

UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

Medizinische Fakultät

Klinische Chemie, Zentrallabor

Arbeitsgruppe Prof. Dr. Rima Obeid

Phospholipide als Biomarker bei Diabetes und Vitaminmangel; methodische Entwicklung und klinische Studien

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften*

2012

**Vorgelegt von Yannick Rabagny,
geb. am 03.10.1983 in Recklinghausen**

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Zusammenfassung | 4 |
| 2 | Summary | 5 |
| 3 | Einleitung | 6 |
| 3.1 | Nomenklatur..... | 6 |
| 3.1.1 | Phospholipidklassen | 6 |
| 3.1.2 | Lipoproteine..... | 8 |
| 3.1.3 | Fettsäureketten der Phospholipide..... | 11 |
| 3.2 | Biochemische Rolle der Phospholipide | 12 |
| 3.2.1 | Phospholipid-Biosynthese und der Methylierungskreislauf..... | 12 |
| 3.2.2 | Phospholipide und Membranen | 16 |
| 3.3 | Klinische Bedeutung der Phospholipide | 17 |
| 3.3.1 | Genetische Defekte und Polymorphismen bei Enzymen des Methylierungsstoffwechsels..... | 19 |
| 3.3.2 | Diabetes | 20 |
| 3.3.3 | Schlaganfall | 22 |
| 3.3.4 | Lipide und neurodegenerative Krankheiten..... | 23 |
| 3.3.5 | Einfluss der Phospholipide auf den Lipoproteinstoffwechsel und damit auf Herz-Kreislaferkrankungen und Arteriosklerose | 26 |
| 3.4 | Fragestellung..... | 27 |
| 4 | Material und Methoden | 28 |
| 4.1 | Methoden der Phospholipidquantifizierung..... | 28 |
| | Geräte und Arbeitsmaterialien | 29 |
| 4.2 | | 29 |
| 4.3 | Studienprobanden..... | 31 |
| 4.3.1 | Kollektiv Diabetespatienten..... | 31 |
| 4.3.2 | Probanden zur Intervention mit B-Vitaminen | 31 |
| 4.4 | Lipidextraktion..... | 32 |
| 4.5 | Bedingungen der Ultra-Performance Flüssigkeits-chromatographie Tandem- Massenspektrometrie zur Phospholipidanalyse | 32 |
| 4.5.1 | Datenanalyse | 33 |
| 4.5.2 | Qualitätskontrolle | 35 |
| 5 | Ergebnisse | 36 |
| 5.1 | Identifikation der Phospholipidpeaks..... | 36 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.2 | Methodenvalidierung zur Phospholipidquantifizierung..... | 38 |
| 5.2.1 | Linearität und Sensitivität..... | 38 |
| 5.2.2 | Wiederfindungsrate, Präzision und Stabilität | 41 |
| 5.2.3 | Vergleich mit anderen Methoden zur PL-Quantifizierung..... | 44 |
| 5.3 | Plasma-Phospholipide bei Diabetespatienten und scheinbar gesunden Nichtdiabetikern | 46 |
| 5.4 | Phospholipide und andere Parameter nach Intervention mit B-Vitaminen..... | 71 |
| 6 | Diskussion | 82 |
| 7 | Publikationen..... | 96 |
| 8 | Danksagung | 97 |
| 9 | Literaturverzeichnis..... | 98 |

1 Zusammenfassung

In verschiedenen Studien wurde eine Veränderung der Fettsäurezusammensetzung oder der Konzentration der Phospholipid (PL) -Klassen bei Diabetes gezeigt. Die Wechselwirkungen zwischen Diabetes und PL sind allerdings noch nicht vollständig verstanden. Gerade sie stellen aber einen möglichen Ansatzpunkt zum besseren Verständnis und eventuell zur Prävention der Krankheit dar. Auch der Einfluss häufig bei Diabetes verabreichter Medikamente auf die PL-Konzentration sollte in diesem Zusammenhang weiter untersucht werden.

Daher führten wir eine Studie durch, bei der wir die PL-Zusammensetzung zwischen einer Gruppe von Diabetikern und gesunden Kontrollen verglichen. Weiterhin analysierten wir die Auswirkungen des Diabetesmedikaments Metformin und des weit verbreiteten und auch häufig bei Diabetikern eingesetzten Statin. Hierzu entwickelten wir eine neue, validierte Ultra-Performance Flüssigkeitschromatographie Tandem-Massenspektrometrie-Methode.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Plasma-Konzentration von Lysophosphatidylcholin (LPC) und Sphingomyelin (SM) bei Diabetikern signifikant geringer war. In der Teilgruppe der Statin-behandelten Diabetiker war die Konzentration von LPC und SM signifikant niedriger als bei unbehandelten Diabetikern. Bei Patienten mit Metformin-Behandlung war die Konzentration von LPC und Phosphatidylethanolamin (PE) signifikant geringer. Da beide Medikamente ebenso wie die Diabetes Erkrankung mit einer Verringerung der LPC-Konzentration assoziiert waren und Statine auch mit einer Verringerung der SM-Konzentration einhergingen, sollte man einen negativen Einfluss der durch Statine und/oder Metformin hervorgerufenen Änderung der PL-Konzentration auf Diabetes in Betracht ziehen.

Eine Beeinflussung der PL-Konzentration kann bei vielen Krankheiten sinnvoll sein und könnte in Zukunft auch bei Diabetes als möglicher Behandlungsansatz in Betracht gezogen werden. Hierzu bietet sich zunächst eine Supplementation mit Lipiden an, die im Fall von SM auch bereits erprobt wurde. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die PL-Zusammensetzung ebenfalls durch Supplementation mit B-Vitaminen beeinflusst werden kann. In einer von uns durchgeführten Suppletionsstudie mit B-Vitaminen stellten wir eine signifikante Konzentrationserhöhung bei mehr SM-Spezies fest als in der Kontrollgruppe. Dies spricht für eine positive Beeinflussung der PL-Konzentration in Hinblick auf die Ergebnisse unserer Diabetesstudie, da sie den bei Diabetikern beobachteten Konzentrationsänderungen entgegenwirkt. Weil die supplementationsbedingten Konzentrationsänderungen der betreffenden Spezies jedoch zwischen den Behandlungsgruppen nicht signifikant verschieden waren, sollten hierzu weitere Studien durchgeführt werden.

2 Summary

Phospholipids as biomarkers in diabetes and vitamin deficiency; method development and clinical studies

Several studies have shown a change in the fatty acid composition or the concentration of the phospholipid (PL) classes in diabetics. However, the interactions between diabetes and PL are not fully understood. These interactions may offer a chance for a better understanding and potentially even for a prevention of the disease. Because of their potential influence on the PL concentrations drugs that are typically used on diabetics also have to be taken into account.

We conducted a study in which we compared the PL content between a group of diabetics and healthy controls. We also analyzed the effect of metformin which is used in diabetes treatment and statins which are often used on diabetes patients. For this purpose we developed a new validated ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry-method.

The results of our study showed that plasma concentration of lysophosphatidylcholine (LPC) and sphingomyelin (SM) were significantly lower in diabetes patients. The concentration of LPC and SM was lower in statin treated than in untreated diabetics and the LPC and phosphatidylethanolamine (PE) concentration were significantly lower in diabetes patients receiving metformin treatment. Both treatments were associated with a decrease in LPC concentration just as diabetes and statin treatment was also associated with a decrease in SM. Therefore the PL concentration changes induced by those treatments may have a negative influence on diabetes.

Influencing the PL concentration can be beneficial in several diseases and may also be taken into account in diabetes in the future. A direct approach is the use of PL supplements. This has been tested with SM. However there are indications suggesting that B-vitamin supplementation can also influence the PL content.

We conducted a supplementation study with B-vitamins and we found a significant increase in the PL concentrations in more patients treated with B-vitamins than in controls. This suggests that B-vitamins have a positive influence on the PL concentration in regard to the results of our diabetes study because they counteract the concentration changes observed in diabetics. Because the supplementation-induced concentration changes were not significantly different between the treatment groups, further studies are necessary.

3 Einleitung

3.1 Nomenklatur

3.1.1 Phospholipidklassen

Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylcholin (PC), Lyso-Phosphatidylcholin (LPC) und Sphingomyelin (SM) zählen zu den wichtigsten Phospholipiden (PL) (**Abbildung 1-3-1**). Die Diglyceride PC und PE bestehen aus einem Glycerinmolekül, an das sowohl zwei unpolare Fettsäuren (FS) als auch Phosphat über eine Esterbindung gebunden sind. Das Phosphat bildet zusammen mit einem daran gebundenen Cholin- oder Ethanolaminmolekül die polare Kopfgruppe dieser PL. PE und PC unterscheiden sich nur durch die zusätzlichen Methylgruppen, die im Gegensatz zum Ethanolamin des PE im Cholinmolekül des PC vorkommen. Sowohl von PC als auch von PE existieren Lysoformen wie LPC. Diese Lysoformen entstehen, wenn von dem entsprechenden PC oder PE eine FS abgespalten wird. SM unterscheidet sich grundlegend von den anderen vorgestellten PL, da es sich bei SM nicht um ein Diglycerid handelt und es kein Glycerin enthält. Trotzdem ist die Struktur des SM sehr ähnlich. Die dem PC entsprechende Kopfgruppe ist mit einem Sphingosinmolekül verestert, welches strukturell das Glycerinmolekül und eine der FS des PC ersetzt. Die zweite FS ist über eine Amidbindung an das Sphingosin gebunden, die im gleichen Abstand zum Phosphor liegt wie die entsprechende Esterbindung im PC.

Andere wichtige Phospholipidklassen stellen z.B. Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinositol (PI) dar. PI ist wegen seiner Funktion als intrazelluläres Signalmolekül besonders gut untersucht [1].

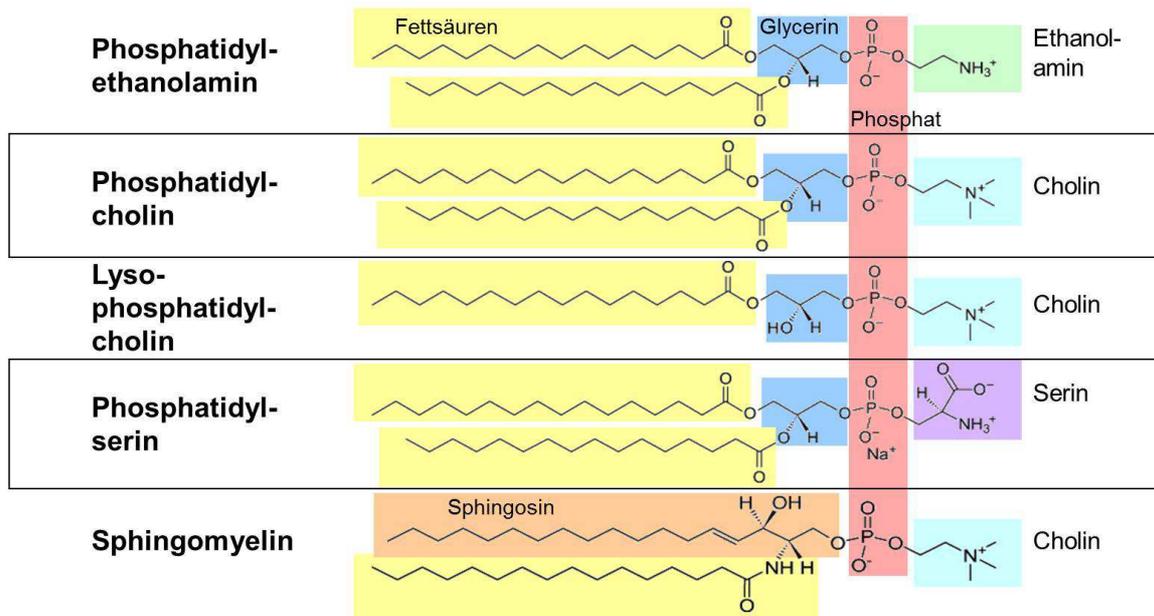


Abbildung 1-3-1: Phospholipidklassen

Die unterschiedlichen PL-Klassen haben aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur andere mechanische Eigenschaften im Verbund mit anderen Lipiden. Diese lassen sich grob mit einfachen geometrischen Formen beschreiben [2]. PC, SM und PS besitzen jeweils zwei Kohlenstoffketten, die gemeinsam ähnlich „breit“ sind wie die Kopfgruppe. Diese PL-Klassen haben daher eine Form, die grob als zylindrisch beschrieben werden kann. Diese Form fügt sich gut in Lipiddoppelschichten ein. Bei LPC und PE unterscheidet sich die „Breite“ der Kopfgruppe und der Alkylreste, sodass sie eine kegelähnliche Form aufweisen. LPC verfügt im Vergleich mit PC über die gleiche Kopfgruppe, aber nur über eine FS. Diese ist schmaler als die Cholin-Kopfgruppe und bildet daher die Spitze des Kegels. Lipidstrukturen, die ausschließlich aus LPC bestehen, bilden deshalb nicht die typischen Lipiddoppelschichten sondern Micellen, kleine Lipidkugeln, die aus nur einer Lipidschicht bestehen. Bei PE sowie auch Cardiolipin und Phosphatidsäure nehmen die unpolaren FS, besonders wenn sie ungesättigt sind, mehr Raum ein als die Kopfgruppen. Daher entspricht ihre Form der eines Kegels mit der Kopfgruppe als Spitze des Kegels. Beim Vergleich der Ethanolamin-Kopfgruppe mit der Cholin-Kopfgruppe ist nicht nur die sterische Hinderung durch die Methylgruppen am Cholin von Bedeutung, sondern auch die positive Ladung des Cholins. In einer Membran, in der vor allem andere PL mit Cholin-Kopfgruppen vorkommen, die ebenfalls positiv geladen sind, stoßen sich diese gegenseitig ab, sodass die Kopfgruppen effektiv mehr Platz benötigen [2].

3.1.2 Lipoproteine

Lipoproteine sind Komplexe aus Lipiden und Proteinen, deren Funktion im Transport nicht wasserlöslicher Lipide durch den Blutkreislauf besteht. Die wichtigsten Lipoproteinkomplexe sind Chylomikronen, Very Low Density Lipoproteine (VLDL), Intermediate Density Lipoproteine (IDL), Low Density Lipoproteine (LDL) und High Density Lipoproteine (HDL). Der Aufbau der Lipoproteinkomplexe besteht aus einer Hülle aus amphiphilen PL und Proteinen, in deren Innern sich lipophile Triglyceride und Cholesterinester befinden. Dies ist im Schema in **Abbildung 1-3-2** dargestellt. Die Hülle der Lipoproteinkomplexe entspricht in ihrem Aufbau einer einschichtigen Lipidmembran.

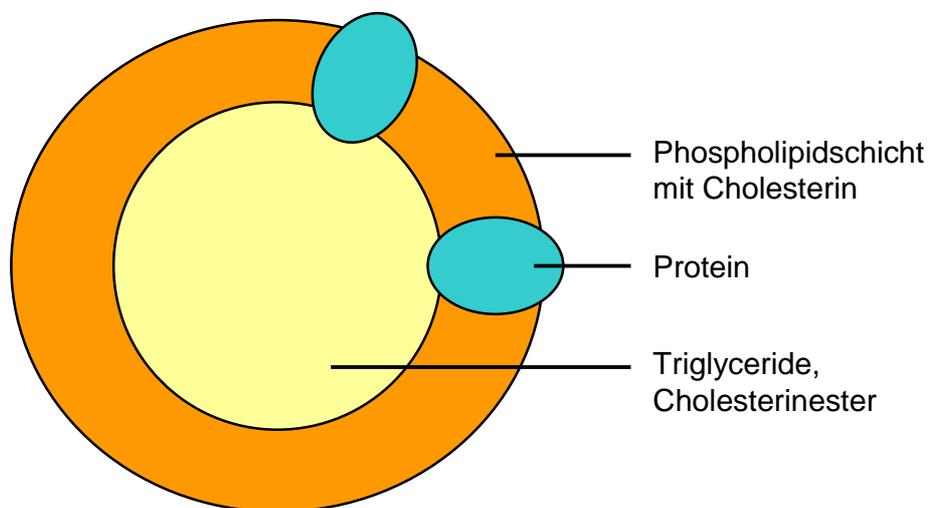


Abbildung 1-3-2: Aufbau der Lipoproteinkomplexe

Aus der Nahrung aufgenommene, exogene Lipide werden über im Darm gebildete Chylomikronen transportiert. Ein für Chylomikronen charakteristisches Protein ist das Apolipoprotein B-48. Die Apolipoproteine C und E (ApoC, ApoE) werden später von HDL auf die Chylomikronen übertragen. ApoB-haltige Lipoproteine (Chylomikronen, VLDL, IDL, LDL) binden an die Oberfläche von Endothelzellen, um in Kontakt mit der ebenfalls dort gebundenen Lipoprotein Lipase (LPL, EC Nummer 3.1.1.34) zu kommen. Die in den Chylomikronen enthaltenen Triglyceride werden durch die LPL gespalten, sodass die freiwerdenden FS von den verschiedenen Geweben verwendet werden können. ApoC spielt hierbei eine wichtige Rolle als Kofaktor der LPL. Wenn ein Großteil der Triglyceride abgebaut wurde, werden die Chylomikronen als Chylomikronen „remnants“ bezeichnet. Nun werden sie, vermittelt durch die LDL- oder LRP-Membranrezeptoren, von Hepatozyten

aufgenommen und in Lysosomen abgebaut. So gelangt im Besonderen das Cholesterin zur Leber.

Um endogene Lipide aus der Leber zu den verschiedenen Geweben zu transportieren, werden in der Leber VLDL gebildet. Diese enthalten im Besonderen das Apolipoprotein B-100. Die in den VLDL enthaltenen Triglyceride werden analog zu den bei Chylomikronen ablaufenden Prozessen durch die LPL gespalten und FS abgegeben. Dadurch werden die VLDL zu IDL und schließlich zu LDL umgewandelt [3]. Die LDL werden dann mit Hilfe des LDL-Rezeptors von Hepatocyten aufgenommen und abgebaut.

Um Lipide aus den Geweben zur Leber zu transportieren, werden die HDL verwendet. Sie werden ebenfalls von der Leber gebildet, enthalten allerdings zunächst keine Triglyceride oder Cholesterin, sondern nur PL und Proteine wie die Apolipoproteine AI und AII. Daher ist ihre Struktur eher flach als kugelförmig. Das in der Membran der Hepatocyten vorkommende Transportprotein ABCA1 hilft dabei, die ApoAI Proteine nach ihrer Synthese in die richtige Konformation zu bringen. Die HDL nehmen Cholesterin und Triglyceride aus den verschiedenen Geweben und von anderen Lipoproteinen auf. Da diese Lipide eine geringere Dichte haben als Proteine, sinkt die Dichte der HDL und es entstehen HDL-Fraktionen verschiedener Dichte. Die Dichte sehr lipidarmer HDL ist $>1,21$ g/ml. Die Dichte der Unterfraktion HDL-3 beträgt $1,12-1,21$ g/ml, die von HDL-2 beträgt $1,063-1,12$ g/ml und die Dichte von HDL-1 ist $<1,063$ g/ml [4]. Cholesterin kann als wasserlösliches Molekül zunächst einmal frei zu den HDL diffundieren. Um es länger in den Lipoproteinen zu halten, wird durch die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT EC-Nummer 2.3.1.43) ein FS-Rest von PC auf Cholesterin übertragen, sodass LPC sowie wasserunlösliche Cholesterinester (CE) gebildet werden, die im Kern der Lipoproteine verbleiben. Diese Reaktion ist für die Bildung normaler HDL unerlässlich.

Für den Efflux von Cholesterol aus verschiedenen Zellen zur Aufnahme durch HDL wird der ABCA1 Transporter verwendet. Der Austausch von CE und Triglyceriden zwischen Lipoproteinen findet über das Cholesterinester-Transferprotein (CETP) statt. Nachdem die HDL Lipide aufgenommen haben, werden sie über den HDL-Rezeptor / Scavenger-Rezeptor B1 von Hepatocyten gebunden und geben diese Lipide wieder ab. Ein Schema des Lipoproteinstoffwechsels ist in **Abbildung 1-3-3** abgebildet.

Lipoproteine sind besonders wegen ihrer Rolle bei der Entstehung von Arteriosklerose bekannt geworden. Generell geht man davon aus, dass eine hohe Konzentration von LDL das Arterioskleroserisiko erhöht [5], während HDL das Risiko senken.

Die Zusammensetzung der PL ist in den verschiedenen Gruppen von Lipoproteinkomplexen unterschiedlich. Sie wurde z.B. von Wiesner et al. [6] untersucht und ist in **Tabelle 3-1** aufgeführt.

Tabelle 3-1: Zusammensetzung der Phospholipide in verschiedenen Lipoproteinklassen, getrennt durch Fast Performance Lipid Chromatography nach [6] (Ergebnisse für gepoolte Fraktionen)

| | Prozentueller Anteil an den Gesamtphospholipiden | | | | | |
|------|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| | PC | LPC | SM | PE | pPE * | Cer |
| VLDL | 75,9% | 4,3% | 14,9% | 2,42% | 1,71% | 0,80% |
| LDL | 74,2% | 3,8% | 19,1% | 0,92% | 1,29% | 0,63% |
| HDL | 73,2% | 16,6% | 7,4% | 1,21% | 1,36% | 0,17% |

* Plasmalogen Phosphatidylethanolamin

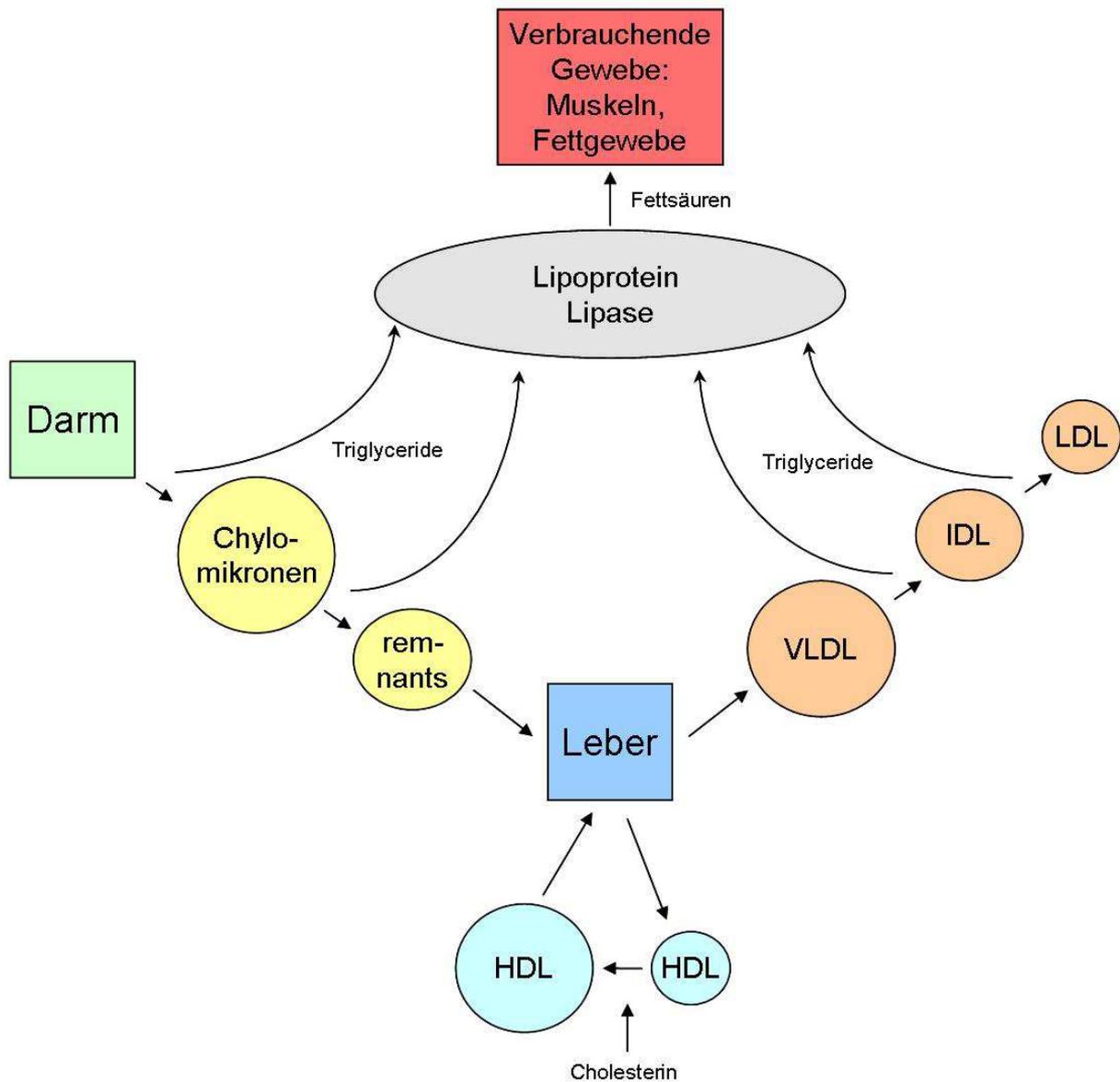


Abbildung 1-3-3: Lipoproteinstoffwechsel

3.1.3 Fettsäureketten der Phospholipide

Die FS in den in dieser Arbeit untersuchten PL sind unverzweigte Carbonsäuren mit endständiger Carboxygruppe. Sie unterscheiden sich in der Länge der Kohlenstoffkette sowie der Anzahl und Position eventuell vorhandener Doppelbindungen. Die FS werden durch Zahlen der Form „X:Y“ angegeben. „X“ gibt die Zahl der Kohlenstoffatome an und „Y“ bezeichnet die Anzahl der Doppelbindungen. Die Ölsäure mit einer Kettenlänge von 18 Kohlenstoffatomen und einer Doppelbindung wird so beispielsweise als 18:1 FS bezeichnet.

Bei über 2 FS verfügenden PL können diese in der Form „X1:Y1/X2:Y2“ angegeben werden. Oft wird allerdings die Summe der Kohlenstoffatome in beiden FS und die Summe der Doppelbindungen angegeben. Der Grund dafür ist, dass viele auf Massenspektrometrie basierende Detektionsmethoden sowie auch die in dieser Arbeit verwendete nicht in der Lage sind, PL-Spezies mit der gleichen Masse zu unterscheiden.

3.2 Biochemische Rolle der Phospholipide

Phospholipide sind die häufigsten Membranlipide und sind daher bei allen in und an den Membranen der Zelle stattfindenden Prozessen von Bedeutung. PL sind auch für andere Stoffwechselfvorgänge entscheidend. PC, das häufigste PL, ist die wichtigste Quelle für Cholin in der Nahrung [7]. PL nehmen außerdem Funktionen als Signalmoleküle oder bei der Bildung von Signalmolekülen wahr. Das aus SM gebildete Ceramid fördert generell die Apoptose [8] und das Ceramid-1-Phosphat wirkt dem entgegen [9]. Aus den in PL enthaltenen FS werden weiterhin Lipidmediatoren gebildet, die Entzündungsreaktionen regulieren [10,11]. Für die Regulation der Bildung dieser Lipidmediatoren werden unter anderem PI sowie phosphorylierte Formen des PI benötigt [1].

Beispiele für physiologische Änderungen der Phospholipidzusammensetzung

Altmaier et al. berichten von einer Zunahme der Konzentration bestimmter Sphingomyeline im Blutplasma bei erhöhtem Kaffeekonsum [12]. Eine weitere Studie ergab eine erhöhte Konzentration von LPC 14:0 und LPC 18:0 sowie eine verringerte Konzentration von LPC 18:1 bei Übergewicht [13,14].

3.2.1 Phospholipid-Biosynthese und der Methylierungskreislauf

Synthese von Phosphatidylcholin

Der Lipidstoffwechsel ist mit dem Methylierungskreislauf über Cholin und die Methylierung von PE verbunden. Die Reaktion wird durch das Enzym Phosphatidylethanolamin N-Methyltransferase (PEMT, EC Nummer 2.1.1.17) katalysiert und führt zur Bildung von PC. Die Methylgruppen stammen dabei vom häufigsten Methylgruppendonor S-Adenosylmethionin (SAM), welches zu S-Adenosylhomocystein (SAH) reagiert (**Abbildung 1-3-4**). Der PEMT-Stoffwechselweg kommt vor allem in der Leber zur Anwendung und macht dort etwa 30% der gesamten PC-Synthese aus [14]. Alternativ zum PEMT-

Stoffwechselweg kann PC auch über den in allen Körperzellen vorkommenden CDP-Cholin-Stoffwechselweg hergestellt werden, bei dem Cholin auf Diacylglycerol übertragen wird. Cholin kann zu Betain oxidiert werden und gilt daher auch als Methyl donor in der Zelle.

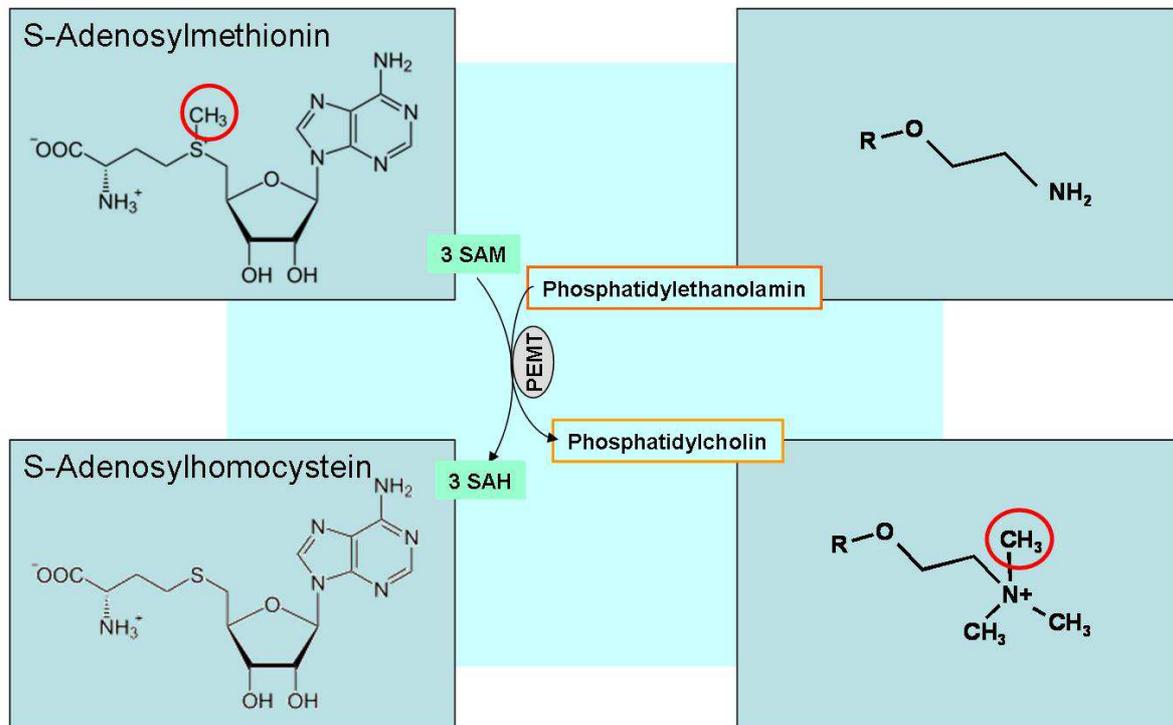


Abbildung 1-3-4:

PEMT-Stoffwechselweg: Methylierung von Phosphatidylethanolamin durch S-Adenosylmethionin führt zur Bildung von Phosphatidylcholin und S-Adenosylhomocystein.

Das zur Methylierung von PE benötigte SAM wird im Remethylierungskreislauf aus Methionin generiert (**Abbildung 1-3-5**). Dieses Methionin kann durch Methylierung von Homocystein (Hcy) hergestellt werden. Die Methylgruppe zur Regeneration von Methionin aus Hcy kann durch die Methionin-Synthase (EC Nummer 2.1.1.13) von 5-Methyl-Tetrahydrofolat (5-Methyl-THF) oder durch die Betain-Homocystein S-Methyltransferase (BHMT, EC Nummer 2.1.1.5) von Betain übertragen werden. Dabei entsteht Tetrahydrofolat (THF) aus 5-Methyl-THF und Dimethylglycin (DMG) aus Betain. SAM wird durch die Übertragung von Methionin auf Adenosintriphosphat (ATP) mit Hilfe der Methionin-Adenosyltransferase (MAT, EC Nummer 2.5.1.6) gebildet.

Die durch 5-Methyl-THF auf Hcy übertragene Methylgruppe stammt von Serin und wird durch die Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT, EC Nummer 2.1.2.1) auf THF übertragen. Dabei entstehen 5,10-Methylen-THF und Glycin. Das 5,10-Methylen-THF wird dann durch die Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR, EC Nummer 1.5.1.20) zu 5-Methyl-THF umgesetzt, welches dann eine weitere Methylgruppe auf Hcy übertragen kann.

Die verschiedenen, im Folatkreislauf vorkommenden Folatformen sowie die synthetisch hergestellte Folsäure können ineinander überführt werden.

Alternativ zur Remethylierung kann Hcy über die Cystathionin- β -Synthase (CBS, EC Nummer 4.2.1.22) zu Cystathionin und schließlich zu Cystein umgesetzt werden. Je nach Bedarf und Angebot aus der Nahrung muss die Konzentration der Metabolite durch feine Regulation der Synthesewege eingestellt werden. Eine Übersicht über diese Stoffwechselwege ist in **Abbildung 1-3-5** aufgeführt. Die Regulation des Methioninstoffwechsels auf verstärkte Transsulfurierung oder Remethylierung erfolgt über die Aktivität der beteiligten Enzyme. Wenn eine hohe SAM-Konzentration vorliegt, hemmt SAM die Methionin-Synthase und die MTHFR und damit die Remethylierung. Das Schlüsselenzym der Transsulfurierung CBS wird von SAM aktiviert. So wird ein Überschuss an Methionin und an Methylierungsreagenz über Cystathionin abgebaut. Wenn weniger SAM vorliegt, wird die Aktivität der CBS gesenkt und die der MTHFR und der Methionin-Synthase erhöht. Dies führt zur Konservierung des Methionin im Methioninkreislauf und zu einer Nachproduktion von Methylierungsreagenz [14].

Für die Synthese von PC über den PEMT-Stoffwechselweg wird in der Leber ein beträchtlicher Anteil des SAM verwendet. Daher konnte z.B. in einer Studie an gesunden Männern der Hcy-Spiegel durch eine Supplementation mit PC gesenkt werden [15]. Der Effekt kann dadurch erklärt werden, dass das supplementierte PC nicht mehr unter SAM-Verbrauch und Hcy-Bildung synthetisiert werden musste. Außerdem kann aus dem supplementierten PC Cholin gewonnen werden, das dann zu Betain oxidiert werden kann, welches wiederum zur Remethylierung von Hcy verwendet werden kann. So kann supplementiertes PC die Methylgruppen zur Methylierung von Hcy zur Verfügung stellen, sodass weniger SAM verbraucht wird.

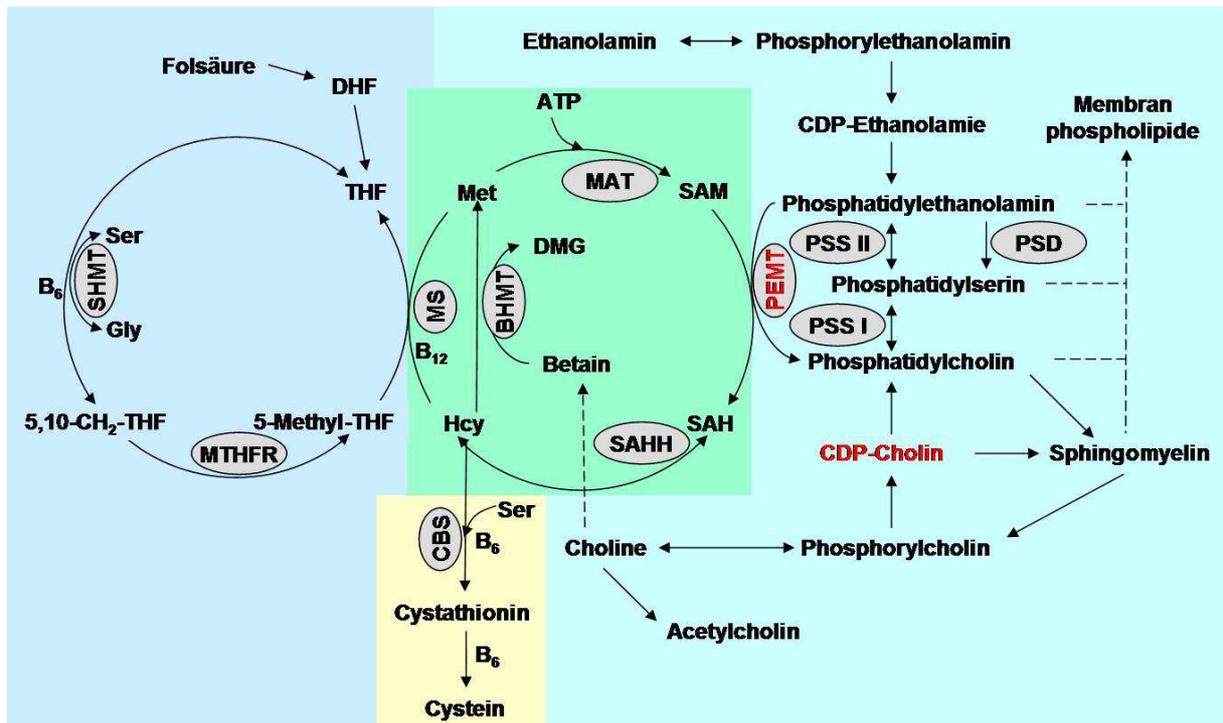


Abbildung 1-3-5:

Methylierungskreislauf: Der durch Übertragung eines Adenosylrests auf Methionin hergestellte Methylgruppendonator S-Adosylmethionin (SAM) wird unter anderem zur Bildung von Phosphatidylcholin durch Methylierung von Phosphatidylethanolamin verwendet. Dabei entsteht S-Adosylhomocystein (SAH), welches durch Entfernen des Adenin zu Homocystein (Hcy) umgewandelt wird. Das Hcy kann durch Übertragung einer über den Folatkreislauf zur Verfügung gestellten Methylgruppe wieder zu Methionin regeneriert werden.

