

Aus dem Institut für  
Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Tübingen  
Direktor: Professor Dr. F. W. Schmahl

**Homocysteinestoffwechsel und Atherosklerose.  
Methionin-Belastungstests und langfristige Methionin-  
Applikation im Kaninchenmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Andreas Michael Reck  
aus Ravensburg

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Clausen

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. W. Schmahl

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Heinle

Gewidmet meiner Familie.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Tiermodell.....</b>	<b>4</b>
2.1.1	Tierhaltung.....	4
2.1.2	Gruppeneinteilung und Behandlungsschema.....	4
2.1.3	Blutentnahme .....	5
2.1.4	Versuchsende und Gefäßentnahme.....	5
<b>2.2</b>	<b>Untersuchungsmethoden .....</b>	<b>7</b>
2.2.1	Analyse der Lipidkonzentration im Plasma.....	7
2.2.2	Analyse der Glucose-Konzentration im Plasma .....	7
2.2.3	Analyse weiterer klinisch-chemischer Parameter .....	8
2.2.4	Histologie und Immunhistochemie der Gefäßpräparate .....	9
2.2.4.1	Herstellung von Paraffinpräparaten .....	9
2.2.4.2	Histologische Färbungen.....	9
2.2.4.3	Immunhistochemische Färbungen.....	10
2.2.5	Auswertung der Gefäßpräparate .....	12
2.2.5.1	Verwendete Geräte.....	12
2.2.5.2	Messung der intimalen Plaquefläche.....	13
2.2.5.3	Beurteilung des Endothels (von Willebrand-Faktor) .....	13
2.2.5.4	Bestimmung der Zelldichte und der Proliferationsrate .....	13
2.2.5.5	Bestimmung des Anteils von Makrophagen an der Plaque.....	14
<b>2.3</b>	<b>Durchführung der oralen Methionin-Belastungstests .....</b>	<b>14</b>
<b>2.4</b>	<b>Zusammenfassung der im Versuch gemessenen Parameter.....</b>	<b>15</b>
<b>2.5</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>16</b>

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Futtermaufnahme und Körpergewicht</b> .....	<b>18</b>
3.1.1	Futtermaufnahme.....	18
3.1.2	Cholesterinaufnahme.....	19
3.1.3	Methioninaufnahme .....	19
3.1.4	Körpergewicht.....	20
<b>3.2</b>	<b>Organgewichte</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3</b>	<b>Lipide im Plasma</b> .....	<b>23</b>
3.3.1	Cholesterin .....	23
3.3.2	Lipoproteinfraktionen.....	24
3.3.3	Triglyceride .....	26
3.3.4	Nicht-veresterte Fettsäuren (NEFA) .....	27
<b>3.4</b>	<b>Homocystein-Konzentration im Plasma</b> .....	<b>28</b>
<b>3.5</b>	<b>Vitaminkonzentration im Plasma</b> .....	<b>29</b>
3.5.1	Vitamin E .....	29
3.5.2	Vitamin B <sub>6</sub> .....	30
<b>3.6</b>	<b>Blutglucose</b> .....	<b>31</b>
3.6.1	Glucose-Konzentration im Plasma .....	31
3.6.2	Glucose-Konzentration im Vollblut .....	32
3.6.3	Vergleich der Bestimmungsmethoden .....	33
<b>3.7</b>	<b>Klinisch-chemische Parameter</b> .....	<b>34</b>
3.7.1	Transaminasen und $\gamma$ -GT .....	34
3.7.2	Kleines Blutbild.....	34
3.7.3	Elektrolyte .....	39
3.7.4	Gerinnungsparameter .....	40
3.7.5	Enzymaktivitäten.....	41
3.7.6	Nierenfunktionsparameter Harnstoff und Kreatinin.....	42
3.7.7	Gesamteiweiß und Albumin .....	42
<b>3.8</b>	<b>Größe und zelluläre Zusammensetzung der intimalen Plaques im Aortenbogen</b> .....	<b>43</b>
3.8.1	Plaquerfläche .....	43
3.8.2	Fläche des Gefäßquerschnitts.....	44
3.8.3	Lumenfläche.....	44

3.8.4	Zelluläre Zusammensetzung der Plaque.....	44
3.8.4.1	Endothelzellen .....	44
3.8.4.2	Zelldichte und Proliferationsrate .....	45
3.8.4.3	Makrophagen .....	45
3.8.5	Plauefläche in den einzelnen Segmenten des Gefäßbaums .....	45
3.8.6	Fläche des Gefäßquerschnitts in den einzelnen Segmenten des Gefäßbaums.....	46
<b>3.9</b>	<b>Methionin-Belastungstests.....</b>	<b>47</b>
3.9.1	Methionin-Konzentration im Plasma .....	47
3.9.2	Homocystein-Konzentration im Plasma.....	49
3.9.3	Cystathionin-Konzentration im Plasma.....	52
3.9.4	Sonstige Aminosäuren im Plasma .....	54
<b>3.10</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>55</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Literaturübersicht.....</b>	<b>61</b>
4.1.1	Pathogenese der Atherosklerose.....	61
4.1.2	Homocystein.....	63
4.1.2.1	Homocystein-Metabolismus .....	63
4.1.2.2	Ursachen einer Hyperhomocysteinämie .....	65
4.1.2.3	Bedeutung des Homocysteins als Risikofaktor der Atherosklerose .....	67
4.1.2.4	Diskutierte Wirkungsmechanismen des Homocysteins auf die Atherogenese .....	68
4.1.3	Methionin-Belastungstest.....	70
4.1.4	Wahl eines geeigneten Tiermodells .....	73
4.1.5	Experimentelle Studien am Weißen Neuseelandkaninchen .....	74
<b>4.2</b>	<b>Bewertung der eigenen Ergebnisse.....</b>	<b>76</b>
4.2.1	Auswirkung der verschiedenen Futterzusätze auf Plaquebildung und Lipidspiegel.....	76
4.2.2	Methionin-Belastungstests .....	79
4.2.3	Problematik der Studie und Schlussfolgerung .....	81
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>101</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abd	Aorta abdominalis
Ao.	Aorta
AoBo	Aortenbogen
AP	alkalische Phosphatase
AUC	Area under the curve
BrdU	5'-Bromo-2'-Desoxycytidin
CHOD-PAP	Cholesterinoxidase-para-Aminoantipyrin
Chol	Cholesterin
CK	Kreatinkinase
CSF	Colony-stimulating factor
d-cyt	2'-Desoxycytidin
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eq	Äquivalent
EvG-Färbung	Elastica-van-Gieson-Färbung
fem.	femoralis
FPIA	fluoreszierender Polarisationsimmunoassay
$\gamma$ -GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPO-PAP	Glycerinphosphat-oxidase-para-Aminophenazon
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Hb	Hämoglobin
HDL	High density lipoprotein
HE-Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
HPLC	High performance liquid chromatography
HPLC-ED	High performance liquid chromatography mit elektrochemischer Detektion
HPLC-FD	High performance liquid chromatography mit fluoreszierender Detektion
ICAM-1	Intracellular adhesion molecules



---

INR	International normalized ratio
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
LC-MS/MS	Liquid chromatography-Elektrospray Tandem-Massenspektrometrie
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Low density lipoprotein
li	links
MCH	Mean corpuscular hemoglobin (Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten)
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration (mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration)
MCV	Mean corpuscular volume (mittleres Erythrozytenvolumen)
Meth	Methionin
MLT	Methionine loading test (Methionin-Belastungstest)
NEFA	Non-esterified fatty acids
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	oxidiertes low density lipoprotein
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PTT	Partial thromboplastin time (partielle Thromboplastinzeit)
re	rechts
Thor	Aorta thoracalis
TPZ	Thromboplastinzeit
U	Unit
VCAM-1	Vascular celladhesion molecules
VLDL	Very low density lipoprotein
vWF	von Willebrand-Faktor



# 1 Einleitung und Fragestellung

Als Atherosklerose wird das Endergebnis der Bildung atheromatöser Plaques in bereits arteriosklerotisch veränderten Gefäßen bezeichnet [33,101,102,103]. Die Atherosklerose tritt klinisch als koronare Herzkrankheit (KHK), als Herzinsuffizienz, als Angina pectoris oder als periphere arterielle Verschlusskrankheit und Schlaganfall in Erscheinung [54].

In Deutschland sind nahezu 50 % aller Todesfälle durch Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems bedingt [112]. Libby et al. [64] gehen davon aus, dass die Atherosklerose bis zum Jahre 2020 die weltweit führende Todesursache sein wird.

Zu den Risikofaktoren der Atherosklerose zählen unbeeinflussbare Risiken wie die familiäre Disposition oder das Lebensalter [54,55]. Weitere, beeinflussbare Risikofaktoren sind z. B. Fettstoffwechselstörungen, Hypertonie, Diabetes mellitus oder auch Verhaltensweisen wie Rauchen und Bewegungsmangel. Bei Auftreten mehrerer Risikofaktoren multipliziert sich das Risiko [73].

Im Jahre 1986 stellte Ross [32,101] die sogenannte „Response-to-injury“-Hypothese auf. Demnach steht am Beginn der Atheroskleroseentstehung eine Verletzung des Gefäßendothels, gefolgt von einer Einwanderung von Monozyten und deren anschließenden Umwandlung in Schaumzellen. Dies führt letztendlich zur Bildung fibröser Plaques [7,21,42,43,93,99,101,113].

Schon 1969 vermutete McCully [76] anhand von Autopsiebefunden bei Patienten mit Homocystinurie einen Zusammenhang zwischen der Homocystein-Konzentration und atherosklerotischen Gefäßveränderungen. Im Jahre 1975 veröffentlichte er gemeinsam mit Wilson [80] seine „Homocystein-Theorie der Arteriosklerose“. Seitdem erschienen zahlreiche Arbeiten, die diese Theorie entweder stützen [59,78,80,85,116] oder widerlegen [26].

Homocystein entsteht im menschlichen Körper aus der essentiellen Aminosäure Methionin [75,95]. Zur weiteren Verstoffwechslung des Homocysteins werden

die Vitamine B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> und Folsäure benötigt. Daher kann ein Mangel an diesen Vitaminen zu einer Hyperhomocysteinämie führen [41,45]. Als weitere Ursachen einer Hyperhomocysteinämie kommen z. B. starker Kaffeekonsum, chronische Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus, ausgeprägte Psoriasis oder ein Defekt der Enzyme Cystathionin- $\beta$ -Synthase, Methionin-Synthetase oder Methylentetrahydrofolat-Reduktase [30,39,82,83,114] in Frage.

Über die Wirkmechanismen des Homocysteins auf die Atherogenese wird intensiv geforscht. Die Interaktion von Methionin und dessen Metaboliten mit dem NO des Endothels scheint eine wichtige Rolle zu spielen [3,16,48,49,50,63,66,126,136]. Außerdem führt eine moderate Hyperhomocysteinämie zu einer erhöhten Thrombozytenaggregation [29] und zu einer vermehrten Fibrinogensynthese [135], beides Faktoren der Atherogenese.

Um die Entstehung atherosklerotischer Plaques zu verfolgen, stellt das Kaninchen ein gutes Tiermodell dar. Mit Hilfe von cholesterinhaltigem Futter gelingt es, innerhalb von sechs bis zwölf Wochen die Bildung von atherosklerotischen Plaques zu induzieren, die denen des Menschen makroskopisch recht ähnlich sind [22,31,57,100].

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer artifiziell induzierten Hyperhomocysteinämie auf die Plaquebildung im Weißen Neuseelandkaninchen untersucht. Dazu wurden an definierten Abschnitten des Gefäßbaums die Plaquefläche, die Gesamtgefäßfläche und der Anteil der Plaque an dieser Gefäßfläche bestimmt. Außerdem wurde der Anteil von Makrophagen und Endothelzellen in den Plaques bestimmt.

An zwei Kaninchen wurden orale Methionin-Belastungstests durchgeführt, entweder mit unterschiedlichen Konzentrationen von Methionin allein oder in Kombination mit Vitaminen. Die Verläufe der Plasmakonzentration von Methionin, Homocystein und Cystathionin wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden hinweg beobachtet. Dadurch sollte der Einfluss der Methioninzufuhr auf die Höhe der resultierenden Konzentration an Homocystein, Methionin und

Cystathionin untersucht werden, um Aussagen über das Ausmaß der Hyperhomocysteinämie machen zu können.

Das Ziel der vorliegenden Studie war zu untersuchen, ob eine artifiziell induzierte Hyperhomocysteinämie direkt an der Atherogenese beteiligt ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiermodell

Als Versuchstiere dienten 24 männliche Weiße Neuseelandkaninchen (Charles River, Kissleg). Zu Beginn des Versuchs wogen die Tiere im Median 3560 g [25%-75%-Quartil: 3400-4040 g].

An zwei weiteren Tieren wurden Belastungstests mit verschiedenen Methionin-Dosierungen durchgeführt.

#### 2.1.1 Tierhaltung

Die Kaninchen wurden während der gesamten Versuchsdauer in Einzelkäfigen gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch künstliche Beleuchtung auf 12 Stunden eingestellt. Während einer Eingewöhnungsphase von ca. 4 Wochen wurden die Tiere mit einer Standarddiät der Firma Sniff, Soest, gefüttert. Sowohl Futter als auch Wasser standen den Kaninchen in dieser Eingewöhnungsphase wie auch während der gesamten Versuchsdauer in beliebiger Menge zur Verfügung. Die Tiere wurden wöchentlich gewogen. Die aufgenommene Futtermenge wurde ebenfalls wöchentlich durch Wiegen bestimmt.

#### 2.1.2 Gruppeneinteilung und Behandlungsschema

Die gesamte Versuchsdauer betrug 16 Wochen. Die Kaninchen wurden randomisiert in 3 Gruppen zu je 8 Tieren eingeteilt.

Die Tiere der Gruppe 1 (**Kontrolle**) dienten als Kontrollgruppe, die weiterhin die Standarddiät erhielt. Die Tiere der Gruppe 2, als **Chol** bezeichnet, erhielten eine Diät mit 0,5 % Cholesterin im Futter. Die Diät der Tiere der Gruppe 3 (**Chol+Meth**) enthielt 0,5 % Cholesterin und 1 % L-Methionin.

Ein Tier der Gruppe 3 verstarb nach 4 Wochen infolge eines Narkosevorfalls und wurde von der Auswertung ausgeschlossen. Gruppe 3 besteht daher nur

aus 7 Tieren. Die beiden Tiere der Belastungstests sind bei dieser Gruppeneinteilung nicht berücksichtigt.

### **2.1.3 Blutentnahme**

Die Blutentnahmen erfolgten bei den Kaninchen jeweils bei Versuchsbeginn, nach 4, 8, 12 und 16 Wochen, jeweils nach 12-stündiger Nahrungskarenz.

Die Blutentnahme erfolgte unter Narkose aus einer Ohrarterie. In diesen Plasmaproben wurden die Homocystein-Konzentration, die Lipide, die Konzentration der Vitamine E und B<sub>6</sub> und verschiedene klinisch-chemische Parameter bestimmt.

Das verabreichte Narkosegemisch, das den Tieren in die Glutealmuskulatur injiziert wurde, bestand aus Ketaminhydrochlorid (Ketanest<sup>®</sup> 50, Parke-Davis, Berlin), Xylazin-Hydrochlorid (Rompun<sup>®</sup> 2 %, Bayer-AG, Leverkusen) und Atropinsulfat (Braun, Melsungen). Initial wurden 2 ml verabreicht (1 ml entspricht 34 mg Ketaminbase und 0,59 mg Xylazin). Bei Bedarf wurde individuell nachgespritzt.

Die Blutentnahmen während der Belastungstests erfolgten am wachen Tier.

### **2.1.4 Versuchsende und Gefäßentnahme**

Achtzehn Stunden vor Versuchsende wurden die Kaninchen mit dem o. g. Narkosegemisch betäubt. Im Nacken wurden 2 subkutane Taschen von ca. 1,5 cm Länge stumpf präpariert.

In diese Taschen wurden 100 mg/kg Körpergewicht (KG) 5'-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) und 75 mg/kg KG 2'-Desoxycytidin (d-cyt) eingebracht (beide von Sigma, St. Louis, USA). Anschließend wurden 30 mg BrdU/kg KG und 25 mg d-cyt/kg KG in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und den Tieren in die Glutealmuskulatur injiziert. Zwölf Stunden vor Versuchsende erfolgte dann eine weitere Injektion.

BrdU ist ein Thymidinanalogon, das während der Synthesephase des Zellzyklus in die DNA eingebaut wird und im histologischen Präparat mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (s. Kapitel 2.2.4.3) nachweisbar ist. BrdU-positive Zellkerne erscheinen rot gefärbt.

Bei Versuchsende wurden den Tieren 5 ml des Narkosegemischs verabreicht, anschließend wurden die Tiere am Bauch rasiert. Es erfolgte eine Blutentnahme am Ohr. Die Tiere wurden durch Punktion des Herzens entblutet, danach wurde eine Überdosis des Narkosemittels injiziert. Der Tod trat rasch durch Kreislaufversagen ein.

Am Hals wurde ein medianer Schnitt gesetzt und die rechte und linke A. carotis communis freipräpariert und entnommen. Die Gefäße wurden jeweils in zwei etwa 0,6 cm lange Abschnitte unterteilt. Der proximale Abschnitt wurde als A. carotis I bezeichnet, der distale Abschnitt als A. carotis II.

Thorax und Abdomen wurden eröffnet. Der Aortenbogen wurde dargestellt und mit der Aorta bis zu deren Durchtritt durch das Zwerchfell entnommen. Der Aortenbogen wurde in drei etwa gleich große Abschnitte geteilt. Der proximale Abschnitt wurde als AoBo I bezeichnet, der sich anschließende Abschnitt als AoBo II und der an die Aorta thoracalis grenzende Teil als AoBo III.

Der proximale Teil der Aorta thoracalis wurde in vier Abschnitte unterteilt und mit Thor I bis Thor IV bezeichnet. Vom nächsten Abschnitt (Thor V) wurde ein Kryostatpräparat hergestellt, das in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht verwendet wurde. Die distale Hälfte der Aorta thoracalis wurde ebenfalls in vier Abschnitte untergliedert und mit Thor VI bis Thor IX bezeichnet.

Die Aorta abdominalis wurde in vier Abschnitte unterteilt. Vom proximalen Abschnitt wurde für andere Arbeiten ein Gefrierpräparat angefertigt, die sich anschließenden Abschnitte wurden mit Abd II bis Abd IV bezeichnet.

Die beiden Iliakalgefäße wurden mitsamt den sich anschließenden Aa. femorales entnommen und mit A. fem. I bis A. fem. III bezeichnet.



Neben den Gefäßen wurden außerdem Herz, Leber, Lunge, Milz und die Nieren entnommen und gewogen.

Mit Ausnahme der Kryostatpräparate wurden alle Gefäß- und Organsegmente sofort nach der Entnahme für max. 24 h in einer gepufferten 4%igen Paraformaldehydlösung (pH 7,4) fixiert.

## 2.2 Untersuchungsmethoden

### 2.2.1 Analyse der Lipidkonzentration im Plasma

Die Cholesterinkonzentration im EDTA-Plasma wurde mit der CHOD-PAP- (Cholesterinoxidase-para-Aminoantipyrin-) Methode (Monotest<sup>®</sup> Cholesterin, Boehringer, Mannheim) bestimmt.

Die Triglycerid-Konzentration wurde mit der GPO-PAP-(Glycerinphosphat-oxidase-para-Aminophenazon-) Methode mit dem enzymatischen Farb-Test Peridochrom<sup>®</sup> (Boehringer, Mannheim) bestimmt.

Die Gesamtcholesterinbelastung während des 16-wöchigen Versuchs wurde anhand der Werte der einzelnen Cholesterinmessungen als „Area under the curve“ aus insgesamt 5 Messzeitpunkten ermittelt (C = Cholesterinkonzentration, t = Zeitpunkt):

$$\left[ \text{AUC} = \sum_{i=0}^n \frac{(C_i + C_{i+1})}{2} \times (t_{i+1} - t_i) \right]$$

### 2.2.2 Analyse der Glucose-Konzentration im Plasma

Bei den Blutentnahmen wurde der Blut-Glucosespiegel zusätzlich zu der Messung im Zentrallabor der Universität Tübingen (s. u.) mit dem Handmess-

gerät Glucometer Elite 2000, Bayer Vital GmbH & Co. KG, Leverkusen, im Vollblut bestimmt (Schnelltest).

Um eine Aussage über die Messgenauigkeit des Handmessgeräts zu treffen, wurden diese beiden Bestimmungsmethoden miteinander verglichen.

Als Vorgabe wurde ein Konfidenzintervall definiert, das alle Werte des Handmessgeräts beinhaltet, die zwei Standardabweichungen über- oder unterhalb des im Labor gemessenen Wertes liegen. Eine Standardabweichung entsprach dabei 15,6 mg Glucose/dl Plasma und wurde anhand der Daten mit Hilfe eines Scatterplots ermittelt.

Für die hier bestimmten Glucosewerte bedeutet dies, dass die von Hand gemessenen Werte für 95,5 % der gemessenen Werte um nicht mehr als maximal  $\pm 31,1$  mg Glucose/dl Plasma (entsprechend zwei Standardabweichungen) vom Laborwert abweichen, für 68,3 % lag die Abweichung bei maximal  $\pm 15,6$  mg Glucose/dl Plasma (entsprechend einer Standardabweichung).

### **2.2.3 Analyse weiterer klinisch-chemischer Parameter**

Die Analyse der sonstigen im Blut bestimmten Parameter erfolgte mit den üblichen Routine-Analyse-Verfahren im klinisch-chemischen Zentrallabor, Abteilung IV, der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen. Die Homocystein-Konzentration wurde mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) bestimmt.

Die Aminosäurekonzentrationen in den gewonnenen Proben der Belastungstests wurden von Herrn Dr. Bellstedt, Kinderklinik der Universität Jena, und von Herrn Prof. Dr. Till, Institut für Pathobiochemie, Erfurt, Jena, bestimmt.

## 2.2.4 Histologie und Immunhistochemie der Gefäßpräparate

### 2.2.4.1 Herstellung von Paraffinpräparaten

Nach Entnahme wurden die Gefäße für 24 Stunden in einer gepufferten 4%igen Paraformaldehydlösung (pH 7,4) fixiert. Anschließend wurde noch vorhandenes Bindegewebe entfernt und die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70-99 %) entwässert. Die Präparate wurden dann in Methylbenzoat<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt) und Rotihistol<sup>®</sup> (Roth, Karlsruhe) überführt. Daraufhin wurden sie in Paraffin (Paraplast<sup>®</sup>, Sherwood, St. Louis, USA) eingebettet und mit einem Mikrotom (Jung RM 2045, Leica, Bensheim) geschnitten. Die Schnittdicke betrug 4 µm. Alle histologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden an diesen Paraffinschnitten durchgeführt.

### 2.2.4.2 Histologische Färbungen

Es wurden folgende histologische Färbungen durchgeführt: „Hämalaun-Eosin (HE)“ und „Elastica-van-Gieson (EvG)“.

Für die HE- und die EvG-Färbung wurden die Präparate durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe (100-70 %) entparaffiniert.

**HE-Färbung:** Die HE-Färbung ist eine Übersichtsfärbung und wurde zur Beurteilung der morphologischen Veränderungen verwendet. Zellkerne erscheinen hier blau, das Zytoplasma und die Interzellulärsubstanz rosa. Nach dem Entparaffinieren wurden die Präparate zur Kernfärbung für 5 min in Mayers Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt) belassen. Anschließend wurden sie 10 min unter fließendem Wasser gebläut und 5 min in Eosin (Sigma, Deisenhofen) gegengefärbt. Zum Schluss wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, einige Minuten in Xylol belassen und in Eukitt (Langenbrinck, Emmendingen) eingebettet.

**EvG-Färbung:** In der EvG-Färbung stellen sich elastische Fasern dunkelviolett bis schwarz dar, Bindegewebe leuchtend rot und Muskulatur gelb. Die EvG-Präparate dienten zur Bestimmung der Plaquefläche sowie der Gesamtfläche

der Gefäßsegmente. Die entparaffinierten Gefäßschnitte wurden 30 min mit Resorcinfuchsin (Chroma Gesellschaft, Köngen) gefärbt und anschließend mit 80%igem Alkohol und H<sub>2</sub>O gespült. Die weitere Färbung erfolgte für 6 min mit Eisenhämatoxylin nach Weigert (Chroma Gesellschaft, Köngen). Danach wurden die Präparate nach Differenzierung in HCl-Alkohol 10 min lang unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach einer weiteren Spülung mit Wasser wurden die Präparate für etwa 2 min in van-Gieson-Lösung (Chroma Gesellschaft, Köngen) belassen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die gefärbten Präparate wurden kurz in Xylol getaucht und in Vitro Clud<sup>®</sup> (Langenbrinck, Emmendingen) eingebettet.

