

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. W. K. Lutz

**Genomprotektive Wirkung der Vitamine Folsäure und Vitamin B12
in Dialysepatienten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Anna-Teresa Treutlein
aus Bad Neustadt an der Saale

Würzburg, Januar 2009

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper

Koreferent: Prof. Dr. med. Udo Bahner

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2009

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern

Inhalt

1. Einleitung

1.1 Karzinominzidenz und –entstehung bei Dialysepatienten	1
1.2 Folsäure	3
1.3 Vitamin B12	6
1.4 Homocystein	9
1.5 Fragestellung dieser Arbeit	13

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Arbeitsgeräte	14
2.2 Medien und Puffer	15
2.3 Isolierung peripherer Lymphozyten aus heparinisiertem Vollblut	15
2.4 Mikrokerntest	
2.4.1 Durchführung und Auswertung des Mikrokerntests	16
2.4.2 Theoretische Grundlagen des Mikrokerntests	17
2.5 Bestimmung der Homocysteinwerte	19
2.6 Probandenkollektiv	19
2.7 Vitaminsubstitution und Blutentnahme	22
2.8 Statistische Methoden	23

3. Ergebnisse

3.1 Mikrokernrate vor Substitutionsbeginn	24
3.2 Veränderung der Mikrokernrate unter Substitution	27
3.3 Mikrokernraten der Kontrollprobanden während des Studienverlaufs	29
3.4 Veränderung der Mikrokernraten in Abhängigkeit von Diabeteserkrankung, Dialysedauer, Alter, Ausgangsmikrokernwerten und bisheriger Vitaminsubstitution	32
3.5 Weitere untersuchte Lymphozytenparameter	41

3.6 Homocysteinwerte	44
3.7 Blutdruck und CRP-Werte	45
4. Diskussion	48
5. Zusammenfassung	58
6. Literaturverzeichnis	60
7. Anhang	
7.1 Daten der Substitutionsgruppe Folsäure	73
7.2 Daten der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12	76
7.3 Daten der Dialyse-Kontrollgruppe	80
7.4 Daten der Nicht-Dialyse-Kontrollgruppe	83

1. Einleitung

1.1 Karzinominzidenz und -entstehung bei Dialysepatienten

Eine erhöhte Inzidenz der Koronaren Herzkrankheit und eine dadurch bedingt ebenfalls erhöhte Mortalität bei Dialysepatienten gilt seit längerem als hinreichend belegt und ist bis heute die häufigste Todesursache von Dialysepatienten (Cheung 2004). Doch obwohl Matas et al. bereits 1975 von einer siebenfach erhöhten Krebsinzidenz bei Patienten mit terminalem Nierenversagen berichteten (Matas 1975), konnte erst im Jahr 1999 durch eine Großstudie anhand von Dialyseregistern aus Australien/Neuseeland, Europa und den USA von Maisonneuve et al. bewiesen werden, dass dialysepflichtige Patienten tatsächlich einer erhöhten Karzinominzidenz unterliegen (Maisonneuve 1999). Nachfolgende epidemiologische Untersuchungen, unter anderem von Teschner et al. (Teschner 2002), konnten Maisonneuves Ergebnisse prinzipiell bestätigen. Das Risiko, an einem Malignom zu erkranken, ist – verglichen mit der gesunden Normalbevölkerung – etwa um den Faktor zwei erhöht (Matas 1975; Maisonneuve 1999; Teschner 2002). Aber nicht nur in der Häufigkeit, auch im Spektrum der betroffenen Organsysteme unterscheiden sich Dialysepatienten von der Allgemeinbevölkerung. So ist das Risiko einer malignen Entartung vor allem von Niere und Blase, aber auch von Schilddrüse, Leber, Cervix sowie des lymphatischen und blutbildenden Systems deutlich erhöht, während Krebserkrankungen von Lunge, Kolorektum, Magen und Brustdrüse nicht signifikant häufiger als im Vergleichskollektiv auftreten. Besonders gefährdet, an einem Karzinom zu erkranken, sind die Patienten jungen (< 35 Jahre) und mittleren Lebensalters (35-50 Jahre). Das Risiko nimmt danach mit steigendem Lebensalter wieder ab, ist aber immer noch erhöht. Die meisten Krebserkrankungen treten im ersten Jahr der Dialyse auf. Betrachtet man die zugrundeliegende Nierenerkrankung und das Karzinomrisiko, so ist dieses besonders bei Patienten mit toxischer oder obstruktiver Nephropathie erhöht.

Bei der Frage, warum bei urämischen Patienten vermehrt Karzinome entstehen, ist von einer Multikausalität auszugehen. Eine wichtige Rolle (Vamvakas 1998) spielen hierbei ein geschwächtes Immunsystem, chronische Entzündungen und persistierende Infektionen, unter anderem mit den onkogenen Viren HCV (Fabrizi 1994), HPV

(Beutner 1997) und EBV (Yamamoto 1995), sowie ein Ungleichgewicht zwischen einer vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen (Roselaar 1995; Tepel 2000) und einem gleichzeitig reduzierten Antioxidantienspiegel (Avisar 1994; Bonomini 1995; Yoshimura 1996). Im Zusammenhang mit dem Mangel an Antioxidantien ist auch der diätetisch bedingt geringe Verzehr von kaliumreichen Früchten und Gemüse, welche vermutlich krebspräventiv wirken (Block 1992), erwähnenswert. Des Weiteren scheinen die Einnahme von Immunsuppressiva (Penn 1972) und Diuretika (Grossman 2001), der bei vielen Dialysepatienten bestehende sekundäre Hyperparathyreoidismus verbunden mit einem gleichzeitigen Mangel an 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol (Kopple 1988) sowie eine Akkumulation von Karzinogenen (Manabe 1992) ursächlich an der Karzinomentstehung beteiligt zu sein.

Bei Karzinogeneseuntersuchungen gilt ein besonderes Augenmerk Genomschäden, da Genmutationen ein wichtiger Mechanismus in der Karzinomentstehung sind. Tatsächlich treten sowohl bei Prädialyse-, als auch bei Dialysepatienten gehäuft Genomschäden auf, welche unter anderem durch erhöhte Mikrokernzahlen (Stopper 1999) und vermehrte DNA-Einzelstrangbrüche (Stopper 2001a) in peripheren Lymphozyten belegt sind. Zur DNA-Schädigung tragen nach in vitro-Untersuchungen auch die sogenannten „advanced glycation end products“ (AGEs) bei (Stopper 2003), welche bei Niereninsuffizienz in Blut und Gewebe erhöht sind (Heidland 2001). Korrelierend zu den DNA-Schäden ist bei chronischer Niereninsuffizienz ebenfalls der Mechanismus der DNA-Reparatur gestört (Malachi 1993), welcher durch die Einleitung einer Dialysebehandlung nur initial verbessert werden kann (Vamvakas 1996). Eine mögliche Ursache für die Beeinträchtigung des Reparaturmechanismus stellt die DNA-Hypomethylierung dar (Ingrosso 2003), welche in Zusammenhang mit einer vermehrten intrazellulären Anreicherung von S-Adenosylhomocystein bei Dialysepatienten steht (Perna 1995).

Eine mögliche Konsequenz der gewonnenen Daten besteht in einer jährlichen Screening-Untersuchung für die besonders gefährdete Gruppe der Dialysepatienten jungen und mittleren Alters (Maisonneuve 1999). Auf der Suche nach präventiven Maßnahmen sind unter anderem die tägliche Dialyse (Fragedaki 2005) sowie die Gabe von Vitaminen und Angiotensin 2-Rezeptorblockern (Stopper 2005) mögliche Ansätze. Die Wirksamkeit der Gabe von Folsäure und Vitamin B12 untersuchte diese Studie.

1.2 Folsäure

Der Name Folsäure leitet sich von lateinisch folium, das Blatt, ab, da Folsäure 1941 erstmals aus vier Tonnen getrockneter Spinatblätter isoliert wurde (Mitchell 1988). In den darauf folgenden Jahren kam es rasch zur Aufklärung von Struktur und Bedeutung der Folsäure beim C1-Transfer (Welch 1952), allerdings geriet danach die Folsäure auch wieder relativ schnell in Vergessenheit.

Folsäure, die, wie in Abbildung 1 gezeigt, aus einem 2-Amino-4-Oxopteridin-Rest, der 4-Aminobenzoesäure und einem Glutaminsäure-Rest besteht, ist kennzeichnend für die Gruppe der sogenannten Folate.

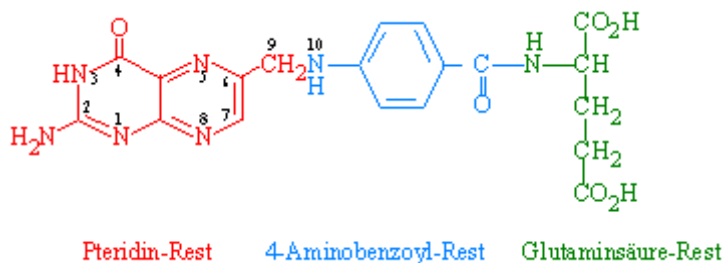


Abb. 1: Struktur der Folsäure (Kick, 2004)

Folate sind in pflanzlichen und tierischen Produkten vorkommende Folsäurederivate, die im Gegensatz zum nur synthetisch herstellbaren Monoglutamat Folsäure bis zu acht Glutamylreste gebunden haben. Die biologisch aktive Form der Folsäure ist die 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure, welche in einer zweistufigen, NADPH-abhängigen Reaktion entsteht (Löffler 2003b).

Folatreiche Lebensmittel sind bestimmte Gemüsearten, wie Spinat, Salat, Weißkohl oder Tomaten, weiterhin Hülsenfrüchte, Vollkornprodukte, Leber, Hühnereier sowie Weichkäsesorten und Milchprodukte (Müller 1995). Neben dem Folatgehalt der Lebensmittel ist auch die Bioverfügbarkeit für die Folatversorgung von Bedeutung. Da die natürlich vorkommenden Folate fast ausschließlich als Pteroyl-Polyglutamate vorliegen, die Resorption im Dünndarm aber nur in Form von Pteroyl-Monoglutamaten erfolgt, müssen Konjugasen (γ -Glutamat-Carboxypeptidasen) im Darmlumen die Polyglutamate in Monoglutamate wandeln (Babior 2003). So beträgt die Bioverfügbarkeit der Folate nur etwa 50–70 % während bei der synthetisch hergestellten

Folsäure, welche Nahrungsmitteln beigelegt werden kann oder in Tablettenform erhältlich ist, von einer nahezu vollständigen Bioverfügbarkeit ausgegangen wird (Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2000b).

Während des Absorptionsvorgangs wird Folsäure überwiegend zu 5-Methyl-Tetrahydrofolat metabolisiert und als solches gebunden an Plasmaproteine zur Leber transportiert, wo es mit Hilfe von Homocystein und dem Coenzym Vitamin B12 demethyliert und in Polyglutamatform gespeichert wird (Babior 2003). Alternativ können an die Stickstoffatome N5 und/oder N10 (vgl. Abb. 1) 1-Kohlenstoffreste in Form von Methyl-, Formyl-, Formiat- oder Hydroxymethyl-Resten, gebunden werden, welche für verschiedene Biosynthesen wichtig sind. Sie liefern die Kohlenstoff-Atome 2 und 8 des Purinkerns, den Kohlenstoff für die Methylgruppe von Thymin und Hydroxymethylcytosin, den β -Kohlenstoff des Serins bei der Umwandlung von Glycin in Serin und den Kohlenstoff für die Methylierung von Homocystein zu Methionin (Löffler 2003b). Dieser letztgenannte Prozess ist präventivmedizinisch von großer Bedeutung.

Da Gewebe mit einer hohen Teilungsrate besonders stark auf Störungen der DNA-Synthese reagieren, äußert sich Folsäuremangel vor allem in einer megaloblastären Anämie, in deren Folge Patienten unter allgemeiner Schwäche, Schwindel, Benommenheit, Angina pectoris sowie Symptomen der Herzinsuffizienz leiden. Außerdem führt die gestörte Teilung der epithelialen Zellen des Gastrointestinaltrakts zu Diarrhöen, Cheilosis und Glossitis (Babior 2003). Folsäuremangel spielt heute allerdings nicht mehr nur wegen der zuvor beschriebenen, in der Medizin schon lange bekannten Krankheitsbilder eine Rolle, sondern auch aufgrund der in den letzten Jahren zunehmend belegten, vielseitig präventiven Wirkungen der Folsäure.

Besonders wichtig ist eine ausreichende Folat-/Folsäureversorgung hierbei in der Frühschwangerschaft, da dadurch das Risiko für Fehlbildungen des Neuralrohrs (Spina bifida, Anenzephalie, Enzephalozele) um etwa 70–75 % reduziert werden kann (Koletzko 2004). Einige Untersuchungen weisen darauf hin, dass möglicherweise auch das Risiko für Lippen-Kiefer-Gaumenspalten gesenkt werden kann (Shaw 1995), ebenfalls scheint eine Abnahme kongenitaler kardiovaskulärer Fehlbildungen möglich (Czeizel 2004). Weitere Studien beschreiben eine Risikoreduktion für angeborene Harnwegsfehlbildungen (Li 1995), für eine spätere Erkrankung des Kindes an akuter

lymphoblastischer Leukämie (Thompson 2001) sowie für das Auftreten von Trisomie 21 (Shaw 1995); letzteres Ergebnis ist allerdings wegen zu kleiner Fallzahlen nicht signifikant. Daneben scheint eine ausreichende Folsäureversorgung auch für die Verringerung des Arterioskleroserisikos wichtig zu sein, wobei der entscheidende Mechanismus hierbei wohl in der Senkung des Homocysteinspiegels liegt (Wald 2002). Zwischen der zweithäufigsten Todesursache in Deutschland, den malignen Erkrankungen, und der Folsäure-/Folataufnahme zeigt die Auswertung epidemiologischer Studien einen inversen Zusammenhang (Eichholzer 2001). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung liegt in der Bedeutung von Folsäure für die DNA-Methylierung und die DNA-Strangstabilität (Choi 2002). Weiterhin steht eine unzureichende Folatversorgung wohl auch im Zusammenhang mit kognitiver Beeinträchtigung im Alter und depressiven Störungen. Bei der Pathogenese der Altersdemenz scheint ein erhöhter Homocysteinspiegel eine Rolle zu spielen (Seshadri 2002), während an der Pathogenese melancholischer Depressionen möglicherweise Störungen im Einkohlenstoffwechsel beteiligt sind (Alpert 1997).

Die Vielzahl protektiver Effekte verdeutlicht die Notwendigkeit einer ausreichenden Folatversorgung. Gesunden Erwachsenen wird von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) und den verantwortlichen Institutionen in der Schweiz und Österreich empfohlen, täglich mit der Nahrung 400 µg Folat aufzunehmen. Frauen, die schwanger werden wollen oder könnten, sollten täglich zusätzlich 400 µg synthetische Folsäure einnehmen und zwar mindestens im Zeitintervall vier Wochen vor Eintritt der Schwangerschaft bis zum Ende des ersten Trimenons (Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2000b). Als Risikofaktoren für einen Folsäuremangel gelten unzureichende Aufnahme durch unausgewogene Diät (häufig bei Alkoholikern), erhöhter Bedarf (Schwangerschaft, maligne Erkrankungen, gesteigerte Hämatopoese, chronisch exfoliative Hauterkrankungen, Hämodialyse), Malabsorption (Sprue, Medikamente wie Phenytoin und Barbiturate) und Störung des Metabolismus (medikamentöse Hemmer der Dihydrofolatreduktase, Alkohol, seltene Enzymdefekte) (Babior 2003). Tatsächlich sind aber nicht nur entsprechende Risikogruppen nicht ausreichend mit Folat versorgt, sondern die Mehrheit der deutschen Bevölkerung. Untersuchungen des Ernährungsverhaltens ergaben, dass 91 % der Frauen und 85 % der Männer weniger Folsäure als empfohlen aufnehmen. Die mittlere tägliche Folatzufuhr liegt laut

Ernährungsbericht 2000 für Frauen bei 214 µg und für Männer bei 235 µg und entspricht damit 55 % beziehungsweise 61 % der empfohlenen Zufuhr (Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2000a). Nur 23 % der Frauen im gebärfähigen Alter sind über die positiven Effekte von Folsäure in der Schwangerschaft informiert und nur 13 % sind optimal mit Folat versorgt (Thamm 1999).

Aufgrund dieser Missstände und der Beobachtung, dass allein durch Empfehlungen die Neuerkrankungsrate an Neuralrohrdefekten nicht verbessert werden kann (Botto 2005), fordern unter anderem die Ernährungskommission der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin (DGKJ) und der Arbeitskreis Folsäure und Gesundheit (AKFG) eine gezielte Anreicherung bestimmter Grundnahrungsmittel mit Folsäure. In den USA und Kanada ist die Anreicherung von Mehl und Cerealien seit 1998 Praxis. Dies führte zu einem Rückgang der Neuralrohrdefekte um 19–31 % in den USA (Williams 2002) und um 54 % in Kanada (Persad 2002), zu erhöhten Folatspiegeln, erniedrigten Homocysteinspiegeln (Jacques 1999) und einem Rückgang der kardiovaskulären Mortalität (Tice 2001). In der Europäischen Union besteht im Bezug auf die Supplementierung eine gewisse Zurückhaltung aus der Sorge heraus, dass das „tolerable upper intake level“ (UL) von 1 mg/d an synthetischer Folsäure überschritten werden könnte. Bei höheren Dosen kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Vitamin B12-Mangel maskiert wird und neurologische Folgeschäden auftreten. Nach einer Simulationsrechnung des Robert-Koch-Instituts im Auftrag des Bundesinstituts für Risikobewertung muss bei einer Folsäureanreicherung von Mehl nur bei einem sehr geringen Bevölkerungsanteil mit einer Überschreitung des UL gerechnet werden (Robert-Koch-Institut 2004). Dieses Risiko besteht vor allem durch weitere mit Folsäure angereicherte Lebensmittel, wie bestimmte Milchprodukte oder Erfrischungsgetränke. Das Robert-Koch-Institut empfiehlt deshalb eine Beschränkung der Folsäureanreicherung dieser Produkte und schlägt zur Vermeidung eines maskierten Vitamin B12-Mangels eine simultane Anreicherung mit Vitamin B12 vor.

1.3 Vitamin B12

Vitamin B12, auch als Cobalamin oder extrinsic factor bezeichnet (Pfreundschuh 2000a), ist – wie in Abbildung 2 ersichtlich – eine komplexe Organometallverbindung,

in der ein Cobaltatom in einem Corrinring positioniert ist. An der freien axialen Position des Cobaltkomplexes können verschiedene Liganden gebunden werden. In der biologisch aktiven Form ist Cobalt mit einer Methylgruppe oder 5'-Desoxyadenosylgruppe substituiert; bei der chemisch synthetisierten und zur Substitution verwendeten Form ist der Ligand eine Cyanogruppe ($X = -CN$) (Löffler 2003b). Im Gewebe muss Cyanocobalamin in eine der biologisch aktiven Formen umgewandelt werden (Babior 2003).

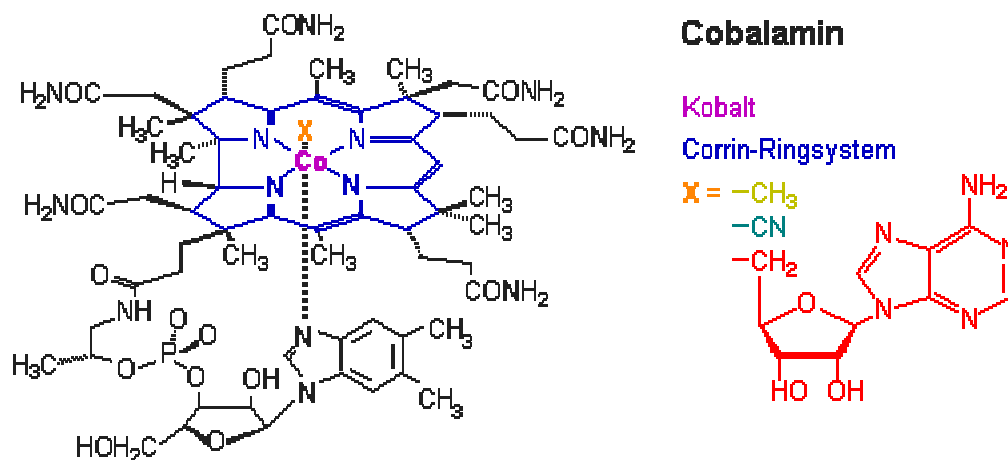


Abb. 2: Struktur von Cobalamin (Gasteiger 2003a)

Das Vitamin ähnelt in seiner Struktur zwar dem Porphyrinringsystem des Häm-moleküls, kann im Gegensatz zu diesem aber vom menschlichen Organismus nicht synthetisiert werden und muss mit der Nahrung aufgenommen werden. Die einzige Quelle für Cobalamin sind tierische Nahrungsmittel wie Fleisch- und Milchprodukte (Babior 2003). Im Magen wird Cobalamin freigesetzt und bildet eine stabile Verbindung mit dem gastralen R-Protein. Dieser Komplex wird im Duodenum zersetzt und das freigesetzte Cobalamin nun an den Intrinsic-Factor gebunden, welcher Cobalamin vor Proteolyse schützt (Thomas 1998). Intrinsic-Factor ist ein Glycoprotein, das von den Belegzellen des Magens gebildet wird (Löffler 2003b). Im distalen Jejunum wird der Intrinsic-Factor-Cobalamin-Komplex mittels Rezeptoren in Mukosazellen aufgenommen, wo der Intrinsic-Factor dann zerstört und Cobalamin auf ein anderes Transportprotein, Transcobalamin, übertragen wird. Gebunden an Transcobalamin gelangt Cobalamin zu seinem Hauptspeicherorgan, der Leber, in das Knochenmark

sowie zu anderen schnell proliferierenden Zellen (Kunz-Thal 2003). In diesen ist es essentieller Cofaktor für die Enzyme Methioninsynthetase und Methylmalonyl-CoA-Synthetase.

Methylcobalamin katalysiert – wie in Abbildung 3 dargestellt – die Umwandlung von Homocystein in Methionin. Bei einem Cobalamin-Mangel kommt es folglich zu einem Anstieg des Plasmahomocysteinspiegels und durch die Störung des Folatmetabolismus zu einer defizienten DNA-Synthese (Babior 2003).

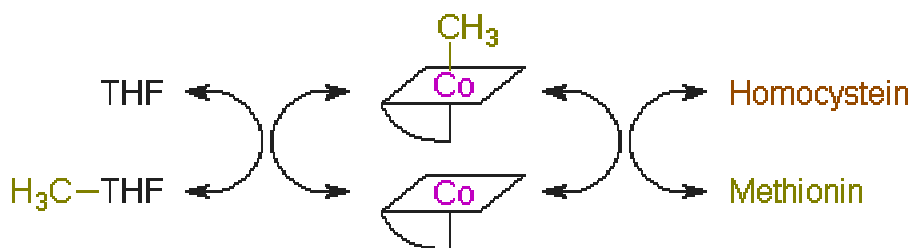


Abb. 3: Methylcobalamin katalysiert die Reaktion vom Methyltetrahydrofolat und Homocystein zu Tetrahydrofolat und Methionin (Gasteiger 2003b)

Die zweite biologisch aktive Form von Vitamin B12, 5-Desoxyadenosylcobalamin, dient der intramolekularen Umwandlung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA (Kreutzig 1997). Bei einem Cobalaminmangel kommt es zu einem erheblichen Anstieg von Methylmalonyl-CoA und seinem Vorläufer Propionyl-CoA, welcher zur Synthese unphysiologischer Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl von Kohlenstoffatomen führt (Babior 2003).

Der Einbau dieser Fette in neuronale Lipide sowie die verminderte Umwandlung von Homocystein zu Methionin, welches für die Synthese cholinhaltiger Phospholipide benötigt wird, könnten die neurologischen Komplikationen des Vitamin B12-Mangels zumindest teilweise erklären (Babior 2003). Klinisch manifestiert sich die sogenannte funikuläre Myelose durch Lagesinn- und Vibrationsempfindungsstörungen, Gangunsicherheit, Parästhesien und Paresen. Diese Symptome bilden sich bei einer verspätet eingeleiteten Cobalamin-Substitution häufig nicht mehr zurück (Kunz-Thal 2003). Die durch Cobalamin-Mangel verursachten hämatologischen und gastrointestinalen Störungen gleichen denen bei Folsäuremangel.

Ursachen für einen Vitamin B12-Mangel sind inadäquate Aufnahme (strenger Vegetarismus), erhöhter Verbrauch (Schwangerschaft, Fischbandwurm, Syndrom der blinden Schlinge), Intrinsic-Factor-Mangel (perniziöse Anämie, totale Gastrektomie, Gastritis, hereditärer Intrinsic-Factor-Mangel) und Dünndarmerkrankungen (Ileumresektion oder -bypass, Sprue, M. Crohn) (Pfreundschuh 2000b).

Ein klinisch manifester Vitamin B12-Mangel ist in Deutschland – abgesehen von Patienten mit oben genannten Risikofaktoren – selten. Ein Grund hierfür sind die relativ großen Speichermengen von 2 mg in der Leber und 2 mg in weiteren Geweben, so dass selbst beim völligen Sistieren der Cobalaminzufuhr Mangelerscheinungen bei gesunden Erwachsenen in der Regel erst nach Jahren auftreten (Thomas 1998). Außerdem liegt nach dem Ernährungsbericht 2000 der Deutschen Gesellschaft für Ernährung die tägliche Cobalaminzufuhr in jeder Bevölkerungsgruppe oberhalb der empfohlenen täglichen Vitamin B12-Zufuhr von 3 µg. Da die Bioverfügbarkeit mit steigender Einzeldosis sinkt, ist dies unbedenklich (Alpert 1997; Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2000b). Trotz ausreichender Aufnahme kann es bei der Gruppe der über 70-Jährigen zu einer Minderversorgung kommen, da durch die in dieser Altersgruppe bei etwa einem Drittel vorliegende zu geringe Salzsäurebildung im Magen die Nahrung nicht mehr richtig aufgeschlossen werden kann. Zusätzlich wird bei chronischer Gastritis, welche häufig Ursache einer zu geringen Salzsäureproduktion ist, intrinsic factor vermindert gebildet (Carmel 1997).

1.4 Homocystein

Die nicht proteinogene Schwefelsäure Homocystein ist ein Intermediärprodukt im Stoffwechsel der essentiellen Aminosäure Methionin. Aktiviertes S-Adenosyl-Methionin ist der wichtigste Methylgruppendonator für zahlreiche Methylgruppenakzeptoren (DNA, Proteine, Neurotransmitter, Hormone, Phospholipide, Kreatin) (Chiang 1996). Bei der Demethylierung entsteht S-Adenosyl-Homocystein, woraus durch hydrolytische Spaltung Homocystein freigesetzt wird (Löffler 2003a). Bei einer Akkumulation von Homocystein verlangsamt sich die Hydrolyse und es kommt zu einem Anstieg von S-Adenosyl-Homocystein, welches über den Mechanismus der Produkthemmung eine Inhibition der Transmethylierung bewirkt (Perna 1999).

Homocystein kann entweder durch Remethylierung zu Methionin regeneriert oder durch Transsulfurierung abgebaut werden. Die Remethylierung zu Methionin ist über den Betainweg und den Tetrahydrofolsäurestoffwechsel möglich. Der Betainweg wird vornehmlich in der Leber bestritten und ist von untergeordneter Bedeutung, während in den meisten anderen Geweben die Remethylierung in Abhängigkeit von Vitamin B12 über den Tetrahydrofolsäurestoffwechsel erfolgt. Der Abbau zu Cystein geschieht in einer zweistufigen Reaktion, die Vitamin B6-abhängig ist (Hertfelder 2004). Einen Überblick über den Homocysteinstoffwechsel gibt Abbildung 4.