Neben der Synthese von PL über den PEMT-Stoffwechselweg stehen der Methylierungs- und der Lipidstoffwechsel auch über andere Prozesse in Verbindung. So konnten beispielsweise Huang et al. bei Ratten zeigen, dass bestimmte FS die Expression und die Aktivität von Enzymen des Methylierungsstoffwechsels beeinflussen [16]. Bei Supplementation mit docosahexaensäurereichem Thunfischöl beobachteten sie eine erhöhte Aktivität der MAT sowie eine erhöhte Expression der für MAT und Cystathionin- γ -Synthase (CSE; EC Nummer 2.5.1.48) kodierenden mRNA. Die CSE katalysiert einen wichtigen Stoffwechselschritt bei der Transsulfurierung. Die erhöhte Expression der CSE- und MAT-mRNA führte nach Huang et al. zu einer signifikanten Reduzierung der Plasma-Hcy-Konzentration. Bei Supplementation mit vor allem aus Eicosapentaensäure bestehendem Lachsöl war dieser Effekt nicht zu beobachten [16].

In der Phospholipidschicht von Lipidtröpfchen, zur intrazellulären Speicherung von Triglyceriden verwendeter Organellen, findet sich im Vergleich zur zellulären Membran ein höherer Anteil an PC, welches aus PS synthetisiert wurde, wie Hörl et al. unter Verwendung

von isotopenmarkiertem PS zeigen konnten [17]. Der PL-Stoffwechsel spielt daher auch bei der Regulation der Bildung der Lipidtropfen eine Rolle. Bei der Bildung von Adipocyten aus Fibroblasten wurde eine Zunahme der PE-Konzentration im Verhältnis zu PC festgestellt [17]. Bei der Ausdifferenzierung von Adipozyten sind PL also ebenfalls von Bedeutung.

Umgekehrt zur Bildung von PC aus PE über den PEMT- oder den CDP-Stoffwechselweg kann PE auch aus PC gebildet werden. Ein Stoffwechselweg hierfür besteht aus einer Reaktion von PC zu PS, katalysiert durch die Phosphatidylserin-Synthase 1 (PSS1; EC Nummer 2.7.8.8) und einer anschließenden Reaktion von PS zu PE, katalysiert durch die Phosphatidylserin Decarboxylase (PSD; EC Nummer 4.1.1.65). Dies spielt nach Hörl et al. möglicherweise eine Rolle bei der Ausdifferenzierung von Adipocyten, da hier erst in der Wachstumsphase des Lipidtropfens eine verstärkte Synthese von PE über PS stattfindet und später, wenn der Lipidtropfen stabilisiert werden soll, die PC-Synthese aus PE durch verstärkte Expression von PEMT angeregt wird [17].

3.2.2 Phospholipide und Membranen

Die wichtigste Funktion der PL ist die Bildung von Biomembranen. Diese Membranen haben die Struktur einer Lipiddoppelschicht (**Abbildung 1-3-6**), in der die hydrophoben FS der amphiphilen PL mit anderen FS in Kontakt kommen, während die polaren, hydrophilen Kopfgruppen mit der wässrigen Phase interagieren können. Diese Lipiddoppelschichten können sich sogar spontan aus PL in Wasser bilden, da sie energetisch besonders günstige Strukturen für dieses System darstellen.

Die Lipiddoppelschicht ist weitgehend undurchlässig für wasserlösliche Stoffe. Daher eignen sich durch sie getrennte Kompartimente als definierte Reaktionsräume, in denen verschiedene Konzentrationen hergestellt werden können. Lipidmembranen sind in der Regel durchsetzt mit verschiedensten membranintegralen und membranassoziierten Proteinen. Diese können unterschiedlichste Funktionen wahrnehmen, zu denen häufig der Transport von Stoffen durch die Membran gehört. Der Transport kann diffusiv durch Poren, Kanäle und ähnliche Strukturen erfolgen oder auch gerichtet. Durch diese (kontrollierten) Transportprozesse können in der Zelle Stoffgradienten über die verschiedenen Membranen aufgebaut und kontrolliert werden. Von besonderer Bedeutung sind hier z.B. die Elektronentransportketten der Photosynthese und der mitochondrialen Atmung, bei denen teilweise innerhalb der Membran stattfindende Reaktionen mit einem Protonengradienten über die Membran gekoppelt werden und in einem komplexen, mehrere Proteinkomplexe umfassenden Prozess

zur Energiegewinnung genutzt werden. Die PL in der Membran interagieren mit den Membranproteinen und spielen bei den beschriebenen Prozessen ebenfalls eine wichtige Rolle.

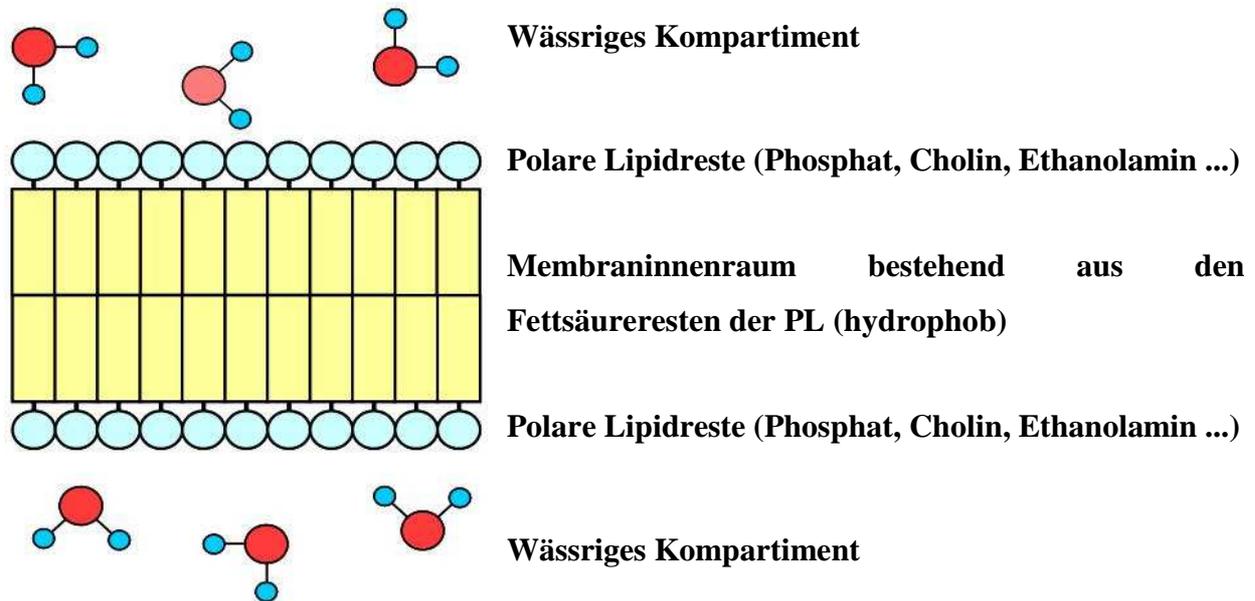


Abbildung 1-3-6: schematischer Aufbau der Lipiddoppelschicht

3.3 Klinische Bedeutung der Phospholipide

Unabhängig von der Wirkung der einzelnen FS konnte die Bedeutung der PL für verschiedene physiologische Zustände und Krankheiten in verschiedenen Fällen gezeigt werden.

Folgen eines Vitaminmangels

Zusammenhänge zwischen B-Vitaminen und PL sind schon seit langem bekannt. So berichten Delorme et al., dass ein Vitamin-B6-Mangel bei Ratten zu einer Veränderung der PL-Zusammensetzung führt [18]. Die PL enthielten weniger Arachidonsäure und mehr Linolensäure. Diese Veränderung war in der Leber am ausgeprägtesten [18] und kann auf Veränderungen in der PL-Synthese zurückgehen. Diese Veränderungen in der PL-Synthese können entweder über den CDP-Stoffwechselweg oder durch den vom Methylierungsstoffwechsel und damit von B-Vitaminen abhängigen PEMT-Stoffwechselweg

stattfinden. Diese Erklärung des Zusammenhangs erscheint wahrscheinlich, da über den PEMT-Stoffwechselweg andere PC-Spezies hergestellt werden als über den CDP-Stoffwechselweg [19]. Im Besonderen enthielten die über den PEMT-Stoffwechselweg hergestellten Spezies mehr Arachidonsäure. Dies deckt sich mit der Beobachtung von Delorme et al. [18].

Neben den Effekten, die sich über die gut erforschten PEMT- und CDP-Stoffwechselwege erklären lassen, gibt es auch Zusammenhänge zwischen B-Vitaminen und Lipiden, die wahrscheinlich über andere Mechanismen wirken. So z.B. die von Ojeda et al. gemachte Beobachtung, dass die Lipidveränderungen, die bei Ethanol aufnehmenden Ratten und bei Rattenjungen, deren Mütter Alkohol tranken, auftreten, durch Folatgabe reduziert werden konnten [20].

Bei einem Mangel an Vitamin B12 wird die Funktion der B12-abhängigen MESE beeinträchtigt. Ein solcher Mangel kann z.B. durch eine Störung des Intrinsic-Faktors hervorgerufen werden, eines Proteins, das für die Aufnahme von Vitamin B12 aus der Nahrung notwendig ist. Um Vitamin B12 aus der Nahrung aufnehmen zu können, muss dieses erst von Proteinen in der Nahrung abgespalten werden, wobei ein niedriger pH-Wert der Magensäure hilfreich ist. Dies ist ein möglicher Grund dafür, dass das, die Protonenpumpen der Belegzellen hemmende, Medikament Omeprazol ebenfalls zu einem Vitamin-B12-Mangel führt [21,22].

Da die MTHFR bei Vitamin-B12-Mangel allerdings weiterhin 5-Methyl-THF produziert, führt dies zu einer Akkumulation von Folat in Form von 5-Methyl-THF. Die Reaktion zur Bildung von 5-Methyl-THF ist nicht reversibel und es kann nur durch die Methylierung von Hcy verstoffwechselt werden. Daher spricht man von einer „Folatfalle“ (engl. folate trap). Ein starker B12- oder Folatmangel führt zu megaloblastischer Anämie. Wenn bei einem durch B12-Mangel und durch die „folate trap“ hervorgerufenen effektiven Folatmangel Folsäure verabreicht wird, verhindert dies das Auftreten megaloblastischer Blutzellen und „maskiert“ so den B12-Mangel. Wenn dieser Vitaminmangel über eine längere Zeit nicht behandelt wird, kann er zu schweren neurologischen Schäden führen [14].

Hypomethylierung

Eine Störung des Kreislaufs und der Methioninregeneration, welche zum Beispiel durch einen Mangel an Folat oder B-Vitaminen verursacht werden kann, führt zunächst zu einer Akkumulation von Hcy und SAH und einer Verringerung der SAM-Konzentration. Erhöhte Hcy-Konzentrationen werden mit zahlreichen Krankheiten in Verbindung gebracht. Beispiele sind Parkinson [23], Alzheimer [24] und kardiovaskuläre Erkrankungen, bei denen in

verschiedenen Arbeiten für [25] und gegen [26] eine Bewertung des Hcy als Risikofaktor argumentiert wird. Da die SAM-Konzentration zurückgeht und SAH auf viele Methylierungsreaktionen, unter anderem auf die durch PEMT katalysierte Bildung von PC [27], kompetitiv hemmend wirkt, kann ein Zustand der Hypomethylierung entstehen, und weil die Methylierung der DNA wichtig für die Regulation der Genexpression ist, kann eine gestörte Methylierung möglicherweise cancerogen wirken [28-30].

Eine vorliegende Hypomethylierung kann auch die PC-Synthese beeinträchtigen. Besonders kritisch ist dies, wenn PC, z.B. auf Grund eines Cholinmangels, auch nicht über den CDP-Cholin-Stoffwechselweg hergestellt werden kann. Wenn eine ausreichende PC-Synthese nicht gewährleistet ist, kann dies zu Leberverfettung führen, da PC zur Bildung von VLDL benötigt wird. VLDL spielen eine wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel und transportieren Triglyceride und Cholesterin aus der Leber zu den verschiedenen Geweben. Eine Störung der VLDL-Synthese bewirkt eine Schädigung der Leber. Eine solche wurde z.B. bei Mäusen beobachtet, deren PEMT durch eine Mutation deaktiviert war, wenn sie unter Cholinmangel litten [31]. Die Leber der Mäuse war blass und vergrößert. Außerdem waren die Plasma-Aktivitäten der Aspartat Aminotransferase und der Alanin Aminotransferase erhöht, was ebenfalls auf eine Schädigung der Leber hindeutet.

3.3.1 Genetische Defekte und Polymorphismen bei Enzymen des Methylierungsstoffwechsels

Genetische Defekte wie Mutationen der CBS können zu starker Hyperhomocysteinämie (Hcy > 70 $\mu\text{mol/L}$) und Homocysteinurie führen [32]. Der wichtigste genetische Faktor, der zu einer leichten Hyperhomocysteinämie (Hcy 12-20 $\mu\text{mol/L}$) führt, ist der C677T Einzelnucleotid-Polymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) der MTHFR. Bei Probanden mit homozygoter T/T Form liegt die Enzymaktivität bei ~30% der Aktivität bei Probanden mit C/C Genotyp. Beim heterozygoten Genotyp beträgt sie ~65% [33]. Dieser Polymorphismus kommt homozygot zu bis zu 20% in der Bevölkerung vor [34]. Die Position 1298 in der Aminosäuresequenz der MTHFR kann von einem weiteren, relativ häufigen Polymorphismus des MTHFR-Gens betroffen sein (~10%) [35].

Der homozygote C/C Genotyp zeigt eine Enzymaktivität, die bei etwa 60% des A/A Genotyps liegt. Unabhängig von anderen genetischen Variablen hat dieser Polymorphismus anscheinend keinen signifikanten Einfluss auf die Plasma-Hcy-Konzentration.

Andere für den Methylierungsstoffwechsel bedeutende Polymorphismen kommen unter anderem bei der MeSe vor. Ein Beispiel ist der A2756G Polymorphismus, der keinen signifikanten Einfluss auf den Hcy-Spiegel zeigte [36,37], nach Gueant-Rodriguez et al. allerdings mit einem erhöhten Risiko für Neuralrohrdefekte assoziiert ist [38].

3.3.2 Diabetes

Dass ein Zusammenhang zwischen Diabetes und dem Lipidstoffwechsel besteht, wurde zunächst in Studien gezeigt, welche die Konzentration verschiedener FS im Blut untersuchten [39-41]. Dabei benutzen sie i.d.R. auf gaschromatographischer Trennung beruhende Methoden, die nur freie oder von PL abgespaltene FS und keine ganzen PL erfassen. So vermerken z.B. Patel et al. und L. Wang et al., dass gesättigte FS im Blut mit einem erhöhten Diabetesrisiko assoziiert sind [39,40]. Rodriguez et al. beobachteten bei Diabetes mellitus Typ 2 einen Rückgang der Konzentration bestimmter FS (14:0, 15:0 und 17:0) im Blutplasma sowie Konzentrationsveränderungen der FS (14:1, 20:0, 24:1, 16:1 ω 7 und 18:4 ω 3) in den PL der Erythrozyten. Die Konzentration der FS 18:0, 18:1, 20:0 war in den Erythrozyten un behandelter Diabetiker gegenüber gesunden Kontrollen verringert. Bei Diabetikern, die mit Glibenclamid behandelt wurden, war die Konzentration dieser FS gegenüber un behandelten Diabetikern erhöht und damit ähnlich wie bei gesunden Kontrollen. Die PL-Klassen oder Spezies, bei denen diese Veränderungen auftraten, wurden allerdings nicht ermittelt [41].

Die PL im Blut von Diabetikern wurden beispielsweise von Pang et al. untersucht, die einzelne Spezies aus 7 Lipidklassen quantifizierten und deren Konzentration stellvertretend für die Konzentration der entsprechenden Lipidklasse verwendeten [42]. Pang et al. untersuchten verschiedene Stadien der diabetischen Nephropathie und beobachteten, dass PC-, PE- und Phosphatidylglycerol (PG)-Konzentrationen bei Diabetespatienten generell geringer waren, während die LPC-Konzentration bei früheren Stadien höher und bei späteren Stadien niedriger war als bei gesunden Testpersonen [42]. Für SM zeigte sich kein erkennbarer Trend zu veränderten Konzentrationen bei Diabetespatienten [42]. Shui et al. dagegen konnten eine Assoziation von Diabetes mit einer geringeren SM-Konzentration feststellen[43]. Sie führten eine Studie an diabetischen Affen durch, die sie mit gesunden Kontrollen verglichen.

Der Einfluss des LPC, den Pang et al. [42] beobachteten, wurde auch von Pietilainen et al. verzeichnet [44]. Nach Pietilainen et al. hat LPC allerdings eine spezifischere Bedeutung. Bei einer Studie zum Einfluss von Fettleibigkeit auf das Lipidprofil bei Zwillingen demonstrierten

sie, dass erhöhte Konzentrationen von LPC und niedrigere Konzentrationen von Ether-PL mit erhöhter Insulinresistenz assoziiert waren [44].

Einzelne PL-Spezies wurden von Wang et al., untersucht, die PE 38:6, PE 38:4, LPC 16:0, und LPC 18:0 als potentielle Marker zur Unterscheidung von Diabetespatienten und Probanden ohne Diabetes identifizierten [45].

Die Veränderungen der LPC-Konzentration haben sich in verschiedenen Studien bestätigt [42-44]. Eine Zunahme der Aktivität der Phospholipase A2 (PLA2; EC Nummer 3.1.1.4), welche durch die Proteinkinase C (PKC; EC Nummer 2.7.11.13) aktiviert wird, wurde in diesem Zusammenhang diskutiert [42], denn die Aktivierung dieser Kinase wurde bereits bei Diabetes beschrieben [46]. Interessant ist in diesem Zusammenhang weiterhin, dass LPC bei Adipocyten eine stärkere Expression des Glukosetransporters GLUT4 und eine erhöhte Glukoseaufnahme in einem Mausmodell für Diabetes bewirkte [47]. Weiterhin verringerte die Gabe von LPC die Glukosekonzentration im Plasma [47]. LPC induziert nach Yea et al. nicht die Phosphorylierung der Insulin-Rezeptorsubstanz 1 (IRS) oder der Proteinkinase B2 (EC Nummer 2.7.11.1), die zur insulininduzierten Glukoseaufnahme benötigt werden. Durch Hemmung der PKC dagegen konnte die LPC-induzierte Glukoseaufnahme verhindert werden [47]. Der Effekt des LPC wird also über einen anderen Mechanismus vermittelt als der des Insulin. LPC scheint allgemein eine Bedeutung bei der Regulation des Blutzuckerspiegels zu haben und damit möglicherweise eine wichtige, bisher wenig untersuchte Rolle bei Diabetes mellitus zu spielen.

Diabetes kann zu verschiedenen Folgeerkrankungen führen (wie Nephropathie, Retinopathie und Krebs). Bei einigen dieser Folgeerkrankungen wurde der Einfluss von Lipiden im Speziellen untersucht. Zu erwähnen ist hier besonders die Arbeit von Pang et al. [42], die Veränderungen der PL-Konzentration mit bestimmten Stadien der diabetischen Nephropathie in Verbindung brachten. Weiterhin ist hervorzuheben, dass bei diabetischer Nephropathie eine geringere glomerulare Filtrationsrate und höhere Inzidenz an kardiovaskulären Vorfällen nach einer B-Vitamin-Supplementation beobachtet wurden [48]. Um die Generalisierbarkeit dieses Ergebnisses zu überprüfen sowie mögliche Mechanismen aufzuklären, sind weitere Untersuchungen notwendig. Hier kann die Untersuchung anderer, über den Methylierungsstoffwechsel mit den B-Vitaminen in Verbindung stehender Metabolite wie der PL sinnvoll sein.

Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Patienten mit diabetischer Nephropathie zeigten eine signifikante Abnahme der Konzentration von zwei Zwischenprodukten der Synthese von Ceramiden und SM [49]. Es scheint ein Zusammenhang zwischen Glycosylceramiden, mit SM verwandten Metaboliten und dem Glukosestoffwechsel sowie mit diabetischer

Nephropathie zu bestehen. Dieser konnte bei Ratten gezeigt werden [50]. Weiterhin wird sogar eine Sphingolipidsupplementation zur Behandlung und Prävention von Diabetes mellitus Typ 2 diskutiert [51].

Eine weitere Folgeerkrankung, bei der der Einfluss von Lipiden untersucht wird, ist die diabetische Retinopathie. So beschreiben z.B. Tikohonenko et al., dass bei Diabetes Fettsäure-Elongasen (EC Nummer 2.3.1.119) in der Retina herunterreguliert werden und die Konzentration von Docosahexaensäure in der Retina verringert wird. Außerdem berichten sie von einem geringeren Einbau mehrfach ungesättigter FS in das PC der Retina. Dies ging mit einer Entzündung der Netzhaut einher [52].

Einfluss von Medikamenten auf den Phospholipidstatus bei Diabetikern

Metformin ist ein weitverbreitetes antidiabetisches Medikament, welches die Glukoneogenese verringert. Es konnte gezeigt werden, dass es ebenfalls den PL-Stoffwechsel beeinflusst. Eine Metforminbehandlung führte in einer Studie an 20 gesunden Patienten [53] sowie in Zellkulturen [54] zu einer LPC-Reduktion. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Metformin den Hcy-Spiegel erhöhen kann [55,56]. Diese Erhöhung konnte durch Folatsupplementation vermieden werden [55].

Statine hemmen die Cholesterinsynthese und werden zur Prävention von Arteriosklerose verwendet. Da bei vielen Diabetespatienten ein hohes Arterioskleroserisiko vorliegt, werden sie häufig mit einer präventiven Statintherapie behandelt. Neben Cholesterin werden auch die Plasma-Konzentrationen der PL durch Statine beeinflusst. Eine Behandlung mit Simvastatin führte in einer Studie an 26 Diabetikern nach 3 Monaten zu einer signifikanten Abnahme des LPC 16:0-Gehalts in den LDL [57]. Weiterhin wurde in einer Metaanalyse aus 13 Studien mit insgesamt über 90000 Patienten eine Zunahme des Diabetesrisikos durch Statine festgestellt [58]. Diese Zunahme schien dosisabhängig zu sein [59]. Des Weiteren konnte durch Atorvastatin die Insulinresistenz in einem Mausmodell für Diabetes erhöht werden [60].

3.3.3 Schlaganfall

In Deutschland starben im Jahr 2009 ca. 25000 Menschen an den Folgen eines Schlaganfalls (ICD-10 Nr.:I64) [61]. Verschiedene Untersuchungen an Tiermodellen sowie klinische Studien am Menschen geben Hinweise auf eine mögliche Prävention von Schlaganfällen durch ungesättigte FS, wie z.B. durch eine fischreiche Ernährung. Bei mit ω -3-FS aus Fisch supplementierten, ischämischen Ratten wurde eine signifikant geringere Zahl von

apoptotischen Neuronen im Hippocampus [62] und auch im prefrontalen Kortex [63] beobachtet als bei Ratten mit einer normalen Diät. Heurtreaux et al. konnten in einem Mausmodell die Folgen eines Schlaganfalls mit α -Linolensäure, nicht jedoch durch Palmitinsäure abmildern [64]. Koizumi et al. [65] fanden Hinweise auf eine Funktion bestimmter, einzelner PL-Spezies bei Schlaganfällen. In einer Arbeit, die sich mit den Gehirnen ischämischer Ratten befasst, vermerken sie, dass im Herd der Ischämie, verglichen mit normalen Gehirnbereichen, PC (16:0/18:1) reduziert und LPC (16:0) erhöht waren [65]. Tanaka et al. zeigten bei einer Studie an einer Gruppe von an Hypercholesterolemie leidenden und in geringen Dosen mit Statin behandelten Japanern einen positiven Effekt einer Eicosapentaensäuresupplementation. Diese konnte das Auftreten von Schlaganfällen in einer Teilpopulation, die bereits einen Schlaganfall erlitten hatte, signifikant verringern [66]. Mozaffarian et al. berichten weiterhin, dass bei älteren Probanden ein regelmäßiger Verzehr von gekochtem Fisch ein geringeres Risiko von ischämischen Schlaganfällen zur Folge hat [67]. Wennberg et al. konnten dagegen keine signifikante Verringerung des Schlaganfallrisikos durch Fischkonsum feststellen [68].

3.3.4 Lipide und neurodegenerative Krankheiten

Yaguchi et al. berichten, dass PE 18:2/18:2 die altersabhängige Abnahme des räumlichen Erinnerungsvermögens positiv beeinflusste [69]. Als Erklärung hierfür führen sie das Verhindern von neuronalem Zelltod an, da das PL in Versuchen mit Zellkulturen die Überlebensrate der Zellen steigern konnte.

Alzheimer

Die Alzheimersche Krankheit ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung. Histologisch wird sie durch intrazelluläre „tangles“ aus Tau-Proteinen und extrazelluläre Plaques aus Amyloid- β -Peptiden (A β) charakterisiert. Generelle Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Lipiden und der Alzheimerschen Krankheit bietet z.B. die von Fassbender et al. gemachte Beobachtung, dass Simvastatin die A β -Konzentration senken kann [70]. Da die bei der Bildung von A β beteiligten Proteine integrale Membranproteine sind und Reaktionen wie der durch das Enzym γ -Sekretase (wichtigstes Protein des Komplexes: Presenilin; EC Nummer 3.4.23) katalysierte, letzte Schritt zur Bildung von A β sogar innerhalb der Membran stattfinden, ist ein Einfluss der membrankonstituierenden Lipide wahrscheinlich [71]. Von besonderer Bedeutung ist die Konzentration von Cholesterin und SM, da die γ -Sekretase

besonders in Lipid Rafts, cholesterin- und sphingolipidreichen Membranbereichen vorkommt [72]. Grimm et al. demonstrierten an Maus-Zellkulturen, dass SM die A β -Produktion erhöht und A β -42 die SM-Konzentration durch Aktivierung der SM zu Ceramid abbauenden Sphingomyelinase (EC Nummer 3.1.4.12) senkt [73]. Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus zwei post mortem Untersuchungen an den Gehirnen von Alzheimerpatienten. So verzeichneten He et al. eine signifikant verringerte SM-Konzentration im Vergleich mit Kontrollen [74]. Cutler et al. konstatierten ebenfalls eine geringere SM-Konzentration bei Alzheimer, dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant [75].

Andere Studien melden dagegen eine signifikante Erhöhung der SM-Konzentration bei Alzheimer. Dies war bei post mortem Untersuchung von Hirngewebe bei Pettegrew et al. und Bandaru et al. der Fall [76,77]. Weiterhin stellten Kosicek et al. einen signifikanten Anstieg der relativen SM-Konzentration um $24,3\% \pm 2,4\%$ im Liquor von Alzheimerpatienten im Vergleich mit Kontrollen fest [78]. Das Auftreten von Studien, welche sowohl eine erhöhte als auch eine verringerte SM-Konzentration bei Alzheimer zeigen, kann auf Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungen zurückgehen, denn in den verschiedenen Studien wurden unterschiedliche Bereiche des Gehirns untersucht und auch die Alzheimer Diagnose wurde mit unterschiedlichen Methoden erstellt. Außer SM wurde auch für andere Sphingolipide ein Zusammenhang mit der Alzheimerschen Krankheit beschrieben.

Mielke et al. beobachteten, dass erhöhte Serumkonzentrationen von Gesamt-SM, bestimmten Ceramidspezies (16:0, 18:0, 22:0, 24:1, 24:0) sowie Sulfatiden mit einem erhöhten Risiko für Gedächtnisstörungen assoziiert sind [79]. Da Gedächtnisstörungen in frühen Stadien der Alzheimerschen Krankheit beobachtet werden, schlagen Mielke et al. die Prüfung der von ihnen mit Gedächtnisstörungen in Verbindung gebrachten Sphingolipide als präklinische Prädiktoren von Alzheimer vor.

Neben SM werden auch andere PL mit Alzheimer in Verbindung gebracht. So demonstrierten Sheikh et al., dass LPC die Bildung von Fibrillen aus Amyloid- β -Peptiden moduliert und im Besonderen die Fibrillenbildung bei Amyloid β (1-42) steigert [80]. Prasad et al. beschreiben einen Rückgang der Konzentration bestimmter FS in den PL-Klassen PE und PI im Hippocampus und im PE des inferioren parietalen Kortex von Alzheimerpatienten [81]. Nitsch et al. verzeichneten einen signifikanten Rückgang der PC- und PE-Konzentration in der grauen Substanz des Kortex und eine Erhöhung der Glycerophosphocholin- und Glycerophosphoethanolaminkonzentration jeweils im Verhältnis zu PC bzw. PE [82]. Diese Veränderung wurde von Nitsch et al. mit einem Abbau der Zellmembran in Zusammenhang gebracht. Nitsch et al. beobachteten sie nur bei Alzheimer, nicht jedoch bei Parkinson, Down-Syndrom oder bei Chorea Huntington [82].

Chorea Huntington

Chorea Huntington ist eine weitere weitverbreitete neurodegenerative Erkrankung. Hierbei handelt es sich um eine Erbkrankheit, die zu Bewegungsstörungen führt. Clifford et al. konnten in einem Mausmodell die Symptome der Krankheit durch Supplementation mit Linolsäure und anderen essentiellen FS verringern [83]. Vaddadi et al. sowie Das Undurti et al. meldeten einen positiven Einfluss einer Supplementation mit ungesättigten FS beim Menschen [84,85].

Parkinson

Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Krankheit nach der Alzheimerschen Krankheit. Die wichtigsten Symptome sind Rigor, Bradykinese, Tremor und Haltungsinstabilität. Die Krankheit zeichnet sich durch ein Absterben von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra Pars compacta und die Bildung von Lewy-Körpern aus, welche größtenteils aus Akkumulationen des Proteins α -Synuclein bestehen.

Verschiedene Untersuchungen konnten einen direkteren Zusammenhang zwischen Lipiden und der Parkinsonschen Krankheit zeigen [86]. Manche Studien stellten fest, dass Cholesterinsenker einen positiven Einfluss bei Parkinson haben können [87]. So fanden z.B. Koob et al., dass Lovastatin der Akkumulation von α -Synuclein in einem Mausmodell für Parkinson entgegenwirkte [88]. Bodner et al. [89] meldeten, dass Mutanten des Proteins α -Synuclein, welche bei erblichen Formen von Parkinson vorkommen, eine stärkere Tendenz haben, eine bestimmte Form der Bindung zu PL einzugehen, welche anfälliger für α -Synuclein Aggregationen ist. Außerdem zeigte Supplementation mit Fischöl, und damit ω -3-FS, bei da Silva et al. eine Verbesserung der Symptome einer die Parkinsonsche Krankheit begleitenden Depression [90]. Tanriover et al. demonstrierten, dass Docosahexaensäure dopaminerge Neuronen im Rattenmodell für Parkinson vor Zelltod schützen kann [91].

Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen Parkinson und anderen neurodegenerativen Erkrankungen und Markern des Methylierungsstatus [23,92]. Ein Hinweis auf diese Zusammenhänge ist, dass Crowell et al. durch eine Injektion von SAM in das Gehirn von Ratten parkinsonähnliche Symptome auslösen konnten [93].

3.3.5 Einfluss der Phospholipide auf den Lipoproteinstoffwechsel und damit auf Herz-Kreislaufkrankungen und Arteriosklerose

LPC wird generell als proinflammatorische und Arteriosklerose verstärkende Substanz angesehen [94]. Des Weiteren beobachteten Olthoff et al. bei Supplementierung mit PC oder Betain eine Zunahme der Plasma-Cholesterinkonzentration, die sie mit einer Zunahme der VLDL-Konzentration begründen [95]. PC wird für die Bildung von VLDL benötigt und Betain kann die PC-Konzentration durch Remethylierung von Hcy und dadurch erhöhte SAM-Konzentration und stärkere Methylierung von PE erhöhen. Die Supplementierung sollte bei Olthoff et al. zur Hcy-Senkung und zur möglichen Prävention von Herz-Kreislaufkrankungen und Schlaganfällen verwendet werden. Leberverfettung durch starken Mangel an VLDL spielt in diesem Zusammenhang keine Rolle. Daher wird die erhöhte Plasma-Cholesterinkonzentration als negativ angesehen, da sie das Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen und Schlaganfälle erhöht. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Zhao et al., die ein geringeres Auftreten von Arteriosklerose bei PEMT-knockout Mäusen beobachteten [96]. Sie begründen das verringerte Auftreten von Arteriosklerose durch eine geringere Anzahl Apolipoprotein-B-haltiger Lipoproteinkomplexe, die vor allem durch eine schnellere Entfernung aus dem Blut und zu einem kleineren Anteil durch eine geringere Synthese von VLDL bedingt wird. Weiterhin führen Zhao et al. eine Erhöhung der PE-Konzentration im Verhältnis zu PC in den Lipoproteinen an, welche die VLDL instabiler machen und damit deren Absorption begünstigen soll. Zhao et al. berichten ebenfalls von einer Hcy-Senkung bei den untersuchten PEMT^{-/-} Mäusen, welche auch zur Verringerung der Arteriosklerose beitragen kann.

3.4 Fragestellung

Einfluss von Diabetes oder Medikamenten auf die PL-Klassen und Spezies im Plasma

Verschiedene Arbeiten berichten von Änderungen der Fettsäurezusammensetzung oder der Konzentration der PL-Klassen (besonders LPC) bei Patienten mit Diabetes [39-42,44]. Mehrere PL-Spezies sind als potentielle Marker zur Unterscheidung von Diabetespatienten und Kontrollen identifiziert worden [45]. Es gibt auch Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen SM und Diabetes [43]. Hierzu liegen aber deutlich weniger Studien vor. Weiterhin ist der Einfluss der häufig bei Diabetes verabreichten Medikamente Statin und Metformin auf die PL-Konzentration näher zu untersuchen, da in mehreren Studien Hinweise auf einen solchen Einfluss und speziell auf eine Reduktion der LPC-Konzentration festgestellt wurden [53,57].

Wir führten daher eine Fall-Kontroll-Studie durch, bei der wir mit der von uns entwickelten Methode zur Quantifizierung von PL-Spezies die PL-Zusammensetzung bei einer Gruppe von Diabetikern mit gesunden Kontrollen verglichen und auch die PL-Konzentrationen in den Gruppen der mit Statin oder Metformin behandelten Patienten untersuchten. Die Hypothese dieser Studie ist: Die Konzentration von PL-Klassen und -Spezies unterscheidet sich zwischen Diabetes Typ 2 Patienten und Nichtdiabetikern. Weiterhin zeigen mit Metformin behandelte Patienten sowie Patienten mit Statinbehandlung ein deutlich unterschiedliches PL-Profil.

Einfluss von B-Vitaminen auf die Plasma-Konzentrationen von PL-Klassen und -Spezies

Der Vitaminstatus wirkt sich sehr wahrscheinlich auf die Spezieszusammensetzung der PL aus, da der von den B-Vitaminen abhängige Methylierungsstoffwechsel für die PC-Synthese über den PEMT-Stoffwechselweg benötigt wird [19]. Der PEMT-Stoffwechselweg synthetisiert generell andere PC-Spezies als der nicht auf den Methylierungsstoffwechsel angewiesene CDP-Stoffwechselweg [19]. Bei Ratten konnte eine Veränderung der PL bei Vitamin-B6-Mangel bereits gezeigt werden [18]. Hierzu sind uns allerdings noch keine Studien am Menschen bekannt.

Vor diesem Hintergrund führten wir eine Supplementationsstudie mit B-Vitaminen über 1 Jahr durch und prüften die Veränderungen der PL-Zusammensetzung im Blut. Die Hypothese dieser Studie ist: Supplementation mit B-Vitaminen kann die Synthese von methylierten PL-Klassen und von über den PEMT-Stoffwechselweg synthetisierten PL-Spezies erhöhen.

4 Material und Methoden

4.1 Methoden der Phospholipidquantifizierung

Bevor die PL analysiert werden können, müssen sie für die meisten Methoden zunächst weitgehend von anderen Substanzen in der Probe getrennt werden. Die wichtigste Methode hierzu ist die 2-Phasen-Extraktion nach Bligh und Dyer [97]. Eine 2-Phasen-Extraktion kann, statt mit Chloroform wie bei Bligh und Dyer, auch mit Methyl-tert-butylether durchgeführt werden [98].

Die meisten Methoden beruhen auf einer Trennung der PL und einer anschließenden Quantifizierung. Einen anderen Ansatz bietet z.B. ein Nachweis über spezifische enzymatische Reaktionen [99]. Die erste Methode, die zur Trennung der PL-Klassen verwendet wurde, ist die Dünnschichtchromatographie [100], die in der Regel mit einer anschließenden Quantifizierung der PL nach Bartlett et al. [101] kombiniert wird. Eine andere, weit verbreitete Trennmethode ist die Flüssigkeitschromatographie (LC). Bei modernen LC-Geräten, die mit höherem Druck arbeiten, spricht man von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und auch von Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UPLC) [102]. Zur Trennung von PL werden hauptsächlich Normal Phase Chromatographie (NP) und Reversed Phase Chromatographie (RP) verwendet. Mittels NP können die PL nach ihren Klassen aufgetrennt werden und mittels RP vor allem nach der Kettenlänge ihrer FS. Bei der LC können die PL nach der Trennung direkt und in einem Arbeitsschritt (online) detektiert werden. Übliche Detektionsverfahren sind die UV/Vis-Spektroskopie, z.B. über die Absorption bei 206 nm [103], die Lichtstreuung (engl. Evaporative Light Scattering Detection, ELSD) [104] oder auch die Massenspektrometrie (MS).