### 2.2.4.3 Immunhistochemische Färbungen

Durch immunhistochemische Färbungen können mit speziellen Antikörpern spezifische Zellarten und Plaquebestandteile differenziert werden. In dieser Studie wurden das Endothel, Makrophagen und proliferierende Zellen (BrdU-Färbung) dargestellt.

Zuerst wurden die Präparate in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100-70 %) entparaffiniert und in Aqua bidest. gespült. Anschließend wurden sie in Citratpuffer in der Mikrowelle bei 750 Watt erhitzt und dann mit Eiswasser gekühlt. Die endogene Peroxidase wurde mit PBS-Puffer<sup>a</sup>, der mit 30%igem Hydrogenperoxid versetzt war, blockiert. In dieser Lösung blieben die Präparate für 30 min. Nach jedem dieser Schritte wurden die Präparate für 10 min mit PBS-Puffer pH 7,4 gespült.

Nun wurden die Präparate für 10 min bei 37 °C mit Normal Horse Serum (Vectastain ABC-Kit, Mouse IgG, PK-4002, Camon Laborservice GmbH, Wiesbaden) inkubiert, um unspezifische Bindungen im Gewebe zu blockieren. Nach der Inkubation mit dem jeweils spezifischen Primärantikörper wurde ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper hinzugegeben, der sich an den

---

<sup>a</sup> 1 Liter PBS-Puffer = 8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,44 g NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> + 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 l Aqua bidest.

Primärantikörper anlagert. Anschließend wurden der ABC- (Vectastain ABC-Kit, Peroxidase Goat IgG, Pk-4005; Camon Laborservice GmbH, Wiesbaden) und der AEC-Komplex (Vector Peroxidase Substrat Kit AEC, SK 4200; Camon Laborservice GmbH, Wiesbaden) aufgetragen. Zwischen diesen Schritten wurden die Präparate wieder mit PBS-Puffer pH 7,4 gespült. Um die Oberflächenspannung des PBS-Puffers zu vermindern, wurde er mit dem Detergens Tween 20 (Merck, Schuchardt) versetzt.

Während des Färbevorgangs wurde die Farbtintensität mehrmals unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Bei Erreichen der gewünschten Farbtintensität wurde der Färbevorgang durch zweimaliges Spülen mit PBS-Puffer abgebrochen. Die Gegenfärbung wurde durch kurzes Eintauchen in Mayers Hämalaun durchgeführt. Abschließend wurden die Gefäßabschnitte in Gelatine (Aquatex, Merck 8562) eingebettet.

Die oben beschriebene Prozedur wurde bei allen immunhistochemischen Verfahren angewandt, Besonderheiten werden im Folgenden behandelt.

**Von Willebrand-Faktor:** Mit dieser Färbung stellt sich der vom Endothel gebildete von Willebrand-Faktor (vWF) rotbraun dar. Im Gegensatz zum oben beschriebenen Verfahren wurden die Gefäßschnitte 30-60 min bei 60 °C im Brutschrank thermisch entparaffiniert und in der Mikrowelle nicht in Citratpuffer erhitzt, sondern in „Enhancer-Lösung“ (Histosafe-Enhancer, Linaris, Wertheim-Bettingen). Diese „Enhancer-Lösung“ soll Quervernetzungen aufbrechen, die bei der Formalin-Fixierung entstehen und zu markierende Epitope maskieren könnten. Die Epitope werden durch diese Lösung den Antikörpern wieder zugänglich. Als Primärantikörper wurde der Anti-Human Factor VIII related Antigen Serum (Goat), Verdünnung 1:100 (INCSTAR Corp., Stillwater, Minnesota, USA) verwendet. Der Zweitantikörper war biotinyliert; Vectastain ABC-Kit, Peroxidase Goat IgG, Pk-4005, Verdünnung 1:200 (Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim).

**BrdU-Färbung:** Mit dieser Färbung werden proliferierende Zellen leuchtend rot angefärbt. Der hier verwendete primäre Antikörper (Mouse-Anti-BrdU-

Antikörper, Bio Cell Consulting, Grelling, Schweiz) ist spezifisch gegen BrdU gerichtet. Der zweite biotinylierte Antikörper war „Horse-Anti-Mouse“ (Vectastain, Camon GmbH, Wiesbaden).

**RAM-11-Färbung:** Der Primärantikörper RAM 11 ist gegen ein zytoplasmatisches Antigen von Kaninchen-Makrophagen gerichtet. Als Sekundärantikörper wurde der biotinylierte monoklonale Anti-Mouse-Total-IgG-Biotinylated-Antibody (DIANOVA, Unitect Mouse Immunohistochemistry System, Hamburg) verwendet.

### 2.2.5 Auswertung der Gefäßpräparate

#### 2.2.5.1 Verwendete Geräte

Die morphometrische Auswertung wurde mit einem Mikroskop (Laborlux S., Leica, Bensheim), einer Maus mit einer Induktionsspule, einem Digitalisierungstableau (SummaSketch III, Summagraphics, München) und der Software „BIOQUANT INTRO: BQANALYSIS BQ-IAD Analysis Software“ und „BQANALYSIS BQ-IAD Measurement Software“ (Bilany Consultants GmbH, Düsseldorf) durchgeführt. Das Mikroskop war mit einem 1,25fach Objektiv (Plan 1,25/0,04; Zeiss, Oberkochen; Okular 10fach, Tubus 1,25fach) und einem 10fach Objektiv (EF 10/0,25; Leica, Bensheim; Okular 10fach, Tubus 1,25fach) bestückt. Für das 1,25fach Objektiv ergab sich so eine 24fache Vergrößerung, für das 10fach Objektiv eine 188fache Vergrößerung. Die Objektive wurden abhängig von der Präparatgröße verwendet. Alle Messungen wurden dreimal durchgeführt, aus den Werten wurde das arithmetische Mittel berechnet und für die weitere Datenanalyse verwendet.

Für digitale Fotografien wurden ein Mikroskop (Photomikroskop Axiophot, Zeiss, Oberkochen) und eine 3CCD-Farbkamera (MC-3225 P, Sony Corp., Japan) verwendet. Die Bilder wurden mit der Software Scion Image (© Scion Corp., Maryland, USA) im TIF-Format gespeichert und mit dem Programm Corel Photo-Paint™, Version 7.373, überarbeitet.

### **2.2.5.2 Messung der intimalen Plauefläche**

Die intimale Plauefläche (in mm<sup>2</sup>) wurde an EvG-gefärbten Präparaten bestimmt. Die Fläche, die in Richtung des Lumens von der Lamina elastica interna umschlossen wird, und die Lumenfläche wurden gemessen und voneinander subtrahiert; der so ermittelte Wert entspricht der Plauefläche. Für die Plauefläche der A. carotis wurde für jede Seite der Mittelwert der beiden Abschnitte ermittelt, für den Aortenbogen wurde der Mittelwert aus drei Abschnitten errechnet. Bei der Aorta thoracalis wurde jeweils aus vier Abschnitten der Mittelwert gebildet und als Aorta thoracalis proximal bzw. distal bezeichnet. Der Mittelwert für die Aorta abdominalis und die A. femoralis wurde aus jeweils drei Abschnitten errechnet. Bei der Bestimmung der Fläche der einzelnen Gefäße des Gefäßbaums wurde ebenso verfahren.

### **2.2.5.3 Beurteilung des Endothels (von Willebrand-Faktor)**

Die vWF-Färbung wurde an den Abschnitten AoBo I und AoBo II durchgeführt; aus den Ergebnissen dieser zwei Präparate wurde der Mittelwert gebildet. Zur Bestimmung des prozentualen Anteils des vWF-positiven Endothels an der Gesamtenothellänge wurde zuerst mit dem 1,25fach Objektiv die Gesamtlänge des Endothels gemessen. Mit dem 10fach Objektiv wurde dann die Länge der ungefärbten Endothelabschnitte ausgemessen, von der Gesamtlänge subtrahiert und dazu ins Verhältnis gesetzt.

### **2.2.5.4 Bestimmung der Zelldichte und der Proliferationsrate**

Die BrdU-gefärbten Präparate wurden an vier diametral gelegenen Stellen unter einem 10fach Objektiv (Plan-Neofluar 10/0,30; Zeiss, Oberkochen; Okular E-PI 10x/20) digital fotografiert. Die Bilder wurden mit einem Farbdrucker (HP Color Laser Jet 4500, Hewlett Packard, USA) ausgedruckt (94fache Vergrößerung).

An den Photos wurden alle Zellkerne der Plaue unter der Lupe ausgezählt. Die Plauefläche (in mm<sup>2</sup>) wurde auf den vier Fotos morphometrisch bestimmt; die Werte der vier Fotos wurden addiert. Aus diesen Daten wurde die Zellzahl pro mm<sup>2</sup> und die Gesamtzellzahl pro Plaue errechnet.

Anschließend wurden die BrdU-positiven Zellen gezählt und zur Gesamtzellzahl der gleichen Schnitte ins Verhältnis gesetzt. Der Anteil der BrdU-positiven Zellen ergab die Proliferationsrate.

#### **2.2.5.5 Bestimmung des Anteils von Makrophagen an der Plaque**

Die mit dem Antikörper RAM 11 gefärbten Präparate wurden an vier diametral gelegenen Stellen unter dem 10fach Objektiv (Plan-Neofluar 10/0,30; Zeiss, Oberkochen; Okular E-PI 10x/20) digital fotografiert. Die Bildanteile, die nicht zur Plaque gehörten, wurden mit Hilfe einer Bildbearbeitungssoftware gelöscht. Die Auswertung erfolgte mit einer speziell dafür programmierten Software („Analyze It“, Till-Karsten Hauser), mit der alle vorhandenen Farbpixel eines Bildes sowie die rot markierten ausgezählt wurden. Die Anzahl der roten Pixel wurde zur Gesamtzahl der Pixel ins Verhältnis gesetzt, daraus ergab sich der prozentuale Anteil der Makrophagen an der Plaque.

### **2.3 Durchführung der oralen Methionin-Belastungstests**

An zwei Tieren erfolgten Belastungstests mit verschiedenen Methionin-Konzentrationen. Diese zwei Tiere waren keiner der drei anderen Gruppen zugeordnet und erhielten während der gesamten Versuchsdauer die Normaldiät. Die Abstände zwischen den Belastungstests waren unterschiedlich lang und betrugen zwischen 5 Tagen und 4 Monaten.

L-Methionin wurde in NaCl gelöst und den nüchternen Tieren oral verabreicht. Den Tieren wurde vor Methioningabe und anschließend nach 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden aus einer Ohrvene oder -arterie Blut entnommen.



## 2.4 Zusammenfassung der im Versuch gemessenen Parameter

Die verschiedenen Parameter, die im vorliegenden Versuch bestimmt wurden, sind in **Tab. 1** zusammengefasst.

**Tab. 1:** Zusammenfassung der im vorliegenden Versuch gemessenen Parameter

<b>Futtermittelaufnahme und Körpergewicht</b>	Futtermittelaufnahme, Cholesterinaufnahme, Methioninaufnahme, Körpergewicht
<b>Organgewicht</b>	Herz, Lunge, Leber, Milz, Nieren
<b>Lipide im Plasma</b>	Cholesterin, HDL-, LDL-, VLDL-Cholesterin, Triglyceride, NEFA
<b>Homocystein</b>	Homocystein
<b>Transaminasen, <math>\gamma</math>-GT</b>	GOT, GPT, $\gamma$ -GT
<b>Kleines Blutbild</b>	Hämatokrit, Erythrozyten, Hämoglobin, MCV, MCHC, MCH, Leukozyten, Thrombozyten
<b>Elektrolyte</b>	Natrium, Kalium, Calcium
<b>Gerinnungsparameter</b>	INR, TPZ, PTT, Fibrinogen
<b>Enzymaktivitäten</b>	AP, LDH, CK, Amylase, Pankreas-Amylase, Lipase
<b>Nierenfunktion</b>	Harnstoff, Kreatinin
<b>Eiweiß</b>	Albumin, Gesamteiweiß
<b>Vitamine</b>	Vitamin E, Vitamin B <sub>6</sub>
<b>Glucose</b>	Glucose (mit zwei Methoden bestimmt)
<b>Histologische Parameter</b>	Aortenbogen: Plaquefläche, Gesamtfläche und Lumenfläche, Endothelzellen, Zelldichte, proliferierende Zellen, Makrophagen; Segmente des Gefäßbaums: Plaquefläche, Gefäßfläche
<b>Belastungstests</b>	Methionin, Homocystein, Cystathionin, Glycin, Alanin, Serin, Threonin, Valin, Leucin, Isoleucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glutamin, Arginin, Lysin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Prolin, Histidin, 1-Methyl-Histidin, 3-Methyl-Histidin, Ornithin, Citrullin, Taurin

## 2.5 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm JMP (Version 3.1, SAS, Heidelberg, Cary, NC, USA) durchgeführt. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  zugrunde gelegt.

Zielgrößen waren die Plaquefläche im Aortenbogen und in den verschiedenen Segmenten des Gefäßbaums, die zelluläre Zusammensetzung dieser Plaques, die Fläche der verschiedenen Segmente des Gefäßbaums und die Lumenfläche des Aortenbogens. Einflussgröße waren die Cholesterin- und Methioninaufnahme, bzw. die Cholesterin- und Methioninkonzentration im Plasma. Da die Daten eine hohe Streuung und zum Großteil eine rechtsschiefe Verteilung aufwiesen, wurde der Wilcoxon-Test angewendet. Es wird der Median mit 25%- und 75%-Quartil angegeben.

Weiterhin wurden die Futtermittelaufnahme pro Tag, die Körpergewichtszunahme im Versuchsverlauf und die Organgewichte relativ zum Körpergewicht mit dem Wilcoxon-Test auf Signifikanz untersucht, da auch hier die Voraussetzungen für eine ANOVA nicht erfüllt waren. Die Darstellung erfolgt ebenfalls als Median mit 25%- und 75%-Quartil.

Für die Labordaten wurde die ‚Area under the curve‘ (AUC) errechnet. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung und mit dem Bartlett-Test auf Homogenität überprüft. Bei Annahme der Nullhypothese wurden die Daten anschließend mit einer ANOVA auf Signifikanz untersucht. Waren die Voraussetzungen für eine ANOVA nicht gegeben, wurden die Daten logarithmiert; auf eine Rücktransformation der Daten wurde verzichtet. Als Anschlussstest wurde der Tukey-Kramer-Test verwendet. Die vollständigen Daten finden sich im Anhang dieser Arbeit. Es werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung angegeben.

**Besonderheiten bei der statistischen Auswertung:** Bei LDL- und VLDL-Cholesterin wurden nur die Gruppen 2 und 3 verglichen, da es ohne Cholesterinfütterung in der Kontrollgruppe zu keiner Lipiderhöhung kommt. Der

Unterschied von den Gruppen 2 und 3 zu Gruppe 1 ist daher sehr groß; eine statistische Analyse ist nicht sinnvoll.

Bei den Triglyceriden und den NEFA wurden die Gruppen einzeln miteinander verglichen.

Beim MCHC wurde ein Tier der Gruppe 2 von der Betrachtung ausgeschlossen, da der Messwert der Woche 8 so weit unter den Messwerten der anderen Tiere lag, dass von einem Messfehler ausgegangen werden musste.

Bei der Berechnung der AUC der Leukozyten-Konzentration wurde ein Tier der Gruppe 2 von der Betrachtung ausgeschlossen, da es ab Woche 4 eine konstant erhöhte Leukozytenzahl aufwies.

Bei der AUC der Lipase-Konzentration zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen 1-2 und 1-3; da allerdings keine Normalverteilung gegeben war, wurden nur logarithmierte Daten der Gruppe 2 und Gruppe 3 verglichen.

Versuchsbedingt konnten die Werte der Woche 4 für Vitamin B<sub>6</sub> nicht ausgewertet werden.

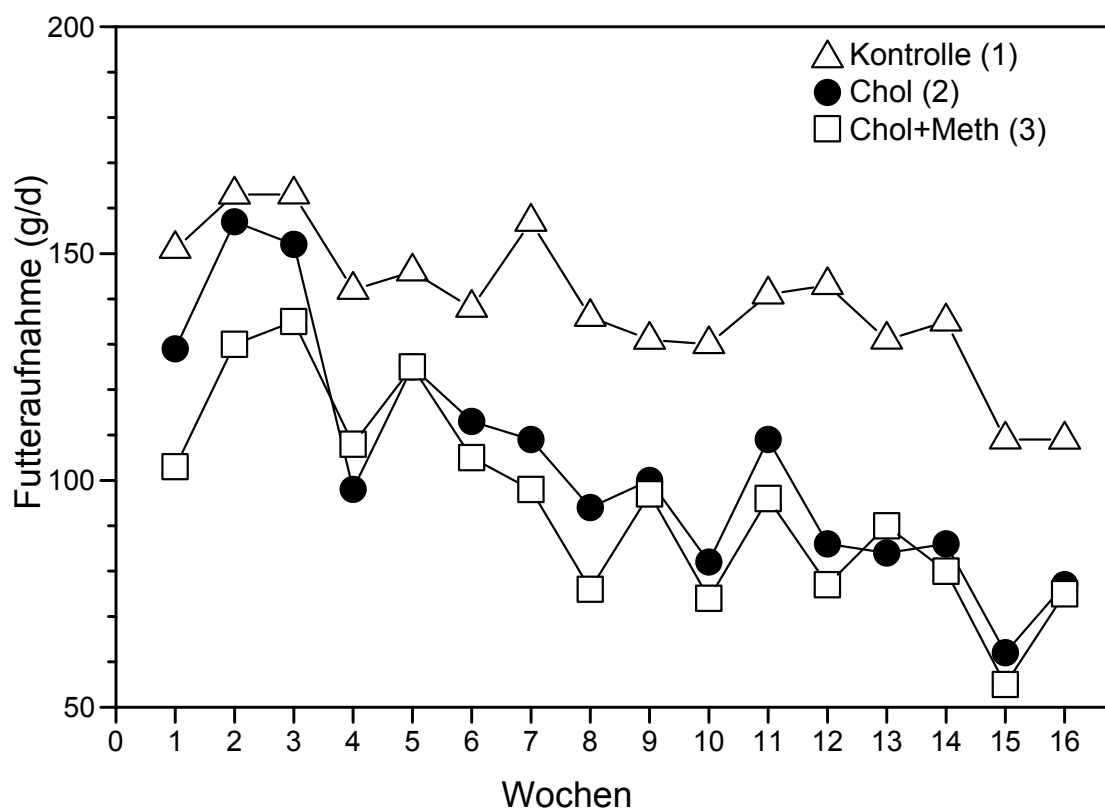
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Futteraufnahme und Körpergewicht

##### 3.1.1 Futteraufnahme

Die Futteraufnahme wurde durch wöchentliche Bestimmung der aufgenommenen Futtermenge ermittelt. Anhand dieser gemessenen Mengen wurde die Futteraufnahme pro Tag bestimmt (**Tab. A1**). Sie war in Gruppe 1 (138 g/d [122-154 g/d]) signifikant höher als in Gruppe 2 (98,5 g/d [91,1-110 g/d]) und Gruppe 3 (92,6 g/d [89,2-101 g/d]) ( $p < 0,0001$ ).

Außerdem ließ sich feststellen, dass die Tiere aller 3 Gruppen im Verlauf des Versuchs weniger Nahrung zu sich nahmen (**Abb. 1**). Dieser Effekt war bei den Tieren der Gruppe 2 und 3 am deutlichsten zu erkennen.

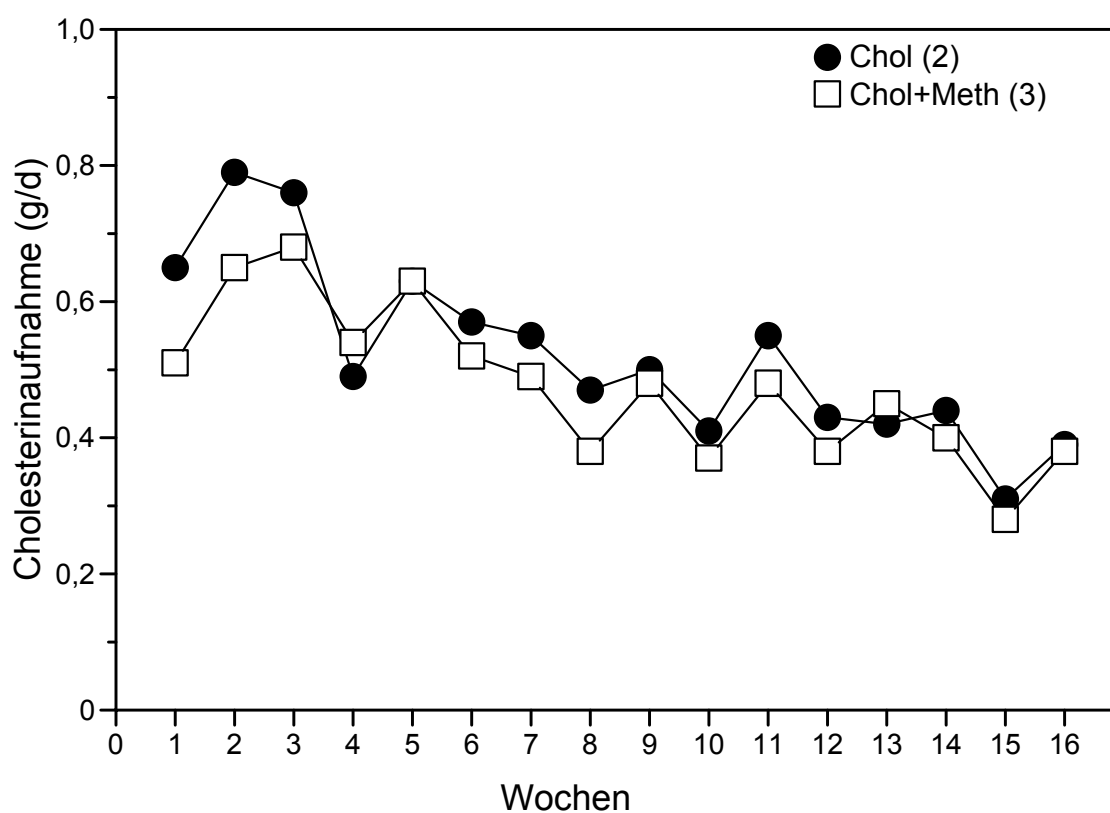


**Abb. 1:** Futteraufnahme pro Tag (Median) im Versuchsverlauf

### 3.1.2 Cholesterinaufnahme

Aus der täglich aufgenommenen Futtermenge wurde die täglich aufgenommene Cholesterinmenge errechnet (**Tab. A2**); dabei zeigte sich zwischen den beiden cholesteringefütterten Gruppen kein signifikanter Unterschied (**Abb. 2**).

Die Tiere der Gruppe 2 nahmen im Durchschnitt der gesamten Versuchsdauer 0,56 g [0,52 g-0,63 g] Cholesterin pro Tag auf, die Tiere der Gruppe 3 0,53 g/d [0,51-0,57 g/d].

