

Studienprotokoll

Wirkung eines veganen Multinährstoffpräparats, eines Cholin- und Omega-3-Präparats auf die Nährstoffversorgung von Veganer*innen

Rationale und Zielsetzung der Studie

Bei rein pflanzlicher (veganer) Ernährung gelten verschiedene Nährstoffe als kritisch. Hierzu zählen insbesondere Vitamin B₁₂, Vitamin B₂, Kalzium, Eisen, Zink, Jod, Selen sowie die langkettigen Omega-3-Fettsäuren (n-3) (Leitzmann und Keller 2020). Aber auch weitere Nährstoffe, beispielsweise Vitamin A und verzweigtkettige Aminosäuren, werden aktuell als potenziell kritisch diskutiert (Hovinen et al. 2021). Kritisch bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die durchschnittliche Zufuhr dieser Nährstoffe häufiger unter den Referenzwerten (z. B. D-A-CH-Referenzwerte) liegt. Eine Ergänzung verschiedener kritischer Nährstoffe wird aus wissenschaftlicher bei veganer Ernährung empfohlen (z. B. Vitamin B₁₂) oder kann sinnvoll sein (Richter et al. 2016). Dies gilt besonders dann, wenn die tägliche Ernährung nicht optimal zusammengestellt ist, der Nährstoffbedarf in bestimmten Lebensphasen erhöht ist oder auch bei optimierter Ernährung die ausreichende Zufuhr aller Nährstoffe nicht immer sichergestellt werden kann (Richter et al. 2020).

Vitamin A hat im menschlichen Körper zahlreiche Aufgaben und ist unter anderem relevant für, die Sehkraft, die Immunfunktion, die Reproduktionsfähigkeit, die Schilddrüsenfunktion und vieles Weitere (Elmadfa und Leitzmann 2019). Bei einer veganen Ernährung werden keine tierischen Produkte konsumiert. Daher können Veganer*innen ihren Vitamin-A-Bedarf lediglich über Vitamin-A-Vorstufen, z. B. β -Carotin (und andere Carotinoide), decken. β -Carotin (Provitamin A) wird durch das cytosolische Enzym β -Carotin-15,15'-Monooxygenase (BCMO1) gespalten und zu Vitamin A umgewandelt (Westphal und Böhm 2015). Da zahlreiche pflanzliche Lebensmittel, wie orange, gelbe, rote und grüne Gemüse- und Obstarten β -Carotin enthalten (Hahn et al. 2016), weisen Veganer*innen in Studien meist eine hohe Zufuhr von β -Carotin auf (Haldar et al. 2007, Schüpbach et al. 2017). Entsprechend sind auch ihre Blutkonzentrationen an β -Carotin höher als bei Mischköstler*innen (Waldmann et al. 2005). Entscheidend für die β -Carotin-Verwertung ist jedoch nicht nur die zugeführte Menge, sondern die Bioverfügbarkeit und vor allem Biokonversion. Für β -Carotin zu Retinol gilt dabei ein Umrechnungsfaktor von 12:1 (DGE et al. 2020). Allerdings ist die Umwandlung von β -Carotin zu Vitamin A nicht bei allen Menschen identisch. Aufgrund von Polymorphismen, die eine verringerte BCMO1-Aktivität verursachen, können unterschiedliche Umwandlungsraten vorliegen (Ferrucci et al. 2009, Burgerstein und Zimmermann 2012). Unklar ist daher, ob die ausschließliche Zufuhr von Vitamin-A-Vorstufen auch zu einem ausreichendem Vitamin-A-Status bei Veganer*innen führt.

Eine Vitamin-A-Zufuhr über ein Multinährstoffpräparat kann hier eine sinnvolle Ergänzung darstellen.

Selen weist zahlreiche Wirkungen auf das Immunsystem, die Schilddrüsenfunktionen und das Herz-Kreislauf-System auf (Elmadfa und Leitzmann 2019). Um entsprechende Mangelerscheinungen zu vermeiden, ist eine adäquate Zufuhr anzustreben. In der Europäischen Union dürfen seit 1992 Futtermittel mit Selen angereichert werden, sodass verschiedene Lebensmittel tierischen Ursprungs meist zuverlässige Selenquellen darstellen (Leitzmann und Keller 2020). Besonders hohe Gehalte finden sich in Innereien, aber auch Fleisch und Fisch liefern Selen (Elmadfa und Leitzmann 2019). Aufgrund unterschiedlicher Selengehalte in den Böden können die Selengehalte pflanzlicher Lebensmittel, wie beispielsweise Leguminosen oder Nüsse, stark schwanken (Parekh et al. 2008, Silva Junior et al. 2017). Nennenswerte pflanzliche Quellen für Selen sind insbesondere Paranüsse (Strunz et al. 2008, Rita Cardoso et al. 2016). Übersichtsarbeiten zeigen, dass Veganer*innen meist deutlich schlechter mit Selen versorgt sind als Mischköstler*innen (Hoeflich et al. 2010, Elorinne et al. 2016a). Auch hier kann eine Ergänzung für Veganer*innen sinnvoll sein.

Vitamin B12 wird für die DNA-Synthese sowie die Zellteilung, die Blutbildung und die ordnungsgemäße Funktion des Nervensystems benötigt (Elmadfa und Leitzmann 2019). Es gilt als der kritischste Nährstoff in einer veganen Ernährung weil dieser nicht oder nur unwesentlich über pflanzliche Lebensmittel zugeführt werden kann. Ein Mangel führt langfristig zu schweren, irreversiblen Schädigungen des Nervensystems und zu schweren Entwicklungsstörungen (Carmel 2014).