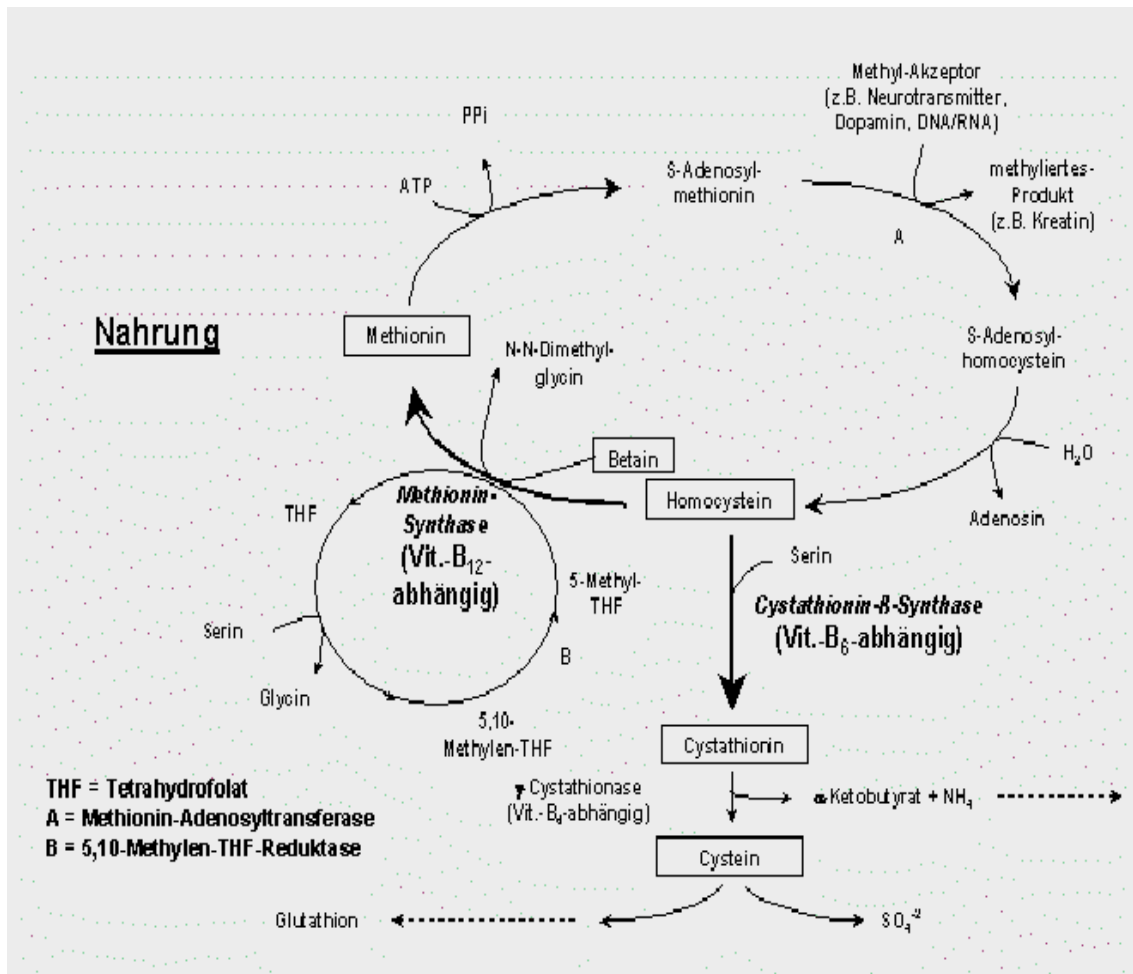


Abb. 4: Stoffwechsel von Homocystein (Stanger 2003)

Da Homocystein zytotoxisch ist, wird seine intrazelluläre Konzentration niedrig gehalten. Dies erfolgt über den Homocysteinstoffwechsel, sowie über einen Homocysteinexportmechanismus in das Plasma. Plasma-Homocystein wird überwiegend in der Niere remethyliert und nur zum kleinen Teil renal ausgeschieden (Herrmann 2002).

Nach Definition der American Heart Association beginnt eine Hyperhomocysteinämie bei Werten größer 15 $\mu\text{mol/L}$ (Malinow 1999). Die häufigste Ursache für eine moderate Hyperhomocysteinämie ist ein Mangel der Vitamine Folsäure, Vitamin B6 und Vitamin B12 (Stanger 2003). Bei einer hochgradigen Hyperhomocysteinämie ($> 100\mu\text{mol/L}$) liegen in der Regel homozygote Enzymdefekte des Methionin-Homocystein-Stoffwechsels auf der Basis von familiär auftretenden Gendefekten zugrunde, häufigste Ursache ist hierbei ein Defekt der Cystathion- β -Synthase. Im Gegensatz zu diesen sehr seltenen Störungen sind 5–15 % der Bevölkerung in Mitteleuropa und Nordamerika homozygote Träger einer Mutation des Enzyms 5,10-Methylen-tetrahydrofolat-Reduktase, welche zu Thermolabilität und verringerter Enzymaktivität führt. Bei gleichzeitigem Folsäuremangel kommt es zur moderaten Hyperhomocysteinämie (Perna 1999). Mit über 80 % findet sich eine besonders hohe Prävalenz für Hyperhomocysteinämie bei Dialysepatienten (Moustapha 1999). Neben einem Vitaminmangel und einer verminderten renalen Ausscheidung scheint hierfür insbesondere die gestörte renale Remethylierung verantwortlich zu sein (Friedman 2001).

Ein Zusammenhang zwischen Arteriosklerose, welche zu vaskulären Erkrankungen führt, und einem erhöhtem Plasma-Homocystein-Spiegel wurde bereits 1969 vorgeschlagen (McCully 1969). Seit mehr als einem Jahrzehnt ist eine milde Hyperhomocysteinämie als ein Risikofaktor für zerebro- und kardiovaskuläre Erkrankungen (Moller 2000; Bautista 2002) sowie venöse Thrombosen (Cattaneo 1996) anerkannt. Meta-Analysen zufolge ist eine Hyperhomocysteinämie für 10 % des Gesamtrisikos für atherothrombotische Gefäßerkrankungen verantwortlich (Wald 2002). Als atherogene Mechanismen von Homocystein werden am häufigsten eine Verdickung der Gefäßintima, ein erhöhter Plättchen-Turnover, eine gesteigerte Plättchenaktivierung mit vermehrter Thromboxansynthese, endotheliale Dysfunktion, aktivierte Leukozyten, verstärkte Oxidation von LDL durch erhöhten oxidativen Stress, verstärkte Schaumzellenbildung durch Lipidablagerung in der Gefäßwand sowie eine vermehrte Proliferation glatter Muskelzellen diskutiert (Herrmann 2002). Daneben scheint Homocystein auch ein Risikofaktor für Demenz und Alzheimer-Erkrankung zu sein (Seshadri 2002).

Die Verabreichung von B-Vitaminen gilt als erfolgreich, um Plasma-Homocysteinspiegel zu senken. So zeigt eine Meta-Analyse der Ergebnisse von zwölf randomisierten kontrollierten Studien, dass die tägliche Gabe von 0,5 bis 5 mg Folsäure eine mittlere Reduktion des Homocysteinspiegels um 25 % bewirkt ("Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements" 1998). Der Effekt ist umso ausgeprägter, je höher der Homocystein-Ausgangswert gewesen ist. In den ausgewerteten Studien hat die Gabe von Vitamin B6 keinen Einfluss auf die Höhe des Homocysteinspiegels. Ähnliche Ergebnisse sind auch für Dialysepatienten beschrieben (Menon 2005).

In einer Therapiestudie wurde die Entwicklung von Carotisplaques vor und nach Supplementierung von Folsäure, Vitamin B6 und Vitamin B12 beobachtet: Die Vitamingabe führte nicht nur zu einem Stopp der Plaqueentwicklung, sondern sogar zu einer signifikanten Abnahme der Plaquefläche (Peterson 1998). Die Hoffnung, einen direkten Zusammenhang zwischen Vitamingabe und Reduktion vaskulärer Erkrankungen durch große prospektive randomisierte Studien zu beweisen, scheint allerdings im Moment zerschlagen. Denn in den drei bisher vorgestellten Studien VISP (Toole 2004), NORVIT (Bonna 2006) und HOPE-2 (Lonn 2006) ist es trotz erfolgreicher Senkung des Homocysteinspiegels nicht zu einer Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse gekommen. Lediglich bei den Schlagfällen konnte in der HOPE-2-Studie eine signifikante Abnahme durch Senkung des Homocysteinspiegels beobachtet werden. Auch die kognitive Leistungsfähigkeit konnte durch eine Reduktion der Plasma-Homocysteinwerte mittels Vitamingabe nicht positiv beeinflusst werden (McMahon 2006). Auch wenn einige Experten methodische und inhaltliche Fehler bemängeln, ist bis zum Erscheinen anderer Studien davon auszugehen, dass durch Homocystein-Senkung das kardiovaskuläre Risiko nicht verringert werden kann.

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen einer Substitution mit Folsäure und Vitamin B12 auf den Genomschaden von Hämodialysepatienten zu erfassen.

Dialysepatienten unterliegen einem erhöhten Krebsrisiko, vermehrte Genomschäden sind nachgewiesen (Stopper 1999). Des Weiteren ist – bei einer ohnehin weit verbreiteten Folsäureminderversorgung in Deutschland – Hämodialyse ein Risikofaktor für einen Folsäuremangel (Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2000a; Babior 2003). In vitro ist es möglich, die Genomschädigung in peripheren Lymphozyten durch Folsäure zu reduzieren (Wang 2003). Vitamin B12 führt in vivo zu einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber genotoxischen Agentien (Joksic 2006).

Die Entwicklung der DNA-Schäden wurde in peripheren Lymphozyten der Patienten mit Hilfe der Mikrokernmethode untersucht. Prospektive epidemiologische Studien zeigten für mittelgradig bis stark erhöhte Mikrokernfrequenzen eine signifikant erhöhte Krebsinzidenz, insbesondere für die bei Dialysepatienten gehäuft vorkommenden Karzinome des Urogenitaltrakts (Bonassi 2006). Parallel wurden die Spiegel von Homocystein, dessen dosisabhängige genomschädigende Wirkung in vitro nachgewiesen ist, bestimmt (Fink 2007).

Sollte die Vitamingabe zu einer Reduktion des Genomschadens führen, wäre dies eine auf breiter Basis umsetzbare Interventionsmöglichkeit zur Senkung des Krebsrisikos von Dialysepatienten.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Arbeitsgeräte

Die Chemikalien wurden von den Firmen Gibco (Maryland, USA), SERVA (Heidelberg) und Sigma Chemical Co. (Taufkirchen) bezogen, Lieferant der Puffersalze war Merck (Darmstadt).

Allgemeine Verbrauchsmaterialien wurden von der Firma Hartenstein (Würzburg), Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur von der Firma Greiner (Nürtingen) erworben. Die Lithium Heparin Monovetten stammten von Sarstedt (Nümbrecht-Rommelsdorf).

Puffer und Lösungen wurden autoklaviert oder durch Filter steril filtriert. Wasser wurde aus der hauseigenen Reinstwasser-Anlage entnommen (Milliporesystem).

Die verwendeten Arbeitsgeräte sind nachfolgend in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt:

Autoklav	Melag Typ 28, Melag, Deutschland
Brutschrank	Typ B 5060 EK-CO2, Heraeus, Deutschland
Coulter Counter	Z1, Coulter Electronics, UK
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Deutschland
Lichtmikroskop	Zeiss, Deutschland
Pipetten	Gilson, Frankreich
	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Labsystem, Finnland
Sterile Werkbank	Gelaire BH 26, Flow Laboratories, Deutschland
Sterilisator	Heraeus, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Labofuge 400e, Heraeus, Deutschland
Zytozentrifuge	Cytospin 3, Shandon, UK

2.2 Medien und Puffer

Die humanen Lymphozyten wurden in RPMI 1640 Medium (Sigma Chemical Co., Taufkirchen) kultiviert. Hierfür sind 500 ml RPMI folgende Substanzen, welche bis auf Penicillin-Streptomycin alle von Sigma Chemical Co., Taufkirchen stammten, zugesetzt worden :

- 75 ml hitzeinaktiviertes (30 Minuten, 56 °C) Pferdeserum
- 5 ml Natriumpyruvat (100 mM)
- 5 ml L-Glutamin (200 mM)
- 2 ml Penicillin-Streptomycin (10.000 IU/ml Penicillin, 10.000 IU/ml Streptomycin; Gibco, Maryland, USA)
- 500 µl Tylosin (8 mg/ml)
- 5 ml MEM (Konzentration: 100 %, non essential amino acids; Gibco, Maryland, USA)

Das Anfärben der Lymphozytenpräparate zur Mikrokernbestimmung erfolgte mit Acridin-Orange.

Acridin-Orange-Lösung: 450 µl 1%ige Acridin-Stammlösung (SERVA, Heidelberg) auf
71,5 ml Sörensen-Puffer

Sörensen-Puffer: Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat: 5,84 g pro 492 ml H₂O,
Kaliumhydrogenphosphat: 4,61 g pro 508 ml H₂O,
pH-Wert: 6,8

Der Sörensen-Puffer diente dem Waschen der Präparate nach dem Anfärben mit Acridin-Orange.

2.3 Isolierung peripherer Lymphozyten aus heparinisiertem Vollblut

6 ml Vollblut wurden vorsichtig in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) auf 6 ml Histopaque 1077 (Sigma Chemical Co., Taufkirchen) aufgeschichtet. Das anschließende Zentrifugieren (1600 Umdrehungen/Minute, 30 Minuten, Raumtemperatur) trennte das Vollblut mittels eines Dichtegradienten in folgende Schichten:

- gelbliches Plasma in der obersten Schicht

- ein weißlicher, dünner Lymphozytensaum zwischen Plasma und Histopaque
- Histopaque als Trennmaterial
- am Boden des Röhrchens Zellmaterial, vor allem Erythrozyten

Das Plasma wurde mittels einer Pasteur-Pipette abgenommen und auf zwei Reaktionsgefäße verteilt, in welchen es bis zur Weiterverwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren werden konnte. Ebenfalls mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde die Lymphozytenschicht in ein neues Zentrifugenröhrchen transferiert und nach Zugabe von 10 ml Lymphozytenmedium wiederum bei 1200 Umdrehungen/Minute und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand aus Lymphozytenmedium wurde verworfen und die Lymphozyten wurden – nach vorsichtiger Resuspension des Zellpellets in 10 ml Lymphozytenmedium – ein zweites Mal für 10 Minuten bei 1200 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Anschließend wurden die isolierten Lymphozyten nach erneutem Verwerfen des Zellpellets in 3 ml Lymphozytenmedium resuspendiert. Aus 200 μl dieser Suspension erfolgte im Coulter Counter die Bestimmung der Zellzahl. Die Lymphozyten, durch Zugabe von Lymphozytenmedium auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt und in eine Kulturflasche überführt, standen nun für den Mikrokernversuch zur Verfügung.

2.4 Mikrokerntest

2.4.1 Durchführung und Auswertung des Mikrokerntests

Der cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) wurde in dieser Studie nach der Methode von Fenech durchgeführt (Fenech 2000). Zur Stimulation der Zellteilung wurden pro Milliliter Lymphozytensuspension 10 μg Phytohämagglutinin zugegeben und die Lymphozyten anschließend bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 -Gehalt im Brutschrank inkubiert. Nach 42 bis 44 Stunden wurden 5 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin B hinzugefügt, welches durch Auflösung von Aktinfilamenten nach erfolgter Mitose die Zellteilung hemmt, so dass die Zellen im Zweikernstadium verbleiben. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation der Lymphozyten über 24 Stunden. Nach erfolgreicher Vereinzelung der Lymphozyten durch mehrmaliges Resuspendieren der Lymphozytenlösung wurden pro Studienteilnehmer mindestens vier Cytospin-Präparate angefertigt, wobei mittels

Zytozentrifuge (5 Minuten, 1000 Umdrehungen/Minute) auf einen Objektträger circa 20.000 Zellen aufgetragen wurden. Im Anschluss daran erfolgte sogleich die Fixation der Präparate in Küvetten mit $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Methanol. Nach mindestens einstündiger Fixierung in Methanol konnten die Präparate in der Acridin-Orange-Färbelösung drei Minuten lang gefärbt werden; überschüssiger Farbstoff wurde im Anschluss durch ein zweimaliges, je fünf Minuten dauerndes Bad in Sörensenpuffer entfernt. Zuletzt wurde auf den mit Puffer benetzten Objektträgern ein Deckglas (24 mm x 40 mm) platziert.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden bei 400facher Vergrößerung pro Patient und Messzeitpunkt etwa 1000 doppelkernige Lymphozyten auf das Vorhandensein von Mikrokerneln untersucht. Hierbei wurde unterschieden, ob ein oder mehrere Mikrokerne vorlagen. Mikrokerne in Zellen mit mehr als zwei Zellkernen wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Neben der Zahl der Mikrokerne wurde die Anzahl an ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen sowie die Häufigkeit von Mitosen und Apoptosen pro 1000 ausgezählter Zellen bestimmt. Unter der Kategorie „Sonstiges“ wurden die Lymphozyten erfasst, die bei der Herstellung der Präparate zerstört worden waren oder aus anderen Gründen nicht eindeutig einer der sieben Kategorien zugeordnet werden konnten. Während der Auswertung war aufgrund eines Verschlüsselungssystem nicht bekannt, zu welcher Person oder Studiengruppe das Präparat zuzuordnen war.

2.4.2 Theoretische Grundlagen des Mikrokerntests

In dieser Arbeit wurde der Mikrokerntest verwendet, um Genomschäden in sich teilenden Lymphozyten zu erfassen. Dieser Test ist wenig aufwändig in der Durchführung und leicht reproduzierbar (Stopper 1997). Die Methode ist weit verbreitet und gut erprobt.

Ein Mikrokernel ist definiert als abgerundete, DNA enthaltende und von einer Membran umgebene Struktur, die eine ähnliche Farbintensität wie der Zellkern aufweist. Der Mikrokernel darf nicht mit dem Zellkern in Verbindung stehen, seine Größe darf ein Drittel des Zellkerns nicht überschreiten. In ultrastrukturellen Details entspricht ein Mikrokernel einem typischen Interphasekern, seine Doppelmembran gleicht im Aufbau mit Nukleoporen und Lamina der Struktur der Kernmembran (Schiffmann 1991).

Mikrokerne entstehen während der Zellteilung durch Ausschluss von ganzen Chromosomen oder Chromosomfragmenten, wobei dieser Vorgang unabhängig vom Zeitpunkt der Genomschädigung nur während der Mitose stattfindet. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind nur ansatzweise geklärt, diskutiert werden sowohl Störungen des Spindelapparats mit nachfolgender Chromosomenfehlverteilung als auch eine Absonderung genetischen Materials, welches durch Mutationen verändert wurde (Tucker 1986; Schmuck 1988).

Mikrokerne werden vermehrt in präkanzerösen Läsionen gefunden (Benner 1993; Garewal 1993; Rosin 1993), die Mikrokernfrequenz von nicht behandelten Krebspatienten ist ebenfalls erhöht (Fenech 1999). Des Weiteren besteht eine positive Korrelation zwischen genotoxischen, Mikrokern-induzierenden Agentien wie ionisierender oder ultravioletter Strahlung und Kanzerogenität (Chang 1997; Bettega 2003). Außerdem ist eine inverse Korrelation zwischen Mikrokernfrequenz und dem Blutspiegel beziehungsweise der Nahrungsaufnahme von Folsäure, Calcium und Vitamin E, welche mit einem reduzierten Krebsrisiko assoziiert werden, bekannt (Fenech 2005). Diese Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Mikrokernfrequenz und Krebsentstehung sind kürzlich durch eine große prospektive epidemiologische Studie verstärkt worden: bei mittelgradig bis stark erhöhten Mikrokernfrequenzen besteht ein signifikant erhöhtes Risiko für eine spätere Krebserkrankung. Hierbei ist besonders das Risiko für Karzinome des Urogenitaltrakts und im Speziellen für Karzinome von Blase und Niere erhöht (Bonassi 2006). Die Inzidenz von Karzinomen dieser beiden Organe ist bei Dialysepatienten sehr deutlich gesteigert.

Es ist allerdings noch unklar, ob Mikrokerne ein Schritt in der Kanzerogenese oder nur ein Marker hierfür sind. Die Bildung von Mikrokernen kann, da Teile des genetischen Materials in der nächsten Mitose nicht mehr repliziert werden, als Teilschritt zur Entwicklung einer Aneuploidie verstanden werden, welche wiederum in der Karzinomentstehung involviert ist. Nach der Theorie von Von-Hoff könnten Mikrokerne aber sogar der Elimination genetischer Schäden dienen und somit eine mögliche maligne Entartung verhindern (Von Hoff 1992). Die Rolle der Mikrokerne in der Karzinogenese ist auch deshalb nur zum Teil verstanden, weil immer noch nicht bekannt ist, was mit Mikrokernen im weiteren Verlauf des Zellzyklus geschieht. Sowohl ein enzymatischer

Abbau (Obe 1982) als auch eine Reintegration in den Zellkern (Gustavino 1994) werden diskutiert.

2.5 Bestimmung der Homocysteinwerte

Die Plasma-Homocysteinspiegel wurden bei Frau Dr. Alessandra Perna in der Forschungsabteilung für Nephrologie der Universität Neapel, Italien, bestimmt.

2.6 Probandenkollektiv

Alle teilnehmenden Patienten wurden vor Beginn der Studie ausführlich mündlich und durch ein Patienteninformationsschreiben aufgeklärt und gaben schriftlich ihr Einverständnis für die Teilnahme an der Studie. Diese war von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Würzburg am 09.05.2005 genehmigt worden.

28 Patienten des Kuratoriums für Hemodialyse in Würzburg nahmen an der Studie teil. Es wurden nur stabile Langzeitdialysepatienten ausgewählt, Ausschlusskriterien waren floride Infekte, Herzinsuffizienz und Karzinome. Nach Bestimmung des Ausgangswertes der Mikrokernfrequenz wurden die Patienten einer Substitutionsgruppe, welche durch die Verabreichung von Folsäure oder Folsäure + Vitamin B12 noch weiter unterteilt war, und einer Kontrollgruppe zugewiesen. Hierfür wurden Paare von Patienten gebildet, die sich in ihrer Mikrokernanzahl glichen. Die Einteilung in Kontroll- oder Substitutionsgruppe erfolgte dann nach dem Zufallsprinzip. Ob die Patienten nur Folsäure oder zusätzlich Vitamin B12 erhielten, wurde durch den Wochentag ihrer Dialyse festgelegt.

Von den 28 teilnehmenden Patienten beendeten 26 die Studie. Aus der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 musste eine Patientin wegen häufiger stationärer Krankenhausaufenthalte und den damit verbundenen Substitutionsunregelmäßigkeiten von der Studie ausgeschlossen werden, sie wird in den folgenden Beschreibungen und Auswertungen nicht mehr berücksichtigt. Eine weitere Patientin der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 verstarb kurz vor Studienende. Nach Auskunft der behandelnden Ärzte steht der Tod (Myokardinfarkt) während der

Interventionsperiode in keinem Zusammenhang mit der Vitamin-Substitution. Bei keinem Patienten wurden im Studienverlauf Nebenwirkungen beobachtet.

Alle Probanden wurden dreimal wöchentlich mit Polysulfonmembrandialysatoren hämodialysiert. Das durchschnittliche Alter betrug zu Beginn der Studie $64,6 \pm 12,7$ Jahre (Folsäure: $64,4 \pm 10,9$; Folsäure + Vitamin B12: $68,2 \pm 16,4$; Kontrolle: $60,3 \pm 8,6$ Jahre), die jüngste Person war 29, die älteste 85 Jahre alt. 8 Frauen und 19 Männer nahmen an der Studie teil, sie wurden durchschnittlich seit $8,2 \pm 5,5$ Jahren dialysiert (Folsäure: $9,0 \pm 7,5$; Folsäure + Vitamin B12: $6,6 \pm 2,9$; Kontrolle: $9,1 \pm 5,5$ Jahre). Bei 22 Patienten war eine Hypertonie diagnostiziert, 13 Patienten litten an einer chronischen Herzerkrankung, bei 11 war eine Hyperlipidämie bekannt und 9 waren an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt.

Die Anzahl der Patienten, das Geschlechterverhältnis, das Alter bei Dialysebeginn und die durchschnittliche Dauer der Dialysebehandlung unterteilt nach Studiengruppen gibt Tabelle 1 wieder.

Tabelle 1: Charakteristika der drei Studiengruppen

Charakteristika	Folsäure	Folsäure + Vitamin B12	Kontrollgruppe
Zahl der Patienten	9	10	8
Weiblich/männlich	1/8	3/7	4/4
Alter (in Jahren)	$64,4 \pm 10,9$	$68,2 \pm 16,4$	$60,3 \pm 8,6$
Dialyse (in Jahren)	$9,0 \pm 7,5$	$6,6 \pm 2,9$	$9,1 \pm 5,5$

Bezüglich Alter und Dialysedauer gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Studiengruppen.

Die Tabellen 24 beschreiben das Patientenkollektiv der drei Studiengruppen bezüglich der Parameter Geschlecht, Alter, Grund und Dauer der Dialysetherapie sowie Erkrankung an Diabetes mellitus.

Tabelle 2: Beschreibung der Substitutionsgruppe Folsäure

Geschlecht	Alter	Primäre Nierenerkrankung	Dialyse (in Jahren)	Diabetes mellitus
M	49	Glomerulonephritis	4	nein
M	62	Diabetische Nephropathie	5	ja
W	67	Diabetische Nephropathie	1	ja
M	65	Interstitielle Nephropathie	18	nein

M	73	Diabetische Nephropathie	1	ja
M	51	Glomerulonephritis	5	nein
M	67	Andere	15	nein
M	60	Interstitielle Nephropathie	11	nein
M	85	Interstitielle Nephropathie	21	nein

Tabelle 3: Beschreibung der Substitutionsgruppe Folsäure und Vitamin B12

Geschlecht	Alter	Primäre Nierenerkrankung	Dialyse (in Jahren)	Diabetes mellitus
M	68	Glomerulonephritis	5	nein
M	79	Nephrosklerose	7	nein
M	59	Glomerulonephritis	10	nein
M	65	Glomerulonephritis	8	nein
M	29	Glomerulonephritis	7	nein
W	61	Chron. Pyelonephritis	12	nein
M	82	Nephrosklerose	5	nein
M	81	Diabetische Nephropathie	5	ja
W	73	Diabetische Nephropathie	5	ja
W	82	Diabetische Nephropathie	2	ja

Tabelle 4: Beschreibung der Kontrollgruppe

Geschlecht	Alter	Primäre Nierenerkrankung	Dialyse (in Jahren)	Diabetes mellitus
M	69	Glomerulonephritis	4	nein
M	54	Glomerulonephritis	10	nein
W	57	Schrumpfniere	20	ja
M	54	Glomerulonephritis	12	nein
W	53	Polyzystische Niere	4	nein
M	53	Glomerulonephritis	5	ja
W	74	Chron. Pyelonephritis	12	nein
W	68	Diabetische Nephropathie	6	ja

Tabelle 5 stellt, unterschieden nach Studiengruppen, Art und Häufigkeit der ärztlich verordneten Medikation dar.

Tabelle 5: Medikation der Patienten, unterschieden nach Studiengruppen

Medikament	Folsäure (n = 9)	Folsäure + Vit. B12 (n = 10)	Kontrollgruppe (n = 8)
ACE-Hemmer	2	2	1
AT ₁ -Antagonist	0	1	1
β-Blocker	7	3	4
Calciumantagonist	1	5	2
Diuretikum	3	5	2

Statin	5	3	2
Erythropoetin	8	10	8
Multivitamine	5	4	8

Zusätzlich wurde einer Kontrollgruppe nicht-dialysepflichtiger Probanden im gleichen Zeitraum zu zwei Zeitpunkten Blut abgenommen. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Eigenschaften dieser Kontrollgruppe. Bei 5 der Probanden waren eine Hyperlipidämie und eine Hypertonie bekannt, 4 litten unter einer chronischen Herzerkrankung.

Tabelle 6: Eigenschaften der nicht-dialysenpflichtigen Kontrollgruppe

Anzahl der Probanden	7
Durchschnittliches Alter (in Jahren)	63,9 ± 21,2
Geschlechterverhältnis	5 Frauen / 2 Männer
Diabetes mellitus	5 Erkrankte / 2 Gesunde
Ärztlich verordnete Medikamente	ACE-Hemmer: 3 AT ₁ -Antagonist: 3 β-Blocker: 4 Calciumantagonist: 3 Diuretikum: 3 Statin: 3

Um einen Einblick in die aktuelle Kreislauf- und Entzündungssituation gewinnen zu können, wurden Blutdruck und CRP-Werte mitbestimmt. Die Blutdruckwerte wurden vom Pflegepersonal des Kuratoriums für Heimdialyse Würzburg vor Dialysebeginn mittels einer elektronischen Blutdruckmessgeräts der Firma Datascope nach der Methode von Riva-Rocci ermittelt. Die CRP-Werte ließ das Kuratorium für Heimdialyse Würzburg in regelmäßige Abständen im Rahmen des Routinelabors ermitteln.