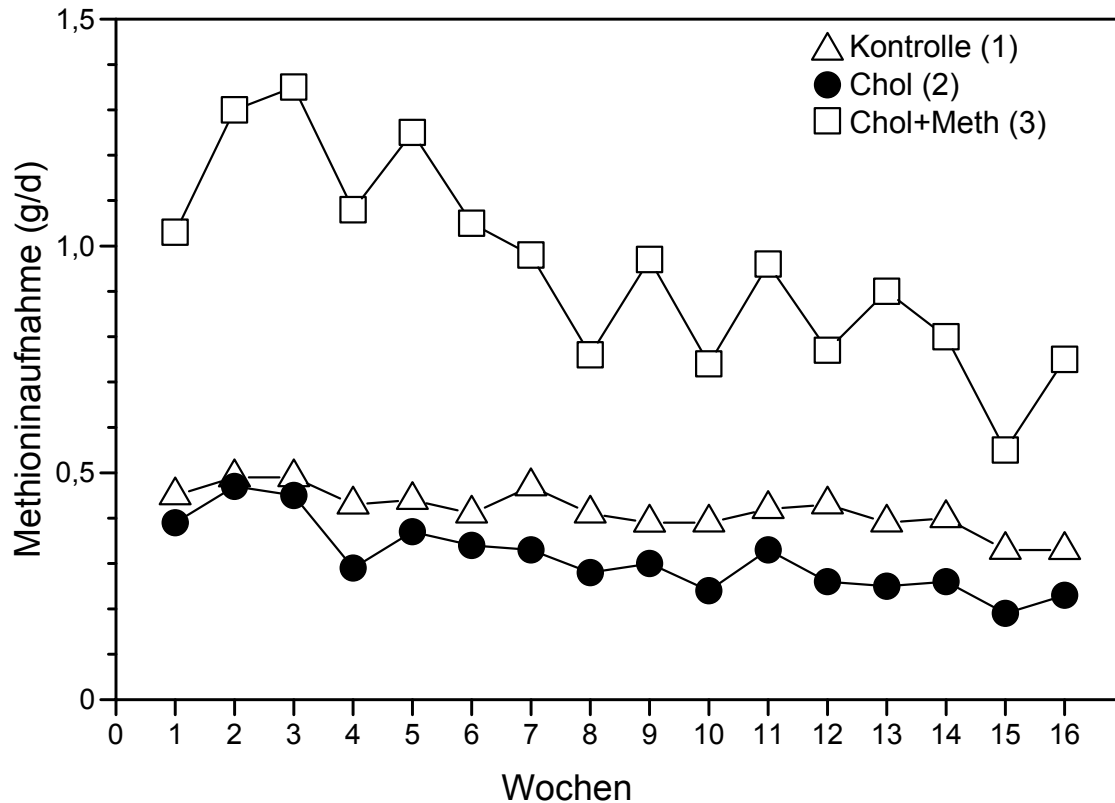


**Abb. 2:** Cholesterinaufnahme pro Tag (Median) im Versuchsverlauf

### 3.1.3 Methioninaufnahme

Zusätzlich zur täglich aufgenommenen Cholesterinmenge wurde die täglich aufgenommene Methioninmenge berechnet (**Tab. A3**). Auch diese nahm zum Versuchsverlauf hin ab (**Abb. 3**). Für die gesamte Versuchsdauer betrug sie in Gruppe 3 durchschnittlich 0,93 g/d [0,89-1,01 g/d], in Gruppe 1 0,42 g/d [0,36-

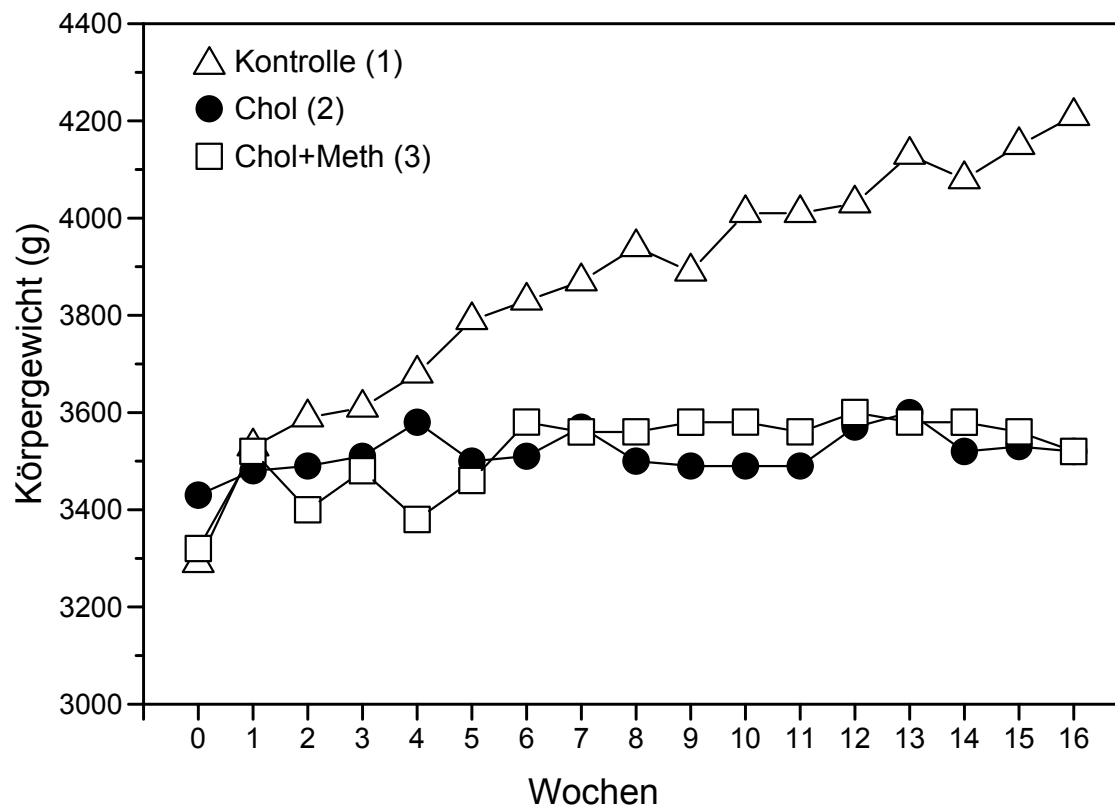
0,46 g/d] und in Gruppe 2 0,30 g/d [0,27-0,33 g/d]. Die drei Gruppen unterschieden sich signifikant voneinander ( $p < 0,0001$ ).



**Abb. 3:** Methioninaufnahme pro Tag (Median) im Versuchsverlauf

### 3.1.4 Körpergewicht

Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde wöchentlich bestimmt (**Tab. A4**). Zu Versuchsbeginn betrug es im Median 3320 g [3160-3520 g], am Versuchsende 3620 g [3430-4040 g]. Die Tiere der Gruppe 1 wogen bei Versuchsende im Median 4210 g [3880-4650 g], die Tiere der Gruppe 2 3520 g [3380-3880 g] und die der Gruppe 3 3520 g [3440-3560 g] (**Abb. 4**). Die Tiere der Gruppe 1 hatten am stärksten zugenommen, gefolgt von den Tieren der Gruppe 2 und Gruppe 3, die Gruppen 1-2 und 1-3 unterschieden sich signifikant voneinander ( $p < 0,0001$ ).



**Abb. 4:** Körpergewicht (Median) im Versuchsverlauf

### 3.2 Organgewichte

Bei Versuchsende wurden die Organgewichte sowohl absolut (in g) als auch relativ (in %) bezogen auf das Körpergewicht bestimmt (**Tab. 2**).

**Tab. 2:** Absolutes Organgewicht (in g) und relatives Organgewicht in Prozent des Körpergewichts (Median mit 25%- und 75%-Quartil)

		Gruppe 1 Kontrolle	Gruppe 2 Chol	Gruppe 3 Chol+Meth
Herz	(g)*	7,9 [6,0-8,8]	6,0 [5,4-7,0]	5,5 [5,0-6,0]
	(%)	0,18 [0,16-0,21]	0,18 [0,15-0,19]	0,15 [0,14-0,17]
Leber	(g)	86,5 [72,3-106] <sup>2,3</sup>	121 [100-140] <sup>1</sup>	122 [111-146] <sup>1</sup>
	(%)*	2,1 [1,9-2,3] <sup>2,3</sup>	3,2 [2,9-3,9] <sup>1</sup>	3,3 [3,1-4,2] <sup>1</sup>

Tab. 2: Fortsetzung

		<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
Lunge	(g)	10,3 [8,6-10,9]	9,8 [8,5-14,1]	10,5 [9,0-13,0]
	(%)*	0,25 [0,21-0,28]	0,28 [0,24-0,41]	0,31 [0,26-0,37]
Milz	(g)*	1,5 [1,5-1,8] <sup>2</sup>	3,3 [2,1-4,2] <sup>1</sup>	2,0 [2,0-2,5]
	(%)*	0,03 [0,03-0,05] <sup>2,3</sup>	0,09 [0,06-0,12] <sup>1</sup>	0,06 [0,05-0,08] <sup>1</sup>
Niere	(g)*	7,8 [6,8-9,6] <sup>3</sup>	7,9 [7,0-8,3]	6,5 [6,0-7,0] <sup>1</sup>
	(%)*	0,19 [0,17-0,21]	0,22 [0,20-0,24]	0,19 [0,17-0,20]

\* Statistik mit logarithmierten Daten

Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

Signifikante Unterschiede zeigten sich beim absoluten Lebergewicht zwischen den Gruppen 1-2 und 1-3 ( $p=0,0012$ ), ebenso beim relativen Lebergewicht ( $p<0,0001$ ). Das Lebergewicht war in den Gruppen 2 und 3 deutlich höher als bei den Tieren aus Gruppe 1.

Weitere signifikante Unterschiede fanden sich beim absoluten Gewicht der Niere, und zwar zwischen der Gruppe 1 und 3 ( $p=0,0260$ ). Bei der Milz fand sich beim absoluten Gewicht ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 1 und 2 ( $p=0,0002$ ), beim relativen Milzgewicht zwischen den Gruppen 1-2 und 1-3 ( $p<0,0001$ ). Die Milz der Tiere der Gruppe 2 war jeweils am größten, gefolgt von der Milz der Tiere in Gruppe 3. Das absolute Gewicht des Herzens war bei den Tieren der Gruppe 1 am höchsten. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen. Bei der Lunge ließ sich weder beim absoluten noch beim relativen Organgewicht ein Unterschied zwischen den Gruppen feststellen.

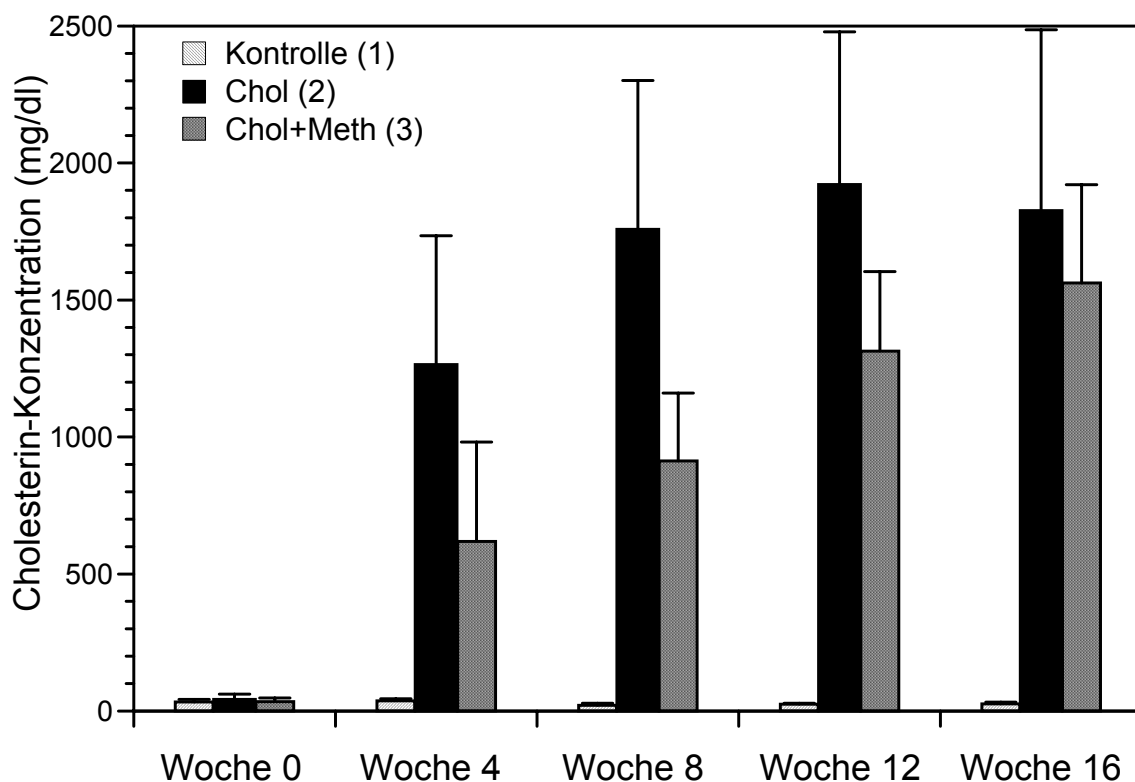


### 3.3 Lipide im Plasma

#### 3.3.1 Cholesterin

Zu Beginn des Versuchs betrug die Plasmacholesterin-Konzentration der Tiere in den 3 Gruppen zwischen  $32,9 \pm 9,5$  mg/dl und  $42,9 \pm 18,6$  mg/dl (**Tab. A5**).

Nach 4 Wochen war die Cholesterin-Konzentration in Gruppe 2 um das 28-fache, in Gruppe 3 um das 18fache angestiegen (**Abb. 5**).



**Abb. 5:** Cholesterin-Konzentration im Versuchsverlauf

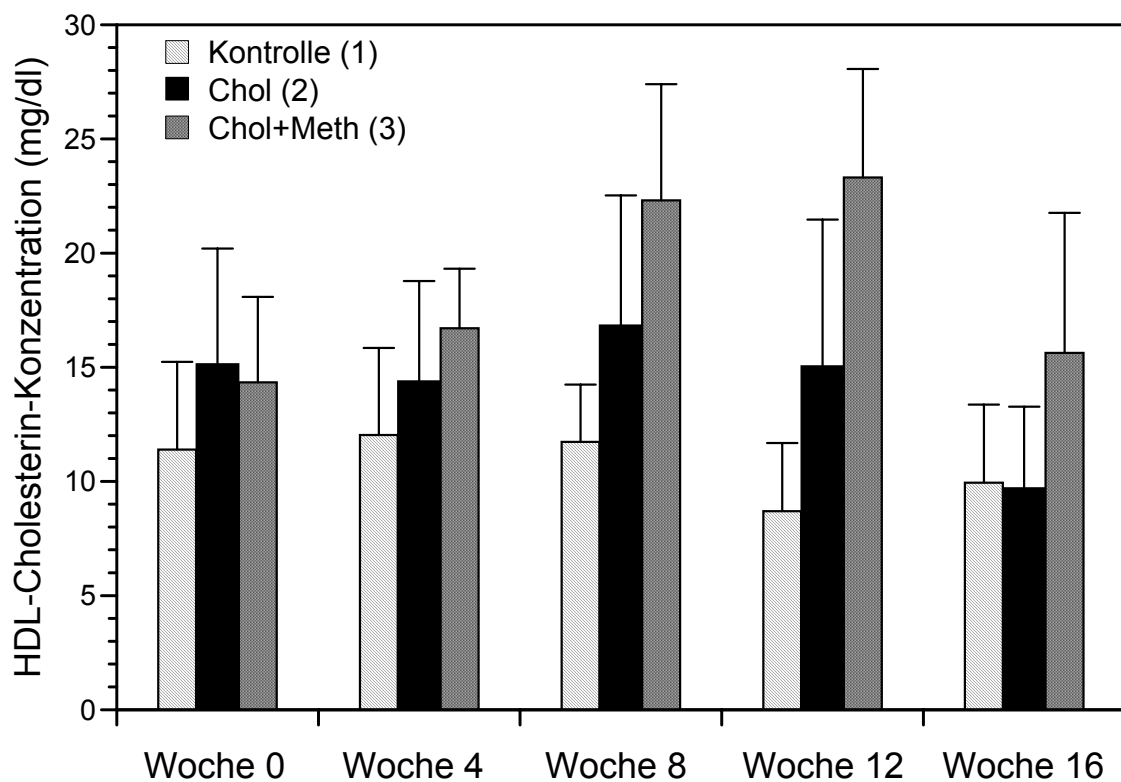
Beim Vergleich der AUC des Cholesterins zeigte sich zwischen Gruppe 2 und Gruppe 3 ein signifikanter Unterschied ( $p=0,0078$ ). Die AUC betrug bei Gruppe 2 etwa das 1,5fache der Konzentration von Gruppe 3. Bei der Kontrollgruppe betrug sie  $451 \pm 76,0$  mg/dl\*16 Wochen, bei Gruppe 2 war sie etwa 50mal höher ( $23515 \pm 6217$  mg/dl\*16 Wochen), bei Gruppe 3 etwa 30mal ( $14548 \pm 3891$  mg/dl\*16 Wochen).

### 3.3.2 Lipoproteinfraktionen

Während des Versuchsverlaufs wurden HDL-, LDL- und VLDL-Cholesterin bestimmt (**Tab. A6**).

**HDL-Cholesterin:** Signifikante Unterschiede in der AUC des HDL-Cholesterins fanden sich zwischen den Gruppen 1-2 und 1-3 ( $p=0,0003$ ). Während des gesamten Versuchsverlaufs war der HDL-Cholesterin-Spiegel in Gruppe 3 höher als in den beiden anderen Gruppen (**Abb. 6**). Die AUC des HDL-Cholesterins betrug in der Kontrollgruppe  $172 \pm 40,1$  mg/dl\*16 Wochen, in Gruppe 2  $234 \pm 63,9$  mg/dl\*16 Wochen und in Gruppe 3  $309 \pm 56,7$  mg/dl\*16 Wochen. In Gruppe 3 war sie damit um 32,1 % höher als in Gruppe 2.

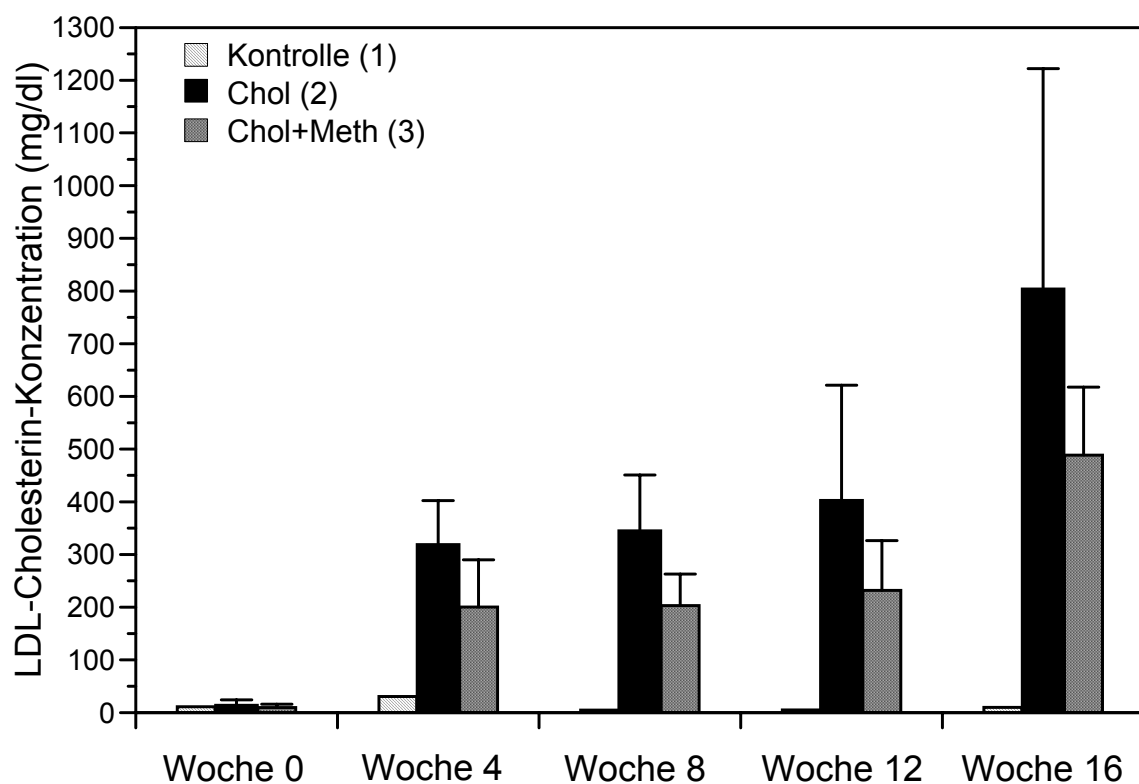
Der Anteil des HDL-Cholesterins am Gesamtcholesterin war in Gruppe 2 und 3 wesentlich geringer als in Gruppe 1. Die AUC des HDL-Cholesterins betrug 34 % des Gesamtcholesterins bei Gruppe 1, 1 % bei Gruppe 2 und 2 % bei Gruppe 3.



**Abb. 6:** HDL-Cholesterin-Konzentration im Versuchsverlauf

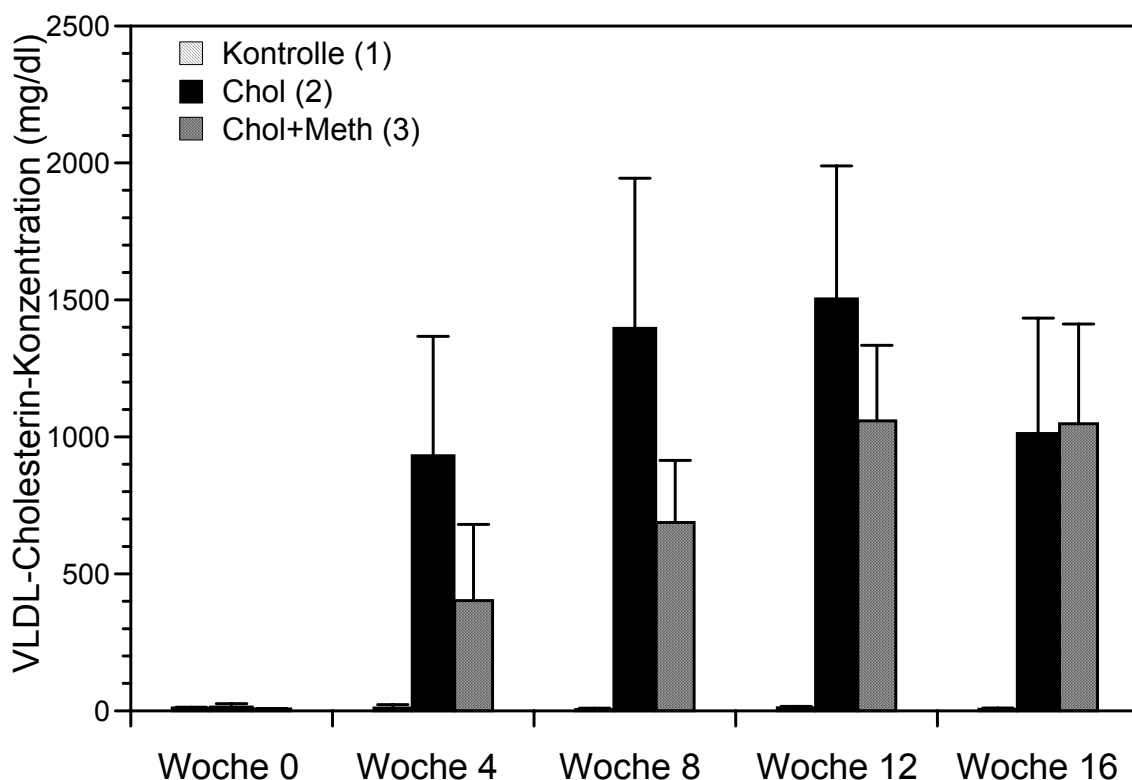
**LDL-Cholesterin:** Es fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen 2 und 3 ( $p=0,0018$ ); die LDL-Cholesterin-Konzentration in Gruppe 2 war um gut ein Drittel höher als in Gruppe 3 (**Abb. 7**). Die LDL-Cholesterin-Konzentration in Gruppe 1 ( $203 \pm 33,8 \text{ mg/dl} \cdot 16 \text{ Wochen}$ ) betrug nur ca. 510 % der Konzentration in Gruppe 2 ( $5899 \pm 1843 \text{ mg/dl} \cdot 16 \text{ Wochen}$ ) und Gruppe 3 ( $3536 \pm 448 \text{ mg/dl} \cdot 16 \text{ Wochen}$ ).

Die AUC des LDL-Cholesterins hatte bei Gruppe 1 zu 40 %, bei Gruppe 2 zu 25 % und bei Gruppe 3 zu 24 % Anteil am Gesamt-Cholesterin.