Die Gaschromatographie (GC) gekoppelt mit Massenspektrometrie (GCMS) wird zur Identifikation und Quantifizierung von FS verwendet [104]. Wenn man mit dieser Technik Informationen über die FS-Zusammensetzung der PL-Klassen erhalten möchte, ist allerdings eine Abspaltung der FS von den PL nötig. Dies macht die Methode vergleichsweise arbeitsaufwendig.

Da sich einzelne Spezies derselben PL-Klasse in ihren chemischen Eigenschaften nur wenig voneinander unterscheiden, ist die MS, die das Masse-zu-Ladung-Verhältnis der Stoffe analysiert und Unterschiede im Dalton-Bereich messen kann, eine der besten Methoden, um zwischen ähnlichen PL-Spezies zu unterscheiden. Um PL bei der für die MS notwendige Ionisierung intakt zu halten, sind sogenannte sanfte Ionisationsmethoden nötig. Die zwei

wichtigsten, bei PL zur Anwendung kommenden, sanften Ionisationsmethoden sind die Matrix-unterstützte Laser-Desorption (MALDI) [105] und die Elektrospray Ionisation (ESI) [106]. Der Vorteil der ESI ist, dass sie direkt mit einer vorherigen LC-Trennung gekoppelt werden kann. Unter Verwendung von Tandem-MS ist es auch möglich, die Position der FS im PL zu bestimmen [107]. Hierzu gibt es allerdings noch keine validierte Methode.

PL-Spezies rufen je nach ihrer Klasse und auch nach der Kettenlänge bei gleicher Konzentration unterschiedliche Signalintensitäten hervor [108,109]. Dies bedeutet, dass eine Kalibration über Lipidstandards mit bekannter Konzentration benötigt wird, wenn man die gemessenen Werte mit den Ergebnissen anderer Methoden vergleichen möchte. Ohne solche Standards kann man nur mit der gleichen Methode erhaltene Ergebnisse vergleichen [43,102]. Validierte Methoden zur Quantifizierung von PL-Spezies wurden von Pang et al. [42], Hu et al. [110] und Liebisch et al. [111,112] veröffentlicht. Hinzu kommt die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode [113].

4.2 Geräte und Arbeitsmaterialien

| Gerät | Hersteller |
|-----------------------------------|---|
| Kolbenhubpipetten | Gilson Microman |
| Konzentrator – Zentrifuge | Labconco 7810007 |
| - Kühlfalle | Labconco 7811030 |
| - Vakuumpumpe | ILMVAC 109023 |
| Glasvakuumkammer | von Lida Manufacturing Corp. |
| LCMS-Vials zur Messung | Waters 186000984 |
| - Verschlusskappen | Waters 186000304 |
| Glasgefäße 5ml für Phasentrenng. | Chromacol, Teil von Fisher Scientific 5-SV – EPA Screw Top Vials |
| Vials für Alliquots von Stocklsg. | Supelco 29371-U |
| - Verschlusskappen | Supelco 29441-U |
| - Inserts | Supelco 29319-U |
| UPLC-Säule | Waters Acquity UPLC BEH Shield RP18, 100×2.1 mm (i.d.); 1.7 µmol/L particle size; 186002854 |
| UPLC-Vorsäule | Waters Acquity UPLC BEH Shield RP18 VanGuard, 5×2.1 mm (i.d.) 1.7 µmol/L particle size; 186003977 |
| UPLC-Filter | Waters 0,2 µmol/L in-line filter |

Chemikalie

BHT

Methanol, ULC grade

Wasser (deionisiert)

mit Stickstoff begast

Isopropanol, ULC grade

Acetonitril, ULC grade

Ameisensäure

Ammoniaklösung 25%

MTBE

Chloroform

Hersteller

Fluka 34750

Biosolve 13684102

Millipore: MilliQ Academic ZMQS50001

Biosolve 16264102

Biosolve 01204102

Biosolve 06914131

VWR 1133.2500

Sigma Aldrich 34875

Merck 102444.2500

PL-Standards

Phosphatidylcholin 28:0

Sigma Aldrich P2663

Phosphatidylcholin 30:0

Avanti 850350P

Phosphatidylcholin 36:2

Avanti 850375P

Sphingomyelin 6:0

Avanti 860582P

Sphingomyelin 16:0

Avanti 860584P

Sphingomyelin 24:1

Avanti 860593P

Phosphatidylethanolamin 30:0

Avanti 850704P

Phosphatidylethanolamin 32:0

Sigma Aldrich P1348

Phosphatidylethanolamin 36:2

Avanti 850725P

Lysophosphatidylcholin 16:0

Sigma Aldrich L5254

Lysophosphatidylcholin 17:0

Avanti 855676P

Lysophosphatidylcholin 18:0

Avanti 855775P

4.3 Studienprobanden

4.3.1 Kollektiv Diabetespatienten

Es wurden 92 Diabetes mellitus Typ 2 Patienten (40 Männer) mit 69 gesunden Kontrollen (20 Männer) verglichen. Als Ausschlusskriterien galten eine Behandlung mit Dialyse, ein Schlaganfall oder Herzinfarkt innerhalb der letzten 3 Monate, eine aktuelle Krebserkrankung, eine Behandlung mit Antifolaten (z.B. Methotrexat), eine Ileumresektion, eine vorhandene Vitamin-B-Supplementierung, Alkoholismus, die Einnahme von Immunsuppressiva, Kortikosteroiden oder Erythropoetin sowie eine primäre Nierenerkrankung (FSGS, hypertensive Nephrosklerose, Lupus Nephritis). Weitere Ausschlusskriterien für die Kontrollgruppe waren Adipositas, Demenz, Depression oder Parkinson. Die bei den Kontrollen gemessenen Werte wurden zum Vergleich der PL-Quantifizierung mit anderen Methoden herangezogen (siehe Abschnitt 5.2.3).

4.3.2 Probanden zur Intervention mit B-Vitaminen

In die Studie wurden Männer und Frauen mit einem Durchschnittsalter von über 65 Jahren aufgenommen. Insgesamt 39 Männer und 57 Frauen im Alter von 50 bis 91 Jahren wurden vor und nach der Intervention untersucht. Als Ausschlusskriterien galten Niereninsuffizienz (GFR < 30 ml/Min nach Cockcroft-Gault), eine kürzer als 1 Jahr zurückliegende periphere Fraktur, die Notwendigkeit einer spezifischen osteologischen Therapie, Kontraindikation gegen eine Therapie mit Calcium oder Vitamin D, eine Dauertherapie mit Glucocorticoiden, megaloblastische Anämie infolge eines isolierten B12-Mangels, isolierter Folsäuremangel, eine aktuelle Krebserkrankung, eine Antifolatbehandlung, eine Ileumresektion, eine bereits bestehende Vitamin-B-Supplementierung, Demenz oder andere Erkrankung mit fehlender Einwilligungsfähigkeit.

Wenn eine spezifische osteologische Therapie oder eine zusätzliche Therapie mit Vitamin B12, Folsäure, Vitamin B6, Vitamin D oder Calcium während der Studie begonnen wurde, so wurde die Studie für den entsprechenden Teilnehmer abgebrochen. Weiterhin galten das Einsetzen einer Behandlung mit Corticosteroiden oder Metotrexat als Abbruchkriterien. Das Auftreten von Herzinfarkt, Krebserkrankung, Apoplexie (Schlaganfall) oder ein operativer Eingriff waren ebenfalls als Kriterien für einen Studienabbruch vorgesehen.

Alle untersuchten Patienten erhielten täglich 1200 iE Vitamin D und 456 mg Calcium. Die Intervention erfolgte mit 50 mg Vitamin B6, 500 µg Folsäure (Vitamin B9) und 500 µg Vitamin B12 täglich (oral).

Von allen Probanden wurde in nüchternem Zustand Blut abgenommen und zur Untersuchung der PL in EDTA enthaltenden Monovetten gesammelt. Dann wurde das Blut für 10 min bei 5000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen und bei -70°C gelagert.

Die Studienteilnehmer wurden über mögliche Risiken aufgeklärt und gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universitätsklinik des Saarlandes genehmigt.

4.4 Lipidextraktion

Die Lipidextraktion aus EDTA-Plasma wurde entsprechend der Methode nach Matyash et al. [98] mit leichten Veränderungen durchgeführt. Zunächst wurden 50 µl einer die internen Standards enthaltenden Lösung (3 mM PC 15:0/15:0, 1 mM SM 6:0, 200 µM PE 15:0/15:0 und 2 mM LPC 17:0) in einem Glasgefäß unter Begasung mit N₂ getrocknet. Nun wurden je 25 µl einer Plasmaprobe oder eines Kalibrators sowie 200 µl Methanol zugegeben und gründlich gemischt. Es wurden 650 µl MTBE zugegeben und die Probe wurde 15 min auf einem Horizontalschüttler gemischt. Danach wurden 650 µl H₂O zugegeben und die Probe wurde nach kurzem Mischen für 10 min im Dunkeln inkubiert. Als nächstes wurde die Probe für 10 min mit 5000 g bei 20°C zentrifugiert und die obere, organische Phase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein 1,5 ml MS-Probengefäß überführt. Schließlich wurde der MTBE-Extraktionsschritt mit der restlichen wässrigen Phase wiederholt. Die organische Phase wurde bei 45°C in der Vakuumzentrifuge (Labconco, Kansas City, USA) getrocknet. Die getrockneten Lipide wurden dann in 500 µl Methanol gelöst.

4.5 Bedingungen der Ultra-Performance Flüssigkeitschromatographie Tandem- Massenspektrometrie zur Phospholipidanalyse

Ultra-Performance Flüssigkeitschromatographie Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-MS/MS) Analysen wurden mit einem Acquity Ultra-Performance LC System gekoppelt mit einem MicroMass Quattro Premier XE Tandem Quadrupole Massenspektrometer (Waters

Corporation, Milford, MA, USA) durchgeführt, wie unter [113] beschrieben. Die Trennung erfolgte mit Hilfe einer Acquity UPLC BEH Shield RP18 Säule (100 mm x 2,1 mm (i.D.); 1,7 µm Partikelgröße) mit einer Acquity UPLC BEH Shield RP18 VanGuard Vorsäule (5 mm x 2,1 mm (i.D.); 1,7 µm Partikelgröße) und einem 0,2 µm in-line Filter (Waters Corporation). Die Säulentemperatur war auf 55°C, die Flussrate auf 0,12 ml/min eingestellt. Mobile Phase A war Isopropanol/H₂O 50/50 mit 0,1% Ameisensäure und 0,028% NH₄OH und mobile Phase B war 100% Isopropanol mit 0,1% Ameisensäure und 0,028% NH₄OH. Die chromatographische Trennung erfolgte mit einem 15 min Gradienten: Ausgangsbedingungen (60% A); 0,0-7,0 min (50% A); 7,1-9,0 min (5% A); 9,1-10,0 min (5% A) und 10,1-15,0 min (60% A). Alle Gradientenschritte waren linear. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl.

Die PL wurden im Massenspektrometer im positiven ESI-Modus identifiziert. Zur Detektion von PC, LPC und SM wurde ein „parent scan“ mit m/z 184 verwendet und PE wurde mit Hilfe eines „neutral loss scan“ mit m/z 141 nachgewiesen. Die Temperatur der Ionenquelle war 120°C, „capillary voltage“ war 3,9 kV und das Desolvatisierungsgas (N₂) wurde bei einer Temperatur von 320°C mit einer Flussrate von 900 l/h zugeführt. Der Fluss des „cone gas“ betrug 100 l/h und der Fluss des Kollisionsgases (Ar) betrug 0,17 l/h. „Inter-scan delay“ und „inter-channel delay“ wurden auf 0,05 s eingestellt und es wurde eine „dwell time“ von 0,5 s verwendet. Die „cone voltage“ betrug 40 V bei PC, LPC und SM und 36 V bei PE, während die „collision energy voltage“ auf 26 eV für PC, LPC und SM und auf 22 eV für PE eingestellt war.

4.5.1 Datenanalyse

Daten wurden mit MassLynx V4.1, QuanLynx und Microsoft Excel ermittelt und bearbeitet. Die PL wurden mit Hilfe von je einem internen Standard und ein oder zwei externen Kalibratoren für jede PL-Klasse quantifiziert. Als Signalstärke für die Quantifizierung wurde die mit QuanLynx in den Chromatogrammen der einzelnen Spezies ermittelte Peakfläche verwendet. Für jede PL-Spezies wurde ein Quotient aus der für die Spezies ermittelten Signalstärke und der Signalstärke des internen Standards ermittelt (Response). Die Konzentrationen der einzelnen Spezies wurden dann durch Vergleichen ihrer Response mit der Standardkurve des externen Kalibrators bestimmt. Die Standardkurven wurden durch Auftragen der bekannten Konzentration des externen Kalibrators gegen die ermittelte

Response erstellt. Die quantifizierten PL-Spezies und die ihnen zugeordneten internen und externen Standards sind in **Tabelle 4-1** aufgeführt.

Die Wiederfindungsrate (%) wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$[\text{ermittelte Konzentration} / (\text{endogene Konzentration} + \text{zugegebene Konzentration})] \times 100$$

Zur Bestimmung des instrumentellen Detektionslimits wurde die mittlere quadratische Abweichung (engl. root mean square error (RMSE)) berechnet. Hierzu wurde die folgende Formel mit der Anzahl der gemessenen Proben n und dem Fehler der einzelnen Messungen E verwendet:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n E_j^2}{n-2}}$$

Das instrumentelle Detektionslimit (IDL) wurde dann als $3 \times RMSE/m$ berechnet und das instrumentelle Quantifikationslimit wurde als $10 \times RMSE/m$ berechnet. Hierbei ist m die Steigung der Standardkurve, die zur Bestimmung des IDL verwendet wurde.

Das Detektionslimit der Methode (engl. method detection limit (MDL)) wurde über die “ $t_{99SLLMV}$ -Methode” nach der folgenden Gleichung berechnet: $[MDL = t_{99(n-1)} \times SA]$. Hierbei ist $t_{99(n-1)}$ der t-Wert für eine einseitige t-Verteilung mit 99% Wahrscheinlichkeit bei n Beobachtungen ($t_{99(n-1)} = 2.821$ bei 10 Proben). SA ist die Standardabweichung zwischen den $n = 10$ Messungen. Das Quantifikationslimit der Methode (engl. method quantification limit (MQL)) wurde als $MQL = 3 \times MDL$ berechnet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SPSS Version 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

Tabelle 4-1: Übersicht der zur Quantifizierung verwendeten externen Kalibratoren

| Quantifizierte PL-Spezies | Externer Kalibrator |
|---------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
| IS PC 30:0 | - | IS SM 6:0 | - | IS PE 30:0 | - | IS LPC 17:0 | - |
| PC 28:0 | Standard | SM 14:0 | SM 16:0 | PE 32:0 | Standard | LPC 16:0 | LPC 16:0 |
| PC 32:1 | PC 36:2 | SM 16:0 | SM 16:0 | PE 34:1 | PE 36:2 | LPC 18:0 | LPC 18:0 |
| PC 34:1 | PC 36:2 | SM 16:1 | SM 24:1 | PE 34:2 | PE 36:2 | LPC 18:1 | LPC 18:0 |
| PC 34:2 | PC 36:2 | SM 18:0 | SM 16:0 | PE 36:2 | PE 36:2 | LPC 18:2 | LPC 18:0 |
| PC 34:3 | PC 36:2 | SM 18:1 | SM 24:1 | PE 36:3 | PE 36:2 | LPC 20:4 | LPC 18:0 |
| PC 36:2 | PC 36:2 | SM 20:0 | SM 24:1 | PE 36:4 | PE 36:2 | | |
| PC 36:3 | PC 36:2 | SM 22:0 | SM 24:1 | PE 38:4 | PE 36:2 | | |
| PC 36:4 | PC 36:2 | SM 22:1 | SM 24:1 | PE 38:5 | PE 36:2 | | |
| PC 36:5 | PC 36:2 | SM 23:0 | SM 24:1 | PE 38:6 | PE 36:2 | | |
| PC 38:3 | PC 36:2 | SM 23:1 | SM 24:1 | PE 40:5 | PE 36:2 | | |
| PC 38:4 | PC 36:2 | SM 23:2 | SM 24:1 | | | | |
| PC 38:5 | PC 36:2 | SM 24:0 | SM 24:1 | | | | |
| PC 38:6 | PC 36:2 | SM 24:1 | SM 24:1 | | | | |
| | | SM 24:2 | SM 24:1 | | | | |

IS: interner Standard

4.5.2 Qualitätskontrolle

Zur Qualitätskontrolle wurde bei jeder Messung eine Probe eines hauseigenen Plasma Pools mituntersucht.

5 Ergebnisse

5.1 Identifikation der Phospholipidpeaks

Die für die einzelnen PL-Spezies ermittelten Chromatogramme zeigten bei manchen PC- und SM-Spezies mehr als einen Peak. Der korrekte Peak wurde durch Vergleichen der Chromatogramme verschiedener Spezies oder im Fall von SM 24:1 durch Vergleich mit Messungen der Reinsubstanz ermittelt. Um die Unterscheidung von SM- und PC-Spezies zu erleichtern, untersuchten wir außerdem ein aus Rinderhirn extrahiertes Gemisch aus SM-Spezies und ein aus Soja extrahiertes PL-Gemisch, das verschiedene PC-Spezies, aber kein SM enthält. Bei Messungen der SM-freien Soja-PL zeigten sich keine Peaks, die fälschlich als SM identifiziert wurden und bei Messungen des SM-Mix wurden keine Peaks fälschlich als PC identifiziert. Die Retentionszeiten variierten leicht zwischen verschiedenen Experimenten. Die Position der Peaks in Relation zueinander war allerdings immer charakteristisch. Typische Retentionszeiten sind in **Tabelle 5-1** aufgeführt.

Tabelle 5-1: Typische Retentionszeiten der quantifizierten PL und Standards

| Quanti- fizierte PL- Spezies | Retentions- zeit [min] |
|------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| IS PC 30:0 | 5,29 | IS SM 6:0 | 2,97 | IS PE 30:0 | 5,53 | IS LPC | |
| PC 28:0 | 4,60 | SM 14:0 | 4,60 | PE 32:0 | 5,87 | LPC 16:0 | 2,88 |
| PC 32:1 | 5,51 | SM 16:0 | 5,31 | PE 34:1 | 6,64 | LPC 18:0 | 2,75 |
| PC 34:1 | 6,35 | SM 16:1 | 4,78 | PE 34:2 | 6,06 | LPC 18:1 | 3,03 |
| PC 34:2 | 5,81 | SM 18:0 | 6,19 | PE 36:2 | 7,00 | LPC 18:2 | 2,80 |
| PC 34:3 | 5,38 | SM 18:1 | 5,55 | PE 36:3 | 6,41 | LPC 18:2 | 2,66 |
| PC 36:2 | 6,73 | SM 20:0 | 7,18 | PE 36:4 | 6,09 | LPC 20:4 | 2,66 |
| PC 36:3 | 6,14 | SM 22:0 | 8,28 | PE 38:4 | 7,10 | | |
| PC 36:4 | 5,86 | SM 22:1 | 7,43 | PE 38:5 | 6,48 | | |
| PC 36:5 | 5,42 | SM 23:0 | 8,85 | PE 38:6 | 6,10 | | |
| PC 38:3 | 7,15 | SM 23:1 | 7,98 | PE 40:5 | 7,06 | | |
| PC 38:4 | 6,80 | SM 23:2 | 7,46 | | | | |
| PC 38:5 | 6,06 | SM 24:0 | 9,46 | | | | |
| PC 38:6 | 5,85 | SM 24:1 | 8,35 | | | | |
| | | SM 24:2 | 7,56 | | | | |

Mehrere Faktoren bestätigten die korrekte Identifikation der PL-Peaks. Zunächst waren unsere Ergebnisse zur Konzentration der PL in Plasma und Soja vergleichbar mit denen aus anderen Arbeiten. Weiterhin konnten wir beobachten, dass die Retentionszeit in gleichmäßigen Schritten mit zunehmender Kettenlänge der FS zunimmt und mit zunehmender Desaturierung abnimmt. Es ist unwahrscheinlich, dass dieser Trend erhalten bliebe, wenn PC- und SM-Spezies verwechselt würden. Beispiele sind in **Abbildung 5-1** und **Abbildung 5-2** dargestellt.

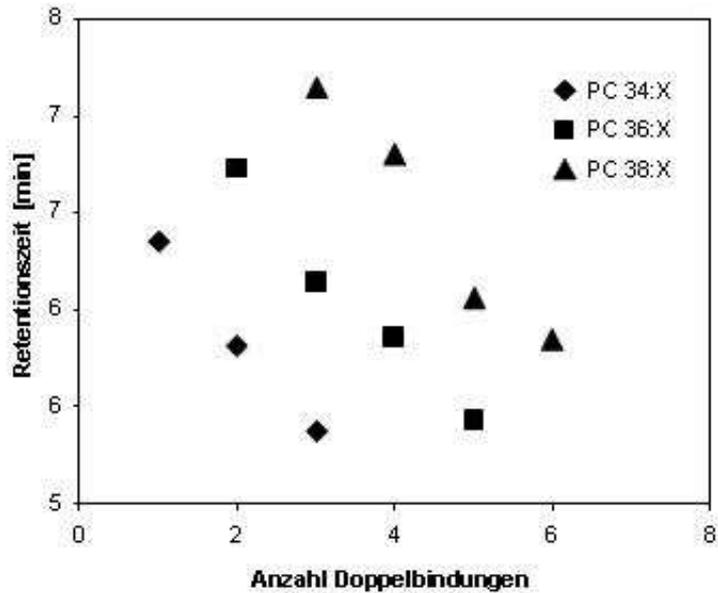


Abbildung 5-1: Abhängigkeit der Retentionszeit vom Desaturierungsgrad von Phosphatidylcholin (PC)-Spezies [113])

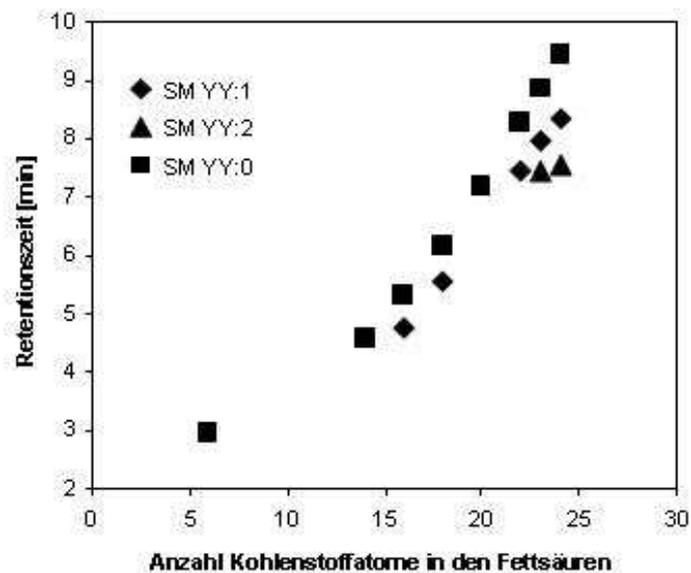


Abbildung 5-2: Abhängigkeit der Retentionszeit von der Kettenlänge bei Sphingomyelin (SM)-Spezies- [113])

5.2 Methodenvalidierung zur Phospholipidquantifizierung

5.2.1 Linearität und Sensitivität

Die Methode war über die in **Tabelle 5-2** angegebenen Konzentrationsbereiche linear. Der lineare Bereich erfasst den gesamten physiologischen Bereich für alle PL-Spezies bis auf

PC 34:2. Proben mit einer PC 34:2-Konzentration >500 μM wurden daher verdünnt. Die Konzentrationen der Standardlösungen korrelierten stark mit den gemessenen „Peak Areas“ und die linearen Regressionskoeffizienten waren $r^2 > 0,98$ für alle Kalibrationskurven in 3 unabhängigen Experimenten mit allen 4 Kalibratoren. Die Kalibrationsgeraden sowie die Geradengleichungen sind in **Abbildung 5-3** dargestellt.

Tabelle 5-2: Linearität der Phospholipidquantifizierung

| | PC (14:0/14:0) | SM (24:1) | LPC (C16:0) | PE (16:0/16:0) |
|--|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Konzentration der Kalibratoren, μM | 500; 300; 100; 40; 10; 2; 0,33; 0 | 300; 100; 40; 10; 2; 0,33; 0 | 500; 300; 100; 40; 10; 2; 0,33; 0 | 300; 100; 40; 10; 2; 0,33; 0 |
| Gleichungen der Geraden mit $x = c [\mu\text{M}]$ und $y = \text{response} *$ | $y = 0,002 x + 0,0026$ | $y = 0,0059x + 0,0008$ | $y = 0,0021x + 0,0058$ | $y = 0,035x + 0,078$ |

* Mittelwerte für Steigung und Nullpunkt aus 3 unabhängigen Messungen

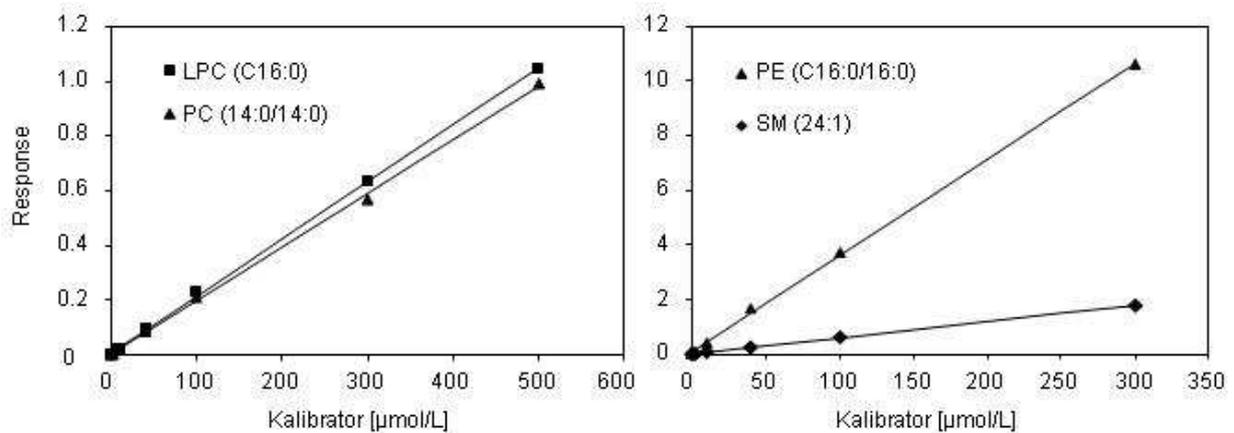


Abbildung 5-3: Kalibrationsgeraden, welche die Linearität der Phospholipid (PL)-Detektion zeigen (Mittelwerte aus 3 Messungen; nach [113])

Um das Detektionslimit und das Quantifikationslimit (engl. Limit of Detection/Quantification LOD/LOQ) zu bestimmen, verwendeten wir ein von der U.S. Environmental Protection Agency vorgeschlagenes Verfahren in zwei Schritten [114]. Der erste Schritt besteht in der Bestimmung des instrumentellen Detektionslimits (IDL), der kleinsten Menge Analyt, die zuverlässig durch das verwendete Instrument detektiert werden kann, und des instrumentellen Quantifikationslimit (IQL), der kleinsten Menge Analyt, die zuverlässig durch das verwendete Instrument quantifiziert werden kann. Mit Hilfe der IDL-Werte werden dann MDL und MQL (definiert als die kleinste Menge Analyt, die verlässlich in einer bestimmten Matrix detektiert/quantifiziert werden kann) bestimmt.

Das IDL und IQL wurden durch Berechnung des RMSE von sieben 5-Punkt Kalibrationskurven abgeschätzt (6-Punkt für PC) (**Tabelle 5-3**). Zur Bestimmung des MDL wurde zunächst eine mit PL abgereicherte EDTA Plasmaprobe hergestellt, die Konzentration der Kalibratorspezies darin in den Bereich des 1-5-fachen des abgeschätzten IDL gebracht und die Proben gemessen. Die mittlere gemessene Konzentration in 10 Blankproben mit internem Standard wurde von der in den anderen Proben gemessenen Konzentration abgezogen und die MDLs wurden berechnet wie oben beschrieben. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 5-3** aufgeführt.

Tabelle 5-3: Detektionslimits der 4 PL-Klassen in EDTA Plasma sowie zur Ermittlung des Detektionslimits verwendete Kalibratorkonzentrationen und Zwischenergebnisse

| | PC (14:0/14:0) [μM] | SM (24:1) [μM] | LPC (C16:0) [μM] | PE (16:0/16:0) [μM] |
|--|---|---------------------------------------|---|--|
| Konzentration der Kalibratoren zur Bestimmung des IDL | 5,00; 2,50; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16; 0 | 3,00; 1,50; 0,75; 0,38; 0,19; 0 | 3,00; 1,50; 0,75; 0,38; 0,19; 0 | 3,00; 1,50; 0,75; 0,38; 0,19; 0 |
| IDL (SA) | 0,64 (0,05) | 0,32 (0,10) | 1,26 (0,27) | 1,05 (0,37) |
| Mittelwert (SA) Plasmakonz. zur Bestimmung des LOD | 2,67 (0,13) | 1,72 (0,31) | 5,95 (1,46) | 3,95 (1,36) |
| LOD | 0,37 | 0,86 | 4,02 | 3,75 |

IDL instrumentelle Detektionslimits; SA Standardabweichung; LOD (engl. Limit of Detection) Detektionslimit

5.2.2 Wiederfindungsrate, Präzision und Stabilität

Wiederfindungsexperimente wurden durch Spiken von Plasma-Pool-Proben mit Kalibratoren durchgeführt. Es wurden jeweils 40 μM und 100 μM PC (28:0), 5 μM und 10 μM PE (32:0), 50 μM und 150 μM SM (24:1) und 50 μM LPC (16:0) zugegeben. Die mittlere Wiederfindungsrate war 92% für PC, 123% für PE, 83% für SM und 95% für LPC.

Die Präzision der Methode wurde mit Hilfe von zwei Kontrollmaterialien bestimmt, die in jedem Run mitgemessen wurden, ein „in House“ EDTA Plasma Pool sowie ein kommerziell erhältliches Gemisch aus Soja-PL. Die intra und inter assay Variationskoeffizienten (engl. coefficients of variation CV) für die einzelnen PL-Spezies sowie für die Summen der quantifizierten Spezies für jede der PL-Klassen (Gesamt-PC, -PE, -LPC, -SM) sind in **Tabelle**

5-4 aufgeführt. Für die Summen der PL in den einzelnen Klassen lagen die intra assay CVs zwischen 3,1% und 8,5% und die inter assay CVs zwischen 7,9% und 14,2%. Intra und inter assay CVs für die einzelnen PL-Spezies lagen für alle nicht PE-Spezies bis auf SM 23:2 unter 16% und unter 20% für SM 23:2. Die inter assay CVs der PE-Spezies lagen nur für die Spezies PE 36:2, PE 38:4 und PE 38:6 unter 20%. Es wurden allerdings alle in **Tabelle 5-4** aufgeführten PE-Spezies zur Bildung des Werts für „Gesamt-PE“ summiert.

PL in bei -70°C gelagerten Plasmaproben waren mindestens für einen Zeitraum von 4 Monaten stabil. Weiterhin zeigten sie keine nennenswerten Veränderungen über 4 Zyklen des Auftauens und Wiedereinfrierens.

Tabelle 5-4: Quantifizierte PL-Spezies; inter und intra assay CV in Plasma Pool und Soja PL Mix (inter assay CV, n = 11)

| | Intra assay CV EDTA Plasma [%] | Inter assay CV EDTA Plasma [%] | Intra Assay CV Soja PL 1,5 mg/ml [%] | Inter assay CV Soja PL 3 mg/ml [%] | | Intra assay CV EDTA Plasma [%] | Inter assay CV EDTA Plasma [%] | Intra assay CV Soja PL 1,5 mg/ml [%] | Inter assay CV Soja PL 3 mg/ml [%] |
|----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---|---|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---|---|
| PC 32:1 | 6,0 | 13,0 | | | SM 14:0 | 8,5 | 8,4 | | |
| PC 34:1 | 3,7 | 9,3 | 4,9 | 11,9 | SM 16:0 | 7,2 | 9,1 | | |
| PC 34:2 | 4,0 | 7,5 | 3,6 | 8,7 | SM 16:1 | 8,5 | 9,8 | | |
| PC 34:3 | 6,7 | 16,3 | 6,5 | 9,3 | SM 18:0 | 6,8 | 10,3 | | |
| PC 36:2 | 4,0 | 9,4 | 3,4 | | SM 18:1 | 10,8 | 12,3 | | |
| PC 36:3 | 3,7 | 6,0 | 4,9 | 6,4 | SM 20:0 | 4,9 | 10,8 | | |
| PC 36:4 | 3,3 | 7,2 | 2,3 | 9,1 | SM 22:0 | 6,6 | 8,3 | | |
| PC 36:5 | 7,3 | 11,0 | 3,2 | 7,5 | SM 22:1 | 7,9 | 6,6 | | |
| PC 38:3 | 4,3 | 12,8 | | 9,4 | SM 23:0 | 5,4 | 10,1 | | |
| PC 38:4 | 4,0 | 7,1 | | | SM 23:1 | 22,8 | 7,4 | | |
| PC 38:5 | 6,1 | 6,9 | | | SM 23:2 | 11,2 | 19,6 | | |
| PC 38:6 | 4,9 | 7,8 | | | SM 24:0 | 7,3 | 9,8 | | |
| Ges. PC | 3,5 | 13,0 | 3,1 | 7,9 | SM 24:1 | 6,1 | 10,8 | | |
| | | | | | SM 24:2 | 4,6 | 9,8 | | |
| | | | | | Ges. SM | 6,3 | 7,9 | | |
| PE 34:1 | 20,1 | 37,7 | 10,3 | 17,2 | | | | | |
| PE 34:2 | 27,7 | 32,2 | 6,6 | 16,5 | | | | | |
| PE 36:2 | 17,0 | 11,2 | 11,3 | 21,5 | LPC 16:0 | 5,0 | 10,4 | 5,1 | 15,9 |
| PE 36:3 | 15,7 | 43,2 | 12,3 | 12,2 | LPC 18:0 | 6,0 | 7,9 | 5,1 | 11,4 |
| PE 36:4 | 15,9 | 26,1 | 9,5 | 19,0 | LPC 18:1 | 7,5 | 10,5 | 5,7 | 10,3 |
| PE 38:4 | 16,1 | 15,2 | | | LPC 18:2 | 13,8 | 9,2 | 6,1 | 12,1 |
| PE 38:5 | 13,8 | 32,2 | | | LPC 20:4 | 9,8 | 15,0 | | |
| PE 38:6 | 10,5 | 19,8 | | | Ges. LPC | 6,1 | 8,8 | 4,9 | 12,5 |
| PE 40:5 | 20,7 | 34,6 | | | | | | | |
| Ges. PE | 6,1 | 13,9 | 8,5 | 14,2 | | | | | |

Nur Soja-PL-Spezies mit Konzentrationen >4,5 µM sind aufgeführt

5.2.3 Vergleich mit anderen Methoden zur PL-Quantifizierung

Die zur Phospholipidquantifizierung verwendete UPLC-MS-Methode zeigte bei der Analyse des Blutplasmas 65 gesunder Testpersonen (21 Männer, Alter 50-86 Jahre) Ergebnisse, die mit denen aus vorherigen Arbeiten vergleichbar waren, sowohl für die relative Konzentration der Lipidspezies innerhalb der PL-Klassen (**Abbildung 5-4 A**) als auch für die Gesamtkonzentration der PL-Klassen relativ zueinander (**Abbildung 5-4 C**). Auch die relativen Konzentrationen der PC-Spezies in Soja stimmten weitgehend mit den von Le Grandois et al. [115] ermittelten überein.

Die Ergebnisse waren unter anderem mit denen von Liebisch et al. [111] vergleichbar, welche mehr Lipidstandards verwendeten. Dies ist besonders hervorzuheben, weil bereits Brügger et al. [108] und Koivusalo et al. [109] zeigten, dass bei der Quantifizierung von PL mit ESI-MS die gemessene Signalstärke nicht nur von der Konzentration der PL, sondern auch von der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der untersuchten Spezies abhängen und daher empfohlen, möglichst viele Standards zu verwenden.

Die Parameter der Validierung waren ebenfalls mit den für andere validierte Methoden zur Quantifizierung einzelner PL-Spezies in Blutplasma berichteten vergleichbar. Zu nennen sind hier Pang et al. [42], die „ion trap“ und „time of flight“ MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) benutzten, Liebisch et al. [111], die ein „Quattro Ultima“ „quadrupole MS“ (Micromass, Manchester, UK) verwendeten und Hu et al. [110], die ein „trap-Fourier-transform ion cyclotron resonance MS“ (Thermo Fisher, San Jose, CA) benutzten.