2.7 Vitaminsubstitution und Blutentnahme

Den Patienten der Substitutionsgruppen wurde nach Beendigung der Dialyse dreimal wöchentlich Folgamma forte intravenös appliziert (15 mg Folsäure + 100 µg Cyanocobalamin). Die Probanden der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 erhielten zusätzlich einmal pro Woche Vitamin B12 forte Hevert injekt als intravenöse Injektion (1000 µg Cyanocobalamin). Beide Präparate werden von Wörwag Pharma (Böblingen) vertrieben.

Die Blutproben wurden vom Pflegepersonal des Kuratoriums für Heimdialyse Würzburg vor Dialysebeginn abgenommen, um Lymphozyten aus dem prädialytischen Stoffwechsel gewinnen zu können.

2.8 Statistische Methoden

Bei der Auswertung der Daten wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet, für die Signifikanzanalysen wurde SPSS oneway Anova verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Mikrokernrate vor Substitutionsbeginn

Vor Substitutionsbeginn wurde im Abstand von jeweils einer Woche bei jedem Patienten dreimal die Mikrokernfrequenz bestimmt, um den Ausgangswert der Mikrokernraten zu detektieren (Messpunkte 1–3). Dieser Wert – im Gesamtdurchschnitt 37,1 Mikrokerne pro 1000 doppelkerniger Lymphozyten – diente als Grundlage der späteren Gruppeneinteilung. Abbildung 1 zeigt diese Mikrokernraten unterschieden sowohl nach Messpunkt als auch nach Studiengruppe.

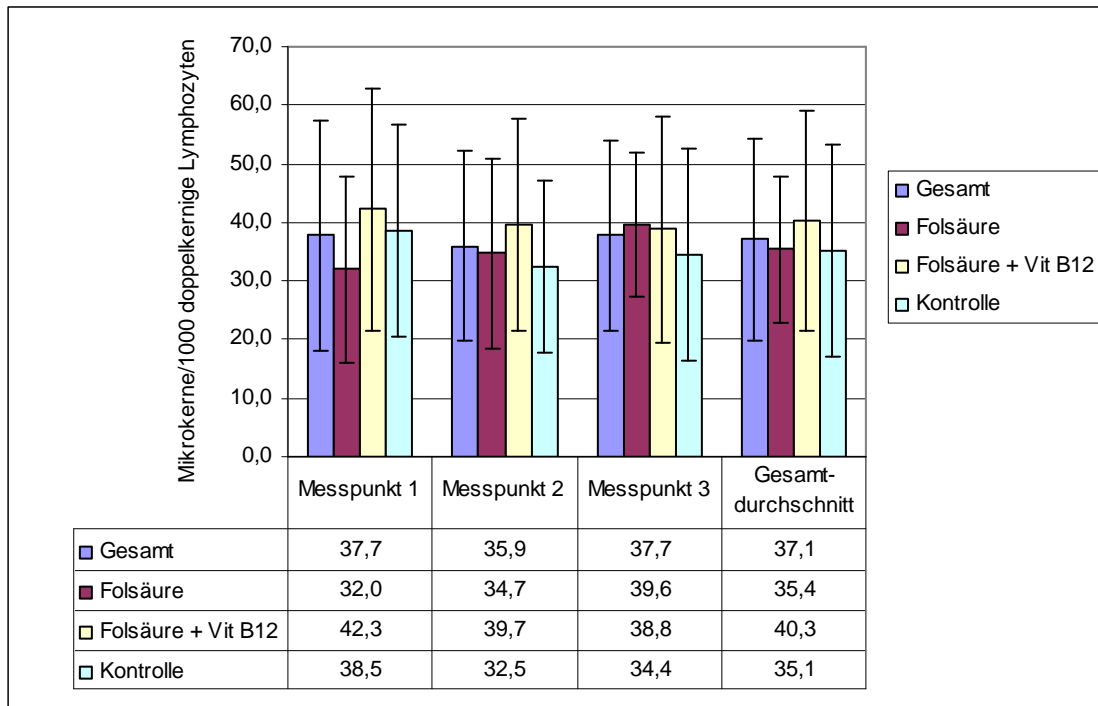


Abb. 1: Mikrokernraten in den Studiengruppen vor Substitutionsbeginn, gemessen zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

Zwischen Kontrollgruppe, Substitutionsgruppe Folsäure und Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 gab es bezüglich der Ausgangs-Mikrokernfrequenz keine signifikanten Unterschiede. Auch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Messzeitpunkten festgestellt werden.

Dagegen bestand – wie in Abbildung 2 dargestellt – ein signifikanter Unterschied in der mittleren Mikrokernfrequenz vor Substitutionsbeginn zwischen weiblichen und männlichen Probanden: Dialysepflichtige Frauen hatten durchschnittlich 62,1 % höhere Mikrokernfrequenzen als dialysepflichtige Männer (Frauen: $50,8 \pm 23,9$; Männer $31,4 \pm 6,7$ Mikrokerne). Berücksichtigt man zusätzlich zu den Dialysepatienten auch die nicht dialysepflichtigen Studienteilnehmer, so lag die Mikrokernrate der Frauen um 53,6 % höher verglichen mit der Mikrokernrate der Männer (Frauen: $48,1 \pm 21,8$; Männer: $31,1 \pm 6,6$ Mikrokerne). Auch dieser Unterschied ist signifikant.

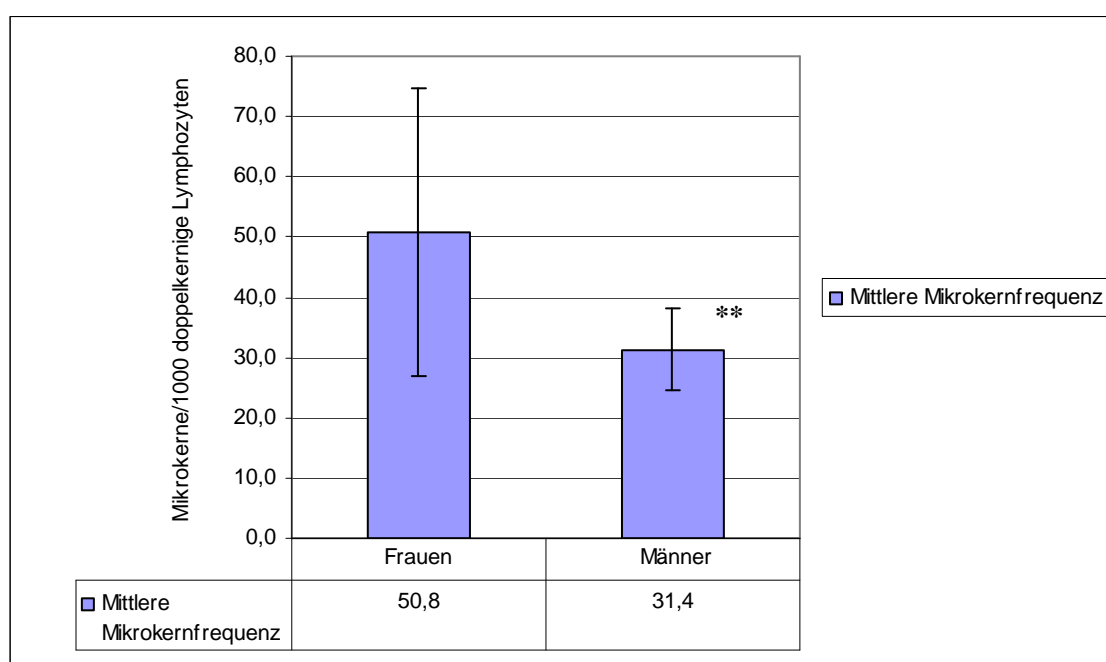


Abb. 2: Mittlere Mikrokernraten der dialysepflichtigen Probanden vor Substitutionsbeginn, unterschieden nach weiblichem oder männlichem Geschlecht (Mittelwert \pm Standardabweichung)

** $p < 0,01$ vs. Mikrokernrate der Frauen

Bei weiterer Analyse der Mikrokernfrequenzen zeigte sich eine geringe Zunahme der Mikrokernrate mit dem Alter und eine Abnahme der Mikrokernrate mit der Dialysedauer (s. Abbildung 3 und 4). Zwischen den Patienten, die bereits im Rahmen ihrer Standardmedikation Vitaminpräparate erhielten, und den Patienten ohne bisherige Vitaminsubstitution gab es keinen Unterschied bezüglich ihrer Mikrokernfrequenz (mit Vitaminen: $37,6 \pm 16,9$; ohne Vitamine: $36,3 \pm 16,2$ Mikrokerne)

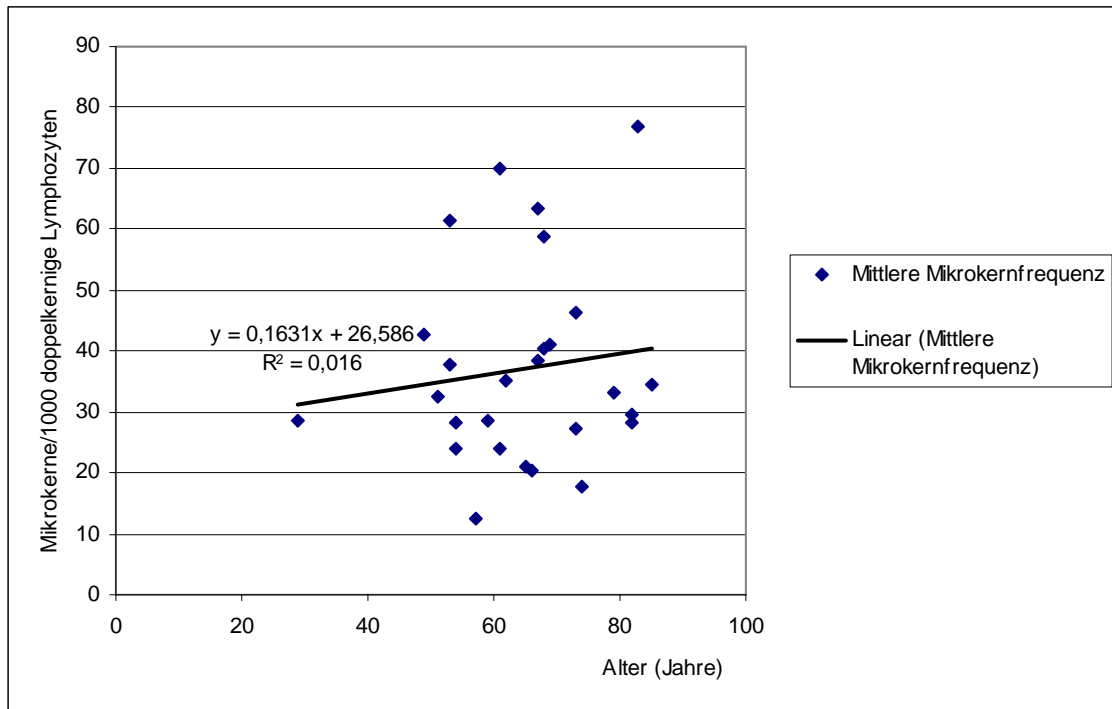


Abb. 3: Mittlere Mikrokernelnfrquenz der dialysepflichtigen Probanden vor Substitutionsbeginn in Abhängigkeit vom Lebensalter

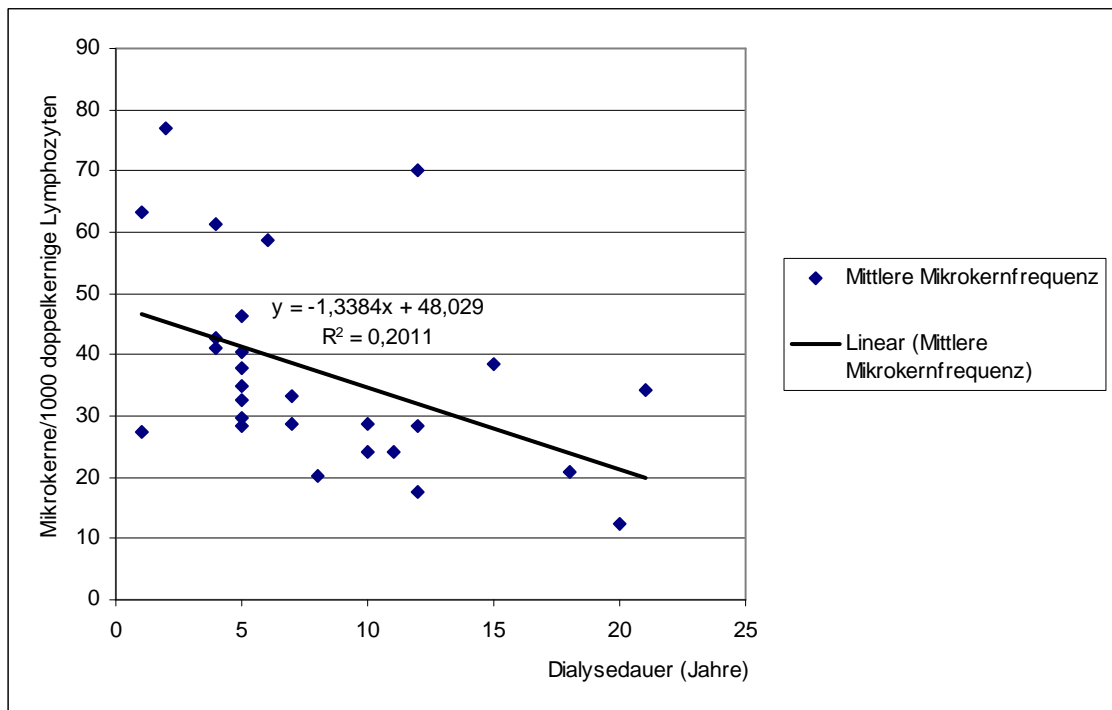


Abb. 4: Mittlere Mikrokernelnfrquenz der dialysepflichtigen Probanden vor Substitutionsbeginn in Abhängigkeit von der Dialysedauer

3.2 Veränderung der Mikrokernrate unter Vitaminsubstitution

Nach Bestimmung des Grundwertes wurde mit der Vitaminsubstitution begonnen. Die erste Messung erfolgte nach 4 Wochen Substitution, weitere Messungen fanden nach 12 und 17 Wochen statt (Messpunkte 4–6).

Die Veränderung der Mikrokernfrequenz nach Gabe von Folsäure oder Folsäure + Vitamin B12 sind in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt. In beiden Gruppen kam es zu einer deutlichen, wenn auch nicht signifikanten Reduktion der Mikrokernfrequenz. In der Substitutionsgruppe Folsäure nahm die mittlere Mikrokernfrequenz nach 17 Wochen Substitution von ursprünglich $35,4 \pm 12,5$ Mikrokernen auf $26,4 \pm 7,5$ ab. Die minimale Mikrokernfrequenz änderte sich hierbei nicht (vor Substitution: 21 Mikrokerne; nach 17 Wochen Substitution: 21 Mikrokerne), während die maximale Mikrokernfrequenz nach 17 Wochen Substitution von ursprünglich 63 auf 44 Mikrokerne pro 1000 doppelkerniger Lymphozyten absank. Unter Substitution mit Folsäure + Vitamin B12 nahm die mittlere Mikrokernfrequenz von $40,3 \pm 19,0$ Mikrokernen vor Substitutionsbeginn auf $23,7 \pm 12,1$ Mikrokerne nach 17 Wochen Substitution ab. Im Gegensatz zur Substitutionsgruppe Folsäure änderte sich nicht nur die maximale Mikrokernfrequenz (vor Substitution: 77 Mikrokerne; nach 17 Wochen Substitution: 46 Mikrokerne), sondern auch die minimale Mikrokernfrequenz (vor Substitution: 20 Mikrokerne; nach 17 Wochen Substitution: 14 Mikrokerne). In der Substitutionsgruppe Folsäure kam es schneller zu einer Reduktion der Mikrokernfrequenz. Nach 4 Wochen waren bereits 74,4 % der maximalen Reduktion nach 17 Wochen erreicht. Dagegen trat der Rückgang der Mikrokernfrequenz in der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 vor allem in den Wochen 5–12 nach Substitutionsbeginn ein, nach 4 Wochen hatten hier nur 27,7 % des maximalen Rückgangs nach 17 Wochen stattgefunden. Zwischen der Messung nach 12 Wochen und der Messung nach 17 Wochen fand keine weitere signifikante Veränderung der Mikrokernrate statt.

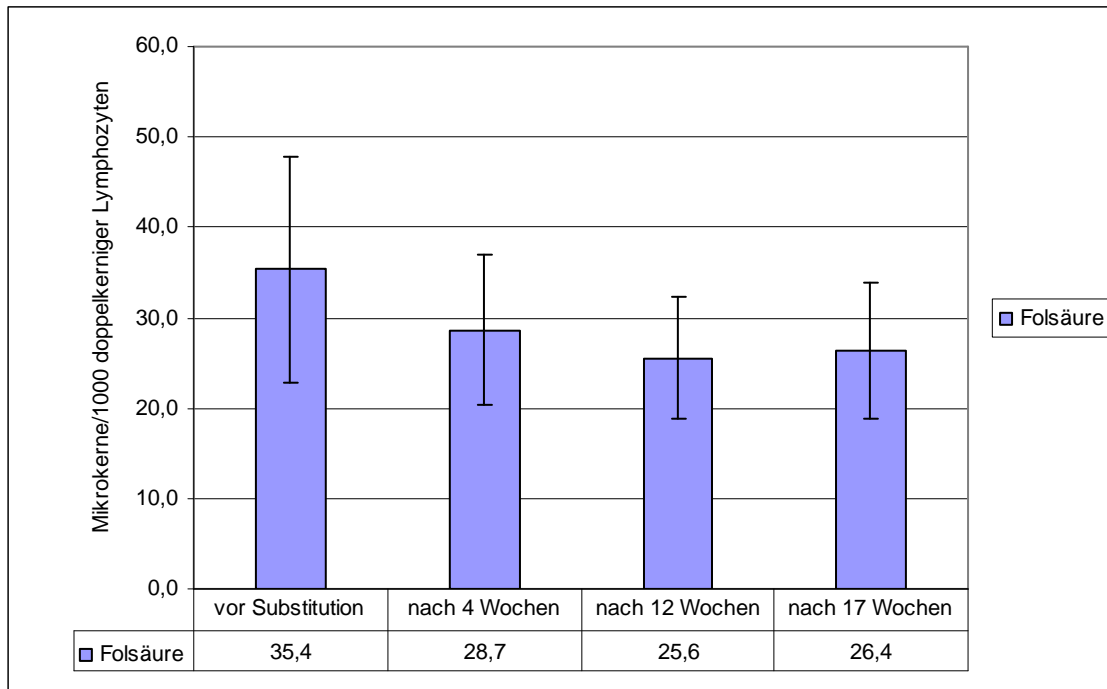


Abb. 5: Veränderung der Mikrokernrate unter Substitution von Folsäure in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf (Mittelwert \pm Standardabweichung)

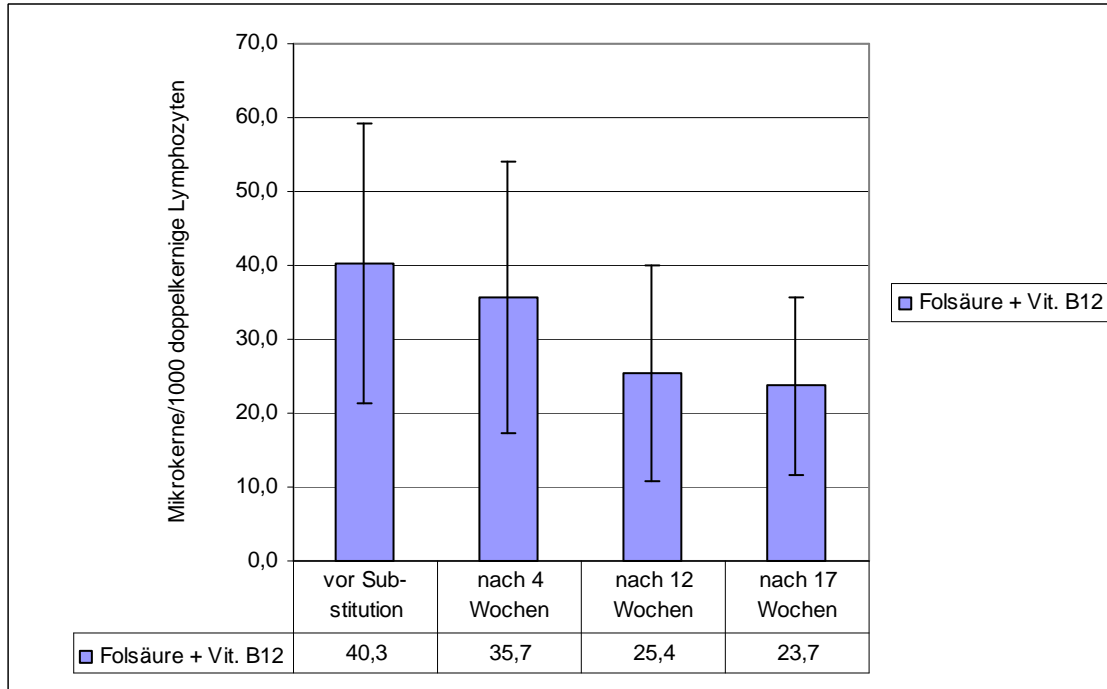


Abb. 6: Veränderung der Mikrokernfrequenz unter Substitution von Folsäure + Vitamin B12 in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf (Mittelwert \pm Standardabweichung)

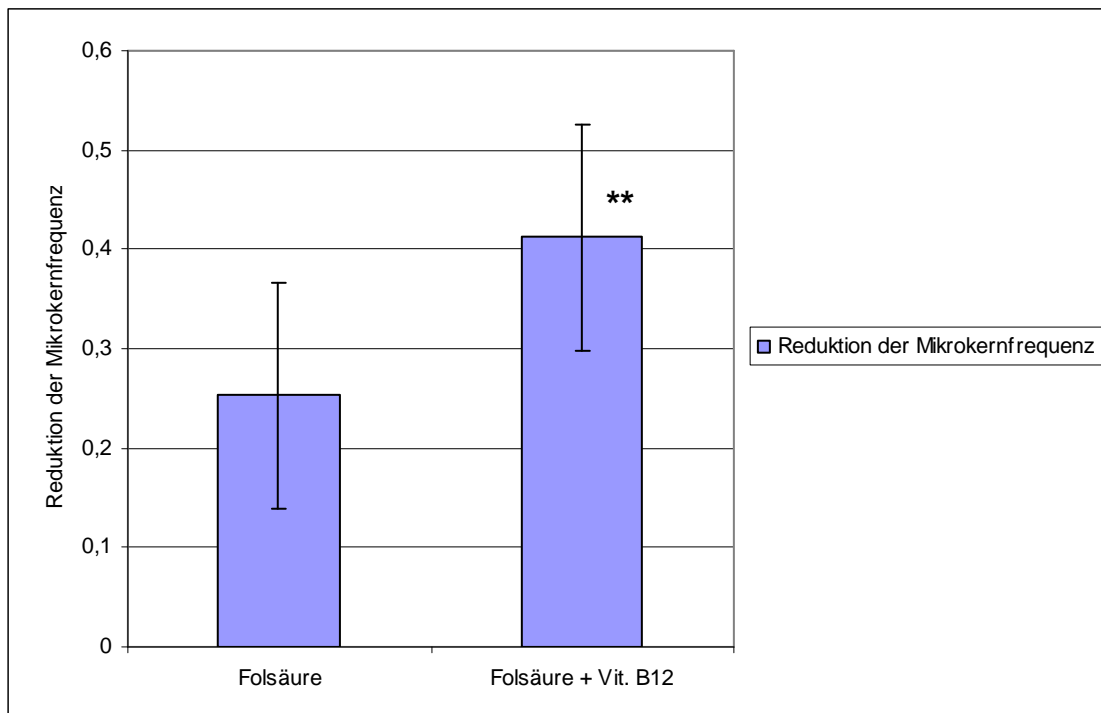


Abb. 7: Relative Reduktion der Mikrokernfrequenz nach 17 Wochen Substitution von Folsäure oder Folsäure + Vitamin B12

** $p < 0,01$ vs. Reduktion der Mikrokernfrequenz unter Folsäuresubstitution

Vergleicht man die Reduktion der Mikrokernfrequenz nach 17 Wochen Substitution von Folsäure oder von Folsäure + Vitamin B12 mit dem Ausgangswert (Mittelwert der drei Messpunkte vor Substitutionsbeginn), so zeigt sich – wie in Abbildung 7 graphisch dargestellt – eine signifikant stärkere Abnahme nach Gabe beider Vitamine (41,2 %) als nach alleiniger Folsäuregabe (25,3 %). Die minimale Reduktion betrug 0 % in der Substitutionsgruppe Folsäure und 13 % in der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12. Die maximale Reduktion lag bei alleiniger Folsäuregabe bei 37 %, bei zusätzlicher Verabreichung von Vitamin B12 bei 51 %.

3.3 Mikrokernraten der Kontrollprobanden während des Studienverlaufs

Um Veränderungen durch andere Faktoren als die Vitaminsubstitution zu erfassen, wurde parallel zu den Untersuchungen der Substitutionsgruppen immer auch die Mikrokernfrequenz der Dialyse-Kontrollgruppe ausgewertet. Wie aus Abbildung 8 ersichtlich, lag der Mittelwert im Verlauf der gesamten Studie bei $34,3 \pm 16,9$. Der

Mittelwert der Messpunkte 1–3 betrug $35,1 \pm 18,1$, für die Messpunkte 4–6 wurde ein Mittelwert von $33,5 \pm 15,9$ ermittelt. Zwischen den einzelnen Messpunkten gab es keinerlei signifikante Unterschiede.

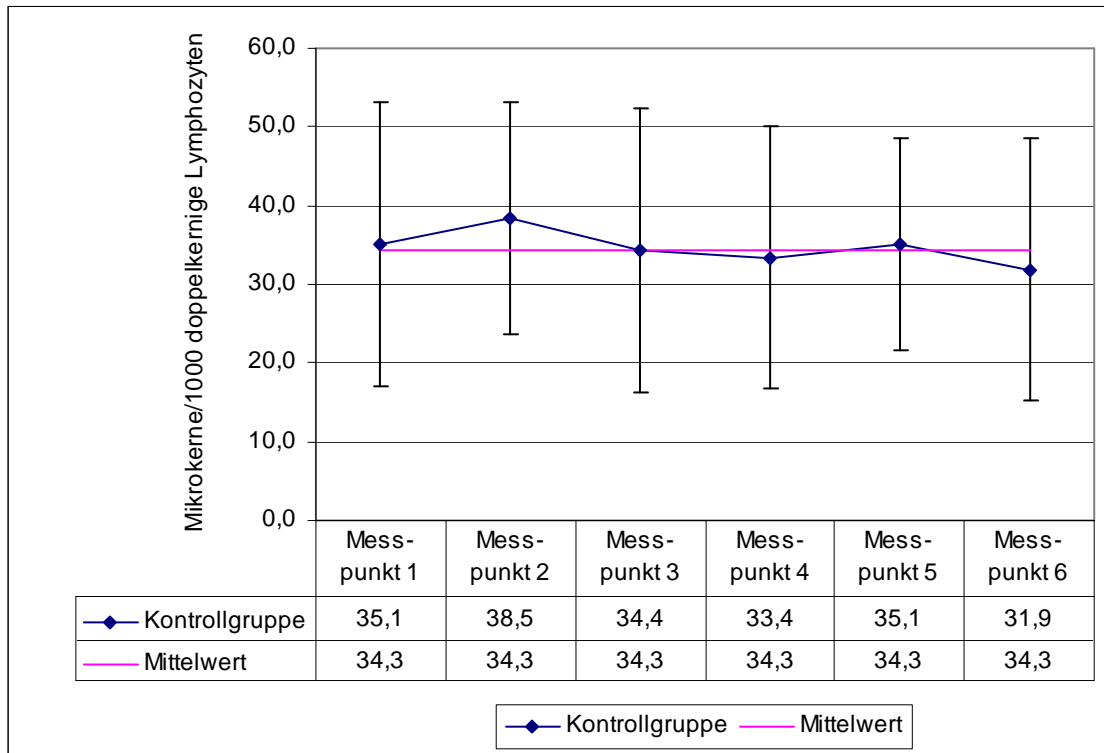


Abb.8: Mikrokernrate der Kontrollgruppe, bestimmt zu sechs Messzeitpunkten
(Mittelwert \pm Standardabweichung)

Weiterhin wurde vor Beginn der Studie einer gesunden Kontrollperson (weiblich, 22 Jahre) einmal Blut abgenommen und aus den hieraus gewonnenen Lymphozyten zahlreiche Präparate angefertigt. Während der ersten drei Messreihen zur Ermittlung des Grundwerts wurden davon drei Präparate pro Messreihe, später fünf Präparate pro Messreihe in verschlüsselter Form ausgewertet. Bei einem Mittelwert von $9,8 \pm 3,0$ Mikrokernen pro 1000 doppelkerniger Lymphozyten betrug – wie in Abbildung 9 dargestellt – die minimale Mikrokernrate 5 Mikrokern und die maximale Mikrokernfrequenz 16 Mikrokern. Die Mittelwerte der einzelnen Messpunkte waren 10,7 (Messpunkt 1), 11,0 (Messpunkt 2), 8,7 (Messpunkt 3), 10,0 (Messpunkte 4 und 5) und 8,8 (Messpunkt 6). Zwischen den einzelnen Messpunkten gab es keine signifikanten

Unterschiede. Das 95 %-Konfidenzintervall für den Gesamt-Mittelwert lag zwischen 8,5 und 11,0 Mikrokerne pro 1000 doppelkerniger Lymphozyten.

