

Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin –
Zentrallabor der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes,
Homburg/Saar

Betreuerin: Prof. Dr. rer. med. Rima Obeid

**Auswirkung einer mit Vitamin B₁₂ angereicherten
Zahncreme auf Plasma-Vitamin-B₁₂**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2018

vorgelegt von Ayman Zant

geboren am 20.07.1975 in Gaza

Inhaltsverzeichnis

Abstract	9
Zusammenfassung	10
1 Einleitung	11
1.1 Vitamin B ₁₂	12
1.1.1 Struktur des Vitamin B ₁₂	12
1.1.2 Bedeutung von Vitamin B ₁₂ im Stoffwechsel	13
1.1.3 Vitamin-B ₁₂ -Quellen	14
1.1.4 Zelluläre Aufnahme von Vitamin B ₁₂	15
1.1.5 Resorption von Vitamin B ₁₂ im Darm und Aufnahme in den Blutkreislauf	15
1.1.6 Resorption von Vitamin B ₁₂ über Schleimhäute und passive Diffusion	17
1.1.7 Ausscheidung von Vitamin B ₁₂	18
1.1.8 Bedeutung des HoloTC	19
1.1.9 Referenzbereiche für Vitamin B ₁₂	19
1.1.10 Klinische Symptome des Vitamin-B ₁₂ -Mangels	20
1.1.11 Vitamin-B ₁₂ -assoziierte neurologische und psychiatrische Störungen	23
1.1.12 Bedeutung von Vitamin B ₁₂ für diabetische Neuropathien	23
1.1.13 Vitamin B ₁₂ und Depression	24
1.1.14 Diagnostik des Vitamin-B ₁₂ -Mangels	24
1.1.15 Diagnostische Aussagekraft der Parameter (Vitamin B ₁₂ , HoloTC, MMA)	27
1.2 Folate	29
1.2.1 Struktur des Folats	29
1.2.2 Bedeutung der Folate im Stoffwechsel	29
1.2.3 Referenzwerte für Folate im Plasma	31
1.2.4 Folatversorgung durch Nahrungsmittel	32
1.2.5 Lebensmittel als Folatquellen	32
1.2.6 Resorption der Folate im Darm und Aufnahme in den Blutkreislauf	33
1.2.7 Speicherformen der Folate im Körper	34

1.2.8 Ausscheidung von Folat.....	34
1.2.9 Klinische Symptome des Folatmangels.....	34
1.3 Homocystein-Metabolismus im Zusammenhang mit Folat und Vitamin B ₁₂	35
1.3.1 Bedeutung von Methionin im Homocysteinein-Metabolismus	35
1.3.2 Bedeutung des Homocystein im Stoffwechsel.....	36
2 Zielsetzung der Studie.....	38
3 Material und Methodik	40
3.1 Studiendesign	40
3.2 Propandieninformation und Aufklärung	40
3.2.1 Hintergrund der Untersuchung	41
3.2.2 Ablauf der Untersuchung	42
3.3 Ein- und Ausschlusskriterien der Probanden.....	42
3.4 Vitamineinahme	43
3.5 Materialgewinnung und Datenerhebung.....	43
3.6 Präanalytik	43
3.7 Probandenrekrutierung	44
4 Laborchemische Methodik	48
4.1 Messung von Methylmalonylsäure (MMA).....	48
4.2 Messung von Homocystein	50
4.3 Messung des Gesamt-Vitamin-B ₁₂	50
4.4 Messung von Holo-transcobalamin	51
5 Statistik.....	53
5.1 Berechnungsformel für Vitamin B ₁₂ Aufnahme	54
6 Ergebnisse	55
6.1 Allgemeine Charakteristik der Teilnehmerpopulation	55
6.2 Charakteristik der allgemeinen Blutwerte der Teilnehmer	56
6.3 Konzentrationen von Vitamin B ₁₂ und Homocystein in der Teilnehmerpopulation.....	57
6.4 Ausgangskonzentration von MMA und Vitamin B ₁₂ und im Vergleich nach 12 Wochen	57
6.5 Ausgangskonzentration von HoloTC und im Vergleich nach 12 Wochen	58

7 Darstellung der Ergebnisse und Vergleich mit der Veganer-Studie	60
7.1 Ausgangskonzentrationen von Vitamin-B ₁₂ -Markern und ihre Veränderungen nach 12 Wochen	60
7.2 Prognose der Vitamin-B ₁₂ -Zufuhr aus Vitamin-B ₁₂ -Konzentrationen	60
7.3 Veränderungen der Vitamin-B ₁₂ -Marker bei älteren Menschen im Vergleich zu Veganern	63
8 Diskussion	65
9 Publikation	73
10 Literaturverzeichnis	74
11 Danksagung	83
12 Anhang	84
12.1 Einwilligungserklärung	84
12.2 Fragebogen	86
12.3 Zahnpasta Nutzungskalender	87
12.4.1 Wie werden die Proben gewonnen und verwendet?	88
12.4.2 Was sind die Risiken dieser Studie?	88
12.4.3 Was sind die Vorteile der Teilnahme an dieser Studie?	88
12.4.4 Ist die Vertraulichkeit meiner Daten gewährleistet?	88
12.4.5 Kann ich meine Teilnahme an der Studie vorzeitig beenden?	89
12.4.6 Kann ich bestimmte Verwendungszwecke ausschließen?	89
12.4.7 Wissenschaftliche Nutzung der Forschungsergebnisse	89

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ADA	American Dietetic Association
aHT	arterielle Hypertonie
AP	alkalische Phosphatase
AS	Atherosklerotischer Index
ATP	Adenosintriphosphat
BHMT	Betain-Homocystein-Methyltransferase
BMI	Body-Mass-Index
BP	Bisphosphonate
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
°C	Celsius
Ca ²⁺	Kalzium
CBS	Cystathionin-β-Synthase
CM	Cobalamin
CIMA	Cehmilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay
CoA	Coenzym A
CRP	C-reaktives Protein
Cys	Cystein
d	Day
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DHF	Dihydrofolat
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
Dm	Diabetes mellitus
DMG	Dimethylglycin

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
DTT	Dithiothreitol
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
ERY	Erythrozyten
Fe	Ferrum
G-Chol	Gesamtcholesterin
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
Gly	Glycin
Gamma (γ)-GT	Gamma-Glutamyltransferase
HB	Hämoglobin
HbA1c	Glykohämoglobin
HCT	Hydrochlorothiazide
Hcy	Homocystein
HDL	High Density Lipoprotein
HHcy	Hyperhomocysteinämie
HI	Herzinsuffizienz
HKT	Hämatokrit
HLP	Hyperlipidämie
HoloTC	Holotranscobalamin
IE	Internationale Einheiten
IF	Intrinsischer Faktor
IFG	Impaired Fasting Glucose
IGT	Impaired Glucose Tolerance

IR	Insulinresistenz
IS	Interne Standards
KHK	Koronare Herzkrankheit
Krea	Kreatinin
LDL	Low Density Lipoprotein
MAT	Methionin-Adenosyl-Transferase
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCH	mittlere korpuskuläres Hämoglobin
MCM	L-Methylmalonyl-CoA-Mutase
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
Meth	Methionin
MMA	Methylmalonsäure
MTHF	Methyltetrahydrofolsäure
MTHFR	5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase
MS	Methionin-Synthase
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
NT-Pro BNP	N-terminales natriuretisches Peptid vom B-Typ
OAD	orale Antidiabetika
PO	per os
PNP	Polyneuropathie
PPI	Protonenpumpenhemmer
PTH	Parathormon
RDA	Recommended Daily Allowance (Tagesmenge)
RLE	relative Lichteinheit
rSAHHase	rekombinanten Enzyms S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase

RNA	Ribonukleinsäure
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAHH	S-Adenosylhomocystein-Hydrolase
SAM	S-Adenosylmethionin
SDH	Schilddrüsenhormone
Ser	Serin
SHMT	Serinhydroxymethyltransferase
SL	sublingual
TC	Transcobalamin
THF	5,6,7,8-Tetrahydrofolat
TRAP5b	Isoform 5b der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase
TRIG	Triglyceride
TS	Thymidylat-Synthase
TSH	Thyreoid-stimulierendes Hormon
VitB ₁₂	Vitamin B ₁₂
v. a	vor allem/ allen
z. B	Zum Beispiel
vs.	Versus

Abstract

Background:

Gradually vitamin B₁₂ deficiency is common in elderly people, but can be prevented by increased vitamin intake.

Aims of the study:

This study examined the ability of vitamin B₁₂-enriched toothpaste to increase vitamin B₁₂ status in elderly patients compared to a placebo.

Materials and methods:

A Random, double-blind, placebo-controlled treatment was performed on 103 elderly volunteers over a three-month period. Of these, 92 met the inclusion criteria and completed the study. Serum concentrations of vitamin B₁₂, holotranscobalamin (holoTC), methylmalonic acid (MMA), and total homocysteine (tHcy) were measured at baseline and after three months.

Results:

After treatment, mean levels of vitamin B₁₂ were significantly higher in vitamin group compared to placebo group [mean (SD) 368 (123) vs. 295 (123) pmol/l; $p = 0.005$]. Concentration of HoloTC tended to increase [112 (48) vs. 91 (68) pmol/l; $p = 0.088$]. Changes of serum vitamin B₁₂ [54 (74) vs. -3 (60) pmol/l, $p < 0.001$, HoloTC 21 (34) vs. 2 (32) pmol/l, $p = 0.007$, and tHcy -0.9 (2.3) vs. 0.3 (1.9) $\mu\text{mol/l}$, $p = 0.010$] were significantly different between vitamin and placebo groups. Mean percentage increase in serum vitamin B₁₂ (% 17) in vitamin B₁₂ toothpaste group indicates that the treatment provided an additional daily intake of 7 μg oral vitamin B₁₂. Diseases and drugs that might be associated with low vitamin B₁₂ status did not affect the change of blood markers in the vitamin group.

Conclusions:

The toothpaste enriched with vitamin B₁₂ has increased vitamin B₁₂ status in elderly people and can be used to improve vitamin status or prevent its deficiency. The trial was registered at ClinicalTrials.gov: NCT02679833.

Zusammenfassung

Hintergrund:

Ein schleichender Vitamin-B₁₂-Mangel ist bei älteren Personen häufig, kann aber durch eine erhöhte Vitaminzufuhr verhindert werden.

Ziel:

In der vorliegenden Studie sollte die Fähigkeit von mit Vitamin B₁₂ angereicherter Zahnpasta im Vergleich zu einem Placebo untersucht werden, den Vitamin-B₁₂-Status bei älteren Patienten zu erhöhen.

Materialien und Methoden:

Es wurde eine stichprobenartig ausgewählte, doppelblinde, placebokontrollierte Behandlung bei 103 älteren Probanden durchgeführt, von denen 92 die Einschlusskriterien erfüllten und die dreimonatige Studie abschlossen. Die Serumkonzentrationen von Vitamin B₁₂, HoloTC, MMA und tHcy im Plasma wurden zu Studienbeginn und nach drei Monaten gemessen.

Ergebnisse:

Nach der Behandlung waren die mittleren Konzentrationen von Vitamin B₁₂ in der Vitamin-B₁₂-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe signifikant höher [368 (123) pmol/l vs. 295 (123) pmol/l; p = 0,005]; die HoloTC-Konzentration war tendenziell erhöht [112 (48) pmol/l vs. 91 (68) pmol/l; p = 0,088]. Die Veränderungen von Serum-Vitamin B₁₂ [54 (74) pmol/l vs. -3 (60) pmol/l, p < 0,001], HoloTC [21 (34) pmol/l vs. 2 (32) pmol/l, p = 0,007] und tHcy [-0,9 (2,3) µmol/l vs. 0,3 (1,9) µmol/l, p = 0,010] waren zwischen der Vitamin- und der Placebogruppe signifikant unterschiedlich.

Der mittlere prozentuale Anstieg von Serum-Vitamin B₁₂ (17 %) in der Vitamin-B₁₂-Zahnpastagruppe deutet darauf hin, dass die Behandlung eine zusätzliche tägliche Zufuhr von 7 µg oralem Vitamin B₁₂ bereitgestellt hatte. Krankheiten und Medikamente, die mit einem niedrigen Vitamin-B₁₂-Status in Verbindung gebracht werden könnten, beeinflussten die Veränderung der Blutmarker in der Substitutionsgruppe nicht.

Schlussfolgerung: Die mit Vitamin B₁₂ angereicherte Zahnpasta hat bei älteren Menschen den Vitamin-B₁₂-Status erhöht und kann somit zur Verbesserung des Vitamin-Status oder zur Vorbeugung eines Vitamin-B₁₂-Mangels eingesetzt werden.

1 Einleitung

Nach klinischen Studien, die einen Zusammenhang von Vitamin B₁₂ mit dem Altern [1] oder positive gesundheitliche Wirkungen nach Verabreichung des Vitamins [2] zeigen, hat der Vitamin-B₁₂-Status älterer Menschen in den letzten Jahren mehr Aufmerksamkeit erlangt. Ältere Patienten bilden eine klassische Risikogruppe für einen schleichenden Vitamin-B₁₂-Mangel [3]. Die typische westliche Ernährung bietet eine ausreichende Vitamin-B₁₂-Zufuhr, um den empfohlenen Tagesbedarf (RDA = 2,4 µg/d) zu decken. Die ungenügende Vitamin-B₁₂-Aufnahme ist jedoch eine verbreitete Ursache für den Vitamin-B₁₂-Mangel bei älteren Menschen [4]. Ursachen, die die Vitamin-B₁₂-Aufnahme oder Bioverfügbarkeit bei älteren Menschen negativ beeinflussen, sind unter anderem Gastritis, Achlorhydrie, Intrinsic-Faktor-Antikörper, Medikamente oder die Unfähigkeit, das Vitamin aus Nahrungsproteinen freizusetzen. Studien an älteren Probanden mit Malabsorption von Vitamin B₁₂ aus Nahrungsmitteln weisen darauf hin, dass eine tägliche Vitamin B₁₂-Zufuhr von etwa 6,0 µg/d erforderlich ist, um bei den meisten Probanden normale Serumkonzentrationen von Vitamin-B₁₂-Biomarkern zu erreichen [5;6]. Mangelernährte, die das Vitamin nicht aufnehmen können, können von hohen oralen Dosen von Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin) (0,5 - 1 mg/d) profitieren, die über passive Diffusion in den Kreislauf gelangen können. Der Konsum von mit Vitamin B₁₂ angereicherter Kuhmilch (1 mg Vitamin B₁₂/d) verbesserte die Vitamin-B₁₂-Statusmarker im Blut älterer Menschen nach 12 Wochen [7]. Einige Ergänzungsformen zielen darauf ab, die geschwindigkeitsbegrenzende Absorptionskapazität im Darm (vermutlich etwa 1,5 µg/Mahlzeit), die pH-empfindliche Absorption und den vom intrinsischen Faktor abhängigen Absorptionsweg im Darm zu vermeiden. Nasenspray wurden erfolgreich verwendet, um große Mengen des Vitamins in die Nasenschleimhaut einzubringen und so den Vitaminspiegel im Blut anzuheben [8;9]. Darüber hinaus zeigte sich, dass Vitamin-B₁₂-angereicherte Zahnpasta den Vitaminspiegel bei veganen Probanden erhöht [10]. Die Serumkonzentrationen von Vitamin B₁₂ und Holotranscobalamin (HoloTC) stiegen bei Veganern innerhalb von drei Monaten bei regelmäßiger Anwendung der angereicherten Zahnpasta im Vergleich zur Placebogruppe [10]. Die Mechanismen der Absorption in der Schleimhaut des Mundes sind nicht bekannt. Haptocorrin, das lokal in den Speicheldrüsen [11] und Unterkieferspeicheldrüsen [12] produziert wird, könnte bei der Aufnahme von Vitamin B₁₂ im Mund eine Rolle spielen, was jedoch noch nicht bewiesen ist. Wenn nachgewiesen werden kann, dass die mit Vitamin B₁₂ angereicherte Zahnpasta das Vitamin ins Blut abgibt und den Vitamin-B₁₂-Status bei älteren Menschen verbessert, könnte dieses Konzept eine Möglichkeit bieten, Mangelzustände zu verhindern und Compliance-Probleme im Zusammenhang mit oralen Nahrungsergänzungsmitteln zu vermeiden. Die vorliegende Studie an älteren Probanden untersuchte die Wirkung einer mit Vitamin B₁₂ angereicherten Zahnpasta (100 µg Cyanocobalamin/g) im Vergleich zu einer Placebo-Zahnpasta auf

Vitamin-B₁₂-Statusmarker, Gesamtserum Vitamin B₁₂, HoloTC, Methylmalonsäure (MMA) und Gesamt-Homocystein (tHcy). In der vorliegenden Studie wurden die Post-Interventions-Serumkonzentrationen von Vitamin B₁₂ verwendet, um die Menge an Vitamin B₁₂ abzuschätzen, die durch die Zugabe verabreicht wurde. Schließlich wurde die Reaktion von Vitamin-B₁₂-Markern auf die Zugabe zwischen älteren Menschen aus der vorliegenden Studie und den Veganern aus der Studie von Obeid et al. (2017) verglichen [10].

1.1 Vitamin B₁₂

Vitamin B₁₂, Cobalamin (Cbl) genannt, wird in Mikroorganismen synthetisiert und spielt eine untergeordnete Rolle bei der Methylgruppenübertragung und der Zellteilung. Es nimmt jedoch eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Reifung und Regeneration von Zellen ein, insbesondere in den Nervenzellsystemen. Zusammen mit Folsäure ist Vitamin B₁₂ der wichtigste enzymatische Co-Faktor des Homocystein- Stoffwechsels. Hauptspeicherort ist die Leber. Sie stellt fast 60 % des Speichers; 30 % werden im Muskelapparat gespeichert [12].

1.1.1 Struktur des Vitamin B₁₂

Das Vitamin-B₁₂-Molekül hat eine einzigartige chemische Struktur (Abb. 1). Es ist aus einem Corrinringssystem aufgebaut, welches dem Porphyrinkern des Häm-Moleküls gleicht, wobei die Corrinstruktur des Vitamin B₁₂ nicht wie im Häm Eisen, sondern Cobalt als zentralen Stoff enthält. Daher wird Vitamin B₁₂ auch Cobalamin (Cbl) genannt und ist das einzige biologisch wichtige Molekül, das Cobalt enthält. Cbl weist nur drei Alpha-Methan-Brücken auf, wobei es im Häm vier sind. Cyanocobalamin ist ein synthetisches Derivat des Cobalamins und wird dieser Form in pharmazeutischen Vitamin-B₁₂-Präparaten verwendet. Cyanocobalamin ist ein hitze- und lichtstabiles Molekül. Es wird aber erst biologisch aktiv, wenn es in-vivo in Hydroxycobalamin hydrolysiert werden kann. Weitere Formen wie das Hydroxy-, Methyl- und Adenosyl-Cobalamin sind als Supplemente erhältlich, deren Wirkung mit dem von Cyanocobalamin relativ vergleichbar ist. Unter Vitamin B₁₂ werden alle Porphyrin-(Abb.1) ähnlichen Verbindungen zusammengefasst, die aus vier reduzierten Prolringen und einem zentralen Cobalt-atom bestehen. Für den Menschen haben nur Cobalaminverbindungen eine essenzielle biologische Funktion, die einen 5,6-Dimethylbenzimidazol-Kette als Liganden besitzen [13].

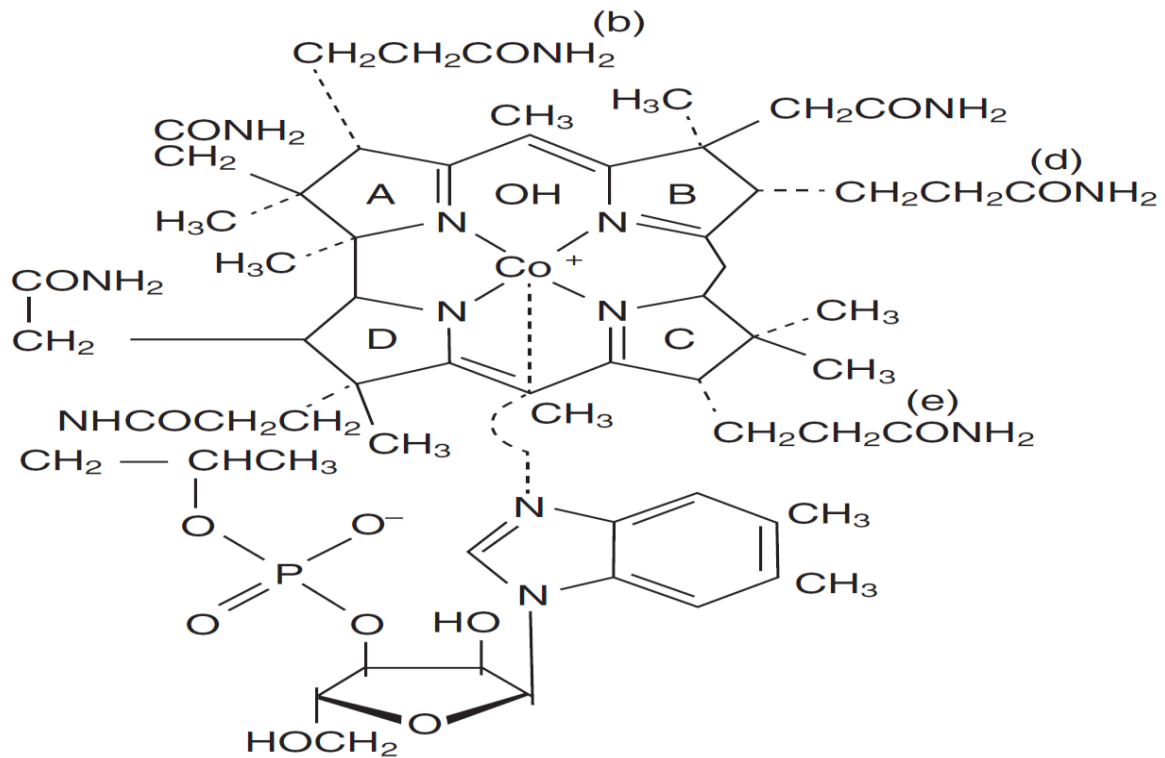


Abb. 1: Struktur von Vitamin B₁₂. Quelle: <http://www.xumuk.ru/biologhim/093.html>

1.1.2 Bedeutung von Vitamin B₁₂ im Stoffwechsel

Beim Menschen spielt Vitamin B₁₂ (Cobalamin) in nur zwei Reaktionen als Koenzym eine Rolle (Abb. 2). Methylcobalamin und 5-Desoxyadenosylcobalamin sind Co-Faktoren für das zytosolische Enzym Methioninsynthase bzw. der mitochondrialen Methylmalonyl-CoA-Mutase. Cbl determiniert die Aktivität der Methioninsynthase und somit die Remethylierung von Hcy zu Methionin (Meth). Dieser Schritt sorgt auch für die Bereitstellung von Methylgruppen und aktiven Folaten. Bei der Remethylierung wird zunächst eine Methylgruppe von 5-Methyltetrahydrofolat (5-Methyl-THF) auf Hydroxycobalamin übertragen, es entsteht Methylcobalamin. Die Methylgruppe wird weiter auf Hcy übertragen, hierbei entsteht Methionin aus Hcy. Die Rolle von Cobalamin in der Hcy-Methylierung erklärt warum ein Cbl-Mangel zu einem Hcy-Anstieg führt. Adenosylcobalamin spielt als Co-Faktor bei der Methylmalonyl-CoA-Mutase in den Mitochondrien eine untergeordnete Rolle und ist somit bei der Isomerisierungsreaktion von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA sehr wichtig [14]. Bei einem Cbl-Mangel wird Methylmalonyl-CoA dann alternativ zu Methylmalonsäure (MMA) hydrolysiert (Abb. 2). Der MMA-Plasmaspiegel steigt bei einem Cbl-Mangel und gilt als sensibler Marker dafür. Die Plasma-MMA-Konzentration ist von diagnostischer Bedeutung bei der Aufklärung von Hyperhomocysteinämie oder einem Vitamin-B₁₂-Mangel [15].

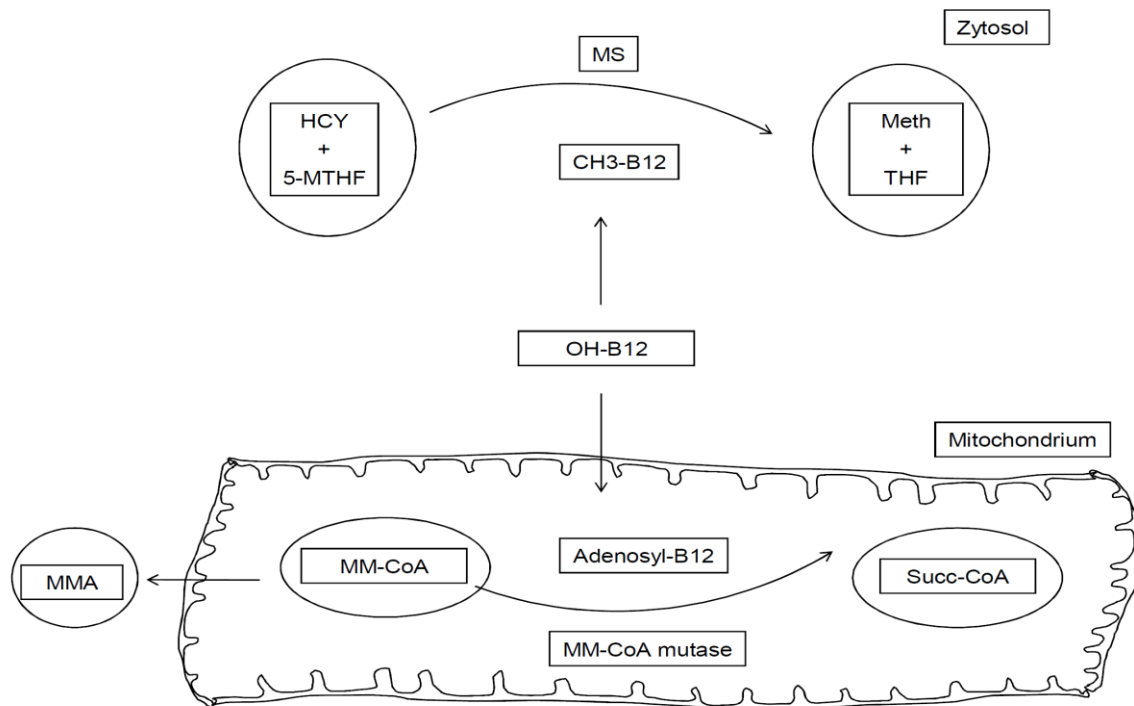


Abb. 2: Zelluläre Vitamin-B₁₂-abhängige Reaktionen [16].

Hcy: Homocystein; 5-MTHF: 5-Methyltetrahydrofolat; Meth: Methionin; MMA: Methylmalonsäure; MMCoA: Methylmalonyl-CoA; MS: Methioninsynthase; Succ-CoA: Succinyl-CoA; THF: Tetrahydrofolat.

1.1.3 Vitamin-B₁₂-Quellen

Die einzige bekannte natürliche Quelle für Vitamin B₁₂ ist die bakterielle Synthese. Im Vergleich zu den Bakterien können Pflanzen, Tiere und Menschen selbst kein Vitamin B₁₂ produzieren. Für Tiere ist die Menge des Vitamin B₁₂, die sie von den Vitamin-B₁₂-produzierenden Bakterien in ihrem Kolon erhalten, ausreichend. Menschen können Vitamin B₁₂ über tierische Nahrungsmittel aufnehmen. Fleisch, Fisch, Leber, Niere, Eier und Milchprodukte sind hierbei geeignete Vitamin-B₁₂-Lieferanten [14], in pflanzlichen Nahrungsmitteln hingegen ist kein Vitamin B₁₂ enthalten [17]. Veganer haben daher eine unzureichende Aufnahme an Vitamin B₁₂ aus der Nahrung. Es ist bereits lange bekannt, dass menschliche Darmbakterien keinen ausreichenden Beitrag zur Vitamin-B₁₂-Versorgung leisten. In den Achtziger Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass auch im menschlichen Dünndarm Bakterien leben, die Vitamin B₁₂ herstellen. Im Gegensatz zum Folat ist Vitamin B₁₂ ein verhältnismäßig stabiles Molekül, welches durch die Nahrungsmittelzubereitung kaum zerstört wird.

Tabelle 1: Vitamin-B₁₂-Quellen

Nahrungsmittel	Vitamin B ₁₂ -Gehalt in µg/100g
Rinderleber	65
Schweineleber	39
Austern	14
Salzhering	12
Muscheln/Makrelen	8
Muskelfleisch Rind	5
Emmentaler/ Camembert	3
Muskelfleisch Lamm	2,7
Muskelfleisch Schwein	2
Eier	1,8

Quelle:Gräfe u. Unzer(GU)-Verlag für Nährwerte 2003

1.1.4 Zelluläre Aufnahme von Vitamin B₁₂

Die Vitamin-B₁₂-Resorption erfolgt auf zwei Wegen: In der aktiven Form vermittelt über den Intrinsic Factor (IF) im terminalen Ileum und in der passiven Form durch passive Diffusion über die Schleimhäute des Gastrointestinaltrakts (v. a. der Mundhöhle, der Nase und des Ileums). Da jedoch die Resorptionsrate von Vitamin B₁₂ bei der passiven Diffusion ca. 1 - 2 % beträgt, sind höhere Zufuhrkonzentrationen notwendig für die Therapie von Malabsorptionen [18].

