkommen isolierter Hypertriglyceridämien ($n=38$, 53,5%). Dieses Verhältnis spiegelte sich auch in der durchschnittlichen Höhe des Quotienten wider, der mit $4,4 \pm 1,2$ ein aus präventiver Sicht günstiges Verhältnis von Gesamt- zu HDL-Cholesterol im Gesamtkollektiv anzeigte. Die hohe Hypertriglyceridämie-Prävalenz (48,9% des Gesamtkollektivs, $n=60$) kam dagegen in erhöhten TG-Serumspiegeln von im Mittel $2,08 \pm 1,34$ mmol/l zum Ausdruck. Die Subgruppen Verum und Placebo unterschieden sich hinsichtlich dieser sowie aller weiteren zu T0 erhobenen Lipidparameter (vgl. Tab. A6, Anhang B) nicht signifikant voneinander.

Mit 63,4% ($n=78$) erwies sich eine **viszerale Adipositas**, definiert durch eine gleichzeitige Erhöhung des BMI und Taillenumfangs, als kardiovaskulärer Risikofaktor mit der dritthöchsten Prävalenz. Zum Zeitpunkt der Basisuntersuchung wurde der BMI-Normbereich von 18,5 bis <25 kg/m² [WHO 2000, S. 9] sowohl im Mittel (vgl. Tab. 10) als auch von der Mehrzahl der Teilnehmer (95,1%, $n=117$) deutlich überschritten (vgl. Tab. A7, Anhang B). Gemäß der Zuordnung zur BMI-Kategorie ≥ 30 kg/m² konnten 78 Probanden als adipös (Adipositas Grad 1-3) eingestuft werden. Unter weiterer Einbeziehung des Taillenumfangs zeigte sich,

⁵⁰ Die mit dem kardiovaskulären Risiko assoziierte Medikamenteneinnahme wird zur besseren Übersicht gesondert unter Kap. 4.2.1.5 dargestellt.

dass mit Umfangsmaßen von ≥ 80 cm (w) bzw. ≥ 94 cm (m) nahezu das gesamte Kollektiv ($n=119$, 96,7%) und hierbei alle als adipös klassifizierten Probanden eine abdominale Fettverteilung aufwiesen (vgl. Tab. A8, Anhang B). Wie erwartet, ergab sich für die männlichen Probanden im Mittel ein signifikant höherer Taillenumfang ($110 \pm 12,2$ cm) als für die weiblichen Teilnehmerinnen ($103 \pm 13,7$ cm, $p=0,004$; t-Test für unabhängige Stichproben). Der Vergleich zwischen der Verum- und Placebogruppe ergab weder für die Verteilung auf die BMI-Klassen ($p=0,523$; Mann-Whitney-U-Test) noch auf die TU-Risiko-Kategorien einen signifikanten Unterschied ($p=0,506$; χ^2 -Test, Daten nicht gezeigt).

Der Anteil an **Typ-2-Diabetikern** im Gesamtkollektiv belief sich auf 38,2% ($n=47$). So ergab das vor Studienbeginn durchgeführte Screening eine Anzahl von 37 Teilnehmern mit ärztlicher Diagnose (30,1%); knapp zwei Drittel ($n=22$) dieser Personen wurde mit Antidiabetika (oral und/oder Insulintherapie) behandelt (vgl. Abb. A5, Anhang A). Eine pathologische Erhöhung der Nüchternglucosekonzentration (Glucose $\geq 7,0$ mmol/l) war bei 37 Probanden nachweisbar, wobei diese Gruppe erwartungsgemäß durch den Großteil der bereits diagnostizierten Typ-2-Diabetiker vertreten wurde ($n=27$, davon 16 unter medikamentöser Therapie). Ferner konnten unter den formal nicht-diabetischen Probanden weitere zehn Personen identifiziert werden, die zu T0 eine diabetische Stoffwechsellage mit Glucose-Serumwerten $\geq 7,0$ mmol/l aufwiesen. Der zu diesem Zeitpunkt im Gesamtkollektiv erhobene mittlere Glucose-Serumspiegel betrug $6,59 \pm 1,98$ mmol/l und unterschritt damit den zur Diagnosestellung veranschlagten Grenzwert. Wurde hingegen der Konzentrationsbereich für eine abnorme Nüchternglucose (Impaired Fasting Glucose, IFG) von 5,6 – 6,9 mmol/l [KERNER et al. 2004; ADA 2005] zugrunde gelegt, so lagen die durchschnittlichen Glucose-Serumspiegel deutlich an der oberen Intervallgrenze und damit im Bereich eines prädiabetischen Stadiums. Die entsprechenden Mittelwerte der Verum- und Placebogruppe unterschieden sich hierbei nur geringfügig und nicht signifikant voneinander (vgl. Tab. A6, Anhang B).

Gegenüber den bisher dargelegten kardiovaskulären Risikofaktoren zeigte sich im Gesamtkollektiv für die Faktoren **familiäre Disposition** (27,6%, $n=34$) sowie **Rauchen** (17,9%, $n=22$, vgl. Kap. 4.2.1.4, Abschnitt Rauchverhalten) eine vergleichsweise geringe Prävalenz. So lag nach der im Rahmen des Screenings durchgeführten Befragung bei 62,6% ($n=77$) des Kollektivs keine positive Familienanamnese vor bzw. der betroffene Familiengehörige war bei Eintreten des kardiovaskulären Ereignisses älter als 60 Jahre. Bei den restlichen zwölf Teilnehmern war keine Beurteilung möglich, da diese aus unterschiedlichen Gründen (u. a. unsichere Diagnose, Adoption) keine näheren Angaben zum Auftreten kardiovaskulärer Vorfälle in der familiären Vorgeschichte machen konnten.

Eine zusammenfassende Übersicht zur Prävalenz der ermittelten kardiovaskulären Risikofaktoren im Gesamtkollektiv gibt Abb. 12. Wie hieraus ersichtlich wird, war auch in diesem Fall eine homogene Verteilung der jeweiligen Einzelfaktoren zwischen der Verum- und Placebogruppe gegeben.

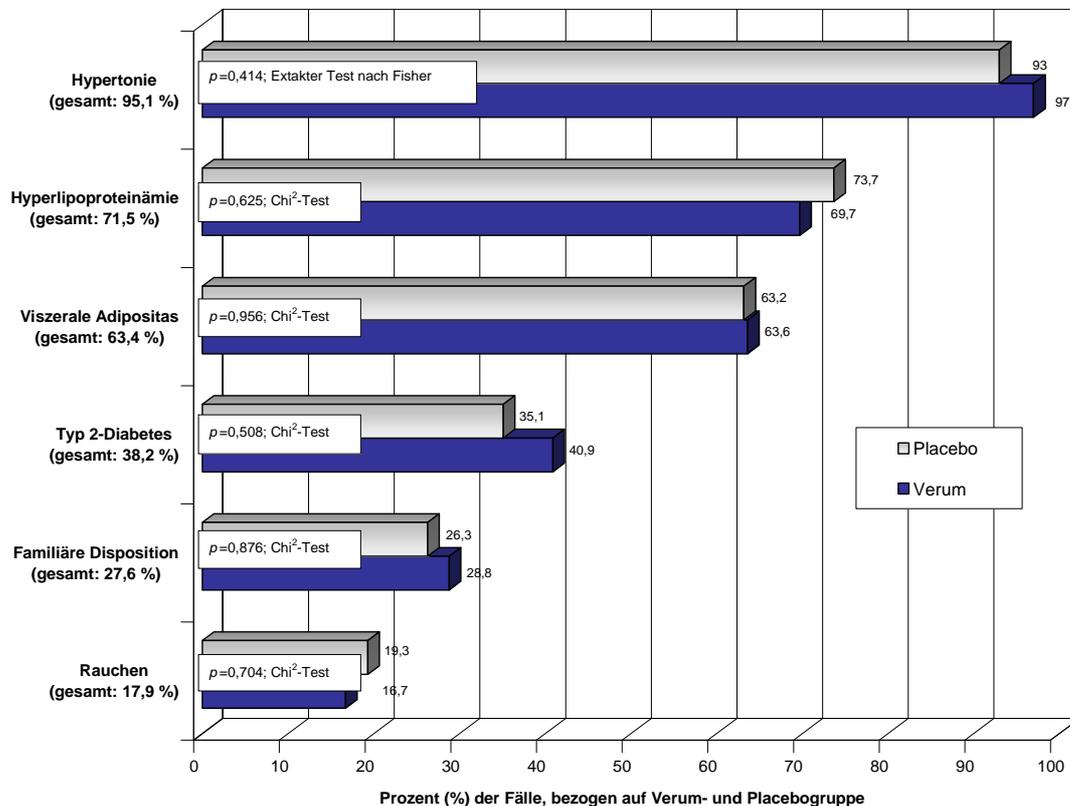


Abb. 12: Einzelprävalenz etablierter kardiovaskulärer Risikofaktoren im Gesamtkollektiv, differenziert nach Verum- und Placebogruppe

Prävalenz des metabolischen Syndroms (MetS)

Nach der in Tab. A5, Anhang B, dargestellten Beurteilungsgrundlage erfüllten 92 Teilnehmer und damit rund drei Viertel (74,8%) des Gesamtkollektivs die von der American Heart Association (AHA) und dem National Heart, Lung, and Blood Institut (NHLBI) festgelegten Kriterien eines metabolischen Syndroms. In der Mehrzahl der Fälle ließ sich die Diagnose auf das Vorhandensein von drei ($n=40$) und vier ($n=38$) Risikofaktoren, seltener hingegen auf fünf prävalente Risikofaktoren ($n=14$) zurückführen. Zwischen der Verum- und Placebogruppe konnten weder hinsichtlich des Auftretens des Gesamtsymptoms (74,2 vs. 75,4%, $p=0,879$; Chi²-Test) noch hinsichtlich der in Abb. 13 dargestellten Verteilung ($p=0,985$; Mann-Whitney-U-Test) signifikante Unterschiede festgestellt werden.

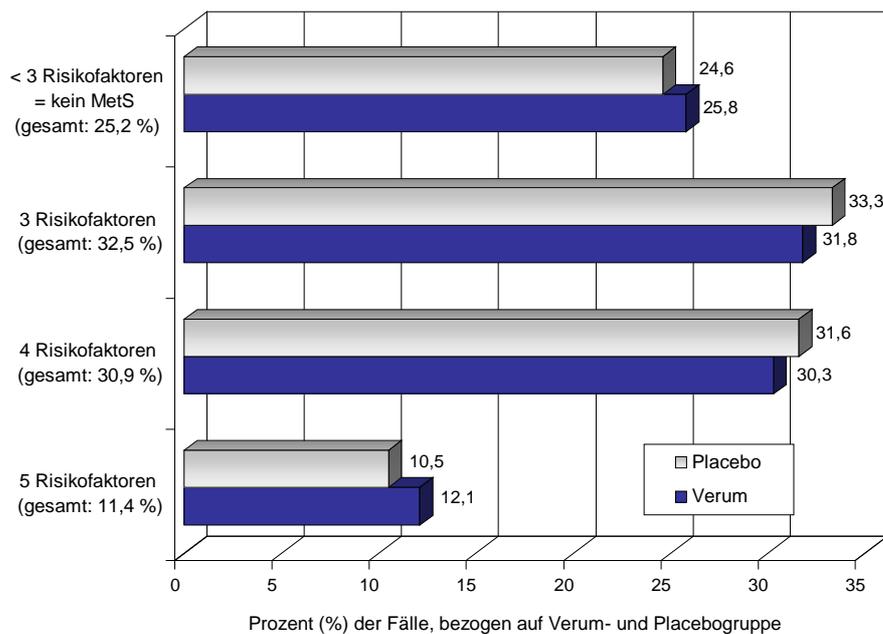


Abb. 13: Summierte Prävalenz der zur Diagnose eines metabolischen Syndroms nach AHA/NHLBI-Definition [GRUNDY 2005; GRUNDY et al. 2005] festgelegten Risikofaktoren im Gesamtkollektiv, differenziert nach Verum- und Placebogruppe

4.2.1.4 Lebensstilfaktoren

Ernährungsgewohnheiten

Bis auf drei Probanden, die angaben, eine rein lacto-ovo-vegetarische ($n=1$) bzw. lacto-ovo-vegetarisch ausgerichtete **Kostform** mit Verzehr geringer Mengen an Fleisch und Fisch ($n=2$) zu praktizieren, setzte sich das Gesamtkollektiv aus Mischköstlern zusammen. Nahezu zwei Drittel der Probanden verzehrten weniger als eine (14,6%, $n=18$) bzw. ein bis zwei Portionen **Obst und Gemüse** pro Tag (58%, $n=72$). Demgegenüber führten rund 25% ($n=31$) der Teilnehmer an, täglich drei bis fünf Portionen Obst und Gemüse zu verzehren, während mehr als fünf Verzehrportionen (1,6%, $n=2$) eine Ausnahme darstellten. Wurde die Häufigkeit des Obst- und Gemüsekonsums in Abhängigkeit von der Zuordnung zu den Subgruppen Verum und Placebo betrachtet, so ließen sich hier keine signifikanten Unterschiede feststellen ($p=0,549$; Mann-Whitney-U-Test, Daten nicht gezeigt).

28,5% ($n=35$) der Teilnehmer gaben ferner an, eine krankheitsbedingte, von ärztlicher Seite verordnete **Diät** durchzuführen. Weit mehr als die Hälfte hiervon (65,7%, $n=23$) praktizierte eine nach eigener Einschätzung fett- bzw. cholesterolreduzierte Ernährungsweise, gefolgt von der z. T. gleichzeitigen Einhaltung einer Diabetes-Diät (40%, $n=14$). Demgegenüber nahmen natrium- (14,3%, $n=5$) und purinarmer Diätformen (8,6%, $n=3$) lediglich einen untergeordneten Stellenwert ein.

Nach Auswertung der mit Hilfe des FFQ erhobenen **Ernährungsmusters** (vgl. Tab. A4, Anhang B) wiesen 57,7% ($n=71$) der Probanden eine in Hinblick auf das kardiovaskuläre Risiko „günstige“ Ernährungsweise (≥ 16 Punktwerte) auf. Ein „normales“ Ernährungsmuster (14-15 Punktwerte) ergab sich für 23,6% ($n=29$), während mit 18,7% ($n=23$) lediglich ein geringer Anteil des Kollektivs ein als „ungünstig“ zu bewertendes Ernährungsverhalten (≤ 13 Punktwerte) zeigte. Wurde der Punktindex zudem als metrische Variable betrachtet, so konnte das durchschnittliche Ernährungsmuster der Studiengruppe mit $16,5 \pm 3,91$ Punkten als insgesamt „günstig“ bewertet werden.

Obwohl in der Verumgruppe deutlich mehr Probanden der Kategorie für eine „ungünstige“ Ernährungsweise zugeordnet werden konnten (24,2% vs. 12,3% in der Placebogruppe), fanden sich hinsichtlich der in Abb. 14 dargestellten Verteilung auf die entsprechenden Ernährungsmuster-Kategorien keine signifikanten Gruppenunterschiede ($p=0,190$; χ^2 -Test). Gleiches traf auf die durchschnittlichen Punktwerte mit $16,2 \pm 4,37$ in der Verumgruppe und $16,9 \pm 3,29$ in der Placebogruppe zu ($p=0,326$; t-Test für unabhängige Stichproben), so dass auch hier von vergleichbaren Ernährungsgewohnheiten auszugehen war.

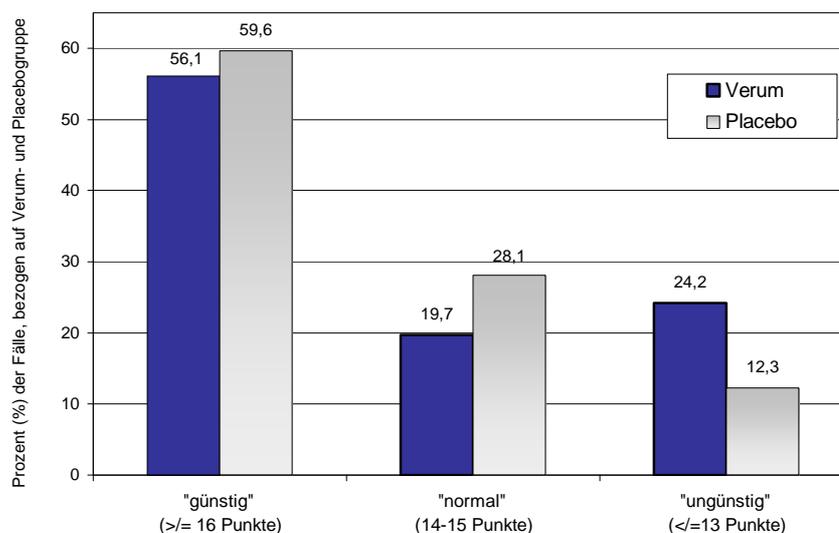


Abb. 14: Verteilung der Verum- und Placebogruppe auf die mittels FFQ ermittelten Ernährungsmuster-Kategorien nach WINKLER U. DÖRING [1995]

Konsum von Nahrungsergänzungsmitteln und vitaminisierten Getränken

49,6% ($n=61$) der Probanden gab an, üblicherweise, d. h. vor Beginn der Depletionsphase, **Nahrungsergänzungsmittel** einzunehmen. Etwas mehr als die Hälfte der Konsumenten (55,7%, $n=34$) führten dabei eine tägliche Verwendung von Nährstoffpräparaten an; 44,3% griffen wöchentlich ($n=4$) bzw. gelegentlich ($n=23$) auf Supplemente zurück. Des Weiteren war festzustellen, dass Frauen (58,9%) tendenziell häufiger Nahrungsergänzungsmittel konsumierten als die männlichen Studienteilnehmer (41,8%, $p=0,058$; χ^2 -Test). Die Einnahmeprävalenz zwischen den Interventionsgruppen mit einem Verwenderanteil von

51,5% (Verum, $n=34$) bzw. 47,4% (Placebo, $n=27$) erwies sich hingegen als nicht signifikant verschieden ($p=0,646$; Chi²-Test). Gleiches traf auf die von den Verwendern angegebene Konsumhäufigkeit in beiden Subgruppen zu ($p=0,808$; Mann-Whitney-U-Test).

Der Verzehr von **Multivitaminsäften** oder **vitaminisierten Getränken** vor der achtwöchigen Auswaschungsphase wurde von 44,7% der Studienteilnehmer (täglich $n=4$, gelegentlich $n=51$) angeführt. Nahezu die Hälfte dieser Personen ($n=27$) waren gleichzeitig Verwender von Nährstoffsupplementen. Das Konsumverhalten zwischen den Interventionsgruppen (Verzehr vitaminisierter Getränke vs. Nicht-Verzehr, $p=0,588$; Chi²-Test) unterschied sich dabei ebenso wenig signifikant wie die in beiden Gruppen angegebene Verzehrshäufigkeit ($p=0,515$; Mann-Whitney-U-Test).

Rauchverhalten

Mit 82,1% ($n=101$) setzte sich der Großteil des Studienkollektivs aus nichtrauchenden Teilnehmern zusammen. 44 Probanden (35,8% des Gesamtkollektivs) wurden hierbei als **Nichtraucher** eingestuft, da sie angaben, nie geraucht zu haben. Hingegen konnten 57 Personen (46,3%) als **Exraucher** ermittelt werden, die jedoch zumeist ($n=52$) bereits seit ≥ 5 Jahren rauchabstinent waren. Unter Einbeziehung einer Person, die angab, weniger als sechs Monate vor Beginn der Studie mit dem Rauchen aufgehört zu haben, setzte sich das Studienkollektiv aus 22 aktiven **Rauchern** (17,9%, vgl. Kap. 4.2.1.3) zusammen. Mit Ausnahme eines Pfeifenrauchers handelte es sich dabei ausschließlich um Zigarettenraucher. Fünf Raucher führten einen moderaten Zigarettenkonsum von durchschnittlich 1-10 Zigaretten täglich an, sieben konsumierten 10-20 Zigaretten pro Tag, während es sich bei den restlichen neun Personen um starke Raucher mit einem Konsum von mehr als 20 Zigaretten pro Tag handelte.

Körperliche Aktivität

Im Zusammenhang mit der im Rahmen des Screenings erhobenen Häufigkeit der sportlichen Betätigung⁵¹ gaben 41% der Probanden an, nie ($n=30$) bzw. selten (<1 Stunde pro Woche, $n=20$) Sport zu treiben. Hingegen war der überwiegende Teil des Kollektivs (50%, $n=61$) mit einer bis fünf Stunden Sport pro Woche regelmäßig körperlich aktiv, während eine kleine Gruppe von Probanden (9%, $n=11$) eine intensive sportliche Betätigung mit mehr als fünf Stunden wöchentlich anführte. Ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der nach Verum- und Placebogruppe differenzierten Angaben lag nicht vor ($p=0,980$; Mann-Whitney-U-Test, Daten nicht gezeigt).

⁵¹ Ziel der Fragestellung war es, einen Trend zur allgemeinen körperlichen Aktivität der Teilnehmer zu erfassen. Aus diesem Grund entfiel die genaue Spezifizierung nach der Art und Intensität der sportlichen Betätigung. Die Aussage hat somit rein deskriptiven Charakter.

4.2.1.5 Besonderheiten des Kollektivs

Prävalenz des C677T-MTHFR-Polymorphismus

Um einen durch den C677T-MTHFR-Polymorphismus⁵² hervorgerufenen und damit genetisch bedingten Störeinfluss bei der Beurteilung der unter Kap. 4.2.2 für Homocystein dargestellten Ergebnisse ausschließen zu können, erfolgte zur Basisuntersuchung eine molekulargenetische Bestimmung der Genvarianten 677CC (Wildtyp), 677CT (heterozygote Mutation) und 677TT (homozygote Mutation). Die hierbei im Gesamtkollektiv sowie in der Verum- und Placebogruppe ermittelten Prävalenzraten sind in Tab. 11 aufgeführt.

Mit einem Anteil von 46,3% war die heterozygote Mutation (677CT, $n=57$) der am häufigsten im Gesamtkollektiv vorkommende MTHFR-Genotyp, während die Wildtyp-Variante (677CC, $n=51$) mit 41,4% vertreten war. 12,2% ($n=15$) der Studienteilnehmer konnten als Merkmals-träger der homozygoten Mutation (677TT) identifiziert werden, womit die Frequenz der thermolabilen Genvariante der für Europa angegebenen Prävalenzrate von 5-15% [KLUJTMANS et al. 1996; CORTESE U. MOTTI 2001; SHARP U. LITTLE 2004] entsprach. Werden hingegen die in der *EPIC-Potsdam-Studie* (Subkohorte $n=363$) beobachteten Frequenzen der mutierten Allel-Formen (677CT: 39,1%, 677TT: 7,0% [DROGAN et al. 2004]) zugrunde gelegt, so war in unserem Kollektiv sowohl die heterozygote CT-Genvariante als auch der homozygote TT-Genotyp vergleichsweise häufiger vertreten. Bezüglich der in Tab. 11 gezeigten Verteilung der MTHFR-Genvarianten in den Subgruppen Verum und Placebo bestand kein signifikanter Unterschied ($p=0,844$; χ^2 -Test).

Tab. 11: Prävalenz des C677T-MTHFR-Polymorphismus im Gesamtkollektiv sowie in der Verum- und Placebogruppe

MTHFR-Genvariante	Gesamtkollektiv ($n=123$)		Verum ($n=66$)		Placebo ($n=57$)	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
677CC (Wildtyp)	51	41,5	28	42,4	23	40,4
677CT (Mutation)	57	46,3	31	47,0	26	45,6
677TT (Mutation, thermolabil)	15	12,2	7	10,6	8	14,0

⁵² Der C677T-MTHFR-Polymorphismus entspricht einer autosomal-rezessiven Punktmutation, die durch einen Basentausch (C→T-Transition) auf dem Nukleotid 677 gekennzeichnet ist und eine Änderung der Aminosäuresequenz (Ala→Val) mit einer phänotypisch thermolabilen Enzymvariante zur Folge hat [FROSST et al. 1995; KLUJTMANS et al. 1996; CORTESE U. MOTTI 2001]. Hierbei weisen Träger der homozygoten 677TT-Mutation eine deutliche Verminderung der Enzymaktivität um ca. 70 % auf [ROZEN 1997], die bei zugleich niedrigem Folatstatus zu einer Erhöhung der Homocystein-Plasmawerte um ca. 25 % (2-3 $\mu\text{mol/l}$) gegenüber der Wildtyp-Variante (677CC) führt [JAQUES et al. 1996; KLERK et al. 2002; WALD et al. 2002]. Des Weiteren ist die homozygote Mutation häufig mit erniedrigten Folat-Serumspiegeln assoziiert [HARMON et al. 1996; JAQUES et al. 1996; MA et al. 1999], womit sich eine insgesamt höhere Disposition für eine moderate Homocysteinämie bei 677TT-Merkmalsträgern ableiten lässt. Zur biochemischen Funktion der 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase vgl. auch die Erläuterungen zu Abb. A12, Anhang A.

Mit dem kardiovaskulären Risiko assoziierte Medikamenteneinnahme

Gemäß den vorangegangenen Ausführungen zur Risikoprofil-Charakteristik und der dabei berücksichtigten Arzneimitteleinnahme, war der Anteil der diesbezüglich medikamentös therapierten Studienteilnehmer mit 89,4% ($n=110$) entsprechend hoch. Wie aus Tab. A9, Anhang B, ersichtlich, überwogen mono-medikamentöse (56,4%) gegenüber multi-medikamentösen Therapien (43,6%), wobei sich für die hierbei aufgeführten Behandlungsformen kein signifikanter Unterschied zwischen der Verum- und Placebogruppe feststellen ließ ($p=0,505$; Mann-Whitney-U-Test).

Die einzelnen Medikamentengruppen betreffend, ergab sich im Gesamtkollektiv die höchste Einnahmeprävalenz für die Gruppe der **Antihypertonika** (82,9%, $n=102$), vornehmlich in der Anwendung als antihypertensive Kombinationstherapie mit zwei oder mehreren Wirkstoffgruppen (55,9% gegenüber antihypertensiver Monotherapie mit 44,1%). Zu den hierbei am häufigsten eingesetzten Wirkstoffgruppen zählten β -Rezeptorblocker und ACE-Hemmer, gefolgt von Angiotensin-II-Antagonisten, Diuretika, Calcium-Antagonisten und Antisymphotonika (Daten nicht gezeigt). Eine medikamentöse Behandlung mit **Lipidsenkern** erfolgte bei 30,1% ($n=37$) des Studienkollektivs, wobei die Monotherapie mit Statinen ($n=33$, 89,1% der Behandelten) die häufigste Anwendungsform darstellte. In Bezug auf eine **antiglykämische Therapie**, der insgesamt 17,9% ($n=22$) der Teilnehmer unterlag, waren in der Mehrzahl ebenfalls mono-medikamentöse Behandlungsformen ($n=15$, davon $n=7$ mit Insulintherapie) vorzufinden. Eine ausschließlich aus oralen Antidiabetika bestehende Kombinationstherapie erhielten vier Probanden, während drei insulinpflichtige Teilnehmer zusätzlich mit Metformin behandelt wurden.

Die Subgruppen Verum und Placebo unterschieden sich weder in der für die Hauptmedikation dargestellten Einnahmeprävalenz signifikant (Antihypertonika $p=0,116$, Lipidsenker $p=0,465$, Antidiabetika $p=0,300$; jeweils χ^2 -Test) noch lag ein entsprechender Unterschied bezüglich der zu T0 eingesetzten Wirkstoffe vor (Daten nicht gezeigt).

Bildungsstand

Im vorliegenden Kollektiv war die mittlere Reife mit 38,5% ($n=47$) der am häufigsten absolvierte **Schulabschluss**, gefolgt von der Fach- bzw. Hochschulreife mit einem Anteil von insgesamt 34,4% ($n=42$). Lediglich ein Proband hatte keinen Schulabschluss, während 26,2% ($n=32$) der Teilnehmer einen Haupt- bzw. Volksschulabschluss aufwiesen. Hinsichtlich der in der Verum- und Placebogruppe ermittelten Schulabschlüsse waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar ($p=0,994$; Mann-Whitney-U-Test, Daten nicht gezeigt), so dass von einem in beiden Interventionsgruppen vergleichbaren Bildungsniveau auszugehen war.

4.2.2 HOMOCYSTEIN UND ASSOZIIERTE B-VITAMINSTATUSPARAMETER

Im Rahmen der nachfolgenden Ausführungen wird der Effekt der Nährstoffgabe auf den Homocystein-Plasmaspiegel (tHcy) und die in diesem Zusammenhang relevanten biochemischen Parameter der B-Vitamine Folsäure (S-Folat und E-Folat), Cobalamin (Cbl) und Vitamin B₆ (Pyridoxalphosphat, PLP) erörtert⁵³. Neben den quantitativen Veränderungen der jeweiligen Blutkonzentrationen wurden zusätzlich die im Gesamtkollektiv unter Verum- und Placebogabe zu beobachtenden Auswirkungen hinsichtlich des Vorliegens einer moderaten Hyperhomocysteinämie bzw. der qualitativen B-Vitaminversorgungslage untersucht. Eine ausführliche Beschreibung der in diesem Zusammenhang für den B-Vitaminstatus erhobenen Ergebnisse findet sich unter Anhang E.

Wie unter Kap. 4.2.1.5 für die Prävalenz des C677T-MTHFR-Polymorphismus dargestellt, bestanden in Hinblick auf die Ausprägung der jeweiligen Genvarianten (CC-Wildtyp, CT- und TT-Mutation) keine signifikanten Häufigkeitsunterschiede zwischen den Subgruppen Verum und Placebo. Damit konnten durch den C677T-MTHFR-Polymorphismus determinierte Interventionsunterschiede bezüglich der nachfolgend für Homocystein und Folat durchgeführten Analysen weitgehend ausgeschlossen werden⁵⁴. Da sich die mittleren Creatinin-Serumspiegel während der Intervention aus klinischer Sicht zwar lediglich geringfügig, innerhalb der Subgruppen Verum und Placebo jedoch auf statistisch unterschiedlichem Niveau erhöhten (vgl. Kap. 4.2.5, Tab. 27), wurde dem Einfluss von Creatinin als bekannte Störgröße der tHcy-Plasmakonzentration⁵⁵ in Form der Kovarianzanalyse Rechnung getragen.

4.2.2.1 Homocystein (tHcy)

tHcy-Plasmaspiegel vor und nach der Intervention

Die zu T0 im Gesamtkollektiv ermittelte tHcy-Plasmakonzentration lag bei durchschnittlich $9,92 \pm 2,51 \mu\text{mol/l}$ (Min-Max: 4,7-19,3 $\mu\text{mol/l}$) und damit knapp unterhalb der für Risikopersonen unter präventiven Gesichtspunkten anzustrebenden Obergrenze von $<10 \mu\text{mol/l}$ (vgl. Kap. 5.1). Wurden die geringfügig höheren Ausgangswerte der Verumgruppe im Vergleich zu Placebo untersucht, so unterschieden sich die beiden Subgruppen vor Beginn

⁵³ vgl. hierzu auch die Ausführungen in Kap. 5.1.

⁵⁴ Zum Einfluss des C677T-MTHFR-Polymorphismus auf die basalen tHcy- und Folat-Konzentrationen sowie die durch die Verumsupplementierung erzielten Effekte sei hier auf die von der Verfasserin dieser Arbeit publizierten Posterbeiträge verwiesen [SCHMITT et al. 2005; 2006].

⁵⁵ Im Gesamtkollektiv bestätigte sich der Zusammenhang zwischen renaler Exkretion und Höhe der tHcy-Plasmakonzentration in einer signifikanten Korrelation der Variablen tHcy und Creatinin zu den Zeitpunkten T0 ($r=0,397$, $p<0,001$) und T6 ($r=0,374$, $p<0,001$). Die Veränderungen der Creatinin-Serumspiegel während der Intervention sind den Ausführungen in Kap. 4.2.5 zu entnehmen.

der Supplementierung nicht signifikant voneinander ($p=0,207$, vgl. Tab. 12).

Nach Abschluss der Intervention ließ sich für das Gesamtkollektiv eine höchst signifikante Abnahme der mittleren tHcy-Konzentration auf $9,07 \pm 2,13 \mu\text{mol/l}$ (Min-Max: 4,5-14,9 $\mu\text{mol/l}$) feststellen. Dieser Sachverhalt war in einer höchst signifikanten Reduktion des tHcy-Plasmaspiegels (Δ : $-2,14 \pm 2,31 \mu\text{mol/l}$) innerhalb der Verumgruppe begründet, während unter Placebogabe ein signifikanter Anstieg der tHcy-Plasmawerte (Δ : $0,65 \pm 1,91 \mu\text{mol/l}$) beobachtet wurde. In der Folge erreichte der Gruppenunterschied zwischen Verum und Placebo sowohl in Bezug auf die im Interventionsverlauf ermittelten T6-T0-Differenzen als auch hinsichtlich des zu T6 erhobenen tHcy-Status ein statistisch höchst signifikantes Niveau (jeweils $p < 0,001$). Wurden zudem die während der Intervention eingetretenen Veränderungen der Creatinin-Serumwerte in die Betrachtung einbezogen, so ließ sich erwartungsgemäß ein signifikanter Einfluss auf die T6-T0-Differenzen der tHcy-Plasmakonzentration aufzeigen (Kovariate Creatinin_T6-T0: $p < 0,001$). Der signifikante Unterschied zwischen den mittleren tHcy-Differenzen beider Subgruppen blieb jedoch weiterhin bestehen ($p < 0,001$; ANCOVA, vgl. Tab. 12).

Tab. 12: tHcy-Plasmaspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)

	Gesamtkollektiv (n=123)	Verum (n=66)	Placebo (n=57)	p^a
tHcy_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	9,92 \pm 2,51	10,3 \pm 2,65	9,52 \pm 2,29	0,207
tHcy_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	9,07 \pm 2,13	8,11 \pm 1,82	10,2 \pm 1,93	<0,001
p^b	<0,001	<0,001	0,014	
tHcy_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	-0,85 \pm 2,54	-2,14 \pm 2,31	0,65 \pm 1,91	<0,001
	ANCOVA*: p<0,001			

^a t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

* Kovariate: Creatinin_T6-T0 ($p=0,001$), Faktor: Interventionsgruppe

Die absoluten tHcy-Differenzen zwischen der End- und Basisuntersuchung sind für beide Untersuchungsgruppen in Abb. 15 dargestellt. Die relativen Veränderungen gegenüber T0 entsprachen einer Abnahme der tHcy-Plasmaspiegel in der Verumgruppe um 20,8%, der einer Erhöhung der tHcy-Plasmawerte um 6,8% in der Placebogruppe gegenüberstand.

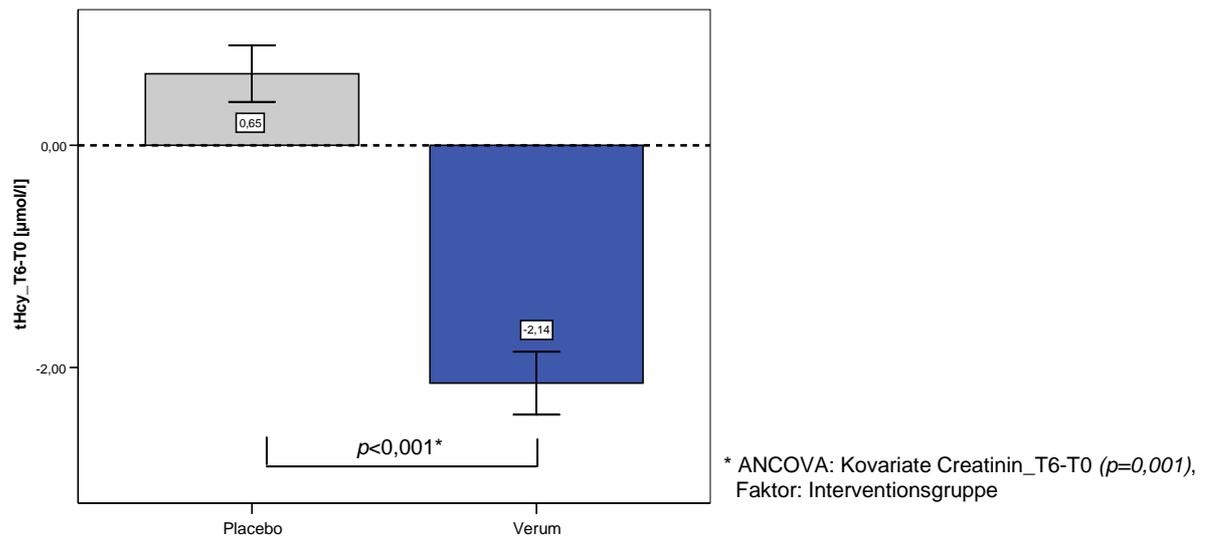


Abb. 15: Absolute T6-T0-Differenzen der tHcy-Plasmaspiegel im Gesamtkollektiv, differenziert nach Verum- und Placebogruppe (Mittelwert \pm SE)

Prävalenz einer moderaten Hyperhomocysteinämie vor und nach der Intervention

Ausgehend von einer tHcy-Plasmakonzentration von $12 \mu\text{mol/l}$, wie sie in der klinischen Praxis als **Obergrenze für gesunde Erwachsene** angesehen wird [UBBINK et al. 1995; WELCH U. LOSCALZO 1998; STANGER et al. 2003], wiesen zur Basisuntersuchung T0 16,3% ($n=20$) der Studienteilnehmer moderat erhöhte tHcy-Plasmaspiegel auf. Demgegenüber wurde der für **Gesunde mit erhöhtem Risikoprofil** und Patienten mit manifester Gefäß-erkrankung **wünschenswerte Zielwert** von $<10 \mu\text{mol/l}$ [MALINOW et al. 1999; HACKAM et al. 2000; STANGER et al. 2003], für dessen Überschreitung sich auf Basis epidemiologischer Daten eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung zum kardiovaskulären Risiko ableiten lässt (vgl. Kap. 5.1), von etwas weniger als der Hälfte des Gesamtkollektivs (44,7%, $n=55$) nicht erreicht. Wie die in Tab. 13 für beide Interventionsgruppen dargelegte Verteilung zeigt, wurden die jeweiligen cut-off-Werte zu Beginn der Supplementierung vergleichsweise häufiger von Probanden der Verumgruppe überschritten; ein signifikanter Unterschied zur Hyperhomocysteinämie-Prävalenz gegenüber Placebo bestand in beiden Fällen jedoch nicht.

Nach Beendigung der Intervention reduzierte sich der Anteil an Personen mit moderater Hyperhomocysteinämie im Gesamtkollektiv auf 9,8% ($n=12$; tHcy $>12 \mu\text{mol/l}$) bzw. 26,8% ($n=33$; tHcy $\geq 10 \mu\text{mol/l}$). Die höchste innerhalb der Verumgruppe zu diesem Zeitpunkt gemessene Plasmakonzentration lag bei $14,4 \mu\text{mol/l}$, wobei der Grenzwert von $>12 \mu\text{mol/l}$ hier lediglich von zwei Probanden (3,0%) und damit signifikant seltener als in der Placebogruppe ($n=10$, 17,5%) überschritten wurde ($p=0,007$, vgl. Tab. 13). Noch deutlicher wurde der T6-Gruppenunterschied ($p < 0,001$), wenn der als Toleranzgrenze für Risikogruppen definierte cut-off-Wert von $<10 \mu\text{mol/l}$ als Beurteilungsgrundlage herangezogen wurde. So

ließ sich unter Einnahme des Verumpräparates eine Erhöhung des Anteils an Probanden mit präventiv wünschenswerten tHcy-Plasmaspiegeln von vormals 51,5% (T0, $n=34$) auf 87,9% (T6, $n=58$) feststellen. In der Placebogruppe hingegen blieb dieser Anteil und damit auch die Prävalenz für eine moderate Hyperhomocysteinämie, definiert durch eine tHcy-Plasmakonzentration von $\geq 10 \mu\text{mol/l}$, weitgehend unverändert.

Tab. 13: Prävalenz einer moderaten Hyperhomocysteinämie zu T0 und T6 in der Verum- und Placebogruppe auf Basis der für gesunde Erwachsene und Risikopersonen empfohlenen Obergrenzen

	tHcy-cut-off	Verum ($n=66$)		Placebo ($n=57$)		p (Chi ²)
		n	%	N	%	
T0	>12 $\mu\text{mol/l}$ *	13	19,7	7	12,3	0,266
	$\geq 10 \mu\text{mol/l}$ **	32	48,5	23	40,4	0,366
T6	>12 $\mu\text{mol/l}$	2	3,0	10	17,5	0,007
	$\geq 10 \mu\text{mol/l}$	8	12,1	25	43,9	<0,001

* für gesunde Erwachsene empfohlene Obergrenze [UBBINK et al. 1995; WELCH U. LOSCALZO 1998; STANGER et al. 2003], ** für Risikopersonen und Patienten mit manifester Atherosklerose empfohlene Obergrenze [MALINOW et al. 1999; HACKAM et al. 2000; STANGER et al. 2003]

Korrelation zwischen den Veränderungen der tHcy-Plasmaspiegel während der Intervention (T6-T0) und dem tHcy-Status zu T0

Da das Ausmaß der Homocystein-Senkung durch eine Intervention mit B-Vitaminen Literaturdaten zufolge wesentlich durch die Höhe der Ausgangswerte determiniert wird [CLARKE U. ARMITAGE 2000; STANGER et al. 2003; HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION 2005], sollte untersucht werden, ob dieser Zusammenhang auch für die vorliegende Untersuchung bestätigt werden konnte. Hierzu wurden die unter Nährstoff-supplementierung erzielten tHcy-Differenzen (T6-T0) der Verumgruppe mit den zu T0 erhobenen tHcy-Plasmawerten korreliert. Zwischen beiden Variablen ergab sich eine hoch inverse Assoziation, die ein statistisch höchst signifikantes Niveau erreichte ($r=-0,738$, $p<0,001$). Danach bestätigte sich, dass Probanden mit initial höheren tHcy-Plasmawerten eine stärkere Homocystein-Abnahme (Schwellenkonzentration: $\text{tHcy} > 6,92 \mu\text{mol/l}$, $y=-0,643x + 4,449$) im Vergleich zu Probanden mit niedrigeren Ausgangswerten verzeichneten (vgl. Abb. 16).

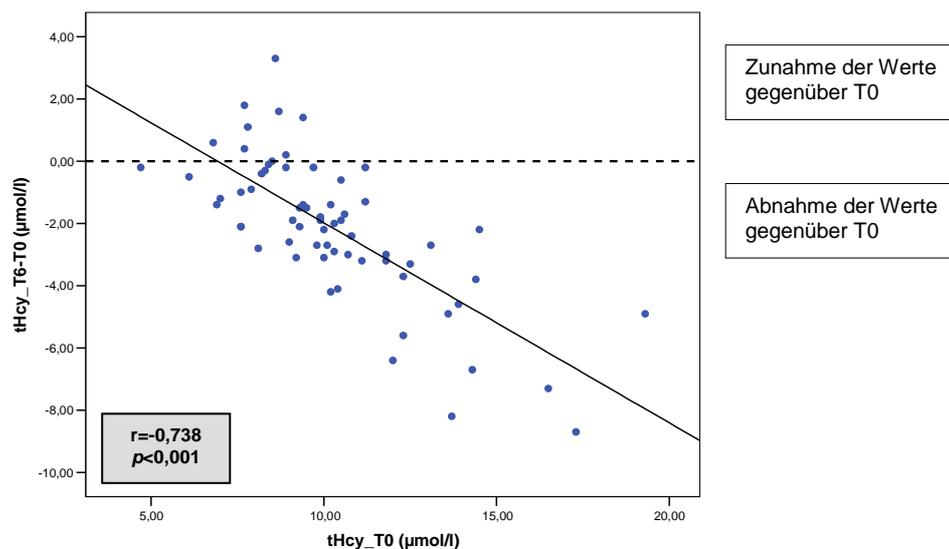


Abb. 16: Korrelation zwischen den absoluten tHcy-Differenzen (T6-T0) und den tHcy-Plasmaspiegeln zu T0 in der Verumgruppe des Gesamtkollektivs

4.2.2.2 Folat (S-Folat/E-Folat)

Zur Beurteilung des Folatstatus und dessen Beeinflussung durch die Supplementierung wurde sowohl die Folatkonzentration im Serum (S-Folat), die einen Anhaltspunkt für den jeweiligen Versorgungsstatus zum Zeitpunkt der Blutentnahme liefert (Kurzzeitindikator), als auch der erythrozytäre Folatgehalt (E-Folat) als Marker für die Gewebespeicher (Langzeitindikator) [LEE U. NIEMAN 1996, S. 425; THIERY U. RICHTER 2002, S. 674f], analysiert.

S-Folat- und E-Folat-Spiegel vor und nach der Intervention

Die zu beiden Untersuchungsterminen im Gesamtkollektiv und in den Subgruppen Verum und Placebo analysierten S-Folat- und E-Folat-Werte sind in Tab. 14 zusammengefasst. Wie daraus ersichtlich wird, wies die Placebogruppe zu Beginn der Intervention einen geringfügig höheren Folatstatus auf. Ein im Vergleich zur Verumgruppe signifikanter Unterschied war hierbei jedoch weder in Bezug auf S-Folat ($p=0,244$) noch auf die erythrozytären Gehalte ($p=0,276$) festzustellen. Damit war sowohl in Hinblick auf die kurz- als auch langfristige Versorgung mit Folat von gleichen Ausgangsbedingungen in beiden Interventionsgruppen auszugehen.

Bei Probanden, die im weiteren Untersuchungsverlauf das Verumpräparat erhielten, wurde im Mittel ein jeweils höchst signifikanter Anstieg der beiden Folatparameter beobachtet. Die mittleren S-Folat-Spiegel der Placebogruppe blieben demgegenüber nahezu konstant ($p=0,958$), während für die E-Folat-Gehalte eine ebenfalls höchst signifikante Zunahme während der Intervention nachgewiesen wurde. Vergleicht man das hierbei erzielte Ausmaß anhand der in beiden Subgruppen errechneten T6-T0-Differenzen, so unterschieden sich diese sowohl für S-Folat ($\Delta: 63,5 \pm 25,2$ vs. $-0,08 \pm 11,3$ nmol/l) als auch für E-Folat ($\Delta: 2,53$

$\pm 0,86$ vs. $0,50 \pm 0,32$ $\mu\text{mol/l}$) höchst signifikant. Gleiches traf auf die zum Zeitpunkt T6 erhobenen Statuswerte der Verum- und Placebogruppe zu, für die der Unterschied in beiden Fällen ein statistisch höchst signifikantes Niveau erreichte (vgl. Tab. 14).

Tab. 14: S-Folat- und E-Folat-Spiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)

	Gesamtkollektiv	Verum	Placebo	p
S-Folat_T0 [nmol/l]	24,5 \pm 13,0 (n=122)	23,3 \pm 12,1 (n=65)	25,8 \pm 14,1 (n=57)	0,244 ^a
S-Folat_T6 [nmol/l]	57,3 \pm 35,4 (n=119)	86,4 \pm 22,8 (n=62)	25,8 \pm 11,6 (n=57)	<0,001 ^b
p	<0,001 ^c	<0,001 ^d	0,958 ^d	
S-Folat_T6-T0 [nmol/l]	32,8 \pm 37,5 (n=118)	63,5 \pm 25,2 (n=61)	-0,08 \pm 11,3 (n=57)	<0,001 ^b
E-Folat_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	0,95 \pm 0,38 (n=122)	0,95 \pm 0,43 (n=65)	0,96 \pm 0,33 (n=57)	0,276 ^a
E-Folat_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	2,46 \pm 1,21 (n=115)	3,45 \pm 0,90 (n=58)	1,46 \pm 0,35 (n=57)	<0,001 ^b
p	<0,001 ^c	<0,001 ^d	<0,001 ^d	
E-Folat_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	1,51 \pm 1,21 (n=114)	2,53 \pm 0,86 (n=57)	0,50 \pm 0,32 (n=57)	<0,001 ^b

^a Mann-Whitney-U-Test, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^c Wilcoxon-Test, bezogen auf T0 und T6

^d t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

Die in der Verlaufsbeobachtung unter Verum- und Placebogabe für beide Variablen ermittelten absoluten Differenzen (T6-T0) veranschaulichen Abb. A6 und A7, Anhang A. Die hierbei innerhalb der Verumgruppe für S-Folat erzielte relative Veränderung gegenüber T0 belief sich im Mittel auf 273%. Mit einer relativen Abnahme um -0,3% verringerten sich die diesbezüglichen Werte der Placebogruppe dagegen nur unwesentlich. Für E-Folat wurden demgegenüber relative Zunahmen von 266% (Verum) und 52% (Placebo) verzeichnet, die für beide Subgruppen – unabhängig vom Signifikanzunterschied der T6-T0-Differenzen – eine klinisch relevante Verbesserung der langfristigen Folatversorgung während des Studienzeitraums anzeigen.

Korrelation zwischen den Veränderungen der Folat-Spiegel während der Intervention (T6-T0) und dem Folatstatus zu T0

Um die in der Verumgruppe erzielten Effekte der Nährstoffgabe und die damit einhergehende Verbesserung der kurz- und langfristigen Folatversorgung in Abhängigkeit von der Ausgangsversorgung zu untersuchen, wurde eine bivariate Korrelation zwischen den T6-T0-Differenzen der S-Folat- bzw. E-Folat-Konzentrationen und den jeweiligen T0-Werten durchgeführt. Ein entsprechender Zusammenhang, der auf einen stärkeren Interventionseffekt bei

initial schlechter versorgten Probanden hindeutet, konnte hierbei lediglich für S-Folat ($r_s=-0,332$, $p=0,009$), nicht jedoch für E-Folat ($r_s=-0,035$, $p=0,794$) gefunden werden.

4.2.2.3 Cobalamin (Cbl)

Cbl-Serumspiegel vor und nach der Intervention

Wie die in Tab. 15 für das Gesamtkollektiv und die Subgruppen Verum und Placebo aufgezeigten Cbl-Serumspiegel verdeutlichen, lagen die Cbl-Ausgangswerte der Placebogruppe im Mittel um 8% höher als in der Verumgruppe. Ein statistisch signifikanter Unterschied, der auf initial unterschiedliche Bedingungen in den Untersuchungsgruppen hindeutet, war hierbei jedoch nicht gegeben ($p=0,538$).

Im Verlauf der Intervention stiegen die Cbl-Serumspiegel sowohl in der Verum- ($p<0,001$) als auch in der Placebogruppe ($p=0,024$) signifikant an; für die unter Verumgabe zu beobachtende Zunahme ergab sich hierbei ein vergleichsweise stärker ausgeprägter Effekt (Δ : 188 ± 105 vs. $20,4 \pm 66,1$ pmol/l unter Placebo). Folglich unterschieden sich sowohl die T6-T0-Differenzen als auch die final erhobenen Cbl-Serumwerte der beiden Subgruppen signifikant voneinander (jeweils $p<0,001$, vgl. Tab. 15).

Tab. 15: Cbl-Serumspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)

	Gesamtkollektiv (n=123)	Verum (n=66)	Placebo (n=57)	p^a
Cbl_T0 [pmol/l]	280 \pm 114	270 \pm 87,7	292 \pm 138	0,538
Cbl_T6 [pmol/l]	390 \pm 157	457 \pm 129	313 \pm 151	<0,001
p^b	<0,001	<0,001	0,024	
Cbl_T6-T0 [pmol/l]	110 \pm 122	188 \pm 105	20,4 \pm 66,1	<0,001

^a Mann-Whitney-U-Test, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

Die absoluten Cbl-Differenzen zwischen T6 und T0 in der Verum- und Placebogruppe sind in Abb. A8, Anhang A, gegenübergestellt. Diese entsprachen relativen Veränderungen von 70% (Verum) bzw. 7% (Placebo), welche den quantitativen Unterschied im Anstieg der Serumwerte beider Interventionsgruppen zusätzlich unterstreichen.

Korrelation zwischen den Veränderungen der Cbl-Serumspiegel während der Intervention (T6-T0) und dem Cbl-Status zu T0

Zwischen den Veränderungen der Cbl-Serumwerte (T6-T0-Differenzen) in der Verumgruppe und den T0-Statuswerten zeigte sich eine sehr geringe, inverse, jedoch nicht signifikante Korrelation ($r=-0,118$, $p=0,347$). Der durch das Verumpräparat induzierte Anstieg der mittleren Cbl-Serumspiegel erwies sich damit als weitgehend unabhängig von der initialen

Versorgungssituation der Probanden.

4.2.2.4 Pyridoxalphosphat (PLP)

PLP-Plasmaspiegel vor und nach der Intervention

Betrachtet man die zu Beginn der Interventionsphase in der Verum- und Placebogruppe ermittelten PLP-Plasmaspiegel, so wies die Placebogruppe im Mittel lediglich geringfügig höhere Basalwerte auf (vgl. Tab. 16). Dass hierbei von vergleichbaren Bedingungen gegenüber Probanden der Verumgruppe ausgegangen werden konnte, ließ sich auch mit Hilfe des hierzu durchgeführten Signifikanztests bestätigen ($p=0,887$).

Eine höchst signifikante Zunahme der mittleren PLP-Spiegel ließ sich im weiteren Untersuchungsverlauf sowohl für die Verum- als auch für die Placebogruppe beobachten. Mit einer absoluten Erhöhung der Plasmakonzentration um 94,5 nmol/l in der Verumgruppe gegenüber 8,50 nmol/l in der Placebogruppe erwies sich der unter Verumgabe erzielte Effekt jedoch als signifikant ausgeprägter ($p<0,001$). Ein die durch die Verumsupplementierung induzierter Effekt ließ sich ferner an den zu T6 ermittelten PLP-Plasmawerten erkennen; auch hier unterschieden sich die beiden Subgruppen Verum und Placebo höchst signifikant voneinander (vgl. Tab. 16).

Tab. 16: PLP-Plasmakonzentrationen zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)

	Gesamtkollektiv (n=123)	Verum (n=66)	Placebo (n=57)	p
PLP_T0 [nmol/l]	42,3 \pm 27,0	41,6 \pm 28,7	43,2 \pm 25,2	0,887 ^a
PLP_T6 [nmol/l]	97,0 \pm 65,3	136 \pm 63,5	51,7 \pm 26,9	<0,001 ^b
p	<0,001 ^c	<0,001 ^d	0,001 ^c	
PLP_T6-T0 [nmol/l]	54,6 \pm 64,0	94,5 \pm 60,7	8,50 \pm 24,8	<0,001 ^a

^a Mann-Whitney-U-Test, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^c Wilcoxon-Test, bezogen auf T0 und T6

^d t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

Die zwischen der End- und Basisuntersuchung für die Untersuchungsgruppen ermittelten absoluten Differenzen sind in Abb. A9, Anhang A, dargestellt. Die hierbei gezeigten Veränderungen entsprachen einer relativen Erhöhung des mittleren PLP-Plasmaspiegels um 227% in der Verumgruppe sowie einem deutlich geringer ausgeprägten Anstieg von 20% in der Placebogruppe.

Korrelation zwischen den Veränderungen der PLP-Plasmaspiegel während der Intervention (T6-T0) und dem PLP-Status zu T0

Zur Überprüfung des Zusammenhangs zwischen dem Ausmaß des durch die Verum-supplementierung induzierten Anstiegs der PLP-Plasmaspiegel und dem Versorgungsstatus vor der Intervention wurden die absoluten PLP-Differenzen (T6-T0) mit den T0-Werten der Verumgruppe korreliert. Eine entsprechende Assoziation, die auf eine Statusverbesserung in Abhängigkeit vom Ausgangswert hinweist, konnte hierbei jedoch nicht gezeigt werden ($r_s=0,108$, $p=0,390$).

4.2.2.5 Korrelationen und Interaktionen

Korrelationen zwischen tHcy und den B-Vitaminstatusparametern zu T0

Im Rahmen der bivariaten Korrelationsrechnung ergab sich für das Gesamtkollektiv eine schwach inverse, höchst signifikante Assoziation zwischen der Höhe des initialen tHcy-Plasmaspiegels und der zu T0 ermittelten Höhe der S-Folat- ($r_s=-0,389$) bzw. Cbl-Serumkonzentration ($r=-0,311$). Keine Assoziationen ließen sich hingegen zwischen Homocystein und E-Folat sowie den PLP-Plasmawerten aufzeigen (vgl. Tab. A10, Anhang B).

Unter den B-Vitaminen fanden sich zu Beginn der Intervention schwach ausgeprägte, positive Korrelationen zwischen S-Folat und allen weiteren Parametern des B-Vitaminstatus. Des Weiteren bestand zu diesem Zeitpunkt eine schwache, positive Assoziation zwischen den Cbl-Serumkonzentrationen und den erythrozytären Folatgehalten (vgl. Tab. A10, Anhang B).

Korrelationen zwischen den Veränderungen der tHcy-Plasmaspiegel während der Intervention (T6-T0) und den B-Vitaminstatusparametern zu T0

Analog zu der unter Kap. 4.2.2.1 ermittelten Korrelation hinsichtlich der tHcy-Differenzen (T6-T0) und den tHcy-Plasmawerten zu T0 sollte überprüft werden, inwieweit Assoziationen zwischen der zu beobachtenden Homocystein-Reduktion in der Verumgruppe und dem initialen B-Vitaminstatus bestanden haben. Es zeigte sich, dass die Verumgabe bei initial niedrigen S-Folat- ($r_s=0,479$, $p<0,001$) und Cbl-Serumwerten ($r=0,349$, $p=0,004$) mit einer stärkeren Abnahme der tHcy-Plasmakonzentration einherging. Für den E-Folat- sowie den PLP-Ausgangstatus ließ sich diesbezüglich ein Trend zu einer schwach positiven Korrelation mit vergleichsweise geringerer Stärke errechnen (E-Folat: $r_s=0,229$, $p=0,067$, PLP: $r_s=0,233$, $p=0,059$).

Korrelationen zwischen den Veränderungen der tHcy-Plasmaspiegel während der Intervention (T6-T0) und den Veränderungen des B-Vitaminstatus (T6-T0)

Wurden die T6-T0-Differenzen der tHcy-Plasmakonzentration mit den Veränderungen der jeweiligen B-Vitaminspiegel in der Verumgruppe korreliert, so fand sich ein signifikant

inverser Zusammenhang zwischen tHcy und den Parametern Cbl ($r=-0,528$, $p<0,001$) und S-Folat ($r=-0,408$, $p=0,001$). Wie Abb. A10, Anhang A, verdeutlicht, war demnach die unter Verumgabe erzielte Reduktion der tHcy-Plasmaspiegel umso ausgeprägter, je höher die Anstiege der S-Folat- und Cbl-Serumkonzentrationen im Interventionsverlauf waren. Keine Korrelationen fanden sich demgegenüber zwischen den tHcy-Differenzen und den durch die Verumsupplementierung induzierten Veränderungen der E-Folat- sowie PLP-Plasmakonzentrationen.

Des Weiteren wurden diverse Interkorrelationen zwischen den unter Verumgabe erzielten T6-T0-Differenzen der jeweiligen B-Vitaminsparameter gefunden. Eine entsprechende Übersicht findet sich unter Anhang B, Tab. A11.

4.2.2.6 Zusammenfassung

Mit einer Konzentration von $9,92 \pm 2,51 \mu\text{mol/l}$ war für das Gesamtkollektiv bereits zu Beginn der Intervention eine im Mittel präventiv wünschenswerte Höhe des **tHcy-Plasmaspiegels** ($<10 \mu\text{mol/l}$) festzustellen. Bei genauerer Betrachtung wird allerdings deutlich, dass knapp die Hälfte (44,7%) der Studienteilnehmer diesen Wert initial überschritten. Im weiteren Untersuchungsverlauf ließ sich unter Gabe des Verumpräparates eine höchst signifikante Senkung der tHcy-Plasmawerte ($\Delta: -2,14 \pm 2,31 \mu\text{mol/l}$, $p<0,001$) beobachten, die einer relativen Abnahme um 20,8% entsprach. Eine durch die Nährstoffgabe induzierte Optimierung der tHcy-Plasmawerte spiegelte sich ferner in einer deutlichen und gegenüber Placebo signifikanten Verringerung des Anteils an Probanden mit prävalenter Hyperhomocysteinämie, definiert durch tHcy-Plasmawerte >12 bzw. $\geq 10 \mu\text{mol/l}$, nach Beendigung der Intervention wider. Die Placebogruppe verzeichnete demgegenüber eine geringfügige, wenn auch signifikante Zunahme der tHcy-Plasmakonzentration ($\Delta: 0,65 \pm 1,91 \mu\text{mol/l}$, $p=0,014$), wobei die jeweiligen Hyperhomocysteinämie-Prävalenzen über den Zeitverlauf nahezu konstant blieben. Des Weiteren ließ sich zeigen, dass die unter Verumgabe erzielte Homocystein-Senkung umso ausgeprägter ausfiel, je höher die tHcy-Ausgangswerte der Probanden waren.

In Hinblick auf die B-Vitaminsparameter **S-Folat**, **E-Folat**, **Cbl** und **PLP** wurde ein höchst signifikanter Anstieg der jeweiligen Blutspiegel durch die Nährstoffsupplementierung nachgewiesen, der in allen Fällen ein signifikantes Niveau gegenüber Placebo erreichte. Die deutlichsten quantitativen Veränderungen ließen sich hierbei für die Folsäuremarker S-Folat ($\Delta: 273\%$) und E-Folat ($\Delta: 266\%$) sowie den PLP-Plasmaspiegel ($\Delta: 227\%$) aufzeigen, gefolgt von einer ebenfalls ausgeprägten Zunahme der Cbl-Serumkonzentration ($\Delta: 70\%$). Signifikante Erhöhungen der B-Vitaminspiegel waren mit Ausnahme von S-Folat auch innerhalb der Placebogruppe festzustellen. Diese erwiesen sich für E-Folat ($\Delta: 52\%$) und die PLP-

Plasmawerte (Δ : 20%) als quantitativ bedeutsam.

Unter qualitativen Gesichtspunkten zeigte sich für alle erhobenen B-Vitaminsstatusparameter – basierend auf den in der Literatur für eine ausreichende Bedarfsdeckung angegebenen Referenzwerten – bereits zu Beginn der Intervention eine insgesamt gute Versorgungslage des Kollektivs (vgl. hierzu die Ausführungen unter Anhang E). Wurden demgegenüber die zur Homocystein-Optimierung höher angesetzten Grenzwerte veranschlagt, so ließ sich für S-Folat und Cobalamin ein initial höherer Anteil suboptimal versorgter Probanden identifizieren (vgl. Tab. A25, S. E6). Hierbei erwies sich die Verumgabe als geeignet, sowohl die S-Folat- als auch die Cbl-Konzentrationen in den jeweils wünschenswerten Bereich anzuheben und den qualitativen T6-Versorgungsstatus gegenüber Placebo signifikant zu verbessern. Für E-Folat und Pyridoxalphosphat wurden in diesem Zusammenhang dagegen bereits zur Basisuntersuchung ausreichend hohe und durch eine Supplementierung nicht weiter zu optimierende Blutspiegel erreicht.

Eine unterschiedliche Ansprechbarkeit auf die Verumsupplementierung in Abhängigkeit von der initialen Versorgungslage wurde lediglich für die im Serum gemessene Folatkonzentration gefunden. Danach verzeichneten Probanden mit niedrigeren Ausgangswerten die in der Verlaufsbeobachtung stärksten Erhöhungen der S-Folat-Spiegel. Für die Parameter E-Folat, Cbl und PLP konnte ein entsprechender Zusammenhang hingegen nicht gezeigt werden.

In der **Interkorrelationsanalyse** ergaben sich höchst signifikante, inverse Assoziationen zwischen Homocystein und den Parametern S-Folat und Cbl, die sowohl auf den T0-Status als auch auf die Veränderungen im Zeitverlauf (T6-T0-Differenzen) zutrafen. Im ersten Fall war – gemessen an der Höhe der im Gesamtkollektiv ermittelten Korrelationskoeffizienten – ein geringfügig stärkerer, negativer Zusammenhang zwischen den tHcy-Ausgangsspiegeln und der Höhe der basalen S-Folat-Konzentrationen feststellbar. Demgegenüber bestand für die unter Verumgabe erzielte Homocystein-Senkung eine vergleichsweise stärkere, negative Assoziation zur Erhöhung der Cbl-Serumspiegel. In Bezug auf E-Folat und PLP ließen sich in den vorgenannten Analysen hingegen keine Korrelationen aufzeigen. Des Weiteren war in der Verumgruppe zu beobachten, dass die T6-T0-Differenzen der tHcy-Plasmakonzentration mit der Höhe des initialen S-Folat- sowie Cbl-Status positiv korrelierten, während für die E-Folat- und PLP-Ausgangswerte ein Trend zu einer entsprechenden Assoziation (stärkere Homocystein-Senkung bei schlechterer initialer Vitaminversorgung) ermittelt werden konnte.

4.2.3 OXIDIERTES LDL UND ASSOZIIERTE ANTIOXIDANZIENPARAMETER

Im Folgenden wird der Einfluss der Nährstoffsupplementierung auf die Serumkonzentration an oxidiertem LDL (oxLDL) sowie auf ausgewählte Marker des antioxidativen Status (TEAC, α -Tocopherol) beschrieben. Analog zu den unter Kap. 4.2.2 abgehandelten biochemischen B-Vitaminstatusparametern fanden neben den quantitativen Veränderungen der α -Tocopherol-Serumwerte auch qualitative Effekte der Nährstoffgabe Berücksichtigung. Letztere werden unter Anhang E detailliert erörtert.

4.2.3.1 Oxidiertes LDL (oxLDL)

oxLDL-Serumspiegel vor und nach der Intervention

Zum Zeitpunkt T0 lag der oxLDL-Serumspiegel der Gesamtgruppe ($n=73^{56}$) bei 71 ± 16 U/l (Min-Max: 38-107 U/l), womit der für gesunde Erwachsene angegebene Referenzwert von 70 U/l (methodenspezifischer cut-off-Wert nach ITABE u. UEDA [2007]) im Mittel nur geringfügig überschritten wurde. OxLDL-Serumkonzentrationen >70 U/l waren demgegenüber bei der Hälfte der Teilnehmer (50,7%, $n=37$) mit nahezu gleicher Verteilung in den Subgruppen Verum und Placebo (47,5 vs. 50,7%, $p=0,549$; χ^2 -Test) festzustellen. Der geringfügig höhere oxLDL-Ausgangswert der Placebogruppe unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zu dem der Verumgruppe ($p=0,259$; vgl. Tab. 17).

Am Ende der Intervention ließ sich für das Gesamtkollektiv eine höchst signifikante Abnahme des oxLDL-Serumspiegels gegenüber der Basisuntersuchung verzeichnen (T6: 62 ± 15 U/l, Min-Max: 33-101 U/l), womit sich auch der Anteil an Probanden mit Werten >70 U/l auf weniger als ein Drittel (28,8%, $n=21$) verringerte. Wie die nach Verum- und Placebogruppe differenzierte Auswertung zeigt, reduzierten sich die mittleren oxLDL-Serumkonzentrationen auch hier auf jeweils höchst signifikantem Niveau, wobei eine stärker ausgeprägte Senkung unter Einnahme von Placebo (Δ : $-9,2 \pm 11$ U/l bzw. -12,6%) im Vergleich zur Verumgabe ($-7,3 \pm 12$ U/l bzw. -10,6%) beobachtet wurde. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Verum- und Placebogruppe lag jedoch weder für die Veränderungen im Zeitverlauf ($p=0,510$) noch für die T6-Serumwerte vor ($p=0,490$, vgl. Tab. 17). Desgleichen waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Überschreitung des oxLDL-cut-offs (>70 U/l, Verum: 30,0%, Placebo: 27,3%) zwischen beiden Subgruppen gegeben ($p=0,798$; χ^2 -Test).

⁵⁶ Dies entspricht der im Gesamtkollektiv untersuchten Teilstichprobe ($n=102$) abzüglich der Probanden mit hypolipidämischer Medikation (vgl. Kap. 4.2.1.1, Fußnote 45).