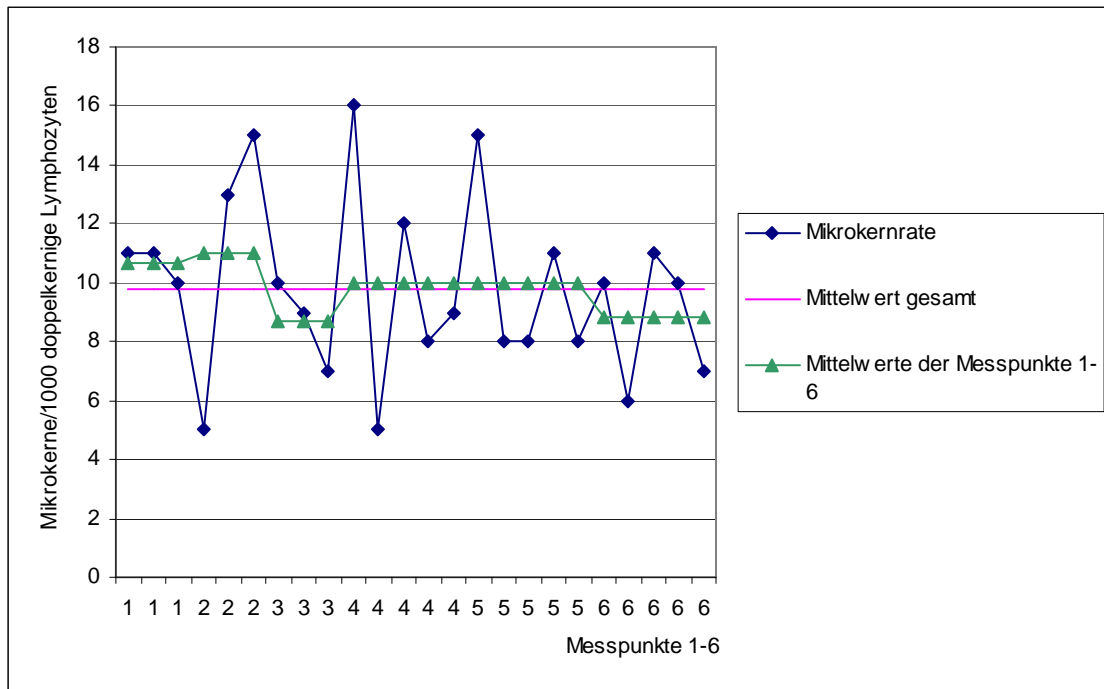


Abb.9: Im Studienverlauf bezüglich der Mikrokernelfrequenz ausgewertete Präparate aus einer Blutprobe einer gesunden Kontrollperson (Mikrokernrate, Gesamt-Mittelwert und Mittelwerte der Messpunkte 1–6)

Außerdem wurden die Lymphozyten nicht-dialysepflichtiger Kontrollpersonen zu zwei Zeitpunkten im Abstand von 3 Monaten auf ihre Mikrokernelraten untersucht. Zwischen diesen beiden Messpunkten kam es zu keiner signifikanten Änderung in der Mikrokernelfrequenz: Zum Zeitpunkt 1 betrug die Mikrokernelfrequenz $39,3 \pm 18,0$, zum Zeitpunkt 2 $35,7 \pm 16,7$ Mikrokerne pro 1000 doppelkerniger Lymphozyten. Die in Abbildung 10 veranschaulichte Mikrokernelfrequenz dieser Gruppe, die in ihrer Altersstruktur der Dialysegruppe gleicht, entspricht der Mikrokernelrate in der Dialysegruppe (Mittelwert Nicht-Dialysegruppe: $37,5 \pm 16,8$; Mittelwert Dialysegruppe vor Substitution: $37,43 \pm 17,01$). Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass in der Nicht-Dialysegruppe bei prozentual mehr Probanden Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und chronische Herzerkrankung diagnostiziert sind (s. Kapitel 2.6).

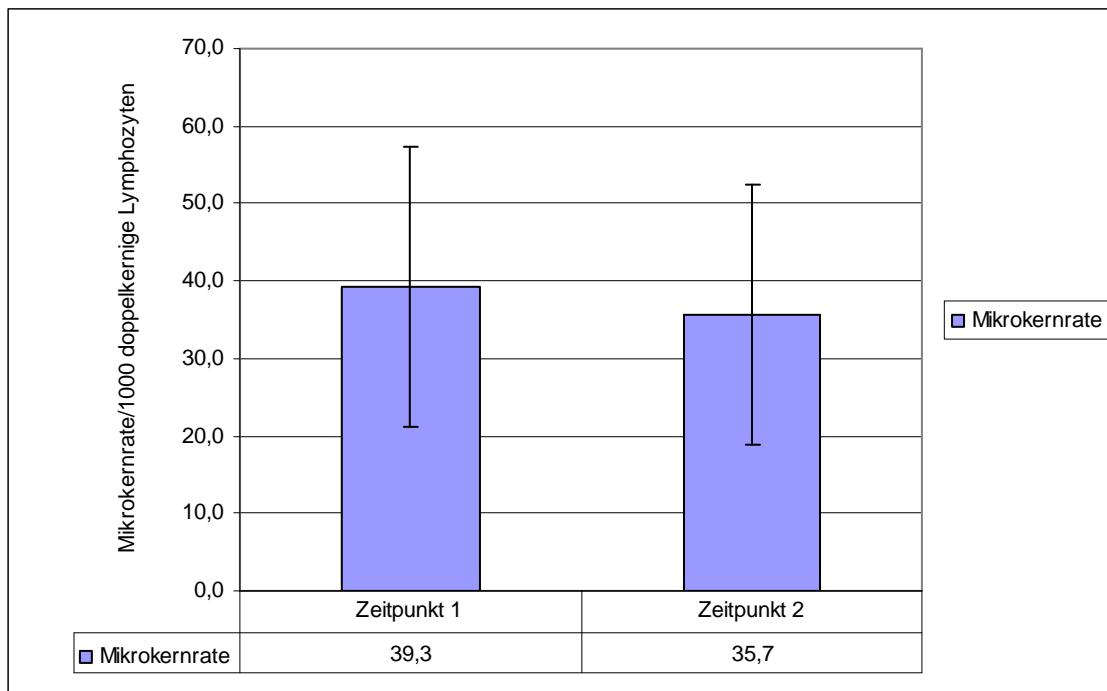


Abb. 10: Mikrokernrate in der Kontrollgruppe nicht-dialysepflichtiger Probanden, gemessen zu zwei Zeitpunkten (Mittelwert \pm Standardabweichung)

3.4 Veränderung der Mikrokernraten in Abhängigkeit von Diabeteserkrankung, Dialysedauer, Alter, Ausgangsmikrokernwerten und bisheriger Vitaminsubstitution

Im folgenden Kapitel wurde die Abhängigkeit der Mikrokernreduktion von den Parametern Diabeteserkrankung, Dialysedauer, Alter, Ausgangsmikrokernwerte und bisherige Vitaminsubstitution untersucht. Zur Bestimmung der Mikrokernreduktion wurden hierfür die Mikrokernwerte nach 17 Wochen Substitution mit dem Mittelwert an Mikrokernen vor Substitutionsbeginn verglichen.

Beim Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern fiel in der Folsäuresubstitutionsgruppe eine stärkere, wenn auch nicht signifikante Abnahme der Mikrokernfrequenz bei den diabetischen Patienten auf (30,3 % versus 19,5 %). Wie Abbildung 11 zeigt, bestätigte sich dieser Zusammenhang nicht in der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 (39,0 % versus 39,2 %). Bei Betrachtung der gesamten Substitutionsgruppe (Folsäure und Folsäure + Vitamin B12) konnte eine ebenfalls nicht signifikante gesteigerte Mikrokernreduktion bei Diabetikern festgestellt

werden (34,6 % versus 30,0 %). In beiden Substitutionsgruppen waren allerdings bei den an Diabetes erkrankten Patienten verglichen mit den nicht an Diabetes erkrankten Patienten höhere Ausgangsmikrokernwerte gemessen worden (Folsäure: 41,9 versus 32,3 Mikrokerne; Folsäure + Vitamin B12: 50,6 versus 35,9 Mikrokerne).

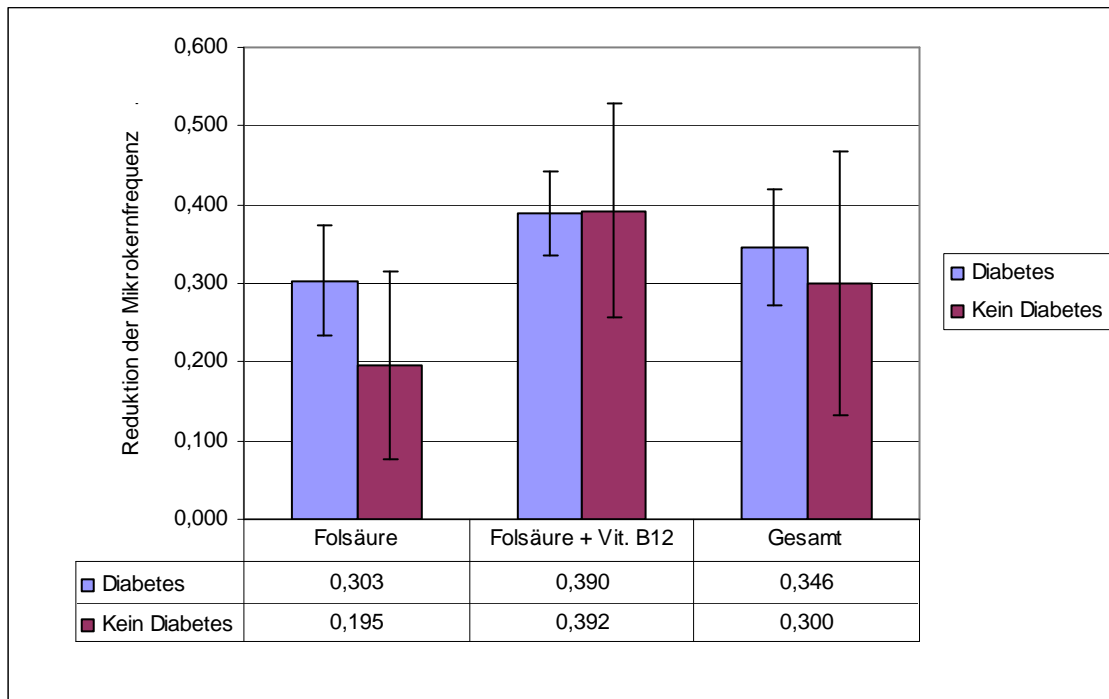


Abb. 11: Reduktion der Mikrokernfrequenz bei an Diabetes mellitus erkrankten und nicht an Diabetes mellitus erkrankten Patienten, unterteilt nach Folsäure- oder Folsäure + Vitamin B12-Substitution (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Analysiert man die Mikrokernreduktion in Abhängigkeit von der Dauer der Dialyse, so zeigt sich bei Betrachtung der gesamten Substitutionsgruppe eine verminderte Abnahme der Mikrokernfrequenz mit zunehmender Länge der Dialysedauer. Abbildung 12 veranschaulicht diesen Zusammenhang. Diese negative Korrelation gilt – wie in Abbildung 13 ersichtlich – auch für die Folsäure-Substitutionsgruppe. Dagegen kam es in der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 mit zunehmender Dialysedauer zu einer stärkeren Reduktion der Mikrokernfrequenz. In Abbildung 14 ist diese positive Korrelation dargestellt.

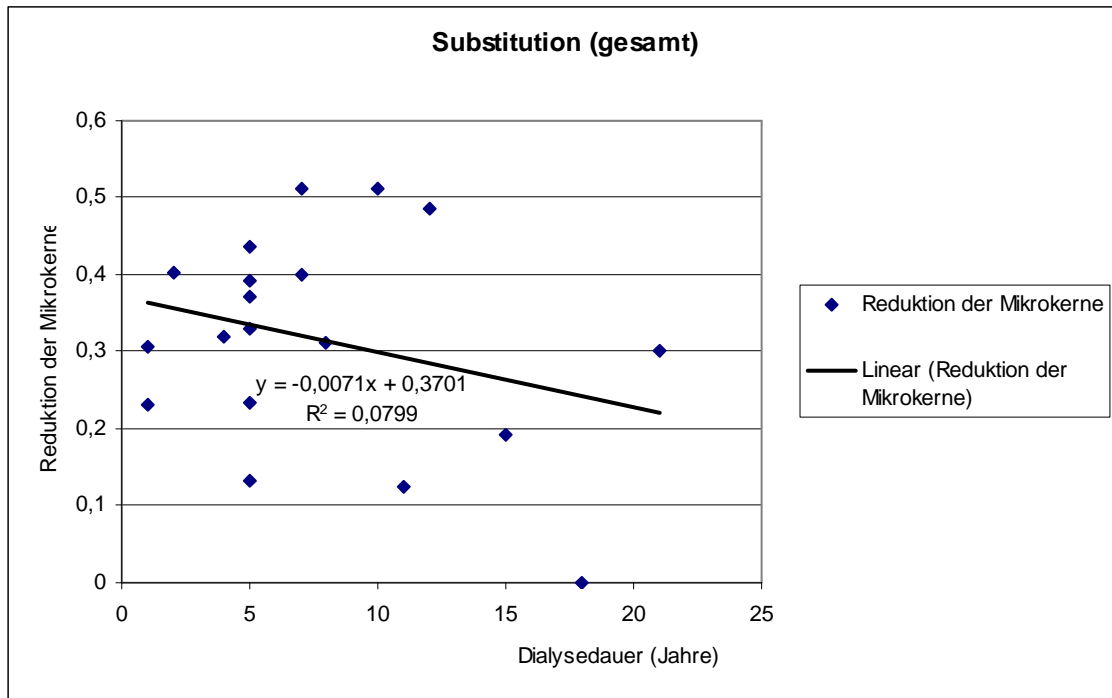


Abb. 12: Reduktion der Mikrokerne in Abhängigkeit von der Dialysedauer bei der gesamten Substitutionsgruppe

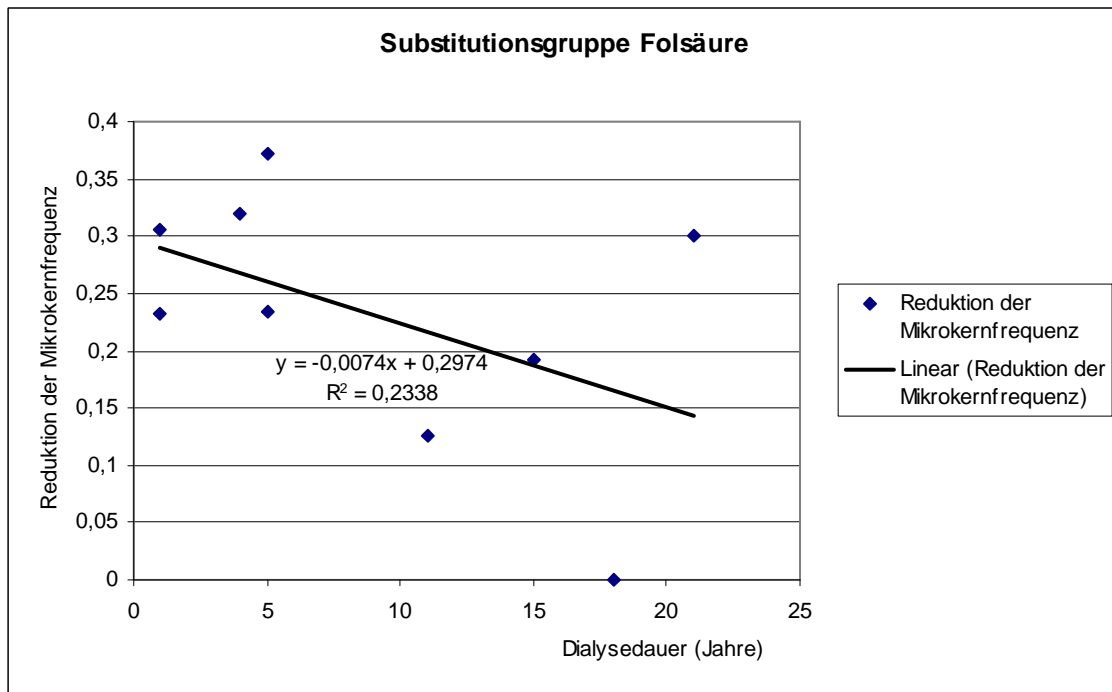


Abb.13: Reduktion der Mikrokernelnfrequenz in Abhängigkeit von der Dialysedauer bei der Substitutionsgruppe Folsäure

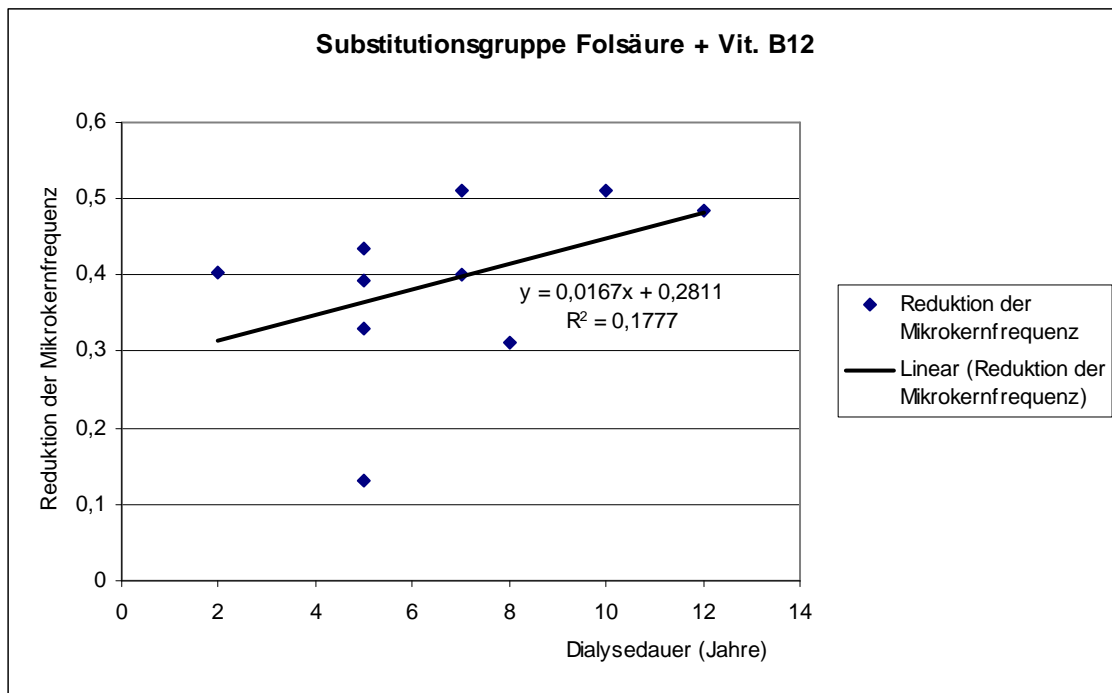


Abb. 14: Reduktion der Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit von der Dialysedauer bei der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12

Bei diesen Ergebnissen ist zu berücksichtigen, dass in der Folsäure + Vitamin B12-Substitutionsgruppe nur 10 % der Patienten länger als zehn Jahre dialysiert wurden, während in der Folsäure-Substitutionsgruppe 44,4 % der Patienten seit mehr als zehn Jahren dialysepflichtig waren.

Beobachtet man die Reduktion der Mikrokernfrequenz in der Subgruppe der Patienten, die seit maximal zehn Jahren mittels Dialyse behandelt werden, so ist nicht nur in der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12, sondern auch in der Substitutionsgruppe Folsäure und in der gesamten Substitutionsgruppe mit Zunahme der Dialysedauer eine vermehrte Reduktion der Mikrokernfrequenz zu verzeichnen. Diese positive Korrelation zwischen Dialyselänge und Mikrokernabnahme in der gesamten Substitutionsgruppe zeigt die Abbildung 15.

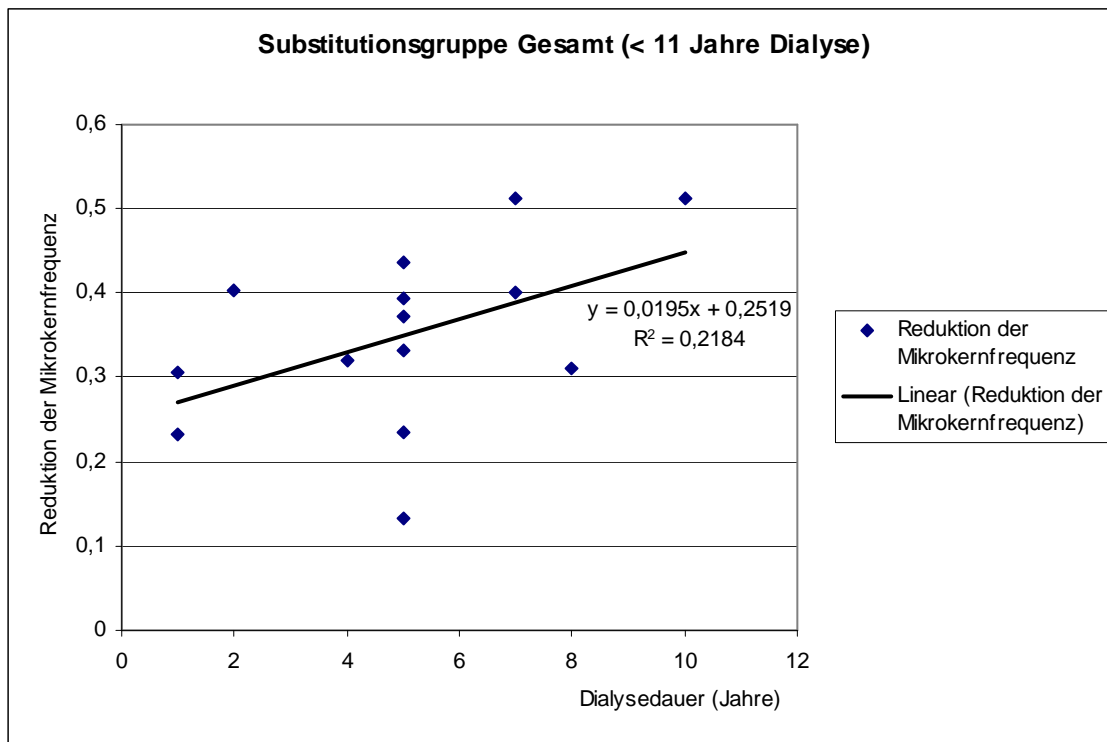


Abb. 15: Reduktion der Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit von der Dialysedauer bei Patienten der Substitutionsgruppe Folsäure und der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12, die seit < 11 Jahre dialysiert wurden

Bei Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Lebensalter und Reduktion der Mikrokernfrequenz fiel auf, dass mit zunehmendem Alter die Abnahme der Mikrokernrate zurückging. Dies galt – wie die Abbildungen 16 und 18 zeigen – für die Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 und auch für die gesamte Substitutionsgruppe. Dagegen war – wie in Abbildung 17 dargestellt – in der Folsäure-Substitutionsgruppe kein Zusammenhang zwischen Patientenalter und Rückgang der Mikrokernrate zu erkennen.

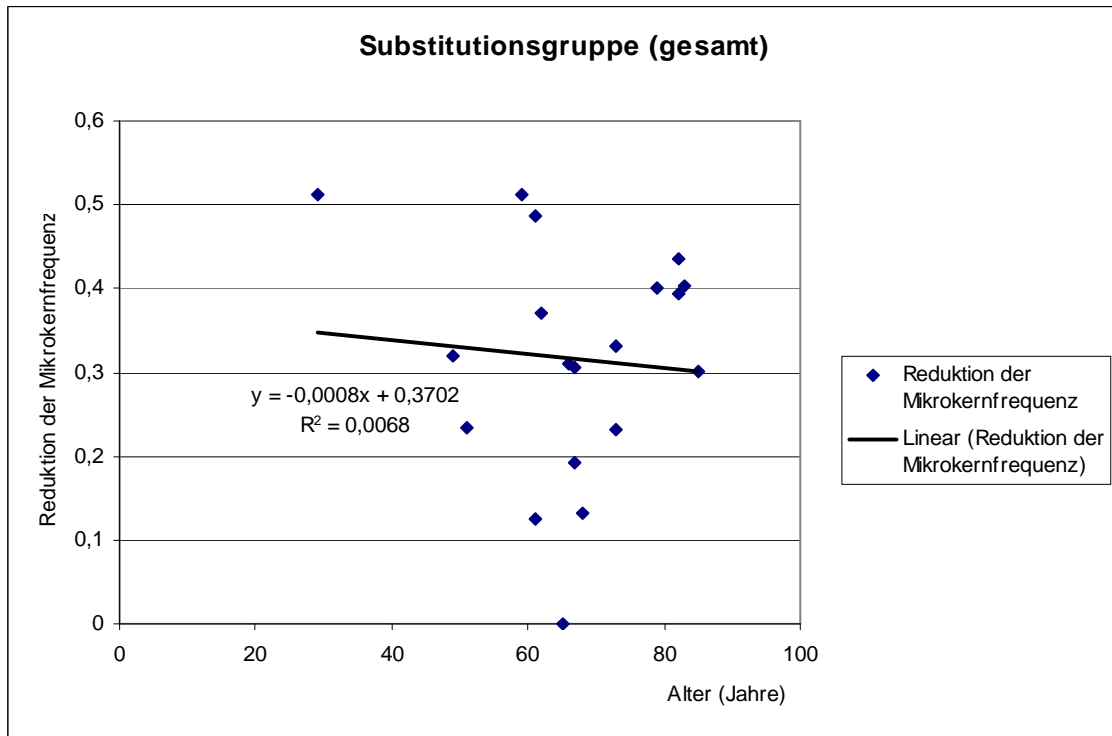


Abb.16: Reduktion der Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit vom Alter der Patienten in der gesamten Substitutionsgruppe

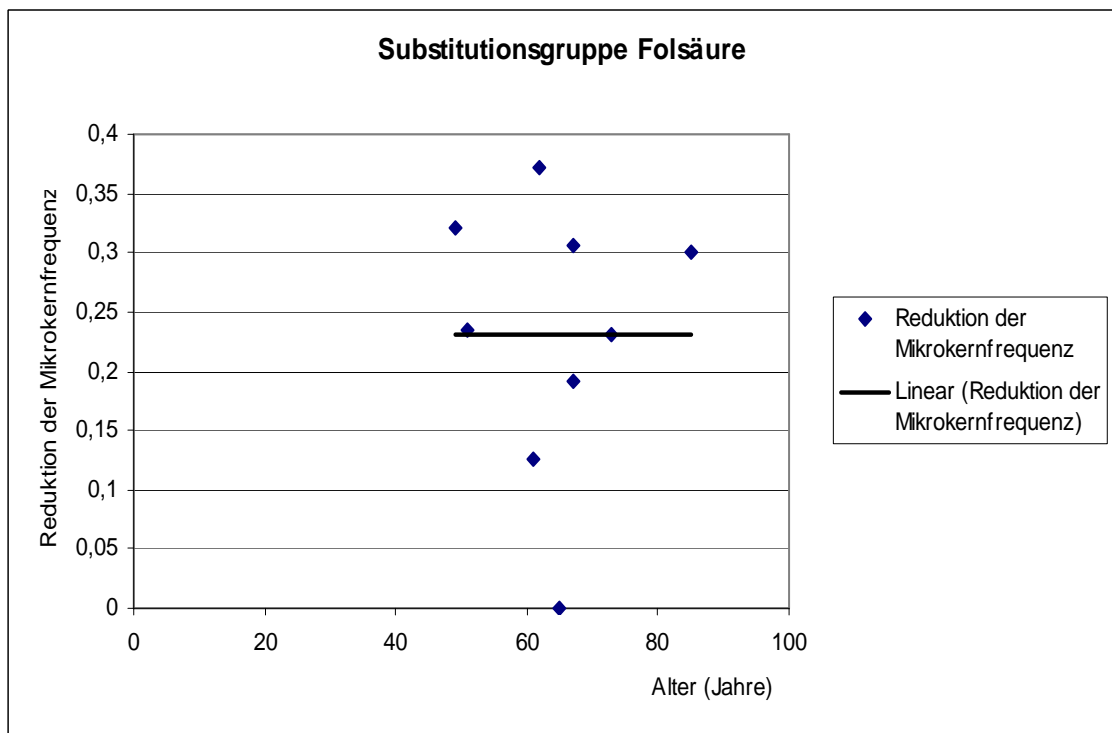


Abb.17: Reduktion der Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit vom Alter der Patienten in der Substitutionsgruppe Folsäure