1.1.5 Resorption von Vitamin B₁₂ im Darm und Aufnahme in den Blutkreislauf

Cobalamin (Cbl) liegt zum größten Teil an Proteine gebunden vor und wird zunächst im Magen durch in den Hauptzellen des Magens gebildete Peptidase bzw. Pepsin protolytisch gespalten bzw. freigesetzt. Cbl wird an Transcobalamin (TC) gebunden und dann in den Dünndarm transportiert. Um das Cbl an den Intrinsic Factor (IF) binden zu können, muss es vorher mittels spaltender Enzyme bzw. Endopeptidase durch Trypsin gespalten werden (Abb. 3). Der IF ist ein Glykoprotein, das von den Belegzellen der Magenmukosa gebildet wird [19]. 60 - 70 % des in der Nahrung enthaltenen Cbl werden durch einen IF-Komplex aufgenommen und nur ca. 1 % diffundieren auf passivem Weg. Der Cobalamin-IF-Komplex haftet im unteren Ileum an einen spezifischen Rezeptor an und wird durch Endozytose in Enterozyten aufgenommen. Die Bindung des Cobalamin-IF-Komplexes am

Rezeptor ist Ca^{2+} -abhängig (freies Ca^{2+}) [19]. Fehlt freies Ca^{2+} (z. B. assoziiert durch Metformin-Einnahme bei Diabetikern, chronischen Pankreaserkrankungen), ist die Komplexbindung am Rezeptor gestört [20]. Diese Störung ist reversibel und durch Ca^{2+} -Gabe aufhebbar. Intrazellulär wird Cbl nach Abspaltung vom IF freigesetzt und an TC gebunden. Dieser Komplex aus Cbl und TC wird Holotranscobalamin (HoloTC) genannt. Es spiegelt die aktive Form von Cbl dar und wird somit als intrazellulärer Speicher betrachtet.

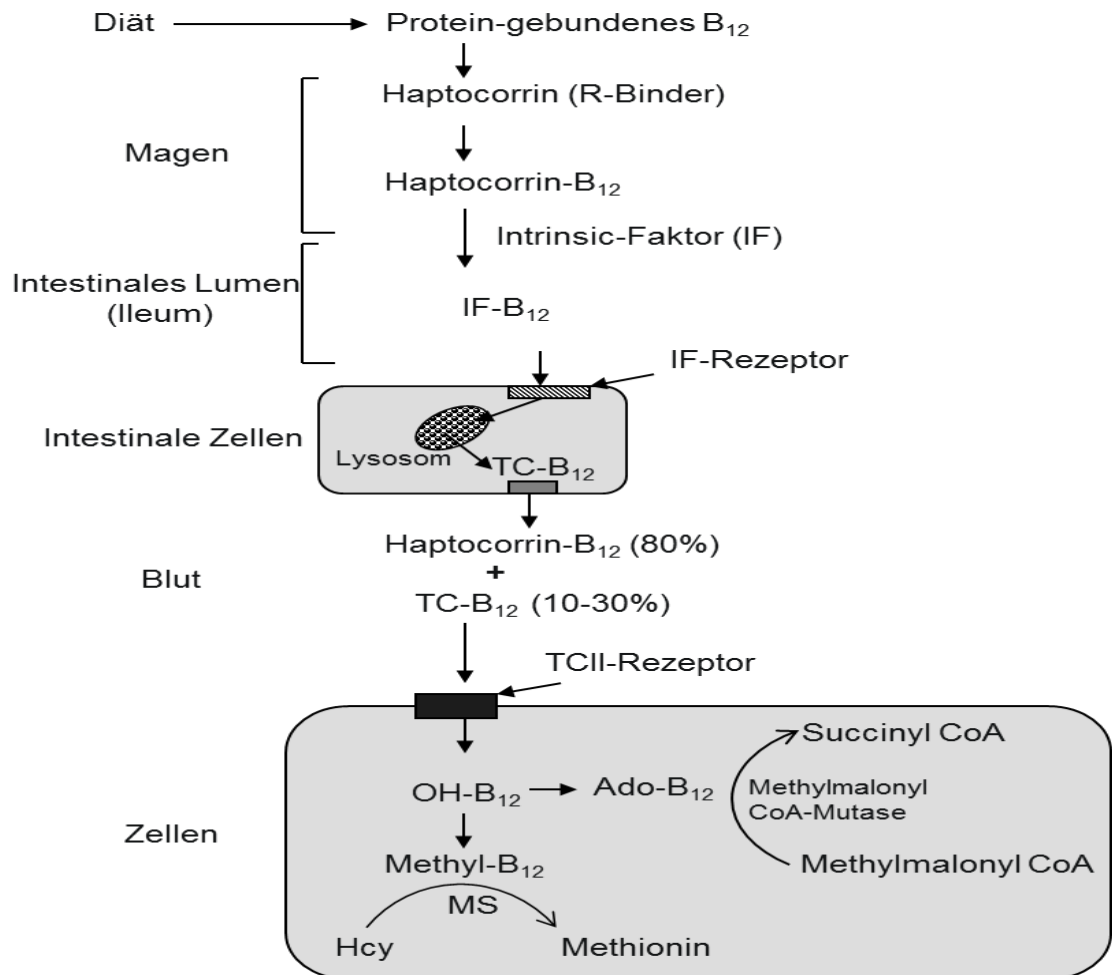


Abb. 3: Schematische Darstellung der Vitamin-B₁₂-Aufnahme. Quelle: <https://www.homocysteine-panel.org/vitamin-b12> [21].

Für die Resorption von Vitamin B₁₂ muss das Vitamin einen Komplex mit dem im Magen gebildeten Intrinsic-Faktor bilden. Der IF-B₁₂-Komplex wird im terminalen Ileum bei Anwesenheit von Calciumionen resorbiert. Aufnahme ins Blut, Umwandlung des Vitamin B₁₂ in den Aktiven Form (holoTC) bzw. Endozytose Blut dann intrazelluläre Umwandlung in bioaktiven Formen der Vitamin B₁₂ in Methylcobalamin und Adenosylcobalamin. **(Cbl)** Cobalamin, **(IF)** Intrinsic Faktor, **(TC)** Transcobalamin, **(holoTC)** od. **(TC II-B₁₂)** Holotranscobalamin, **(MMA)** Methylmalonyl CoA, **(Hcy)** Homocystein, **(AdoCbl)** Adenosylcobalamin, **(OH-B₁₂)** Hydroxocobalamin, **(Methyl-B₁₂)** Methylcobalamin, **(HC)** Haptocorrin.

1.1.6 Resorption von Vitamin B₁₂ über Schleimhäute und passive Diffusion

Vitamin B₁₂ kann sowohl über die Darm- als auch über die Mundschleimhäute aufgenommen werden [21]. Daher kann bei gestörter Aufnahme über den Magen-Darm-Trakt die Aufnahme theoretisch über die passive Diffusion über die Mundschleimhäute erfolgen. Nun stellt sich die Frage, ob die über diesen Weg aufgenommene Menge den Bedarf decken könnte. Wieviel Vitamin B₁₂ dabei genau über die Mundschleimhaut aufgenommen wird und wieviel nicht, ist bisher nicht ausreichend erforscht. Die sublinguale Aufnahme ist nach Sharabi et al. (2003) mindestens ebenso effektiv, wie die normale orale Aufnahme [21]. In dieser Studie wurden verschiedene Vitamin-B₁₂-Darreichungsformen verglichen, sowohl die orale (PO) und die sublinguale (SL) Zufuhr als auch die intramuskuläre Injektion [106]. Hierbei erhielten die Probanden (davon 50 % Vegetarier) über einen vorher definierten Zeitraum von acht Wochen folgende Präparate: 1) sublinguale Gabe 500 µg; 2) orale Gabe 500 µg; 3) Orale Vitamin-B-Komplex (Cbl 250 µg, Thyamin 100 µg, und Pyridoxin 250 µg). Es wurden Serum-Folat- und Plasma-Homocystein-Konzentrationen sowie MAA als Marker für Vitamin-B₁₂-Mangel gemessen. In der prospektiv durchgeführten Studie zeigten sich Hinweise auf einen Mangel an Serum-Cbl sowie völlig normale Hcy- und MMA-Konzentrationen. Nach vier Wochen der Cbl-Behandlung schien es jedoch einen Trend hin zu niedrigeren Hcy-Konzentrationen zu geben, im Vergleich zum in der Norm gelegenen Ausgangswert. Zusammenfassend ist nach dieser Studie eine Supplementation von Cbl sublingual oder oral scheinbar wirksam, besonders in Frühstadium eines möglichen Vitamin-B₁₂-Mangels [21].

Eine vergleichbare Studie untersuchte die relative Wirksamkeit von sublingual (SL) gegenüber oral (PO) verabreichtem Vitamin-B-Komplex auf das Serum-Hcy bei 41 Probanden im Alter zwischen 50 und 80 Jahren. Der Vitamin B-Komplex bestand aus 1.000 µg Vitamin B₁₂ Methyl-Cbl, 400 µg Folat (als Folsäure) und 5 µg Vitamin B₆ (als Pyridoxin-HCl) [22]. Probanden in der Gruppe SL erhielten einen sublingual verabreichten Vitamin-B-Komplex und ein passendes orales Placebo. Personen in der Gruppe PO erhielten einen oral zugesetzten Vitamin-B-Komplex und ein passendes sublingual verabreichtes Placebo. Es ließ sich eine signifikante Verringerung der Hcy-Konzentrationen in beiden Gruppen nach Beendigung des 6-Wochen-Protokolls im Vergleich mit den Ausgangswerten beobachten. Zusammenfassend war in dieser Studie kein Unterschied in der Wirksamkeit zwischen den beiden Methoden der Lieferung des Vitamin-Komplexes beobachten [22].

Die Möglichkeit der Vitamin-B₁₂-Zufuhr über passive Diffusion führte zu der Überlegung, eine mit Vitamin B₁₂ angereicherte Zahncreme zu entwickeln [21]. Im Jahr 2001 wurde am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Universität Magdeburg eine placebokontrollierte Studie durchgeführt, die die Wirkung einer mit Vitamin B₁₂, Folat und

Vitamin B₆ angereicherten Zahncreme über einen Interventionszeitraum von vier Wochen untersuchte. Die Probanden der Verum-Gruppe wiesen nach Ende der Intervention signifikant verringerte Hcy-Spiegel ($-0,9 \pm 1,0 \mu\text{mol/l}$) sowie einen um 60 % angestiegenen Serum-Vitamin-B₁₂-Spiegel auf. Bei den Probanden der Kontrollgruppe zeigten sich keine Veränderungen hinsichtlich des Hcy-Spiegels. Die Vitamin B₆-Werte hatten sich in beiden Gruppen nicht verändert [23]. Die Zahncreme war mit 100 $\mu\text{g/g}$ Vitamin B₁₂ angereichert. Rechnerisch gelangten dadurch bei der üblichen Nutzungsmenge von 1,27 g Zahncreme pro Tag [24] 127 μg Vitamin B₁₂ in die Mundhöhle. Da bei jedem Putzvorgang etwa 50 mg Zahncreme verschluckt werden [25], ergeben sich bei zweimaligem Zähneputzen täglich 100 mg Zahncreme mit 10 μg Vitamin B₁₂ pro Tag, welche in den Gastrointestinaltrakt gelangen. Bei Betrachtung der tatsächlichen Resorption, ergibt sich daraus folgendes: In der Mundhöhle verbleiben 1,17 g Zahncreme mit 117 μg Vitamin B₁₂. Davon werden von Probanden, die das Vitamin B₁₂ über IF nicht aufnehmen können, etwa 1,17 μg Vitamin B₁₂ durch passive Diffusion resorbiert (Resorptionsrate = 1 %). Es kann davon ausgegangen werden, dass mit täglichen Aufnahmemengen von etwa 1 μg Vitamin B₁₂, bei völliger Bioverfügbarkeit, der Minimalbedarf des Menschen zu decken ist [18]. Diese Menge würde bereits über die passive Diffusion des aus der Zahncreme in der Mundhöhle verbleibenden Vitamin B₁₂ erreicht. Bei Voraussetzung des ausreichenden Vorhandenseins von IF entspräche die aktive Resorption des Vitamin B₁₂, welches durch das Verschlucken von Zahncreme in den Gastrointestinaltrakt gelangt, etwa 1,5 μg [18]. Somit ergibt sich aus der passiven Diffusion von 1,17 μg und der aktiven Resorption von 1,5 μg eine rechnerische Aufnahmemenge von 2,67 μg pro Tag, die den angenommenen Mindestbedarf auf jeden Fall abdeckt. Eine mit Vitamin B₁₂ angereicherte Zahncreme könnte somit eine praktikable Möglichkeit der Supplementierung darstellen, um die Vitamin-B₁₂-Versorgung vegetarisch und vegan lebender sowie älterer Menschen zu verbessern [26].

1.1.7 Ausscheidung von Vitamin B₁₂

Die renale Ausscheidung von Vitamin B₁₂ bei normaler Aufnahme ist sehr gering. Je höher der Aufnahme ist, umso mehr wird renal eliminiert, da die renale Retentionskapazität überschritten wird. Nach Aufnahme von 1.000 μg Vitamin B₁₂ werden beispielsweise von den resorbierten 9,6 μg Vitamin B₁₂ noch 94 % (9,06 μg) retiniert und 6 % (0,54 μg) renal (über die Nieren) eliminiert. Das mit der Gallenflüssigkeit ausgeschiedenen Vitamin B₁₂ wird nahezu vollständig wieder im terminalen Ileum rückresorbiert [27-29].

1.1.8 Bedeutung des HoloTC

Neben der MMA- und Hcy-Bestimmung ist HoloTC ein hoch sensitive Biomarker bei der Diagnostik eines möglichen Vitamin-B₁₂-Mangels. HoloTC als biologisch aktive Form spiegelt den Intrazellulären Speicher des Vitamin B₁₂ und stellt insgesamt 10 - 30 % des zirkulierende Vitamin B₁₂ dar (Abb. 4) [30]. Der größte Anteil des Cbl ist an Transcobalamin (Haptocorrin) gebunden [30].

HoloTC hat eine Plasma-Halbwertszeit von ca. zwei Stunden. Ein verringerter Plasma-HoloTC-Spiegel gilt als frühester Indikator für eine Resorptionstörung.

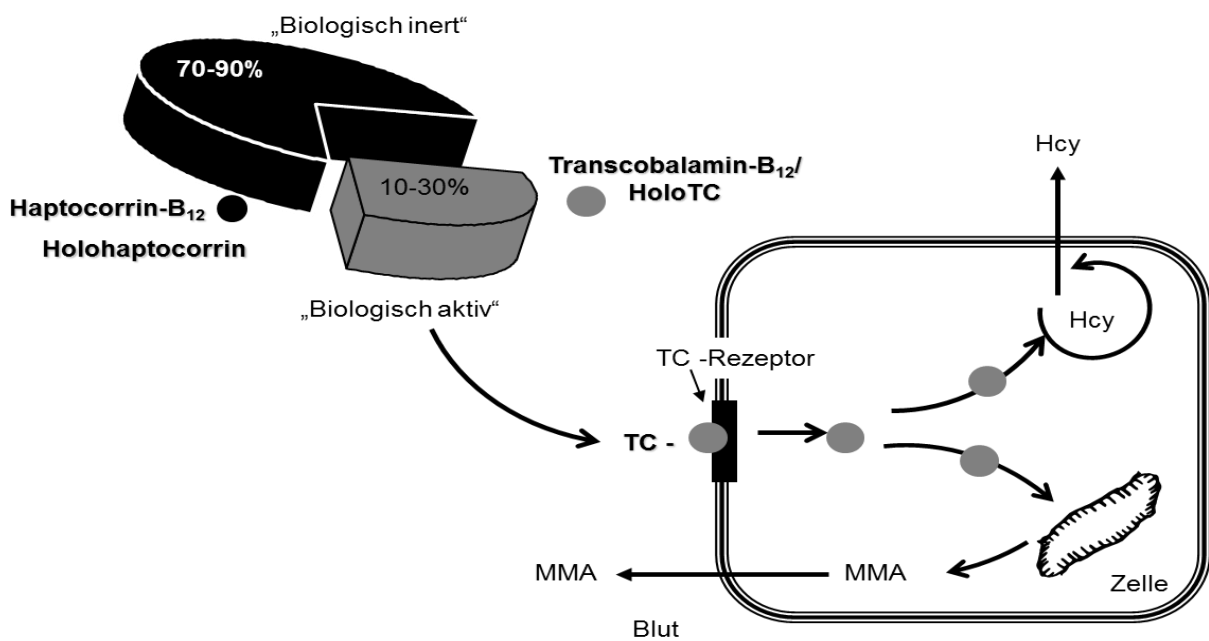


Abb. 4: Bestandteile des Gesamtcobalamins im Serum. (Cbl) Cobalamin, (TC) Transcobalamin, (HoloTC) Holotranscobalamin, (MMA) Methylmalonsäure (Hcy) Homocystein, (HC) Haptocorrin. Quelle: Obeid et al.

1.1.9 Referenzbereiche für Vitamin B₁₂

Die für den Vitamin-B₁₂-Status relevanten Referenzbereiche und empfohlene Zufuhrmengen sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengefasst.

Tabelle 2: Referenzbereiche für Vitamin B₁₂ im Plasma [31]

Vitamin B ₁₂	Plasma	Männer	154 - 467 pmol/l
		Frauen	170 - 517 pmol/l

Tabelle 3: Empfohlene Zufuhr von Vitamin B₁₂ (Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2016)

Gruppen	Vitamin B₁₂ µg/Tag
Säuglinge	
0 bis unter 4 Monate ^a	0,4
4 bis unter 12 Monate	0,8
Kinder	
1 bis unter 4 Jahre	1,0
4 bis unter 7 Jahre	1,5
7 bis unter 10 Jahre	1,8
10 bis unter 13 Jahre	2,0
13 bis unter 15 Jahre	3,0
Jugendliche und Erwachsene	
15 bis unter 19 Jahre	3,0
19 bis unter 25 Jahre	3,0
25 bis unter 51 Jahre	3,0
51 bis unter 65 Jahre	3,0
65 Jahre und älter	3,0
Schwangere	3,5
Stillende	4,0

^aHierbei handelt es sich um einen Schätzwert. Zur Auffüllung der Speicher und zur Erhaltung der Nährstoffdichte ca. 0,13 µg Vitamin-B₁₂-Zulage pro 100 g sezernierter Milch.

1.1.10 Klinische Symptome des Vitamin-B₁₂-Mangels

Insbesondere Senioren, Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen sowie Vegetarier weisen eine hohe Prävalenz für Vitamin-B₁₂-Mängel auf [32]. Gleiches gilt auch für Schwangere und Enteropathie-Patienten. Die durch einen Vitamin-B₁₂-Mangel bedingte Erhöhung der Hcy und Hypomethylierung können metabolische Störungen im Hinblick auf ein metabolisches Syndrom und damit verbunden kardiovaskuläre Risiken verstärkt auftreten. Vitamin-B₁₂-Mangel-assoziierte klinische Erscheinungsbilder sind neben der Bestimmung der Bio-Marker durch ein verändertes Blutbild mit erhöhtem MCV und MCH sowie Übersegmentierung der Neutrophilen gekennzeichnet (Abb. 5) [33].

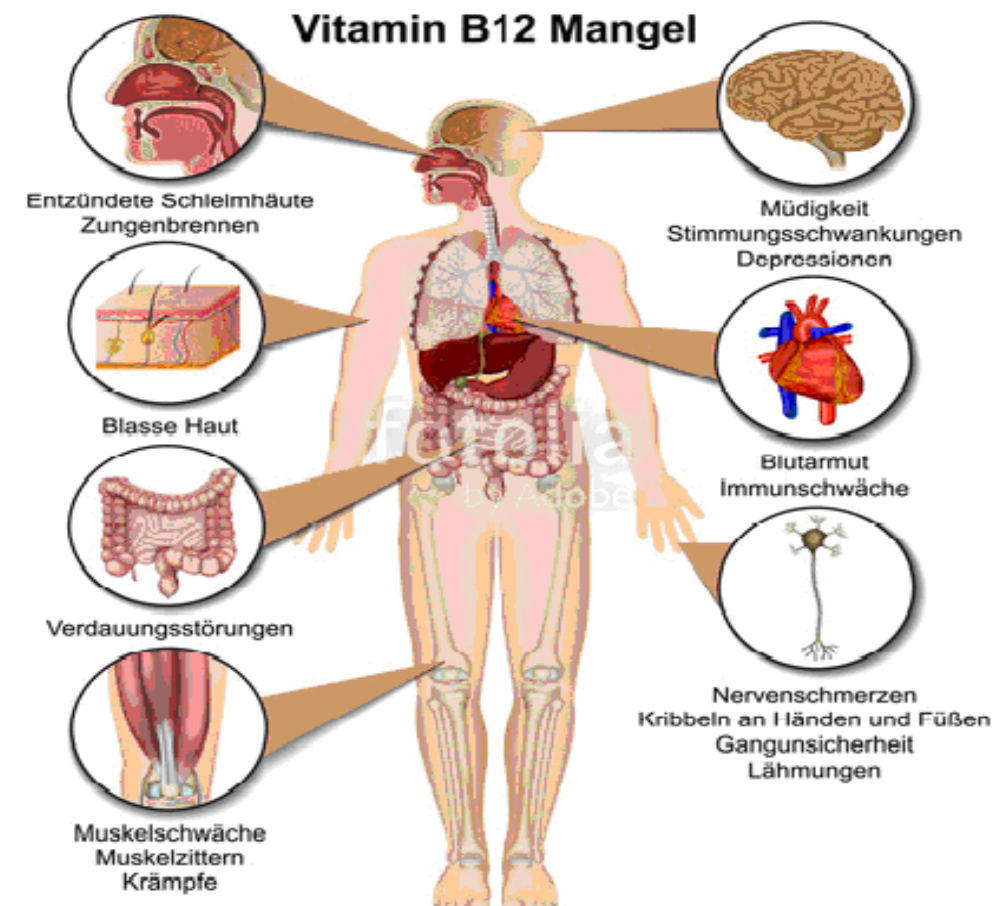


Abb. 5: Die häufigsten klinischen Beschwerdebilder bei manifestem Vitamin-B₁₂-Mangel. Quelle: https://gesundpedia.de/Vitamin_B

Gestörter Energiestoffwechsel (Erschöpfung und Müdigkeit, Konzentrationsschwäche, Muskelschwäche). **Nervenschäden** (Analgesie, Hypästhesien, Kribbeln, Lähmungen, Koordinationsstörungen, Gedächtnisstörungen). **Blutarmut** (Leistungsschwäche, Immunschwäche). **Störungen des Hormon- und Neurotransmitterstoffwechsels** (geistig-psychische Störungen, Depressionen, Psychosen). **Verdauungsstörungen** (Verstopfung, Durchfall). **Entzündungen** (Mund, Magen und Darm).

Die Prävalenz eines subklinischen funktionellen Vitamin-B₁₂-Mangels in der allgemeinen Bevölkerung ist bei Verwendung sensitiverer und spezifischerer Marker, wie MMA oder HoloTC, höher als bislang angenommen [34;35]. In der Bevölkerung liegt die Prävalenz eines Vitamin-B₁₂-Mangels bei jüngeren Personen zwischen 5 und 7 % [36;37]. Ein funktioneller Vitamin-B₁₂-Mangel (erhöhtes MMA und erniedrigtes HoloTC) ist im Alter weit verbreitet und wurde bei älteren gesunden Personen über 65 Jahre mit einer Prävalenz von 10 - 30 % diagnostiziert [34;35;38]. Von Senioren wurde auch berichtet, dass, obwohl die empfohlene tägliche Aufnahme von Vitamin B₁₂ (> 2,4 µg/Tag) meist erreicht wurde, eine hohe Prävalenz an leicht abnormalem Vitamin-B₁₂-Status vorlag (erhöhtes MMA und Homocystein), der nicht-diätetischen Ursachen (z. B. Malabsorption) zugeordnet wurde [39]. Bei älteren Patienten aus Straßburg mit Vitamin-B₁₂-Mangel wurde gezeigt, dass 53 % eine

Nahrungs-Vitamin B₁₂-Malabsorption aufwiesen, 33 % hatten perniziöse Anämie, in nur 2 % lag ein diätetisch bedingter Vitamin-B₁₂-Mangel vor und in 11 % war die Ätiologie des Vitamin-B₁₂-Mangels ungeklärt [40]. Es sollte aber erwähnt werden, dass aufgrund der niedrigen RDA (recommended dietary allowance) für Vitamin B₁₂ bei älteren Menschen die diätetische Insuffizienz unterbestimmt ist. In Tabelle 4 sind die Risikopopulationen mit hoher Frequenz an Vitamin-B₁₂-Mangel aufgelistet.

Tabelle 4: Risikopopulationen mit höherer Häufigkeit an Vitamin B₁₂-Mangel [41]

Gruppe	Ursachen und Bemerkungen
Vegetarische, vegane und makrobiotische Diät	Niedrige Vitamin B ₁₂ -Aufnahme mit der Nahrung
Hyperhomocysteinämie, Homocystinurie	B-Vitaminmangel, ältere Menschen, Dialysepatienten
Neugeborene und gestillte Kleinkinder von vegetarischen Müttern	Niedrige Vitamin B ₁₂ -Aufnahme mit der Muttermilch
Alte Menschen	Perniziöse Anämie, Achlorhydrie, gastrointestinale Erkrankungen verursachen Malabsorption von Cobalamin (Magen-/Darm-Operationen, Gastritis, Atrophie, bakterielle Überwucherung des Darms, Arzneimittel-Vitamin-Wechselwirkungen, Alkohol)
Chronisch-atrophische Corpus-Gastritis	Malabsorption von Vitamin B ₁₂
Erkrankungen des terminalen Ileum	M. Crohn, Lymphome des Ileum, Ileumsekretion, bakterielle Überwucherung des Ileum
Pankreasinsuffizienz	
Chronische Leber- und Nierenerkrankungen	
Makrozytäre Anämie	Niedrige Vitamin B ₁₂ -Aufnahme oder perniziöse Anämie
Chronischer Alkoholismus	Niedrige Vitamin B ₁₂ -Aufnahme, Störung der Vitamin B ₁₂ -Absorption
Medikamente	Protonenpumpen-Hemmer, H ₂ -Rezeptor-Antagonisten, Distickstoffoxid (Lachgas)-Inhalation
AIDS-assoziierte Myelopathie	Abnormale Vitamin B ₁₂ -abhängige Transmethylierung

1.1.11 Vitamin-B₁₂-assoziierte neurologische und psychiatrische Störungen

Vitamin B₁₂ spielt eine wichtige Rolle für die Funktion des Nervensystems. Im Vordergrund der neurologischen Symptome bei manifestem Vitamin-B₁₂-Mangel stehen Parästhesien, Hypästhesie der oberen und unteren Extremitäten, Ataxie und Koordinationsstörungen bis hin zu Lähmungen. Diese Symptome sind Ausdruck der funikulären Myelose (funikuläre Spinalerkrankung, subakute kombinierte Degeneration (SCD) des Rückenmarks). Es wird davon ausgegangen, dass etwa 60 % aller Patienten mit klinisch manifester perniziöser Anämie Symptome einer funikulären Myelose aufweisen. Die neurologischen bzw. psychiatrischen Defizite entstehen auf dem Boden einer kombinierten Degeneration der Seiten- und Hinterstränge des Rückenmarkes durch einen Defekt der Myelinscheiden. Es kommt zu einer Entmarkung bzw. Zerstörung der Myelinscheiden in den Hinterstrangbahnen, welche die taktile Wahrnehmung und Propriozeption vermitteln, in den Kleinhirnseitenstrangbahnen und der Pyramidenbahn des Rückenmarks (Abb. 6) [42-44]

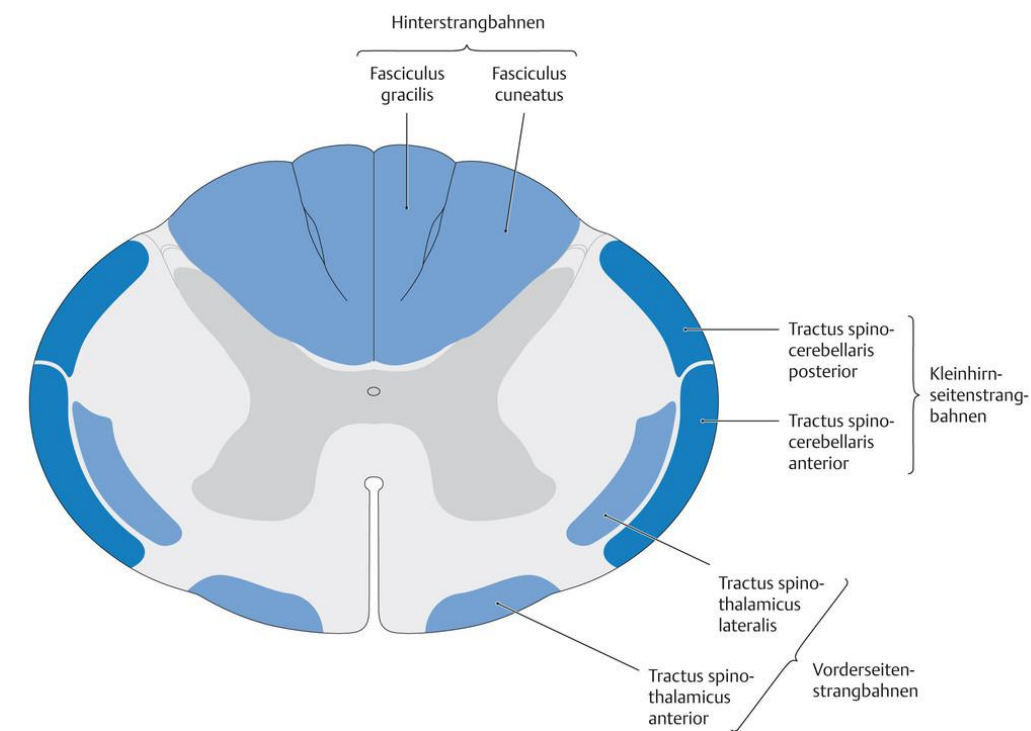


Abb. 6: Rückenmark-Querschnitt. Thieme-Verlag Neuroanatomie <https://eref.thieme.de/G7CPJ>

1.1.12 Bedeutung von Vitamin B₁₂ für diabetische Neuropathien

Bei jedem dritten Diabetes-Patienten entsteht eine sogenannte diabetische Neuropathie. Diese tritt häufig als Polyneuropathie der peripheren Nerven, besonders an den Füßen und Händen, auf. Die sogenannte periphere sensomotorische Polyneuropathie (PNP) tritt meist symmetrisch an beiden Füßen auf. Der genaue Entstehungsmechanismus der diabetischen Neuropathie ist bislang unklar. Es wird davon ausgegangen, dass die PNP durch

hyperglykämischen BZ-Verläufe und Medikamente induziert ist [45]. Vitamin B₁₂ wird bei diabetischer Neuropathie neben der analgetischen Therapie als Therapeutikum eingesetzt. Hier zeigen sich sowohl orale Präparate als auch Injektionen als wirksam [46-50].