Tab. 17: oxLDL-Serumspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)

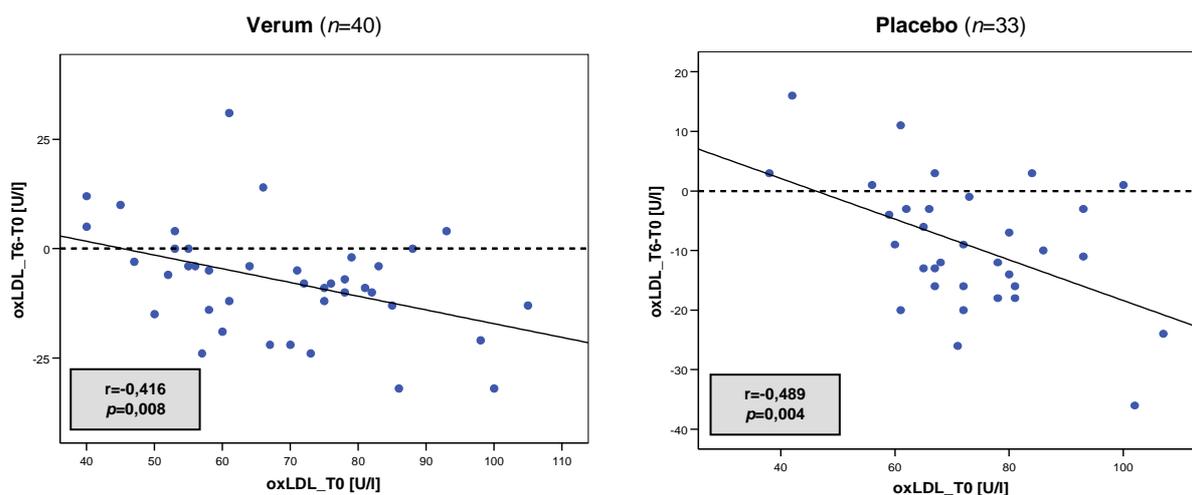
	Gesamtkollektiv (n=73)	Verum (n=40)	Placebo (n=33)	p^a
oxLDL_T0 [U/l]	71 \pm 16	69 \pm 17	73 \pm 16	0,259
oxLDL_T6 [U/l]	62 \pm 15	61 \pm 16	64 \pm 14	0,490
p^b	<0,001	0,001	<0,001	
oxLDL_T6-T0 [U/l]	-8,2 \pm 12	-7,3 \pm 12	-9,2 \pm 11	0,510

^a t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

Korrelation zwischen den Veränderungen der oxLDL-Serumspiegel während der Intervention (T6-T0) und dem oxLDL-Status zu T0

Da sich die oxLDL-Serumspiegel in der Verum- und Placebogruppe in vergleichbarem Ausmaß reduzierten, sollte untersucht werden, ob in beiden Subgruppen ein Zusammenhang zwischen den basal gemessenen Konzentrationen und den im Interventionsverlauf beobachteten Veränderungen bestand. In der hierzu durchgeführten bivariaten Korrelationsanalyse fand sich sowohl für die Verumgruppe ($r=-0,416$, $p=0,008$) als auch für die Placebogruppe ($r=-0,489$, $p=0,004$) ein hoch signifikant inverser Zusammenhang, der auf eine Abhängigkeit der oxLDL-Senkung vom Ausgangsniveau hinweist. Wie die in Abb. 17 dargestellten Regressionsgeraden verdeutlichen, war eine Abnahme der oxLDL-Serumkonzentration während der Intervention mit Ausgangswerten ≥ 45 U/l (Verum, $y=-0,314x+14,2$) bzw. ≥ 46 U/l (Placebo, $y=-0,342x+15,8$) assoziiert.

**Abb. 17:** Korrelation zwischen den absoluten oxLDL-Differenzen (T6-T0) und den oxLDL-Serumspiegeln zu T0 in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs

4.2.3.2 Antioxidative Kapazität des Plasmas (TEAC)

Die antioxidative Kapazität wurde mit Hilfe des TEAC-Tests (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Test) bestimmt, der als funktioneller Test die *In-vitro*-Hemmung einer synthetischen Radikalverbindung (ABTS^{•+}) durch im Plasma vorhandene Antioxidanzien anzeigt (vgl. Anhang C). In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass endogene Antioxidanzien einen hohen Beitrag zum antioxidativen Potenzial von humanen Plasmaproben leisten, wobei Harnsäure neben Bilirubin als wesentliche Komponente für die im TEAC-Test ermittelte Gesamtkapazität gilt [BENZIE U. STRAIN 1996; RICE-EVANS U. MILLER 1994]. Da für die Verum- und Placebogruppe ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der im Studienverlauf ermittelten T6-T0-Differenzen der Harnsäure-Serumspiegel vorlag (vgl. Kap. 4.2.5, Tab. 27), wurden diese für den Vergleich der TEAC-Differenzen beider Subgruppen als Kontrollvariable berücksichtigt. Durch dieses Vorgehen sollte eine mögliche Kaschierung von Interventionseffekten mit Hilfe der Kovarianzanalyse ausgeschlossen werden⁵⁷.

TEAC-Plasmawerte vor und nach der Intervention

Betrachtet man die durchschnittlichen TEAC-Werte zu Beginn der Intervention, so wies die Verumgruppe eine um 16 µmol/l Trolox-Äquivalent höhere antioxidative Plasmakapazität im Vergleich zur Placebogruppe auf (vgl. Tab. 18). Absolut gesehen betrug dieser Unterschied lediglich 0,7%, wobei die Ausgangsbedingungen der beiden Untersuchungsgruppen auch aus statistischer Sicht als vergleichbar eingestuft werden konnten ($p=0,342$).

Während unter Einnahme von Placebo eine geringfügige, nicht signifikante Erhöhung der mittleren TEAC verzeichnet wurde ($\Delta: 8,98 \pm 97,2$ µmol/l bzw. 0,4%), ließ sich innerhalb der Verumgruppe eine signifikante Zunahme der antioxidativen Plasmakapazität aufzeigen ($\Delta: 39,32 \pm 136,5$ µmol/l bzw. 1,7%, $p=0,022$). Für die daraus resultierenden Unterschiede im T6-Status der beiden Subgruppen ergab sich ein Trend zur Signifikanz ($p=0,064$). Vergleicht man demgegenüber das unter Verumeinnahme erzielte Ausmaß der Veränderungen (T6-T0-Differenzen) im Vergleich zu Placebo, so war hier kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen ($p=0,164$). Wie das Ergebnis der Kovarianzanalyse zeigt (vgl. Tab. 18), war dieses Ergebnis unabhängig von den beobachteten T6-T0-Differenzen der Harnsäure-Serumwerte. Deren Einfluss als Kovariate erwies sich im vorliegenden Modell demnach als nicht signifikant (Harnsäure_T6-T0: $p=0,263$).

⁵⁷ Im Gesamtkollektiv bestätigte sich die in der Literatur für die TEAC beschriebene Assoziation zur Harnsäure-Serumkonzentration mit einem Trend zu einer zu T0 schwach ausgeprägten Korrelation allerdings nur bedingt ($r=0,169$, $p=0,061$). Zum Zeitpunkt T6 ließ sich dagegen kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen beiden Parametern nachweisen ($r_s=0,133$, $p=0,143$).

Tab. 18: TEAC-Plasmawerte zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)

	Gesamtkollektiv (n=123)	Verum (n=66)	Placebo (n=57)	p^a
TEAC_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	2287 \pm 95,76	2295 \pm 99,96	2279 \pm 90,71	0,342
TEAC_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	2313 \pm 140,0	2334 \pm 157,0	2287 \pm 113,6	0,064
p	0,240 ^b	0,022^c	0,488 ^c	
TEAC_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	25,26 \pm 120,4	39,32 \pm 136,5	8,98 \pm 97,2	0,164
ANCOVA*: p=0,275				

^a t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b Wilcoxon-Test, bezogen auf T0 und T6

^c t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

* Kovariate: Harnsäure_T6-T0 ($p=0,263$), Faktor: Interventionsgruppe

Korrelation zwischen den Veränderungen der TEAC-Plasmawerte während der Intervention (T6-T0) und dem TEAC-Status zu T0

Da die TEAC-Werte in der Verumgruppe während der Intervention signifikant anstiegen, sollte untersucht werden, inwieweit die im Studienverlauf zu beobachtenden Veränderungen durch den initialen Status beeinflusst wurden. In der hierzu durchgeführten bivariaten Korrelation zwischen den T6-T0-Differenzen und den TEAC-Werten zum Zeitpunkt T0 fand sich jedoch keine signifikante Assoziation ($r=-0,145$, $p=0,246$). Die unter Supplementierung mit Verum erzielte Erhöhung der antioxidativen Kapazität erwies sich somit als unabhängig von den initial gemessenen TEAC-Werten.

4.2.3.3 α -Tocopherol (AT)

Da α -Tocopherol im Serum eng mit den Blutlipiden assoziiert ist⁵⁸ und hohe bzw. niedrige Lipid-Serumwerte zu einer nicht adäquaten Beurteilung des Vitamin-E-Status in Form einer Über- bzw. Unterschätzung der Versorgungslage führen [VOGEL et al. 1997; BÄSSLER et al. 2002, S. 396, 417, GROSS et al. 2003] wurden die mittels RP-HPLC-Verfahren bestimmten α -Tocopherol(AT)-Serumkonzentrationen (vgl. Anhang C) zusätzlich auf den individuellen Blutlipidgehalt der Probanden standardisiert. Hierzu wurde die in der Literatur übliche Darstellung der AT-Serumspiegel in Relation zur Gesamtcholesterol- (AT/TC) bzw. Gesamtlipid-Fraktion (AT/TC+TG) gewählt [vgl. ERHARDT 2002b, S. 677f; VOGEL et al. 1997; HAMILTON et al. 2000; MONGE-ROJAS et al. 2005].

⁵⁸ Dieser Zusammenhang ließ sich auch für die vorliegende Untersuchung bestätigen, wobei im Gesamtkollektiv eine geringfügig stärkere Assoziation zur TC-Serumkonzentration (T0: $r=0,600$, T6: $r=0,514$, jeweils $p<0,001$) im Vergleich zu den TG-Serumspiegeln (T0: $r_s=0,409$, T6: $r_s=0,371$, jeweils $p<0,001$) erkennbar wurde.

α -Tocopherol-Serumspiegel vor und nach der Intervention

Betrachtet man die zu T0 erhobenen α -Tocopherolstatuswerte der Verum- und Placebogruppe, so lagen für alle der in Tab. 19 dargestellten Variablen im Mittel vergleichbare Ausgangsbedingungen vor.

Während der Interventionsphase verzeichnete die Verumgruppe eine höchst signifikante Zunahme der **AT-Serumspiegel** (Δ : $12,9 \pm 8,99 \mu\text{mol/l}$), die sich auf 36% gegenüber dem Basalwert belief. Innerhalb der Placebogruppe traten in der Verlaufsbeobachtung hingegen keine wesentlichen Veränderungen auf (Δ : $0,82 \pm 9,62 \mu\text{mol/l}$ bzw. 2,3%, $p=0,523$). Zwischen beiden Interventionsgruppen war sowohl für die absoluten T6-T0-Differenzen als auch für die T6-Mittelwerte der AT-Serumkonzentration ein jeweils höchst signifikanter Unterschied festzustellen. Für die AT-Differenzen zwischen T6 und T0 ließ sich zudem ein signifikanter Einfluss der Blutlipid-Veränderungen aufzeigen (Kovariate TC_T6-T0: $p<0,001$, TG_T6-T0: $p=0,001$); allerdings blieb das zwischen beiden Subgruppen ermittelte Signifikanzniveau hiervon unbeeinflusst ($p<0,001$; ANCOVA, vgl. Tab. 19).

Wurden die in der Verumgruppe ebenfalls höchst signifikanten Anstiege der **lipid-korrigierten Serumkonzentrationen** in Hinblick auf das relative Ausmaß beurteilt, so erwies sich der unter Nährstoffsupplementierung erzielte Effekt als vergleichsweise stärker ausgeprägt: Die hier durchschnittlich zu beobachtenden Erhöhungen der Quotienten **AT/TC** (Δ : $2,56 \pm 1,35 \mu\text{mol/mmol}$) und **AT/TC+TG** (Δ : $2,00 \pm 1,10 \mu\text{mol/mmol}$) betragen 42,7% bzw. 44,2%. Die unter Placebogabe ermittelten T6-T0-Differenzen, die sich in der Testung gegen Verum in beiden Fällen höchst signifikant unterschieden (vgl. Tab. 19), wiesen analog zur Auswertung der unkorrigierten AT-Serumspiegel auf keine wesentlichen Statusveränderungen hin (Δ AT/TC: 3,4%, $p=0,288$; Δ AT/TC+TG: 2,0%, $p=0,493$). Ebenso ließen sich zum Zeitpunkt T6 höchst signifikante Unterschiede zwischen der Verum- und Placebogruppe nachweisen.

Tab. 19: α -Tocopherol-Serumspiegel (ohne/mit Lipidkorrektur) zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)

	Gesamtkollektiv (n=123)	Verum (n=66)	Placebo (n=57)	p^a
AT_T0 [μ mol/l]	35,9 \pm 11,0	35,8 \pm 10,7	36,1 \pm 11,3	0,915
AT_T6 [μ mol/l]	43,3 \pm 12,0	48,8 \pm 11,9	36,9 \pm 8,60	<0,001
p^b	<0,001	<0,001	0,523	
AT_T6-T0 [μ mol/l]	7,31 \pm 11,1	12,9 \pm 8,99	0,82 \pm 9,62	<0,001
ANCOVA*: p<0,001				
AT/TC_T0 [μ mol/mmol]	5,99 \pm 1,42	6,00 \pm 1,37	5,97 \pm 1,49	0,903
AT/TC_T6 [μ mol/mmol]	7,45 \pm 1,81	8,56 \pm 1,51	6,17 \pm 1,16	<0,001
p^b	<0,001	<0,001	0,288	
AT/TC_T6-T0 [μ mol/mmol]	1,46 \pm 1,81	2,56 \pm 1,35	0,20 \pm 1,41	<0,001
AT/TC+TG_T0 [μ mol/mmol]	4,48 \pm 1,02	4,52 \pm 0,94	4,44 \pm 1,10	0,656
AT/TC+TG_T6 [μ mol/mmol]	5,60 \pm 1,33	6,52 \pm 1,07	4,53 \pm 0,59	<0,001
p^b	<0,001	<0,001	0,493	
AT/TC+TG_T6-T0 [μ mol/mmol]	1,12 \pm 1,42	2,00 \pm 1,10	0,09 \pm 1,01	<0,001

^a t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

* Kovariate: TC_T6-T0 ($p<0,001$), TG_T6-T0 ($p=0,001$), Faktor: Interventionsgruppe

Korrelation zwischen den Veränderungen der α -Tocopherol-Serumspiegel während der Intervention (T6-T0) und dem α -Tocopherolstatus zu T0

Hinsichtlich der durch die Intervention mit Verum erzielten, höchst signifikanten Zunahme der α -Tocopherol-Serumwerte, ließ sich für alle erhobenen Variablen eine signifikant negative Assoziation zwischen den im Studienverlauf ermittelten Veränderungen und den T0-Werten aufzeigen. Wie Abb. 18 verdeutlicht, profitierten Probanden mit initial niedrigeren Serumspiegeln in größerem Ausmaß von der Supplementierung als Personen mit höheren Basalwerten. Der in diesem Kontext stärkste negative Zusammenhang ($r=-0,454$, $p<0,001$) wurde für den Quotienten AT/TC+TG mit der im Mittel stärksten relativen Erhöhung gegenüber dem Ausgangswert (44,2%, vgl. S. 94) berechnet.

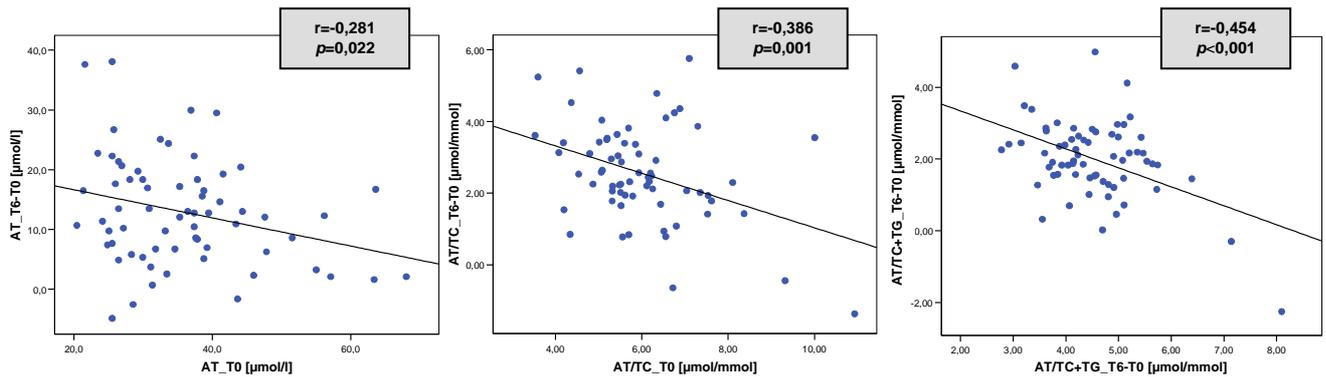


Abb. 18: Korrelation zwischen den absoluten AT-, AT/TC- bzw. AT/TC+TG-Differenzen (T6-T0) und den jeweiligen Plasmaspiegeln zu T0 in der Verumgruppe des Gesamtkollektivs

4.2.3.4 Korrelationen und Interaktionen

Korrelationen zwischen oxLDL und Antioxidanzienparametern zu T0

Die vor Interventionsbeginn in der Teilstichprobe mit ($n=102$) und ohne hypolipidämischer Medikation ($n=73$) ermittelten oxLDL-Serumspiegel korrelierten weder mit der antioxidativen Plasmakapazität noch mit den lipidstandardisierten α -Tocopherol-Serumwerten (AT/TC, AT/TC+TG) signifikant. Ein erwartungsgemäß positiver Zusammenhang bestand zwischen oxLDL und der unbereinigten AT-Serumkonzentration ($n=102$: $r=0,515$, $n=73$: $r=0,517$, jeweils $p < 0,001$). Bei partieller Korrelation mit der zu T0 erhobenen TC- und TG-Serumkonzentration war dieser allerdings nicht mehr gegeben (vgl. Tab. A12, Anhang B).

Wie Tab. A12 ferner zeigt, konnten im Gesamtkollektiv keine signifikanten Assoziationen zwischen der TEAC und den jeweiligen Variablen des α -Tocopherolstatus festgestellt werden.

Korrelation zwischen den Veränderungen der oxLDL-Serumspiegel während der Intervention (T6-T0) und den Veränderungen des Antioxidanzienstatus (T6-T0)

Um zu überprüfen, inwieweit die beobachtete, signifikante Reduktion der mittleren oxLDL-Serumkonzentration mit den durch die Nährstoffgabe erzielten Veränderungen des Antioxidanzienstatus einherging, wurden die in der Verumgruppe der Teilstichprobe ($n=40$) ermittelten absoluten T6-T0-Differenzen der jeweiligen Parameter miteinander korreliert (vgl. Tab. A13, Anhang B). Dabei ergab sich weder zu den T6-T0-Differenzen der TEAC eine entsprechende Assoziation noch bestand ein Zusammenhang zwischen den oxLDL-Differenzen und den Veränderungen der α -Tocopherol-Serumkonzentrationen (ohne/mit Lipidkorrektur).

Für die Verumgruppe der Gesamtstichprobe ($n=66$) waren zudem keine signifikanten Korrelationen zwischen den T6-T0-Differenzen der TEAC und den Variablen des α -Tocopherolstatus nachzuweisen (vgl. Tab. A13). Dies deutet darauf hin, dass die in der Verumgruppe feststellbare Erhöhung der antioxidativen Plasmakapazität offensichtlich nicht mit der durch das Verumsupplement induzierten Zunahme der α -Tocopherol-Serumwerte assoziiert war.

4.2.3.5 Zusammenfassung

Im Studienverlauf ließ sich eine höchst signifikante Abnahme der mittleren **oxLDL-Serumwerte** innerhalb des Gesamtkollektivs verzeichnen, die sich als unabhängig vom Interventionsregime erwies. Das hierbei in der Verum- und Placebogruppe erzielte Ausmaß (Δ Verum: $-7,3 \pm 12$ U/l bzw. $-10,6\%$; Δ Placebo: $-9,2 \pm 11$ U/l bzw. $-12,6\%$) unterschied sich nicht signifikant ($p=0,510$) und war in beiden Subgruppen mit der Höhe der oxLDL-Ausgangskonzentrationen assoziiert. Wurden die mittleren oxLDL-Serumwerte der Gesamtgruppe betrachtet, so lagen diese sowohl vor (71 ± 16 U/l) als auch nach der Intervention (62 ± 15 U/l) in einem mit gesunden Kollektiven vergleichbaren Bereich, wenngleich $50,7\%$ (T0) bzw. $28,8\%$ (T6) der Probanden höhere oxLDL-Serumspiegel (>70 U/l) aufwiesen.

Ein von der Supplementierung abhängiger Effekt deutete sich demgegenüber für die **antioxidative Plasmakapazität** an, die sich in der Verlaufsbeobachtung lediglich unter Verumgabe signifikant erhöhte (Δ : $39,32 \pm 136,5$ $\mu\text{mol/l}$, $p=0,022$). Unter klinischen Gesichtspunkten konnte die Relevanz dieses Effekts mit einer relativen Steigerung der TEAC um $1,7\%$ jedoch als gering eingestuft werden, zumal kein signifikanter Unterschied zu den T6-T0-Differenzen der Placebogruppe (Δ : $8,98 \pm 97,2$ $\mu\text{mol/l}$) vorlag. Auch stand das Ausmaß der Zunahme nicht im Zusammenhang mit dem initialen TEAC-Status der Verumgruppe.

Die deutlichsten Supplementierungseffekte ließen sich für **α -Tocopherol** und die zur Lipidkorrektur berechneten Quotienten ermitteln. So führte die Verumintervention zu jeweils höchst signifikanten Anstiegen der mittleren Serumspiegel, wobei die stärksten relativen Erhöhungen für die lipidstandardisierten Serumwerte (Δ AT/TC: $42,7\%$, Δ AT/TC+TG: $44,3\%$) beobachtet wurden. Von klinischer Bedeutung in diesem Zusammenhang war, dass die im Vergleich zur Placebogabe erzielte, signifikante Statusverbesserung sich auch in einer qualitativen Veränderung der Versorgungslage widerspiegelte: Trotz einer initial vergleichbaren und insgesamt als gut zu bewertenden Versorgungslage beider Subgruppen ließ sich zum Zeitpunkt T6 zeigen, dass Probanden der Verumgruppe signifikant häufiger die in Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen als protektiv angesehenen AT- und AT/TC-Serumkonzentrationen erreichten (vgl. hierzu die Ausführungen unter Anhang E). Des Weiteren

konnte für alle drei erhobenen Variablen demonstriert werden, dass Probanden mit initial schlechter Versorgungslage in größerem Ausmaß von der Verumeinnahme profitierten als diejenigen mit höheren Ausgangswerten.

In der **Interkorrelationsanalyse** ließen sich weder zwischen oxLDL und den Antioxidanzienparametern noch zwischen der TEAC und den α -Tocopherol-Serumspiegeln signifikante Assoziationen in Bezug auf die im Gesamtkollektiv gemessenen Ausgangswerte bzw. die unter Verumgabe ermittelten T6-T0-Differenzen feststellen.

4.2.4 ASYMMETRISCHES DIMETHYLARGININ (ADMA)

Im Folgenden werden die Ergebnisse zum Einfluss der Nährstoffsupplementierung auf die ADMA-Plasmakonzentration als Hauptzielparameter der vorliegenden Arbeit (vgl. Kap. 3, „Arbeitshypothese und Fragestellung“) vorgestellt⁵⁹. Diese schließen sowohl eine Betrachtung der im Gesamtkollektiv unter Verum- bzw. Placebogabe zu beobachtenden Veränderungen als auch eine Überprüfung von Interventionseffekten in ausgewählten Subkollektiven mit ein. Des Weiteren werden die im Rahmen der Korrelationsanalyse ermittelten Interaktionen zwischen ADMA (T0-Status, T6-T0-Differenzen) und den für die zentrale Fragestellung relevanten sowie weiteren Parametern beschrieben.

4.2.4.1 Gesamtkollektiv-Analyse

ADMA-Plasmaspiegel vor und nach der Intervention

Die zu Studienbeginn im Gesamtkollektiv ($n=123$) gemessene ADMA-Plasmakonzentration betrug im Mittel $0,38 \pm 0,06 \mu\text{mol/l}$ (Min-Max: $0,25\text{-}0,54 \mu\text{mol/l}$) und lag damit innerhalb des in der Literatur für gesunde Personen angegebenen Konzentrationsbereichs von durchschnittlich $0,3\text{-}0,5 \mu\text{mol/l}$ [MARTENS-LOBENHOFER U. BODE-BÖGER 2006] bzw. geringfügig unterhalb des für Analyseverfahren mit MS-Detektion angegebenen „Normalwerts“ von $0,4 \mu\text{mol/l}$ [MARTENS-LOBENHOFER U. BODE-BÖGER 2007] (vgl. Kap. 2.2.2.3). Hinsichtlich der Verteilung der basalen ADMA-Plasmaspiegel des Studienkollektivs zeigte sich sowohl graphisch (vgl. Abb A11, Anhang A) als auch rechnerisch ($p=0,865$; KS-Test) eine Normalverteilung der Daten an. Wurden die zur Basisuntersuchung T0 in der Verum- und Placebogruppe erhobenen ADMA-Plasmakonzentrationen betrachtet, so konnte mit im Mittel übereinstimmenden Ausgangswerten von vergleichbaren Bedingungen hinsichtlich des initialen ADMA-Status ausgegangen werden ($p=0,625$, vgl. Tab. 20).

Zum Zeitpunkt T6 lag der durchschnittliche ADMA-Plasmaspiegel des Gesamtkollektivs bei $0,39 \pm 0,06 \mu\text{mol/l}$ (Min-Max: $0,25\text{-}0,56 \mu\text{mol/l}$) und damit auf nahezu unverändertem Niveau. Gleiches traf auf die Subgruppen Verum und Placebo zu, die im Mittel keine (Δ Verum: $0,00 \pm 0,07 \mu\text{mol/l}$) bzw. minimale, nicht signifikante Veränderungen (Δ Placebo: $0,01 \pm 0,06 \mu\text{mol/l}$) der Plasmawerte im Studienverlauf verzeichneten. In der Folge unterschieden sich weder die T6-T0-Differenzen ($p=0,495$) noch die T6-Mittelwerte der beiden Interventionsgruppen signifikant voneinander ($p=0,784$, vgl. Tab. 20).

⁵⁹ Die im Interventionsverlauf ermittelten Veränderungen der SDMA-Plasmawerte werden unter Kap. 4.2.5, „Begleit- und Basisparameter“, abgehandelt.

Tab. 20: ADMA-Plasmaspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)

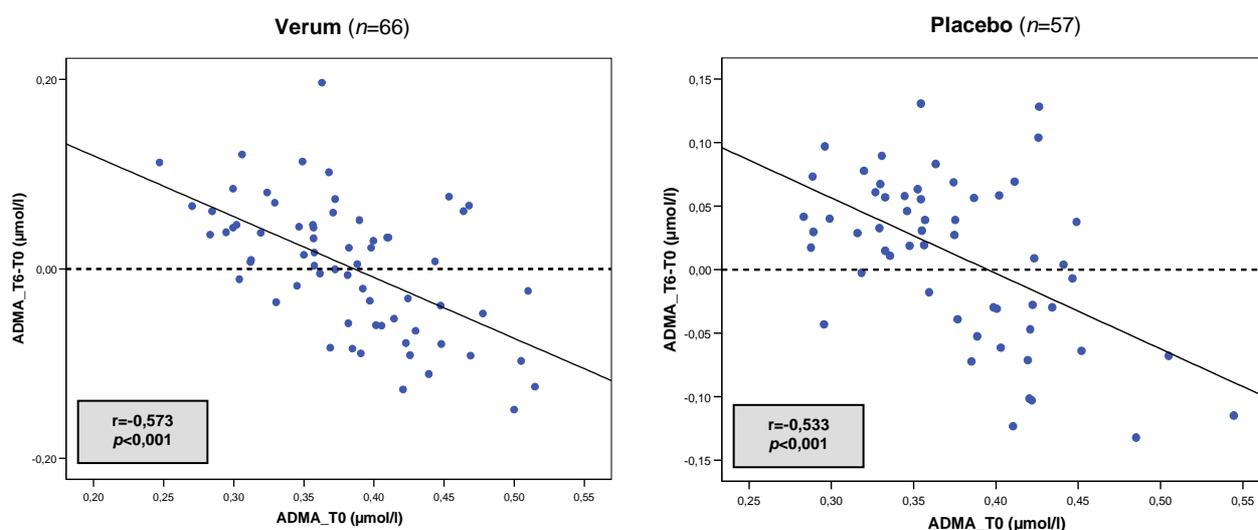
	Gesamtkollektiv (n=123)	Verum (n=66)	Placebo (n=57)	p^a
ADMA_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	0,38 \pm 0,06	0,38 \pm 0,06	0,38 \pm 0,06	0,625
ADMA_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	0,39 \pm 0,06	0,38 \pm 0,06	0,39 \pm 0,06	0,784
p^b	0,254	0,721	0,185	
ADMA_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	0,01 \pm 0,07	0,00 \pm 0,07	0,01 \pm 0,06	0,495

^a t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

Korrelation zwischen den Veränderungen der ADMA-Plasmaspiegel während der Intervention (T6-T0) und dem ADMA-Status zu T0

Wenngleich sich im Mittel keine erkennbaren Veränderungen der ADMA-Plasmaspiegel im Studienverlauf ergaben, sollte mit Hilfe der bivariaten Korrelationsrechnung überprüft werden, ob bzw. inwieweit mögliche Assoziationen zwischen den T0-Werten und den ADMA-Differenzen (T6-T0) der Verum- und Placebogruppe vorlagen. Wie Abb. 19 verdeutlicht, ließ sich dabei eine jeweils höchst signifikante, negative Korrelation mittlerer Stärke (Verum: $r=-0,573$, Placebo: $r=-0,533$) feststellen, wobei – wie in der Subkollektiv-Analyse „Höhe der ADMA-Plasmaspiegel“ noch weiter zu erörtern ist (vgl. S. 101f) – gegenläufige Veränderungen der Plasmawerte je nach Höhe des initialen ADMA-Status (d. h. ADMA-Anstieg bei niedrigen Basalwerten und umgekehrt) ersichtlich wurden. Die hierzu aus den Regressionsgeraden für die Vorzeichenumkehr der T6-T0-Differenzen ermittelten Schwellenwerte betrugen 0,39 $\mu\text{mol/l}$ in der Verumgruppe ($y=-0,642x+0,248$) und 0,40 $\mu\text{mol/l}$ in der Placebogruppe ($y=-0,594x+0,237$).

**Abb. 19:** Korrelation zwischen den absoluten ADMA-Differenzen (T6-T0) und den ADMA-Plasmaspiegeln zu T0 in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs

4.2.4.2 Subkollektiv-Analyse

Da sich die mittleren ADMA-Plasmawerte im Gesamtkollektiv weder innerhalb noch zwischen den beiden Interventionsgruppen Verum und Placebo wesentlich veränderten, sollte nun überprüft werden, inwieweit sich dieser Befund in verschiedenen Subkollektiven bestätigen ließ bzw. sich die Nährstoffgabe unterschiedlich auf die ADMA-Plasmawerte ausgewählter Subkollektive auswirkte. Neben der Höhe des ADMA-Ausgangstatus fanden dabei die für die ADMA-Akkumulation wesentlichen und durch die Supplementierung zu beeinflussenden Determinanten Homocystein und oxLDL sowie Marker bzw. Kriterien des (anti-)oxidativen Status (TEAC, Rauchverhalten) Berücksichtigung.

ADMA-Plasmaspiegel vor und nach der Intervention: Subkollektiv „Höhe der ADMA-Plasmaspiegel“

Um potenzielle Effekte der Intervention in Abhängigkeit vom initialen ADMA-Status und damit ergänzend zu der unter Kap. 4.2.4.1 dargestellten Korrelationsanalyse untersuchen zu können, wurde für die Bildung entsprechender Subkollektive die im Gesamtkollektiv zum Zeitpunkt T0 ermittelte höchste (Q4: ADMA $\geq 0,43 \mu\text{mol/l}$) und niedrigste (Q1: ADMA $\leq 0,33 \mu\text{mol/l}$) ADMA-Quartil-Kategorie herangezogen. Die separat nach Verum- und Placebogruppe ausgewerteten Daten zeigt Tab. 21.

Wie zu erwarten, unterschieden sich die zu T0 und T6 erhobenen ADMA-Plasmawerte im Vergleich der **Subkollektive ADMA_T0 $\leq 0,33 \mu\text{mol/l}$** ($n=32$) und **ADMA_T0 $\geq 0,43 \mu\text{mol/l}$** ($n=30$) zu beiden Messzeitpunkten signifikant (jeweils $p < 0,001$; t-Test für unabhängige Stichproben). Wurden daraufhin die Veränderungen in beiden Subkollektiven für sich genommen betrachtet, so ließen sich deutlich gegenläufige Entwicklungen in Abhängigkeit vom initialen ADMA-Status erkennen: Während der ADMA-Plasmaspiegel bei Probanden des **Subkollektivs ADMA_T0 $\leq 0,33 \mu\text{mol/l}$** im Mittel höchst signifikant anstieg ($\Delta: 0,05 \pm 0,04 \mu\text{mol/l}$, $p < 0,001$), verzeichneten Probanden des **Subkollektivs ADMA_T0 $\geq 0,43 \mu\text{mol/l}$** einen signifikanten Rückgang der mittleren ADMA-Plasmawerte ($\Delta: -0,04 \pm 0,07 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,011$).

Die ADMA-Ausgangswerte der Verum- und Placebogruppe des **Subkollektivs ADMA_T0 $\leq 0,33 \mu\text{mol/l}$** zeigten im Mittel lediglich minimale und damit statistisch nicht signifikante Abweichungen ($p = 0,184$). Wie in der zuvor für das Subkollektiv beschriebenen Verlaufsbeobachtung stiegen die ADMA-Plasmaspiegel beider Subgruppen auf jeweils höchst signifikantem Niveau mit annähernd vergleichbarer Ausprägung an (Δ Verum: $0,05 \pm 0,04 \mu\text{mol/l}$, Δ Placebo: $0,04 \pm 0,04 \mu\text{mol/l}$). Demzufolge unterschieden sich weder die T6-T0-Differenzen ($p = 0,698$) noch die T6-Mittelwerte ($p = 0,765$) der Verum- und Placebogruppe statistisch signifikant.

Die für das **Subkollektiv ADMA_T0 $\geq 0,43 \mu\text{mol/l}$** im Zeitverlauf gezeigte signifikante ADMA-Senkung basierte indessen auf einer unterschiedlich starken Abnahme der Plasmaspiegel in beiden Untersuchungsgruppen. Danach ließ sich, ausgehend von einer vergleichbaren Ausgangssituation ($p=0,466$), lediglich unter Supplementierung mit Verum eine signifikante Reduktion der mittleren ADMA-Plasmawerte feststellen ($\Delta: -0,05 \pm 0,07 \mu\text{mol/l}$). Die Einnahme des Placebopräparates war demgegenüber von einem vergleichsweise leichten, nicht signifikanten Rückgang der Plasmaspiegel begleitet ($\Delta: -0,02 \pm 0,08 \mu\text{mol/l}$). Allerdings unterschied sich das Ausmaß der ADMA-Senkung zwischen der Verum- und Placebogruppe ebenso wenig signifikant ($p=0,311$) wie der zur Abschlussuntersuchung T6 erhobene ADMA-Status ($p=0,465$).

Betrachtet man abschließend die im Zusammenhang mit den Subkollektiven erörterten, gegenläufigen Veränderungen der ADMA-Plasmawerte (s. o.) jeweils separat für die **Verum-** und **Placebogruppen**, so sich erwiesen die hierbei gezeigten absoluten Differenzen in beiden Fällen als signifikant unterschiedlich (Verum vs. Verum: $p<0,001$, Placebo vs. Placebo: $p=0,017$; jeweils t-Test für unabhängige Stichproben). Wie bereits im Rahmen der bivariaten Korrelationsanalyse gezeigt (vgl. Kap. 4.2.4.1), schien das zu beobachtende Phänomen der Senkung des mittleren ADMA-Plasmaspiegels bei hohen bzw. des Anstiegs bei niedrigen Ausgangswerten damit unabhängig vom jeweiligen Interventionsregime aufzutreten.

Tab. 21: ADMA-Plasmaspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Subkollektivs „Höhe der ADMA-Plasmaspiegel“ (Mittelwert \pm SD)

	Subkollektiv	Verum	Placebo	p^a
ADMA_T0 $\leq 0,33 \mu\text{mol/l}$	($n=32$)	($n=16$)	($n=16$)	
ADMA_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	0,31 \pm 0,02	0,30 \pm 0,02	0,31 \pm 0,02	0,184
ADMA_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	0,35 \pm 0,04	0,35 \pm 0,04	0,35 \pm 0,04	0,765
p^b	<0,001	<0,001	<0,001	
ADMA_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	0,05 \pm 0,04	0,05 \pm 0,04	0,04 \pm 0,04	0,698
ADMA_T0 $\geq 0,43 \mu\text{mol/l}$	($n=30$)	($n=17$)	($n=13$)	
ADMA_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	0,46 \pm 0,03	0,46 \pm 0,03	0,45 \pm 0,04	0,466
ADMA_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	0,42 \pm 0,07	0,41 \pm 0,07	0,43 \pm 0,07	0,465
p^b	0,011	0,010	0,374	
ADMA_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	-0,04 \pm 0,07	-0,05 \pm 0,07	-0,02 \pm 0,08	0,311

^a t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

ADMA-Plasmaspiegel vor und nach der Intervention: Subkollektiv „Moderate Hyperhomocysteinämie“

Zur Untersuchung potenzieller Effekte der Supplementierung auf den ADMA-Status bei Probanden mit moderater Hyperhomocysteinämie wurde im Rahmen der nachfolgenden Subkollektiv-Analyse der für Risikopersonen definierte Grenzwert von tHcy ≥ 10 $\mu\text{mol/l}$ angesetzt⁶⁰. Die für das Gesamtkollektiv erhobenen Daten zur Hyperhomocysteinämie-Prävalenz sowie die Untersuchung des Einflusses der Intervention hierauf und die tHcy-Plasmakonzentration sind in Kap. 4.2.2 dargestellt.

Wurde zunächst die Höhe der durchschnittlichen ADMA-Plasmaspiegel zwischen Probanden ohne ($n=68$) und mit ($n=55$) Hyperhomocysteinämie verglichen (**Subkollektiv tHcy_T0 <10 $\mu\text{mol/l}$ vs. tHcy_T0 ≥ 10 $\mu\text{mol/l}$** , vgl. Tab. 22), so erwies sich diese weder zu T0 ($p=0,962$) noch zum Zeitpunkt T6 ($p=0,915$; jeweils T-Test für unabhängige Stichproben) als signifikant verschieden.

Zu Beginn der Intervention ließen sich für die Subgruppen Verum und Placebo des **Subkollektivs tHcy_T0 <10 $\mu\text{mol/l}$** im Mittel identische ADMA-Plasmakonzentrationen nachweisen ($p=0,867$). Während die mittleren ADMA-Werte der Placebogruppe im weiteren Verlauf konstant blieben, kam es unter Verumgabe zu einer geringfügigen, nicht signifikanten Erhöhung des Plasmaspiegels ($\Delta: 0,01 \pm 0,07$ $\mu\text{mol/l}$). Dementsprechend konnte weder für die absoluten T6-T0-Differenzen ($p=0,552$) noch für die final gemessenen ADMA-Mittelwerte ($p=0,389$) ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Interventionsgruppen festgestellt werden.

Ebenfalls vergleichbare Ausgangsbedingungen konnten für die Verum- und Placebogruppe des **Subkollektivs tHcy_T0 ≥ 10 $\mu\text{mol/l}$** festgestellt werden ($p=0,548$). Anders als in der zuvor gezeigten Analyse blieben die ADMA-Plasmaspiegel der Verumgruppe im Mittel unverändert, wohingegen die Placebogruppe eine statistisch signifikante Zunahme der mittleren Plasmawerte während der Intervention verzeichnete ($\Delta: 0,02 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/l}$, $p=0,038$). Allerdings unterschied sich weder das unter Placebogabe ermittelte Ausmaß der ADMA-Erhöhung ($p=0,079$) noch die Höhe des T6-Plasmaspiegels ($p=0,167$) von den jeweiligen Mittelwerten der Verumgruppe.

⁶⁰ Dieser Wert wurde dem höher veranschlagten cut-off-Wert von tHcy >12 $\mu\text{mol/l}$ auch aus Gründen der statistischen Aussagekraft vorgezogen, da durch die vergleichsweise höhere Anzahl an Probanden mit tHcy-Plasmawerten ≥ 10 $\mu\text{mol/l}$ (vgl. Tab. 13, Kap. 4.2.2.1) eine homogenere Fallzahlverteilung der in der Subkollektiv-Analyse zu untersuchenden Gruppen erreicht wurde.

Beim Vergleich der absoluten Veränderungen der ADMA-Plasmakonzentrationen (T6-T0) zwischen den **Verumgruppen** beider Subkollektive (tHcy_T0 <10 µmol/l vs. ≥10 µmol/l) unterschieden sich diese mit einer mittleren Differenz von 0,01 µmol/l nur unwesentlich voneinander ($p=0,251$; t-Test für unabhängige Stichproben). Der diesbezüglich durchgeführte **Placebogruppen-Vergleich** erbrachte trotz des signifikant ausgeprägten Anstiegs der mittleren ADMA-Werte bei Probanden mit Hyperhomocysteinämie ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zu denjenigen ohne Hyperhomocysteinämie ($p=0,215$; t-Test für unabhängige Stichproben).

Tab. 22: ADMA-Plasmaspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Subkollektivs „Moderate Hyperhomocysteinämie“ (Mittelwert ± SD)

	Subkollektiv	Verum	Placebo	p^a
tHcy_T0 <10 µmol/l	(n=68)	(n=34)	(n=34)	
ADMA_T0 [µmol/l]	0,38 ± 0,07	0,38 ± 0,07	0,38 ± 0,07	0,867
ADMA_T6 [µmol/l]	0,39 ± 0,06	0,39 ± 0,06	0,38 ± 0,06	0,389
p^b	0,360	0,284	0,825	
ADMA_T6-T0 [µmol/l]	0,01 ± 0,07	0,01 ± 0,07	0,00 ± 0,07	0,552
tHcy_T0 ≥10 µmol/l	(n=55)	(n=32)	(n=23)	
ADMA_T0 [µmol/l]	0,38 ± 0,05	0,38 ± 0,06	0,37 ± 0,04	0,548
ADMA_T6 [µmol/l]	0,39 ± 0,06	0,38 ± 0,06	0,40 ± 0,06	0,167
p^b	0,500	0,574	0,038	
ADMA_T6-T0 [µmol/l]	0,01 ± 0,07	0,00 ± 0,07	0,02 ± 0,05	0,079

^a t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

ADMA-Plasmaspiegel vor und nach der Intervention: Subkollektiv „Höhe der tHcy-Plasmaspiegel“

Um einen möglichen Einfluss der Intervention auf die ADMA-Plasmakonzentration bei Probanden mit den initial höchsten gegenüber denjenigen mit den niedrigsten tHcy-Plasmaspiegeln ermitteln zu können, wurde zusätzlich eine Einteilung nach der zu T0 höchsten (Q4: tHcy ≥10,9 µmol/l) und niedrigsten (Q1: tHcy ≤8,30 µmol/l) tHcy-Quartil-Kategorie vorgenommen. Die detaillierten Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tab. A14, Anhang B, aufgeführt.

Wie bereits für das Subkollektiv „Moderate Hyperhomocysteinämie“ demonstriert, konnten weder zu Beginn ($p=0,396$) noch nach der Intervention ($p=0,581$; jeweils t-Test für unabhängige Stichproben) signifikante Unterschiede hinsichtlich der mittleren ADMA-Plasmaspiegel zwischen Probanden mit den initial niedrigsten (**Subkollektiv tHcy_T0 ≤8,30 µmol/l**, n=32) und höchsten tHcy-Plasmawerten (**Subkollektiv tHcy_T0 ≥10,9 µmol/l**, n=30)

gefunden werden.

Weitere Übereinstimmungen zur vorangegangenen Analyse ergaben sich in der nach Interventionsgruppen separat durchgeführten Auswertung, mit dem Unterschied, dass im **Subkollektiv tHcy_T0 $\leq 8,30 \mu\text{mol/l}$** unter Verumsupplementierung eine im Mittel stärkere, jedoch nicht signifikante Erhöhung der ADMA-Plasmakonzentration ($\Delta: 0,03 \pm 0,08 \mu\text{mol/l}$) beobachtet wurde. Des Weiteren war für die Placebogruppe des Subkollektivs **tHcy_T0 $\geq 10,9 \mu\text{mol/l}$** ein zum vorab gewählten Einstufungskriterium tHcy_T0 $\geq 10 \mu\text{mol/l}$ gleichermaßen ausgeprägter Anstieg der mittleren Plasmakonzentrationen feststellbar ($\Delta: 0,02 \pm 0,05 \mu\text{mol/l}$). Allerdings erreichte dieser aufgrund der vergleichsweise geringeren Fallzahlen hier kein statistisch signifikantes Niveau ($p=0,214$).

Auch ließ sich bei Betrachtung der ADMA-Differenzen (T6-T0) weder für den **Verum-** noch für den **Placebogruppen-Vergleich** ein Signifikanzunterschied zwischen beiden Subkollektiven ermitteln (Verum vs. Verum: $p=0,326$, Placebo vs. Placebo: $p=0,361$; jeweils t-Test für unabhängige Stichproben).

ADMA-Plasmaspiegel vor und nach der Intervention: Subkollektiv „Höhe der oxLDL-Serumspiegel“

Für die Bildung von Subkollektiven nach der Höhe des initialen oxLDL-Status wurde, analog zu der für ADMA und Homocystein angewandten Verfahrensweise (vgl. Subkollektiv „Höhe der ADMA- bzw. tHcy-Plasmaspiegel“, S. 101f und 104f), die Zugehörigkeit zum höchsten (Q4: oxLDL $\geq 83 \text{ U/l}$) bzw. niedrigsten (Q1: oxLDL $\leq 60 \text{ U/l}$) T0-Quartil als Einstufungskriterium gewählt. Da die oxLDL-Bestimmung an einer kleineren Gesamtstichprobe erfolgte und Probanden mit hypolipidämischer Medikation von den Auswertungen ausgenommen wurden, sei darauf hingewiesen, dass die nachfolgenden Ergebnisse aufgrund der niedrigen Fallzahlen der zu untersuchenden Gruppen statistisch nur bedingt aussagekräftig sind. Die für die Studiengruppe ($n=73$)⁶¹ ermittelten Veränderungen der oxLDL-Serumwerte im Interventionsverlauf werden gesondert unter Kap. 4.2.3.1 abgehandelt.

Wie Tab. 23 zu entnehmen ist, ließ sich für Probanden des **Subkollektivs oxLDL_T0 $\geq 83 \text{ U/l}$** ($n=15$) ein geringfügig höheres Niveau der mittleren ADMA-Plasmakonzentration aufzeigen. Statistische Unterschiede zum **Subkollektiv oxLDL_T0 $\leq 60 \text{ U/l}$** ($n=20$) waren allerdings weder zu T0 ($p=0,240$) noch zu T6 ($p=0,334$; t-Test für unabhängige Stichproben) nachweisbar.

⁶¹ Diese Fallzahl entspricht der im Gesamtkollektiv untersuchten Teilstichprobe ($n=102$) abzüglich der Probanden mit hypolipidämischer Medikation (vgl. Fußnote 45).

Im **Subkollektiv oxLDL_T0 ≤60 U/l** lagen die basalen ADMA-Mittelwerte der Verumgruppe geringfügig, jedoch nicht signifikant höher als in der Placebogruppe ($p=0,592$). Während die ADMA-Plasmaspiegel unter Verumgabe im Mittel leicht anstiegen ($\Delta: 0,02 \pm 0,07 \mu\text{mol/l}$), fielen die Werte der Placebogruppe im Zeitverlauf geringfügig ab ($\Delta: -0,01 \pm 0,08 \mu\text{mol/l}$). Die hierbei gegenüber T0 zu beobachtenden Veränderungen erreichten in beiden Fällen keine statistisch signifikante Ausprägung. Gleiches traf auf den Vergleich der T6-T0-Differenzen ($p=0,368$) sowie der T6-Mittelwerte ($p=0,089$) zwischen der Verum- und Placebogruppe zu.

Anders als im vorgenannten Subkollektiv nahmen die ADMA-Plasmakonzentrationen bei Probanden des höchsten oxLDL-Quartils (**Subkollektiv oxLDL_T0 ≥83 U/l**) innerhalb beider Subgruppen um durchschnittlich $0,01 \mu\text{mol/l}$ und damit minimal zu. Wie auch anhand der p -Werte zu erkennen ist (vgl. Tab. 23, t-Test für unabhängige Stichproben), lagen sowohl zu T0 und T6 als auch für die Veränderungen der ADMA-Werte im Zeitverlauf (T6-T0-Differenzen) im Mittel identische Bedingungen in der Verum- und Placebogruppe vor.

Im **Subgruppen-Vergleich** (Verum vs. Verum bzw. Placebo vs. Placebo) zwischen beiden Subkollektiven (oxLDL_T0 ≤60 U/l vs. ≥83 U/l) wurden ebenfalls keine, die T6-T0-Differenzen der ADMA-Plasmakonzentration betreffenden Signifikanzunterschiede gefunden ($p=0,729$ bzw. $p=0,492$; jeweils t-Test für unabhängige Stichproben).

Tab. 23: ADMA-Plasmaspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Subkollektivs „Höhe der oxLDL-Serumspiegel“ (Mittelwert \pm SD)

	Subkollektiv	Verum	Placebo	p^a
oxLDL_T0 ≤60 U/l	($n=20$)	($n=15$)	($n=5$)	
ADMA_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,37 \pm 0,05$	$0,37 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,08$	0,592
ADMA_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,38 \pm 0,07$	$0,40 \pm 0,06$	$0,34 \pm 0,06$	0,089
p^b	0,389	0,227	0,761	
ADMA_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,02 \pm 0,08$	$0,02 \pm 0,07$	$-0,01 \pm 0,08$	0,368
oxLDL_T0 ≥83 U/l	($n=15$)	($n=8$)	($n=7$)	
ADMA_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,39 \pm 0,06$	$0,39 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,06$	0,918
ADMA_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,40 \pm 0,06$	$0,40 \pm 0,08$	$0,40 \pm 0,05$	0,970
p^b	0,335	0,566	0,456	
ADMA_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,01 \pm 0,06$	$0,01 \pm 0,06$	$0,01 \pm 0,05$	0,941

^a t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

ADMA-Plasmaspiegel vor und nach der Intervention: Subkollektiv „Höhe der antioxidativen Kapazität“

Zur Untersuchung von möglichen Effekten der Intervention auf die ADMA-Plasmakonzentration in Abhängigkeit vom antioxidativen Status wurde das im Gesamtkollektiv ermittelte niedrigste und höchste Quartil der zu T0 erhobenen TEAC-Werte (Q1: TEAC \leq 2213 $\mu\text{mol/l}$ bzw. Q4: TEAC \geq 2363 $\mu\text{mol/l}$) herangezogen. Die mittels TEAC-Test als funktionellem Marker im Gesamtkollektiv ermittelte antioxidative Plasmakapazität und die diesbezüglich in der Interventionsphase zu beobachtenden Veränderungen werden unter Kap. 4.2.3.2 erörtert.

Beim Vergleich der zu T0 und T6 gemessenen ADMA-Plasmakonzentrationen beider Subkollektive (**TEAC_T0 \leq 2213 $\mu\text{mol/l}$ vs. TEAC_T0 \geq 2363 $\mu\text{mol/l}$) wiesen Probanden mit initial niedrigem Antioxidanzienstatus ($n=32$) im Mittel geringfügig höhere ADMA-Werte auf (vgl. Tab. 24). Ein signifikanter Unterschied zu Personen mit hoher antioxidativer Plasmakapazität ($n=30$) war jedoch zu keinem der beiden Untersuchungszeitpunkte (T0: $p=0,464$, T6: $p=0,355$; jeweils t-Test für unabhängige Stichproben) feststellbar.**

In den Interventionsgruppen des **Subkollektivs TEAC_T0 \leq 2213 $\mu\text{mol/l}$** ließ sich ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der mittleren ADMA-Plasmaspiegel verzeichnen, der unter Placebogabe minimal stärker (Δ : $0,02 \pm 0,06 \mu\text{mol/l}$) als unter Verumeinnahme (Δ : $0,01 \pm 0,07 \mu\text{mol/l}$) ausfiel. Insgesamt erwiesen sich weder die Veränderungen im Zeitverlauf ($p=0,631$), noch die T0- ($p=0,660$) und T6-Mittelwerte ($p=0,913$) zwischen der Verum- und Placebogruppe als signifikant verschieden.

Im **Subkollektiv TEAC_T0 \geq 2363 $\mu\text{mol/l}$** lagen die durchschnittlichen Ausgangswerte der Verumgruppe höher als in der Placebogruppe. Ein statistisch signifikanter Unterschied war diesbezüglich jedoch nicht gegeben ($p=0,401$). Im weiteren Verlauf sanken die ADMA-Plasmaspiegel der Verumgruppe geringfügig ab (Δ : $-0,01 \pm 0,08 \mu\text{mol/l}$), während in der Placebogruppe eine Zunahme der mittleren Plasmakonzentration (Δ : $0,03 \pm 0,07 \mu\text{mol/l}$) zu beobachten war. Dabei erreichten weder die Veränderungen innerhalb (vgl. Tab. 24, t-Test für abhängige Stichproben) noch zwischen den Interventionsgruppen ($p=0,276$) ein statistisch signifikantes Niveau. Ebenso wurden zum Zeitpunkt T6 keine signifikanten Unterschiede zwischen Verum und Placebo gefunden ($p=0,640$).

Trotz der gegenläufigen Veränderungen der ADMA-Plasmaspiegel (T6-T0-Differenzen) in den **Verumgruppen** beider Subkollektive (TEAC_T0 \leq 2213 $\mu\text{mol/l}$ vs. TEAC_T0 \geq 2363 $\mu\text{mol/l}$) unterschieden sich diese nicht signifikant voneinander ($p=0,681$). Auch lagen für den diesbezüglich durchgeführten **Placebogruppen-Vergleich** keine signifikanten Unterschiede vor ($p=0,702$; jeweils t-Test für unabhängige Stichproben).

Tab. 24: ADMA-Plasmaspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Subkollektivs „Höhe der antioxidativen Kapazität“ (Mittelwert \pm SD)

	Subkollektiv	Verum	Placebo	p^a
TEAC_T0 ≤ 2213 $\mu\text{mol/l}$	($n=32$)	($n=16$)	($n=16$)	
ADMA_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,39 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,06$	$0,38 \pm 0,04$	0,660
ADMA_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,40 \pm 0,06$	$0,40 \pm 0,07$	$0,40 \pm 0,05$	0,913
p^b	0,348	0,759	0,314	
ADMA_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,01 \pm 0,06$	$0,01 \pm 0,07$	$0,02 \pm 0,06$	0,631
TEAC_T0 ≥ 2363 $\mu\text{mol/l}$	($n=30$)	($n=19$)	($n=11$)	
ADMA_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,38 \pm 0,06$	$0,39 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,05$	0,401
ADMA_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,38 \pm 0,06$	$0,38 \pm 0,06$	$0,39 \pm 0,06$	0,640
p^b	0,643	0,781	0,220	
ADMA_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,01 \pm 0,067$	$-0,01 \pm 0,08$	$0,03 \pm 0,07$	0,276

^a t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

ADMA-Plasmaspiegel vor und nach der Intervention: Subkollektiv „(Nicht-)Raucher“

Wurde zunächst der allgemeine ADMA-Status in Abhängigkeit vom Rauchverhalten gemäß der unter Kap. 4.2.1.4 beschriebenen Charakterisierung untersucht, so wiesen **Nicht-raucher**⁶² zu beiden Messzeitpunkten im Mittel höhere ADMA-Plasmakonzentrationen als aktive **Raucher** auf (vgl. Tab. 25). Statistisch ließ sich dieser Unterschied hingegen weder zur Basisuntersuchung ($p=0,308$) noch zur Abschlussuntersuchung ($p=0,140$; jeweils t-Test für unabhängige Stichproben) untermauern.

Innerhalb des **Subkollektivs der Nichtraucher** wiesen Probanden der Verumgruppe initial höhere ADMA-Werte als Probanden der Placebogruppe auf. Der t-Test für unabhängige Stichproben erbrachte diesbezüglich allerdings keinen signifikanten Unterschied ($p=0,292$). Während der Intervention nahmen die Plasmaspiegel in beiden Subgruppen geringfügig zu. Dabei kam es unter Placebogabe zu einem unwesentlich stärkeren, gegenüber Verum jedoch nicht signifikant höheren Anstieg (Δ Placebo: $0,02 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/l}$ vs. Δ Verum: $0,01 \pm 0,07$ $\mu\text{mol/l}$, $p=0,532$). Die hieraus zum Ende der Intervention resultierenden mittleren ADMA-Plasmakonzentrationen der Verum- und Placebogruppe unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant voneinander ($p=0,683$).

⁶² Die Gruppe der Exraucher ($n=57$) wurde von der Betrachtung ausgenommen.

Ausgehend von identischen Ausgangswerten der Subgruppen Verum und Placebo im **Subkollektiv der Raucher** ($p=0,967$), trat auch hier im Verlauf der Placeboeinnahme eine um $0,01 \mu\text{mol/l}$ minimal stärker ausgeprägte Erhöhung der mittleren ADMA-Plasmawerte im Vergleich zur Intervention mit Verum auf. Wie im Fall der Nichtraucher, konnte dabei weder für die Veränderungen innerhalb (vgl. Tab. 25, t-Test für abhängige Stichproben) noch für die Unterschiede hinsichtlich der absoluten ADMA-Differenzen ($p=0,866$) und T6-Mittelwerte ($p=0,774$) zwischen beiden Untersuchungsgruppen ein statistisches Signifikanzniveau ermittelt werden.

Wie Tab. 25 ferner erkennen lässt, ergaben sich beim Vergleich der jeweiligen **Verum-** bzw. **Placebogruppen** im Mittel gleiche T6-T0-Differenzen (Verum vs. Verum: $p=0,973$, Placebo vs. Placebo: $p=0,739$; jeweils t-Test für unabhängige Stichproben). Dies weist darauf hin, dass die beobachteten Veränderungen in beiden Subgruppen nicht im Zusammenhang mit dem Rauchverhalten der Probanden standen.

Tab. 25: ADMA-Plasmaspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Subkollektivs „(Nicht-)Raucher“ (Mittelwert \pm SD)

	Subkollektiv	Verum	Placebo	p^a
Nichtraucher	($n=44$)	($n=23$)	($n=21$)	
ADMA_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,38 \pm 0,06$	$0,39 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,06$	0,292
ADMA_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,40 \pm 0,05$	$0,40 \pm 0,06$	$0,39 \pm 0,05$	0,683
p^b	0,118	0,518	0,102	
ADMA_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,02 \pm 0,07$	$0,01 \pm 0,07$	$0,02 \pm 0,06$	0,532
Raucher	($n=22$)	($n=11$)	($n=11$)	
ADMA_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,36 \pm 0,07$	$0,36 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,07$	0,967
ADMA_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,38 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,07$	$0,38 \pm 0,04$	0,774
p^b	0,485	0,751	0,487	
ADMA_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	$0,01 \pm 0,08$	$0,01 \pm 0,09$	$0,02 \pm 0,07$	0,866

^a t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

4.2.4.3 Korrelationen und Interaktionen

Korrelationen zwischen ADMA und den für die Fragestellung relevanten Parametern zu T0

Die im Gesamtkollektiv durchgeführte Untersuchung hinsichtlich einer möglichen Assoziation zwischen den Basalwerten der ADMA- und **tHcy-Plasmakonzentration** sowie den **B-Vitaminstatusparametern** S-Folat, E-Folat, Cbl und PLP erbrachte keine statistisch signifikanten Korrelationen. Auch korrelierte ADMA zur Basisuntersuchung T0 weder mit den **oxLDL-Serumwerten** noch bestand zu diesem Zeitpunkt ein Zusammenhang zu den **Parametern des Antioxidanzienstatus** (TEAC, AT, AT/TC, AT/TC+TG, vgl. Tab. A15, Anhang B).

Korrelationen zwischen ADMA und weiteren ausgewählten Parametern zu T0

Neben den für die Nährstoffintervention relevanten Parametern sollten weitere, sich aus den Literaturdaten ableitende Assoziationen zwischen ADMA und verschiedenen biochemischen sowie klinischen Begleit- und Basisparametern überprüft werden. Eine Übersicht der hierzu im Gesamtkollektiv ermittelten Korrelationskoeffizienten und zugehörigen Signifikanzniveaus zum Zeitpunkt T0 gibt Tab. A16, Anhang B.

Zwischen der Höhe der initialen ADMA- und **SDMA-Plasmaspiegel** bestand eine schwache, positive Korrelation, die ein statistisch hoch signifikantes Niveau erreichte ($r=0,281$, $p=0,002$). Während sich für SDMA eine erwartungsgemäß positive, höchst signifikante Korrelation zur Höhe des **Creatinin-Serumspiegels** als Marker der renalen Funktion feststellen ließ ($r=0,404$, $p<0,001$), war zwischen dem initialen ADMA-Status und den basalen Creatinin-Serumwerten keine Assoziation zu beobachten.

Da **L-Arginin** als physiologischer NO-Präkursor fungiert, wäre hypothetisch zu erwarten, dass bei einem hohem ADMA-Angebot und einer daraus resultierenden, gesteigerten NOS-Hemmung L-Arginin - einen verstärkten nach extrazellulär gerichteten Transport unter diesen Bedingungen vorausgesetzt - im Plasma akkumuliert. Ein derartiger Zusammenhang, der eine positive Korrelation zwischen den Variablen ADMA_T0 und L-Arg_T0 zur Folge hätte, konnte mit einer nicht signifikanten, sehr geringen Assoziation ($r=0,153$, $p=0,092$) allerdings nicht bestätigt werden.

Wurden die ADMA-Plasmaswerte mit den für das kardiovaskuläre Risiko relevanten biochemischen Parametern des Lipidprofils (**TC, HDL, LDL, TG**), der **Glucose-Serumkonzentration** sowie den systolischen und diastolischen **Blutdruckwerten** bivariat korreliert, so waren weder statistisch signifikante noch pathophysiologisch plausible Zusammenhänge erkennbar. Auch wurden zwischen den zu T0 erhobenen anthropometrischen Variablen **BMI**

und **TU** und der Höhe des initialen ADMA-Plasmaspiegels keine Korrelationen gefunden.

Ein in verschiedenen klinischen Studien [u. a. MIYAZAKI et al. 1999; HORI et al. 2003; MITTERMAYER et al. 2006; MAAS et al. 2007] nachgewiesener positiver Zusammenhang zwischen der ADMA-Plasmakonzentration und dem **Alter** der Probanden konnte im vorliegenden Studienkollektiv mit einer sehr geringen, statistisch nicht signifikanten Assoziation ($r=0,157$, $p=0,083$) ebenfalls nicht bestätigt werden.

Korrelationen zwischen ADMA und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren zu T0

In Ergänzung zu den metrisch-skalierten Risikovariablen (s. o.) galt es nun zu klären, inwieweit innerhalb des Gesamtkollektivs mögliche Assoziationen zwischen dem initialen ADMA-Status und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren gemäß der unter Kap. 4.2.1.3 dargestellten Risikobeurteilung bestanden haben. Wie sowohl das Ergebnis der bivariaten Korrelationsrechnung (in Klammern) als auch das der einfaktoriellen Varianzanalyse (vgl. Tab. 26) zeigte, war die Höhe des ADMA-Plasmaspiegels weder mit der Häufigkeit **etablierter Risikofaktoren** ($r_s=-0,039$, $p=0,672$) noch mit der Anzahl der **(MetS-)Risikofaktoren nach AHA/NHLBI-Definition** ($r_s=-0,003$, $p=0,972$) assoziiert.

Tab. 26: ADMA-Plasmaspiegel zu T0 in Abhängigkeit von der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren im Gesamtkollektiv (Mittelwert \pm SD)

Anzahl Risikofaktoren	1	2	3	4	5	p (ANOVA)
„etabliert“	--	0,38 \pm 0,06 (n=36)	0,38 \pm 0,06 (n=46)	0,37 \pm 0,07 (n=29)	0,37 \pm 0,06 (n=12)	0,739
nach AHA/NHLBI	0,41 \pm 0,06 (n=8)	0,37 \pm 0,06 (n=23)	0,38 \pm 0,05 (n=40)	0,38 \pm 0,06 (n=38)	0,39 \pm 0,07 (n=14)	0,435

Korrelation zwischen den Veränderungen der ADMA-Plasmaspiegel während der Intervention (T6-T0) und den Veränderungen der für die Fragestellung relevanten Parameter (T6-T0)

In der nachfolgend für die Verumgruppe durchgeführten Korrelationsanalyse sollte überprüft werden, ob sich auf Basis der für ADMA errechneten T6-T0-Differenzen und den unter Einnahme des Nährstoffpräparates aufgetretenen Veränderungen hinsichtlich der Variablen **Homocystein** und **oxLDL** sowie den Parametern des **B-Vitamin-** bzw. **Antioxidanzienstatus** mögliche Zusammenhänge aufzeigen ließen. Wie den in Tab. A17, Anhang B, dargestellten Ergebnissen zu entnehmen ist, ließ sich hierbei ein Trend zu einer schwach inversen Korrelation zwischen den ADMA-Differenzen und den Veränderungen der AT-Serumspiegel beobachten ($r=-0,228$, $p=0,066$). Die Zunahme der AT-Serumkonzentration während der Intervention (positives Vorzeichen) war demnach mit einer Reduktion der ADMA-Plasmaswerte (negatives Vorzeichen) assoziiert. Korrelationen der ADMA-Differenzen zu weiteren, in

die Analyse einbezogenen Variablen wurden nicht beobachtet.

Da unter Placeboeinnahme hinsichtlich der für den ADMA-Stoffwechsel diskutierten Modulatoren **Homocystein** und **oxLDL** ebenfalls signifikante Veränderungen während der Interventionsphase aufgetreten sind, sollten auch hier mögliche Assoziationen zu den für ADMA ermittelten T6-T0-Differenzen überprüft werden. Während zu den Veränderungen der tHcy-Plasmakonzentration kein Zusammenhang vorhanden war ($r=-0,023$, $p=0,867$), errechnete sich in der bivariaten Korrelation zwischen den oxLDL- und ADMA-Differenzen eine signifikant inverse Assoziation ($n=33^{63}$: $r=-0,389$, $p=0,025$). Für die Placebogruppe lässt sich dementsprechend ableiten, dass ein Abfall der oxLDL-Serumkonzentration (negative T6-T0-Differenzen) mit einer Zunahme des ADMA-Plasmaspiegels (positive T6-T0-Differenzen) bzw. ein oxLDL-Anstieg mit einer ADMA-Senkung während des Untersuchungsverlaufs verbunden war.

4.2.4.4 Zusammenfassung

Wie die im Gesamtkollektiv durchgeführte Analyse hinsichtlich des für den Hauptzielparameter ADMA zu überprüfenden **Interventionseffekts** zeigte, war mit im Studienverlauf (nahezu) unveränderten mittleren Plasmaspiegeln in den Subgruppen Verum (Δ : $0,00 \pm 0,07 \mu\text{mol/l}$) und Placebo (Δ : $0,01 \pm 0,06 \mu\text{mol/l}$) kein Einfluss der Nährstoffgabe ersichtlich. Wurde demgegenüber eine nach der Höhe des initialen ADMA-Status differenzierte Subkollektiv-Auswertung vorgenommen, so zeigte sich ein von der Verum- und Placebogabe unabhängiger, signifikanter Anstieg der ADMA-Plasmaspiegel bei initial niedrigen Werten (Subkollektiv ADMA_T0 $\leq 0,33 \mu\text{mol/l}$) bzw. eine ADMA-Senkung bei hohen Ausgangspiegeln (Subkollektiv ADMA_T0 $\geq 0,43 \mu\text{mol/l}$). Letztere erwies sich lediglich innerhalb der Verumgruppe nicht jedoch gegenüber Placebo als statistisch signifikant. Ein entsprechend invers assoziierter, signifikanter Zusammenhang zwischen dem T0-Status und den T6-T0-Differenzen ließ sich ferner in der für die Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs durchgeführten bivariaten Korrelation belegen, was ebenfalls auf einen von der Intervention unabhängigen Effekt hinweist.