Die langkettigen n-3-Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) sind unter anderem wichtig für die Entwicklung und den Erhalt der kognitiven Fähigkeiten und werden ebenfalls als potenziell kritische Nährstoffe in der veganen Ernährung definiert (Richter et al. 2016, Elmadfa und Leitzmann 2019). Zu den n-3-Fettsäuren werden neben EPA und DHA auch die Docosapentaensäure (DPA) und α -Linolensäure (ALA) gezählt. Als essenziell gilt neben der n-6-Fettsäure Linolensäure (LA) nur die n-3-Fettsäure ALA. Diese müssen über die Nahrung aufgenommen werden, da der menschliche Körper sie nicht selbst bilden kann (DGE et al. 2020). Wird eine ausreichende Zufuhr sichergestellt, wandelt der menschliche Organismus ALA unter bestimmten Voraussetzungen in nennenswerte Mengen der langkettigen n-3-Fettsäuren EPA, DPA und DHA um (Burdge und Wootton 2002). Deshalb gelten diese Fettsäuren in der Literatur auch nur als semi-essenziell (DGE et al. 2020). Bei den Umwandlungsprozessen innerhalb der Familien der n-3- und n-6-Fettsäuren konkurrieren diese jedoch um dieselben Enzymsysteme aus

Desaturasen und Elongasen. Dadurch reduziert die Aufnahme von viel n-6-Fettsäuren über die Nahrung die Umwandlungsrate der n-3-Fettsäuren (Biesalski et al. 2017). Empfehlungen gehen deshalb von einem idealen Verhältnis von 5:1 (LA:ALA) oder niedriger aus (Simopoulos 2002, DGE et al. 2020). Veganer*innen nehmen verglichen mit anderen Ernährungsstilen tendenziell mehr LA und ALA zu sich, jedoch meist in einem ungünstigeren Verhältnis (20:1) (Mann et al. 2006a). Dadurch und durch den Wegfall der Hauptquellen (fettreicher Seefisch) (Rizzo et al. 2013) der langkettigen n-3-Fettsäuren folgt eine geringere Zufuhr an EPA und DHA (Welch et al. 2010, Sarter et al. 2015). Auch beim Versorgungsstatus weisen sich vegan ernährende Menschen im Vergleich zu Menschen mit anderen Ernährungsweisen meist signifikant niedrigere Blutspiegel an EPA und DHA auf (Sanders 2009, Elorinne et al. 2016). Aufgrund dessen bietet es sich für Veganer*innen an, diese auch direkt über die Nahrung aufzunehmen. Vegane Quellen hierfür sind z. B. Mikroalgenöle, die EPA und DHA enthalten.

Auf dem Markt gibt es mittlerweile verschiedene Nährstoffpräparate, die speziell Veganer*innen dabei unterstützen sollen, ihren Nährstoffbedarf zu decken. Wissenschaftliche Studien zur Wirksamkeit der Präparate und Bioverfügbarkeit der enthaltenen Nährstoffe liegen bisher kaum vor. Vor diesem Hintergrund sollen ein Multinährstoffpräparat (s. Tab. 1) sowie ein Cholin- (s. Tab. 2) und n-3-Präparat (s. Tab. 3) der Marke Watson Nutrition untersucht werden. Hierbei wird ein besonderer Fokus auf die Verbesserung der Versorgung der bisher unzureichend untersuchten, potenziell kritischen Nährstoffe Vitamin A, Selen, Cholin sowie EPA und DHA gelegt werden.

Es sollen deshalb folgende Fragestellungen beantwortet werden:

Hauptfragestellung

Wie wirkt sich die tägliche Verwendung des zu untersuchenden Multinährstoffpräparats über 16 Wochen auf den Vitamin-A- und Selen-Status sowie Vitamin-B₁₂-Status von Veganer*innen aus?

Wie wirkt sich die Gabe eines Cholin-Präparats über 16 Wochen auf den Cholinstatus von Veganer*innen aus?

Wie wirkt sich die Gabe eines n-3-Präparats mit DHA, EPA und Vitamin E über 16 Wochen auf den Fettsäurestatus von Veganer*innen aus?

Weitere Fragestellungen

Wie wirkt sich die tägliche Verwendung des zu untersuchenden Multinährstoffpräparats über 16 Wochen auf den Vitamin-B₂-, Vitamin-D-, Jod-, Zink- und Eisenstatus von Veganer*innen aus?

Definition des Kollektivs und der Eigenschaften der Patient*innen/Proband*innen, die in die Studie aufgenommen werden sollen

Insgesamt sollen etwa 80 freiwillige Proband*innen aufgenommen werden, die sich vegan ernähren und mindestens 18 Jahre alt sind. Die Geschlechterverteilung sollte möglichst jeweils 50 Prozent Männer und Frauen umfassen.

Einschlusskriterien: Freiwillige Proband*innen ab dem 18. Lebensjahr, seit mindestens einem Jahr vegane Ernährung.

Ausschlusskriterien: Raucher*innen, Schwangerschaft oder Stillzeit, diagnostizierter Vitamin- oder Mineralstoff-Mangel, diagnostizierte Erkrankungen, die den Stoffwechsel beeinflussen (z. B. chronische Gastritis, chronische Darmerkrankungen, Schilddrüsenerkrankungen, sonstige Resorptionsstörungen), chronische Medikamenteneinnahme (Ausnahme: Kontrazeptiva), Supplementierung von Vitamin A/Beta-Carotin oder Selen sowie (höherer) Verzehr von Paranüssen (erlaubt: max. zwei Paranüsse/Tag) in den letzten drei Monaten vor Studienbeginn, hohe Dosierung von Vitamin B₁₂-Supplementen (erlaubt: max. 1x/Monat \leq 1.000 μ g bzw. max. 1x/Woche \leq 200 μ g, max. 1x/Tag \leq 50 μ g oder \leq 1x/Tag Nutzung einer Vitamin B₁₂-Zahncreme), (regelmäßige) Supplementierung von Vitamin B₂, Vitamin D, Zink, Eisen, und/oder Cholin (erlaubt: jeweils max. 1x/Woche) in den letzten drei Monaten vor Studienbeginn, (regelmäßige) Supplementierung von Jod bzw. regelmäßiger Konsum von jodhaltigen Meeresalgen (erlaubt: $<$ 1x/Woche) in den letzten drei Monaten vor Studienbeginn (erlaubt: Nori-Algen \leq 1 TL/Blatt pro Tag).

Verfahren zur Rekrutierung der Proband*innen

Die Gewinnung vegan lebender Proband*innen erfolgt aus dem Pool der interessierten und geeigneten Personen, die sich bereits für andere Studien des IFPE gemeldet hatten. Weitere Rekrutierungswege sind Onlinemedien (Newsletter, Instagram, Facebook, Webseiten usw.) über Aufrufe des IFPE, Niko Rittenau, ProVeg Deutschland, Albert Schweitzer Stiftung für unsere Mitwelt und weiterer Institutionen, sowie ggfs. über Presseberichte.