1.1.13 Vitamin B₁₂ und Depression

Ein Vitamin-B₁₂-Mangel ist häufig mit Depression assoziiert [51]. Auch wurde diesbezüglich unter Verabreichung von Vitamin B₁₂ als Therapeutikum eine Verbesserung beobachtet [52;53]. In einer Metaanalyse aus dem Jahr 2015 zeigte sich ein positiver Effekt [54]. Als Therapieoption bei depressiven Episoden stellt sich die Kombination von Vitamin B₁₂ und Folat als wichtiger therapeutischer Ansatz dar. Es wird davon ausgegangen, dass bei Depressionen eine mögliche Mutation vorliegt, welche die Umwandlung der Folsäure in Folat stark beeinflusst [55-57]. Patienten mit MTHFR-Mutation sind auf Folat in der aktiven Form Methylfolat (L-5-MTHF) angewiesen; dieses zeigte einen positiven Effekt bei Depressionstherapie [58].

1.1.14 Diagnostik des Vitamin-B₁₂-Mangels

Beim Verdacht auf Vitamin-B₁₂-Mangel ist eine Stufendiagnostik von Bedeutung. In mehreren Studien zeigte sich, dass die Bestimmung von HoloTC ein sensitiver Indikator für einen Vitamin-B₁₂-Mangel darstellt, im Vergleich zur Bestimmung des Gesamt-Vitamin-B₁₂. Hierbei ist auch die Bestimmung von MMA bei Vorliegen eines Vitamin-B₁₂-Mangels aussagekräftig. Bei einem Vitamin-B₁₂-Mangel lässt sich eine erniedrigte HoloTC- und eine erhöhte MMA-Konzentration feststellen. Zunächst sollten Gesamt-Vitamin-B₁₂ und HoloTC und anschließend MMA bestimmt werden, da ein erniedrigter HoloTC- und ein erhöhter MMA-Spiegel als sensitive aussagekräftige Marker für einen Vitamin-B₁₂-Mangel gelten (Tabelle 5 und 6) [32;33;59].

Der Anstieg des MMA-Spiegels bei einem Vitamin-B₁₂-Mangel kommt dadurch zustande, dass der Abbau von D-Methylmalonyl-CoA über L-Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA gehemmt wird, welches wiederum eine von Vitamin B₁₂ abhängige Transferase ist. In diesem Zusammenhang wird bei Vitamin-B₁₂-Mangel L-Methylmalonyl-CoA zu D-Methylmalonyl-CoA zu MMA umgewandelt (Abb. 7). Zur Bestimmung eines klinisch manifesten Vitamin-B₁₂-Mangels ist die Messung von HoloTC und Gesamt-Vitamin-B₁₂ im Serum zunächst ausreichend und zufriedenstellend, jedoch liefert dies keine zufriedenstellende Daten für die Früherkennung eines subklinischen Vitamin-B₁₂-Mangels [60]. In Abb. 8 ist eine schematische Basisdiagnostik bzw. ein Algorithmus der Vitamin-B₁₂-Mangel-Vorsorge dargestellt.

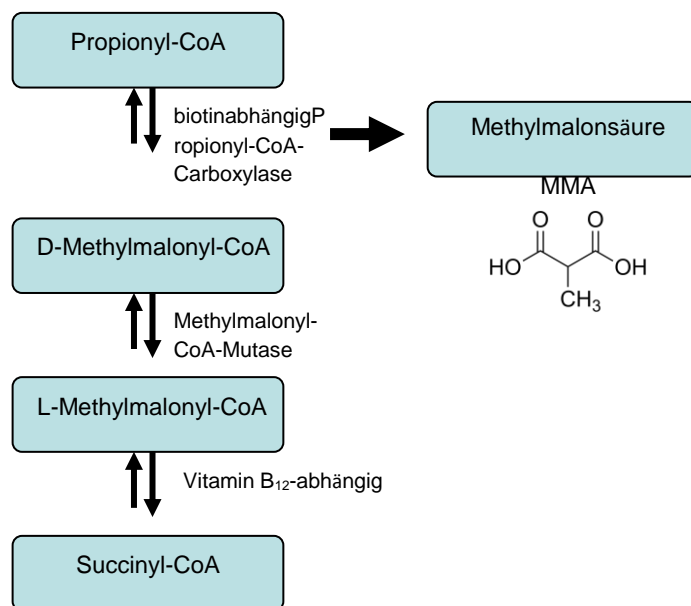


Abb. 7: Schematische Darstellung der Umwandlung von D-Methylmalonyl-CoA zu L-Methylmalonyl-CoA und zu Succinyl-CoA. Beim Fehlen von Vitamin B₁₂ wird Propionyl-CoA zu Methylmalonsäure MMA umgewandelt. Quelle: Eigene Darstellung nach www.viamedici.thieme.de

Tabelle 5: Alters- und geschlechtsspezifische Referenzbereiche für Serum Vitamin B₁₂

Alter (Jahre)	weiblich		männlich	
	ng/l	pmol/l	ng/l	pmol/l
< 1	228 - 1.515	168 - 1.115	293 - 1.210	216 - 891
2 - 3	416 - 1.210	307 - 892	264 - 1.215	195 - 897
4 - 6	313 - 1.410	231 - 1.040	245 - 1.075	181 - 795
7 - 9	247 - 1.175	182 - 866	271 - 1.170	200 - 863
10 - 12	196 - 1.020	145 - 752	183 - 1.090	135 - 803
13 - 18	182 - 820	134 - 605	214 - 864	158 - 638
Erwachsene	211 - 911	156 - 672	211 - 911	156 - 672

Vitamin-B₁₂-Mangel bei 45 Patienten mit gesicherter Diagnose (95 %-Bereich): 32 - 246 ng/l (24 - 181 pmol/l). Umrechnungsfaktor: ng/l x 0,738 = pmol/l. Werte für Kinder und Jugendliche beziehen sich auf Radioimmunoassay, für Erwachsene auf Chemolumineszenz-Immunoassay [41;61].

Tabelle 6: Referenzbereiche für weitere relevante Marker des Vitamin-B₁₂-Status

Serum marker	Referenz
MMA	≤ 271 nmol/l
HoloTC	≥ 35 pmol/l

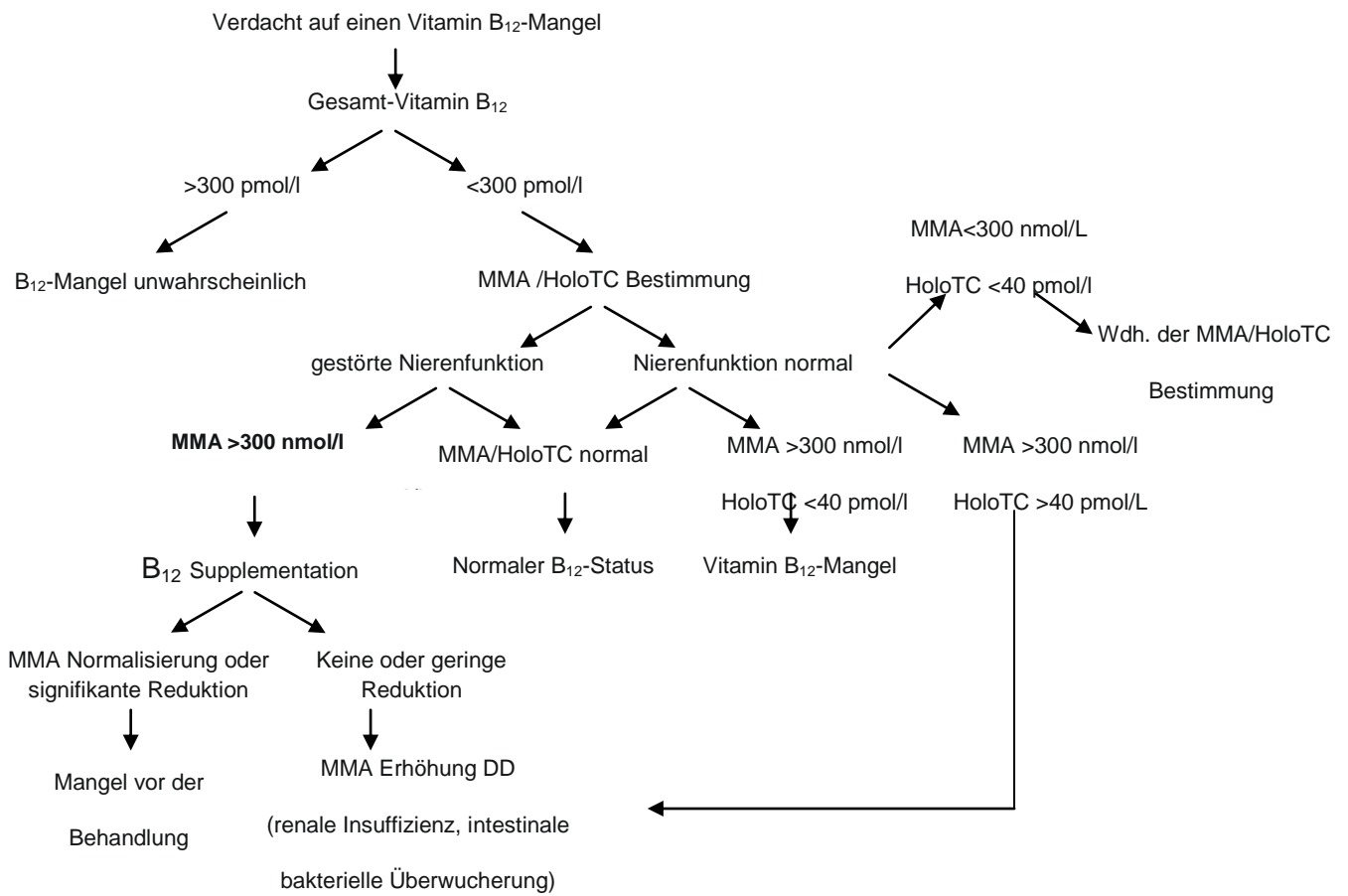


Abb. 8: Schematische Basisdiagnostik bzw. Algorithmus des Vitamin B₁₂-Mangels. Quelle: Obeid et al.

1.1.15 Diagnostische Aussagekraft der Parameter (Vitamin B₁₂, HoloTC, MMA)

Die diagnostische Sensitivität und Spezifität der Bestimmung von Vitamin B₁₂ ist nicht befriedigend. Vor allem im unteren Konzentrationsbereich ist die diagnostische Aussagekraft niedrig [32;62]. Insgesamt zeigten etwa 25 % der Patienten mit erniedrigtem Vitamin B₁₂ < 148 pmol/l (< 200 ng/l) klinisch keine relevanten Zeichen eines Vitamin-B₁₂-Mangels [63]. Bei Verwendung von MMA als Marker eines funktionellen Vitamin-B₁₂-Mangels hatten 90 - 95 % der Patienten mit erhöhtem MMA auch erniedrigtes Vitamin B₁₂ [64]. In Untersuchungen an Vegetariern war die diagnostische Effizienz einen Vitamin-B₁₂-Mangel zu entdecken bei Anwendung der MMA-Bestimmung etwa 40 % höher als bei Nutzung des konventionellen Vitamin-B₁₂-Tests [32]. In diesem Zusammenhang fand sich im diagnostischen Vergleich von MMA mit HoloTC eine hohe Übereinstimmung [65;66]. Die diagnostische Sensitivität und Spezifität lagen für HoloTC signifikant höher als für Gesamt-Vitamin-B₁₂. Mit dem Alter war eine deutliche Zunahme des Vitamin-B₁₂-Mangels zu verzeichnen [34]. An älteren Personen [Median Alter 82 (69 - 92) Jahre] wurden erniedrigte Vitamin-B₁₂-Konzentrationen in 7 %, aber pathologische HoloTC-Konzentrationen in 21 % und hohe MMA-Werte in 42 % der Fälle gemessen [37]. Neben den Senioren sind vor allem Vegetarier und Patienten mit Nierenerkrankungen von einer hohen Prävalenz an Vitamin-B₁₂-Mängeln betroffen [32]. Bei Vegetariern ist die Prävalenz an abnormalem Vitamin B₁₂, MMA oder HoloTC von der Dauer wie auch von der Strenge der vegetarischen Diät abhängig [32;67]. Schwangere und stillende Frauen weisen einen besonderen Vitaminverbrauch auf, daher gehören sie zu den Menschen mit einem hohem Risiko, an Vitamin-B₁₂-Mangel zu leiden. Weitere Risikogruppen sind auch immunabgeschwächte Patienten, zum Beispiel durch Autoimmunerkrankungen oder HIV-Infektionen. Durch die Einnahme von Protonenpumpen-Hemmern kann es ebenfalls zu einem Vitamin-B₁₂-Mangel kommen [32]. Bei Untersuchung von gastrektomierten Patienten (n = 128) hatten 25 % ein HoloTC < 42 pmol/l, aber nur 7,8 % hatten ein Gesamt-Vitamin-B₁₂ von < 139 pmol/l [68]. Weiterhin zeigte sich, dass von diesen Patienten mit grenzwertigem Gesamt-Vitamin-B₁₂ (139 - 295 pmol/l) bereits 44 % ein erniedrigtes HoloTC (< 42 pmol/l) aufwiesen. Im Rahmen einer statistischen Arbeit, die bei älteren Menschen insbesondere den Zusammenhang der Diagnostik möglicher funktioneller Vitamin-B₁₂-Mangel im Hinblick auf Korrelation mit Niereninsuffizienz in zunehmenden Alter untersuchte, zeigte sich bei älteren Patienten mit erhöhtem Kreatinin bzw. erniedrigter GFR erhöhte MMA als sensitiver Marker des funktionellen Vitamin-B₁₂-Mangels [34] (Abb. 9).

MMA ist höher bei älteren Menschen

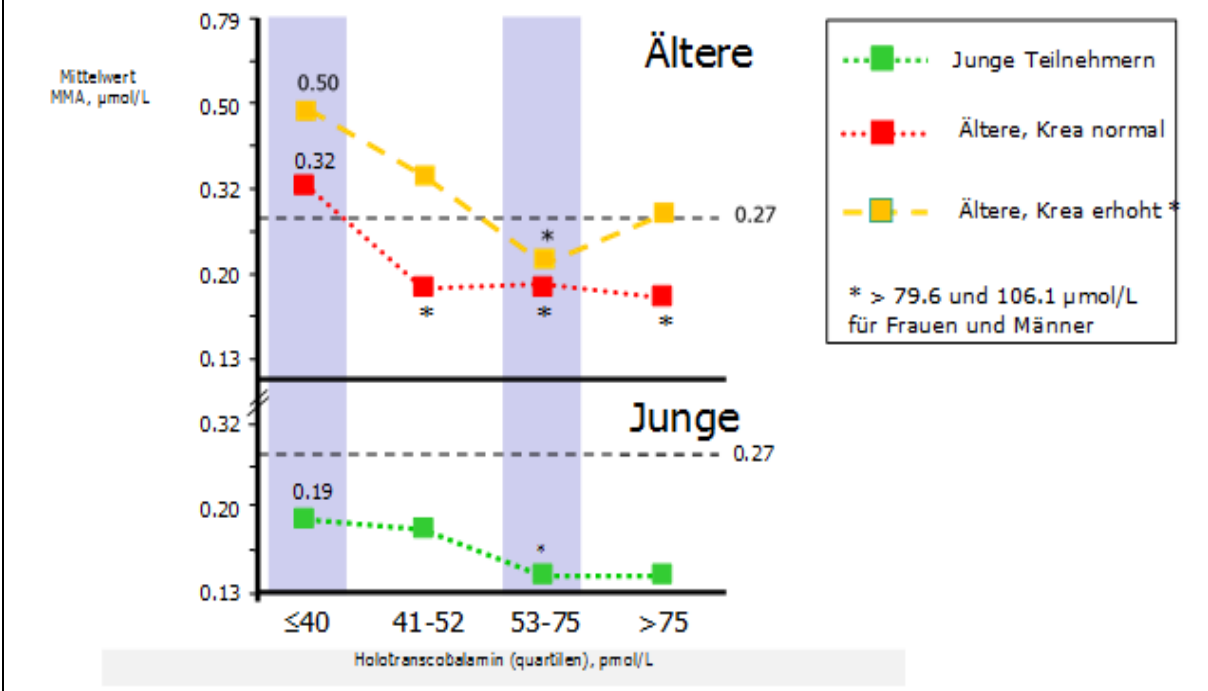


Abb. 9: R.Obeid, H.Schorr, R.Eckertand W.Herrmann (2004) Clin Chem 50, 238-24.

1.2 Folate

1.2.1 Struktur des Folats

Folat gehört von der Grundstruktur gesehen zur Gruppe der B-Vitamine. Bei den Ein-Kohlenstoff-Übertragungen spielt Folat als Co-Faktor eine wichtige Rolle und ist für die DNA-Biosynthese unerlässlich. Folat wird bei der Remethylierung von Hcy zu Meth benötigt. Es ist ein wasserlösliches Molekül, welches aus einem Pteridinkern (2-Amino-4-hydroxypteridin), p-Aminobenzoessäure und L-Glutamat (mit 1 bis 9 Glutaminresten) aufgebaut ist. Als Folate werden die Derivate bezeichnet, die sich vom Grundskelett des Folats ableiten (Abb. 10). 5,6,7,8-Tetrahydrofolat (THF) ist die biologisch aktive Form des Folats [69].

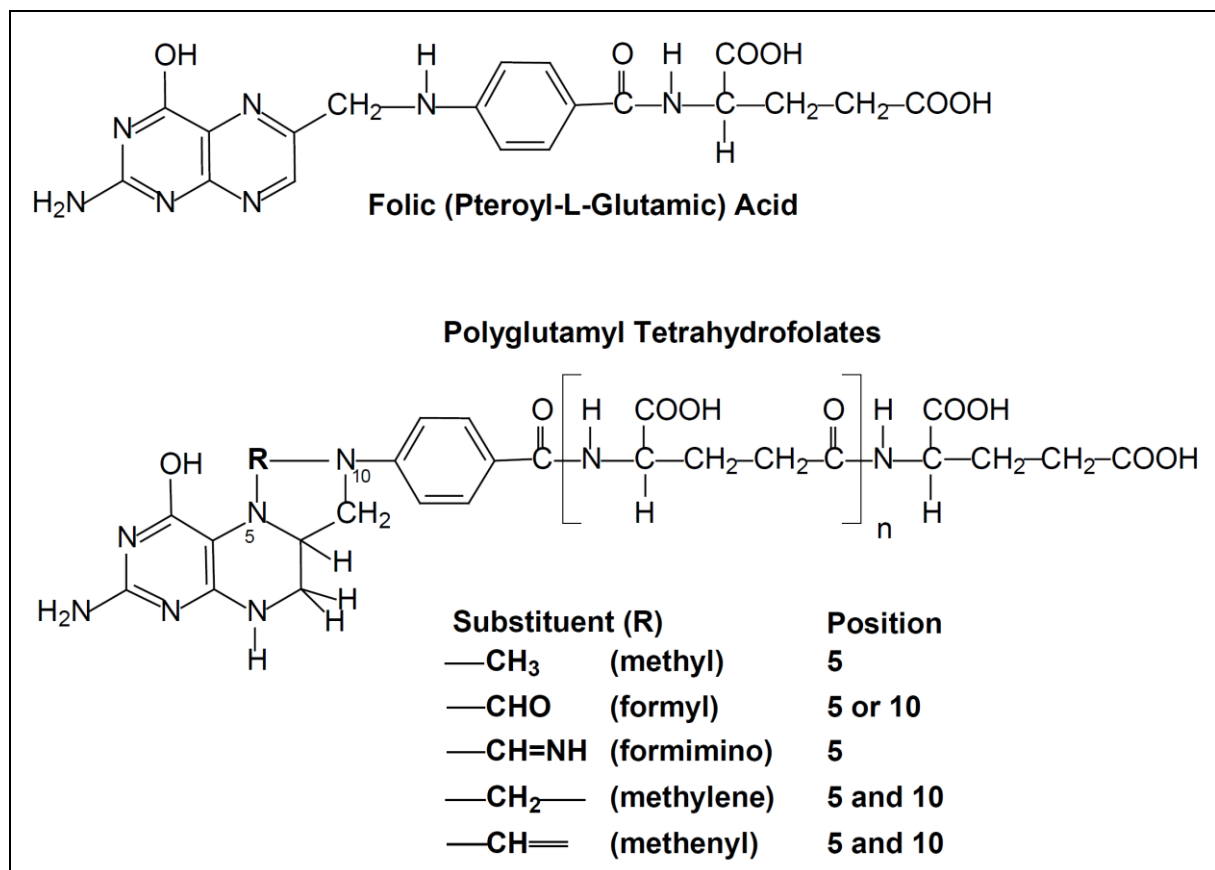


Abb. 10: Struktur von Folat [70].

1.2.2 Bedeutung der Folate im Stoffwechsel

THF ist ein wichtiges Koenzym mit zentraler Bedeutung als C1-Akzeptor im sogenannten C1-Transfer (Abb. 11). Es ist für die DNA-Synthese, die Remethylierung von Hcy zu Met, die Synthese von Glycin und Serin und den Histidinstoffwechsel unerlässlich [14].

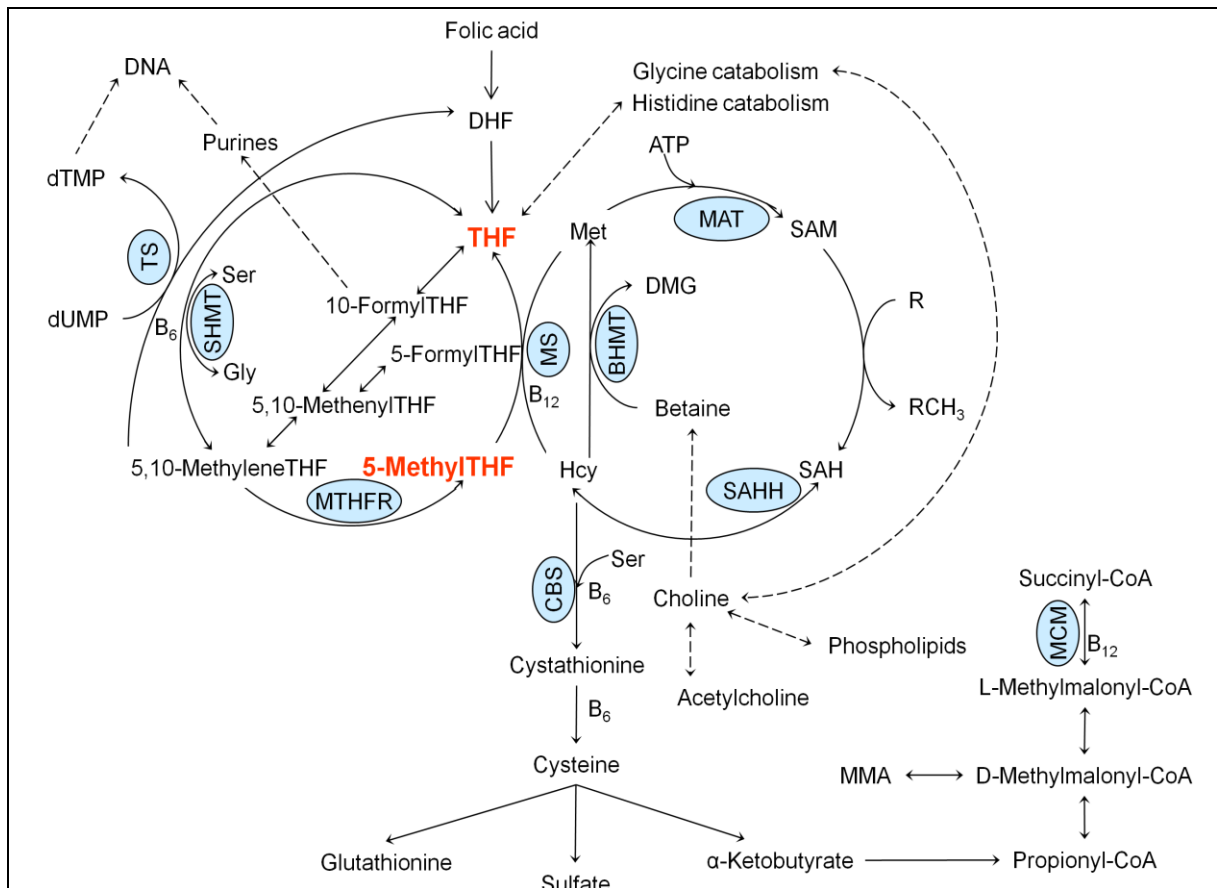


Abb. 11: Folat- und C1-Metabolismus. BHMT: Betain-Homocystein-Methyltransferase; CBS: Cystathionin-β-synthase; DHF: Dihydrofolat; DMG: Dimethylglycin; dTMP: Desoxythymidin-Monophosphat; dUMP: Desoxyuridine-Monophosphat; Gly: Glycin; Hcy: Homocystein; MS: Methionin-Synthase; MAT: Methionin-Adenosyltransferase; MCM: L-Methylmalonyl-CoA-Mutase; Met: Methionin; MMA: Methylmalonsäure; MTHF: Methyl-Tetrahydrofolat, MTHFR: 5,10-Methyl-Tetrahydrofolat-Reduktase; SAH: S-Adenosyl-Homocystein; SAHH: S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase; SAM: S-Adenosyl-Methionine; Ser: Serin; SHMT: Serin-Hydroxy-Methyltransferase; THF: Tetrahydrofolat; TS: Thymidylat-Synthase. –Quelle: Herrmann W. et al. 2013. Uni-Med Verlag AG

In der Zelle fungiert 5-Methyl-THF als Methylgruppendedor für die Remethylierung von Hcy zu Methionin und wird selbst zu THF. Meth ist der Antrieb für die Synthese von SAM (S-Adenosylmethionin), dem wichtigsten Methylgruppendedor für DNA, RNA, Proteine und Phospholipide. Bei Folatmangel wird weniger Meth produziert, was zu verminderten Konzentrationen von SAM führt. Ein Mangel an SAM führt zur Hypomethylierung. THF, welches nach der Demethylierung von 5-Methyl-THF entsteht, wird in mehreren Reaktionen als Substrat benutzt. Es kann in 10-Formyl-THF umgewandelt werden. Diese Reaktion wird durch das Enzym Methyltetrahydrofolatdehydrogenase (MTHFD) katalysiert. Die MTHFD katalysiert weiterhin die reversible Reaktion von 10-Formyl-THF zu 5,10-Methenyl-THF und dieses wiederum weiter zu 5,10-Methylen-THF [71]. Der Folatmetabolismus stellt Einkohlenstoffeinheiten zur Synthese der Purine Adenin und Guanin zur Verfügung, welche Bausteine der DNA sind. Ein weiterer DNA-Baustein ist das Pyrimidin Thymin, dessen

Synthese durch die Thymidilatsynthase katalysiert wird. In dieser Reaktion überträgt 5,10-Methylen-THF seine Methylengruppe auf dUMP. Es entsteht dTMP und Dihydrofolat (DHF). Durch die als Hilfsenzym wirkende Dihydrofolatreduktase wird DHF mithilfe von NADPH+H⁺ wieder in THF umgewandelt. THF kann unter Katalyse der Serin-Hydroxymethyl-Transferase einen CH₂OH-Rest des Serins aufnehmen und liegt nach Wasserabspaltung wieder als 5,10-Methylen-THF vor. Für beide Enzyme ist das Vorhandensein von Vitamin B6 als Co-Faktor wichtig. Hier wird deutlich, dass die Geschwindigkeit des Thyminstoffwechsels eng mit dem Folatstoffwechsel verknüpft ist. Bei jeder Verminderung des Folatangebotes bzw. der zur Verfügung stehenden Folate, muss es zu einer Störung der Thyminnukleotid-Biosynthese und damit der DNA-Replikation kommen. Ein Mangel an Thymin führt zum fälschlichen Einbau von Uracil in die DNA während der Replikation [72]. Dieser wiederum führt zu vermehrten Doppelstrangbrüchen und kann bei der notwendigen Basenexzisionsreparatur zur Induktion von Punktmutationen führen [73]. 5,10-Methylen-THF wird letztlich durch die MTHFR reduziert zu 5-Methyl-THF [69].