Während die ADMA-Plasmaswerte bei Probanden mit einer zu T0 prävalenten Hyperhomocysteinämie (Subkollektiv tHcy_T0 $\geq 10 \mu\text{mol/l}$) im Verlauf der Verumintervention im Mittel ebenfalls unverändert blieben, ging die Einnahme des Placebos mit einer signifikanten Erhöhung der ADMA-Plasmakonzentration einher. Das hierbei ermittelte Ausmaß der ADMA-Zunahme unterschied sich jedoch weder zu den T6-T0-Differenzen der Verumgruppe, noch lag ein signifikanter Unterschied zu den unter Placebogabe bei Probanden ohne Hyperhomo-

⁶³ Placebogruppe der untersuchten Teilstichprobe abzüglich Probanden mit hypolipidämischer Medikation.

cysteinämie (Subkollektiv tHcy_T0 <10 µmol/l) ermittelten ADMA-Differenzen vor. Des Weiteren konnten in der Analyse der Subkollektive „Höhe der tHcy-Plasmaspiegel“, „Höhe der oxLDL-Serumspiegel“, „Höhe der antioxidativen Kapazität“ sowie „(Nicht-)Raucher“ weder klinisch relevante noch statistisch signifikante Veränderungen der ADMA-Plasmawerte innerhalb sowie zwischen beiden Interventionsgruppen gefunden werden.

Wurde der **allgemeine ADMA-Status in Abhängigkeit der für die Subkollektiv-Bildung zugrunde gelegten Parameter** untersucht, so fand sich zu T0 und T6 eine geringe, nicht signifikante Tendenz zu höheren ADMA-Mittelwerten bei hohen gegenüber niedrigen oxLDL-Serumspiegeln (Subkollektiv oxLDL_T0 ≥ 83 vs. ≤ 60 U/l) sowie niedriger gegenüber hoher antioxidativer Plasmakapazität (Subkollektiv TEAC_T0 ≤ 2213 vs. ≥ 2363 µmol/l). Demgegenüber wiesen Nichtraucher zu beiden Untersuchungszeitpunkten im Mittel geringfügig höhere ADMA-Plasmawerte im Vergleich zum Subkollektiv der Raucher auf ($p > 0,05$). Keinerlei Hinweise auf entsprechende Unterschiede waren demgegenüber bei Betrachtung der Subkollektive „Moderate Hyperhomocysteinämie“ und „Höhe der tHcy-Plasmaspiegel“ erkennbar.

Im Rahmen der zu T0 im Gesamtkollektiv durchgeführten **Interkorrelationsanalyse** zeigte sich für die basalen ADMA-Plasmawerte lediglich eine signifikant positive Korrelation zur Höhe der SDMA-Ausgangsspiegel. Weder fanden sich zu diesem Zeitpunkt Assoziationen zu den Variablen des Homocystein-/B-Vitamin- bzw. oxLDL-/Antioxidanzienstatus, noch waren Zusammenhänge zwischen dem initialen ADMA-Status und diesbezüglich relevanten biochemisch-klinischen Begleit- und Basisparametern einschließlich der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren erkennbar. Auch wurden hinsichtlich der in der Verumgruppe errechneten T6-T0-Differenzen der ADMA-Plasmawerte und den Veränderungen der für die Fragestellung wesentlichen Parameter bis auf einen Trend zu einer schwach ausgeprägten, inversen Korrelation mit den AT-Serumspiegeln ($r = -0,228$, $p = 0,066$) keine Korrelationen gefunden. Indessen war in der Placebogruppe eine signifikant inverse Assoziation zwischen den ADMA-Differenzen und den im Zeitverlauf aufgetretenen Veränderungen der oxLDL-Serumspiegel zu beobachten.

4.2.5 BEGLEIT- UND BASISPARAMETER

Tab. 27 gibt eine Übersicht der als Begleitvariablen zu T0 und T6 in der Verum- und Placebogruppe ermittelten SDMA- und L-Arginin-Plasmaspiegel sowie ihrer Veränderungen im Studienverlauf. Des Weiteren sind die bereits im Zusammenhang mit Homocystein (vgl. Kap. 4.2.2.1) erwähnten und für den SDMA-Status gleichermaßen als relevant anzusehenden Veränderungen der Creatinin-Serumspiegel nebst Darstellung der Harnsäure-Serumwerte, welche im Rahmen der TEAC-Auswertung berücksichtigt wurden (vgl. Kap. 4.2.3.2), aufgeführt.

Betrachtet man zunächst die zu T0 erhobenen Statuswerte der Variablen **L-Arg, Creatinin und Harnsäure**, so unterschieden sich die Verum- und Placebogruppe in keinem der drei genannten Begleitparameter signifikant. Wurde demgegenüber der initiale **SDMA-Status** beider Subgruppen verglichen, so war ein Signifikanztrend zu niedrigeren Ausgangswerten (8% vs. Verum, $p=0,059$) in der Placebogruppe gegeben.

Zum Ende der Intervention stiegen die **SDMA-Plasmaspiegel** sowohl innerhalb des Gesamtkollektivs als auch in den beiden Interventionsgruppen höchst signifikant an. Dabei verzeichneten Probanden der Placebogruppe eine im Mittel stärker ausgeprägte SDMA-Zunahme ($\Delta: 0,12 \pm 0,06 \mu\text{mol/l}$), die gegenüber den T6-T0-Differenzen der Verumgruppe jedoch kein statistisch signifikantes Niveau erreichte ($\Delta: 0,10 \pm 0,07 \mu\text{mol/l}$, $p=0,302$). Wurde zusätzlich der Einfluss des SDMA-Ausgangsstatus (Kovariate SDMA_T0: $p<0,001$) sowie die Veränderungen der Creatinin-Serumkonzentration während der Intervention (Kovariate Creatinin_T6-T0: $p=0,240$)⁶⁴ berücksichtigt, so fiel der statistische Unterschied zwischen den T6-T0-Differenzen beider Subgruppen mit einer Erhöhung des p -Wertniveaus weitaus geringer aus ($p=0,808$; ANCOVA). Auch unterschieden sich die final erhobenen SDMA-Plasmaspiegel der Verum- und Placebogruppe nicht signifikant ($p=0,499$).

Ein zum Zeitpunkt T6 signifikanter Unterschied zwischen der Verum- und Placebogruppe ergab sich hingegen für den **L-Argininstatus** ($p=0,045$). Betrachtet man hingegen die Veränderungen im Zeitverlauf, so wurde ein leichter Rückgang der Plasmawerte unter Intervention mit Verum und Placebo verzeichnet, der sich sowohl innerhalb ($p=0,265$ bzw. $p=0,618$) als auch zwischen den beiden Subgruppen als nicht signifikant erwies ($p=0,124$; ANCOVA).

⁶⁴ Dieses Vorgehen erschien insofern erforderlich, als dass sich die Bedeutung der renalen Exkretion als determinierende Größe des SDMA-Plasmaspiegels in der unter Kap. 4.2.4.3 aufgezeigten Korrelation zwischen dem SDMA- und Creatininstatus des Gesamtkollektiv ($r=0,404$, $p<0,001$) bestätigen ließ.

Für **Creatinin** wurde im weiteren Untersuchungsverlauf eine Erhöhung der durchschnittlichen Serumkonzentrationen beobachtet, welche sich sowohl im Gesamtkollektiv ($p=0,011$) als auch in der Placebogruppe ($p=0,009$) als statistisch signifikant herausstellte. Innerhalb der Verumgruppe ließ sich demgegenüber ein schwächerer, nicht signifikanter Anstieg der Serumspiegel feststellen ($\Delta: 1,26 \pm 8,17 \mu\text{mol/l}$). Verglichen mit den unter Placebo gezeigten T6-T0-Differenzen ($\Delta: 2,26 \pm 6,32 \mu\text{mol/l}$) erwies sich dieser Unterschied jedoch als nicht signifikant ($p=0,452$). Gleiches galt für den T6-Status, für den ebenfalls kein signifikanter Gruppenunterschied ermittelt wurde ($p=0,748$).

Während die **Harnsäurewerte** der Verumgruppe im Interventionsverlauf im Mittel nicht signifikant absanken ($\Delta: -5,82 \pm 59,0 \mu\text{mol/l}$), war für die Serumspiegel der Placebogruppe ein vergleichsweise stark ausgeprägter, hoch signifikanter Anstieg nachzuweisen ($\Delta: 21,1 \pm 52,1 \mu\text{mol/l}$). In der Testung der absoluten T6-T0-Differenzen zwischen beiden Subgruppen ließ sich ein signifikanter Unterschied errechnen ($p=0,009$), der auch unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Ausgangswerte bestehen blieb ($p=0,020$; ANCOVA). Die zum Zeitpunkt T6 ermittelten Harnsäure-Serumspiegel der Verum- und Placebogruppe unterschieden sich demgegenüber nicht signifikant ($p=0,520$).

Tab. 27: SDMA-, L-Arg-Plasmaspiegel, Creatinin- und Harnsäure-Serumspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)

	Gesamtkollektiv	Verum	Placebo	p^a
SDMA_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	0,26 \pm 0,06 (n=123)	0,27 \pm 0,06 (n=66)	0,25 \pm 0,06 (n=57)	0,059
SDMA_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	0,37 \pm 0,07 (n=123)	0,38 \pm 0,08 (n=66)	0,37 \pm 0,06 (n=57)	0,499
p	<0,001^b	<0,001^c	<0,001^c	
SDMA_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	0,11 \pm 0,07 (n=123)	0,10 \pm 0,07 (n=66)	0,12 \pm 0,06 (n=57)	0,302
ANCOVA*: $p=0,808$				
L-Arg_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	81,1 \pm 17,3 (n=123)	78,9 \pm 17,4 (n=66)	83,5 \pm 17,0 (n=57)	0,145
L-Arg_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	79,6 \pm 14,4 (n=122)	77,1 \pm 14,5 (n=65)	82,4 \pm 13,8 (n=57)	0,045
p^c	0,256	0,265	0,618	
L-Arg_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	-1,67 \pm 16,2 (n=122)	-2,13 \pm 15,3 (n=65)	-1,15 \pm 17,3 (n=57)	0,240
ANCOVA**: $p=0,124$				

Fortsetzung Tab. 27:

Creatinin_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	74,6 \pm 13,2 (n=123)	74,7 \pm 13,5 (n=66)	74,5 \pm 12,9 (n=57)	0,921
Creatinin_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	76,3 \pm 13,2 (n=123)	76,0 \pm 13,7 (n=66)	76,8 \pm 12,6 (n=57)	0,748
p^c	0,011	0,215	0,009	
Creatinin_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	1,72 \pm 7,36 (n=123)	1,26 \pm 8,17 (n=66)	2,26 \pm 6,32 (n=57)	0,452
Harnsäure_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	367 \pm 78,2 (n=123)	375 \pm 67,7 (n=66)	358 \pm 88,5 (n=57)	0,217
Harnsäure_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	374 \pm 78,7 (n=123)	370 \pm 68,5 (n=66)	379 \pm 89,4 (n=57)	0,520
p^c	0,201	0,426	0,003	
Harnsäure_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	6,64 \pm 57,3 (n=123)	-5,82 \pm 59,0 (n=66)	21,1 \pm 52,1 (n=57)	0,009
ANCOVA***: $p=0,020$				

^a t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b Wilcoxon-Test, bezogen auf T0 und T6,

^c t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

* Kovariate: SDMA_T0 ($p<0,001$), Creatinin_T6-T0 ($p=0,240$), Faktor: Interventionsgruppe

** Kovariate: L-Arg_T0 ($p<0,001$), Faktor: Interventionsgruppe

*** Kovariate: Harnsäure_T0 ($p<0,001$), Faktor: Interventionsgruppe

Für die als Basisvariablen erhobenen Parameter des Lipidprofils (**TC, HDL, LDL, TG**) bestanden weder innerhalb noch zwischen beiden Interventionsgruppen signifikante Unterschiede. Gleiches traf auf die separat nach Verum- und Placebogruppe durchgeführte Auswertung der **Glucose-Serumspiegel** zu. Die detaillierten Ergebnisse sind in Anhang B, Tab. A18 dargestellt.

5 DISKUSSION

Seit der erstmaligen Beschreibung von ADMA als endogenem NOS-Inhibitor durch die Gruppe um VALLANCE und Mitarbeiter [VALLANCE et al. 1992a; VALLANCE et al. 1992b] und den sich daraus ableitenden Konsequenzen für das endotheliale L-Arginin-NO-System war das proatherogene Potenzial des kompetitiven NOS-Hemmstoffs Gegenstand zahlreicher experimenteller sowie klinischer Untersuchungen. Wie sich aus der Gesamtheit der hierzu publizierten Arbeiten ableiten lässt, scheint ADMA sowohl einen Promotor als auch Marker des atherosklerotischen Geschehens darzustellen, der im Sinne eines integrativen „*Übermarkers* [COOKE 2004]“ die nachteiligen Effekte kardiovaskulärer Risikofaktoren auf das Endothel vermittelt [COOKE 2004; BÖGER et al. 2005]. So ist eine Akkumulation von ADMA sowohl auf epidemiologischer als auch biochemischer Ebene mit verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren (u. a. Hyperhomocysteinämie, Hypercholesterolämie,) bzw. den dazugehörigen proatherogenen Noxen (Homocystein, oxLDL) assoziiert.

Dieser letztgenannte Sachverhalt bildete auch den zentralen Ausgangspunkt der im Rahmen dieser Arbeit formulierten Basishypothese (vgl. Kap. 3): Ausgehend von *In-vitro*-Befunden, die auf eine redoxsensitive Modulation der an der ADMA-Synthese sowie am ADMA-Abbau beteiligten Enzyme PRMT-I bzw. DDAH hindeuten, kann in einer Homocystein- und oxLDL-induzierten Steigerung des oxidativen Stresses ein wesentlicher molekularer Mechanismus gesehen werden, welcher für eine Erhöhung der ADMA-Plasmakonzentration bei entsprechenden Risikopersonen verantwortlich ist. Demgemäß wurde postuliert, dass die Minimierung der ADMA-akkumulierenden Determinanten Homocystein und oxLDL sowie eine Reduktion oxidativer Prozesse von einer Senkung der ADMA-Plasmaspiegel *in vivo* begleitet ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den synergistischen Einfluss einer kombinierten B-Vitamin- und Antioxidanzisupplementierung auf die ADMA-Plasmakonzentration bei Personen mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko im Rahmen einer randomisierten, placebo-kontrollierten Doppelblind-Studie zu überprüfen.

Wie aus den unter Kap. 4.2.4 dargestellten Ergebnissen hervorgeht, ergaben sich sowohl innerhalb des Gesamtkollektivs als auch in verschiedenen Subkollektiven keine Hinweise, die auf eine Beeinflussung der ADMA-Plasmakonzentration durch das hier verabreichte Nährstoffpräparat schließen lassen. So ließen sich weder signifikante Veränderungen der ADMA-Plasmaspiegel unter Intervention mit Verum feststellen, noch waren in den jeweiligen Analysen signifikante Effekte gegenüber der Placebogabe zu beobachten.

Auf Basis der für eine Senkung der ADMA-Plasmaspiegel im Rahmen der Arbeitshypothese formulierten Prämissen gilt daher zu diskutieren,

- (a) inwieweit die Supplementierung erfolgreich war, eine (ausreichende) Reduktion der Homocystein- und oxLDL-Konzentration in Plasma/Serum bzw. Erhöhung der antioxidativen Kapazität zu bewirken,
- (b) inwieweit diese dem Vergleich mit Daten aus anderen Interventionsstudien zum Einfluss einer B-Vitamin-/Antioxidanzien-supplementierung auf die ADMA-Plasmakonzentration standhalten und
- (c) inwieweit sich diese durch gegebene Interaktionen zwischen ADMA und den Parametern des Homocystein-/B-Vitamin- bzw. oxLDL-/Antioxidanzienstatus in der vorliegenden Untersuchung sowie im Kontext aktueller Literaturdaten bestätigen lassen.

5.1 HOMOCYSTEIN UND ASSOZIIERTE B-VITAMINSTATUSPARAMETER

Seitdem Ende der 1960er Jahre erstmals über den Zusammenhang zwischen erhöhten Homocysteinkonzentrationen im Blut und dem Auftreten von schwerwiegenden atherosklerotischen Läsionen bei Patienten mit Homocysteinurie⁶⁵ berichtet wurde [MC CULLY 1969], stößt das gefäßschädigende Potenzial von Homocystein und im Zuge dessen auch die Senkung erhöhter Plasmaspiegel durch eine Supplementierung mit B-Vitaminen auf großes Interesse. Neben zahlreichen experimentellen Arbeiten, die zur Aufklärung einer Reihe proatherogener, durch Homocystein vermittelter Mechanismen (u. a. endotheltoxische Wirkung, prokoagulatorische und prooxidative Effekte) beigetragen haben, stützt eine Fülle an epidemiologischen Daten die heute etablierte Auffassung, wonach bereits eine moderate Erhöhung des tHcy-Plasmaspiegels ($>12 \mu\text{mol/l}$) als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre und atherothrombotische Ereignisse anzusehen ist [GRAHAM et al. 1997; WELCH U. LOSCALZO 1998; COPPOLA et al. 2000; UELAND et al. 2000; HOMOCYSTEINE STUDIES COLLABORATION 2002]. Wie verschiedene Untersuchungen zeigen, steigt das kardiovaskuläre Risiko dabei bereits ab tHcy-Plasmawerten von $\sim 10 \mu\text{mol/l}$ kontinuierlich, d. h. im Sinne einer linearen Dosis-Wirkungsbeziehung, an [BOUSHEY et al. 1995; GRAHAM et al. 1997; OMENN et al. 1998; GERHARD U. DUELL 1999; BOSTOM et al. 1999]. Diese Beobachtung

⁶⁵ Bei der Homocysteinurie handelt es sich um eine seltene, autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselstörung, bei der es durch einen Defekt des Enzyms Cystathionin- β -Synthase (CBS, vgl. Abb. A12, Anhang A) zu einer massiven Akkumulation von Homocystein im Plasma ($>100\text{-}300 \mu\text{mol/l}$ und höher) und konsekutiv zum Übertritt in den Urin kommt. Unbehandelt führt die Erkrankung bereits im frühen Erwachsenenalter zu schweren kardio- und zerebrovaskulären Komplikationen bis hin zum Tod der Patienten [MC CULLY 1969; KRAUS et al. 1999; YAP et al. 2000].

wiederum führte dazu, dass die früher als „normal“ angesehene Obergrenze mit Werten von bis zu 16 $\mu\text{mol/l}$ [KANG 1993; UELAND et al. 1993; REFSUM et al. 1998] in den letzten Jahren stetig nach unten korrigiert wurde. Die gegenwärtig in der klinischen Praxis gebräuchlichen Grenzwerte stützen sich zumeist auf Empfehlungen internationaler Fachgremien (u. a. Nutrition Committee of the American Heart Association [MALINOW et al. 1999]; DACH-Liga Homocystein [STANGER et al. 2003]), die tHcy-Plasmakonzentrationen von $\leq 12 \mu\text{mol/l}$ (Gesunde) bzw. $< 10 \mu\text{mol/l}$ (Risikopersonen, Patienten mit manifester Atherosklerose) als präventiv wünschenswert erachten. Allerdings besteht bis dato weiterhin Klärungsbedarf, ob Homocystein als kausaler Faktor des atherosklerotischen Geschehens anzusehen ist [WALD et al. 2000; LEWIS et al. 2005]. Damit bleibt auch die Frage offen, inwieweit einer Homocystein-senkenden Maßnahme ein präventiver Nutzen eingeräumt werden kann. Dieser wird gegenwärtig in mehreren Interventionsstudien zum Einfluss einer B-Vitaminsupplementierung auf kardiovaskuläre Endpunkte (u. a. Restenoserate nach Revaskularisation, Inzidenz kardiovaskulärer Zweitereignisse) nachgegangen, von denen nun erste, in ihrer Gesamtheit inkonsistente Ergebnisse vorliegen [Übersicht bei WEISS et al. 2004; CLARKE 2005; B-VITAMIN TREATMENT TRIALISTS' COLLABORATION 2006; WIERZBICKI 2007].

Ungeachtet dessen stellt die Reduktion erhöhter tHcy-Plasmaspiegel durch eine Supplementierung mit Folsäure, Vitamin B₁₂ und B₆ ein allgemein etabliertes diätetisches Prinzip dar [STANGER et al. 2003; WOLTERS et al. 2004b; HAHN et al. 2006, S. 108], für das inzwischen umfangreiches Datenmaterial aus Interventionsstudien vorliegt (s. u.). Das hierbei zugrunde liegende Rational lässt sich auf die Funktion der jeweiligen Vitamine als Cofaktoren für die am Homocysteinabbau beteiligten Enzyme zurückführen (vgl. Erläuterungen zu Abb. A12 „Biochemie des Homocystein-Stoffwechsels“, Anhang A). Demgemäß gilt eine unzureichende alimentäre B-Vitaminversorgung, insbesondere jedoch ein Mangel an Folsäure, neben weiteren, den Homocystein-Metabolismus beeinflussenden Faktoren (u. a. Alter, Geschlecht, genetische Enzymdefekte, Nierenfunktion, Medikamente) als häufigste Ursache moderater Hyperhomocysteinämien [SELHUB et al. 1993; WEISS et al. 1999; VOLLSET et al. 2001]. Ein erhöhter (Nüchtern-)tHcy-Plasmaspiegel stellt daher auch einen unspezifischen Marker eines Folat- und/oder Vitamin-B₁₂-Defizits dar, während dies für Vitamin B₆ aus den nachfolgend noch näher erläuterten Gründen (vgl. Kap. 5.1.1) nur bedingt der Fall ist. Gleichzeitig kann die tHcy-Plasmakonzentration bzw. deren Senkung als „Erfolgsindikator“ einer additiven B-Vitamingabe herangezogen werden [MILLER et al. 1992; PIETRZIK U. BRÖNSTRUP 1998; STANGER et al. 2003].

5.1.1 EFFEKT DER SUPPLEMENTIERUNG AUF DEN tHCY-PLASMASPIEGEL

Wie erwartet, konnte auch in unserer Untersuchung eine signifikante Reduktion der tHcy-Plasmakonzentration (Δ : $-2,14 \pm 2,31 \mu\text{mol/l}$, $p < 0,001$) durch die sechsmonatige Einnahme des B-Vitamin-haltigen Verumpräparates (800 $\mu\text{g/d}$ Folsäure, 20 $\mu\text{g/d}$ Vitamin B₁₂, 6 mg/d Vitamin B₆) nachgewiesen werden. Das hierbei innerhalb der Verumgruppe erzielte **Ausmaß der Homocystein-Senkung**, welches einer relativen Abnahme um 20,8% entsprach, steht im Konsens mit den Ergebnissen einer aktuellen Metaanalyse (25 RCTs, $n=2596$) [HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION 2005], in der die hier **eingesetzte Folatdosierung von 800 $\mu\text{g/d}$** mit einer mittleren Reduktion des tHcy-Plasmaspiegels um 23% (standardisiert auf Basalwerte von tHcy 12 $\mu\text{mol/l}$ bzw. S-Folat 12 nmol/l) assoziiert ist. Bezogen auf den alleinigen Effekt von Folsäure erwiesen sich 800 μg Folat/d als die zugleich niedrigste Dosierung, über welche eine maximale Senkung der tHcy-Plasmakonzentration erzielt werden kann⁶⁶. Die um 2% geringere Homocystein-Reduktion innerhalb unseres Kollektivs erklärt sich durch die zu Studienbeginn vergleichsweise niedrigeren tHcy-Plasma- ($10,3 \pm 2,65 \mu\text{mol/l}$) bzw. deutlich höheren S-Folat-Spiegel ($23,3 \pm 12,1 \text{ nmol/l}$) der Verumgruppe. In diesem Kontext ließ sich auch der aus der Literatur bekannte Zusammenhang bestätigen, wonach das Ausmaß der Homocystein-Senkung wesentlich durch die Höhe der tHcy-Ausgangskonzentration sowie den initialen B-Vitaminversorgungsstatus – und hierbei speziell durch die Versorgung mit Folat – determiniert wird [CLARKE U. ARMITAGE 2000; HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION 2005; WOLTERS et al. 2005]: Demnach ging die Verumsupplementierung auch bei unseren Probanden mit der im Mittel stärksten Reduktion der tHcy-Plasmakonzentration einher, je höher die tHcy-Ausgangswerte ($r=-0,738$, $p < 0,001$, Schwellenwert: 6,92 $\mu\text{mol/l}$) und je niedriger die basalen S-Folat-Spiegel ($r_s=0,479$, $p < 0,001$) waren. Eine analoge, wenn auch vergleichsweise schwächer ausgeprägte Beziehung fand sich zudem für den basalen Cbl-Status ($r=0,349$, $p=0,004$), während für E-Folat ($r_s=0,229$, $p=0,067$) und PLP ($r_s=0,233$, $p=0,059$) lediglich ein Trend zu einer stärkeren Homocystein-Abnahme bei initial schlechterer Versorgungssituation bestand. Letzteres lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass das Studienkollektiv bereits zu Beginn der Intervention einen in Hinblick auf die Minimierung des tHcy-Plasmaspiegels guten E-Folat- sowie PLP-Versorgungsstatus aufwies (vgl. Kap. 5.1.3).

⁶⁶ Dosierungen im Bereich von 2-5 mg Folat/d waren mit keiner weiteren bzw. einer nur geringfügig höheren Homocystein-Senkung (23-25%) verbunden [HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION 2005].

Betrachtet man die zu T0 im Gesamtkollektiv ermittelte **Höhe des tHcy-Plasmaspiegels**, so lag diese mit durchschnittlich $9,92 \pm 2,51 \mu\text{mol/l}$ innerhalb des für Risikopersonen aus präventiver Sicht anzustrebenden Zielbereichs von $<10 \mu\text{mol/l}$. Die tHcy-Ausgangskonzentration tendierte damit in einen Bereich ($8\text{-}10 \mu\text{mol/l}$), wie er für gut versorgte Populationen – etwa im Rahmen von Folatfortikationsmaßnahmen – beschrieben ist (s. u.) [BAILEY et al. 2003; CLARKE 2005; HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION 2005]. Auch zeigt der Vergleich zu der von DROGAN et al. [2004] untersuchten Subkohorte ($n=362$) der *EPIC-Potsdam*-Studie, für die durchschnittliche tHcy-Plasmawerte von $11,7 \pm 4,1$ (Männer, Anteil 56%) bzw. $9,4 \pm 2,8 \mu\text{mol/l}$ (Frauen, Anteil 44%) angegeben werden, dass die tHcy-Plasmaspiegel unserer selektiv rekrutierten Risikogruppe (Männer: $10,4 \pm 2,41 \mu\text{mol/l}$, Frauen: $9,39 \pm 2,53 \mu\text{mol/l}$; Geschlechterverhältnis: 54,5 vs. 45,5%, vgl. Kap. 4.2.1.2) nicht höher als in einem gesunden Vergleichskollektiv ausfielen.

Ein anderes Bild ergab sich, wenn die im Gesamtkollektiv zur Basisuntersuchung ermittelte **Prävalenz einer moderaten Hyperhomocysteinämie** berücksichtigt wurde: So zeigte sich, dass nahezu die Hälfte des Kollektivs (44,7%) den cut-off-Wert von $\geq 10 \mu\text{mol/l}$ überschritten, wobei der Anteil an Probanden mit tHcy-Plasmawerten $>12 \mu\text{mol/l}$ mit 16,3% geringfügig über der in der Allgemeinbevölkerung angenommenen Häufigkeit von 5-10% [STANGER et al. 2003] lag. Zwar erwies sich die sechsmonatige Verumgabe auch in diesem Fall als erfolgreich, die jeweiligen Hyperhomocysteinämie-Prävalenzen (tHcy >12 bzw. $\geq 10 \mu\text{mol/l}$) signifikant gegenüber der Einnahme des Placebopräparates zu verringern. Allerdings ließ sich bei zwei (3%) bzw. acht (12,1%) Probanden der Verumgruppe keine Absenkung der tHcy-Plasmawerte auf ≤ 12 bzw. $<10 \mu\text{mol/l}$ erreichen. Ein wesentlicher Grund hierfür könnte sein, dass die im Verumpräparat **eingesetzte Vitamin-B₁₂-Dosierung** mit $20 \mu\text{g/d}$ zu gering angesetzt war. So beobachteten QUINLIVAN et al. [2002] im Rahmen einer zweiarmigen Interventionsstudie, in der die Probanden sequentielle Folatgaben von 100-400 bzw. 500 $\mu\text{g/d}$ über einen Zeitraum von sechs Wochen erhielten, dass die Abhängigkeit des tHcy-Plasmaspiegels von der S-Folat-Konzentration mit zunehmender Folatdosierung abnimmt, während sich der determinierende Einfluss der Cbl-Serumkonzentration in umgekehrter Weise erhöht. Die Autoren folgerten hieraus, dass Vitamin B₁₂ mit steigender Folsäuredosis zum limitierenden Faktor wird, wobei der vergleichsweise geringere Beitrag zur Homocystein-Reduktion durch den Effekt der Folatsupplementierung kaschiert wird [QUINLIVAN et al. 2002]⁶⁷. Für diese Interpretation spricht auch der hier erhobene Befund, wonach die Asso-

⁶⁷ Hiermit in Zusammenhang steht das als „Methylfalle“ bekannte Phänomen, wonach ein relativer Cobalamin-Mangel zu einer Anhäufung von 5-Methyl-THF führt, während die Bereitstellung der biologisch aktiven THF infolge einer verminderten Remethylierung von Homocystein zu Methionin blockiert wird (funktionelles Folatdefizit) [HAHN et al. 2006, S. 103].

ziation zwischen der unter Verumeinnahme erzielten Abnahme des tHcy-Plasmaspiegels und der Erhöhung der Cbl-Serumwerte stärker ausfiel ($r=-0,528$, $p<0,001$), als dies zum Anstieg der S-Folat-Spiegel der Fall war ($r=-0,408$, $p=0,001$). In Übereinstimmung hierzu zeigt auch die o. g. Metaanalyse, dass die für einen additiven Homocystein-senkenden Effekt in Interventionsstudien eingesetzten Vitamin-B₁₂-Mengen die in unserer Untersuchung verabreichte Dosierung von 20 µg/d deutlich übersteigen. Demnach waren Zugaben von im Mittel 0,4 mg/d (!) erforderlich, um den tHcy-Plasmaspiegel um weitere 7%, entsprechend einem Gesamteffekt von -30% (3-4 µmol/l, bezogen auf tHcy-Ausgangswerte von 10-12 µmol/l) durch eine kombinierte Folat- und Vitamin-B₁₂-Supplementierung, zu senken [HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION 2005].

Die Beobachtung, wonach in der Verumgruppe keine Assoziation zwischen der Reduktion des tHcy-Plasmaspiegels und der Erhöhung der PLP-Plasmaswerte festzustellen war ($r=-0,092$, $p=0,461$), steht im Einklang zu den Ergebnissen aus anderen Interventionsstudien, die mehrheitlich keinen Einfluss einer **Vitamin-B₆-Gabe** (alleine oder in Kombination) auf die tHcy-Plasmakonzentration nachweisen konnten [u. a. MILLER et al. 1992; ARNADOTTIR et al. 1993; UBBINK et al. 1994; DIERKES et al. 1998; LEE et al. 2004; HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION 2005]. Wie bereits einleitend erwähnt, wird der Vitamin-B₆-Status durch den Nüchtern-tHcy-Plasmaspiegel nur unzureichend reflektiert [MILLER et al. 1992; STANGER et al. 2003] – ein Umstand, der auch in unserem Kollektiv durch die fehlende Korrelation zwischen den tHcy- und PLP-Ausgangswerten deutlich wird ($r_s=0,063$, $p=0,488$). Nach MILLER et al. [1992] kann dies u. a. darauf zurückgeführt werden, dass die Cystathionin-β-Synthase, die eine höhere PLP-Affinität im Vergleich zu anderen Vitamin-B₆-abhängigen Enzymen aufweist, selbst bei vermindertem Cofaktor-Angebot über eine für den katabolen Homocysteinabbau noch ausreichende Restaktivität verfügt. Infolgedessen gehen eingeschränkte Transsulfurierungskapazitäten, die neben Vitamin-B₆-Defiziten auch aus heterozygoten CBS-Defekten resultieren können, zwar selten mit einer Erhöhung der Nüchtern-tHcy-Plasmakonzentration, dafür aber mit einem deutlichen Homocystein-Anstieg nach oraler Methioninbelastung (oMBT) einher [UBBINK et al. 1996]. In diesem Zusammenhang konnte durch verschiedene Untersuchungen gezeigt werden, dass sich der post-Load-Anstieg des tHcy-Plasmaspiegels durch eine additive Vitamin-B₆-Gabe signifikant abschwächen lässt [DUDMAN et al. 1993; FRANKEN et al. 1994; UBBINK et al. 1996; BOSTOM et al. 1997]. Daneben existieren in der Literatur vereinzelte Studien, in denen eine Vitamin-B₆-Supplementierung mit einer Senkung der tHcy-Nüchternwerte, etwa bei hochdosierter Pyridoxingabe (120 mg/d) [MANSOOR et al. 1999] oder bei Probanden mit klinischer Vitamin-B₆-Mangelsymptomatik [LAKSHMI U. RAMALAKSHMI 1998], assoziiert war. Hieraus lässt sich folgern, dass unter den hier vorliegenden Bedingungen, d. h. bei einer noch im physiologischen Bereich angesiedelten Vitamin-B₆-Dosierung (6 mg/d, entsprechend

dem 4-5-Fachen der DGE-Zufuhrempfehlung, vgl. Tab. 7) sowie einer guten PLP-Ausgangsversorgung des Kollektivs (vgl. Kap. 5.1.3 sowie Fußnote 70), kein derartiger Zusammenhang erwartet werden konnte.

5.1.2 EFFEKT DER SUPPLEMENTIERUNG AUF DEN B-VITAMINSTATUS

Werden die Effekte der Nährstoffgabe in Hinblick auf die **absoluten Veränderungen** der B-Vitaminsparameter S-Folat, E-Folat, Cbl und PLP betrachtet, so zeigte sich eine höchst signifikante Zunahme der jeweiligen Blutspiegel, die sowohl innerhalb der Verumgruppe als auch gegenüber der Placebogruppe auftrat. Bezogen auf die Einnahme der Studienpräparate lässt sich aus dieser Beobachtung somit eine insgesamt gute **Compliance der Probanden** ableiten. Dieser Sachverhalt bestätigt sich ferner durch die im Verlauf der Verumsupplementierung aufgetretenen **relativen Erhöhungen**, die mit 273% und 266% (S-Folat bzw. E-Folat, Placebo: -0,3% bzw. +52%) sowie 70% (Cbl, Placebo: +7%) und 227% (PLP, Placebo: +20%) mehr oder weniger stark ausgeprägten Veränderungen unter Placebogabe (Werte in Klammern) gegenüberstanden. Die hierbei innerhalb der Placebogruppe feststellbaren Anstiege der E-Folat-, Cbl- und PLP-Spiegel, die sich in allen Fällen als signifikant und für E-Folat und PLP zugleich als quantitativ bedeutsam erwiesen, können vermutlich auf saisonal bedingte Effekte resp. Änderungen im Ernährungsverhalten der Probanden während der von November bis Mitte Mai dauernden Intervention zurückgeführt werden. So ließen sich auch in anderen Untersuchungen (z. T. divergierende) Schwankungen im B-Vitaminsstatus in Abhängigkeit von der Jahreszeit [BATES et al. 1999; MCKINLEY et al. 2001; HAO et al. 2003] bzw. bei identischem Interventionsdesign [WOLTERS et al. 2005] aufzeigen. Während beispielsweise MCKINLEY et al. [2001] bei Probanden, die weder Vitaminsupplemente noch angereicherte Lebensmittel konsumierten, im Frühjahr signifikant niedrigere S-Folat- und E-Folat-Konzentrationen als im Herbst und Winter ermittelten, wies die Placebogruppe des von unserer Arbeitsgruppe [WOLTERS et al. 2005] untersuchten *HANNA*-Kollektivs⁶⁸ im Frühjahr (Interventionsende April) signifikant höhere E-Folat-Gehalte bei zugleich unveränderten S-Folat-Spiegeln gegenüber Herbst (Interventionsbeginn Oktober) auf. Wenngleich die Ursache des deutlichen E-Folat-Anstiegs in der Placebogruppe spekulativ bleibt, so können aufgrund der Randomisierung wie auch der Homogenität der beiden Subgruppen in Bezug auf die allgemeinen Ernährungsgewohnheiten (vgl. Kap. 4.2.1.4) analoge Effekte in der Verumgruppe angenommen werden. Dass die unter Placebogabe feststellbaren Veränderungen der B-Vitaminspiegel im Vergleich zu den unter Nähr-

⁶⁸ Bei der *HANNA-Studie (Hannoversche Nahrungsergänzungs-Studie)* handelt es sich um eine randomisierte, placebo-kontrollierte Doppelblind-Studie, in der die Auswirkungen einer physiologisch dosierten Multivitamin-/Mineralstoff-Supplementierung auf den Nährstoffstatus gut versorgter, älterer Frauen (>60 Jahre), die ein überdurchschnittliches Bildungsniveau aufwiesen, untersucht wurden.

stoffsupplementierung erzielten Netto-Effekten (E-Folat: +214%, Cbl: +63%, PLP: +207%) keine Relevanz besitzen, wird nicht zuletzt auch daran ersichtlich, dass der tHcy-Plasmaspiegel, der den Untersuchungen von MCKINLEY et al. [2001] zufolge nicht durch saisonale Schwankungen beeinflusst wird, innerhalb der Placebogruppe geringfügig (Δ : $0,65 \pm 1,91 \mu\text{mol/l}$ bzw. 6,8%), wenn auch signifikant ($p=0,014$) angestiegen ist⁶⁹.

5.1.3 BEWERTUNG DES B-VITAMINVERSORGUNGSSTATUS VOR DER SUPPLEMENTIERUNG

In Bezug auf den qualitativen B-Vitaminstatus wies das von uns untersuchte Studienkollektiv bereits zu Beginn der Intervention - je nach Parameter und zugrunde gelegtem Grenzwert - eine unterschiedlich gute Versorgungslage auf (vgl. Tab. A25, Anhang E, S. E6). So lagen die **B-Vitamin-Ausgangswerte** des Gesamtkollektivs **im Mittel** etwa doppelt (Cbl) bzw. dreimal (S-Folat, E-Folat, PLP) so hoch, wie die für eine adäquate Bedarfsdeckung definierten und zur Beurteilung des B-Vitaminstatus in der Literatur allgemein verwendeten Normwerte. Eine gleichermaßen gute Ausgangsversorgung ließ sich ferner auf Basis der zur Homocystein-Minimierung höher angesetzten cut-off-Werte aufzeigen, die im Mittel ebenfalls deutlich überschritten wurden. Stellt man zudem die für Männer und Frauen zu T0 erhobenen B-Vitaminspiegel denen der bereits für die tHcy-Plasmawerte als Vergleichsgruppe gewählten *EPIC-Potsdam*-Subkohorte [DROGAN et al. 2004] gegenüber (vgl. Tab. A19, Anhang B), so lässt sich mit Ausnahme von PLP (im Mittel vergleichbarer Bereich) ein eindeutig günstigeres Abschneiden unserer Probanden feststellen. Gleiches traf auf den Vergleich der im Rahmen des Folsäure-Moduls des *Bundesgesundheitsveys* 1998 untersuchten Teilnehmerinnen ($n=1266$, 18-40 Jahre) zu, deren Folatgehalte in Serum und Erythrozyten im Median bei 17 nmol/l ($7,6 \mu\text{g/l}$, 25-95 Perzentile $5,9-9,8 \mu\text{g/l}$) und $0,60 \mu\text{mol/l}$ ($266 \mu\text{g/l}$, 25-95 Perzentile $218-327 \mu\text{g/l}$) lagen [THAMM et al. 1999]. Dieses Ergebnis ist insofern erstaunlich, als dass Frauen im gebärfähigen Alter eine stärker sensibilisierte Gruppe in Hinblick auf die Verwendung von Folsäuresupplementen repräsentieren (sollten). Die in unserer Untersuchung auffallend hohen, über eine alimentäre Folatzufuhr nur schwer zu realisierenden E-Folat-Spiegel, sprechen überdies dafür, dass die Probanden angesichts der zum Bundesdurchschnitt (Männer: 37,8%, Frauen: 48,1% [BEITZ et al. 2002]) vergleichsweise höheren Einnahmeprävalenz von Nahrungsergänzungsmitteln (Männer: 41,8%, Frauen: 58,9%, vgl. Kap. 4.2.1.4) offenbar nur unzureichend depletiert waren bzw. die üblicherweise verwendeten Supplemente verspätet abgesetzt wurden.

⁶⁹ Wie unter Kap. 4.2.2.1 im Rahmen der Kovarianzanalyse gezeigt, handelte es sich hierbei um einen Effekt, der in Zusammenhang mit der Erhöhung der mittleren Creatinin-Serumwerte resp. Veränderungen der Nierenfunktion innerhalb der Subgruppen Verum und Placebo (vgl. Kap. 4.2.5) stand.

Ein differenzierteres Bild ergab sich, wenn die in Tab. A25, Anhang E, angegebenen Prävalenzen für eine defizitäre Versorgungssituation, gemessen an der **Unterschreitung der cut-off-Werte**, betrachtet wurden. Während das Gesamtkollektiv die zur Bedarfsdeckung veranschlagten Grenzwerte bis auf wenige Ausnahmen (S-Folat: 0,8%, Cbl: 3,3%, PLP: 4,9%) erreichte, wies mit einem Anteil von 52,5 und 46,3% (nahezu) jeder zweite Proband eine in Hinblick auf die Homocystein-Minimierung suboptimale Versorgung mit S-Folat bzw. Cobalamin auf. Von einem entsprechenden E-Folat- und PLP-Defizit⁷⁰ waren demgegenüber vergleichsweise weniger Studienteilnehmer (10,7 bzw. 9,8%) betroffen. Wie bereits unter Kap. 5.1.1 beschrieben, deckt sich dieser Befund mit der Beobachtung, wonach die mit der Verumgabe einhergehende Senkung der tHcy-Plasmakonzentration wesentlich stärker mit den (diesbezüglich noch weiter zu optimierenden) S-Folat- und Cbl-Ausgangsspiegeln korrelierte, als dies für die E-Folat- und PLP-Basalwerte der Fall war.

Des Weiteren könnten die auf diese Weise sichtbar werdenden Versorgungsunterschiede als Erklärung dafür dienen, weshalb Probanden mit initial schlechterem S-Folatstatus in größerem Ausmaß von der Supplementierung profitierten (T0-Wert vs. T6-T0-Differenzen: $r_s = -0,332$, $p = 0,009$), während für E-Folat und PLP aufgrund der insgesamt besseren Ausgangslage kein derartiger Effekt abzuleiten war. Hiervon ausgehend überrascht allerdings das Ergebnis, wonach der durch die Verumgabe induzierte Anstieg der Cbl-Serumkonzentration ebenfalls unabhängig von den Cbl-Ausgangswerten war. Im Gegensatz zu Folsäure, deren alimentäre Zufuhr in der Allgemeinbevölkerung bekanntermaßen als kritisch anzusehen ist, lässt sich dies möglicherweise darauf zurückführen, dass in der Verumgruppe neben der über das Studienpräparat verabreichten Dosierung absolut wie auch relativ gesehen ausreichende Vitamin-B₁₂-Mengen aus der Nahrung aufgenommen wurden. Diese Annahme erscheint auch insofern plausibel, als dass altersassoziierte Vitamin-B₁₂-Defizite vornehmlich aus der mit höherem Lebensalter steigenden Prävalenz einer atrophischen Gastritis⁷¹ und den damit verbundenen Resorptionsstörungen (verminderte intestinale Vitamin-B₁₂-Freisetzung und -Absorption) einhergehen [STANGER et al. 2003; WOLTERS et al. 2004b]. Aus diesem Sachverhalt begründet sich einerseits die in Studien mit älteren Kollektiven fehlende Assoziation zwischen der Nahrungszufuhr und dem Cobalaminstatus [HOWARD et al. 1998; WOLTERS et al. 2003]. Andererseits erklärt dies auch, weshalb der Anteil suboptimal versorgter Probanden, der mit der Prävalenz erniedrigter Cbl-Serumwerte

⁷⁰ Unabhängig von der zu diskutierenden Eignung des PLP-Grenzwertes hinsichtlich der tatsächlichen Senkung der tHcy-Nüchternwerte, war die diesbezügliche Prävalenz eines PLP-Defizits weitaus geringer, als sie auf Basis eines cut-off-Wertes <20 nmol/l mit einem Viertel der älteren, nicht-institutionalisierten Personen in europäischen Populationen angegeben wird [BATES et al. 1999].

⁷¹ Nach WOLTERS et al. [2004 b] kommt der sich zumeist auf dem Boden einer atrophischen Gastritis vom Typ B manifestierenden Abnahme der gastralen Pepsinogen- und HCl-Sekretion sowie fortgeschritten einem Mangel an Intrinsic-Factor die größte Bedeutung für die Ätiopathogenese eines Vitamin-B₁₂-Mangels bei Senioren zu.

(<258 pmol/l) in der *Framingham*-Kohorte (40,5% [LINDENBAUM et al. 1994]) sowie dem *HANNA*-Kollektiv (42,9% [WOLTERS et al. 2003]) weitgehend übereinstimmte, in der von uns untersuchten Studiengruppe relativ hoch ausfiel.

Wie im 2006 veröffentlichten DGE-Positionspapier [KRAWINKEL et al. 2006] zur Verbesserung der Folsäureversorgung in Deutschland konstatiert wurde, fehlt es indessen an Daten, die eine Beurteilung des Folatstatus hinsichtlich des Auftretens funktioneller Defizite in der Bevölkerung erlauben. Nach KRAWINKEL et al. [2006] ist allerdings davon auszugehen, dass klinisch-hämatologische Mangelerscheinungen (Leitysymptom: megaloblastäre Anämie) und damit unter der üblichen Normgrenze liegende Folatspiegel bei der in Deutschland derzeit üblichen Folsäurezufuhr (d. h. ohne obligatorische Fortifizierung von Grundnahrungsmitteln) nur selten in Erscheinung treten, während die für eine maximale Homocystein-Reduktion erforderlichen Folatgehalte in Serum und Erythrozyten nicht erreicht werden. Dass sich demnach auch bei (vermeintlich) gut versorgten Personen eine weitere Absenkung des tHcy-Plasmaspiegels durch eine additive Folsäuregabe erreichen lässt, ließ sich in Übereinstimmung mit der Literatur [BOSTOM et al. 2001; BAILEY et al. 2003; HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION 2005] auch in unserer Untersuchung bestätigen. Für eine in Hinblick auf intrazelluläre Funktionsabläufe adäquate Folatversorgung wäre demnach zu fordern, dass der diesbezüglich für Homocystein anzustrebende Zielwert geringer (8-9 $\mu\text{mol/l}$) als die in der Praxis aus präventiver Sicht übliche Grenze (<10 bzw. $\leq 12 \mu\text{mol/l}$) anzusetzen ist.

5.1.4 ZUSAMMENFASSUNG UND ZWISCHENFAZIT

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse stehen mit der Literatur insoweit in Konsens, als dass der Rahmen einer durch B-Vitamine induzierbaren Homocystein-Senkung unter (1) Berücksichtigung des Folsäureeffekts und (2) der im Mittel vergleichsweise niedrigen tHcy-Ausgangsspiegel bzw. (3) insgesamt guten B-Vitaminversorgung des Kollektivs maximal ausgeschöpft wurde. So entsprach die über das Verumpräparat verabreichte Folatmenge von 800 $\mu\text{g/d}$ der niedrigsten Dosierung, die metaanalytischen Berechnungen zufolge mit der größtmöglichen Effektivität einhergeht. Des Weiteren erwies sich die Vitamin-B₁₂-Supplementierung als erfolgreich, den tHcy-Plasmaspiegel zu senken, wenngleich der auf die Gesamtreduktion bezogene Beitrag durch die mit der Folatgabe assoziierte Homocystein-Abnahme überlagert wurde. Für einen additiven Homocystein-senkenden Effekt, wie er sich metaanalytischen Berechnungen zufolge durch vergleichsweise höhere Vitamin-B₁₂-Mengen erzielen lässt (~7% bei einer Zufuhr von durchschnittlich 0,4 mg/d), erwies sich die hier eingesetzte Vitamin-B₁₂-Dosierung mit 20 $\mu\text{g/d}$ allerdings als zu gering angesetzt. Aufgrund der inkonsistenten Datenlage wie auch der fehlenden Korrelation zwischen der Ab-

und Zunahme der tHcy- bzw. PLP-Plasmawerte in der Verumgruppe erscheint eine Steigerung der Vitamin-B₆-Dosis hingegen als nicht geeignet, um die Effektivität der Supplementierung weiter zu erhöhen. Unabhängig von der Frage der Vitamin-Dosierung ist zu vermuten, dass das Ausmaß der absoluten Homocystein-Senkung, bedingt durch die relativ gute Versorgungssituation der untersuchten Probanden, zu gering ausfiel, um Auswirkungen auf den ADMA-Plasmaspiegel beobachten zu können. Demnach könnte es sich hier um eine ähnliche Situation handeln, wie sie aufgrund der Verbesserung der Folatversorgung in Ländern mit gesetzlicher Fortifikation (USA, Kanada) für das Fehlen eines Effekts auf kardiovaskuläre Endpunkte in entsprechenden Interventionsstudien (speziell *VISP*, *HOPE-2*, *WACS*)⁷² angenommen wird [BOSTOM et al. 2001; BAILEY et al. 2003; MOAT et al. 2004].

⁷² Nach BOSTOM et al. [2001] ist die statistische Power und damit Aussagekraft der genannten Studien, die vor Einführung der in den USA und Kanada seit 01.01.1998 gesetzlich verbindlichen Folatfortifizierung konzipiert wurden, dadurch vermindert, dass in Hinblick auf die mittlere Homocystein-Abnahme lediglich 20-25% (1,0-1,5 µmol/l) des ursprünglich für die Fallzahlschätzung zugrunde gelegten Behandlungseffekts (4,0-6,0 µmol/l) erreicht wurden.

5.2 OXIDIERTES LDL UND ASSOZIIERTE ANTIOXIDANZIENPARAMETER

In Ergänzung zur „Response-to-injury-Hypothese“, die die Inflammation als Dreh- und Angelpunkt des atherosklerotischen Geschehens betrachtet, hat sich das Modell der Atheroskleroseentstehung in den vergangenen Jahrzehnten dahingehend erweitert, dass der erstmals durch STEINBERG et al. [1989] formulierten Theorie der oxidativen Modifikation von LDL-Lipoproteinen („oxidative modification hypothesis“) ein ebenso bedeutender Stellenwert eingeräumt wird. Aufbauend auf den Arbeiten von BROWN U. GOLDSTEIN [1983], die – gestützt durch eine breite Basis epidemiologischer und klinischer Daten – die Hypercholesterolämie als den für die Atherogenese zentralen pathogenetischen Faktor hervorhebt, fokussiert das vorgenannte Modell auf dem Ansatz, wonach LDL-Partikel ihre Atherogenität erst durch radikalvermittelte, im subendothelialen Raum stattfindende Oxidationsvorgänge erwerben. So verfügen oxLDL – je nach Oxidationsgrad⁷³ – über ein breites, proatherogenes Wirkungsspektrum, über welches sie den Prozess der Plaquebildung auf verschiedenen Ebenen (vgl. Kap. 2.1.2.2, Abb. 3) unterhalten [BRIGELIUS-FLOHE´ 2002, S. 437; STOCKER U. KEANEY 2004; SCHRÖDER 2004]. Neben zahlreichen experimentellen Befunden wird die „LDL-Oxidationshypothese“ inzwischen auch durch Daten aus Querschnitts- und Fall-Kontrollstudien bekräftigt, nach denen KHK-Patienten und Personen mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko signifikant höhere Konzentrationen an zirkulierendem oxLDL im Vergleich zu gesunden Kontrollen aufweisen [u. a. HOLVOET et al. 1998; 2001; KOPPRASCH et al. 2002; SIGURDARDOTTIR 2002; HOLVOET et al. 2004]. Auch legen prospektive Studien die Bedeutung eines erhöhten oxLDL-Plasmaspiegels als Prädiktor für zukünftige Koronarereignisse nahe [HOLVOET et al. 2000; NORDIN et al. 2003; MEISINGER et al. 2005]. Demgegenüber konnten WU et al. [2006] im Rahmen einer gepoolten Analyse der *Nurses' Health* und *Health Professionals Follow-Up Study* (n=1503) keine unabhängige Beziehung nach Adjustierung um weitere Risikovariablen (u. a. Blutlipide, TC/HDL-Quotient, Apo B) aufzeigen.

Vor diesem Hintergrund erscheint es daher mehr als naheliegend, dass der atherogene Prozess durch eine vermehrte Zufuhr antioxidativ wirksamer Substanzen positiv zu beeinflussen ist. Das Prinzip einer Antioxidanzien-Substitution gründet dabei auf dem Rational, wonach die antioxidative Kapazität, definiert als Summe der endo- und exogen verfügbaren antioxidativen Schutzmechanismen [BIESALSKI et al. 1997], über die alimentäre Zufuhr modu-

⁷³ In diesem Zusammenhang wird zwischen oxidativen Veränderungen, die vornehmlich den Lipidanteil einschließlich der Depletion des Antioxidanziengehalts (minimally oxidized LDL) sowie solchen, die zusätzlich den Apo-B₁₀₀-Anteil betreffen (highly oxidized LDL), unterschieden. Letztere Modifikationen sind insofern von besonderer Bedeutung, als dass sich hierdurch die Affinität der oxLDL gegenüber Scavenger-Rezeptoren, deren Expression nicht der negativen Feedback-Kontrolle über den intrazellulären Cholesterolgehalt unterliegt, erhöht [STOCKER U. KEANEY 2004; TSIMIKAS 2006].

liert und oxidative Vorgänge hierdurch diätetisch beeinflusst werden können. In Übereinstimmung hierzu fanden sich *in vitro* protektive Effekte von Antioxidanzien – im Speziellen Vitamin E – auf einzelne Teilsysteme des atherosklerotischen Geschehens, im Besonderen auf die LDL-Oxidierbarkeit *ex vivo* [SIEKMEIER et al. 2007; LAPOINTE et al. 2006]. Ein entsprechend präventives Potenzial wird ferner durch zahlreiche Beobachtungsstudien untermauert, die eine inverse Beziehung zwischen dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse und dem Antioxidanzienstatus *in vivo* erkennen lassen [u. a. RIEMERSMA et al. 1991; GEY et al. 1991; 1993; GALE et al. 1995; GEY 1998; KHAW et al. 2001]. Obwohl unklar ist, inwieweit dieser Zusammenhang ursächlich auf den Plasmagehalt einzelner Antioxidanzien zurückgeführt werden kann oder dieser vielmehr einen Indikator für einen gesundheitsbewussteren Lebensstil darstellt, bilden diese Daten die Grundlage für die in der Primärprävention aus Sicht einiger Autoren [BIESALSKI et al. 1997; GEY 1998] anzustrebenden Antioxidanzien-Plasmaspiegel. Biochemischer Plausibilität und positiven Befunden aus Kohortenstudien, die für einen protektiven Effekt einer erhöhten Antioxidanzienzufuhr sprechen [vgl. Metaanalyse von HOOPER et al. 2001], stehen nunmehr ernüchternde Resultate aus Interventionsstudien sowie ersten gepoolten Analysen gegenüber, die den primär- und sekundärpräventiven Nutzen einzelner oder in Kombination verabreichter Antioxidanzien mehr und mehr in Frage stellen [Übersicht bei STOCKER u. KEANEY 2004; KRIS-ETHERTON et al. 2004; LAPOINTE et al. 2006; SIEKMEIER et al. 2007].

5.2.1 EFFEKT DER SUPPLEMENTIERUNG AUF DEN oxLDL-SERUMSPIEGEL

Im Verlauf unserer Studie verzeichnete das Gesamtkollektiv eine signifikante Abnahme der mittleren oxLDL-Serumkonzentration, die sich jedoch als unabhängig von der Verabreichung des Verum- bzw. Placebopräparates herausstellte. So ließ sich in beiden Untersuchungsgruppen eine jeweils höchst signifikante Reduktion des oxLDL-Serumspiegels zwischen T0 und T6 beobachten, wobei der oxLDL-Abfall unter Placeboeinnahme sogar geringfügig stärker (Δ : $-9,2 \pm 11$ U/l bzw. $-12,6\%$) als unter Gabe von Verum (Δ : $-7,3 \pm 12$ U/l bzw. $-10,6\%$) ausfiel. Dass die sechsmonatige Antioxidanzien-supplementierung demnach offenbar keinen Einfluss auf die Konzentration an zirkulierendem oxLDL hatte, bestätigte sich ferner durch die Beobachtung, wonach weder der TEAC-Anstieg noch die Erhöhung der α -Tocopherol-Serumwerte mit der Senkung des oxLDL-Serumspiegels innerhalb der Verumgruppe korrelierte. Auch konnten zum Zeitpunkt T0 keine Assoziationen zwischen den oxLDL-Serumwerten und der TEAC sowie dem α -Tocopherolstatus (lipidkorrigierte bzw. unbereinigte AT-Serumwerte nach partieller Korrelation um den TC- und TG-Spiegel) des Gesamtkollektivs festgestellt werden.

Zur Ermittlung von Oxidationsprozessen an LDL-Lipoproteinen wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Methoden etabliert. Ein zur Messung des Schutzeffekts von Antioxidanzien weit verbreitetes Verfahren stellt der ursprünglich von ESTERBAUER et al. [1989] entwickelte *Ex-vivo*-Assay der **Kupfer-katalysierten LDL-Oxidation** dar [LAPOINTE et al. 2006; ITABE U. UEDA 2007]. Wie bereits einleitend angeführt, ließen sich in einer Reihe von Humanstudien überwiegend positive Effekte auf verschiedene Parameter der LDL-Oxidationskinetik (Verlängerung der lag-time⁷⁴, Verminderung der Propagations- und maximalen Oxidationsrate) nach Supplementierung mit Vitamin E (minimale Dosis: 400 I.E. bzw. 268 mg TÄ/d [Übersicht bei LAPOINTE et al. 2006]) sowie verschiedenen Antioxidanzienkombinationen [u. a. ABBEY et al. 1993; WOODSIDE et al. 1999; ANDERSON et al. 1999; BUNOUT et al. 2000; EARNEST et al. 2003] aufzeigen. Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass der *Ex-vivo*-Assay – nicht wie häufig suggeriert – allenfalls indirekte Rückschlüsse auf die im Plasma vorhandene oxLDL-Konzentration, etwa durch eine verstärkte LDL-Oxidationsneigung bei erhöhtem Lipidperoxidgehalt, erlaubt. Auch muss die Übertragbarkeit auf *In-vivo*-Verhältnisse aufgrund der unphysiologisch hohen Cu²⁺-Konzentrationen (Labor-Artefakte?) sowie des heterogenen Spektrums oxidiertes LDL-Spezies fraglich bleiben [ITABE U. UEDA 2007; LAPOINTE et al. 2006; TSIMIKAS 2006].

In der neueren Literatur finden daher zunehmend immunologische Verfahren Verwendung, die es ermöglichen, die **Konzentration zirkulierender oxLDL** sowohl indirekt (Messung von oxLDL-Autoantikörper-Titern) als auch direkt (Markierung von oxidationsspezifischen LDL-Epitopen durch monoklonale Antikörper, mAb) zu bestimmen [Übersicht bei TSIMIKAS 2006; ITABE U. UEDA 2007]. Neben den bereits erwähnten Fall-Kontroll- und prospektiven Kohortenstudien, die einen prädiktiven Aussagewert der direkten oxLDL-Bestimmung in Hinblick auf das KHK-Risiko nahelegen, liegen inzwischen erste, vorwiegend kleinere Untersuchungen vor, in denen die Effekte einer Antioxidanzien-supplementierung auf die Konzentration zirkulierender oxLDL u. a. mit Hilfe des hier verwendeten *Mercodia oxLDL ELISA* (mAb-4E6, vgl. Anhang C) überprüft wurden.

Wie Tab. 28 verdeutlicht, stimmen die bisher publizierten Ergebnisse placebo-kontrollierter Interventionsstudien mit unseren Daten [SCHMITT et al. 2007] dahingehend überein, dass weder moderate noch hochdosierte Nährstoffgaben trotz deutlicher Erhöhung der Antioxidanzienpiegel (nicht gezeigt) sowie z. T. signifikanter Verbesserung weiterer Oxidationsmarker keine Senkung der oxLDL-Plasmakonzentration bewirkten. So wurde bei dialyse-

⁷⁴ Die lag-time entspricht der Zeit zwischen der Cu²⁺-Zugabe und dem Beginn der Lipidperoxidation, deren Dauer direkt proportional zum Antioxidanziengehalt bzw. der antioxidativen Kapazität der LDL-Partikel ist. Eine Verzögerung der lag-Phase ist demnach mit einer erhöhten LDL-Oxidationsresistenz gleichzusetzen [LAPOINTE et al. 2006].

pflichtigen Probanden, die im Rahmen eines vierarmigen Interventionsdesigns täglich 40 mg Atorvastatin in Kombination mit 800 I.E. (537 mg TÄ) α -Tocopherol (Gruppe 3) einnahmen, zwar ein zusätzlicher Benefit der Vitamin-E-Gabe in Form einer signifikanten Verzögerung der lag-time nachgewiesen; das Ausmaß der hierbei zu beobachtenden, signifikanten oxLDL-Abnahme unterschied sich im Gegensatz zur LDL-Oxidierbarkeit allerdings nicht vom Effekt der alleinigen Statin-Einnahme (Gruppe 1). Bei Teilnehmern, die ausschließlich Vitamin E verabreicht bekamen (Gruppe 2), wurde demgegenüber sogar ein signifikanter Anstieg der oxLDL-Plasmawerte verzeichnet, obwohl sich die LDL-Oxidationsresistenz im *Ex-vivo*-Versuch auch hier verbesserte ($p=0,051$) [DIEPEVEEN et al. 2005].

Eine ähnliche Diskrepanz zwischen *In-vitro*- und *In-vivo*-Befunden ergab ein dreiarmer Parallel-Gruppenvergleich [UPRITCHARD et al. 2003], bei dem gesunde Probanden eine moderat dosierte Kombination aus Vitamin E und verschiedenen Carotinoiden (Lutein, Lycopin, α - und β -Carotin) in Form von zwei unterschiedlich angereicherten Brotaufstrichen bzw. einen carotinoidfreien Streichfettersatz mit geringem Vitamin-E-Gehalt (Kontrollgruppe) erhielten. Am Ende der Intervention waren weder innerhalb noch zwischen den Gruppen signifikante Veränderungen der oxLDL-Plasmawerte festzustellen, obwohl der Verzehr der fortifizierten Aufstriche auch hier mit einer dosisabhängigen Verbesserung der *Ex-vivo*-Parameter FRAP-LDL und lag-time (Gruppe 1 und 2: jeweils $p<0,05$ vs. Gruppe 3), mit einem Trend zu steigenden FRAP-Plasmawerten sowie einer Reduktion der $F_{2\alpha}$ -Isoprostan-Plasmakonzentration⁷⁵ ($F_{2\alpha}$ -ISP, Gruppe 2: $p<0,05$ vs. Gruppe 3) einherging.

Inwieweit in den Untersuchungen von DIEPEVEEN et al. [2005] und UPRITCHARD et al. [2003] Assoziationen zwischen den oxLDL-Plasmaspiegeln und den jeweils angeführten Parametern bzw. ihren Veränderungen bestanden haben, kann aufgrund fehlender Angaben zu möglichen Korrelationen nicht beantwortet werden. In anderen Studien fanden sich demgegenüber selbst nach z. T. hochdosierter Gabe von Vitamin C (0,5-3 g/d) alleine [LU et al. 2005; VAN HOYDONCK et al. 2004] oder in Kombination mit Vitamin E [ENGLER et al. 2003 (vgl. auch Kap. 5.3.2); KINLAY et al. 2004] weder Auswirkungen auf die oxLDL-Plasmawerte noch auf andere Oxidationsmarker.

Eine signifikante Senkung des oxLDL-Plasmaspiegels konnte bislang dagegen nur in zwei unkontrollierten Pilotstudien einer kanadischen Arbeitsgruppe [RUEL et al. 2005; 2008] gezeigt werden, deren Aussagekraft in Hinblick auf mögliche Effekte einer Cranberrysaft-Intervention angesichts zahlreicher methodischer Mängel fraglich ist. So muss aufgrund der fehlenden Kontrollgruppe offen bleiben, inwieweit die jeweils zu beobachtenden oxLDL-

⁷⁵ Marker der Lipidperoxidation

Abnahmen tatsächlich auf den Verzehr des Saftes und nicht auf andere Faktoren zurückgeführt werden können, zumal die signifikante oxLDL-Senkung innerhalb unserer Placebogruppe die Notwendigkeit eines placebo-kontrollierten Studiendesigns unterstreicht. Obwohl ein direkter Vergleich mit Blick auf die zweiwöchige (!) Interventionsdauer und des in seiner stofflichen Zusammensetzung nicht näher spezifizierten Saftes nur sehr eingeschränkt möglich ist, ergab der erste Pilotversuch Parallelen zu unseren Ergebnissen: Weder konnten zwischen den initialen oxLDL- und TEAC-Werten noch zwischen den in Tab. 28 dargestellten Differenzen beider Parameter, deren relatives Ausmaß in etwa den Veränderungen innerhalb unserer Verumgruppe entsprachen, signifikante Korrelationen festgestellt werden. Die Folgeuntersuchung lässt demgegenüber jegliche Angaben zum Einfluss der Intervention auf den antioxidativen Status vermissen, was auch vor dem Hintergrund der Bioverfügbarkeit der antioxidativ wirksamen Saftinhaltsstoffe als weitere Limitation zu werten ist.

In Ergänzung zu Tab. 28 sei an dieser Stelle eine von CHANG et al. [2007] durchgeführte Studie erwähnt, in der sich eine nicht signifikante Senkung der medianen oxLDL-Plasmakonzentration unter Supplementierung mit α -Liponsäure (600 mg/d, Kontrollarm: ohne Intervention) zeigte. Diese Untersuchung, die auf einer möglichen Beeinflussung der ADMA-Plasmakonzentration bei diabetischen Hämodialyse-Patienten fokussiert, wird unter Kap. 5.3.2 detailliert erörtert.

Tab. 28: Ergebnisse bisheriger Humansstudien zum Einfluss einer Antioxidanzisupplementierung auf die oxLDL-Konzentration *in vivo*

Kollektiv	Interventionsart (Dosis/d) und -dauer	Effekt	Referenz
placebo-kontrolliert			
gesunde Nichtraucher (n=97)	Gr. 1: 43 mg Vit. E, 0,45 mg Carotinoide Gr. 2: 111 mg Vit. E, 1,24 mg Carotinoide Gr. 3: 1,3 mg Vit. E für 11 Wochen	\leftrightarrow Plasma-oxLDL* Gr. 1, Gr. 2: \uparrow lag-time, \uparrow LDL-FRAP ⁷⁶ Gr. 2: \downarrow F _{2α} -ISP (\uparrow) Plasma-FRAP	UPRITCHARD et al. 2003
Kinder mit familiärer Hypercholesterol-/kombinierter Hyperlipidämie (n=15)	500 mg Vit. C, 400 I.E. Vit. E + lipidsenk. Diät im <i>cross-over</i> mit Placebo + lipidsenk. Diät für je 6 Wochen	\leftrightarrow Plasma-oxLDL [#] , \leftrightarrow oxLDL-AAK-Titer, \leftrightarrow F _{2α} -ISP, \leftrightarrow 8-OH-2'-dG (Urin) ⁷⁷	ENGLER et al. 2003
gesunde, männliche Raucher (n=34)	500 mg Vit. C im <i>cross-over</i> mit Placebo für je 4 Wochen	\leftrightarrow Plasma-oxLDL [§] , \leftrightarrow MDA	VAN HOYDONCK et al. 2004

⁷⁶ Der FRAP-LDL-Wert entspricht der eisenreduzierenden Fähigkeit und damit antioxidativen Kapazität der LDL, analog zur Bestimmung im Plasma (Plasma-FRAP).

⁷⁷ 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin; Hauptmetabolit der DNA-Oxidation mit mutagenem Potenzial.