Interessierte füllen einen Online-Fragebogen aus, der u. a. Fragen zu Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht, Ernährungsweise, diagnostiziertem Vitamin- und Mineralstoffmangel, diagnostizierten Erkrankungen, Medikamenteneinnahme, Verwendung von Nahrungsergänzungsmitteln, Schwangerschaft und Stillzeit oder Raucherstatus enthält. Am Ende des Fragebogens werden die Bereitschaft zur Studienteilnahme sowie, bei erklärter Bereitschaft, Telefonnummer und E-Mail-Adresse erfragt. Anhand der ausgewerteten Fragebögen wird unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien die Vorauswahl der Teilnehmer*innen getroffen.

Zusammensetzung

Tabelle 1: Zusammensetzung des veganen Multinährstoffpräparats

Nährstoff	Tagesdosis
Vitamine	
Vitamin B ₂ (Riboflavin-5-Phosphat Natrium)	1,4 mg
Vitamin B ₁₂ (MHA; Methyl, Hydroxo- und Adenosylcobalamin)	100 µg
Vitamin A (Retinylacetat und Retinylpalmitat im Verhältnis 1:1)	500 µg
Vitamin D (Cholecalciferol)	25 µg
Vitamin K ₂ (all-trans Menachinon-7)	50 µg
Mineralstoffe	
Calcium (Calciumbisglycinat)	120 mg
Eisen (Eisenbisglycinat)	6 mg
Zink (Zinkbisglycinat)	6,5 mg
Jod (Kaliumiodid)	150 µg
Selen (Natriumselenit)	55 µg

Tabelle 2: Zusammensetzung des veganen Cholin-Präparats

Nährstoff	Tagesdosis
Sojalecithin	11,5 g
- davon Phosphatidylcholin	2,3 g
- davon Cholin	300 mg

Tabelle 3: Zusammensetzung des veganen n-3-Präparats

Nährstoff	Tagesdosis
EPA	Mindestens 75 mg
DHA	Mindestens 150 mg
Vitamin D (Cholecalciferol)	25 µg
Vitamin E (d-alpha, d-Beta, d-Gamma- & d-Delta Tocopherol)	3 mg

Studiendesign

Die geplante Interventionsstudie wird zweifachblind, randomisiert und Placebo-kontrolliert durchgeführt. Die Teilnehmer*innen werden per Zufallsprinzip in eine Verum- und eine Placebogruppe (Kontrollgruppe) eingeteilt. Jede Gruppe umfasst zu Beginn der Studie 40 Proband*innen (berechnete Mindeststichprobengröße: 35 plus Drop-Out). Die Verumgruppe erhält das Multinährstoffpräparat sowie das Cholin- und n-3-Fettsäuren-Präparat und die Kontrollgruppe jeweils Placebos (gleiche Optik, gleicher Geschmack). Die Verteilung der Charakteristika (v. a. Alter, Geschlecht) und möglicher Confounder (Störfaktoren) soll zwischen der Verum- und Placebogruppe möglichst gleich sein.

Die Proband*innen werden angewiesen, die ihnen ausgegebenen Präparate (Verum bzw. Placebo) über einen Zeitraum von 16 Wochen in der jeweiligen Tagesdosierung einzunehmen. Außerdem sollen die Proband*innen während der Interventionsphase angereicherte Lebensmittel bzw. Nahrungsergänzungsmittel in der (vorher abgefragten) Art und Menge weiter einnehmen bzw. verzehren, wie vor Studienbeginn. Zur Kontrolle der Ernährung werden von den Proband*innen jeweils zu Studienbeginn, in der Mitte und am Ende der Intervention 3-Tage-Wiegeverzehrsprotokolle geführt. An nicht vorangekündigten Zeitpunkten werden zur Überprüfung der Compliance zusätzlich Erinnerungsanrufe durchgeführt.

Vor Beginn der Intervention wird den nüchternen Proband*innen Blut entnommen, um eine Urinprobe (Spontanurin) gebeten, beides präanalytisch aufbereitet und bis zum Ende der Studienphase tiefgefroren (Ausnahme: Hb, Folat und Vitamin B₂ werden bei 4 °C gekühlt und innerhalb von 24 h analysiert). Für die Ermittlung des BMI werden Körpergröße und -gewicht der Proband*innen gemessen. Die Blutentnahmen, Urinproben und Untersuchungen erfolgen räumlich und zeitlich zentralisiert (Studienzentrum Bad Homburg). Nach der 16-wöchigen Verwendung des Multinährstoffpräparat sowie des Cholin- und n-3-Fettsäuren-Präparat bzw. der jeweiligen Placebos wird den Proband*innen ein zweites Mal Blut entnommen und es wird um eine Urinprobe gebeten. Nach Abschluss der Intervention werden die Blut- und Urinproben (Baseline/T0 und T1) zeitgleich im Studienlabor analysiert. Bestimmt werden die in **Tab. 4** angegebenen Parameter.

Welche Merkmale, Messgrößen (Variablen) werden beobachtet bzw. bestimmt?**Tab. 4:** Zu untersuchende Nährstoffe und Parameter im Blut bzw. Urin der Proband*innen

Nährstoff	Parameter
Vitamin A	<ul style="list-style-type: none"> • Retinol im Serum • Retinolbindendes Protein (RBP) • Transthyretin • β-Carotin
Vitamin B ₁₂	<ul style="list-style-type: none"> • Holo-Transcobalamin (Holo-TC) • Methylmalonsäure (MMA) • Serum-Vitamin B₁₂ • Homocystein (Hcy)
Vitamin B ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Vitamin B₂ (Vollblut, als FAD)
Vitamin D ₃	<ul style="list-style-type: none"> • 25-OH-Vit. D₃
Vitamin E	<ul style="list-style-type: none"> • Vitamin E (im Serum)
Vitamin K ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Serum-Osteocalcin (OC) • Glu-OC • Gla-OC
Kalzium	(wird nicht untersucht) ²
Magnesium	(wird nicht untersucht) ¹
Zink	<ul style="list-style-type: none"> • Zink (im Vollblut)
Eisen	<ul style="list-style-type: none"> • Hb • Ferritin • Löslicher Transferrinrezeptor (sTFR)
Selen	<ul style="list-style-type: none"> • Selenoprotein P
Jod	<ul style="list-style-type: none"> • Jod im Urin (Spontanurin)
Folat	<ul style="list-style-type: none"> • Folat (Vollblut)
Cholin	<ul style="list-style-type: none"> • Cholin (im Plasma)
Omega-3-Index	<ul style="list-style-type: none"> • EPA- und DHA-Verhältnis zu restlichen Fettsäuren (Erythrozyten)

¹ Magnesium sind bei veganer Ernährung unkritisch (Leitzmann und Keller 2020)² Kein guter Blut- oder Urinparameter für die Kalziumversorgung vorhanden³ cB12: Ein Ansatz, um den Vitamin B12-Status adäquat zu bestimmen besteht darin, die Marker für die Berechnung des Index zu kombinieren: Serum-Vitamin B₁₂, Holo-TC, MMA und Hcy (Siebert et al. 2017)

Anhand eines Online-Fragebogens werden zu Studienbeginn soziodemographische und ernährungsbezogene Daten der Proband*innen erhoben.