1.2.3 Referenzwerte für Folate im Plasma

Die Referenzwerte für Folate im Plasma werden in Europa und den USA unterschiedlich angegeben [74] (Tabelle 7). Bei Folatspiegeln im Plasma, die sich an der unteren Grenze der europäischen Referenzwerte befinden, kann ein Folatmangel nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 7: Referenzwerte für Plasma Folate im Vergleich: USA – Europa

Folate	USA	4,2 - 19,9 µg/l
	Europa	2,0 - 9,1 µg/l

Folate: 5-MethylTHF, 5-FormylTHF, 5,10-MethenylTHF, THF, Folsäure, Eigene Darstellung nach www.dge.de

Die gravierenden Unterschiede in den angegebenen Referenzwerten lassen sich auf den unterschiedlichen Ernährungsstatus der beiden Bevölkerungsgruppen zurückführen.

1.2.4 Folatversorgung durch Nahrungsmittel

Folate weisen eine um 30 - 80 % eingeschränkere Bioverfügbarkeit auf als Folsäure. Der empfohlene tägliche Bedarf für Erwachsene liegt bei 400 µg (DGE). Durch eine mittlere tägliche Zufuhr von 400 µg Folsäure können folatabhängige Stoffwechselwege optimiert, Neuralrohrdefekte eradiert und funktionelle Störungen, wie Hyperhomocysteinämie (HHcy) und Anämie, minimiert werden. In Mitteleuropa liegt die derzeitige tägliche Aufnahme mit durchschnittlich 197 - 235 µg für Männer und 168 - 214 µg für Frauen (Tabelle 8) [75;76] deutlich unter den anzustrebenden Werten. Die empfohlenen Mengen können von einem Großteil der Bevölkerung nicht über die Nahrung gedeckt werden [77]. In den USA und benachbarten Ländern unterscheidet sich aufgrund der Lebensmittelanreicherung mit Zusatzstoffen die Menge der über die Nahrung aufgenommenen Folsäure im Vergleich zu europäischen Ländern. In Deutschland wird die verpflichtende Lebensmittelanreicherung von Grundnahrungsmitteln noch kontrovers diskutiert [74].

Tabelle 8: Über Nahrung aufgenommene Folate bei Mitteleuropäern

		aus Nahrung/d	empfohlen/d
Folate	Männer	168 - 214 µg	400 µg
	Frauen	197 - 235 µg	400 µg

Folate = 5-MethylTHF, 5-FormylTHF, 5,10-MethenylTHF, THF. Eingendarstellung Quelle: www.dge.de

1.2.5 Lebensmittel als Folatquellen

Folate kommen sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Lebensmitteln vor und liegen als Pteroylmonoglutamate vor. Leber, Gemüse, Getreide, Nüsse, Hülsenfrüchte und Sonnenblumen weisen einen hohen Gehalt an Folat auf [78]. Folate sind hitzeempfindlich und wasserlöslich, daher wird davon ausgegangen, dass bei der Lebensmittelzubereitung ein Drittel der Menge verloren geht [79].

1.2.6 Resorption der Folate im Darm und Aufnahme in den Blutkreislauf

Folate liegen zu 60 - 80 % als Polyglutamylfolate vor. Bevor die Folate in den proximalen Ileum gelangen, müssen sie im Doudenum zunächst enzymatisch aufgespalten bzw. hydrolysiert werden, um in den Enterozyten bzw. im Bürstensaum der Mukosazellen des Dünndarms absorbiert werden zu können (Abb. 12). Die Folattransporter 1 (Reduced-folate-carrier-1, RFC1) und protonengekoppelte Folattransporter (PCFT/HCP1) spielen eine unerlässliche Rolle bei der Folatabsorption in der Zellmembran der Mukosazellen [80]. Bis zu 20 - 30 % der Folate diffundieren passiv in die Darmmukosazellen. Gelangen die Folate durch den portalen Kreislauf in die Leber, werden sie dort methyliert. Im Blut findet sich hauptsächlich 5-Methyl-THF, welches an Albumin, α -2-Makroglobulin und Transferrin gebunden transportiert wird. Über ein membranständiges Transportsystem wird während der Erythropese 5-Methyl-THF in die Erythrozyten aufgenommen und gespeichert [14].

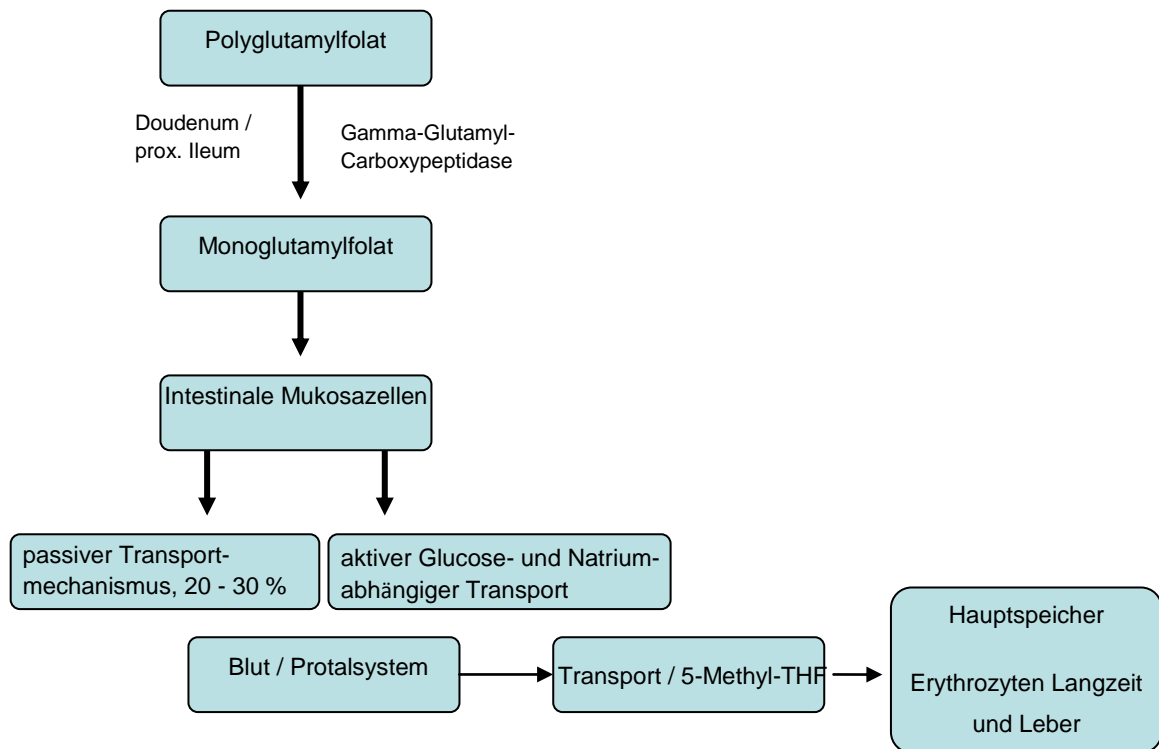


Abb. 12: Enterales Absorptionsschema der Folate. Eigene Darstellung Quelle: clinical consequences. Herrmann W. et al. 2013. Uni-Med Verlag AG.

1.2.7 Speicherformen der Folate im Körper

Der Hauptspeicher der Folate befindet sich in den Erythrozyten und wird als Langzeitspeicher angesehen, da die erythrozytäre Lebensdauer ca. 120 Tage beträgt. Die Folatspiegel-Bestimmung im Serum ist bei kurzzeitigen folatarmen Diäten oder einem kurzzeitigen Mangel sensibel im Vergleich zur erythrozytären Spiegelbestimmung. Ein Folatmangel liegt vor, wenn die Folatkonzentration im Serum $< 3,5 \mu\text{g/l}$ und in den Erythrozyten $< 250 \mu\text{g/l}$ beträgt [81].

1.2.8 Ausscheidung von Folat

Die mit der Galle ausgeschiedene Menge von 10 - 90 μg bzw. das bereits hydrolysierte Monoglutamylfolat unterliegt dem enterohepatischen Kreislauf. Somit wird der Großteil über die Galle ausgeschieden, welche wiederum nahezu vollständig in den Darm rückresorbiert. Bei chronischen Darmerkrankungen (CED) oder Darmresektion ist häufig mit Mangelerscheinung zu rechnen [28]. Daher spielt die biliäre Folatkonzentration zusammen mit dem intrazellulären Folatpool (in der Leber und extrahepatischen Geweben) eine wichtige Rolle [27;82].

Die physiologische Folatzufuhr liegt täglich bei 1 - 12 μg (ca. 10 - 20 % der absorbierten Menge an Folatmonoglutamat) in Form von Folsäure, 5-MTHF und 10-Formyl-THF werden renal eliminiert, der Großteil des Vitamins wird tubulär retiniert bzw. rückresorbiert [82]. Durch einen Folatmangel lässt sich die tubuläre Reabsorption erhöhen und die renale Ausscheidung senken [27;82]. Die mit den Fäzes (Stuhl) ausgeschiedene Menge ist schwer zu beurteilen. Dem liegt zugrunde, dass die nicht resorbierten und die möglicherweise mikrobiell synthetisierten Folate (in distalen Darmabschnitten) auch fäkal ausgeschieden werden. Es wird angenommen, dass die mit den Fäzes ausgeschiedenen Mengen um fünf- bis zehnfach höher sind als die Folatmengen, die sich in der aufgenommenen Nahrung befinden [28;83-85].

1.2.9 Klinische Symptome des Folatmangels

Kommt es zu einem klinisch bedeutsamen Folsäuremangel, sinkt zunächst die renale Elimination, gefolgt von einem erniedrigten Serumspiegel. Da dieser die erythrozytäre Langzeitspeicherform darstellt, erfolgt die Abnahme der Folatkonzentration erst vier Wochen später. Zu einer Blutbildveränderung kommt es frühestens nach zehn bis zwölf Wochen. Dabei zeigt sich im Differentialblutbild eine Übersegmentierung der neutrophilen Granulozyten, eine Thromboleukopenie und eine makrozytäre Anämie. Bei funktioneller

Mangelerkrankung an Folat und Vitamin B₁₂ ist die weitere Diagnostik klinisch bedeutsam hinsichtlich der megaloblastären Anämie und der damit verbundenen Gefahr der funikulären Myelose. Eine Folsäuresubstitution sollte immer im Zusammenhang mit einem Vitamin-B₁₂-Mangel abgeklärt werden [14]. Ein Folatmangel bei Schwangeren kann Neuralrohrdefekte beim Fetus hervorrufen [72].

1.3 Homocystein-Metabolismus im Zusammenhang mit Folat und Vitamin B₁₂

1.3.1 Bedeutung von Methionin im Homocystein-Metabolismus

Methionin wird dem Körper über tierisches Eiweiß zugeführt. Es handelt sich hierbei um eine essenzielle Aminosäure und einen wichtigen Methylgruppendonator für eine Vielzahl von Akzeptoren, wie Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA) und Kreatin-Synthese [86]. Der Tagesbedarf an Methionin für Erwachsene liegt bei ca. 13 mg pro kg Körpergewicht. Methionin entsteht durch Hcy-Methylierung (Abb. 11,13). Methionin aus der Nahrung wird durch Adenosyltransferase mit Adenosintriphosphat (ATP) verbunden und zu S-Adosylmethionin (SAM) umgewandelt, dabei ist die Methylgruppe des Methions leichter abzuspalten. SAM ist der wichtigste Methylgruppendonator. Es überträgt seine Methylgruppe leicht (Transmethylierung) und wird zu S-Adosylhomocystein (SAH) demethyliert. Unter physiologischen Rahmenbedingungen wird SAH durch SAH-Hydrolase reversibel zu Hcy und Adenosin gespalten (Abb. 11). Der SAM/SAH-Quotient wird als Indikator für die zelluläre Methylierungskapazität bzw. als „Methylierungs-Index“ bezeichnet. SAM hemmt die Methylentetrahydrofolatreduktase-Aktivität (MTHFR) [87] und SAH hemmt die Methyltransferasen-Aktivität [88]. SAM aktiviert die Cystathionin-β-Synthase (CBS) [89]. Niedrige SAM-Serumspiegel beeinflussen die Produktion von 5-Methyl-THF nicht, hohe SAM-Serumspiegel hingegen verschieben das Gleichgewicht der Reaktionen in Richtung Transsulfurierung von Hcy zu Cys [90].

Tabelle 9: Referenzwerte für SAM/SAH [91]

SAM	angesäuertes Plasma	74,4 - 96,6 nmol/l
SAH	angesäuertes Plasma	8,3 - 18,3 nmol/l

1.3.2 Bedeutung des Homocystein im Stoffwechsel

Homocystein (Hcy) ist stark zelltoxisch und die intrazelluläre Konzentration wird möglichst niedrig gehalten. Es kann durch Remethylierung zu Meth umgewandelt oder durch Transsulfurierung abgebaut werden [92] (Abb. 13).

Bei der Remethylierung wird eine von der 5-Methyl-THF zur Verfügung gestellte Methylgruppe mittels Vitamin B₁₂-abhängiger Methioninsynthese auf Hcy übertragen. Das Vitamin B₁₂ wird dabei als Co-Faktor in aktivierter Form (Methylcobalamin) benötigt. 5-Methyl-THF wird dann zu THF umgewandelt. Dabei wird Serin mittels Serinhydroxymethyltransferase zu Glycin umwandelt. Anschließend wird THF zu 5,10-Methylen-THF aufgebaut. Die 5,10-Methylen-THF-Reduktase reduziert 5,10-Methylen-THF zu 5-Methyl-THF, welches wiederum für den Remethylierungsweg zur Verfügung steht [92]. Dieser Schritt wird von SAM gehemmt [93] (Abb. 11 und 13).

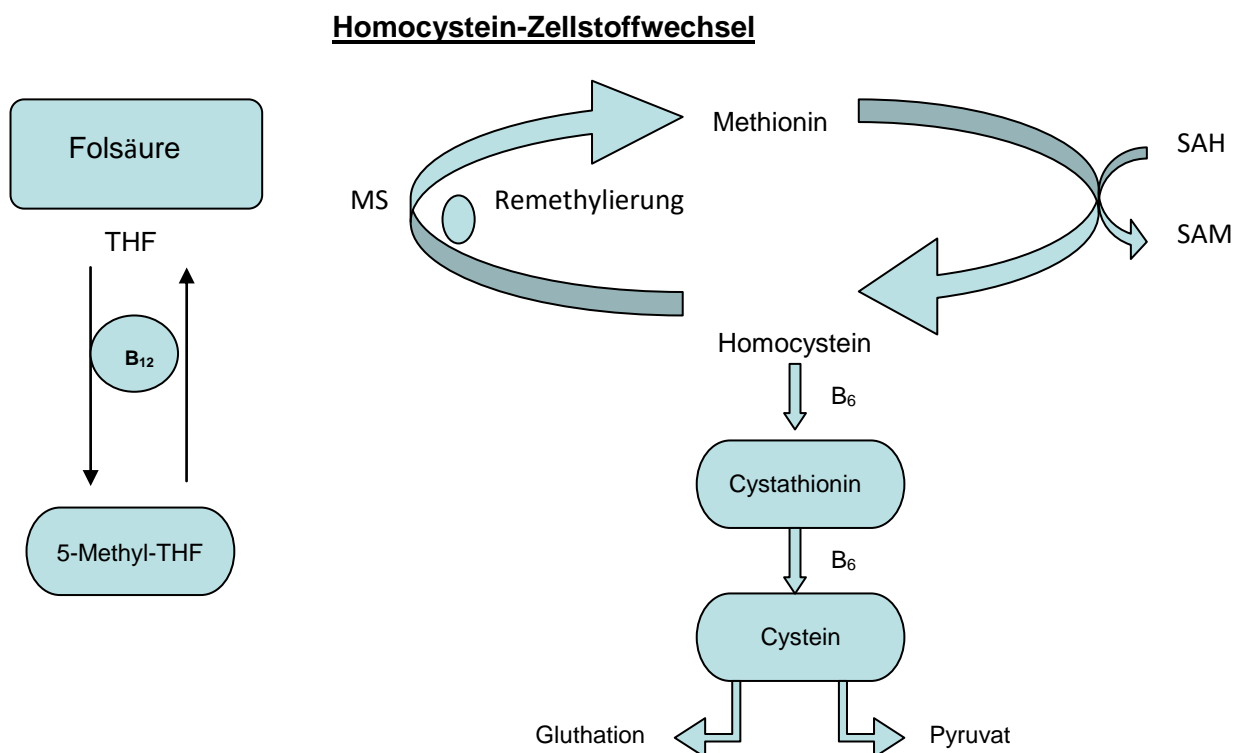


Abb. 13: Homocystein-Zellstoffwechsel Eigendarstellung, MS: Methionin-Synthase; SAH: S-Adenosyl-Homocystein; SAM: S-Adenosyl-Methionine; THF: Tetrahydrofolat. Quelle: D.A.C.H. Liga, Jornal 2003;10 (5):190-199.

1.3.3 Hyperhomocysteinämie Aufgrund von Vitaminmangel

Ein Mangel an den im Hcy-Stoffwechsel als Koenzyme beteiligten Vitaminen wie Folat und Vitamin B₁₂ führt zu einem erhöhten Hcy-Wert. Eine Substitution kann zur Normalisierung der Spiegel führen [94-96].

1.3.4 Assoziierte Erkrankungen, die durch erhöhtes Homocystein begünstigt sind

Bei Erkrankungen wie Niereninsuffizienz, inflammatorischer endothelialer Dysfunktion, Erkrankungen des Fettstoffwechsels, hypothyreoser Anämie und einigen malignen Tumoren wird ein erhöhte Hcy-Spiegel beobachtet [97-99].

2 Zielsetzung der Studie

Zu den Risikogruppen eines Vitamin-B₁₂-Mangels zählen insbesondere Vegetarier und Veganer sowie ältere Menschen. Studien zeigen Prävalenzen von etwa 25 % (Vegetarier), 40 - 52 % (Veganer) und 12 - 25 % (ältere Menschen > 65 Jahre) [100-104]. Während Vegetarier und Veganer dem Risiko eines Vitamin-B₁₂-Mangels aufgrund einer fehlenden bzw. zu niedrigen Aufnahme mit der Nahrung ausgesetzt sind, weisen viele ältere Menschen eine verringerte Resorption des Vitamins auf. Ursache ist oftmals eine chronische atrophische Gastritis mit daraus resultierendem Mangel an Intrinsic-Factor (IF). Außerdem ist die Magensäurebildung im Alter vermindert, sodass das Protein-gebundene Vitamin B₁₂ nur noch im geringen Maße aus der Nahrung freigesetzt wird. Des Weiteren kann bei älteren Menschen aufgrund von Mangelernährung eine zu niedrige Vitamin-B₁₂-Zufuhr über Lebensmittel vorliegen. Die Vitamin-B₁₂-Resorption erfolgt auf zwei Wegen: aktiv IF-vermittelt im terminalen Ileum sowie durch passive Diffusion über die Schleimhäute des Gastrointestinaltrakts (v. a. der Mundhöhle und des Ileums). Da jedoch die Resorptionsrate von Vitamin B₁₂ bei der passiven Diffusion lediglich 1 - 2 % beträgt, sind höhere Zufuhrkonzentrationen notwendig [27;28]. Die Möglichkeit der Vitamin-B₁₂-Zufuhr über passive Diffusion führte zu der Überlegung, eine mit Vitamin B₁₂ angereicherte Zahncreme zu entwickeln. Im Jahr 2001 wurde am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Universität Magdeburg eine placebokontrollierte Studie durchgeführt, die die Wirkung einer mit Vitamin B₁₂, Folat und Vitamin B₆ angereicherten Zahncreme über einen Interventionszeitraum von vier Wochen untersuchte. Die Probanden der Verum-Gruppe wiesen nach Ende der Intervention signifikant verringerte Hcy-Spiegel (-0,9 ±1,0 µmol/l) sowie einen um 60 % angestiegenen Serum-Vitamin-B₁₂-Spiegel auf. Bei den Probanden der Kontrollgruppe zeigten sich keine Veränderungen der Hcy-Spiegel. Die Vitamin-B₆-Werte hatten sich in beiden Gruppen nicht verändert [23]. Schließlich entwickelte die Firma Logocos Naturkosmetik AG in Zusammenarbeit mit dem Vegetarierbund Deutschland eine mit Cyanocobalamin angereicherte Zahncreme, die seit 2012 auf dem Markt ist. Seit Februar 2014 ist eine weitere Variante der Vitamin-B₁₂-Zahncreme in Form eines Gels erhältlich, dem außerdem kein Fluorid zugesetzt wurde. Die neue Variante ist Gegenstand der geplanten Interventionsstudie. Die Zahncreme ist mit 100 µg Vitamin B₁₂ pro Gramm Zahncreme angereichert. Rechnerisch gelangen dadurch bei der üblichen Nutzungsmenge von 1,27 g Zahncreme pro Tag [24] 127 µg Vitamin B₁₂ in die Mundhöhle. Da bei jedem Putzvorgang etwa 50 mg Zahncreme verschluckt werden [25], ergibt dies bei zweimaligem Zähneputzen täglich 0,1 g Zahncreme mit 10 µg Vitamin B₁₂ pro Tag, welche in den Gastrointestinaltrakt gelangen. Eine mit Vitamin B₁₂ angereicherte Zahncreme könnte somit eine praktikable Möglichkeit der Supplementierung darstellen, um die Vitamin-B₁₂-Versorgung von vegetarischen oder vegan lebenden sowie älteren Menschen zu verbessern bzw. eine

Compliance-Problematik im Hinblick auf die Einnahme von zusätzlichen oralen Ergänzungen zu vermeiden.

2.1 Hauptfragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Studie gilt es folgende Hauptfragestellung zu klären:

Wie wirkt sich die Verwendung einer Vitamin-B₁₂-Zahncreme über einen längeren Zeitraum auf ältere Menschen aus?

2.2 Untergeordnete Fragestellungen

Des Weiteren sollen folgende untergeordnete Fragen beantwortet werden:

- Ist die Vitamin-B₁₂-Zahncreme als zusätzliche Vitamin-B₁₂-Quelle geeignet, die Vitamin-B₁₂-Versorgung älterer Menschen sicherzustellen?
- Trägt die Verwendung der Zahncreme zur Verbesserung bzw. Aufrechterhaltung des Vitamin-B₁₂-Status von älteren Menschen bei?
- Wie beeinflusst die Art der Zahnbürste (Hand- oder elektrische Zahnbürste) die Veränderung des Vitamin-B₁₂-Status durch die Zahncreme?

Daraus ergibt sich folgende Hypothese:

Durch die zweimal tägliche Anwendung der Vitamin-B₁₂-Zahncreme über einen Zeitraum von 12 Wochen bei älteren Menschen wird es vermutlich zu einer signifikanten Senkung der MMA kommen

3 Material und Methodik

3.1 Studiendesign

Die Untersuchung erfolgte mit einer Dauer von 12 Wochen als placebokontrollierte doppelblind randomisierte Interventionsstudie zur Untersuchung der Wirkung einer mit Vitamin B₁₂ angereicherten Zahncreme auf den Vitamin-B₁₂-Status. Die Teilnehmer wurden per Zufallsprinzip jeweils in eine Verum- und eine Placebogruppe (Kontrollgruppe) eingeteilt. Die Randomisierung erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes. Durch einen Code, der nur den Studienleitern bzw. Studienverantwortlichen bekannt war, wurde die Zugehörigkeit der Teilnehmer zur jeweiligen Untersuchungsgruppe verschlüsselt (Einfachverblindung). Die Verumgruppe erhielt eine mit Vitamin B₁₂ angereicherte Zahncreme und die Kontrollgruppe eine Placebo-Zahncreme (gleiche Optik, gleicher Geschmack). Die Verteilung der Grundeigenschaften (Alter, Geschlecht u. a.) sollte zwischen der Verum- und der Placebogruppe möglichst gleich sein, ebenso die jeweilige Anzahl der Teilnehmer. Die Probanden wurden angewiesen, ihre Zähne über einen Zeitraum von zwölf Wochen (90 Tage) mit der ausgehändigten Zahncreme genau zweimal pro Tag für jeweils zwei Minuten zu putzen. Wurde von Probanden häufigeres Zähneputzen gewünscht, sollte dies mit einer anderen Zahncreme ohne Vitamin-B₁₂-Zusatz erfolgen. Außerdem wurde um eine Zahnbürstenwahl (Handzahnbürste oder elektrische Zahnbüste) vor Beginn der Studie gebeten, welche die Probanden über den gesamten Interventionszeitraum nutzten. Die Probanden sollten das Zähneputzen anhand eines Zahnputzprotokolls (Anlage 12.3) protokollieren. Während des Untersuchungszeitraums sollte die bisherige Supplementierung mit Vitamin B₁₂ (sofern bisher erfolgt) beibehalten, jedoch keine mit Vitamin B₁₂ oder Folsäure angereicherten Lebensmittel bzw. entsprechende Nahrungsergänzungsmittel zusätzlich verwendet werden. Vor Beginn der Intervention bzw. vor der ersten Blutentnahme wurden die bisher erfassten Daten erneut abgefragt bzw. überprüft, um eventuelle Änderungen (u. a. bezüglich der Ausschlusskriterien) zu erfassen.

Vor Beginn der Intervention wurde den Teilnehmern 30 ml Vollblut entnommen, aufbereitet und bis nach der Studienphase eingefroren. Nach der 12-wöchigen Verwendung der Zahncreme wurde den Teilnehmern ein zweites Mal 30 ml Vollblut entnommen. Bei Vorliegen beider Blutproben von jedem Teilnehmer, wurden diese zeitgleich analysiert.

3.2 Probandeninformation und Aufklärung

Doppelblinde, randomisierte placebokontrollierte Interventionsstudie zur Untersuchung der Wirkung einer mit Vitamin B₁₂ angereicherten Zahncreme auf den Vitamin-B₁₂-Status (Versuchsdauer 12 Wochen). Studienstelle: Universitätsklinikum des Saarlandes, Zentrallabor,

Homburg 66421. Studienärzte: R. Obeid / A. Zant. In der Studie geht es um die Wirkung einer mit Vitamin B₁₂ angereicherten Zahncreme auf den Vitamin-B₁₂-Status.

Alle Teilnehmern wurden nach standardisiertem Fragenkatalog und Tabellen randomisiert (Tabellen im Anhang Anlage 12). Mit jedem Teilnehmer wurde vor Beginn der Studienteilnahme ein standardisiertes Interview auf der Basis eines Fragebogens geführt (Anlage 12.2). Die Studienteilnehmer wurden mündlich und schriftlich über Hintergrund, Durchführung, Zeitraum, laborchemische Untersuchungen und den Datenschutz informiert und stimmten diesen Bedingungen schriftlich zu. Die Teilnehmer erhielten sowohl ein Informationsblatt für die eigenen Unterlagen, als auch ein Informationsschreiben für den behandelnden Arzt (siehe Anlage 12.1 und 12.1). Das Informationsschreiben für den behandelnden Arzt enthielt sowohl eine eingehende Beschreibung der Studie als auch der Ein- und Ausschlusskriterien.

Die Probanden wurden im Zeitraum zwischen März 2015 und Dezember 2015 aus verschiedenen Kollektiven rekrutiert (Tabelle. 10, Abb. 14).

3.2.1 Hintergrund der Untersuchung

Zu den Risikogruppen eines Vitamin-B₁₂-Mangels zählen insbesondere Vegetarier und Veganer sowie ältere Menschen. Während Vegetarier und Veganer dem Risiko eines Vitamin-B₁₂-Mangels aufgrund einer fehlenden bzw. zu niedrigen Aufnahme mit der Nahrung ausgesetzt sind, weisen viele ältere Menschen eine verringerte Resorption des Vitamins auf. Ursache ist oftmals eine chronische atrophische Gastritis. Des Weiteren kann bei älteren Menschen aufgrund von Malnutrition ebenfalls eine zu niedrige Vitamin-B₁₂-Zufuhr über Lebensmittel vorliegen. Den genannten Risikogruppen wird daher eine Supplementierung von Vitamin B₁₂ empfohlen, um einen Mangel zu verhüten. Zu den Auswirkungen eines anhaltenden Vitamin-B₁₂-Mangels zählen hämatologische, neurologische, psychiatrische und kardiovaskuläre Effekte. Schließlich entwickelte die Firma Logocos Naturkosmetik AG in Zusammenarbeit mit dem Vegetarierbund Deutschland eine mit Cyanocobalamin (eine synthetische Form von Vitamin B₁₂) angereicherte Zahncreme¹, die seit 2012 auf dem Markt ist. Seit Februar 2014 ist eine weitere Variante der Vitamin-B₁₂-Zahncreme in Form eines Gels² erhältlich, dem außerdem kein Fluorid zugesetzt wurde. Die neue Variante ist Gegenstand der geplanten Interventionsstudie.

¹ Handelsname „SANTE Dental Med Zahncreme Vitamin B₁₂“

² Handelsname „SANTE Dental Med Zahngel Vitamin B₁₂“

Eine mit Vitamin B₁₂ angereicherte Zahncreme könnte somit eine praktikable Möglichkeit der Supplementierung darstellen, um die Vitamin-B₁₂-Versorgung vegetarisch und vegan lebender sowie älterer Menschen zu verbessern.