Fortsetzung Tab. 28:

KHK-Patienten (<i>n</i> =30)	<u>Gr. 1:</u> 800 I.E. Vit. E, 1 g Vit. C <u>Gr. 2:</u> Placebo für 6 Monate	↔ Plasma-oxLDL, ↔ oxLDL-AAK-Titer, (↓) F _{2α} -ISP	KINLAY et al. 2004 (abstract)
dialysepflichtige Nichtdiabetiker ohne manifeste Athero- sklerose (<i>n</i> =44)	<u>Gr. 1:</u> 40 mg Atorvastatin + Placebo <u>Gr. 2:</u> 800 I.E. Vit. E + Placebo <u>Gr. 3:</u> 40 mg Atorvastatin + 800 I.E. Vit. E <u>Gr. 4:</u> Placebo + Placebo für 12 Wochen	<u>Gr. 1:</u> ↓ Plasma-oxLDL [*] (Δ:-29% vs. T0, <i>p</i> =0,001), ↔ lag-time <u>Gr. 2:</u> ↑ Plasma-oxLDL (Δ:+17% vs. T0, <i>p</i> =0,015), (↑) lag-time <u>Gr. 3:</u> ↓ Plasma-oxLDL (Δ:-28% vs. T0, <i>p</i> =0,004), ↑ lag-time	DIEPEVEEN et al. 2005
Typ-2-Diabetiker (<i>n</i> =17)	3 g Vit. C <u>im cross-over</u> mit Placebo für je 2 Wochen	↔ Plasma-oxLDL [*]	LU et al. 2005
gesunde Probanden mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko (<i>n</i> =123)	<u>Gr. 1:</u> 80 mg Vit. E, 500 mg Vit. C, 15 mg Zink, 80 µg Selen, 30 mg Q ₁₀ , 3 mg Carotinoide, 2 mg Lycopin, 50 mg Polyphenole <u>Gr. 2:</u> Placebo für 6 Monate	<u>Gr. 1:</u> ↓ Plasma-oxLDL [*] (Δ:-10,6% vs. T0, <i>p</i> =0,001), ↑ TEAC (Δ:+1,7% vs. T0, <i>p</i> =0,022) <u>Gr. 2:</u> ↓ Plasma-oxLDL (Δ:-12,6% vs. T0, <i>p</i> <0,001), ↔ TEAC	SCHMITT et al. 2007
unkontrolliert (Pilotstudien)			
gesunde männliche Probanden (<i>n</i> =21)	7 ml/kg KG (~600 ml) Cranberrysaft für 2 Wochen	↓ Plasma-oxLDL [†] (Δ:-9,9% vs. T0, <i>p</i> <0,05), ↑ TEAC (Δ:+6,5% vs. T0, <i>p</i> <0,05)	RUEL et al. 2005
männliche Probanden mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko (<i>n</i> =30)	125, 250, 500 ml Cranberry-Saft <u>aufeinanderfolgend</u> für je 4 Wochen	<u>250 ml:</u> ↓ Plasma-oxLDL [†] (Δ:-5,5% vs. T0, <i>p</i> <0,05) <u>500 ml:</u> ↓ Plasma-oxLDL (Δ:-20,7% vs. T0, <i>p</i> <0,001)	RUEL et al. 2008

* *Mercodia* ELISA-Kit (mAb-4E6), § Methode nach Holvoet (mAb-4E6), # Methode nach Witztum (mAb E06)

† ALPCO ELISA-Kit (mAb-4E6)

Ob bzw. inwieweit die oxLDL-Plasmakonzentration durch eine additive Antioxidanzengabe zu senken ist, lässt sich trotz des fehlenden Effekts in unserer Untersuchung sowie der wenigen, bisher vorliegenden Daten nicht abschließend beurteilen. So können mögliche **Ursachen für die negativen Resultate** u. a. darin zu sehen sein, dass (1) je nach verwendetem ELISA bzw. Ausrichtung des monoklonalen Antikörpers gegenüber oxidations-

spezifischen Epitopen⁷⁸ nur Subfraktionen und nicht der oxLDL-Gesamtgehalt erfasst wird [ITABE U. UEDA 2007], (2) zirkulierende oxLDL vornehmlich der Freisetzung aus ruptierten Plaques und damit aus dem lipophilen Umfeld der Arterienwand resp. Oxidationsvorgängen im Bereich des Subendothels entstammen [VAN HOYDONCK et al. 2004; TSIMIKAS 2006; LAPOINTE et al. 2006] und (3) die in Plasma/Serum vorhandenen oxLDL hauptsächlich minimal modifizierte Partikel verkörpern, während hochoxidierte LDL⁷⁹ einer raschen Clearance (binnen weniger Minuten) über das reticuloendotheliale System unterliegen [TSIMIKAS 2006].

Des Weiteren ist im Zusammenhang mit dem hier eingesetzten *Mercodia oxLDL ELISA* von Bedeutung, dass oxLDL-Spiegel, die mit Hilfe mAb-4E6-gestützter Assays quantifiziert werden, eng mit der LDL-Konzentration korrelieren ($r=0,65-0,77$ [NORDIN et al. 2003; TSIMIKAS 2006]) sind. Nach TSIMIKAS [2006] sind entsprechende Assays daher mit dem Nachteil behaftet, dass ihre Spezifität in Hinblick auf die Unterscheidung zwischen Veränderungen der oxLDL- und LDL-Konzentration als gering einzustufen ist. Da auch in dem hier untersuchten Teilkollektiv ($n=73$) eine ähnlich ausgeprägte Assoziation zwischen den oxLDL- und LDL-Serumspiegeln (T0: $r=0,675$, $p<0,001$, T6-T0: $r=0,468$, $p<0,001$) vorlag, ist anzunehmen, dass sich der unter Verum- und Placebogabe zu beobachtende oxLDL-Abfall auf die in beiden Subgruppen ebenfalls feststellbaren, wenn auch durch den Ausschluss von Probanden mit hypolipidämischer Medikation⁸⁰ im Mittel geringen LDL-Abnahmen (vgl. Tab. A6, Anhang B) zurückführen lässt. Dabei sei angemerkt, dass sich auch bei Überprüfung der LDL-bereinigten oxLDL-Serumspiegel (**oxLDL/LDL-Quotient**, vgl. Tab. A20) und ihrer Veränderungen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Interventionsgruppen ergaben.

5.2.2 EFFEKT DER SUPPLEMENTIERUNG AUF DEN ANTIOXIDATIVEN STATUS

Die Bestimmung der **antioxidativen Plasmakapazität** erfolgte mit der Intention, eine Beurteilung des Effekts der Verumgabe hinsichtlich der darin enthaltenen antioxidativen Verbindungen (Vitamin E, Vitamin C, Zink, Selen, Coenzym Q₁₀, Carotinoide, Lycopin, Polyphenole) und ihrer synergistischen Wirkung treffen zu können. Dabei stellt der hier verwendete **TEAC-Test**, der v. a. zur Charakterisierung des antioxidativen Potenzials von Lebensmitteln und Getränken breite Anwendung findet [u. a. PROTEGGENTE et al. 2002; MARTÍNEZ-TOMÉ et al. 2004; DE BEER et al. 2006; SEERAM et al. 2008], eine in klinischen Studien häufig eingesetzte Methode zur Erfassung des Redoxstatus *in vivo* dar.

⁷⁸ z. B. Aldehyd-substituiertes Apo B₁₀₀ (mAb-4E6), oxidiertes Phosphatidylcholin (mAb-E06).

⁷⁹ vgl. Fußnote 73

⁸⁰ Durch dieses Vorgehen sollten zudem speziell mit der Einnahme von Statinen assoziierte, antioxidative Effekte ausgeschlossen werden.

Insgesamt ließen sich in unserer Untersuchung lediglich geringe Effekte der sechsmonatigen Antioxidanzisupplementierung auf die antioxidative Kapazität im Nüchternplasma feststellen: Zwar war die Einnahme des Verumpräparates mit einem signifikanten TEAC-Anstieg (Δ : $39,32 \pm 136,5 \mu\text{mol/l}$, $p=0,022$) verbunden; zu T6 erreichte der Unterschied zur Placebogabe, unter der sich die TEAC-Werte ebenfalls geringfügig erhöhten (Δ : $8,98 \pm 97,2 \mu\text{mol/l}$, $p=0,488$), allerdings nur einen Trend zur Signifikanz ($p=0,064$). Auch erwies sich der Unterschied zwischen den T6-T0-Differenzen beider Subgruppen als nicht signifikant ($p=0,164$). Unabhängig davon ist die Frage zu stellen, inwieweit die unter Verumsupplementierung erzielte TEAC-Erhöhung, die einer relativen Zunahme um 1,7% entsprach, klinisch relevante Effekte widerspiegelt bzw. der Assay als solcher sensitiv genug ist, um Veränderungen durch exogene Antioxidanzen anzuzeigen. So konnten auch in anderen Untersuchungen allenfalls moderate Anstiege der TEAC-Werte [ARENDE et al. 2001; WOUTERS-WESSELING et al. 2003] bzw. keine Effekte [BÖHM U. BITSCH 1999; DRAGSTEDT et al. 2004; ARENDE et al. 2005; PATERSON et al. 2006; JACOB et al. 2008] nach Gabe von Antioxidanzen (isoliert und/oder als komplexes Lebensmittel) beobachtet werden. Dies dürfte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass mögliche Auswirkungen der Intervention durch den dominierenden Einfluss endogener Antioxidanzen (z. B. Harnsäure und Bilirubin [BENZIE U. STRAIN 1996; RICE-EVANS U. MILLER 1994]) überlagert wurden, wenngleich sich der Harnsäure-Serumspiegel in der vorliegenden Untersuchung nicht (vgl. ANCOVA, Tab. 18) bzw. nur bedingt (vgl. Fußnote 57) als Confounder herausstellte. Zum anderen ist die bessere Ansprechbarkeit des Assays gegenüber hydrophilen im Vergleich zu lipophilen Antioxidanzen [PATERSON et al. 2006] zu nennen, was die fehlende Assoziation zwischen den TEAC- und α -Tocopherol-Serumwerten unserer Probanden (T0, T6-T0 [Verumgruppe]) erklären könnte.

Deutliche Effekte der Supplementierung wurden demgegenüber durch die Veränderungen im **α -Tocopherol**status angezeigt, die – analog zur Verbesserung des B-Vitaminstatus (vgl. Kap. 5.1.2) – auf eine gute **Compliance der Studienteilnehmer** schließen lassen: Blieben die α -Tocopherol-Serumkonzentrationen (ohne/mit Lipidkorrektur) unter Placeboeinnahme im Mittel nahezu konstant, führte die sechsmonatige Intervention mit 80 mg/d Vitamin E sowohl innerhalb der Verumgruppe als auch gegenüber Placebo zu einer jeweils höchst signifikanten Zunahme der Serumspiegel. Dabei ließ sich die Beobachtung, wonach Personen mit initial schlechter Versorgungslage in größerem Ausmaß von einer additiven Vitamin-E-Gabe profitieren [WOLTERS et al. 2004a], für alle der hier erhobenen Variablen bestätigen. Auch stimmen unsere Befunde mit der Literatur insoweit überein, als dass die relativen Anstiege der Serumspiegel unter Berücksichtigung der guten Ausgangsversorgung unseres Kollektiv (vgl. Kap. 5.2.3) sowie Unterschieden hinsichtlich Dosierung, Art und Dauer der Intervention mit denen anderer Studien [u. a. WOODSIDE et al. 1999; MCGAVIN et al. 2001; OLMEDILLA et al. 2002; UPRITCHARD et al. 2003; WOUTERS-WESSELING et al. 2003;

WOLTERS et al. 2004a] vergleichbar sind. Des Weiteren erwies sich die eingesetzte Dosierung als wirkungsvoll, um eine deutliche und im Vergleich zu Placebo signifikante Anhebung der Vitamin-E-Spiegel in den als protektiv angesehenen Bereich (AT >30 µmol/l: 97% bzw. AT/TC >5,0 µmol/mmol: 100% der Verumgruppe, vgl. Tab. A26, Anhang E) zu erreichen.

5.2.3 BEWERTUNG DES (ANTI-)OXIDATIVEN STATUS VOR DER SUPPLEMENTIERUNG

Betrachtet man zunächst die in unserer Studiengruppe ermittelte **Höhe des oxLDL-Serumspiegels**, so lag der zu T0 gemessene Mittelwert (71 ± 16 U/l) in einem Bereich, wie er für gesunde Personen (70 U/l, methodenspezifischer Referenzwert nach ITABE U. UEDA [2007]) angegeben wird. Wie sich jedoch in Hinblick auf die Prävalenz erhöhter Serumwerte, definiert durch einen oxLDL-cut-off von >70 U/l, zeigte, war auf Basis dieser Bewertungsgrundlage bei jedem zweiten Probanden (50,7%) von einer erhöhten oxidativen Belastung auszugehen. Allerdings ist anzumerken, dass derartige Rückschlüsse aufgrund der engen Korrelation zur LDL-Konzentration nur bedingt zulässig sind, zumal der T6-Status, bedingt durch die vermeintlich LDL-assoziierte oxLDL-Abnahme (vgl. Kap. 5.2.1, S. 134), auf eine deutlich geringere Belastung des Kollektivs hindeutet. Eine adäquate Beurteilung sollte daher grundsätzlich auch den LDL-Status, etwa unter Zuhilfenahme des oxLDL/LDL-Quotienten, berücksichtigen.

Stellt man demgemäß die **auf die LDL-Konzentration bezogenen oxLDL-Serumwerte (oxLDL/LDL-Quotient [mit hypolipidämischer Medikation]: $17,6 \pm 3,34$ [$17,9 \pm 3,84$] U/mmol)** denen anderer Studien gegenüber, fielen diese zumeist höher als in anderen Risikokollektiven aus. So errechnet sich auf Basis der von EID et al. [2004] für eine männliche Risikogruppe ($n=563$, 70 ± 6 Jahre, davon 28% mit vorangegangenen MI) angegebenen oxLDL- (67 U/l) und LDL-Plasmaspiegel ($4,1$ mmol/l) ein im Median geringeres Verhältnis von $16,3$. Als deutlich niedriger erwies sich der oxLDL/LDL-Quotient ($15,1$ U/mmol) der von RUEL et al. [2008] untersuchten Teilnehmer (vgl. Kap. 5.2.1, Tab. 28), die im Mittel zwar analoge LDL-Ausgangswerte ($4,06 \pm 0,70$ mmol/l), ansonsten aber eine eher moderate Risikoerhöhung verglichen mit unserem Kollektiv aufwiesen. Werte, die ebenfalls deutlich unterhalb des hier ermittelten Quotienten angesiedelt waren, fanden sich zudem in einer schwedischen Fall-Kontroll-Studie (nested-Design⁸¹), in der das oxLDL/LDL-Verhältnis des vorwiegend aus Männern bestehenden Kollektivs eine stärkere prädiktive Aussagekraft für ein akutes Koronarereignis als die absoluten oxLDL-Spiegel besaß [NORDIN et al. 2003]. So lag das initial für Personen mit neuauftretendem MI (Fälle) angegebene oxLDL/LDL-Verhältnis bei

⁸¹ Fall-Kontroll-Studie, bei der die Fälle und Kontrollen aus einer laufenden Kohortenstudie gezogen werden.

13,5 U/mmol und der der Kontrollen (normo- und hyperlipidämisch, LDL-cut-off >5,0 mmol/l) bei 12,6 bzw. 12,2 U/mmol. Ein wesentlich höheres oxLDL- zu LDL-Verhältnis ergibt sich hingegen aus einer entsprechenden Auswertung, die auf den Daten der männlichen Probanden einer aus der Region Augsburg rekrutierten Kohorte mit moderat erhöhtem Risiko (*MONICA/KORA*-Projekt) basiert [MEISINGER et al. 2005]. Hierbei betrug der für Männer mit akutem Koronarereignis (Fälle) ermittelte oxLDL/LDL-Quotient 24,9 U/mmol, während für die ereignisfreien Kontrollen ein durchschnittlicher Wert von 22,9 U/mmol errechnet wurde.

Analog zum B-Vitaminstatus wies das Gesamtkollektiv bereits zu Studienbeginn eine als gut zu bewertende α -Tocopherolverversorgung auf: Wie Tab. A27, Anhang E, veranschaulicht, lag der **mittlere AT-Serumspiegel (ohne Lipidkorrektur)** nicht nur deutlich über dem für eine adäquate Bedarfsdeckung gültigen cut-off, sondern überstieg zugleich die in Hinblick auf präventive Effekte anzustrebende Untergrenze von 30 $\mu\text{mol/l}$. Die initiale AT-Serumkonzentration erreichte damit ein Niveau, das in etwa dem des *HANNA*-Kollektivs entsprach ($34,4 \pm 6,41 \mu\text{mol/l}$), obgleich sich dort eine geringere Prävalenz (23,2%) für Werte <30 $\mu\text{mol/l}$ ergab [WOLTERS et al. 2006]. In einem niedrigeren Bereich bewegten sich demgegenüber die AT-Plasmawerte, die bei klinisch gesunden, jedoch vergleichsweise älteren Teilnehmern der *Framingham*-Kohorte ($n=638$, 67-96 Jahre) beobachtet wurden. Sie lagen bei $30,6 \pm 13,6 \mu\text{mol/l}$ (Männer) und $33,1 \pm 12,6 \mu\text{mol/l}$ (Frauen), wobei zu berücksichtigen ist, dass 25 bzw. 34% der männlichen und weiblichen Teilnehmer Vitamin-E-haltige Nährstoffpräparate einnahmen [VOGEL et al. 1997]. Ein ebenfalls besseres Abschneiden unseres Kollektivs zeigt sich im Vergleich mit einer in fünf westeuropäischen Ländern durchgeführten Querschnittsstudie (349 Nichtraucher, 25-45 Jahre, ohne Supplement-Einnahme seit >1 Monat), in der die für Männer und Frauen erhobenen AT-Serumkonzentrationen durchschnittlich 26,1 bzw. 26,8 $\mu\text{mol/l}$ betrug [OLMEDILLA et al. 2001]. Anders als in den beiden vorgenannten Untersuchungen wird die Bewertung allerdings dadurch erschwert, dass die von OLMEDILLA et al. [2001] angegebenen TC- (4,66-5,25 mmol/l) und TG-Serumspiegel (0,74-1,15 mmol/l) im Mittel wesentlich niedriger als in unserer Studiengruppe lagen.

Eine gleichermaßen gute Ausgangsversorgung ließ sich auch anhand der **auf die TC-Konzentration bezogenen AT-Serumwerte (AT/TC-Quotient)** aufzeigen, die im Mittel ebenfalls in den als präventiv angesehenen Konzentrationsbereich fielen (vgl. Tab. A27, Anhang E). Dabei zeigte sich weiterhin, dass sich nunmehr auch der Anteil an Probanden, die die protektiven Serumspiegel nicht erreichten, von 35,8% (Prävalenz ohne Lipidkorrektur) auf 22,8% reduzierte. Zieht man zudem die in der *HANNA*-Studie und in der *Framingham*-Kohorte ermittelten AT/TC-Quotienten von $5,45 \pm 1,26 \mu\text{mol/mmol}$ [WOLTERS et al. 2006] und $2,2 \pm 0,8$ (Männer) bzw. $2,5 \pm 0,9 \mu\text{mol/mmol}$ (Frauen) [VOGEL et al. 1997] heran, so war in Übereinstimmung mit den nicht-lipidstandardisierten Werten eine geringfügig bzw. ungleich

bessere Versorgungssituation bei den hier untersuchten Studienteilnehmern gegeben. Die TC-bereinigten AT-Serumspiegel der europäischen Vergleichsstudie lagen demgegenüber etwas höher (Männer: 6,50 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$, Frauen: 6,47 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ [OLMEDILLA et al. 2001]), womit sich ein geringfügig schlechteres Abschneiden unserer Probanden trotz der deutlich höheren Absolutwerte ergab. Dies wiederum veranschaulicht eindrucksvoll, dass die lipid-korrigierten Serumkonzentrationen eine höhere Aussagekraft im Rahmen einer vergleichenden Vitamin-E-Statusbewertung besitzen, als dies bei der isolierten Betrachtung der AT-Serumspiegel der Fall ist.

5.2.4 ZUSAMMENFASSUNG UND ZWISCHENFAZIT

In Übereinstimmung mit den bislang vorliegenden Interventionsstudien ließ sich trotz Verbesserung des antioxidativen Status, wie sie in der vorliegenden Untersuchung insbesondere durch die Veränderungen im α -Tocopherolstatus angezeigt wurde, kein Effekt der sechsmonatigen Supplementierung auf die oxLDL-Konzentration *in vivo* feststellen. Die für die ADMA-Reduktion formulierte Prämisse war damit *formal*, d. h. in Bezug auf den postulierten Effekt der Nährstoffgabe, als nicht erfüllt anzusehen, wenngleich eine von der Intervention unabhängige oxLDL-Abnahme innerhalb des Gesamtkollektivs verzeichnet wurde. Inwieweit letztere Beobachtung auf eine Verringerung oxidativer Prozesse an LDL-Partikeln zurückgeführt und damit als relevant für den allgemeinen ADMA-Status eingestuft werden konnte oder diese vielmehr durch (geringfügige) Veränderungen der LDL-Serumwerte zustande kam, lässt sich aufgrund analytischer Limitationen nicht abschließend beantworten. Auch stellte sich der TEAC-Test als nur bedingt geeignete Methode heraus, um eine durch die Intervention induzierte Steigerung der antioxidativen Kapazität *in vivo* adäquat widerzuspiegeln. Des Weiteren zeigte sich für die hier untersuchten Probanden, dass der um die LDL-Serumwerte korrigierte oxLDL-Status in einem für Risikokollektive typischen Bereich angesiedelt war. Demgegenüber stützt die Bewertung des initialen α -Tocopherolstatus die bereits im Zusammenhang mit den B-Vitaminen diskutierte Annahme, wonach das Ausbleiben eines möglichen ADMA-senkenden Effekts u. a. durch die insgesamt gute Versorgungssituation des Kollektivs (\rightarrow geringe Effektgröße) begründet sein könnte.

5.3 ASYMMETRISCHES DIMETHYLARGININ

Zum Zeitpunkt der Planung der vorliegenden Untersuchung⁸² lagen lediglich vereinzelte Humanstudien vor, in denen der Einfluss einer Supplementierung mit entweder B-Vitaminen [HOLVEN et al. 2002; JONASSON et al. 2003; SYDOW et al. 2003] oder Antioxidanzien [SARAN et al. 2003; ENGLER et al. 2003] auf den ADMA-Plasmaspiegel untersucht wurde. Während in Hinblick auf die Auswirkungen einer B-Vitamingabe bis dato eine Reihe von Studien an (nierengesunden) Risikokollektiven publiziert worden sind, beschränkt sich die *In-vivo*-Datenlage bei Antioxidanzien auf experimentelle Tierstudien sowie einige wenige Interventionen an vornehmlich niereninsuffizienten Patienten. Studien, in denen eine Kombination beider Nährstoffgruppen bei äquivalenter Methodik (d. h. vergleichbarem Studienkollektiv und -design) eingesetzt wurde, sind unserem Kenntnisstand nach bis zur Abfassung der vorliegenden Arbeit nicht publiziert. Unsere Untersuchung bezieht sich somit erstmalig auf die Fragestellung, inwieweit sich bei gleichzeitiger Gabe von B-Vitaminen und Antioxidanzien synergistische Effekte auf den ADMA-Plasmaspiegel bei einem aus nierengesunden Probanden bestehenden Risikokollektiv beobachten lassen.

Zur Bewertung des Effekts der hier verabreichten Nährstoffkombination ist es daher angezeigt, den möglichen Einfluss von B-Vitaminen und Antioxidanzien zunächst einer isolierten Betrachtung zu unterziehen. Im Anschluss daran ist zu erörtern, wie die fehlende Senkung des ADMA-Plasmaspiegels vor dem Hintergrund der ADMA-Ausgangswerte unseres Kollektivs zu bewerten ist. Damit einhergehend steht zur Diskussion, welcher Stellenwert der ADMA-Plasmakonzentration als potenziellem Risikomarker innerhalb der hier untersuchten Risikogruppe eingeräumt werden kann.

5.3.1 BEWERTUNG DES EFFEKTS DER B-VITAMINSUPPLEMENTIERUNG

Der Hyperhomocysteinämie wird neben weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren eine zentrale Rolle in der Ätiopathogenese der endothelialen Dysfunktion zugeschrieben. So gehen experimentell induzierte Hyperhomocysteinämien sowohl im Tiermodell [LENTZ et al. 1996; Ungvari et al. 1999; LANG et al. 2000] als auch beim Menschen [BELLAMY et al. 1998; BÖGER et al. 2001; HANRATTY et al. 2001; STÜHLINGER et al. 2002; ANTONIADES et al. 2006] mit einer Beeinträchtigung NO-abhängiger Endothelfunktionen einher. Eine entsprechende Assoziation wurde ferner für klinisch erhöhte tHcy-Plasmaspiegel nachgewiesen [TAWAKOL et al. 1997; HOFMANN et al. 1998; WOO et al. 2000; ANTONIADES et al. 2006]. Auch konnte in

⁸² Die konzeptionelle Planung der vorliegenden Untersuchung erfolgte im Zeitraum März bis Mai 2003.

Interventionsstudien eine signifikante Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation nach Folatsupplementierung aufgezeigt werden [BELLAMY et al. 1999; CHAMBERS et al. 2000; XU et al. 2008], wenngleich sich dieser Effekt nicht durchgängig [SYDOW et al. 2003; CARLSSON et al. 2004; PEÑA et al. 2007; JEHLIČKA et al. 2009] bzw. ausschließlich nach Verabreichung hoher Folatmengen (bis zu 10 mg/d) [WOO et al. 1999; MOAT et al. 2006; TITLE et al. 2006; MOENS et al. 2007] bestätigen ließ. Inwieweit der protektive Einfluss von Folsäure auf die mit der Supplementierung einhergehende Homocystein-Senkung oder auf eigenständige Effekte des B-Vitamins (z. B. Stabilisierung und Regeneration des NOS-Cofaktors BH₄ [MOAT et al. 2004; MOAT et al. 2006]) zurückgeführt werden kann, bleibt damit allerdings offen.

Obwohl die genauen Mechanismen einer durch Homocystein hervorgerufenen Endotheldysfunktion bisher nur unzureichend geklärt sind, gilt als weitgehend gesichert, dass deren Vermittlung vorrangig über den Verlust an biologisch aktivem NO erfolgt. So sind weder die eNOS-Expression noch die Nitroglycerin-induzierte Vasodilatation bei Hyperhomocysteinämie beeinträchtigt, was auf eine normale NO-Sensitivität der löslichen Guanylatzyklase in glatten Gefäßmuskelzellen schließen lässt [LENTZ et al. 2003; DAYAL U. LENTZ 2005]. Neben dem Vermögen, zu einer verstärkten oxidativen NO-Inaktivierung u. a. durch Bildung von Superoxidanionen sowie Entkopplung der eNOS beizutragen (vgl. Kap. 2.1.2.2), wird eine vermehrte Akkumulation des NOS-Inhibitors ADMA als ein weiterer „key mediator“ einer durch Homocystein induzierten Verringerung der NO-Bioverfügbarkeit angesehen [FARACI 2003; DAYAL U. LENTZ 2005]. Dies ergründet sich zum einen aus dem Zusammenhang, wonach das für den ADMA-Katabolismus primär verantwortliche Enzym DDAH eine hohe Oxidationsanfälligkeit aufweist [MURRAY-RUST et al. 2001; SYDOW U. MÜNDEL 2003; PALM et al. 2007] und Homocystein die Enzymaktivität, vermutlich durch Ausbildung einer kovalenten Disulfidbindung am aktiven Zentrum (Cystein-249), *in vitro* inhibiert. Bekräftigt wird diese Annahme durch Inkubationsversuche, in denen sowohl die durch Homocystein ausgelöste DDAH-Blockade als auch der daraus resultierende ADMA-Anstieg in Gegenwart reduzierender Agenzien (PDTC) aufgehoben wurde [STÜHLINGER et al. 2001; SELLEY 2004].

Zum anderen ist nach Auffassung einiger Autoren [BÖGER et al. 2000a; BÖGER et al. 2001; SYDOW et al. 2004] eine mögliche Verbindung darin zu sehen, dass die PRMT-abhängige *De-novo*-Synthese von ADMA die Bereitstellung des Methylgruppen-Donors SAM („aktiviertes Methionin“) erfordert, welches in das Intermediat SAH als direktem Homocystein-Vorläufer übergeht (Methionin-Homocystein-Demethylierung, vgl. Kap. 2.2.2, Abb. 6). Die enge metabolische Verknüpfung zwischen endogener ADMA- und Homocystein-Bildung wurde dabei durch verschiedene *In-vitro*- [BÖGER et al. 2000b] und *In-vivo*-Modelle [BÖGER et al. 2000a; BÖGER et al. 2001; STÜHLINGER et al. 2003; ANTONIADES et al. 2006] verdeut-

licht, in denen eine akute Methionin-Exposition einen parallelen Anstieg der ADMA- und Homocysteinkonzentration infolge eines erhöhten SAM-Angebots bewirkte. Aus den bereits angeführten Überlegungen ist allerdings fraglich, inwieweit diese Befunde als relevant für eine ADMA-Akkumulation bei chronisch erhöhten tHcy-Plasmaspiegeln (\rightarrow Situation eines erhöhten SAH-/SAM-Ratios bzw. erniedrigten Methylierungsstatus, vgl. Kap. 2.2.3.2, S. 37) anzusehen sind bzw. den hierbei zugrunde liegenden Mechanismus erklären⁸³ [STÜHLINGER et al. 2001; JONASSON et al. 2003; DAYAL U. LENTZ 2005]. Stattdessen gilt es als wahrscheinlich, dass in diesem Fall die prooxidativen Effekte via Inhibition des katabolen DDAH-ADMA-Systems und/oder Hochregulation der ADMA-anabolen PRMT-I-Expression überwiegen (vgl. Abb. 20). Auch wird in diesem Zusammenhang eine Störung der Redox-Homöostase im endoplasmatischen Reticulum („ER-Stress“) und damit einhergehend eine vermehrte ADMA-Bildung aufgrund einer gesteigerten Proteolyse methylierter Proteine diskutiert [LENTZ et al. 2003; DAYAL U. LENTZ 2005; SIROEN et al. 2006].

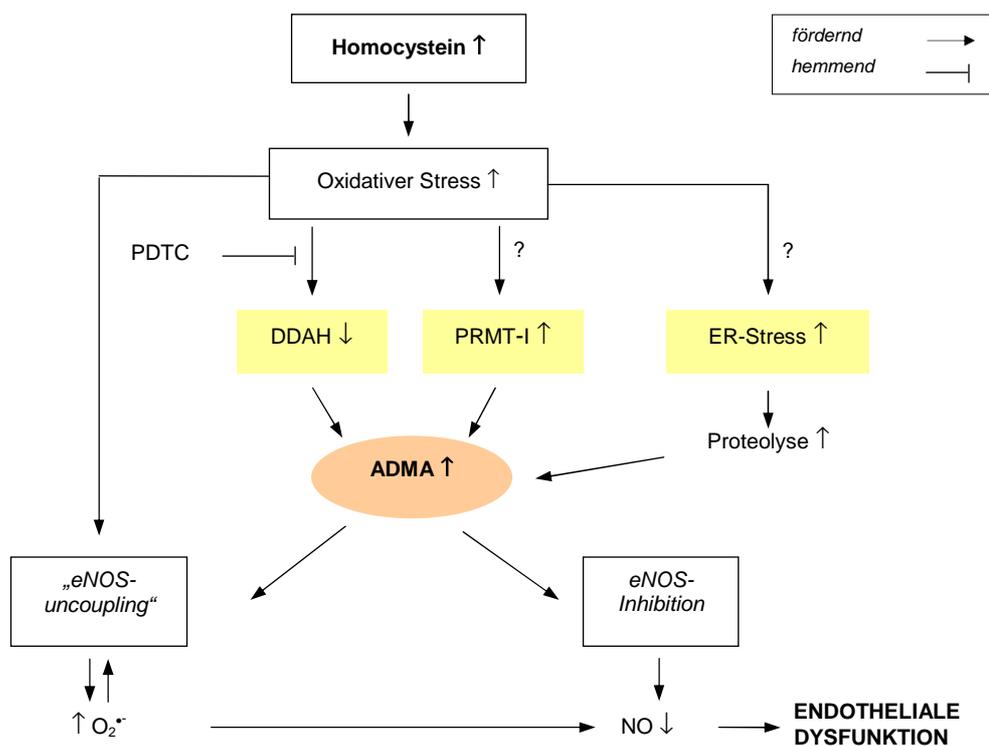


Abb. 20: Diskutierte Mechanismen einer Homocystein-induzierten ADMA-Akkumulation und deren Bedeutung für die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion [modifiziert nach DAYAL U. LENTZ 2005]. DDAH: Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase, ER: endoplasmatisches Reticulum, PDTC: Pyrrolidin-Dithiocarbamat (synthetisches Antioxidanz), PRMT-I: Protein-Arginin-Methyltransferase-I.

⁸³ Die aus dem Methionin-Load resultierende Homocystein-Erhöhung, die der metabolischen Situation eines erniedrigten SAH-/SAM-Ratio (\rightarrow erhöhter Methylierungsstatus) entspricht, ist demnach als Sekundärereignis einer gesteigerten ADMA-Bildung und nicht als der eigentlich auslösende Faktor für selbige zu betrachten.

Vor dem Hintergrund des in Abb. 20 dargestellten Konzepts einer vorwiegend auf oxidativen Mechanismen basierenden ADMA-Akkumulation bei erhöhten tHcy-Plasmaspiegeln erscheint der hier verfolgte Ansatz einer ADMA-Senkung durch eine kombinierte B-Vitamin- und Antioxidanzienangabe einer alleinigen Intervention mit B-Vitaminen daher insofern überlegen, als dass nicht nur der Hyperhomocysteinämie als solcher, sondern zugleich auch den hierdurch bedingten, prooxidativen Effekten in synergistischer Weise entgegengewirkt werden sollte.

Ergänzend zu der Beobachtung, wonach die sechsmonatige Nährstoffsupplementierung trotz effektiver Senkung des tHcy-Plasmaspiegels ohne Auswirkung auf die ADMA-Plasmakonzentration des Gesamtkollektivs blieb, ließ sich auch im Rahmen der Subkollektiv-Analyse „Moderate Hyperhomocysteinämie“ und „Höhe der tHcy-Plasmaspiegel“ kein entsprechender Effekt feststellen. Des Weiteren waren weder die Homocystein-Senkung noch der Anstieg der jeweiligen B-Vitaminspiegel mit den unter Verumeinnahme ermittelten ADMA-Differenzen (T6-T0) korreliert. Daher erbrachte auch dieser Befund keinerlei Hinweise auf eine Beeinflussung der ADMA-Plasmawerte im Zusammenhang mit der B-Vitamingabe. Unsere Ergebnisse stehen damit in Einklang mit den bislang publizierten Daten aus **Interventionsstudien**, die in ihrer Gesamtheit ein weitgehend einheitliches Bild hinsichtlich des fehlenden Effekts einer B-Vitaminsupplementierung auf den ADMA-Plasmaspiegel liefern (vgl. Tab. 29).

So liegt bis heute lediglich eine einzige Interventionsstudie vor, in der eine signifikante Senkung der mittleren ADMA-Plasmawerte um ca. 65 und 80% (!) nach sechswöchiger bzw. zwölfmonatiger Folatsupplementierung aufgezeigt wurde [HOLVEN et al. 2002]. Vor dem Hintergrund der wesentlich höheren tHcy-Ausgangswerte ($21,0 \pm 10,8 \mu\text{mol/l}$) wurde hierbei eine mehr als doppelt so hohe Homocystein-Senkung (-53 bzw. -51%) im Vergleich zu unserer Studie (-20,8%, [SCHMITT et al. 2007]) erreicht. Demnach scheint sich zunächst die Annahme zu bestätigen, dass das Ausmaß der Homocystein-Senkung bei unseren Probanden zu gering war, als dass hieraus Effekte auf die ADMA-Plasmakonzentration hätten resultieren können (vgl. Kap. 5.1). Ob die von HOLVEN et al. [2002] nachgewiesene ADMA-Abnahme allerdings tatsächlich in Zusammenhang mit der Folat-induzierten Senkung der tHcy-Plasmawerte stand, muss aufgrund der fehlenden Kontrollgruppe offen bleiben. Darüberhinaus lässt sich der Publikation nicht entnehmen, inwieweit die unter Nährstoffgabe beobachteten Veränderungen auf mögliche Korrelationen überprüft wurden.

Eine Supplementierung mit Folat alleine oder in Kombination mit Vitamin B₁₂ und/oder B₆ konnte in kontrollierten Studien hingegen kein vergleichbares Ergebnis erzielen. Obwohl auch hier eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Homocystein-Senkung (-28 bis -47%, vgl. Tab. 29) erreicht wurde, ließen sich weder signifikante noch klinisch relevante Veränderungen der ADMA-Plasmaswerte bei verschiedenen hyperhomocysteinämischen (Patienten-)Kollektiven feststellen [JONASSON et al. 2003; SYDOW et al. 2003; ZIEGLER et al. 2005; SPOELSTRA-DE MAN et al. 2006; AUSTEN et al. 2006].

Tab. 29: Ergebnisse bisheriger Humanstudien zum Einfluss einer B-Vitaminsupplementierung auf den ADMA-Plasmaspiegel

Kollektiv	Interventionsart (Dosis/d) und -dauer	Effekt	Referenz
placebo-kontrolliert			
pAVK-Patienten mit Hyperhomocysteinämie (n=18)	<u>Gr. 1:</u> 10 mg Folat, 0,2 mg Vit. B ₁₂ , 20 mg Vit. B ₆ <u>Gr. 2:</u> Placebo für 2 Monate	↔ ADMA, ↔ SDMA, ↔ FMD, ↓ tHcy (Δ:-45% vs. T0, p<0,01)	SYDOW et al. 2003
pAVK-Patienten mit Hyperhomocysteinämie (>15 µmol/l, n=49)	<u>Gr. 1:</u> 5 mg Folat, 0,05 mg Vit. B ₁₂ , 50 mg Vit. B ₆ <u>Gr. 2:</u> Placebo für 6 Wochen	↔ ADMA, ↔ SDMA ↓ tHcy (Δ:-34% vs. T0, p<0,05)	ZIEGLER et al. 2005
Typ-2-Diabetiker mit Hyperhomocysteinämie (>14 µmol/l, n=41)	<u>Gr. 1:</u> 5 mg Folat <u>Gr. 2:</u> Placebo für 12 Monate	↔ ADMA, ↔ SDMA, ↓ tHcy (Δ:-28% vs. T0 bzw. -21% vs. Placebo)	SPOELSTRA-DE MAN et al. 2006
Probanden mit diagn. post-load-Hyperhomocysteinämie und familiärer Disposition (n=119)	<u>Gr. 1:</u> 5 mg Folat, 250 mg Vit. B ₆ <u>Gr. 2:</u> Placebo für 12 Monate	↔ ADMA, ↔ SDMA ↓ tHcy (Δ:-43% vs. T0 bzw. -32% vs. Placebo)	SPOELSTRA-DE MAN et al. 2006
Patienten nach Nierentransplantation (n=10)	5 mg Folat <u>im cross-over</u> mit Placebo für je 3 Monate	↔ ADMA, ↔ FMD, ↓ tHcy (Δ:-37% vs. T0, p<0,05)	AUSTEN et al. 2006 (abstract)
gesunde Probanden mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko (n=123)	<u>Gr. 1:</u> 0,8 mg Folat, 20 µg Vit. B ₁₂ , 6 mg Vit. B ₆ <u>Gr. 2:</u> Placebo für 6 Monate	↔ ADMA, ↔ SDMA ↓ tHcy (Δ:-20,8% vs. T0, p<0,001)	SCHMITT et al. 2007
kontrolliert			
KHK-Patienten mit Hyperhomocysteinämie (>15 µmol/l, n=60)	<u>Gr. 1:</u> 5 mg Folat, 1 mg Vit. B ₁₂ , 40 mg Vit. B ₆ <u>Gr. 2:</u> ohne Intervention für 3 Monate	↔ ADMA, ↔ SDMA, ↓ tHcy (Δ:-47% vs. T0, p<0,001)	JONASSON et al. 2003

Fortsetzung Tab. 29:

unkontrolliert

Probanden mit Hyperhomocysteinämie (>15 µmol/l, n=21)	5, 1 und 0,4 mg Folat aufeinanderfolgend für 1, 37 und 14 Wochen	nach 6 Wochen: ↓ ADMA (Δ:-65%* vs. T0, p<0,001), ↓ tHcy (Δ:-53% vs. T0, p<0,001) nach 12 Monaten: ↓ ADMA (Δ:-80%* vs. T0, p<0,001), ↓ tHcy (Δ:-51% vs. T0, p<0,001)	HOLVEN et al. 2002
Kinder mit familiärer Hypercholesterolämie (FH, n=18) bzw. Typ-1-Diabetes (DM, n=10)	5 mg Folat für 3 Monate	↔ ADMA, ↔ FMD, ↓ tHcy in FH bzw. DM (Δ:-44 bzw. -29% vs. T0, p<0,001)	JEHLIČKA et al. 2009

* abgeleitet aus den in Abb. 1 dargestellten Mittelwerten

Dass eine Homocystein-modulierende Maßnahme keinerlei Auswirkungen auf die ADMA-Plasmakonzentration besitzt, zeigte sich auch in einer Untersuchung von DIERKES et al. [2004]. In einem *Cross-over-Design* wurde Probanden mit Hypertriglyceridämie (n=25) Fenofibrat⁸⁴ in Kombination mit Placebo bzw. B-Vitaminen (650 µg/d Folsäure, 50 µg/d Vitamin B₁₂, 5 mg/d Vitamin B₆) für je sechs Wochen verabreicht. Obwohl die zusätzliche Gabe der B-Vitaminskombination den Fenofibrat-induzierten Homocystein-Anstieg um ca. 30% vermindern konnte (p<0,05 vs. Fenofibrat plus Placebo), waren auch hier keine signifikanten Veränderungen der ADMA-Plasmawerte weder innerhalb noch zwischen beiden Interventionsphasen festzustellen.

Es steht also an, einen **Erklärungsansatz für den fehlenden Einfluss einer B-Vitamin-supplementierung**, wie er sich auf Basis der derzeitigen Datenlage darstellt, aufzuzeigen. So schließen SPOELSTRA-DE MAN et al. [2006] nicht aus, dass eine additive B-Vitamingabe durchaus ADMA-senkende Effekte, insbesondere durch eine mittelbare Beeinflussung des katabolen DDAH-Systems⁸⁵, ausübt. In Anlehnung an eine von BÖGER et al. formulierte These [BÖGER et al. 2000a; SYDOW et al. 2003] sehen die Autoren eine mögliche Ursache für ihre negativen Resultate jedoch darin, dass die ADMA-senkende Wirkung durch eine zugleich verstärkt stattfindende *De-novo*-Synthese von ADMA konterkariert wird. Dies wiederum begründet sich aus dem biochemischen Zusammenhang, wonach (1) eine Steigerung der Folat- und Vitamin-B₁₂-abhängigen Remethylierung zu einem erhöhten Turnover der Methionin-Homocystein-Demethylierung und damit Anstieg SAM-abhängiger Methylierungs-

⁸⁴ Die Behandlung mit Fenofibrat resultiert für gewöhnlich in einer moderaten Erhöhung der tHcy-Plasmawerte.

⁸⁵ Denkbar ist hier die mit einer Homocystein-Reduktion einhergehende Abschwächung prooxidativer Effekte gemäß des in Abb. 20 dargestellten Konzepts.

reaktionen führt sowie (2) eine verstärkte Remethylierung sowie Transsulfurierung die PRMT-inhibitorische Wirkung von SAH durch Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts zugunsten von Homocystein abschwächt (vgl. Abb. 6, Kap. 2.2.2). Die Zusammenfassung von (1) und (2) ist demnach faktisch mit einer Verringerung des SAH-/SAM-Quotienten gleichzusetzen. Die potenziell ADMA-katabolen Effekte einer B-Vitamingabe außen vor gelassen, wäre der These zufolge somit eine ähnliche metabolische Situation gegeben, wie sie für eine Erhöhung der ADMA-Plasmawerte nach akuter Methionin-Belastung diskutiert wird.

Basierend auf dieser Annahme wäre ferner davon auszugehen, dass ein erhöhter Methylierungsstatus zugleich mit einer verstärkten Bildung von SDMA, welches nicht dem enzymatischen Abbau durch die DDAH unterliegt, einhergehen müsste. So wird die Aktivität der PRMTs analog zu anderen SAM-abhängigen Methyltransferasen über das SAH-/SAM-Verhältnis reguliert [CHENG et al. 2004; STÜHLINGER U. STANGER 2005]. Dementsprechend ist es als äußerst unwahrscheinlich anzusehen, dass eine durch eine B-Vitaminsupplementierung oder Methionin-Belastung hervorgerufene Verringerung des Ratio zu einer spezifischen Aktivitätssteigerung der PRMT-I ohne Einfluss auf die PRMT-II führt [STÜHLINGER et al. 2001; LENTZ et al. 2003]. Ein Beleg hierfür findet sich auch in einer kürzlich publizierten Studie, in der die Auswirkungen einer hochdosierten Niacingabe auf den ADMA-Plasmaspiegel untersucht wurden [WESTPHAL et al. 2006]. Dabei zeigte sich, dass die sechswöchige Einnahme von 1,5-2,0 g/d Niacin zu einer dosisabhängigen ADMA-Senkung um 8-12% bei gleichzeitiger Reduktion der SDMA-Plasmakonzentration führte. Nach Ansicht der Autoren ist dieser Effekt dadurch zu erklären, dass die renale Ausscheidung von Niacin, welche primär über methylierte Derivate (v. a. 1-Methylnicotinamid, 1-Methyl-2-Pyridon-5-Carboxamid [CREEK U. SEAL 2005]) erfolgt, die Bereitstellung von Methylgruppen aus SAM erfordert. Je höher also die Niacingabe, desto höher ist der Verbrauch an Methylgruppen, die nun nicht mehr für SAM-abhängige Methylierungsreaktionen zur Verfügung stehen [WESTPHAL et al. 2006]. Ein durch die B-Vitamingabe induzierter SDMA-Anstieg, wie er unter Annahme der von BÖGER et al. formulierten These demnach hätte erwartet werden müssen, ließ sich jedoch weder in den bisherigen Interventionsstudien (vgl. Tab. 29) noch in der vorliegenden Untersuchung (vgl. Kap. 4.2.5) nachweisen. Stattdessen scheint dies analog zu den für SDMA unter Kap. 2.2.3.2 dargestellten *In-vitro*-Befunden darauf hinzudeuten, dass der PRMT-katalysierten Methylierung von proteingebundenem L-Arginin - wenn überhaupt - nur ein vergleichsweise geringer Stellenwert, gemessen an der Modulation des ADMA-Plasmaspiegels über das katabole DDAH-System, beizumessen ist [STÜHLINGER et al. 2001; STÜHLINGER U. STANGER 2005; MAAS 2005].

Angesichts der fehlenden Beeinflussung des ADMA-Plasmaspiegels durch eine B-Vitamin-intervention bzw. eine Homocystein-Senkung stellt sich ferner die Frage, inwieweit sich aus den bisherigen Studienergebnissen überhaupt Anhaltspunkte für eine **Assoziation zwischen dem ADMA- und Homocysteinstatus *in vivo*** ergeben. Betrachtet man dabei zunächst die Resultate aus Querschnittsanalysen, in denen der ADMA-Status in Abhängigkeit von der Höhe der tHcy-Plasmakonzentration ermittelt wurde, so scheinen verschiedene Untersuchungen auf eine positive Beziehung zwischen beiden Parametern hinzudeuten: Wie in Tab. 3, Kap. 2.2.3.1 dargestellt, verzeichneten Probanden mit z. T. ausgeprägter Hyperhomocysteinämie (durchschnittliche tHcy-Plasmakonzentrationen: 15,6-29,5 $\mu\text{mol/l}$) signifikant höhere ADMA-Plasmaspiegel als Kontrollen mit grenzwertig erhöhten tHcy-Plasmawerten (Mittelwert: 11,0 $\mu\text{mol/l}$ [HOLVEN et al. 2002]) bzw. ohne Hyperhomocysteinämie (Mittelwert: $\leq 9,0$ $\mu\text{mol/l}$ [SIROKÁ et al. 2005; PARONI et al. 2005]). Ein analoges Ergebnis erbrachte der Vergleich der ADMA-Plasmawerte zwischen pAVK-Patienten des höchsten tHcy-Tertils ($>10,6$ $\mu\text{mol/l}$, $14,4 \pm 1,2$ $\mu\text{mol/l}$) gegenüber denjenigen des niedrigsten tHcy-Tertils ($<9,6$ $\mu\text{mol/l}$, $9,4 \pm 0,1$ $\mu\text{mol/l}$ [SYDOW et al. [2004]). Darüber hinaus beobachteten JONASSON et al. [2003] einen Trend zu höheren ADMA-Plasmaspiegeln innerhalb ihres hyperhomocysteinämischen KHK-Patientenkollektivs ($n=59$, ADMA: $0,68 \pm 0,19$ $\mu\text{mol/l}$, tHcy: $17,9 \pm 4,1$ $\mu\text{mol/l}$), wenn diese vor Interventionsbeginn mit den ADMA-Plasmawerten von KHK-Patienten ohne Hyperhomocysteinämie ($n=34$, ADMA: $0,61 \pm 0,10$ $\mu\text{mol/l}$, tHcy: $8,1 \pm 1,4$ $\mu\text{mol/l}$) verglichen wurden. Allerdings erreichte der Unterschied in diesem Fall kein statistisch signifikantes Niveau ($p=0,080$).

Im Gegensatz dazu waren in unserer Studie weder zum Zeitpunkt T0 noch zu T6 Tendenzen zu unterschiedlich hohen ADMA-Plasmawerten in Abhängigkeit von der Prävalenz einer moderaten Hyperhomocysteinämie (tHcy ≥ 10 $\mu\text{mol/l}$) oder Höhe der initialen tHcy-Plasmawerte (Q1: tHcy $\leq 8,30$ $\mu\text{mol/l}$ vs. Q4: tHcy $\geq 10,9$ $\mu\text{mol/l}$, vgl. Kap. 4.2.4.2) feststellbar. In Übereinstimmung hierzu steht eine Querschnittsanalyse, die unter Nüchternbedingungen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im ADMA-Status zwischen Probanden mit hohen gegenüber niedrigen tHcy-Plasmaspiegeln (Median: 23,7 vs. 6,80 $\mu\text{mol/l}$) belegen konnte. Bei Betrachtung der absoluten Plasmakonzentrationen wiesen Teilnehmer mit niedrigen tHcy-Nüchternwerten im Mittel sogar höhere ADMA-Plasmaspiegel (0,60-0,65 $\mu\text{mol/l}$) als diejenigen mit hohen tHcy-Nüchternwerten (0,57-0,58 $\mu\text{mol/l}$) auf [ANTONIADES et al. 2006]. Auch konnten JEHLIČKA et al. [2009] in einer Trend-Analyse zwischen den ADMA-Tertilen und den tHcy- bzw. Folat-Plasmawerten eines kleineren Kollektivs, bestehend aus Kindern mit familiärer Hypercholesterolemie ($n=18$) bzw. Typ-1-Diabetes ($n=10$), keine signifikanten Assoziationen ermitteln.

Die Inkonsistenz der vorangestellten Daten spiegelt sich gleichermaßen auf Korrelations-ebene wider. So zeigte sich in unserem Gesamtkollektiv, dass die zu T0 erhobenen ADMA-Plasmaspiegel weder mit den tHcy-Ausgangskonzentrationen noch mit den Basalwerten der Variablen S-Folat, E-Folat, Cbl und PLP korrelierten. Dieser Befund deckt sich mit den Beobachtungen anderer Autoren, die ebenfalls keine Assoziationen zwischen ADMA und dem Homocystein-/B-Vitaminstatus nachweisen konnten [DIERKES et al. 2004; JONASSON et al. 2005; ZIEGLER et al. 2005; PARONI et al. 2005; SPOELSTRA-DE MAN et al. 2006; ANTONIADES et al. 2006; WILCKEN et al. 2006]. Konträr dazu stehen die Ergebnisse von HOLVEN et al. [2002], die von einer positiven Korrelation zwischen den ADMA- und tHcy-Plasmaspiegeln ($r=0,390$, $p<0,01$) sowie einer inversen Korrelation zwischen ADMA und Plasma-Folat ($r=-0,420$, $p<0,001$) zu Beginn ihrer Intervention berichteten. Dem schließt sich eine Analyse von SIROKÁ et al. [2005] an, die eine ähnlich ausgeprägte Assoziation zwischen den ADMA- und tHcy-Plasmawerten ($r=0,420$, $p<0,001$) ergab. Wie sich allerdings im Rahmen einer multiplen linearen Regressionsanalyse zeigte, verlor sich dieser Zusammenhang unter Einbeziehung der Variablen Creatinin und Alter, die beide sowohl untereinander ($r=0,370$, $p<0,001$) als auch mit ADMA (Creatinin: $r=0,390$, $p<0,001$, Alter: $r=0,570$, $p<0,001$) und Homocystein (Creatinin: $r=0,690$, $p<0,001$, Alter: $r=0,470$, $p<0,001$) korrelierten. Stattdessen stellte sich einzig das Alter als determinierender Faktor der ADMA-Plasmakonzentration heraus [SIROKÁ et al. 2005]. Ein positiver Zusammenhang zwischen ADMA und dem Alter ließ sich – wenngleich nicht durchgängig [vgl. Kap. 4.2.4.3 sowie EID et al. 2004; BLACKWELL et al. 2007] – durch eine Vielzahl an Untersuchungen belegen [u. a. MIYAZAKI et al. 1999; HORI et al. 2003; MITTERMAYER et al. 2006; MAAS et al. 2007]. Als mögliche Erklärung hierfür ziehen HOROWITZ u. HERESZTYN [2007] u. a. die mit dem Alter nachlassende Nierenaktivität, wie sie bekanntermaßen auch für den altersbedingten Anstieg der tHcy-Plasmakonzentration verantwortlich gemacht wird [STANGER et al. 2003], in Betracht. Demzufolge ist denkbar, dass die in einigen Studien beobachtete Assoziation zwischen hohen tHcy- und ADMA-Plasmaspiegeln zumindest teilweise auf eine verminderte renale Clearance beider Metabolite zurückgeführt bzw. die Diskrepanz der Daten durch Unterschiede im renalen Status erklärt werden kann.

Zu dieser Annahme gelangten auch JONASSON et al. [2005] auf Basis der folgenden Beobachtung: In der Querschnittsanalyse wies ihr hyperhomocysteinämisches KHK-Patientenkollektiv im Mittel signifikant höhere Cystatin-C-Serumwerte ($1,15 \pm 0,29$ mg/dl) im Vergleich zu den KHK-Kontrollen ohne Hyperhomocysteinämie auf ($0,96 \pm 0,18$ mg/dl, $p<0,01$). Des Weiteren zeigte sich, dass Cystatin C, welches als sensitiver Marker der glomerulären Filtra-

tionsrate (GFR) etabliert ist⁸⁶ [TANAKA et al. 2007; ROOS et al. 2007], signifikant mit der Höhe der ADMA-Plasmaspiegel korrelierte. Dieser Zusammenhang war sowohl in der Gesamtbeurteilung ($r=0,370$, $p<0,001$) als auch bei separater Analyse der beider Gruppen (KHK-Patienten mit/ohne Hyperhomocysteinämie: $r=0,380$, $p<0,01$ bzw. $r=0,420$, $p<0,05$) gegeben. Demgegenüber waren zwischen ADMA und Creatinin – wie auch in unserer (vgl. Kap. 4.2.4.3) sowie anderen Studien mit nierengesunden Kollektiven [DIERKES et al. 2004; ZIEGLER et al. 2005] – keinerlei Korrelationen vorhanden. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass Creatinin im Serum erst bei deutlich reduzierter GFR ansteigt, während der Cystatin-C-Serumspiegel bereits auf geringfügige Einschränkungen im sog. „creatinin-blinden“ Bereich reagiert [TANAKA et al. 2007]. Vor dem Hintergrund des fehlenden Effekts ihrer B-Vitaminintervention kamen JONASSON et al. [2005] zu der Schlussfolgerung, dass der beobachtete Trend zu höheren ADMA-Plasmaspiegeln bei erhöhten tHcy-Plasmawerten demnach weniger durch eine direkte, d. h. kausale Assoziation zwischen beiden Parametern als vielmehr durch eine subklinische Einschränkung der Nierenfunktion bedingt ist. Dieser These schließt sich die Arbeitsgruppe um WILCKEN et al. [2006] an, die zu vergleichbaren Befunden in einer Untersuchung an CBS-defizienten Patienten unter Berücksichtigung des Cystatin-C-Status gelangten. In Anlehnung an die von POTTER et al. [2008] betitelte Arbeit „*Homocysteine or renal impairment: which is the real cardiovascular risk factor?*“ liegt damit insgesamt die Vermutung nahe, dass eine Erhöhung der ADMA-Plasmakonzentration analog zu Homocystein lediglich als Epiphänomen einer milden Nierendysfunktion zu betrachten ist, deren Bedeutung als „wahrer“ kardiovaskulärer Risikofaktor bei (vermeintlich) Nierengesunden in der wissenschaftlichen Literatur aktuell intensiv diskutiert wird [POTTER et al. 2008; RODIONOV U. LENTZ et al. 2008; WANG et al. 2008].

5.3.2 BEWERTUNG DES EFFEKTS DER ANTIOXIDANZIENSUPPLEMENTIERUNG

Nach heutigem Erkenntnisstand ist eine Erhöhung des oxidativen Stresses als ein, wenn nicht als *der* wesentliche pathophysiologische Mechanismus anzusehen, über welchen kardiovaskuläre Risikofaktoren bzw. die damit assoziierten Primärnoxen zur Entstehung einer endothelialen Dysfunktion beitragen. Vor dem Hintergrund der „LDL-Oxidationshypothese“, die die Oxidation von LDL-Partikeln als Voraussetzung für deren atherogenes Potenzial beschreibt (vgl. Kap. 5.2), erscheint es somit mehr als naheliegend, dass neben der Hyperhomocysteinämie auch der Hypercholesterolämie ein zentraler Stellenwert im Zusam-

⁸⁶ Bei Cystatin C handelt es sich um ein niedermolekulares Protein aus der Familie der Cystein-Protease-Inhibitoren, welches frei glomerulär filtiert, tubulär reabsorbiert und metabolisiert wird. Im Gegensatz zu Creatinin, dessen Serumkonzentration durch vielfältige Faktoren (u. a. Alter, Geschlecht, Muskelmasse) beeinflusst und mit zunehmender GFR-Reduktion durch eine gesteigerte tubuläre Sekretion verfälscht wird, hängt die Höhe des Cystatin-C-Serumspiegels ausschließlich von der glomerulären Filtrationsleistung ab [TANAKA et al. 2007].

menhang mit einer durch oxidativen Stress hervorgerufenen Endotheldysfunktion einzu-räumen ist. Neben experimentellen Studien, die eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit sowie eine Beeinträchtigung der FMD in isolierten Aortensegmenten nach nLDL- und/oder oxLDL-Exposition demonstrieren [GALLE et al. 1991; CHIN et al. 1992; MUROHARA et al. 1994; BUCKLEY et al. 1996; HEIN et al. 1998], wird eine entsprechende Beziehung auch durch zahlreiche Befunde auf *In-vivo*-Ebene bekräftigt. So ließ sich bei cholesterolgefütterten Kaninchen [MÜGGE et al. 1991; KEANEY et al. 1993; BÖGER et al. 1998a; INOUE et al. 1998] sowie bei Probanden mit klinischer und experimentell bedingter Hypercholesterolämie [TING et al. 1997; GREEN et al. 1998; HEITZER et al. 1999; PLOTNICK et al. 1997; LING et al. 2002] eine Wiederherstellung bzw. signifikante Verbesserung der NO-abhängigen Gefäßfunktion nach Gabe verschiedener Antioxidanzien (u. a. PEG-SOD, ProbucoI, Vitamin E und C) beobachten.

In Hinblick auf die molekularen Vorgänge, welche einer endothelialen Dysfunktion unter hypercholesterolämischen Bedingungen zugrunde liegen, scheint zum einen eine verstärkte oxidative NO-Inaktivierung - insbesondere durch eine gesteigerte Bildung von Lipid- und Superoxidradikalen - eine entscheidende Rolle zu spielen. Als Ursache für den vermehrten Anfall von Superoxidanionen kommt dabei sowohl eine verstärkte Produktion durch die eNOS selbst (eNOS-Entkopplung) als auch eine erhöhte Aktivität der NAD(P)H- und Xanthin-Oxidase in Betracht [PRITCHARD et al. 1995; VERGNANI et al. 2000; STEPP et al. 2002]. Des Weiteren ergaben Untersuchungen, dass oxLDL die eNOS-Genexpression herabsetzt [HARRISON 1997; YANG U. MING 2006] sowie die Ablösung des Enzyms aus den Caveolae der Zellmembran induziert. Letztgenannte Umlagerung ist den Beobachtungen der Arbeitsgruppe um SHAUL [2003] zufolge mit einer deutlichen Reduktion der eNOS-Aktivität verbunden. Ein weiterer, auf Ebene der NO-Biosynthese diskutierter Mechanismus stellt eine Erhöhung der endogenen ADMA-Konzentration bei Hypercholesterolämie dar, wobei *In-vitro*-Befunde auch hier vornehmlich prooxidative Effekte auf Seite der ADMA-Synthese sowie des ADMA-Abbaus nahelegen. So bewirkte die Inkubation von Endothelzellen mit nLDL und/oder oxLDL eine dosisabhängige sowie durch Antioxidanzien (PDTC, ProbucoI) hemmbare Steigerung der zellulären ADMA-Freisetzung, welche mit einem signifikanten Anstieg der PRMT-I-Expression assoziiert war [BÖGER et al. 2000b; JIANG et al. 2006]. Daneben konnten zwei weitere Zellkulturstudien eine ADMA-akkumulative Wirkung von oxLDL bei zugleich signifikant verminderter DDAH-Aktivität aufzeigen. Unter dem Einfluss von nLDL waren derartige Effekte hingegen nicht [JIANG et al. 2003] bzw. nur in abgeschwächter Form [ITO et al. 1999] feststellbar. Wie sich für oxLDL schließlich auch in Bezug auf die DDAH demonstrieren ließ, konnte die auf einer nachlassenden Enzymaktivität basierende ADMA-Zunahme durch gleichzeitige Inkubation mit verschiedenen antioxidativ wirksamen Verbindungen (PDTC, ProbucoI, EGCG) verhindert werden [JIANG et al. 2006; TANG et al. 2006].

Das sich hieraus sowie aus den für Homocystein dargestellten Daten (vgl. Kap. 5.3.1, Abb. 20) ableitende Konzept einer redoxsensitiven Modulation der ADMA-Stoffwechsels und dessen positive Beeinflussung durch Antioxidanzien wird ferner durch Befunde gestützt, wonach eine unter hyperglykämischen Bedingungen hervorgerufene Deregulation des DDAH-ADMA-Systems in Gegenwart von PEG-SOD *in vitro* ebenfalls reversibel ist [LIN et al. 2002].

Wenngleich die für die ADMA-Senkung formulierte Prämisse hinsichtlich der Reduktion der oxLDL-Serumkonzentration durch das hier verabreichte Nährstoffpräparat als formal nicht erfüllt anzusehen war und die Bedeutung der interventionsunabhängigen oxLDL-Abnahme in Bezug auf das Ausbleiben eines ADMA-senkenden Effekts innerhalb der Gesamt- sowie Subkollektiv-Analyse („Höhe der oxLDL-Serumspiegel“) aus den unter Kap. 5.2.1 dargestellten Gründen offen bleiben muss, so scheint die fehlende bzw. die pathobiochemisch paradoxe Korrelation zwischen den oxLDL- und ADMA-Differenzen in der Verum- bzw. Placebogruppe einen entsprechenden Kausalzusammenhang eher zu widerlegen als zu erhärten. Auch ließen sich bei Betrachtung der Subkollektive „Höhe der antioxidativen Kapazität“/„(Nicht-) Raucher“ keine, den ADMA-Plasmaspiegel betreffenden Veränderungen trotz signifikanter Verbesserung der Antioxidanzienparameter TEAC und α -Tocopherol im Zuge der sechsmonatigen Supplementierung nachweisen. Eine mögliche Beeinflussung von ADMA durch die im Verumpräparat enthaltenen Antioxidanzien deutete sich einzig in einer inversen Korrelation zwischen den ADMA-Differenzen (T6-T0) und den Veränderungen der AT-Serumspiegel an ($r=-0,228$, $p=0,066$), wobei die Aussagekraft aufgrund des Signifikanz-trends sowie des niedrigen Korrelationskoeffizienten als gering einzustufen ist.

Im Gegensatz zu unserer Studie, in der sich somit keine relevanten Anhaltspunkte für einen ADMA-modulierenden Effekt einer additiven Antioxidanzienangabe auf *In-vivo*-Ebene fanden, erbrachten **tierexperimentelle Untersuchungen** vereinzelt Hinweise für einen positiven Einfluss. So wurde in Versuchen an Ratten gezeigt, dass eine nLDL-Infusion (4 mg/kg KG, Einmaldosis) zu einem signifikanten Anstieg der ADMA-Spiegel im Serum der Tiere führte und dass sich dieser bei vorheriger peroraler Verabreichung verschiedener Antioxidanzien (Probucol: 75-150 mg/kg KG, Vitamin E: 50-100 mg/kg KG, ECGC: 10-50 mg/kg KG) verhindern ließ [JIANG et al. 2002; TANG et al. 2006]. Die Beobachtung, wonach es unter alleiniger Antioxidanzienangabe zu keiner Veränderung der ADMA-Serumkonzentrationen kam, spricht allerdings dafür, dass es sich hierbei um Effekte speziell in Verbindung mit einem experimentell bedingten (akuten) ADMA-Anstieg handeln könnte. Ob bzw. inwieweit diese unter klinischen (chronischen) Bedingungen zum Tragen kommen, lässt sich auf Basis der vorgenannten Befunde hingegen nicht beantworten. In diesem Zusammenhang konnte in einer kürzlich publizierten, unkontrollierten (?) Studie gezeigt werden, dass ältere, nierenin-

suffiziente Ratten, denen eine Antioxidanzienkombination aus Catechinen, Vitamin E und C verabreicht wurde, eine Reduktion der ADMA-Plasmaspiegel verzeichneten [KORISH U. ARAFAH 2008 (abstract)]. Letzteres wurde von den Autoren auf die im Verlauf der Supplementierung ebenfalls zu beobachtende Erhöhung der antioxidativen Kapazität und damit einhergehend auf eine Verminderung des durch die Niereninsuffizienz induzierten oxidativen Stresses, angezeigt durch zugleich verringerte MDA-Plasmawerte, zurückgeführt. Den insgesamt positiven Befunden an Ratten steht ein Primaten-Modell mit cerebralem Vasospasmus gegenüber, das trotz eines nachweislich ADMA-senkenden Effekts von Probucol *in vitro* (HUVEC) keinen Beleg für eine Beeinflussung der ADMA-Spiegel *in vivo* nach Gabe von Probucol (100 mg/kg) im Vergleich zu Placebo erbrachte [PLUTA et al. 2005]. Wenngleich die genannten Tierstudien mit Blick auf die Methodik und das Design differenziert zu betrachten sind, so liegt die Vermutung nahe, dass die Inkonsistenz der Ergebnisse mit speziesspezifischen Unterschieden zu erklären sind.