Was ist/sind die zur Beantwortung der Fragestellung wesentliche/n Variable/n?

Die Hauptmarker für das Outcome sind für **Vitamin A** Serum-Retinol und retinolbindendes Protein (RBP) im Serum. Serum-Retinol ist der am häufigsten verwendete Biomarker für die Vitamin-A-Statusbestimmung. Allerdings sinkt der Parameter erst bei einem sehr ausgeprägten Vitamin-A-Mangel. Unterversorgungen können durch den Parameter erst recht spät aufgezeigt werden (Tanumihardjo et al. 2016). Um daher aussagekräftigere Ergebnisse zu erzielen, werden zusätzlich RBP und Transthyretin untersucht. RBP wird hauptsächlich von den Hepatozyten der Leber synthetisiert und bindet Retinol im Serum, um es zu den jeweiligen Zielorganen zu transportieren. Ist die Retinolkonzentration im Serum zu gering, wird RBP nicht mehr von der Leber freigesetzt, und kennzeichnet so Versorgungsdefizite (Tanumihardjo et al. 2016). Transthyretin ist ebenfalls am Transport von Retinol beteiligt und bildet mit RBP und Retinol einen Komplex. In Kombination mit RBP und dem Entzündungsmarker CRP zeigen sich gute Ergebnisse in bei der Diagnostik eines Vitamin-A-Mangels (Talsma et al. 2015).

Zudem werden auch β -Carotin und die Aktivität der BCMO1 als weitere Parameter zur Vitamin-A-Bestimmung hinzugezogen, um Aufschluss darüber zu erhalten, wieviel Retinol tatsächlich durch die Gabe des Multinährstoffpräparats aufgenommen wurde. Die Umwandlung von β -Carotin zu Retinol ist u. a. abhängig vom Vitamin-A-Speicher in der Leber. Mit steigender Sättigung an Vitamin A sinkt die Aktivität der BCMO1 und somit die Umwandlungsrate. Gleichwohl steigen die β -Carotin-Plasma-Werte, wenn weniger β -Carotin gespalten wird (Biesalski et al. 2002, Amengual et al. 2020, Zhou et al. 2020).

Für die Veränderung der Selenkonzentration ist **Selenoprotein P (SPP)** der Hauptmarker. Selenoprotein P stellt das Transportprotein des Selens dar und ist als Biomarker zur Beurteilung des Selenstatus besonders bei geringer Selenzufuhr geeignet. Zudem ist es nach aktuellem Wissensstand der aussagekräftigste Marker (Simonová und Pfannhauser 2008, EFSA 2014).

Um die Versorgung mit den langkettigen n-3-Fettsäuren EPA und DHA zu überprüfen, ist die Messung des HS-Omega-3-Index sinnvoll. Der Omega-3-Index ist die Summe der beiden langkettigen n-3-Fettsäuren EPA und DHA in den Erythrozytenmembranen und wird als prozentualer Anteil an den gesamten Erythrozytenfettsäuren ausgedrückt. Die Auswirkungen dieser Fettsäuren auf die grundlegenden Zellfunktionen beruhen in erster Linie auf ihren Wirkungen auf und in den Membranen, weshalb der HS-Omega-3-Index im Gegensatz zur n-3-Fettsäuren-

Zusammensetzung oder -Konzentration im Plasma, eine besser Aussagekraft hinsichtlich der Versorgungslage mit diesen Fettsäuren gibt.

Mit Hilfe welcher Variablen sollen zusätzliche Informationen gewonnen werden (z.B. Parameter, mit deren Hilfe Aussagen zur Sicherheit der Therapie gemacht werden sollen)?

Geschlecht, Alter, BMI, Daten zur Dauer der veganen Ernährungsweise, bisherige Form und Dosis von Supplementierungen, Selbsteinschätzung des Versorgungsgrades mit den potenziell kritischen Nährstoffen, 3-Tage-Wiegeverzehrsprotokolle zur Ernährungskontrolle während der Intervention.

Welche Störgrößen können das Ergebnis beeinflussen?/ Maßnahmen zur Kontrolle der Störgrößen in der Durchführung und Auswertung

Eine von der Vorgabe abweichende Einnahme des Multinährstoffpräparats würde eine potenzielle Störgröße darstellen. Die Compliance wird über einen Erinnerungsanruf während der laufenden Intervention überprüft. Eine weitere Störgröße wäre eine Veränderung der vor der Studie eingenommenen Nahrungsergänzungsmittel während der Intervention, aufgrund von gegenläufigen Effekten auf die Blutwerte. Um dies auszuschließen, werden die Proband*innen angehalten, während der Studienphase ihre bisherigen Supplementationen beizubehalten. Es werden zudem möglichst Proband*innen mit wenig Einnahme von Supplementen in die Studie eingeschlossen.

Planung der biometrischen Auswertung

Die Daten werden in SPSS eingegeben und alle Variablen auf Normalverteilung anhand der Kriterien der Kolmogorov-Smirnov-Statistik und der Shapiro-Wilk-Statistik untersucht. Bei normalverteilten Variablen wird der t-Test für unverbundene Stichproben verwendet, um signifikante Mittelwertunterschiede zwischen der Placebo- und Verum-Studiengruppe während der Intervention festzustellen. Signifikante Unterschiede zwischen der Placebo- und Verum-Studiengruppe werden dann mittels allgemeiner univariater ANOVA mit linearem Modell (Varianzanalyse) untersucht, ebenso die Mittelwerte der Differenzen der verschiedenen Blutmarker zwischen den Placebo- und Verumgruppe. Eine allgemeine univariate ANOVA für Messwiederholungen wird genutzt, um auf signifikante Unterschiede innerhalb der Studiengruppen zu testen. Bei nicht-normalverteilten Variablen kommen entweder der nicht-parametrische Wilcoxon-Test und der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test oder die oben genannten Tests mit transformierten Werten zum Einsatz. Die Auswertung betrachtet einen p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant.