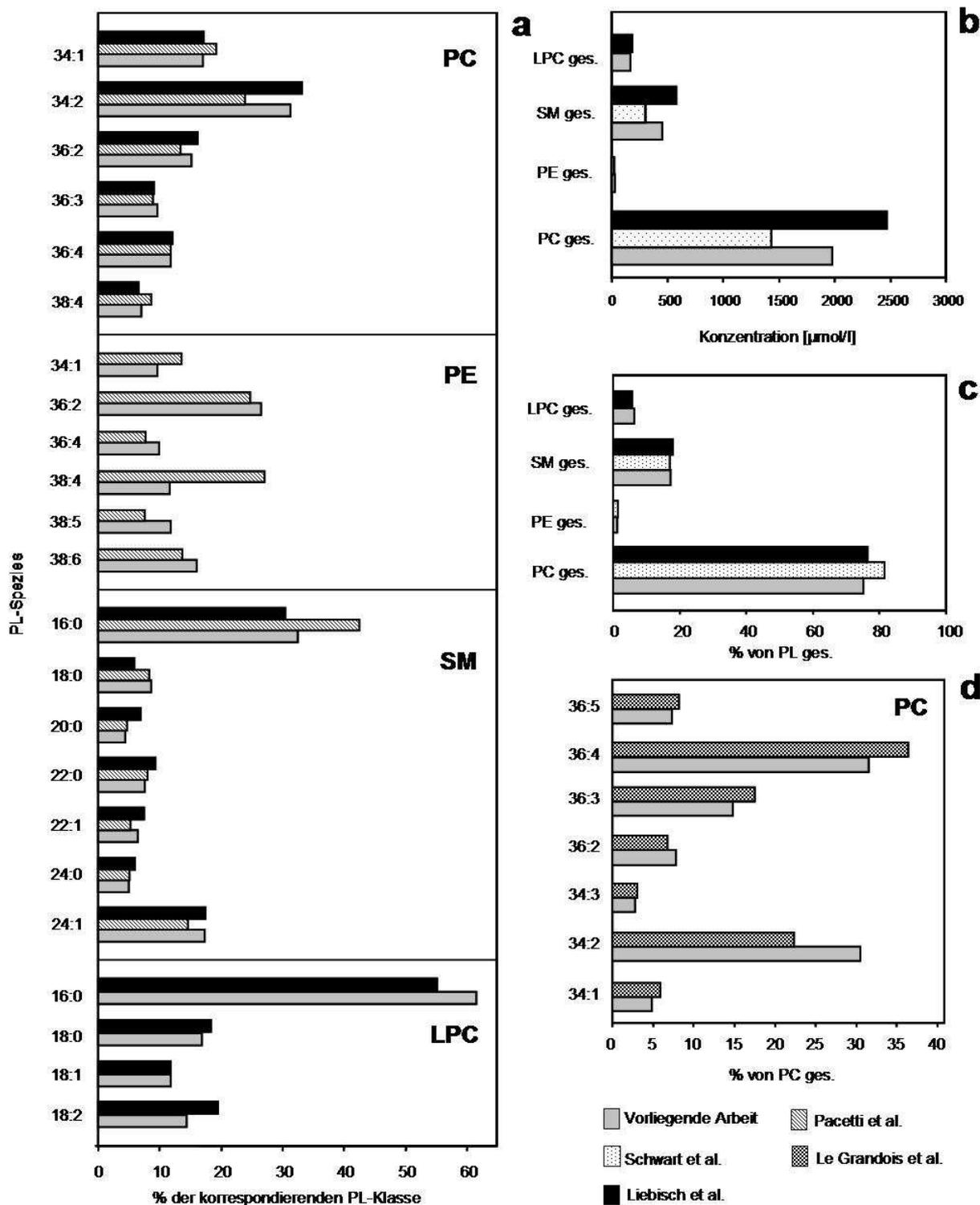


Abbildung 5-4: PL-Konzentrationen der häufigsten PL-Spezies im Blutplasma von 65 gesunden Spendern und in Soja. Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit [113] mit Ergebnissen von Pacetti et al. [116], Schwarz et al. [117], Le Grandois et al. [115] und Liebisch et al. [111,112]

a relative Menge der einzelnen PL-Spezies innerhalb der PL-Klassen

b Gesamt-PC, -PE, -SM, -LPC, bestimmt über Phosphat-Assay durch Schwarz et al. oder berechnet als Summe der Konzentrationen der einzelnen Spezies in den PL-Klassen bei der vorgestellten Methode und bei Liebisch et al. [4,5]

c relative Konzentration der PL-Klassen bezogen auf PL ges.

d relative Konzentration der PC-Spezies in Soja

5.3 Plasma-Phospholipide bei Diabetespatienten und scheinbar gesunden Nichtdiabetikern

Bei 92 Diabetikern und 69 Kontrollen wurden die Plasma-PL sowie andere Blutwerte ermittelt und zwischen den Gruppen verglichen (**Tabelle 5-5, Tabelle 5-6**). Das Alter unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen und auch der Anteil der Geschlechter war sehr ähnlich. Von den in **Tabelle 5-5** aufgeführten Glykierungsmarkern wurden Ethylcarboxylysin und für Lysin korrigiertes Ethylcarboxylysin bei Diabetespatienten in signifikant höherer Konzentration detektiert.

Im Vergleich mit der Kontrollgruppe waren bei Diabetespatienten die Konzentrationen von LPC und SM signifikant geringer. Bei SM war der Median der Konzentration aller Spezies und der Median des Gesamt-SM signifikant reduziert. Bei LPC waren die Konzentration aller Spezies bis auf LPC 20:4 sowie die Konzentration des Gesamt-SM signifikant niedriger. Weiterhin war die Konzentration der Spezies PC 34:3 bei Diabetespatienten signifikant kleiner. Diese Änderungen sind in **Abbildung 5-5** und **Abbildung 5-6** noch einmal verdeutlicht.

Tabelle 5-5: Plasma-Phospholipide und andere Blutwerte bei Diabetes mellitus Typ 2 Patienten und Kontrollen

| | Scheinbar gesunde Nichtdiabetiker | Diabetespatienten | P-Wert^a |
|---|--|--------------------------|---------------------------|
| N = | 69 (49 Frauen) | 92 (52 Frauen) | |
| Alter [Jahre] | 65 (53-75) | 66 (54-81) | 0,263 |
| Body mass index [kg/m²] | 26,5 (21,9-30,6) | 28,7 (23,5-35,8) | < 0,001 |
| Kreatinin [mg/dl] | 0,80 (0,70-1,00) | 0,89 (0,63-1,30) | 0,169 |
| Glukose [mg/dl] | 101 (87,7-115) | 139 (107-188) | < 0,001 |
| HbA_{1c} % | 5,4 (4,9-6,2) | 6,7 (5,7-8,6) | < 0,001 |
| Cholesterin [mg/dl] | 219 (177-270) | 186 (146-253) | < 0,001 |
| Triglyceride [mg/dl] | 106 (70-188) | 146 (77-289) | 0,001 |
| LDL-Cholesterin [mg/dl] | 144 (100-185) | 109 (65-76) | < 0,001 |
| HDL-Cholesterin [mg/dl] | 64,0 (41,3-89,0) | 51,5 (36,9-76,4) | 0,002 |
| Phospholipide [µM] | | | |
| Gesamt-PL | 2626 (2165-3204) | 2493 (2040-3061) | 0,117 |
| Gesamt-PC | 1949 (1587-2496) | 1939 (1534-2489) | 0,937 |
| Gesamt-LPC | 162 (106-228) | 139 (97-190) | 0,003 |
| Gesamt-PE | 28,3 (13,6-57,3) | 32,2 (14,5-54,5) | 0,201 |
| Gesamt-SM | 449 (372-545) | 386 (284-491) | < 0,001 |
| Folat [ng/ml] | 12,1 (7,2-22,1) | 13,0 (6,4-23,6) | 0,518 |
| Vitamin B12 [pg/ml] | 375 (215-599) | 386 (206-584) | 0,835 |
| MMA [nM] | 206 (126-346) | 250 (150-522) | 0,018 |
| HoloTC [pmol/L] | 53,0 (32,0-97,0) | 62,3 (33,0-120,8) | 0,080 |
| 25-Hydroxy-Vitamin D [ng/mL] | 17,0 (8,4-36,1) | 15,2 (8,0-32,0) | 0,630 |
| Carboxymethyllysin [nM] | 3230 (2652-3923) | 3206 (2505-4392) | 0,968 |
| Ethylcarboxylysin [nM] | 1303 (874-2150) | 1734 (980-2715) | < 0,001 |
| Homocysteine [µM] | 14,3 (9,1-19,8) | 13,2 (8,8-22,4) | 0,954 |
| Cystathionin [nM] | 245 (132-670) | 287 (157-653) | 0,255 |
| Cholin [µM] | 10,0 (6,7-15,1) | 10,9 (7,5-15,7) | 0,076 |
| Betain [µM] | 34,4 (21,4-47,2) | 33,8 (21,5-49,3) | 0,851 |
| SAH [nM] | 11,8 (8,4-26,5) | 15,2 (10,0-30,6) | < 0,001 |
| SAM [nM] | 111 (92-149) | 130 (95-184) | < 0,001 |
| Verhältnis SAM/SAH | 9,1 (6,2-12,2) | 8,2 (5,2-11,4) | 0,006 |

Ohne Betrachtung des Einflusses von Statinen oder Metformin

Daten sind: Median (10 – 90 Percentile)

^a nach Mann-Whitney-Test

Tabelle 5-6: Phospholipidspezies bei Diabetes mellitus Typ 2 Patienten und Kontrollen

| | Scheinbar gesunde Nichtdiabetiker | Diabetespatienten | P-Wert ^a |
|--------------------|--------------------------------------|--------------------------|---------------------|
| N = | 69 | 92 | |
| Phospholipide [µM] | | | |
| PC 32:1 | 20,9 (12,1-44,2) | 20,3 (11,4-35,6) | 0,486 |
| PC 34:1 | 302 (234-398) | 301 (217-457) | 0,806 |
| PC 34:2 | 564 (403-744) | 560 (438-696) | 0,592 |
| PC 34:3 | 22,2 (14,0-33,3) | 19,6 (12,7-28,4) | 0,027 |
| PC 36:2 | 276 (178-367) | 263 (202-350) | 0,463 |
| PC 36:3 | 170 (140-232) | 167 (127-219) | 0,348 |
| PC 36:4 | 205 (162-305) | 209 (149-314) | 0,946 |
| PC 36:5 | 33,6 (17,9-52,0) | 26,7 (18,5-47,6) | 0,076 |
| PC 38:3 | 45,9 (33,9-72,5) | 49,4 (30,9-78,3) | 0,867 |
| PC 38:4 | 123 (97-170) | 132 (88-203) | 0,216 |
| PC 38:5 | 78,8 (57,9-107,4) | 75,9 (56,2-105,7) | 0,568 |
| PC 38:6 | 84,2 (55,5-129,4) | 82,7 (57,5-117,2) | 0,657 |
| LPC 16:0 | 92,3 (58,5-131,2) | 76,5 (56,4-110,8) | 0,003 |
| LPC 18:0 | 24,6 (16,7-36,9) | 20,2 (13,4-31,2) | 0,002 |
| LPC 18:1 | 18,1 (11,8-24,2) | 14,9 (10,3-22,4) | 0,008 |
| LPC 18:2 | 21,8 (11,8-32,7) | 19,3 (11,5-27,3) | 0,045 |
| LPC 20:4 | 5,10 (3,28-7,65) | 4,74 (2,69-7,34) | 0,136 |
| PE 34:1 | 2,38 (0,76-5,03) | 2,93 (1,07-5,45) | 0,086 |
| PE 34:2 | 1,97 (0,47-5,91) | 2,30 (0,81-4,23) | 0,257 |
| PE 36:2 | 6,23 (2,76-16,64) | 7,35 (2,62-13,32) | 0,219 |
| PE 36:3 | 2,12 (0,68-4,80) | 2,48 (0,83-5,18) | 0,167 |
| PE 36:4 | 2,73 (1,01-4,89) | 2,92 (1,05-5,33) | 0,150 |
| PE 38:4 | 2,81 (1,21-6,31) | 4,05 (1,54-6,42) | 0,148 |
| PE 38:5 | 3,01 (1,31-7,21) | 3,33 (1,50-5,86) | 0,299 |
| PE 38:6 | 4,04 (1,93-8,70) | 3,89 (1,84-9,91) | 0,764 |
| PE 40:5 | 1,39 (0,38-3,03) | 1,29 (0,34-3,60) | 0,715 |
| SM 14:0 | 13,4 (9,7-18,6) | 11,2 (7,6-15,1) | < 0,001 |
| SM 16:0 | 131 (112-170) | 116 (84-148) | < 0,001 |
| SM 16:1 | 16,1 (11,5-21,6) | 14,3 (10,4-18,8) | < 0,001 |
| SM 18:0 | 36,5 (25,1-46,8) | 30,5 (21,3-39,4) | < 0,001 |
| SM 18:1 | 13,9 (10,2-18,4) | 12,0 (7,9-17,1) | 0,001 |
| SM 20:0 | 18,7 (13,2-25,4) | 16,0 (10,7-20,6) | < 0,001 |
| SM 22:0 | 31,3 (24,2-43,1) | 27,7 (18,7-36,5) | 0,001 |
| SM 22:1 | 26,0 (19,6-34,3) | 22,4 (16,0-28,7) | < 0,001 |
| SM 23:0 | 15,6 (11,8-22,8) | 13,3 (9,5-18,8) | < 0,001 |
| SM 23:1 | 16,1 (11,7-22,1) | 13,2 (9,1-18,9) | < 0,001 |
| SM 23:2 | 10,6 (7,8-14,5) | 9,95 (6,35-12,28) | 0,017 |
| SM 24:0 | 19,3 (15,1-28,5) | 16,9 (11,7-22,7) | < 0,001 |
| SM 24:1 | 71,3 (56,3-90,1) | 57,9 (44,3-80,9) | < 0,001 |
| SM 24:2 | 22,2 (15,4-31,2) | 17,2 (11,3-26,8) | < 0,001 |

Ohne Betrachtung des Einflusses von Statinen oder Metformin

Daten sind: Median (10 – 90 Percentile)

^a nach Mann-Whitney-Test

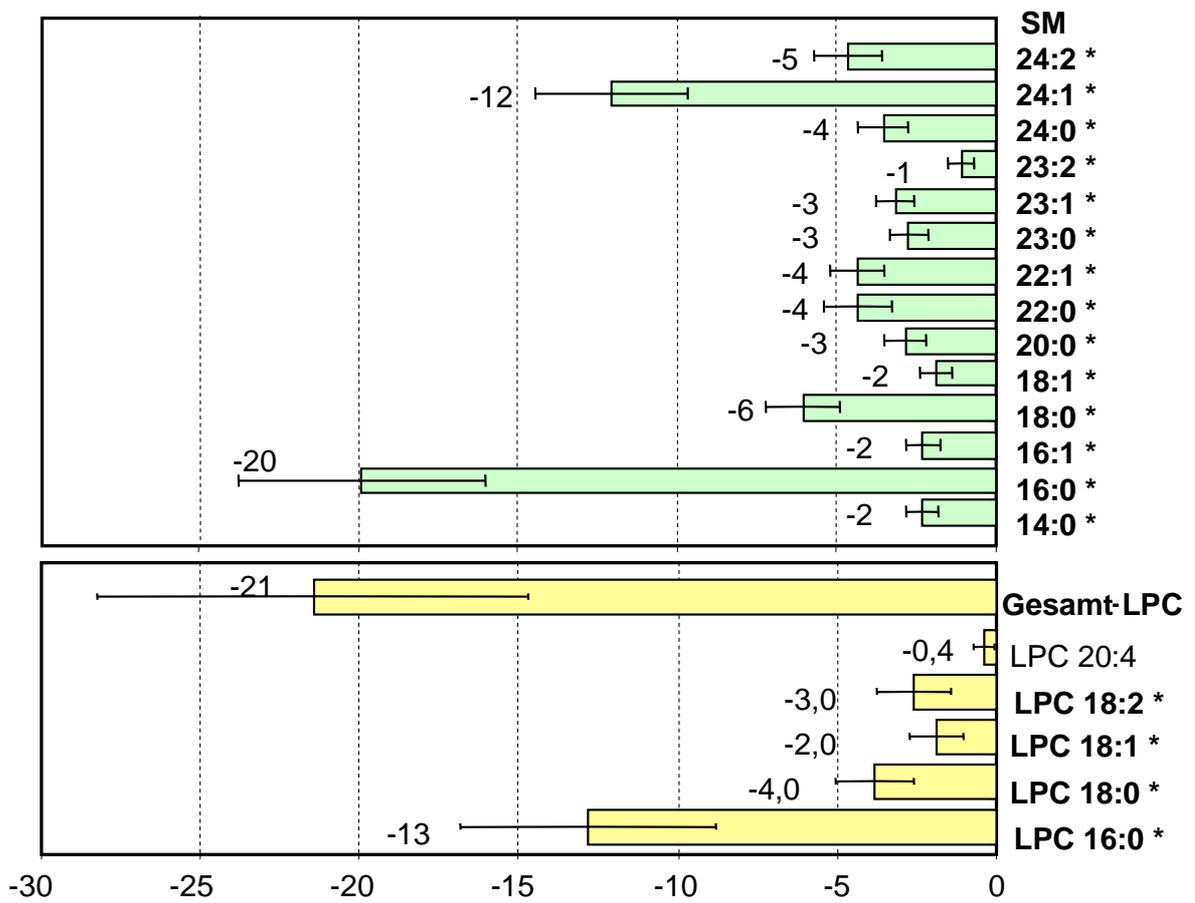


Abbildung 5-5: Mittelwerte der Differenz der Konzentrationen verschiedener SM- und LPC-Spezies [μM] bei 92 Diabetikern im Vergleich mit 69 scheinbar gesunden Kontrollen
 * Mittelwerte signifikant verschieden (p<0,05)

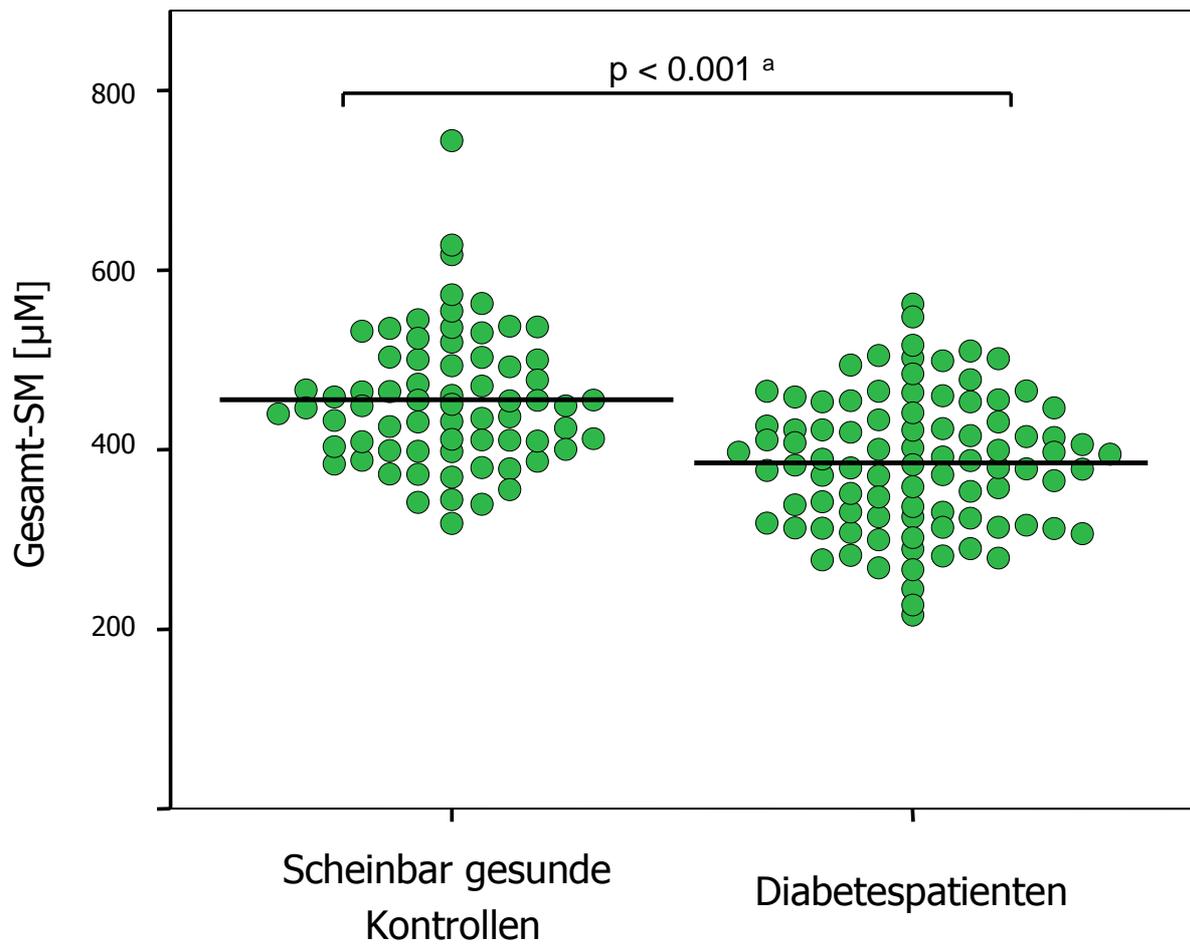


Abbildung 5-6: Sphingomyelinkonzentration bei scheinbar gesunden Kontrollen und Diabetikern; ^anach Mann-Whitney-Test

Einfluss von Metformin und Statinen auf die Plasma-Konzentration der Phospholipide bei Diabetikern

Das Kollektiv der untersuchten Diabetesprieten wurde einmal in mit Metformin behandelte und in nicht mit Metformin behandelte Probanden und einmal in mit Statin behandelte und in nicht mit Statin behandelte Probanden aufgeteilt. Es wurde jeweils die Gruppe der Probanden, die das Medikament einnahmen, mit den restlichen Probanden verglichen. Um den Effekt der Medikamente einzeln beobachten zu können, wurden für die Analyse der Werte von Patienten mit bzw. ohne Metformin-Behandlung alle Probanden ausgeklammert, die Statine erhalten hatten. Umgekehrt wurden beim Vergleich der mit Statinen behandelten Patienten mit den nicht mit Statinen behandelten Patienten die Werte von Probanden, die Metformin einnahmen, nicht berücksichtigt.

In Bezug auf ihren BMI, die Dauer ihrer Erkrankung und ihre Blutwerte für Glukose, HbA_{1c}, Kreatinin, Triglyceride, Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin oder HDL-Cholesterin unterschieden sich die mit Metformin behandelten Diabetesprieten nicht signifikant von den anderen Diabetikern. Allerdings waren die mit Metformin behandelten signifikant jünger (**Tabelle 5-7**).

Eine Behandlung mit Metformin war mit einer Erhöhung des Verhältnisses von SAM zu SAH assoziiert und die Konzentration der Glykierungsmarker Carboxymethyllysin sowie des für Lysin korrigierten Carboxymethyllysin war bei mit Metformin behandelten Patienten signifikant geringer. Auch die Konzentration von Vitamin B12 und MMA war bei Probanden mit Metformin-Behandlung signifikant geringer. Im Hinblick auf die PL war die Konzentration von Gesamt-LPC und von Gesamt-PE signifikant geringer (**Tabelle 5-7**). Bei den einzelnen PL-Spezies war diese Verringerung bei allen LPC- und PE-Spezies zu beobachten. Sie war allerdings nur für LPC 16:0 und LPC 18:0 sowie für 5 PE-Spezies (34:2, 26:2, 36:4, 38:4, 38:5) signifikant. (**Tabelle 5-8**)

Tabelle 5-7: Phospholipidkonzentrationen und andere Studienparameter im Plasma von mit Metformin behandelten Diabetes mellitus Typ 2 Patienten und nicht mit Metformin behandelten Diabetikern

| | Metformin-Behandlung | | P-Wert ^a |
|--------------------------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | Nein | Ja | |
| N = | 21 | 25 | |
| Alter (Jahre) | 76 (84-46) | 64 (75-56) | 0,031 |
| Body-Mass-Index [kg/m ²] | 27,3 (23,1-33,6) | 30,8 (22,9-37,3) | 0,062 |
| Kreatinin [mg/dl] | 0,90 (0,62-1,48) | 0,80 (0,51-1,09) | 0,077 |
| Glukose [mg/dl] | 130 (112-147) ^c | 141 (106-212) | 0,485 |
| HbA _{1c} % | 7,30 (5,47-9,76) | 6,60 (5,90-8,60) | 0,260 |
| Cholesterin [mg/dl] | 217 (140-282) | 199 (157-257) | 0,533 |
| Triglyceride [mg/dl] | 146 (54-194) | 133 (52-228) | 0,796 |
| LDL-Cholesterin [mg/dl] | 149 (76-192) | 122 (71-176) | 0,576 |
| HDL-Cholesterin [mg/dl] | 60,0 (37,4-90,4) | 51,0 (39,0-92,0) | 0,343 |
| Phospholipide [µM] | | | |
| Gesamt-PL | 2591 (2061-3305) | 2510 (1936-3054) | 0,221 |
| Gesamt-PC | 1991 (1519-2618) | 1951 (1432-2365) | 0,205 |
| Gesamt-LPC | 157 (101-209) | 123 (99-184) | 0,012 |
| Gesamt-PE | 35,4 (20,7-66,3) | 24,9 (8,1-40,3) | 0,004 |
| Gesamt-SM | 415 (325-497) | 415 (320-512) | 0,869 |
| Folat [ng/ml] | 11,3 (6,7-15,9) ^b | 10,3 (5,9-23,5) | 0,680 |
| B12 [pg/ml] | 446 (346-759) | 346 (243-470) | 0,003 |
| MMA [nM] | 246 (181-607) | 201 (148-296) | 0,047 |
| HoloTC [pmol/L] | 19 (8-41) | 56 (30-101) | 0,069 |
| 25-Hydroxy-Vitamin D [ng/mL] | 18,5 (9,6-46,3) | 15,6 (6,5-29,2) | 0,380 |
| Carboxymethyllysin [nM] | 3602 (2884-4829) | 3199 (2534-4072) | 0,011 |
| Ethylcarboxylysin [nM] | 1676 (846-2315) | 1582 (1005-2525) | 0,766 |
| Homocystein [µM] | 12,2 (8,9-24,0) | 12,2 (7,4-20,2) | 0,733 |
| Cystathionin [mg/dl] | 296 (126-1079) | 285 (152-633) | 0,530 |
| Cholin [µM] | 11,1 (7,5-16,5) | 9,8 (7,4-14,8) | 0,378 |
| Betain [µM] | 36,3 (21,5-71,2) | 33,3 (24,7-51,0) | 0,574 |
| SAH [nM] | 18,9 (9,6-46,3) | 14,2 (9,7-24,6) | 0,062 |
| SAM [nM] | 126 (92-194) | 120 (94-172) | 0,447 |
| Verhältnis SAM/SAH | 7,03 (3,82-10,18) | 9,06 (6,45-11,95) | 0,022 |

Daten sind: Median (10 – 90 Percentile)

Mit Statinen behandelte Patienten sind aus der Betrachtung ausgeschlossen.

Methylierte PL (Summe aus Gesamt-PC, -LPC, -SM)

^a nach Mann-Whitney-Test; ^b nach T-Test; ^c 10-75 Percentile

Tabelle 5-8: Phospholipidspezies im Plasma von mit Metformin behandelten Diabetes mellitus Typ 2 Patienten und nicht mit Metformin behandelten Diabetikern

| | Metformin-Behandlung | | P-Wert ^a |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|
| | Nein | Ja | |
| N = | 21 | 25 | |
| Phospholipide [μ M] | | | |
| PC 32:1 | 22,5 (11,4-53,5) | 18,8 (10,0-32,9) | 0,749 |
| PC 34:1 | 292 (247-546) | 293 (199-392) | 0,349 |
| PC 34:2 | 603 (408-836) | 564 (461-677) | 0,080 |
| PC 34:3 | 20,4 (13,6-40,8) | 19,4 (12,0-26,2) | 0,131 |
| PC 36:2 | 289 (174-470) | 267 (215-344) | 0,197 |
| PC 36:3 | 173 (131-252) | 171 (123-215) | 0,213 |
| PC 36:4 | 200 (151-273) | 209 (135-295) | 0,956 |
| PC 36:5 | 24,9 (16,0-66,7) | 28,3 (16,9-49,6) | 0,635 |
| PC 38:3 | 52,7 (29,2-112,0) | 46,1 (30,8-72,3) | 0,349 |
| PC 38:4 | 125 (84-189) | 123 (84-191) | 0,651 |
| PC 38:5 | 76 (59-106) | 78 (49-97) | 0,447 |
| PC 38:6 | 90 (50-126) | 82 (64-131) | 0,974 |
| LPC 16:0 | 92 (59-122) | 71 (58-110) | 0,012 |
| LPC 18:0 | 24,3 (15,3-40,3) | 18,3 (12,6-29,6) | 0,024 |
| LPC 18:1 | 16,9 (10,5-22,5) | 13,1 (10,2-22,7) | 0,069 |
| LPC 18:2 | 22,0 (11,0-32,2) | 19,1 (12,3-27,0) | 0,087 |
| LPC 20:4 | 4,32 (1,45-6,59) | 4,03 (2,65-6,31) | 0,974 |
| PE 34:1 | 2,92 (1,20-7,61) | 2,78 (0,65-3,96) | 0,295 |
| PE 34:2 | 2,59 (1,56-5,94) | 1,64 (0,56-4,13) | 0,005 |
| PE 36:2 | 7,6 (2,9-23,3) | 5,8 (2,8-12,4) | 0,028 |
| PE 36:3 | 2,98 (0,98-5,59) | 2,08 (0,51-3,65) | 0,067 |
| PE 36:4 | 3,87 (1,54-5,01) | 2,41 (0,61-4,42) | 0,002 |
| PE 38:4 | 4,22 (1,76-6,25) | 2,71 (0,90-4,67) | 0,010 |
| PE 38:5 | 3,54 (1,77-6,26) | 2,50 (0,78-4,58) | 0,005 |
| PE 38:6 | 3,84 (1,61-9,98) | 3,06 (1,38-7,13) | 0,143 |
| PE 40:5 | 1,35 (0,50-3,96) | 1,02 (0,07-2,58) | 0,305 |
| SM 14:0 | 13,4 (7,5-17,0) | 11,3 (8,2-15,8) | 0,120 |
| SM 16:0 | 128 (99-161) | 126 (92-163) | 0,589 |
| SM 16:1 | 15,4 (12,0-18,4) | 14,7 (10,8-19,5) | 0,749 |
| SM 18:0 | 31,7 (24,4-41,3) | 33,0 (23,3-39,3) | 0,886 |
| SM 18:1 | 13,2 (9,6-17,3) | 13,1 (8,8-17,6) | 0,716 |
| SM 20:0 | 17,3 (12,3-22,1) | 17,2 (12,4-20,8) | 0,667 |
| SM 22:0 | 29,9 (19,7-36,0) | 31,6 (22,2-41,2) | 0,161 |
| SM 22:1 | 23,8 (16,7-30,8) | 23,8 (19,4-29,3) | 0,667 |
| SM 23:0 | 13,7 (10,2-20,1) | 15,2 (10,8-20,1) | 0,604 |
| SM 23:1 | 15,5 (11,5-20,1) | 13,8 (10,7-20,6) | 0,295 |
| SM 23:2 | 10,0 (7,0-14,8) | 10,9 (7,6-13,0) | 0,396 |
| SM 24:0 | 17,5 (11,3-23,3) | 18,3 (13,0-27,6) | 0,372 |
| SM 24:1 | 66,6 (53,3-80,4) | 62,1 (45,1-88,4) | 0,956 |
| SM 24:2 | 20,4 (16,2-28,2) | 17,8 (10,4-28,9) | 0,072 |

Daten sind: Median (10 – 90 Percentile)

Mit Statinen behandelte Patienten sind aus der Betrachtung ausgeschlossen.

^a nach Mann-Whitney-Test

Die mit Statin behandelten Patienten unterschieden sich in Alter, BMI, Plasma-Glukosekonzentration und in ihren Lipoprotein-Parametern nicht signifikant von den nicht mit Statinen behandelten Patienten (**Tabelle 5-9**). Wie in **Tabelle 5-9** weiterhin aufgeführt, war bei Behandlung mit Statinen die Konzentration des Gesamt-LPC und des Gesamt-SM signifikant erhöht. Die Verringerung war ebenfalls bei allen einzeln untersuchten LPC-Spezies bis auf LPC 20:4 zu beobachten und auch für alle untersuchten LPC-Spezies bis auf LPC 20:4 signifikant. Bei allen untersuchten SM-Spezies war der Median der Plasma-Konzentration in der Gruppe der mit Statinen behandelten Diabetiker geringer. Das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde allerdings nur für SM 14:0, SM 16:0, SM 18:1, SM 20:0 sowie SM 23:1 erreicht (**Tabelle 5-10**).

Tabelle 5-9: Phospholipidkonzentrationen und andere Studienparameter bei mit Statin behandelten Diabetes mellitus Typ 2 Patienten und nicht mit Statin behandelten Diabetespatienten

| | Statin-Behandlung ^b | | P-Wert ^a |
|--------------------------------------|--------------------------------|----------------------|---------------------|
| | Nein | Ja | |
| N = | 21 | 22 | |
| Alter (Jahre) | 72,0 (46,0-82,0) | 65,5 (57,3-75,4) | 0,050 |
| Body-Mass-Index [kg/m ²] | 27,3 (23,1-33,6) | 28,6 (21,0-35,8) | 0,319 |
| Kreatinin [mg/dl] | 0,9 (0,6-1,5) | 1,0 (0,7-2,0) | 0,804 |
| Glukose [mg/dl] | 130 (112-147 ^b) | 125 (93-227) | 0,928 |
| HbA _{1c} % | 7,30 (5,47-9,76) | 6,45 (5,55-8,65) | 0,395 |
| Cholesterin [mg/dl] | 217 (140-282) | 181 (125-231) | 0,052 |
| Triglyceride [mg/dl] | 146 (54-194) | 154 (64-384) | 0,273 |
| LDL-Cholesterin [mg/dl] | 149 (76-192) | 103 (41-164) | 0,124 |
| HDL-Cholesterin [mg/dl] | 60,0 (37,4-90,4) | 49,0 (36,3-87,0) | 0,254 |
| Phospholipide [µM] | | | |
| Gesamt-PL | 2543 (2081-3298) | 2493 (1948-3354) | 0,333 |
| Gesamt-PC | 1978 (1533-2608) | 1990 (1478-2694) | 0,495 |
| Gesamt-LPC | 155 (103-208) | 129 (95-185) | 0,003 |
| Gesamt-PE | 34,6 (21,0-65,1) | 37,3 (8,2-67,1) | 0,792 |
| Gesamt-SM | 414 (324-493) | 351 (273-488) | 0,029 |
| Folate [pg/ml] | 11,3 (6,7-15,9) ^b | 12,2 (4,4-24,9) | 0,583 |
| B12 [pg/ml] | 446 (346-759) | 400 (219-609) | 0,136 |
| MMA [nM] | 246 (181-607) | 297 (138-549) | 0,716 |
| Holo TC [pmol/L] | 75 (46-259) | 79 (33-169) | 0,980 |
| 25-Hydroxy-Vitamin D [pg/ml] | 18,5 (8,4-14,6) | 17,4 (7,7-40,6) | 1,000 |
| Carboxymethyllysin [nM] | 3602 (2884-4829) | 3424 (2451-4462) | 0,134 |
| Ethylcarboxylysin [nM] | 1676 (846-2315) | 1822 (818-3168) | 0,606 |
| Homocystein [µM] | 12,2 (8,9-24,0) | 14,1 (9,3-26,8) | 0,206 |
| Cystathionin [mg/dl] | 296 (126-1079) | 252 (127-947) | 0,741 |
| Cholin [µM] | 11,1 (7,5-16,5) | 12,0 (8,2-17,0) | 0,688 |
| Betain [µM] | 36,3 (21,5-71,2) | 33,8 (19,4-47,0) | 0,627 |
| SAM [nM] | 126 (92-194) | 141 (90-236) | 0,468 |
| SAH [nM] | 18,9 (9,6-46,3) | 17,3 (9,5-44,6) | 0,947 |
| Verhältnis SAM/SAH | 7,0 (3,8-10,2) | 8,1 (4,7-10,4) | 0,395 |

Daten sind: Median (10 – 90 Percentile)

Mit Metformin behandelte Patienten sind aus der Betrachtung ausgeschlossen.