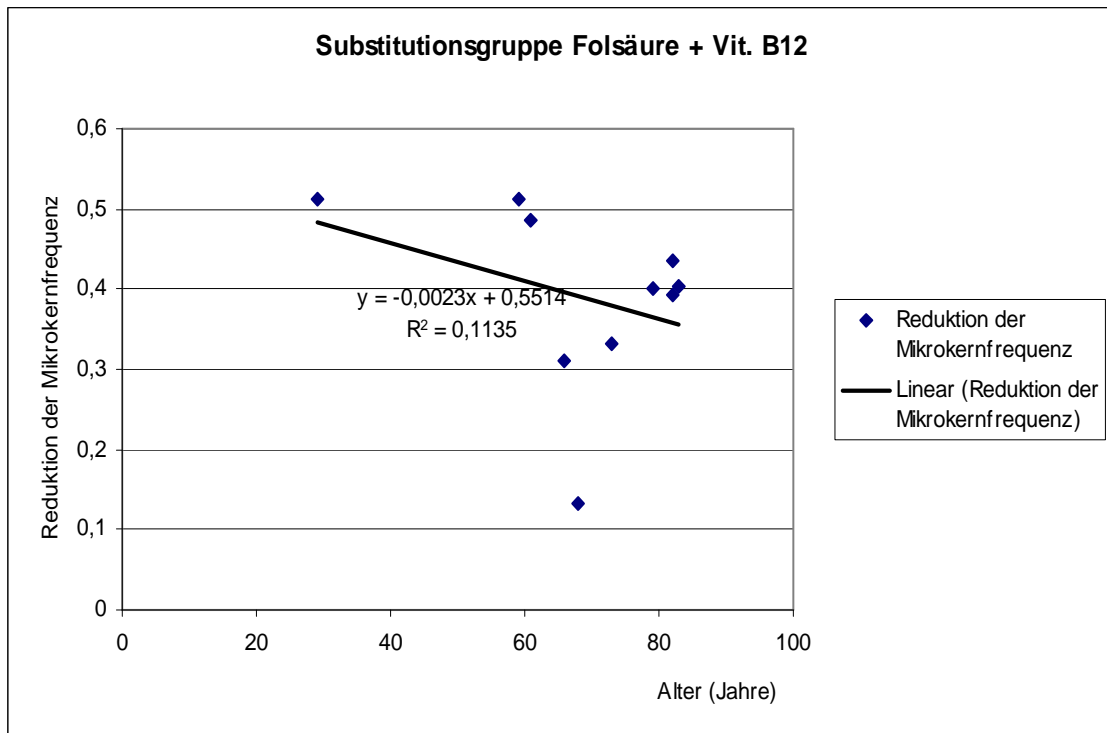


Abb. 18: Reduktion der Mikrokernelnfrequenz in Abhängigkeit vom Alter der Patienten in der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12

Analysiert man die Reduktion der Mikrokernelnfrequenz in Abhängigkeit vom MikrokernelnAusgangswert (Mittelwert der drei Messwerte vor Substitutionsbeginn), so war bei Betrachtung der gesamten Substitutionsgruppe bei höheren Mikrokerneln-frequenzen eine stärkere prozentuale Reduktion zu erkennen. In Abbildung 19 ist dieser Sachverhalt graphisch dargestellt. Allerdings unterschieden sich hierbei – wie in Abbildung 20 und 21 gezeigt – die beiden Substitutionsgruppen. In der Substitutionsgruppe Folsäure bestand eine positive Korrelation zwischen MikrokernelnAusgangswert und Reduktion der Mikrokernelnfrequenz. Dagegen war in der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Ausgangswerte und der Reduktion der Mikrokernelnrate zu verzeichnen.

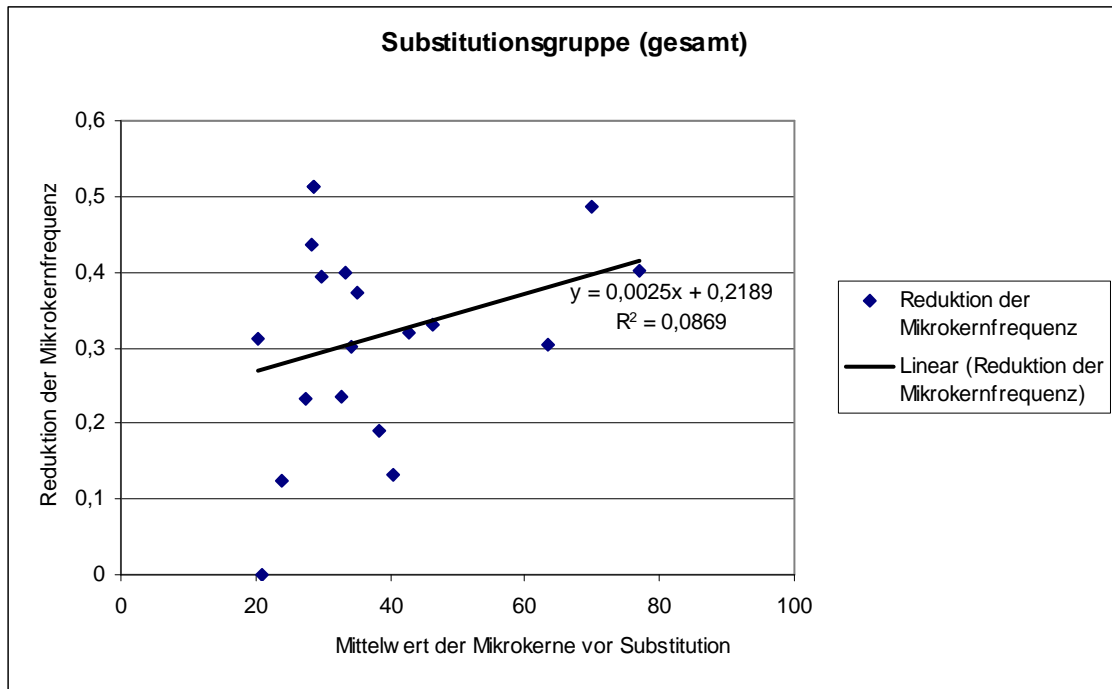


Abb. 19: Reduktion der Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit vom Mikrokernausgangswert in der gesamten Substitutionsgruppe

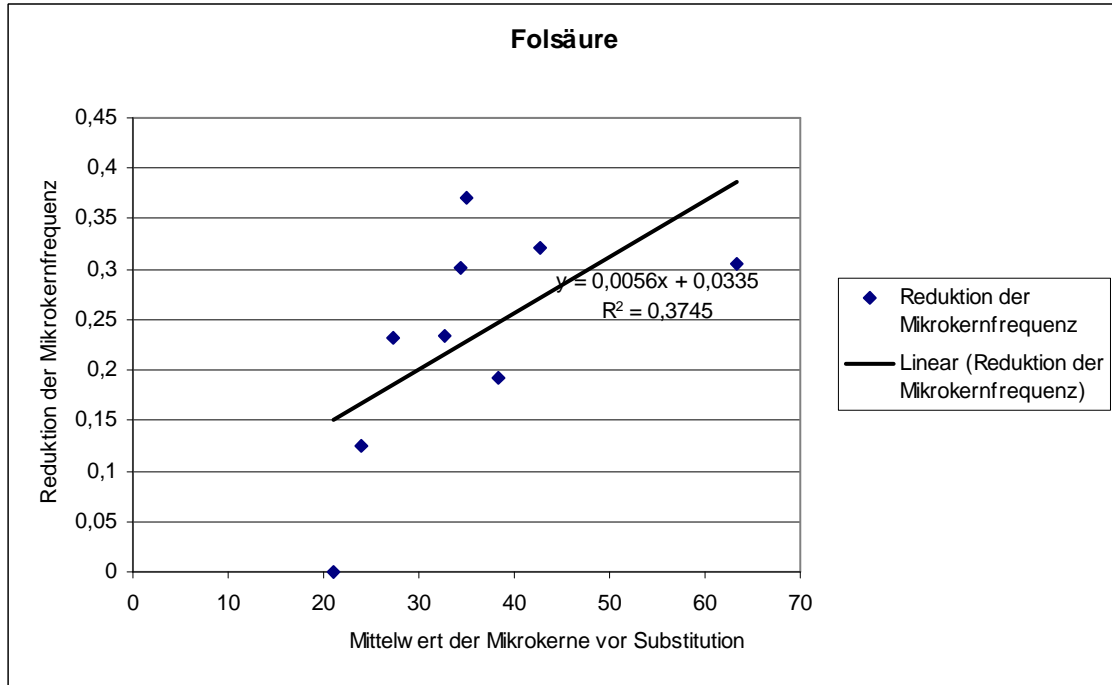


Abb. 20: Reduktion der Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit vom Mikrokernausgangswert in der Substitutionsgruppe Folsäure

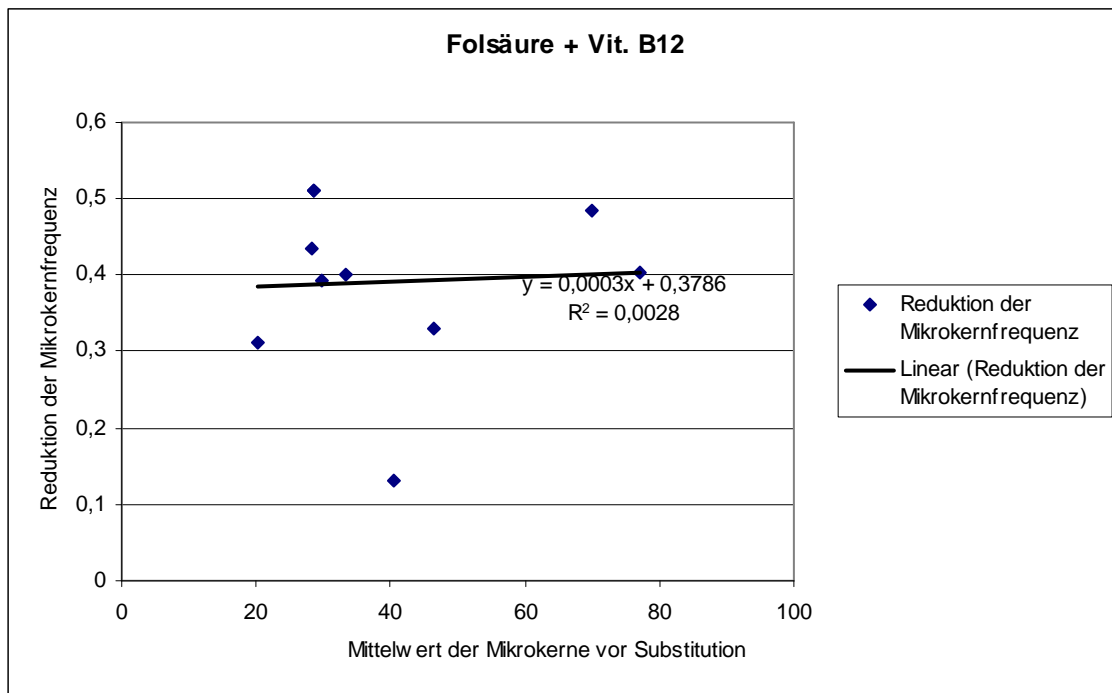


Abb. 21: Reduktion der Mikrokernelnfrequenz in Abhängigkeit vom Mikrokernelnwert in der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12

Bereits vor Beginn der Studie hatten 55,6 % der Patienten in der Substitutionsgruppe Folsäure und 40 % der Patienten in der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 einmal täglich oral Multivitaminpräparate eingenommen. Die Gabe dieser Präparate wurde als Teil der Standardmedikation auch während der Studie beibehalten. Die entsprechenden Tabletten enthielten neben anderen Vitaminen 1000 µg Folsäure und 6 µg Vitamin B12.

Bei der in Abbildung 22 dargestellten Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Reduktion der Mikrokernelnfrequenz und bisheriger Vitamineinnahme fiel auf, dass es im Durchschnitt bei den Patienten, die bereits oral Vitamine einnahmen, zu einer etwas stärkeren Abnahme der Mikrokernelnrate kam. In der Substitutionsgruppe Folsäure betrug die Mikrokernelnreduktion bei zusätzlicher Einnahme der Multivitaminpräparate 27 % und ohne bisherige Vitamineinnahme 19 %. In der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 war die Mikrokernelnreduktion bei schon bestehender Vitamineinnahme mit 43 % gegenüber 37 % ohne bisherige Vitamineinnahme ebenfalls leicht erhöht. Beide Unterschiede sind allerdings nicht signifikant.

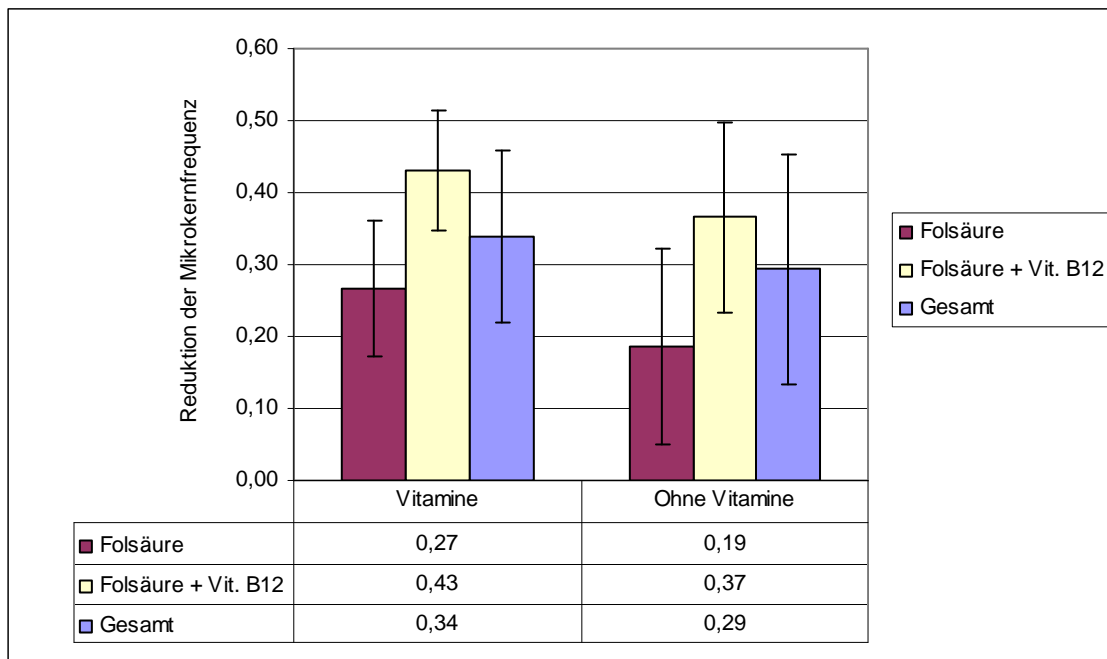


Abb. 22: Reduktion der Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit von der vorherigen Einnahme von Vitaminen (Mittelwert \pm Standardabweichung)

3.5 Weitere untersuchte Lymphozytenparameter

Bei der Auswertung der Lymphozytenpräparate wurde neben der Mikrokernrate auch die Anzahl von Lymphozyten mit einem, zwei oder mehr als zwei Zellkernen bestimmt, ferner die Häufigkeit von Mitosen und Apoptosen. Bei den Mikrokernen wurde unterschieden, ob ein einzelner oder multiple Mikrokerne in einem doppelkernigen Lymphozyten vorlagen. Für die Bestimmung der Mikrokernrate war es bedeutungslos, wie viele Mikrokerne der Lymphozyt enthielt, da bei der Mikrokernfrequenz nur das Vorhandensein von Mikrokernen, nicht aber deren Anzahl berücksichtigt wurde. Unter der Kategorie Sonstiges wurden die Lymphozyten subsummiert, die entweder destruiert waren oder nicht sicher einer der anderen Kategorien zugeordnet werden konnten.

Durchschnittlich 16,4 % der mikrokernhaltigen Zellen enthielten mehr als einen Mikrokern. Für die einzelnen Präparate lag das Verhältnis von doppelkernigen Lymphozyten mit mehreren Mikrokernen zu doppelkernigen Lymphozyten mit einem Mikrokern zwischen 0 und 0,45.

Das Verhältnis von doppelkernigen zu einkernigen Lymphozyten – im Folgenden als Proliferationsrate bezeichnet – betrug minimal 0,34 und maximal 2,69. Die Proliferationsrate aller dialysepflichtigen Studienteilnehmer lag über die sechs Messpunkte gemittelt bei $1,16 \pm 0,41$. Hierbei waren die Unterschiede zwischen den drei Studiengruppen gering (Folsäure: $1,17 \pm 0,45$; Folsäure + Vitamin B12: $1,10 \pm 0,37$; Kontrolle: $1,22 \pm 0,41$). Betrachtet man die Proliferationsraten zu den einzelnen Messzeitpunkten, so gab es nur zum Messzeitpunkt 1 zwischen der Substitutionsgruppe Folsäure und der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 einen signifikanten Unterschied in der Proliferationsrate. Beim Vergleich der Mittelwerte der Messpunkte 1 bis 3 vor Substitutionsbeginn und der Messpunkte 4 bis 6 nach Substitutionsbeginn konnte in den Studiengruppen Folsäure und Kontrolle eine Zunahme der Proliferationsrate verzeichnet werden (Folsäure: $1,01 \pm 0,31$ versus $1,34 \pm 0,50$; Kontrolle: $1,09 \pm 0,33$ versus $1,36 \pm 0,44$), wobei hierbei lediglich die Zunahme der Proliferationsrate in der Substitutionsgruppe Folsäure Signifikanzniveau erreichte. In der Folsäure + Vitamin B12-Substitutionsgruppe kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Proliferationsrate unter Vitaminsupplementierung (Folsäure + Vitamin B12: $1,10 \pm 0,29$ versus $1,11 \pm 0,44$). In Abbildung 23 ist die jeweilige mittlere Proliferationsrate der Studiengruppen zu den sechs Messpunkten dargestellt.

Zwischen der Höhe der Proliferationsrate und der Dauer der Dialysebehandlung war kein Zusammenhang festzustellen. Dagegen nahm die Proliferationsrate – wie aus Abbildung 24 ersichtlich – bei zunehmendem Lebensalter ab.

Die durchschnittliche Anzahl an Lymphozyten mit mehr als zwei Zellkernen lag bei $34,7 \pm 21,4$ pro tausend ausgewerteter Zellen (Folsäure: $38,4 \pm 18,1$; Folsäure + Vitamin B12: $29,4 \pm 22,1$; Kontrolle: $37,0 \pm 23,0$). Die höchste Anzahl mehrkerniger Zellen betrug 108, die niedrigste 1.

Pro tausend ausgewerteter Zellen wurden zwischen 0 und 10 Apoptosen gezählt, der Mittelwert aller sechs Messpunkte lag bei $1,3 \pm 1,4$ (Folsäure: $1,3 \pm 1,3$; Folsäure + Vitamin B12: $1,3 \pm 1,3$; Kontrolle: $1,3 \pm 1,7$).

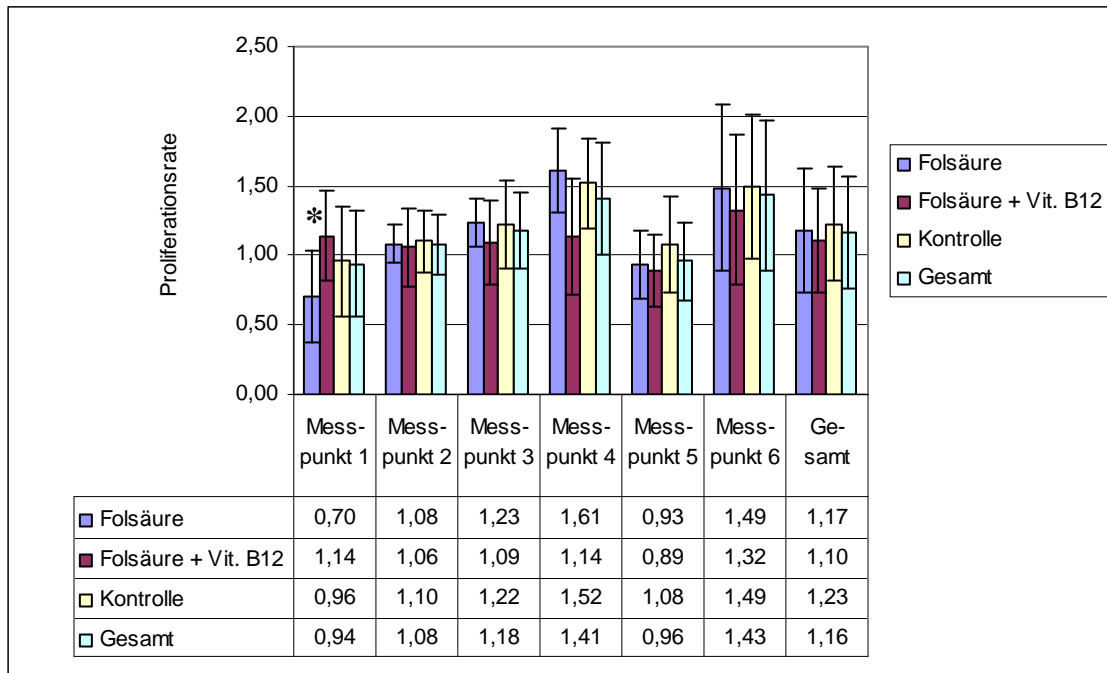


Abb. 23: Verhältnis von doppelkernigen zu einkernigen Lymphozyten, gemessen zu sechs Messpunkten, unterteilt in die beiden Substitutionsgruppen und die Kontrollgruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung)

* $p < 0,05$ vs. Proliferationsrate der Folsäure-Gruppe zum Messpunkt 1

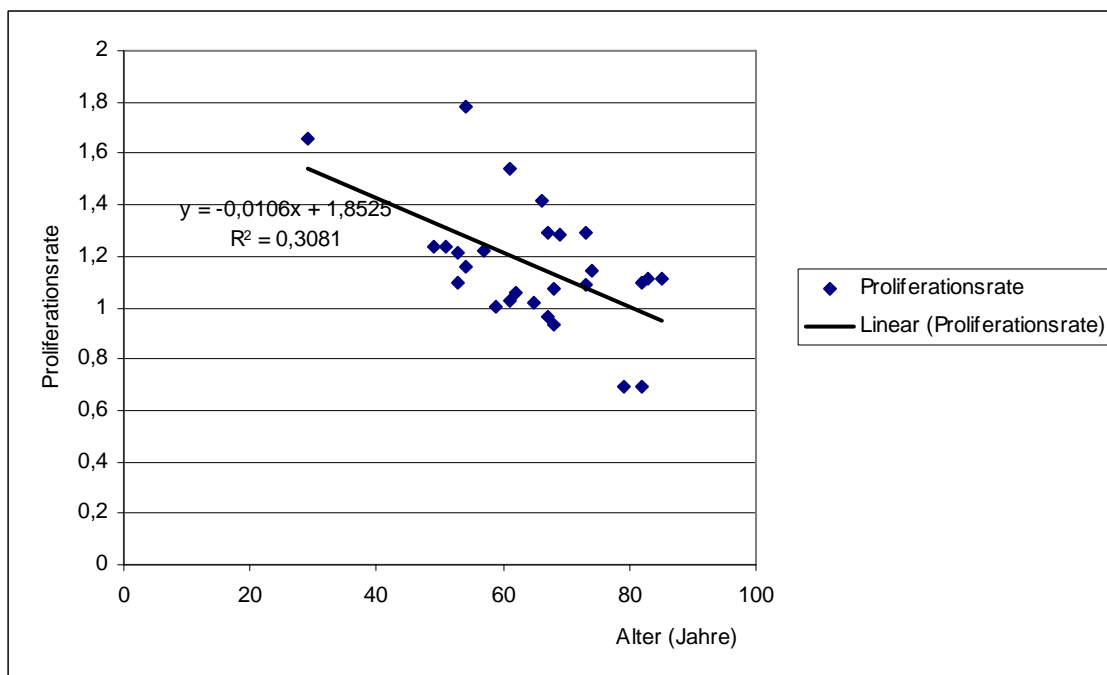


Abb. 24: Proliferationsrate (Verhältnis von doppelkernigen zu einkernigen Lymphozyten) in Abhängigkeit vom Lebensalter

Die Anzahl von Mitosen pro tausend ausgewerteter Lymphozyten schwankte zwischen 1 und 25, wobei der Gesamt-Mittelwert $8,4 \pm 4,5$ betrug (Folsäure: $8,8 \pm 5,3$; Folsäure + Vitamin B12: $8,3 \pm 4,3$; Kontrolle: $8,3 \pm 4,0$).

In die Rubrik Sonstiges wurden zwischen 5 und 96 Zellen eingeordnet, der Durchschnitt lag bei $27,3 \pm 16,8$ (Folsäure: $26,5 \pm 16,1$; Folsäure + Vitamin B 12: $28,8 \pm 16,8$; Kontrolle: $26,5 \pm 17,7$).

Auch in der Kontrollgruppe der nicht dialysepflichtigen Probanden wurden die Präparate hinsichtlich Anzahl der Zellkerne, Apoptosen und Mitosen sowie der Rubrik Sonstiges untersucht. Im Folgenden wird zum Vergleich immer der entsprechende Wert der Dialysepatienten in Klammern angegeben. Die Proliferationsrate hatte einen Mittelwert von $1,11 \pm 0,28$ ($1,16 \pm 0,41$), das Minimum war hierbei 0,69, das Maximum 1,73. Die weiteren Mittelwerte lagen für die mehrkernigen Zellen bei $30,7 \pm 12,8$ ($34,7 \pm 21,4$), für die Apoptosen bei $1,2 \pm 1,3$ ($1,3 \pm 1,4$), für die Mitosen bei $8,4 \pm 3,9$ ($8,4 \pm 4,5$) und in der Rubrik Sonstiges bei $24,0 \pm 11,1$ ($27,3 \pm 16,8$).

Alle ermittelten Daten sind im Anhang aufgeführt.

3.6 Homocystein-Werte

Die Homocysteinplasmaspiegel wurden von Frau Dr. Alessandra Perna vor und nach Substitutionsbeginn aus tiefgefrorenen Plasmaproben bestimmt.

Vor Substitutionsbeginn betrug der mittlere Homocystein-Plasmaspiegel $24,1 \pm 9,2$ $\mu\text{mol/l}$, es existierten bezüglich der Höhe des Plasmaspiegels keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen von Dialysepatienten (Folsäure: $24,5 \pm 11,8$ $\mu\text{mol/l}$; Folsäure + Vitamin B12: $24,0 \pm 6,0$ $\mu\text{mol/l}$; Kontrolle: $24,0 \pm 10,1$ $\mu\text{mol/l}$). Unter Vitaminsubstitution kam es, wie aus Abbildung 25 ersichtlich, in der Folsäure-Substitutionsgruppe zu einer Homocystein-Reduktion um 32,7 %, in der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 um 47,1 %. Allerdings war auch in der Dialyse-Kontrollgruppe eine Abnahme des Homocysteinspiegels um 23,3 % zu verzeichnen. Während die Veränderungen in der Substitutionsgruppe Folsäure und der Kontrollgruppe nicht signifikant waren, war die Homocystein-Reduktion in der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 hoch signifikant. Die einmalig bestimmten

Homocystein-Werte der Nicht-Dialyse-Kontrollgruppe waren mit $13,6 \pm 4,5$ deutlich niedriger als die Homocysteinspiegel der Dialysepatienten vor Substitution.