Adjustiert für die Baseline-Werte, das Alter und das Geschlecht wird eine ANOVA für die einzelnen kontinuierlichen und dichotomen Variablen wie erforderlich durchgeführt.

Vergleich: Vorher-Nachher

Vitamin A

Hypothese 1 und 2: Die Serum-Retinol-Konzentration (Hauptzielgröße) wird bei Anwendung des Multinährstoffpräparats über 16 Wochen gesteigert, jedoch nicht bei Anwendung des Placebo-Präparats (gepaarter t-test, ANOVA). Die mittlere Serum-Retinol-Konzentration zwischen Verum- und Placebogruppe unterscheidet sich nach der Intervention signifikant (ANOVA).

Hypothese 2: Die RBP-Konzentration (Hauptzielgröße) wird bei Anwendung des Multinährstoffpräparats über 16 Wochen gesteigert, jedoch nicht bei Anwendung des Placebo-Präparats (gepaarter t-test, ANOVA). Die mittlere RBP-Konzentration zwischen Verum- und Placebogruppe unterscheidet sich nach der Intervention signifikant (ANOVA).

Hypothese 3: Die β -Carotin-Konzentration (Hauptzielgröße) wird bei Anwendung des Multinährstoffpräparats über 16 Wochen gesteigert, jedoch nicht bei Anwendung des Placebo-Präparats (gepaarter t-test, ANOVA). Die mittlere β -Carotin -Konzentration zwischen Verum- und Placebogruppe unterscheidet sich nach der Intervention signifikant (ANOVA).

Hypothese 4: Die Aktivität der Carotin-15,15'-Monooxygenase (BCMO1) (Hauptzielgröße) wird bei Anwendung des Multinährstoffpräparats über 16 Wochen geringer, jedoch nicht bei Anwendung des Placebo-Präparats (gepaarter t-test, ANOVA). Die mittlere BCMO1-Konzentration zwischen Verum- und Placebogruppe unterscheidet sich nach der Intervention signifikant (ANOVA)

Hypothese 5: Die Transthyretin-Konzentration (Hauptzielgröße) wird bei Anwendung des Multinährstoffpräparats über 16 Wochen geringer, jedoch nicht bei Anwendung des Placebo-Präparats (gepaarter t-test, ANOVA). Die mittlere Transthyretin-Konzentration zwischen Verum- und Placebogruppe unterscheidet sich nach der Intervention signifikant (ANOVA)

Selen

Hypothese 6: Die Konzentration des Selenoproteins P (Hauptzielgröße) wird bei Anwendung des Multinährstoffpräparats über 16 Wochen gesteigert, jedoch nicht bei Anwendung des Placebo-Präparats (gepaarter t-test, ANOVA). Die mittlere Selen -Konzentration zwischen Verum- und Placebogruppe unterscheidet sich nach der Intervention signifikant (ANOVA).

Vitamin B₁₂

Hypothese 7: Die MMA-Konzentration (Hauptzielgröße) wird bei Anwendung des Multinährstoffpräparats über 16 Wochen gesenkt, jedoch nicht bei Anwendung des Placebo-Präparats (gepaarter t-test, ANOVA).

Hypothese 8: Die HoloTC-Konzentration (Hauptzielgröße) wird bei Anwendung des Multinährstoffpräparats über 16 Wochen erhöht, jedoch nicht bei Anwendung des Placebo-Präparats (gepaarter t-test, ANOVA).

Cholin:

Hypothese 9: Die Cholin-Konzentration (Hauptzielgröße) wird bei Anwendung des Multinährstoffpräparats über 16 Wochen erhöht, jedoch nicht bei Anwendung des Placebo-Präparats (gepaarter t-test, ANOVA).

Hypothese 10: Die TMAO-Konzentration (Hauptzielgröße) wird bei Anwendung des Multinährstoffpräparats über 16 Wochen erhöht, jedoch nicht bei Anwendung des Placebo-Präparats (gepaarter t-test, ANOVA).

n-3-Fettsäuren:

Hypothese 11: Die Erythrozytenkonzentration von EPA und DHA (Omega-3-Index) (Hauptzielgröße) wird bei Anwendung des Multinährstoffpräparats über 16 Wochen gesteigert, jedoch nicht bei Anwendung des Placebo-Präparats (gepaarter t-test, ANOVA). Die mittlere Omega-3-Index-Konzentration zwischen Verum- und Placebogruppe unterscheidet sich nach der Intervention signifikant (ANOVA).

Vergleich Verum-Placebo nach Intervention

Weitere Hypothesen: Nach Anwendung des Multinährstoffpräparats über 16 Wochen unterscheiden sich die Konzentrationen der Parameter Vitamin B₂, und/oder Vitamin D, und/oder Vitamin E, und/oder Zink, und/oder Eisen, und/oder Folat und/oder Jod zwischen Verum- und Kontrollgruppe signifikant (ANOVA).

Die statistischen Analysen werden nach dem „Intention to treat“-Prinzip durchgeführt (inklusive Dropouts) sowie nach Protokoll wiederholt (nur Teilnehmer*innen, die die Intervention vollständig beendet haben).

Falls Zwischenauswertung vorgesehen ist, zu welchem Zeitpunkt, bzw. bei welchem Ereignis wird die Zwischenauswertung durchgeführt?

Was sind die Konsequenzen?

Wie wird die globale Irrtumswahrscheinlichkeit kontrolliert?

Im Rahmen der Studie sind keine Zwischenauswertungen vorgesehen.

Überlegungen zum Stichprobenumfang

Die Berechnung des Stichprobenumfangs erfolgte anhand der Hauptzielgröße Vitamin A mit Hilfe von G*Power 3.1.9.2. Hierzu wurde eine Studie mit 206 Proband*innen aus der Schweiz verwendet, die die Serum-Retinol-Spiegel von Veganer*innen und Mischköstler*innen untersuchte, da es unseres Wissens keine Studie gibt, die Vitamin-A-supplementierende Veganer*innen und nicht Vitamin-A-supplementierende Veganer*innen miteinander verglichen hat. Für die Berechnung wurde eine Differenz im Serum-Retinol-Spiegel zwischen omnivor (1.869 ± 436 nmol/l) und vegan (1.562 ± 408 nmol/l) ernährten Teilnehmer*innen von 307 nmol/l festgestellt (Schüpbach et al. 2017). Auf dieser Basis wurde eine starke Effektgröße (Cohen's d) von ca. 0,7 antizipiert. Dies resultiert in einer benötigten Fallzahl von $n = 25$ pro Studiengruppe mit einer Power von $\beta = 0,8$ und einem einseitigen $\alpha = 0,05$ (a priori einseitiger t-Test).