Auch existieren in der Literatur bislang nur wenige Untersuchungen, die Auskunft über einen potenziellen Einfluss von Antioxidanzien auf die ADMA-Plasmakonzentration beim Menschen geben können. Die erste **Humanstudie**, in der ein entsprechender Zusammenhang überprüft wurde, stellt eine 2003 durchgeführte Pilotstudie der Arbeitsgruppe um SARAN et al. dar, in der acht Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (5 Männer, 3 Frauen, 46 ± 10 Jahre) und sechs gesunde Vergleichspersonen (5 Männer, 1 Frau, 55 ± 18 Jahre) täglich 800 I. E. α -Tocopherol über einen Zeitraum von acht Wochen erhielten. Hierbei zeigte sich, dass bei den nierengesunden Studienteilnehmern trotz stärkerer relativer Erhöhung der mittleren Vitamin-E-Plasmaspiegel (93,5 vs. 36,2% in der Patientengruppe bei vergleichbarer Ausgangsversorgung) keinerlei Veränderungen der ADMA-Plasmawerte⁸⁷ im Interventionsverlauf auftraten. Konträr dazu war bei sechs der insgesamt acht Patienten eine signifikante ADMA-Reduktion um durchschnittlich 22,8% (von $2,02 \pm 0,54$ auf $1,56 \pm 0,44$ $\mu\text{mol/l}$, $p < 0,001$) festzustellen, was von SARAN et al. [2003] als Hinweis auf einen positiven Effekt der Supplementierung gewertet wurde. Da die in der Gesamtgruppe der Patienten mit -13,5% erzielte ADMA-Netto-Senkung⁸⁸ (von $1,85 \pm 0,60$ auf $1,60 \pm 0,57$ $\mu\text{mol/l}$) ohne statistische Signifikanz blieb ($p = 0,160$), erscheint diese Interpretation neben zahlreichen methodischen Mängeln (u. a. fehlende Placebo-Kontrolle, geringer Stichprobenumfang, z. T. zusätzliche Einnahme von nicht näher spezifizierten Multinährstoffpräparaten in der Patientengruppe, fehlende Charakteristik der Vergleichsgruppe) allerdings als äußerst fragwürdig. Da bis auf Albumin, welches erst bei deutlich verminderter GFR im Plasma absinkt, keine Angabe zu weiteren (sensitiven) Markern der renalen Funktion und ihrer Verän-

⁸⁷ d. h. weder im Mittel noch in der Einzelbetrachtung

⁸⁸ Konstanz bzw. Anstieg der ADMA-Verlaufswerte bei den restlichen zwei Patienten

derungen im Studienverlauf erfolgte, ist auch hier nicht auszuschließen, dass die in der Patientengruppe beobachtete Abnahme der ADMA-Plasmaspiegel durch mehr oder weniger starke (sub-)klinische Veränderungen der renalen Clearance zustande kam.

Mögliche Anhaltspunkte für einen ADMA-modulierenden Effekt von Vitamin E ergeben sich aus einer weiteren Studie an Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (15 Männer, 16 Frauen, $69,2 \pm 11,2$ Jahre), in der folgende zwei Hämodialyseregime über einen Zeitraum von 18 Monaten miteinander verglichen wurden: (1) PSE-Gruppe ($n=16$): sechs Monate Hämodialyse unter Verwendung einer Polysulfon-Membran mit Vitamin-E-Coating, gefolgt von einem zwölfmonatigen Dialysezeitraum mit Switch auf eine Polysulfon-Membran ohne Vitamin-E-Coating, (2) PS-Gruppe ($n=15$): 18 Monate Hämodialyse unter Verwendung einer Polysulfon-Membran ohne Vitamin-E-Coating [MORIMOTO et al. 2005]. Das Ausmaß der ADMA-Clearance zwischen der PSE- und PS-Membran unterschied sich dabei ebenso wenig signifikant wie die in beiden Dialysegruppen gemessenen ADMA-Ausgangswerte⁸⁹. Nach sechsmonatiger Dialyse wiesen Patienten der PSE-Gruppe im Mittel signifikant niedrigere ADMA-Plasmaspiegel ($0,54 \pm 0,09 \mu\text{mol/l}$) im Vergleich zu Studienbeginn auf (T0: $0,74 \pm 0,12 \mu\text{mol/l}$, $p < 0,01$). Auch lag zu diesem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zu den ADMA-Plasmawerten der PS-Gruppe vor (T6: $0,62 \pm 0,06 \mu\text{mol/l}$, $p < 0,05$). Demgegenüber war nach Umstellung auf das PS-Dialyseregime ein signifikanter Anstieg der ADMA-Plasmaspiegel zum Ende des 18-monatigen Behandlungszeitraumes feststellbar ($0,66 \pm 0,12 \mu\text{mol/l}$, $p < 0,01$ vs. T6). Parallel hierzu wurden unter der sechsmonatigen PSE-Dialyse signifikant geringere oxLDL- und MDA-LDL-Werte (jeweils bezogen auf $\text{ng}/\mu\text{g}$ LDL-Protein) gegenüber T0 sowie der PS-Gruppe beobachtet, wohingegen abermals signifikante Anstiege beider Oxidationsmarker während des darauffolgenden zwölfmonatigen PS-Dialysezyklus verzeichnet wurden. In der PS-Gruppe blieben demgegenüber sowohl die ADMA-Plasmaspiegel als auch die oxLDL- und MDA-LDL-Werte während des gesamten 18-monatigen Behandlungszeitraumes auf unverändertem Niveau. Auf Basis dieser Ergebnisse wie auch der Beobachtung, nach der weder das PSE- noch das PS-Dialyseregime einen signifikanten Einfluss auf die SDMA-Plasmawerte besaß, sahen MORIMOTO et al. [2005] ihre Hypothese bestätigt, wonach das Vitamin-E-Coating die lokale ROS-Bildung an bioinkompatiblen Hämodialyse-Membranen herabsetzt und auf diese Weise eine ADMA-Senkung durch Steigerung der DDAH-Aktivität bewirkt. Allerdings relativierten die Autoren ihre Annahme aufgrund der Tatsache, dass Patienten unter der sechsmonatigen PSE-Dialyse eine signifikant geringere Dosis an Erythropoetin (EPO) zur Vermeidung einer renalen Anämie benötigten ($p < 0,05$ vs.

⁸⁹ Mit Ausnahme der ADMA-Clearance entsprechen alle in der Studie ermittelten Parameter prädialytischen Plasmakonzentrationen.

T0), während die EPO-Dosis im nachfolgenden PS-Dialysezyklus signifikant angehoben wurde ($p < 0,01$ vs. T6). Einer Studie von SCALERA et al. [2005] zufolge verringert EPO (Epoetin β , Darbepoetin α) die DDAH-Aktivität *in vitro* – ein Effekt, welcher von einer signifikant gesteigerten ADMA-Freisetzung in entsprechend inkubierten Endothelzellen (HUVEC) begleitet war. Demnach muss letztlich auch hier offen bleiben, ob bzw. in welchem Ausmaß die beobachtete ADMA-Senkung auf antioxidative Effekte im Zusammenhang mit dem Vitamin-E-Coating oder auf die mit dem PSE-Dialyseregime assoziierte EPO-Dosisreduktion zurückgeführt werden kann. Dabei ist ferner als limitierend anzusehen, dass durch MORIMOTO et al. [2005] keine Überprüfung auf mögliche Korrelationen zwischen den Veränderungen der ADMA-Plasmakonzentrationen und der oxLDL-/MDA-LDL-Werte bzw. der Menge an eingesetztem EPO vorgenommen wurde.

Ein positiver Effekt einer oralen Antioxidanziengabe deutete sich ferner in einer kontrollierten Studie an, in der diabetische Hämodialyse-Patienten (27 bzw. 23 Männer und Frauen mit z. T. koronarer Vorgeschichte, mittleres Alter: 64 Jahre) entweder 600 mg/d α -Liponsäure für drei Monate ($n=25$) oder keine Supplementierung ($n=25$) bei vergleichbarem Ausgangsstatus aller der in der Untersuchung erhobenen Parameter⁹⁰ verabreicht bekamen [CHANG et al. 2007]. Während die ADMA- und oxLDL-Plasmakonzentrationen der Kontrollgruppe im Median unverändert blieben, sank der ADMA-Plasmaspiegel der Verumgruppe von basal 1,68 auf 1,31 $\mu\text{mol/l}$ zum Ende der Intervention hin ab (-22%, $p=0,001$). Innerhalb der Verumgruppe konnte zudem eine Abnahme der medianen oxLDL-Plasmawerte von 71 (T0) auf 57 U/l (T3) beobachtet werden, welche sich jedoch als statistisch nicht signifikant herausstellte. Ob bzw. inwieweit die unter Supplementierung ermittelte ADMA-Senkung hiermit in kausalem Zusammenhang stand, lässt sich aufgrund fehlender Angaben in Hinblick auf eine Korrelation zwischen beiden Variablen nicht beantworten. Aus methodenkritischer Sicht ist dabei weiterhin anzuführen, dass weder für die Veränderungen der jeweiligen Plasmaspiegel noch für den zum Interventionsende in der Verumgruppe gemessenen ADMA- bzw. oxLDL-Status eine Testung auf Signifikanzunterschiede zur Kontrollgruppe (unabhängiger Stichprobenvergleich) erfolgt ist. Ungeachtet dessen konnten CHANG et al. [2007] allerdings zeigen, dass das Niveau der ADMA-Plasmakonzentration nach α -Liponsäure-Intervention mit 1,31 $\mu\text{mol/l}$ um den Faktor 3,6 und damit signifikant ($p=0,001$) höher lag, als in einer Vergleichsgruppe mit nierengesunden Probanden ($n=10$, ADMA: 0,36 $\mu\text{mol/l}$). Einen Interventionseffekt vorausgesetzt, konnten die ADMA-Plasmawerte der untersuchten Hämodialyse-Patienten damit nicht auf ein mit Nierengesunden vergleichbares Niveau gesenkt werden. Demnach wäre ferner zu postulieren, dass die bei Nierenpatienten beobachteten Effekte sich

⁹⁰ prädialytische Bestimmung

in einem Konzentrationsbereich bewegen, der – unabhängig von der jeweiligen Analyse-methode – deutlich über den ADMA-Plasmawerten von Personen ohne manifeste Nieren-funktionsstörung und damit unseres Kollektivs angesiedelt ist.

In Hinblick auf die Auswirkungen einer Antioxidanzengabe bei **nierengesunden Kollektiven** ist der Literatur lediglich eine kleinere Untersuchung von ENGLER et al. [2003] zu entnehmen, die übereinstimmend mit unseren Ergebnissen weder signifikante noch klinische relevante Veränderungen der ADMA-Plasmakonzentration bei Kindern und Jugendlichen mit Hyperlipidämie ($n=15$, familiäre Hypercholesterol-/kombinierte Hyperlipidämie, Alter: 9-20 Jahre) aufzeigen konnte. Ziel dieser Studie war es, die Effekte einer lipidsenkenden Diät (National Cholesterol Education Program Step II, NCEP II) in Kombination mit Vitamin E (400 I.E. bzw. 268 TÄ/d) und Vitamin C (500 mg/d) auf die FMD, den ADMA- und CRP-Plasmaspiegel sowie verschiedene Oxidationsmarker (u. a. zirkulierendes oxLDL, oxLDL-AAK-Titer) im *cross-over* mit einer NCEP-II-Diät plus Placebo für je sechs Wochen zu überprüfen (vgl. Kap. 5.2.1, Tab. 28). Wie erwartet, konnte durch die NCEP-II-Diät eine signifikante LDL-Reduktion nach einem *run in* von sechs Wochen erzielt werden (-8% vs. Baseline, $p<0,01$), welche über den gesamten Interventionsverlauf, einschließlich der *wash-out*-Periode (NCEP-II-Diät, 6 Wochen) zwischen den beiden *Cross-over*-Armen, anhielt. Für die im *cross-over* zu vergleichenden Diätregime ließen sich mit Ausnahme eines signifikanten Anstiegs der FMD bei additiver Antioxidanzengabe (65% vs. Baseline, $p<0,001$) keinerlei Veränderungen der in der Studie gemessenen Parameter feststellen. In Bezug auf ADMA fanden sich nach NCEP-II-Diät in Kombination mit Antioxidanzien im Mittel sogar geringfügig höhere Plasmawerte ($1,10 \pm 0,85 \mu\text{mol/l}$), während die ADMA-Plasmawerte unter NCEP-II-Diät plus Placebo in der Tendenz geringer ($0,87 \pm 0,40 \mu\text{mol/l}$) als zur Baseline ($1,00 \pm 0,38 \mu\text{mol/l}$) ausfielen. Aufgrund der kurzen Interventionsdauer, der geringen Fallzahl wie auch der Spezifität des Kollektivs (Kinder und Jugendliche) erscheinen die von ENGLER et al. [2003] gezeigten Resultate allerdings nur bedingt geeignet, um einen möglichen Effekt von Antioxidanzien auf die ADMA-Plasmakonzentration bei nierengesunden Kollektiven *per se* zu widerlegen.

Im Zusammenhang mit der Beeinflussbarkeit der ADMA-Plasmakonzentration durch Antioxidanzien ist ferner der Frage nachzugehen, inwieweit unsere Daten wie auch andere Humanstudien die auf *In-vitro*-Ebene gezeigten Befunde auf **Assoziationsebene** stützen. Werden zunächst die in der Korrelationsanalyse zu T0 ermittelten Resultate betrachtet, so war für die ADMA-Plasmakonzentration weder eine Assoziation zum oxLDL-Status noch zu den in unserer Untersuchung erhobenen Antioxidanzienparametern (TEAC, α -Tocopherol-Serumwerten mit/ohne Lipidkorrektur) vorhanden. Zu einem übereinstimmenden Ergebnis gelangte eine Korrelationsanalyse der Arbeitsgruppe um EID et al. [2004], in der ebenfalls kein Zusammenhang zwischen ADMA und den oxLDL-Plasmawerten sowie der Konzentration an Thio-

barbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) in einer männlichen Hochrisikogruppe ($n=563$) bestand. Auch ließ sich in der Kohorte der prospektiven *MONICA-Augsburg-Studie* ($n=342$) keine Assoziation zwischen den ADMA- und oxLDL-Plasmaspiegeln nachweisen [MAAS et al. 2007]. In Hinblick auf oxLDL ist die Vergleichbarkeit mit unseren Daten dabei insofern gegeben, als dass die in den beiden vorgenannten Studien ermittelten Plasmakonzentrationen unter Einsatz des hier verwendeten *Mercodia oxLDL ELISA* bestimmt wurden (\rightarrow Spezifität des monoklonalen Antikörpers mAb-4E6, vgl. Kap. 5.2.1, S. 133f). Überdies ist festzustellen, dass Korrelationen zwischen ADMA und dem (anti-)oxidativen Status *in vivo* der bisherigen Literaturlage zufolge kaum untersucht wurden.

Zieht man die Ergebnisse der Subkollektiv-Analyse zur Beurteilung möglicher Assoziationen im Querschnitt heran, so konnte innerhalb unseres Kollektivs zwar keine statistisch signifikante, dafür jedoch eine aus pathobiochemischer Sicht plausible Tendenz zu höheren ADMA-Mittelwerten bei hohen gegenüber niedrigen oxLDL-Serumspiegeln (Subkollektiv oxLDL_T0 ≥ 83 vs. < 60 U/l) sowie niedriger gegenüber hoher antioxidativer Plasmakapazität (Subkollektiv TEAC_T0 < 2213 vs. ≥ 2363 $\mu\text{mol/l}$) beobachtet werden. Im Widerspruch dazu steht hingegen der Befund, wonach das Subkollektiv der Nichtraucher im Mittel geringfügig höhere ADMA-Plasmawerte im Vergleich zur Gruppe der aktiven Raucher (T0: $0,38 \pm 0,06$ vs. $0,36 \pm 0,07$ $\mu\text{mol/l}$, T6: $0,40 \pm 0,05$ vs. $0,38 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/l}$; jeweils $p > 0,05$) verzeichnete.

Interessant hierbei ist, dass der Einfluss des Rauchverhaltens auf den ADMA-Stoffwechsel derzeit noch kontrovers diskutiert wird. So ergab eine von ZHANG et al. [2006] durchgeführte *In-vitro*-Studie, dass Endothelzellen (human, bovin), die einem wässrigen Zigarettenrauchextrakt ausgesetzt wurden, signifikant höhere intrazelluläre ADMA-Gehalte (129%, $p < 0,05$) als Kontrollzellen aufwiesen. Des Weiteren ließ sich eine signifikante sowie durch Antioxidanzien (N-Acetyl-Cystein) hemmbare Abnahme der DDAH-Aktivität in entsprechend exponierten Zellen (-35% vs. Kontrollen, $p < 0,01$) feststellen. In Einklang hiermit konnten ZHANG et al. [2006] im Rahmen einer kleineren Querschnittsuntersuchung zeigen, dass die mittleren ADMA-Plasmawerte bei aktiven Rauchern ($n=12$, ≥ 20 Zigaretten pro Tag) um ca. 80% und damit signifikant höher als bei Nichtrauchern ($n=10$, vgl. Kap. 2.2.3.1, Tab. 3) lagen. Diese Beobachtung fand sich zudem in zwei größeren Kollektiven ($n=3238$ [MEINITZER et al. 2007], $n=1874$ [SCHNABEL et al. 2005]), wobei die relativen Unterschiede im ADMA-Status zwischen Rauchern und Nichtrauchern (3,1 bzw. 4,9%) trotz des in beiden Untersuchungen erreichten Signifikanzniveaus aus klinischer Sicht jedoch vergleichsweise gering ausfielen. Im Gegensatz dazu wiesen Nichtraucher der *MONICA-Augsburg-Kohorte* ($n=342$) im Durchschnitt höhere ADMA-Plasmawerte als aktive Raucher auf [MAAS et al. 2007]. Dies traf sowohl auf die im Querschnitt untersuchten KHK-Fälle ($0,87 \pm 0,23$ vs. $0,69 \pm 0,17$ $\mu\text{mol/l}$, $p < 0,001$) als auch mit vergleichsweise geringerer Ausprägung auf die gesunden

Kontrollen ($0,80 \pm 0,22$ vs. $0,74 \pm 0,20$ $\mu\text{mol/l}$, $p=0,067$) zu. Stimmig mit diesem Phänomen, welches auch in Querschnittsanalysen anderer Arbeitsgruppen demonstriert werden konnte [EID et al. 2004; ONAT et al. 2008], ist der von MAAS et al. [2007] an Endothelzellen (EAhy 926) nachgewiesene Befund, wonach sich unter dem Einfluss von Zigarettenrauchkondensat eine Steigerung der DDAH-II-mRNA-Expression (87,6%, $p=0,025$) bei zugleich signifikant verringerter ADMA-Freisetzung (um ca. 25-28% vs. Kontrollen) ergab. Die gegenteiligen Resultate zur *In-vitro*-Studie von ZHANG et al. [2006] begründen die Autoren mit Unterschieden in der Aufbereitung resp. Zusammensetzung der verwendeten Zigarettenrauchextrakte, wenn auch die genauen Ursachen für die paradoxe DDAH-Aktivitätssteigerung angesichts der Redoxsensitivität des Enzyms im Unklaren bleiben. Auf *In-vivo*-Ebene konnte dagegen in einer weiterführende Analyse von EID et al. [2004] gezeigt werden, dass sich der signifikante Unterschied im ADMA-Status zwischen Nichtrauchern und Rauchern (Median 1,42 vs. 1,32 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,037$) nach Adjustierung um weitere Risikovariablen (BMI, Insulin, Blutdruck, Creatinin) verlor. Demzufolge ist es als wahrscheinlich anzusehen, dass für die widersprüchlichen Ergebnisse aus Querschnittsstudien Confounder-bedingte Effekte verantwortlich zu machen sind, zumal mögliche Störgrößen in den meisten der vorgenannten Analysen nicht berücksichtigt wurden. Auch wird hierdurch einmal mehr verdeutlicht, dass die einer ADMA-Erhöhung zugrunde liegenden Mechanismen – unabhängig von der *In-vitro*- bzw. *In-vivo*-Ebene – weitaus komplexerer Natur sind und nicht allein durch den Einfluss eines Einzelfaktors erklärbar sind [KIELSTEIN et al. 2006; MAAS et al. 2007].

Neben generellen Problemen, die sich bei der **Übertragbarkeit von *In-vitro*-Befunden auf *In-vivo*-Verhältnisse** ergeben (u. a. unphysiologische Konzentrationen der in Zellkultur eingesetzten Noxen, durch Kulturbedingungen und -medium hervorgerufene Störeinflüsse, Verwendung von Zelllinien aus unterschiedlichen Organen [HUVEC, HCAEC], Spezies [BAEC] oder pathologisch verändertem Gewebe [EAhy 926], Verwendung von isolierten und damit von metabolischen und regulatorischen Vorgängen unabhängigen Zellen), lässt sich als ein möglicher Grund für die Diskrepanz zwischen der *in vitro* unter oxLDL-Inkubation zu beobachtenden ADMA-Akkumulation und der fehlenden *In-vivo*-Assoziation zwischen beiden Parametern anführen, dass in den jeweiligen Zellkulturstudien [ITO et al. 1999; BÖGER et al. 2000b; JIANG et al. 2003; JIANG et al. 2006; TANG et al. 2006] ausschließlich durch Cu^{2+} -Oxidation gewonnenes oxLDL zur Anwendung kam. Wie bereits im Zusammenhang mit dem *Ex-vivo*-Assay der Kupfer-katalysierten LDL-Oxidation angesprochen wurde (vgl. Kap. 5.2.1), stellt experimentell generiertes oxLDL nur ein bedingt geeignetes Korrelat für zirkulierende oxLDL-Spezies dar, da von gravierenden Unterschieden in Hinblick auf strukturelle Veränderungen (d. h. den Lipid-, Protein- und/oder Antioxidanziengehalt betreffende, oxidative Modifikationen) sowie den Oxidationsgrad ausgegangen werden kann.

Auch könnte ein möglicher Erklärungsansatz für die Abweichung zwischen dem Ausbleiben eines nachweislich ADMA-senkenden Effekts in Interventionsstudien und den positiven Befunden, wie sie mit synthetischen Antioxidanzien in Zellkultur erzielt wurden, darin bestehen, dass im letzteren Fall auch substanzspezifische Wirkungen zu berücksichtigen sind. So besitzt z. B. PDTC nicht nur antioxidative Eigenschaften, sondern wirkt zudem als NF κ B-Inhibitor, wobei PDTC direkt mit der p50-Untereinheit des dimerischen NF κ B-Komplexes interagiert [KIM et al. 1999; BRENNAN U. O'NEILL 1996]. Dieser Sachverhalt erscheint insofern von Bedeutung, als dass die Aktivierung des NF κ B-Signalwegs als derjenige Mechanismus identifiziert werden konnte, über welchen moderater Scherstress zu einer ADMA-Akkumulation via Steigerung der PRMT-1-mRNA-Expression führt [OSANAI et al. 2003]. Des Weiteren ist denkbar, dass die in Gegenwart von Antioxidanzien beobachtete Aufhebung der oxLDL-induzierten ADMA-Steigerung darauf zurückzuführen ist, dass im *In-vitro*-Modell der Schutzeffekt der im Plasma vorhandenen Antioxidanzien entfällt. Umgekehrt könnte demnach spekuliert werden, dass der additive Beitrag durch exogen verabreichte Antioxidanzien zu gering ausfällt, um eine weitere (quantifizierbare) ADMA-Reduktion *in vivo* zu bewirken. In diesem Kontext muss ferner die Frage gestellt werden, inwieweit der ADMA-Plasmaspiegel überhaupt einen geeigneten Marker darstellt, um die auf intrazellulärer Ebene stattfindenden Prozesse adäquat widerzuspiegeln.

Abschließend sei noch erwähnt, dass bislang publizierte Daten aus methodisch hochwertigen Studien ebenfalls keinen Nachweis für eine ADMA-senkende Wirkung von Statinen erbringen konnten [Übersicht bei MAAS 2005; BELTOWSKI U. KEDRA 2006; VLADIMIROVA-KITOVA 2008]. Dieses Ergebnis überrascht insofern, da ein synergistischer Effekt, resultierend aus der lipidsenkenden und antioxidativen Wirkung von Statinen, zu erwarten wäre. Die in der hier vorliegenden Arbeitshypothese postulierte ADMA-Senkung durch eine Modulation der oxLDL-Serumkonzentration erscheint somit auch vor diesem Hintergrund als fraglich.

5.3.3 BEWERTUNG DES ADMA-STATUS VOR DER SUPPLEMENTIERUNG

Wie bereits im Zusammenhang mit den sich aus Interventionsstudien an niereninsuffizienten Patienten ergebenden Hinweisen für eine potenziell ADMA-senkende Wirkung von Antioxidanzien angesprochen wurde, könnte in der Höhe der ADMA-Plasmakonzentration eine weitere Ursache für das Ausbleiben eines Interventionseffekts in unserem Kollektiv gesehen werden. Die hierbei zugrunde liegende Annahme eines **determinierenden Einflusses des initialen ADMA-Status auf die Veränderungen der ADMA-Plasmawerte** im Zeitverlauf wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Korrelations- (T6-T0-Differenzen vs. T0-Status, Kap. 4.2.4.1, S. 100) und Subkollektiv-Analyse („Höhe der ADMA-Plasmaspiegel“, vgl. Kap.

4.2.4.2, S. 101f) gestützt, anhand derer sich eine entsprechend inverse Assoziation, d. h. eine Konzentrationsabnahme (-zunahme) bei hohen (niedrigen) Basalwerten, trotz der im Gesamtkollektiv im Mittel errechneten Konstanz der ADMA-Verlaufswerte aufzeigen ließ. In Bezug auf mögliche Effekte der Nährstoffgabe erscheint dabei interessant, dass die zu beobachtende ADMA-Reduktion im Subkollektiv mit den initial höchsten Plasmawerten (ADMA_T0 $\geq 0,43 \mu\text{mol/l}$) lediglich unter Verabreichung des Verumpräparats ein statistisch signifikantes Niveau erreichte ($-0,05 \pm 0,07$, $p=0,010$, t-Test für abhängige Stichproben). Neben den geringen Fallzahlen wird dieser Befund allerdings durch den Umstand relativiert, dass der Vergleich mit den unter Placebo ermittelten Differenzen ($-0,02 \pm 0,08 \mu\text{mol/l}$) keinen signifikanten Unterschied erbrachte ($p=0,311$; t-Test für unabhängige Stichproben).

In Hinblick auf die **qualitative Beurteilung des ADMA-Status** gilt zu beachten, dass die in der Literatur für verschiedene Populationen im Mittel angegebene Höhe der ADMA-Plasmawerte in Abhängigkeit vom Analyseverfahren großen Schwankungen unterliegt (Gesunde: $0,12\text{-}4,0 \mu\text{mol/l}$, vgl. Kap. 2.2.2.3). Ohne in die Diskussion um die mit der Analytik verbundenen Probleme im Detail einsteigen zu wollen, sei an dieser Stelle kurz erwähnt, dass neben verschiedenen Trenn- und Detektionsverfahren (u. a. HPLC-Systeme gekoppelt mit UV-, Fluoreszenz- oder MS-Detektion, GC-MS-Verfahren, Kapillarelektrophorese mit Fluoreszenzdetektion, ELISA-Technik) auch das Probenmaterial selbst (Serum, Heparin- oder EDTA-Plasma) sowie die Art der Probenaufbereitung (z. B. mit/ohne OPA-Derivatisierung, Festphasenextraktion oder Proteinpräzipitation) für die beschriebenen Unterschiede verantwortlich zu machen sind [Übersicht bei TEERLINK 2007; HOROWITZ U. HERESZTYN 2007; MARTENS-LOBENHOFER U. BODE-BÖGER 2007]. Ein direkter Vergleich der in dieser Arbeit erhobenen ADMA-Plasmaspiegel mit denen anderer (Risiko-)Kollektive ist daher nur bedingt, d. h. lediglich bei gleicher oder ähnlicher Methodik, möglich.

Zieht man allerdings „Normal- bzw. Referenzwerte“, wie sie in den letzten Jahren unter Berücksichtigung analytisch-methodischer Aspekte formuliert wurden, für eine Bewertung heran, so können die ADMA-Plasmawerte unseres Kollektivs als relativ niedrig eingestuft werden: Wie in Kap. 4.2.4.1 bereits dargelegt wurde, war der im Gesamtkollektiv gemessene Ausgangsspiegel ($0,38 \pm 0,06 \mu\text{mol/l}$) in einem Konzentrationsbereich angesiedelt, wie er unter Verwendung von Fluoreszenz- sowie MS-gekoppelten HPLC-Verfahren für gesunde Personen charakteristisch ist [$0,3\text{-}0,5$ bzw. $0,4 \mu\text{mol/l}$, MARTENS-LOBENHOFER U. BODE-BÖGER 2006; MARTENS-LOBENHOFER U. BODE-BÖGER 2007]. Auch zeigt sich mit Blick auf den zu T0 ermittelten Maximalwert ($0,54 \mu\text{mol/l}$), dass auf Basis dieser Beurteilungsgrundlage allenfalls geringfügig erhöhte ADMA-Plasmawerte in der von uns untersuchten Studien- gruppe auftraten.

Dieses Ergebnis fällt insofern erstaunlich aus, da aufgrund der Risikocharakteristik unseres Kollektivs von einer stärkeren Erhöhung der ADMA-Plasmakonzentration, wie sie als Voraussetzung für die vorliegende Arbeitshypothese auf Basis epidemiologischer Daten (vgl. Kap. 2.2.3.1) formuliert wurde, auszugehen wäre. Gleichmaßen überraschend - wenn auch stimmig mit der zuvor getroffenen Feststellung - ist die Beobachtung, wonach zwischen der Höhe der ADMA-Plasmakonzentration und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren ebenfalls keine Assoziation innerhalb unseres Kollektivs bestand (vgl. Kap. 4.2.4.3, Tab. 26). Des Weiteren waren in der vorliegenden Untersuchung keinerlei Zusammenhänge zwischen den ADMA-Plasmawerten und den für das kardiovaskuläre Risiko relevanten biochemisch-klinischen Variablen (Lipidprofil, Glucose, SBD, DBD, BMI, TU) erkennbar. Beim Vergleich mit der Literatur stehen unsere Daten jedoch keinesfalls isoliert, da auch andere Arbeitsgruppen von einer fehlenden Assoziation zwischen ADMA und verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren bzw. damit assoziierten biochemisch-klinischen Parametern berichten [u. a. STÜHLINGER et al. 2002; LU et al. 2003a; DIERKES et al. 2004; ZIEGLER et al. 2005; GARCIA et al. 2007; CETINALP-DEMIRCAN et al. 2007; JEHLIČKA et al. 2009; GRUBER et al. 2008].

Auch wenn die Komplexität der sich hieraus ergebenden Frage nach der Eignung von ADMA als universellem Risikomarker keine tiefere Analyse erlaubt, so könnte eine mögliche Erklärung für die in unserer Studie nicht nachweisbare Assoziation in der multimedikamentösen Behandlung unserer Probanden zu sehen sein (vgl. Kap. 4.2.1.5, S. 78 sowie Tab. A9, Anhang B): Mit einem Anteil von 89,4% unterlagen nahezu alle Studienteilnehmer einer Pharmakotherapie, welche auf eine Behandlung kardiovaskulärer Risikofaktoren abzielte. Knapp die Hälfte davon (43,6%) erhielt eine Kombination aus zwei oder drei verschiedenen Arzneimittelgruppen (z. B. Antihypertonika kombiniert mit Lipidsenkern und/oder Antidiabetika). Weiterhin ist festzustellen, dass in Bezug auf die im Gesamtkollektiv verwendeten Medikamentengruppen die hohe Einnahmeprävalenz von Antihypertonika (82,9%, darunter v. a. β -Rezeptorblocker und ACE-Hemmer) hervorsticht. Ausgehend von Humanstudien, die erste Hinweise auf einen ADMA-senkenden Effekt einer antihypertensiven Pharmakotherapie mit ACE-Hemmern und β -Rezeptorblockern geben, ist denkbar, dass die relativ niedrigen ADMA-Plasmaspiegel unseres Kollektivs zumindest teilweise auf die Wirkung dieser Medikamente zurückzuführen sind. Daneben sind verschiedene Arbeiten publiziert, in denen positive Effekte von oralen Antidiabetika auf ADMA *in vitro* und *in vivo* beschrieben wurden [Übersicht bei MAAS 2005; BELTOWSKI U. KEDRA 2006; VLADIMIROVA-KITOVA 2008]. Wie im Fall der Statine (vgl. Kap. 5.3.2) gilt es durch weiterführende Studien zu prüfen, welcher Stellenwert der (multi-)medikamentösen Behandlung mit den zuvor genannten Arzneimitteln in Hinblick auf eine Modulation des ADMA-Stoffwechsels tatsächlich beigemessen werden kann.

5.3.4 ZUSAMMENFASSUNG UND ZWISCHENFAZIT

Die hier gezeigten Ergebnisse stimmen mit der Literatur dahingehend überein, dass eine B-Vitaminsupplementierung – hier isoliert von der Antioxidanzengabe betrachtet – keinen Einfluss auf die ADMA-Plasmakonzentration ausübt. Vor dem Hintergrund, dass in der Gesamtheit der kontrollierten Interventionsstudien z. T. deutlich höhere Homocystein-Senkungen erzielt wurden, war dabei auch die unter Kap. 5.1 getroffene Annahme zu widerlegen, wonach die in unserer Studie erzielte Homocystein-Reduktion zu gering war, um einen Effekt auf ADMA bewirken zu können. Auch ließ sich die von verschiedenen Autoren aufgestellte These nicht bestätigen, wonach eine durch die B-Vitamingabe induzierte Steigerung der PRMT-I-abhängigen *De-novo*-Synthese potenziell ADMA-senkende Effekte auf Seite des katabolen DDAH-Systems kompensiert. Folgerichtig hätte dies zu einem simultanen Anstieg der SDMA-Plasmakonzentration führen müssen. Dieser ließ sich allerdings in keiner der bislang durchgeführten Interventionsstudien – einschließlich der hier vorliegenden Arbeit – ermitteln.

Im nächsten Schritt stellte sich die Frage, ob im Ergebnis überhaupt von einem kausalen Zusammenhang zwischen Homocystein und ADMA *in vivo* auszugehen ist, da die Datenlage hierzu keinesfalls ein einheitliches Bild hervorbringt. Vielmehr scheint es, dass das Fehlen einer Assoziation in unserer Studie gegenüber Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen durch subklinische Unterschiede im renalen Status determiniert wird. Wie für Homocystein in der aktuellen Literatur diskutiert, konnte demnach postuliert werden, dass eine mit einer Hyperhomocysteinämie assoziierte Erhöhung der ADMA-Plasmakonzentration lediglich als ein Epiphänomen einer milden Nierendysfunktion anzusehen ist.

In Hinblick auf die Gabe von Antioxidanzien erbrachte unsere Untersuchung in Übereinstimmung mit einer anderen Studie an Nierengesunden keine Anhaltspunkte für eine Beeinflussung von ADMA. Demgegenüber lieferten Studien an niereninsuffizienten Patienten Hinweise für ADMA-senkende Effekte, wenngleich hierbei ausgeprägte methodische Mängel identifiziert werden konnten. Vor dem Hintergrund des renalen Status könnten die beobachteten Unterschiede allerdings darauf hindeuten, dass positive Effekte einer additiven Antioxidanzengabe möglicherweise erst bei verhältnismäßig hohen ADMA-Plasmakonzentrationen in Erscheinung treten. Dies vermag auch den fehlenden Einfluss der Supplementierung in unserer Studie zu erklären, da unser Kollektiv - selbst in Relation zu den als physiologisch angenommenen Werten - niedrige ADMA-Plasmaspiegel aufwies.

Anknüpfend an das Konzept einer durch oxidativen Stress induzierten ADMA-Erhöhung konnte ferner dargelegt werden, dass auf Basis unserer Resultate sowie den Ergebnissen anderer Studien Assoziationen zwischen ADMA und oxLDL sowie dem Rauchverhalten

(noch) nicht bzw. nicht eindeutig belegt sind. So konnte die der vorliegenden Fragestellung zugrunde liegende Annahme, dass eine höhere oxidative Belastung *per se* mit einer Erhöhung der ADMA-Konzentration *in vitro* und *in vivo* einhergeht, aufgrund der widersprüchlichen Datenlage zum Einfluss des Rauchens nicht zweifelsfrei bestätigt werden. Des Weiteren ließ sich im Zusammenhang mit der Antioxidanzengabe demonstrieren, dass *In-vitro*-Befunde nicht unkritisch auf *In-vivo*-Verhältnisse übertragen werden dürfen. Konkret verdeutlicht wurde dies u. a. anhand der in jeweiligen Zellkulturstudien eingesetzten, durch Cu^{2+} -Oxidation gewonnenen oxLDL-Partikel, welche kein geeignetes Korrelat für die im Plasma zirkulierende oxLDL-Fraktion darstellen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass der ADMA-Plasmaspiegel, bedingt durch die fehlende Assoziation zur Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren sowie der hierfür relevanten biochemisch-klinischen Variablen, nicht die Funktion eines potenziellen Risikomarkers in unserer Studiengruppe erfüllte.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND FAZIT

Hintergrund: Wie Forschungsarbeiten der letzten drei Jahrzehnte verdeutlichen, kommt dem Gefäßendothel und hierbei im Besonderen der durch Endothelzellen vermittelten Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) eine für die Gefäßhomöostase und -integrität zentrale Bedeutung zu. Das gasförmige Radikal, welches unter Katalyse der NO-Synthase (NOS) aus L-Arginin synthetisiert wird, bewirkt vielfältige vasoprotektive Effekte, die auf seiner vasodilatatorischen Funktion sowie auf seinen antithrombotischen, antiinflammatorischen, anti-proliferativen und antioxidativen Eigenschaften beruhen. In einer Dysfunktion des Endothels und dem damit einhergehenden Verlust an biologisch aktivem NO wird daher ein wichtiges pathophysiologisches Ereignis gesehen, welches dem durch die bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren induzierten Initialphänomen der Atherogenese basierend auf der „Response-to-injury-Hypothese“ entspricht.

Ein auf molekularer Ebene diskutierter Mechanismus, der in diesem Zusammenhang zunehmend in den Fokus rückte, stellt die kompetitive Hemmung der NOS-Enzymaktivität durch asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), einem endogenen methylierten L-Arginin-Analogon, dar. Dies wiederum geht aus einer Vielzahl klinischer und experimenteller Arbeiten hervor, in denen eine mit kardiovaskulären Risikofaktoren (u. a. Hyperhomocysteinämie, Hypercholesterolämie) bzw. proatherogenen Noxen (Homocystein, oxLDL) assoziierte ADMA-Erhöhung aufgezeigt werden konnte. *In-vitro*-Befunde, die auf eine redoxsensitive Regulation der an der ADMA-Synthese sowie am ADMA-Abbau beteiligten Enzyme PRMT-I bzw. DDAH hinweisen, lassen dabei den Schluss zu, dass oxidativer Stress offensichtlich als pathophysiologisches Bindeglied einer durch Homocystein- und oxLDL-induzierten ADMA-Akkumulation bei Personen mit erhöhtem Atherosklerose-Risiko anzusehen ist.

Arbeitshypothese und Fragestellung: Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, den Einfluss einer kombinierten Gabe von B-Vitaminen (800 µg/d Folsäure, 20 µg/d Vitamin B₁₂, 6 mg/d Vitamin B₆) und antioxidativ wirksamen Substanzen (80 mg/d Vitamin E, 500 mg/d Vitamin C, 15 mg/d Zink, 80 µg/d Selen, 30 mg/d Coenzym Q₁₀, 3 mg/d Carotinoide, 2 mg/d Lycopin, 50 mg/d Polyphenole) auf

- (a) die Homocystein- und oxLDL-Konzentration im Plasma/Serum sowie die antioxidative Plasmakapazität mit dem Ziel der Minimierung der für eine ADMA-Akkumulation wesentlichen Determinanten zu untersuchen, um hieraus
- (b) potenziell synergistische Effekte auf die ADMA-Plasmaspiegel einer klinisch gesunden Risikogruppe abzuleiten.

(c) Dieser Ansatz beinhaltete schließlich auch die Frage, welche Relevanz den für die Modulation des ADMA-Stoffwechsels *in vitro* aufgezeigten Befunden auf *In-vivo*-Ebene beigemessen werden kann.

Ausgehend von einer zum Zeitpunkt der Studienplanung sehr lückenhaften und auf eine isolierte Gabe von entweder B-Vitaminen oder Antioxidanzien beschränkten Datenlage, wurde in der vorliegenden Humanstudie erstmalig das Konzept eines ADMA-senkenden Effekts durch eine kombinierte Supplementierung beider Nährstoffgruppen verfolgt.

Methodik und Kollektiv: Die sechsmonatige Interventionsstudie wurde als randomisierte, placebo-kontrollierte, monozentrische Doppelblind-Studie mit zwei Messzeitpunkten (T0, T6) durchgeführt. In die Untersuchung wurden 123 klinisch gesunde Probanden (45,5% Frauen, 54,5% Männer, mittleres Alter: $58,3 \pm 8,12$ Jahre) mit mindestens zwei kardiovaskulären Risikofaktoren (95,1% Hypertonie, 71,5% Hyper-/Dyslipidämie, 63,4% viszerale Adipositas, 38,2% Typ-2-Diabetes, 27,6% familiäre Disposition, 17,9% Rauchen) eingeschlossen. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurde den Studienteilnehmern entweder das Nährstoffpräparat (Verumgruppe: $n=66$) oder ein identisch aussehendes Scheinpräparat (Placebogruppe: $n=57$) verabreicht. Beide Subgruppen unterschieden sich in ihrer allgemeinen Charakteristik (anthropometrische Kenndaten, kardiovaskuläres Risikoprofil und assoziierte Medikation, C677T-MTHFR-Polymorphismus-Prävalenz, Ernährungs- und Lebensstilfaktoren) nicht signifikant voneinander.

Ergebnisse: Im Verlauf der Intervention verzeichnete die Verumgruppe eine signifikante Reduktion der mittleren **tHcy-Plasmakonzentration** (Δ : $-2,14 \pm 2,31$ $\mu\text{mol/l}$ bzw. -20,8%, $p < 0,001$), die sich als höchst signifikant gegenüber der in der Placebogruppe zu beobachtenden Erhöhung der tHcy-Plasmawerte (Δ : $0,65 \pm 1,91$ $\mu\text{mol/l}$ bzw. 6,8%, $p = 0,014$) erwies. Ein durch die Nährstoffsupplementierung induzierter Effekt konnte ebenfalls für die mit dem Homocystein-Stoffwechsel assoziierten **B-Vitaminstatusparameter** S-Folat, E-Folat, Cbl und PLP aufgezeigt werden, die sowohl im Zeitverlauf als auch im Vergleich zu Placebo auf jeweils höchst signifikantem Niveau anstiegen.

In Bezug auf **oxLDL** ließ sich eine moderate, aber höchst signifikante Abnahme der mittleren Serumkonzentration während der Interventionsphase feststellen, die jedoch unabhängig von der Gabe des Verum- bzw. Placebopräparates auftrat. Stattdessen zeigte sich, dass das Ausmaß der oxLDL-Senkung unter Placeboeinnahme sogar geringfügig stärker (Δ : $-9,2 \pm 11$ U/l bzw. -12,6%) als unter Gabe von Verum (Δ : $-7,3 \pm 12$ U/l bzw. -10,6%) ausfiel. Demgegenüber war lediglich innerhalb der Verumgruppe eine signifikante Erhöhung der **antioxidativen Plasmakapazität** (Δ : $39,32 \pm 136,5$ $\mu\text{mol/l}$ bzw. 1,7%, $p = 0,022$) nachzuweisen, wengleich kein signifikanter Unterschied zu den TEAC-Differenzen der Placebogruppe

(Δ : $8,98 \pm 97,2 \mu\text{mol/l}$ bzw. 0,4%) bestand. Höchst signifikante Unterschiede zwischen den Subgruppen Verum und Placebo ließen sich hingegen für die **Variablen des α -Tocopherolstatus** (AT, AT/TC, AT/TC+TG) und ihre Veränderungen im Zeitverlauf demonstrieren. So war die Intervention mit Verum von jeweils höchst signifikanten Anstiegen der α -Tocopherol-Serumkonzentrationen (ohne/mit Lipidkorrektur) begleitet, die nahezu unveränderten Werten unter Einnahme von Placebo gegenüberstanden.

Hinsichtlich des in der vorliegenden Studie zu untersuchenden **Hauptzielparameters ADMA** war mit im Interventionsverlauf im Mittel annähernd konstanten Plasmaspiegeln in den Subgruppen Verum (Δ : $0,00 \pm 0,07 \mu\text{mol/l}$) und Placebo (Δ : $0,01 \pm 0,06 \mu\text{mol/l}$) kein Einfluss der Nährstoffsupplementierung festzustellen. Wie sich in weiterführenden Analysen zeigte, konnte die im Gesamtkollektiv beobachtete Konstanz der Verlaufswerte auf einen signifikanten ADMA-Anstieg bei niedrigen bzw. eine signifikante ADMA-Senkung bei hohen Ausgangsspiegeln zurückgeführt werden. Dieser Effekt erwies sich als unabhängig von der Verum- und Placebogabe. Auch ergaben sich bei Betrachtung ausgewählter Subkollektive weder klinisch relevante noch statistisch signifikante Veränderungen der ADMA-Plasmaswerte innerhalb sowie zwischen beiden Interventionsgruppen. Zudem konnten keine statistisch aussagekräftigen Korrelationen zwischen den unter Verum errechneten ADMA-Differenzen (T6-T0) und den diesbezüglichen Veränderungen im Homocystein-/B-Vitamin- bzw. oxLDL-/Antioxidanzienstatus ermittelt werden. Ebenso waren die ADMA-Plasmaswerte zum Zeitpunkt T0 weder mit den für die Fragestellung relevanten Parametern noch mit biochemisch-klinischen Risikovariablen (u. a. Lipidprofil, Glucose- und Blutdruckwerte) sowie der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren korreliert.

Diskussion: Der durch die B-Vitaminsupplementierung auf den tHcy-Plasmaspiegel erzielte Effekt steht mit der Literatur dahingehend in Konsens, dass die hierdurch induzierbare Senkung der bereits im präventiv-wünschenswerten Bereich angesiedelten Ausgangswerte ($9,92 \pm 2,51 \mu\text{mol/l}$) maximal ausgeschöpft wurde. Bedingt durch die relativ gute Versorgungssituation unserer Probanden lag dabei zunächst die Vermutung nahe, dass das Ausmaß der absoluten Homocystein-Senkung zu gering ausfiel, um Auswirkungen auf den ADMA-Plasmaspiegel beobachten zu können. Diese Vermutung konnte anschließend unter Einbeziehung der bis dato publizierten, kontrollierten Interventionsstudien entkräftet werden. So ergaben auch diese im Gesamtergebnis keinen ADMA-senkenden Effekt einer additiven B-Vitamingabe trotz z. T. deutlich höherer Homocystein-Senkung (Δ : -28 bis -47%).

Weniger einheitlich stellt sich demgegenüber die Datenlage zur Assoziation zwischen ADMA und Homocystein *in vivo* dar. Während verschiedene Untersuchungen auf einen positiven Zusammenhang zwischen der Höhe der ADMA- und tHcy-Plasmakonzentration hindeuten,

konnte dies in unserer wie auch anderen Studien nicht gezeigt werden. Auf Basis dieser Diskrepanz sowie der Tatsache, dass beide Metabolite der renalen Exkretion unterliegen, kann vermutet werden, dass simultane Erhöhungen der Plasmaspiegel weniger auf einer direkten, d. h. kausalen Assoziation, sondern vielmehr auf einer subklinischen Einschränkung der Nierenfunktion im sog. „creatininblinden“ Bereich beruhen.

In Hinblick auf die Antioxidanzien-supplementierung und die fehlende Beeinflussung der oxLDL-Serumkonzentration in unserer Untersuchung, lässt sich beim Vergleich mit kontrollierten Interventionsstudien, die ebenfalls negative Resultate erbrachten, eine insgesamt konsistente Datenlage ermitteln. Anders als im Fall von Homocystein entsprach dies nicht der in unserer Arbeitshypothese für eine ADMA-Senkung *formal* zugrunde gelegten Prämisse. Inwieweit die in unserem Kollektiv im Zeitverlauf zu beobachtende oxLDL-Senkung allerdings tatsächlich mit einer für den ADMA-Status potenziell relevanten Verringerung oxidativer Prozesse an LDL-Partikeln in Zusammenhang stand, muss aufgrund der vermutlich unzureichenden laborchemischen Diskriminierung zwischen oxidierten und nativen LDLs durch den hier verwendeten ELISA offen bleiben. Des Weiteren spricht der als marginal einzustufende Anstieg der antioxidativen Plasmakapazität dafür, dass der TEAC-Assay übereinstimmend mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen vermutlich nicht sensitiv genug ist, um Effekte durch exogene Antioxidanzien anzuzeigen.

Unabhängig vom Einfluss auf zirkulierendes oxLDL ergaben sich in unserer sowie einer weiteren Interventionsstudie keine Anhaltspunkte für einen positiven Effekt von Antioxidanzien auf die ADMA-Plasmakonzentration nierengesunder Personen. Hingegen existieren vereinzelte - wenn auch mit erheblichen methodischen Mängeln behaftete - Studien, die Hinweise auf eine ADMA-Senkung in Verbindung mit einer Antioxidanzien-gabe bei niereninsuffizienten Kollektiven liefern. Da Niereninsuffizienz-Patienten deutlich höhere ADMA-Plasmaspiegel als nierengesunde Personen aufweisen, deuten die beobachteten Unterschiede möglicherweise darauf hin, dass Effekte einer additiven Antioxidanzien-gabe erst in einem wesentlich höheren ADMA-Konzentrationsbereich auftreten.

Letztgenannter Aspekt bietet auch einen Erklärungsansatz für den insgesamt fehlenden Einfluss der Supplementierung in der hier untersuchten Risikogruppe. So wiesen unsere Studienteilnehmer verhältnismäßig niedrige ADMA-Plasmawerte (T0: $0,38 \pm 0,06 \mu\text{mol/l}$), gemessen an der für Analyseverfahren mit MS-Detektion als physiologisch angenommenen Plasmakonzentration ($0,3\text{-}0,5 \mu\text{mol/l}$ bzw. $0,4 \mu\text{mol/l}$), auf.

Fazit: Insgesamt ergeben sich aus den hier gezeigten Untersuchungsergebnissen folgende Schlüsse:

(1) Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgestellte Hypothese eines synergistischen Effekts einer kombinierten B-Vitamin- und Antioxidanzisupplementierung hinsichtlich einer Senkung der ADMA-Plasmakonzentration bei Personen mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko konnte nicht bestätigt werden. Damit erwies sich das in dieser Untersuchung verfolgte Konzept einer kombinierten Gabe gegenüber der isolierten Verabreichung von entweder B-Vitaminen oder Antioxidanzien als nicht überlegen.

(2) Gegenüber den *in vitro* erhobenen Befunden ist auf Basis der hier gezeigten Ergebnisse sowie unter Einbeziehung der bis dato vorliegenden Humanstudien kein eindeutiger Kausalzusammenhang zwischen dem ADMA-Status und a) Homocystein sowie b) oxLDL *in vivo* festzustellen.

(3) Stattdessen legt die insgesamt inkonsistente Datenlage in Bezug auf eine Homocystein-assoziierte Erhöhung der ADMA-Plasmakonzentration nahe, dass diese vielmehr ein Epiphänomen einer milden Nierendysfunktion darzustellen scheint.

(4) Demzufolge gilt es zu ermitteln, welcher quantitative Beitrag der renalen ADMA-Clearance als determinierende Größe der ADMA-Plasmakonzentration nierengesunder Personen in Relation zur PRMT-I-abhängigen ADMA-Synthese sowie dem ADMA-katabolen DDAH-System zukommt.

(5) Schließlich zeigt sich, dass die redox-sensitive Regulation der PRMT-I und DDAH weitaus komplexer zu sein scheint, als bisher angenommen. Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten sollte daher sein, die hierbei zugrunde liegenden Mechanismen in ihrer Gesamtheit aufzuklären.

(6) Abschließend und vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit gewonnenen Resultate konnte die Bedeutung des ADMA-Plasmaspiegels als Marker des kardiovaskulären Risikos bei einer klinisch gesunden Risikogruppe nicht verifiziert werden. Dies impliziert jedoch nicht, dass mögliche Effekte der hier verabreichten Nährstoffkombination auch bei Patienten mit manifester Gefäßerkrankung (und vermeintlich höheren ADMA-Plasmawerten) ausbleiben. Vielmehr bietet es sich an, das Forschungsinteresse zukünftig auf diesen Aspekt zu richten.

7 SUMMARY AND CONCLUSION

Background: In the last three decades, several studies have shown that the vascular endothelium especially the endothelial cell mediated nitric oxide (NO) production plays a pivotal role for the vascular homeostasis and integrity. The aeri ally radical which is synthesized from L-arginine via catalysis by the enzyme NO synthase (NOS) exerts many vasoprotective effects resulting from its vasodilative function as well as from its anti-thrombotic, antiinflammatory, antiproliferative, and antioxidative properties. Endothelial dysfunction is associated with a loss of biologically active NO and is therefore considered to be a pathophysiologically important initial atherogenic phenomenon induced by the known cardiovascular risk factors according to the 'response to injury hypothesis'.

In this context an intensively discussed molecular mechanism is the competitive inhibition of the NOS enzyme activity by asymmetric dimethylarginine (ADMA) which is an endogenous methylated L-arginine analogue. An involvement of ADMA has been emerged from several experimental and clinical trials demonstrating an association between elevated ADMA and cardiovascular risk factors such as hyperhomocysteinemia and hypercholesterolemia as well as corresponding proatherogenic agents such as homocysteine or oxLDL. Findings from *in vitro* studies which indicate a redox sensitive regulation of the enzymes PRMT-I and DDAH involved in ADMA synthesis and degradation thereby suggest that oxidative stress may be the pathophysiological link of the homocysteine and oxLDL induced ADMA accumulation in subjects with increased cardiovascular risk.

Hypothesis and Aims: The present doctoral thesis aimed at investigating the effect of a combined supplementation of B vitamins (800 µg/d folic acid, 20 µg/d vitamin B₁₂, 6 mg/d vitamin B₆) and antioxidants (80 mg/d vitamin E, 500 mg/d vitamin C, 15 mg/d zinc, 80 µg/d selenium, 30 mg/d coenzyme Q₁₀, 3 mg/d carotinoids, 2 mg/d lycopene, 50 mg/d poly-phenols) on

(a) the homocysteine and oxLDL concentration in plasma/serum as well as the antioxidant capacity of plasma with the intention to minimize the significant determinants of ADMA accumulation and therefore

(b) to detect potential synergistic effects on the ADMA plasma concentration of a healthy risk group.

(c) This approach further implied the question if the modulation of ADMA metabolism which demonstrated *in vitro* is also relevant *in vivo*.

At the beginning of the present study only incomplete data from either isolated B vitamin or antioxidant supplementation on ADMA had been available. Therefore, the concept of ADMA reduction by the combined nutrient supplementation was evaluated in this clinical study for the first time.

Methods and study sample: The six months interventional study was designed as randomized, placebo-controlled, monocentric, double-blind study with two measurement times (T0, T6). A total of 123 healthy subjects (45.5% women, 54.5% men, mean age: 58.3 ± 8.1 years) with at least two prevalent cardiovascular risk factors (95.1% hypertension, 71.5% hyper-/dyslipidemia, 63.4% visceral obesity, 38.2% type 2 diabetes, 27.6% familial disposition, 17.9% smoking) were included and received either the nutrient supplement (verum group: $n=66$) or placebo capsules with identical appearance (placebo group: $n=57$). Both groups did not differ significantly in their general characteristics (anthropometrics, cardiovascular risk profile and associated pharmacotherapy, C677T-MTHFR polymorphism prevalence, diet, and life style).

Results: During the intervention the verum group showed a significant reduction of the mean **tHcy plasma concentration** (Δ : -2.14 ± 2.31 $\mu\text{mol/l}$; -20.8%, $p<0.001$), which was highly significant compared to the increase in tHcy plasma levels observed within the placebo group (Δ : 0.65 ± 1.91 $\mu\text{mol/l}$; 6.8%, $p=0.014$). Supplementation also induced a notable effect on **B vitamin status variables** associated with homocysteine metabolism: S-folate, E-folate, Cbl and PLP increased highly significantly both compared with the baseline values and with the placebo group.

After the intervention period there was also a moderate but highly significant reduction of the mean **oxLDL serum concentration** which occurred independently of the verum or placebo administration. The degree of reduction was even slightly higher in the placebo (Δ : -9.2 ± 11 U/l; -12.6%) than in the verum group (Δ : -7.3 ± 12 U/l; -10.6%). The TEAC test showed that the **antioxidant capacity of plasma** was significantly increased within the verum group only (Δ : 39.32 ± 136.5 $\mu\text{mol/l}$; 1.7%, $p=0.022$), although there was no significant difference compared with the TEAC differences of the placebo group (Δ : 8.98 ± 97.2 $\mu\text{mol/l}$; 0.4%). In contrast, the variables of the **α -tocopherol status** (AT, AT/TC AT/TC+TG) and their changes during the intervention differed highly significantly between both groups: While the α -tocopherol serum concentrations (with/without correction for lipids) increased highly significantly within the verum group the values of the placebo group remained nearly unchanged.

Regarding **ADMA as the primary endpoint** of this study, no effect of the nutrient supplementation could be shown as the ADMA plasma concentrations were nearly constant within the verum (Δ : $0.00 \pm 0.07 \mu\text{mol/l}$) and the placebo group (Δ : $0.01 \pm 0.06 \mu\text{mol/l}$). Further analyses indicated that the stability of the mean values of the total sample during the study course resulted from a significant increase in subjects with low baseline ADMA and a significant reduction in those with high baseline ADMA. This effect did not depend on the allocation to verum or placebo. Moreover, the evaluation of selected subgroups neither showed clinically relevant nor statistically significant changes of the ADMA concentration within or between the verum and placebo group. Additionally, no statistically meaningful correlation between the ADMA differences (T6-T0) of the verum group and the corresponding changes in the homocysteine/B vitamin or oxLDL/antioxidant status could be observed. Likewise, the baseline ADMA concentrations did not correlate significantly neither with any of the relevant parameters, biochemical or clinical risk variables (i. e. lipid profile, glucose concentration, blood pressure) nor with the number of cardiovascular risk factors.

Discussion: The effect of B vitamin supplementation on the tHcy plasma concentration is consistent with published data: Regarding the baseline tHcy levels ($9.92 \pm 2.51 \mu\text{mol/l}$), which were already in a range recommended as a target for prevention of cardiovascular disease in high risk individuals, the degree of homocysteine reduction observed in the present study was probably as high as maximally achievable. Due to the high baseline nutrient status of our sample it was initially assumed that the degree of absolute homocysteine reduction was probably too low to induce an effect on ADMA concentration. This assumption could be refuted in the light of other controlled interventional studies published up to now which also failed to detect an ADMA reducing effect of B vitamin supplementation despite in part a significantly higher homocysteine reduction (Δ : -28 to -47%).

Less consistent is the data regarding the association of ADMA and homocysteine *in vivo*. While various studies indicate a positive correlation between ADMA and tHcy plasma concentrations this could not be confirmed by us and other investigators. Based on this discrepancy and the fact that both metabolites are renally excreted it can be assumed that simultaneous elevations of plasma ADMA and homocysteine do not result from a causal relationship but rather from a subclinical restriction of renal function in the “creatinine blind” range.

Regarding the lack of effect of an antioxidant supplementation on the oxLDL serum concentration observed in our study, the published findings from other controlled studies are in line with our results. Unlike the case of homocysteine which was significantly reduced by the nutrient supplement, this result did not correspond with our hypothesis of the required

factors for an ADMA reduction. If or to what extent the observed oxLDL reduction in our sample was associated with a decrease of oxidative processes on LDL particles with potential relevance regarding ADMA cannot be clarified since the used ELISA probably do not allow sufficient discrimination between oxLDL and native LDL. Moreover, the marginal increase of the antioxidative capacity of plasma suggests that the TEAC assay may not be sensitive enough to demonstrate effects of exogenous antioxidants which is consistent with the results of other investigators.

Irrespective of the influence on circulating oxLDL in our and in another clinical study no evidence of a positive effect of antioxidants on the ADMA plasma concentration in renally healthy subjects could be shown. However, single methodically inadequate studies indicate an ADMA reduction in association with antioxidant supplementation in renally insufficient samples. Since renal insufficient patients exhibit significantly higher ADMA plasma levels than healthy subjects the observed differences may indicate that an effect of antioxidant supplementation occurs only in case of considerably higher baseline ADMA concentrations.

The last-mentioned aspect also provides an explanation for the overall lack of effect of the supplementation in the investigated risk group. So our sample had relatively low ADMA levels (T0: $0.38 \pm 0.06 \mu\text{mol/l}$) compared with the plasma concentration estimated as physiological if measured by MS-based analytical methods ($0.3\text{-}0.5 \mu\text{mol/l}$ or $0.4 \mu\text{mol/l}$).

Conclusion: All in all, the observed results of the present study allow the following conclusions:

- (1) The hypothesis of the present study assuming a synergistic lowering effect of a combined supplementation of B vitamins and antioxidants on the ADMA plasma concentration in subjects with increased cardiovascular risk could not be confirmed. Therefore, the concept of a combined nutrient administration pursued in this trial instead of an isolated supplementation of either B vitamins or antioxidants has not been shown to be superior.
- (2) In contrast to the results from *in vitro* studies a causal relationship between the ADMA status and a) homocysteine or b) circulating oxLDL cannot be proved on the basis of clinical studies in humans including the results of this study.
- (3) Instead, conflicting data regarding increased ADMA plasma concentrations especially in hyperhomocysteinemic subjects suggest that homocysteine associated ADMA elevations rather could be an epiphenomenon of a mild renal dysfunction.
- (4) Hence, it is necessary to find out the quantitative contribution of renal ADMA clearance as determinant of the ADMA plasma concentration in renally healthy subjects compared with the PRMT-I dependent ADMA synthesis and the ADMA catabolizing DDAH system.

(5) Finally, it appears that the redox sensitive regulation of PRMT-I and DDAH is much more complex than expected. Therefore, future investigations should aim at the clarification of the underlying mechanisms as a whole.

(6) In conclusion and against the background of the results from this thesis the significance of ADMA plasma concentration as a marker for the cardiovascular risk in a healthy risk group could not be verified. However, this does not rule out that potential effects of the tested nutrient combination may occur in patients with manifest vascular disease (and supposed higher ADMA plasma concentrations). In fact, it would be interesting to focus future research on this aspect.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ABBASI F, ASAGMI T, COOKE JP, LAMENDOLA C, MCLAUGHLIN TL, REAVEN GM, STÜHLINGER M, TSAO PS. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2001;88:1201-3.
- ABBEY M, NESTEL PJ, BAGHURST PA. Antioxidant vitamins and low-density-lipoprotein oxidation. *Am J Clin Nutr* 1993;58:525-32.
- ACHAN V, BROADHEAD M, MALAKI M, WHITLEY G, LEIPER J, MACALLISTER R, VALLANCE P. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2003;23:1455-9.
- ADA (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2005; 28(Suppl 1):S37-S42.
- AL SUWAIDI JA, HAMASAKI S, HIGANO ST, NISHIMURA RA, HOLMES DR, LERMAN A. Longterm follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000;101:948-54.
- ALBERTI KG, ZIMMET P, SHAW J (IDF EPIDEMIOLOGY TASK FORCE CONSENSUS GROUP). The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 2005;366:1059-62.
- ALLEN RH, STABLER SP, SAVAGE DG, LINDENBAUM J. Metabolic abnormalities in cobalamin (vitamin B12) and folate deficiency. *FASEB J* 1993;7:1344-53.
- AL-SA'DONI HH, FERRO A. S-nitrosothiols as nitric oxide-donors: chemistry, biology and possible future therapeutic applications. *Curr Med Chem* 2004;11:2679-90.
- ANDERSON JW, GOWRI MS, TURNER J, NICHOLS L, DIWADKAR VA, CHOW CK, OELTGEN PR. Antioxidant supplementation effects on low-density lipoprotein oxidation for individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* 1999;18:451-61.
- ANITSCHKOW NN, CHALATOV S. Über experimentelle Cholesterinsteatose: Ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Centrbl Allg Pathol Pathol Anat* 1913;24:1-9.
- ANTONIADES C, TOUSOULIS D, MARINO K, VASILIOU C, TENTOLOURIS C, BOURAS G, PITSAVOS C, STEFANADIS C. Asymmetrical dimethylarginine regulates endothelial function in methionine-induced but not in chronic homocystinemia in humans: effect of oxidative stress and proinflammatory cytokines. *Am J Clin Nutr* 2006;84:781-8.
- ARCHER S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* 1993;7:349-60.
- ARENDRT BM, BOETZER AM, LEMOCH H, WINKLER P, ROCKSTROH JK, BERTHOLD HK, SPENGLER U, GOERLICH R. Plasma antioxidant capacity of HIV-seropositive and healthy subjects during long-term ingestion of fruit juices or a fruit-vegetable-concentrate containing antioxidant polyphenols. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:786-92.
- ARENDRT BM, ELLINGER S, KEKIC K, GEUS L, FIMMERS R, SPENGLER U, MÜLLER WU, GOERLICH R. Single and repeated moderate consumption of native or dealcoholized red wine show different effects on antioxidant parameters in blood and DNA strand breaks in peripheral leukocytes in healthy volunteers: a randomized controlled trial (ISRCTN68505294). *Nutr J* 2005;4:33.
- ARNADOTTIR M, BRATTSTRÖM L, SIMONSEN O, THYSELL H, HULTBERG B, ANDERSSON A, NILSSON-EHLE P. The effect of high-dose pyridoxine and folic acid supplementation on serum lipid and plasma homocysteine concentrations in dialysis patients. *Clin Nephrol* 1993;40:236-40.
- ARNAL JF, DINH-XUAN AT, PUEYO M, DARBLADE B, RAMI J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:1078-87.
- ASSMANN G, CARMENA R, CULLEN P, FRUCHART JC, JOSSA F, LEWIS B, MANCINI M, PAOLETTI R. Coronary heart disease: reducing the risk: a worldwide view. International Task Force for the Prevention of Coronary Heart Disease. *Circulation* 1999;100:1930-8.

- ASSMANN G, CULLEN P, SCHULTE H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation* 2002;105:310-5.
- AUSTEN SK, FASSETT RG, GERAGHTY DP, COOMBES JS. Folate supplementation fails to affect vascular function and carotid artery intima media thickness in cyclosporin A-treated renal transplant recipients. *Clin Nephrol* 2006;66:373-9.
- AZUMA H, SATO J, HAMASAKI H, SUGIMOTO A, ISOTANI E, OBAYASHI S. Accumulation of endogenous inhibitors for nitric oxide synthesis and decreased content of L-arginine in regenerated endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1995;115:1001-4.
- BAILEY LB, RAMPERSAUD GC, KAUELL GP. Folic acid supplements and fortification affect the risk for neural tube defects, vascular disease and cancer: evolving science. *J Nutr* 2003;133:1961S-8S.
- BÄSSLER KH, GOLLY I, LOEW D, PIETRIK K. *Vitamin-Lexikon*. München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 2002.
- BATES CJ, PENTIEVA KD, PRENTICE A, MANSOOR MA, FINCH S. Plasma pyridoxal phosphate and pyridoxic acid and their relationship to plasma homocysteine in a representative sample of British men and women aged 65 years and over. *Br J Nutr* 1999;81:191-201.
- BAUER M. Stickstoffmonoxid. *Anaesthesist* 1997;46:441-50.
- BEITZ R, MENSINK GB, FISCHER B, THAMM M. Vitamins--dietary intake and intake from dietary supplements in Germany. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:539-45.
- BELLAMY MF, MCDOWELL IF, RAMSEY MW, BROWNLEE M, BONES C, NEWCOMBE RG, LEWIS MJ. Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults. *Circulation* 1998;98:1848-52.
- BELLAMY MF, MCDOWELL IF, RAMSEY MW, BROWNLEE M, NEWCOMBE RG, LEWIS MJ. Oral folate enhances endothelial function in hyperhomocysteinemic subjects. *Eur J Clin Invest* 1999;29:659-62.
- BEŁTOWSKI J, KEDRA A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacol Rep* 2006;58:159-78.
- BENZIE IFF, STRAIN JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 1996;239:70-6.
- BIESALSKI HK, BÖHLES H, ESTERBAUER H, FÜRST P, GEY KF, HUNSDÖRFER G, KASPER H, SIES H, WEISBURGER J. Antioxidant vitamins in prevention. *Clin Nutr* 1997;16:151-5.
- BILLIAR TR. Nitric oxide. Novel biology with clinical relevance. *Ann Surg* 1995;221:339-49.
- BIRSCHMANN I, WALTER U. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Acta Biochim Pol* 2004;51:397-404.
- BLACKWELL S, O'REILLY DS, TALWAR D. Biological variation of asymmetric dimethylarginine and related arginine metabolites and analytical performance goals for their measurement in human plasma. *Eur J Clin Invest* 2007;37:364-71.
- BLOUNT BC, MACK MM, WEHR CM, MACGREGOR JT, HIATT RA, WANG G, WICKRAMASINGHE SN, EVERSON RB, AMES BN. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3290-5.
- BODE-BÖGER SM, BÖGER RH, FRÖLICH JC. Antiatherosklerotische Wirkungen durch Stimulation der endogenen NO-Synthese. *Internist* 1997;38:461-5.
- BODE-BÖGER SM, BÖGER RH, KIENKE S, JUNKER W, FRÖLICH JC. Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;219:598-603.
- BODE-BÖGER SM, SCALERA F, IGNARRO LJ. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol Ther* 2007;114:295-306.