**Abb. 7:** LDL-Cholesterin-Konzentration im Versuchsverlauf

**VLDL-Cholesterin:** Die Gruppen 2 und 3 unterschieden sich signifikant ( $p=0,0207$ ), wobei die VLDL-Cholesterin-Konzentration in Gruppe 2 ( $17380 \pm 5827 \text{ mg/dl} \cdot 16 \text{ Wochen}$ ) nahezu doppelt so hoch war wie in Gruppe 3 ( $10702 \pm 3533 \text{ mg/dl} \cdot 16 \text{ Wochen}$ ). Bei Gruppe 1 ( $129 \pm 46,4 \text{ mg/dl} \cdot 16 \text{ Wochen}$ ) betrug sie nur 1-3 % des Wertes der Gruppen 2 und 3 (**Abb. 8**).



**Abb. 8:** VLDL-Cholesterin-Konzentration im Versuchsverlauf

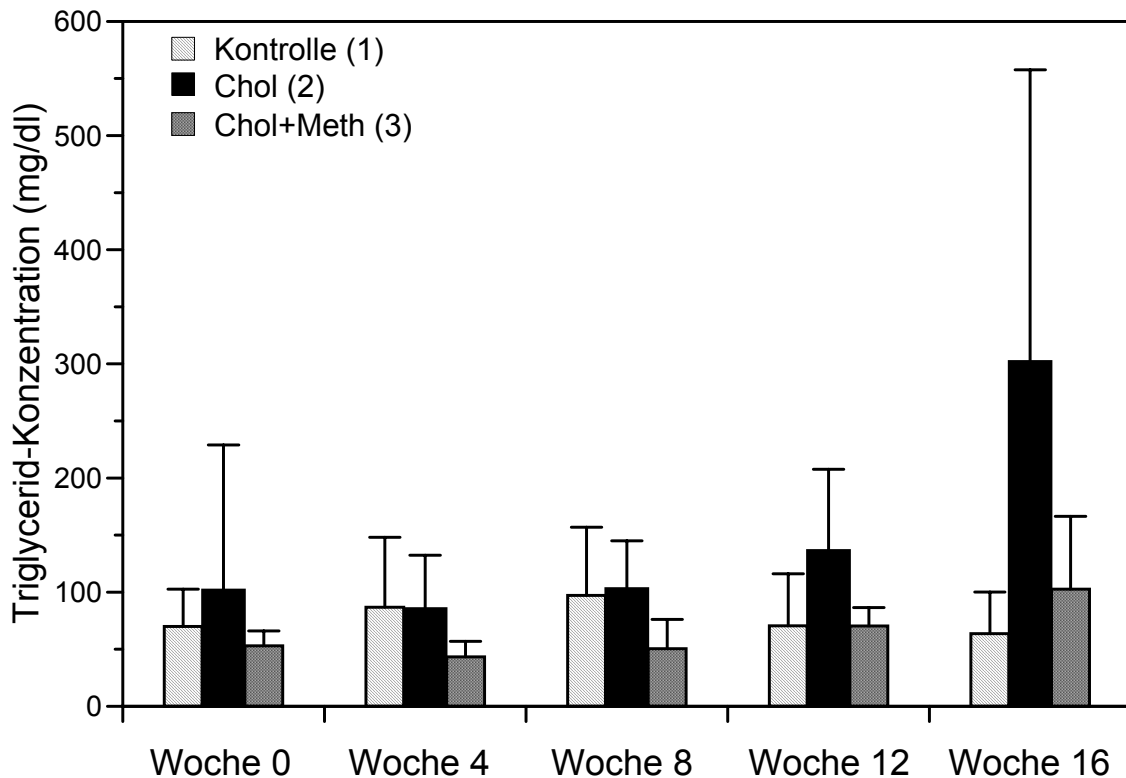
Die AUC des VLDL-Cholesterins betrug 26 % des Gesamt-Cholesterins bei Gruppe 1, 74 % bei Gruppe 2 und 74 % bei Gruppe 3.

### 3.3.3 Triglyceride

Bei Betrachtung der AUC der Triglyceride zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen 1-2 ( $p=0,0460$ ) und den Gruppen 2-3 ( $p=0,0078$ ) (**Tab. A7**); die Triglycerid-Konzentration der Gruppe 2 (AUC  $2108 \pm 942$  mg/dl\*16 Wochen) war dabei ca. doppelt so hoch wie die der Gruppe 1 (AUC  $1285 \pm 769$  mg/dl\*16 Wochen) und der Gruppe 3 (AUC  $968 \pm 205$  mg/dl\*16 Wochen).

Im Versuchsverlauf stieg die Konzentration der Triglyceride bei den Gruppen 2 und 3 an (**Abb. 9**). Bei Gruppe 3 war die Triglycerid-Konzentration am Ende des Versuchs doppelt so hoch wie zu Beginn des Versuchs ( $102 \pm 63,8$  mg/dl vs.

53,0 ± 13,0 mg/dl), bei Gruppe 2 dreimal so hoch (302 ± 255 mg/dl vs. 101 ± 127 mg/dl).

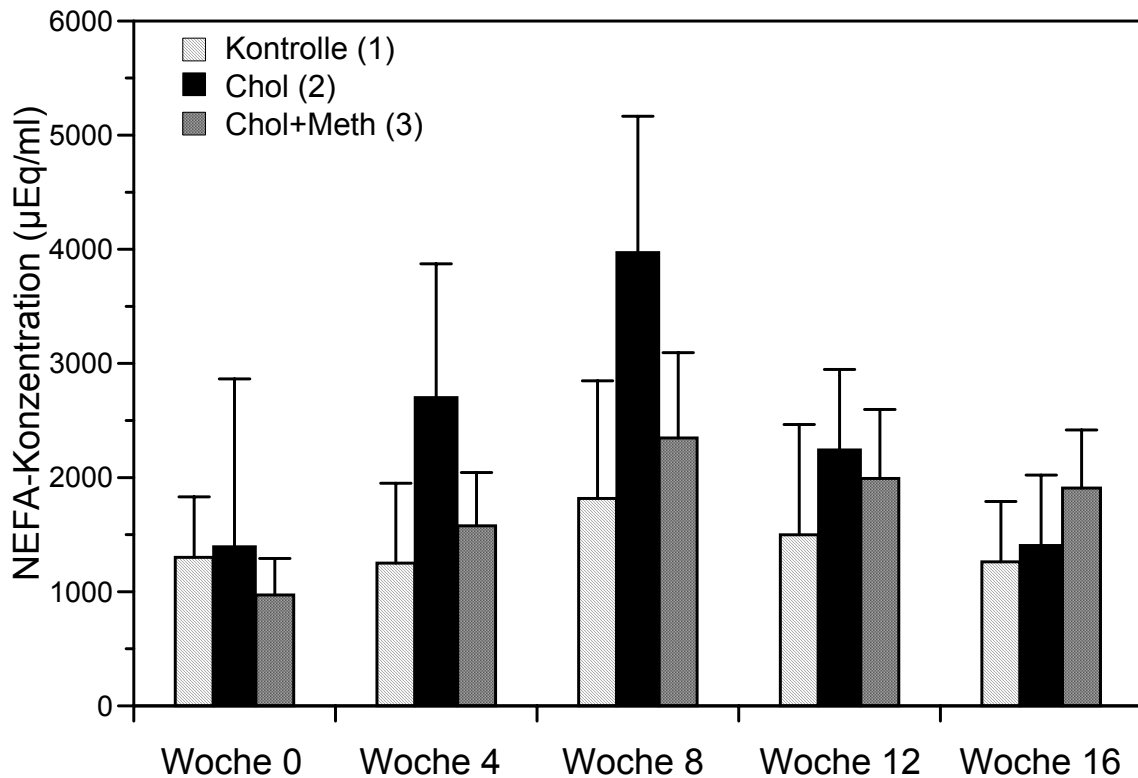


**Abb. 9:** Konzentration der Triglyceride im Versuchsverlauf

### 3.3.4 Nicht-veresterte Fettsäuren (NEFA)

Während des gesamten Versuchs wurde die Konzentration der nichtveresterten Fettsäuren bestimmt (NEFA, **Tab. A8**).

Dabei fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen 1-2 ( $p=0,0460$ ) und den Gruppen 2-3 ( $p=0,0279$ ). Bei Gruppe 2 und 3 zeigte sich zur Versuchsmitte hin ein Anstieg der NEFA, zum Versuchsende hin sanken diese wieder ab. Bei Gruppe 1 war ein solcher Trend nur bedingt erkennbar (**Abb. 10**).



**Abb. 10:** Konzentration der NEFA im Versuchsverlauf

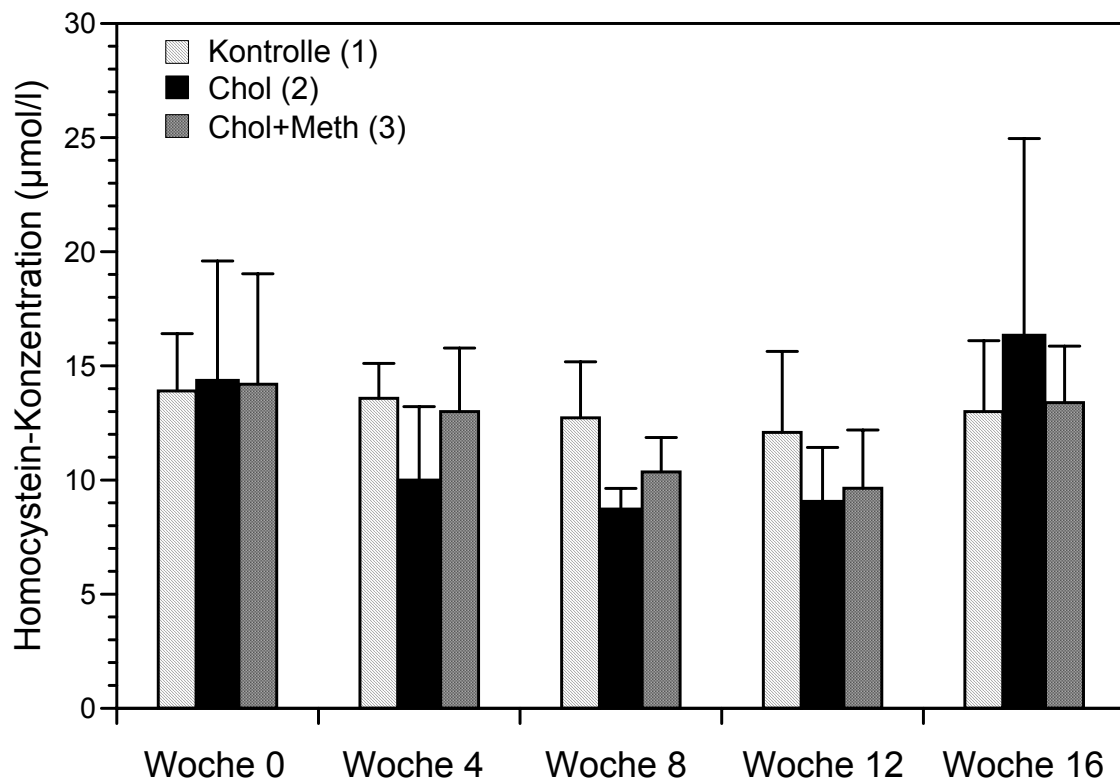
Die AUC der NEFA betrug am Versuchsende  $23396 \pm 11691 \mu\text{Eq/ml} \cdot 16$  Wochen bei Gruppe 1,  $41250 \pm 13304 \mu\text{Eq/ml} \cdot 16$  Wochen bei Gruppe 2 und  $29428 \pm 5190 \mu\text{Eq/ml} \cdot 16$  Wochen bei Gruppe 3.

### 3.4 Homocystein-Konzentration im Plasma

Die Bestimmung der Homocystein-Konzentration erfolgte jeweils nach einer ca. 12-stündigen Nüchternphase.

Bei der AUC des Homocysteins im Plasma zeigte sich zwischen den 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied (**Tab. A9**). Bei 3 der 5 Bestimmungzeitpunkte war die Homocystein-Konzentration im Plasma der Kontrollgruppe am höchsten (**Abb. 11**), ebenso bei der Betrachtung der AUC ( $207 \pm 27,7$

$\mu\text{mol/l} \cdot 16$  Wochen in Gruppe 1,  $172 \pm 39,7 \mu\text{mol/l} \cdot 16$  Wochen in Gruppe 2,  $187 \pm 29,6 \mu\text{mol/l} \cdot 16$  Wochen in Gruppe 3).

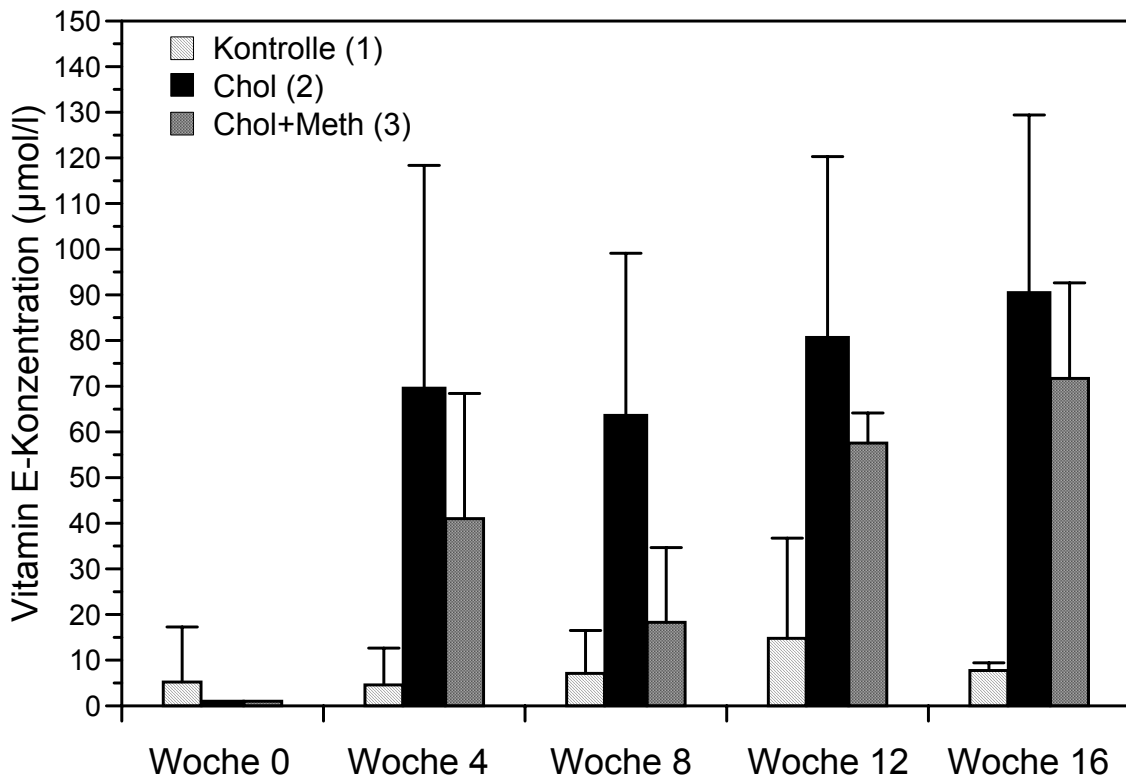


**Abb. 11:** Homocystein-Konzentration im Versuchsverlauf

### 3.5 Vitaminkonzentration im Plasma

#### 3.5.1 Vitamin E

Bei allen drei Gruppen stieg die Konzentration des Vitamin E zum Versuchsende hin an (**Abb. 12**). Signifikante Unterschiede fanden sich zwischen den Gruppen 1-2, 1-3 und 2-3 ( $p < 0,0001$ ), (**Tab. A10**). Die AUC der Gruppe 1 betrug  $128 \pm 55,3 \mu\text{mol/l} \cdot 16$  Wochen, die der Gruppe 2  $933 \pm 450 \mu\text{mol/l} \cdot 16$  Wochen und die der Gruppe 3  $516 \pm 144 \mu\text{mol/l} \cdot 16$  Wochen.

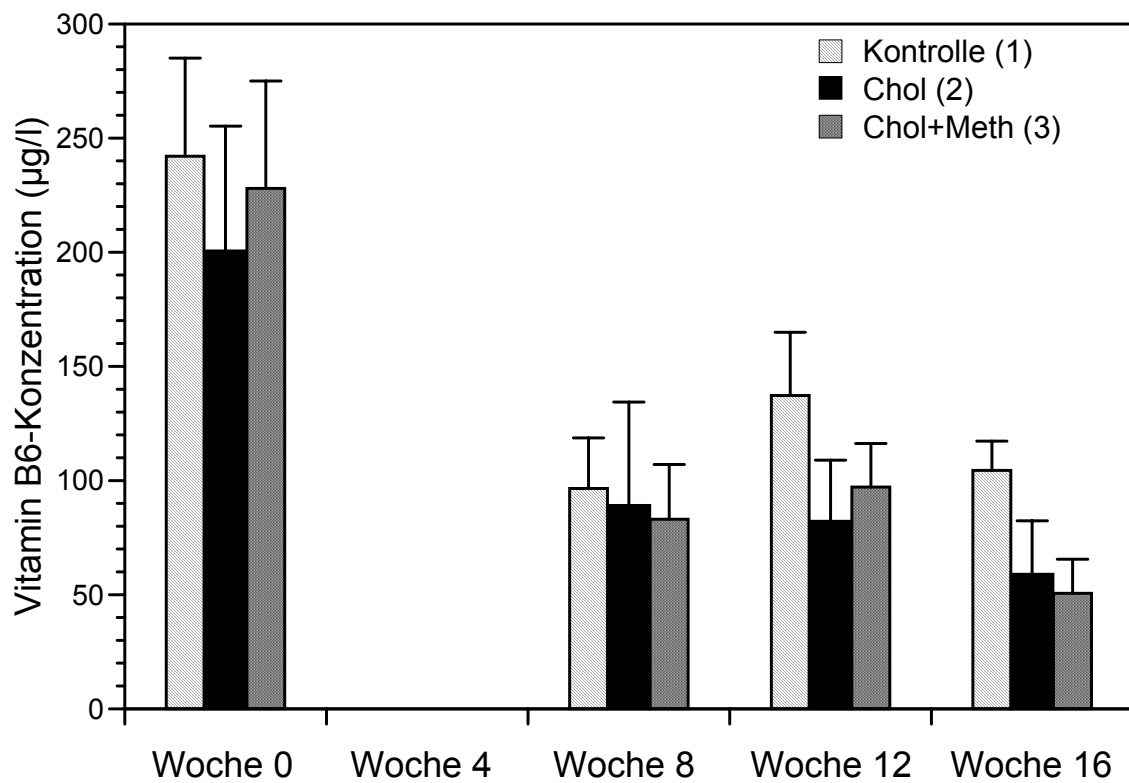


**Abb. 12:** Vitamin-E-Konzentration im Versuchsverlauf

### 3.5.2 Vitamin B<sub>6</sub>

Bei der AUC der Vitamin-B<sub>6</sub>-Konzentration fand sich mit  $p=0,0346$  ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 1 (AUC  $2306 \pm 333 \mu\text{g/l} \cdot 16$  Wochen) und Gruppe 2 (AUC  $1840 \pm 401 \mu\text{g/l} \cdot 16$  Wochen) (**Tab. A10**). Auffällig war bei allen Gruppen ein Rückgang der Vitamin-B<sub>6</sub>-Konzentration während des Versuchs (**Abb. 13**). In Gruppe 3 (AUC  $1900 \pm 323 \mu\text{g/l} \cdot 16$  Wochen) war dieser Rückgang am größten: der Wert der Woche 16 betrug nur noch 19,9 % des Ausgangswertes; in Gruppe 2 lag er noch bei 29,2 % und in Gruppe 1 bei 41,7 %.





**Abb. 13:** Vitamin-B<sub>6</sub>-Konzentration im Versuchsverlauf

## 3.6 Blutglucose

### 3.6.1 Glucose-Konzentration im Plasma

Es ließ sich keine Veränderung der Plasma-Glucose-Konzentration im Verlauf des Versuchs erkennen, ebenso ergaben sich zwischen den 3 Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede (**Tab. 3**)

**Tab. 3:** Glucose-Konzentration im Plasma (mg/dl, Median mit 25%- und 75%-Quartil)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
Woche 0	194 [170-244]	152 [118-220]	226 [197-231]
Woche 4	231 [202-254]	242 [216-249]	193 [156-273]
Woche 8	275 [258-340]	279 [250-286]	242 [225-326]
Woche 12	209 [195-230]	172 [188-142]	207 [199-224]
Woche 16	201 [156-211]	98,0 [94,0-138]	170 [133-184]
AUC	3577 [3298-4544]	3136 [2954-3551]	3570 [3002-3646]

AUC = Area under the curve

### 3.6.2 Glucose-Konzentration im Vollblut

Bei Betrachtung der Glucose-Konzentration im Vollblut zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (**Tab. 4**).

**Tab. 4:** Glucose-Konzentration im Vollblut (mg/dl, Median mit 25%- und 75%-Quartil)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
Woche 0	183 [157-228]	117 [98,0-144]	195 [160-227]
Woche 4	239 [195-249]	244 [217-274]	205 [154-287]
Woche 8	336 [293-380]	†	360 [343-377]
Woche 12	209 [191-234]	181 [154-203]	205 [196-235]
Woche 16	174 [133-215]	146 [107-154]	156 [126-206]
AUC	3378 [2777-3858]	3080 [2703-3571]	3284 [3012-3662]

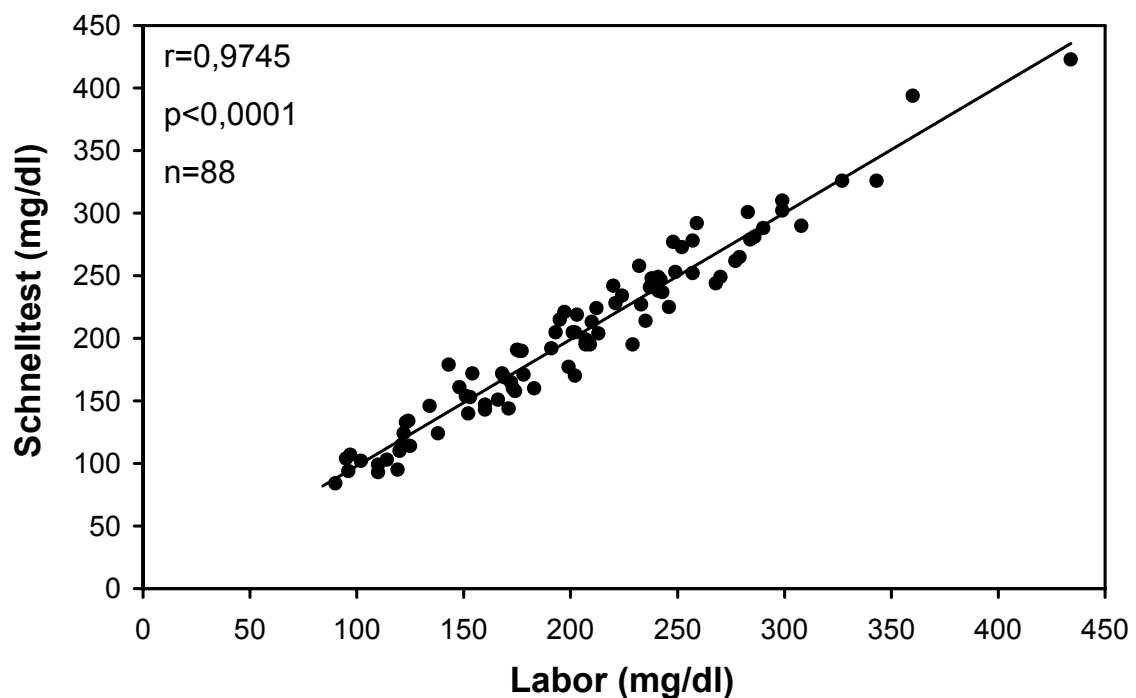
AUC = Area under the curve  
möglich

† Datenerhebung versuchsbedingt nicht

### 3.6.3 Vergleich der Bestimmungsmethoden

Die vom Labor im Plasma gemessenen Glucosewerte betragen im Median 209 mg/dl [165-257 mg/dl], der Median der mit einem Handmessgerät bestimmten Glucosewerte lag bei 198 mg/dl [152-249 mg/dl]. Die Differenz der beiden Messmethoden betrug im Median 1,5 mg/dl [-10,0-12,8 mg/dl], was einer Abweichung von 1,4 % entspricht.