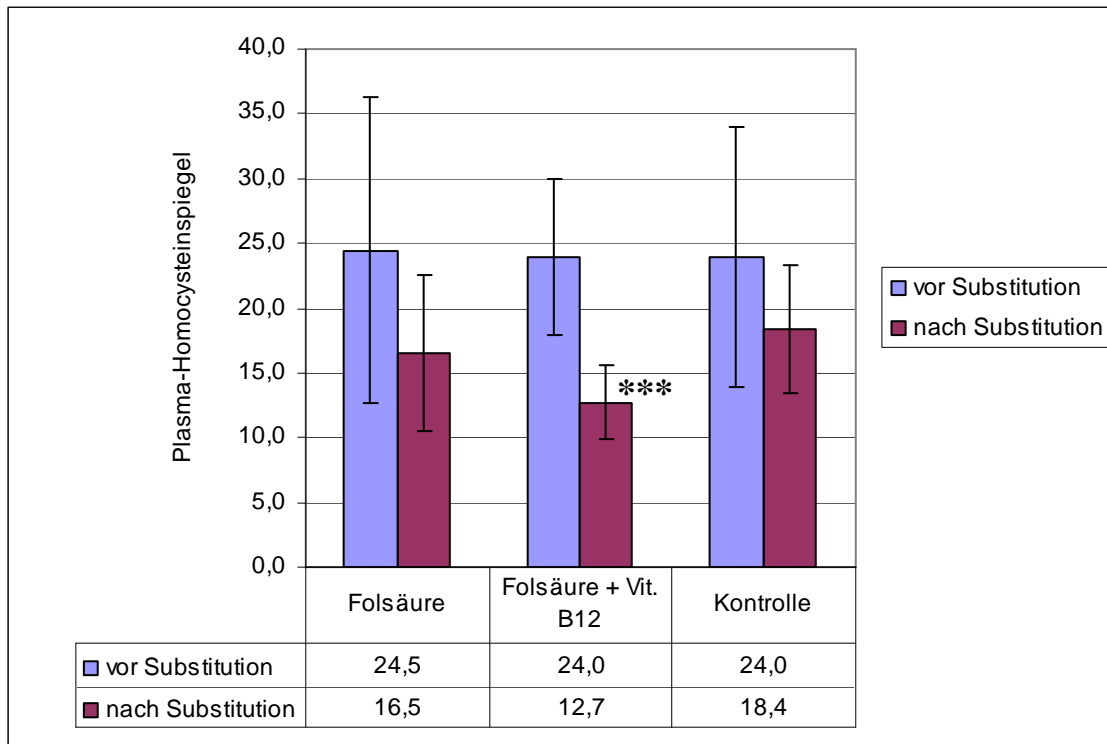


Abb. 25: Plasma-Homocysteinspiegel vor und nach Vitaminsubstitution, unterteilt in die Substitutionsgruppe Folsäure die Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 und die Kontrollgruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung)

*** $p < 0.001$ vs. Homocysteinspiegel der Substitutionsgruppe Folsäure + Vit. B12 vor Substitution

3.7 Blutdruck und CRP-Werte

Die Blutdruckwerte wurden vom Pflegepersonal des Kuratoriums für Heimdialyse Würzburg vor Dialysebeginn nach der Methode von Riva-Rocci bestimmt. Den Vergleich zwischen einem Messzeitpunkt vor Substitutionsbeginn und einem Messzeitpunkt zu Studienende zeigt Abbildung 26. Vor Substitutionsbeginn betrug der durchschnittliche Blutdruckwert $135 \pm 26 / 70 \pm 15$ mmHg, zwischen den einzelnen Gruppen gab es weder bei systolischen noch bei diastolischen Blutdruckwerten signifikante Unterschiede (Folsäure: $132 \pm 27 / 67 \pm 15$ mmHg; Folsäure + Vitamin

B12: $144 \pm 15 / 74 \pm 11$ mmHg; Kontrolle: $129 \pm 35 / 68 \pm 21$ mmHg). Auch zu Studienende unterschieden sich die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte nicht signifikant von einander (Folsäure: $118 \pm 22 / 70 \pm 13$ mmHg; Folsäure + Vitamin B12: $143 \pm 15 / 74 \pm 11$ mmHg; Kontrolle: $118 \pm 29 / 64 \pm 18$ mmHg). Insgesamt war eine leichte Abnahme der systolischen und diastolischen Blutdruckwerte zu beobachten, wobei es beim Vergleich der Blutdruckwerte vor und nach Substitution in keiner der Studiengruppen zu einer signifikanten Veränderung der systolischen oder diastolischen Blutdruckwerte kam.

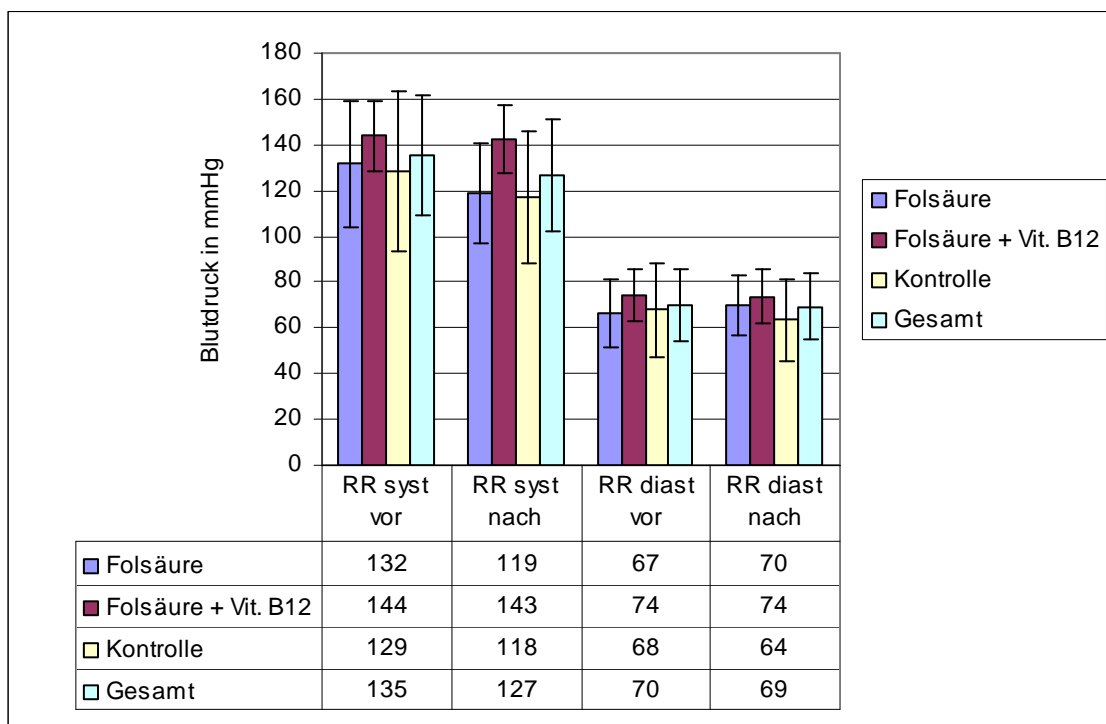


Abb. 26: Systolische und diastolische Blutdruckwerte vor und nach Substitution, unterteilt in die Gruppen Folsäure, Folsäure + Vitamin B12, Kontrolle und Gesamt (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Die CRP-Werte ließ das Kuratorium für Hemodialyse Würzburg in regelmäßigen Abständen im Rahmen des Routinelabors bestimmen. Zu Beginn der Studie lag der CRP-Wert im Durchschnitt bei $9,6 \pm 9,8$ mg/l, wobei es zwischen den einzelnen Studiengruppen keinen signifikanten Unterschied in der Höhe des CRP-Spiegels gab (Folsäure: $8,2 \pm 11,0$ mg/l; Folsäure + Vitamin B12: $7,4 \pm 6,1$ mg/l; Kontrolle: $14,0 \pm$

11,8 mg/l). Nach Substitution betrug der CRP-Wert – wie in Abbildung 27 dargestellt – durchschnittlich $14,5 \pm 22,1$ mg/l, auch hierbei unterschieden sich die Studiengruppen nicht signifikant (Folsäure: $23,4 \pm 35,5$ mg/l; Folsäure + Vitamin B12: $8,6 \pm 7,4$ mg/l; Kontrolle: $12,3 \pm 14,7$ mg/l). Die Veränderungen des CRP-Werts zwischen dem Messzeitpunkt vor und dem Messzeitpunkt nach Substitutionsbeginn waren bei keiner der drei Studiengruppen signifikant.

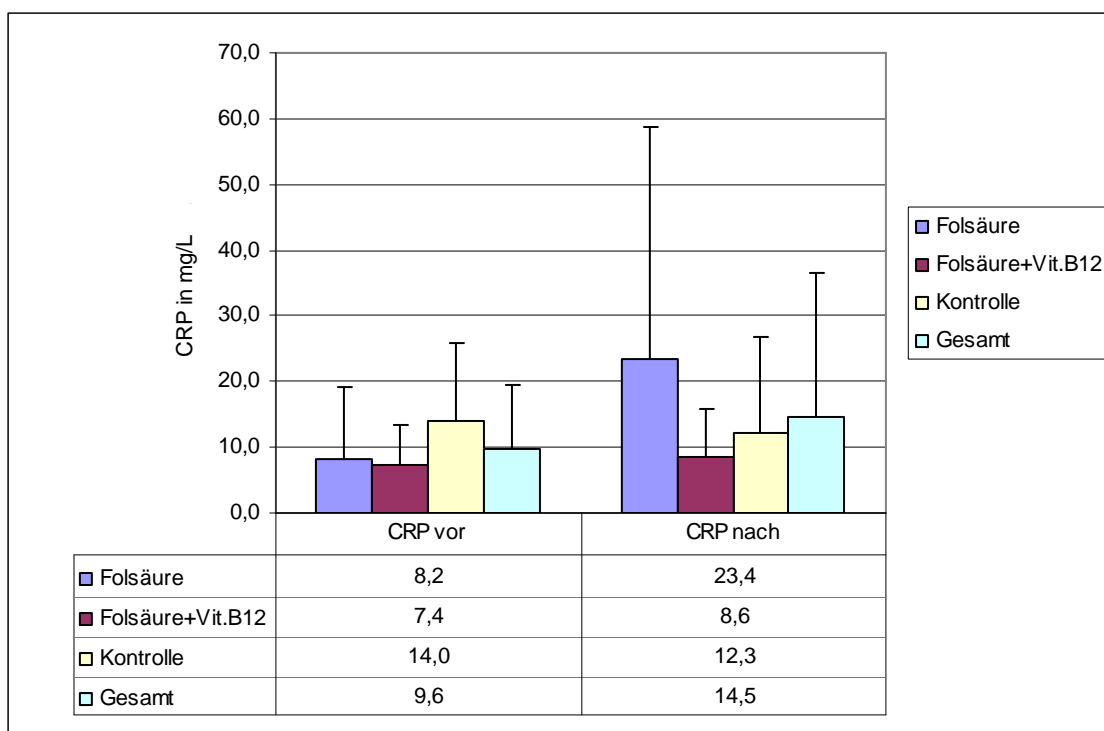


Abb. 27: CRP-Werte vor und nach Substitution, unterteilt in die Gruppen Folsäure, Folsäure + Vitamin B12, Kontrolle und Gesamt (Mittelwert + Standardabweichung)

4. Diskussion

Folsäuremangel gilt als Risikofaktor für die Krebsentstehung. Die Gabe von Folsäure verringert sogar das Auftreten von Karzinomen bei schon bestehenden Vorläuferstadien (Zhu 2003). Da bei Dialysepatienten eine erhöhte Karzinominzidenz vorliegt und sie häufiger als die Normalbevölkerung von Vitaminmangelzuständen betroffen sind, wurde in dieser Studie untersucht, inwieweit die Gabe von Folsäure und Vitamin B12 eine genomprotektive Wirkung in Dialysepatienten ermöglicht. Hierfür wurde der Genomschaden mit Hilfe des Mikrokerntests quantifiziert und der Spiegel von Homocystein, welches *in vitro* dosisabhängig genotoxisch ist (Fink 2007), bestimmt. Nach einer 2006 von Bonassi veröffentlichten Untersuchung mit über 6700 Studienteilnehmern in zehn Ländern korreliert die Höhe der Mikrokernfrequenz mit dem späteren Risiko einer Krebserkrankung (Bonassi 2006).

Die zunächst bestimmte Mikrokernfrequenz der Dialysepatienten vor Substitutionsbeginn lag bei 37,1 Mikrokernen pro 1000 doppelkerniger Lymphozyten. Frauen hatten hierbei deutlich höhere Werte als Männer. Mit zunehmendem Alter kam es zu einem Anstieg, mit der Dauer der Dialysebehandlung zu einer Abnahme der Mikrokernfrequenz. Eine bisherige orale Vitamingabe äußerte sich nicht in niedrigeren Mikrokernfrequenzen.

Diese Mikrokernfrequenz erscheint zunächst sehr hoch, gibt doch das Human MicroNucleus Project als Normalfrequenz für die allgemeine Bevölkerung 6,5 Mikrokernkerne pro 1000 doppelkerniger Lymphozyten an (Bonassi 2001). Unter Berücksichtigung altersangepasster Werte ist die Mikrokernfrequenz der Dialysepatienten gegenüber dem Referenzwert um das dreifache erhöht. Allerdings beschreiben andere Untersuchungen ähnlich hohe Werte für Dialysepatienten (Stopper 2001b; Stopper 2004).

Auch die verglichen mit den männlichen Studienteilnehmern signifikant erhöhten Mikrokernfrequenzen bei Frauen decken sich mit anderen Mikrokernfrequenzuntersuchungen, welche bei nicht-dialysepflichtigen Frauen um 32 % ("Nordic data base on somatic chromosome damage in humans." 1990), 40 % (Fenech 1994) und 29 % (Bonassi 1995) erhöhte Werte fanden. Der in dieser Studie festgestellte

Unterschied von über 50 % erscheint jedoch sehr hoch, insbesondere da das Human MicroNucleus Project in einer Metaanalyse von Daten aus 25 Laboratorien in zehn Ländern bei Frauen eine um 19 % erhöhte Mikrokernfrequenz fand (Bonassi 2001). Ein potentieller Schwachpunkt der Studie ist hierbei das mit 13 : 21 ungleiche Verhältnis zwischen Frauen und Männern. Ein höherer Frauenanteil hätte hier möglicherweise eine größere Aussagekraft ermöglicht.

Ähnlich wie die Abhängigkeit der Mikrokernfrequenz vom Geschlecht ist eine – in dieser Studie ebenfalls beobachtete – Zunahme mit dem Alter in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben worden (Bolognesi 1999; Bonassi 2001). Das Erreichen eines Plateaus für die höchste Altersgruppe, wie von Bolognesi postuliert (Bolognesi 1997), konnte in dieser Studie nicht gefunden werden die Gruppe der über Achtzigjährigen hatte im Gegenteil die höchsten Mikrokernfrequenzen. Dies deckt sich mit einer Untersuchung von Proietti de Santis, der einen kontinuierlichen Mikrokernanstieg in der Altersklasse größer 80 Jahren und sogar besonders hohe Mikrokernwerte für über hundertjährige Personen feststellte (vgl. Bonassi 2001). Insgesamt fällt der Zusammenhang zwischen Mikrokernfrequenz und Alter in dieser Studie schwächer und inhomogener aus, als auf Grund der allgemeinen Studienlage zu erwarten gewesen wäre. Eine Ursache hierfür könnte die ungleiche Altersverteilung der Patienten sein: 63,0 % sind zwischen 50 und 69 Jahren alt, nur 7,4 % sind jünger als 50 und 29,6 % älter als 70 Jahre. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass bei den Patienten die Mikrokernfrequenz nicht nur durch ihr Alter, sondern auch durch ihre Erkrankungen und ihre Dialysepflicht beeinflusst wird.

Die Dauer der Dialysepflicht korreliert in dieser Studie negativ mit der Mikrokernfrequenz. Dieses Ergebnis widerspricht einer von Stopper festgestellten Zunahme der Mikrokernfrequenz mit der Dauer der Dialysebehandlung (Stopper 2001b). Allerdings spiegelt es interessanterweise die Karzinominzidenz von Dialysepatienten wieder: Eine besonders hohe Inzidenz zu Beginn und eine Abnahme der Inzidenz mit der Dauer der Dialysebehandlung, auch wenn die Krebsinzidenz – ebenso wie die Mikrokernfrequenz – verglichen mit der Normalbevölkerung erhöht bleibt.

Dass diejenigen Patienten, die bereits im Rahmen ihrer Standardmedikation eine orale Vitaminsubstitution erhielten, sogar etwas höhere Mikrokernfrequenzen aufwiesen, mag

verwundern. Allerdings ist es kaum möglich, hieraus Schlussfolgerungen abzuleiten, da die Mikrokernfrequenzen vor dieser oralen Vitamineinnahme nicht bekannt sind.

Sowohl unter der Substitution von Folsäure als auch unter der Substitution von Folsäure und Vitamin B12 kam es zur Reduktion der Mikrokernfrequenz. Diese war bei zusätzlicher Vitamin B12-Gabe signifikant höher als bei alleiniger Folsäuresupplementierung.

Eine erste Mikrokernreduktion zeigte sich nach 4 Wochen Substitution, der ausgeprägteste Rückgang hatte nach 12 Wochen stattgefunden. Da es zwischen dem Messpunkt nach 12 Wochen und dem nach 17 Wochen zu keiner relevanten Veränderungen der Mikrokernfrequenzen mehr kam, erwies sich der Beobachtungszeitraum als ausreichend lange.

Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Folsäureversorgung und Genomschaden ergaben Experimente in den siebziger Jahren, die bei der Kultivierung menschlicher Lymphozyten bei einer geringen Folsäurekonzentration vermehrt chromosomale Strangbrüche feststellten (Sutherland 1979). Bei Personen mit niedrigem Folsäurespiegel sind mittlerweile erhöhte Mikrokernfrequenzen und vermehrte chromosomale Strangbrüche unter anderem für humane Lymphozyten, Erythrozyten und Knochenmarkzellen bekannt (MacGregor 1990). Ebenfalls zu einer erhöhten Mikrokernfrequenz führt die unter Folsäuremangel vermehrte zelluläre Empfindlichkeit für genom-schädigende ionisierende Strahlung (Beetstra 2005). Doch nicht nur der Folsäurestatus, auch Vitamin B12 ist im Zusammenhang mit erhöhten Mikrokernfrequenzen von Bedeutung. Eine große australische Bevölkerungsstudie zeigte, dass der Plasmaspiegel von Folsäure und Vitamin B12 für die Minimierung des Genomschadens in doppelkernigen Lymphozyten entscheidender ist als der Vitamin C- und Vitamin E-Spiegel (Fenech 1994; Fenech 1995). Auf die wichtige Rolle von Vitamin B12 deuten Fenechs Beobachtungen einer statistisch signifikanten negativen Korrelation zwischen Mikrokernfrequenz und Vitamin B12-Plasmaspiegel bei fünfzig- bis siebzijährigen Männern hin (Fenech 1997). Die signifikante Assoziation zwischen niedrigen Folsäure- und Vitamin B12-Plasmaspiegeln auf der einen Seite und erhöhten Mikrokernfrequenzen auf der anderen Seite ist durch mehrere Studien belegt (Everson 1988; Fenech 1995; MacGregor 1997). Inwieweit die erhöhten Mikrokernfrequenzen

nun durch Gabe von Folsäure oder Vitamin B12 zu beeinflussen sind, wurde in verschiedenen Untersuchungen exploriert. Titenko-Holland konnte unter kontrollierten Bedingungen zeigen, dass eine verminderte Folsäureaufnahme zu einem Anstieg der Mikrokernfrequenz führt und dass diese erhöhte Mikrokernfrequenz durch eine anschließende vermehrte Folsäurezufuhr wieder absinkt (Titenko-Holland 1998). Interessanterweise war in dieser Studie für die Höhe der Mikrokernfrequenz nicht nur der Folsäure-, sondern auch der nicht supplementierte Vitamin B12-Plasmaspiegel entscheidend. Fenech beobachtete bei einer Folsäuresupplementierung über sechs Monate in der Gruppe mit der höchsten Folsäureeinnahme einen Rückgang der Mikrokernfrequenz um 33 % (Fenech 2005). Nicht nur Mikrokernfrequenzen können durch Folsäure gesenkt werden, sondern auch Genexpressionsmuster können nach einer Untersuchung von Ingrosso durch Folsäure korrigiert werden (Ingrosso 2003). Wie wichtig Vitamin B12 für die Stabilität des menschlichen Genoms ist, zeigt eine Studie, in der die Zellkulturen, welche zusätzlich zur Gabe des genotoxischen Ribavirins noch mit Vitamin B12 behandelt wurden, signifikant geringere Mikrokernfrequenzen aufwiesen als die Lymphozyten, welche nur mit Ribavirin behandelt worden waren (Joksic 2006). Diese Arbeiten stimmen alle mit der Beobachtung der hier vorliegenden Studie überein, dass die Gabe von Folsäure und Vitamin B12 zu einer Reduktion der Mikrokernfrequenz führt. Allerdings existieren bisher keine weiteren Untersuchungen über die Veränderung der Mikrokernrate bei Dialysepatienten unter Substitution von Folsäure oder Folsäure und Vitamin B12. Auch ist diese Studie der erste Vergleich von alleiniger Folsäuregabe oder der Kombination mit Vitamin B12 bezüglich der Reduktion der Mikrokernfrequenz.

Die Mikrokernfrequenzen wurden nicht nur bei den Substitutionsgruppen, sondern auch bei dialysepflichtigen und nicht-dialysepflichtigen Kontrollprobanden sowie bei Präparaten, die zu einem Zeitpunkt aus den Lymphozyten einer Kontrollperson angefertigt worden waren, bestimmt. In keiner der drei Kontrollen kam es zu einer signifikanten Veränderung der Mikrokernfrequenz.

In der Kontrollgruppe der Dialysepatienten kam es zwischen den Messpunkten 1 bis 3 und 4 bis 6 zu einem nicht signifikanten Rückgang der Mikrokernfrequenz um 4,7 %. Diese Reduktion ist verglichen mit den Substitutionsgruppen (28,7 % beziehungsweise

41,2 %) gering. Des Weiteren verlief die Abnahme der Mikrokernfrequenz zwischen den Substitutionsgruppen und der Kontrollgruppe nicht parallel. Während es in den Substitutionsgruppen zwischen den Messpunkten 4 und 5 zur stärksten Abnahme der Mikrokernfrequenz kam, nahm in der Kontrollgruppe die Mikrokernfrequenz zu diesem Zeitpunkt sogar zu. Ein verändertes Zählverhalten erscheint daher als mögliche Ursache eher unwahrscheinlich. Ein denkbarer Grund für den Rückgang der Mikrokernfrequenz könnte ein verändertes Ernährungsverhalten der Kontrollpersonen mit einer vitaminreicheren Kost sein. Ein derartiger Effekt wäre möglicherweise durch eine Placebogabe zu vermeiden gewesen.

Durch das Auswerten vieler Präparate, die alle von den Lymphozyten einer einzelnen Kontrollperson zu einem einzelnen Zeitpunkt stammen, konnten Einblicke in die Schwankungsbreite der zufallsbedingten Verteilung mikrokernhaltiger Lymphozyten auf die einzelnen Präparate gewonnen werden. Dies wiederum ermöglicht Rückschlüsse darauf, wie viele Präparate ausgewertet werden müssen, um die wahre Mikrokernfrequenz zu ermitteln. Vergleicht man den Mittelwert zweier zu einem beliebigen Zeitpunkt hintereinander ausgewerteter Präparate, so lag von den so gebildeten 23 Präparate-Paaren nur ein Paar außerhalb des Bereichs von Mittelwert \pm Standardabweichung. Es kann deswegen davon ausgegangen werden, dass die wahre Mikrokernfrequenz in dieser Studie durch das Auswerten von zwei Präparaten mit ausreichender Genauigkeit ermittelt werden konnte. Dieser Tatsache wurde Rechnung getragen, indem pro Durchgang und Patient zwei Präparate ausgewertet wurden und vor und nach Substitutionsbeginn die Mikrokernfrequenzen zu jeweils drei Zeitpunkten bestimmt wurden. Außerdem kann durch diese Methode ein eventuell verändertes Zählverhalten detektiert werden. In dieser Studie kam es zu keinerlei signifikanten Unterschieden zwischen den Mittelwerten der sechs Messpunkte. Die Mittelwerte der Messpunkte 4 sowie 5 entsprechen dem Mittelwert der Messpunkte 1 bis 3. Lediglich zum Messpunkt 6 kam es zu einer geringen Reduktion der Mikrokernfrequenz. Es kann deshalb ausgeschlossen werden, dass der in den Substitutionsgruppen beobachtete Rückgang der Mikrokernfrequenz auf ein verändertes Zählverhalten zurückzuführen ist. Die Gruppe der nicht-dialysepflichtigen Kontrollprobanden überraschte durch hohe Mikrokernwerte. Mögliche Ursachen hierfür könnten das hohe Alter und die zahlreichen Grunderkrankungen sein. Zwischen den zwei Messpunkten kam es zu

einem minimalen, nicht signifikanten Rückgang der Mikrokernfrequenz. Dieser ist allerdings durch die intraindividuelle Schwankungsbreite erklärbar.

Insgesamt dienten die zahlreichen Kontrollen dazu, auszuschließen, dass die Reduktion der Mikrokernfrequenz in den Substitutionsgruppen entweder auf ein verändertes Zählverhalten oder auf andere exogene Faktoren, wie beispielsweise eine gesündere Ernährung oder eine bessere medizinische Betreuung, zurückzuführen ist. Der geringfügige, nicht signifikante Rückgang der Mikrokernfrequenz in den Kontrollen erklärt nicht die deutliche Reduktion in den Substitutionsgruppen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass diese durch die Gabe der Vitamine verursacht worden ist.

Die Reduktion der Mikrokernfrequenzen in den Substitutionsgruppen wurde bezüglich Diabeteserkrankung, Dialysedauer, Alter der Patienten, Ausgangsmikrokernfrequenzen und bisheriger Vitaminsupplementierung auf eine Abhängigkeit untersucht. Hierbei fielen bisweilen gegenläufige Tendenzen in den beide Substitutionsgruppen auf.

Die an Diabetes erkrankten Dialysepatienten profitierten in beiden Substitutionsgruppen deutlich von der Vitamingabe, vor allem in der Folsäuresubstitutionsgruppe kam es im Vergleich mit den Nicht-Diabetikern zu einer stärkeren Mikrokernreduktion. Auffällig war, dass die Diabetiker vor Substitutionsbeginn bedeutend höhere Mikrokernfrequenzen aufwiesen als die nicht an Diabetes erkrankten Dialysepatienten. Bei den einerseits hohen Mikrokernwerten und dem andererseits guten Ansprechen auf die Supplementation von Folsäure und Vitamin B12 stellt sich die Frage, inwieweit Diabetiker, die einer chronischen Entzündungssituation unterliegen (Zozulinska 2006) und vor allem dialysepflichtige Diabetiker, die gewissermaßen einer doppelten Entzündungsreaktion ausgesetzt sind (Nasri 2005), im Besonderen einer Vitaminsubstitution bedürfen, eventuell sogar in höheren Dosierungen als in dieser Studie verwendet. Um diese Fragen zu klären, wäre eine Untersuchung, die einen höheren Anteil an Diabetes erkrankter Dialysepatienten einschließt, wünschenswert.

Mit Zunahme der Dialysedauer kam es unter Vitamingabe zu einer verminderten Reduktion der Mikrokernfrequenz. Dies ist insofern nicht verwunderlich, als es mit zunehmender Dauer der Dialysetherapie zu einer Abnahme der Mikrokernfrequenz kam und zwischen Ausgangsmikrokernfrequenz und Rückgang der Mikrokernfrequenz ein positiver Zusammenhang besteht. Allerdings zeigte sich bei den Patienten, die seit

maximal zehn Jahren hämodialysiert wurden, unter Vitamingabe eine Zunahme der Mikrokernreduktion mit ansteigender Dialysedauer, obwohl auch in dieser Patientengruppe eine negative Korrelation zwischen Ausgangsmikrokernfrequenz und Dialysedauer besteht. Eine mögliche Konsequenz hieraus könnte eine frühzeitige Substitution von Folsäure und Vitamin B12 sein, da zum einen die Patienten zu Beginn ihrer Dialysetherapie besonders hohe Mikrokernfrequenzen aufwiesen und zum anderen in den ersten Jahren der Dialysetherapie besonders gut auf eine Vitamintherapie ansprachen.

Ein zunehmendes Lebensalter der Dialysepatienten ging mit einer verringerten Reduktion der Mikrokernfrequenz einher. Bei getrennter Betrachtung der beiden Substitutionsgruppen war dieser Effekt allerdings nur in der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 zu beobachten. Er ist dennoch bemerkenswert, da mit Zunahme des Alters die basale Mikrokernfrequenz anstieg und – bei einer positiven Korrelation zwischen Ausgangsmikrokernfrequenz und Reduktion der Mikrokernfrequenz – eine verstärkte Reduktion der Mikrokernfrequenz zu erwarten gewesen wäre. Da ältere Patienten auf der einen Seite höhere Mikrokernfrequenzen aufweisen und auf der anderen Seite offensichtlich schlechter auf die Gabe von Folsäure und Vitamin B12 ansprechen, wäre es überlegenswert, die Dosis altersabhängig zu steigern. Ob hierdurch eine Verbesserung zu erreichen ist, kann nur durch nachfolgende Studien geklärt werden.