Die geplante Studie soll Beiträge liefern, wie sich die Verwendung einer Vitamin-B₁₂-Zahncreme über einen längeren Zeitraum auf den Vitamin-B₁₂-Status auswirkt und ob die Verwendung der Zahncreme zur Verbesserung bzw. Aufrechterhaltung des Vitamin-B₁₂-Status von älteren Menschen beiträgt.

3.2.2 Ablauf der Untersuchung

Im Rahmen der Studie und Zeitrahmen werden Blutproben von Probanden untersucht. Wir werden Ihnen 10 ml Blut (Hinweis: Dies entspricht ca. 3 Teelöffeln voll) entnehmen. Von den abgegebenen Blutproben werden wichtige und sensitive Marker für einen Vitamin-B₁₂-Mangel (z. B. MMA, Hcy, HoloTC, Folsäure, Blutbild und andere relevante Parameter) bestimmt.

Alle weiteren Fragen der Teilnehmer beantwortet der Studienarzt (Anhang 12.4.3 - 9).

3.3 Ein- und Ausschlusskriterien der Probanden

Einschlusskriterium war ein Alter zwischen 60 und 75 Jahren sowie die Bereitschaft der Probanden, über einen vordefinierten Zeitraum von 12 Wochen zuverlässig das Studienmedikament (Zahnpasta) einzunehmen.

Einschlusskriterien:

- Freiwillige Probanden, Alter 60 - 75 Jahre (m / w),
- Wohnort Raum Homburg/Saarbrücken/Saarland und Umkreis,
- Erfassung weiterer Erkrankungen (z. B. Hypertonie, Diabetes Typ 2) sowie der regelmäßig eingenommenen Medikamente.

Ausschlusskriterien:

- Krebserkrankungen,
- Depressionen,
- chronische Nierenerkrankungen,
- Zahnprothese,
- Vitamin-B₁₂-Supplementierung (mehr als der Tagesbedarf bis zur therapeutische Dosierung > 10 µg/d),
- Erkrankungen, die den Vitamin-B₁₂-Status beeinflussen (z. B. chronische Gastritis, Morbus Crohn, sonstige Vitamin-B₁₂-Resorptionsstörungen).

3.4 Vitamineinnahme

Alle Teilnehmer wurden tabellarisch unter randomisierten Rahmenbedingungen in den Gruppen 1 und 2 erfasst. Weder die Studienleitung noch die Teilnehmer wussten bei Durchführung der Studie, welche der beiden Gruppen zusätzlich das Vitamin B₁₂ einnimmt (doppelblind). Entsprechend seiner Gruppenzugehörigkeit erhielt jeder Teilnehmer zu Beginn seiner Studienteilnahme einen Vorrat an Zahnpasta für mindestens 12 Wochen. In diesem Zeitraum fanden mindestens zwei Arzt-Patient-Kontakte statt. Mit den Patienten wurde über die regelmäßige Einnahme der Vitamin-B₁₂-Zahnpasta sowie über die Nutzungskalender (Versuchsdauer 12 Wochen) gesprochen (Anhang 11.3).

3.5 Materialgewinnung und Datenerhebung

Zu Studienbeginn wurde allen Probanden im nüchternen Zustand Blut entnommen. Eine zweite Entnahme erfolgte nach durchschnittlich 12 Wochen. Die Blutentnahmen erfolgten jeweils terminiert im Praxislabor des Universitätsklinikums des Saarlandes. Bei der Blutentnahme wurden folgende Röhrchen (Monovetten[®] der Firma Sarstedt) gewonnen:

- 4,9 ml Blut auf EDTA (als Vollblut belassen) für ein Blutbild,
- 4,7 ml Blut in trockener Monovette zur Bestimmung von Hcy, Cys, MMA, Vitamin B₁₂, holoTC und Folat,
- 4,7 ml Blut auf Lithium-Heparin zur Routinediagnostik Kreatinin (GFR), Glukose, Alanin-Aminotransferase (ALAT), Cholesterin, Triglyceride, Low-density-lipoprotein (LDL), High-density-lipoprotein (HDL), Albumin, C-reaktives Protein (CRP), Ferritin.

3.6 Präanalytik

3.6.1 Blutentnahme und biochemische Analysen

Während der ersten (Behandlungsbeginn) und zweiten (nach 3 Monaten) Studienvisite wurde Nüchternblut (\geq achtstündige Fastenperiode) in Röhrchen ohne Antikoagulantien (für Serum) und solchen mit EDTA-K⁺ (für Plasma) gesammelt. Die Blutproben wurden zentrifugiert und die Serum- und Plasmaproben wurden jeweils innerhalb von maximal 40 bzw. 30 Minuten getrennt. Alle Proben wurden bis zum Ende der Studie bei - 70 °C gelagert und am Ende der Studie die Blutmarker des Vitamin B₁₂ gemessen. Die Proben jedes Teilnehmers wurden nach Beendigung der Intervention analysiert, um analytische Variationen zu minimieren. Zusätzlich wurden Blutbild und Plasma- oder Serummarker (d. h.

Leber, Niere, Entzündungsmarker) von allen Teilnehmern bei jeder der Studienvisiten als Teil des allgemeinen Versorgungsmanagements gemessen.

Der kombinierte Vitamin-B₁₂-Indikator (4cB₁₂) wurde für jeden Teilnehmer aus den Daten zu Beginn und nach der Intervention an Vitamin B₁₂, holoTC, MMA und tHcy analog der Gleichung von Brito et al. [22] und Fedosov et al. [38] berechnet. Der 4cB₁₂-Indikator wurde auf das Alter und die Serumfolsäurekonzentrationen, die bei allen Teilnehmern gemessen wurden, angepasst (Siehe Kapitel 5.5).

3.7 Probandenrekrutierung

Die Probanden wurden im Zeitraum zwischen März 2015 und Dezember 2015 rekrutiert. Alle Teilnehmer wurden nach einem standardisierten Fragenkatalog und Tabellen randomisiert (vgl. Tabellen im Anhang 11.2). Mit jedem Teilnehmer wurde vor Beginn der Studienteilnahme ein standardisiertes Interview auf der Basis eines Fragebogens geführt (Anlage 12.2). Der Fragebogen beinhaltete, neben dem Datum des Interviews, die Kontaktinformationen des Teilnehmenden (Name, Adresse, Telefonnummer) und das Geburtsdatum. Darüber hinaus wurden anthropometrische Daten wie Größe und Gewicht erhoben, neben Informationen über den Lebensstil (Rauchen, Alkoholkonsum), bestehenden Vorerkrankungen (im Speziellen Diabetes, Bluthochdruck, koronare Herzerkrankung, Krebserkrankung, Infekte, Magen-Darm-Erkrankungen und Medikamente (im Speziellen Medikamente zur Diabetesbehandlung, arterielle Hypertonie, Lipidsenker, Behandlung mit Protonenpumpenhemmern). Die Studienteilnehmer wurden mündlich und schriftlich über Hintergrund, Durchführung, Zeitraum, laborchemische Untersuchungen und den Datenschutz informiert und stimmten diesen Bedingungen schriftlich zu. Die Teilnehmer erhielten sowohl ein Informationsblatt für die eigenen Unterlagen als auch ein Informationsschreiben für den behandelnden Arzt (siehe Anlagen 12.1 und 12.4). Das Informationsschreiben für den behandelnden Arzt enthielt eine eingehende Beschreibung der Studie sowie der Ein- und Ausschlusskriterien. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die Gruppeneinteilung.

Tabelle 10: Übersicht über die Gruppeneinteilung

	Gesamt	Vit.-B12-Gruppe	Placebo-Gruppe
Studienteilnehmer randomisiert	107	n1 = 53	n2 = 54
Blut zu Studienbeginn	107	53 davon 2 verworfen*	54 davon 2 verworfen*
Blut nach 12 Wochen	103	51	52
Nicht auswertungsfähig	11	7	4
Ausgewertete Analysen	92	n1 = 44	n2 = 48
Weibliche Teilnehmer	49		

*Studie abgebrochen: insgesamt 4 Personen (1 x wegen med. Einnahme bzw. Supplementen, 1 x verstorben und 2 x wegen stationärem Aufenthalt und akuten Erkrankungen)

3.8 Flussdiagramm der Studie

Das Flussdiagramm der Studie ist in der ergänzenden Abbildung 12 dargestellt. Insgesamt waren zunächst 120 Probanden an einer Teilnahme an der Studie interessiert. Fünf Probanden lehnten eine Teilnahme später ab und acht wurden aufgrund der Erfüllung von mindestens einem der Ausschlusskriterien ausgeschlossen. 107 Teilnehmer stimmten der Teilnahme zu und wurden am Tag des ersten Studienbesuchs nach dem Zufallsprinzip aufgeteilt (53 Placebo und 54 Vitamine). 103 Probanden beendeten die Studie mit dem zweiten Termin nach drei Monaten, während vier Teilnehmer ausschieden (einer verstarb, einer berichtete von der Einnahme pharmakologischer Dosen von Vitamin B₁₂ und zwei hatten akute Erkrankungen mit Krankenhausaufenthalt). Den Teilnehmern stand es frei, Fachärzte für Rückenschmerzen, Gefäßerkrankungen oder andere altersbedingte Erkrankungen zu konsultieren. Der Arzt der Studie wurde über Veränderungen in der Dauermedikation informiert. Es waren jedoch keine Informationen über akute Behandlungen (d. h. Vitamin-B₁₂-Injektionen) verfügbar, die während der Studie von anderen Gesundheitsdienstleistern durchgeführt wurden. Von den 103 Teilnehmern, die die Studie abschlossen, wurden elf Patienten nach Abschluss der 3-monatigen Intervention und Messung der Blutkonzentrationen ausgeschlossen. Von diesen wurde ein Proband aufgrund einer extrem hohen Serumfolsäurekonzentration beim zweiten Besuch ausgeschlossen, sieben Probanden wurden ausgeschlossen, weil sie einen Vitamin-B₁₂-Ausgangsserumspiegel zwischen 900 und 2000 pmol/l hatten und während des Untersuchungszeitraums starke Erschöpfungsanzeichen zeigten. Von diesen sieben

Probanden wurde angenommen, dass sie vor der Studie mit pharmakologischen Dosen von Vitamin B₁₂ behandelt worden waren. Schließlich wurden drei der elf Probanden ausgeschlossen, da sie zwischen Visite 1 (Ausgangskonzentration) und Visite 2 einen starken Anstieg des Serumvitamins B₁₂ und des HoloTC aufwiesen. Diese Zunahme wurde höher eingeschätzt, als von der alleinigen Intervention erwartet, und wahrscheinlich durch die Behandlung mit pharmakologischen Dosen von Vitamin B₁₂ während der Studie verursacht. Die endgültigen statistischen Analysen enthielten Daten von 92 Probanden, die die Studienvisiten abgeschlossen und alle Einschlusskriterien erfüllt hatten.

Während der ersten Studienvisite wurden Blutproben entnommen und Informationen zur Anamnese, akuten und chronischen Zuständen und Medikamenten in den Patientendokumenten aktualisiert. Zwei Tuben der Zahnpasta (jeweils 75 ml) wurden an die Teilnehmer ausgegeben und sie wurden angewiesen, die Zahnpasta zweimal täglich für jeweils 2 Minuten zu verwenden. Die Anwendung wurde durch den Abschluss eines schriftlichen Protokolls kontrolliert, das den Typ der verwendeten Zahnbürste (d. h. manuell oder elektrisch) sowie die Zeit und Dauer des Bürstens über den Untersuchungszeitraum umfasste. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki [105] durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission des Saarlandes geprüft und genehmigt (Zulassungsnummer: 244/14) und alle Teilnehmer haben ihre schriftliche Einwilligungserklärung abgegeben.

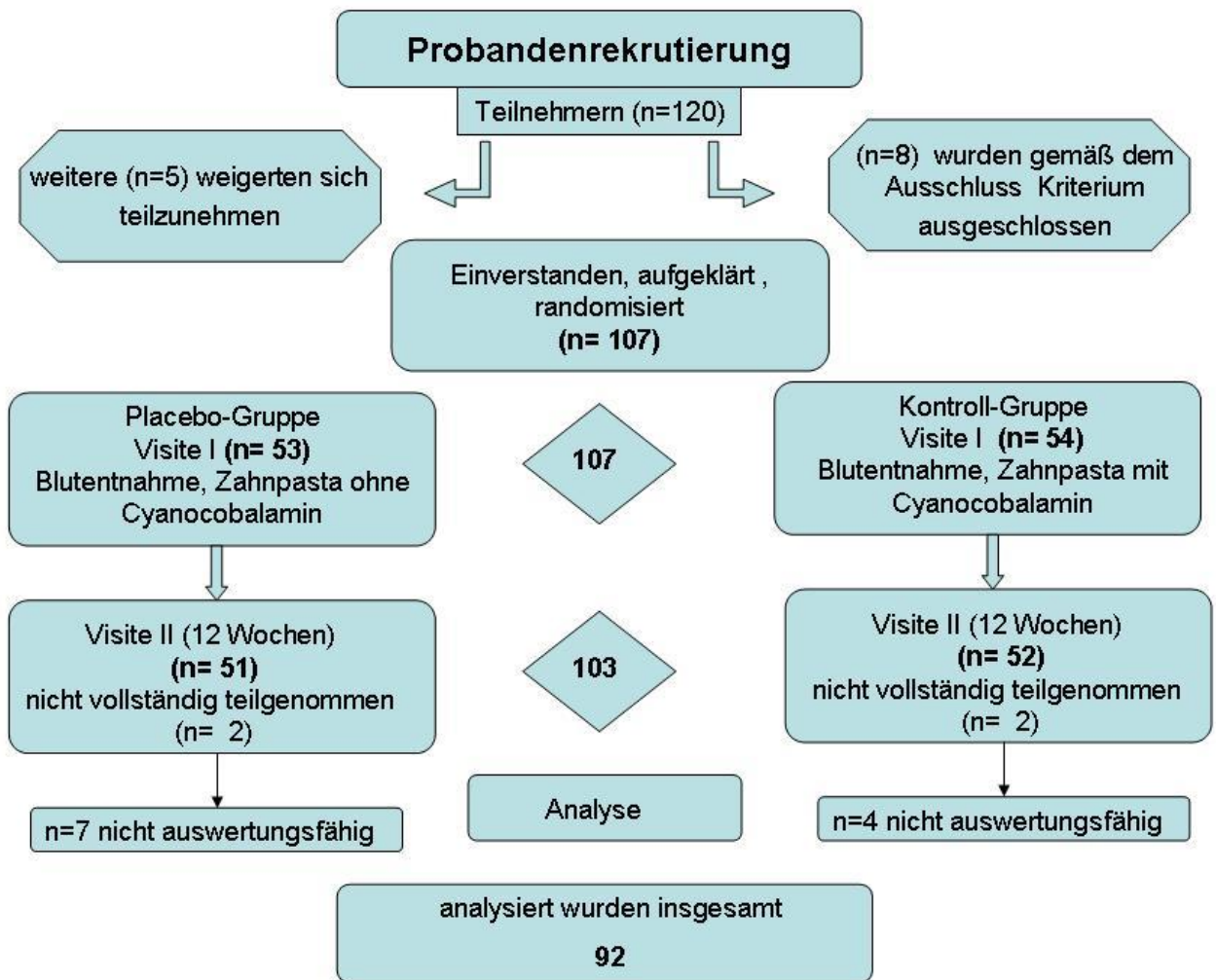


Abb.14: Flussdiagramm der Studie

4 Laborchemische Methodik

4.1 Messung von Methylmalonylsäure (MMA)

Die Bestimmung MMA-Spiegels wurde mittels einer Gaschromatographie- und Massenspektrometrie Massenspektrometrie-Messtechnik (GC/MS) durchgeführt. Hierfür wurde die Methode von Allen et al. [106] übernommen. Nach Umwandlung der Moleküle in ihren gasförmigen Zustand werden diese Moleküle gaschromatographisch aufgetrennt. Die jeweilige Konzentration wird dann massenspektrometrisch gemessen. Diese Probe enthält deuterierte MMA als internen Standard (IS). Für die Ionisation wird die Elektronenstoßionisation (EI) genutzt. Bei diesem Verfahren entstehen durch Energieübertragung die Ionenfragmente, die jeweils einem substanzspezifischen Muster folgen. In einem Analysator werden diese Ionenfragmente aufgetrennt. Die Anzahl der Fragmente wird durch einen Detektor erfasst. Der Detektor setzt die Anzahl in ein Signal um, welches zu der Gesamt-Ionenzahl einer bestimmten Masse proportional ist. Die dabei entstandene Kurve des Massenspektrogramms spiegelt dann die Funktion der Masse/Ladung. Die Konzentration des zu ermittelnden Stoffes in der Probe wird mittels der bereits bekannten Konzentration der deuterierten Form in der Probe errechnet [106].

Geräte und Reagenzien:

- Gaschromatograph/Massenspektrometer (Agilent Technologies[®], Typ 6890N),
- Poly-Prep Chromatography Columns (Bio-Rad[®]),
- Anionisches Resin (Bio-Rad[®]),
- Derivatisierung: N-methyl-butyldimethylsilyl-Tri-fluoroacetamid (MBDSTFA) (Machery and Nagel[®]),
- Reduktionsmittel: 1,4-Dithiothritol (C₄H₁₀O₂S₂, DTT) (Roth[®]),
- Arbeitskonzentration: 10 mg/ml in 1N; NaOH,
- Acetonitril, Methanol, Essigsäure und Chromatographenwasser (HPLC Grade) (Merck[®]),
- Concentrator (Typ 5301) (Eppendorf[®]).

Interne Standards:

- MMA: DL-Methylmalonylsäure (CDN – Isotopes[®]),

Zur Vorbereitung der Messung der MMA wurde anionisches Resin mit 1N HCl und Methanol vorgewaschen und bei 60 °C für vier Stunden getrocknet (pro Säule 100 mg Resin). 200 µl Serum wurden mit 50 µl IS MMA versetzt. Vor dem Auftragen der Probe wurde die Festphase einmal mit 3 ml Wasser und dreimal mit 3 ml 0,01 N Essigsäure-Methanol-Mischung gespült. Die Elution erfolgte mit 0,8 ml einer Mischung aus Essigsäure und Methanol und 1N HCl im Verhältnis 9:1. Getrocknet wurden die Proben für etwa drei Stunden bei 60 °C im Concentrator. Den getrockneten Proben wurden 30 µl Acetonitril und MBDSTFA im Verhältnis 2:1 hinzugefügt und für fünf Minuten bei 440 Watt in die Mikrowelle gestellt. Danach konnte das GC/MS-Gerät beladen werden. Autosampler, Chromatograph und Massenspektrometer führten die Analyse vollautomatisch durch.

Die Konzentration wird als Quotient aus dem Integral des Peaks der Probenkurve und dem Integral des Peaks der Standardkurve ausgerechnet (Abb. 15), multipliziert mit folgenden Standardkonzentrationsfaktoren: 33,03 nmol/l

Formel zur Konzentrationsbestimmung im Analyt:

KonzentrationAnalyt = [Peakintegral Analyt / Peakintegral Standard] x Konzentration Standard

Geräteeinstellung des Gaschromatographen:

- Ofentemperatur: Min: 80 °C, Max: 310 °C
- Einlasstemperatur: 230 °C

Injektionsvolumen: 1 µl

Retentionszeit: MMA ~ 8 min.

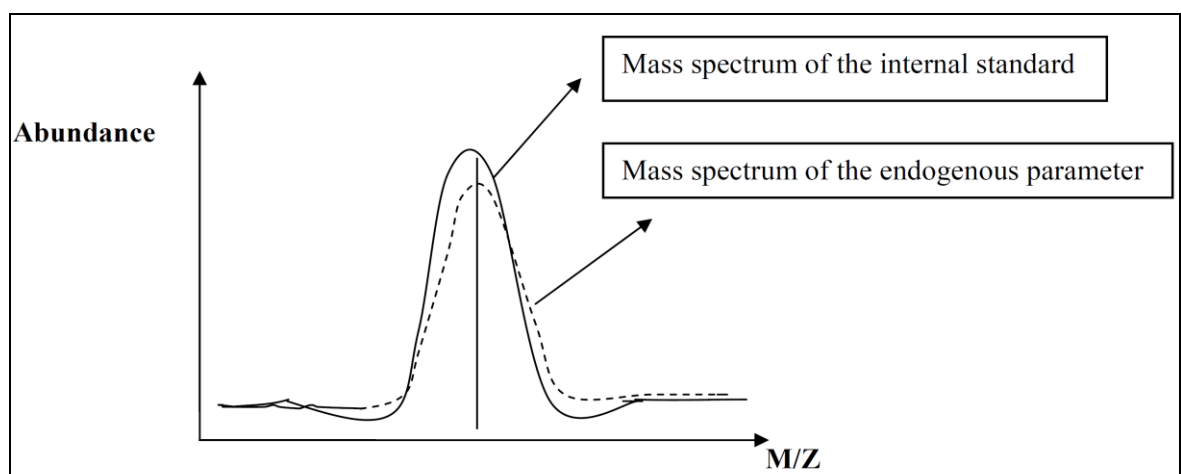


Abb. 15: MMA-Peaks von Proben und internen Standards

4.2 Messung von Homocystein

Zur Messung von Hcy wurde das Gerät der Firma Abbott (Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay (CMIA) / ARCHITECT, Abbott®) benutzt. ARCHITECT eignet sich gut zur quantitativen Bestimmung des Gesamt-Homocysteins in Plasma und bezieht sich auf die CMIA-Technik mit flexiblen Assay-protokollen, die Chemiflex genannt wird. Gebundenes oder oxidierte Homocystein wird durch Dithiothreitol (DTT) zu ungebundenem bzw. freiem Homocystein reduziert, welches durch die Reaktion des rekombinanten Enzyms S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase (rSAHHase) bei einem Adenosinüberschuss zu S-Adenosyl-Homocystein (SAH) umgewandelt wird. Das SAH konkurriert danach mit dem akridiniummarkierten S-Adenosyl-Cystein um den partikelgebundenen monoklonalen Antikörper. Nach dem Waschzyklus und der magnetischen Separierung werden die Pre-Triggerlösung und die Triggerlösung zum Reaktionsgemisch zugegeben, sodass die Chemilumineszenzreaktion ausgelöst wird, welche in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen wird. Die in der Probe enthaltene Homocystein-Menge ist indirekt proportional zu den vom optischen System des ARCHITECT gemessenen RLE [107].

4.3 Messung des Gesamt-Vitamin-B₁₂

Die Bestimmung des Vitamin-B₁₂-Spiegels im Serum wurde durch der ElektrochemiLumineszenz-Immunoassay (ECLIA) mit dem Cobas-Analyzer (Roche Diagnostics GmbH®) durchgeführt. Das Testprinzip ist spezifisch für den Vitamin-B₁₂-Intrinsic-Faktor-Komplex und kompetitiv. Das in der Probe enthaltene Vitamin B₁₂ konkurriert mit dem exogen zugefügten biotinylierten Vitamin B₁₂ um die Bindungsstellen am mit Ruthenium-Komplex markierten Intrinsic-Faktor.

Testprinzip:

Um Vitamin B₁₂ freisetzen zu können müssen die Proben in den Vorbehandlungsreagenzien 1 und 2 mit Vitamin B₁₂ inkubiert werden, dann erst kann Vitamin B₁₂ freigesetzt werden. Anschließend werden die Reagenzien mit dem Ruthenium-markierten Intrinsic-Faktor (IF) inkubiert; dadurch wird ein Vitamin-B₁₂-Bindungsprotein-Komplex gebildet. Die Menge dieses Komplexes ist von der Konzentration des Analyten in der Probe abhängig. Nach Zugabe von Streptavidin-beschichteten Mikropartikeln und biotinyliertem Vitamin B₁₂ werden, unter Bildung eines Ruthenium-markierten IF-Vitamin-B₁₂-Biotin-Komplexes, die noch freien Bindungsstellen des Ruthenium-markierten IF besetzt. Der Gesamtkomplex wird über die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung an die Festphase gebunden. Die Reaktionsmischung muss in die Messzelle überführt werden, in der die Mikropartikel mithilfe einer magnetischen Wirkung an die Oberfläche der Elektrode fixiert werden. Die ungebundenen Substanzen mit

ProCell/ProCell M werden entfernt. Durch einer zugefügten Spannung wird die Chemilumineszenzemission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen. Die Ergebnisse werden in Form einer Kalibrationskurve ermittelt [108].

4.4 Messung von Holotranscobalamin

Die Konzentration von HoloTC im Serum wurde mit einem Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay (CMIA) mit dem ARCHITECT iSystems von Abbott® durchgeführt. ARCHITECT Active-Vitamin-B₁₂ (Holotranscobalamin) ist ein Zwei-Schritt-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Holotranscobalamin in Humanserum und beruht auf der CMIA-Technik mit flexiblen Assayprotokollen, die als Chemiflex bezeichnet werden [109].

Die Probe und die mit Anti-HoloTC beschichteten paramagnetischen Mikropartikel werden zunächst im ersten Schritt vermischt. In der Probe vorhandenes Holotranscobalamin bindet an die mit Anti-HoloTC beschichteten Mikropartikel. Nach einem Wachszyklus wird im zweiten Schritt akridiniummarkiertes Anti-Transcobalamin-Konjugat zugegeben und so ein Reaktionsgemisch hergestellt. Nach einem weiteren Waschzyklus werden dem Reaktionsgemisch Pre-Trigger- und Triggerlösung zugegeben. Die resultierende Chemilumineszenzreaktion wird in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen. Die Menge an HoloTC in der Probe ist zu den vom optischen System des ARCHITECT iSystems gemessenen RLE direkt proportional [109].

4.7 Messungen der Standardwerte im Blut

4.7.1 Messung von Kreatinin

Die sogenannte Jaffé-Reaktion kennzeichnet die gelb-orangene Verbindung von Kreatinin in alkalischen Medien mit Pikrinsäure. Die Farbenintensität dieses Komplexes wird photometrisch gemessen und ist proportional zur Konzentration des Kreatinins in der Probe. Die Analyse wurde mit Geräten und Material der Firma Roche Diagnostics® durchgeführt.

4.7.2 Messung von GOT, GPT, γ -GT

GOT	Enzymatischer Farbtest	Cobas 8000 (Roche Diagnostics)
GPT	Enzymatischer Farbtest	Cobas 8000 (Roche Diagnostics)
AP	Enzymatischer Farbtest	Cobas 8000 (Roche Diagnostics)
GGT	Enzymatischer Farbtest	Cobas 8000 (Roche Diagnostics)

4.7.3 Messung des C-reaktiven Proteins

CRP wird durch immunologische Turbidimetrie/Nephelometrie ermittelt. Nach einer Antigen-Antikörper-Reaktion des CRP kommt es zu einer Veränderung der Absorption (Turbidimetrie) bzw. des Streulichts (Nephelometrie) eines Licht- oder Laserstrahls in einer Suspension.

4.7.4 Blutbild

Blutbildmessmethode:

Optische Messung (Leukozyten, Differenzierung) Sysmex XE5000 (Sysmex)
Impedanzmessung (Erythrozyten, Thrombozyten) SLS-Methode (Hämoglobin).

4.7.5 Messung von Eisen

FE Farbttest Cobas 8000 (Roche Diagnostics)

3.5.6 Messung von Ferritin

Ferritin ECLIA Cobas 8000 (Roche Diagnostics)

4.7.7 Messung von Low Density Lipoprotein, High Density Lipoprotein und Triglyceriden

LDL Homogener enzymatischer Farbttest Cobas 8000 (Roche Diagnostics)

HDL Homogener enzymatischer Farbttest Cobas 8000 (Roche Diagnostics)

Triglyceride Enzymatischer Farbttest Cobas 8000 (Roche Diagnostics)

4.7.8 Messung des Thyreoid-stimulierendes Hormons

TSH ECLIA Cobas 8000 (Roche Diagnostics)

4.7.9 Messung von Glykohämoglobin

HbA1c Immunturbidimetrie Cobas c513 (Roche Diagnostics)

5 Statistik

Die Daten wurden in SPSS eingegeben und alle Variablen anhand der Kriterien der Kolmogorov-Smirnov-Statistik ($p < 0,1$) auf Normalverteilung geprüft. Bei nachweislich normalverteilten Variablen wurde der T-Test für verbundene Stichproben verwendet, während bei nicht-normalverteilten Variablen der nicht-parametrische Wilcoxon-Test eingesetzt wurde. Somit konnten paarweise Vergleiche zwischen beiden Zeitpunkten der Intervention durchgeführt werden (Signifikanzniveau $p = 0,05$) und der Fragestellung der Langzeitwirkung einer mit Vitamin B₁₂ angereicherten Zahncreme auf den Vitamin-B₁₂-Status nachgegangen werden.

Um die Median-Werte innerhalb mehrerer Gruppen vergleichen zu können, wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Um die Ergebnisse innerhalb einer Gruppe über bestimmte Merkmale zu vergleichen, wurde der abhängige T-Test verwendet. Korrelationen zwischen verschiedenen Variablen wurden mit dem Spearman-Test überprüft. Die p-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant erachtet.

Die Ergebnisse wurden mit SPSS (Version 24, IBM, Chicago, USA) analysiert. Kontinuierliche Variablen wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit Lilliefors-Signifikanzkorrektur auf Verteilungsnormalität getestet. Alle Vitamin-B₁₂-Marker wurden zur Erreichung einer Normalverteilung logarithmisch transformiert, bevor statistische Tests durchgeführt wurden, die eine normale Verteilung der Daten erfordern. Alle Marker und die Veränderungen zwischen dem Studienbeginn und nach 12 Wochen (Baseline: Visite 1; Post-Intervention nach 12 Wochen: Visite 2) wurden als Mittelwert = Standardabweichung (SD) erfasst.