Von den 88 von Hand bestimmten Werten hielten 85 die Vorgaben ein (Kap. 2.3), drei Werte lagen außerhalb des definierten 95,5%-Intervalls (**Abb. 14**). Diese drei abweichenden Werte wurden bei jeweils einem Tier aus jeder der drei Gruppen festgestellt.



**Abb. 14:** Vergleich der Glucose-Bestimmungsmethoden „Schnelltest“ (Vollblut) und „Labor“ (Plasma)

## 3.7 Klinisch-chemische Parameter

### 3.7.1 Transaminasen und $\gamma$ -GT

Es wurden die Transaminasen GOT, GPT und  $\gamma$ -GT im Plasma bestimmt (**Tab. A11**).

**GOT:** Es zeigten sich Unterschiede zwischen den Gruppen 1-2 und 1-3 ( $p=0,0002$ ). Die Werte der Gruppen 2 und 3 lagen ab Woche 4 durchweg über den Werten der Gruppe 1. Die AUC der Gruppe 1 betrug  $120 \pm 17,6$  U/l\*16 Wochen, die der Gruppe 2  $196 \pm 48,4$  U/l\*16 Wochen und die der Gruppe 3  $202 \pm 45,1$  U/l\*16 Wochen.

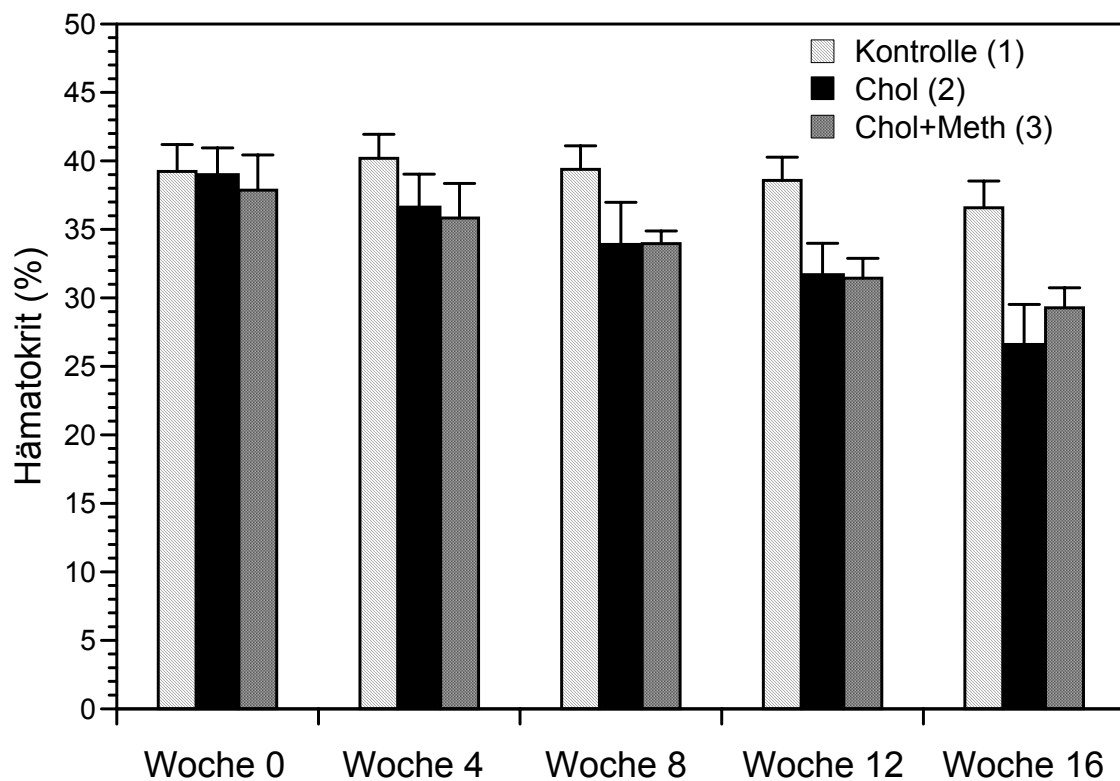
**GPT:** Es fand sich ein Unterschied zwischen den Gruppen 2 und 3 ( $p=0,0458$ ). Während des gesamten Versuchsverlaufs lagen die Werte der Gruppe 3 über den Werten der Gruppen 1 und 2, ebenso war die AUC der Gruppe 3 ( $401 \pm 103$  U/l\*16 Wochen) höher als die AUC der Gruppe 1 ( $301 \pm 127$  U/l\*16 Wochen) und Gruppe 2 ( $250 \pm 94,8$  U/l\*16 Wochen).

**$\gamma$ -GT:** Es fand sich kein Unterschied zwischen den Gruppen, allerdings stiegen die Werte bei einzelnen Tieren der Gruppen 2 und 3 zum Versuchsende hin stark an. Die AUC betrug für Gruppe 1  $56,8 \pm 10,6$  U/l\*16 Wochen, für Gruppe 2  $161 \pm 150$  U/l\*16 Wochen und  $178 \pm 142$  U/l\*16 Wochen für Gruppe 3.

### 3.7.2 Kleines Blutbild

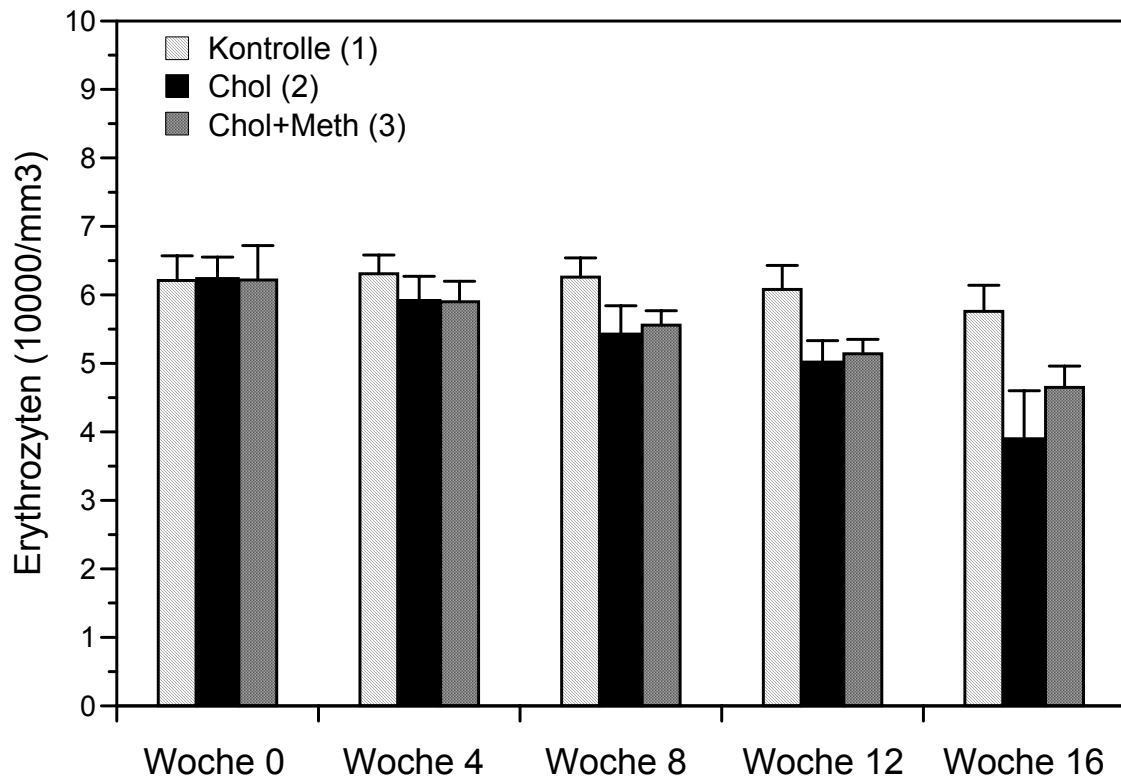
Über die gesamte Versuchsdauer hinweg wurden alle 4 Wochen Hämatokrit, Erythrozytenzahl, Hämoglobin (Hb), MCV, MCHC, Leukozytenzahl und Thrombozytenzahl bestimmt (**Tab. A12**).

**Hämatokrit:** Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen 1-2 und 1-3 gefunden ( $p<0,0001$ ). Dabei waren die Werte der Kontrollgruppe zu allen Zeiten höher als die der beiden anderen Gruppen (**Abb. 15**), ebenso war die AUC der Gruppe 1 ( $624 \pm 24,8$  %\*16 Wochen) um ca. 14 % größer als die der Gruppen 2 ( $540 \pm 33,5$  %\*16 Wochen) und 3 ( $539 \pm 16,1$  %\*16 Wochen).



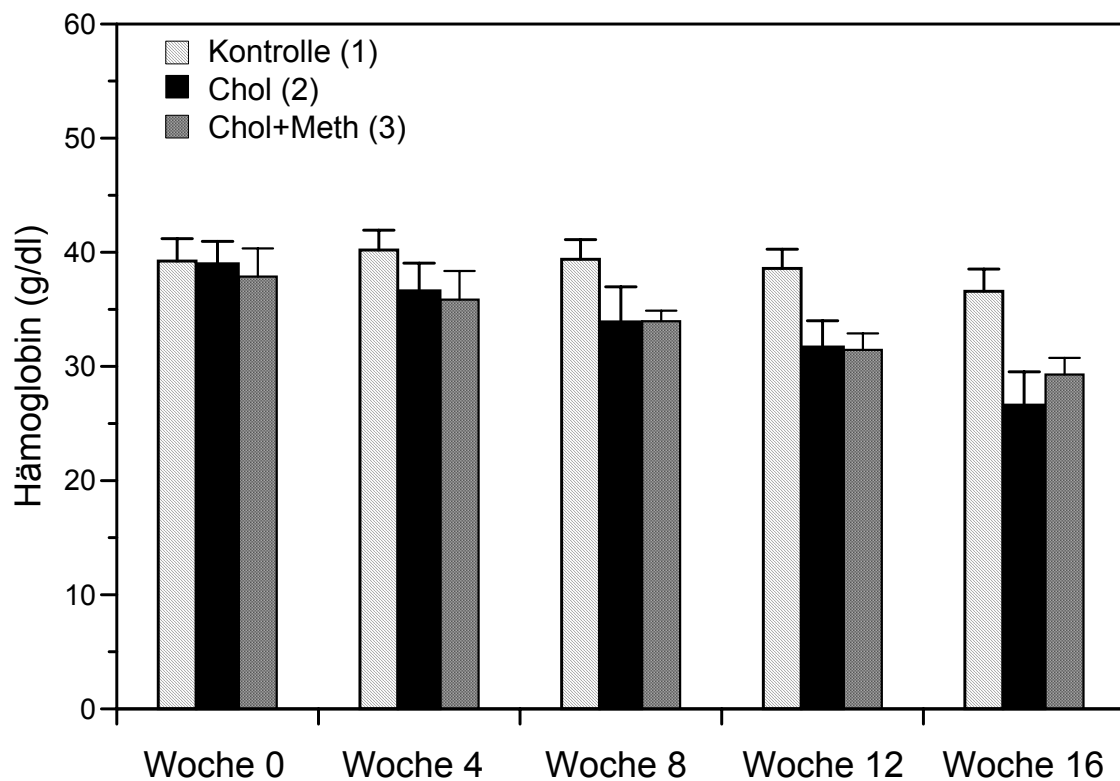
**Abb. 15:** Hämatokrit im Versuchsverlauf

**Erythrozyten:** Es war ein signifikanter Unterschied festzustellen zwischen den Gruppen 1-2 und 1-3 ( $p < 0,0001$ ). Auch hier waren die Werte im Verlauf (**Abb. 16**) und die AUC in der Kontrollgruppe zu allen Zeiten höher als die Werte der beiden anderen Gruppen (AUC der Gruppe 1  $98,5 \pm 4,7 \times 10^4 / \text{mm}^3 \cdot 16$  Wochen, der Gruppe 2  $85,7 \pm 4,8 \times 10^4 / \text{mm}^3 \cdot 16$  Wochen und der Gruppe 3  $88,1 \pm 2,4 \times 10^4 / \text{mm}^3 \cdot 16$  Wochen).



**Abb. 16:** Erythrozytenzahl im Versuchsverlauf

**Hämoglobin:** Beim Hämoglobin waren ab Woche 4 die Werte der Kontrollgruppe höher als die Werte der beiden anderen Gruppen (**Abb. 17**). Entsprechend fand sich auch bei diesem Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen 1-2 und 1-3 ( $p < 0,0001$ ). Die AUC der Gruppe 1 war ca. 10 % höher als die AUC der beiden anderen Gruppen und betrug  $215 \pm 8,8$  g/dl\*16 Wochen, die der Gruppe 2  $193 \pm 11,3$  g/dl\*16 Wochen und die der Gruppe 3  $193 \pm 5,7$  g/dl\*16 Wochen.



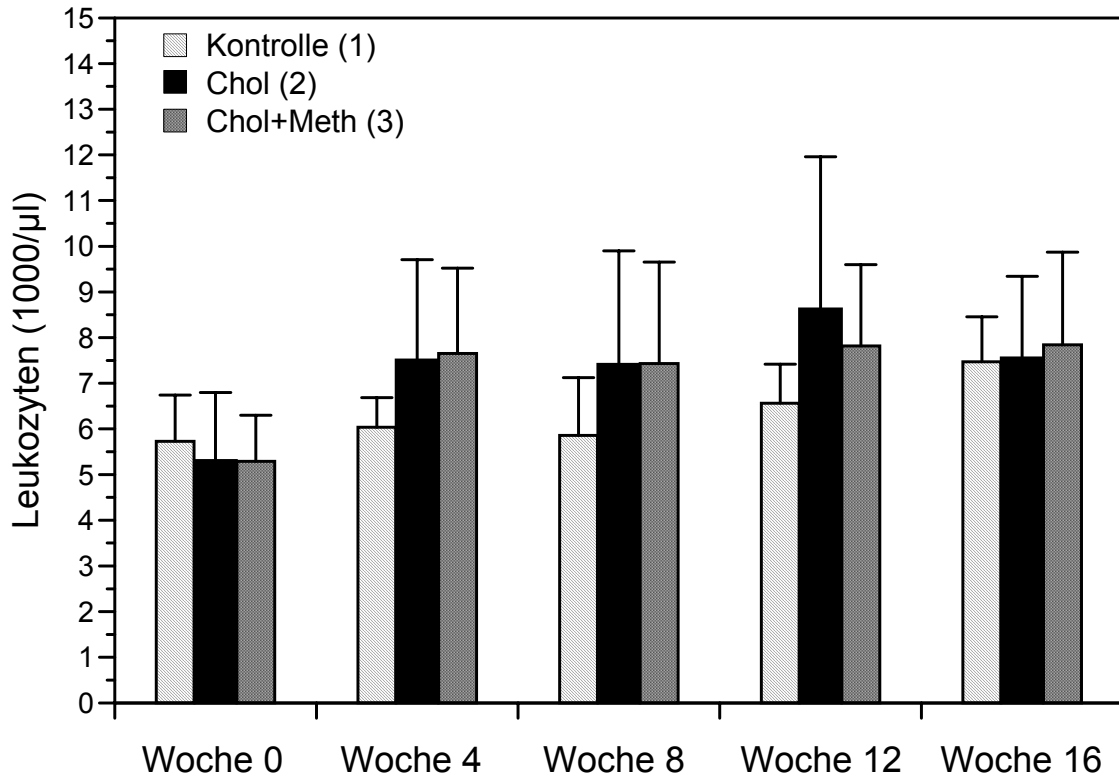
**Abb. 17:** Hämoglobinkonzentration im Versuchsverlauf

**MCV:** Hier ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisen. In Gruppe 1 betrug die AUC  $1015 \pm 33,2 \text{ fl} \cdot 16 \text{ Wochen}$ , in Gruppe 2  $1014 \pm 25,8 \text{ fl} \cdot 16 \text{ Wochen}$  und in Gruppe 3  $981 \pm 22,1 \text{ fl} \cdot 16 \text{ Wochen}$ .

**MCHC:** Hier fand sich ein Unterschied zwischen den Gruppen 1-2 und 1-3 ( $p < 0,0001$ ). Die AUC der Gruppe 1 war am geringsten und lag bei  $551 \pm 5,1 \text{ g/dl} \cdot 16 \text{ Wochen}$ , gefolgt von Gruppe 2 ( $571 \pm 6,7 \text{ g/dl} \cdot 16 \text{ Wochen}$ ) und Gruppe 3 ( $573 \pm 11,1 \text{ g/dl} \cdot 16 \text{ Wochen}$ ). Bei allen drei Gruppen war die MCHC am Ende des Versuchs geringer als zu Beginn.

**MCH:** Es fand sich ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0207$ ) zwischen Gruppe 1 (AUC  $349 \pm 10,5 \text{ pg} \cdot 16 \text{ Wochen}$ ) und Gruppe 2 (AUC  $360 \pm 6,0 \text{ pg} \cdot 16 \text{ Wochen}$ ). Die AUC des MCH der Gruppe 3 betrug  $350 \pm 5,7 \text{ pg} \cdot 16 \text{ Wochen}$ .

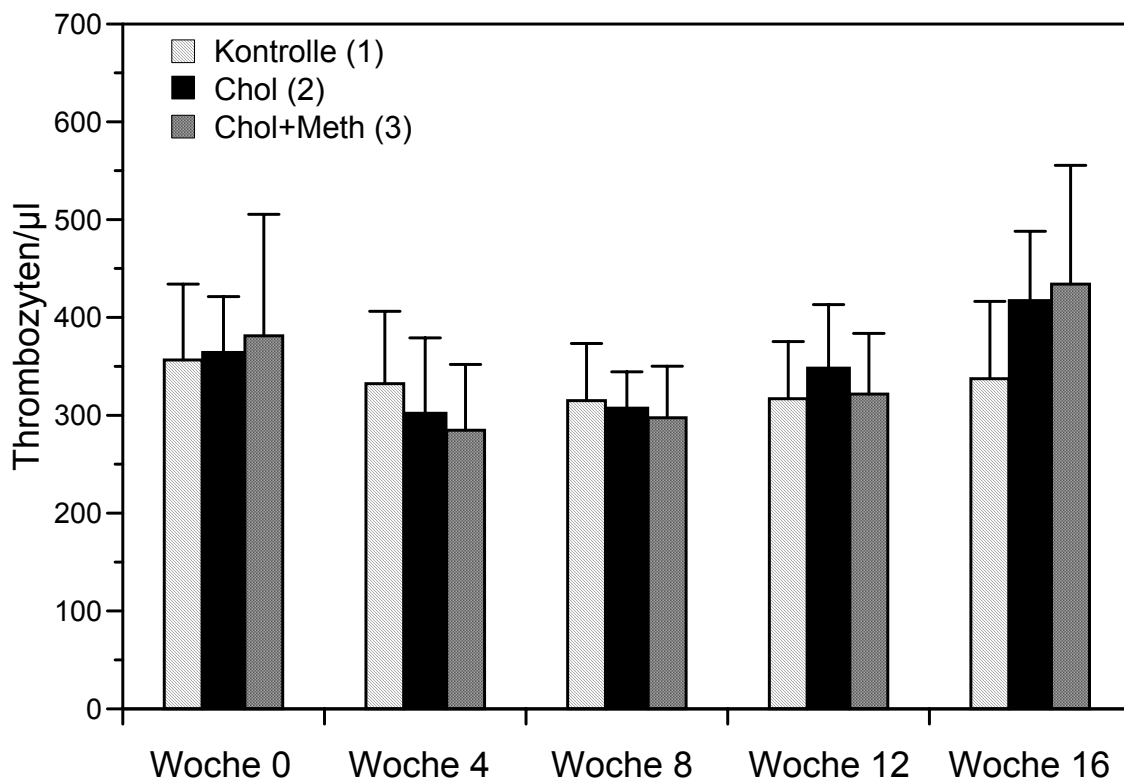
**Leukozyten:** Zwischen den Gruppen ließen sich keine Unterschiede nachweisen (**Abb. 18**). Die AUC der Leukozyten der Gruppe 1 betrug  $101018 \pm 14338$  Leukozyten/ $\mu\text{l} \cdot 16$  Wochen, die der Gruppe 2  $110211 \pm 19909$  Leukozyten/ $\mu\text{l} \cdot 16$  Wochen und die der Gruppe 3  $117874 \pm 26681$  Leukozyten/ $\mu\text{l} \cdot 16$  Wochen.



**Abb. 18:** Leukozytenzahl im Versuchsverlauf

**Thrombozyten:** Es ließen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisen (**Abb. 19**). Die AUC der Thrombozytenzahl betrug für Gruppe 1  $5228 \pm 997$  Thrombozyten/ $\mu\text{l} \cdot 16$  Wochen, für Gruppe 2  $5394 \pm 705$  Thrombozyten/ $\mu\text{l} \cdot 16$  Wochen und für Gruppe 3  $5207 \pm 925$  Thrombozyten/ $\mu\text{l} \cdot 16$  Wochen.





**Abb. 19:** Thrombozytenzahl im Versuchsverlauf

### 3.7.3 Elektrolyte

Über die gesamte Versuchsdauer hinweg wurden die Elektrolyte Natrium, Kalium und Calcium bestimmt (**Tab. A13**).

**Natrium:** Die logarithmierten Daten der AUC unterschieden sich signifikant ( $p=0,0002$ ) voneinander. Die Unterschiede befanden sich zwischen den Gruppen 1-2, 1-3 und 2-3. Die Natriumkonzentration nahm in allen drei Gruppen zum Versuchsende hin ab. Die AUC der Natriumkonzentration betrug für Gruppe 1  $2240 \pm 25,6$  mmol/l\*16 Wochen, für Gruppe 2  $2184 \pm 22,3$  mmol/l\*16 Wochen und für Gruppe 3  $2212 \pm 10,0$  mmol/l\*16 Wochen.

**Kalium:** Bei den logarithmierten Daten der AUC war ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 1 ( $56,9 \pm 2,2$  mmol/l\*16 Wochen) und Gruppe 2 ( $59,9 \pm 1,3$  mmol/l\*16 Wochen) ( $p=0,0396$ ) vorhanden. Die AUC der Kaliumkonzentration der Gruppe 3 betrug  $58,9 \pm 3,1$  mmol/l\*16 Wochen. Die Werte

aller drei Gruppen lagen während des Versuchs unterhalb der vom Züchter angegebenen Normalwerte (4,8 mmol/l).

**Calcium:** Bei allen Blutentnahmezeitpunkten betrug die gemessenen Calciumkonzentrationen in etwa das Doppelte der vom Züchter als Normalwert angegebenen Konzentration (1,6 mmol/l). Unterschiede zwischen den Gruppen ließen sich jedoch nicht nachweisen. Die AUC der Calciumkonzentration betrug  $52,8 \pm 1,0$  mmol/l\*16 Wochen in Gruppe 1,  $53,0 \pm 1,7$  mmol/l\*16 Wochen in Gruppe 2 und  $52,3 \pm 1,4$  mmol/l\*16 Wochen in Gruppe 3.

### 3.7.4 Gerinnungsparameter

Als Gerinnungsparameter wurden die International Normalized Ratio (INR), die Thromboplastinzeit (TPZ/Quick), die Partielle Thromboplastinzeit (PTT) und Fibrinogen bestimmt (**Tab. A14**).

**INR:** Hier ließen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen. Die AUC der INR betrug  $19,3 \pm 1,2$ \*16 Wochen für Gruppe 1,  $19,6 \pm 2,6$ \*16 Wochen für Gruppe 2 und  $18,2 \pm 1,2$ \*16 Wochen für Gruppe 3.

**TPZ (Quick):** Auch hier fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die AUC der Gruppe 1 lag bei  $1303 \pm 123$  %\*16 Wochen, die der Gruppe 2 bei  $1321 \pm 225$  %\*16 Wochen und die der Gruppe 3 bei  $1507 \pm 150$  %\*16 Wochen.

**PTT:** Hier lagen nahezu alle Werte über den vom Züchter genannten Normalwerten, größtenteils lagen sie auch außerhalb des Messbereichs des Zentrallabors. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ließen sich nicht feststellen.