Methylierte PL (Summe aus Gesamt-PC,-LPC, -SM)

^a nach Mann-Whitney-Test; ^b 10-75 Percentile

Tabelle 5-10: Phospholipidspezies im Plasma von mit Statin behandelten Diabetespatienten und nicht mit Statin behandelten Diabetespatienten

| | Statin-Behandlung | | P-Wert ^a |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|
| | Nein | Ja | |
| Phospholipide [μ M] | | | |
| PC 32:1 | 22,5 (11,7-50,1) | 17,8 (9,8-54,9) | 0,538 |
| PC 34:1 | 299 (247-528) | 301 (206-555) | 0,809 |
| PC 34:2 | 599 (422-827) | 535 (358-702) | 0,020 |
| PC 34:3 | 20,4 (13,6-39,7) | 17,6 (10,4-29,7) | 0,041 |
| PC 36:2 | 286 (178-462) | 239 (175-363) | 0,059 |
| PC 36:3 | 172 (132-250) | 168 (122-235) | 0,344 |
| PC 36:4 | 199 (152-272) | 216 (156-362) | 0,153 |
| PC 36:5 | 25,2 (16,0-63,8) | 28,4 (14,1-58,2) | 0,344 |
| PC 38:3 | 53 (30-110) | 50 (27-74) | 0,281 |
| PC 38:4 | 127 (84-189) | 143 (97-233) | 0,262 |
| PC 38:5 | 79 (59-106) | 74 (51-111) | 0,982 |
| PC 38:6 | 90 (50-126) | 86 (50-124) | 0,930 |
| LPC 16:0 | 92 (59-122) | 73 (50-103) | 0,011 |
| LPC 18:0 | 24,3 (15,6-39,9) | 19,9 (12,8-30,4) | 0,006 |
| LPC 18:1 | 17,1 (10,7-22,4) | 13,5 (10,9-21,5) | 0,029 |
| LPC 18:2 | 21,8 (11,4-31,5) | 16,1 (10,7-26,6) | 0,016 |
| LPC 20:4 | 4,33 (1,48-6,52) | 5,00 (2,42-8,11) | 0,113 |
| PE 34:1 | 2,93 (1,23-7,26) | 3,18 (0,64-6,44) | 0,538 |
| PE 34:2 | 2,57 (1,59-5,89) | 3,33 (0,44-6,08) | 0,775 |
| PE 36:2 | 7,7 (3,2-22,9) | 7,6 (1,5-15,9) | 0,692 |
| PE 36:3 | 2,94 (1,05-5,58) | 2,54 (0,31-6,23) | 0,441 |
| PE 36:4 | 3,78 (1,64-4,98) | 3,78 (0,61-6,90) | 0,895 |
| PE 38:4 | 4,05 (1,82-6,19) | 4,55 (1,24-6,93) | 0,344 |
| PE 38:5 | 3,35 (1,85-6,17) | 3,94 (1,62-6,93) | 0,644 |
| PE 38:6 | 3,70 (1,64-9,91) | 6,34 (1,46-11,69) | 0,429 |
| PE 40:5 | 1,39 (0,50-3,87) | 1,86 (0,26-4,43) | 0,613 |
| SM 14:0 | 13,4 (7,9-16,9) | 10,0 (6,8-14,3) | 0,005 |
| SM 16:0 | 128 (99-160) | 105 (74-146) | 0,031 |
| SM 16:1 | 15,1 (12,0-18,3) | 12,7 (8,9-18,7) | 0,090 |
| SM 18:0 | 31,6 (24,5-41,3) | 26,5 (18,1-40,6) | 0,086 |
| SM 18:1 | 13,4 (9,8-17,4) | 10,8 (7,5-16,3) | 0,022 |
| SM 20:0 | 17,4 (12,5-22,1) | 14,5 (11,0-18,2) | 0,009 |
| SM 22:0 | 28,6 (19,7-35,8) | 26,7 (13,9-33,7) | 0,660 |
| SM 22:1 | 23,8 (16,8-30,5) | 20,9 (12,6-30,2) | 0,050 |
| SM 23:0 | 13,3 (10,3-20,0) | 12,6 (7,4-16,7) | 0,253 |
| SM 23:1 | 15,1 (11,5-20,1) | 11,2 (7,7-19,2) | 0,016 |
| SM 23:2 | 10,0 (7,0-14,5) | 9,2 (6,2-13,3) | 0,391 |
| SM 24:0 | 17,2 (10,4-23,2) | 15,9 (10,2-21,1) | 0,322 |
| SM 24:1 | 65,8 (51,0-79,8) | 57,2 (43,7-83,6) | 0,218 |
| SM 24:2 | 20,2 (15,4-28,0) | 16,9 (11,4-30,2) | 0,035 |

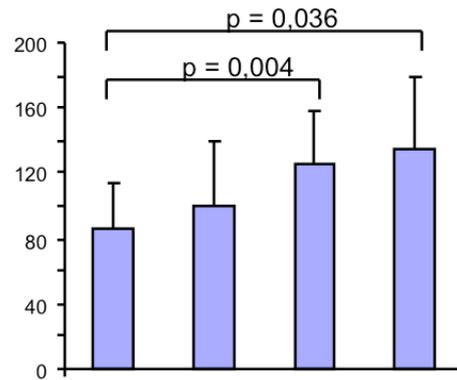
Daten sind: Median (10 – 90 Percentile)

Mit Metformin behandelte Patienten sind aus der Betrachtung ausgeschlossen.

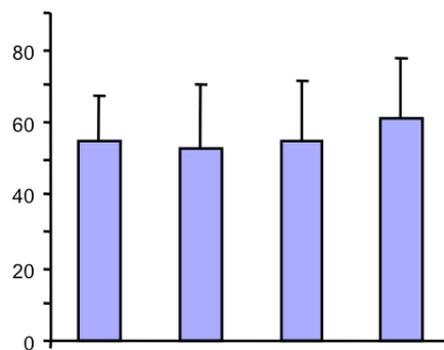
^a nach Mann-Whitney-Test; ^b 10-75 Percentile

Die Gruppen der ausschließlich mit Metformin oder Statin behandelten Patienten wurden miteinander und mit der Gruppe der mit beiden Medikamenten behandelten Patienten sowie mit der Gruppe, die weder Statin noch Metformin verabreicht bekam, verglichen (**Abbildung 5-7, Abbildung 5-8**). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden in der Konzentration des LDL-Cholesterins sowie in der Konzentration der PL-Klassen LPC und SM. Die Konzentration des LDL-Cholesterins sowie die Konzentration des Gesamt-SM waren bei mit beiden Medikamenten behandelten Diabetikern signifikant geringer als bei nur mit Metformin oder mit keinem der beiden Medikamente behandelten Patienten. Die LPC-Konzentration war bei Patienten, die Statine genommen hatten, signifikant geringer als bei Patienten, die kein Statin und auch kein Metformin bekamen.

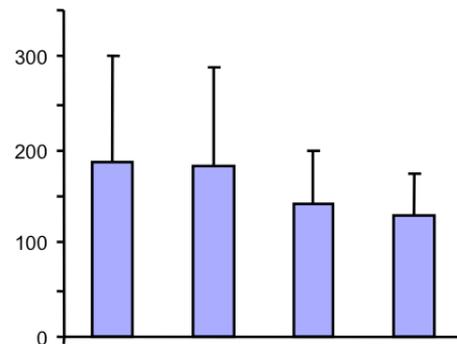
LDL-Cholesterin [mg/dl]



HDL-Cholesterin [mg/dl]



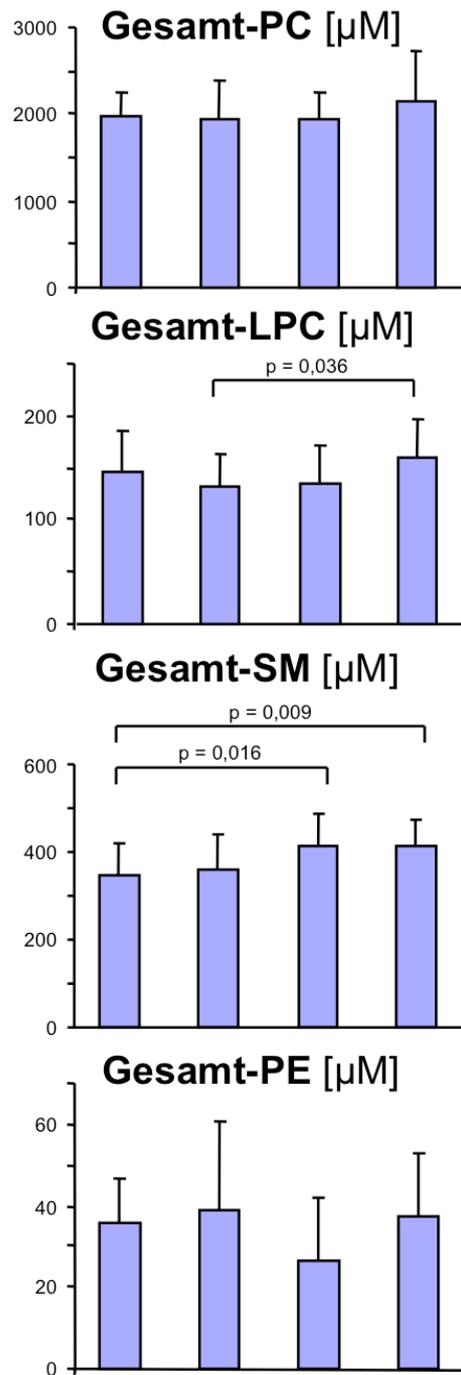
Triglyceride [mg/dl]



Behandlung mit:

| | | | | |
|-----------|---|---|---|---|
| Statin | + | + | - | - |
| Metformin | + | - | + | - |

Abbildung 5-7: Einfluss einer Behandlung mit Metformin und Statin auf die Lipidkonzentrationen im EDTA-Plasma von Diabetikern
 Werte sind Mittelwert (Standardabweichung); signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit P-Wert angegeben; N zwischen 11 und 19 Probanden.



Behandlung mit:

| | | | | |
|-----------|---|---|---|---|
| Statin | + | + | - | - |
| Metformin | + | - | + | - |

Abbildung 5-8: Einfluss einer Behandlung mit Metformin und Statin auf die Phospholipidkonzentration im EDTA-Plasma von Diabetikern

Werte sind Mittelwert (Standardabweichung); signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit P-Wert angegeben; N zwischen 21 und 25 Probanden.

Variablen, welche die Variation der Gesamt-Phosphatidylcholin-Konzentration bei Diabetikern erklären können

Mit „multiple backward regression analysis“ wurden ausgehend von verschiedenen Blutwerten die Parameter bestimmt, welche die Variation der Konzentration der PL-Klassen und der Gesamt-PL bei Diabetikern beschreiben konnten. Zur Erklärung der Variation der PC-Konzentration waren dies die Konzentrationen von Cholin, Gesamt-PE, HDL-C, SAH, Cholesterin und Triglyceriden. Eine Erhöhung der Konzentration eines jeden dieser Faktoren, bis auf SAH, war mit einer Erhöhung der PC-Konzentration assoziiert. Nur bei SAH ging eine Konzentrationserhöhung mit einer Verringerung der PC-Konzentration einher. Die zur Berechnung verwendeten Variablen sowie die Ergebnisse sind in **Tabelle 5-11** aufgeführt. Die Variation der PE-Konzentration war hauptsächlich durch Cholin, Hcy, das Alter der Probanden und durch die Konzentration von SAM, Gesamt-LPC, Cholesterin und Gesamt-PC zu erklären. Cholin, das Alter der Diabetespatienten sowie die Cholesterinkonzentration hatten in dem zur Beschreibung der Variation der PE-Konzentration berechneten Modell einen negativen Einfluss (**Tabelle 5-12**). Cholin, Gesamt-PE, HDL-C, Betain, Cholesterin, Gesamt-SM und Triglyceride waren die stärksten Determinanten der Konzentration des LPC. Betain, Gesamt-SM und die Triglyceridkonzentration waren mit einer Verringerung der PE-Konzentration assoziiert (**Tabelle 5-13**). Als Parameter mit einem signifikanten Einfluss auf die Variation der SM-Konzentration wurden nur HDL-C und Cholesterin mit einem positiven Einfluss und Gesamt-LPC mit einem negativen Einfluss ermittelt (**Tabelle 5-14**). Die Variation der Gesamt-PL-Konzentration konnte mit Hilfe von HDL-C, Cholesterin, Betain und Triglyceriden beschrieben werden. Von diesen unabhängigen Variablen war nur Betain mit einer Reduktion der abhängigen Variabel assoziiert (**Tabelle 5-15**).

Tabelle 5-11: Variablen, welche die Variation der **Gesamt-Phosphatidylcholin**-Konzentration bei Diabetikern (n=91) erklären können

| Unabhängige Variablen ohne signifikanten Einfluss | Unabhängige Variablen mit signifikantem Einfluss | Regressionskoeffizient (Konfidenzintervall 95%) | P-Wert |
|--|--|---|---------|
| Hcy, Gesamt-LPC, Alter, Statin, Betain, SAM, Gesamt-SM | Cholin | 14,2 (-1,7 – 30,1) | 0,080 |
| | Gesamt-PE | 9,28 (5,60 – 12,95) | < 0,001 |
| | HDL-C | 6,70 (3,35 – 10,05) | < 0,001 |
| | SAH | -6,38 (-12,38 – -0,39) | 0,037 |
| | Cholesterin | 3,60 (2,59 – 4,61) | < 0,001 |
| | Triglyceride | 2,03 (1,12 – 2,95) | < 0,001 |

Modell erstellt mit „multiple backward regression analysis“; abhängige Variabel: Gesamt-Phosphatidylcholin; R² = 0,813

Tabelle 5-12: Variablen, welche die Variation der **Gesamt-Phosphatidylethanolamin**-Konzentration bei Diabetikern (n=91) erklären können

| Unabhängige Variablen ohne signifikanten Einfluss | Unabhängige Variablen mit signifikantem Einfluss | Regressionskoeffizient (Konfidenzintervall 95%) | P-Wert |
|---|--|---|---------|
| Statin, Betain, Gesamt-SM, HDL-C, SAH, Triglyceride | Cholin | -0,95 (-1,74 – -0,15) | 0,020 |
| | Hcy | 0,421 (-0,053 – 0,896) | 0,081 |
| | Alter | -0,219 (-0,455 – 0,018) | 0,069 |
| | SAM | 0,144 (0,071 – 0,218) | < 0,001 |
| | Gesamt-LPC | 0,103 (0,041 – 0,165) | 0,002 |
| | Cholesterin | -0,095 (-0,164 – -0,026) | 0,008 |
| | Gesamt-PC | 0,029 (0,020 – 0,039) | < 0,001 |

Modell erstellt mit „multiple backward regression analysis“; abhängige Variabel: Gesamt-Phosphatidylethanolamin; $R^2 = 0,746$

Tabelle 5-13: Variablen, welche die Variation der **Gesamt-Lysophosphatidylcholin**-Konzentration bei Diabetikern (n=91) erklären können

| Unabhängige Variablen ohne signifikanten Einfluss | Unabhängige Variablen mit signifikantem Einfluss | Regressionskoeffizient (Konfidenzintervall 95%) | P-Wert |
|---|--|---|---------|
| Alter, Statin, Hcy, SAH, SAM, Gesamt-PC | Cholin | 5,02 (1,82 – 8,34) | 0,003 |
| | Gesamt-PE | 1,60 (0,82 – 2,37) | < 0,001 |
| | HDL-C | 0,858 (0,122 – 1,594) | 0,023 |
| | Betain | -0,836 (-1,808 – 0,137) | 0,090 |
| | Cholesterin | 0,398 (0,081 – 0,715) | 0,015 |
| | Gesamt-SM | -0,220 (-0,405 – -0,036) | 0,020 |
| | Triglyceride | -0,212 (-0,397 – -0,026) | 0,026 |

Modell erstellt mit „multiple backward regression analysis“; abhängige Variabel: Gesamt-Lysophosphatidylcholin; $R^2 = 0,536$

Tabelle 5-14: Variablen, welche die Variation der **Gesamt-Sphingomyelin**-Konzentration bei Diabetikern (n=91) erklären können

| Unabhängige Variablen ohne signifikanten Einfluss | Unabhängige Variablen mit signifikantem Einfluss | Regressionskoeffizient (Konfidenzintervall 95%) | P-Wert |
|--|--|---|---------|
| Gesamt-PE, Cholin, Alter, Statin, Betain, Hcy, SAH, Triglyceride, SAM, Gesamt-PC | HDL-C | 1,91 (1,11 – 2,70) | < 0,001 |
| | Cholesterin | 1,37 (1,07 – 1,67) | < 0,001 |
| | Gesamt-LPC | -0,506 (-0,814 – -0,198) | 0,002 |

Modell erstellt mit „multiple backward regression analysis“; abhängige Variabel: Gesamt-Sphingomyelin; $R^2 = 0,851$

Tabelle 5-15: Variablen, welche die Variation der **Gesamt-Phospholipid**-Konzentration bei Diabetikern (n=91) erklären können

| Unabhängige Variablen ohne signifikanten Einfluss | Unabhängige Variablen mit signifikantem Einfluss | Regressionskoeffizient (Konfidenzintervall 95%) | P-Wert |
|---|--|---|---------|
| Folate, SAM, Alter, Diabetes seit y Jahren, Statin, Vitamin B12, Cholin, Hcy, SAH | HDL-C | 8,93 (4,33 – 13,52) | < 0,001 |
| | Cholesterin | 6,35 (4,63 – 8,07) | < 0,001 |
| | Betain | -6,05 (-13,24 – 1,14) | 0,097 |
| | Triglyceride | 2,88 (1,68 – 4,08) | < 0,001 |

Modell erstellt mit „multiple backward regression analysis“; abhängige Variabel: Gesamt-Phospholipide; $R^2 = 0,742$

Mehrere untersuchte PL-Spezies korrelierten mit verschiedenen Routinemarkern des Lipoproteinstatus. Auch hier gab es Unterschiede zwischen den mit Statin und den mit Metformin behandelten Diabetikern (**Tabelle 5-16**, **Tabelle 5-17**). In beiden Behandlungsgruppen korrelierte ein großer Teil der untersuchten PC- und SM-Spezies signifikant positiv mit der Gesamtcholesterinkonzentration sowie mit der Cholinkonzentration in HDL und LDL. Dabei fällt auf, dass das HDL-Cholesterin signifikant mit PC-Spezies korrelierte, die kürzerkettige und weniger stark ungesättigte FS enthalten (PC 32:1-PC36:2 bzw. PC 32:1-PC36:3 bei Metforminbehandlung).

Die größten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen konnten bei LPC und PE sowie bei Triglyceriden beobachtet werden. So korrelierten bei Probanden mit Statinbehandlung alle untersuchten PE-Spezies signifikant positiv mit der Triglyceridkonzentration, während bei mit Metformin behandelten Probanden diese Korrelation nur für die Spezies PE 34:1 und PE 38:4 signifikant war. Eine signifikante positive Korrelation zwischen LPC 20:4 und Cholesterin sowie eine signifikante positive Korrelation zwischen LPC 18:0 und 18:1 und HDL-Cholesterin konnte nur bei Diabetikern mit Metforminbehandlung gezeigt werden. Eine signifikante negative Korrelation zwischen den SM-Spezies SM 22:1, SM 23:1 und SM 24:1 und Triglyceriden lag ebenfalls nur in der Gruppe der mit Metformin behandelten Diabetiker vor.

Bei einem nicht mit Metformin oder Statin behandelten Kollektiv 76 älterer Nicht-Diabetiker waren die Ergebnisse ähnlich (Daten nicht gezeigt). Es lag ebenfalls eine signifikante positive Korrelation zwischen einem Großteil der SM- und PC-Spezies mit Gesamtcholesterin sowie HDL- und LDL-Cholesterin vor. Alle untersuchten PE-Spezies korrelierten signifikant positiv mit Triglyceriden und wie in der Gruppe der Statin-behandelten Diabetiker. Mehrere LPC-Spezies (16:0, 18:0, 18:1, 18:2) korrelierten signifikant positiv mit HDL-Cholesterin, ähnlich

wie in der Gruppe der Diabetiker mit Metformin-Behandlung. Eine signifikante negative Korrelation zwischen Triglyceriden und SM, wie sie bei den mit Metformin behandelten Diabetespatienten beobachtet werden konnte, lag in der Gruppe der Nichtdiabetiker nur für SM 23:1 vor.

Tabelle 5-16: Korrelationen zwischen PL-Spezies und anderen Blutwerten bei mit Metformin behandelten Diabetikern

| | Cholesterin | Triglyceride | LDL-Cholesterin | HDL-Cholesterin |
|----------|--------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| PC 32:1 | 0,509 | | 0,450 | 0,365 |
| PC 34:1 | 0,558 | | 0,441 | 0,390 |
| PC 34:2 | 0,480 | | | 0,469 |
| PC 34:3 | | | | 0,404 |
| PC 36:2 | | | | 0,479 |
| PC 36:3 | 0,544 | | 0,381 | 0,406 |
| PC 36:4 | 0,541 | 0,526 | 0,395 | |
| PC 36:5 | 0,683 | | 0,639 | |
| PC 38:3 | 0,520 | | 0,485 | |
| PC 38:4 | 0,592 | 0,423 | 0,465 | |
| PC 38:5 | 0,631 | 0,401 | 0,481 | |
| PC 38:6 | 0,480 | 0,392 | | |
| LPC 18:0 | | | | 0,357 |
| LPC 18:1 | | | | 0,446 |
| LPC 20:4 | 0,371 | | | |
| PE 34:1 | | 0,400 | | |
| PE 38:4 | | 0,496 | | |
| PE 38:5 | 0,392 | | | |
| SM 14:0 | 0,619 | | 0,461 | 0,449 |
| SM 16:0 | 0,583 | | 0,497 | 0,473 |
| SM 16:1 | 0,630 | | 0,474 | 0,567 |
| SM 18:0 | 0,415 | | | 0,356 |
| SM 18:1 | 0,500 | | | |
| SM 20:0 | 0,602 | | 0,530 | |
| SM 22:0 | 0,643 | | 0,637 | |
| SM 22:1 | 0,547 | -0,355 | 0,435 | |
| SM 23:0 | 0,606 | | 0,585 | |
| SM 23:1 | | -0,645 | | 0,705 |
| SM 23:2 | | -0,366 | | |
| SM 24:0 | 0,568 | | 0,551 | 0,408 |
| SM 24:1 | 0,518 | | 0,477 | 0,476 |
| SM 24:2 | | -0,438 | 0,376 | 0,514 |

Angegeben sind nur nach Spearman-Rho-Test signifikante ($p < 0,05$) Korrelationen. Die Werte sind die Korrelationskoeffizienten.

Tabelle 5-17: Korrelationen zwischen PL-Spezies und anderen Blutwerten bei mit Statinen behandelten Diabetikern

| | Cholesterin | Triglyceride | LDL-Cholesterin | HDL-Cholesterin |
|---------|--------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| PC 32:1 | | | | 0,441 |
| PC 34:1 | | | | 0,405 |
| PC 34:2 | 0,448 | | | 0,631 |
| PC 34:3 | | | | 0,546 |
| PC 36:2 | 0,429 | | | 0,591 |
| PC 36:3 | | | | |
| PC 36:4 | | 0,559 | 0,421 | |
| PC 36:5 | 0,468 | | 0,431 | |
| PC 38:3 | 0,637 | | 0,565 | |
| PC 38:4 | 0,534 | 0,442 | 0,603 | |
| PC 38:5 | 0,425 | | | |
| PC 38:6 | 0,410 | 0,451 | | |
| PE 34:1 | | 0,720 | | |
| PE 34:2 | | 0,509 | | |
| PE 36:2 | | 0,543 | | |
| PE 36:3 | | 0,398 | | |
| PE 36:4 | | 0,396 | | |
| PE 38:4 | | 0,657 | | |
| PE 38:5 | | 0,489 | | |
| PE 38:6 | | 0,515 | | |
| PE 40:5 | | 0,514 | | |
| SM 14:0 | 0,663 | | 0,489 | 0,489 |
| SM 16:0 | 0,674 | | 0,587 | |
| SM 16:1 | 0,621 | | | 0,736 |
| SM 18:0 | 0,583 | | 0,502 | |
| SM 18:1 | 0,720 | | 0,601 | |
| SM 20:0 | 0,685 | | 0,590 | |
| SM 22:0 | 0,687 | | 0,615 | |
| SM 22:1 | 0,665 | | 0,498 | 0,469 |
| SM 23:0 | 0,726 | | 0,660 | |
| SM 23:1 | 0,579 | | | 0,698 |
| SM 24:0 | 0,617 | | 0,516 | 0,479 |
| SM 24:1 | 0,504 | | | 0,614 |
| SM 24:2 | | | | 0,655 |

Angegeben sind nur nach Spearman-Rho-Test signifikante ($p < 0,05$) Korrelationen. Die Werte sind die Korrelationskoeffizienten.

Neben den Lipoproteinmarkern konnte auch für andere Blutwerte eine Korrelation mit den untersuchten PL innerhalb der Behandlungsgruppen der Diabetiker festgestellt werden. Wie in

Abbildung 5-9 dargestellt, korrelierte die Plasma-SM-Konzentration negativ mit der Konzentration des Serum-Kreatinin, eines Markers der Nierenfunktion. (Diabetiker) Weiterhin korrelierte die Konzentration mehrerer LPC-Spezies sowie des Gesamt-LPC bei Diabetikern negativ mit der Konzentration des Entzündungsmarkers CRP (**Abbildung 5-10**). Die LPC-Spezies 18:0 war mit einer Verringerung der Plasma-Glukose-Konzentration sowie des Langzeit-Glykierungsmarkers HbA_{1C} assoziiert. Dies ist in

Abbildung 5-11 und **Abbildung 5-12** dargestellt. Diese Korrelation war allerdings nur bei scheinbar gesunden Nicht-Diabetikern signifikant. Wie in **Abbildung 5-13** gezeigt, korrelierte SM in einer Population älterer Nicht-Diabetiker negativ mit dem atherogenen Index.

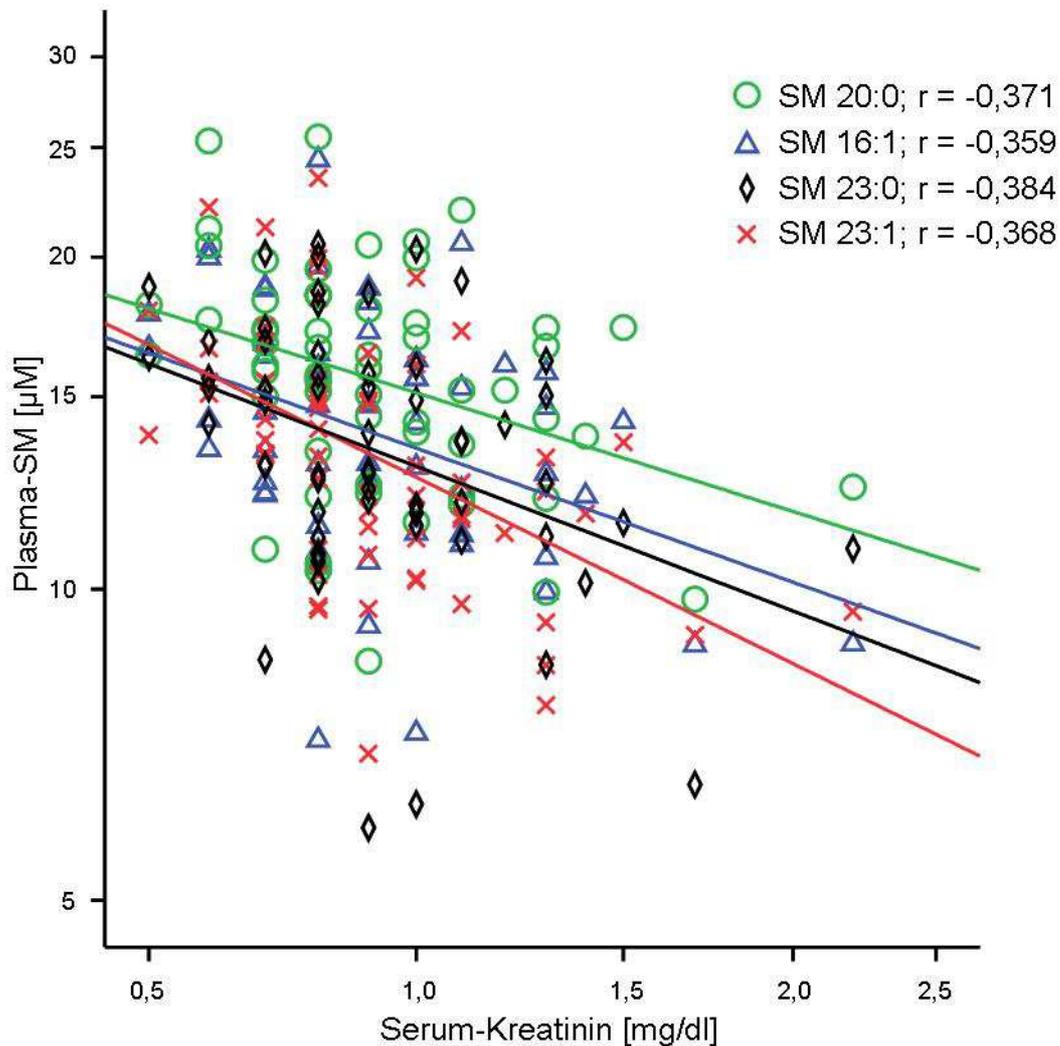


Abbildung 5-9: Zusammenhang zwischen Plasma-SM und Nierenfunktion, ausgedrückt als Konzentration des Serum-Kreatinin bei Diabetikern. Korrelationskoeffizient (r) nach Spearman-Rho; Korrelation für die gezeigten Spezies sowie für Gesamt-SM nach Spearman-Rho-Test signifikant ($p < 0,05$) (ohne Berücksichtigung des Einflusses von Statinen oder Metformin).

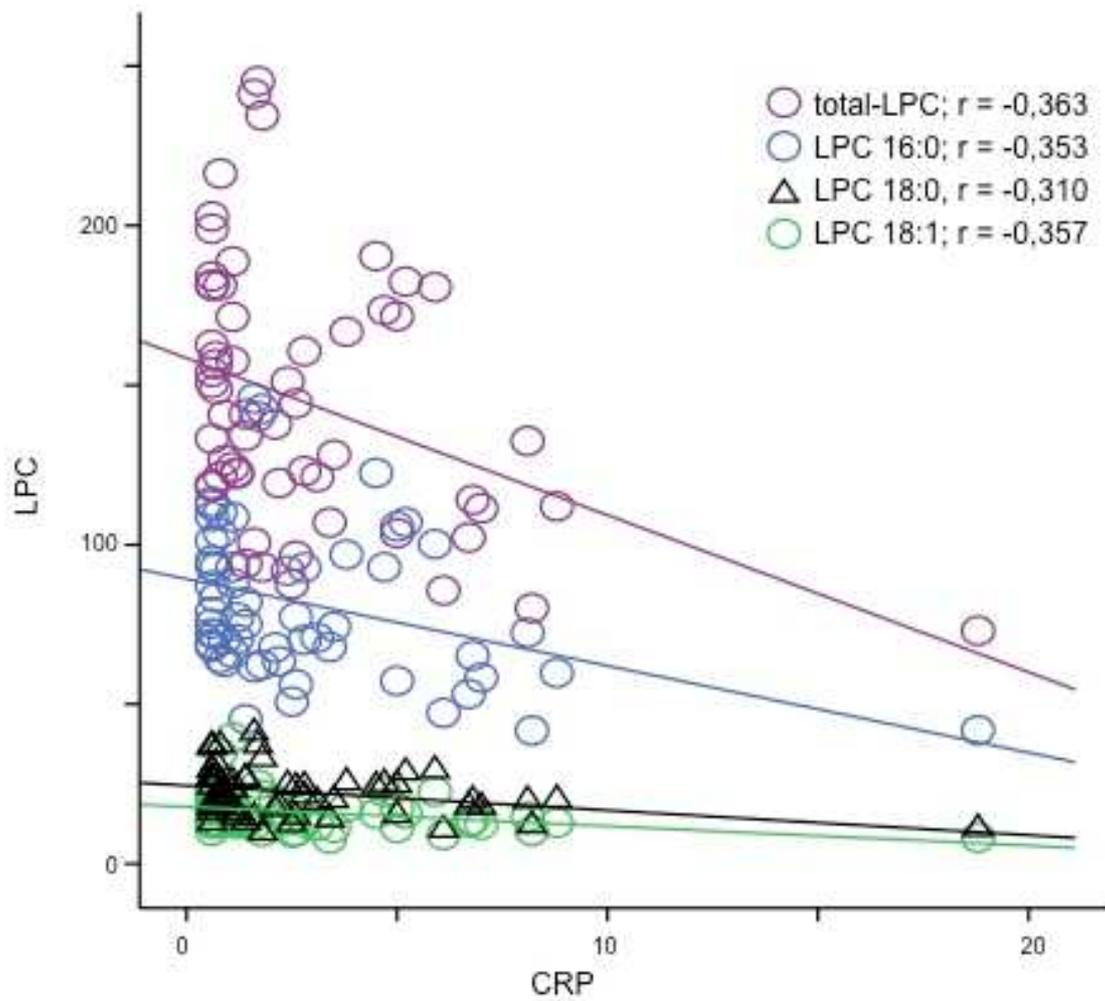


Abbildung 5-10: Zusammenhang zwischen der Plasma-Konzentration des Gesamt-LPC und der Konzentration des C-reaktiven Proteins bei Diabetikern. Korrelationskoeffizient (r) nach Spearman-Rho.

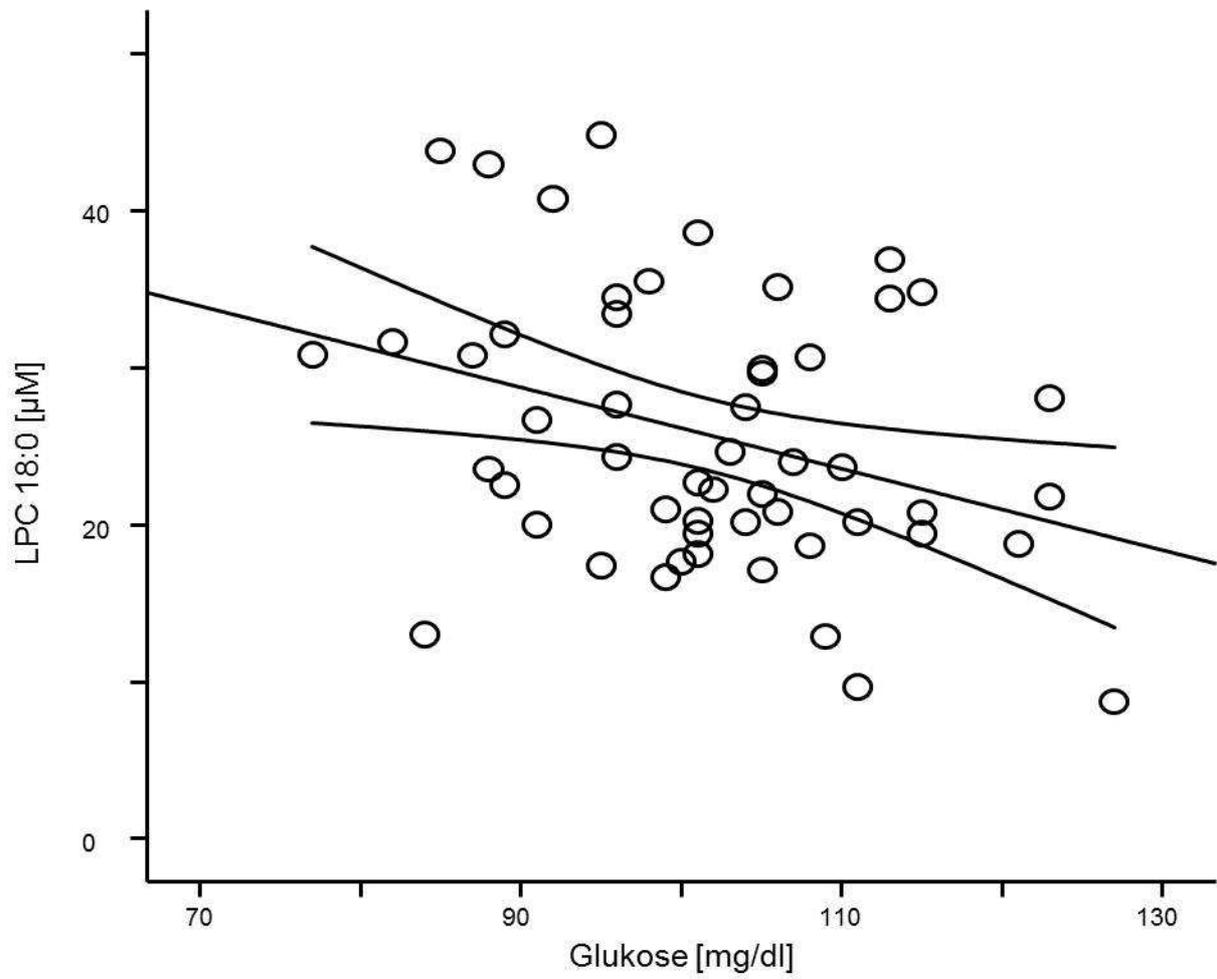


Abbildung 5-11: Beziehung zwischen der Plasma-Konzentration des LPC 18:0 und der Glukosekonzentration im Blut scheinbar gesunder Nicht-Diabetiker. Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho: $r = -0,288$

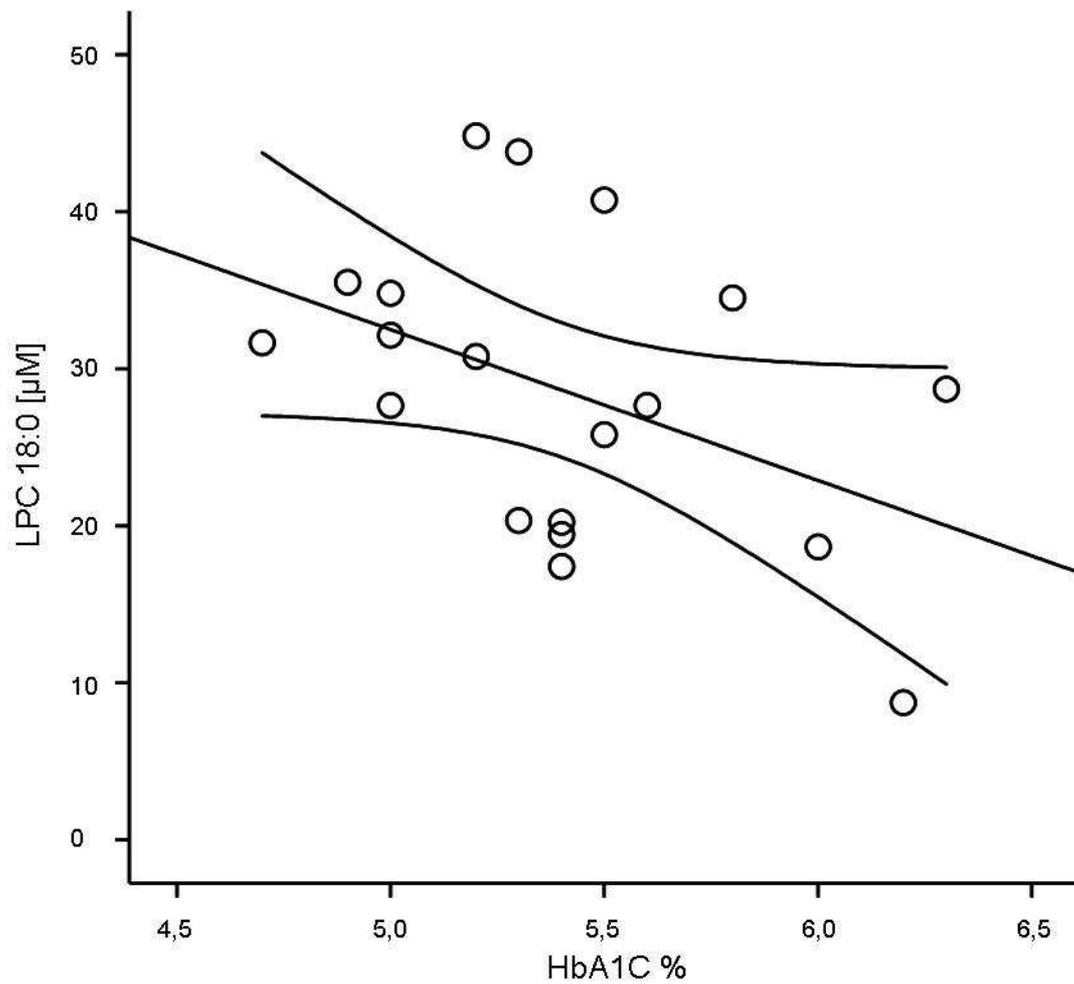


Abbildung 5-12: Zusammenhang zwischen der Plasma-Konzentration des LPC 18:0 mit dem Langzeit-Blutzucker-Marker HbA_{1c} bei 19 scheinbar gesunden Nicht-Diabetikern. (Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho: $r = -0,460$).