Die bereits mehrfach erwähnte positive Korrelation zwischen Höhe der Ausgangsmikrokernfrequenz und Ausmaß der Reduktion fiel in der Substitutionsgruppe Folsäure besonders deutlich aus. Einen derartigen Zusammenhang zwischen Basiswert und Reduktion beschrieb auch Titenko-Holland in ihrer Studie (Titenko-Holland 1998). Möglicherweise ist dieser Effekt bei gesunden Studienteilnehmern von größerer Bedeutung als bei Dialysepatienten, da – unter Annahme einer altersabhängigen Mikrokern-Basalfrequenz – nur bei erhöhten Ausgangswerten auch eine signifikante Senkung zu erwarten ist. Bei gesunden Probanden sind die Mikrokernfrequenzen nur selten deutlich erhöht, bei den Dialysepatienten dieser Studie waren sie dagegen fast ausnahmslos erhöht.

Dass die Patienten, die bereits im Rahmen ihrer Standardmedikation oral Vitamine einnahmen, von einer zusätzlichen intravenösen Gabe von Folsäure und Vitamin B12

stärker profitierten als diejenigen Patienten, die bisher noch keine Vitaminpräparate bekamen, verwundert. Zum einen scheint dies ein Hinweis darauf zu sein, dass die bisher verordneten Vitaminpräparate zu geringe Dosen Folsäure und Vitamin B12 enthalten, um eine Reduktion des Genomschadens zu erreichen. Diese Überlegung stimmt mit der Beobachtung Fenechs überein, dass für eine Senkung der Mikrokernfrequenz um 25 % eine Einnahme von Folsäure und Vitamin B12 über der momentan empfohlenen täglichen Aufnahme notwendig ist (Fenech 2001). Zum anderen wurde durch die doppelte Vitamineinnahme möglicherweise ein additiver Effekt verursacht. Dies wirft die Frage auf, ob durch eine höhere Vitamindosierung, als in dieser Studie gewählt, eine noch stärkere Reduktion der Mikrokernfrequenz möglich wäre.

Die Reduktion der Mikrokernfrequenz durch Gabe von Folsäure und Vitamin B12 wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Besonders interessant sind hierbei das gute Ansprechen auf die Vitaminsubstitution in den ersten Jahren einer Dialysetherapie, welches die Bedeutung einer rechtzeitigen Substitution unterstreicht, sowie die Hinweise, dass eine höhere Dosierung als in dieser Studie mit einer stärkeren Reduktion der Mikrokernfrequenz einhergehen könnte.

Bei der Auswertung der Lymphozytenpräparate wurde neben der Mikrokernfrequenz und weiteren Parametern die Proliferationsrate bestimmt, welche mit dem Alter abnahm und durch die Gabe von Folsäure und Vitamin B12 nicht anstieg.

Die in dieser Studie beobachtete Abnahme der Proliferationsrate mit dem Alter stimmt mit einer Untersuchung, welche die Daten von über 700 Personen auswertete, überein (Bolognesi 1999). Beim Vergleich der Proliferationsraten vor und nach Substitutionsbeginn zeigte sich in der Substitutionsgruppe Folsäure eine Proliferationszunahme. Allerdings kam es auch in der Kontrollgruppe zu einer Zunahme, während sich in der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 die Proliferationsrate nicht veränderte. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die Proliferationsrate nicht durch die Vitaminsubstituierung beeinflusst wurde. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung von Titenko-Holland, dass weder durch verminderte noch durch vermehrte Zufuhr eine Veränderung des replikativen Index erreicht wird (Titenko-Holland 1998).

Unter Vitaminsubstituierung sank in beiden Substituierungsgruppen der Homocystein-Plasmaspiegel ab, bei zusätzlicher Vitamin B12-Gabe war diese Reduktion sogar hoch signifikant. Allerdings kam es auch in der Kontrollgruppe zu einer – wenn auch geringeren und nicht signifikanten Abnahme des Homocystein-Plasmaspiegels.

Die Dialysepatienten hatten nach der Definition der American Heart Association von Hyperhomocysteinämie durchschnittlich alle erhöhte Werte, während die Plasmaspiegel der nicht-dialysepflichtigen Studienteilnehmer im Normbereich lagen. Ein Überblick von Wilcox über verschiedene Untersuchungen, die mit Dosen zwischen 2,5 und 60 mg Folsäure täglich arbeiteten, zeigt, dass Homocystein im Durchschnitt um 30 % gesenkt werden konnte, aber nur wenige der chronisch nierenkranken Patienten normale Homocysteinwerte erreichen konnten (Wilcox 2003). Die Homocysteinreduktion der hier vorliegenden Studie lag mit 32,7 % in der gleichen Größenordnung, ebenso war mit 11,1 % der Anteil der Patienten, die durch die Folsäuregabe normale Werte erzielen konnten, gering. Da kontrollierte Studien bei Dialysepatienten keine verbesserte Homocysteinreduktion durch Folsäure und 5-Methyltetrahydrofolat im Vergleich zur Folsäure feststellen (Bostom 2000; Yango 2001; Gonin 2003), wurde auch in dieser Studie Folsäure verwendet. Des Weiteren wurde in dieser Studie auf eine Bestimmung des 5,10-Methyltetrahydrofolat-Genotyps verzichtet, da eine große Wiener Studie feststellte, dass dieser keinen Einfluss auf das Therapieansprechen hat (Sunder-Plassmann 2000). Die bessere Homocysteinreduktion bei zusätzlicher Gabe von Vitamin B12 – im Durchschnitt wurde der Normalwert für Plasma-Homocystein erreicht – stimmt mit dem Ergebnis einer Studie von Koyama überein, in welcher bei hochdosierter Folsäuretherapie durch additive Vitamin B12-Gabe alle Patienten Normalwerte erzielten (Koyama 2002). Das Senken des Homocysteinwerts in den Normbereich gelang in dieser Studie durch die parallele Gabe von Vitamin B12 und Folsäure zwar nicht bei allen Patienten, aber immerhin bei 75 % der Patienten, die zuvor unter einer Hyperhomocysteinämie gelitten hatten. Im Durchschnitt hatten die Dialysepatienten nach Substitution von Folsäure + Vitamin B12 sogar niedrigere Plasmaspiegel als die Kontrollgruppe der nicht dialysepflichtigen Patienten. Weshalb es auch in der Kontrollgruppe zu einer Reduktion des Homocystein-Plasmaspiegels kam, ist unklar. Möglicherweise könnte ein verändertes Essverhalten in Form von vitaminreicherer Ernährung in der Kontrollgruppe hierbei eine Rolle spielen.

Zusammenfassend scheint sich die Gabe von Vitamin B12 zusätzlich zur Folsäuresupplementierung nicht nur auf die Mikrokernfrequenz, sondern auch auf den Homocysteinspiegel sehr günstig auszuwirken.

Zu jeweils einem Zeitpunkt vor und nach Substitutionsbeginn wurden Blutdruck- und CRP-Werte bestimmt. Die systolischen Blutdruckwerte waren bei einem als normal definierten systolischen Blutdruckwert von weniger als 130 mmHg (Herold 2005a) durchschnittlich leicht erhöht. Der geringfügige, nicht signifikante Rückgang der Blutdruckwerte scheint nicht mit der Vitaminsubstitution im Zusammenhang zu stehen, da einerseits die Blutdruckwerte in der Kontrollgruppe sanken und es andererseits in der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 nur zu einer marginalen Reduktion kam. Wahrscheinlicher sind diese Änderungen durch die natürlichen intraindividuellen Blutdruckschwankungen zu erklären. Ebenfalls deutlichen Schwankungen unterlagen die CRP-Werte, welche insgesamt – bei einem Referenzbereich von kleiner 5 mg/l (Herold 2005b) – erhöht waren. Bei Dialysepatienten sind erhöhte CRP-Werte auch ohne akute Infektionen jedoch bekannt. Bei einer Untersuchung mit über 250 Dialysepatienten hatten 50 % der Probanden CRP-Werte von mehr als 6,1 mg/l (Racki 2006). Der CRP-Anstieg zwischen erster und zweiter Messung lässt ausschließen, dass die Mikrokernreduktion durch eine verbesserte Entzündungssituation zu erklären ist. Allerdings sind nach einer Studie von Stigant einzelne CRP-Werte nur von bedingter Validität (Stigant 2005). Aussagekräftigere Ergebnisse wären möglicherweise durch häufigere Messungen zu erreichen gewesen.

5. Zusammenfassung

Bei Dialysepatienten sind vermehrte Genomschäden bekannt, sie unterliegen auch einer erhöhten Karzinominzidenz. Erhöhte Genomschäden können in vivo durch die Substitution von Folsäure reduziert werden, unter Gabe von Vitamin B12 sinkt die Empfindlichkeit gegenüber genotoxischen Agentien.

27 Dialysepatienten nahmen an dieser Studie teil. Die 9 Patienten der Substitutionsgruppe Folsäure erhielten dreimal wöchentlich 15 mg Folsäure intravenös, den 10 Patienten der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12 wurde zusätzlich einmal wöchentlich 1000 µg Vitamin B12 intravenös verabreicht. 8 Dialysepatienten und 7 nicht dialysepflichtige Probanden dienten als Kontrolle.

Zu drei Zeitpunkten vor und drei Zeitpunkten nach Substitutionsbeginn wurden die Mikrokernfrequenzen in peripheren, doppelkernigen Lymphozyten bestimmt. Mikrokernkerne dienen als Marker für Genomschäden, die Methode ist gut erprobt und es ist ein Zusammenhang zwischen erhöhten Mikrokernfrequenzen und einer prospektiv erhöhten Karzinominzidenz beschrieben. Weiterhin wurden die Homocystein-Plasmaspiegel vor und nach Substitutionsbeginn gemessen. Homocystein zählt zu den Urämietoxinen, in vitro steigt bei erhöhten Homocysteinwerten dosisabhängig der Genomschaden in Form von Mikrokernen an.

Vor Substitutionsbeginn wiesen die Dialysepatienten um ein mehrfaches gegenüber den Referenzwerten erhöhte Mikrokernfrequenzen auf, wobei die Mikrokernfrequenzen der Frauen deutlich über denen der Männer lagen. Mit zunehmender Dialysedauer kam es zu einer Reduktion der Mikrokernfrequenz, wobei diese immer noch gegenüber den Referenzwerten erhöht blieb. Unter Gabe von Folsäure + Vitamin B12 kam es zu einem signifikant stärkeren Rückgang der Mikrokernfrequenz als unter alleiniger Folsäuregabe. Dieser Rückgang unter Vitaminsubstitution nahm mit zunehmendem Dialysealter zunächst zu, bei einer Dialysedauer von länger als 10 Jahren nahm er wieder ab.

Die Homocysteinspiegel waren vor Substitutionsbeginn deutlich erhöht. Unter kombinierter Gabe von Folsäure und Vitamin B12 kam es zu einer signifikanten Reduktion der Homocysteinwerte, so dass diese sogar unterhalb der im Normbereich liegenden Homocysteinwerte der nicht dialysepflichtigen Kontrollgruppe lagen.

Ob die in der Studie vielversprechende kombinierte Substitution von Folsäure und Vitamin B12 tatsächlich das Krebsrisiko von Dialysepatienten beeinflussen kann, wird nur durch prospektive Langzeitstudien zu klären sein. Ebenfalls werden weitere Studien nötig sein, um die optimale Dosis, welche möglicherweise in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, Dialysedauer und Grunderkrankung variieren kann, zu ermitteln. Weitere Vorteile einer therapeutischen Gabe von Folsäure und Vitamin B12 liegen sicherlich einerseits in den vergleichsweise geringen Kosten und andererseits in der guten Verträglichkeit, welche für die Compliance der Patienten von großer Bedeutung ist.

6. Literaturverzeichnis

- Alpert, J. E., Fava, M. (1997). "Nutrition and depression: the role of folate." *Nutr Rev* 55(5): 145-149.
- Avissar, N., Ornt, D. B., Yagil, Y., Horowitz, S., Watkins, R. H., Kerl, E. A., Takahashi, K., Palmer, I. S., Cohen, H. J. (1994). "Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase." *Am J Physiol* 266(2 Pt 1): C367-375.
- Babior, B. M., Bunn, H. F. (2003). "Megaloblastäre Anämien." in: Dietel, M., Dudenhausen, J., Suttorp, N. "Harrisons Innere Medizin." ABW Wissenschaftsverlag, 15. Auflage. 107: 748-754
- Bautista, L. E., Arenas, I. A., Penuela, A., Martinez, L. X. (2002). "Total plasma homocysteine level and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective cohort studies." *J Clin Epidemiol* 55(9): 882-887.
- Beetstra, S., Thomas, P., Salisbury, C., Turner, J., Fenech, M. (2005). "Folic acid deficiency increases chromosomal instability, chromosome 21 aneuploidy and sensitivity to radiation-induced micronuclei." *Mutat Res* 578(1-2): 317-326.
- Benner, S. E., Wargovich, M. J., Lippman, S. M., Hong, W. K. (1993). "Micronuclei: a potential intermediate marker for chemoprevention of aerodigestive tract cancer." *J Cell Biochem Suppl* 17F: 250-254.
- Bettega, D., Calzolari, P., Doneda, L., Belloni, F., Tallone, L., Redpath, J. L. (2003). "Differential effectiveness of solar UVB subcomponents in causing cell death, oncogenic transformation and micronucleus induction in human hybrid cells." *Int J Radiat Biol* 79(3): 211-216.
- Beutner, K. R., Tying, S. (1997). "Human papillomavirus and human disease." *Am J Med* 102(5A): 9-15.
- Block, G., Patterson, B., Subar, A. (1992). "Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence." *Nutr Cancer* 18(1): 1-29.
- Bolognesi, C., Abbondandolo, A., Barale, R., Casalone, R., Dalpra, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., Forni, A., Lamberti, L., Lando, C., Migliore, L., Padovani, P., Pasquini, R., Puntoni, R., Sbrana, I., Stella, M., Bonassi, S. (1997). "Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome

- aberrations, and micronuclei in human lymphocytes." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6(4): 249-256.
- Bolognesi, C., Lando, C., Forni, A., Landini, E., Scarpato, R., Migliore, L., Bonassi, S. (1999). "Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes." *Age Ageing* 28(4): 393-397.
- Bonaa, K. H., Njolstad, I., Ueland, P. M., Schirmer, H., Tverdal, A., Steigen, T., Wang, H., Nordrehaug, J. E., Arnesen, E., Rasmussen, K. (2006). "Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction." *N Engl J Med* 354(15): 1578-1588.
- Bonassi, S., Bolognesi, C., Abbondandolo, A., Barale, R., Bigatti, P., Camurri, L., Dalpra, L., De Ferrari, M., Forni, A., Lando, C. et al. (1995). "Influence of sex on cytogenetic end points: evidence from a large human sample and review of the literature." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4(6): 671-679.
- Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y. P., Ceppi, M., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L. R., Fucic, A., Lima, O. G., Hrelia, P., Krishnaja, A. P., Lee, T. K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W. U., Odagiri, Y., Scarffi, M. R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A., Zijno, A. (2001). "HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei." *Environ Mol Mutagen* 37(1): 31-45.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M. R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M. (2006). "An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans." *Carcinogenesis*.
- Bonomini, M., Albertazzi, A. (1995). "Selenium in uremia." *Artif Organs* 19(5): 443-448.

- Bostom, A. G., Shemin, D., Bagley, P., Massy, Z. A., Zanabli, A., Christopher, K., Spiegel, P., Jacques, P. F., Dworkin, L., Selhub, J. (2000). "Controlled comparison of L-5-methyltetrahydrofolate versus folic acid for the treatment of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients." *Circulation* 101(24): 2829-2832.
- Botto, L. D., Lisi, A., Robert-Gnansia, E., Erickson, J. D., Vollset, S. E., Mastroiacovo, P., Botting, B., Cocchi, G., de Vigan, C., de Walle, H., Feijoo, M., Irgens, L. M., McDonnell, B., Merlob, P., Ritvanen, A., Scarano, G., Siffel, C., Metneki, J., Stoll, C., Smithells, R., Goujard, J. (2005). "International retrospective cohort study of neural tube defects in relation to folic acid recommendations: are the recommendations working?" *Bmj* 330(7491): 571.
- Carmel, R. (1997). "Cobalamin, the stomach, and aging." *Am J Clin Nutr* 66(4): 750-759.
- Cattaneo, M., Martinelli, I., Mannucci, P. M. (1996). "Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis." *N Engl J Med* 335(13): 974-975; author reply 975-976.
- Chang, W. P., Hwang, B. F., Wang, D., Wang, J. D. (1997). "Cytogenetic effect of chronic low-dose, low-dose-rate gamma-radiation in residents of irradiated buildings." *Lancet* 350(9074): 330-333.
- Cheung, A. K., Sarnak, M. J., Yan, G., Berkoben, M., Heyka, R., Kaufman, A., Lewis, J., Rocco, M., Toto, R., Windus, D., Ornt, D., Levey, A. S. (2004). "Cardiac diseases in maintenance hemodialysis patients: results of the HEMO Study." *Kidney Int* 65(6): 2380-2389.
- Chiang, P. K., Gordon, R. K., Tal, J., Zeng, G. C., Doctor, B. P., Pardhasaradhi, K., McCann, P. P. (1996). "S-Adenosylmethionine and methylation." *Faseb J* 10(4): 471-480.
- Choi, S. W., Mason, J. B. (2002). "Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis." *J Nutr* 132(8 Suppl): 2413S-2418S.
- Czeizel, A. E., Dobo, M., Vargha, P. (2004). "Hungarian cohort-controlled trial of periconceptional multivitamin supplementation shows a reduction in certain congenital abnormalities." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 70(11): 853-861

- Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) (2000a). Ernährungsbericht 2000.
Frankfurt am Main
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) (2000b). Referenzwerte für
Nährstoffzufuhr. Neuer Umschau-Verlag, Frankfurt, 1. Auflage
- Eichholzer, M., Luthy, J., Moser, U., Fowler, B. (2001). "Folate and the risk of
colorectal, breast and cervix cancer: the epidemiological evidence." *Swiss Med
Wkly* 131(37-38): 539-549.
- Everson, R. B., Wehr, C. M., Erexson, G. L., MacGregor, J. T. (1988). "Association of
marginal folate depletion with increased human chromosomal damage in vivo:
demonstration by analysis of micronucleated erythrocytes." *J Natl Cancer Inst*
80(7): 525-529.
- Fabrizi, F., Marcelli, D., Bacchini, G., Guarnori, I., Erba, G., Locatelli, F. (1994).
"Antibodies to hepatitis C virus (HCV) in chronic renal failure (CRF) patients on
conservative therapy: prevalence, risk factors and relationship to liver disease."
Nephrol Dial Transplant 9(7): 780-784.
- Fenech, M. (1997). Folate supplementation and genetic damage. Proceedings of 7th
International Conference on Environmental Mutagens. Toulouse, France.
- Fenech, M. (2000). "The in vitro micronucleus technique." *Mutat Res* 455(1-2): 81-95.
- Fenech, M. (2001). "Recommended dietary allowances (RDAs) for genomic stability."
Mutat Res 480-481: 51-54.
- Fenech, M., Baghurst, P., Luderer, W., Turner, J., Record, S., Ceppi, M., Bonassi, S.
(2005). "Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-
carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are
significantly associated with increased genome instability--results from a dietary
intake and micronucleus index survey in South Australia." *Carcinogenesis* 26(5):
991-999.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E. Bonassi, S. (1999). "The HUman
MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the
micronucleus technique for measuring DNA damage in humans." *Mutat Res*
428(1-2): 271-283.
- Fenech, M., Rinaldi, J. (1994). "The relationship between micronuclei in human
lymphocytes and plasma levels of vitamin C, vitamin E, vitamin B12 and folic

- acid." *Carcinogenesis* 15(7): 1405-1411.
- Fenech, M., Rinaldi, J. (1995). "A comparison of lymphocyte micronuclei and plasma micronutrients in vegetarians and non-vegetarians." *Carcinogenesis* 16(2): 223-230.
- Fink, K., Brink, A., Vienken, J., Heidland, A., Stopper, H. (2007). "Homocysteine exerts genotoxic and antioxidative effects in vitro." *Toxicol in Vitro* 21(8): 1402-8.
- Fragedaki, E., Nebel, M., Schupp, N., Sebekova, K., Volkel, W., Klassen, A., Pischetsrieder, M., Frischmann, M., Niwa, T., Vienken, J., Heidland, A., Stopper, H. (2005). "Genomic damage and circulating AGE levels in patients undergoing daily versus standard haemodialysis." *Nephrol Dial Transplant* 20(9): 1936-1943.
- Friedman, A. N., Bostom, A. G., Selhub, J., Levey, A. S., Rosenberg, I. H. (2001). "The kidney and homocysteine metabolism." *J Am Soc Nephrol* 12(10): 2181-2189.
- Garewal, H. S., Ramsey, L., Kaugars, G., Boyle, J. (1993). "Clinical experience with the micronucleus assay." *J Cell Biochem Suppl* 17F: 206-212.
- Gasteiger, J., Schunk, A. (Computer Chemie Centrum Universität Erlangen) (2003a). "Chemie für Mediziner." <http://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects/vsc/chemie-mediziner-neu/vitamine/vitb1201.html>, Stand September 2006
- Gasteiger, J., Schunk, A. (Computer Chemie Centrum Universität Erlangen) (2003b). "Chemie für Mediziner." <http://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects/vsc/chemie-mediziner-neu/vitamine/vitb1202.html>, Stand September 2006
- Gonin, J. M., Nguyen, H., Gonin, R., Sarna, A., Michels, A., Masri-Imad, F., Bommarreddy, G., Chassaing, C., Wainer, I., Loya, A., Cary, D., Barker, L. F., Assefi, A., Greenspan, R., Mahoney, D., Wilcox, C. S. (2003). "Controlled trials of very high dose folic acid, vitamins B12 and B6, intravenous folinic acid and serine for treatment of hyperhomocysteinemia in ESRD." *J Nephrol* 16(4): 522-534.
- Grossman, E., Messerli, F. H., Goldbourt, U. (2001). "Antihypertensive therapy and the risk of malignancies." *Eur Heart J* 22(15): 1343-1352.

- Gustavino, B., Degrassi, F., Filipponi, R., Modesti, D., Tanzarella, C., Rizzoni, M. (1994). "Mitotic indirect non-disjunction in phytohemagglutinin stimulated human lymphocytes." *Mutagenesis* 9(1): 17-21.
- Heidland, A., Sebekova, K., Schinzel, R. (2001). "Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease." *Am J Kidney Dis* 38(4 Suppl 1): S100-106.
- Herold, G. und Mitarbeiter (2005a). "Innere Medizin." 252-256
- Herold, G. und Mitarbeiter (2005b). "Innere Medizin." 799
- Herrmann., W. (2002). "Die Bedeutung der Hyperhomocysteinämie als Risikofaktor für degenerative Erkrankungen. Ein Überblick." *J Ernährungsmed* 4(1): 7-14
- Hertfelder, H. J., Gnida, C., Pötzsch, B., Hanfland, P. (2004). "MTHFR-Polymorphismus C677T Sinn und Unsinn der Diagnostik." *Dtsch Arztebl* 101(46): A 3101-3105
- Ingrosso, D., Cimmino, A., Perna, A. F., Masella, L., De Santo, N. G., De Bonis, M. L., Vacca, M., D'Esposito, M., D'Urso, M., Galletti, P., Zappia, V. (2003). "Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia." *Lancet* 361(9370): 1693-1699.
- Jacques, P. F., Selhub, J., Bostom, A. G., Wilson, P. W., Rosenberg, I. H. (1999). "The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations." *N Engl J Med* 340(19): 1449-1454.
- Joksic, I., Leskovac, A., Petrovic, S., Joksic, G. (2006). "Vitamin B12 reduces ribavirin-induced genotoxicity in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes." *Tohoku J Exp Med* 209(4): 347-354.
- Kick, L., Engelhardt, G. (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit) (2004). "Die Rolle des Vitamins Folsäure in der Ernährung". http://www.visernaehrung.bayern.de/de/left/fachinformationen/ernaehrung/ernaehrung_allgemein/folsaeure.html, Stand September 2006
- Koletzko, B., Pietrzik, K.(2004). "Gesundheitliche Bedeutung der Folsäurezufuhr." *Dtsch Arztebl* 101(23): A 1670–1681
- Kopple, J. D., Massry, S. G. (1988). "Is there an association between neoplasia and primary or secondary hyperparathyroidism?" *Am J Nephrol* 8(6): 437-448.

- Koyama, K., Usami, T., Takeuchi, O., Morozumi, K., Kimura, G. (2002). "Efficacy of methylcobalamin on lowering total homocysteine plasma concentrations in haemodialysis patients receiving high-dose folic acid supplementation." *Nephrol Dial Transplant* 17(5): 916-922
- Kreutzig, T. (1997). *Biochemie*. Gustav Fischer-Verlag. 9. Auflage: 172-173
- Kunz-Thal, H. (2003) *Neurologie*. 378-382
- Li, D. K., Daling, J. R., Mueller, B. A., Hickok, D. E., Fantel, A. G., Weiss, N. S. (1995). "Periconceptional multivitamin use in relation to the risk of congenital urinary tract anomalies." *Epidemiology* 6(3): 212-218.
- Löffler, G. (2003a). *Basiswissen Biochemie*. Springer-Verlag, 5. Auflage: 249-251
- Löffler, G. (2003b). *Basiswissen Biochemie*. Springer-Verlag, 5. Auflage: 615-617
- Lonn, E., Yusuf, S., Arnold, M. J., Sheridan, P., Pogue, J., Micks, M., McQueen, M. J., Probstfield, J., Fodor, G., Held, C., Genest, J., Jr. (2006). "Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease." *N Engl J Med* 354(15): 1567-1577.
- "Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration." (1998). *Bmj* 316(7135): 894-898.
- MacGregor, J. T. (1990). "Dietary factors affecting spontaneous chromosomal damage in man." *Prog Clin Biol Res* 347: 139-153.
- MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Hiatt, R. A., Peters, B., Tucker, J. D., Langlois, R. G., Jacob, R. A., Jensen, R. H., Yager, J. W., Shigenaga, M. K., Frei, B., Eynon, B. P., Ames, B. N. (1997). "'Spontaneous' genetic damage in man: evaluation of interindividual variability, relationship among markers of damage, and influence of nutritional status." *Mutat Res* 377(1): 125-135.
- Maisonneuve, P., Agodoa, L., Gellert, R., Stewart, J. H., Buccianti, G., Lowenfels, A. B., Wolfe, R. A., Jones, E., Disney, A. P., Briggs, D., McCredie, M., Boyle, P. (1999). "Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study." *Lancet* 354(9173): 93-99.
- Malachi, T., Zevin, D., Gafter, U., Chagnac, A., Slor, H., Levi, J. (1993). "DNA repair and recovery of RNA synthesis in uremic patients." *Kidney Int* 44(2): 385-389.

- Malinow, M. R., Bostom, A. G., Krauss, R. M. (1999). "Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association." *Circulation* 99(1): 178-182.
- Manabe, S., Suzuki, M., Kusano, E., Wada, O., Asano, Y. (1992). "Elevation of levels of carcinogenic tryptophan pyrolysis products in plasma and red blood cells of patients with uremia." *Clin Nephrol* 37(1): 28-33.
- Matas, A. J., Simmons, R. L., Kjellstrand, C. M., Buselmeier, T. J., Najarian, J. S. (1975). "Increased incidence of malignancy during chronic renal failure." *Lancet* 1(7912): 883-886.
- McCully, K. S. (1969). "Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis." *Am J Pathol* 56(1): 111-128.
- McMahon, J. A., Green, T. J., Skeaff, C. M., Knight, R. G., Mann, J. I., Williams, S. M. (2006). "A controlled trial of homocysteine lowering and cognitive performance." *N Engl J Med* 354(26): 2764-2772.
- Menon, V., Wang, X., Greene, T., Beck, G. J., Kusek, J. W., Selhub, J., Levey, A. S., Sarnak, M. J. (2005). "Homocysteine in chronic kidney disease: Effect of low protein diet and repletion with B vitamins." *Kidney Int* 67(4): 1539-1546.
- Mitchell, H. K., Snell, E. E., Williams, R. J. (1988). "Journal of the American Chemical Society, Vol. 63, 1941: The concentration of "folic acid" by Herschel K. Mitchell, Esmond E. Snell, and Roger J. Williams." *Nutr Rev* 46(9): 324-325.
- Moller, J., Nielsen, G. M., Tvedegaard, K. C., Andersen, N. T., Jorgensen, P. E. (2000). "A meta-analysis of cerebrovascular disease and hyperhomocysteinaemia." *Scand J Clin Lab Invest* 60(6): 491-499.
- Moustapha, A., Gupta, A., Robinson, K., Arheart, K., Jacobsen, D. W., Schreiber, M. J., Dennis, V. W. (1999). "Prevalence and determinants of hyperhomocysteinemia in hemodialysis and peritoneal dialysis." *Kidney Int* 55(4): 1470-1475.
- Müller, H. (1995). "Neubestimmung und Bewertung der Folsäuregehalte von ausgewählten Lebensmitteln pflanzlicher und tierischer Herkunft." *Ernährungs-Umschau* 42: 170-74
- Nasri, H. (2005). "Serum C-reactive protein (CRP) in association with various nutritional parameters in maintenance hemodialysis patients." *Bratisl Lek Listy* 106(12): 390-395.