- BÖGER RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003;59:824-33.
- BÖGER RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* 2004;134:2842S-7S.
- BÖGER RH. The pharmacodynamics of L-arginine. *J Nutr* 2007;137:1650S-5S.
- BÖGER RH, BODE-BÖGER SM, BRANDES RP, PHIVTHONG-NGAM L, BOHME M, NAFE R, MÜGGE A, FRÖLICH JC. Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. *Circulation* 1997a;96:1282-90.
- BÖGER RH, BODE-BÖGER SM, PHIVTHONG-NGAM L, BRANDES RP, SCHWEDHELM E, MÜGGE A, BÖHME M, TSIKAS D, FRÖLICH JC. Dietary L-arginine and alpha-tocopherol reduce vascular oxidative stress and preserve endothelial function in hypercholesterolemic rabbits via different mechanisms. *Atherosclerosis* 1998a;141:31-43.
- BÖGER RH, BODE-BÖGER SM, SYDOW K, HEISTAD DD, LENTZ SR. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000a;20:1557-64.
- BÖGER RH, BODE-BÖGER SM, SZUBA A, TSAO PS, CHAN JR, TANGPHAO O, BLASCHKE TF, COOKE JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998b;98:1842-7.
- BÖGER RH, BODE-BÖGER SM, THIELE W, JUNKER W, ALEXANDER K, FRÖLICH JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997b;95:2068-74.
- BÖGER RH, LENTZ SR, BODE-BÖGER SM, KAPP HR, HAYNES WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin Sci (Lond)* 2001;100:161-7.
- BÖGER RH, MAAS R, SCHULZE F, SCHWEDHELM E. Elevated levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a marker of cardiovascular disease and mortality. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1124-9.
- BÖGER RH, SYDOW K, BORLAK J, THUM T, LENZEN H, SCHUBERT B, TSIKAS D, BODE-BÖGER SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 2000b;87:99-105.
- BÖGER RH, VALLANCE, P, COOKE JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase. *Atheroscler Suppl* 2003;4:1-3.
- BÖGER, RH, ZOCCALI C. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler Suppl* 2003;4:23-8.
- BOGLE RG, MAC ALLISTER RJ, WHITLEY GS, VALLANCE P. Induction of NG-monomethyl-L-arginine uptake: a mechanism for differential inhibition of NO synthases? *Am J Physiol* 1995; 269:C750-6.
- BÖHM V, BITSCH R. Intestinal absorption of lycopene from different matrices and interactions to other carotenoids, the lipid status, and the antioxidant capacity of human plasma. *Eur J Nutr* 1999;38:118-25.
- BOSTOM AG, GOHH RY, BEAULIEU AJ, NADEAU MR, HUME AL, JACQUES PF, SELHUB J, ROSENBERG IH. Treatment of hyperhomocysteinemia in renal transplant recipients. A randomized, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1997;127:1089-92.
- BOSTOM AG, ROSENBERG IH, SILBERSHATZ H, JACQUES PF, SELHUB J, D'AGOSTINO RB, WILSON PW, WOLF PA. Nonfasting plasma total homocysteine levels and stroke incidence in elderly persons: the Framingham Study. *Ann Intern Med* 1999;131:352-5.
- BOSTOM AG, SELHUB J, JACQUES PF, ROSENBERG IH. Power shortage: clinical trials testing the "homocysteine hypothesis" against a background of folic acid-fortified cereal grain flour. *Ann Intern Med* 2001;135:133-7.
- BOUCHER JL, MOALI C, TENU JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:1015-28.

- BOUSHEY CJ, BERESFORD SA, OMENN GS, MOTULSKY AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995;274:1049-57.
- BOYD S, OWENS D, GIN T, BUNCE K, SHERAFAT H, PERRY D, HYKIN PG. Plasma homocysteine, methylene tetrahydrofolate reductase C677T and factor II G20210A polymorphisms, factor VIII, and VWF in central retinal vein occlusion. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1313-5.
- BREDT DS, SNYDER SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:682-5.
- BRENNAN P, O'NEILL LA. 2-mercaptoethanol restores the ability of nuclear factor kappa B (NF kappa B) to bind DNA in nuclear extracts from interleukin 1-treated cells incubated with pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC). Evidence for oxidation of glutathione in the mechanism of inhibition of NF kappa B by PDTC. *Biochem J* 1996;320:975-81.
- BRIGELIUS-FLOHÉ R. Arteriosklerose. In: Biesalski HK, Köhrle J, Schümann K. Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe. Prävention und Therapie mit Mikronährstoffen. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2002:437-49.
- BRITTEN MB, ZEIHNER AM, SCHÄCHINGER V. Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options. *J Intern Med* 1999;245:315-27.
- BRÖNSTRUP A, HAGES M, PRINZ-LANGENOHL R, PIETRZIK K. Effects of folic acid and combinations of folic acid and vitamin B12 on plasma homocysteine concentrations in healthy, young women. *Am J Clin Nutr* 1998;68:1104-10.
- BROWN MS, GOLDSTEIN JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983;52:223-61.
- BUCKLEY C, BUND SJ, MCTAGGART F, BRUCKDORFER KR, OLDHAM A, JACOBS M. Oxidized low-density lipoproteins inhibit endothelium-dependent relaxations in isolated large and small rabbit coronary arteries. *J Auton Pharmacol* 1996;16:261-7.
- BÜHL A, ZÖFEL P. SPSS 12. Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. München: Person Studium, 2005.
- BULAU P, ZAKRZEWICZ D, KITOWSKA K, LEIPER J, GUNTHER A, GRIMMINGER F, EICKELBERG O. Analysis of methylarginine metabolism in the cardiovascular system identifies the lung as a major source of ADMA. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L18-24.
- BUNOUT D, GARRIDO A, SUAZO M, KAUFFMAN R, VENEGAS P, DE LA MAZA P, PETERMANN M, HIRSCH S. Effects of supplementation with folic acid and antioxidant vitamins on homocysteine levels and LDL oxidation in coronary patients. *Nutrition* 2000;16:107-10.
- B-VITAMIN TREATMENT TRIALISTS' COLLABORATION. Homocysteine-lowering trials for prevention of cardiovascular events: a review of the design and power of the large randomized trials. *Am Heart J* 2006;151:282-7.
- CAI H, HARRISON DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease. The role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87:840-4.
- CALVER A, COLLIER J, LEONE A, MONCADA S, VALLANCE P. Effect of local intra-arterial asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the forearm arteriolar bed of healthy volunteers. *J Hum Hypertens* 1993; 7: 193-4.
- CANDIPAN RC, WANG B, BUITRAGO R, TSAO PS, COOKE JP. Regression or progression. Dependency on vascular nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:44-50.
- CANNON RO. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 1998; 44:1809-19.
- CARLSSON CM, PHARO LM, AESCHLIMANN SE, MITCHELL C, UNDERBAKKE G, STEIN JH. Effects of multivitamins and low-dose folic acid supplements on flow-mediated vasodilation and plasma homocysteine levels in older adults. *Am Heart J* 2004;148:E11.

- CARMEL R. Current concepts in cobalamin deficiency. *Annu Rev Med* 2000;51:357-75.
- CARVAJAL JA, GERMAIN AM, HUIDOBRO-TORO JP, WEINER CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* 2000;184:409-20.
- CASTELLI WP, ANDERSON K, WILSON PW, LEVY D. Lipids and risk of coronary heart disease. The Framingham Study. *Ann Epidemiol* 1992;2:23-28.
- CATIGNANI GL, BIERI JG. Simultaneous determination of retinol and alpha-tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clin Chem* 1983;29:708-12.
- CAYATTE AJ, PALACINO JJ, HORTEN K, COHEN RA. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 1994;14:753-9.
- CELERMAJER DS. Endothelial dysfunction: Does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 1997;30:325-33.
- CELERMAJER DS, SORENSEN KE, BULL C, ROBINSON J, DEANFIELD JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24:1468-74.
- CELERMAJER DS, SORENSEN KE, GOOCH VM, SPIEGELHALTER DJ, MILLER OI, SULLIVAN ID, LLOYD JK, DEANFIELD JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992;340:1111-5.
- CETINALP-DEMIRCAN P, CAN A, BEKPINAR S, UNLUCERCI Y, ORHAN Y. Unchanged asymmetric dimethylarginine levels in non-diabetic, premenopausal obese women who have common risk factors for cardiovascular disease. *Endocrine* 2007;31:100-4.
- CHAMBERS JC, UELAND PM, OBEID OA, WRIGLEY J, REFSUM H, KOONER JS. Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: an effect mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine. *Circulation* 2000;102:2479-83.
- CHAN JR, BÖGER RH, BODE-BÖGER SM, TANGPHAO O, TSAO PS, BLASCHKE TF, COOKE JP. Asymmetric Dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1040-6.
- CHANG JW, LEE EK, KIM TH, MIN WK, CHUN S, LEE KU, KIM SB, PARK JS. Effects of alpha-lipoic acid on the plasma levels of asymmetric dimethylarginine in diabetic end-stage renal disease patients on hemodialysis: a pilot study. *Am J Nephrol* 2007;27:70-4.
- CHENG D, YADAV N, KING RW, SWANSON MS, WEINSTEIN EJ, BEDFORD MT. Small molecule regulators of protein arginine methyltransferases. *J Biol Chem* 2004;279:23892-9.
- CHIN JH, AZHAR S, HOFFMAN BB. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest* 1992;89:10-8.
- CHOBANIAN AV, BAKRIS GL, BLACK HR, CUSHMAN WC, GREEN LA, IZZO JL JR, JONES DW, MATERSON BJ, OPARIL S, WRIGHT JT JR, ROCCELLA EJ. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003;42:1206-52.
- CIFKOVA R, ERDINE S, FAGARD R, FARSANG C, HEAGERTY AM, KIOWSKI W, KJELDSSEN S, LUSCHER T, MALLION JM, MANCIA G, POULTER N, RAHN KH, RODICIO JL, RUILOPE LM, VAN ZWIETEN P, WAEBER B, WILLIAMS B, ZANCHETTI A. ESH/ESC Hypertension Guidelines Committee. Practice guidelines for primary care physicians: 2003 ESH/ESC hypertension guidelines. *J Hypertens* 2003;21:1779-86.
- CLARKE R. Homocysteine-lowering trials for prevention of heart disease and stroke. *Semin Vasc Med* 2005;5:215-22.
- CLARKE R, ARMITAGE J. Vitamin supplements and cardiovascular risk: review of the randomized trials of homocysteine-lowering vitamin supplements. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:341-8.

- CLOSS EI, BASHA FZ, HABERMEIER A, FÖRSTERMANN U. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y^+ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide* 1997;1:65-73.
- COOKE JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2032-7.
- COOKE JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation* 2004;109:1813-8.
- COOKE JP. ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med* 2005;10 Suppl 1:S11-7.
- COOKE JP, DZAU VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997;48:489-509.
- COPPOLA A, DAVI G, DE STEFANO V, MANCINI FP, CERBONE AM, DI MINNO G. Homocysteine, coagulation, platelet function, and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:243-54.
- CORSON M, JAMES N, LATTA S, NEMREM R, BERK B, HARRISON D. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996;79:984-91.
- CORTESE C, MOTTI C. MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease. *Public Health Nutr* 2001;4:493-7.
- CREEKE PI, SEAL AJ. Quantitation of the niacin metabolites 1-methylnicotinamide and l-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in random spot urine samples, by ion-pairing reverse-phase HPLC with UV detection, and the implications for the use of spot urine samples in the assessment of niacin status. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;817:247-53.
- DAYAL S, LENTZ SR. ADMA and hyperhomocysteinemia. *Vasc Med* 2005;10 Suppl 1:S27-33.
- DIERKES J, WESTPHAL S, MARTENS-LOBENHOFFER J, LULEY C, BODE-BÖGER SM. Fenofibrate increases the L-arginine:ADMA ratio by increase of L-arginine concentration but has no effect on ADMA concentration. *Atherosclerosis* 2004;173:239-44.
- DRAGSTED LO, PEDERSEN A, HERMETTER A, BASU S, HANSEN M, HAREN GR, KALL M, BREINHOLT V, CASTENMILLER JJ, STAGSTED J, JAKOBSEN J, SKIBSTED L, RASMUSSEN SE, LOFT S, SANDSTRÖM B. The 6-a-day study: effects of fruit and vegetables on markers of oxidative stress and antioxidative defense in healthy nonsmokers. *Am J Clin Nutr* 2004;79:1060-72.
- DE BEER D, JOUBERT E, MARAIS J, MANLEY M. Unravelling the total antioxidant capacity of pinotage wines: contribution of phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 2006;54:2897-905.
- DAYOUB H, ACHAN V, ADIMOOLAM S, JACOBI J, STÜHLINGER MC, WANG BY, TSAO PS, KIMOTO M, VALLANCE P, PATTERSON AJ, COOKE JP. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 2003;108:3042-7.
- DIEPEVEEN SH, VERHOEVEN GW, VAN DER PALEN J, DIKESCHEI LD, VAN TITS LJ, KOLSTERS G, OFFERMAN JJ, BILO HJ, STALENHOEF AF. Effects of atorvastatin and vitamin E on lipoproteins and oxidative stress in dialysis patients: a randomised-controlled trial. *J Intern Med* 2005;257:438-45.
- DENNINGER JW, MARLETTA MA. Guanylate cyclase and the *NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:334-50.
- DGE (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG E.V.), ÖSTERREICHISCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG (ÖGE), SCHWEIZERISCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG (SGE), SCHWEIZERISCHE VEREINIGUNG FÜR ERNÄHRUNG (SVE). Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Frankfurt a. M.: Umschau/Braus Verlag, 2000.
- DIERKES J, KROESEN M, PIETRZIK K. Folic acid and Vitamin B6 supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. *Int J Vitam Nutr Res* 1998;68:98-103.
- DROGAN D, KLIPSTEIN-GROBUSCH K, WANS S, LULEY C, BOEING H, DIERKES J. Plasma folate as marker of folate status in epidemiological studies: the European Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study. *Br J Nutr* 2004;92:489-96.
- DUDMAN NP, WILCKEN DE, WANG J, LYNCH JF, MACEY D, LUNDBERG P. Disordered methionine/homocysteine metabolism in premature vascular disease. Its occurrence, cofactor therapy, and enzymology. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1253-60.

- EARNEST CP, WOOD KA, CHURCH TS. Complex multivitamin supplementation improves homocysteine and resistance to LDL-C oxidation. *J Am Coll Nutr* 2003;22:400-7.
- ECKEL RH, GRUNDY SM, ZIMMET PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415-28.
- EID HM, ARNESEN H, HJERKINN EM, LYBERG T, SELJEFLOT I. Relationship between obesity, smoking, and the endogenous nitric oxide synthase inhibitor, asymmetric dimethylarginine. *Metabolism* 2004;53:1574-9.
- EID HM, ERITSLAND J, LARSEN J, ARNESEN H, SELJEFLOT I. Increased levels of asymmetric dimethylarginine in populations at risk for atherosclerotic disease. Effects of pravastatin. *Atherosclerosis* 2003;166:279-84.
- ENGLER MM, ENGLER MB, MALLOY MJ, CHIU EY, SCHLOETTER MC, PAUL SM, STUEHLINGER M, LIN KY, COOKE JP, MORROW JD, RIDKER PM, RIFAI N, MILLER E, WITZTUM JL, MIETUS-SNYDER M. Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia: Endothelial Assessment of Risk from Lipids in Youth (EARLY) Trial. *Circulation* 2003;108:1059-63.
- ERHARDT J. Normwerte für fett- und wasserlösliche Vitamine. In: Biesalski HK, Köhrle J, Schümann K. Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe. Prävention und Therapie mit Mikronährstoffen. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2002a:681-2.
- ERHARDT J. Labormethoden. In: Biesalski HK, Köhrle J, Schümann K. Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe. Prävention und Therapie mit Mikronährstoffen. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2002b:676-80.
- ESPER RJ, NORDABY RA, VILARINO JO, PARAGANO A, CACHARRON JL, MACHADO RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol* 2006;5:4.
- ESTERBAUER H, STRIEGL G, PUHL H, ROTHENEDER M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* 1989;6:67-75.
- FARACI FM. Hyperhomocysteinemia: a million ways to lose control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:371-3.
- FLEMING I, BAUERSACHS J, BUSSE R. Calcium-dependent and Calcium-independent activation of the endothelial NO synthase. *J Vasc Res* 1997;34:165-74.
- FLISER D. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): the silent transition from an 'uraemic toxin' to a global cardiovascular risk molecule. *Eur J Clin Invest* 2005;35:71-9.
- FÖRSTERMANN U, MÜGGE A, ALHEID U, HAVERICH A, FRÖLICH JC. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ Res* 1988;62:185-90.
- FÖRSTERMANN U, MÜNDEL T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006;113:1708-14.
- FRANKEN DG, BOERS GH, BLOM HJ, TRIJBELS FJ, KLOPPENBORG PW. Treatment of mild hyperhomocysteinemia in vascular disease patients. *Arterioscler Thromb* 1994;14:465-70.
- FRIEDMAN AN, BOSTOM AG, SELHUB J, LEVEY AS, ROSENBERG IH. The kidney and homocystein metabolism. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2181-9.
- FROSST P, BLOM HJ, MILOS R, GOYETTE P, SHEPPARD CA, MATTHEWS RG, BOERS GJ, DEN HEIJER M, KLUJTMANS LA, VAN DEN HEUVEL LP, ET AL. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
- FURCHGOTT RF. The role of endothelium in the presence of vascular smooth muscle to drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1984;24:175-97.
- FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6.
- FURUKI K, ADACHI H, MATSUOKA H, ENOMOTO M, SATOH A, HINO A, HIRAI Y, IMAIZUMI T. Plasma levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) are related to intima-media thickness of the carotid artery: an epidemiological study. *Atherosclerosis* 2007;191:206-10.

- GALE LR, MARTYN CN, WINTER PD, COOPER C. Vitamin C and risk of death from stroke and coronary heart disease in cohort of elderly people. *Br J Med* 1995;310:1563-6.
- GALLE J, MÜLSCH A, BUSSE R, BASSENGE E. Effects of native and oxidized low density lipoproteins on formation and inactivation of endothelium-derived relaxing factor. *Arterioscler Thromb* 1991;11:198-203.
- GARCIA RG, PEREZ M, MAAS R, SCHWEDHELM E, BÖGER RH, LÓPEZ-JARAMILLO P. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in metabolic syndrome. *Int J Cardiol* 2007;122:176-8.
- GERHARD GT, DUELL PB. Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:417-28.
- GEY KF. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. *Biofactors* 1998;7:113-74.
- GEY KF, PUSKA P, JORDAN P, MOSER UK. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 1991;53:326S-34S.
- GEY KF, STAHELIN HB, EICHHOLZER M. Poor plasma status of carotene and vitamin C is associated with higher mortality from ischemic heart disease and stroke: Basel Prospective Study. *Clin Investig* 1993; 71:3-6.
- GIUSTARINI D, MILZANI A, COLOMBO R, DALLE-DONNE I, ROSSI R. Nitric oxide and S-nitrosothiols in human blood. *Clin Chim Acta* 2003;330:85-98.
- GOONASEKERA CD, SHAH V, REES DD, DILLON MJ. Vascular endothelial cell activation associated with increased plasma asymmetric dimethyl arginine in children and young adults with hypertension: a basis for atheroma? *Blood Press* 2000;9:16-21.
- GRAHAM IM, DALY LE, REFSUM HM, ROBINSON K, BRATTSTROM LE, UELAND PM, PALMA-REIS RJ, BOERS GH, SHEAHAN RG, ISRAELSSON B, UITERWAAL CS, MELEADY R, MCMASTER D, VERHOEF P, WITTEMAN J, RUBBA P, BELLET H, WAUTRECHT JC, DE VALK HW, SALES LUIS AC, PARROT-ROULAND FM, TAN KS, HIGGINS I, GARCON D, ANDRIA G, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997;277:1775-81.
- GREEN D, O'DRISCOLL G, RANKIN JM, MAIORANA AJ, TAYLOR RR. Beneficial effect of vitamin E administration on nitric oxide function in subjects with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 1998;95: 361-7.
- GREILING H, GRESSNER AM. *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*. Stuttgart, New York: Schattauer, 1995.
- GROSS M, YU X, HANNAN P, PROUTY C, JACOBS DR JR. Lipid standardization of serum fat-soluble antioxidant concentrations: the YALTA study. *Am J Clin Nutr* 2003;77:458-66.
- GRUBER HJ, MAYER C, MEINITZER A, ALMER G, HOREJSI R, MÖLLER R, PILZ S, MÄRZ W, GASSER R, TRUSCHNIG-WILDERS M, MANGGE H. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is tightly correlated with growth in juveniles without correlations to obesity related disorders. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008;116:520-4.
- GRUNDY SM. Metabolic syndrome scientific statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2243-4.
- GRUNDY SM, CLEEMAN JI, DANIELS SR, DONATO KA, ECKEL RH, FRANKLIN BA, GORDON DJ, KRAUSS RM, SAVAGE PJ, SMITH SC JR, SPERTUS JA, COSTA F; AMERICAN HEART ASSOCIATION; NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005;112:2735-52.
- GRUNDY SM, CLEEMAN JI, MERZ CN, BREWER HB JR, CLARK LT, HUNNINGHAKE DB, PASTERNAK RC, SMITH SC JR, STONE NJ; NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE; AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY FOUNDATION; AMERICAN HEART ASSOCIATION. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation* 2004;110: 227-39.

- HACKAM DG, PETERSON JC, SPENCE JD. What level of plasma homocyst(e)ine should be treated? Effects of vitamin therapy on progression of carotid atherosclerosis in patients with homocyst(e)ine levels above and below 14 micromol/L. *Am J Hypertens* 2000;13:105-10.
- HADI HA, CARR CS, AL SUWAIDI J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag* 2005;1:183-98.
- HAHN A, STRÖHLE A, WOLTERS M: ERNÄHRUNG. Physiologische Grundlagen, Prävention, Therapie. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2006.
- HALCOX JP, SCHENKE WH, ZALOS G, MINCEMOYER R, PRASAD A, WACLAWIC MA, NOUR KR, QUYYUMI AA. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 2002;106:653-8.
- HAMILTON IM, GILMORE WS, BENZIE IF, MULHOLLAND CW, STRAIN JJ. Interactions between vitamins C and E in human subjects. *Br J Nutr* 2000;84(3):261-7.
- HANRATTY CG, MCGRATH LT, MCAULEY DF, YOUNG IS, JOHNSTON GD. The effects of oral methionine and homocysteine on endothelial function. *Heart* 2001;85:326-30.
- HAO L, MA J, STAMPFER MJ, REN A, TIAN Y, TANG Y, WILLETT WC, LI Z. Geographical, seasonal and gender differences in folate status among Chinese adults. *J Nutr* 2003;133:3630-5.
- HARMON DL, WOODSIDE JV, YARNELL JW, MCMASTER D, YOUNG IS, MCCRUM EE, GEY KF, WHITEHEAD AS, EVANS AE. The common 'thermolabile' variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinaemia. *QJM* 1996;89:571-7.
- HARRISON DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997; 100:2153-7.
- HAUNER H. Übergewicht im Erwachsenenalter. In: Biesalski HK, Fürst P, Kasper H, Kluthe R, Pöler W, Puchstein C, Stähelin HB. *Ernährungsmedizin*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2004:246-69.
- HAYOZ D, MAZZOLAI L. Endothelial function, mechanical stress and atherosclerosis. *Adv Cardiol* 2007; 44:62-75.
- HECKER H. Auswahl, Anwendung und Interpretation statistischer Tests. Eine kurze Einführung. Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Biometrie, November 1997.
- HEIN TW, KUO L. LDLs impair vasomotor function of the coronary microcirculation: role of superoxide anions. *Circ Res* 1998;83:404-14.
- HEITZER T, YLÄ HERTTUALA S, WILD E, LUOMA J, DREXLER H. Effect of vitamin E on endothelial vasodilator function in patients with hypercholesterolemia, chronic smoking or both. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:499-505.
- HELLWIG B. Stickoxid – Botenstoff und Arzneimittel. *Med Mo Pharm* 1994;17:66-8.
- HERRMANN W, KNAPP JP. Hyperhomocysteinemia: a new risk factor for degenerative diseases. *Clin Lab* 2002;48:471-81.
- HOFMANN F, AMMENDOLA A, SCHLOSSMANN J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* 2000;113:1671-6.
- HOFMANN MA, KOHL B, ZUMBACH MS, BORCEA V, BIERHAUS A, HENKELS M, AMIRAL J, SCHMIDT AM, FIEHN W, ZIEGLER R, WAHL P, NAWROTH PP. Hyperhomocyst(e)inemia and endothelial dysfunction in IDDM. *Diabetes Care* 1998;21:841-8.
- HOGG N. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42: 585-600.
- HOGG N, KALYANARAMAN B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:378-84.
- HOHNLOSER SH. Risk factor assessment: defining populations and individuals at risk. *Cardiol Clin* 2008;26:355-66.

- HOLVEN KB, AUKRUST P, HOLM T, OSE L, NENSETER MS. Folic acid treatment reduces chemokine release from peripheral blood mononuclear cells in hyperhomocysteinemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:699-703.
- HOLVOET P, KRITCHEVSKY SB, TRACY RP, MERTENS A, RUBIN SM, BUTLER J, GOODPASTER B, HARRIS TB. The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort. *Diabetes* 2004;53:1068-73.
- HOLVOET P, MERTENS A, VERHAMME P, BOGAERTS K, BEYENS G, VERHAEGHE R, COLLEN D, MULS E, VAN DE WERF F. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:844-8.
- HOLVOET P, VAN CLEEMPUT J, COLLEN D, VANHAECKE J. Oxidized low density lipoprotein is a prognostic marker of transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:698-702.
- HOLVOET P, VANHAECKE J, JANSSENS F, VAN DE WERF F, COLLEN D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 1998;98:1487-94.
- HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration*. *BMJ* 1998;316:894-8.
- HOMOCYSTEINE STUDIES COLLABORATION. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2015-22.
- HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a meta-analysis of the randomized trials. *Am J Clin Nutr* 2005;82:806-12.
- HOOPER L, NESS AR, SMITH GD. Antioxidant strategy for cardiovascular diseases. *Lancet* 2001;357:1705-6.
- HOPPE UC, BÖHM M, DIETZ R, HANRATH P, KROEMER HK, OSTERSPREY A, SCHMALTZ AA, ERDMANN E. Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Z Kardiol* 2005;94:488-509.
- HORI T, MATSUBARA T, ISHIBASHI T, OZAKI K, TSUCHIDA K, MEZAKI T, TANAKA T, NASUNO A, KUBOTA K, NAKAMURA Y, YAMAZOE M, AIZAWA Y, NISHIO M. Significance of asymmetric dimethylarginine (ADMA) concentrations during coronary circulation in patients with vasospastic angina. *Circ J* 2003;67:305-11.
- HOROWITZ JD, HERESZTYN T. An overview of plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in health and disease and in clinical studies: methodological considerations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;851:42-50.
- HOWARD JM, AZEN C, JACOBSEN DW, GREEN R, CARMEL R. Dietary intake of cobalamin in elderly people who have abnormal serum cobalamin, methylmalonic acid and homocysteine levels. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:582-7.
- HU FB, WILLETT WC. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA* 2002 27;288:2569-78.
- HÜLSMANN O. Effekte einer Nährstoffkombination auf Parameter des antioxidativen Stoffwechsels bei Personen mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko. Dissertation, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Ökotrophologie, Leibniz Universität Hannover 2009.
- IGNARRO LJ, BALESTRIERI ML, NAPOLI C. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update. *Cardiovasc Res* 2007;73:326-40.
- IGNARRO LJ, BYRNS RE, BUGA GM, WOOD KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 1987;61(6):866-79.

IGNARRO LJ, CIRINO G, CASINI A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: An overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34:879-86.

IGNATOWSKI A. Über die Wirkung des tierischen Eiweisses auf die Aorta und die parenchymatösen Organe der Kaninchen. *Virchows Arch Pathol Anat* 1909;198:248-70.

INOUE N, OHARA Y, FUKAI T, HARRISON DG, NISHIDA K. Probucol improves endothelial-dependent relaxation and decreases vascular superoxide production in cholesterol-fed rabbits. *Am J Med Sci* 1998;315:242-7.

INSTITUTE OF MEDICINE, FOOD AND NUTRITION BOARD. Dietary reference intakes for thiamine, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. A report of the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline and Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients. Washington D.C.: National Academy Press, 1998.

INTERNATIONAL TASK FORCE FOR PREVENTION OF CORONARY HEART DISEASE. Coronary heart disease: reducing the risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1998;205-71.

ITABE H, UEDA M. Measurement of plasma oxidized low-density lipoprotein and its clinical implications. *J Atheroscler Thromb* 2007;14:1-11.

ITO A, TSAO PS, ADIMOOLAM S, KIMOTO M, OGAWA T, COOKE JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999;99:3092-5.

JACOB K, PERIAGO MJ, BÖHM V, BERRUEZO GR. Influence of lycopene and vitamin C from tomato juice on biomarkers of oxidative stress and inflammation. *Br J Nutr* 2008;99:137-46.

JACOBI J, TSAO PS. Asymmetrical Dimethylarginine in Renal Disease: Limits of Variation or Variation Limits? A Systematic Review. *Am J Nephrol* 2008;28:224-37.

JACQUES PF, BOSTOM AG, WILLIAMS RR, ELLISON RC, ECKFELDT JH, ROSENBERG IH, SELHUB J, ROZEN R. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9.

JEHLIČKA P, STOŽICKÝ F, MAYER JR O, VARVAŘOVSKÁ J, RACEK J, TREFIL L, SIALA K. Asymmetric dimethylarginine and the effect of folate substitution in children with familial hypercholesterolemia and diabetes mellitus type 1. *Physiol Res* 2009;58:179-84.

JIANG DJ, HU GY, JIANG JL, XIANG HL, DENG HW, LI YJ. Relationship between protective effect of xanthone on endothelial cells and endogenous nitric oxide synthase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2003;11:5171-7.

JIANG JL, LI NS NS, LI YJ, DENG HW. Probucol preserves endothelial function by reduction of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor level. *Br J Pharmacol* 2002;135:1175-82.

JIANG JL, ZHANG XH, LI NS, RANG WQ, FENG-YE, HU CP, LI YJ, DENG HW. Probucol decreases asymmetrical dimethylarginine level by alternation of protein arginine methyltransferase I and dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006;20:281-94.

JONASSON TF, HEDNER T, HULTBERG B, OHLIN H. Hyperhomocysteinaemia is not associated with increased levels of asymmetric dimethylarginine in patients with ischaemic heart disease. *Eur J Clin Invest* 2003;33:543-9.

KABE Y, ANDO K, HIRAO S, YOSHIDA M, HANDA H. Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:395-403.

KAKIMOTO Y, AKAZAWA S. Isolation and identification of N-G,N-G- and N-G,N'-G-dimethyl-arginine, N-ε-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-δ-hydroxylysine from human urine. *J Biol Chem* 1970;245:5751-8.

KANG SS. Treatment of hyperhomocyst(e)inemia: physiological basis. *J Nutr* 1996;126(4 Suppl):1273S-5S.

- KEANEY JF JR, GAZIANO JM, XU A, FREI B, CURRAN-CELENTANO J, SHWAERY GT, LOSCALZO J, VITA JA. Dietary antioxidants preserve endothelium-dependent vessel relaxation in cholesterol-fed rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:11880-4.
- KEIL U, SPELSBERG A, LIESE AD. Epidemiologie der Atheroskleroserisikofaktoren. In: Schwandt P, Richter WO, Parhofer KG. *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Stuttgart, New York: Schattauer Verlagsgesellschaft, 2001:624-44.
- KELM M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:273-89.
- KELM M, RATH J. Endothelial dysfunction in human coronary circulation: relevance of the L-arginine-NO pathway. *Basic Res Cardiol* 2001;96:107-27.
- KELM M, STRAUER BE. Endotheliale Dysfunktion. Therapeutische und prognostische Relevanz. *Internist* 1999;40:1300-7.
- KERNER W, BRÜCKEL J, BÖHM BO. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG). Aktualisierung 10/2004. Elektronisches Dokument, URL am 24.08.2005; http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/redaktion/mitteilungen/leitlinien/EBL_Update_Klassifikation_11_2004_neues_Layout.pdf
- KERWIN JF, LANCASTER JR, FELDMAN PL. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 1995;38:4343-62.
- KEYS A. *Seven Countries: A multivariate analysis of death and coronary heart disease*. Cambridge, MA.: Harvard University Press, 1980.
- KHAW KT, BINGHAM S, WELCH A, LUBEN R, WAREHAM N, OAKES S, DAY N. Relation between plasma ascorbic acid and mortality in men and women in EPIC-Norfolk prospective study: a prospective population study. *Lancet* 2001;357:657-63.
- KIELSTEIN JT, FRÖLICH JC, HALLER H, FLISER D. ADMA (asymmetric dimethylarginine): an atherosclerotic disease mediating agent in patients with renal disease? *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1742-5.
- KIELSTEIN JT, IMPRAIN B, SIMMEL S, BODE-BÖGER SM, TSIKAS D, FRÖLICH JC, HOEPER MM, HALLER H, FLISER D. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 2004;109:172-7.
- KIELSTEIN JT, PETER C, ADAMS MC. Cigarettes and ADMA: the smoke hasn't cleared yet. *Hypertension* 2006;48:E20.
- KIELSTEIN JT, ZOCCALI C. Asymmetric dimethylarginine: a cardiovascular risk factor and a uremic toxin coming of age? *Am J Kidney Dis* 2005;46:186-202.
- KIM CH, KIM JH, HSU CY, AHN YS. Zinc is required in pyrrolidine dithiocarbamate inhibition of NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 1999;449:28-32.
- KIMURA M, KANEHIRA K, YOKOI K. Highly sensitive and simple liquid chromatographic determination in plasma of B6 vitamers, especially pyridoxal 5'-phosphate. *J Chromatogr A* 1996;722:295-301.
- KINLAY S, BEHRENDT D, FANG JC, DELAGRANGE D, MORROW J, WITZTUM JL, RIFAI N, SELWYN AP, CREAGER MA, GANZ P. Long-term effect of combined vitamins E and C on coronary and peripheral endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:629-34.
- KIRCHHERR H, KÜHN-VELTEN WN. HPLC-tandem mass spectrometric method for rapid quantification of dimethylarginines in human plasma. *Clin Chem* 2005;51:249-52.
- KLERK M, VERHOEF P, CLARKE R, BLOM HJ, KOK FJ, SCHOUTEN EG. MTHFR 677C→T Polymorphism and Risk of Coronary Heart Disease: A Meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2023-31.
- KLUJTMANS LA, VAN DEN HEUVEL LP, BOERS GH, FROSST P, STEVENS EM, VAN OOST BA, DEN HEIJER M, TRIBELS FJ, ROZEN R, BLOM HJ. 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* 1996;58:35-41.

- KOPPRASCH S, PIETZSCH J, KUHLSCH E, FUECKER K, TEMELKOVA-KURKTSCHIEV T, HANEFELD M, KÜHNE H, JULIUS U, GRAESSLER J. In vivo evidence for increased oxidation of circulating LDL in impaired glucose tolerance. *Diabetes* 2002;51:3102-6.
- KORISH AA, ARAFAH MM. Catechin combined with vitamins C and E ameliorates insulin resistance (IR) and atherosclerotic changes in aged rats with chronic renal failure (CRF). *Arch Gerontol Geriatr* 2008; 46:25-39.
- KOUGIAS P, CHAI H, LIN PH, LUMSDEN AB, YAO Q, CHEN C. Lysophosphatidylcholine and secretory phospholipase A2 in vascular disease: mediators of endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Med Sci Monit* 2006;12:RA5-16.
- KRAUS JP, JANOSÍK M, KOZICH V, MANDELL R, SHIH V, SPERANDEO MP, SEBASTIO G, DE FRANCHIS R, ANDRIA G, KLUIJTMANS LA, BLOM H, BOERS GH, GORDON RB, KAMOUN P, TSAI MY, KRUGER WD, KOCH HG, OHURA T, GAUSTADNES M. Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. *Hum Mutat* 1999;13:362-75.
- KRAWINKEL M, BRÖNSTRUP A, BECHTHOLD A, BIESALSKI HK, BOEING H, ELMADFA I, HESEKER H, KROKE A, LESCHIK-BONNET E, OBERRITTER H, STEHLE P. Strategien zur Verbesserung der Folatversorgung in Deutschland – Nutzen und Risiken. Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V. Elektronisches Dokument, URL am 15.04.2008; <http://www.dge.de/pdf/ws/DGE-Positionspapier-Folatversorgung.pdf>.
- KRESSEL G. Einfluss einer Multinährstoffsupplementierung auf inflammatorische und fibrinolytische Risikoparameter der Atherosklerose. Dissertation, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Ökotrophologie, Leibniz Universität Hannover 2009.
- KRIS-ETHERTON PM, LICHTENSTEIN AH, HOWARD BV, STEINBERG D, WITZTUM JL; NUTRITION COMMITTEE OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION COUNCIL ON NUTRITION, PHYSICAL ACTIVITY, AND METABOLISM. Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease. *Circulation* 2004;110:637-41.
- KROMHOUT D, MENOTTI A, BLOEMBERG B, ARAVANIS C, BLACKBURN H, BUZINA R, DONTAS AS, FIDANZA F, GIAMPAOLI S, JANSEN A, ET AL. Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev Med* 1995;24:308-15.
- KRZYZANOWSKA K, MITTERMAYER F, WOLZT M, SCHERNTHANER G. Asymmetric dimethylarginine predicts cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007;30:1834-9.
- KÜHN-VELTEN WN. Persönliche Mitteilung (E-mail) zum methodischen Vorgehen der allgemeinen Aminosäureanalytik vom 10.06.2005a.
- KÜHN-VELTEN WN. Persönliche Mitteilung (E-mail) zum methodischen Vorgehen der Vitamin E-Analytik vom 14.06.2005b.
- LAKSHMI AV, RAMALAKSHMI BA. Effect of pyridoxine or riboflavin supplementation on plasma homocysteine levels in women with oral lesions. *Natl Med J India* 1998;11:171-2.
- LANG D, KREDAN MB, MOAT SJ, HUSSAIN SA, POWELL CA, BELLAMY MF, POWERS HJ, LEWIS MJ. Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:422-7.
- LAPOINTE A, COUILLARD C, LEMIEUX S. Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. *J Nutr Biochem* 2006;17:645-58.
- LECERF JM. Fatty acids and cardiovascular disease. *Nutr Rev* 2009;67:273-83.
- LEE BJ, HUANG MC, CHUNG LJ, CHENG CH, LIN KL, SU KH, HUANG YC. Folic acid and vitamin B12 are more effective than vitamin B6 in lowering fasting plasma homocysteine concentration in patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:481-7.
- LEE RD, NIEMAN DC. *Nutritional Assessment*. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc, 1996.
- LEIPER J, MURRAY-RUST J, McDONALD N, VALLANCE P. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: Further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *PNAS* 2002;99:13527-32.

- LEIPER J, SANTA MARIA J, CHUBB A, MACALLISTER RJ, CHARLES IG, WHITLEY GS, VALLANCE P. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* 1999; 343(Pt1):209-14.
- LEIPER J, VALLANCE P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 43:542-8.
- LENTZ SR, RODIONOV RN, DAYAL S. Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. *Atheroscler Suppl* 2003;4:61-5.
- LENTZ SR, SOBEY CG, PIEGORS DJ, BHOPATKAR MY, FARACI FM, MALINOW MR, HEISTAD DD. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996;98:24-9.
- LENZEN H. Persönliche Mitteilung (Telefonat) zur prospektiven Datenerhebung und -auswertung der *CARDIAC-PRO*-Studie vom 05.02.2008.
- LERMAN A, ZEIHNER AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 2005;111:363-8.
- LEWIS SJ, EBRAHIM S, DAVEY SMITH G. Meta-analysis of MTHFR 677C->T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? *BMJ* 2005;331:1053.
- LI H, FÖRSTERMANN U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000;190:244-54.
- LIAPIS CD, AVGERINOS ED, KADOGLOU NP, KAKISIS JD. What a vascular surgeon should know and do about atherosclerotic risk factors. *J Vasc Surg* 2009;49:1348-54.
- LIN KY, ITO A, ASAGAMI T, TSAO PS, ADIMOOLAM S, KIMOTO M, TSUJI H, REAVEN GM, COOKE JP. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002;106:987-92.
- LINDENBAUM J, ROSENBERG IH, WILSON PW, STABLER SP, ALLEN RH. Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. *Am J Clin Nutr* 1994;60:2-11.
- LING L, ZHAO SP, GAO M, ZHOU QC, LI YL, XIA B. Vitamin C preserves endothelial function in patients with coronary heart disease after a high-fat meal. *Clin Cardiol* 2002;25:219-24.
- LORENZ MW, MARKUS HS, BOTS ML, ROSVALL M, SITZER M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2007;115:459-67.
- LÖWEL H. Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt – GBE-Heft 33. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Robert Koch-Institut (Hrsg.) in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt. Berlin: Robert Koch Institut, 2006.
- LU Q, BJÖRKHEM I, WRETLIND B, DICZFALUSY U, HENRIKSSON P, FREYSCHUSS A. Effect of ascorbic acid on microcirculation in patients with Type II diabetes: a randomized placebo-controlled cross-over study. *Clin Sci (Lond)* 2005;108:507-13.
- LU TM, DING YA, CHARNG MJ, LIN SJ. Asymmetrical dimethylarginine: a novel risk factor for coronary artery disease. *Clin Cardiol* 2003a;26:458-64.
- LU TM, DING YA, LIN SJ, LEE WS, TAI HC. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2003b;24:1912-9.
- LUDMER PL, SELWYN AP, SHOOK TL, WAYNE RR, MUDGE GH, ALEXANDER RW, GANZ P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986 23;315:1046-51.
- LUNDMAN P, ERIKSSON MJ, STÜHLINGER M, COOKE JP, HAMSTEN A, TORNVALL P. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:111-6.
- LÜSCHER TF, TSCHUDI MR, WENZEL RR, NOLL G. Endotheliale Dysfunktion und Stickstoffmonoxid (NO; Nitric Oxide). *Internist* 1997;38:411-9.
- LUSIS AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-41.

- MA J, STAMPFER MJ, CHRISTENSEN B, GIOVANNUCCI E, HUNTER DJ, CHEN J, WILLETT WC, SELHUB J, HENNEKENS CH, GRAVEL R, ROZEN R. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:825-9.
- MAAS R. Pharmacotherapies and their influence on asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Vasc Med* 2005;10 Suppl 1:S49-57.
- MACALLISTER RJ, PARRY H, KIMOTO M, OGAWA T, RUSSELL RJ, HODSON H, WHITLEY GS, VALLANCE P. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 1996; 119:1533-40.
- MALINOW MR, BOSTOM AG, KRAUSS RM. Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation* 1999;99:178-82.
- MANN GE, YUDILEVICH DL, SOBREVIA L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 2003;83:183-252.
- MANSOOR MA, KRISTENSEN O, HERVIG T, BATES CJ, PENTIEVA K, VEFRING H, OSLAND A, BERGE T, DRABLØS PA, HETLAND O, ROLFSEN S. Plasma total homocysteine response to oral doses of folic acid and pyridoxine hydrochloride (vitamin B6) in healthy individuals. Oral doses of vitamin B6 reduce concentrations of serum folate. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:139-46.
- MARTENS-LOBENHOFFER J, BODE-BÖGER SM. Measurement of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma: from liquid chromatography estimation to liquid chromatography-mass spectrometry quantification. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:61-8.
- MARTENS-LOBENHOFFER J, BODE-BÖGER SM. Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of L-arginine and its methylated metabolites in biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;851:30-41.
- MARTÍNEZ-TOMÉ M, MURCIA MA, FREGA N, RUGGIERI S, JIMÉNEZ AM, ROSES F, PARRAS P. Evaluation of antioxidant capacity of cereal brans. *J Agric Food Chem* 2004;52:4690-9.
- MAXWELL AJ, TSAO PS, COOKE JP. Modulation of the nitric oxide synthase pathway in atherosclerosis. *Exp Physiol* 1998;83:573-84.
- MCCULLY KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-28.
- MCGAVIN JK, MANN JI, SKEAFF CM, CHISHOLM A. Comparison of a vitamin E-rich diet and supplemental vitamin E on measures of vitamin E status and lipoprotein profile. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:555-61.
- MCKINLEY MC, STRAIN JJ, MCPARTLIN J, SCOTT JM, McNULTY H. Plasma homocysteine is not subject to seasonal variation. *Clin Chem* 2001;47:1430-6.
- MEINITZER A, SEELHORST U, WELLNITZ B, HALWACHS-BAUMANN G, BOEHM BO, WINKELMANN BR, MÄRZ W. Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study). *Clin Chem* 2007;53:273-83.
- MEISINGER C, BAUMERT J, KHUSEYINOVA N, LOEWEL H, KOENIG W. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation* 2005;112:651-7.
- MENTE A, DE KONING L, SHANNON HS, ANAND SS. A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 2009;169:659-69.
- MERCODIA AB, UPPSALA, SCHWEDEN: Persönliche Mitteilung (E-mail) zur oxLDL-Einheit U/l im Zusammenhang mit der Bestimmung durch den *Mercodia Oxidized LDL Competitive ELISA*, Nr. 10-1158-01, vom 08.07.2009.
- MICHEL T, LI GK, BUSCONI L. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6252-6.

- MILES E, THIES F, WALLACE FA, POWELL JR, HURST TL, NEWSHOLME EA, CALDER PC. Influence of age and dietary fish oil on plasma soluble adhesion molecule concentrations. *Clinical Science* 2001;100:91-100.
- MILLER JW, RIBAYA-MERCADO JD, RUSSELL RM, SHEPARD DC, MORROW FD, COCHARY EF, SADOWSKI JA, GERSHOFF SN, SELHUB J. Effect of vitamin B-6 deficiency on fasting plasma homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr* 1992;55:1154-60.
- MILLER NJ, RICE-EVANS C, DAVIES MJ, GOPINATHAN V, MILNER A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993;84:407-12.
- MITTENDORF S. Ernährungs- und Lebensstilfaktoren in einem Atherosklerose-Risikokollektiv. Ergebnisse der Studie „Effekte einer Nährstoffsupplementierung auf ausgewählte kardiovaskuläre Risikofaktoren“. Hausarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung, Institut für Lebensmittelwissenschaft, Universität Hannover 2005.
- MITTERMAYER F, KRZYZANOWSKA K, EXNER M, MLEKUSCH W, AMIGHI J, SABETI S, MINAR E, MÜLLER M, WOLZT M, SCHILLINGER M. Asymmetric dimethylarginine predicts major adverse cardiovascular events in patients with advanced peripheral artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2536-40.
- MIYAZAKI H, MATSUOKA H, COOKE JP, USUI M, UEDA S, OKUDA S, IMAIZUMI T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1141-6.
- MOAT SJ, DOSHI SN, LANG D, MCDOWELL IF, LEWIS MJ, GOODFELLOW J. Treatment of coronary heart disease with folic acid: is there a future? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H1-7.
- MOAT SJ, MADHAVAN A, TAYLOR SY, PAYNE N, ALLEN RH, STABLER SP, GOODFELLOW J, MCDOWELL IF, LEWIS MJ, LANG D. High- but not low-dose folic acid improves endothelial function in coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 2006;36:850-9.
- MOENS AL, CLAEYS MJ, WUYTS FL, GOOVAERTS I, VAN HERTBRUGGEN E, WENDELEN LC, VAN HOOF VO, VRINTS CJ. Effect of folic acid on endothelial function following acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2007;99:476-81.
- MONCADA S, HIGGS A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-12.
- MONCADA S, PALMER RM, HIGGS EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 1988;12:365-72.
- MONGE-ROJAS R, BARRANTES M, HOLST I, NUNEZ-RIVAS H, ALFARO T, RODRIGUEZ S, CUNNINGHAM L, CAMBRONERO P, SALAZAR L, HERRMANN FH. Biochemical indicators of nutritional status and dietary intake in Costa Rican Cabecar Indian adolescents. *Food Nutr Bull* 2005;26:3-16.
- MORI M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr* 2007;137:1616S-1620S.
- MORI M, GOTOH T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:715-19.
- MORIMOTO H, NAKAO K, FUKUOKA K, SARAI A, YANO A, KIHARA T, FUKUDA S, WADA J, MAKINO H. Long-term use of vitamin E-coated polysulfone membrane reduces oxidative stress markers in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:2775-82.
- MÜGGE A, ELWELL JH, PETERSON TE, HOFMEYER TG, HEISTAD DD, HARRISON DG. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 1991;69:1293-300.
- MÜGGE A, HANEFELD C, BÖGER RH; CARDIAC STUDY INVESTIGATORS. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine and the risk of coronary heart disease: rationale and design of the multicenter CARDIAC study. *Atheroscler Suppl* 2003;4:29-32.
- MÜLLER S, GEWALTIG MT, KOJDA G. Vasoprotektion durch vaskuläres NO. *MMP* 2002;25:45-51.
- MULLER G, GOETTSCHE C, MORAWIETZ H. Oxidative stress and endothelial dysfunction. *Hämostaseologie* 2007;27:5-12.

MUROHARA T, KUGIYAMA K, OHGUSHI M, SUGIYAMA S, OHTA Y, YASUE H. LPC in oxidized LDL elicits vasoconstriction and inhibits endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol* 1994;267:H2441-9.

MURPHY MP. Nitric oxide and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:401-14.

MURRAY-RUST J, LEIPER J, MCALISTER M, PHELAN J, TILLEY S, SANTA MARIA J, VALLANCE P, McDONALD N. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol* 2001;8:679-83.

NAPOLI C, DE NIGRIS F, WILLIAMS-IGNARRO S, PIGNALOSA O, SICA V, IGNARRO LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide* 2006;15:265-79.

NIJVELDT RJ, TEERLINK T, SIROEN MP, VAN LAMBALGEN AA, RAUWERDA JA, VAN LEEUWEN PA. The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA). *Clin Nutr* 2003;22:17-22.

NORDIN FREDRIKSON G, HEDBLAD B, BERGLUND G, NILSSON J. Plasma oxidized LDL: a predictor for acute myocardial infarction? *J Intern Med* 2003;253:425-9.

OGAWA T, KIMOTO M, SASAOKA K. Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of N^G,N^G-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats. *Biochim Biophys Res Commun* 1987;148:671-7.

OGAWA T, KIMOTO M, SASAOKA K. Purification and properties of a new enzyme, N^G,N^G-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 1989;264:10205-9.

OGAWA T, KIMOTO M, SASAOKA K. Dimethylarginine:pyruvate aminotransferase in rats. Purification, properties, and identity with alanine:glyoxylate aminotransferase 2. *J Biol Chem* 1990;265:20938-45.

OLMEDILLA B, GRANADO F, SOUTHON S, WRIGHT AJ, BLANCO I, GIL-MARTINEZ E, BERG H, CORRIDAN B, ROUSSEL AM, CHOPRA M, THURNHAM DI. Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries. *Br J Nutr* 2001;85:227-38.

OLMEDILLA B, GRANADO F, SOUTHON S, WRIGHT AJ, BLANCO I, GIL-MARTINEZ E, VAN DEN BERG H, THURNHAM D, CORRIDAN B, CHOPRA M, HININGER I. A European multicentre, placebo-controlled supplementation study with alpha-tocopherol, carotene-rich palm oil, lutein or lycopene: analysis of serum responses. *Clin Sci (Lond)* 2002;102:447-56.

OMENN GS, BERESFORD SA, MOTULSKY AG. Preventing coronary heart disease: B vitamins and homocysteine. *Circulation* 1998;97:421-4.

ONAT A, HERGENÇ G, CAN G, KARABULUT A. Serum asymmetric dimethylarginine levels among Turks: association with metabolic syndrome in women and tendency to decrease in smokers. *Turk Kardiyol Dern Ars* 2008;36:7-13.

OSANAI T, SAITHO M, SASAKI S, TOMITA H, MATSUNAGA T, OKUMURA K. Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells. *Hypertension* 2003;42:985-90.

PALM F, ONOZATO ML, LUO Z, WILCOX CS. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): Expression, regulation and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H3227-45.

PALMER RMJ, ASHTON DS, MONCADA S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333:664-7.

PALMER RMJ, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.

PARONI R, FERMO I, FIORINA P, CIGHETTI G. Determination of asymmetric and symmetric dimethylarginines in plasma of hyperhomocysteinemic subjects. *Amino Acids* 2005;28:389-94.

- PATERSON E, GORDON MH, NIWAT C, GEORGE TW, PARR L, WAROONPHAN S, LOVEGROVE JA. Supplementation with fruit and vegetable soups and beverages increases plasma carotenoid concentrations but does not alter markers of oxidative stress or cardiovascular risk factors. *J Nutr* 2006;136:2849-55.
- PEARSON TA. New tools for coronary risk assessment: what are their advantages and limitations? *Circulation* 2002;105:886-92.
- PEÑA AS, WILTSHIRE E, GENT R, PIOTTO L, HIRTE C, COUPER J. Folic acid does not improve endothelial function in obese children and adolescents. *Diabetes Care* 2007;30:2122-7.
- PIETRZIK K, BRÖNSTRUP A. Vitamins B₁₂, B₆ and folate as determinants of homocysteine concentration in healthy population. *Eur J Pediatr* 1998;157(Suppl 2):S135-8.
- PIETTE J, PIRET B, BONIZZI G, SCHOONBROODT S, MERVILLE MP, LEGRAND-POELS S, BOURS V. Multiple redox regulation in NF-kappaB transcription factor activation. *Biol Chem* 1997;378:1237-45.
- PLOTNICK GD, CORRETTI MC, VOGEL RA. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. *JAMA* 1997;278:1682-6.
- PLUTA RM, JUNG CS, HARVEY-WHITE J, WHITEHEAD A, SHILAD S, ESPEY MG, OLDFIELD EH. In vitro and in vivo effects of probucol on hydrolysis of asymmetric dimethyl L-arginine and vasospasm in primates. *J Neurosurg* 2005;103:731-8.
- POLLOCK JS, FÖRSTERMANN U, MITCHELL JA, WARNER TD, SCHMIDT HH, NAKANE N, MURAD F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10480-4.
- POTTER K, HANKEY GJ, GREEN DJ, EIKELBOOM JW, ARNOLDA LF. Homocysteine or renal impairment: which is the real cardiovascular risk factor? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1158-64.
- PRITCHARD KA, GROSZEK L, SMALLEY DM, SESSA WC, VILLALON P. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res* 1995;77:510-8.
- PROTEGGENTE AR, PANNALA AS, PAGANGA G, VAN BUREN L, WAGNER E, WISEMAN S, VAN DE PUT F, DACOMBE C, RICE-EVANS CA. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radic Res* 2002;36:217-33.
- PRYOR WA, SQUADRITO GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995;268:L699-722.
- PSCHYREMBEL. *Klinisches Wörterbuch*. Berlin, New York: Walter de Gruyter, 2002.
- QUASCHNING T, RUSCHITZKA FT, MAIER W, LÜSCHER TF. Die Rolle des Endothels bei der Entstehung und Behandlung von Gefäßerkrankungen. *Internist* 2000;41:355-62.
- QUINLIVAN EP, MCPARTLIN J, MCNULTY H, WARD M, STRAIN JJ, WEIR DG, SCOTT JM. Importance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk of vascular disease. *Lancet* 2002;359:227-8.
- QUYYUMI AA, DAKAK N, ANDREWS NP, HUSAIN S, ARORA S, GILLIGAN DM, PANZA JA, CANNON RO. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 1995;95:1747-55.
- RAITAKARI OT, CELERMAJER DS. Flow-mediated dilatation. *Br J Clin Pharmacol* 2000;50:397-404.
- RAJAN S, WALLACE JI, BERESFORD SAA, BRODKIN KI, ALLAN RA, STABLER SP. Screening for cobalamin deficiency in geriatric outpatients: prevalence and influence of synthetic cobalamin intake. *J Am Geriatr Soc* 2002;50:624-30.
- RAVNSKOV U. A hypothesis out-of-date. the diet-heart idea. *J Clin Epidemiol* 2002;55:1057-63.

- RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, PANNALA A, YANG M, RICE-EVANS C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1231-7.
- REAVEN PD, WITZTUM JL. Oxidized low density lipoproteins in atherogenesis: role of dietary modification. *Annu Rev Nutr* 1996;16:51-71.
- REDDY KG, NAIR RN, SHEEHAN HM, HODGSON JM. Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:833-43.
- REES DA, ALCOLADO JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 2005;22:359-70.
- REFSUM H, UELAND PM, NYGÅRD O, VOLLSET SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998;49:31-62.
- RICE-EVANS C, MILLER NJ. Total Antioxidant Status in Plasma and Body Fluids. *Methods Enzymol* 1994;234:279-93.
- RIEDER A. Epidemiologie der Herz-Kreislauf-Erkrankungen. *J Kardiologie* 2004;11(Suppl D):3-4.
- RIEMERSMA RA, WOOD DA, MACINTYRE CC, ELTON RA, GEY KF, OLIVER MF. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C, and E and carotene. *Lancet* 1991;337:1-5.
- RiliBÄK (Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen) gemäß Beschluss des Vorstandes der Bundesärztekammer vom 24. August 2001. *Deutsches Ärzteblatt* 2001;98:A2747-59.
- RiliBÄK (Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen) geändert durch Beschluss des Vorstandes der Bundesärztekammer vom 14. November 2003. *Deutsches Ärzteblatt* 2003;100:A 3335-8.
- RODIONOV RN, LENTZ SR. The homocysteine paradox. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1031-3.
- ROMERO MJ, PLATT DH, CALDWELL RB, CALDWELL RW. Therapeutic use of citrulline in cardiovascular disease. *Cardiovasc Drug Rev* 2006;24:275-90.
- ROOS JF, DOUST J, TETT SE, KIRKPATRICK CM. Diagnostic accuracy of cystatin C compared to serum creatinine for the estimation of renal dysfunction in adults and children--a meta-analysis. *Clin Biochem* 2007;40:383-91.
- ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
- ROSS R, GLOMSET J. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science* 1973;180:1332-9.
- ROZEN R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost* 1997;78:523-6.
- RUEL G, POMERLEAU S, COUTURE P, LAMARCHE B, COUILLARD C. Changes in plasma antioxidant capacity and oxidized low-density lipoprotein levels in men after short-term cranberry juice consumption. *Metabolism* 2005;54:856-61.
- RUEL G, POMERLEAU S, COUTURE P, LEMIEUX S, LAMARCHE B, COUILLARD C. Low-calorie cranberry juice supplementation reduces plasma oxidized LDL and cell adhesion molecule concentrations in men. *Br J Nutr* 2008;99:352-9.
- SALA R, ROTOLI BM, COLLA E, VISIGALLI R, PAROLARI A, BUSSOLATI O, GAZZOLA GC, DALL'ASTA V. Two-way arginine transport in human endothelial cells: TNF-alpha stimulation is restricted to system y(+). *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C134-43.
- SARAN R, NOVAK JE, DESAI A, ABDULHAYOGLU E, WARREN JS, BUSTAMI R, HANDELMAN GJ, BARBATO D, WEITZEL W, D'ALECY LG, RAJAGOPALAN S. Impact of vitamin E on plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) in chronic kidney disease (CKD): a pilot study. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2415-20.
- SARTI C, GALLAGHER J. The metabolic syndrome: prevalence, CHD risk, and treatment. *J Diabetes Complications* 2006;20:121-32.

- SAUBERLICH HE, KRETSCH MJ, SKALA JH, JOHNSON HL, TAYLOR PC. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am J Clin Nutr* 1987;46:1016-102.
- SCALERA F, KIELSTEIN JT, MARTENS-LOBENHOFFER J, POSTEL SC, TÄGER M, BODE-BÖGER SM. Erythropoietin increases asymmetric dimethylarginine in endothelial cells: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:892-8.
- SCHÄCHINGER V, BRITTEN MB, ZEIHNER AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000;101:1899-906.
- SCHÄCHINGER V, ZEIHNER AM. Atherosclerosis-associated endothelial dysfunction. *Z Kardiol* 2000;89 Suppl 9:IX/70-4.
- SCHMIDT HHHW, WALTER U, KOCHSIEK K. Bildung und Wirkungen von Stickstoffmonoxid (NO) im vaskulären System. *Internist* 1997;38:406-10.
- SCHMIDT TS, ALP NJ. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin Sci (Lond)* 2007;113:47-63.
- SCHMITT B, WOLTERS M, BUB A, BARTH S, HAHN A. Role of MTHFR genetic polymorphisms in homocysteine reduction by vitamin supplementation. 4th Conference on Hyperhomocysteinemia, Saarland University, Saarbrücken 14.-16. April 2005, Abstracts: S. 49 (P64)
- SCHMITT B, WOLTERS M, KRESSEL G, HÜLSMANN O, BARTH SW, BUB A, HAHN A. Einfluss einer Multinährstoffmischung auf die Plasma-Homocysteinkonzentration (Hcy) unter Berücksichtigung des MTHFR-Genotyps bei Personen mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko. *Proc Germ Nutr Soc* 2006;8:67-8.
- SCHMITT B, WOLTERS M, KRESSEL G, HÜLSMANN O, STROHLE A, KUHN-VELTEN WN, LICHTINGHAGEN R, BUB A, BARTH SW, STICHTENOTH DO, HAHN A. Effects of combined supplementation with B vitamins and antioxidants on plasma levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in subjects with elevated risk for cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2007;193:168-76.
- SCHNABEL R, BLANKENBERG S, LUBOS E, LACKNER KJ, RUPPRECHT HJ, ESPINOLA-KLEIN C, JACHMANN N, POST F, PEETZ D, BICKEL C, CAMBIEN F, TIRET L, MÜNZEL T. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 2005;97:e53-9.
- SCHNEIDER R. Vom Umgang mit Zahlen und Daten. Eine praxisnahe Einführung in die Statistik und Ernährungsepidemiologie. Frankfurt a. M.: Umschau-Zeitschriften-Verlag, 1997.
- SCHRÖDER S. Sind Antioxidantien zur Behandlung der Atherosklerose sinnvoll? *Dtsch Med Wochenschr* 2004;129:321-6.
- SCHULZE F, LENZEN H, HANEFELD C, BARTLING A, OSTERZIEL KJ, GOUDEVA L, SCHMIDT-LUCKE C, KUSUS M, MAAS R, SCHWEDHELM E, STRÖDTER D, SIMON BC, MÜGGE A, DANIEL WG, TILLMANN H, MAISCH B, STREICHERT T, BÖGER RH. Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study. *Am Heart J* 2006;152:493.e1-8.
- SCHWARZ JA. Leitfaden klinische Prüfungen von Arzneimitteln und Medizinprodukten. Aulendorf: Editio Cantor Verlag, 2000.
- SCHWEDHELM E, MAAS R, FREESE R, JUNG D, LUKACS Z, JAMBRECINA A, SPICKLER W, SCHULZE F, BOGER RH. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 2008;65:51-9.
- SEERAM NP, AVIRAM M, ZHANG Y, HENNING SM, FENG L, DREHER M, HEBER D. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J Agric Food Chem* 2008;56:1415-22.
- SELHUB J, JACQUES PF, BOSTOM AG, WILSON PWF, ROSENBERG IH. Relationship between plasma homocysteine and vitamin status in the Framingham study population. Impact of folic acid fortification. *Public Health Rev* 2000;28:117-145.
- SELHUB J, JACQUES PF, WILSON PWF, RUSH D, ROSENBERG IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993;270:2693-8.

- SELLEY ML. Increased concentrations of homocysteine and asymmetric dimethylarginine and decreased concentrations of nitric oxide in the plasma of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:903-7.
- SELLEY ML. Homocysteine increases the production of asymmetric dimethylarginine in cultured neurons. *J Neurosci Res* 2004;77:90-3.
- SHARP L, LITTLE J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004;159:423-43.
- SHAUL PW. Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis. *J Physiol* 2003;547:21-33.
- SHIMOKAWA H. Primary Endothelial Dysfunction: Atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:23-37.
- SIEKMEIER R, STEFFEN C, MÄRZ W. Role of oxidants and antioxidants in atherosclerosis: results of in vitro and in vivo investigations. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2007;12:265-82.
- SIEMS WG, SOMMERBURG O, MAYER H, GRUNE T. Die wichtigsten Radikalquellen im menschlichen Organismus. *PZ* 1998;143:1515-27.
- SIGURDARDOTTIR V, FAGERBERG B, HULTHE J. Circulating oxidized low-density lipoprotein (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58-year-old men (AIR study). *J Intern Med* 2002;252:440-7.
- SIMON BC, NOLL B, MAISCH B. Endotheliale Dysfunktion – eine Bestandsaufnahme und Ansätze zur Therapie. *Herz* 1999;24:62-71.
- SIROEN MP, TEERLINK T, NIJVELDT RJ, PRINS HA, RICHIR MC, VAN LEEUWEN PA. The clinical significance of asymmetric dimethylarginine. *Annu Rev Nutr* 2006;26:203-28.
- SIROKÁ R, TREFIL L, RAJDL D, RACEK J, RUSNÁKOVÁ H, CIBULKA R, EISELT J, FILIPOVSKÝ J. Asymmetric dimethylarginine, homocysteine and renal function--is there a relation? *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1147-50.
- SPOELSTRA-DE MAN AM, TEERLINK T, BROUWER CB, RAUWERDA JA, STEHOUWER CD, SMULDERS YM. No effect of B vitamins on ADMA levels in patients at increased cardiovascular risk. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;64:495-501.
- SRINATH REDDY K, KATAN MB. Diet, nutrition and the prevention of hypertension and cardiovascular diseases. *Public Health Nutr* 2004;7:167-86.
- STANGER O. Homocystein. Grundlagen, Klinik, Therapie, Prävention. Wien: Verlag Wilhelm Maudrich, 2004.
- STANGER O, HERRMANN W, PIETRZIK K, FOWLER B, GEISEL J, DIERKES J, WEGER M. Konsensuspapier der D.A.C.H.-Liga Homocystein über den rationellen klinischen Umgang mit Homocystein, Folsäure und B-Vitaminen bei kardiovaskulären und thrombotischen Erkrankungen – Richtlinien und Empfehlungen. *J Kardiologie* 2003;10:190-9.
- STEINBERG D, PARTHASARATHY S, CAREW TE, KHOO JC, WITZTUM JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-24.
- STEPP DW, OU J, ACKERMAN AW, WELAK S, KLICK D, PRITCHARD KA JR. Native LDL and minimally oxidized LDL differentially regulate superoxide anion in vascular endothelium in situ. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H750-9.
- STOCKER R, KEANEY JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84:1381-478.
- STÜHLINGER M. Asymmetrisches Dimethyl Arginin (ADMA): Ein neuer kardiovaskulärer Risikofaktor? *Wien Med Wochenschr* 2007;157:57-60.
- STÜHLINGER MC, ABBASI F, CHU JW, LAMENDOLA C, MCLAUGHLIN TL, COOKE JP, REAVEN GM, TSAO PS. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* 2002;287:1420-6.