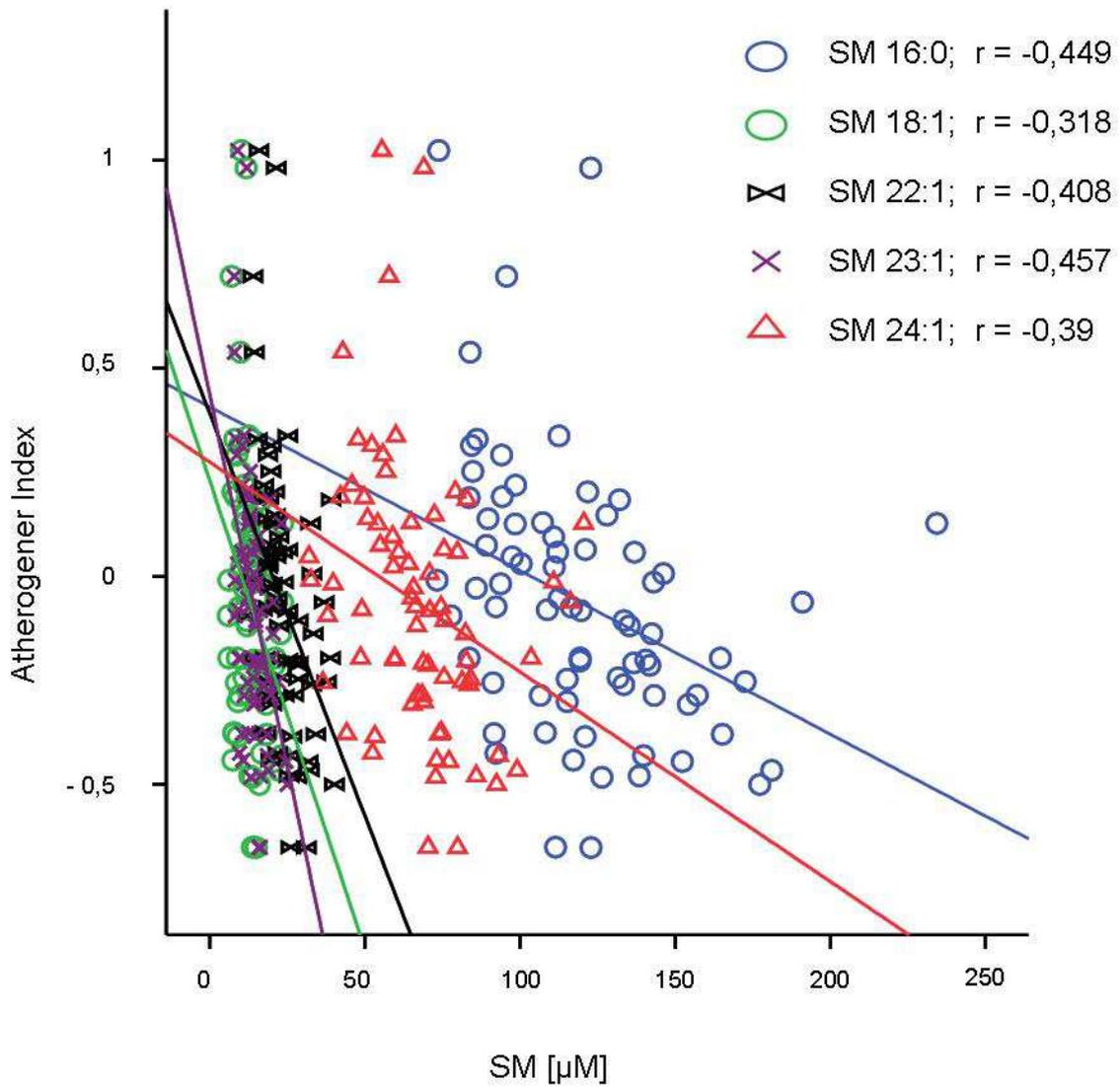


Abbildung 5-13: Beziehung zwischen Plasma-SM-Konzentration und atherogenem Index bei älteren Nichtdiabetikern. Korrelationskoeffizient (r) nach Spearman-Rho (ohne Berücksichtigung des Einflusses von Statinen oder Metformin).

5.4 Phospholipide und andere Parameter nach Intervention mit B-Vitaminen

Zwei Gruppen von Probanden wurden über 12 Monate mit Vitamin D und Calcium supplementiert. Eine der beiden Gruppen erhielt zusätzlich B-Vitamine. Für beide Gruppen wurden vor und nach der Supplementation die Plasma-Phospholipid-Konzentrationen und andere Blutwerte ermittelt. Zum einen wurden die Ergebnisse zwischen den beiden Gruppen verglichen und zum anderen wurden die am Anfang der Studie gemessenen Werte mit den nach der Supplementation gemessenen verglichen.

Vor Beginn der Supplementation lag für keinen der in **Tabelle 5-18** aufgeführten Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vor. Nach der Supplementation war die Konzentration von 5-Methyl-THF sowie von Vitamin B12 in der mit B-Vitaminen supplementierten Gruppe signifikant höher. In dieser Gruppe war weiterhin die Konzentration von Hcy, Cys und DMG signifikant geringer (**Tabelle 5-19**). Verglichen mit den zu Beginn der Studie gemessenen Werten war die Konzentration von 5-Methyl-THF, Vitamin B12, 25-Hydroxy-Vitamin D, Betain und Cholin nach Supplementation mit Vitamin B, D und Calcium signifikant erhöht. Die Konzentration von Hcy war dagegen signifikant reduziert (**Tabelle 5-20**). Nach Supplementation mit Vitamin D und Calcium lag eine signifikant höhere Konzentration von 25-Hydroxy-Vitamin D, Cystathionin, Cholin, DMG und Kreatinin vor, während die Konzentration von Cholesterin im Vergleich zum Beginn der Therapie signifikant reduziert war (**Tabelle 5-21**).

Bei mit B-Vitaminen, Vitamin D und Calcium supplementierten Probanden war die Konzentration des Gesamt-PE sowie mehrerer SM-Spezies signifikant erhöht (**Tabelle 5-22**). Bei nur mit Vitamin D und Calcium supplementierten Probanden war dieser Unterschied allerdings nur für PE und für eine einzelne SM-Spezies signifikant (**Tabelle 5-23, Abbildung 5-14**). Wenn man allerdings die Konzentrationsänderung der PE- und SM-Spezies zwischen vor und nach der Therapie betrachtet und diese Änderung zwischen den beiden Gruppen vergleicht, stellt man fest, dass sich die Gruppen nicht signifikant unterscheiden (**Abbildung 5-16**).

Wie in **Abbildung 5-17** dargestellt, korrelierte die Konzentration methylierter PL bei scheinbar gesunden Nicht-Diabetikern negativ mit der Konzentration des SAH.

Tabelle 5-18: Metabolite und Vitamine in beiden Behandlungsgruppen vor **Supplementation** mit Vitamin D, Calcium und B-Vitaminen

| | Supplementation mit | | | | P-Wert ^a |
|--------------------------------------|------------------------------------|----|-----------------------|----|---------------------|
| | Vitamin D, Calcium und B-Vitaminen | N | Vitamin D und Calcium | N | |
| Alter (Jahre) | 68,0 (54,2-82,8) | 50 | 70,5 (58,0-85,6) | 46 | 0,089 |
| Frauen [n] | 35 | 50 | 22 | 46 | |
| Body-Mass-Index [kg/m ²] | 26,3 (22,9-31,1) | 35 | 23,5 (21,7-32,5) | 35 | 0,414 |
| Kreatinin [mg/dl] | 0,80 (0,60-1,28) | 41 | 0,90 (0,60-1,29) | 40 | 0,867 |
| Glukose [mg/dl] | 104 (94-125) | 41 | 106 (88-137) | 40 | 0,590 |
| Cholesterin [mg/dl] | 208 (149-254) | 41 | 200 (142-261) | 40 | 0,688 |
| Triglyceride [mg/dl] | 101 (60-165) | 41 | 116 (64-281) | 40 | 0,279 |
| LDL-Cholesterin [mg/dl] | 131 (94-168) | 27 | 126 (69-173) | 31 | 0,668 |
| HDL-Cholesterin [mg/dl] | 56 (37-84) | 41 | 55 (33-94) | 40 | 0,561 |
| Phospholipide [µM] | | | | | |
| Gesamt-PL | 2531 (2021-3319) | 33 | 2426 (1878-3481) | 32 | 0,117 |
| Gesamt-PC | 1960 (1459-2647) | 33 | 1867 (1446-2741) | 32 | 0,174 |
| Gesamt-LPC | 165 (110-260) | 33 | 156 (115-233) | 32 | 0,932 |
| Gesamt-PE | 18,9 (7,7-40,2) | 33 | 23,7 (9,4-49,4) | 32 | 0,270 |
| Gesamt-SM | 417 (292-486) | 33 | 364 (284-531) | 32 | 0,168 |
| 5-Methyl-THF [nM] | 14,0 (5,0-36,9) | 48 | 15,4 (3,4-47,8) | 45 | 0,721 |
| B12 [pg/mL] | 379 (238-671) | 41 | 390 (257-576) | 36 | 0,752 |
| MMA [nM] | 212 (142-402) | 47 | 212 (126-388) | 45 | 0,916 |
| HoloTC [pM] | 53 (35-79) | 41 | 47 (26-85) | 36 | 0,288 |
| 25-Hydroxy-D3 [ng/mL] | 16 (5-26) | 25 | 12 (5-27) | 19 | 0,813 |
| Homocystein [µM] | 12,9 (8,7-20,4) | 46 | 13,0 (8,6-21,3) | 45 | 0,968 |
| Cystathionin [mg/dl] | 232 (120-651) | 46 | 225 (109-513) | 45 | 0,470 |
| Cholin [µM] | 8,9 (6,3-12,8) | 46 | 8,9 (6,0-12,6) | 45 | 0,592 |
| Betain [µM] | 33,2 (22,5-42,7) | 46 | 32,0 (22,0-48,9) | 45 | 0,994 |
| DMG [µM] | 2,84 (1,80-4,76) | 46 | 2,96 (2,08-5,21) | 45 | 0,298 |
| SAH [nM] | 17,6 (11,9-29,2) | 46 | 18,3 (10,8-33,1) | 44 | 0,508 |
| SAM [nM] | 121 (88-167) | 46 | 116 (95-178) | 44 | 0,821 |
| Verhältnis SAM/SAH | 6,99 (4,81-9,31) | 46 | 6,31 (3,94-8,93) | 44 | 0,245 |

Daten sind: Median (10 – 90 Percentile); Alter > 65 Jahre

Dosierung: täglich 1200 iE Vitamin D und 456 mg Calcium, 50 mg Vitamin B6, 500 µg Folsäure (Vitamin B9), 500 µg Vitamin B12 über 12 Monate

^a nach Mann-Whitney-Test

Tabelle 5-19: Metaboliten und Vitamine in beiden Behandlungsgruppen nach **Supplementation** mit Vitamin D, Calcium und B-Vitaminen

| | Supplementation mit | | | | |
|--|------------------------------------|-----------|-------------------------|-----------|---------------------|
| | Vitamin D, Calcium und B-Vitaminen | N | Vitamin D und Calcium | N | P-Wert ^a |
| Kreatinin [mg/dl] | 0,82 (0,66-1,15) | 34 | 1,00 (0,62-1,44) | 31 | 0,060 |
| Glukose [mg/dl] | 101 (90-117) | 34 | 104 (92-172) | 31 | 0,082 |
| Cholesterin [mg/dl] | 210 (152-262) | | 196 (157-278) | 31 | 0,748 |
| Triglyceride [mg/dl] | 106 (52-214) | 34 | 110 (75-232) | 31 | 0,568 |
| LDL-Cholesterin [mg/dl] | 132 (76-174) | 34 | 120 (83-174) | 31 | 0,404 |
| HDL-Cholesterin [mg/dl] | 58 (36-85) | 34 | 55 (35-103) | 31 | 0,849 |
| Phospholipide [μ M] | | | | | |
| Gesamt-PL | 2622 (1989-3165) | 33 | 2461 (1967-3077) | 32 | 0,074 |
| Gesamt-PC | 2021 (1448-2442) | 33 | 1906 (1456-2316) | 32 | 0,100 |
| Gesamt-LPC | 145 (108-237) | 33 | 135 (113-210) | 32 | 0,290 |
| Gesamt-PE | 27,1 (6,2-50,0) | 33 | 27,5 (16,4-54,4) | 32 | 0,604 |
| Gesamt-SM | 412 (260-516) | 33 | 412 (303-503) | 32 | 0,468 |
| 5-Methyl-THF [nM] | 46,1 (18,9-69,7) | 34 | 13,9 (5,5-35,5) | 31 | <0,001 |
| B12 [pg/mL] | 622 (428-1169) | 34 | 354 (229-488) | 31 | <0,001 |
| MMA [nM] | 212 (146-303) | 34 | 237 (143-478) | 31 | 0,203 |
| 25-Hydroxy-D3 [ng/mL] | 30 (19-42) | 34 | 28 (19-43) | 31 | 0,844 |
| Homocystein [μM] | 9,1 (6,0-14,1) | 33 | 14,9 (8,7-28,5) | 31 | <0,001 |
| Cystathionin [mg/dl] | 152 (92-352) | 33 | 283 (106-1236) | 31 | 0,005 |
| Cholin [μ M] | 12,0 (7, 8-16,3) | 34 | 11,1 (8,3-18,0) | 31 | 0,490 |
| Betain [μ M] | 36,9 (25,4-46,6) | 34 | 32,8 (20,4-49,6) | 31 | 0,351 |
| DMG [μM] | 3,00 (2,15-4,52) | 34 | 3,76 (2,42-5,81) | 31 | 0,033 |
| SAH [nM] | 18,4 (11,4-41,9) | 34 | 18,9 (11,3-41,2) | 31 | 0,646 |
| SAM [nM] | 120 (92-196) | 34 | 120 (79-159) | 31 | 0,250 |
| Verhältnis SAM/SAH | 6,93 (2,80-9,54) | 34 | 5,81 (3,31-8,90) | 31 | 0,039 |

Daten sind: Median (10 – 90 Percentile); Alter > 65 Jahre

Dosierung: täglich 1200 iE Vitamin D und 456 mg Calcium, 50 mg Vitamin B6, 500 μ g Folsäure (Vitamin B9), 500 μ g Vitamin B12 über 12 Monate

^a nach Mann-Whitney-Test

Tabelle 5-20: Metaboliten und Vitamine vor und nach Supplementation mit Vitamin D, Calcium und B-Vitaminen

| | Vor | N | Nach | N | P-Wert ^a |
|-------------------------------------|-------------------------|-----------|-------------------------|-----------|---------------------|
| Kreatinin [mg/dl] | 0,80 (0,60-1,28) | 41 | 0,82 (0,66-1,15) | 34 | 0,473 |
| Glukose [mg/dl] | 104 (94-125) | 41 | 101 (90-117) | 34 | 0,465 |
| Cholesterin [mg/dl] | 208 (149-254) | 41 | 210 (152-262) | 34 | 0,386 |
| Triglyceride [mg/dl] | 101 (60-165) | 41 | 106 (52-214) | 34 | 0,175 |
| LDL-Cholesterin [mg/dl] | 131 (94-168) | 27 | 132 (79-174) | 34 | 0,556 |
| HDL-Cholesterin [mg/dl] | 56 (37-84) | 41 | 58 (36-85) | 34 | 0,899 |
| Phospholipide [µM] | | | | | |
| Gesamt-PL | 2531 (2021-3319) | 33 | 2622 (1989-3165) | 33 | 0,883 |
| Gesamt-PC | 1960 (1459-2647) | 33 | 2021 (1448-2442) | 33 | 0,676 |
| Gesamt-LPC | 165 (110-260) | 33 | 145 (108-237) | 33 | 0,176 |
| Gesamt-PE | 18,9 (7,7-40,2) | 33 | 27,1 (6,2-50,0) | 33 | < 0,001 |
| Gesamt-SM | 417 (292-486) | 33 | 412 (260-516) | 33 | 0,234 |
| 5-Methyl-THF [nM] | 14,0 (5,0-36,9) | 48 | 46,1 (18,9-69,7) | 34 | < 0,001 |
| B12 [pg/ml] | 379 (238-671) | 41 | 622 (428-1169) | 34 | < 0,001 |
| MMA [nM] | 212 (142-402) | 47 | 212 (146-303) | 34 | 0,089 |
| 25-Hydroxy-Vitamin D [ng/mL] | 16,0 (5,3-26,2) | 25 | 30,0 (19,1-42,1) | 34 | < 0,001 |
| Homocystein [µM] | 12,9 (8,7-20,4) | 46 | 9,1 (6,0-14,1) | 33 | < 0,001 |
| Cystathionin [nM] | 232 (120-651) | 46 | 152 (92-352) | 33 | 0,059 |
| Cholin [µM] | 8,9 (6,3-12,8) | 46 | 12,0 (7, 8-16,3) | 34 | 0,002 |
| Betain [µM] | 33,2 (22,5-42,7) | 46 | 36,9 (25,4-46,6) | 34 | 0,009 |
| DMG [µM] | 2,84 (1,80-4,76) | 46 | 3,00 (2,15-4,52) | 34 | 0,176 |
| SAH [nM] | 17,6 (11,9-29,2) | 46 | 18,4 (11,4-41,9) | 34 | 0,086 |
| SAM [nM] | 121 (88-167) | 46 | 120 (92-196) | 34 | 0,533 |
| Verhältnis SAM/SAH | 6,99 (4,81-9,31) | 46 | 6,93 (2,80-9,54) | 34 | 0,562 |

Daten sind: Median (10 – 90 Percentile); Alter > 65 Jahre

Dosierung: täglich 1200 iE Vitamin D und 456 mg Calcium, 50 mg Vitamin B6, 500 µg Folsäure (Vitamin B9), 500 µg Vitamin B12 über 12 Monate

^a nach Mann-Whitney-Test

Tabelle 5-21: Metaboliten und Vitamine vor und nach Supplementation mit Vitamin D und Calcium

| | Vor | N | Nach | N | P-Wert ^a |
|-------------------------------------|-------------------------|-----------|-------------------------|-----------|---------------------|
| Kreatinin [mg/dl] | 0,90 (0,60-1,29) | 40 | 1,00 (0,62-1,44) | 31 | 0,021 |
| Glukose [mg/dl] | 106 (88-137) | 40 | 104 (92-172) | 31 | 0,393 |
| Cholesterin [mg/dl] | 200 (142-261) | 40 | 196 (157-278) | 31 | 0,006 |
| Triglyceride [mg/dl] | 116 (64-281) | 40 | 110 (75-232) | 31 | 0,191 |
| LDL-Cholesterin [mg/dl] | 126 (69-173) | 31 | 120 (83-174) | 31 | 0,119 |
| HDL-Cholesterin [mg/dl] | 55 (33-94) | 40 | 55 (35-103) | 31 | 0,271 |
| Phospholipide [µM] | | | | | |
| Gesamt-PL | 2426 (1878-3481) | 32 | 2461 (1967-3077) | 32 | 0,277 |
| Gesamt-PC | 1867 (1446-2741) | 32 | 1906 (1456-2316) | 32 | 0,197 |
| Gesamt-LPC | 156 (115-233) | 32 | 135 (113-210) | 32 | 0,160 |
| Gesamt-PE | 23,7 (9,4-49,4) | 32 | 27,5 (16,4-54,4) | 32 | 0,046 |
| Gesamt-SM | 364 (284-531) | 32 | 412 (303-503) | 32 | 0,646 |
| 5-Methyl-THF [nM] | 15,4 (3,4-47,8) | 45 | 13,9 (5,5-35,5) | 31 | 0,135 |
| B12 [pg/ml] | 390 (257-576) | 36 | 354 (229-488) | 31 | 0,068 |
| MMA [nM] | 212 (126-388) | 45 | 237 (143-478) | 31 | 0,006 |
| 25-Hydroxy-Vitamin D [ng/mL] | 12,3 (5,0-27,2) | 19 | 28,0 (19,2-43,2) | 31 | < 0,001 |
| Homocystein [µM] | 13,0 (8,6-21,3) | 45 | 14,9 (8,7-28,5) | 31 | 0,093 |
| Cystathionin [nM] | 225 (109-513) | 45 | 283 (106-1236) | 31 | 0,007 |
| Cholin [µM] | 8,9 (6,0-12,6) | 45 | 11,1 (8,3-18,0) | 31 | < 0,001 |
| Betain [µM] | 32,0 (22,0-48,9) | 45 | 32,8 (20,4-49,6) | 31 | 0,729 |
| DMG [µM] | 2,96 (2,08-5,21) | 45 | 3,76 (2,42-5,81) | 31 | 0,011 |
| SAH [nM] | 18,3 (10,8-33,1) | 44 | 18,9 (11,3-41,2) | 31 | 0,106 |
| SAM [nM] | 116 (95-178) | 44 | 120 (79-159) | 31 | 0,053 |
| Verhältnis SAM/SAH | 6,31 (3,94-8,93) | 44 | 5,81 (3,31-8,90) | 31 | 0,056 |

Daten sind: Median (10 – 90 Percentile); Alter > 65 Jahre

Dosierung: täglich 1200 iE Vitamin D und und 456 mg Calcium über 12 Monate

^a nach Mann-Whitney-Test

Tabelle 5-22: Plasma-Phospholipide vor und nach Supplementation mit Vitamin D, Calcium und B-Vitaminen

| | Vor | Nach | P-Wert ^a |
|--------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Phospholipide [μ M] | | | |
| PC 32:1 | 23,5 (12,2) | 26,0 (12,5) | 0,182 |
| PC 34:1 | 320 (105) | 288 (75) | 0,053 |
| PC 34:2 | 579 (141) | 535 (130) | 0,284 |
| PC 34:3 | 20,8 (7,7) | 22,8 (6,6) | 0,044 |
| PC 36:2 | 303 (89) | 291 (75) | 0,767 |
| PC 36:3 | 181 (48) | 184 (35) | 0,200 |
| PC 36:4 | 221 (60) | 234 (45) | 0,034 |
| PC 36:5 | 37,0 (19,5) | 38,5 (20,4) | 0,756 |
| PC 38:3 | 50,8 (15,4) | 50,4 (16,2) | 0,749 |
| PC 38:4 | 132 (41) | 127 (30) | 0,766 |
| PC 38:5 | 82,9 (21,8) | 79,7 (18,3) | 0,508 |
| PC 38:6 | 91,3(25,7) | 87,2 (29,2) | 0,332 |
| LPC 16:0 | 96,5 (35,3) | 89,3 (29,5) | 0,297 |
| LPC 18:0 | 28,3 (9,6) | 25,5 (11,9) | 0,227 |
| LPC 18:1 | 18,8 (5,9) | 16,8 (4,8) | 0,153 |
| LPC 18:2 | 22,2 (6,9) | 21,2 (7,4) | 0,475 |
| LPC 20:4 | 6,03 (1,83) | 4,84 (2,59) | 0,005 |
| PE 34:1 | 1,80 (1,32) | 2,02 (1,59) | 0,530 |
| PE 34:2 | 1,27 (1,29) | 1,79 (1,55) | 0,748 |
| PE 36:2 | 4,96 (3,08) | 6,00 (3,69) | 0,020 |
| PE 36:3 | 1,23 (1,08) | 1,69 (1,50) | 0,334 |
| PE 36:4 | 1,66 (1,33) | 2,70 (1,93) | 0,074 |
| PE 38:4 | 2,20 (1,60) | 3,42 (2,73) | 0,014 |
| PE 38:5 | 2,56 (1,19) | 3,68 (2,38) | 0,009 |
| PE 38:6 | 2,97 (1,95) | 4,89 (4,22) | 0,011 |
| PE 40:5 | 0,84 (0,90) | 1,51 (1,53) | 0,757 |
| SM 14:0 | 11,6 (3,6) | 13,4 (5,0) | 0,001 |
| SM 16:0 | 118 (25) | 123 (30) | 0,050 |
| SM 16:1 | 15,6 (4,0) | 14,3 (4,0) | 0,341 |
| SM 18:0 | 30,5 (6,6) | 31,9 (7,8) | 0,034 |
| SM 18:1 | 13,0 (3,4) | 11,9 (3,2) | 0,515 |
| SM 20:0 | 17,1 (4,0) | 15,9 (4,3) | 0,538 |
| SM 22:0 | 28,0 (6,7) | 26,8 (8,5) | 0,795 |
| SM 22:1 | 24,0 (5,9) | 22,1 (7,0) | 0,328 |
| SM 23:0 | 14,0 (3,6) | 14,9 (4,6) | 0,027 |
| SM 23:1 | 14,3 (3,5) | 14,6 (3,6) | 0,200 |
| SM 23:2 | 9,7 (3,8) | 11,5 (3,6) | 0,002 |
| SM 24:0 | 19,0 (5,2) | 19,2 (6,2) | 0,449 |
| SM 24:1 | 67,0 (15,5) | 67,5 (15,3) | 0,446 |
| SM 24:2 | 22,1 (6,7) | 19,5 (6,0) | 0,030 |
| Gesamt-PC | 2042 (475) | 1965 (371) | 0,676 |
| Gesamt-LPC | 172 (52) | 158 (49) | 0,176 |
| Gesamt-PE | 19,6 (10,3) | 27,9 (16,8) | < 0,001 |
| Gesamt-SM | 404 (82) | 407 (90) | 0,234 |
| Gesamt-PL | 2638 (524) | 2557 (456) | 0,883 |

Daten sind: Mittelwert (Standardabweichung); n = 33 Probanden; Alter > 65 Jahre
 Dosierung: täglich 1200 iE Vitamin D und 456 mg Calcium, 50 mg Vitamin B6, 500 μ g
 Folsäure (Vitamin B9), 500 μ g Vitamin B12

^a nach Zweistichproben-t-Test für abhängige Stichproben

Tabelle 5-23: Plasma-Phospholipide vor und nach Supplementation mit Vitamin D und Calcium.

| | Vor | Nach | P-Wert ^a |
|--------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Phospholipide [μ M] | | | |
| PC 32:1 | 23,6 (11,3) | 22,8 (11,6) | 0,730 |
| PC 34:1 | 328 (114) | 281 (71) | 0,033 |
| PC 34:2 | 566 (128) | 532 (90) | 0,210 |
| PC 34:3 | 20,5 (7,0) | 20,4 (6,7) | 0,923 |
| PC 36:2 | 286 (84) | 280 (66) | 0,679 |
| PC 36:3 | 176 (42) | 179 (38) | 0,605 |
| PC 36:4 | 229 (70) | 236 (56) | 0,425 |
| PC 36:5 | 36,1 (19,9) | 33,6 (15,6) | 0,435 |
| PC 38:3 | 48,3 (16,3) | 44,4 (14,0) | 0,107 |
| PC 38:4 | 134 (45) | 124 (37) | 0,097 |
| PC 38:5 | 84,7 (25,8) | 76,5 (19,4) | 0,064 |
| PC 38:6 | 98,1 (32,2) | 85,8 (29,3) | 0,028 |
| LPC 16:0 | 94,5 (32,3) | 85,8 (27,6) | 0,276 |
| LPC 18:0 | 27,0 (9,9) | 23,6 (10,3) | 0,190 |
| LPC 18:1 | 19,2 (6,7) | 16,4 (5,6) | 0,065 |
| LPC 18:2 | 21,8 (7,7) | 19,8 (5,6) | 0,180 |
| LPC 20:4 | 6,04 (2,81) | 4,36 (2,20) | 0,011 |
| PE 34:1 | 2,52 (2,12) | 2,82 (2,13) | 0,353 |
| PE 34:2 | 1,78 (1,19) | 1,88 (1,19) | 0,095 |
| PE 36:2 | 5,24 (2,83) | 7,12 (3,93) | 0,083 |
| PE 36:3 | 1,58 (1,37) | 1,84 (1,11) | 0,115 |
| PE 36:4 | 2,20 (1,42) | 2,84 (1,90) | 0,009 |
| PE 38:4 | 2,81 (1,54) | 3,66 (1,80) | 0,015 |
| PE 38:5 | 3,36 (2,70) | 3,86 (1,88) | 0,362 |
| PE 38:6 | 4,75 (3,19) | 5,61 (2,88) | 0,114 |
| PE 40:5 | 1,42 (1,02) | 1,49 (1,55) | 0,023 |
| SM 14:0 | 10,7 (3,3) | 12,1 (3,5) | 0,075 |
| SM 16:0 | 118 (28) | 122 (24) | 0,468 |
| SM 16:1 | 14,5 (4,5) | 14,4 (3,9) | 0,866 |
| SM 18:0 | 30,5 (10,1) | 32,8 (8,1) | 0,135 |
| SM 18:1 | 13,0 (5,1) | 12,7 (3,6) | 0,634 |
| SM 20:0 | 15,8 (4,2) | 15,5 (4,1) | 0,709 |
| SM 22:0 | 26,6 (6,6) | 25,8 (5,5) | 0,523 |
| SM 22:1 | 21,8 (6,0) | 21,3 (5,7) | 0,710 |
| SM 23:0 | 12,9 (3,3) | 13,0 (3,1) | 0,900 |
| SM 23:1 | 13,6 (3,6) | 13,7 (3,7) | 0,884 |
| SM 23:2 | 9,0 (3,5) | 11,5 (2,7) | < 0,001 |
| SM 24:0 | 17,7 (4,7) | 18,0 (3,7) | 0,712 |
| SM 24:1 | 67,7 (18,8) | 68,1 (15,0) | 0,911 |
| SM 24:2 | 20,9 (6,3) | 19,7 (6,9) | 0,278 |
| Gesamt-PC | 2029 (501) | 1916 (357) | 0,197 |
| Gesamt-LPC | 168 (54) | 150 (46) | 0,160 |
| Gesamt-PE | 25,9 (14,1) | 31,4 (13,7) | 0,046 |
| Gesamt-SM | 393 (93) | 401 (74) | 0,646 |
| Gesamt-PL | 2617 (606) | 2499 (391) | 0,277 |

Daten sind: Mittelwert (Standardabweichung); n = 32 Probanden; Alter > 65 Jahre

Dosierung: täglich 1200 iE Vitamin D und 456 mg Calcium

^a nach Zweistichproben-t-Test für abhängige Stichproben

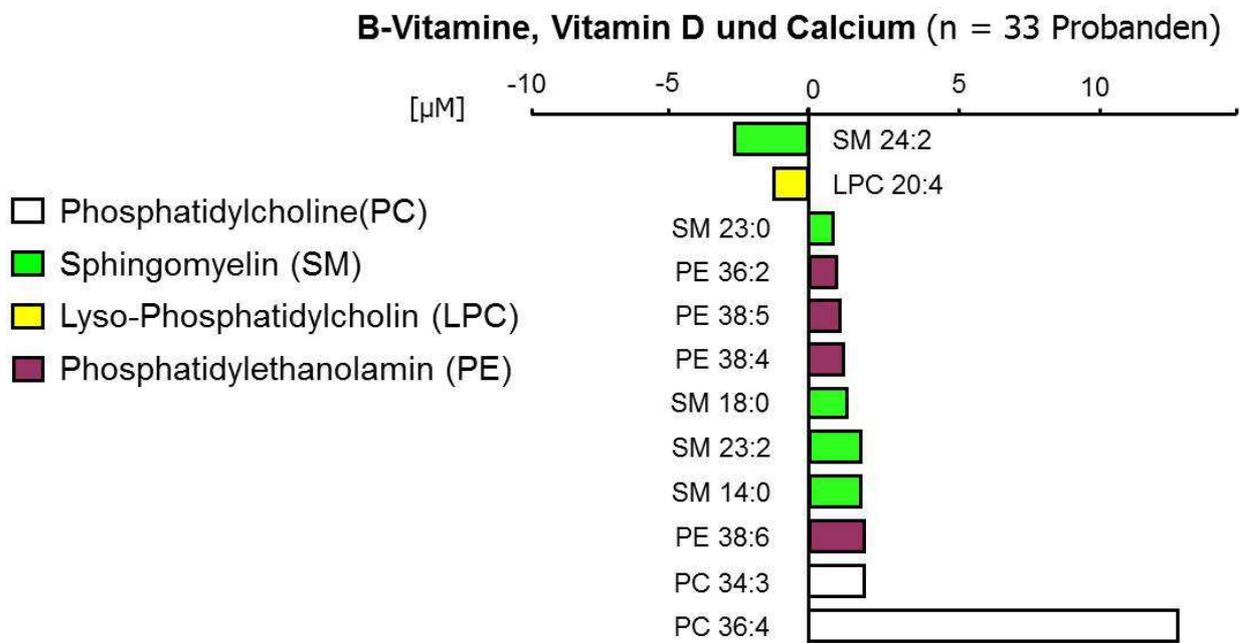
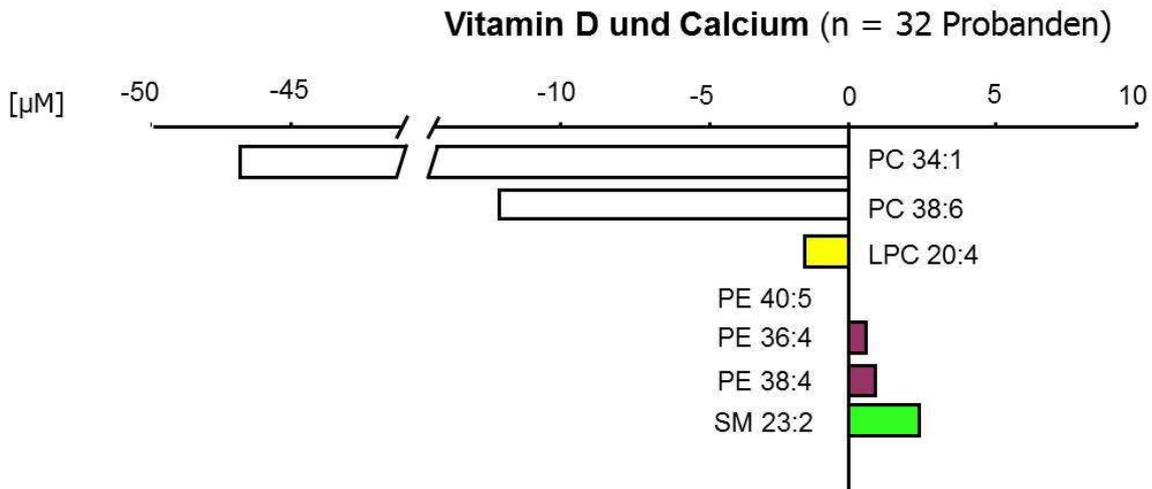


Abbildung 5-14: Änderung des Medians der Plasma-Phospholipid-Konzentration nach Supplementation.

Unterschiede zwischen vor und nach der Supplementierung für alle aufgeführten Spezies signifikant ($p > 0,05$) nach Zweistichproben-t-Test für abhängige Stichproben.

Alter Probanden > 65 Jahre; Dosierung: täglich 1200 iE Vitamin D und 456 mg Calcium, 50 mg Vitamin B6, 500 μg Folsäure (Vitamin B9), 500 μg Vitamin B12.