**Fibrinogen:** Es ließen sich Unterschiede zwischen Gruppe 1 (AUC  $4963 \pm 1224$  mg/dl\*16 Wochen) und Gruppe 2 (AUC  $3668 \pm 433$  mg/dl \*16 Wochen) feststellen ( $p=0,0275$ ). Die AUC der Gruppe 3 betrug  $4211 \pm 575$  mg/dl\*16 Wochen.

### 3.7.5 Enzymaktivitäten

Im Versuchsverlauf wurden die Aktivitäten der Alkalischen Phosphatase (AP), der Laktatdehydrogenase (LDH), der Kreatinkinase (CK), der Amylase, der Pankreas-Amylase und der Lipase bestimmt (**Tab. A15**).

**AP:** Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen. Die AUC der AP betrug für Gruppe 1  $1259 \pm 366$  U/l\*16 Wochen, für Gruppe 2  $1482 \pm 410$  U/l\*16 Wochen und für Gruppe 3  $1242 \pm 374$  U/l\*16 Wochen.

**LDH:** Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar (AUC der Gruppe 1:  $690 \pm 187$  U/l\*16 Wochen, Gruppe 2:  $720 \pm 152$  U/l\*16 Wochen, Gruppe 3:  $914 \pm 218$  U/l\*16 Wochen).

**CK:** Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisen. Alle drei Gruppen zeigten Maxima der CK in den Wochen 8 und 12, am Ende des Versuchs waren diese Werte jedoch wieder gesunken. Die AUC der CK betrug für Gruppe 1  $8337 \pm 3393$  U/l\*16 Wochen, für Gruppe 2  $7619 \pm 1718$  U/l\*16 Wochen und für Gruppe 3  $9607 \pm 2274$  U/l\*16 Wochen.

**Amylase:** Es fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen 1-2 und 1-3 ( $p=0,0108$ , AUC der Amylase für Gruppe 1:  $2457 \pm 324$  U/l \*16 Wochen, Gruppe 2:  $2955 \pm 373$  U/l\*16 Wochen, Gruppe 3:  $2893 \pm 230$  U/l\*16 Wochen). Vor allem bei Gruppe 3 stieg die Amylase zum Versuchsende hin an.

**Pankreas-Amylase:** Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen 1-2 und 1-3 ( $p=0,0115$ ). Sowohl in Gruppe 2 (AUC  $2893 \pm 365$  U/l\*16 Wochen) wie auch in Gruppe 3 (AUC  $2829 \pm 222$  U/l\*16 Wochen) wurde die höchste Konzentration in Woche 12 gemessen, in Gruppe 1 (AUC  $2408 \pm 321$  U/l\*16 Wochen) dagegen in Woche 8.

**Lipase:** Beim Vergleich der AUC der Lipase zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 2 und 3. Auffällig war jedoch ein starker Anstieg der Lipase in Gruppe 3 (AUC  $11012 \pm 5425$  U/l\*16 Wochen) und vor allem in

Gruppe 2 (AUC  $18164 \pm 7739$  U/l\*16 Wochen). In diesen beiden Gruppen erreichte die Konzentration am Ende des Versuchs das 12- bis 20fache der Werte der Gruppe 1 (AUC  $2474 \pm 455$  U/l\*16 Wochen).

### 3.7.6 Nierenfunktionsparameter Harnstoff und Kreatinin

Als Nierenfunktionsparameter wurden Harnstoff und Kreatinin bestimmt (Tab. A16).

**Harnstoff:** Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Die AUC des Harnstoffs bei Gruppe 1 betrug  $640 \pm 79,1$  mg/dl\*16 Wochen, bei Gruppe 2  $635 \pm 109,9$  mg/dl\*16 Wochen und bei Gruppe 3  $734 \pm 113$  mg/dl\*16 Wochen.

**Kreatinin:** Es war ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen 1 und 3 nachweisbar ( $p=0,0007$ ). Zudem stieg das Kreatinin bei allen drei Gruppen zum Versuchsende hin an, bei Gruppe 1 (AUC  $17,3 \pm 2,5$  mg/dl\*16 Wochen) unwesentlich, bei Gruppe 3 ( $23,0 \pm 2,2$  mg/dl\*16 Wochen) annähernd bis auf das Doppelte der Ausgangswerte. Gruppe 2 ( $20,2 \pm 2,4$  mg/dl\*16 Wochen) lag zwischen den beiden anderen Gruppen.

### 3.7.7 Gesamteiweiß und Albumin

Sowohl das Gesamteiweiß als auch Albumin wurden während der gesamten Versuchsdauer kontrolliert (Tab. A17).

**Gesamteiweiß:** Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen (AUC Gruppe 1  $87,6 \pm 3,5$  g/dl\*16 Wochen, Gruppe 2  $85,7 \pm 5,5$  g/dl\*16 Wochen, Gruppe 3  $87,1 \pm 3,5$  g/dl\*16 Wochen).

**Albumin:** Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die AUC der Albuminkonzentration lag bei  $81,7 \pm 3,8$  g/dl\*16 Wochen in Gruppe 1, bei  $79,9 \pm 4,1$  g/dl\*16 Wochen in Gruppe 2 und bei  $84,5 \pm 3,4$  g/dl\*16 Wochen in Gruppe 3.

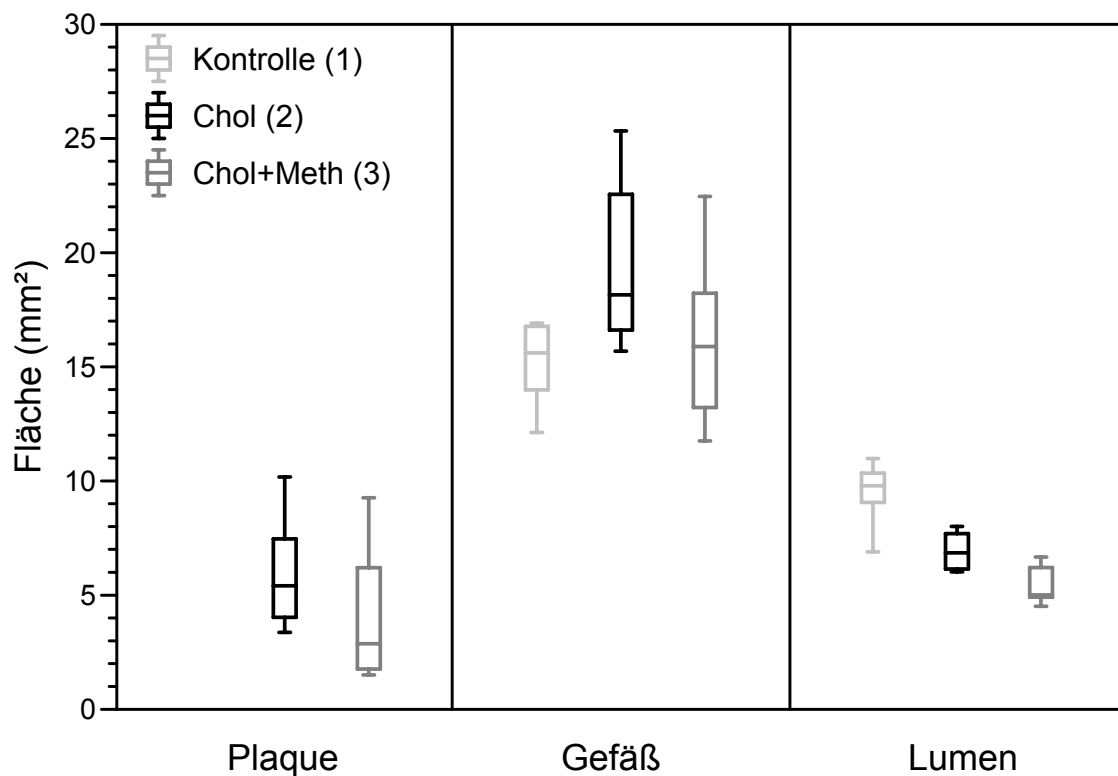
## 3.8 Größe und zelluläre Zusammensetzung der intimalen Plaques im Aortenbogen

### 3.8.1 Plauefläche

Die Größe der Plauefläche wurde an drei Segmenten des Aortenbogens gemessen (**Abb. 20, Tab. 5**).

In den Präparaten der Tiere der Kontrollgruppe waren keine Plaues nachweisbar.

In Gruppe 2 betrug die Plauefläche im Median 5,4 mm<sup>2</sup> [4,0-7,5 mm<sup>2</sup>], in Gruppe 3 2,9 mm<sup>2</sup> [1,8-6,2mm<sup>2</sup>]. Dieser Unterschied von 46 % war statistisch nicht signifikant (p=0,1052).



**Abb. 20:** Fläche der Plaue, des gesamten Gefäßquerschnitts und des -lumens (Median mit 25%- und 75%-Quartil sowie Minimum und Maximum)

### 3.8.2 Fläche des Gefäßquerschnitts

Bei der Gefäßfläche des Aortenbogens fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 1 und 2 ( $p=0,0087$ ). Der Median betrug für Gruppe 1  $15,6 \text{ mm}^2$  [ $14,0-16,8 \text{ mm}^2$ ], für Gruppe 2  $18,2 \text{ mm}^2$  [ $16,6-22,6 \text{ mm}^2$ ] und für Gruppe 3  $15,9 \text{ mm}^2$  [ $13,2-18,2 \text{ mm}^2$ ] (**Abb. 20, Tab. 5**).

### 3.8.3 Lumenfläche

Bei den beiden Gruppen mit Cholesterinfütterung war die Lumenfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert (**Abb. 20, Tab. 5**). Der Unterschied war zwischen allen drei Gruppen signifikant. Für die Gruppen 1-2 betrug der p-Wert  $p=0,0033$ , für die Gruppen 1-3  $p=0,0012$  und für die Gruppen 2-3  $p=0,0151$ .

**Tab. 5:** Übersicht über Plaquefläche, Fläche des Gefäßquerschnitts und Lumenfläche in  $\text{mm}^2$  (Median mit 25%- und 75%-Quartil)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
Plaquefläche	0 [0-0]	5,4 [4,0-7,5]	2,9 [1,8-6,2]
Gefäßfläche	15,6 [14,0-16,8] <sup>2</sup>	18,2 [16,6-22,6] <sup>1</sup>	15,9 [13,2-18,2]
Lumenfläche	9,8 [9,1-10,3] <sup>2,3</sup>	6,9 [6,1-7,7] <sup>1,3</sup>	5,0 [4,9-6,2] <sup>1,2</sup>

Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

### 3.8.4 Zelluläre Zusammensetzung der Plaque

#### 3.8.4.1 Endothelzellen

Beim Anteil der vWF-positiven Endothelzellen zeigte sich bei Gruppe 1 der geringste Anteil, im Median  $56,2 \%$  [ $46,1-63,7 \%$ ]. Bei Gruppe 3 war der Anteil vWF-positiv gefärbter Endothelzellen am größten, er lag im Median bei  $85,7 \%$  [ $74,8-87,3 \%$ ], Gruppe 2 lag mit  $66,5 \%$  [ $62,4-85,4 \%$ ] dazwischen. Signifikant war der Unterschied zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 ( $p=0,0046$ ) sowie Gruppe 1 und Gruppe 3 ( $p=0,0206$ ).

### 3.8.4.2 Zelldichte und Proliferationsrate

In den Plaques wurde die Zellzahl pro mm<sup>2</sup> bestimmt. Diese betrug für Gruppe 2 2122 Zellen/mm<sup>2</sup> [1764-2303 Zellen/mm<sup>2</sup>] und für Gruppe 3 2109 Zellen/mm<sup>2</sup> [1623-2714 Zellen/mm<sup>2</sup>]. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ließ sich nicht feststellen (p=0,9079).

Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl und der BrdU-positiven Zellen wurde der Anteil der proliferierenden Zellen an der Gesamtzellzahl errechnet. Er betrug bei Gruppe 2 8,7 % [3,7-13,0 %] und bei Gruppe 3 11,8 % [7,7-13,2 %]. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant (p=0,3545).

### 3.8.4.3 Makrophagen

Die mit dem Antikörper RAM 11 angefärbten Makrophagen befanden sich bevorzugt in dem an die Media angrenzenden Plaquebereich. Der Anteil der Makrophagen an der Plaquefläche war bei Gruppe 2 größer (23,5 % [11,5-27,0 %]) als bei Gruppe 3 (18,3 % [14,5-26,9 %]). Dieser Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant (p=0,9999).

### 3.8.5 Plaquefläche in den einzelnen Segmenten des Gefäßbaums

Die Plaquebildung wurde in den verschiedenen Segmenten des Gefäßbaums untersucht und zwischen Gruppe 2 und 3 verglichen. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (**Tab. 6**).

**Tab. 6:** Plaquefläche (mm<sup>2</sup>) in den einzelnen Segmenten des Gefäßbaums (Median mit 25%- und 75%-Quartil)

	Gruppe 2 Chol	Gruppe 3 Chol+Meth	Wilcoxon (p)
A. carotis (re)	0,10 [0,03-0,22]	0,59 [0,03-1,5]	0,2239
A. carotis (li)	0 [0-0,04]	0 [0-0,02]	0,9479
Aortenbogen	5,4 [4,0-7,5]	2,9 [1,8-6,2]	0,1052

**Tab. 6:** Fortsetzung

	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>	<b>Wilcoxon (p)</b>
Ao. thoracalis proximal	3,1 [1,7-6,1]	2,5 [1,2-3,2]	0,2472
Ao. thoracalis distal	0,18 [0,02-0,50]	0,60 [0,18-0,83]	0,2712
Ao. abdominalis	0,20 [0,05-0,48]	0,12 [0,07-0,17]	0,2472
A. femoralis (re)	0 [0-0]	0 [0-0]	0,8449
A. femoralis (li)	0 [0-0]	0 [0-0]	0,3496

### 3.8.6 Fläche des Gefäßquerschnitts in den einzelnen Segmenten des Gefäßbaums

Neben der Plaquefläche wurde auch die Fläche des Gefäßquerschnitts in den verschiedenen Segmenten bestimmt. Anschließend wurden die drei Gruppen einzeln miteinander verglichen.

Der Vergleich von Gruppe 1 mit Gruppe 2 (**Tab. 7**) zeigte signifikante Unterschiede im Bereich des Aortenbogens ( $p=0,0087$ ) und der proximalen Aorta thoracalis ( $p=0,0087$ ).

Der Vergleich von Gruppe 1 und Gruppe 3 zeigte signifikante Unterschiede bei der rechten A. carotis ( $p=0,0206$ ) und ebenfalls in der proximalen Aorta thoracalis ( $p=0,0372$ ).

Zwischen Gruppe 2 und 3 konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

**Tab. 7:** Gefäßfläche ( $\text{mm}^2$ ) der einzelnen Segmente des Gefäßbaums (Median mit 25%- und 75%-Quartil)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
A. carotis (re)	1,1 [1,1-1,4] <sup>3</sup>	1,4 [1,2-1,7]	2,1 [1,2-2,8] <sup>1</sup>
A. carotis (li)	1,0 [0,9-1,3]	1,3 [0,9-1,7]	1,1 [0,9-1,1]



Tab. 7: Fortsetzung

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
Aortenbogen	15,6 [14,0-16,8] <sup>2</sup>	18,2 [16,6-22,6] <sup>1</sup>	15,9 [13,2-18,2]
Ao. thoracalis proximal	7,6 [6,6-9,2] <sup>2,3</sup>	10,6 [9,0-14,6] <sup>1</sup>	10,3 [8,3-10,8] <sup>1</sup>
Ao. thoracalis distal	5,8 [5,5-5,9]	5,8 [5,1-6,6]	5,6 [4,9-6,5]
Ao. abdominalis	2,4 [2,2-3,0]	2,3 [1,9-3,7]	2,1 [1,8-2,4]
A. femoralis (re)	0,48 [0,46-0,54]	0,49 [0,43-0,57]	0,52 [0,38-0,54]
A. femoralis (li)	0,48 [0,40-0,57]	0,54 [0,45-0,67]	0,48 [0,38-0,53]

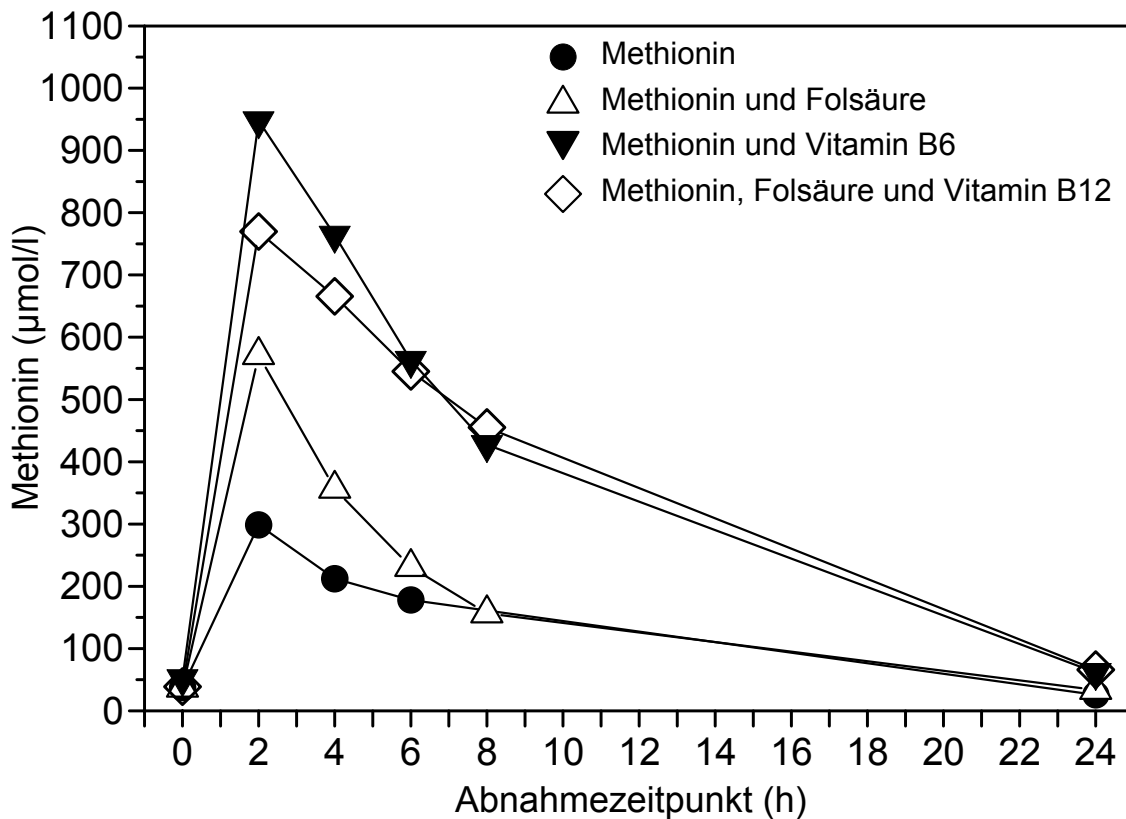
Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

### 3.9 Methionin-Belastungstests

#### 3.9.1 Methionin-Konzentration im Plasma

An zwei Tieren, die keiner der drei Gruppen zugeordnet waren, wurden Methionin-Belastungstests mit verschiedenen Methionin-Konzentrationen und Zusätzen durchgeführt.

Jeweils nach Gabe von 100 mg Methionin/kg KG allein oder in Kombination mit 0,2 mg Folsäure/kg KG, mit 1,5 mg Vitamin B<sub>6</sub>/kg KG sowie mit 0,2 mg Folsäure/kg KG und 0,01 mg Vitamin B<sub>12</sub>/kg KG wurde der Verlauf des Plasmaspiegels von Methionin über einen Zeitraum von 24 h beobachtet (**Abb. 21**).



**Abb. 21:** Plasma-Methionin-Konzentration über 24 h bei Gabe von 100 mg L-Methionin/kg KG und Vitaminzusätzen (Mittelwert von zwei Tieren)

Dabei zeigte sich bei alleiniger Gabe von 100 mg Methionin/kg KG bei beiden Tieren nach 2 h ein Maximum der Methionin-Konzentration (**Tab. A18**). Bei Tier 1 betrug dieser Wert das 7,3fache des Ausgangswerts, bei Tier 2 das 8,8fache.

Auch bei Gabe von Methionin in Kombination mit Folsäure zeigte sich das Maximum nach 2 h (**Tab. A19**). Bei Tier 1 betrug das Maximum das 19fache des Ausgangswerts, bei Tier 2 das 12fache. Das erreichte Maximum war bei Tier 1 2,5fach höher als bei alleiniger Methionin-Gabe, bei Tier 2 1,4fach.

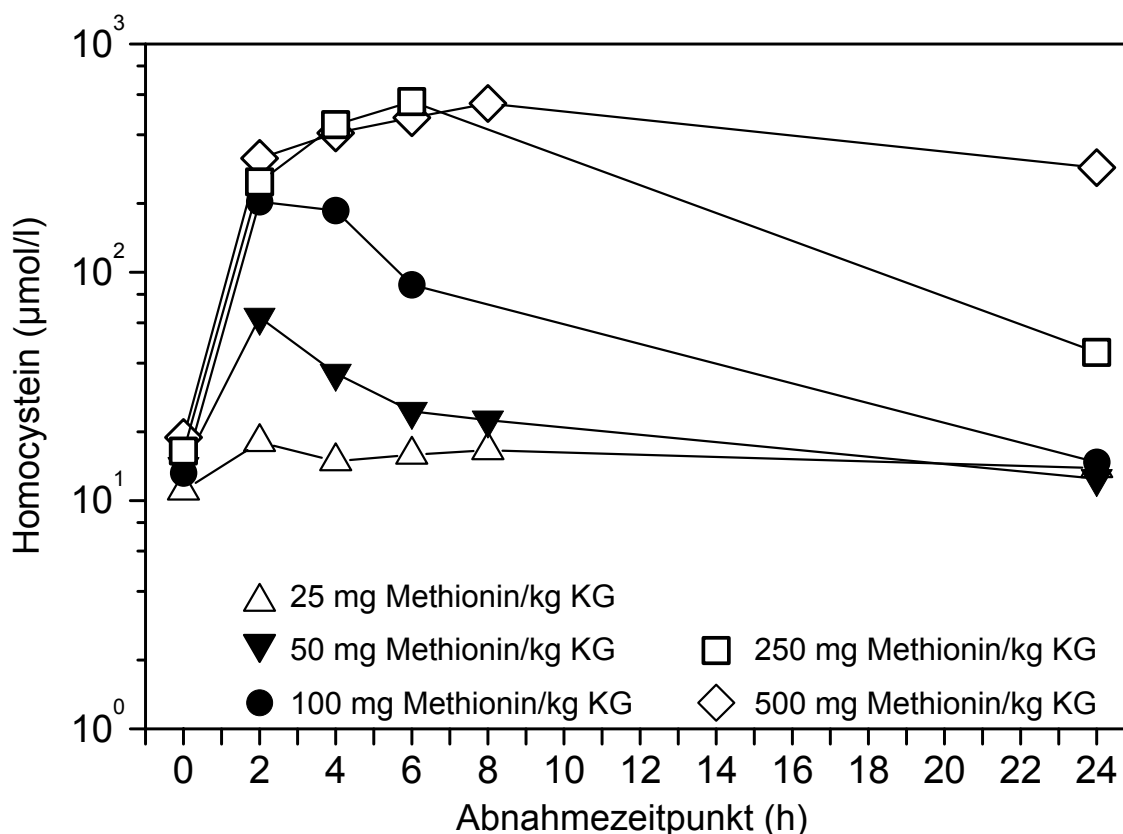
Wurde den Tieren Methionin in Kombination mit Vitamin B<sub>6</sub> verabreicht, fand sich das Maximum ebenso bei 2 h und betrug bei Tier 1 das 22fache des Ausgangswerts und bei Tier 2 das 16fache (**Tab. A20**). Das Maximum war bei Tier 1 um das 3,5fache höher und bei Tier 2 um das 2,9fache als bei alleiniger Methionin-Gabe.

Bei kombinierter Gabe von Methionin mit Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub> wurde das Maximum der Plasma-Methionin-Konzentration nach 2 h erreicht und betrug sowohl bei Tier 1 als auch bei Tier 2 das 20fache des Ausgangswerts (**Tab. A21**). Das Maximum betrug bei Tier 1 das 2,7fache und bei Tier 2 das 2,5fache des Maximums bei alleiniger Methionin-Gabe.