- STÜHLINGER MC, OKA RK, GRAF EE, SCHMÖLZER I, UPSON BM, KAPOOR O, SZUBA A, MALINOW R, WASCHER TC, PACHINGER O, COOKE JP. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia. Role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2003;108:933-8.
- STÜHLINGER MC, STANGER O. Asymmetric dimethyl-L-arginine (ADMA): a possible link between homocyst(e)ine and endothelial dysfunction. *Curr Drug Metab* 2005;6:3-14.
- STÜHLINGER MC, TSAO PS, HER JH, KIMOTO M, BALINT RF, COOKE JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001;104:2569-75.
- STUEHR DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:217-30.
- SURDACKI A, NOWICKI M, SANDMANN J, TSIKAS D, BÖGER RH, BODE-BÖGER SM, KRUSZELNICKA-KWIATKOWSKA O, KOKOT F, DUBIEL JS, FRÖLICH JC. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:652-8.
- SYDOW K, HORNIG B, ARAKAWA N, BODE-BÖGER SM, TSIKAS D, MÜNDEL T, BÖGER RH. Endothelial dysfunction in patients with peripheral arterial disease and chronic hyperhomocysteinemia: potential role of ADMA. *Vasc Med* 2004;9:93-101.
- SYDOW K, MÜNDEL T. ADMA and oxidative Stress. *Atheroscler Suppl* 2003;4:41-51.
- SYDOW K, SCHWEDHELM E, ARAKAWA N, BODE-BÖGER SM, TSIKAS D, HORNIG B, FRÖLICH JC, BÖGER RH. ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res* 2003;57:244-52.
- TANAKA A, SUEMARU K, ARAKI H. A new approach for evaluating renal function and its practical application. *J Pharmacol Sci* 2007;105:1-5.
- TANG J, FRANKEL A, COOK RJ, KIM S, PAIK WK, WILLIAMS KR, CLARKE S, HERSCHMAN HR. PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 7723-30.
- TANG WJ, HU CP, CHEN MF, DENG PY, LI YJ. Epigallocatechin gallate preserves endothelial function by reducing the endogenous nitric oxide synthase inhibitor level. *Can J Physiol Pharmacol* 2006;84:163-71.
- TAWAKOL A, OMLAND T, GERHARD M, WU JT, CREAGER MA. Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 1997;95:1119-21.
- TEERLINK T. ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med* 2005;10 Suppl 1:S73-81.
- TEERLINK T. HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;851:21-9.
- THAMM M, MENSINK GBM, THIERFELDER W. Folsäureversorgung von Frauen im gebärfähigen Alter. *Gesundheitswesen* 1999;61:207-12.
- THIERY J, RICHTER V. Aussagekraft der Labordiagnostik für die Statusbestimmung von Vitaminen. In: Biesalski HK, Köhrle J, Schümann K. Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe. Prävention und Therapie mit Mikronährstoffen. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2002: 667-80.
- TING HH, TIMIMI FK, HALEY EA, RODDY MA, GANZ P, CREAGER MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation* 1997;95:2617-22.
- TITLE LM, UR E, GIDDENS K, MCQUEEN MJ, NASSAR BA. Folic acid improves endothelial dysfunction in type 2 diabetes--an effect independent of homocysteine-lowering. *Vasc Med* 2006;11:101-9.
- TRAN CT, FOX MF, VALLANCE P, LEIPER JM. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* 2000;68:101-5.
- TRAN CT, LEIPER JM, VALLANCE P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 2003;4:33-40.

- TRIEBEL T. Der potentielle kardiovaskuläre Risikofaktor Asymmetrisches Dimethylarginin – Statusbestimmung an einem Risikokollektiv. Diplomarbeit, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Ökotrophologie, Leibniz Universität Hannover 2004.
- TSCHUDI MR, LÜSCHER TF. STICKSTOFFMONOXID: Das endogene Nitrat im Kreislauf. *Herz* 1996;21(Suppl 1):50-60.
- TSIKAS D. Measurement of nitric oxide synthase activity in vivo and in vitro by gas chromatography-mass spectrometry. *Meth Mol Biol* 2004;279:81-104.
- TSIKAS D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res* 2005;39:797-815.
- TSMIKAS S. Oxidized low-density lipoprotein biomarkers in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2006;8:55-61.
- UBBINK JB. Assay methods for the measurement of total homocyst(e)ine in plasma. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:233-41.
- UBBINK JB, BECKER PJ, VERMAAK WJ, DELPORT R. Results of B-vitamin supplementation study used in a prediction model to define a reference range for plasma homocysteine. *Clin Chem* 1995;41:1033-7.
- UBBINK JB, VAN DER MERWE A, DELPORT R, ALLEN RH, STABLER SP, RIEZLER R. The effect of a subnormal vitamin B-6 status on homocysteine metabolism. *J Clin Invest* 1996;98:177-84.
- UBBINK JB, VERMAAK WJ, VAN DER MERWE A, BECKER PJ, DELPORT R, POTGIETER HC. Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans. *J Nutr* 1994;124:1927-33.
- UELAND PM, REFSUM H. Plasma homocysteine, a risk faktor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989;114:473-501.
- UELAND PM, REFSUM H, BERESFORD SA, VOLLSET SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000;72:324-32.
- UELAND PM, REFSUM H, STABLER SP, MALINOW MR, ANDERSSON A, ALLEN RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993;39:1764-79.
- UNGVARI Z, PACHER P, RISCHÁK K, SZOLLÁR L, KOLLER A. Dysfunction of nitric oxide mediation in isolated rat arterioles with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1899-904.
- UPRITCHARD JE, SCHUURMAN CR, WIERSMA A, TIJBURG LB, COOLEN SA, RIJKEN PJ, WISEMAN SA. Spread supplemented with moderate doses of vitamin E and carotenoids reduces lipid peroxidation in healthy, nonsmoking adults. *Am J Clin Nutr* 2003;78:985-92.
- USUI M, MATSUOKA H, MIYAZAKI H, UEDA S, OKUDA S, IMAIZUMI T. Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sci* 1998;62:2425-30.
- VALKONEN VP, PÄIVA H, SALONEN JT, LAKKA TA, LEHTIMÄKI T, LAAKSO J, LAAKSONEN R. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001;358:2127-8.
- VALLANCE P, HINGORANI A. Endothelial nitric oxide in humans in health and disease. *Int J Exp Path* 1999;80:291-303.
- VALLANCE P, LEIPER J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1023-30.
- VALLANCE P, LEONE A, CALVER A, COLLIER J, MONCADA S. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992a;20(Suppl 12):S60-S2.
- VALLANCE P, LEONE A, CALVER A, COLLIER J, MONCADA S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992b;339:572-5.
- VAN HOYDONCK PG, SCHOUTEN EG, MANUEL-Y-KEENOY B, VAN CAMPENHOUT A, HOPPENBROUWERS KP, TEMME EH. Does vitamin C supplementation influence the levels of circulating oxidized LDL, sICAM-1, sVCAM-1 and vWF-antigen in healthy male smokers? *Eur J Clin Nutr* 2004;58:1587-93.

- VERGNANI L, HATRIK S, RICCI F, PASSARO A, MANZOLI N, ZULIANI G. Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production: key role of L-arginine availability. *Circulation* 2000;101:1261-6.
- VIRCHOW R. Cellular pathology: as based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI. Atheromatous affection of arteries. 1858. Reprinted in *Nutr Rev* 1989;47:23-5.
- VITARIUS JA. The metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Mt Sinai J Med* 2005;72:257-62.
- VLADIMIROVA-KITOVA LG. Asymmetric dimethylarginine--mechanisms and targets for therapeutic management. *Folia Med (Plovdiv)* 2008;50:12-21.
- VOGEL S, CONTOIS JH, TUCKER KL, WILSON PW, SCHAEFER EJ, LAMMI-KEEFE CJ. Plasma retinol and plasma and lipoprotein tocopherol and carotenoid concentrations in healthy elderly participants of the Framingham Heart Study. *Am J Clin Nutr* 1997;66:950-8.
- VOLLSET SE, REFSUM H, UELAND PM. Population determinants of homocysteine. *Am J Clin Nutr* 2001;73:499-500.
- WALD DS, LAW M, MORRIS JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002;325:1202.
- WANBY P, TEERLINK T, BRUDIN L, BRATTSTRÖM L, NILSSON I, PALMQVIST P, CARLSSON M. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a risk marker for stroke and TIA in a Swedish population. *Atherosclerosis* 2006;185:271-7.
- WANG J, SIM AS, WANG XL, SALONIKAS C, MORIATIS M, NAIDOO D, WILCKEN DE. Relations between markers of renal function, coronary risk factors and the occurrence and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2008;197:853-9.
- WEBER P, BENDICH A, MACHLIN LJ. Vitamin E and human health: Rationale for determining recommended intake levels. *Nutrition* 1997;13:450-60.
- WEINBERG SL. The diet-heart hypothesis: a critique. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:731-3.
- WEISS N, HILGE R, HOFFMANN U. Mild hyperhomocysteinemia: risk factor or just risk predictor for cardiovascular diseases? *Vasa* 2004;33:191-203.
- WEISS N, PIETRZIK K, KELLER C. Atheroskleroserisikofaktor Hyperhomocyst(e)inämie: Ursachen und Konsequenzen. *Dtsch Med Wschr* 1999;124:1107-13.
- WELCH GN, LOSCALZO J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998;338:1042-50.
- WESTPHAL S, BORUCKI K, LULEY C, MARTENS-LOBENHOFFER J, BODE-BÖGER SM. Treatment with niacin lowers ADMA. *Atherosclerosis* 2006;184:448-50.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) / ISH (INTERNATIONAL SOCIETY OF HYPERTENSION). Guidelines Subcommittee 1. 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. *J Hypertens* 1999;17:151-83.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Definition, diagnosis and classification of Diabetes Mellitus and its complications. Part I: Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Report of a WHO consultation, 1999. Elektronisches Dokument, URL am 24.08.2005; http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_NCD_NCS_99.2.pdf
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Part I: The problem of overweight and obesity. Genf: WHO Technical Report Series 894, 2000.
- WIERZBICKI AS. Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diab Vasc Dis Res* 2007;4:143-50.
- WILCKEN DE, SIM AS, WANG J, WANG XL. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in vascular, renal and hepatic disease and the regulatory role of L-arginine on its metabolism. *Mol Genet Metab* 2007;91:309-17.

- WILCKEN DE, WANG J, SIM AS, GREEN K, WILCKEN B. Asymmetric dimethylarginine in homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: relevance of renal function. *J Inher Metab Dis* 2006;29:30-7.
- WILD S, ROGLIC G, GREEN A, SICREE R, KING H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27:1047-53.
- WILSON PW, D'AGOSTINO RB, LEVY D, BELANGER AM, SILBERSHATZ H, KANNEL WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998;97:1837-47.
- WINKLER G, DÖRING A. Kurzmethoden zur Charakterisierung des Ernährungsmusters: Einsatz und Auswertung eines Food-Frequency-Fragebogens. *Ernähr Um* 1995;42:289-91.
- WINKLER G, DÖRING A. Validation of a short qualitative food frequency list used in several German large scale surveys. *Z Ernähr* 1998;37:234-41.
- WIRTH A. Adipositas: Epidemiologie, Ätiologie, Folgekrankheiten, Therapie. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2000.
- WOLTERS M, HERMANN S, GOLF S, KATZ N, HAHN A. Selenium and antioxidant vitamin status of elderly German women. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:85-91.
- WOLTERS M, HERMANN S, HAHN A. B vitamin status and concentrations of homocysteine and methylmalonic acid in elderly German women. *Am J Clin Nutr* 2003;78:765-72.
- WOLTERS M, HERMANN S, HAHN A. Effects of 6-month multivitamin supplementation on serum concentrations of alpha-tocopherol, beta-carotene, and vitamin C in healthy elderly women. *Int J Vitam Nutr Res* 2004a;74:161-8.
- WOLTERS M, HERMANN S, HAHN A. Effect of multivitamin supplementation on the homocysteine and methylmalonic acid blood concentrations of women over the age of 60 years. *Eur J Nutr* 2005;44:183-92.
- WOLTERS M, STRÖHLE A, HAHN A. Altersassoziierte Veränderungen im Vitamin-B₁₂- und Folsäurestoffwechsel: Prävalenz, Ätiopathogenese und pathophysiologische Konsequenzen. *Z Gerontol Geriat* 2004b;37:109-35.
- WOO KS, CHOOK P, LOLIN YI, SANDERSON JE, METREWELI C, CELERMAJER DS. Folic acid improves arterial endothelial function in adults with hyperhomocystinemia. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:2002-6.
- WOO KS, SANDERSON JE, SUN YY, CHOOK P, CHEUNG AS, CHAN LT, METREWELI C, LOLIN YI, CELERMAJER DS. Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 2000;101:E116.
- WOODSIDE JV, YOUNG IS, YARNELL JW, ROXBOROUGH HE, MCMASTER D, MCCRUM EE, GEY KF, EVANS A. Antioxidants, but not B-group vitamins increase the resistance of low-density lipoprotein to oxidation: a randomized, factorial design, placebo-controlled trial. *Atherosclerosis* 1999;144:419-27.
- WOUTERS-WESSELING W, WAGENAAR LW, DE GROOT LC, BINDELS JG, VAN STAVEREN WA. Biochemical antioxidant levels respond to supplementation with an enriched drink in frail elderly people. *J Am Coll Nutr* 2003;22:232-8.
- WU T, WILLETT WC, RIFAI N, SHAI I, MANSON JE, RIMM EB. Is plasma oxidized low-density lipoprotein, measured with the widely used antibody 4E6, an independent predictor of coronary heart disease among U.S. men and women? *J Am Coll Cardiol* 2006;48:973-9.
- XU T, ZHANG XW, QU XK, YE HY, HUANG XB, ZHANG XP, HOU SK, WANG XF. Treatment of hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in renal transplant recipients with B vitamins in the Chinese population. *J Urol* 2008;179:1190-4.

- YAMAMOTO A. A unique antilipidemic drug--probucol. *J Atheroscler Thromb* 2008;15:304-5.
- YANG Z, MING XF. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res* 2006;4:53-65.
- YAO Y, YAO SL, YAO SS, YAO G, LOU W. Prevalence of vitamin B12 deficiency among geriatric outpatients. *J Fam Pract* 1992;35:524-28.
- YAP S, NAUGHTEN ER, WILCKEN B, WILCKEN DE, BOERS GH. Vascular complications of severe hyperhomocysteinemia in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: effects of homocysteine-lowering therapy. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:335-40.
- YOO JH, LEE SC. Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* 2001;158:425-30.
- ZAGO AS, ZANESCO A. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. *Arq Bras Cardiol* 2006;87:e264-70.
- ZANI BG, BOHLEN HG. Transport of extracellular L-arginine via cationic amino acid transporter is required during in vivo endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H1381-90.
- ZHANG WZ, VENARDOS K, CHIN-DUSTING J, KAYE DM. Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability: role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension* 2006;48:278-85.
- ZIEGLER S, MITTERMAYER F, PLANK C, MINAR E, WOLZT M, SCHERNTHANER GH. Homocyst(e)ine-lowering therapy does not affect plasma asymmetrical dimethylarginine concentrations in patients with peripheral artery disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2175-8.
- ZOCCALI C, BENEDETTO FA, MAAS R, MALLAMACI F, TRIPEPI G, MALATINO LS, BÖGER R; CREED INVESTIGATORS. Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:490-6.
- ZOCCALI C, BODE-BÖGER S, MALLAMACI F, BENEDETTO F, TRIPEPI G, MALATINO L, CATALIOTTI A, BELLANUOVA I, FERMO I, FRÖLICH J, BÖGER R. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001;358:2113-7.
- ZÖFEL P. Statistik verstehen. Ein Begleitbuch zur computergestützten Anwendung. München: Addison-Wesley Verlag, 2002.

9 ANHANG

Anhang A: Abbildungen

Anhang B: Tabellen

Anhang C: Analysemethoden

Anhang D: Umrechnungsfaktoren

Anhang E: Qualitativer Vitaminversorgungsstatus

ANHANG A: ABBILDUNGEN

Abb. A1: Schematischer Aufbau sowie Transfer von Elektronen innerhalb eines NOS-Dimers	A2
Abb. A2: Muster des in der vorliegenden Studie eingesetzten FFQ zur Erhebung der Verzehrhäufigkeit ausgewählter Lebensmittelgruppen	A3
Abb. A3: Verteilung der Verum- und Placebogruppe auf die zur Hypertonie-Prävalenz definierten Einzelkriterien	A4
Abb. A4: Verteilung der Verum- und Placebogruppe auf die Hyper-/Dyslipidämie-Prävalenz definierten Einzelkriterien	A4
Abb. A5: Verteilung der Verum- und Placebogruppe auf die zur Typ-2-Diabetes-Prävalenz definierten Einzelkriterien	A5
Abb. A6: Absolute T6-T0-Differenzen der S-Folat-Spiegel im Gesamtkollektiv, differenziert nach Verum- und Placebogruppe (Mittelwert \pm SE)	A5
Abb. A7: Absolute T6-T0-Differenzen der E-Folat-Spiegel im Gesamtkollektiv, differenziert nach Verum- und Placebogruppe (Mittelwert \pm SE)	A6
Abb. A8: Absolute T6-T0-Differenzen der Cbl-Serumspiegel im Gesamtkollektiv, differenziert nach Verum- und Placebogruppe (Mittelwert \pm SE)	A6
Abb. A9: Absolute T6-T0-Differenzen der PLP-Plasmaspiegel im Gesamtkollektiv, differenziert nach Verum- und Placebogruppe (Mittelwert \pm SE)	A6
Abb. A10: Korrelation zwischen den absoluten tHcy-Differenzen (T6-T0) und den Veränderungen der Cbl-Serumspiegel sowie S-Folat-Spiegel während der Intervention (T6-T0) in der Verumgruppe des Gesamtkollektivs	A7
Abb. A11: Verteilung der ADMA-Plasmakonzentration im Gesamtkollektiv zu T0	A7
Abb. A12: Biochemie des Homocystein-Stoffwechsels (vereinfachte Darstellung)	A8

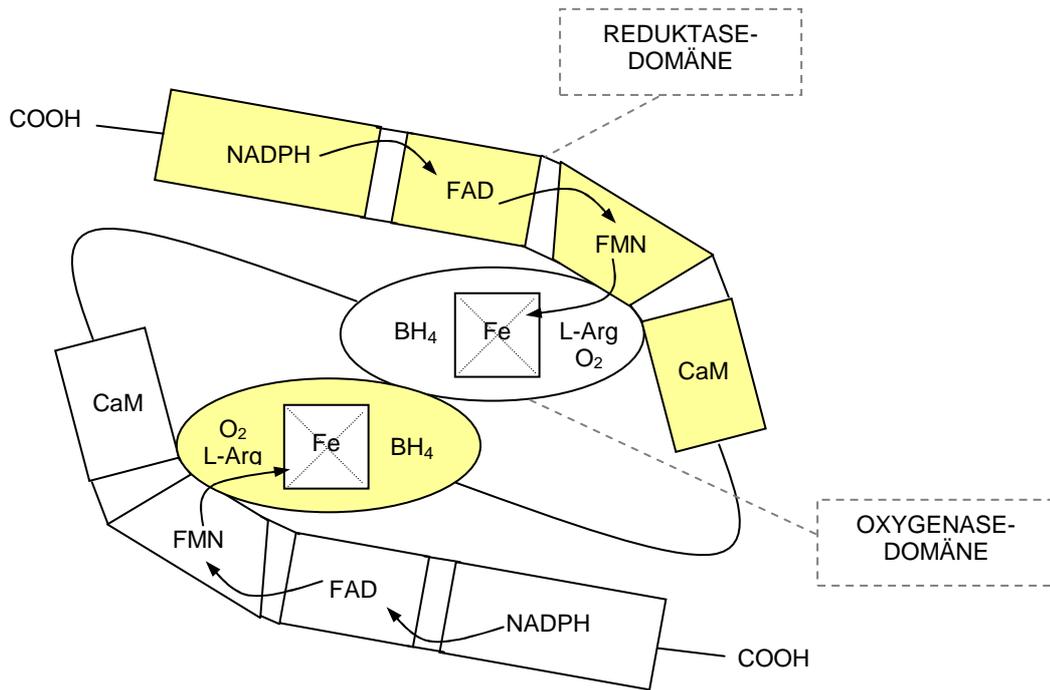


Abb. A1: Schematischer Aufbau sowie Transfer von Elektronen innerhalb eines NOS-Dimers [modifiziert nach STUEHR 1999]

Wie häufig haben Sie in den vergangenen 12 Monaten Lebensmittel aus folgenden Gruppen verzehrt (Bitte ankreuzen!)?

Lebensmittel- gruppe	Verzehrhäufigkeit					
	(fast) täglich	2-3x pro Woche	ca. 1x pro Woche	2-3x pro Monat	1x pro Monat/ seltener	nie
Fleisch (ohne Wurst)						
Wurstwaren, Schinken						
Geflügel						
Fisch						
Kartoffeln						
Teigwaren, Nudeln						
Reis						
rohes Gemüse, Salat						
gekochtes Gemüse						
frisches Obst						
Schokolade, Pralinen						
sonstige Süßwaren, z. B. Bonbons						
salzige Knabbereien, z. B. Chips, Erdnüsse						
Weißbrot, Mischbrot, Toastbrot						
Vollkorn-, Schwarz- und Knäcke Brot						
Haferflocken, Müsli, Cornflakes						
Quark, Joghurt, Dickmilch						
Käse						
Eier						

Bemerkungen:

Abb. A2: Muster des in der vorliegenden Studie eingesetzten FFQ zur Erhebung der Verzehrhäufigkeit ausgewählter Lebensmittelgruppen [modifiziert nach WINKLER U. DÖRING 1995]

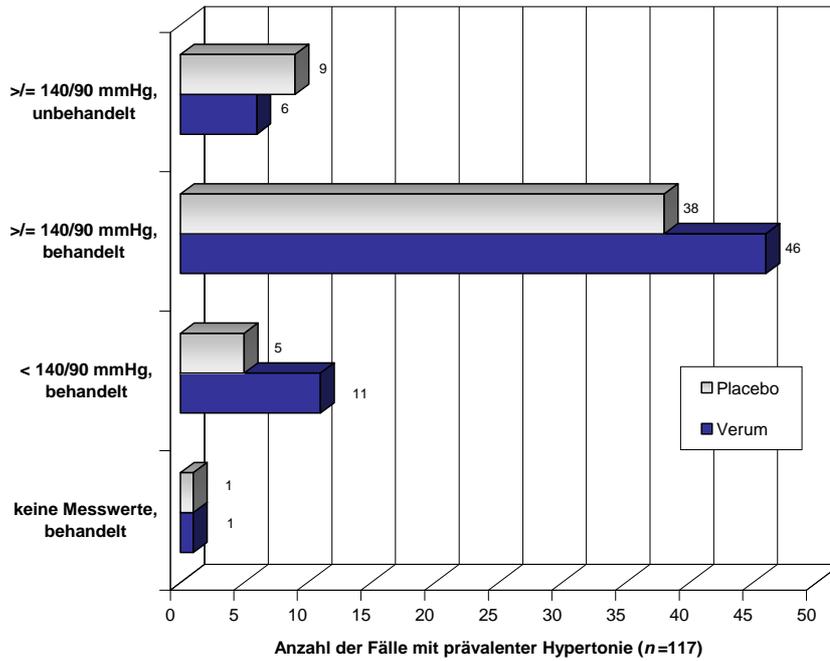


Abb. A3: Verteilung der Verum- und Placebogruppe auf die zur Hypertonie-Prävalenz definierten Einzelkriterien

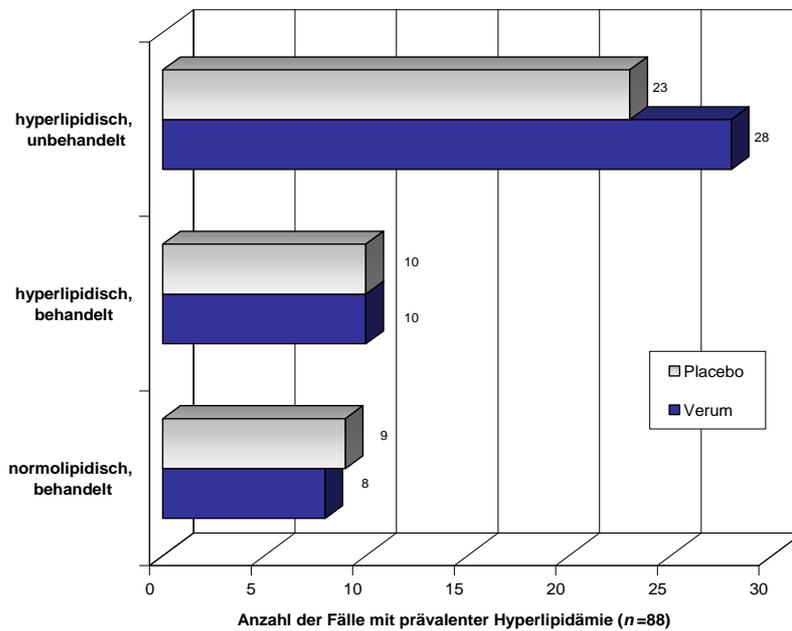


Abb. A4: Verteilung der Verum- und Placebogruppe auf die Hyper-/Dyslipidämie-Prävalenz definierten Einzelkriterien

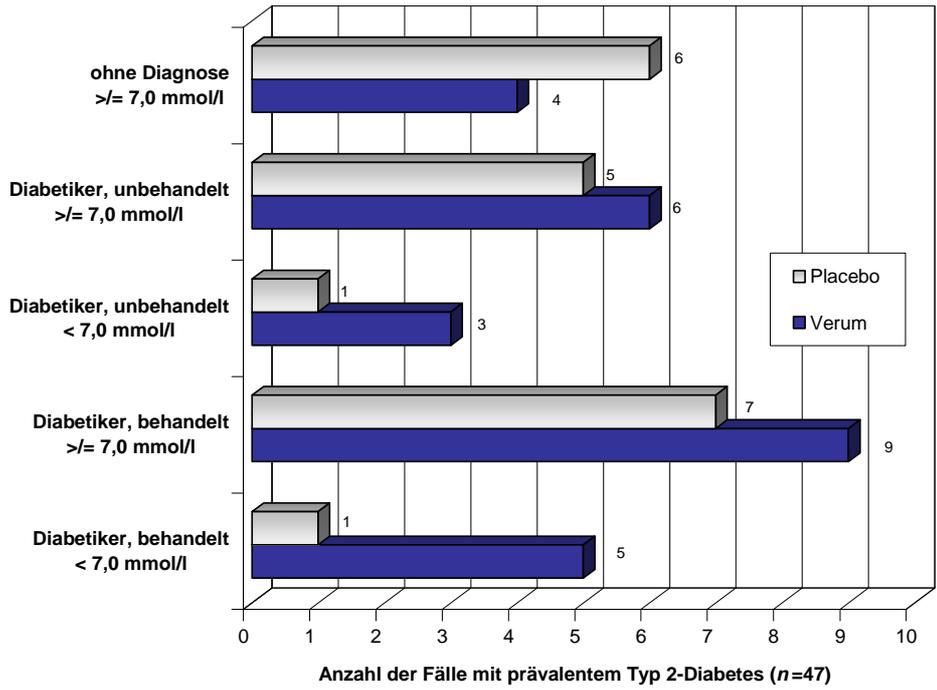


Abb. A5: Verteilung der Verum- und Placebogruppe auf die zur Typ-2-Diabetes-Prävalenz definierten Einzelkriterien

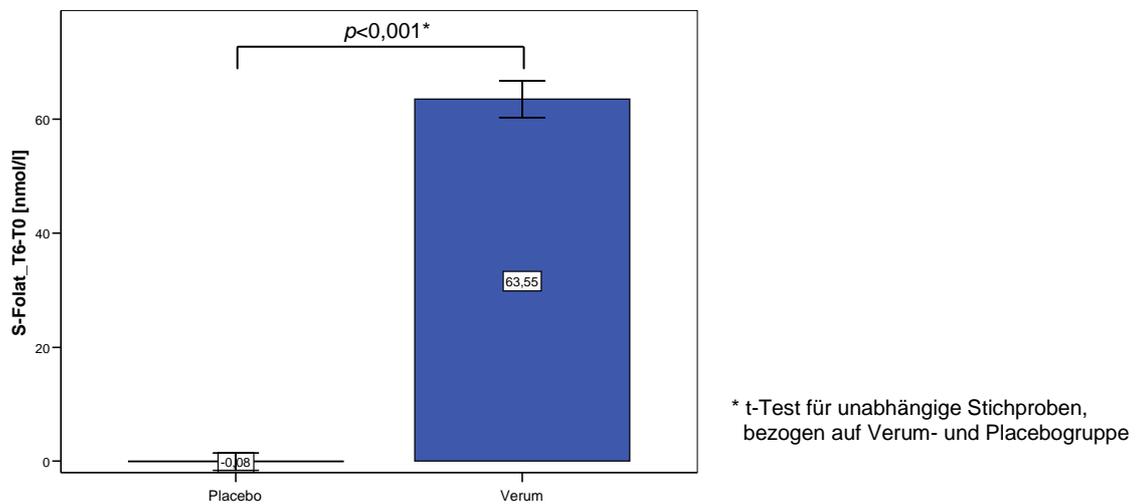
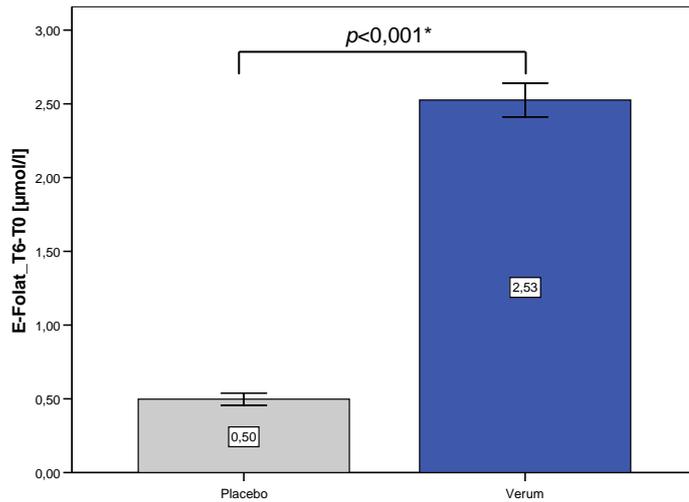
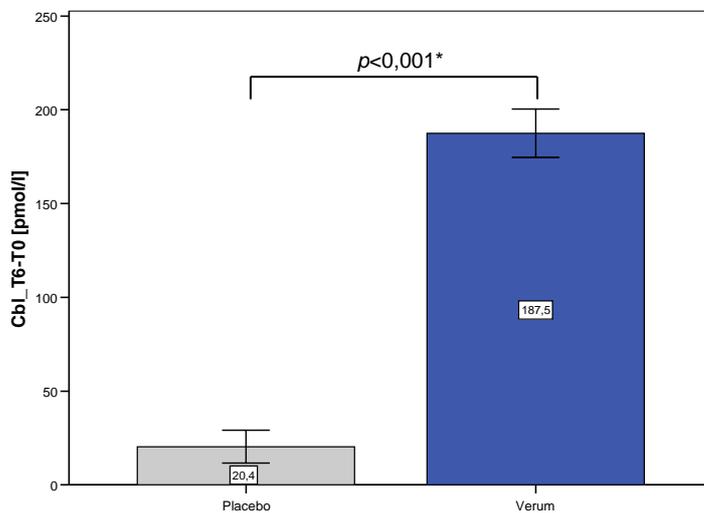


Abb. A6: Absolute T6-T0-Differenzen der S-Folat-Spiegel im Gesamtkollektiv, differenziert nach Verum- und Placebogruppe (Mittelwert \pm SE)



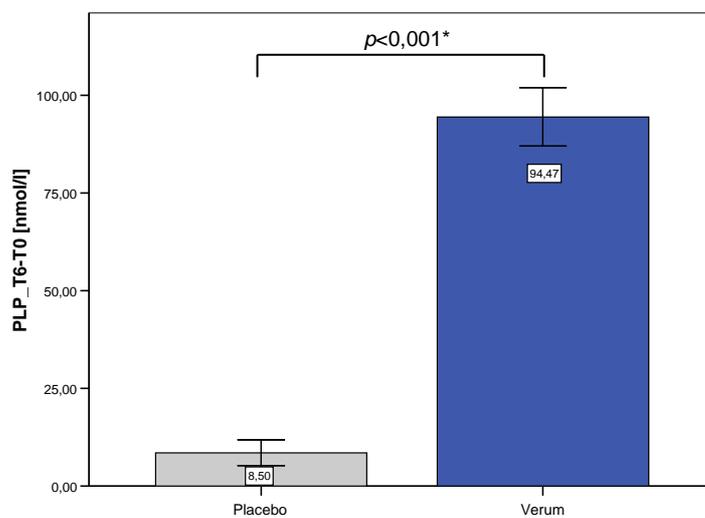
* t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

Abb. A7: Absolute T6-T0-Differenzen der E-Folat-Spiegel im Gesamtkollektiv, differenziert nach Verum- und Placebogruppe (Mittelwert ± SE)



* Mann-Whitney-U-Test, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

Abb. A8: Absolute T6-T0-Differenzen der Cbl-Serumspiegel im Gesamtkollektiv, differenziert nach Verum- und Placebogruppe (Mittelwert ± SE)



* Mann-Whitney-U-Test, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

Abb. A9: Absolute T6-T0-Differenzen der PLP-Plasmaspiegel im Gesamtkollektiv, differenziert nach Verum- und Placebogruppe (Mittelwert ± SE)

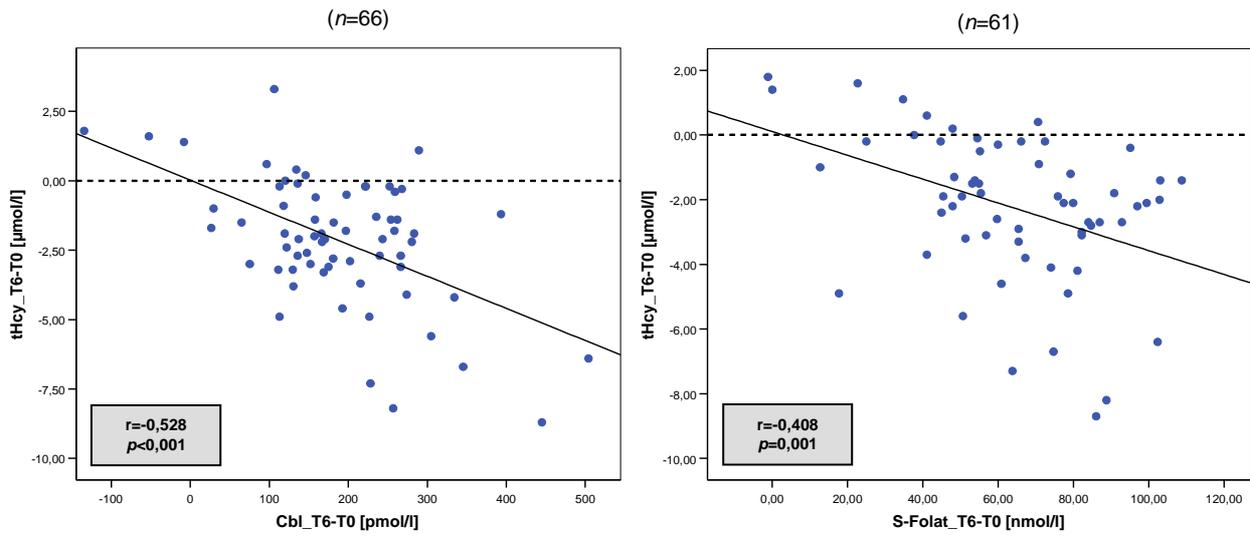


Abb. A10: Korrelation zwischen den absoluten tHcy-Differenzen (T6-T0) und den Veränderungen der Cbl-Serumspiegel sowie S-Folat-Spiegel während der Intervention (T6-T0) in der Verumgruppe des Gesamtkollektivs

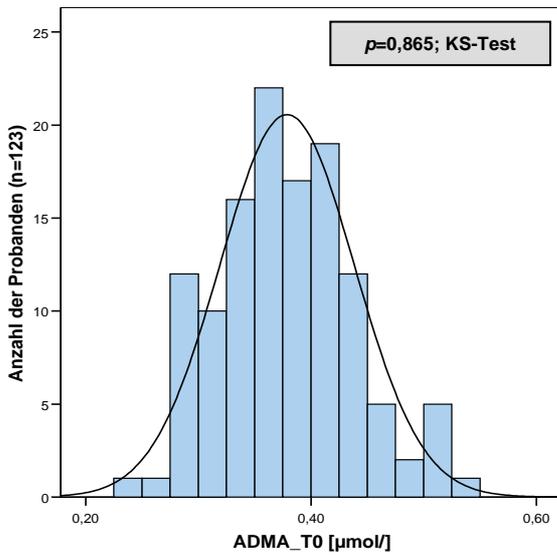


Abb. A11: Verteilung der ADMA-Plasmakonzentration im Gesamtkollektiv zu T0

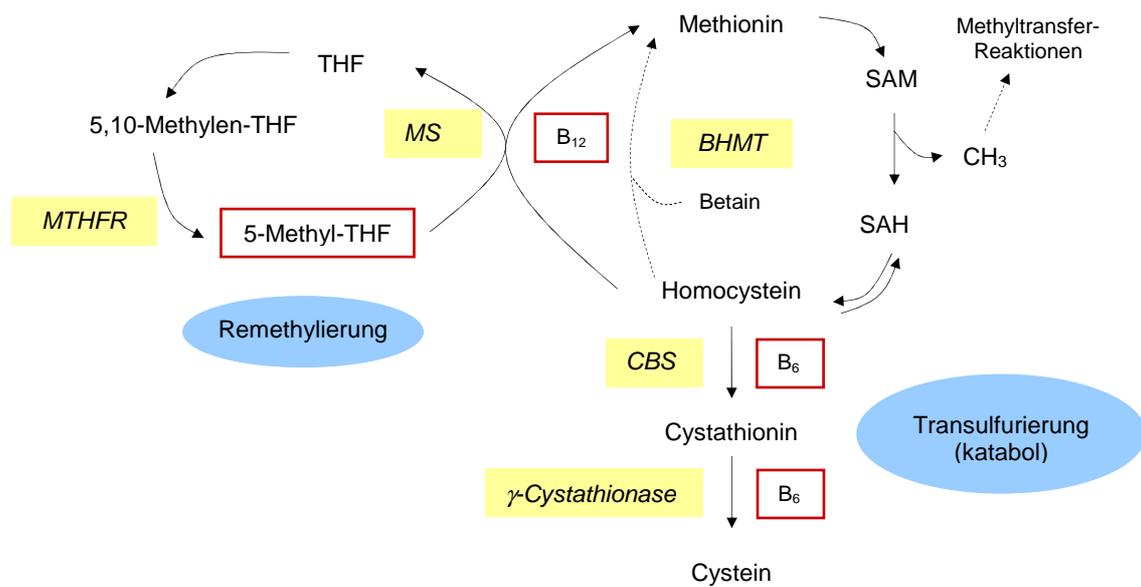


Abb. A12: Biochemie des Homocystein-Stoffwechsels (vereinfachte Darstellung) [modifiziert nach DAYAL U. LENTZ 2005]

Der Abbau von Homocystein, das ein Intermediärprodukt im Stoffwechsel der essenziellen Aminosäure Methionin darstellt, erfolgt über den Reaktionsweg der Remethylierung von Homocystein zu Methionin, der durch die Methionin-Synthase (MS) katalysiert wird, sowie durch die irreversible Transulfurierung von Homocystein zu Cystein durch die Enzyme Cystathionin-β-Synthetase (CBS) und γ-Cystathionase. Die Remethylierung erfordert Vitamin B₁₂ als Coenzym der Methionin-Synthase sowie 5-Methyl-Tetrahydrofolat (5-Methyl-THF), welches als Methylgruppendonor durch die 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) bereitgestellt wird. Die Transulfurierung unterliegt einer Vitamin-B₆-abhängigen Reaktionsfolge. In Leber und Niere existiert ein alternativer Remethylierungsweg, der durch die Betain-Homocystein-Methyltransferase (BHMT) katalysiert wird und bei der Betain als Methylgruppendonor fungiert. SAH: S-Adenosyl-Homocystein, SAM: S-Adenosyl-Methionin.

ANHANG B: TABELLEN

Tab. A1: Übersicht über die wichtigsten, von Endothelzellen gebildeten vasoaktiven Substanzen	B3
Tab. A2: ADMA-Plasmaspiegel [$\mu\text{mol/l}$] bei Probanden mit und ohne manifeste Atherosklerose – Ergebnisse aus Querschnittsstudien (Auswahl)	B4
Tab. A3: Für die Studienteilnahme relevante und im Rahmen des Screenings der Studieninteressenten überprüfte Einschlusskriterien	B5
Tab. A4: Bewertungsmatrix zur Ermittlung des Ernährungsmuster-Index mittels FFQ	B6
Tab. A5: Beurteilungsgrundlage für das Vorliegen eines metabolischen Syndroms nach AHA/NHLBI-Definition	B7
Tab. A6: Blutdruckwerte, Lipid- und Glucose-Serumspiegel zu T0 in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)	B7
Tab. A7: Im Gesamtkollektiv zu T0 ermittelter BMI und damit assoziiertes Komorbiditätsrisiko nach WHO	B8
Tab. A8: Im Gesamtkollektiv zu T0 ermittelter Taillenumfang und damit assoziiertes Komorbiditätsrisiko nach WHO	B8
Tab. A9: Medikamentöse Behandlung kardiovaskulärer Risikofaktoren im Gesamtkollektiv	B9
Tab. A10: Korrelationskoeffizienten und zugehörige Signifikanzniveaus zwischen Homocystein und B-Vitaminsstatusparametern im Gesamtkollektiv zu T0	B9
Tab. A11: Korrelationskoeffizienten und zugehörige Signifikanzniveaus zwischen den absoluten tHcy-Differenzen (T6-T0) und den Differenzen der B-Vitaminsstatusparameter (T6-T0) in der Verumgruppe des Gesamtkollektivs	B10
Tab. A12: Korrelationskoeffizienten und zugehörige Signifikanzniveaus zwischen oxLDL und Antioxidanzienparametern im Gesamtkollektiv zu T0	B10
Tab. A13: Korrelationskoeffizienten und zugehörige Signifikanzniveaus zwischen den absoluten oxLDL-Differenzen (T6-T0) und den Differenzen der Antioxidanzienparameter (T6-T0) in der Verumgruppe des Gesamtkollektivs	B11
Tab. A14: ADMA-Plasmaspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Subkollektivs „Höhe der tHcy-Plasmaspiegel“ (Mittelwert \pm SD)	B11
Tab. A15: Korrelationskoeffizienten und zugehörige Signifikanzniveaus zwischen ADMA und den für die Fragestellung relevanten Parametern im Gesamtkollektiv zu T0..	B12
Tab. A16: Korrelationskoeffizienten und zugehörige Signifikanzniveaus zwischen ADMA und weiteren ausgewählten Parametern im Gesamtkollektiv zu T0	B13

-
- Tab. A17:** Korrelationskoeffizienten und zugehörige Signifikanzniveaus zwischen den absoluten ADMA-Differenzen (T6-T0) und den Differenzen der für die Fragestellung relevanten Parameter (T6 T0) in der Verumgruppe des Gesamtkollektivs B14
- Tab. A18:** Lipid- und Glucose-Serumspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD) .. B15
- Tab. A19:** Vergleich der B-Vitaminspiegel des Gesamtkollektivs zu T0 mit den nach Geschlecht angegebenen Mittelwerten (\pm SD) der EPIC-Potsdam-Subkohorte B16
- Tab. A20:** oxLDL/LDL-Quotient zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD) B16

Tab. A1: Übersicht über die wichtigsten, von Endothelzellen gebildeten vasoaktiven Substanzen [modifiziert nach SIMON et al. 1999]

Vasodilatoren	<ul style="list-style-type: none"> – Stickstoffmonoxid, NO (Endothelium Derived Relaxing Factor, EDRF) – Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF) – Prostacyclin I₂ (PCI₂), Prostaglandin E₂ (PGE₂)
Vasokonstriktoren	<ul style="list-style-type: none"> – Endothelin-1 – Angiotensin II – Thromboxan A₂ (TXA₂), Endoperoxide (Prostaglandin H₂, PGH₂) – Superoxidanionen (O₂⁻)⁹¹
Wachstumsfaktoren	<ul style="list-style-type: none"> – Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) – Transforming Growth Factor-β (TGF-β) – Platelet Derived Growth Factor (PDGF) – Monocyte Colony Stimulating Factor-1 (MCSF-1)
Hämostasefaktoren	<ul style="list-style-type: none"> – von Willebrand Faktor (vWF) – Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) – tissue- Plasminogen Activator (t-PA)
Adhäsionsmoleküle	<ul style="list-style-type: none"> – Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) – Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) – E-Selektin
Chemo-/Zytokine	<ul style="list-style-type: none"> – Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) – Interleukine

⁹¹ Die hier vorgenommene Einordnung als vasokonstriktorische Substanz ergibt sich aus seiner Funktion als NO-Scavenger.

Tab. A2: ADMA-Plasmaspiegel [$\mu\text{mol/l}$] bei Probanden mit und ohne manifeste Atherosklerose – Ergebnisse aus Querschnittsstudien (Auswahl)

Atherosklerose-Manifestation	Patienten *	Kontrollen *	Erhöhung **	Referenz
Akutes Koronarsyndrom / KHK	$0,56 \pm 0,18^a$	$0,47 \pm 0,12$	1,2-fach $p < 0,05$	VALKONEN et al. 2001
	$0,66 \pm 0,17^b$ $n=46$	$0,44 \pm 0,09$ $n=51$	1,5-fach $p < 0,001$	LU et al. 2003a
	$0,70 (0,59-0,87)$ $n=131$	$0,60 (0,54-0,69)$ $n=131$	1,2-fach $p < 0,001$	SCHULZE et al. 2006 <i>CARDIAC-Study</i>
Herzinsuffizienz	$0,55 \pm 0,02^c$ $n=40$	$0,49 \pm 0,02$ $n=36$	1,1-fach $p < 0,01$	USUI et al. 1998
Apoplex / zerebrale Ischämien	$1,85 \pm 1,32$ $n=52$	$0,93 \pm 0,32$ $n=36$	2,0-fach $p < 0,001$	YOO U. LEE 2001
	$0,55 \pm 0,08^d$ $n=71$	$0,50 \pm 0,06$ $n=48$	1,1-fach $p < 0,001$	WANBY et al. 2006
	$0,54 \pm 0,05^e$ $n=31$	$0,50 \pm 0,06$ $n=48$	1,1-fach $p < 0,001$	WANBY et al. 2006
pAVK	$2,80 \pm 0,22$ $n=77$	$1,01 \pm 0,05$ $n=37$	2,8-fach $p < 0,05$	BÖGER et al. 1997b

* Mittelwert \pm SD bzw. Median (25-75er Perzentil), ** Patienten vs. Kontrolle (gerundete Werte)

^a KHK-Patienten mit vs. ohne akutes Koronareignis,

^b Koronarstenose $\geq 50\%$ vs. Koronarstenose $< 50\%$

^c schweres (NYHA-Klasse⁹² III-IV) vs. mildes Erkrankungsstadium (NYHA-Klasse I-II)

^d kardioembolischer Insult

^e transitorisch-ischämische Attacke

⁹² Von der New York Heart Association etabliertes Klassifizierungsschema zur Einteilung der Herzinsuffizienz nach ihrem funktionellen Schweregrad [HOPPE et al. 2005]: Stadium I = asymptotische kardiale Dysfunktion ohne körperliche Limitationen, Stadium II = kardiale Dysfunktion mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit, Symptomatik bei alltäglicher körperlicher Belastung, Stadium III = kardiale Dysfunktion mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit, Symptomatik bei geringer körperlicher Belastung, Stadium IV = kardiale Dysfunktion mit Beschwerden bei allen körperlichen Belastungen und in Ruhe, Bettlägerigkeit.

Tab. A3: Für die Studienteilnahme relevante und im Rahmen des Screenings der Studieninteressenten überprüfte Einschlusskriterien

Einschlusskriterien	Beurteilungskriterien	Basis
Hyper-/Dyslipoproteinämie	- ärztliche Diagnose erhöhter Blutfettwerte	Framingham-Risk-Score ^a
	- bzw. Abweichung von mind. einem der folgenden Grenzwerte*: TC $\geq 6,22$ mmol/l (240 mg/dl) LDL $\geq 4,15$ mmol/l (160 mg/dl) HDL $\leq 0,91$ mmol/l (35 mg/dl) Triglyceride 1,7-4,5 mmol/l (150-400 mg/dl) ^c	PROCAM-Risk-Score ^b
Arterielle Hypertonie	- Blutdruck $\geq 140/90$ mmHg	Framingham-Risk-Score
	- und/oder antihypertensive Medikation	
Typ-2-Diabetes	- ärztlich festgestellte Diagnose - und/oder medikamentöse Behandlung mit oralen Antidiabetika bzw. Insulin - und/oder Einhaltung einer Diabetes-Diät	
Familiäre Disposition	- Myokardinfarkt, Schlaganfall oder pAVK im 1. Verwandtschaftsgrad vor Erreichen des 60. Lebensjahres	PROCAM-Risk-Score
Adipositas	- BMI ≥ 30 kg/m ² nach Berechnung aus subjektiven Angaben zu Körpergröße und -gewicht	WHO 2000
Rauchen	- regelmäßiger Zigaretten-, Zigarillo- und/oder Pfeifenkonsum	Framingham-Risk-Score
	- oder Aufgabe des Rauchens innerhalb der letzten 12 Monate	

* Die Beurteilung erfolgte anhand von eingesandten oder telefonisch von den Interessenten mitgeteilten Laborbefunden. Andernfalls war die medikamentöse Behandlung maßgebendes Zuordnungskriterium.

^a im Score berücksichtigte Risikofaktoren; im Fall der Lipid- und Blutdruckwerte wurden die Grenzwerte der „high risk“-Kategorie nach WILSON et al. [1998] zugrunde gelegt

^b im Score berücksichtigte Risikofaktoren nach ASSMANN et al. [2002]

^c nach den Kriterien der INTERNATIONAL TASK FORCE FOR PREVENTION OF CORONARY HEART DISEASE [1998], wonach Triglyceridspiegel $>4,5$ mmol/l mit dem Vorhandensein größerer, jedoch weniger atherogener Lipoproteinpartikel assoziiert sind⁹³

⁹³ Für das Probanden-Screening wurden Personen mit Triglyceridwerten $>4,5$ mmol/l primär aus methodischen Gründen (lipidämische Probe) von der Teilnahme ausgenommen. Darüber hinaus können Triglyceridspiegel dieser Größenordnung u. U. auf eine alkoholinduzierte Hypertriglyceridämie bzw. einen damit verbundenen Alkoholabusus (=Ausschlusskriterium) zurückgeführt werden.

Tab. A4: Bewertungsmatrix zur Ermittlung des Ernährungsmuster-Index mittels FFQ [nach WINKLER U. DÖRING 1995]

In den Index einbezogene Lebensmittelgruppen	Verzehrshäufigkeit*					
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Fleisch (ohne Wurstwaren)	0	1	2	2	1	0
Wurstwaren, Schinken	0	1	2	2	1	0
Fisch	1	2	2	1	0	0
Kartoffeln	2	1	0	0	0	0
Teigwaren, Nudeln	2	1	0	0	0	0
Reis	2	1	0	0	0	0
Gemüse (roh) oder Salat	2	1	0	0	0	0
Gemüse (gekocht)	2	1	0	0	0	0
frisches Obst	2	1	0	0	0	0
Schokolade, Pralinen	0	0	1	1	2	2
Kuchen, Gebäck, Kekse	0	0	1	1	2	2
Salzige Knabberereien, z.B. Chips, Erdnüsse	0	0	1	1	2	2
Vollkorn-, Schwarz-, Knäckeibrot	2	1	0	0	0	0
Haferflocken, Müsli, Cornflakes	2	2	1	1	0	0
Eier	0	1	2	2	2	2
Ernährungsmusterindex-Kategorie	Σ der vergebenen Punktwerte					
optimales „günstiges“ Ernährungsmuster	≥16 Punkte					
mittleres „normales“ Ernährungsmuster	14-15 Punkte					
abweichendes „ungünstiges“ Ernährungsmuster	≤13 Punkte					

* Kategorien der Häufigkeitsskala gemäß den Angaben im FFQ (vgl. Abb. A2, Anhang A): **(1)** „(fast) täglich“, **(2)** „2-3x pro Woche“, **(3)** „ca. 1x pro Woche“, **(4)** „2-3x pro Monat“, **(5)** „1x pro Monat/seltener“, **(6)** „nie“

Tab. A5: Beurteilungsgrundlage für das Vorliegen eines metabolischen Syndroms nach AHA/NHLBI-Definition [GRUNDY 2005; GRUNDY et al. 2005]

Risikofaktor	Diagnose eines Metabolischen Syndroms bei <i>mindestens drei</i> der folgenden fünf Kriterien
Erhöhter Taillenumfang	- w: ≥ 88 cm - m: ≥ 102 cm
Erhöhte Triglyceride	- $\geq 1,7$ mmol/l (150 mg/dl) - und/oder TG-senkende Medikation*
Erniedrigtes HDL	- w: $\leq 1,3$ mmol/l (50 mg/dl) - m: $\leq 1,0$ mmol/l (40 mg/dl) - und/oder HDL-erhöhende Medikation*
Erhöhter Blutdruck	- SBD ≥ 130 mmHg und/oder DBD ≥ 85 mmHg - und/oder antihypertensive Medikation
Erhöhte Nüchtern-glucose	- $\geq 5,6$ mmol/l (100 mg/dl) - und/oder antiglykämische Medikation

* Behandlung mit Fibraten oder Nicotinsäure

Tab. A6: Blutdruckwerte, Lipid- und Glucose-Serumspiegel zu T0 in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)

	Gesamtkollektiv	Verum	Placebo	<i>p</i>
SBD_T0 [mmHg]	151 \pm 19,9 (n=121)	153 \pm 23,1 (n=65)	148 \pm 15,3 (n=56)	0,193 ^a
DBD_T0 [mmHg]	94 \pm 10 (n=121)	94 \pm 11 (n=65)	95 \pm 9,1 (n=56)	0,374 ^a
TC_T0 [mmol/l]	6,03 \pm 1,28 (n=123)	6,01 \pm 1,32 (n=66)	6,06 \pm 1,24 (n=57)	0,855 ^a
LDL_T0 [mmol/l]	3,98 \pm 0,96 (n=123)	4,01 \pm 1,00 (n=66)	3,94 \pm 0,92 (n=57)	0,683 ^a
HDL_T0 [mmol/l]	1,43 \pm 0,40 (n=123)	1,42 \pm 0,38 (n=66)	1,44 \pm 0,42 (n=57)	0,694 ^b
TC/HDL_T0	4,4 \pm 1,2 (n=123)	4,4 \pm 1,1 (n=66)	4,5 \pm 1,4 (n=57)	0,811 ^a
TG_T0 [mmol/l]	2,08 \pm 1,34 (n=123)	1,96 \pm 0,98 (n=66)	2,19 \pm 1,67 (n=57)	0,841 ^b
Glucose_T0 [mmol/l]	6,59 \pm 1,98 (n=123)	6,61 \pm 2,20 (n=66)	6,57 \pm 1,72 (n=57)	0,651 ^b

^a t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b Mann-Whitney-U-Test, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

Tab. A7: Im Gesamtkollektiv zu T0 ermittelter BMI und damit assoziiertes Komorbiditätsrisiko nach WHO [WHO 2000, S. 9]

Klassifikation	BMI-Kategorie	Komorbiditätsrisiko	Gesamt (n=123)	
			n	%
Normalgewicht	18,5 - <25 kg/m ²	durchschnittlich	6	4,9
Präadipositas	25 - <30 kg/m ²	gering erhöht	39	31,7
Adipositas (gesamt)	≥30 kg/m ²		78	63,4
Adipositas Grad 1	30 - <35 kg/m ²	erhöht	51	41,5
Adipositas Grad 2	35 - <40 kg/m ²	hoch	17	13,8
Adipositas Grad 3	≥40 kg/m ²	sehr hoch	10	8,1

Tab. A8: Im Gesamtkollektiv zu T0 ermittelter Taillenumfang und damit assoziiertes Komorbiditätsrisiko nach WHO [WHO 2000, S. 11]

TU-Risikoklassifikation	Gesamt (n=123)		BMI ≥ 30 kg/m ² (n=78)		BMI < 30 kg/m ² (n=45)	
	n	%	n	%	n	%
keine Risikoerhöhung (w <80 cm; m <94 cm)	4	3,3	--	--	4	8,9
erhöhtes Komorbiditätsrisiko	119	96,7	78	100	41	91,1
moderate Risikoerhöhung (w ≥80 cm; m ≥94 cm)	24	19,5	1	1,3	23	51,1
deutliche Risikoerhöhung (w ≥88 cm; m ≥102 cm)	95	77,2	77	98,7	18	40,0

Tab. A9: Medikamentöse Behandlung kardiovaskulärer Risikofaktoren im Gesamtkollektiv

	Gesamt (n=123)		Verum (n=66)		Placebo (n=57)	
	n	%	n	%	n	%
Keine risikoassoziierte Medikation	13	10,6	5	7,6	8	14,0
Risikoassoziierte Medikation (gesamt)	110	89,4	61	92,4	49	86,0
Antihypertonika	55	50	32	52,5	23	46,9
Lipidsenker	6	5,5	3	4,9	3	6,1
Antidiabetika	1	0,9	--	--	1	2,0
Antihypertonika + Lipidsenker	27	24,5	12	19,7	15	30,6
Antihypertonika + Antidiabetika	17	15,5	11	18,0	6	12,2
Lipidsenker + Antidiabetika	1	0,9	--	--	1	2,0
Antihypertonika + Lipidsenker + Antidiabetika	3	2,7	3	4,9	--	--

Tab. A10: Korrelationskoeffizienten und zugehörige Signifikanzniveaus zwischen Homocystein und B-Vitaminstatusparametern im Gesamtkollektiv zu T0

		tHcy_T0 [μmol/l]	S-Folat_T0 [nmol/l]	E-Folat_T0 [μmol/l]	Cbl_T0 [pmol/l]
S-Folat_T0 [nmol/l]	r _s	-0,389			
	p	<0,001			
	n	122			
E-Folat_T0 [μmol/l]	r _s	-0,143	0,385		
	p	0,116	<0,001		
	n	122	122		
Cbl_T0 [pmol/l]	r/r _s	-0,311[#]	0,216	0,254	
	p	<0,001	0,017	0,005	
	n	123	122	122	
PLP_T0 [nmol]	r _s	0,063	0,306	0,013	-0,141
	p	0,488	0,001	0,884	0,120
	n	123	122	122	123

[#] Korrelationskoeffizient nach Pearson (r)

Tab. A11: Korrelationskoeffizienten und zugehörige Signifikanzniveaus zwischen den absoluten tHcy-Differenzen (T6-T0) und den Differenzen der B-Vitaminstatusparameter (T6-T0) in der Verumgruppe des Gesamtkollektivs

		tHcy_T6-T0 [μmol/l]	S-Folat_T6-T0 [nmol/l]	E-Folat_T6-T0 [μmol/l]	Cbl_T6-T0 [pmol/l]
S-Folat_T6-T0 [nmol/l]	r	-0,408			
	p	0,001			
	n	61			
E-Folat_T6-T0 [μmol/l]	r	-0,257	0,562		
	p	0,054	<0,001		
	n	57	57		
Cbl_T6-T0 [pmol/l]	r _s	-0,528	0,581	0,401	
	p	<0,001	<0,001	0,002	
	n	66	61	57	
PLP_T6-T0 [nmol]	r	-0,092	0,335	0,273	0,159
	p	0,461	0,008	0,040	0,203
	n	66	61	57	66

Tab. A12: Korrelationskoeffizienten und zugehörige Signifikanzniveaus zwischen oxLDL und Antioxidanzienparametern im Gesamtkollektiv zu T0

		oxLDL_T0 [U/l]		TEAC_T0 [μmol/l]
TEAC_T0 [μmol/l]	r	-0,041	-0,101	
	p	0,681	0,394	
	n	102 ⁺	73 ⁺⁺	
AT_T0 [μmol/l]	r	-0,001*	0,058*	-0,131
	p	0,994	0,631	0,148
	n	102 ⁺	73 ⁺⁺	123
AT/TC_T0 [μmol/mmol]	r _s	-0,033	-0,038	-0,145
	p	0,744	0,747	0,109
	n	102 ⁺	73 ⁺⁺	123
AT/TC+TG_T0 [μmol/mmol]	r	-0,054	0,013	-0,087
	p	0,592	0,915	0,337
	n	102 ⁺	73 ⁺⁺	123

⁺ untersuchte Teilstichprobe, ⁺⁺ untersuchte Teilstichprobe abzüglich Probanden mit hypolipidämischer Medikation, * partielle Korrelation (Kontrollvariablen: TC_T0, TG_T0_{log})

Tab. A13: Korrelationskoeffizienten und zugehörige Signifikanzniveaus zwischen den absoluten oxLDL-Differenzen (T6-T0) und den Differenzen der Antioxidanzienparameter (T6-T0) in der Verumgruppe des Gesamtkollektivs

		oxLDL_T6-T0 [U/l]	TEAC_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]
TEAC_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	r_s	0,028	
	p	0,866	
	<i>n</i>	40 ⁺	
AT_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	<i>r</i>	0,026*	-0,113
	p	0,875	0,367
	<i>n</i>	40 ⁺	66
AT/TC_T6-T0 [$\mu\text{mol}/\text{mmol}$]	<i>r</i>	-0,005	-0,047
	p	0,977	0,708
	<i>n</i>	40 ⁺	66
AT/TC+TG_T6-T0 [$\mu\text{mol}/\text{mmol}$]	<i>r</i>	-0,079	-0,032
	p	0,626	0,800
	<i>n</i>	40 ⁺	66

⁺ untersuchte Teilstichprobe abzüglich Probanden mit hypolipidämischer Medikation, * partielle Korrelation (Kontrollvariable: TC_T6-T0)

Tab. A14: ADMA-Plasmaspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Subkollektivs „Höhe der tHcy-Plasmaspiegel“ (Mittelwert \pm SD)

	Subkollektiv	Verum	Placebo	p^a
tHcy_T0 $\leq 8,30 \mu\text{mol/l}$	(n=32)	(n=15)	(n=17)	
ADMA_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	0,37 \pm 0,06	0,36 \pm 0,05	0,37 \pm 0,07	0,773
ADMA_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	0,38 \pm 0,06	0,39 \pm 0,06	0,37 \pm 0,06	0,316
p^b	0,331	0,177	0,952	
ADMA_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	0,01 \pm 0,07	0,03 \pm 0,08	0,00 \pm 0,07	0,263
tHcy_T0 $\geq 10,9 \mu\text{mol/l}$	(n=30)	(n=19)	(n=11)	
ADMA_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	0,38 \pm 0,05	0,38 \pm 0,06	0,38 \pm 0,04	0,773
ADMA_T6 [$\mu\text{mol/l}$]	0,39 \pm 0,06	0,38 \pm 0,06	0,41 \pm 0,05	0,316
p^b	0,469	0,913	0,214	
ADMA_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	0,01 \pm 0,07	0,00 \pm 0,08	0,02 \pm 0,05	0,263

^a t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

Tab. A15: Korrelationskoeffizienten und zugehörige Signifikanzniveaus zwischen ADMA und den für die Fragestellung relevanten Parametern im Gesamtkollektiv zu T0

	ADMA_T0 [$\mu\text{mol/l}$]			
	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>r_s</i>	<i>p</i>
tHcy_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	123	0,046		0,615
S-Folat_T0 [nmol/l]	122		0,074	0,421
E-Folat_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	122		0,037	0,687
Cbl_T0 [pmol/l]	123	0,099		0,278
PLP_T0 [nmol]	123		0,049	0,594
oxLDL_T0 [U/l]	102 ⁺	0,084		0,399
	73 ⁺	0,167		0,159
TEAC_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	123	-0,154		0,088
AT_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	123	-0,043		0,638
AT/TC_T0 [$\mu\text{mol/mmol}$]	123	0,011		0,906
AT/TC+TG_T0 [$\mu\text{mol/mmol}$]	123	0,023		0,797

⁺ untersuchte Teilstichprobe, ⁺⁺ untersuchte Teilstichprobe abzüglich Probanden mit hypolipidämischer Medikation

Tab. A16: Korrelationskoeffizienten und zugehörige Signifikanzniveaus zwischen ADMA und weiteren ausgewählten Parametern im Gesamtkollektiv zu T0

	ADMA_T0 [$\mu\text{mol/l}$]			
	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>r_s</i>	<i>p</i>
SDMA_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	123	0,281		0,002
Creatinin_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	123	-0,042		0,642
L-Arg_T0 [$\mu\text{mol/l}$]	123	0,153		0,092
TC_T0 [mmol/l]	123	-0,062		0,493
	86 ⁺	-0,092		0,401
HDL_T0 [mmol/l]	123		0,051	0,578
	86 ⁺		-0,007	0,949
LDL_T0 [mmol/l]	123	-0,077		0,400
	86 ⁺	-0,081		0,461
TG_T0 [mmol/l]	123		-0,031	0,731
	86 ⁺		0,048	0,663
Glucose_T0 [mmol/l]	123		0,008	0,934
	101 [#]		0,038	0,707
SBD_T0 [mmHg]	121	0,005		0,960
DBD_T0 [mmHg]	121	-0,076		0,403
BMI_T0 [kg/m^2]	123	0,058		0,522
TU_T0 [cm]	123	0,018		0,843
Alter_T0 [Jahre]	123	0,157		0,083

⁺ Gesamtstichprobe abzüglich Probanden mit hypolipidämischer Medikation, [#] Gesamtstichprobe abzüglich Probanden mit antiglykämischer Medikation

Tab. A17: Korrelationskoeffizienten und zugehörige Signifikanzniveaus zwischen den absoluten ADMA-Differenzen (T6-T0) und den Differenzen der für die Fragestellung relevanten Parameter (T6-T0) in der Verumgruppe des Gesamtkollektivs

	ADMA_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]			
	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>r_s</i>	<i>p</i>
tHcy_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	66	0,102		0,416
S-Folat_T6-T0 [nmol/l]	61	0,032		0,809
E-Folat_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	57	-0,147		0,276
Cbl_T6-T0 [pmol/l]	66	-0,079		0,527
PLP_T6-T0 [nmol]	66	0,041		0,742
oxLDL_T6-T0 [U/l]	40 ⁺	-0,234		0,147
TEAC_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	66	0,213		0,085
AT_T6-T0 [$\mu\text{mol/l}$]	66	-0,228		0,066
AT/TC_T6-T0 [$\mu\text{mol/mmol}$]	66	-0,070		0,576
AT/TC+TG_T6-T0 [$\mu\text{mol/mmol}$]	66	-0,103		0,412

⁺ untersuchte Teilstichprobe abzüglich Probanden mit hypolipidämischer Medikation

Tab. A18: Lipid- und Glucose-Serumspiegel zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)

	Gesamtkollektiv	Verum	Placebo	<i>p</i>
TC_T0 [mmol/l]	6,14 \pm 1,28 (n=86) ⁺	6,08 \pm 1,36 (n=48) ⁺	6,22 \pm 1,18 (n=38) ⁺	0,623 ^a
TC_T6 [mmol/l]	6,07 \pm 1,21 (n=86) ⁺	5,99 \pm 1,25 (n=48) ⁺	6,16 \pm 1,16 (n=38) ⁺	0,528 ^a
<i>p</i>^b	0,393	0,455	0,662	
TC_T6-T0 [mmol/l]	-0,08 \pm 0,83 (n=86) ⁺	-0,09 \pm 0,82 (n=48) ⁺	-0,06 \pm 0,85 (n=38) ⁺	0,873 ^a
HDL_T0 [mmol/l]	1,43 \pm 0,42 (n=86) ⁺	1,41 \pm 0,37 (n=48) ⁺	1,45 \pm 0,48 (n=38) ⁺	0,705 ^a
HDL_T6 [mmol/l]	1,45 \pm 0,42 (n=86) ⁺	1,43 \pm 0,36 (n=48) ⁺	1,47 \pm 0,48 (n=38) ⁺	0,731 ^a
<i>p</i>^b	0,419	0,464	0,669	
HDL_T6-T0 [mmol/l]	0,02 \pm 0,25 (n=86) ⁺	0,02 \pm 0,22 (n=48) ⁺	-0,06 \pm 0,85 (n=38) ⁺	0,951 ^a
LDL_T0 [mmol/l]	4,08 \pm 0,94 (n=86) ⁺	4,10 \pm 1,02 (n=48) ⁺	4,07 \pm 0,84 (n=38) ⁺	0,894 ^a
LDL_T6 [mmol/l]	3,96 \pm 0,87 (n=86) ⁺	3,96 \pm 0,86 (n=48) ⁺	3,96 \pm 0,70 (n=38) ⁺	0,977 ^a
<i>p</i>^b	0,072	0,128	0,315	
LDL_T6-T0 [mmol/l]	-0,12 \pm 0,63 (n=86) ⁺	-0,13 \pm 0,60 (n=48) ⁺	-0,11 \pm 0,67 (n=38) ⁺	0,873 ^a
TG_T0 [mmol/l]	2,01 \pm 1,17 (n=86) ⁺	1,90 \pm 0,91 (n=48) ⁺	2,16 \pm 1,43 (n=38) ⁺	0,313 ^a
TG_T6 [mmol/l]	2,01 \pm 1,33 (n=86) ⁺	1,81 \pm 0,91 (n=48) ⁺	2,27 \pm 1,70 (n=38) ⁺	0,137 ^c
<i>p</i>	0,988 ^d	0,531 ^b	0,499 ^b	
TG_T6-T0 [mmol/l]	0,00 \pm 1,01 (n=86) ⁺	-0,09 \pm 1,01 (n=48) ⁺	0,11 \pm 1,02 (n=38) ⁺	0,355 ^a
Glucose_T0 [mmol/l]	6,12 \pm 1,14 (n=101) [#]	6,07 \pm 1,22 (n=52) [#]	6,17 \pm 1,05 (n=49) [#]	0,343 ^c
Glucose_T6 [mmol/l]	6,21 \pm 0,96 (n=101) [#]	6,16 \pm 0,99 (n=52) [#]	6,27 \pm 0,94 (n=49) [#]	0,570 ^a
<i>p</i>	0,033^d	0,461 ^b	0,231 ^b	
Glucose_T6-T0 [mmol/l]	0,09 \pm 0,73 (n=101) [#]	0,09 \pm 0,86 (n=52) [#]	0,10 \pm 0,57 (n=49) [#]	0,948 ^a

⁺ Gesamtstichprobe abzüglich Probanden mit hypolipidämischer Medikation, [#] Gesamtstichprobe abzüglich Probanden mit antiglykämischer Medikation

^a t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

^c Mann-Whitney-U-Test, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^d Wilcoxon-Test, bezogen auf T0 und T6

Tab. A19: Vergleich der B-Vitaminspiegel* des Gesamtkollektivs zu T0 mit den nach Geschlecht angegebenen Mittelwerten (\pm SD) der *EPIC-Potsdam*-Subkohorte [DROGAN et al. 2004]

	Gesamtkollektiv		EPIC-Potsdam	
	m	w	m (n=203)	w (n=160)
S-Folat [nmol/l]	23,4 \pm 11,0 (n=66)	25,8 \pm 15,1 (n=56)	17,3 \pm 5,3	18,4 \pm 6,2
E-Folat [μ mol/l]	0,95 \pm 0,36 (n=66)	0,95 \pm 0,42 (n=56)	0,77 \pm 0,25	0,76 \pm 0,25
Cbl [pmol/l]	252 \pm 66,7 (n=67)	314 \pm 146 (n=56)	237 \pm 85	256 \pm 113
PLP [nmol/l]	48,7 \pm 30,9 (n=67)	34,7 \pm 19,1 (n=56)	46,8 \pm 29,5	40,7 \pm 35,0

* Die grau unterlegten Felder entsprechen den jeweils höheren B-Vitaminkonzentrationen.