Für das zweite Haupt-Outcome Selen liegen ebenfalls keine vergleichenden Untersuchungen zwischen supplementierenden Veganer*innen und nicht-supplementierenden Veganer*innen vor. Daher wird eine Untersuchung mit Mischköstler*innen und (nicht-supplementierenden) Veganer*innen (Kadabova et al. 1994) zugrunde gelegt. Hier wurde das (im Vergleich zum Selenoprotein P) weniger selektive Enzym GPx (Glutathionperoxidase) im Plasma als Biomarker verwendet. Mit einem Unterschied zwischen Veganer*innen ($223.9 \pm 11.9\mu\text{g/l}$) und Omnivoren ($333.5 \pm 10.6\mu\text{g/l}$) von $109,6 \mu\text{g/l}$ sowie einer Power von $\beta = 0,8$, $\alpha = 0,05$ (a priori einseitiger t-Test) erhält man eine benötigte Fallzahl von $n = 2$ pro Gruppe.

Um auch eine ausreichende Fallzahl für das dritte Haupt-Outcome der langkettigen Omega-3-Fettsäuren (DHA und EPA) zu haben, werden ebenfalls mindestens $n = 2$ Proband*innen benötigt. Grundlage sind Daten einer Studie mit 114 Vegetarier*innen aus Deutschland, die über acht Wochen täglich ein Mikroalgenöl ($0,94$ g DHA) erhielten (Geppert et al. 2005). Dies führte zu einer Erhöhung von EPA+DHA in den Erythrozyten von $4,8 \pm 0,2$ auf $8,4 \pm 0,2$. Mit $\beta = 0,8$ und $\alpha = 0,05$ (a priori einseitiger t-Test) ergibt dies eine sehr hohe Effektstärke von 18. Obwohl die DHA-Dosis in der Studie von Geppert et al. (2005) etwa 4-mal höher lag, wird daher angenommen, dass die Fallzahl von $n = 40$ ausreichend wird, um statistisch signifikante Effekte der Intervention zu detektieren.

Für Vitamin B₁₂ wird ein erwarteter Interventions-Effekt auf die MMA-Konzentrationen von mindestens 30 % zwischen Verum- und Placebogruppe zugrunde gelegt. Dieser Unterschied basiert auf früheren Studien mit Vitamin-B₁₂-supplementierenden Vegetarier*innen im Vergleich zu nicht-supplementierenden Vegetarier*innen (Siebert et al. 2017). Bei einem $\beta = 0,8$ und $\alpha = 0,05$ (a priori einseitiger t-Test) ergibt sich eine Fallzahl von $n = 35$.

Insgesamt wird mit einem Dropout von etwa 15 % (Erfahrung aus eigener Studie, von Siebert et al. 2017) gerechnet und somit eine **Gesamt-Fallzahl von 40** pro Gruppe angestrebt.

Dauer der Rekrutierungsphase

Etwa zwei Monate (Erfahrungswert).

Falls Design-Änderungen durchgeführt werden sollen/können

Es sind keine Designänderungen im Verlauf der Studie geplant, da eine ähnliche Interventionsstudie mit einer Vitamin-B₁₂-angereicherten Zahncreme (Siebert et al. 2017) mit vergleichbarem Studienprotokoll gezeigt hat, dass dieses eingehalten werden kann.

Die Studie wird abgebrochen

- bei Auftreten relevanter medizinischer oder ethischer Gründe,
- bei Auftreten von unerwünschten Ereignissen, deren Schwere und Dauer unbekannt sind, oder bei unerwartetem Eintritt bekannter unerwünschter Ereignisse,
- wenn durch die individuellen Abbruchkriterien die Zahl der Proband*innen soweit reduziert ist, dass eine statistische Auswertung nicht mehr durchzuführen ist.

Ein Studienabbruch ist jedoch nicht zu erwarten.

Verantwortlichkeiten, Entscheidungsstrukturen und Studienorganisation

Studienleitung: Dr. Markus Keller, Forschungsinstitut für pflanzenbasierte Ernährung (IFPE) in Biebertal/Gießen

Kooperationspartner: Hersteller des Multinährstoffpräparats: Watson Nutrition, Inhaber Benjamin Ploberger, Kulmer Straße 1, 10783 Berlin

Orte der Blutentnahmen und Messungen: Studienzentrum Bad Homburg, Gesundheitspraxis Dr. med. Petra Bracht & Kollegen

Beteiligte Labore: MVZ Medizinisches Labor Bremen GmbH (Dr. Andreas Sputtek)

Dokumentation, Bericht: Doktorand M. Sc. Tim Ritzheim, Dr. Stine Weder, Dr. Markus Keller

Auswertung: Doktorand M. Sc. Tim Ritzheim, Dr. Stine Weder; Statistikberatung: Johannes Herrmann

Ethik

Die Untersuchung wird in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki in der Fassung von 2000 (Revision 2013) durchgeführt. Die Studie untersucht eine praktikable und einfache Möglichkeit der Nährstoff-Supplementierung bei Risikogruppen – in diesem Falle Veganer*innen. Um die Wirksamkeit des Multinährstoffpräparats sowie des n-3-Präparats bewerten zu können, sind Blutentnahmen und Urinproben bei den Proband*innen notwendig. Ebenfalls erforderlich ist eine Aufteilung der Teilnehmer*innen in Untersuchungs- und Kontrollgruppe (doppeltblinde Randomisierung per Zufallsverfahren), um die Wirksamkeit des Verum-Präparats mit einem Placebo-Präparats vergleichen zu können sowie mögliche Störgrößen der Verteilung auszuschließen.

Die teilnehmenden Proband*innen werden in einem Aufklärungsgespräch sowie einer schriftlichen Proband*inneninformation über die Studie sowie mögliche Risiken informiert. Die Teilnahme der Proband*innen an der Untersuchung ist freiwillig; die Zustimmung kann jederzeit, ohne Angaben von Gründen und ohne Nachteile zurückgezogen werden. Die Studie wird durch einen Prüfarzt* eine Prüfarztin begleitet und überwacht.