Unabhängig von der Art der Vitaminzusätze wurde bei beiden Tieren das Maximum des Plasma-Methionin-Spiegels jeweils nach 2 h erreicht, wenn 100 mg Methionin/kg KG verabreicht wurden. Durch den Zusatz der Vitamine war die maximale Methionin-Konzentration erhöht.

### **3.9.2 Homocystein-Konzentration im Plasma**

Es wurden fünf Versuchsreihen mit alleiniger Gabe von L-Methionin durchgeführt. Die Methionin-Konzentration betrug dabei zwischen 25 mg Methionin/kg KG und 500 mg Methionin/kg KG. Die Homocystein-Konzentration wurde zu sechs Zeitpunkten innerhalb von 24 h bestimmt (**Abb. 22**).



**Abb. 22:** Plasma-Homocystein-Konzentration über 24 h bei alleiniger Gabe von L-Methionin (Mittelwert von zwei Tieren)

Bei der geringsten Methionin-Dosis von 25 mg Methionin/kg KG betrug der Anstieg der Homocystein-Konzentration bei Tier 1 maximal das 1,7fache des Ausgangswerts (**Tab. A22**) und wurde 2 h nach Verabreichung erreicht. Bei Tier 2 betrug das Maximum das 1,5fache und wurde ebenfalls nach 2 h erreicht.

Bei der nächst höheren Methionin-Dosis von 50 mg Methionin/kg KG betrug das Maximum für Tier 1 das 3,7fache des Ausgangswerts, für Tier 2 das 5,1fache. Beide Tiere erreichten das Maximum nach 2 h (**Tab. A23**).

Bei Verabreichung von 100 mg Methionin/kg KG wurde das Maximum ebenfalls nach 2 h erreicht und betrug für Tier 1 das 16fache und für Tier 2 das 14fache des Ausgangswerts (**Tab. A24**).

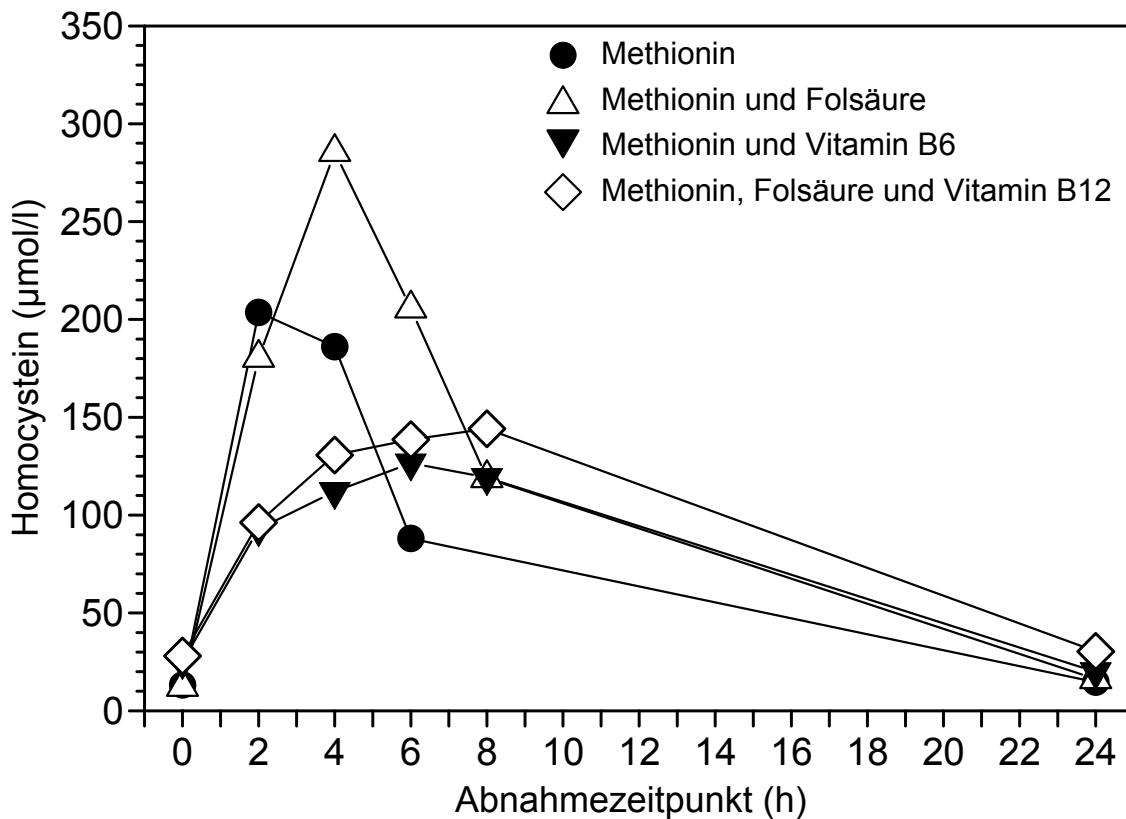
Bei 250 mg Methionin/kg KG wurde das Maximum erst nach 6 h erreicht und betrug für Tier 1 das 23fache und für Tier 2 das 54fache des Ausgangswerts.

Möglicherweise wurde das Maximum noch später erreicht; da zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Blutentnahmen erfolgten, ist dazu jedoch keine Aussage möglich. Nach 24 h betrug die Homocystein-Konzentration bei Tier 1 noch das 1,6fache und bei Tier 2 noch das 4,7fache des Ausgangswerts (**Tab. A25**).

Die höchste verabreichte Methionin-Dosis betrug 500 mg Methionin/kg KG. Die maximale Konzentration von Homocystein im Plasma wurde hierbei nach 8 h gemessen und lag bei Tier 1 beim 20fachen und bei Tier 2 beim 44fachen des Ausgangswerts. Nach 24 h war die Homocystein-Konzentration bei Tier 1 noch um das 3,5fache erhöht und bei Tier 2 um das 34fache (**Tab. A26**).

Bei einer Methionin-Dosis von 100 mg/kg KG und Zusatz von 0,2 mg Folsäure/kg KG (**Abb. 23**) wurde das Maximum der Homocystein-Konzentration nach 4 h erreicht und betrug bei Tier 1 das 21fache des Ausgangswerts. Bei Tier 2 wurde das Maximum ebenfalls nach 4 h erreicht und betrug das 27fache des Ausgangswerts (**Tab. A27**). Damit wurde das Maximum der Homocystein-Konzentration bei beiden Tieren 2 h später erreicht als bei alleiniger Methionin-Gabe und war zumindest bei Tier 2 doppelt so hoch.

Bei Verabreichung von 100 mg Methionin/kg KG und 1,5 mg Vitamin B<sub>6</sub>/kg KG wurde das Maximum der Homocystein-Konzentration nach 6 h erreicht und betrug bei Tier 1 das 4,7fache des Ausgangswerts (**Abb. 23**). Damit wurde das Maximum hier 4 h später erreicht als bei alleiniger Gabe von 100 mg Methionin/kg KG und betrug außerdem nur 60 % dieses Werts. Bei Tier 2 wurde das Maximum des Homocysteins bei kombinierter Gabe nach 6 h erreicht und betrug das 5,9fache des Ausgangswerts. Damit wurde das Maximum 4 h später erreicht als bei alleiniger Methionin-Gabe und betrug nur ca. 50 % dieses Werts (**Tab. A28**).

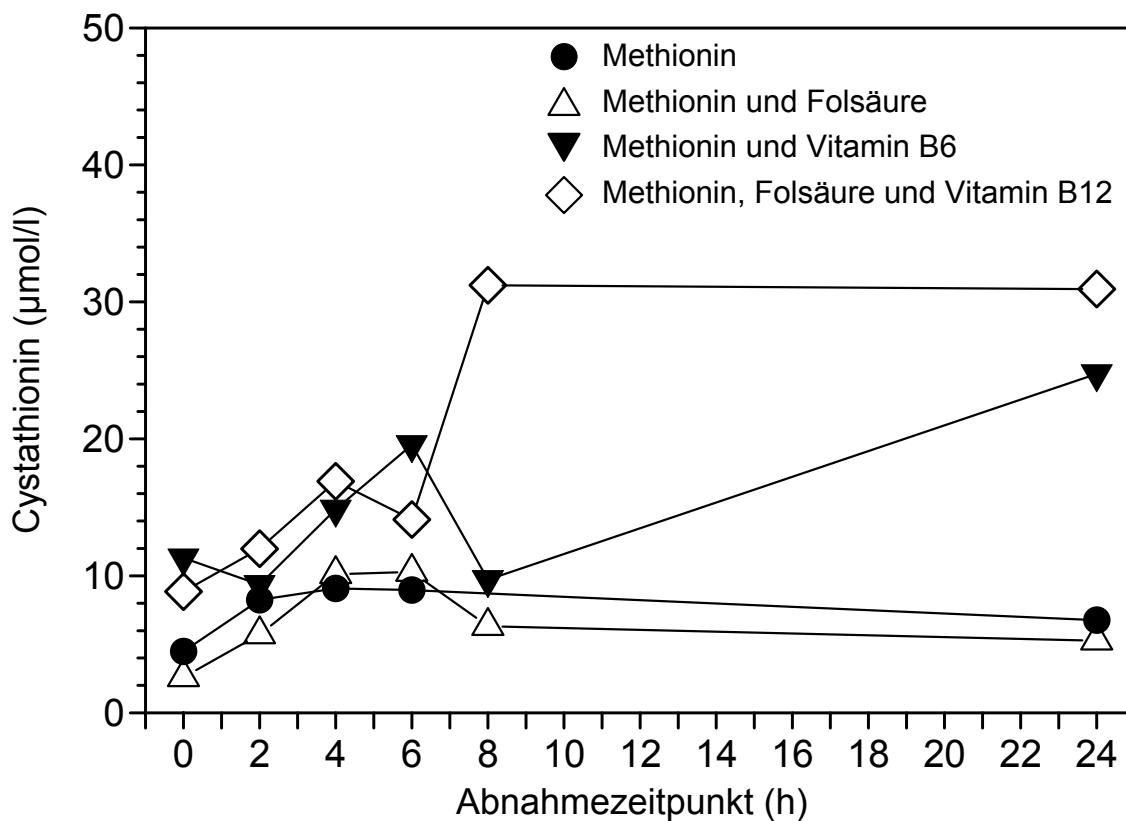


**Abb. 23:** Plasma-Homocystein-Konzentration über 24 h bei Gabe von 100 mg L-Methionin/kg KG und Vitaminzusätzen (Mittelwert von zwei Tieren)

Wurden 100 mg Methionin/kg KG in Kombination mit 0,01 mg Vitamin B<sub>12</sub>/kg KG und 0,2 mg Folsäure/kg KG verabreicht, wurde die maximale Homocystein-Konzentration nach 8 h erreicht und betrug bei Tier 1 das 4fache und bei Tier 2 das 7,6fache des Ausgangswerts (**Abb. 23, Tab. A29**). Somit wurde die maximale Homocystein-Konzentration 6 h später erreicht als bei alleiniger Methionin-Gabe und betrug bei Tier 1 ca. 60 % und bei Tier 2 ca. 85 % des Maximums bei alleiniger Methionin-Gabe.

### 3.9.3 Cystathionin-Konzentration im Plasma

Als weiterer Verlaufsparemeter wurde der Plasmaspiegel von Cystathionin nach Gabe von 100 mg Methionin/kg KG allein und in Kombination mit Folsäure, Vitamin B<sub>6</sub> und der Kombination von Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub> bestimmt (**Abb. 24**).



**Abb. 24:** Plasma-Cystathionin-Konzentration über 24 h bei Gabe von 100 mg L-Methionin/kg KG und Vitaminzusätzen (Mittelwert von zwei Tieren)

Nach Gabe von 100 mg Methionin/kg KG stieg bei beiden Tieren der Cystathioninspiegel an und erreichte bei Tier 1 nach 4 h ein Maximum, also 2 h nach den Maxima von Methionin und Homocystein, und betrug das 3,4fache des Ausgangswerts (**Tab. A30**). Bei Tier 2 wurde das Maximum nach 2 h erreicht und betrug das 1,5fache des Ausgangswerts.

Wurde Methionin in Kombination mit Folsäure verabreicht, wurde die maximale Cystathionin-Konzentration bei Tier 1 nach 4 h erreicht und betrug das 3,7fache der Ausgangskonzentration (**Tab. A31**), es erreichte somit das 1,2fache des Maximums bei alleiniger Methionin-Gabe. Bei Tier 2 wurde der Maximalwert nach 6 h erreicht und betrug das 6,4fache des Ausgangswerts, das Maximum wurde 4 h nach dem Maximum bei alleiniger Methionin-Gabe erreicht und betrug das 1,5fache dieses Maximums.

Bei gleichzeitiger Gabe von Methionin und Vitamin B<sub>6</sub> wurde der maximale Wert bei beiden Tieren nach 24 h gemessen und betrug bei Tier 1 das 2,9fache des Ausgangswerts und bei Tier 2 das 1,7fache des Ausgangswerts (**Tab. A32**). Somit wurde bei Tier 1 das Maximum 20 h später als bei alleiniger Methionin-Gabe erreicht und betrug das 2,9fache des ursprünglichen Maximums, bei Tier 2 wurde es 22 h später erreicht und betrug das 2,4fache.

Bei Verabreichung von Methionin, Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub> betrug die maximale Cystathionin-Konzentration bei Tier 1 das 4,2fache des Ausgangswerts und wurde nach 8 h erreicht, bei Tier 2 betrug das Maximum das 3,4fache des Ausgangswerts und wurde nach 24 h erreicht (**Tab. A33**). Verglichen mit der alleinigen Gabe von Methionin wurde das Maximum bei Tier 1 4 h später erreicht, bei Tier 2 22 h später; bei Tier 1 betrug es das 4,6fache des Ausgangsmaximums, bei Tier 2 das 2,8fache.

#### **3.9.4 Sonstige Aminosäuren im Plasma**

Während der Belastungstests wurden zahlreiche weitere Aminosäuren bestimmt. Es ließen sich keine eindeutigen Veränderungen der Plasma-Konzentrationen feststellen, d. h., es kam zu keinen Änderungen der Plasma-Konzentrationen oder es ließ sich keine eindeutige Änderung in eine bestimmte Richtung erkennen.

**Neutrale Aminosäuren:** Glycin, Alanin, Serin, Threonin, Valin, Leucin und Isoleucin

**Saure Aminosäuren:** Asparaginsäure, Glutaminsäure und Glutamin

**Basische Aminosäuren:** Arginin und Lysin

**Aromatische Aminosäuren:** Phenylalanin und Tyrosin

**Heterozyklische Aminosäuren:** Tryptophan, Prolin, Histidin, 1-Methyl-Histidin und 3-Methyl-Histidin

**Nicht-proteinogene Aminosäuren:** Ornithin, Citrullin und Taurin



### 3.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der statistischen Analysen sind in Tabellenform zusammengefasst (Tab. 8-Tab. 11).

Bei der Darstellung der Belastungstests wird der Zeitpunkt des Maximums der verschiedenen Konzentrationen angegeben und in welchem Verhältnis dieses Maximum zum Ausgangswert steht.

**Tab. 8:** Zusammenfassung der statistischen Auswertung der Futteraufnahmen und Organgewichte (Zahlen entsprechend der Gruppenbezeichnung)

	Gruppe 1 Kontrolle	Gruppe 2 Chol	Gruppe 3 Chol+Meth
<b>tägliche Futteraufnahme</b>	2,3	1	1
<b>tägliche Cholesterinaufnahme</b>	x	—	—
<b>tägliche Methioninaufnahme</b>	x	x	—
<b>Gewichtsveränderung</b>	2,3	1	1
<b>Organgewichte</b>			
Herz, absolut	—	—	—
Herz, relativ	—	—	—
Leber, absolut	2,3	1	1
Leber, relativ	2,3	1	1
Lunge, absolut	—	—	—
Lunge, relativ	—	—	—
Milz, absolut	2	1	—
Milz, relativ	2,3	1	1
Niere, absolut	3	—	1
Niere, relativ	—	—	—

— Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.  
x Dieser Wert ist nicht vorhanden.

**Tab. 9:** Zusammenfassung der statistischen Auswertung der AUC der Laborparameter (nach 12-stündiger Nüchternphase gemessen, Zahlen entsprechend der Gruppenbezeichnung)

	Gruppe 1 Kontrolle	Gruppe 2 Chol	Gruppe 3 Chol+Meth
<b>Lipide im Plasma</b>			
Cholesterin	—	3	2
HDL	2,3	1	1
LDL	x	3	2
VLDL	x	3	2
Triglyceride	2	1,3	2
NEFA	2	1,3	2
<b>Homocystein</b>	—	—	—
<b>Transaminasen, <math>\gamma</math>-GT</b>			
GOT	2,3	1	1
GPT	—	3	2
$\gamma$ -GT	—	—	—
<b>Kleines Blutbild</b>			
Hämatokrit	2,3	1	1
Erythrozyten	2,3	1	1
Hämoglobin	2,3	1	1
MCV	—	—	—
MCHC	2,3	1	1
MCH	2	1	—
Leukozyten	—	—	—
Thrombozyten	—	—	—
<b>Elektrolyte</b>			
Natrium	2,3	1,3	1,2
Kalium	2	1	—
Calcium	—	—	—

Tab. 9: Fortsetzung

	Gruppe 1 Kontrolle	Gruppe 2 Chol	Gruppe 3 Chol+Meth
<b>Gerinnungsparameter</b>			
INR	—	—	—
TPZ (Quick)	—	—	—
PTT	—	—	—
Fibrinogen	2	1	—
<b>Enzymaktivitäten</b>			
AP	—	—	—
LDH	—	—	—
CK	—	—	-
Amylase	2,3	1	1
Pankreas-Amylase	2,3	1	1
Lipase	2,3	1	1
<b>Nierenfunktionparameter</b>			
Harnstoff	—	—	—
Kreatinin	3	—	1
<b>Albumin</b>	—	—	—
<b>Gesamteiweiß</b>	—	—	—
<b>Vitamine</b>			
Vitamin E	2,3	1,3	1,2
Vitamin B <sub>6</sub>	2	1	—
<b>Glucose</b>			
Zentrallabor	—	—	—
Handmessgerät	—	—	—

Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

— Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

x Dieser Wert wurde nicht ausgewertet.

**Tab. 10:** Zusammenfassung der statistischen Auswertung der Ergebnisse der morphologischen Parameter (Zahlen entsprechend der Gruppenbezeichnung)

	Gruppe 1 Kontrolle	Gruppe 2 Chol	Gruppe 3 Chol+Meth
<b>Aortenbogen</b>			
Plaquerfläche	x	—	—
Gefäßfläche	2	1	—
Lumenfläche	2,3	1,3	1,2
<b>Zelluläre Zusammensetzung der Plaque</b>			
Endothelzellen	2,3	1	1
Zelldichte	x	—	—
Anteil proliferierender Zellen	x	—	—
Makrophagen	x	—	—
<b>Plaquerflächen in den einzelnen Segmenten des Gefäßbaums</b>			
A. carotis re	x	—	—
A. carotis li	x	—	—
Aortenbogen	x	—	—
Ao. thoracalis proximal	x	—	—
Ao. thoracalis distal	x	—	—
Ao. abdominalis	x	—	—
A. femoralis re	x	—	—
A. femoralis li	x	—	—

Tab. 10: Fortsetzung

	Gruppe 1 Kontrolle	Gruppe 2 Chol	Gruppe 3 Chol+Meth
<b>Gefäßfläche der einzelnen Segmente des Gefäßbaums</b>			
A. carotis re	3	—	1
A. carotis li	—	—	—
Aortenbogen	2	1	—
Ao. thoracalis proximal	2,3	1	1
Ao. thoracalis distal	—	—	—
Ao. abdominalis	—	—	—
A. femoralis re	—	—	—
A. femoralis li	—	—	—

Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

— Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

x Dieser Wert war nicht vorhanden.

**Tab. 11:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Belastungstests (Zeitpunkt des Erreichens des Maximums der Plasmakonzentration der jeweiligen Aminosäure und dessen Vielfaches im Vergleich zur Ausgangskonzentration)

	Tier 1	Tier 2
<b>25 mg Methionin/kg KG</b>		
Methionin	2,4fach / 2h	3,6fach / 2h
Homocystein	1,7fach / 2h	1,5fach / 2h
Cystathionin	1,4fach / 6h	1,6fach / 6h
<b>50 mg Methionin/kg KG</b>		
Homocystein	3,7fach / 2h	5,1fach / 2h
<b>100 mg Methionin/kg KG</b>		
Homocystein	16fach / 2h	15fach / 2h
<b>250 mg Methionin/kg KG</b>		
Homocystein	23fach / 6h	54fach / 6h

Tab. 11: Fortsetzung

	Tier 1	Tier 2
<b>500 mg Methionin/kg KG</b>		
Homocystein	20fach / 8h	44fach / 8h
<b>100 mg Methionin/kg KG und 0,2 mg Folsäure/kg KG</b>		
Methionin	19fach / 2h	12fach / 2h
Homocystein	21fach / 4h	27fach / 4h
Cystathionin	3,7fach / 4h	6,4fach / 6h
<b>100 mg Methionin/kg KG und 1,5 mg Vitamin B<sub>6</sub>/kg KG</b>		
Methionin	22fach / 2h	16fach / 2h
Homocystein	4,7fach / 6h	5,9fach / 6h
Cystathionin	2,9fach / 24h	1,7fach / 24h
<b>100 mg Methionin/kg KG, 0,2 mg Folsäure/kg KG und 0,01 mg Vitamin B<sub>12</sub>/kg KG</b>		
Methionin	20fach / 2h	20fach / 2h
Homocystein	4fach / 8h	7,6fach / 8h
Cystathionin	4,2fach / 8h	3,4fach / 24h
<b>Sonstige Aminosäuren vgl. Kapitel 3.9.4</b>		

## 4 Diskussion

### 4.1 Literaturübersicht

#### 4.1.1 Pathogenese der Atherosklerose

Die Arteriosklerose wird heutzutage als chronisch inflammatorische Erkrankung verstanden [33,102,103]. Kommt es in bereits arteriosklerotisch veränderten Gefäßen zur Bildung atheromatöser Plaques in der Intima und zur Sklerose mit Bindegewebsvermehrung, so wird dies als Atherosklerose bezeichnet. Die Atherosklerose kann sowohl einzelne Organe als auch das gesamte arterielle Gefäßsystem betreffen. Die klinischen Manifestationsformen sind vielfältig: sie können sich in Form von Herzrhythmusstörungen, als Herzinsuffizienz, als Angina pectoris, als plötzlicher Herztod oder als Herzinfarkt sowie als periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und zerebrovaskuläre Erkrankungen äußern. Die häufigste Manifestationsform ist die koronare Herzerkrankung (KHK) [54].

In den westlichen Industrieländern ist die KHK die häufigste Todesursache [12,88,137]. Im Jahr 2003 waren Erkrankungen des Herzkreislaufsystems in Deutschland für ca. 50 % der Todesfälle verantwortlich [112], in den USA für annähernd zwei Drittel der Todesfälle [54]. Weltweit sind 50 % aller Todesfälle auf die KHK zurückzuführen [54], ab einem Alter über 75 Jahren über 70 % [44].

Ausgehend von der Framingham-Studie, die prospektiv seit 1948 durchgeführt wird, konnten für die Atherosklerose zahlreiche Risikofaktoren identifiziert werden [54,55]. Unbeeinflussbare Risikofaktoren sind die familiäre Disposition, das Lebensalter und ein männliches Geschlecht. Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren zählen z. B. Fettstoffwechselstörungen mit Erhöhung von Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin und Triglyceriden und Erniedrigung von HDL-Cholesterin, Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen, Übergewicht, Bewegungsmangel und Stress. Weitere Risikofaktoren sind Antiphospholipid-Antikörper, ein erhöhter Lipoprotein (a)-Spiegel und eine Hyperhomo-

cysteinämie. Oft treten mehrere dieser Risikofaktoren gemeinsam auf, das Risiko einer KHK vervielfacht sich dabei [73].

Im Jahr 1986 stellte Ross die sogenannte „Response-to-injury“-Hypothese [32,101] auf, wonach der atherosklerotische Prozess mit Veränderungen am Endothel beginnt. Normalerweise trennt das Endothel Blutstrom und Gefäßwand, es produziert Prostazyklin ( $\text{PGI}_2$ ) und Stickstoffmonoxid (NO), welche eine antithrombotische Wirkung besitzen [47,67,72,104]; NO wirkt zudem blutdruckregulierend, indem es zur Relaxation der glatten Muskelzellen der Gefäßwand führt [56].