^a nach Zweistichproben-t-Test für abhängige Stichproben

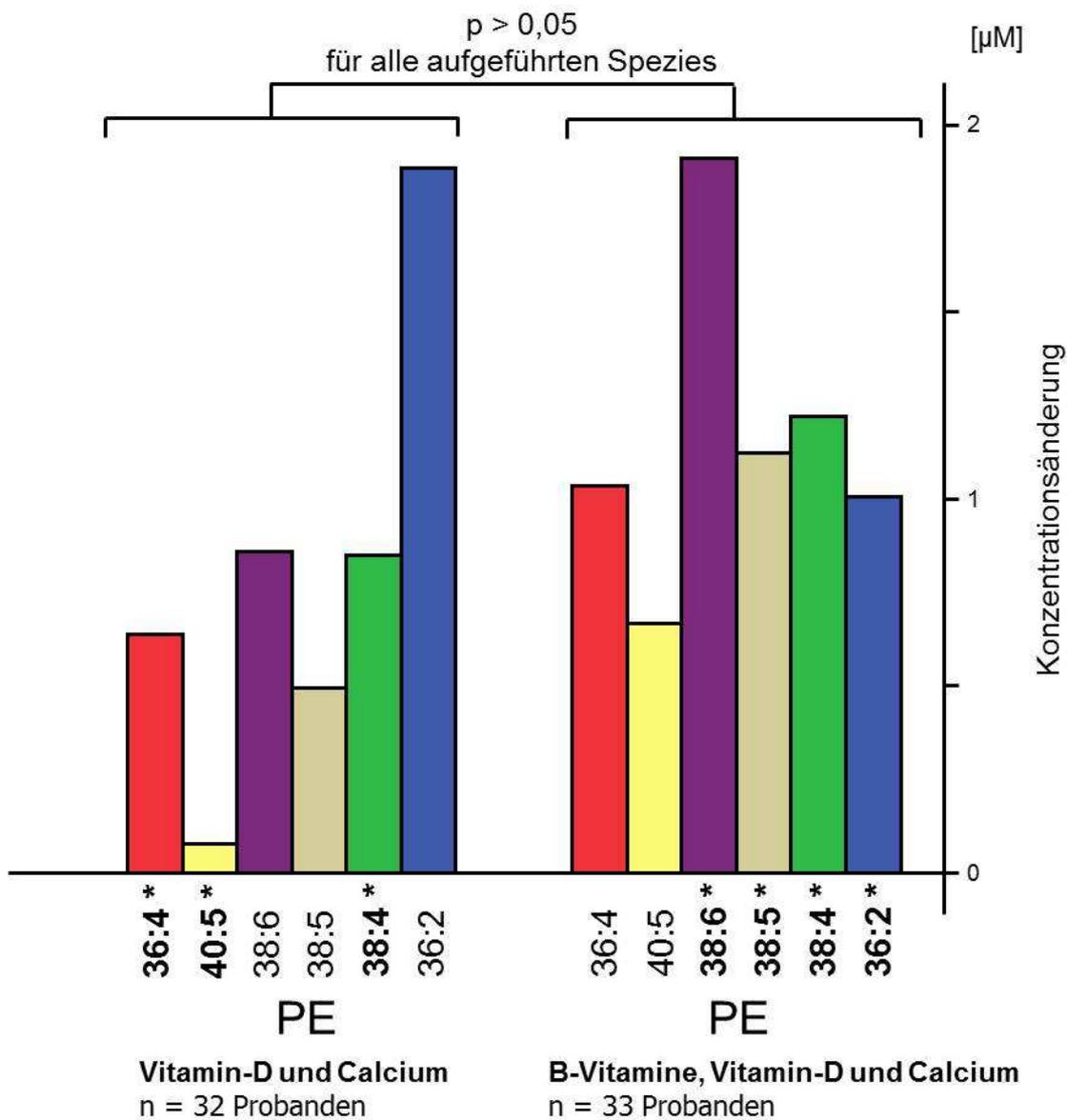


Abbildung 5-15: Änderung der Plasma-Phosphatidylethanolamin-Konzentration nach Supplementation mit B-Vitaminen Aufgetragen ist die Änderung des Mittelwerts der PE-Konzentration in den beiden Behandlungsgruppen. (Konzentration nach Supplementation – Konzentration vor Supplementation; positive Werte im Diagramm entsprechen einer Zunahme der Konzentration nach der Supplementation)
Die Unterschiede zwischen den Gruppen mit/ohne B-Vitamin-Supplementierung waren nicht signifikant ($p > 0,05$) für alle aufgeführten Spezies.

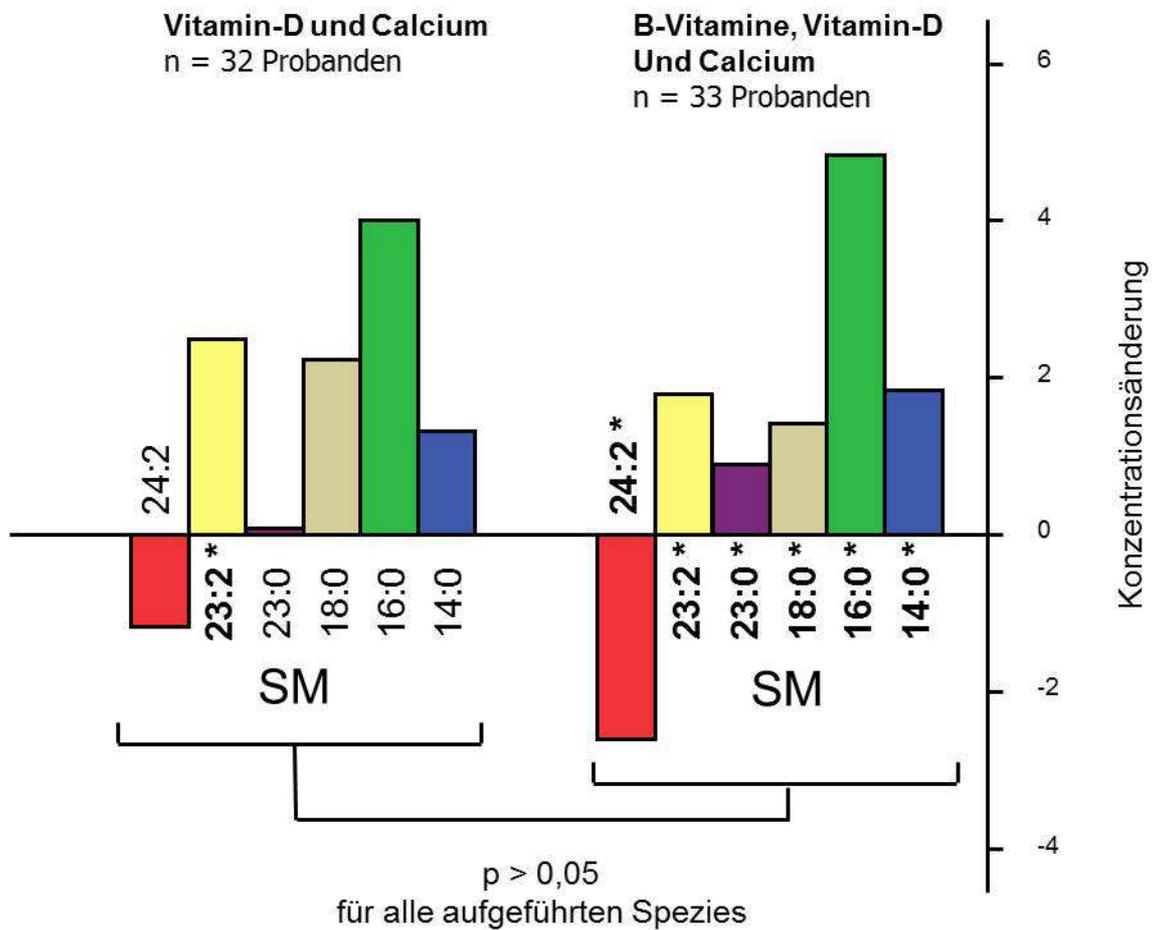


Abbildung 5-16: Änderung der Plasma-Sphingomyelin-Konzentration nach Supplementation mit B-Vitaminen. Aufgetragen ist die Änderung des Mittelwerts der SM-Konzentration in den beiden Behandlungsgruppen. (Konzentration nach Supplementation – Konzentration vor Supplementation; positive Werte im Diagramm entsprechen einer Zunahme der Konzentration nach der Supplementation).

Die Unterschiede zwischen den Gruppen mit/ohne B-Vitamin-Supplementierung waren nicht signifikant ($p > 0,05$) für alle aufgeführten Spezies.

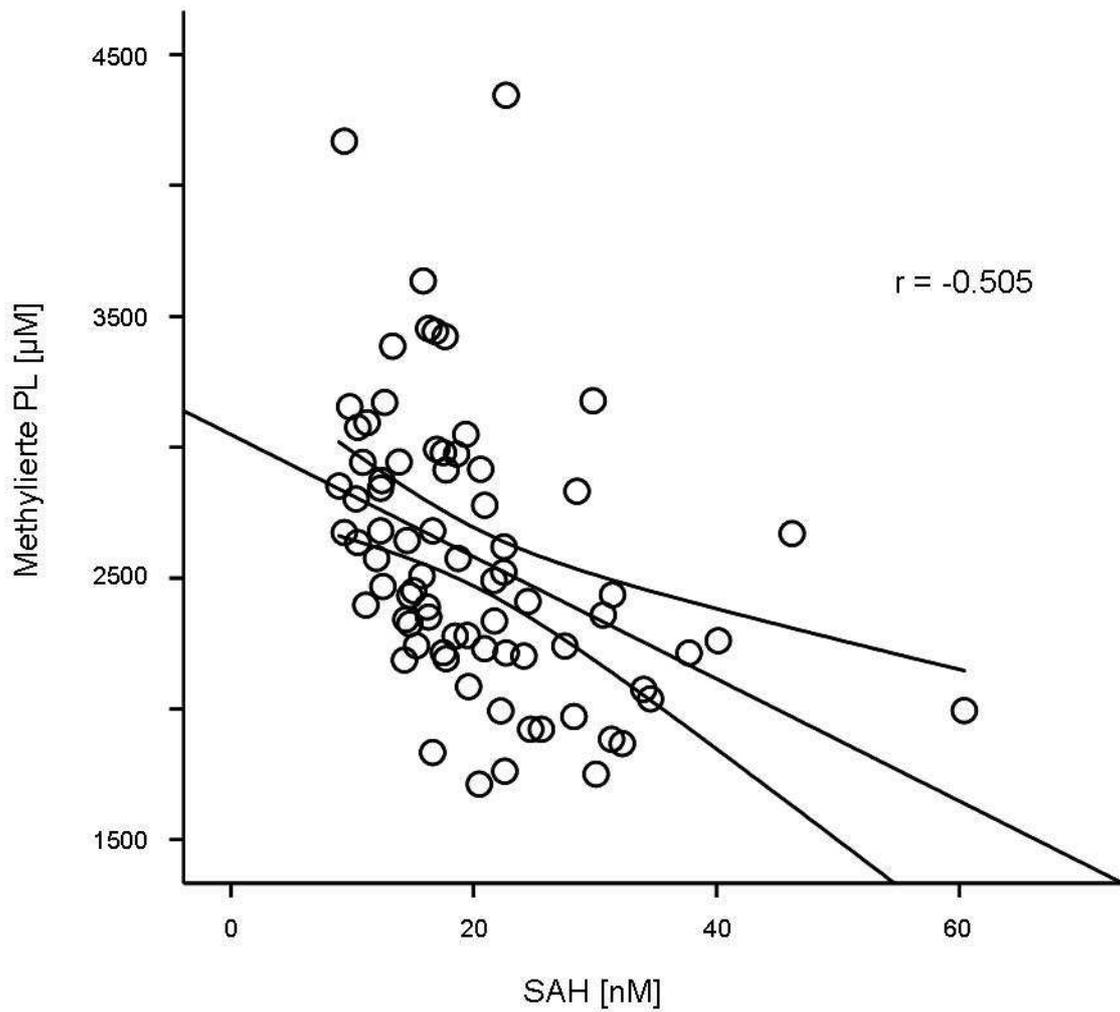


Abbildung 5-17: Beziehung zwischen Plasma-SAH-Konzentration und Konzentration methylierter Phospholipide im EDTA-Plasma 76 scheinbar gesunder Nicht-Diabetiker, Korrelationskoeffizient (r) nach Spearman-Rho; ohne Berücksichtigung des Einflusses von Statinen oder Metformin

6 Diskussion

Die Inzidenz von Diabetes mellitus Typ 2 nimmt weltweit zu [118]. Diabetes mellitus ist mit höheren Risiken für koronare Herzkrankheiten, Demenz, Polyneuropathie und altersbedingte Makuladegeneration assoziiert. Daher rückt das Verständnis dieser Krankheit immer mehr in den Fokus der medizinischen Forschung. Bei Diabetespatienten liegt oft ein gestörter Cholesterin- und Lipoproteinstoffwechsel vor. Die Wechselwirkungen zwischen Glucose und PL-Metabolismus stellen einen noch nicht vollständig verstandenen Aspekt dieser Krankheit dar, der mehr Informationen über ablaufende Mechanismen liefern und damit Möglichkeiten zur Prävention eröffnen kann.

Um Veränderungen der PL wie z.B. Variationen des Methylierungsstatus bei Diabetes und anderen Krankheiten zu untersuchen, entwickelten wir eine UPLC/MSMS-Methode zur Quantifizierung von PC, PE, LPC und SM im Plasma. Die Methode wurde validiert und die Ergebnisse für gesunde Probanden waren mit den in der Literatur dargestellten vergleichbar (**Abbildung 5-4**) [113].

Die Validierungsparameter Präzision, Linearität und Sensitivität waren ebenfalls vergleichbar mit drei anderen Methoden zur Quantifizierung von PL-Spezies im menschlichen Plasma (**Tabelle 6-1**). Im Vergleich mit den Methoden von Pang et al. [42], Hu et al. [110] und Liebisch et al. [111,112] hat die in dieser Arbeit vorgestellte Methode den Vorteil, dass sie interne und externe Standards verwendet, hiervon allerdings weniger benötigt werden als bei Liebisch et al. [111,112]. Zusätzlich ist die Chromatographie schneller und es werden mehr PL-Klassen und Spezies quantifiziert als bei manchen der verglichenen Methoden [113].

Bei Verwendung von weniger Standards ist zu beachten, dass bei PL-Messungen mit ESI-MS die gemessene Intensität nicht nur von der Konzentration und der PL-Klasse abhängig ist, sondern auch von der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der in den PL vorkommenden FS [100,101]. Daher wird von Brügger et al. [108] und Koivusalo et al. [109] empfohlen, möglichst viele PL-Standards zu verwenden. Da ausgehend von ihrer Konzentration ca. 80% der PC-Spezies und ca. 70% der PE-Spezies sich nicht um mehr als zwei Kohlenstoffatome von den externen Kalibratoren unterscheiden, ist ein signifikanter Einfluss der Kettenlänge allerdings weniger wahrscheinlich. Daher entschieden wir uns dennoch weniger Standards zu verwenden. Wie in **Abbildung 5-4a** dargestellt, war weiterhin die mit der hier vorgestellten Methode ermittelte, relative Konzentration der PL-Spezies innerhalb der PL-Klassen im Plasma von gesunden Probanden den Ergebnissen anderer Studien sehr ähnlich, obwohl diese teilweise mit Methoden durchgeführt wurden, die deutlich mehr Standards verwenden. Auch

die relative Konzentration der PC-Spezies in Soja war mit den Ergebnissen in der Literatur vergleichbar (**Abbildung 5-4 d**) [113].

Der Effekt von Kettenlänge und Sättigungsgrad der FS auf die Signalintensität sinkt mit abnehmender PL-Konzentration [100,101]. Da unsere Methode eine chromatographische Trennung verwendet, wird die Probe zum Zeitpunkt der Injektion ins MS stark verdünnt. Dies sollte den Effekt von Kettenlänge und Sättigungsgrad auf die Signalintensität minimieren. Andere Studien [100,101,106,107] arbeiten dagegen mit Methoden, bei denen die Probe direkt ins MS injiziert wird.

Tabelle 6-1: Vergleich mehrerer validierter MS-Methoden zur Quantifizierung einzelner PL-Spezies im menschlichen Plasma

| | Quantifizierte Lipidklassen | Anzahl quantifizierter PL-Spezies | Gradientlänge | Instrument | Kalibration | Anzahl Standards | Inter assay CV | Linearer Regressionskoeffizient | Detektionslimit [µmol/L] | Wiederfindungsrate |
|-------------------------------------|---|--|--------------------------|---|---|------------------|--|---------------------------------|--|--------------------|
| Vorliegende Methode [113] | 4 PC, PE, LPC, SM | 41 Spezies (34 mit Inter assay CV <16%) | 15 min | Acquity UPLC, Quattro Premier XE, Micromass | IS, Kurven mit externen Kalibratoren | 10 | < 16% für alle SM-, LPC-, PC-Spezies bis auf eine | R ² > 0,98 | PC 0,37; LPC 4,02; PE 3,75; SM 0,86 | 83% - 123% |
| Pang et al. [42] | 7 PC, PE, LPC, SM, Phosphatidylserine Phosphatidylglycerol Phosphatidylinositol | 21 (3 pro Klasse) | >50 min | Agilent 1100 HPLC-System Ion trap MS, TOF-MS (Agilent) | kein IS, Kurven mit externen Kalibratoren | 7 | <10% in Standardlösungen | R ² >0,99 | - | 79% - 95% |
| Liebisch et al. [111,112] | 3 PC, LPC, SM | 65 PC-Spezies, 38 SM-Spezies, 12 LPC-Spezies | Direkte Injektion ins MS | Quattro Ultima, Micromass | 2 IS für PC, externe Kalibratoren, „isotope correction algorithm“ | 6 für PC | <10% für Spezies mit hoher Konz., <15% für Spezies mit niedriger Konz. | R ² >0,99 | 0,3-0,6 | - |
| Hu et al. [110] | 8 PC, PE, LPC, LPE, SM, Diglyceride, Triglyceride, Cholesterolester | Peakflächen bestimmt für 92 Spezies | 30 min | Surveyor LC system, ESI-LTQ-FTMS, Thermo Fisher | IS, keine externen Kalibratoren | 5 | <16% für 11 zufällig ausgewählte Spezies | R ² >0,99 | < 2 ^a | 69% - 101% |

IS: interner Standard. ^a berechnet aus $\leq 1,28 \mu\text{g/ml}$, ESI-LTQ-FTMS: ESI hybrid linear ion trap-Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer.

Plasma-Phospholipide bei Diabetes mellitus Typ 2

Die Plasma-Konzentrationen wie die Profile der PL wurden bei Typ-2-Diabetespatienten und einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Bei den Diabetikern wurde weiterhin der Einfluss der häufig verwendeten Medikamente Statin und Metformin auf die PL-Konzentration wie auch deren Zusammensetzung im Plasma untersucht. Der auffälligste Unterschied zwischen Diabetespatienten und scheinbar gesunden Kontrollen in der durchgeführten Studie war die signifikant geringere Konzentration von LPC und SM bei Diabetikern (**Tabelle 5-5, Tabelle 5-6**). Die von uns beobachtete geringere SM-Konzentration bei Diabetikern stimmt mit verschiedenen Ergebnissen aus der Literatur überein [45,49,50]. Veränderungen der LPC-Konzentration wurden ebenfalls häufig beschrieben [42-44,57]. Bisherige Studien ergaben allerdings unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Richtung dieser Veränderungen.

Lysophosphatidylcholin bei Diabetes mellitus Typ 2

In der vorliegenden Studie war die Konzentration von Gesamt-LPC und aller LPC-Spezies bis auf LPC 20:4 bei Diabetikern signifikant geringer als bei scheinbar gesunden Kontrollen. In einer Metabolom-Studie wurden mehrere LPC- und PE-Spezies als Marker für Diabetes vorgeschlagen [45]. Unsere Daten bestätigen den in dieser Studie beobachteten Unterschied in der Plasma-Konzentration von LPC 16:0 und LPC 18:0 zwischen Diabetikern und Kontrollen [45]. Außerdem waren bei unserer Studie auch die Konzentrationen anderer LPC-Spezies (18:1, 18:2) bei Diabetikern signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Die berichteten Änderungen bei verschiedenen PE-Spezies konnten wir jedoch nicht bestätigen. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können auf die unterschiedliche Methodik zurückgehen (Bestimmen von potentiellen Markern im MS gefolgt von Identifikation der Markermoleküle). Eine andere Studie berichtete über eine signifikant höhere Konzentration von LPC 16:0 in LDL-Fraktionen bei Diabetikern [57]. Die hier vorgestellten Ergebnisse für LPC im EDTA-Plasma unterscheiden sich von Ergebnissen für LDL-Fraktionen [57].

Bei scheinbar gesunden Nichtdiabetikern waren höhere LPC-18:0-Werte außerdem mit niedrigeren Glukose-Konzentrationen (

Abbildung 5-11) sowie niedrigeren Konzentrationen des Langzeit-Blutzucker-Markers HbA_{1c} (**Abbildung 5-12**) assoziiert. Dieser Zusammenhang konnte bei Diabetikern nicht beobachtet werden, was möglicherweise mit der nach der Diagnose der Krankheit beginnenden antidiabetischen Behandlung erklärbar ist, die den Glucose-, HbA_{1c} -, und PL-Spiegel beeinflusst.

LPC wurde über die Regulation des Glukosetransporters GLUT4 mit Diabetes in Verbindung gebracht, denn LPC steigerte bei Adipocyten die GLUT4-Expression und reduzierte die Glukoseaufnahme und die Plasma-Glukose-Konzentration in einem Mausmodell [47]. LPC übt seinen Effekt auf GLUT4 über die Proteinkinase C (PKC) aus [47] (**Abbildung 6-1**). Die Stärke der Wirkung ist darüber hinaus vom Typ der im LPC gebundenen Fettsäure abhängig [47]. Ob diese Wirkung durch eine direkte Bindung an PKC, durch Beeinflussung der Membranstruktur und damit von membrangebundenen PKC-Molekülen oder durch einen anderen Mechanismus erfolgt, wurde nach unserem Kenntnisstand allerdings noch nicht behandelt. Da wir bei Diabetikern geringere Plasma-LPC-Konzentrationen beobachteten als bei scheinbar gesunden Kontrollen, kann man vermuten, dass die GLUT4-Aktivität hierdurch weiter verringert und darüber der Glukosemetabolismus ungünstig beeinflusst wird.. LPC ist aber auch als proinflammatorische und Arteriosklerose verstärkende Substanz bekannt [94,119]. Im Verlauf der arteriosklerotischen Veränderung der Humanaorta ist eine starke PL-Anreicherung der Gefäßwand beobachtet worden, LPC stieg gegenüber der normalen Aorta um 800% und SM um 516% [Herrmann, Arteriosclerosis 1974]. SM ist in der arteriosklerotischen Aorta das dominierende PL (66%). Die proinflammatorische Wirkung des LPC konnte in unserer Studie nicht bestätigt werden. Die Gesamt-LPC-Konzentration korrelierte im Gegenteil bei Diabetikern negativ mit der Konzentration des Entzündungsmarkers CRP (**Abbildung 5-10**). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass der proinflammatorische Effekt des LPC nur bei frühen Stadien der Diabetes deutlich ausgeprägt ist. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass bei Diabetikern ein hoher LPC-Spiegel, aufgrund von Mechanismen wie der Regulation des GLUT4, generell bei weniger stark erkrankten Personen vorkommt und daher indirekt mit niedrigeren Konzentrationen des Entzündungsmarkers assoziiert ist.

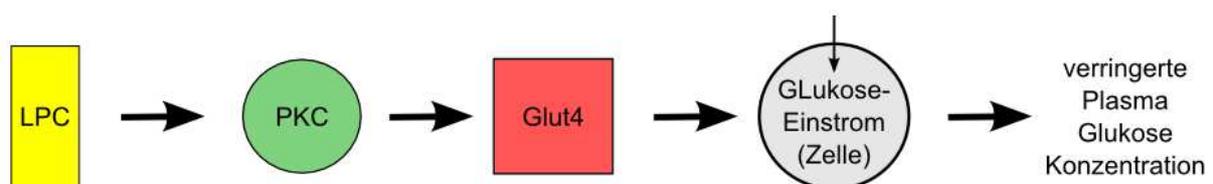


Abbildung 6-1: Vermuteter Mechanismus zur Beeinflussung der Plasma Glukosekonzentration durch LPC nach [47]

Sphingomyelin bei Diabetes mellitus Typ 2

SM ist die zweite PL-Klasse, deren Konzentration in der von uns durchgeführten Studie bei Diabetikern signifikant geringer war als bei scheinbar gesunden Kontrollen. Dieser Unterschied war für alle SM-Spezies signifikant. Diese Beobachtung ist im Einklang mit Ergebnissen in der Literatur [45,49,50]. So wurde z.B. bei Diabetespatienten und bei Patienten mit diabetischer Nephropathie eine signifikant geringere Serum-Konzentration von zwei Zwischenprodukten der Synthese von Ceramiden und SM berichtet [49]. Weiterhin beobachteten Shui et al. bei diabetischen Affen ebenfalls eine geringere SM-Konzentration als bei entsprechenden Kontrollen [43]. Bei Ratten konnte auch gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen Glycosylceramiden, dem Glukosestoffwechsel und diabetischer Nephropathie zu bestehen scheint [50].

SM ist ein wichtiger Bestandteil von Lipid Rafts. Daher ist es möglich, dass eine Verringerung der SM-Konzentration zu einer Störung der Membranstruktur und dadurch zur Reduzierung der Aktivität des Glukosetransporters GLUT4 führt. Dies würde schließlich zu einer Erhöhung der Serum-Glukose-Konzentration führen und könnte zur Assoziation von Diabetes mit einer Verringerung der SM-Konzentration beitragen. Ein ähnlicher Prozess wurde von Han et al. vermutet, die bei Alzheimer ebenfalls eine Verringerung der SM-Konzentration beobachteten [120]. Bei Han et al. [120] ging die Konzentrationsabnahme bei den verschiedenen SM-Spezies mit einer Zunahme der Konzentration der Ceramid-Spezies mit der gleichen FS einher [120]. Daher ist es wahrscheinlich, dass der durch die Sphingomyelinase katalysierte Abbau von SM zu Ceramid bei den von Han et al. untersuchten Patienten ein entscheidender Faktor für die Reduktion der SM-Konzentration war. Auch bei Diabetes ist es möglich, dass die verringerte SM-Konzentration zumindest teilweise durch einen Abbau des SM zu Ceramid verursacht wird. Eine Erhöhung der Ceramid-Konzentration kann die Aktivität des Glukosetransporters GLUT4 hemmen [121] und könnte so ebenfalls zur Erklärung der Assoziation von Diabetes mit einer Verringerung der SM-Konzentration beitragen.

Für eine Parallele zwischen den bei Alzheimer und bei Diabetes beobachteten Phänomenen spricht, dass Han et al. bei Alzheimer eine Konzentrationsverringerng bei den gleichen SM-Spezies beobachteten wie wir bei den von uns untersuchten Diabetespatienten. Eine geringere Insulinreaktion ist wiederum mit einem höheren Demenzrisiko assoziiert, wie in der „Uppsala Longitudinal Study of Adult Men“, in einer Population mit 2,1% Diabetikern, gezeigt wurde [122]. Im Allgemeinen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine geringe SM-Konzentration bei Diabetikern mit einem erhöhten Demenzrisiko assoziiert sein könnte. Dies sollte allerdings in weiteren Studien untersucht werden.

Die in unserer Studie beobachtete Assoziation von Diabetes mit verringerten SM-Konzentrationen spricht für einen vorgeschlagenen Behandlungsansatz zur Behandlung von Diabetes: die Supplementierung von SM oder anderen Sphingolipiden. Dieser wurde bereits in mehreren Studien getestet. Supplementation mit Phytosphingosin, einem mit SM verwandten Sphingolipid, führte in einer placebokontrollierten Studie an Patienten mit dem metabolischen Syndrom zu einer Abnahme der Serum-Glukosekonzentration und einer Veränderung eines Parameters (K-Value), der auf eine erhöhte Insulinsensitivität hinweist [123]. Supplementation mit SM (Gemisch mehrerer Spezies isoliert aus Hühnerhaut) und auch mit Glucosylceramid führte bei fettleibigen Ratten (Zucker-Genotyp) zu einer signifikant geringeren Plasma-Insulinkonzentration als in der Kontrollgruppe [124]. Der Glukosespiegel war allerdings nicht signifikant geringer.

Durch Supplementation mit Sphingolipiden wurden die Plasmakonzentrationen von Cholesterin, LDL und VLDL im Blut gesenkt [123,125]. Eine pathophysiologische Erklärung dieser Wirkung wird nach den Autoren [125] in der Verringerung der intestinalen Cholesterinaufnahme durch die Sphingolipide gesehen. Da Hyperlipoproteinämie die Insulinresistenz und Diabetes beeinflussen, kann die durch Sphingolipidsupplementation bewirkte Veränderung des Lipoproteinprofils den antidiabetischen Effekt mitbedingt haben. Außerdem könnten die Sphingolipide die Glukoseaufnahme im Darm durch Inhibition der intestinalen Maltase (EC-Nummer 3.2.1.20) reduzieren. Eine solche Wirkung wurde bei Mäusen beobachtet [126]. Dieser Effekt der Sphingolipide ähnelt stark der Wirkungsweise des Diabetesmedikaments Acarbose, das ebenfalls die Maltase hemmt. Für Acarbose wurden teilweise ähnliche Wirkungen wie für die Sphingolipidsupplementation berichtet, beispielsweise eine signifikante Verbesserung der Glukoseresistenz [127].

Es ist denkbar, dass die bei einer Supplementation mit Sphingolipiden beschriebene Wirkung durch die von Sphingolipiden berichtete Inhibition der intestinalen Maltase verursacht wird. Die Beeinflussung des GLUT4 durch SM ist allerdings ebenfalls ein wichtiger Ansatzpunkt für die Wirkung einer Sphingolipidsupplementation. Um festzustellen, welcher der beiden Mechanismen in welchem Umfang eine Rolle spielt, sollte man zunächst untersuchen, ob und in welchem Maße eine Supplementation mit SM oder anderen Sphingolipiden die Plasma-SM-Konzentration beeinflusst. Weiterhin sollte man die Aktivität des GLUT4 bei Sphingolipidsupplementation prüfen. Hierzu gibt es nach unserem Wissen allerdings noch keine Studien.

Einfluss von Medikamenten auf die Plasmakonzentration der Phospholipide bei

Diabetes:

Statine

Die untersuchten Diabetiker zeigten signifikant geringere Konzentration von Gesamt-LPC und Gesamt-SM sowie mehrerer LPC- und SM-Spezies (**Tabelle 5-9, Tabelle 5-10**) bei mit Statinen behandelten Patienten im Vergleich zu nicht mit diesem Medikament behandelten Diabetikern. Dies kann möglicherweise durch die Wirkung der Statine auf die Konzentration der Lipoproteine im Blut erklärt werden. Da Statine die Konzentration von LDL senken, ist mit einer Verringerung der Konzentration der PL zu rechnen, die in LDL stark vertreten sind, z.B. von SM [6]. Dies erklärt die signifikant geringere Konzentration von SM bei statinbehandelten Diabetikern in unserer Studie.

Statine können die Konzentration von HDL nach verschiedenen Studien zumindest leicht erhöhen [123,124]. Daher würde man auch mit einer Konzentrationserhöhung bei PE und LPC rechnen, die besonders in HDL vorkommen. Eine signifikant höhere PE-Konzentration konnte in unserer Studie allerdings nicht beobachtet werden, weil PE nicht nur in HDL, sondern auch in VLDL stärker vertreten ist und weil die PE-Konzentrationsunterschiede zwischen den Lipoproteinklassen nur gering sind. Im Gegensatz zur starken Reduktion der LDL-Konzentration bewirken Statine allerdings nur geringe Konzentrationsänderungen bei HDL (i.d.R. <10% Änderung [123,124]). Dass die LPC-Konzentration bei Statinbehandlung in unserer Studie signifikant niedriger war, kann nicht auf eine mögliche HDL-Erhöhung zurückgeführt werden.

Nach Simvastatinbehandlung von 26 Diabetikern über 3 Monate wurde eine signifikante Abnahme des LPC-16:0-Gehalts in den LDL beobachtet [57]. Diese erklären die Autoren über eine ebenfalls signifikante Konzentrationsabnahme der Lipoprotein-Phospholipase A2 (PLA2). Dieser Pathomechanismus ist eine mögliche Erklärung dafür, dass die LPC-Konzentration in unserer Studie bei Diabetikern mit Statinbehandlung geringer war. Dabei ist allerdings zu beachten, dass Iwase et al. [57] speziell die LPC-Konzentration in den LDL untersuchten, während wir die Gesamtkonzentration im Plasma quantifizierten.

Eine Zunahme des Diabetesrisikos durch Statine wurde in einer Metaanalyse aus 13 Studien mit insgesamt über 90000 Patienten festgestellt [58]. Diese Zunahme des Diabetesrisikos scheint dosisabhängig zu sein [59]. In einem Mausmodell für Diabetes konnte weiterhin durch Atorvastatin erhöhte Insulinresistenz festgestellt werden [60]. Ein möglicher Ansatzpunkt zur Erklärung der Wirkung von Statinen auf Diabetes ist die in unserer Studie beobachtete Beeinflussung von LPC und SM sowohl durch Diabetes als auch durch Statine. In diesem Zusammenhang wird ein plausibler, möglicher Wirkmechanismus diskutiert: Eine

Verringerung des LPC- und SM-Gehalts kann über die Beeinflussung der Aktivität von Membranproteinen und speziell GLUT4 die Insulinresistenz erhöhen. Bei Atorvastatin-behandelten Zellkulturen wurde weiterhin eine geringere GLUT4-Expression beobachtet [60]. Weitere Studien sind notwendig, um die Verringerung der LPC- und SM-Konzentration durch eine Statinbehandlung zu bestätigen und die Auswirkung von Statinen auf das Diabetesrisiko zu klären.

Metformin

Für Gesamt-LPC und mehrere LPC-Spezies wurden signifikant geringere Konzentrationen bei Metformin-behandelten Diabetikern beobachtet als bei Patienten, die nicht mit diesem Medikament behandelt wurden. Eine Reduktion von LPC bei Metforminbehandlung wurde bereits in einer Studie an 20 gesunden Patienten [53] sowie in Zellkulturen [54] beschrieben. Wir beobachteten weiterhin eine signifikant geringere Gesamt-PE-Konzentration bei Metformin-behandelten Diabetespatienten. Dies führte zu einer Erhöhung des Verhältnisses von methylierten zu nicht methylierten PL, da die PC-Konzentration bei Patienten mit und ohne Metforminbehandlung sehr ähnlich war. In einer Studie zum Einfluss von Metformin auf Hepatocyten, bei der unter anderem PE quantifiziert wurde, wurde keine signifikante Veränderung der PE-Konzentration festgestellt. Die Wirkung von Metformin auf LPC und PE sollte in weiteren Studien untersucht werden. [53]

Es wurde auch gezeigt, dass Metformin den Hcy-Spiegel erhöhen kann [55,56]. Diese Erhöhung konnte durch Folatsupplementation vermieden werden [55]. Wir beobachteten bei Diabetespatienten mit Metforminbehandlung ein signifikant höheres Verhältnis von SAM zu SAH. Dies weist auf einen besseren Methylierungsstatus hin und steht im Gegensatz zu einer in anderen Studien beobachteten Hcy-Erhöhung. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass bei den von uns untersuchten Diabetikern ein hoher Folat- und B-Vitamin-Spiegel vorlag, der den Effekt des Metformins ausglich.

Zusammenhänge zwischen Phospholipiden und Metaboliten des Methylierungsstoffwechsels

PL sind eng mit dem Methylierungsstoffwechsel verbunden, da PE durch Methylierung zu PC umgesetzt wird. LPC und SM können wiederum aus PC gebildet werden. Die für die Reaktion von PE zu PC benötigten Methylierungsäquivalente (SAM) werden im Methylierungskreislauf aus Methionin hergestellt, das wiederum durch Methylierung von

Hcy (Methylgruppenübertragung von 5-MTHF) gebildet wird. Diese Methylierungsreaktion wird durch die Vitamin-B₁₂-abhängige Methionin-Synthase (MS) im Folatkreislauf katalysiert. Im Folatkreislauf wird unter anderem die Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT) eingebunden, die den Kofaktor Vitamin B₆ benötigt. Hcy kann weiterhin auch über die ebenfalls Vitamin-B₆-abhängigen Cystathionin-β-Synthase (CBS) abgebaut werden. Eine Veränderung der Konzentration der verschiedenen PL in Abhängigkeit des B-Vitamin-Status scheint daher wahrscheinlich.

In der von uns durchgeführten Supplementationsstudie wurden ältere Menschen über 1 Jahr entweder mit Vitamin D und Calcium oder mit Vitamin D, Calcium und B-Vitaminen behandelt. Bei den mit B- und D-Vitaminen supplementierten Probanden fand sich im Behandlungsverlauf bei mehreren SM-Spezies (14:0, 16:0, 18:0, 23:0, 24:2) eine signifikante Konzentrationserhöhung, die bei nur mit Vitamin D und Calcium supplementierten Probanden weniger deutlich war (**Tabelle 5-22, Tabelle 5-23**). Die supplementationsbedingten Konzentrationsänderungen der betreffenden Spezies waren jedoch zwischen den Behandlungsgruppen nicht signifikant verschieden (**Abbildung 5-16**). Dies könnte damit erklärt werden, dass die Verfügbarkeit des Methylgruppendonators SAM und auch die Konzentration von SAH als Inhibitor von Transmethylierungsreaktionen durch die Supplementierung nicht signifikant verändert wurden (**Tabelle 5-19, Tabelle 5-20**). Die Vitamin-Supplementierung (B + D) erhöhte allerdings die Konzentration der B-Vitamine signifikant und verbesserte dadurch die Bereitstellung von Methylgruppen über den Folatkreislauf, so dass die Konzentration des Hcy und des aus Hcy gebildeten Cystathionins gegenüber der Gruppe mit nur Vitamin-D-Supplementierung signifikant niedriger lag.