Die prozentualen Veränderungen der Marker vom Ausgangswert wurden wie folgt berechnet: $(\text{Post-Intervention} - \text{Ausgangswert}) * 100 / \text{Ausgangskonzentrationen}$.

Das Varianzanalyse-Verfahren (ANOVA) wurde verwendet, um die logarithmisch transformierten Daten zwischen den Studiengruppen zu vergleichen. Zum Vergleich zwischen den Gruppen wurde die unabhängige variable Varianzanalyse des linearen Modells unter Einbeziehung der möglichen Störfaktoren als Kovarianten genutzt. Die Konzentrationen der Vitamin-B₁₂-Marker und deren Veränderungen (Post-Intervention - Baseline) zwischen den Studiengruppen wurden für die Baseline-Konzentrationen dieser Marker adjustiert. Weitere Adjustierungen wurden durchgeführt für Geschlecht, gastrointestinale Störungen (Ja vs. Nein), Protonenpumpeninhibitoren (Ja vs. Nein), Diabetesstatus (kein Diabetes, Diabetes mellitus und Diabetes ohne Metformin).

Unterschiede in der Verteilung der kategorischen Variablen zwischen den Studiengruppen oder den Untergruppen wurden mit Chi-Quadrat-Tests geprüft. Alle Tests waren zweiseitig und p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet [111].

5.1 Berechnungsformel für Vitamin B₁₂ Aufnahme

Die Berechnung der Aufnahme von Vitamin B₁₂ bei Veganern erfolgte basierend auf dem Vitamin-B₁₂-Spiegel im Serum und deren Veränderungen nach Einnahme von Vitamin-B₁₂-angereicherter Zahnpasta. Das Regressionsmodell wurde von Dullemeijer et al. [112] publiziert und hier verwendet.

Ausgangstatus und Aufnahme:

Der mittlere Vitamin-B₁₂-Serumspiegel bei Veganern liegt bei (y) = 197 pmol/l

Die Regressionsgleichung für die geschätzte aufgenommene Menge basiert auf der Veränderung des Vitamin-B₁₂-Serumspiegels:

$$\log_e(y) = 0,15 * \log_e(x) + 5,50$$

$$\rightarrow \log_e(197) = 0,15 * \log_e(x) + 5,50$$

$$\rightarrow \log_e(x) = [\log_e(197) - 5,50] / 0,15 = -1,445$$

$$\rightarrow x = e^{-1,445} = 1 / e^{1,445} = 0,24 \mu\text{g/d.}$$

Die Baseline-Aufnahme von Vitamin B₁₂ bei Veganern wurde mit dieser Gleichung auf 0,24 µg/d geschätzt.

$$\log_e(y) = 0,18 * \log_e(x) + 5,47$$

Vitamin B₁₂ Aufnahmestatus:

Der mittlere Vitamin-B₁₂-Spiegel im Serum bei Veganern nach 3 Monaten liegt bei (y) = 279 pmol/l.

$$\rightarrow \log_e(279) = 0,15 * \log_e(x) + 5,50$$

Die Aufnahme nach 3 Monaten lag folglich bei 2,4 µg/d (nach der o. g. Formel) [112].

6 Ergebnisse

Die Unterschiede in den Serumkonzentrationen von Vitamin B₁₂ und HoloTC und deren Veränderungen über drei Monate zwischen den beiden Interventionsgruppen sowie die Baseline-Konzentrationen von Vitamin B₁₂ und der Vitamin-B₁₂-Marker HoloTC, MMA und Hcy waren zu Studienbeginn nicht bekannt, weswegen eine Berechnung der Mittelwerte nicht möglich war. Darüber hinaus wurde erwartet, dass die Veränderungen dieser Marker von den Baseline-Konzentrationen abhängen. Es wurde eine signifikante Veränderung von Vitamin B₁₂ und HoloTC. Bei der Auswertung ergab sich ein Mittelwert (SD) für Vitamin B₁₂ nach drei Monaten [Vitamingruppe 368 (123) pmol/l vs. Placebogruppe 295 (123) pmol/l] boten eine Signifikanz von mindestens 80 % (P1 = 0,05), um Unterschiede zu sehen, wenn 45 Probanden in jeder Gruppe enthalten waren. Die Konzentrationen von HoloTC [112 (48) vs. 91 (68) pmol/l in der Vitamin- bzw. Placebogruppe] bieten boten mindestens 65 % (P2 = 0,10), um Unterschiede zu erkennen, wenn 45 Probanden in jeder Gruppe waren. Daher wurde die Probengröße als ausreichend betrachtet, um Veränderungen von Vitamin B₁₂ im Serum zu zeigen, während möglicherweise eine größere Probe benötigt wird, um Unterschiede in den Holo TC-Konzentrationen darzustellen. Es ist bekannt, dass die Serumkonzentrationen von Vitamin B₁₂ und HoloTC frühere Veränderungen und stärkere Reaktionen auf Vitamin-B₁₂-Supplementierung zeigen als MMA-Konzentrationen [113-116]. Darüber hinaus hängen die Veränderungen von MMA stark von der Vitamindosis, der Dauer der Studie und den MMA-Werten ab. Daher werden in der vorliegenden Studie die MMA-Konzentrationen oder -Veränderungen nicht als Hauptziele betrachtet.

6.1 Allgemeine Charakteristik der Teilnehmerpopulation

Die Studie umfasste 92 Probanden (n1 = 48 Probanden in der Vitamingruppe; n2 = 44 Probanden in der Placebogruppe). Der Altersdurchschnitt (medianer Wert) betrug 66,3 (4,8) Jahre. Der Anteil der weiblichen Teilnehmer betrug 53 % (n = 49). Die erfassten Daten, die Hauptmerkmale der Studienpopulation und die Verteilung im Hinblick auf Begleiterkrankungen und Medikationen sind in Tabelle 11 dargestellt. Der Anteil der Patienten mit Typ-2-Diabetes war in der Vitamin-B₁₂-Gruppe etwas höher als in der Placebogruppe, jedoch nicht signifikant (p1 = 0,065). In der Gruppe mit Vitamin B₁₂ angereicherten Zahncreme (n = 48) nahmen ca. 8 % mehr Probanden teil als in der Placebogruppe (n = 44). Der BMI aller Teilnehmenden lag im Mittel bei 28,3 kg/m² (28,2 - 28,4 kg/m²).

Tabelle 11: Baseline-Charakteristika, Morbiditäten und Medikationen der Teilnehmer

	Vitamin B12 n = 48	Placebo n = 44	p¹
Alter, Jahre (SD)	66,8 (4,6)	65,9 (5,0)	0,382
BMI, kg/m ² (SD)	28,4 (5,2)	28,2 (4,1)	0,835
BMI ≥ 30 kg/m ²	14 (29,2 %)	15 (34,1 %)	0,612
Serum Kreatinin, mg/dl	0,97 (0,53)	0,92 (0,19)	0,573
Hämoglobin, mg/dl	14,1 (1,0)	14,0 (1,3)	0,669
Hämatokrit, %	43 (3)	42 (3)	0,380
MCV mittleres korpuskuläres Volumen, fl	92 (9)	91 (4)	0,383
Frauen, n (%)	27 (56,3 %)	22 (50,0 %)	0,548
Diabetes, n (%)	36 (75,0 %)	25 (56,8 %)	0,065
Hypertonie, n (%)	38 (79,2 %)	29 (65,9 %)	0,153
Metabolisches Syndrom (IDF), n (%)	16 (33,3 %)	13 (29,5 %)	0,696
Gastrointestinal diseases, n (%), Reflux oder Gastritis	12 (25,0 %)	12 (27,3 %)	0,804
Hypothyreose n (%)	17 (35,4 %)	13 (29,5 %)	0,548
Protonenpumpen Hemmer, n (%)	15 (31,3 %)	16 (36,4 %)	0,604
Metformin, n (%)			
Metformin-Einnahme	17 (35,4 %)	13 (29,5 %)	0,171
Kein Metformin-Einnahme	19 (39,6 %)	12 (27,3 %)	
Kein Diabetes mellitus	12 (25,0 %)	19 (43,2 %)	
HMG-Reduktase-Statine, n (%)	20 (41,7 %)	14 (31,8 %)	0,328

¹p: Die Berechnungen der p Werte erfolgten nach dem ANOVA-Test für kontinuierliche Variablen und Chi-Quadrat-Test für kategoriale Variablen.

Von 79 Patienten mit Diabetes waren 27 diätetisch eingestellt, davon erhielten 16 eine Monotherapie mit Metformin, 13 eine Metformin- plus Insulintherapie und 2 nur eine Insulintherapie.

6.2 Charakteristik der allgemeinen Blutwerte der Teilnehmer

Es zeigten sich kaum Veränderung in Erythrozytenkonzentration, Hämoglobin und MCV in beiden Gruppen bzw. keine signifikante Änderung nach 12 Wochen. Dennoch verbesserten sich in der Vitamin-B₁₂-Gruppe die medianen Kreatinin-Werte von 0,9 mg/dl (Baseline) auf 0,93 mg/dl (12 Wochen) (Tabelle 12).

Tabelle 12: Baseline-Charakteristika und Werte nach 12 Wochen von Kreatinin, Hämoglobin, Hydrochlorothiazide und mittleres korpuskuläres Volumen der randomisierten Teilnehmer

	Baseline		p ¹	Nach 3 Monaten		p ²
	Vitamin B ₁₂ n = 48	Placebo n = 44		Vitamin B ¹² n = 48	Placebo n = 44	
Kreatinin, mg/dL	0,97 (0,53)	0,92 (0,19)	0,573	0,93 (0,19)	0,95 (0,16)	0,621
Hb, mg/dl	14,1 (1,0)	14,0 (1,3)	0,669	14,1 (1,0)	13,8 (1,2)	0,233
Hct, %	43 (3)	42 (3)	0,380	43 (3)	42 (4)	0,172
MCV, fl	92 (9)	91 (4)	0,383	92 (10)	90 (4)	0,386

¹ P-Werte zum Baseline. ² P-Werte nach 3 Monaten

6.3 Konzentrationen von Vitamin B₁₂ und Homocystein in der Teilnehmerpopulation

Die Blutwerte der Vitamine und Metabolite zu Studienbeginn und nach 12 Wochen sind in Tabelle 13 dargestellt. Die Serumspiegel für Vitamin B₁₂ lagen im Durchschnitt in der Vitamingruppe bei 313 pmol/l und Hcy bei 12,8 µmol/l. Nach 12 Wochen stieg Vitamin B₁₂ auf 368 pmol/l an und Hcy sank auf 11,9 µmol/l. Die Serumspiegel für Vitamin B₁₂ lagen im Durchschnitt in der Placebogruppe bei 298 pmol/l und Hcy bei 11,9 µmol/l. Nach 12 Wochen sank Vitamin B₁₂ geringfügig auf 295 pmol/l. Hcy stieg auf 12,2 µmol/l innerhalb von 12 Wochen (nicht signifikant).

In der Vitamin-B₁₂-Gruppe zeigte sich nach 12 Wochen eine ansteigenden Tendenz des Vitamin-B₁₂-Spiegels und eine sinkende Tendenz des Hcy-Serumspiegels.

6.4 Ausgangskonzentration von MMA und Vitamin B₁₂ und im Vergleich nach 12 Wochen

Im Vergleich zur Ausgangskonzentration stieg die MMA-Serumkonzentration nach 12 Wochen in der Vitamin-Gruppe kaum an. Hingegen stieg die MMA-Serumkonzentration in der Placebogruppe binnen 12 Wochen deutlich an. Die Ergebnisse zeigen in der Placebogruppe eine mögliche Zellfunktionsstörung des Vitamin-B₁₂-Stoffwechsels. Eine erhöhte MMA und Hcy weisen auf einen VitaminB₁₂-Mangel hin (Tabelle 13).

6.5 Ausgangskonzentration von HoloTC und im Vergleich nach 12 Wochen

Im Vergleich der Serumwerte zwischen Baseline und nach 12 Wochen stieg in der Vitamin-B₁₂-Gruppe die HoloTC-Serumkonzentration von 91 auf 112 pmol/l an. In der Placebogruppe blieb HoloTC nach 12 Wochen nahezu konstant.

Tabelle 13: Konzentrationen der Metabolite von Vitamin- und Placebogruppe – Baseline und nach 12 Wochen

	Baseline		p ¹	Nach 3 Monaten		p ²	p ³
	Vitamin B ₁₂ n = 48	Placebo n = 44		Vitamin B ₁₂ n = 48	Placebo n = 44		
Hcy, µmol/l	12,8 (6,4)	11,9 (3,9)	0,492	11,9 (6,2)	12,2 (3,7)	0,445	0,014
MMA, nmol/l	175 (48)	208 (80)	0,035	178 (59)	223 (81)	0,002	0,062
Vitamin B12, pmol/l	313 (128)	298 (118)	0,557	368 (123)	295 (123)	0,002	< 0,001
HoloTC, pmol/l	91 (37)	89 (50)	0,411	112 (48)	91 (68)	0,006	0,001
4 Marker cB124	0,47 (0,44)	0,37 (0,54)	0,322	0,66 (0,40)	0,29 (0,57)	0,001	< 0,001
Änderung nach 3 Monaten⁵							
				Vitamin B ₁₂	Placebo	p ²	p ³
Hcy, µmol/l				-0,9 (2,3)	0,3 (1,9)	0,010	0,024
MMA, nmol/l				3 (49)	15 (64)	0,300	0,185
Vitamin B12				54 (74)	-3 (60)	< 0,001	< 0,001
HoloTC, pmol/l				21 (34)	2 (32)	0,007	0,032

Mittelwert eines Datensatzes (SD).

¹ p: Die Berechnungen der Werte wurden nach ANOVA-Tests kalkuliert.

² p: Die Berechnungen der Werte wurden nach dem General linear Model Varianzanalysestests (nicht adjustiert) kalkuliert.

³ p (adjustiert): Die Veränderungen zwischen den Gruppen wurden unter Verwendung eines allgemeinen linearen Varianzanalysestests berechnet, einschließlich Geschlecht, Metformin (ja, nein, kein Diabetes), Protonenpumpeninhibitoren (ja, nein), gastrointestinale Erkrankungen (ja, nein) und Baseline-Konzentrationen des entsprechenden Markers als Kovarianz.

⁴ cB₁₂: Die Berechnung der Werte erfolgte mittels vier Markern (Vitamin B12, HoloTC, MMA, tHcy) und wurde adjustiert für Alter und Folat.

⁵ Veränderungen der Marker wurden als Post-Ausgangskonzentrationen berechnet.

7 Darstellung der Ergebnisse und Vergleich mit der Veganer-Studie

7.1 Ausgangskonzentrationen von Vitamin-B₁₂-Markern und ihre Veränderungen nach 12 Wochen

Die Ausgangskonzentrationen von Plasma-tHcy, Vitamin B₁₂ und HoloTC unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht signifikant. Zu Beginn der Studie waren die Konzentrationen von Serum-MMA in der Placebogruppe signifikant höher als in der Vitamin-B₁₂-Gruppe ($p = 0,035$). Nur fünf von 92 Teilnehmern hatten erhöhte Ausgangskonzentrationen von MMA ≥ 300 nmol/l, während vier niedrigeres HoloTC < 36 pmol/l aufwiesen. Nach zwölf Wochen unterschieden sich die Konzentrationen von tHcy zwischen den Behandlungsgruppen nicht signifikant. Die Serumkonzentrationen von MMA in der Placebogruppe waren jedoch im Vergleich zur Vitamin-B₁₂-Gruppe höher, während die Serumkonzentrationen von Vitamin B₁₂ und HoloTC in der Vitamingruppe höher lagen als in der Placebogruppe. Die Veränderungen von tHcy (Post Intervention - Basiswert) über drei Monate waren in der Vitamingruppe stärker als in der Placebogruppe (Mittelwert $-0,9$ vs. $+0,3$ $\mu\text{mol/l}$, $p = 0,010$). Die Veränderungen der MMA-Konzentrationen unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht signifikant. Die Veränderungen der Serumkonzentrationen von Vitamin B₁₂ (Mittelwert $+54$ vs. -3 pmol/l, $p < 0,001$) und holoTC (Mittelwert $+21$ vs. $+2$ pmol/l, $p = 0,007$) waren in der Vitamingruppe signifikant höher im Vergleich zur Placebogruppe.

Der mittlere prozentuale Anstieg von Serum-Vitamin B₁₂ in der Vitamingruppe betrug $+23\%$ (Median $+17\%$), während er in der Placebogruppe -1% (Median -2%) betrug ($p < 0,001$). Der mittlere prozentuale Anstieg von Serum-HoloTC lag bei $+29\%$ vs. -1% (Median $+22\%$ vs. -5%), ($p = 0,001$), während die prozentuale Veränderung des Serum-MMA in der Vitamingruppe $+4\%$ (-1%) bzw. in der Placebogruppe $+11\%$ ($+14\%$) betrug ($p = 0,183$).

7.2 Prognose der Vitamin-B₁₂-Zufuhr aus Vitamin-B₁₂-Konzentrationen

Dullemeijer et al. haben eine Metaanalyse über die Beziehung zwischen der Vitamin-B₁₂-Aufnahme und dem Plasma-Vitaminspiegel durchgeführt [112]. Die Regressionsgleichung der Beziehung zwischen der Vitamin-B₁₂-Zufuhr und dem Plasma-Vitamin-B₁₂ bei nicht zusätzlich versorgten älteren Menschen wurde verwendet, um die durchschnittliche Vitamin-B₁₂-Zufuhr (x) von durchschnittlichen Vitamin-B₁₂-Konzentrationen (y) in der vorliegenden Studie vorherzusagen:

$$\log_e(y) = 0,18 * \log_e(x) + 5,47$$

Die Serumkonzentrationen von Vitamin B₁₂ zu Studienbeginn (y) lagen zwischen 295 und 313 pmol/l bei älteren Patienten ohne zusätzliche Versorgung (in beiden Studiengruppen). Somit wurde gemäß der obigen Gleichung die Vitamin-B₁₂-Aufnahme am Anfang auf zwischen 3,5 und 4,6 µg/Tag geschätzt.

$$\rightarrow \log_e(295) = 0,18 * \log_e(x) + 5,47$$

$$\rightarrow \log_e(313) = 0,18 * \log_e(x) + 5,47$$

Unter Verwendung derselben Gleichung wurde die Aufnahme in der mit Vitamin B₁₂ angereicherten Zahnpastagruppe auf 11,4 g/d geschätzt:

Durchschnitt Serum-Vitamin-B₁₂ (y) = 368 pmol/l nach der Behandlung

$$\rightarrow \log_e(368) = 0,18 * \log_e(x) + 5,47$$

$$\rightarrow \log_e(x) = [\log_e(368) - 5,47] / 0,18 = 2,434$$

$$\rightarrow x = e^{2,434} = 11,4 \mu\text{g/d}$$

(Gesamte tägliche Vitamin-B₁₂-Aufnahme während der Behandlung).

Die Prognose der Vitamin-B₁₂-Zufuhr aus dem Serum-Vitamin-B₁₂ bei Veganern ergab vor der Intervention eine sehr niedrige Zufuhr (0,24 µg/d). Es wurde geschätzt, dass der Eingriff bei Veganern 2,4 µg/d Vitamin B₁₂ liefert (Abb.16).

Mögliche Aufnahme von Vitamin B₁₂ bei Veganern. Vergleich der Vitamin-B₁₂-Serumkonzentrationen vor und nach Supplementation bei der Intervention mit Vitamin-B₁₂-angereicherter Zahnpasta [26]. Das Regressionsmodell entspricht der Metaanalyse von Dullemeijer et al. [112].

Baseline-Status und Aufnahme von Vitamin B₁₂ bei Veganern

Mittlere Baseline-Vitamin-B₁₂-Serumkonzentration bei Veganern (y) = 197 pmol/l

Regressionsgleichung zur Bestimmung der Serumspiegel aus Aufnahmemengen:

$$\log_e(y) = 0,15 * \log_e(x) + 5,50$$

$$\rightarrow \log_e(197) = 0,15 * \log_e(x) + 5,50$$

$$\rightarrow \log_e(x) = [\log_e(197) - 5,50] / 0,15 = -1,445$$

$$\rightarrow x = e^{-1,445} = 1 / e^{1,445} = 0,24 \mu\text{g/d.}$$

Die Aufnahme von Vitamin B12 bei Veganern wurde mit dieser Gleichung auf 0,24 µg/d geschätzt.

$$\log_e(y) = 0,18 * \log_e(x) + 5,47$$

Status nach Supplementation und Aufnahmemenge von Vitamin B₁₂ bei Veganern

Mittlere Vitamin-B₁₂-Serumkonzentration nach 12 Wochen Anwendung der mit Vitamin B₁₂ angereicherten Zahnpasta

$$(y) = 279 \text{ pmol/l} \rightarrow \log_e(279) = 0,15 * \log_e(x) + 5,50$$

Die postinterventionelle Aufnahme bei Veganern wird auf 2,4 µg/d geschätzt (unter Verwendung der gleichen Formel oben) [26;112].

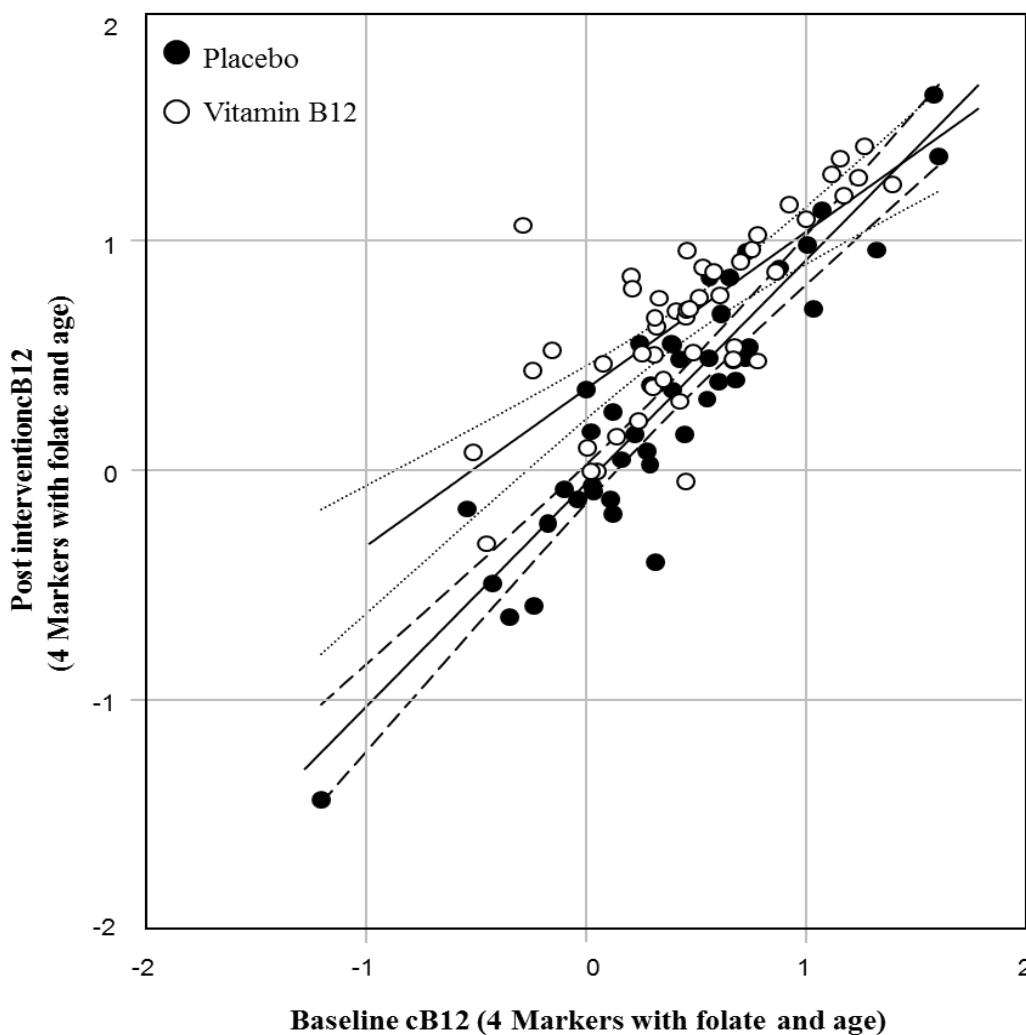


Abb. 16: Substitutionsmodell.

7.3 Veränderungen der Vitamin-B₁₂-Marker bei älteren Menschen im Vergleich zu Veganern

Die Reaktion der Vitamin-B₁₂-Marker auf die Gabe von mit Vitamin B₁₂ angereicherter oder Placebo-Zahnpasta wurden bei älteren Probanden aus der vorliegenden Studie mit Veganern aus einer früheren Studie verglichen [26]. Abgesehen von der Veränderung der Serumkonzentrationen von MMA, die bei älteren Menschen geringer war als bei Veganern [mittlere Veränderung (SD) = 3 (49) vs. -169 (340) nmol/l; p = 0,001], unterschieden sich die Veränderungen (Post Intervention - Ausgangswert) von Serums-Vitamin-B₁₂ [54 (74) vs. 81 (135) pmol/l, p = 0,300], HoloTC [21 (34) vs. 26 (34) pmol/l, p = 0,465], und tHcy [-0,9 (2,3) vs. -0,7 (4,4) µmol/l, p = 0,838] in der mit Vitamin B₁₂ angereicherten Zahnpastagruppe nicht zwischen älteren und veganen Probanden, die das gleiche Interventionsprotokoll verwendeten.

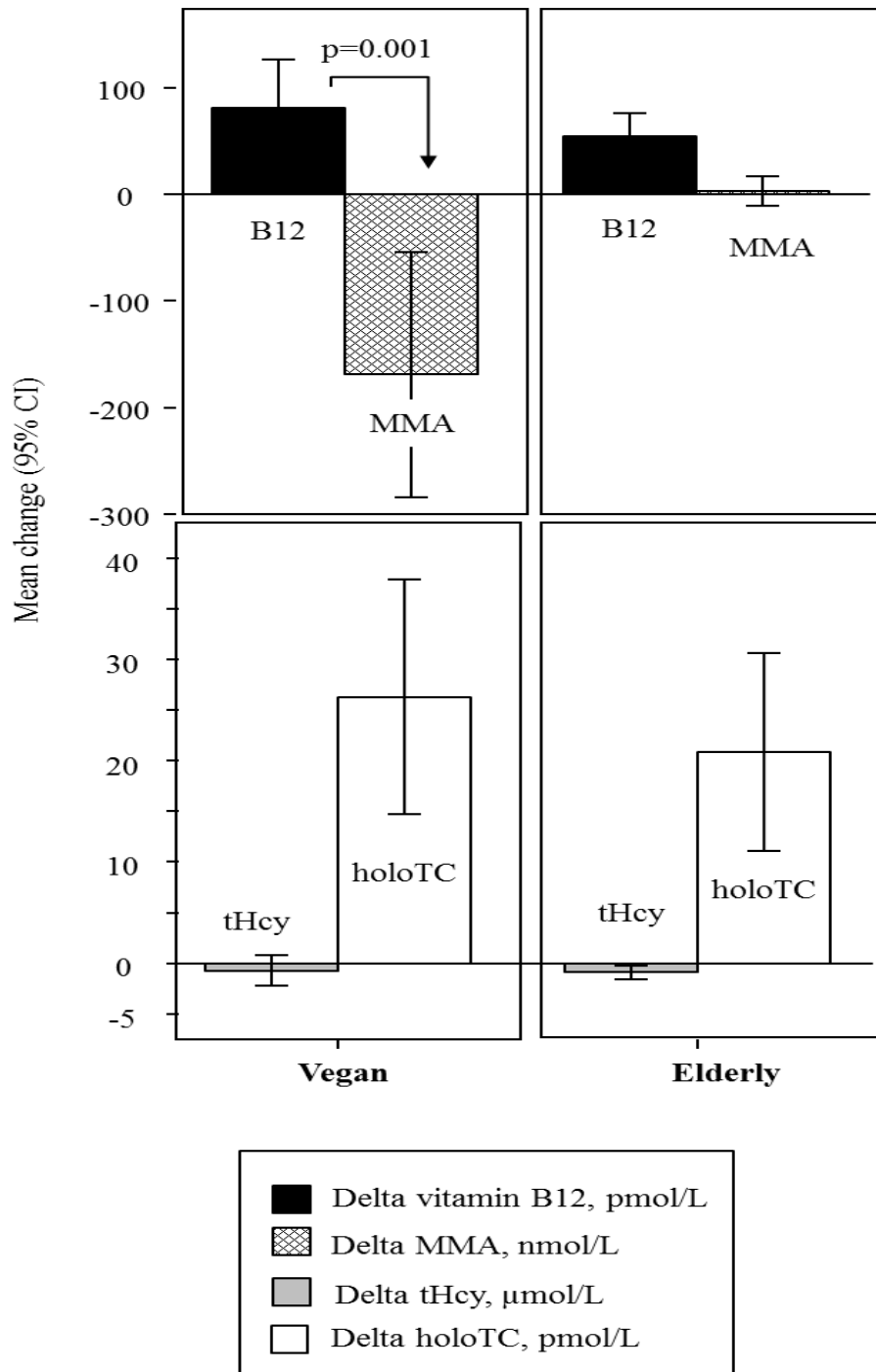


Abb. 17: Veränderungen von Serum-Vitamin-B₁₂-Markern bei älteren Patienten im Vergleich zu Veganern [26]. Veränderungen (Werte Post-Intervention - Werte vor der Intervention) von Serum-Vitamin-B₁₂-Markern als mittlere und 95 %-Konfidenzintervalle bei älteren Patienten im Vergleich zu Veganern von Siebert et al. Mit Ausnahme von MMA unterschieden sich die Veränderungen aller anderen Marker nicht zwischen Veganern und älteren Menschen.