Datenschutz

Methoden zur Anonymisierung der Daten; Angaben bezüglich Aufbewahrung der Daten und Originalunterlagen

Die Namen der Proband*innen sowie alle vertraulichen Informationen unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht sowie der Datenschutzgrundverordnung (DSGVO). Eine Weitergabe von Proband*innendaten nach außen ist ausgeschlossen. Die Auswertung erfolgt in anonymisierter Form. Daten und Originalunterlagen werden zentral bei den Studiendurchführenden aufbewahrt und befinden sich auf einem separaten Rechner.

Maßnahmen zur Gewährleistung der Proband*innen-/Patient*innensicherheit

Es sind keine unerwünschten Wirkungen durch die Verwendung des Multinährstoffpräparats und des n-3-Präparats zu erwarten. Des Weiteren können bei der korrekten Einnahme (nach Dosierungsempfehlung) der Präparate Überdosierungen einzelner Nährstoffe ausgeschlossen werden.

Während der Blutentnahme kann es zu einem kurzen Schmerz beim Einstich der Nadel und nach der Blutentnahme zu einer leichten Einblutung mit nachfolgendem Bluterguss kommen. Manche Personen reagieren mit Kreislaufbeschwerden auf eine Blutentnahme. Weitere Risiken einer Blutentnahme, wie Infektionen, Thrombosierung oder Verletzung von benachbartem Gewebe und Nerven, sind sehr selten und können bei geschultem Personal so gut wie ausgeschlossen werden.

Es wird eine Wegeunfallversicherung für die An- und Abreise der Proband*innen zum Ort der Blutentnahmen (Studienzentrum) abgeschlossen.

Qualitätsmanagement

Maßnahmen zur Standardisierung der Durchführung der einzelnen studienbedingten Maßnahmen und Erfassungen der Ereignisse

Die Blutabnahmen werden routinemäßig von geschultem Personal durchgeführt, ebenso die Aufbereitung der Blutproben. Die Analyse aller Blutproben (erste und zweite Blutprobe) erfolgt nach Abschluss der Intervention zum gleichen Zeitpunkt im Partnerlabor.

Publikation der Ereignisse

Welche Institution erhält Zwischenergebnisse und den statistischen und medizinischen Abschlussbericht?

Autorenschaft und Zustimmungspflicht

Der Auftraggeber Watson Nutrition erhält den Abschlussbericht.

Es sind wissenschaftliche Publikationen durch die beteiligten Forscher*innen vorgesehen. Der Auftraggeber muss dem nicht gesondert zustimmen.

Durchführung und Auswertung sind Gegenstand einer Promotion am Fachbereich 09 der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Soll das Studienprotokoll publiziert werden, bzw. die Studie angemeldet werden?

Ja

Literatur

- Amengual J, Coronel J, Marques C, Aradillas-García C, Morales JMV, Andrade FCD, Erdman JW, Teran-Garcia M (2020): β -Carotene Oxygenase 1 Activity Modulates Circulating Cholesterol Concentrations in Mice and Humans. *The Journal of Nutrition* 150(8):2023–2030.
- Biesalski HK, Grimm P, Nowitzki-Grimm S (2017): Taschenatlas Ernährung, 7., unveränderte Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag.
- Biesalski HK, Kroll J, Schmittmann K (2002): Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Burdge GC, Wootton SA (2002): Conversion of α -linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *British Journal of Nutrition* 88(4):411–420.
- Burgerstein L, Zimmermann M (2012): Handbuch Nährstoffe: vorbeugen und heilen durch ausgewogene Ernährung; alles über Spurenelemente, Vitamine und Mineralstoffe, 12. Aufl., vollst. neu bearb. und erw. Stuttgart: TRIAS-Verl.
- Carmel R (2014): In Ross A, Caballero B, Cousins R (Hrsg), *Modern nutrition in health and disease.*, 369–389. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,.
- DGE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung), ÖGE (Österreichische Gesellschaft für Ernährung), SGE (Schweizerische Gesellschaft für Ernährung) (2020): D-A-C-H-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, 2. Auflage, 6. akt. Ausgabe. Bonn: Neuer Umschau Buchverlag.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2014): Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. *EFSA Journal* (2014;12(10):3846).
- Elmadfa I, Leitzmann C (2019): Ernährung des Menschen: 270 Tabellen, 6., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage. Stuttgart: Ulmer.
- Elorinne A-L, Alfthan G, Erlund I, Kivimäki H, Paju A, Salminen I, Turpeinen U, Voutilainen S, Laakso J (2016a): Food and Nutrient Intake and Nutritional Status of Finnish Vegans and Non-Vegetarians. *PLoS ONE* 11(2):e0148235.

- Elorinne A-L, Alfthan G, Erlund I, Kivimäki H, Paju A, Salminen I, Turpeinen U, Voutilainen S, Laakso J (2016b): Food and Nutrient Intake and Nutritional Status of Finnish Vegans and Non-Vegetarians. *PLOS ONE* 11(2):e0148235.
- Ferrucci L, Perry JRB, Matteini A, Perola M, Tanaka T, Silander K, Rice N, Melzer D, Murray A, Cluett C, Fried LP, Albanes D, Corsi A-M, Cherubini A, Guralnik J, Bandinelli S, Singleton A, Virtamo J, Walston J, Semba RD, Frayling TM (2009): Common Variation in the β -Carotene 15,15'-Monooxygenase 1 Gene Affects Circulating Levels of Carotenoids: A Genome-wide Association Study. *The American Journal of Human Genetics* 84(2):123–133.
- Fokkema MR, Brouwer DAJ, Hasperhoven MB, Hetteema Y, Bemelmans WJE, Muskiet FAJ (2000): Polyunsaturated fatty acid status of Dutch vegans and omnivores. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA) 63(5):279–285.
- Geppert J, Kraft V, Demmelmair H, Koletzko B (2005): Docosahexaenoic acid supplementation in vegetarians effectively increases omega-3 index: A randomized trial. *Lipids* 40(8):807–814.
- Hahn A, Ströhle A, Wolters M, Behrendt I, Heinen D (2016): Ernährung: physiologische Grundlagen, Prävention, Therapie, 3., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Haldar S, Rowland IR, Barnett YA, Bradbury I, Robson PJ, Powell J, Fletcher J (2007): Influence of habitual diet on antioxidant status: a study in a population of vegetarians and omnivores. *European Journal of Clinical Nutrition* 61(8):1011–1022.
- Hoeflich J, Hollenbach B, Behrends T, Hoeg A, Stosnach H, Schomburg L (2010): The choice of biomarkers determines the selenium status in young German vegans and vegetarians. *British Journal of Nutrition* 104(11):1601–1604.
- Hovinen T, Korkalo L, Freese R, Skaffari E, Isohanni P, Niemi M, Nevalainen J, Gylling H, Zamboni N, Erkkola M, Suomalainen A (2021): Vegan diet in young children remodels metabolism and challenges the statuses of essential nutrients. *EMBO Molecular Medicine* 13(2).