Tab. A20: oxLDL/LDL-Quotient zu T0 und T6 sowie absolute T6-T0-Differenzen in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs (Mittelwert \pm SD)

	Gesamtkollektiv (n=73)	Verum (n=40)	Placebo (n=33)	p^a
oxLDL/LDL_T0 [U/mmol]	17,6 \pm 3,34	17,1 \pm 3,05	18,3 \pm 3,58	0,106
oxLDL/LDL_T6 [U/mmol]	16,2 \pm 3,44	15,5 \pm 2,70	17,0 \pm 4,07	0,081
p^b	<0,001	0,001	0,022	
oxLDL/LDL_T6-T0 [U/mmol]	-1,47 \pm 2,97	-1,56 \pm 2,76	-1,32 \pm 3,24	0,774

^a t-Test für unabhängige Stichproben, bezogen auf Verum- und Placebogruppe

^b t-Test für abhängige Stichproben, bezogen auf T0 und T6

ANHANG C: ANALYSEMETHODEN

Bestimmung von ADMA und SDMA	C2
Bestimmung von L-Arginin (L-Arg)	C2
Bestimmung von Homocystein (tHcy)	C2
Bestimmung von Folat (S-Folat/E-Folat)	C3
Bestimmung von Cobalamin (Cbl).....	C4
Bestimmung von Pyridoxalphosphat (PLP)	C4
Bestimmung von oxidiertem LDL (oxLDL).....	C4
Bestimmung der antioxidativen Kapazität (TEAC-Test).....	C5
Bestimmung von α -Tocopherol (AT)	C6
Bestimmung von Creatinin.....	C6
Bestimmung von Harnsäure.....	C6
Bestimmung von Gesamt-Cholesterol (TC).....	C7
Bestimmung von HDL-Cholesterol (HDL).....	C7
Bestimmung von LDL-Cholesterol (LDL).....	C8
Bestimmung von Triglyceriden (TG).....	C8
Bestimmung von Glucose	C9
Bestimmung des C677T-MTHFR-Polymorphismus.....	C9

Bestimmung von ADMA und SDMA

Die Plasmakonzentration der dimethylierten L-Arginin-Analoga ADMA und SDMA wurde mittels eines HPLC-ESI-MS/MS-Verfahrens analysiert, welches anlässlich der Kooperation mit dem Medizinischen Labor Bremen (MLHB, Bremen) durch selbiges etabliert und validiert wurde [KIRCHHERR U. KÜHN-VELTEN 2005]. Methodenprinzip: In einem Vorbehandlungsschritt werden die zu untersuchenden Proben zunächst mit Fällungsreagenz (Acetonitril-Methanol, 9:1) und einem Isotop-markierten internen Standard (d_3 -Leucin) versetzt und mittels Zentrifugation gereinigt. Der enteweißte und mit aqua dest. verdünnte Überstand wird unter Verwendung einer Graphit-Spezialsäule (*Hypercarb*, Thermo Electron; 50 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 μm) chromatographisch aufgetrennt. Zur anschließenden Elution wird eine wässrige Acetonitril-/Trifluoressigsäurelösung unter Aufbau eines linearen Acetonitril-Gradienten (5-20% innerhalb 3 min, Flow 0,8 ml/min) eingesetzt. Die Detektion der im Eluat enthaltenen Analyte, die mittels Elektronen-Spray-Ionisation (3,0 kV, 500°C) in positiv geladene Ionen-Fragmente überführt werden, erfolgt im Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (*API 4000*, Applied Biosystems/MDS Sciex) unter Zugrundelegung der Retentionszeit und des Masse-/Ladungsverhältnis (m/z) [weiterführende Details vgl. KIRCHHERR U. KÜHN-VELTEN 2005].

Bestimmung von L-Arginin (L-Arg)

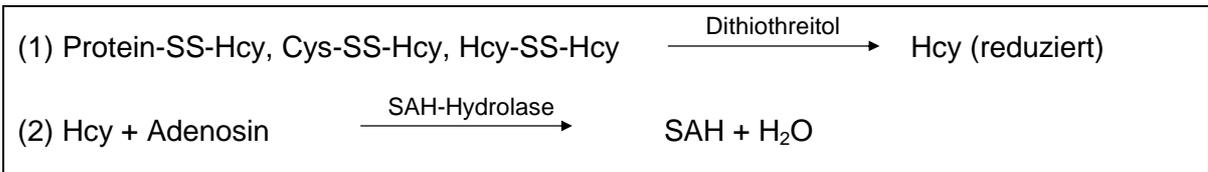
Die quantitative Bestimmung von L-Arginin (L-Arg) im Plasma wurde ebenfalls unter Anwendung eines HPLC-ESI-MS/MS-Verfahrens durchgeführt (separater Analysegang zur o. g. Methode). Methodenprinzip: Die Ausfällung der Proteinfraction erfolgt durch Zugabe von Sulfosalicylsäure (10%) nach Zusatz der internen Standards (d_3 -Phenylalanin, ^{15}N -Lysin). Der durch Zentrifugation gewonnene und mit mobiler Phase (Methanol-Essigsäure, 70:30) verdünnte Überstand wird unter isokratischen Bedingungen separiert (Säule: *Luna CN*, Phenomenex; 100 x 2 mm, Partikelgröße 5 μm) und der eluierte Analyt mittels ESI-MS-MS (*API 2000*, Applied Biosystems/MDS Sciex), ähnlich dem für die Dimethylarginine beschriebenen Verfahren, detektiert [KÜHN-VELTEN 2005a].

Bestimmung von Homocystein (tHcy)

Homocystein wurde als Gesamt-Homocystein (tHcy)⁹⁴ im Plasma unter Verwendung eines vollautomatisierten Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays (*AxSYM® Homocystein*, Nr. 36-6024/R4, Abbott Laboratories 2003, Wiesbaden) erfasst. Methodenprinzip: Gebundenes

⁹⁴ Die tHcy-Fraktion umfasst die Summe aller Homocystein-Varianten, die sich aus der proteingebundenen Form (Protein-SS-Hcy, 70-90 %) und dem frei zirkulierenden Anteil aus Homocystin (Hcy-SS-Hcy, 5-10 %), gemischten Disulfiden mit Cystein (Cys-SS-Hcy, 5-10 %) sowie geringen Mengen an reduziertem Hcy (< 2 %) zusammensetzt [UBBINK 2000, STANGER 2004, S 149].

(oxidiertes) Hcy wird zunächst in freies (reduziertes) Hcy überführt (1), welches durch enzymatische Konversion zu S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) umgesetzt wird (2):



Der Probenansatz wird mit anti-SAH-Antikörper-Reagenz und S-Adenosyl-L-Cystein-Fluoreszein-Tracer-Lösung versetzt, wobei SAH und der markierte Fluoreszein-Tracer um die Bindungsstellen am Antikörper konkurrieren. Der Polarisationsgrad des emittierten Lichts, der mit zunehmender Bindung des Tracers steigt, wird über das optische Messsystem des AxSYM®-Analysegeräts erfasst, woraus dieses den SAH-Gehalt der Probe berechnet.

Bestimmung von Folat (S-Folat/E-Folat)

Für die Analyse des Folatgehalts in Serum (S-Folat) und Erythrozyten (E-Folat) wurde ein vollautomatisierter Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (*Folat Elecsys® Test*, Nr. 03253678, Roche Diagnostics 2003-05, Mannheim) eingesetzt. Methodenprinzip: Das Testverfahren beruht auf der Konkurrenz zwischen dem in der Probe (Serum bzw. Vollblut-Hämolyt) enthaltenen Folat und exogen zugefügtem biotiniliertem Folat an einem markierten⁹⁵ Folatbindungsprotein. Mit Ausnahme der zur Vorbehandlung verwendeten Reagenzien (hier: Monothioglycerin, NaOH), handelt es sich um ein zur Cbl-Bestimmung analoges Analyseverfahren, das nachfolgend näher erläutert wird (s. u.).

Zur Herstellung des für die Bestimmung von E-Folat erforderlichen Hämolytats wird EDTA-Vollblut mit einer gebrauchsfertigen Ascorbinsäurelösung (*RBC Folate Hemolyzing Reagent*, Nr. 12017741, Roche Diagnostics 2002-11, Mannheim) verdünnt und 90 min bei 20-25°C inkubiert (Erythrozytenlyse und Stabilisierung des freigesetzten Folats). Die automatisierte Berechnung der E-Folatkonzentration erfolgt unter Berücksichtigung des aus jeder Vollblutprobe vorab bestimmten Hämatokrits (HK) einschließlich der durch die Vorbehandlung entstandenen Verdünnung nach folgender Formel:

$$\text{E-Folat} = \frac{\text{Konz. Folat} \times 31}{\% \text{ HK}} \times 100$$

Bei Proben mit niedriger E-Folat- und zugleich hoher S-Folatkonzentration werden die Werte durch eine zusätzliche Serumkorrektur automatisch vom System bereinigt.

⁹⁵ Markierung mit Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-Komplex

Bestimmung von Cobalamin (Cbl)

Die quantitative Bestimmung von Cobalamin (Cbl) im Serum wurde unter Verwendung eines vollautomatisierten Elektrochemilumineszenz-Immunoassays (*Vitamin B₁₂ Elecsys®-Test*, Nr. 11820753, Roche Diagnostics 2003-02, Mannheim) durchgeführt. Methodenprinzip: Der *in vitro* Bindungstest basiert auf einem kompetitiven Testprinzip, bei dem das aus endogenen Bindungsproteinen freigesetzte Cbl (Probenvorbehandlung mit Dithiothreitol, NaOH, NaCN) mit einem markierten⁹⁶ Intrinsic Faktor (IF) Komplexe ausbildet, deren Konzentration von der des Analyten abhängt. Die nicht-besetzten IF-Bindungsstellen werden durch anschließende Inkubation mit biotinyliertem Cbl abgesättigt und die so entstandenen Cbl-Biotin-IF-Komplexe über Streptavidin-beschichtete Mikropartikel an die Festphase gebunden. Der auf diese Weise vorbehandelte Ansatz wird anschließend in die Messzelle des zum Assay kompatiblen Analysegeräts (*Elecsys® Systeme 2010, MODULAR ANALYTICS E170*, Roche Diagnostics, Mannheim) überführt und die Chemilumineszenzemission der an die Elektrode fixierten Mikropartikel nach Anlegen einer Spannung detektiert. Der Cbl-Gehalt der Probe wird anhand einer Kalibrierungskurve ermittelt und automatisch vom System berechnet.

Bestimmung von Pyridoxalphosphat (PLP)

Die Messung der PLP-Plasmakonzentration erfolgte nach einer von KIMURA et al. [1996] beschriebenen RP-HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion. Methodenprinzip: Die Proben werden zunächst mit Perchlorsäure (0,8 M) versetzt und elutionsfähige Nicht-PLP-Plasmabestandteile mittels Zentrifugation abgetrennt. Derivatisierung und isokratische Elution (Flow 0,5 ml/min, Chromatograph: *HP 1090 Liquid Chromatograph*, Agilent, Ratingen) erfolgen an einer C18-Trennsäule unter Verwendung einer sauren (pH 4) Phosphatpufferlösung, der Natriumperchlorat sowie Natriumdisulfit (Derivatisierungsdetergenz) zugesetzt werden. Der PLP-Gehalt des Eluats wird fluorometrisch (Fluoreszenz Detektor *HP 1046*, Agilent, Ratingen; Anregung 300 nm, Emission 400 nm) durch den Vergleich mit einer Standardkalibrierungskurve ermittelt.

Bestimmung von oxidiertem LDL (oxLDL)

Die Analyse der oxLDL-Serumkonzentration erfolgte mit Hilfe eines kompetitiven ELISA Kit (*Mercodia Oxidized LDL Competitive ELISA*, Nr. 10-1158-01, Mercodia AB 2004, Uppsala, Schweden). Methodenprinzip: Der Assay beruht auf einer von HOLVOET et al. [1998; 2001] entwickelten Methode, die einen monoklonalen Antikörper (Biotin-mAb-4E6) mit LDL-spezifischer Ausrichtung gegen oxidativ modifizierte Apo-B₁₀₀-Moleküle (Epitop: Aldehydsubstituierte Lysinreste) benutzt. Hierzu werden mit human-oxLDL-beschichtete Mikrotiter-

⁹⁶ Markierung mit Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-Komplex

platten zunächst mit verdünntem Serum, Kalibratorlösung und Antikörperreagenz inkubiert, wobei das oxLDL in der Probe mit den an der Platte fixierten oxLDL-Partikeln um die Bindungsstellen am Antikörper konkurriert. Nicht-reaktive Serumbestandteile werden durch mehrmaliges Waschen aus dem Ansatz entfernt und die an die oxLDL-Festphase gebundenen biotinylierten mAb-4E6-Moleküle durch Inkubation mit einer Peroxidase-konjugierten Streptavidinlösung identifiziert. Die Detektion des gebundenen Enzym-Konjugats erfolgt durch Chromogen-Zugabe⁹⁷ und Stoppen der Farbreaktion mittels Säurezusatz (H₂SO₄) bei $\lambda=450$ nm. Die Angabe des oxLDL-Gehalts der Probe erfolgt in U/l. Nach Aussage des Herstellers handelt es sich hierbei um eine methodenspezifische Einheit, die auf der Kalibrierung des Assays mit einem Referenzstandard für *in-vivo*-modifiziertes oxLDL beruht [MERCODIA 2009]⁹⁸.

Bestimmung der antioxidativen Kapazität (TEAC-Test)

Zur Erfassung des Gesamt-Antioxidanzienstatus wurde der Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Test (TEAC-Test) nach einer modifizierten Methode von RE et al. [1999] verwendet. Die TEAC ist definiert als Konzentration von Trolox⁹⁹ in mmol/l, die eine vergleichbare antioxidative Kapazität wie eine 1 mM Lösung der zu untersuchenden Probe (hier: Plasma) hat [MILLER et al. 1993]. Methodenprinzip: Der TEAC-Test – auch als ABTS Radical Cation Decolorization Assay bezeichnet – beruht auf dem kolorimetrischen Nachweis der Reduktion des Radikalkations ABTS^{•+}¹⁰⁰ durch im Plasma vorhandene Antioxidanzien. Zur Bildung der Radikalverbindung wird ABTS-Reagenz zunächst mit Kaliumpersulfat-Lösung versetzt (1:100) und für 12-16 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird die ABTS^{•+}-Lösung mit PBS-Puffer (pH 7,4) bis zu einer stabilen Absorption von $0,70 \pm 0,02$ bei $\lambda=734$ nm verdünnt und die Reaktion durch Zugabe der ABTS^{•+}-Lösung in eine mit Plasma befüllte Mikrotiterplatte gestartet. Der Entfärbungsgrad der Lösung, bedingt durch die Reduktion des blau-grün gefärbten ABTS^{•+}-Radikals zur farblosen Ausgangssubstanz wird im UV/VIS-Spektrometer (*Lambda Bio 20*, Perkin Elmer, Wellesley MA, USA) bei $\lambda=734$ nm ermittelt. Die Berechnung der TEAC-Werte erfolgt durch den Vergleich mit einer Trolox-Standardlösung in $\mu\text{mol/l}$ Trolox-Äquivalent.

⁹⁷ 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

⁹⁸ In diesem Fall handelt es somit nicht um die für die Enzymaktivität verwendete Einheit U/l.

⁹⁹ hydrophiles Vitamin E-Derivat (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure)

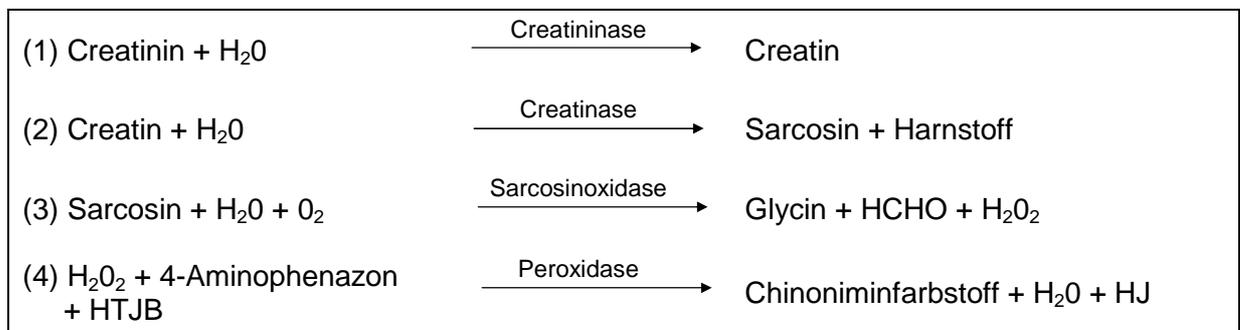
¹⁰⁰ 2,2'-Azinobis-[3-ethylbenzothiazolin-6-sulphonsäure]

Bestimmung von α -Tocopherol (AT)

Für die Bestimmung von α -Tocopherol (AT) im Serum wurde ein RP-HPLC-Verfahren mit anschließender UV-VIS-Detektion in Anlehnung an die Methode von CATIGNANI U. BIERI [1983] durchgeführt. Methodenprinzip: Die Proben werden zunächst mit Isopropanol-Lösung (2:1) versetzt, zentrifugiert und die im entweißten Überstand enthaltene Tocopherolfraction an RP-Material isokratisch getrennt (Säule: *ProntoSIL 120-5 C18*, Bischoff Chromatography, Leonberg; Eluent: Methanol/Wasser). Die Messung der UV-Absorption erfolgt bei $\lambda=280$ nm (*L-4250 UV-VIS-Detektor*, Merck-Hitachi). Die AT-Serumgehalte werden anhand einer Kalibrationsgeraden berechnet, die mit der zugesetzten Standardlösung (DL- α -Tocopherol) aufgenommen wird [KÜHN-VELTEN 2005b].

Bestimmung von Creatinin

Der Creatinin-Serumspiegel wurde mit Hilfe eines enzymatischen Farbtests (*CREA plus*, Roche Diagnostics 2000-12, Mannheim) ermittelt. Methodenprinzip: Der vollautomatisierte *in vitro* Assay basiert auf der Bildung von Sarcosin durch enzymatische Hydrolyse von Creatinin bzw. Creatin (1-2) und anschließender Oxidation von Sarcosin unter Bildung von H_2O_2 (3). Das entstandene H_2O_2 wird über eine modifizierte Trinder-Reaktion unter Verwendung von 4-Aminophenazon und HTJB¹⁰¹ zu einem Chinoniminfarbstoff umgesetzt (4), dessen Farbintensität direkt proportional zur Creatininkonzentration ist und UV-metrisch erfasst wird.

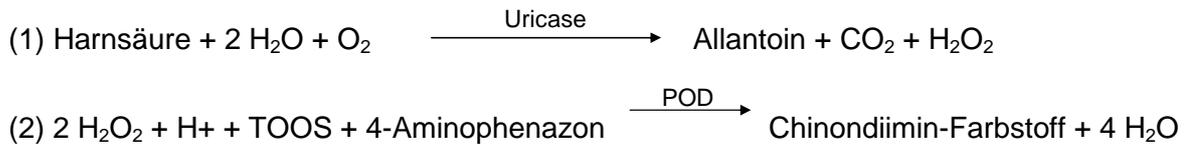


Bestimmung von Harnsäure

Zur quantitativen Bestimmung von Harnsäure im Serum kam ein vollautomatisierter, enzymatischer Farbttest (*UA plus*, Roche Diagnostics, Mannheim) zum Einsatz. Methodenprinzip: In einem Vorbehandlungsschritt wird zunächst die in der Probe enthaltene Ascorbinsäure eliminiert (Reagenz: Ascorbatoxidase), um Störeinflüsse auf die nachfolgende Indikatorreaktion auszuschließen. Diese beruht auf der Oxidation von Harnsäure durch das Enzym Uricase (1). Unter der katalytischen Wirkung der Peroxidase bildet das entstandene

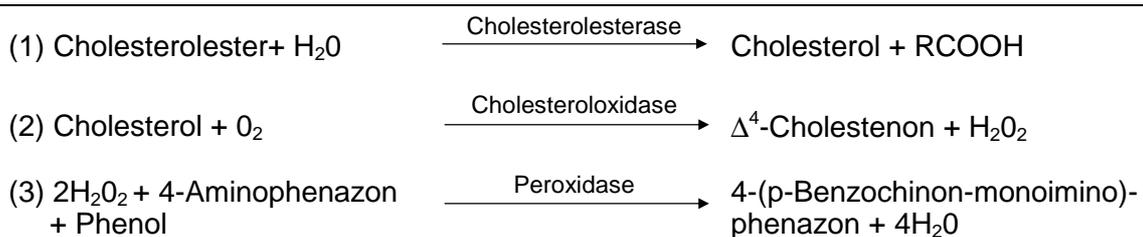
¹⁰¹ 2,4,6-Trijod-3-hydroxybenzoesäure

H_2O_2 mit 4-Aminophenazon und TOOS^{102} einen roten Chinondiimin-Farbstoff (2), dessen Farbintensität ($\lambda = 546 \text{ nm}$) direkt proportional zur Harnsäurekonzentration im Ansatz ist.



Bestimmung von Gesamt-Cholesterol (TC)

Die Bestimmung der TC-Serumspiegel erfolgte mit Hilfe der CHOD-PAP-Methode unter Verwendung von *CHOL*-Testreagenz (Roche Diagnostics 2003-07, Mannheim). Methodenprinzip: Der Farbtest basiert auf der enzymatischen Hydrolyse der Cholesterolester (1) und anschließender Oxidation von Cholesterol unter Bildung von H_2O_2 (2). Das entstandene H_2O_2 wird mittels 4-Aminophenazon und Phenol unter Peroxidase-Katalyse zum photometrisch messbaren Chromophor umgesetzt (Trinder-Reaktion, Schritt 3). Der gebildete rote Chinonimin-Farbstoff ($\lambda=500\text{-}550 \text{ nm}$) steht in stöchiometrischer Beziehung zum TC-Gehalt der Probe, der mittels Kalibrierung bestimmt wird.



Bestimmung von HDL-Cholesterol (HDL)

Zur Messung der HDL-Serumkonzentration wurde ein enzymatischer Farbtest nach vorausgegangener selektiver Immunoinhibition (*HDL-C L-Typ*, Wako Chemicals, Neuss) durchgeführt. Methodenprinzip: Das Testverfahren beruht auf der Bindung von Anti-Human- β -Lipoprotein-Antikörpern an Nicht-HDL-Lipoproteine (Chylomikronen, VLDL, LDL), deren enzymatischer Abbau durch die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen blockiert wird. In Analogie zur TC-Bestimmung (s. o.) wird das im Serum vorhandene HDL nach Zugabe von Cholesterolesterase und Cholesteroxidase selektiv hydrolysiert bzw. oxidiert. Das dabei gebildete H_2O_2 wird in einer Peroxidase-katalysierten Oxidation mit 4-Aminoantipyrin und dem Trinder-Reagenz¹⁰³ zu einem blauen Farbkomplex umgesetzt. Die Absorption des Chromophors wird bei $\lambda=593 \text{ nm}$ gemessen und die HDL-Konzentration der Probe durch Kalibrierung ermittelt.

¹⁰² N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylanilin

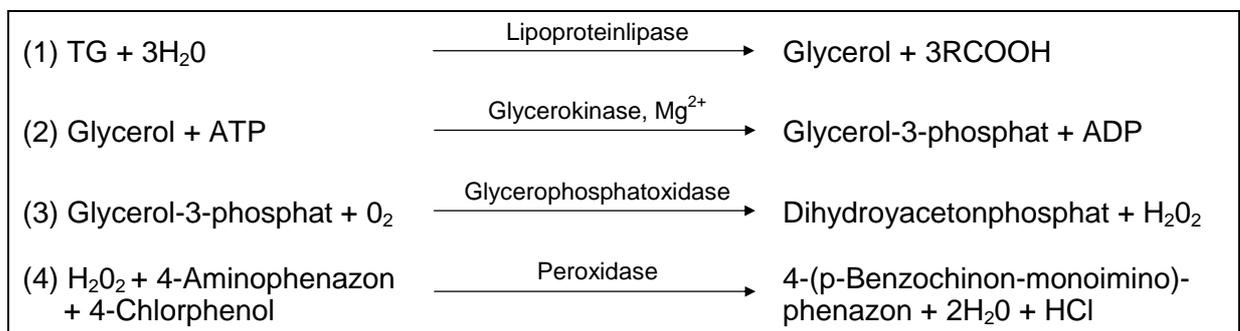
¹⁰³ N-Ethyl-N-[2-hydroxy-3-sulfopropyl]-3,5-dimethoxy-4-fluoranilin

Bestimmung von LDL-Cholesterol (LDL)

Der LDL-Serumspiegel wurde durch einen enzymatischen Farbttest nach selektiver Maskierung bestimmt (*LDL-C L-Type*, Wako Chemicals, Neuss). Methodenprinzip: Die Probe wird zunächst mit Enzymreagenz (Cholesterolesterase, Cholesteroxidase) versetzt, dem ein LDL-spezifisches Maskierungsreagenz beigelegt wurde. Letzteres bindet an LDL und schützt es so vor enzymatischen Reaktionen. Das aus dem Abbau der Nicht-LDL-Fraktion anfallende H_2O_2 wird durch eine im Reagenz enthaltene Katalase zu H_2O umgesetzt. Durch Zugabe eines Deprotecting-Reagenz wird das Maskierungsreagenz von den LDL-Partikeln entfernt und die Katalase durch enthaltenes NaN_3 inaktiviert. In diesem zweiten Schritt wird das demaskierte LDL nun vollständig durch Cholesterolesterase und Cholesteroxidase umgesetzt. In Gegenwart einer Peroxidase vermittelt das durch die Enzymreaktion aus LDL gebildete H_2O_2 die Reaktion zwischen 4-Aminoantipyrin und dem Trinder-Reagenz¹⁰⁴ zu einem blauen Farbkomplex, dessen Konzentration UV-metrisch ($\lambda=600$ nm) bestimmt wird. Die Ermittlung des LDL-Gehalts der Probe erfolgt durch den Vergleich mit der Absorption des LDL-Kalibrators.

Bestimmung von Triglyceriden (TG)

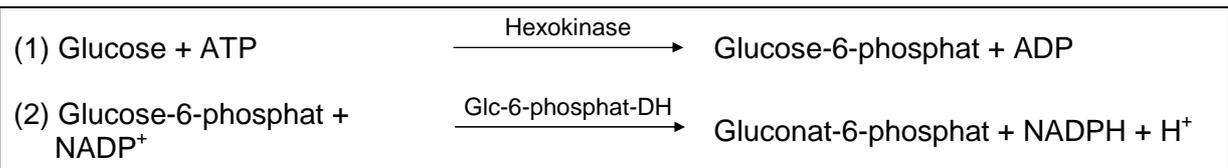
Die Bestimmung der TG-Serumkonzentration erfolgte durch das GPO-PAP-Verfahren unter Verwendung von TG-Testreagenz (Roche Diagnostics 2003-09, Mannheim). Methodenprinzip: Der enzymatische Farbttest beruht auf der Hydrolyse der TG-Fraktion zu Glycerol und freien Fettsäuren (1), Phosphorylierung von Glycerol (2) und anschließender Oxidation von Glycerol-3-phosphat zu Dihydroxyacetonphosphat und H_2O_2 (3). Die in Reaktionsschritt 4 dargestellte Kopplungsreaktion nach Trinder führt zur Bildung des roten Chinonimin-Farbkomplex ($\lambda=500-550$ nm), dessen Konzentration direkt proportional zum TG-Gehalt im Ansatz ist.



¹⁰⁴ N-(2-Hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyanilin

Bestimmung von Glucose

Zur Analyse der Glucose-Serumkonzentration wurde die Hexokinase-Methode unter Anwendung eines *in vitro* Assays (*Gluco-quant*®, Roche Diagnostics 2004-03, Mannheim) eingesetzt. Methodenprinzip: Die Bestimmung basiert auf der Hexokinase-katalysierten Phosphorylierung von Glucose (1) und anschließender Oxidation von Glucose-6-phosphat in Anwesenheit von NADP⁺ (2). Die Geschwindigkeit der NADPH-Zunahme verhält sich direkt proportional zur Glucosekonzentration im Probenansatz und wird photometrisch durch Messung der Extinktionszunahme ($\lambda=334/340/365$ nm) ermittelt.



Bestimmung des C677T-MTHFR-Polymorphismus

Die molekulargenetische Analyse der C677T-Mutation im Gen der 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) erfolgte mittels RFLP-PCR nach Hinf I Digestion [Verfahren nach BOYD et al. 2001]. Als Probenmaterial diente die institutsintern aufbereitete Zell-Lysat-Lösung (vgl. Kap. 4.1.5.2), aus der genomische DNA unter Verwendung des dabei eingesetzten Extraktions-Kit extern (Institut für Ernährungsphysiologie, BFEL, Karlsruhe) isoliert wurde. Reinheit und Konzentration des Isolats wurden UV-metrisch bei $\lambda=260/280$ nm überprüft. Methodenprinzip: Für die Genotypisierung wird der zu untersuchende Genabschnitt zunächst mittels PCR amplifiziert (*Thermocycler PTC-200*, MJ Research, Waltham MA, USA) und die auf dem Amplifikat (Länge: 198 bp) vorhandenen Mutationen durch Inkubation (37°C/2h) mit dem Restriktionsenzym Hinf I in Fragmente mit Längen von 175 bp und 23 bp überführt¹⁰⁵. Die generierten Restriktionsfragmente werden anschließend mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (3,0% TBE Standard Agarose) getrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht (Emission $\lambda=520$ nm). Die Auswertung der gefärbten Banden erfolgt mittels eines computergestützten Bildaufnahme- und Verarbeitungssystems (*FluorS Multi-Imager*, *QuantityOne Software Vers. 4,01*, BioRad, München) anhand mitgelaufener DNA-Längenstandards. Die Identifizierung der jeweiligen Genotypen resultiert aus folgenden Bandenmustern:

677CC (homozygoter Wildtyp):	198 bp
677CT (heterozygote Mutation):	198 bp, 175 bp, 23 bp
677TT (homozygote Mutation):	175 bp, 23 bp

¹⁰⁵ Die Endonuclease Hinf I schneidet ausschließlich mutierte Allel-Sequenzen (T677), während das Amplifikat beim Wildtyp (C677) unverändert bleibt.

ANHANG D: UMRECHNUNGSFAKTOREN

Tab. A21: In der vorliegenden Arbeit verwendete Faktoren für die Umrechnung der in der klinischen Diagnostik vielfach gebräuchlichen Massenkonzentration in die molare Konzentration (SI-Einheit)

Substanz	Massenkonz.	x Faktor	= Stoffmengenkonz.
ADMA	µg/l	x 0,00495	= µmol/l
SDMA	µg/l	x 0,00493	= µmol/l
L-Arg	mg/dl	x 57,41	= µmol/l
tHcy	mg/l	x 7,41	= µmol/l
S-Folat/E-Folat	µg/ml	x 2,266	= nmol/l
Cbl	pg/ml	x 0,738	= pmol/l
PLP	µg/l	x 4,046	= nmol/l
α-Tocopherol	mg/l	x 2,322	= µmol/l
Cholesterol (TC, HDL, LDL)	mg/dl	x 0,02586	= mmol/l
TG (M _r =875)	mg/dl	x 0,0114	= mmol/l
Glucose	mg/dl	x 0,05551	= mmol/l
Creatinin	mg/dl	x 88,402	= µmol/l
Harnsäure	mg/dl	x 59,5	= µmol/l

ANHANG E: QUALITATIVER VITAMINVERSORGUNGSSTATUS

Qualitative Folatversorgung vor und nach der Intervention	E2
Qualitative Cobalaminversorgung vor und nach der Intervention	E3
Qualitative Vitamin-B ₆ -Versorgung vor und nach der Intervention.....	E4
Zusammenfassende Darstellung zum qualitativen B-Vitaminversorgungstatus vor der Intervention.....	E6
Qualitative α -Tocopherolversorgung vor und nach der Intervention	E6
Zusammenfassende Darstellung zum qualitativen α -Tocopherolversorgung vor der Intervention.....	E7

Qualitative Folatversorgung vor und nach der Intervention

Zur Charakterisierung der Folatversorgung existieren in der Literatur verschiedene Referenzwerte, wobei vorwiegend **Untergrenzen zur Mangelvermeidung** aufgrund fehlender klinischer und hämatologischer Symptomatik angegeben werden. Wurden für eine qualitative Beurteilung zunächst diese cut-off-Werte herangezogen, so zeigte sich bereits zu Beginn der Intervention eine gute Versorgungslage des Kollektivs: Mit einem durchschnittlichen T0-Wert von $24,5 \pm 13,0$ nmol/l ($5,9-85,4$ nmol/l) im Gesamtkollektiv wurde die für S-Folat definierte Untergrenze von $\geq 7,0$ nmol/l [SAUBERLICH et al. 1987; INSTITUTE OF MEDICINE 1998, S. 9-6; ERHARDT 2002a, S. 682] lediglich von einem Teilnehmer (0,8%) mit Zugehörigkeit zur Verumgruppe nicht erreicht. Einen adäquaten E-Folatstatus, definiert durch einen cut-off von $\geq 0,32$ μ mol/l [BLOUNT et al. 1997; INSTITUTE OF MEDICINE 1998, S. 8-4; ERHARDT 2002a, S. 682], wiesen demgegenüber ausnahmslos alle Probanden (T0: $0,95 \pm 0,38$ μ mol, Min-Max: $0,39-2,40$ μ mol/l) auf. Bedingt durch die zum Zeitpunkt T6 im Mittel weitaus höheren S-Folat ($57,3 \pm 35,4$ nmol/l, Min-Max: $9,1-123$ nmol/l) und E-Folat-Spiegel ($2,46 \pm 1,21$ μ mol/l, Min-Max: $0,64-5,38$ μ mol/l) des Gesamtkollektivs, ließ sich auch hier kein Absinken unter die jeweiligen Grenzwerte feststellen.

Ein differenzierteres Bild ergab sich, wenn die **zur Minimierung des tHcy-Plasmaspiegels als ausreichend erachteten Folatkonzentrationen** zugrunde gelegt wurden, für die PIETRZIK U. BRÖNSTRUP [1998] nahezu doppelt so hohe cut-off-Werte (S-Folat ≥ 20 nmol/l, E-Folat $0,5-0,6$ μ mol/l) ermittelten. Danach wies mit 52,5% ($n=64$) etwas mehr als die Hälfte des Gesamtkollektivs eine in Hinblick auf Homocystein suboptimale S-Folat-Konzentration (<20 nmol/l) auf. Für E-Folat war dieser Anteil mit 2,5% ($n=3$, E-Folat $<0,5$ μ mol/l) bzw. 10,7% ($n=13$, E-Folat $<0,6$ μ mol/l) weitaus geringer. Die Interventionsgruppen Verum und Placebo unterschieden sich trotz der insgesamt höheren Prävalenzzahlen in der Verumgruppe nicht signifikant voneinander (vgl. Tab. A22).

Zu T6 verringerte sich der Anteil des Gesamtkollektivs mit S-Folat-Spiegeln <20 nmol/l auf 18,5% ($n=22$). Dabei wurde der zur Homocystein-Senkung veranschlagte Mindestwert signifikant häufiger von Probanden der Placebogruppe unterschritten (38,8% vs. 1,6% in der Verumgruppe, $p<0,001$, vgl. Tab. A22). Hierbei zeigte sich allerdings auch, dass trotz der Konstanz der mittleren S-Folat-Werte im Studienverlauf eine entsprechende Abnahme suboptimal versorgter Personen innerhalb der Placebogruppe verzeichnet wurde. Entsprechende Unterschreitungen des für E-Folat definierten Konzentrationsbereiches von $0,5-0,6$ μ mol/l ließen sich demgegenüber in keiner der beiden Untersuchungsgruppen nachweisen. In Übereinstimmung zu den vorab durchgeführten Auswertungen weist dies auf einen überdurchschnittlich guten E-Folatstatus des Studienkollektivs – unabhängig vom Interventionszeitpunkt und -regime – hin.

Tab. A22: Prävalenz eines suboptimalen Folatversorgungsstatus zu T0 und T6 auf Basis der zur Homocystein-Minimierung nach PIETRZIK U. BRÖNSTRUP [1998] als wünschenswert erachteten S-Folat- und E-Folat-Spiegel in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs

Folat-cut-off	Verum (n=65*)		Placebo (n=57)		p
	n	%	n	%	
T0 S-Folat <20 nmol/l	37	56,9	27	47,4	0,292 ^a
E-Folat <0,5 µmol/l	2	3,1	1	1,8	1,000 ^b
E-Folat <0,6 µmol/l	10	15,4	3	5,3	0,071 ^a
T6 S-Folat <20 nmol/l	1	1,6	21	36,8	<0,001^a
E-Folat <0,5 µmol/l	--	--	--	--	--
E-Folat <0,6 µmol/l	--	--	--	--	--

* entspricht T0; T6: S-Folat n=62, E-Folat n=58

^a Chi²-Test, bezogen auf die Verteilung zwischen Verum- und Placebogruppe

^b Exakter Test nach Fisher, bezogen auf die Verteilung zwischen Verum- und Placebogruppe

Qualitative Cobalaminversorgung vor und nach der Intervention

Um eine Aussage darüber treffen zu können, inwieweit die im Zeitverlauf unter Kap. 4.2.2.3 beschriebenen Veränderungen der Cbl-Serumwerte beider Gruppen mit qualitativen Versorgungsunterschieden einhergingen, wurden als Beurteilungsgrundlage die **zur Minimierung des tHcy- und Methylmalonsäure¹⁰⁶-Spiegels** von LINDENBAUM et al. [1994] sowie anderen Arbeitsgruppen [YAO et al. 1992; RAJAN et al. 2002] **empfohlenen Grenzwerte** herangezogen. Auf Basis der Beobachtung, dass die Cbl-Serumkonzentration im Frühstadium eines Mangels zu Lasten der Gewebespeicher konstant gehalten wird [CARMEL 2000] und Störungen intrazellulärer Funktionsabläufe bei den in der Praxis üblichen Normwerten von ca. >150 pmol/l¹⁰⁷ [INSTITUTE OF MEDICINE 1998, S. 9-8] nicht diagnostiziert werden, sprechen sich die o. g. Autoren insbesondere bei älteren Personen für eine Anhebung der Normwert-Untergrenze auf 220-258 pmol/l aus.

Ausgehend von den durchschnittlichen Serumspiegeln des Gesamtkollektivs wurden die als wünschenswert erachteten Cbl-Serumkonzentration sowohl vor (T0: 280 ± 114 pmol/l, Min-Max: 94-1089 pmol/l) als auch nach Abschluss der Intervention (T6: 390 ± 157 pmol/l, Min-Max: 184-1293 pmol/l) erreicht. Wie die in Tab. A23 aufgeführten Prävalenzen für eine Unterschreitung der veranschlagten cut-off-Werte erkennen lassen, konnten zu T0 dennoch 28,5% (n=35; Cbl <220 pmol/l) bzw. 46,3% (n=57; Cbl <258 pmol/l) der Probanden mit

¹⁰⁶ Auf die Darstellung des Parameters Methylmalonsäure (MMA), der als spezifischer Marker einer unzureichenden Cobalamin-Versorgung für die zentrale Fragestellung dieser Arbeit von ungeordneter Bedeutung ist, wurde aus Gründen des Umfangs verzichtet.

¹⁰⁷ Dieser Wert entspricht in seiner Größenordnung auch der vom Labor (MHH) angeführten Untergrenze des Cbl-Referenzintervalls (145-639 pmol/l).

suboptimalem Versorgungsstatus identifiziert werden. Die Häufigkeitsverteilung in den Subgruppen Verum und Placebo unterschied sich trotz des jeweils höheren Anteils defizitär versorgter Probanden in der Verumgruppe nicht signifikant ($p=0,091$ bzw. $p=0,608$).

Nach sechsmonatiger Supplementierung verringerte sich der Anteil an Personen mit Cbl-Konzentrationen <220 bzw. <258 pmol/l auf 7,3% ($n=9$) und 21,1% ($n=26$) im Gesamtkollektiv. Während sich die Prävalenzzahlen innerhalb der Placebogruppe nur unwesentlich veränderten, war unter Verumeinnahme eine deutliche Reduktion der suboptimalen Cbl-Werte zu beobachten (vgl. Tab. A23). Bezogen auf den höheren cut-off (Cbl ≥ 258 pmol/l) erhöhte sich hier der Anteil an Probanden mit wünschenswerten Serumspiegeln von eingangs 51,5 auf 93,9% nach der Intervention. In der Placebogruppe wurde diesbezüglich lediglich eine geringfügige Steigerung von 56,1% (T0) auf 61,4% (T6) festgestellt. Zum Zeitpunkt T6 hatte dies wiederum ein signifikant unterschiedliches Verteilungsmuster beider Subgruppen auf die cut-off-Bereiche <220 pmol/l ($p=0,012$) sowie <258 pmol/l ($p<0,001$) zur Folge.

Tab. A23: Prävalenz eines suboptimalen Cobalaminversorgungsstatus zu T0 und T6 auf Basis der zur Homocystein- und MMA-Minimierung als wünschenswert erachteten Cbl-Serumspiegel in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs

	Cbl-cut-off	Verum ($n=66$)		Placebo ($n=57$)		<i>p</i>
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
T0	<220 pmol/l*	23	34,8	12	21,1	0,091 ^a
	<258 μ mol/l**	32	48,5	25	43,9	0,608 ^a
T6	<220 pmol/l	1	1,5	8	14,0	0,012^b
	<258 μ mol/l	4	6,1	22	38,6	$<0,001^a$

* nach YAO et al. 1992; RAJAN et al. 2002, ** nach LINDENBAUM et al. 1994

^a Chi²-Test, bezogen auf die Verteilung zwischen Verum- und Placebogruppe

^b Exakter Test nach Fisher, bezogen auf die Verteilung zwischen Verum- und Placebogruppe

Qualitative Vitamin-B₆-Versorgung vor und nach der Intervention

Wurde zunächst das **vom Labor (MHH) ausgewiesene PLP-Referenzintervall¹⁰⁸** (14,6-72,8 nmol/l) zur qualitativen Beurteilung der Vitamin-B₆-Versorgung herangezogen, so zeigte sich mit einer innerhalb dieses Bereiches liegenden T0-Plasmakonzentration von $42,3 \pm 27,0$ nmol/l (Min-Max: 11,0-216 nmol/l) eine insgesamt gute Ausgangsversorgung der Studiengruppe. Niedrige PLP-Plasmawerte, definiert durch die Intervall-Untergrenze (PLP $<14,6$ nmol/l), ließen sich demzufolge lediglich bei 4,9% ($n=6$) feststellen, während 83,7%

¹⁰⁸ Dieses entspricht dem in der klinischen Chemie üblichen Referenzintervall der PLP-Plasmakonzentration [vgl. GREILING U. GRESSNER 1995, S. 459].

der Probanden ($n=103$) innerhalb der Referenz lagen ($p=0,378$; χ^2 -Test für Verteilung Verum vs. Placebo, vgl. Tab. A24). Basierend auf den Daten der *Framingham-Studie*, aus denen SELHUB et al. [1993; 2000] eine **für Homocystein kritische Schwellenwert-Konzentration** von $PLP \leq 18 \text{ nmol/l}^{109}$ ableiteten, war mit 9,8% (Verum $n=6$, Placebo $n=6$, $p=0,789$; χ^2 -Test) von einem unwesentlich höheren Anteil an Probanden mit suboptimalem Ausgangsstatus auszugehen.

Zum Zeitpunkt T6 wies die Gesamtgruppe eine im Mittel deutlich über dem o. g. Referenzbereich liegende Plasmakonzentration von $97,0 \pm 65,3 \text{ nmol/l}$ (Min-Max: 12,6-408 nmol/l) auf. Der untere cut-off-Wert ($<14,6 \text{ nmol/l}$) wie auch der zur Homocystein-Minimierung veranschlagte Schwellenwert ($\leq 18 \text{ nmol/l}$) wurde, bedingt durch die Erhöhung der mittleren PLP-Spiegel beider Gruppen, lediglich von einem Probanden der Placebogruppe unterschritten. Qualitative Unterschiede, die zu einem signifikant unterschiedlichen Verteilungsmuster der Interventionsgruppen auf die vom Labor angegebenen Referenzbereich-Kategorien führten, wurden hingegen im oberen Konzentrationsbereich erkennbar ($p<0,001$; χ^2 -Test, vgl. Tab. A24). So erhöhte sich der Anteil an Probanden mit PLP-Plasmawerten $>72,8 \text{ nmol/l}$ in der Verumgruppe von vormals 9,1% (T0) auf 87,9% (T6). Innerhalb der Placebogruppe ergaben sich diesbezüglich keine wesentlichen Veränderungen (T0: 14,0% vs. T6: 17,5%).

Tab. A24: Verteilung der Verum- und Placebogruppe auf die Kategorien des vom Labor ausgewiesenen PLP-Referenzintervalls zu T0 und T6

	PLP-cut-off	Verum ($n=66$)		Placebo ($n=57$)		p (χ^2)
		n	%	n	%	
T0	$<14,6 \text{ nmol/l}$	2	3,0	4	7,0	0,378
	14,6-72,8 nmol/l	58	87,9	45	78,9	
	$>72,8 \text{ nmol/l}$	6	9,1	8	14,0	
T6	$<14,6 \text{ nmol/l}$	--	--	1	1,8	$<0,001$
	14,6-72,8 nmol/l	8	12,1	46	80,7	
	$>72,8 \text{ nmol/l}$	58	87,9	10	17,5	

¹⁰⁹ entsprechend dem 1. Dezil mit einem OR von 2,7 (95%-CI 1,2-6,1) für tHcy-Plasmawerte $>14,0 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ($p<0,01$ vs. 10. Dezil) [SELHUB et al. 1993]

Zusammenfassende Darstellung zum qualitativen B-Vitaminversorgungstatus vor der Intervention

Eine zusammenfassende Übersicht der in den vorangegangenen Abschnitten aufgezeigten Daten zur qualitativen B-Vitaminversorgung vor der Supplementierung gibt Tab. A25.

Tab. A25: Übersicht zur qualitativen B-Vitaminversorgung des Gesamtkollektivs zu T0 auf Basis der zur Bedarfsdeckung (BD) sowie Homocystein-Minimierung (tHcy-Min) veranschlagten Grenzwerte

	cut-off-Wert		Mittelwert \pm SD	Unterschreitung der cut-off-Werte (BD / tHcy-Min) in %
	BD	tHcy-Min		
S-Folat [nmol/l]	≥ 7	≥ 20	24,5 \pm 13,0 (n=122)	0,8 / 52,5
E-Folat [μ mol/l]	$\geq 0,32$	$\geq (0,5-)0,6$	0,95 \pm 0,38 (n=122)	0 / (2,5) 10,7
Cbl [pmol/l]	≥ 150	$\geq (220-)258$	280 \pm 114 (n=123)	3,3 / (28,5) 46,3
PLP [nmol/l]	$\geq 14,6$	> 18	42,3 \pm 27,0 (n=123)	4,9 / 9,8

Qualitative α -Tocopherolverversorgung vor und nach der Intervention

Um zu überprüfen, inwieweit die für das Gesamtkollektiv unter Kap. 4.2.3.3 beschriebenen quantitativen Veränderungen der α -Tocopherol-Serumwerte mit qualitativen Veränderungen der Versorgungssituation einhergingen, wurden für eine entsprechende Beurteilung zunächst die in der Literatur gebräuchlichen **Normwerte für eine ausreichende Bedarfsdeckung** (AT: $\geq 11,6 \mu\text{mol/l}$ ¹¹⁰, AT/TC: $\geq 2,2 \mu\text{mol/mmol}$ [BÄSSLER ET AL. 2002, S. 396; ERHARDT 2002b, S. 678]) herangezogen. Beide Grenzwerte wurden sowohl vor als auch nach der Intervention weder im Mittel (vgl. Tab. 19, AT- und AT/TC-Werte des Gesamtkollektivs) noch von den einzelnen Studienteilnehmern unterschritten.

Wurden die in Hinblick auf kardiovaskuläre und neoplastische Erkrankungen als **präventiv angenommenen Schwellenwerte** von AT $> 30 \mu\text{mol/l}$ ¹¹¹ [BIESALSKI et al. 1997; WEBER et al. 1997]) bzw. AT/TC $> 5,0 \mu\text{mol/mmol}$ [GEY 1998]) zugrunde gelegt, so wurden zu T0 und T6 im Mittel auch diese Grenzwerte erreicht (s. o.). Eine suboptimale Ausgangsversorgung wiesen demgegenüber 35,8% (n=44, AT $\leq 30 \mu\text{mol/l}$) bzw. 22,8% (n=28, AT/TC $\leq 5,0 \mu\text{mol/mmol}$) der Probanden auf. Die Interventionsgruppen unterschieden sich trotz der höheren Anzahl an Teilnehmern mit einem AT/TC-Quotient von basal $\leq 5,0 \mu\text{mol/mmol}$ in der Placebogruppe (29,8% vs. 16,7% in der Verumgruppe, vgl. Tab. A26) nicht signifikant.

¹¹⁰ Dieser Wert stimmt mit der Untergrenze des vom Labor (MLHB) angeführten Referenzintervalls (11,6-37,2 $\mu\text{mol/l}$) überein.

¹¹¹ standardisiert auf 220 mg/dl (5,69 mmol/l) Gesamtcholesterol und 110 mg/dl (1,25 mmol/l) Triglyceride

Nach Abschluss der Intervention verringerte sich der Anteil an Personen mit suboptimalen Serumspiegeln auf 13,0% ($n=16$, AT ≤ 30 $\mu\text{mol/l}$) bzw. 8,1% ($n=10$, AT/TC $\leq 5,0$ $\mu\text{mol/mmol}$) im Gesamtkollektiv. Wie Tab. A26 veranschaulicht, konnte dies auf eine deutliche Anhebung der Serumwerte in den als protektiv angesehenen Bereich innerhalb der Verumgruppe auf 97,0% (AT > 30 $\mu\text{mol/l}$) bzw. 100% (AT/TC $> 5,0$ $\mu\text{mol/mmol}$) zurückgeführt werden. Der Unterschied zur Verteilung in der Placebogruppe, bei der sich ebenfalls eine geringfügige Reduktion des Anteils an Probanden mit suboptimalen Serumspiegeln beobachten ließ, erwies sich für beide Parameter mit $p < 0,001$ als jeweils höchst signifikant.

Tab. A26: Prävalenz eines suboptimalen α -Tocopherolverorgungsstatus zu T0 und T6 auf Basis der als präventiv angenommenen AT- und AT/TC-Serumspiegel in der Verum- und Placebogruppe des Gesamtkollektivs

cut-off	Verum ($n=66$)		Placebo ($n=57$)		<i>p</i>
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
T0 AT ≤ 30 $\mu\text{mol/l}$ *	24	36,4	20	35,1	0,883 ^a
	11	16,7	17	29,8	0,083 ^a
T6 AT ≤ 30 $\mu\text{mol/l}$	2	3,0	14	24,6	$< 0,001$ ^a
	--	--	10	17,5	$< 0,001$ ^b

* nach BIESALSKI et al. 1997; WEBER et al. 1997, ** nach GEY 1998

^a Chi²-Test, bezogen auf die Verteilung zwischen Verum- und Placebogruppe

^b Exakter Test nach Fisher, bezogen auf die Verteilung zwischen Verum- und Placebogruppe

Zusammenfassende Darstellung zum qualitativen α -Tocopherolverorgungsstatus vor der Intervention

Eine zusammenfassende Übersicht der im vorangegangenen Abschnitt aufgezeigten Daten zur qualitativen α -Tocopherolverorgung vor der Supplementierung gibt Tab. A27.

Tab. A27: Übersicht zur qualitativen α -Tocopherolverorgung des Gesamtkollektivs zu T0 auf Basis der zur Bedarfsdeckung (BD) sowie der aus präventiver Sicht (Präv) veranschlagten Grenzwerte

	cut-off-Wert*		Mittelwert \pm SD ($n=123$)	Unterschreitung der cut-off-Werte (BD / Präv) in %
	BD	Präv		
AT [$\mu\text{mol/l}$]	$\geq 11,6$	≥ 30	$35,9 \pm 11,0$ ($n=123$)	0 / 35,8
AT/TC [$\mu\text{mol/mmol}$]	$\geq 2,2$	$\geq 5,0$	$5,99 \pm 1,42$ ($n=123$)	0 / 22,8

GANZ HERZLICH BEDANKEN MÖCHTE ICH MICH...

... bei allen Personen, die mich auf vielfältige Art und Weise bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben:

- Herrn Prof. Dr. Andreas Hahn für die Überlassung des Themas sowie sein mir entgegengebrachtes Vertrauen während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in seiner Arbeitsgruppe,
- Herrn Prof. Dr. Dirk O. Stichtenoth für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens und seine Unterstützung als Kooperationspartner bei der Erstellung des Ethikantrags,
- Frau Prof. Dr. Brita M. Watkinson für die ebenfalls bereitwillige Übernahme der Funktion als Drittprüferin im Rahmen meiner Disputation,
- Jan Winters, Alexander Ströhle und Maike Wolters für den wertvollen inhaltlichen Austausch, die großartige Hilfe bei der englischen Übersetzung sowie ihre stetigen Ermutigungen „das Ding jetzt endlich fertig zu machen“,
- Michaela Luz und Tamar Triebel für das Korrekturlesen meines Manuskriptes und ihre akribische Fählensuche,
- Gaby Kressel und allen damaligen Kollegen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Hahn - insbesondere Maike Wolters, Annika Waldmann, Doreen Stettin, Tamar Triebel, Sonja Hornig, Susanne Mittendorf, Robert Peris, Jeanette Thamala, Marie Lewin, Nicole Kutys, Patrizia Serrapiglio, Peter Kosko, Wiebke Nüchter, Kristin Heidotting und Elske Boomgarden – für ihre intensive Mitarbeit an der Vorbereitung und Durchführung der Studie,
- Frau Heike Kohrs und Frau Gudrun Gläser für die Aufbereitung der Proben und das gesamte „Drumherum“,
- Herrn PD Dr. Achim Bub, Herrn Prof. Dr. W. Nikolaus Kühn-Velten, Herrn Prof. Dr. Ralf Lichtinghagen und Herrn Dr. Karl Reuner für die wissenschaftliche Kooperation im Rahmen der Studie und die vielen hilfreichen Fachgespräche im Zusammenhang mit den verwendeten Analysemethoden,

- dem Team der Westdeutschen Studiengruppe für das geduldige Ertragen einer zeitweise „leicht zerstreuten“ Kollegin,
- Erich und Falk Trunz, Gudrun und Herbert Bähre und Familie Anacker für ihre seelische Unterstützung und Hilfe in allen (Promotions-)Lebenslagen

sowie ganz besonders

- meinem Mann Timo für seinen bedingungslosen Rückhalt und immerwährenden Optimismus in dieser oft nicht einfachen Zeit.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Birgit Trunz, geb. Schmitt
Benderstr. 19
41065 Mönchengladbach
Email: birgit.trunz@gmx.de
geboren am 12.08.1975 in Nürnberg, verheiratet

Beruflicher Werdegang

- 15.01.2009 – heute Clinical Research Associate, Westdeutsche Studiengruppe gGmbH, Mönchengladbach
- 01.03.2003 – 30.04.2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Abt. Ernährungsphysiologie und Humanernährung, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Ökotrophologie der Leibniz Universität Hannover
- 01.12.2005 – 11.05.2006 Freiberufliche Beratungstätigkeit (Call-Center-Training und Produktschulung) für ein mittelständisches Pharmaunternehmen, Marktsegment Nahrungsergänzungsmittel
- 01.07.2002 - 28.02.2003 Angestellte Oecotrophologin, Sachgebiet Ernährungsberatung und Verbraucherschutz, Regierung von Oberbayern, München

Hochschulausbildung

- 01.10.1996 - 24.04.2002 Studium der Oecotrophologie, Fachrichtung Ernährungswissenschaft, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Abschluss: Dipl. oec. troph. (Note: 1,0 mit Auszeichnung)
- Titel der Diplomarbeit: „Funktionelle Lebensmittel – ein Beitrag zur Prävention der Arteriosklerose?“ (Note: 1,0)

Freiwilliges Soziales Jahr

- 01.08.1995 - 31.07.1996 Krankenpflege in der Unfallchirurgie, Station 2 West, Friederikenstift, Hannover

Schulbildung

- 01.10.1996 - 24.04.2002 Gymnasium Burgdorf, Abschluss: Abitur (Note: 2,0)
- 1988 – 1990 Beethoven Gymnasium, Berlin-Steglitz
- 1982 – 1988 Grundschule in Nürnberg und Berlin

PUBLIKATIONEN UND WISSENSCHAFTLICHE AKTIVITÄTEN

Originalarbeiten (Volltextpublikationen)

Kressel G, Trunz B, Bub A, Hülsmann O, Wolters M, Lichtinghagen R, Stichtenoth R, Hahn A. Systemic and vascular markers of inflammation in relation to metabolic syndrome and insuline resistance in adults with elevated atherosclerosis risk. *Atherosclerosis* 2009;202: 263-71.

Nettekoven S, Ströhle A, Trunz B, Wolters M, Hoffmann S, Horn R, Steinert M, Brabant G, Lichtinghagen R, Welkoborsky HJ, Tuxhorn I, Hahn A. Effects of antiepileptic drug therapy on vitamin D status and biochemical markers of bone turnover in children with epilepsy. *Eur J Pediatr* 2008;167:1369-77.

Stettin D, Waldmann A, Wolters M, Trunz B, Schauder P, Hahn A. Infektion mit *Helicobacter pylori* und Lebensstil - Ergebnisse einer deutschen Untersuchung. *Dtsch Med Wochenschr* 2007;132:2677-82.

Schmitt B, Wolters M, Kressel G, Hülsmann O, Strohle A, Kuhn-Velten WN, Lichtinghagen R, Bub A, Barth SW, Stichtenoth DO, Hahn A. Effects of combined supplementation with B vitamins and antioxidants on plasma levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in subjects with elevated risk for cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2007;193:168-76.

Mang B, Wolters M, Schmitt B, Kelb K, Lichtinghagen R, Stichtenoth DO, Hahn A. Effects of a cinnamon extract on plasma glucose, HbA_{1c}, and serum lipids in diabetes mellitus type 2. *Eur J Clin Invest* 2006;36:340-4.

Originalarbeiten (Abstracts)

Birkefeld A, Weißhaupt A, Trunz B, Kressel G, Hahn A. Vergleichende Untersuchung zur Gewichtsreduktion isokalorischer Formulaprodukte mit unterschiedlichem Protein- und Kohlenhydratgehalt. *Proc Germ Nutr Soc* 2008;12: 23.

Schneider I, Triebel T, Kenklies M, Trunz B, Hager K, Hahn A. Bedeutung von Vitamin B12 und Folsäure für die kognitiven Funktionen im Alter. *Der Nervenarzt* 2007;78(Suppl 2):140.

Kressel G, Trunz B, Bub A, Hülsmann O, Lichtinghagen R, Hahn A. Einfluss einer Nährstoff-supplementierung auf neue Risikofaktoren (hs-CRP, sVCAM-1, sICAM-1, PAI-1) der Atherosklerose. *Proc Germ Nutr Soc* 2007;9:10.

Kressel G, Wolters M, Schmitt B, Hülsmann O, Bub A, Lichtinghagen R, Hahn A. Indikatoren der Inflammation, Adhäsion und Gerinnung in Relation zur Insulinresistenz bei einem Kollektiv mit erhöhtem Atherosklerose-Risiko. *Diabetologie* 2006;1:S124.

Mang B, Wolters M, Schmitt B, Kelb K, Lichtinghagen R, Stichtenoth DO, Hahn A. Einfluss eines wässrigen Zimtextraktes auf Parameter des Glucose- und Lipidstoffwechsels bei Diabetes mellitus Typ 2 – Ergebnisse einer randomisierten, plazebo-kontrollierten Doppelblindstudie. *Proc Germ Nutr Soc* 2006;8:25-6.

Hülsmann O, Schmitt B, Wolters M, Kressel G, Bub A, Hahn A. Effekte einer Supplementierung mit Vitaminen, Mineralstoffen und Omega-3-Fettsäuren auf funktionelle Marker der antioxidativen Kapazität und Lipidperoxidation von Personen mit erhöhtem Atheroskleroserisiko. Proc Germ Nutr Soc 2006;8:47.

Schmitt B, Wolters M, Kressel G, Hülsmann O, Barth SW, Bub A, Hahn A. Einfluss einer Multinährstoffmischung auf die Plasma-Homocysteinkonzentration (Hcy) unter Berücksichtigung des MTHFR-Genotyps bei Personen mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko. Proc Germ Nutr Soc 2006;8:67-8.

Schmitt B, Wolters M, Bub A, Barth S, Hahn A. Role of MTHFR genetic polymorphisms in homocysteine reduction by vitamin supplementation. 4th Conference on Hyperhomocysteinemia, Saarland University, Saarbrücken 14.-16. April 2005, Abstracts: S.49 (P64)

Schmitt B, Triebel T, Kühn-Velten WN, Hahn A. Statusbestimmung der ADMA-Plasmakonzentration bei Personen mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko. Proc Germ Nutr Soc 2005;7:66.

Wolters M, Schmitt B, Schuster C, Waldmann A, Bub A, Hahn A: TEAC- und FORT-Messung zur Ermittlung der antioxidativen Kapazität vor und nach Antioxidanzien-Supplementierung. Proc Germ Nutr Soc 2004;6:70.

Übersichtsarbeiten

Schmitt B, Ströhle A, Hahn A. Krankheitsprävention mit Nährstoffen – Möglichkeiten und Grenzen am Beispiel der Arteriosklerose. Praxis der Naturwissenschaften Chemie in der Schule 2004;53:30-3.

Ströhle A, Schmitt B, Hahn A. Functional Foods – eine Übersicht zur aktuellen Situation. Teil 2: Gesundheitsfördernde Substanzen in funktionellen Lebensmitteln: Probiotika, Präbiotika, ω -3-Fettsäuren und Phytosterole. Journal für Orthomolekulare Medizin 2002;10:326-49.

Schmitt B, Ströhle A, Watkinson BM, Hahn A. Wirkstoffe funktioneller Lebensmittel in der Prävention der Arteriosklerose. Teil 3: Phytosterole. Ernähr Um 2002;49:266-70.

Schmitt B, Ströhle A, Watkinson BM, Hahn A. Wirkstoffe funktioneller Lebensmittel in der Prävention der Arteriosklerose. Teil 2: ω -3-Fettsäuren- Versorgungssituation und Zufuhrempfehlung. Ernähr Um 2002;49:223-6.

Hahn A, Ströhle A, Schmitt B, Watkinson BM. Wirkstoffe funktioneller Lebensmittel in der Prävention der Arteriosklerose. Teil 1: Physiologische Grundlagen der Wirkung von ω -3-Fettsäuren. Ernähr Um 2002;49:172-7.

Braun K, Hahn A, Watkinson BM, Schmitt B. Functional Foods- Konzept und Ziele. Ernähr Um 2001;48:180-7.

Kurzbeiträge

Schmitt B, Ströhle A, Hahn A. Supplemente zur Gewichtsreduktion – Wunsch und Wirklichkeit. Diät und Information 2006;4:114-7.

Hahn A, Schmitt B, Ströhle A. Functional Food zur Gesunderhaltung – Wie Omega-3-Fettsäuren Herz und Gefäße schützen können. Forschungsmagazin der Universität Hannover, Unimagazin Hannover 2004;1/2:18-20.

Fachtagungen und Kongresse

Homocystein senken mit B-Vitaminen - was bringt's? (Vortrag)

UGB-Tagung „Nährstoffe im Fokus“, Verband für unabhängige Gesundheitsberatung e.V., Giessen, 05.-06.05.2006.

Mikronährstoffe und Atherosklerose - Was ist gesichert? (Vortrag)

11. Kongress für Orthomolekulare Medizin, Ralf Reglin Verlag, Köln, 29.04.2006.

Supplemente zur Gewichtsreduktion - Wunsch und Wirklichkeit (Vortrag)

1. Gemeinsamer Bundeskongress des Bundesverbands Deutscher Ernährungsmediziner (BDEM) e.V., des Verbands der Diätassistenten (VDD) e.V. sowie des Verbands der Oecotrophologen (VDOE) e.V., Wolfsburg, 28.04.2006.

Vegane Ernährung in verschiedenen Lebensphasen - Nährstoffbedarf gedeckt? (Vortrag)

6. UGB-Symposium, Verband für unabhängige Gesundheitsberatung e.V., Edertal-Bringhausen, 23.-25.09.2005.

Vitamine als Schutz vor Atherosklerose - Wunsch und Wirklichkeit (Vortrag)

8. Niedersächsisches Ernährungsforum, Akademie für Fortbildung der Ärztekammer Niedersachsen, Hannover, 02.10.2004.

Außeruniversitäre Fort- und Weiterbildungsveranstaltungen

Fettstoffwechselstörungen – Risiken und Prävention (Vortrag)

Fortbildungsveranstaltung für Lehrkräfte, Niedersächsisches Landesamt für Lehrerbildung und Schulentwicklung (NiLS), Anna-von-Siemsen-Schule, Hannover, 11.10.2007

Ernährung in Schwangerschaft und Stillzeit (Vortrag)

Weiterbildung „Ernährungsberatung“ für Apotheker, Apothekerkammer Niedersachsen, Hannover, 20.05.2007

Ernährung von Säuglingen und Kleinkindern (Vortrag)

Weiterbildung „Ernährungsberatung“ für Apotheker, Apothekerkammer Niedersachsen, Hannover, 20.05.2007

Digestion und Absorption (Vortrag)

Weiterbildung „Ernährungsberatung“ für Apotheker, Apothekerkammer Niedersachsen, Hannover, 25.02.2007

ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

Hierdurch erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Mönchengladbach im Juli 2009