8 Diskussion

In der vorliegenden Studie sollte die Fähigkeit einer mit Vitamin B₁₂ angereicherten Zahnpasta untersucht werden, den Vitamin-B₁₂-Status bei älteren Patienten zu erhöhen.

Hierzu wurde über drei Monate eine stichprobenartig ausgewählte, doppelblinde, placebokontrollierte Behandlung von 92 älteren Probanden durchgeführt (Vitamingruppe n = 44; Placebogruppe n = 48). Die Serumkonzentrationen von Vitamin B₁₂, HoloTC, MMA und tHcy im Plasma wurden zu Studienbeginn und nach drei Monaten gemessen. Weiterhin wurden die ermittelten Werte mit einer früheren Studie an Veganern verglichen.

8.1 Möglichkeiten der Diagnostik und Substitution

Die Schwierigkeit der Erkennung eines Vitamin-B₁₂-Mangels liegt darin, dass die typischen Blutbildveränderungen und Symptome zunächst unspezifisch bzw. subklinisch verlaufen oder fehlen können. Aufgrund dessen ist eine frühzeitige und präventive Diagnostik wichtig, wobei sensitive und spezifische Biomarker des Vitamin B₁₂ zu verwenden sind, um entsprechend eine frühzeitige Substitutionstherapie einleiten zu können. Dadurch können zum Beispiel reversible neurologische Symptome bei Vitamin-B₁₂-Mangel behandelt werden.

Die Bestimmung von Vitamin B₁₂ im Serum ist ein relativ unsensitiver und unspezifischer Marker des Vitamin-B₁₂-Mangels. Deswegen ist die Bestimmung der sensitiven Biomarker. Holotranscobalamin (HoloTC), welches als aktives Vitamin B₁₂ bezeichnet und Methylmalonsäure (MMA), welche als funktioneller Vitamin-B₁₂-Marker bezeichnet wird, erforderlich.

HoloTC und MMA sind die frühesten sensitiven Laborparameter des Vitamin-B₁₂-Mangels. Ein manifester Mangel des Vitamins zeichnet sich durch erhöhten Spiegel von MMA und Hcy sowie einen erniedrigten Spiegel von HoloTC aus. HoloTC hat eine Aussagekraft über die Vitamin-B₁₂-Bilanz im Hinblick auf den intrazellulären Speicher und den extrazellulären Vitamin-B₁₂-Spiegel. In diesem Zusammenhang erlaubt die diagnostische Auswertung von HoloTC die Einleitung therapeutischer Schritte.

Es zeigten sich in verschiedenen Studien mehrere Möglichkeiten der Substitution: oral, parenteral oder intramuskulär. Unter oraler Substitutionstherapie stiegen die Serumspiegel von Vitamin B₁₂ dosisabhängig an (Abb. 18) [37].

Die Studie von Eussen et al. zeigte bei der oralen Substitution von mildem Vitamin-B₁₂-Mangel bei älteren Menschen einen deutlichen Anstieg von Vitamin B₁₂ und MMA. In der

Vergleichstudie bei 38 Patienten mit neu festgestelltem Vitamin-B₁₂-Mangel wurde eine orale Substitution mit Cyanocobalamin von 1x täglich 2 mg täglich an verschiedenen Tagen verordnet. Hierbei kam es bei vier von 18 Patienten unter oraler Therapie und bei vier von 15 unter dieser Therapie zu deutlicher Verbesserung aller Serummarker. Cbl und MMA waren bei der oralen Therapie signifikant besser als bei der intramuskulären Therapie (Abb. 19 und 20) [117;118].

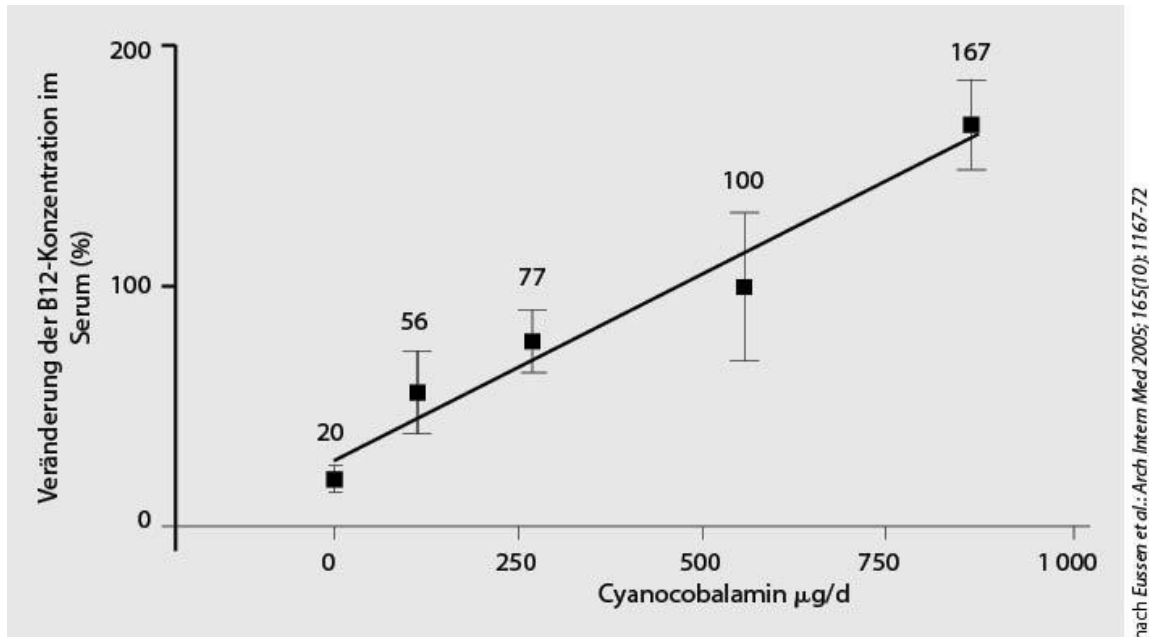


Abb. 18: Dosisabhängiger Anstieg von Vitamin B₁₂ bei oraler Substitution [37].

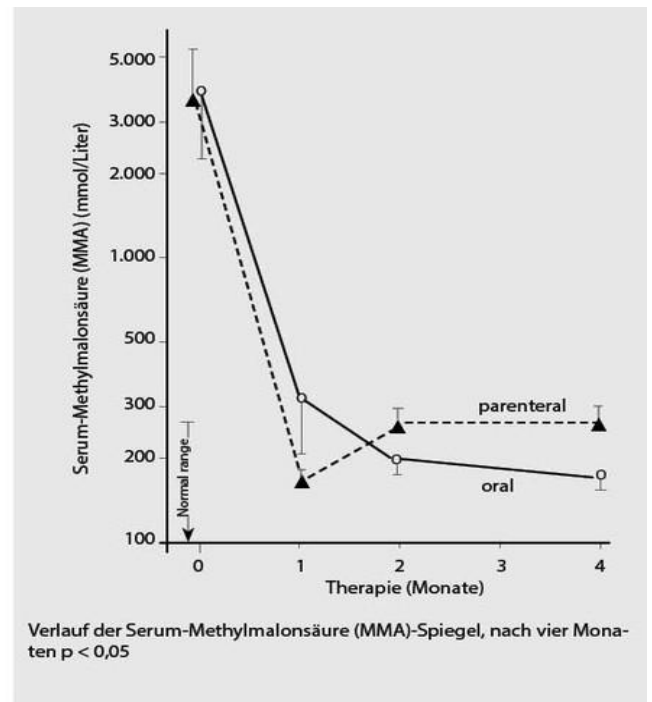
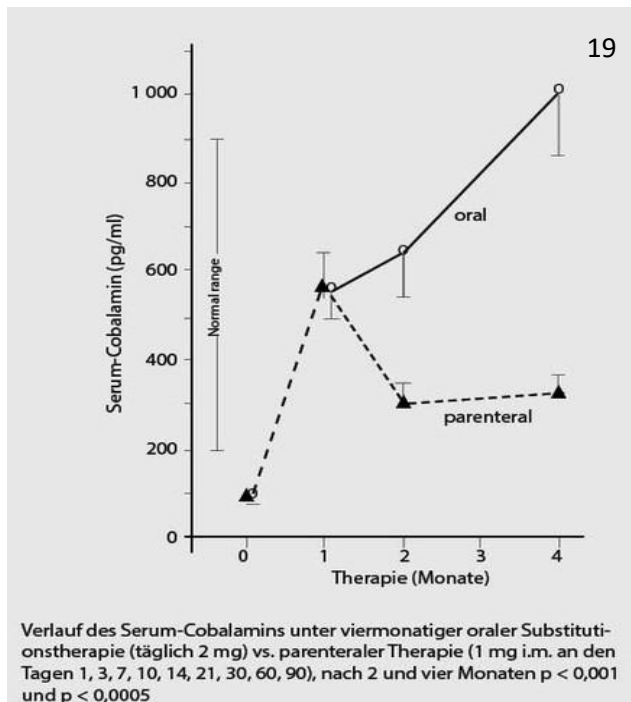


Abb. 19 & 20: Verbesserte MMA- und Vitamin-B₁₂-Spiegel unter oraler Substitutionstherapie [117;118].

In der Cocharne Review, zweit - kontrollierten randomisierten Studien mit 108 Patienten mit Vitamin B₁₂ Mangel. In der Auswertung war die bereits beschriebene Kuzminski-Studie [118] einer Therapie mit 1 - 2 mg Cyanocobalamin als orale Gabe einer intramuskulären Substitution keineswegs unterlegen [119].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine hochdosierte orale Gabe von Vitamin B₁₂ bei manifestem Vitamin-B₁₂-Mangel eine gleichwertige Alternative zur parenteralen oder intramuskulären Applikation darstellt.

Die Möglichkeit der Vitamin-B₁₂-Zufuhr über passive Diffusion führte zu der Überlegung, eine mit Vitamin B₁₂ angereicherte Zahncreme zu entwickeln. Im Jahr 2001 wurde am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Universität Magdeburg eine placebokontrollierte Studie durchgeführt, die die Wirkung einer mit Vitamin B₁₂, Folat und Vitamin B₆ angereicherten Zahncreme über einen Zeitraum von vier Wochen untersuchte. Dabei wurde eine signifikante Verringerung des Homocysteinspiegels ($-0,9 \pm 1,0 \mu\text{mol/l}$) sowie ein um 60 % angestiegener Vitamin-B₁₂-Spiegel beobachtet [23].

In der vorliegenden Studie war die Zahncreme mit 100 $\mu\text{g/g}$ Vitamin B₁₂ angereichert. Rechnerisch gelangten dadurch bei der üblichen Nutzungsmenge von 1,27 g Zahncreme pro Tag [24] 127 μg Vitamin B₁₂ in die Mundhöhle. Da bei jedem Putzvorgang etwa 50 mg Zahncreme verschluckt werden [25], ergaben sich bei zweimaligem Zähneputzen täglich 0,1 g Zahncreme mit 10 μg Vitamin B₁₂ pro Tag, welche in den Gastrointestinaltrakt der Probanden gelangten.

Für die tatsächliche Resorption ergibt sich folgendes: In der Mundhöhle verbleiben 1,17 g Zahncreme mit 117 μg Vitamin B₁₂. Davon werden bei Probanden, die das Vitamin B₁₂ über IF nicht aufnehmen können, etwa 1,17 μg Vitamin B₁₂ durch passive Diffusion resorbiert (Resorptionsrate = 1 %).

Es kann davon ausgegangen werden, dass mit täglichen Aufnahmemengen von etwa 1 μg Vitamin B₁₂ - unter der Voraussetzung der völligen Bioverfügbarkeit - der Minimalbedarf des Menschen zu decken ist [18]. Diese Menge würde bereits über die passive Diffusion des aus der Zahncreme in der Mundhöhle verbleibenden Vitamin B₁₂ erreicht.

Wird ein ausreichendes Vorhandensein von IF vorausgesetzt, dann läge die aktive Resorption des Vitamin B₁₂, welche durch das Verschlucken von Zahncreme in den Gastrointestinaltrakt gelangt, bei 10 μg Vitamin B₁₂. Dies entspricht etwa 1,5 μg [18].

Somit ergibt sich aus der passiven Diffusion von 1,17 μg und der aktiven Resorption von 1,5 μg eine rechnerische Aufnahmemenge von 2,67 μg pro Tag, die den angenommenen Mindestbedarf auf jeden Fall abdeckt.

Eine mit Vitamin B₁₂ angereicherte Zahncreme könnte somit eine praktikable Möglichkeit der Supplementierung darstellen, um die Vitamin-B₁₂-Versorgung vegetarisch und vegan lebender sowie älterer Menschen zu verbessern.

In verschiedenen Ländern wurden der tägliche Bedarf an Vitamin B₁₂ und die Ernährungsquellen in verschiedenen Studien verglichen. Der Tagesbedarf für Jugendliche und Erwachsene liegt bei 3 µg pro Tag.

In einer Datenanalyse aus den USA zeigten 4 % der Teilnehmer der NHANES-Studie ab 50 Jahre ohne vorbekannte Mangelerscheinung oder chronische Erkrankungen einen Vitamin-B₁₂-Mangel [120].

Laut einer nationalen Verzehrstudie nehmen in Deutschland Männer durchschnittlich 5,8 µg und Frauen 4,0 µg Vitamin B₁₂ pro Tag zu sich [121]. In mehreren Studien zeigte sich ein positiver Effekt auf oral verabreichte Vitamin-B₁₂-Präparate. Probanden, bei denen bereits eine erniedrigte Vitamin B₁₂ ausgewiesen war, über acht Wochen verschiedene Tagesdosen an oralem Vitamin B₁₂ (10 µg/d, 100 µg/d und 500 µg/d) [12;122]. Nach Supplementierung hatte die Gruppe, die 10 µg/d erhielt, im Vergleich zur Placebogruppe [122] einen um ca. 60 pmol/l höheren VitaminB₁₂- und einen um ca. 25 pmol/l höheren HoloTC-Wert im Vergleich zum Placebo [122].

Die Höhe der Veränderungen der Vitamin-B₁₂-Biomarker in der vorliegenden Studie ist vergleichbar mit früheren Studien bei älteren Personen, die niedrige orale Dosen von Cbl (≤ 10 µg) einnahmen [6;123]. In einer plazebokontrollierten Studie wendeten Hill et al. über acht Wochen 10 µg/Tag, 100 µg/Tag und 500 µg/Tag orales Cyanocobalamin bei älteren Patienten mit niedrigen anfänglichen Plasmakonzentrationen von Vitamin B₁₂ an [122]. Nach der Gabe hatte die Gruppe, die 10 µg/Tag erhielt, etwa 60 pmol/l höhere Vitamin-B₁₂-Spiegel im Vergleich zur Placebogruppe, während HoloTC etwa 25 pmol/l höher war als in der Placebogruppe [122].

In einer Querschnittsstudie bei älteren Kanadiern wurde bei Verwendung von Nahrungsergänzungsmitteln, die weniger als 10 µg/Tag Vitamin B₁₂ enthielten, höhere Vitamin-B₁₂-Serumkonzentrationen im Vergleich zu Nicht-Vitaminkonsumenten beobachtet (geometrischer Mittelwert 348 vs. 285 pmol/l; Unterschied 63 pmol/l). Während die Verwendung von 10 - 25 µg/d oder höheren Dosen mit einer mittleren Vitamin-B₁₂-Konzentration von etwa 415 pmol/l (Unterschied zu Nicht-Vitamin-Konsumenten 130 pmol/l) assoziiert war [124]. Darüber hinaus wurde von einer Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen oralem Vitamin B₁₂ (2,5 bis 80 µg/Tag über 30 Tage) und Vitamin-B₁₂-Serumkonzentrationen bei Patienten mit niedrigem Vitamin B₁₂ und Malabsorption berichtet [5]. Der Anstieg von Serum-Vitamin-B₁₂ als Reaktion auf die Vitamin-B₁₂-Zufuhr scheint sich bei einer Aufnahme

über 20 µg/d abzuschwächen, was mit den Ergebnissen der kanadischen Studie übereinstimmt [124]. Bei einer Vitamin-B₁₂-Dosis von ≤ 10 µg/Tag stieg das Serum-Vitamin-B₁₂ innerhalb eines Monats bis auf 50 pmol/l an [5]. Dosen von mehr als 10 µg/d führten zu einer Erhöhung des Vitamin-B₁₂-Spiegels im Serum um bis zu 80 pmol/l im Vergleich zu den Ausgangswerten. Wenn Vitamin B₁₂ oral in Dosen von ≤ 10 µg/Tag verabreicht wird, wird es wahrscheinlich über den IF-Rezeptor absorbiert, während höhere Dosen wahrscheinlich über passive Diffusion passieren. Das Ausmaß der Veränderung von Serum-HoloTC in der vorliegenden Studie (21 pmol/l) liegt in dem Bereich, der nach oralen Dosen unter 10 µg/d erwartet wird.

Der Dosis-Wirkungs-Zusammenhang zwischen Vitamin-B₁₂-Aufnahme und Serum-Plasma-Marker (Vitamin B₁₂ und MMA) wurde in einer aktuellen Metaanalyse untersucht [112]. Dullemeijer et al. schätzten, dass eine Verdoppelung der Vitamin-B₁₂-Aufnahme die Vitamin-B₁₂-Serumkonzentration um 11,0 % erhöhen würde (95 %-KI: 9,4 %, 12,5 %) [112].

Diese Assoziation war in der Metaanalyse bei Studien an älteren Personen stärker als in erwachsenen Populationen, von denen angenommen wurde, dass sie mit niedrigeren Basis-Serumkonzentrationen von Vitamin B₁₂ bei älteren Menschen in Zusammenhang stehen (d. h. höhere Marge für Veränderungen) [112]. In der vorliegenden Untersuchung wurde die altersspezifische Regressionsgleichung aus der Metaanalyse von Dullemeijer et al. [112] angewandt, um die durchschnittliche Vitamin-B₁₂-Aufnahme aus den durchschnittlich gemessenen Vitamin-B₁₂-Serumkonzentrationen vorherzusagen. Dementsprechend wurde prognostiziert, dass die Zahnpasta, die 100 µg Cyanocobalamin/g enthält, eine zusätzliche durchschnittliche tägliche Zufuhr von Vitamin B₁₂ liefert, die einer zusätzlichen oralen Zufuhr von 7 µg/d entspricht, während die Vitamin-Grundeinnahme gemäß derselben Gleichung 3,5 - 4,6 µg/d betragen würde (d. h. Gesamtzufuhr unter Supplementation ca. 11,4 µg/d). Die Basis-Aufnahme stimmte mit den Einnahmeschätzungen bei älteren Deutschen überein, die keine zusätzlichen Nahrungsergänzungen verwenden [125]. Darüber hinaus stimmte die mittlere prozentuale Zunahme des durch die Gabe verursachten Serum-Vitamin-B₁₂ (+17 %) mit einer um mehr als das Zweifache erhöhten Vitamin-B₁₂-Aufnahme überein, wie aus der Studie von Dullemeijer et al. erwartet [112]. Die geschätzte Vitamin-B₁₂-Zufuhr über die Zahnpasta bei Veganern, die dieselbe Dosis verwendeten, war geringer (2,4 µg/d) [26]. Dies könnte mit einer Ungenauigkeit der Regressionsgleichung im niedrigen Serum-Vitamin B₁₂-Bereich oder mit einer möglicherweise unterschiedlichen Kinetik von Vitamin B₁₂ bei Veganern zusammenhängen, die die Studie mit niedrigem Anfangs-Serum-Vitamin-B₁₂ begonnen haben.

Die Reaktion von Serum-MMA auf niedrige Dosen von Cyanocobalamin ist bekanntermaßen weniger ausgeprägt als die von Serum-HoloTC oder Vitamin B₁₂ [112;122]. Dullemeijer et al.

[112] haben gezeigt, dass die absoluten Veränderungen des Serum-MMA (Mittelwert -7 %; 95 %-KI = -10 % bis -4 %) nach Verdoppelung der Vitamin-B₁₂-Zufuhr geringer waren als die Veränderungen des Serum-Vitamin-B₁₂ [+11,0 % (95 %-KI: 9,4 %, 12,5 %)] [112]. Erhöhte MMA-Plasma-Ausgangskonzentrationen (> 260 nmol/l) sanken nach 16-wöchiger Gabe mit 2,5 µg/d oder 100 µg/d Cyanocobalamin bei älteren Menschen um ca. 16 % [117]. Da die Mehrheit der Teilnehmer der vorliegenden Untersuchung zu Studienbeginn kein erhöhtes MMA aufwies, wurde keine Serum-MMA-Reduktion nach Vitamin-B₁₂-Supplementierung erwartet. In Übereinstimmung damit war die Reaktion von Serum-MMA bei älteren Menschen geringer als bei veganen Patienten, die höhere MMA-Anfangskonzentrationen hatten [10]. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Veränderungen von Serum-HoloTC und -Vitamin-B₁₂ über drei Monate nicht zwischen älteren Menschen und Veganern, was darauf hindeutet, dass die Verwendung der mit Vitamin B₁₂ angereicherten Zahnpasta den Vitamin-B₁₂-Status erfolgreich wiederherstellt oder einen Vitaminabbau unabhängig vom Alter oder klinischen Bedingungen verhindert. Studien an älteren Menschen, die das Vitamin nicht aufnehmen können (z. B. aufgrund von perniziöser Anämie oder Gastritis), könnten weitere Informationen über den Absorptionsweg von im Mund angewendetem Vitamin B₁₂ liefern. Im Falle einer Cbl-Malabsorption ist nicht bekannt, ob die Menge des Vitamins, die den Kreislauf erreicht, ausreichend wäre, um normale Vitamin-B₁₂-Statusmarker im Blut aufrechtzuerhalten.

Zusammengefasst zeigten ältere Probanden, die Zahnpasta mit 100 µg Cyanocobalamin/g verwendeten, innerhalb von drei Monaten verbesserte Serumkonzentrationen von Vitamin B₁₂ und HoloTC im Vergleich zur Placebogruppe. So könnte mit Vitamin B₁₂ angereicherte Zahnpasta dazu dienen, den Vitamin-B₁₂-Status bei älteren Menschen im Allgemeinen zu verbessern oder Vitaminmangel zu vermeiden. Weitere Studien an älteren Patienten mit Vitamin-B₁₂-Malabsorption sind erforderlich, bevor der Verabreichungsweg durch die Mundschleimhaut allgemein empfohlen werden kann, um einen Mangel bei älteren Menschen zu verhindern.

8.2 Fazit

Nach der Behandlung waren die Konzentrationen von Vitamin B₁₂ in der Vitamin-B₁₂-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe signifikant höher [Mittelwert (SD) 368 (123) vs 295 (123) pmol/l; p = 0,005] und die Konzentration von HoloTC tendenziell höher [112 (48) vs. 91 (68) pmol/l; p = 0,088]. Die Veränderungen von Serum-Vitamin-B₁₂ [54 (74) vs. -3 (60) pmol/l; p < 0,001], HoloTC [21 (34) vs. 2 (32) pmol/l; p = 0,007] und tHcy [-0,9 (2,3) vs. 0,3 (1,9) µmol/l; p = 0,010] waren zwischen der Vitamin- und der Placebogruppe signifikant unterschiedlich.

Der mittlere prozentuale Anstieg von Serum-Vitamin B₁₂ (+17 %) in der Vitamin-B₁₂-Zahnpastagruppe deutet darauf hin, dass die Intervention/Behandlung eine zusätzliche tägliche Zufuhr von 7 µg oralem Vitamin B₁₂ bereitgestellt hatte. Krankheiten und Medikamente, die mit einem niedrigen Vitamin-B₁₂-Status in Verbindung gebracht werden könnten, beeinflussten die Veränderung der Blutmarker in der Vitamingruppe nicht.

Die mit Vitamin B₁₂ angereicherte Zahnpasta hat bei älteren Menschen den Vitamin B₁₂-Status erhöht und kann somit bei älteren Menschen zur Verbesserung des Vitamin-Status oder zur Vorbeugung eines Vitamin B₁₂-Mangels eingesetzt werden. Eine mit Vitamin B₁₂ angereicherte Zahncreme könnte somit eine einfache und praktikable Möglichkeit der Supplementierung darstellen, um die Vitamin-B₁₂-Versorgung vegetarisch und veganer lebender sowie älterer Menschen zu verbessern.

Empfehlungen:

Der Vitamin-B₁₂-Mangel ist weit verbreitet. Ältere Menschen sind neben Vegetariern, Schwangeren und Patienten mit Nieren- oder Darmerkrankungen besonders prädisponiert, an Vitaminmangel zu leiden. Die Problematik bei dieser Bevölkerungsgruppe hat verschiedene Institutionen dazu veranlasst, die präventive Substitution von Vitamin B₁₂ generell auszusprechen.

Für Menschen ab dem 65. Lebensjahr ist grundsätzlich die Einnahme von Vitamin B₁₂ (> 50 µg/d) zu empfehlen [39, 45]. Bei fortgeschrittenen Formen der atrophischen Gastritis bzw. beim Vorliegen einer perniziösen Anämie sind deutlich höhere, therapeutische Dosen bis zu 1000 µg/d erforderlich.[126].

Die Empfehlungen im Hinblick auf die Dosierung und Anwendung der Vitamin-B₁₂-Substitution für die Prävention oder Behandlung von B₁₂ Mangel sind bisher nicht einheitlich.

Die Ernährungsumstellung stellt sich in erster Linie als präventiver Aspekt dar. Bei Mangelerkrankung ist eine systemische oder orale Substitution zu empfehlen.

Die passive Diffusion über Schleimhäute ist als Substitutionsaspekt zu empfehlen, solange die intrazellulären Speicher im Normbereich sind.

Die Orale Substitution als Monotherapie ist bei normalen Hcy-Spiegel zu empfehlen.

Bei erhöhtem Spiegel von Hcy ist eine duale Therapie mit Folsäure angezeigt. Die intravenöse oder muskuläre Substitution ist eine initiale Option bei hyperchromemakrozytärer Megaloblastenanämie (Perniziosa, Biermer-Anämie, Addison-Anämie) und einer funikulären Spinalerkrankung.

9 Publikation

Vitamin B12-fortified toothpaste improves vitamin status in elderly people; a randomized, double blind, placebo-controlled study.

Ayman Zant, Hussain M Awwad, Jürgen Geisel, Markus Keller, Rima Obeid

Aging Clinical and Experimental Research (Springer), in der Beurteilung.

10 Literaturverzeichnis

- [1] Hooshmand B, Mangialasche F, Kalpouzos G, et al. Association of Vitamin B12, Folate, and Sulfur Amino Acids With Brain Magnetic Resonance Imaging Measures in Older Adults: A Longitudinal Population-Based Study. *JAMA Psychiatry* 2016;73: 606-13.
- [2] Brito A, Verdugo R, Hertrampf E, et al. Vitamin B-12 treatment of asymptomatic, deficient, elderly Chileans improves conductivity in myelinated peripheral nerves, but high serum folate impairs vitamin B-12 status response assessed by the combined indicator of vitamin B-12 status. *Am J Clin Nutr* 2016;103: 250-7.
- [3] Carmel R. Cobalamin, the stomach, and aging. *Am J Clin Nutr* 1997;66: 750-9.
- [4] Carmel R. Malabsorption of food cobalamin. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8: 639-55.
- [5] Blacher J, Czernichow S, Raphael M, et al. Very low oral doses of vitamin B-12 increase serum concentrations in elderly subjects with food-bound vitamin B-12 malabsorption. *J Nutr* 2007;137: 373-8.
- [6] Bor MV, Lydeking-Olsen E, Moller J, Nexø E. A daily intake of approximately 6 microg vitamin B-12 appears to saturate all the vitamin B-12-related variables in Danish postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2006;83: 52-8.
- [7] Dhonukshe-Rutten RA, van ZM, de Groot LC, et al. Effect of supplementation with cobalamin carried either by a milk product or a capsule in mildly cobalamin-deficient elderly Dutch persons. *Am J Clin Nutr* 2005;82: 568-74.
- [8] Rozgonyi NR, Fang C, Kuczmarski MF, Bob H. Vitamin B(12) deficiency is linked with long-term use of proton pump inhibitors in institutionalized older adults: could a cyanocobalamin nasal spray be beneficial? *J Nutr Elder* 2010;29: 87-99.
- [9] Slot WB, Merkus FW, van Deventer SJ, Tytgat GN. Normalization of plasma vitamin B12 concentration by intranasal hydroxocobalamin in vitamin B12-deficient patients. *Gastroenterology* 1997;113: 430-3.
- [10] Obeid R, Awwad HM, Keller M, Geisel J. Trimethylamine-N-oxide and its biological variations in vegetarians. *Eur J Nutr* 2017;56: 2599-609.
- [11] Nexø E, Hansen MR, Konradsen L. Human salivary epidermal growth factor, haptocorrin and amylase before and after prolonged exercise. *Scand J Clin Lab Invest* 1988;48: 269-73.
- [12] Nexø E, Hansen M, Poulsen SS, Olsen PS. Characterization and immunohistochemical localization of rat salivary cobalamin-binding protein and comparison with human salivary haptocorrin. *Biochim Biophys Acta* 1985;838: 264-9.