- Kornsteiner M, Singer I, Elmadfa I (2008): Very Low n-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Status in Austrian Vegetarians and Vegans. *Annals of Nutrition and Metabolism* 52(1):37–47.
- Leitzmann C, Keller M (2020): *Vegetarische und vegane Ernährung*, 4. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Eugen Ulmer.
- Liet J-M, Piloquet H, Marchini JS, Maugère P, Bobin C, Rozé J-C, Darmaun D (1999): Leucine metabolism in preterm infants receiving parenteral nutrition with medium-chain compared with long-chain triacylglycerol emulsions. *The American Journal of Clinical Nutrition* 69(3):539–543.
- Mann N, Pirota Y, O’Connell S, Li D, Kelly F, Sinclair A (2006a): Fatty acid composition of habitual omnivore and vegetarian diets. *Lipids* 41(7):637–646.
- Mann N, Pirota Y, O’Connell S, Li D, Kelly F, Sinclair A (2006b): Fatty acid composition of habitual omnivore and vegetarian diets. *Lipids* 41(7):637–646.
- Parekh PP, Khan AR, Torres MA, Kitto ME (2008): Concentrations of selenium, barium, and radium in Brazil nuts. *Journal of Food Composition and Analysis* 21(4):332–335.
- Richter M, Kroke A, Grünewald-Funk D, Hesecker H, Virmani K, Watzl B (2020): Ergänzung der Position der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V. zur veganen Ernährung hinsichtlich Bevölkerungsgruppen mit besonderem Anspruch an die Nährstoffversorgung. *Ernaehrungs Umschau Sonderheft* (5):64–72.
- Richter Ma, Boeing H, Grünewald-Funk D, Hesecker H, Kroke A (2016): Vegane Ernährung - Position der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V. (DGE). *Ernaehrungs Umschau* 64(4):92–102.
- Rita Cardoso B, Apolinário D, da Silva Bandeira V, Busse AL, Magaldi RM, Jacob-Filho W, Cozzolino SMF (2016): Effects of Brazil nut consumption on selenium status and cognitive performance in older adults with mild cognitive impairment: a randomized controlled pilot trial. *European Journal of Nutrition* 55(1):107–116.

- Rizzo NS, Jaceldo-Siegl K, Sabate J, Fraser GE (2013): Nutrient Profiles of Vegetarian and Nonvegetarian Dietary Patterns. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 113(12):1610–1619.
- Sanders TAB (2009): DHA status of vegetarians. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 81(2–3):137–141.
- Sarter B, Kelsey KS, Schwartz TA, Harris WS (2015): Blood docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in vegans: Associations with age and gender and effects of an algal-derived omega-3 fatty acid supplement. *Clinical Nutrition* 34(2):212–218.
- Schüpbach R, Wegmüller R, Berguerand C, Bui M, Herter-Aeberli I (2017): Micronutrient status and intake in omnivores, vegetarians and vegans in Switzerland. *Eur J Nutr* 56(1):283–293.
- Siebert A-K, Obeid R, Weder S, Awwad HM, Sputtek A, Geisel J, Keller M (2017): Vitamin B-12-fortified toothpaste improves vitamin status in vegans: a 12-wk randomized placebo-controlled study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 105(3):618–625.
- Silva Junior EC, Wadt LHO, Silva KE, Lima RMB, Batista KD, Guedes MC, Carvalho GS, Carvalho TS, Reis AR, Lopes G, Guilherme LRG (2017): Natural variation of selenium in Brazil nuts and soils from the Amazon region. *Chemosphere* 188:650–658.
- Simonová A, Pfannhauser W (2008): Selen - Vorkommen, Wirkung und Versorgung. *Ernährung/Nutrition* 32(9):346–378.
- Simopoulos AP (2002): The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56(8):365–379.
- Strunz CC, Oliveira TV, Vinagre JCM, Lima A, Cozzolino S, Maranhão RC (2008): Brazil nut ingestion increased plasma selenium but had minimal effects on lipids, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function in human subjects. *Nutrition Research* 28(3):151–155.
- Talsma EF, Verhoef H, Brouwer ID, Mburu-de Wagt AS, Hulshof PJ, Melse-Boonstra A (2015): Proxy markers of serum retinol concentration, used alone and in combination, to assess population vitamin A status in Kenyan children: a cross-sectional study. *BMC Medicine* 13(1):30.

- Tanumihardjo SA, Russell RM, Stephensen CB, Gannon BM, Craft NE, Haskell MJ, Lietz G, Schulze K, Raiten DJ (2016): Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)—Vitamin A Review. *The Journal of Nutrition* 146(9):1816S-1848S.
- Waldmann A, Koschizke JW, Leitzmann C, Hahn A (2005): Dietary Intakes and Blood Concentrations of Antioxidant Vitamins in German Vegans. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 75(1):28–36.
- Welch AA, Shakya-Shrestha S, Lentjes MA, Wareham NJ, Khaw K-T (2010): Dietary intake and status of n–3 polyunsaturated fatty acids in a population of fish-eating and non-fish-eating meat-eaters, vegetarians, and vegans and the precursor-product ratio of α -linolenic acid to long-chain n–3 polyunsaturated fatty acids: results from the EPIC-Norfolk cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition* 92(5):1040–1051.
- Westphal A, Böhm V (2015): Carotenoids. Properties, distribution, bioavailability, metabolism and health effects. *Ernahrungs Umschau* (62(11)):196–207.
- Zhou F, Wu X, Pinos I, Abraham BM, Barrett TJ, von Lintig J, Fisher EA, Amengual J (2020): β -Carotene conversion to vitamin A delays atherosclerosis progression by decreasing hepatic lipid secretion in mice. *Journal of Lipid Research* 61(11):1491–1503.