- "A Nordic data base on somatic chromosome damage in humans. Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage." (1990). *Mutat Res* 241(3): 325-337.
- Obe, G., Beek, B. (1982). "Premature chromosome condensation in micronuclei", in: Rao, P., Johnson, R., Sperling, K. (Eds.) "Application in Basic, Clinical and Mutation Research." Academic Press, New York.
- Penn, I., Starzl, T. E. (1972). "Malignant tumors arising de novo in immunosuppressed organ transplant recipients." *Transplantation* 14(4): 407-417.
- Perna, A. F., Castaldo, P., Ingrosso, D., De Santo, N. G. (1999). "Homocysteine, a new cardiovascular risk factor, is also a powerful uremic toxin." *J Nephrol* 12(4): 230-240.
- Perna, A. F., Ingrosso, D., De Santo, N. G., Galletti, P., Zappia, V. (1995). "Mechanism of erythrocyte accumulation of methylation inhibitor S-adenosylhomocysteine in uremia." *Kidney Int* 47(1): 247-253.
- Persad, V. L., Van den Hof, M. C., Dube, J. M., Zimmer, P. (2002). "Incidence of open neural tube defects in Nova Scotia after folic acid fortification." *Cmaj* 167(3): 241-245.
- Peterson, J. C., Spence, J. D. (1998). "Vitamins and progression of atherosclerosis in hyper-homocyst(e)inaemia." *Lancet* 351(9098): 263.
- Pfreundschuh, M., Schölmerich, J. (2000a). "Pathophysiologie Pathobiochemie." Urban&Fischer-Verlag.1.Auflage: 39-41
- Pfreundschuh, M., Schölmerich, J. (2000b). "Pathophysiologie Pathobiochemie." Urban&Fischer-Verlag.1.Auflage: 64-65
- Racki, S., Zaputovic, L., Mavric, Z., Vujcic, B., Dvornik, S. (2006). "C-reactive protein is a strong predictor of mortality in hemodialysis patients." *Ren Fail* 28(5): 427-433.
- Robert-Koch-Institut. (2004). "Epidemiologisches Bulletin Nr.34." 281-283
- Roselaar, S. E., Nazhat, N. B., Winyard, P. G., Jones, P., Cunningham, J., Blake, D. R. (1995). "Detection of oxidants in uremic plasma by electron spin resonance spectroscopy." *Kidney Int* 48(1): 199-206.
- Rosin, M. P. (1993). "Genetic alterations in carcinogenesis and chemoprevention." *Environ Health Perspect* 101 Suppl 3: 253-256.

- Schiffmann, D., De Boni, U. (1991). "Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise." *Mutat Res* 246(1): 113-122.
- Schmuck, G., Lieb, G., Wild, D., Schiffmann, D., Henschler, D. (1988). "Characterization of an in vitro micronucleus assay with Syrian hamster embryo fibroblasts." *Mutat Res* 203(6): 397-404.
- Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P. F., Rosenberg, I. H., D'Agostino, R. B., Wilson, P. W., Wolf, P. A. (2002). "Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease." *N Engl J Med* 346(7): 476-483.
- Shaw, G. M., Lammer, E. J., Wasserman, C. R., O'Malley, C. D., Tolarova, M. M. (1995). "Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid preconceptionally." *Lancet* 346(8972): 393-396.
- Stanger, O., Herrmann, W., Pietrzik, K., Fowler, B., Geisel, J., Dierkes, J., Weger, M. (2003). "Konsensuspapier der D.A.C.H.-Liga Homocystein über den rationellen klinischen Umgang mit Homocystein, Folsäure und B-Vitaminen bei kardiovaskulären und thrombotischen Erkrankungen – Richtlinien und Empfehlungen." *J Kardiologie* 10(5): 190-199
- Stigant, C. E., Djurdjev, O., Levin, A. (2005). "C-reactive protein levels in patients on maintenance hemodialysis: reliability and reflection on the utility of single measurements." *Int Urol Nephrol* 37(1): 133-140.
- Stopper, H., Boullay, F., Heidland, A., Vienken, J., Bahner, U. (2001a). "Comet-assay analysis identifies genomic damage in lymphocytes of uremic patients." *Am J Kidney Dis* 38(2): 296-301.
- Stopper, H., Boullay, F., Vienken, J., Schinzel, R., Bahner, U., Heidland, A. (2001b). "Genomschäden in niereninsuffizienten Patienten im Prädialyse- und Dialysestadium. *Nephrologisches Jahrgespräch* 2001; 48-52
- Stopper, H., Meysen, T., Bockenforde, A., Bahner, U., Heidland, A., Vamvakas, S. (1999). "Increased genomic damage in lymphocytes of patients before and after long-term maintenance hemodialysis therapy." *Am J Kidney Dis* 34(3): 433-437.
- Stopper, H., Müller, S. O. (1997) "Micronuclei as a Biological Endpoint for Genotoxicity: A Minireview." *Toxicol in Vitro* 11: 661-667

- Stopper, H., Schinzel, R., Sebekova, K., Heidland, A. (2003). "Genotoxicity of advanced glycation end products in mammalian cells." *Cancer letters* 190: 151-156
- Stopper, H., Schupp, N., Bahner, U., Sebekova, K., Klassen, A., Heidland, A. (2004). "Genomic damage in end-stage renal failure: potential involvement of advanced glycation end products and carbonyl stress." *Semin Nephrol* 24(5): 474-478.
- Stopper, H., Schupp, N., Klassen, A., Sebekova, K., Heidland, A. (2005). "Genomic damage in chronic renal failure--potential therapeutic interventions." *J Ren Nutr* 15(1): 81-86.
- Sunder-Plassmann, G., Fodinger, M., Buchmayer, H., Papagiannopoulos, M., Wojcik, J., Kletzmayer, J., Enzenberger, B., Janata, O., Winkelmayr, W. C., Paul, G., Auinger, M., Barnas, U., Horl, W. H. (2000). "Effect of high dose folic acid therapy on hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients: results of the Vienna multicenter study." *J Am Soc Nephrol* 11(6): 1106-1116.
- Sutherland, G. R. (1979). "Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocyte culture." *Am J Hum Genet* 31(2): 125-135.
- Tepel, M., Echelmeyer, M., Orie, N. N., Zidek, W. (2000). "Increased intracellular reactive oxygen species in patients with end-stage renal failure: effect of hemodialysis." *Kidney Int* 58(2): 867-872.
- Teschner, M. Garte, C., Rückle-Lanz, H., Mäder, U., Stopper, H., Klassen, A., Heidland, A. (2002). "Inzidenz und Spektrum maligner Erkrankungen bei Dialysepatienten in Nordbayern." *Dtsch med Wochenschr* 127:2497-2502
- Thamm, M., Mesink, G. B. M., Thierfelder, W. (1999) "Folsäureversorgung von Frauen im gebärfähigen Alter." *Das Gesundheitswesen* 61: S207-S212
- Thomas, L. (1998). "Labor und Diagnose." TH-Books Verlagsgesellschaften. 5. Auflage: 435-441
- Thompson, J. R., Gerald, P. F., Willoughby, M. L., Armstrong, B. K. (2001). "Maternal folate supplementation in pregnancy and protection against acute lymphoblastic leukaemia in childhood: a case-control study." *Lancet* 358(9297): 1935-1940.
- Tice, J. A., Ross, E., Coxson, P. G., Rosenberg, I., Weinstein, M. C., Hunink, M. G., Goldman, P. A., Williams, L., Goldman, L. (2001). "Cost-effectiveness of vitamin therapy to lower plasma homocysteine levels for the prevention of

- coronary heart disease: effect of grain fortification and beyond." *Jama* 286(8): 936-943.
- Titenko-Holland, N., Jacob, R. A., Shang, N., Balaraman, A., Smith, M. T. (1998). "Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate." *Mutat Res* 417(2-3): 101-114.
- Toole, J. F., Malinow, M. R., Chambless, L. E., Spence, J. D., Pettigrew, L. C., Howard, V. J., Sides, E. G., Wang, C. H., Stampfer, M. (2004). "Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISIP) randomized controlled trial." *Jama* 291(5): 565-575.
- Tucker, R. W., Barrett, J. C. (1986). "Decreased numbers of spindle and cytoplasmic microtubules in hamster embryo cells treated with a carcinogen, diethylstilbestrol." *Cancer Res* 46(4 Pt 2): 2088-2095.
- Vamvakas, S., Bahner, U., Becker, P., Steinle, A., Gotz, R., Heidland, A. (1996). "Impairment of DNA repair in the course of long-term hemodialysis and under cyclosporine immunosuppression after renal transplantation." *Transplant Proc* 28(6): 3468-3473.
- Vamvakas, S., Bahner, U., Heidland, A. (1998). "Cancer in end-stage renal disease: potential factors involved -editorial." *Am J Nephrol* 18(2): 89-95.
- Von Hoff, D. D., McGill, J. R., Forseth, B. J., Davidson, K. K., Bradley, T. P., Van Devanter, D. R., Wahl, G. M. (1992). "Elimination of extrachromosomally amplified MYC genes from human tumor cells reduces their tumorigenicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(17): 8165-8169.
- Wald, D. S., Law, M., Morris, J. K. (2002). "Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis." *Bmj* 325(7374): 1202.
- Wang, X., Fenech, M. (2003). "A comparison of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate for prevention of DNA damage and cell death in human lymphocytes in vitro." *Mutagenesis* 18(1): 81-86.
- Welch, A. D., Nichol, C. A. (1952). "Water-soluble vitamins concerned with one and two-carbon intermediates." *Annu Rev Biochem* 21: 633-686.
- Wilcox, C. S. (2003). "Hyperhomocyst(e)inaemia in therapy in nephrology and hypertension." Vol. 68. 2nd ed. London: Saunders. 665-668

- Williams, L. J., Mai, C. T., Edmonds, L. D., Shaw, G. M., Kirby, R. S., Hobbs, C. A., Sever, L. E., Miller, L. A., Meaney, F. J., Levitt, M. (2002). "Prevalence of spina bifida and anencephaly during the transition to mandatory folic acid fortification in the United States." *Teratology* 66(1): 33-39.
- Yamamoto, T., Nakajima, Y., Yamamoto, M., Hironaka, T., Hirai, K., Nakamura, Y. (1995). "Epstein-Barr virus activity in patients on chronic hemodialysis." *Nephron* 70(4): 449-454.
- Yango, A., Shemin, D., Hsu, N., Jacques, P. F., Dworkin, L., Selhub, J., Bostom, A. G. (2001). "Rapid communication: L-folinic acid versus folic acid for the treatment of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients." *Kidney Int* 59(1): 324-327.
- Yoshimura, S., Suemizu, H., Nomoto, Y., Sakai, H., Katsuoka, Y., Kawamura, N., Moriuchi, T. (1996). "Plasma glutathione peroxidase deficiency caused by renal dysfunction." *Nephron* 73(2): 207-211.
- Zhu, S., Mason, J., Shi, Y., Hu, Y., Li, R., Wahg, M., Zhou, Y., Jin, G., Xie, Y., Wu, G., Xia, D., Qian, Z., Sohng, H., Zhang, L., Russell, R., Xiao, S. (2003). "The effect of folic acid on the development of stomach and other gastrointestinal cancers." *Chin Med J (Engl)* 116(1): 15-19.
- Zozulinska, D., Wierusz-Wysocka, B. (2006). "Type 2 diabetes mellitus as inflammatory disease." *Diabetes Res Clin Pract* 74(2 Suppl): S12-16.

7. Anhang

7.1 Daten der Substitutionsgruppe Folsäure

Patient	Messpunkt	Einkernig	Zweikernig	Mehrkernig	1 Mikrokern	> 1 Mikrokern	Apoptosen	Mitosen	Sonstiges
1	1	477	423	35	17	1	3	4	40
			1000		40	5			
	2	422	487	49	11	1	0	7	23
	3	404	511	37	17	5	1	12	13
	4	395	524	33	7	4	1	18	18
	5	424	513	24	15	3	1	8	12
	6	355	557	42	13	4	1	15	12
2	1	630	237	40	7	0	3	8	75
			1000		23	11			
	2	462	460	42	12	5	2	7	10
	3	420	487	37	17	2	3	7	27
	4	323	553	71	7	4	1	16	25
	5	485	454	20	7	3	1	11	19
	6	423	505	42	6	5	0	4	15
3	1	628	259	39	20	5	0	25	24
			1000		58	7			
	2	429	446	52	24	6	4	12	27
	3	493	438	20	20	6	1	2	20
	4	327	571	52	17	5	0	9	19
	5	514	413	23	15	3	0	6	26
	6	493	454	23	17	2	0	2	9

Patient	Messpunkt	Einkernig	Zweikernig	Mehrkernig	1 Mikrokern	> 1 Mikrokern	Apoptosen	Mitosen	Sonstiges
4	1	431	474	24	12	0	3	4	52
			1000		25	1			
	2	475	463	26	5	1	1	4	25
			1000		15	2			
	3	414	476	22	9	1	3	23	52
			1000		18	2			
	4	366	533	49	11	5	3	11	23
			1000		20	6			
	5	582	361	5	4	1	0	1	46
			1000		18	3			
	6	506	419	18	6	1	3	5	40
			1000		17	4			
5	1	481	452	27	4	1	2	6	27
			1000		12	3			
	2	468	464	28	12	0	2	4	22
			1000		24	1			
	3	401	503	41	21	4	1	11	18
			1000		36	6			
	4	427	458	52	4	0	2	12	45
			1000		18	2			
	5	480	458	16	7	2	0	13	24
			1000		18	2			
	6	396	531	43	6	0	0	6	18
			1000		18	3			
6	1	729	249	15	5	0	1	1	20
			1000		19	3			
	2	421	501	35	15	2	3	11	12
			1000		32	7			
	3	350	529	46	17	2	1	10	45
			1000		31	6			
	4	348	558	37	9	9	0	17	28
			1000		17	5			
	5	523	427	13	12	1	1	6	17
			1000		22	2			
	6	306	609	43	10	4	0	12	16
			1000		21	4			

Patient	Messpunkt	Einkernig	Zweikernig	Mehrkernig	1 Mikrokern	> 1 Mikrokern	Apoptosen	Mitosen	Sonstiges
7	1	537	303	27	7	0	0	2	64
			1000		19	1			
	2	419	478	52	22	7	0	8	14
			1000		47	12			
	3	369	523	55	15	2	1	15	20
			1000		30	6			
	4	317	585	52	15	3	1	7	20
			1000		28	4			
	5	471	459	11	8	1	0	4	36
			1000		21	7			
	6	321	580	60	16	7	0	5	11
			1000		24	7			
8	1	617	324	27	5	1	1	4	21
			1000		19	2			
	2	375	502	81	6	2	3	4	27
			1000		16	4			
	3	400	489	70	12	4	1	10	14
			1000		26	5			
	4	278	582	86	12	4	0	17	21
			1000		21	4			
	5	376	518	67	10	0	0	12	17
					19	1			
	6	247	665	55	13	4	1	10	5
			1000		16	6			
9	1	411	488	43	14	2	0	2	40
			1000		35	5			
	2	459	419	15	13	1	3	6	84
			1000		27	2			
	3	405	495	44	10	5	1	11	29
			1000		27	7			
	4	333	551	58	13	4	6	13	22
			1000		24	8			
	5	567	374	15	7	2	1	7	27
			1000		19	7			
	6	453	479	34	6	3	3	7	15
			1000		16	8			

7.2 Daten der Substitutionsgruppe Folsäure + Vitamin B12

Patient	Messpunkt	Einkernig	Zweikernig	Mehrkernig	1 Mikrokern	> 1 Mikrokern	Apoptosen	Mitosen	Sonstiges
1	1	386	516	58	13	5	1	3	18
			1000			35	10		
	2	510	427	13	8	4	0	8	30
			1000			24	9		
	3	395	482	26	20	5	2	6	64
			1000			34	9		
	4	529	405	3	14	6	0	16	27
			1000			32	12		
	5	542	415	10	7	3	0	1	16
			1000			25	9		
	6	405	504	36	15	7	2	16	15
			1000			26	9		
2	1	590	307	7	14	0	4	7	71
			1000			31	1		
	2	514	400	18	8	1	3	10	46
			1000			27	5		
	3	555	364	9	9	1	4	4	54
			1000			32	4		
	4	492	414	16	9	0	5	19	45
			1000			21	3		
	5	601	326	11	5	0	3	9	45
			1000			14	5		
	6	513	430	13	8	3	0	9	24
			1000			16	4		
3	1	458	424	17	15	2	2	6	76
			1000			28	5		
	2	424	531	17	9	0	3	4	18
			1000			19	4		
	3	446	478	18	13	3	1	8	33
			1000			27	3		
	4	414	538	6	12	1	1	9	19
			1000			24	3		
	5	551	402	12	3	1	0	15	16
			1000			9	3		
	6	547	413	11	4	0	0	11	13
			1000			13	1		

Patient	Messpunkt	Einkernig	Zweikernig	Mehrkernig	1 Mikrokern	> 1 Mikrokern	Apoptosen	Mitosen	Sonstiges
4	1	401	503	39	12	1	2	8	34
			1000		22	2			
	2	403	530	32	7	1	1	11	15
			1000		17	1			
	3	410	481	61	7	0	0	20	21
			1000		19	0			
	4	404	509	42	8	2	1	5	29
			1000		18	2			
	5	409	518	40	8	2	0	12	11
			1000		15	3			
	6	305	610	41	6	1	2	13	22
			1000		10	4			
5	1	366	550	40	8	1	3	7	25
			1000		23	1			
	2	365	517	62	16	2	1	8	29
			1000		31	4			
	3	301	499	108	16	0	3	17	56
			1000		27	0			
	4	290	583	69	11	5	0	18	24
			1000		18	7			
	5	438	492	35	8	1	0	13	13
			1000		16	2			
	6	281	626	57	6	1	0	6	23
			1000		12	2			
6	1	509	422	22	21	10	2	7	15
			1000		57	17			
	2	457	477	14	19	8	0	5	20
			1000		50	18			
	3	409	487	40	25	4	0	10	33
			1000		57	11			
	4	443	481	16	13	8	4	8	27
			1000		41	15			
	5	546	413	3	9	3	0	5	21
			1000		29	8			
	6	417	521	16	14	7	1	8	16
			1000		26	10			

Patient	Messpunkt	Einkernig	Zweikernig	Mehrkernig	1 Mikrokern	> 1 Mikrokern	Apoptosen	Mitosen	Sonstiges	
7	1	382	522	70	11	1	1	2	11	
			1000		26	3				
	2	457	541	30	16	2	3	4	37	
			1000		31	3				
	3	452	466	26	7	1	2	5	41	
			1000		23	3				
	4	469	442	10	16	2	3	3	55	
			1000		26	6				
	5	572	392	9	3	0	1	12	11	
			1000		8	2				
	6	386	539	37	7	2	1	8	20	
			1000		16	2				
8	1	510	524	30	13	0	0	7	16	
			1000		26	4				
	2	630	329	4	9	0	3	2	23	
			1000		29	4				
	3	584	355	13	5	0	0	4	39	
			1000		20	2				
	4	554	400	14	6	2	0	10	14	
			1000		17	3				
	5	610	361	1	6	0	0	7	15	
			1000		17	0				
	6	583	388	5	4	1	1	8	10	
			1000		10	5				
9	1	358	482	70	24	3	2	7	54	
			1000		45	5				
	2	391	499	37	17	4	1	8	43	
			1000		38	10				
	3	371	472	72	17	2	3	6	55	
			1000		34	7				
	4	339	544	35	13	1	0	7	61	
			1000		29	3				
	5	472	454	30	15	2	1	5	21	
			1000		27	4				
	6	Verstorben								

Patient	Messpunkt	Einkernig	Zweikernig	Mehrkernig	1 Mikrokern	> 1 Mikrokern	Apoptosen	Mitosen	Sonstiges
10	1	437	462	35	33	8	1	8	16
			1000		68	14			
	2	401	490	44	21	6	1	9	28
			1000		60	13			
	3	424	452	56	24	5	0	10	29
			1000		59	17			
	4	502	426	14	27	7	1	7	16
			1000		64	13			
	5	424	505	22	25	3	1	7	13
			1000		47	11			
	6	369	567	30	21	0	0	4	9
			1000		42	4			

7.3 Daten der Dialyse-Kontrollgruppe

Patient	Messpunkt	Einkernige	Zweikernige	Mehrkernige	1 Mikrokern	> 1 Mikrokern	Apoptosen	Mitosen	Sonstiges	
1	1	358	529	35	22	5	1	6	44	
			1000			39	8			
	2	472	459	23		13	4	0	8	15
				1000			30	10		
	3	440	494	24		13	5	0	10	14
				1000			28	8		
	4	397	565	4		8	7	0	6	13
				1000			24	15		
	5	440	491	14		18	6	1	15	15
				1000			37	7		
	6	363	572	23		10	7	0	12	13
				1000			21	14		
2	1	387	501	73	14	0	1	9	15	
			1000			23	3			
	2	352	535	58		7	1	3	8	36
				1000			23	1		
	3	346	542	66		7	1	1	9	28
				1000			19	3		
	4	304	604	55		12	0	1	10	14
				1000			19	2		
	5	326	585	56		10	0	1	13	9
				1000			24	0		
	6	249	625	92		7	3	0	7	17
				1000			15	5		
3	1	654	227	12	3	1	1	6	96	
			1000			13	1			
	2	410	507	58		4	1	0	2	16
				1000			10	2		
	3	387	521	55		8	0	2	6	21
				1000			10	1		
	4	305	571	87		4	2	0	15	16
				1000			12	3		
	5	451	482	41		6	0	0	14	16
				1000			11	3		
	6	361	527	68		7	0	0	13	24
				1000			11	2		

Patient	Messpunkt	Einkernige	Zweikernige	Mehrkernige	1 Mikrokern	> 1 Mikrokern	Apoptosen	Mitosen	Sonstiges
4	1	442	477	29	10	0	2	3	37
			1000		22	4			
	2	453	472	37	16	2	0	7	13
			1000		24	5			
	3	456	464	28	9	3	2	6	32
			1000		23	7			
	4	343	534	57	15	1	1	20	20
			1000		25	2			
	5	482	452	26	9	4	0	5	22
			1000		25	8			
	6	352	464	31	9	4	0	9	31
			1000		21	5			
5	1	411	458	67	31	5	1	7	20
			1000		65	12			
	2	445	491	21	22	0	1	7	13
			1000		42	3			
	3	408	492	54	18	5	10	10	13
			1000		48	14			
	4	387	516	57	14	1	0	12	13
			1000		51	6			
	5	487	441	13	19	3	3	9	25
			1000		44	11			
	6	487	447	21	15	9	1	8	12
			1000		40	19			
6	1	679	267	16	8	1	0	4	24
			1000		38	4			
	2	421	504	33	6	2	2	27	
			1000		28	4			
	3	460	482	12	15	1	4	10	16
			1000		33	6			
	4	336	575	50	14	2	0	11	12
			1000		29	5			
	5	408	518	12	15	3	1	18	25
			1000		35	8			
	6	472	473	15	9	5	1	4	21
			1000		22	8			

Patient	Messpunkt	Einkernig	Zweikernig	Mehrkernig	1 Mikrokern	> 1 Mikrokern	Apoptosen	Mitosen	Sonstiges
7	1	487	446	9	8	1	0	1	58
			1000		14	1			
	2	433	423	40	7	2	5	9	81
			1000		15	5			
	3	433	472	60	5	0	2	9	49
			1000		17	1			
	4	438	477	9	9	2	1	5	60
			1000		15	2			
	5	520	438	8	6	1	0	4	23
			1000		15	4			
	6	311	602	54	8	3	1	5	16
			1000		14	4			
8	1	434	446	67	17	2	1	5	28
			1000		51	10			
	2	508	393	27	21	1	1	7	42
			1000		50	8			
	3	529	381	29	13	1	3	12	32
			1000		48	9			
	4	421	487	24	21	2	3	8	34
			1000		53	4			
	5	563	378	11	16	3	2	3	24
			1000		49	10			
	6	418	516	14	18	3	0	6	25
			1000		44	10			

7.4 Daten der Nicht-Dialyse-Kontrollgruppe

Patient	Messpunkt	Einkernige	Zweikernige	Mehrkernige	1 Mikrokern	> 1 Mikrokern	Apoptosen	Mitosen	Sonstiges
1	1	400	484	39	28	8	1	10	30
			1000			56	14		
	2	436	495	29	18	5	0	3	13
			1000			49	10		
2	1	463	464	18	15	1	2	13	24
			1000			41	7		
	2	409	533	13	18	4	1	10	12
			1000			37	10		
3	1	341	589	13	20	3	0	5	29
			1000			43	5		
	2	430	501	21	16	6	1	6	19
			1000			37	10		
4	1	419	482	40	11	2	2	16	28
			1000			29	5		
	2	382	532	56	8	5	0	5	12
			1000			24	7		
5	1	450	465	32	8	0	1	10	34
			1000			14	2		
	2	422	513	51	4	0	1	3	6
			1000			7	1		
6	1	501	411	25	15	1	0	10	37
			1000			34	2		
	2	529	391	33	8	0	2	9	28
			1000			28	2		
7	1	481	436	30	3	2	1	12	45
			1000			18	5		
	2	551	378	30	9	2	5	6	19
			1000			24	4		

Danke

Frau Prof. Dr. H. Stopper danke ich dafür, dass ihre Tür auch im übertragenen Sinne immer offen stand und ich mich jederzeit mit Fragen an sie wenden konnte. Ihr Engagement und ihr Interesse an meinen Ergebnissen habe ich als große Unterstützung empfunden.

Herrn Prof. Dr. U. Bahner danke ich besonders für seine Bestärkung und Ermutigung in den komplizierteren Phasen dieser Arbeit. Dass er im klinischen Alltag trotz seiner vielen Verpflichtungen immer Zeit für ein Gespräch mit mir fand, habe ich sehr hoch geschätzt.

Herrn Prof. Dr. A. Heidland danke ich für die interessanten, informativen und konstruktiven Gespräche. Die vielen wissenschaftlichen Artikel und Studien, auf die er mich aufmerksam gemacht hat, erwiesen sich gerade beim Schreiben dieser Arbeit als sehr wertvoll.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Stopper des toxikologischen Instituts der Universität Würzburg danke ich für ihre Herzlichkeit und ihre Hilfsbereitschaft. Ganz besonders danke ich Herrn M. Kessler, der mir als Anfängerin mit sehr viel Geduld grundlegende Labortechniken beibrachte und Frau Dr. N. Schupp, die mir bei den statistischen Auswertungen sehr geholfen hat.

Dem pflegerischen und ärztlichen Personal des Kuratoriums für Heimdialyse in Würzburg danke ich für die große Unterstützung in Form von Blutabnahmen und Applikation der Vitamine. Zu ganz besonderem Dank bin ich den Dialysepatienten verpflichtet: Ohne ihr Interesse an dieser Studie und ihre Bereitschaft zur Teilnahme hätte diese Arbeit nicht entstehen können.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Anna-Teresa Treutlein
Geburtsdatum: 09.11.1982
Geburtsort: Bad Neustadt an der Saale
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1989 – 1991 Stephani-Grundschule, Gunzenhausen
1991 – 1993 Schiller-Grundschule, Schweinfurt
1993 – 2002 Celtis-Gymnasium, Schweinfurt
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Gesamtnote: 1,0

Studium:

September 2002 Immatrikulation an der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg im Fach Humanmedizin
September 2004 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,
Gesamtnote: 1,66
November 2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,
Gesamtnote 1,0

Würzburg, Januar 2009