- [13] Linnell JC, Bhatt HR. Inherited errors of cobalamin metabolism and their management. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8: 567-601.
- [14] Herrmann W. Hyperhomocysteinämie, B-Vitamin-Mangel und Gefäß- sowie neurodegenerative Erkrankungen. In: Thomas L, Ed. *Labor und Diagnose - Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH; 2008, p. 586-621.
- [15] COX EV, WHITE AM. Methylmalonic acid excretion: an index of vitamin-B12 deficiency. *Lancet* 1962;2: 853-6.
- [16] Krautler B. Vitamin B12: chemistry and biochemistry. *Biochem Soc Trans* 2005;33: 806-10.
- [17] Herbert V. Vitamin B-12: plant sources, requirements, and assay. *Am J Clin Nutr* 1988;48: 852-8.
- [18] Pietrzik K, Golly I, Loew D. Folsäure/Folat. In: Pietrzik K, Golly I, Loew D, Eds.: *ELSEVIER-URBAN & FISCHER*, München. Jena; 2008, p. 83-127.
- [19] Kozyraki R, Kristiansen M, Silahatoglu A, et al. The human intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin: molecular characterization and chromosomal mapping of the gene to 10p within the autosomal recessive megaloblastic anemia (MGA1) region. *Blood* 1998;91: 3593-600.
- [20] Herzlich B, Herbert V. The role of the pancreas in cobalamin (vitamin B12) absorption. *Am J Gastroenterol* 1984;79: 489-93.
- [21] Sharabi A, Cohen E, Sulkes J, Garty M. Replacement therapy for vitamin B12 deficiency: comparison between the sublingual and oral route. *Br J Clin Pharmacol* 2003;56: 635-8.
- [22] Yazaki Y, Chow G, Mattie M. A single-center, double-blinded, randomized controlled study to evaluate the relative efficacy of sublingual and oral vitamin B-complex administration in reducing total serum homocysteine levels. *J Altern Complement Med* 2006;12: 881-5.
- [23] Dierkes J, Westphal S, Luley C. Vitamins in toothpaste: bioavailability and effect on plasma homocysteine concentrations. 2001.
- [24] Staehle HJ. [Oral health behavior in Germany and Switzerland]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2004;114: 1236-51.
- [25] Hellwig E, Klimek J, Attin T. *Einführung in die Zahnerhaltung*. 5 ed.: Dt. ZahnÄrzte-Verlag, 2009.
- [26] Siebert AK, Obeid R, Weder S, et al. Vitamin B-12-fortified toothpaste improves vitamin status in vegans: a 12-wk randomized placebo-controlled study. *Am J Clin Nutr* 2017;105: 618-25.

- [27] Biesalski HK, Bischoff SC, Puchstein C. Vitamine. Ernährungsmedizin: Nach dem Curriculum Ernährungsmedizin der Bundesärztekammer und der DGE.: Thieme; 2010, p. 133-90.
- [28] Pietrzik K, Golly I, Loew D. Handbuch Vitamine: für Prophylaxe, Therapie und Beratung ; 94 Tabellen.: Elsevier, Urban & Fischer, 2008.
- [29] Schmidt E, Bieger W. Leitfaden Mikronährstoffe: orthomolekulare Prävention und Therapie.: Elsevier, Urban & Fischer, 2004.
- [30] Seetharam B. Receptor-mediated endocytosis of cobalamin (vitamin B12). *Annu Rev Nutr* 1999;19: 173-95.
- [31] Hicks JM, Cook J, Godwin ID, Soldin SJ. Vitamin B12 and folate. Pediatric reference ranges. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117: 704-6.
- [32] Herrmann W, Schorr H, Obeid R, Geisel J. Vitamin B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 2003;78: 131-6.
- [33] Herrmann W, Obeid R. Causes and early diagnosis of vitamin B12 deficiency. *Dtsch Arztebl Int* 2008;105: 680-5.
- [34] Obeid R, Schorr H, Eckert R, Herrmann W. Vitamin B12 status in the elderly as judged by available biochemical markers. *Clin Chem* 2004;50: 238-41.
- [35] Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Geisel J. The usefulness of holotranscobalamin in predicting vitamin B12 status in different clinical settings. *Curr Drug Metab* 2005;6: 47-53.
- [36] Herrmann W, Obeid R, Jouma M. Hyperhomocysteinemia and vitamin B-12 deficiency are more striking in Syrians than in Germans--causes and implications 2. *Atherosclerosis* 2003;166: 143-50.
- [37] Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Geisel J. Functional vitamin B12 deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk. *Clin Chem Lab Med* 2003;41: 1478-88.
- [38] Herrmann W, Schorr H, Bodis M, et al. Role of homocysteine, cystathionine and methylmalonic acid measurement for diagnosis of vitamin deficiency in high-aged subjects. *Eur J Clin Invest* 2000;30: 1083-9.
- [39] 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 1. *Eur J Clin Nutr* 1998;52: 582-7.
- [40] Henoun LN, Noel E, Ben AM, et al. Cobalamin deficiency due to non-immune atrophic gastritis in elderly patients. A report of 25 cases. *J Nutr Health Aging* 2005;9: 462.
- [41] Soldin OP, Hanak B, Soldin SJ. Blood lead concentrations in children: new ranges. *Clin Chim Acta* 2003;327: 109-13.

- [42] Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Lindenbaum J. Neurologic aspects of cobalamin deficiency. *Medicine (Baltimore)* 1991;70: 229-45.
- [43] Gunes HN, Bekircan-Kurt CE, Tan E, Erdem-Ozdamar S. The histopathological evaluation of small fiber neuropathy in patients with vitamin B12 deficiency. *Acta Neurol Belg* 2017.
- [44] McCombe PA, McLeod JG. The peripheral neuropathy of vitamin B12 deficiency. *J Neurol Sci* 1984;66: 117-26.
- [45] Yaqub BA, Siddique A, Sulimani R. Effects of methylcobalamin on diabetic neuropathy. *Clin Neurol Neurosurg* 1992;94: 105-11.
- [46] Li G. [Effect of mecobalamin on diabetic neuropathies. Beijing Methycobal Clinical Trial Collaborative Group]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 1999;38: 14-7.
- [47] Dominguez J, Ng A, Damian L. A prospective, open label, 24-week trial of methylcobalamin in the treatment of diabetic polyneuropathy. *Journal of Diabetes Mellitus* 2012;2: 408-12.
- [48] Sun Y, Lai MS, Lu CJ. Effectiveness of vitamin B12 on diabetic neuropathy: systematic review of clinical controlled trials. *Acta Neurol Taiwan* 2005;14: 48-54.
- [49] Talaei A, Siavash M, Majidi H, Chehrei A. Vitamin B12 may be more effective than nortriptyline in improving painful diabetic neuropathy. *Int J Food Sci Nutr* 2009;60 Suppl 5: 71-6.
- [50] Hermann LS., Nilsson B., Wettre S. Vitamin B₁₂ status of patients treated with metformin: A cross-sectional cohort study. *British Journal of Diabetes and Vascular Disease* 2004;4: 401-6.
- [51] Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, et al. Vitamin B12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. *Am J Psychiatry* 2002;159: 2099-101.
- [52] Hintikka J, Tolmunen T, Tanskanen A, Viinamaki H. High vitamin B12 level and good treatment outcome may be associated in major depressive disorder. *BMC Psychiatry* 2003;3: 17.
- [53] Coppen A, Bolander-Gouaille C. Treatment of depression: time to consider folic acid and vitamin B12. *J Psychopharmacol* 2005;19: 59-65.
- [54] Almeida OP, Ford AH, Flicker L. Systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials of folate and vitamin B12 for depression. *Int Psychogeriatr* 2015;27: 727-37.
- [55] Hickie I, Scott E, Naismith S, et al. Late-onset depression: genetic, vascular and clinical contributions. *Psychol Med* 2001;31: 1403-12.
- [56] Gilbody S, Lewis S, Lightfoot T. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genetic polymorphisms and psychiatric disorders: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2007;165: 1-13.

- [57] Bjelland I, Tell GS, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM. Folate, vitamin B12, homocysteine, and the MTHFR 677C->T polymorphism in anxiety and depression: the Hordaland Homocysteine Study. *Arch Gen Psychiatry* 2003;60: 618-26.
- [58] Stahl SM. Novel therapeutics for depression: L-methylfolate as a trimonoamine modulator and antidepressant-augmenting agent. *CNS Spectr* 2007;12: 739-44.
- [59] Herrmann W, Obeid R. Utility and limitations of biochemical markers of vitamin B12 deficiency. *Eur J Clin Invest* 2013;43: 231-7.
- [60] Carmel R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. *Am J Clin Nutr* 2011.
- [61] Bamonti F, Moscato GA, Novembrino C, et al. Determination of serum holotranscobalamin concentrations with the AxSYM active B(12) assay: cut-off point evaluation in the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2010;48: 249-53.
- [62] Joosten E, van den Berg A, Riezler R, et al. Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B-12 (cobalamin), folate, and vitamin B-6 occur commonly in elderly people. *Am J Clin Nutr* 1993;58: 468-76.
- [63] Stabler SP, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency 2. *Blood* 1990;76: 871-81.
- [64] Lindenbaum J, Rosenberg IH, Wilson PW, Stabler SP, Allen RH. Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population 1. *Am J Clin Nutr* 1994;60: 2-11.
- [65] Bamonti F, Moscato GA, Novembrino C, et al. Determination of serum holotranscobalamin concentrations with the AxSYM active B(12) assay: cut-off point evaluation in the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2010;48: 249-53.
- [66] Obeid R, Herrmann W. Holotranscobalamin in laboratory diagnosis of cobalamin deficiency compared to total cobalamin and methylmalonic acid. *Clin Chem Lab Med* 2007;45: 1746-50.
- [67] Obeid R, Geisel J, Schorr H, Hubner U, Herrmann W. The impact of vegetarianism on some haematological parameters. *Eur J Haematol* 2002;69: 275-9.
- [68] Lee YK, Kim HS, Kang HJ. Holotranscobalamin as an indicator of vitamin B12 deficiency in gastrectomized patients. *Ann Clin Lab Sci* 2009;39: 361-6.
- [69] Cook RJ. Folate metabolism. In: Carmel R, Jacobsen DW, Eds. *Homocysteine in Health and Disease*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2001, p. 113-34.
- [70] Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab* 2000;71: 121-38.
- [71] Bailey LB, Gregory JF, III. Folate metabolism and requirements. *J Nutr* 1999;129: 779-82.

- [72] Blount BC, Mack MM, Wehr CM, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94: 3290-5.
- [73] Melnyk S, Pogribna M, Miller BJ, et al. Uracil misincorporation, DNA strand breaks, and gene amplification are associated with tumorigenic cell transformation in folate deficient/repleted Chinese hamster ovary cells. *Cancer Lett* 1999;146: 35-44.
- [74] Herrmann W, Obeid R. The mandatory fortification of staple foods with folic acid: a current controversy in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 2011;108: 249-54.
- [75] de Bree A, van Dusseldorp M, Brouwer IA, van het Hof KH, Steegers-Theunissen RP. Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. *Eur J Clin Nutr* 1997;51: 643-60.
- [76] Flynn A, Hirvonen T, Mensink GB, et al. Intake of selected nutrients from foods, from fortification and from supplements in various European countries. *Food Nutr Res* 2009;53.
- [77] 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.
- [78] Stanger O. Physiology of folic acid in health and disease. *Curr Drug Metab* 2002;3: 211-23.
- [79] JUKES TH. Instability of compounds in the folic acid series. *Science* 1954;120: 324.
- [80] Sikka PK, McMartin KE. Determination of folate transport pathways in cultured rat proximal tubule cells. *Chem Biol Interact* 1998;114: 15-31.
- [81] Bäsler KH, Golly I, Loew D, Pietrzik K. *Vitamin-Lexikon*. München: Urban & Fischer, 2002.
- [82] Biesalski HK, Adam O. *Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe: Prävention und Therapie mit Mikronährstoffen ; 241 Tabellen.*: Thieme, 2002.
- [83] Bässler KH. *Vitamin-Lexikon für Ärzte, Apotheker und Ernährungswissenschaftler: 81 Tabellen*. 3 ed.: Urban & Fischer, 2002.
- [84] Hahn A, Strähle A, Wolters M. *Ernährung: physiologische Grundlagen, Prävention, Therapie*. 2 ed.: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2006.
- [85] Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. USA: Washington, DC, National Academy Press; 1998, p. 390-422.
- [86] Chiang PK, Gordon RK, Tal J, et al. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 1996;10: 471-80.
- [87] Kutzbach C, Stokstad EL. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* 1971;250: 459-77.
- [88] Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990; 228-37.

- [89] Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine 2. *Am J Clin Nutr* 1992;55: 131-8.
- [90] Finkelstein JD. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med* 2007;45: 1694-9.
- [91] Kirsch SH, Knapp JP, Geisel J, Herrmann W, Obeid R. Simultaneous quantification of S-adenosyl methionine and S-adenosyl homocysteine in human plasma by stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877: 3865-70.
- [92] Medina M, Urdiales JL, mores-Sanchez MI. Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions. *Eur J Biochem* 2001;268: 3871-82.
- [93] Krebs HA, Hems R, Tyler B. The regulation of folate and methionine metabolism. *Biochem J* 1976;158: 341-53.
- [94] Kang SS, Wong PW, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 1987;36: 458-62.
- [95] Stabler SP, Lindenbaum J, Savage DG, Allen RH. Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency. *Blood* 1993;81: 3404-13.
- [96] Brattstrom L, Israelsson B, Lindgarde F, Hultberg B. Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Metabolism* 1988;37: 175-8.
- [97] Robinson K, Gupta A, Dennis V, et al. Hyperhomocysteinemia confers an independent increased risk of atherosclerosis in end-stage renal disease and is closely linked to plasma folate and pyridoxine concentrations. *Circulation* 1996;94: 2743-8.
- [98] Lien EA, Nedrebo BG, Varhaug JE, et al. Plasma total homocysteine levels during short-term iatrogenic hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85: 1049-53.
- [99] Guttormsen AB, Ueland PM, Lonning PE, Mella O, Refsum H. Kinetics of plasma total homocysteine in patients receiving high-dose methotrexate therapy. *Clin Chem* 1998;44: 1987-9.
- [100] Clarke R, Refsum H, Birks J, et al. Screening for vitamin B-12 and folate deficiency in older persons. *Am J Clin Nutr* 2003;77: 1241-7.
- [101] Waldmann A, Koschizke JW, Leitzmann C, Hahn A. Homocysteine and cobalamin status in German vegans. *Public Health Nutr* 2004;7: 467-72.
- [102] Loikas S, Koskinen P, Irjala K, et al. Vitamin B12 deficiency in the aged: a population-based study. *Age Ageing* 2007;36: 177-83.

- [103] Gilsing AM, Crowe FL, Lloyd-Wright Z, et al. Serum concentrations of vitamin B12 and folate in British male omnivores, vegetarians and vegans: results from a cross-sectional analysis of the EPIC-Oxford cohort study. *Eur J Clin Nutr* 2010;64: 933-9.
- [104] Elmadfa I, Singer I. Vitamin B-12 and homocysteine status among vegetarians: a global perspective. *Am J Clin Nutr* 2009;89: 1693S-8S.
- [105] World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2013;310: 2191-4.
- [106] Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J. Elevation of 2-methylcitric acid I and II levels in serum, urine, and cerebrospinal fluid of patients with cobalamin deficiency. *Metabolism* 1993;42: 978-88.
- [107] ARCHITECT Homocysteine, Abbott Diagnostics Division, 2008.
- [108] Elecsys Vitamin B12 II, 2015.
- [109] AxSYM Active-B12 (Holotranscobalamin), Axis-Shield, 2007.
- [110] Kirsch SH, Knapp JP, Herrmann W, Obeid R. Quantification of key folate forms in serum using stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010;878: 68-75.
- [111] Bland JM, Altman DG. Best (but oft forgotten) practices: testing for treatment effects in randomized trials by separate analyses of changes from baseline in each group is a misleading approach. *Am J Clin Nutr* 2015;102: 991-4.
- [112] Dullemeijer C, Souverein OW, Doets EL, et al. Systematic review with dose-response meta-analyses between vitamin B-12 intake and European Micronutrient Recommendations Aligned's prioritized biomarkers of vitamin B-12 including randomized controlled trials and observational studies in adults and elderly persons. *Am J Clin Nutr* 2013;97: 390-402.
- [113] Bhat DS, Thuse NV, Lubree HG, et al. Increases in plasma holotranscobalamin can be used to assess vitamin B-12 absorption in individuals with low plasma vitamin B-12. *J Nutr* 2009;139: 2119-23.
- [114] Bor MV, Cetin M, Aytac S, Altay C, Nexo E. Nonradioactive vitamin B12 absorption test evaluated in controls and in patients with inherited malabsorption of vitamin B12. *Clin Chem* 2005;51: 2151-5.
- [115] Hardlei TF, Morkbak AL, Bor MV, et al. Assessment of vitamin B(12) absorption based on the accumulation of orally administered cyanocobalamin on transcobalamin. *Clin Chem* 2010;56: 432-6.
- [116] Nexo E, Hvas AM, Bleie O, et al. Holo-transcobalamin is an early marker of changes in cobalamin homeostasis. A randomized placebo-controlled study. *Clin Chem* 2002;48: 1768-71.

- [117] Eussen SJ, de Groot LC, Clarke R, et al. Oral cyanocobalamin supplementation in older people with vitamin B12 deficiency: a dose-finding trial. *Arch Intern Med* 2005;165: 1167-72.
- [118] Kuzminski AM, Del Giacco EJ, Allen RH, Stabler SP, Lindenbaum J. Effective treatment of cobalamin deficiency with oral cobalamin. *Blood* 1998;92: 1191-8.
- [119] Vidal-Alaball J, Butler CC, Cannings-John R, et al. Oral vitamin B12 versus intramuscular vitamin B12 for vitamin B12 deficiency. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; CD004655.
- [120] Qi YP, Do AN, Hamner HC, Pfeiffer CM, Berry RJ. The prevalence of low serum vitamin B-12 status in the absence of anemia or macrocytosis did not increase among older U.S. adults after mandatory folic acid fortification. *J Nutr* 2014;144: 170-6.
- [121] Ergebnisbericht Teil 2 Nationale Verzehrsstudie II, in: Max Rubner-Institut, editor. Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, 2008.
- [122] Hill MH, Flatley JE, Barker ME, et al. A vitamin B-12 supplement of 500 mug/d for eight weeks does not normalize urinary methylmalonic acid or other biomarkers of vitamin B-12 status in elderly people with moderately poor vitamin B-12 status. *J Nutr* 2013;143: 142-7.
- [123] Bor MV, von Castel-Roberts KM, Kauwell GP, et al. Daily intake of 4 to 7 microg dietary vitamin B-12 is associated with steady concentrations of vitamin B-12-related biomarkers in a healthy young population. *Am J Clin Nutr* 2010;91: 571-7.
- [124] MacFarlane AJ, Shi Y, Greene-Finestone LS. High-dose compared with low-dose vitamin B-12 supplement use is not associated with higher vitamin B-12 status in children, adolescents, and older adults. *J Nutr* 2014;144: 915-20.
- [125] Mensink GB, Fletcher R, Gurinovic M, et al. Mapping low intake of micronutrients across Europe. *Br J Nutr* 2013;110: 755-73.
- [126] Wolters M, Strohle A, Hahn A. Cobalamin: a critical vitamin in the elderly. *Prev Med* 2004;39: 1256-66.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen

dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. rer. med. habil. Rima Obeid und Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Geisel, Direktor der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin - Zentrallabor der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar für die Überlassung der interessanten Thematik zur Bearbeitung im Rahmen dieser Studie.

Besonderen Dank richte ich an Frau Prof. Dr. rer. med. habil. Rima Obeid für die herzliche Betreuung, die wissenschaftliche Unterstützung und die Geduld bei der Erstellung dieser Arbeit.

Weiterer Dank gebührt den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Labors, insbesondere Dr. Hussain Awwad, der mich in die verschiedenen Untersuchungstechniken und Analyseverfahren eingewiesen hat und dadurch wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Besonderer Dank gilt meinen Praxismitarbeitern, insbesondere Frau Christine Bürger MFA und Praxislabor-Leiterin. Ihre Leistung hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Den größten Dank richte ich an meine Familie, insbesondere meiner Frau, die mich in vielfältiger Weise bei der Fertigstellung dieser Dissertationsschrift unterstützt hat. Großer Dank gilt auch meinen Eltern. Ohne ihr Vertrauen und ihre immerwährende Unterstützung während des Studiums und darüber hinaus wäre dies alles nicht möglich gewesen.

12 Anhang

12.1 Einwilligungserklärung

Einwilligungserklärung

Doppelblinde, randomisierte placebokontrollierte Interventionsstudie zur Untersuchung der Wirkung einer mit Vitamin B₁₂ angereicherten Zahncreme auf den Vitamin-B₁₂ -Status (Versuchsdauer 12 Wochen).

Forschungsteilnehmer:Teilnehmer-Nr.:

Name, Vorname:.....Geb.-Datum:.....

- () Hiermit erkläre ich meine Einwilligung zur Teilnahme an der Studie gemäß der vorstehenden Information. Ich bestätige mit meiner Unterschrift, dass ich den Inhalt der Information gelesen und verstanden habe. Ich hatte Gelegenheit Fragen zu stellen, die mir zufriedenstellend beantwortet wurden. Es ist mir bewusst, dass die Teilnahme freiwillig ist und ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen und die Vernichtung der Blut-/Speichelprobe fordern kann, ohne dass mir daraus irgendwelche Nachteile entstehen.
- () Ich bin ausdrücklich damit einverstanden, dass die Zwecke wissenschaftlich-medizinischer Forschung, für die die Blut-/Speichelprobe verwendet werden, heute noch nicht eingegrenzt werden.
- () Mir ist soweit bewusst, dass ich keinen persönlichen Vorteil aus diesem Forschungsprojekt haben werde und dass mir die Ergebnisse nicht mitgeteilt werden.

Ich möchte die Verwendung meiner Blut-/Speichelprobe wie folgt eingrenzen:
.....

Datenschutz:

Mir ist bekannt, dass bei dieser Studie personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung die Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an dieser Studie folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus. Das heißt, ohne die nachfolgende Einwilligung kann ich nicht an dieser Studie teilnehmen.

1. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen diese Studie personenbezogene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit und in Papierform sowie auf

elektronischen Datenträgern im Zentrallabor (*Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg 66421*) aufgezeichnet werden.

2. Ich wurde darüber aufgeklärt, dass ich jederzeit meine Teilnahme an der Studie beenden kann. Im Falle eines Widerrufs meiner Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, habe ich jederzeit das Recht, die Löschung aller meiner gespeicherten personenbezogenen Daten zu verlangen.
3. Ich bin damit einverstanden, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Studie bis zu 7 Jahre aufbewahrt werden. Danach erfolgt die Löschung meine bisher erhobene Daten, soweit nicht gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.

Eine Kopie dieser Information und Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt in der Studienstelle.

Name des Forschungsteilnehmers in Druckbuchstaben

Ort, Datum (vom Teilnehmer einzutragen)

Unterschrift Teilnehmer

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung des Forschungsteilnehmers eingeholt.

Name des Studienarztes in Druckbuchstaben

Ort, Datum

Unterschrift des Studienarztes

12.2 Fragebogen

Fragebogen für Vitamin-B₁₂-Zahnpasta-Studie Teilnehmer

PERSÖNLICHE DATEN	
Name, Vorname:	Fortlaufende Nr.:
Geburtstag:	Schein Nr.:
Adresse:	Datum
Gewicht:	Größe:
ERKRANKUNG	Sonstige (bitte auflisten)
<input type="checkbox"/> Hypertonie <input type="checkbox"/> Diabetes Typ 2 <input type="checkbox"/> Koronare Herzkrankheit (KHK) <input type="checkbox"/> chronische Gastritis <input type="checkbox"/> Magengeschwür <input type="checkbox"/> Morbus Crohn <input type="checkbox"/> Schilddrüsenunterfunktion (Hypothyreose) <input type="checkbox"/> Schilddrüsenüberfunktion <input type="checkbox"/> Anämie <input type="checkbox"/> VitB12-Resorptionsstörungen	
MEDIKAMENTE	Sonstige (bitte auflisten)
<input type="checkbox"/> Metformin Dose: <input type="checkbox"/> H2-Rezeptor-Antagonisten (z. B. Ranitidin) Dose: <input type="checkbox"/> Protonenpumpenhemmer (z. B. Omeprazol) Dose: <input type="checkbox"/> Statin (z. B. Atorvastatin, Pravastatin) Dose: <input type="checkbox"/> Vitamine und Mineralstoff (z. B. Vit B12, Vit D, Ca) Sort und Dose:	<input type="checkbox"/> Dose: <input type="checkbox"/> Dose: <input type="checkbox"/> Dose: <input type="checkbox"/> Dose:
SONSTIGE BEMERKUNG	
ANAMNESE (wird von Ärzten ausgefüllt)	

12.3 Zahnpasta Nutzungskalender

Probanden-Nr.:

Name:

Vorname:

Geburtstag:

Aufnahmedatum:

Vitamin B₁₂ Zahnpasta Nutzungskalender (Versuchsdauer 12 Wochen)

	Montag			Dienstag			Mittwoch			Donnerstag			Freitag			Samstag			Sonntag			
	Mor	Mittag	Abend	Mor	Mittag	Abend	Mor	Mittag	Abend	Mor	Mittag	Abend	Mor	Mittag	Abend	Mor	Mittag	Abend	Mor	Mittag	Abend	
KW (Ja mit X) Zähneputzen Zeit																						
KW Zähneputzen Zeit																						
KW Zähneputzen Zeit																						
KW Zähneputzen Zeit																						
KW Zähneputzen Zeit																						
KW Zähneputzen Zeit																						
KW Zähneputzen Zeit																						
KW Zähneputzen Zeit																						
KW Zähneputzen Zeit																						
KW Zähneputzen Zeit																						
KW Zähneputzen Zeit																						
KW Zähneputzen Zeit																						
KW Zähneputzen Zeit																						

Bitte markieren Sie mit X: wenn die Zähne geputzt werden.
 Bitte schreiben Sie: die Zeit des Zähneputzens in Minuten.

12.4.1 Wie werden die Proben gewonnen und verwendet?

Das entnommene Blut wird mit einer Labor-ID-Nummer kodiert, sodass Name und persönlichen Daten nicht zu erkennen sind. Die Zuordnung der Probe zu Ihren Daten ist nur dem Studienarzt möglich. Es können ausschließlich autorisierte Personen die beim Studienarzt registrierten personenbezogenen Daten einsehen, soweit dies für die Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der Studie notwendig ist und diese Personen nach dem Datenschutzgesetz befugt sind. Es kann möglicherweise in der hiesigen Studie zu erweiterten wissenschaftlichen Fragestellungen kommen, welche durch Ihre Probe beantwortet werden können. Ihre Probe wird bis zu 7 Jahre nach Studienabschluss archiviert. Die Probe wird Eigentum des Zentrallabors des Universitätsklinikums des Saarlandes. Sie haben jederzeit das Recht, Ihrer Probe vernichten zu lassen. Bereits registrierte Daten verbleiben auch nach Vernichtung der Probe in der Studie, soweit der Personenbezug nicht mehr besteht.

12.4.2 Was sind die Risiken dieser Studie?

Die Blutentnahme erfolgt in Rahmen einer routinemäßigen Untersuchung. Es werden dabei 10 ml Blutproben entnommen. Es bestehen Risiken, die bei der üblichen Blutentnahme vorkommen können. Es kann an der Einstichstelle zu leichten Schmerzen oder einem Bluterguss kommen. In seltenen Fällen kann es zu einem Blutgerinnsel (Thrombose/Thrombophlebitis), einer Entzündung oder einer Infektion oder möglichen Schädigungen der Blutgefäße oder Nerven kommen. Der Versicherungsschutz besteht im Rahmen einer allgemeinen Patientenversicherung der Universitätskliniken des Saarlandes.

12.4.3 Was sind die Vorteile der Teilnahme an dieser Studie?

Die Ergebnisse dienen ausschließlich zu Forschungszwecken und werden keine Konsequenzen für die Teilnehmer haben. Sie können für Ihre Gesundheit dadurch keinen unmittelbaren Vorteil erwarten.

12.4.4 Ist die Vertraulichkeit meiner Daten gewährleistet?

Die Blutprobe wird mit mit einer Labor-ID-Nummer kodiert. Die im Rahmen dieser Studie aufgenommenen Daten und Analyseergebnisse werden ohne den Namen ermittelt, wissenschaftlich ausgewertet und den gesetzlichen Bestimmungen entsprechend archiviert.

Einzelheiten zur Einwilligung in die Datenerhebung und -verwendung, auch die Möglichkeit eines Widerrufs, sollten die Teilnehmer ihrer Einwilligungserklärung entnehmen.

12.4.5 Kann ich meine Teilnahme an der Studie vorzeitig beenden?

Jeder Teilnehmer hat das Recht, jederzeit ohne Angabe von Gründen seine Teilnahme zu beenden. Im Falle des Widerrufs können sie entscheiden, ob das Blut vernichtet werden sollen. Die Bedeutung eines Widerrufs für die Verwendung der Daten ist in der Einwilligungserklärung erläutert.

12.4.6 Kann ich bestimmte Verwendungszwecke ausschließen?

Die Teilnehmer haben das Recht, bestimmte Verwendungen des Bluts auszuschließen.

12.4.7 Wissenschaftliche Nutzung der Forschungsergebnisse

Die Ergebnisse dieses Forschungsprojekts können möglicherweise in wissenschaftlichen Zeitschriften und auf Konferenzen veröffentlicht werden. Persönliche Daten der Teilnehmer werden keinesfalls bei diesen Veröffentlichungen bekannt gegeben.