Sowohl in der Gruppe der mit Vitamin D und Calcium supplementierten Probanden als auch bei den zusätzlich mit B-Vitaminen behandelten Studienteilnehmern stellten wir eine signifikant höhere Gesamt-PE-Konzentration nach der Behandlung fest. Ein Einfluss von Vitamin D auf die PL-Zusammensetzung erscheint plausibel, da Vitamin D die physikalischen Eigenschaften der PL-Membran beeinflussen kann [128]. Ein Einfluss des Calciums scheint unwahrscheinlicher, weil im Gegensatz zu Vitamin D keine Verknüpfung zu PL bekannt ist und weil in einer placebokontrollierten Supplementationsstudie mit Calcium keine signifikante Konzentrationsveränderung der PL-Klassen beobachtet wurde [129]. Weitere Studien, die PL bei Supplementierung mit Vitamin D und/oder Calcium untersuchten, sind uns nicht bekannt.

Viele der zur Erklärung der Variation der PL-Konzentration bei Diabetikern ermittelten Variablen stehen in Zusammenhang mit dem Methylierungsstoffwechsel (**Abbildung 1-3-5**). Dass PC mit höheren PE-Konzentrationen (**Tabelle 5-11**) und PE mit höheren PC-Konzentrationen assoziiert ist (**Tabelle 5-12**), erklärt sich dadurch, dass PE über die PEMT zu PC umgewandelt wird. Eine hohe PE-Konzentration bedeutet, dass mehr PC produziert werden kann, und eine hohe PC-Konzentration bedeutet, dass PE nicht zur PC-Bildung verstoffwechselt werden muss. Cholin wird zur Synthese von PC über den CDP-Cholin-Stoffwechselweg verwendet. Cholin wird auch häufig aus PC gewonnen, welches in der Regel die wichtigste Cholinquelle in der Nahrung ist [7]. Daher ist ein hoher Cholinspiegel mit einer höheren PC-Konzentration assoziiert (**Tabelle 5-11**). Da LPC hauptsächlich durch hydrolytische Spaltung von PC entsteht, scheint es zunächst naheliegend, dass Cholin ebenfalls mit höheren LPC-Konzentrationen assoziiert ist (**Tabelle 5-13**). Falls die Bildung von LPC aus PC, welches bei höherem Cholinspiegel in höherer Konzentration vorkommt, der einzige Grund für eine Assoziation von Cholin mit LPC ist, würde man allerdings erwarten, dass PC ebenfalls ein wichtiger Prediktor für die LPC-Konzentration ist. Dies war jedoch nicht der Fall. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass bei einem Überschuss an PC dieses schnell zu LPC, Cholin, Triglyceriden und anderen Metaboliten umgesetzt wird, sodass bei der Untersuchung der Probanden mit einem solchen Überschuss keine erhöhte PC-Konzentration, sondern nur eine Erhöhung von Cholin und LPC beobachtet wird. Man würde vermuten, dass ein erhöhter Cholinspiegel auch mit einer erhöhten Konzentration von PE assoziiert ist, da er mit einer höheren PC-Konzentration einhergeht und PC mit einer PE-Erhöhung assoziiert ist. Ganz im Gegenteil wurde allerdings eine Assoziation eines erhöhten Cholinspiegels mit kleineren PE-Konzentrationen beobachtet (**Tabelle 5-12**). Dies ist durch die Wirkung des Cholins als Inhibitor der PE-Biosynthese zu erklären [130].

SAH ist mit einer niedrigeren PC-Konzentration assoziiert (**Tabelle 5-11**). Dies liegt daran, dass SAH im Blut akkumuliert wird, wenn die Remethylierung von Hcy im Methylierungskreislauf zu langsam abläuft und zu wenig Methylgruppendonatoren (SAM) gebildet werden. Diese werden aber benötigt, um PC aus PE herzustellen. Dies ist auch der Grund dafür, dass SAH negativ mit methylierten PL korreliert (**Abbildung 5-17**). Genau wie SAH akkumuliert Hcy, wenn der Methylierungsstatus im Körper niedrig ist. SAM dagegen zeigt einen hohen Methylierungsstatus an. SAH ist außerdem ein starker Inhibitor der Transmethylierung und kann daher einen relativen SAM-Stau bedingen [27]. Daher ist es scheinbar widersprüchlich, dass sowohl Hcy als auch SAM mit einer höheren PE-Konzentration assoziiert sind (**Tabelle 5-12**).

Betain wird aus Cholin hergestellt und kann zur Remethylierung von Hcy zu Methionin im Methylierungskreislauf verwendet werden. Man würde daher erwarten, dass Betain mit einer höheren Konzentration von PC assoziiert ist. Dies war allerdings nicht der Fall. Stattdessen war Betain mit niedrigeren Konzentrationen von LPC und Gesamt-PL assoziiert (**Tabelle 5-13, Tabelle 5-15**). Dies deutet auf einen uns unbekanntem Regulationsmechanismus hin.

Die PL-Klassen PE und LPC scheinen bei denselben Probanden in höherer Konzentration vorzukommen, da PE mit einer Erhöhung der LPC-Konzentration assoziiert ist und LPC mit einer Erhöhung der PE-Konzentration (**Tabelle 5-12, Tabelle 5-13**). Eine Erklärung hierfür ist, dass LPC und PE beide in recht hoher Konzentration in HDL vorkommen und es sich bei Probanden mit hohen LPC- und PE-Plasma-Werten um solche mit vergleichsweise hohen Plasmakonzentrationen von HDL handeln könnte. Hiergegen spricht allerdings, dass HDL-Cholesterin nicht bei der Bestimmung von Variablen mit signifikantem Einfluss auf die PE-Konzentration ermittelt wurde, sondern nur bei solchen mit signifikantem Einfluss auf LPC. LPC war weiterhin mit niedrigeren SM-Konzentrationen assoziiert und SM ebenfalls mit niedrigeren LPC-Werten (**Tabelle 5-13, Tabelle 5-14**). Dies kann auf die Konzentrationsverhältnisse in der Teilgruppe der Metformin einnehmenden Diabetiker zurückgehen, bei denen im Vergleich mit den anderen Gruppen höhere SM-Werte vorlagen. Weiterhin entsprachen die LPC-Werte bei den Metformin-behandelten Probanden zwar in etwa denen in der Statin-Gruppe, sie waren allerdings niedriger als bei Patienten, die beide Medikamente oder keins der beiden Medikamente einnahmen (**Abbildung 5-8**). Diese Unterschiede zwischen den Gruppen waren allerdings bis auf den Unterschied zwischen den Metformin einnehmenden Probanden und denjenigen, die beide Medikamente bekamen, nicht signifikant.

Die Zusammenhänge zwischen Lipoproteinen und PL lassen sich zum Teil über den PL-Gehalt der Lipoproteine erklären (**Tabelle 5-11 bis Tabelle 5-15**). Da der PL-Anteil in HDL von allen Lipoproteinen am größten ist [131], ist es nicht verwunderlich, dass HDL-Cholesterin mit einer erhöhten Konzentration der Gesamt-PL, des PC, LPC und des SM assoziiert ist. Gesamt-Cholesterin ist ein guter Indikator für die Konzentration von LDL und hohe Triglycerid-Werte sind ein Anzeichen für das verstärkte Vorkommen von VLDL. Triglyceride kommen auch in hoher Konzentration in Chylomikronen vor [132], Chylomikronen sind allerdings im nüchternen Zustand, abgesehen von bestimmten Krankheiten, nur in äußerst geringer Konzentration im Plasma vorhanden [131]. Dies erklärt, dass erhöhte Konzentrationen von PC, SM und Gesamt-PL mit höheren Konzentrationen

von Triglyceriden und/oder Cholesterin assoziiert sind (**Tabelle 5-11, Tabelle 5-14, Tabelle 5-15**), da diese PL sehr häufig in LDL und VLDL vorkommen [6]. PE ist negativ mit Gesamtcholesterin assoziiert (**Tabelle 5-12**), da es sehr wenig in LDL und stärker in HDL vorkommt und ein durch hohe Werte von Gesamtcholesterin angezeigter, hoher LDL-Cholesterin-Spiegel oft mit verringerten HDL-Werten einhergeht. Die Ergebnisse für LPC (**Tabelle 5-13**) scheinen zunächst widersprüchlich, da Gesamtcholesterin mit höheren und Triglyceride mit niedrigeren LPC-Konzentrationen assoziiert sind. Die Assoziation mit Triglyceriden kann jedoch durch die geringe Konzentration von LPC in VLDL erklärt werden, genau wie die entsprechende Assoziation bei PE. Da Cholesterin allerdings unter Bildung von LPC zu Cholesterylester umgesetzt wird, ist es einleuchtend, dass eine hohe Cholesterinkonzentration mit höheren Konzentrationen von LPC einhergeht.

Die wichtigsten Befunde im Überblick

- Wir entwickelten eine UPLC/MSMS-Methode zur Quantifizierung von PC, PE, LPC und SM im menschlichen Plasma. Die Methode ist einfach, robust, schnell und valide.
- Die Ergebnisse für gesunde Probanden sind mit der Literatur vergleichbar und die Methode ergänzt das Spektrum der vorhandenen, validierten Methoden.
- In einer Studie an Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und scheinbar gesunden Kontrollen war die Plasma-Konzentration von LPC und SM bei Diabetikern signifikant geringer und das Profil der PL-Spezies verändert.
- Die Plasma-Konzentration von LPC und SM war in dieser Studie bei Diabetikern mit Statinbehandlung signifikant geringer als bei Diabetikern ohne Statinbehandlung.
- Eine Behandlung mit Metformin war bei Diabetikern in unserer Studie weiterhin mit einer niedrigeren Plasma-Konzentration von LPC und PE assoziiert.
- In einer Supplementationstudie mit Vitamin D und Calcium wurde nach der Behandlung im Plasma eine signifikant höhere Gesamt-PE-Konzentration beobachtet. Dieser Effekt war unabhängig von einer gleichzeitigen Supplementation mit B-Vitaminen.
- Bei Supplementation mit B-Vitaminen war die Konzentration mehrerer SM-Spezies signifikant erhöht, während bei Supplementation mit Vitamin D und Calcium nur die Konzentration einer SM-Spezies signifikant erhöht war. Diese Veränderung wirkt den bei Diabetikern beobachteten PL-Konzentrationsänderungen entgegen.
- Eine mögliche Erhöhung der SM-Konzentration durch B-Vitamine sollte in weiteren Studien untersucht werden.
- In weiterführenden Studien sollte auch die Plasma-Konzentration von Ceramid bei Diabetikern untersucht werden, um festzustellen, ob eine SM-Reduktion bei Diabetes mit einem Abbau des SM zu Ceramid einhergeht.
- Die Wechselwirkungen der Medikamente Statin und Metformin mit PL und die dadurch induzierte Wirkung auf Diabetes mellitus sollte ebenfalls in weiterführenden Studien untersucht werden.
- Die Wirksamkeit einer Sphingolipidsupplementation zur Prävention und Behandlung von Diabetes bleibt ein wichtiges Thema. Zunächst sollte in diesem Zusammenhang geklärt werden, ob eine Supplementation die Plasma-Konzentration des SM beeinflusst.

7 Publikationen

Quantification of plasma phospholipids by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.

Rabagny Y, Herrmann W, Geisel J, Kirsch SH, Obeid R.

Analytical and bioanalytical chemistry

Aug. 2011, PMID: 21698504

Quantification of acetylcholine, choline, betaine, and dimethylglycine in human plasma and urine using stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Kirsch SH, Herrmann W, Rabagny Y, Obeid R.

Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences

Dec. 2011, PMID: 21074502

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Herrmann für die Bereitstellung des interessanten Themas, für sein kontinuierliches Interesse und seine Motivation.

Frau Prof. Dr. Rima Obeid für Ihre exzellente Betreuung und Unterstützung.

Den Studienteilnehmern, ohne deren freiwilliges Engagement diese und viele andere Arbeiten nicht möglich wären.

Susanne Kirsch für die gute Zusammenarbeit und die Hilfe bei Problemen an UPLC und MS.

Herrn Prof. Dr. Geisel und den anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zentrallabors der Uniklinik des Saarlandes für das positive Arbeitsklima und ihre Unterstützung. Im Besonderen möchte ich Frau Claudia Teunis danken, die mir bei Formularen und Bestellungen und mit allgemeinen Ratschlägen eine Hilfe war.

Mariz Kasoha, Batool Shannan, Ranwa Al-Sayed, Vera Kruse, Nicole Klein, Frank Hoffmann, Cosima Klein und Sarah Dielmann und Hussein Awwad, die mit mir zu verschiedenen Zeitpunkten einen Arbeitsraum geteilt und die immer zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Meinen Eltern dafür, dass sie mich immer unterstützt haben.

9 Literaturverzeichnis

- [1] M.P. Wymann, R. Schneiter, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9 (2008) 162.
- [2] P.R. Cullis, B. de Kruijff, *Biochim Biophys Acta.* 559 (1979) 399.
- [3] J.L. Goldstein, M.S. Brown, *Eur Heart J.* 13 Suppl B (1992) 34.
- [4] C.J. Fielding, P.E. Fielding, in: DE Vance (Ed.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* 5th ed., Elsevier, Oxford, 2008, 536.
- [5] K. Skalen, M. Gustafsson, E.K. Rydberg, L.M. Hulten, O. Wiklund, T.L. Innerarity, J. Boren, *Nature.* 417 (2002) 750.
- [6] P. Wiesner, K. Leidl, A. Boettcher, G. Schmitz, G. Liebisch, *J Lipid Res.* 50 (2009) 574.
- [7] S.H. Zeisel, M.H. Mar, J.C. Howe, J.M. Holden, *J Nutr.* 133 (2003) 1302.
- [8] A. Morales, H. Lee, F.M. Goni, R. Kolesnick, J.C. Fernandez-Checa, *Apoptosis.* 12 (2007) 923.
- [9] A. Gomez-Munoz, *Biochim Biophys Acta.* 1758 (2006) 2049.
- [10] G. Bannenberg, C.N. Serhan, *Biochim Biophys Acta.* 1801 (2010) 1260.
- [11] M. Spite, C.N. Serhan, *Circ Res.* 107 (2010) 1170.
- [12] E. Altmaier, G. Kastenmuller, W. Romisch-Margl, B. Thorand, K.M. Weinberger, J. Adamski, T. Illig, A. Doring, K. Suhre, *Mol Nutr Food Res.* 53 (2009) 1357.
- [13] J.Y. Kim, J.Y. Park, O.Y. Kim, B.M. Ham, H.J. Kim, D.Y. Kwon, Y. Jang, J.H. Lee, *J Proteome Res.* 9 (2010) 4368.
- [14] O. Stanger, in: O Stanger (Ed.), *Homocystein.* 1st ed., Maudrich, Wien, 2004, 58 u. 86.
- [15] M.R. Olthof, E.J. Brink, M.B. Katan, P. Verhoef, *Am J Clin Nutr.* 82 (2005) 111.
- [16] T. Huang, M.L. Wahlqvist, D. Li, *Nutrition.* 26 (2010) 112.
- [17] G. Hoerl, A. Wagner, L.K. Cole, R. Malli, H. Reicher, P. Kotzbeck, H. Koefeler, G. Hoefler, S. Frank, J.G. Bogner-Strauss, W. Sattler, D.E. Vance, E. Steyrer, *J Biol Chem.* 286 (2011) 17338.
- [18] C.B. Delorme, P.J. Lupien, *J Nutr.* 106 (1976) 169.
- [19] C.J. DeLong, Y.J. Shen, M.J. Thomas, Z. Cui, *J Biol Chem.* 274 (1999) 29683.
- [20] M.L. Ojeda, M.J. Delgado-Villa, R. Llopis, M.L. Murillo, O. Carreras, *Alcohol Alcohol.* 43 (2008) 544.

- [21] K.E. McColl, *Am J Gastroenterol.* 104 Suppl 2 (2009) S5.
- [22] B. Termanini, F. Gibril, V.E. Sutliff, F. Yu, D.J. Venzon, R.T. Jensen, *Am J Med.* 104 (1998) 422.
- [23] J. Levin, K. Botzel, A. Giese, M. Vogeser, S. Lorenzl, *Dement Geriatr Cogn Disord.* 29 (2010) 553.
- [24] R.C. Ho, M.W. Cheung, E. Fu, H.H. Win, M.H. Zaw, A. Ng, A. Mak, *Am J Geriatr Psychiatry.* 19 (2011) 607.
- [25] L.L. Humphrey, R. Fu, K. Rogers, M. Freeman, M. Helfand, *Mayo Clin Proc.* 83 (2008) 1203.
- [26] R. Clarke, J. Halsey, S. Lewington, E. Lonn, J. Armitage, J.E. Manson, K.H. Bonna, J.D. Spence, O. Nygard, R. Jamison, J.M. Gaziano, P. Guarino, D. Bennett, F. Mir, R. Peto, R. Collins, B-Vitamin Treatment Trialists' Collaboration, *Arch Intern Med.* 170 (2010) 1622.
- [27] D.R. Hoffman, J.A. Haning, W.E. Cornatzer, *Lipids.* 16 (1981) 561.
- [28] R.Z. Chen, U. Pettersson, C. Beard, L. Jackson-Grusby, R. Jaenisch, *Nature.* 395 (1998) 89.
- [29] B. Stefanska, J. Huang, B. Bhattacharyya, M. Suderman, M. Hallett, Z.G. Han, M. Szyf, *Cancer Res.* (2011).
- [30] B. Yang, H. Sun, W. Lin, W. Hou, H. Li, L. Zhang, F. Li, Y. Gu, Y. Song, Q. Li, F. Zhang, *Urol Oncol.* (2011).
- [31] K.A. Waite, N.R. Cabilio, D.E. Vance, *J Nutr.* 132 (2002) 68.
- [32] J.P. Kraus, M. Janosik, V. Kozich, R. Mandell, V. Shih, M.P. Sperandio, G. Sebastio, R. de Franchis, G. Andria, L.A. Kluijtmans, H. Blom, G.H. Boers, R.B. Gordon, P. Kamoun, M.Y. Tsai, W.D. Kruger, H.G. Koch, T. Ohura, M. Gaustadnes, *Hum Mutat.* 13 (1999) 362.
- [33] P. Frosst, H.J. Blom, R. Milos, P. Goyette, C.A. Sheppard, R.G. Matthews, G.J. Boers, M. den Heijer, L.A. Kluijtmans, L.P. van den Heuvel, *Nat Genet.* 10 (1995) 111.
- [34] B. Wilcken, F. Bamforth, Z. Li, H. Zhu, A. Ritvanen, M. Renlund, C. Stoll, Y. Alembik, B. Dott, A.E. Czeizel, Z. Gelman-Kohan, G. Scarano, S. Bianca, G. Ettore, R. Tenconi, S. Bellato, I. Scala, O.M. Mutchinick, M.A. Lopez, H. de Walle, R. Hofstra, L. Joutchenko, L. Kavteladze, E. Bermejo, M.L. Martinez-Frias, M. Gallagher, J.D. Erickson, S.E. Vollset, P. Mastroiacovo, G. Andria, L.D. Botto, *J Med Genet.* 40 (2003) 619.
- [35] N.M. van der Put, F. Gabreels, E.M. Stevens, J.A. Smeitink, F.J. Trijbels, T.K. Eskes, L.P. van den Heuvel, H.J. Blom, *Am J Hum Genet.* 62 (1998) 1044.
- [36] L. Huang, X.M. Song, W.L. Zhu, Y. Li, *Biomed Environ Sci.* 21 (2008) 514.
- [37] M. Palep-Singh, H.M. Picton, Z.R. Yates, J.H. Barth, A.H. Balen, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 138 (2008) 180.

- [38] R.M. Gueant-Rodriguez, C. Rendeli, B. Namour, L. Venuti, A. Romano, G. Anello, P. Bosco, R. Debard, P. Gerard, M. Viola, E. Salvaggio, J.L. Gueant, *Neurosci Lett.* 344 (2003) 189.
- [39] P.S. Patel, S.J. Sharp, E. Jansen, R.N. Luben, K.T. Khaw, N.J. Wareham, N.G. Forouhi, *Am J Clin Nutr.* 92 (2010) 1214.
- [40] L. Wang, A.R. Folsom, Z.J. Zheng, J.S. Pankow, J.H. Eckfeldt, ARIC Study Investigators, *Am J Clin Nutr.* 78 (2003) 91.
- [41] Y. Rodriguez, A.B. Christophe, *Ann Nutr Metab.* 48 (2004) 335.
- [42] L.Q. Pang, Q.L. Liang, Y.M. Wang, L. Ping, G.A. Luo, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 869 (2008) 118.
- [43] G. Shui, J.W. Stebbins, B.D. Lam, W.F. Cheong, S.M. Lam, F. Gregoire, J. Kusunoki, M.R. Wenk, *PLoS One.* 6 (2011) e19731.
- [44] K.H. Pietilainen, M. Sysi-Aho, A. Rissanen, T. Seppanen-Laakso, H. Yki-Jarvinen, J. Kaprio, M. Oresic, *PLoS One.* 2 (2007) e218.
- [45] C. Wang, H. Kong, Y. Guan, J. Yang, J. Gu, S. Yang, G. Xu, *Anal Chem.* 77 (2005) 4108.
- [46] E. Schleicher, A. Nerlich, *Horm Metab Res.* 28 (1996) 367.
- [47] K. Yea, J. Kim, J.H. Yoon, T. Kwon, J.H. Kim, B.D. Lee, H.J. Lee, S.J. Lee, J.I. Kim, T.G. Lee, M.C. Baek, H.S. Park, K.S. Park, M. Ohba, P.G. Suh, S.H. Ryu, *J Biol Chem.* 284 (2009) 33833.
- [48] A.A. House, M. Eliasziw, D.C. Cattran, D.N. Churchill, M.J. Oliver, A. Fine, G.K. Dresser, J.D. Spence, *JAMA.* 303 (2010) 1603.
- [49] J. Zhang, L. Yan, W. Chen, L. Lin, X. Song, X. Yan, W. Hang, B. Huang, *Anal Chim Acta.* 650 (2009) 16.
- [50] J.A. Shayman, *J Am Soc Nephrol.* 7 (1996) 171.
- [51] W.F. Nieuwenhuizen, A.M. Havekes, J.J. Emeis, *US Patent.* 12/369,322 (2009).
- [52] M. Tikhonenko, T.A. Lydic, Y. Wang, W. Chen, M. Opreanu, A. Sochacki, K.M. McSorley, R.L. Renis, T. Kern, D.B. Jump, G.E. Reid, J.V. Busik, *Diabetes.* 59 (2010) 219.
- [53] S. Cai, T. Huo, N. Li, Z. Xiong, F. Li, *Biomed Chromatogr.* 23 (2009) 782.
- [54] J. Wanninger, M. Neumeier, J. Weigert, G. Liebisch, T.S. Weiss, A. Schaffler, C. Aslanidis, G. Schmitz, J. Scholmerich, C. Buechler, *Biochim Biophys Acta.* 1781 (2008) 321.
- [55] S. Palomba, A. Falbo, F. Giallauria, T. Russo, A. Tolino, F. Zullo, A. Colao, F. Orio, *Diabetes Care.* 33 (2010) 246.
- [56] D. Sullivan, P. Forder, J. Simes, M. Whiting, L. Kritharides, A. Merrifield, M.

Donoghoe, P.G. Colman, N. Graham, H. Haapamaki, A. Keech, for the FIELD Study Investigators, *Diabetes Res Clin Pract.* (2011).

[57] M. Iwase, K. Sonoki, N. Sasaki, S. Ohdo, S. Higuchi, H. Hattori, M. Iida, *Atherosclerosis.* 196 (2008) 931.

[58] N. Sattar, D. Preiss, H.M. Murray, P. Welsh, B.M. Buckley, A.J. de Craen, S.R. Seshasai, J.J. McMurray, D.J. Freeman, J.W. Jukema, P.W. Macfarlane, C.J. Packard, D.J. Stott, R.G. Westendorp, J. Shepherd, B.R. Davis, S.L. Pressel, R. Marchioli, R.M. Marfisi, A.P. Maggioni, L. Tavazzi, G. Tognoni, J. Kjekshus, T.R. Pedersen, T.J. Cook, A.M. Gotto, M.B. Clearfield, J.R. Downs, H. Nakamura, Y. Ohashi, K. Mizuno, K.K. Ray, I. Ford, *Lancet.* 375 (2010) 735.

[59] D. Preiss, S.R. Seshasai, P. Welsh, S.A. Murphy, J.E. Ho, D.D. Waters, D.A. DeMicco, P. Barter, C.P. Cannon, M.S. Sabatine, E. Braunwald, J.J. Kastelein, J.A. de Lemos, M.A. Blazing, T.R. Pedersen, M.J. Tikkanen, N. Sattar, K.K. Ray, *JAMA.* 305 (2011) 2556.

[60] M. Nakata, S. Nagasaka, I. Kusaka, H. Matsuoka, S. Ishibashi, T. Yada, *Diabetologia.* 49 (2006) 1881.

[61] Statistisches Bundesamt, Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland - Ausführliche vierstellige ICD10-Klassifikation - 2009
<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Publikationen/Fachveroeffentlichungen/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachenstatistik5232101097015,property=file.xls>; (2.2.2011) Zugriff Jun/21.2011.

[62] O. Bas, A. Songur, O. Sahin, H. Mollaoglu, O.A. Ozen, M. Yaman, O. Eser, H. Fidan, M. Yagmurca, *Neurochem Int.* 50 (2007) 548.

[63] O.A. Ozen, M. Cosar, O. Sahin, H. Fidan, O. Eser, H. Mollaoglu, O. Alkoc, M. Yaman, A. Songur, *Neurol Sci.* 29 (2008) 147.

[64] C. Heurteaux, C. Laigle, N. Blondeau, G. Jarretou, M. Lazdunski, *Neuroscience.* 137 (2006) 241.

[65] S. Koizumi, S. Yamamoto, T. Hayasaka, Y. Konishi, M. Yamaguchi-Okada, N. Goto-Inoue, Y. Sugiura, M. Setou, H. Namba, *Neuroscience.* 168 (2010) 219.

[66] K. Tanaka, Y. Ishikawa, M. Yokoyama, H. Origasa, M. Matsuzaki, Y. Saito, Y. Matsuzawa, J. Sasaki, S. Oikawa, H. Hishida, H. Itakura, T. Kita, A. Kitabatake, N. Nakaya, T. Sakata, K. Shimada, K. Shirato, J. JELIS Investigators, *Stroke.* 39 (2008) 2052.

[67] D. Mozaffarian, W.T. Longstreth, R.N. Lemaitre, T.A. Manolio, L.H. Kuller, G.L. Burke, D.S. Siscovick, *Arch Intern Med.* 165 (2005) 200.

[68] M. Wennberg, I.A. Bergdahl, B. Stegmayr, G. Hallmans, T. Lundh, S. Skerfving, U. Stromberg, B. Vessby, J.H. Jansson, *Br J Nutr.* 98 (2007) 1038.

[69] T. Yaguchi, T. Nagata, T. Nishizaki, *Behav Brain Funct.* 6 (2010) 52.

[70] K. Fassbender, M. Simons, C. Bergmann, M. Stroick, D. Lutjohann, P. Keller, H. Runz, S. Kuhl, T. Bertsch, K. von Bergmann, M. Hennerici, K. Beyreuther, T. Hartmann, *Proc Natl*

Acad Sci U S A. 98 (2001) 5856.

[71] B. Grziwa, M.O. Grimm, C.L. Masters, K. Beyreuther, T. Hartmann, S.F. Lichtenthaler, *J Biol Chem.* 278 (2003) 6803.

[72] J.Y. Hur, H. Welander, H. Behbahani, M. Aoki, J. Franberg, B. Winblad, S. Frykman, L.O. Tjernberg, *FEBS J.* 275 (2008) 1174.

[73] M.O. Grimm, H.S. Grimm, A.J. Patzold, E.G. Zinser, R. Halonen, M. Duering, J.A. Tschape, B. De Strooper, U. Muller, J. Shen, T. Hartmann, *Nat Cell Biol.* 7 (2005) 1118.

[74] X. He, Y. Huang, B. Li, C.X. Gong, E.H. Schuchman, *Neurobiol Aging.* 31 (2010) 398.

[75] R.G. Cutler, J. Kelly, K. Storie, W.A. Pedersen, A. Tammara, K. Hatanpaa, J.C. Troncoso, M.P. Mattson, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (2004) 2070.

[76] J.W. Pettegrew, K. Panchalingam, R.L. Hamilton, R.J. McClure, *Neurochem Res.* 26 (2001) 771.

[77] V.V. Bandaru, J. Troncoso, D. Wheeler, O. Pletnikova, J. Wang, K. Conant, N.J. Haughey, *Neurobiol Aging.* 30 (2009) 591.

[78] M. Kosicek, S. Kirsch, R. Bene, Z. Trkanjec, M. Titlic, L. Bindila, J. Peter-Katalinic, S. Hecimovic, *Anal Bioanal Chem.* 398 (2010) 2929.

[79] M.M. Mielke, V.V. Bandaru, N.J. Haughey, P.V. Rabins, C.G. Lyketsos, M.C. Carlson, *Neurobiol Aging.* 31 (2010) 17.

[80] A.M. Sheikh, A. Nagai, *FEBS J.* 278 (2011) 634.

[81] M.R. Prasad, M.A. Lovell, M. Yatin, H. Dhillon, W.R. Markesbery, *Neurochem Res.* 23 (1998) 81.

[82] R.M. Nitsch, J.K. Blusztajn, A.G. Pittas, B.E. Slack, J.H. Growdon, R.J. Wurtman, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 (1992) 1671.

[83] J.J. Clifford, J. Drago, A.L. Natoli, J.Y.F. Wong, A. Kinsella, J.L. Waddington, K.S. Vaddadi, *Neuroscience.* 109 (2002) 81.

[84] K.S. Vaddadi, E. Soosai, E. Chiu, P. Dingjan, *Neuroreport.* 13 (2002) 29.

[85] U.N. Das, K.S. Vaddadi, *Nutrition.* 20 (2004) 942.

[86] V. Ruiperez, F. Darios, B. Davletov, *Prog Lipid Res.* 49 (2010) 420.

[87] A. Roy, K. Pahan, *Neuroscientist.* 17 (2011) 244.

[88] A.O. Koob, K. Ubhi, J.F. Paulsson, J. Kelly, E. Rockenstein, M. Mante, A. Adame, E. Masliah, *Exp Neurol.* 221 (2010) 267.

[89] C.R. Bodner, A.S. Maltsev, C.M. Dobson, A. Bax, *Biochemistry.* 49 (2010) 862.

- [90] T.M. da Silva, R.P. Munhoz, C. Alvarez, K. Naliwaiko, A. Kiss, R. Andreatini, A.C. Ferraz, *J Affect Disord.* 111 (2008) 351.
- [91] G. Tanriover, Y. Seval-Celik, O. Ozsoy, G. Akkoyunlu, F. Savcioglu, G. Hacıoglu, N. Demir, A. Agar, *Folia Histochem Cytobiol.* 48 (2010) 434.
- [92] R. Obeid, A. Schadt, U. Dillmann, P. Kostopoulos, K. Fassbender, W. Herrmann, *Clin Chem.* 55 (2009) 1852.
- [93] B.G. Crowell Jr, R. Benson, D. Shockley, C.G. Charlton, *Behav Neural Biol.* 59 (1993) 186.
- [94] T. Matsumoto, T. Kobayashi, K. Kamata, *Curr Med Chem.* 14 (2007) 3209.
- [95] M.R. Olthof, T. van Vliet, P. Verhoef, P.L. Zock, M.B. Katan, *PLoS Med.* 2 (2005) e135.
- [96] Y. Zhao, B. Su, R.L. Jacobs, B. Kennedy, G.A. Francis, E. Waddington, J.T. Brosnan, J.E. Vance, D.E. Vance, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29 (2009) 1349.
- [97] E.G. BLIGH, W.J. DYER, *Can J Biochem Physiol.* 37 (1959) 911.
- [98] V. Matyash, G. Liebisch, T.V. Kurzchalia, A. Shevchenko, D. Schwudke, *J Lipid Res.* 49 (2008) 1137.
- [99] H. Hidaka, K. Yamauchi, H. Ohta, T. Akamatsu, T. Honda, T. Katsuyama, *Clin Biochem.* 41 (2008) 1211.
- [100] V. SKIPSKI, M. BARCLAY, R. PETERSON, *Biochem J.* 90 (1964) 374.
- [101] G. BARTLETT, *J Biol Chem.* 234 (1959) 466.
- [102] M. Swartz, *Lc Gc N Am.* (2005) 8.
- [103] A.E. Pasvogel, P. Miketova, I.M. Moore, *Biol Res Nurs.* 10 (2008) 113.
- [104] S.M. Innis, A.G. Davidson, A. Chen, R. Dyer, S. Melnyk, S.J. James, *J Pediatr.* 143 (2003) 351.
- [105] B. Fuchs, R. Suss, J. Schiller, *Prog Lipid Res.* 49 (2010) 450.
- [106] M. Pulfer, R.C. Murphy, *Mass Spectrom Rev.* 22 (2003) 332.
- [107] F.F. Hsu, J. Turk, *J Am Soc Mass Spectrom.* 19 (2008) 1681.
- [108] B. Brugger, G. Erben, R. Sandhoff, F.T. Wieland, W.D. Lehmann, *Proc Natl Acad Sci USA.* 94 (1997) 2339.
- [109] M. Koivusalo, P. Haimi, L. Heikinheimo, R. Kostianen, P. Somerharju, *J Lipid Res.* 42 (2001) 663.
- [110] C. Hu, J. van Dommelen, R. van der Heijden, G. Spijksma, T.H. Reijmers, M. Wang, E.

- Slee, X. Lu, G. Xu, J. van der Greef, T. Hankemeier, *J Proteome Res.* 7 (2008) 4982.
- [111] G. Liebisch, B. Lieser, J. Rathenberg, W. Drobnik, G. Schmitz, *Biochim Biophys Acta.* 1686 (2004) 108.
- [112] G. Liebisch, W. Drobnik, B. Lieser, G. Schmitz, *Clin Chem.* 48 (2002) 2217.
- [113] Y. Rabagny, W. Herrmann, J. Geisel, S.H. Kirsch, R. Obeid, *Anal Bioanal Chem.* (2011).
- [114] J. Corley, in: PW Lee (Ed.), *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals.* 1st ed., John Wiley & Sons, Chichester, 2003, 1552.
- [115] J. Le Grandois, E. Marchioni, M. Zhao, F. Giuffrida, S. Ennahar, F. Bindler, *J Agric Food Chem.* 57 (2009) 6014.
- [116] D. Pacetti, P. Lucci, E. Boselli, N.G. Frega, *Eur J Lipid Sci Technol.* 111 (2009) 1201.
- [117] H.P. Schwarz, M.B. Dahlke, L. Dreisbach, *Clin Chem.* 23 (1977) 1548.
- [118] L. Chen, D.J. Magliano, P.Z. Zimmet, *Nat Rev Endocrinol.* (2011).
- [119] W. Herrmann, J. Wagner, R. Emmrich, *Atherosclerosis.* 20 (1974) 117.
- [120] X. Han, S. Rozen, S.H. Boyle, C. Hellegers, H. Cheng, J.R. Burke, K.A. Welsh-Bohmer, P.M. Doraiswamy, R. Kaddurah-Daouk, *PLoS One.* 6 (2011) e21643.
- [121] S.A. Summers, L.A. Garza, H. Zhou, M.J. Birnbaum, *Mol Cell Biol.* 18 (1998) 5457.
- [122] E. Ronnema, B. Zethelius, J. Sundelof, J. Sundstrom, M. Degerman-Gunnarsson, C. Berne, L. Lannfelt, L. Kilander, *Neurology.* 71 (2008) 1065.
- [123] M. Snel, M.A. Sleddering, H. Pijl, W.F. Nieuwenhuizen, M. Frolich, L.M. Havekes, J.A. Romijn, I.M. Jazet, *Eur J Clin Nutr.* 64 (2010) 419.
- [124] K. Yunoki, M. Renaguli, M. Kinoshita, H. Matsuyama, S. Mawatari, T. Fujino, Y. Kodama, M. Sugiyama, M. Ohnishi, *J Agric Food Chem.* 58 (2010) 7030.
- [125] I. Duivenvoorden, P.J. Voshol, P.C. Rensen, W. van Duyvenvoorde, J.A. Romijn, J.J. Emeis, L.M. Havekes, W.F. Nieuwenhuizen, *Am J Clin Nutr.* 84 (2006) 312.
- [126] J. Barrenetxe, P. Aranguren, A. Grijalba, J.M. Martinez-Penuela, F. Marzo, E. Urdaneta, *Br J Nutr.* 95 (2006) 455.
- [127] J.L. Chiasson, R.G. Josse, R. Gomis, M. Hanefeld, A. Karasik, M. Laakso, STOP-NIDDM Trail Research Group, *Lancet.* 359 (2002) 2072.
- [128] O.P. Bondar, E.S. Rowe, *Biochim Biophys Acta.* 1240 (1995) 125.
- [129] J.T. Smilowitz, M.M. Wiest, D. Teegarden, M.B. Zemel, J.B. German, M.D. Van Loan, *Nutr Metab (Lond).* 8 (2011) 67.

[130] E. Cazzaniga, A. Bulbarelli, E. Lonati, A. Orlando, F. Re, M. Gregori, M. Masserini, *Neurochem Res.* 36 (2011) 863.

[131] A. Jonas, M. Phillips, in: DE Vance (Ed.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 5th ed., Elsevier, Oxford, 2008, 489.

[132] R.A. Cox, M.R. García-Palmieri, in: HK Walker, WD Hall, JW Hurst (Eds.), *Clinical Methods*. 3rd ed., Butterworth, Boston, 1990, Table 31.1.