Wird das Endothel verletzt, so wird an dieser Stelle das Gerinnungssystem aktiviert. An der Verletzungsstelle können vermehrt LDL in die Gefäßwand eindringen und werden von den Endothelzellen oxidiert (oxLDL) [42,113]. Die verletzte Endothelzelle exprimiert „intracellular adhesion molecules“ (ICAM-1) und „vascular cell adhesion molecules“ (VCAM-1) auf ihrer Oberfläche. An diese Moleküle lagern sich Monozyten an und wandern in die Intima der Gefäßwand ein, wo sie als Makrophagen bezeichnet werden [21]. Die Makrophagen nehmen das oxidierte LDL auf und wandeln sich in Schaumzellen um [35,109].

Die aktivierten Makrophagen produzieren CSF (colony-stimulating factor) und stimulieren dadurch die eigene Proliferation. Sie gelten deshalb als der hauptsächlichste zelluläre Entzündungsmediator [101]. Sie regen über die Sekretion von PDGF (platelet-derived growth factor) die glatten Muskelzellen der Media zur Einwanderung in den subendothelialen Raum und zur dortigen Proliferation an. Außerdem oxidieren sie ebenso wie die Endothelzellen LDL zu oxLDL [7,93,99].

Das oxLDL hat auf Monozyten und Lymphozyten eine chemotaktische Wirkung, wirkt auf Endothelzellen und Makrophagen zytotoxisch und erhöht die Adhärenz von Thrombozyten und Monozyten an der Gefäßwand [9,24,25,46,68,91]. Durch diese Faktoren spielt das oxLDL eine entscheidende Rolle in der Frühphase der Atherogenese [43].



Die ersten morphologisch sichtbaren Veränderungen der Gefäßwand bestehen aus einer Ansammlung von Makrophagen, Schaumzellen, Lipiden und Lymphozyten und werden als „fatty streaks“ bezeichnet. Bei fortdauernder Einwirkung der atherogenen Noxen kommt es zu einer Vergößerung und anschließend zu einer Fibrosierung dieser fatty streaks, es bilden sich sogenannte fibröse Plaques. In diesen fibrösen Plaques bilden sich zentrale Nekrosen, in denen sich Cholesterinkristalle und Kalksalze ansammeln.

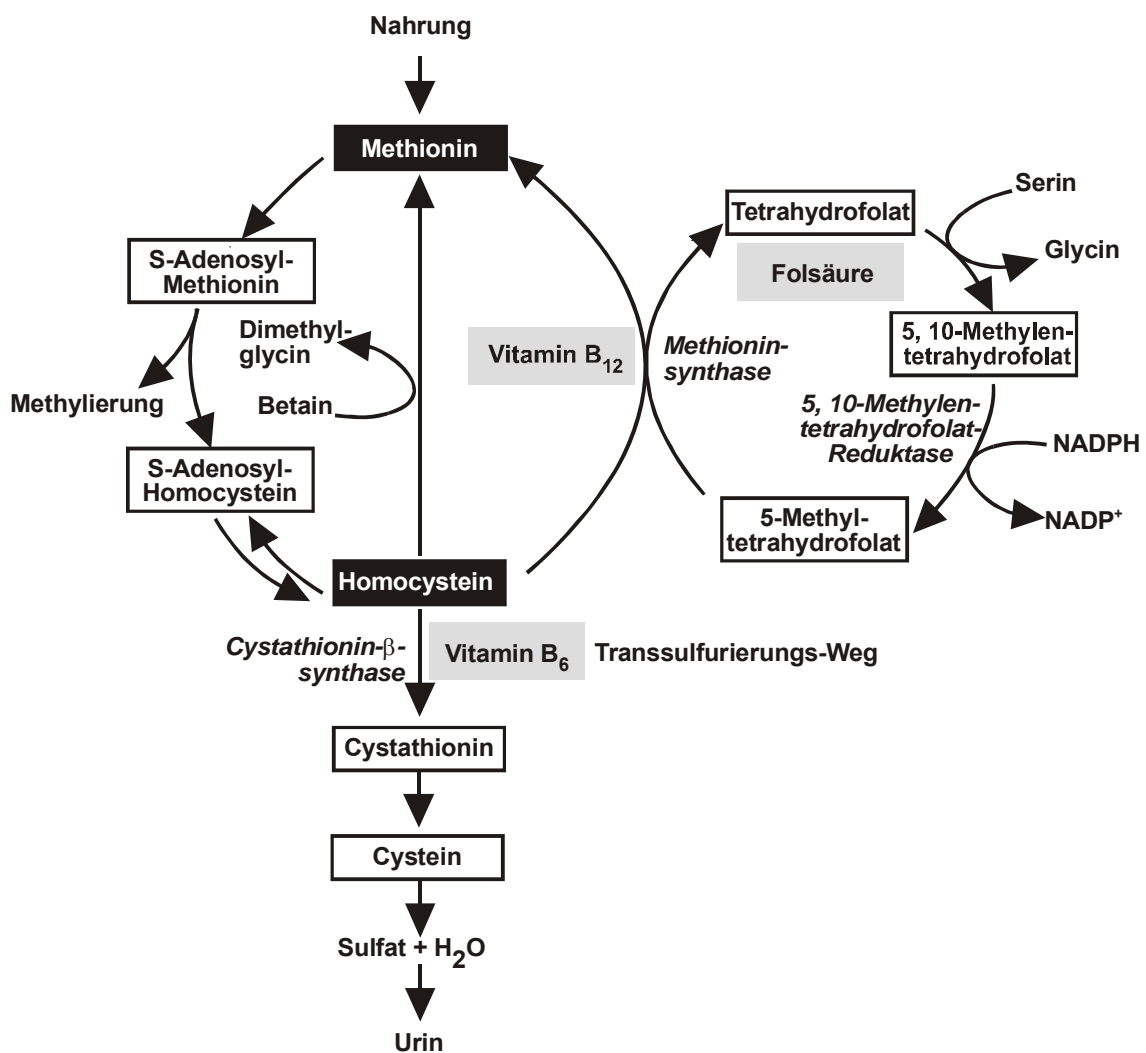
Klinische Symptome, wie z. B. eine Angina pectoris, zeigen sich oft erst, wenn >75 % des Gefäßlumens verschlossen sind. Wenn eine atheromatöse Plaque rupturiert, kann es zur Auflagerung eines Thrombus kommen. Es resultiert ein akuter Gefäßverschluss. Löst sich der Thrombus und wird in andere Gefäße eingeschwenmt, so werden diese verschlossen, es kommt zu einer Embolie.

#### **4.1.2 Homocystein**

##### **4.1.2.1 Homocystein-Metabolismus**

Homocystein wird im Intermediärstoffwechsel aus der essentiellen Aminosäure Methionin gebildet [75,95]. Wichtige Elemente in diesem Stoffwechsel sind die Vitamine B<sub>6</sub> (Pyridoxin), B<sub>12</sub> (Cobalamin) und Folsäure (N<sup>5</sup>-Methyl-Tetrahydrofolat) (**Abb. 25**). Ein Mangel an diesen Vitaminen führt zu einem verminderten Abbau von Homocystein [41,45].

Guttormsen et al. [37] untersuchten die Stoffwechselkinetik von Homocystein anhand eines oralen Homocystein-Belastungstests. Sie verabreichten 13 Probanden verschiedene Homocysteinformen in wässriger Lösung. Für die Bioverfügbarkeit von Homocystein errechneten sie 53 %. Die AUC der Homocystein-Plasmakonzentration war proportional der zugeführten Homocysteinmenge und wies nur geringe interindividuelle Unterschiede auf. Die Halbwertszeit betrug 223 ± 45 min. Die vorübergehende Hyperhomocysteinämie war stets mit einem Anstieg der Plasma-Methionin-Konzentration verbunden. Weniger als 2 % der zugeführten Homocysteinmenge wurden im Urin ausgeschieden.



**Abb. 25:** Metabolismus des Homocystein (modifiziert nach Mayer et al. [75])

Mit der Nahrung aufgenommene Methionin wird durch eine Reaktion mit ATP unter Bildung von S-Adenosyl-Methionin aktiviert. Das S-Adenosyl-Methionin überträgt seine Methylgruppe auf einen entsprechenden Akzeptor und wird dabei zu S-Adenosyl-Homocystein demethyliert, welches durch Hydrolyse in Adenosin und Homocystein aufgespalten wird.

Das so entstandene Homocystein wird zum größten Teil durch die Methionin-Synthase zu Methionin remethyliert. Bei dieser Reaktion dient Vitamin B<sub>12</sub> als Coenzym, Folsäure als Methylgruppen-Donator. In der Leber existiert mit dem Enzym Betain-Homocystein-Methyltransferase ein weiterer Remethylierungsweg.

Ist die Remethylierungskapazität des Organismus erschöpft, so kann Homocystein zusätzlich über den Transsulfierungsweg metabolisiert werden. Hierbei werden Homocystein und Serin mit Hilfe des Enzyms Cystathionin- $\beta$ -Synthase zu Cystathionin verstoffwechselt. Für diese Kondensation wird Vitamin B<sub>6</sub> als Koenzym benötigt. Durch die Transsulfierung entsteht Cystein. Cystein ist das Ausgangsprodukt für die Synthese von Taurin und 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat, welches im Urin bestimmt werden kann. Als weitere Abbauprodukte des Homocysteins entstehen  $\alpha$ -Ketobutyrat bzw. Propionyl-CoA und Methyl-Malonsäure.

Im Blut liegt Homocystein zu ca. 70-80 % proteingebunden vor. Ist diese Bindungskapazität erschöpft, so kommt freies Homocystein in verschiedenen Zustandsformen im Blutserum vor [71]. Homocystein entspricht dabei der reduzierten Form, Homocystin dem Dimer, Homocystein-Thiolacton einem Dipeptit und Homocystin-Cystin einem gemischten Disulfid [70]. Zwischen diesen verschiedenen Zustandsformen stellt sich rasch ein Gleichgewicht ein.

#### **4.1.2.2 Ursachen einer Hyperhomocysteinämie**

Von einer Hyperhomocysteinämie spricht man im Allgemeinen, wenn der Referenzbereich von 5-15  $\mu\text{mol/l}$  Serum im Nüchternzustand überschritten wird [125]. Van de Laak et al. [128] definierten die Grenzen zur Hyperhomocysteinämie für Männer bei 18,8  $\mu\text{mol/l}$  und für Frauen bei 16,3  $\mu\text{mol/l}$  Serum. Bei Männern liegt der Homocystein-Spiegel etwa 10 % über dem von Frauen [75], außerdem erhöht er sich mit zunehmenden Lebensalter [10].

Die Hyperhomocysteinämie wird in eine moderate (15-30  $\mu\text{mol/l}$ ), eine intermediäre (31-100  $\mu\text{mol/l}$ ) und eine schwere Hyperhomocysteinämie (>100  $\mu\text{mol/l}$ ) eingeteilt [53]. Eine homozygote Form der Homocysteinurie kann bei unbehandelten Patienten zu Homocystein-Plasmakonzentrationen von bis zu 500  $\mu\text{mol/l}$  führen. Bereits eine moderate Hyperhomocysteinämie gilt als Risikofaktor für atherosklerotische Veränderungen [11,36,106,110,119,139,140]. Eine Hyperhomocysteinämie kann genetisch bedingt sein. Ein Defekt der Enzyme Cystathionin- $\beta$ -Synthase, Methionin-Synthetase oder Methylentetra-

hydrofolat-Reduktase bewirkt eine Hyperhomocysteinämie, bei homozygotem Vorliegen kommt es zu einer Homocysteinurie [82]. Die Erkrankten leiden neben atherosklerotischen Gefäßveränderungen an einer mentalen Retardierung, neurologischen und ophthalmologischen Komplikationen und an Erkrankungen des Skelettsystems.

Als weitere Ursachen erhöhter Homocystein-Spiegel gelten Hyperthyreoidismus, eine chronische Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus, ausgeprägte Psoriasis, perniziöse Anämie, eine akute lymphatische Leukämie und andere Krebserkrankungen. Als selbstverursachte Risikofaktoren gelten bestimmte Medikamente, starker Kaffeeconsum und Rauchen [30,39,83,114,134].

Eine Hyperhomocysteinämie kann auch nahrungsbedingt sein. Tierische Proteine enthalten mehr Methionin als pflanzliche [30,79]. In den USA wird eine tägliche Methioninzufuhr von 0,9 g empfohlen, die tägliche Aufnahme beträgt jedoch etwa 2 g/d [27].

Ein weiterer nahrungsbedingter Faktor der Hyperhomocysteinämie ist ein Mangel an den Vitaminen B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> und Folsäure [107,121]. Bis zu 50 % der älteren Bevölkerung weisen Mangelzustände bei Folsäure und Vitamin B<sub>6</sub> auf. Ein Vitaminmangel ist in den meisten Fällen einer moderaten Hyperhomocysteinämie als ursächlicher Faktor zu sehen [11,30,75].

Zwischen der mit der Nahrung aufgenommenen Menge von Folsäure, Vitamin B<sub>6</sub> und B<sub>12</sub> und dem Homocystein-Spiegel im Plasma lässt sich eine inverse Korrelation feststellen [107]. Bei zwei Drittel der Patienten mit einer Hyperhomocysteinämie konnten niedrige Plasma-Spiegel dieser Vitamine gefunden werden. Ubbink et al. [124] stellten bei über 95 % der Patienten mit einem Folsäure- oder Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel eine Erhöhung des Homocystein-Spiegels fest. Eine weitere Studie von Ueland et al. [125] erbrachte ähnliche Ergebnisse. Der Mangel von Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub> gilt mittlerweile als sicherer Risikofaktor für eine Hyperhomocysteinämie. Bei Vitamin B<sub>6</sub> sind die Daten

widersprüchlich. So konnten z. B. Boushey et al. [11] bei alleiniger Gabe von Vitamin B<sub>6</sub> keine Besserung der Hyperhomocysteinämie beobachten.

Der Folsäure wird bei der Reduktion des Homocystein-Spiegels eine Schlüsselrolle zugesprochen [11,85,124]. Die Vitaminsubstitution stellt daher einen wichtigen therapeutischen Ansatz dar [13,51,65,92,97,108,115].

#### **4.1.2.3 Bedeutung des Homocysteins als Risikofaktor der Atherosklerose**

Bereits im Jahr 1969 vermutete McCully [76] anhand von Autopsiebefunden bei Patienten mit Homocysteinurie einen Zusammenhang zwischen der Homocystein-Konzentration und atherosklerotischen Gefäßveränderungen. Im Jahr 1975 veröffentlichten McCully und Wilson die „Homocystein-Theorie der Arteriosklerose“ [80], welche besagt, dass erhöhte Homocystein-Spiegel im Blut mit einem erhöhten Risiko vaskulärer Erkrankungen einher gehen.

Mittlerweile belegen zahlreiche weitere Studien die Assoziation zwischen erhöhtem Homocystein-Spiegel und Atherosklerose [11,27,28,58,75,90,98].

Clarke et al. [17] fanden bei KHK-Patienten in bis zu 30 % der Fälle eine Hyperhomocysteinämie. Stampfer et al. [110] konnten in der Physician's Health Study nachweisen, dass bei KHK-Patienten im Mittel signifikant höhere Homocystein-Werte vorlagen als bei vergleichbaren Kontrollpersonen. In dieser Studie wurden 7 % der Herzinfarkte einer Hyperhomocysteinämie zugeschrieben, das Herzinfarktrisiko von Patienten mit einer moderaten Hyperhomocysteinämie war gegenüber der Kontrollgruppe um das 3fache erhöht. Omland et al. [89] wiesen in einer Kohortenstudie nach, dass der Homocystein-Spiegel bei Einlieferung ins Krankenhaus einen Prognosefaktor für das Langzeitüberleben darstellt. Auch Nygård et al. [87] stellten eine hohe Korrelation zwischen Homocystein-Konzentration und Mortalität bei KHK-Patienten fest.

Boushey et al. [11] errechneten für eine Erhöhung der Plasmahomocystein-konzentration um 5 µmol/l eine Erhöhung des Herzinfarktrisikos bei Frauen um

80 % und bei Männern um 60 %. Im Jahr 1999 veröffentlichten Eikelboom et al. [30] eine Übersichtsarbeit über die bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten epidemiologischen Studien zum Zusammenhang zwischen erhöhtem Homocystein-Spiegel und dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass ein moderat erhöhter Homocystein-Spiegel ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellt.

In einer von von Eckardstein et al. [135] publizierten Studie wird ein enger Zusammenhang zwischen Homocystein-Konzentration und Fibrinogenkonzentration, Lebensalter und Plasmapviskosität festgestellt.

In zahlreichen weiteren Studien erwies sich eine Hyperhomocysteinämie als Risikofaktor für zerebrale und periphere Gefäßerkrankungen, Karotis-Stenosen und venöse Thromboembolien [5,11,20,52,75,87,94,105,106,141].

#### **4.1.2.4 Diskutierte Wirkungsmechanismen des Homocysteins auf die Atherogenese**

Die Aorta von methioningefütterten Ratten zeigte Degenerationen und eine Ablösung von Endothelzellen. An diesen Stellen lagerten sich Thrombozyten an, teilweise fanden sich Intimaödeme und Erosionen der Lamina elastica interna [74]. Das heißt, auch für den Wirkmechanismus von Homocystein wird die "Response-to-injury"-Hypothese von Ross [32,101] bei der Atheroskleroseentstehung angenommen.

Bei Affen, die mit einer methioninreichen, folsäurearmen Diät gefüttert wurden, konnte außerdem eine verminderte endothelabhängige Vasodilatation beobachtet werden [63], ebenso bei Patienten mit einer Hyperhomocysteinämie [139]. Diese verminderte Vasodilatation könnte durch eine Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit oder durch eine verminderte NO-Synthese verursacht werden [66,126]. Nach oraler Verabreichung von 100 mg L-Methionin/kg KG konnte bei gefäßgesunden Probanden eine inverse Korrelation zwischen Homocystein-konzentration und flussabhängiger Dilatation der Arteria brachialis festgestellt

werden [15]. Bei vorheriger Gabe von antioxidativ wirkendem Vitamin C konnte diese endotheliale Dysfunktion verhindert werden [84].

Bei einer Hyperhomocysteinämie wird Homocystein verstärkt zu Homocystin oxidiert, wodurch es zu einer gesteigerten Bildung reaktiver oxidativer Metabolite wie  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ , und  $\text{OH}^-$  kommt. Die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Hydroxylradikalen führt zu Endothelzellverletzungen [48,49]. Durch die Radikale wird NO inaktiviert, es entsteht der sogenannte oxidative Stress, d. h. es kommt zu einer verminderten Vasodilatation, einer gesteigerten Thrombozytenaggregation und einer verminderten antikoagulatorischen Aktivität [3,29,61,63].

Im Jahr 2000 veröffentlichten Chao et al. [16] eine Studie, in der untersucht wurde, ob bei gefäßgesunden Probanden nach oraler Gabe von 100 mg Methionin/kg KG ein altersabhängiger Effekt zwischen endothelabhängiger Vasodilatation und oxidativem Status vorhanden war. Dabei wurde kein Zusammenhang festgestellt; der gefäßschädigende Mechanismus wurde in einer direkten Reaktion des Homocysteins mit dem NO des Endothels gesehen.

Wie Ikeda et al. [50] in einer experimentellen Studie an kultivierten glatten Muskelzellen von Ratten nachweisen konnten, können die glatten Muskelzellen eines Gefäßes während einer Hyperhomocysteinämie vermehrt NO synthetisieren und damit teilweise die verminderte NO-Synthese der verletzten Endothelzellen kompensieren. Die zunehmende Aktivität der NO-Synthetase steht allerdings im Verdacht, zu einem entzündlichen Geschehen mit daraus resultierendem vermehrtem oxidativem Stress beizutragen [136].

Upchurch et al. [66,86] konnten bei Endothelzellen der Aorta von Rindern nach einer Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  Homocystein eine Abnahme der Aktivität der Glutathion-Peroxidase um bis zu 81 % feststellen. Die Glutathion-Peroxidase verhindert normalerweise eine Oxidation von NO.

Außerdem bewirkt Homocystein eine vermehrte Oxidation von LDL zu oxLDL und fördert dadurch die Bildung von Schaumzellen [77,96].

Von Durand et al. [29] wurde nachgewiesen, dass eine moderate Hyperhomocysteinämie mit einer erhöhten Thromboxansynthese einhergeht und somit zu einer erhöhten Thrombozytenaggregation führt. Von Eckardstein et al. [135] wiesen nach, dass eine Hyperhomocysteinämie zu einer vermehrten Synthese von Fibrinogen führt. Lentz et al. [63] zeigten bei Affen mit einer Hyperhomocysteinämie eine Abnahme des antikoagulatorisch wirkenden Thrombomodulins auf. In Zellkulturen aus Zellen der menschlichen Nabelschnur wiesen sie während der Inkubation mit Homocystein eine geringere Sekretion des von Willebrand-Faktors nach [62].

Tsai et al. [117,118] beobachteten, dass unter Zugabe von Homocystein glatte Muskelzellen von Gefäßen eine erhöhte DNA-Synthese aufwiesen, Endothelzellen hingegen einen Rückgang. Auch Majors et al. [69] konnten bei einer Homocystein-Konzentration von 50 µmol/l eine erhöhte Zelldichte glatter Muskelzellen und gleichzeitig eine erhöhte Kollagenkonzentration nachweisen. Dass die Zunahme der Kollagenkonzentration in glatten Muskelzellen von der Homocysteindosis abhängig ist, konnte von Tyagi [120] bestätigt werden.

Hofman et al. [45] wiesen nach, dass homocysteinhaltige Nahrung die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen bei Apo-E-defizienten Mäusen beschleunigt. Ebenso konnten sie zeigen, dass diese Entwicklung durch Zufütterung von Folsäure und Vitamin B<sub>6</sub> und B<sub>12</sub> verlangsamt werden kann.

#### **4.1.3 Methionin-Belastungstest**

Eine Möglichkeit, Personen zu identifizieren, die an einer (latenten) Hyperhomocysteinämie leiden, ist die Durchführung eines oralen Methionin-Belastungstests. Bis zu 50 % der Patienten, die an einer Hyperhomocysteinämie leiden, weisen einen normalen Nüchternwert der Plasma-Homocystein-Konzentration auf und können deshalb nur durch einen oralen Methionin-Belastungstest erkannt werden [128,131]. Die heute übliche Dosis zur Durchführung eines Belastungstests beträgt 100 mg Methionin/kg KG. Diese Dosis führt zu akut messbaren klinischen Veränderungen in Befinden und Stoffwechsel der Probanden [60]. Das am meisten beklagte Symptom nach



einem Belastungstest war Benommenheit [60]. Auch Fälle von Schläfrigkeit, Übelkeit, Polyurie und Veränderungen des Blutdrucks wurden beobachtet.

Krupkova-Meixnerova et al. [60] stellten während eines 30-tägigen Beobachtungszeitraums nach Durchführung eines oralen Methionin-Belastungstest mit 100 mg Methionin/kg KG keine erhöhte Mortalität der Probanden fest. Cottington et al. [18] dagegen berichten von einem Todesfall nach dieser Methionin-Dosis. Van de Laak et al. [128] versuchten daher, eine Strategie zu entwickeln, um die Anzahl benötigter Methionin-Belastungstests zu reduzieren. Sie definierten einen Nüchtern-Plasma-Homocystein-Spiegel über 16,3  $\mu\text{mol/l}$  bei Frauen und über 18,8  $\mu\text{mol/l}$  bei Männern bzw. einen Anstieg des Plasma-Homocystein-Spiegels um mehr als 42,3  $\mu\text{mol/l}$  nach Durchführung eines oralen Methionin-Belastungstests mit 100 mg Methionin/kg KG als Hyperhomocysteinämie. Für den Nüchtern-Plasma-Homocystein-Spiegel wurde ein Cutoff von 11,3  $\mu\text{mol/l}$  für Männer und von 9,4  $\mu\text{mol/l}$  für Frauen akzeptiert; gleichzeitig wird damit eine Sensitivität von 90 % akzeptiert. Wenn die Probanden Nüchtern-Plasma-Homocystein-Spiegel oberhalb dieser Grenze aufweisen, wird ein Belastungstest durchgeführt. Auf diese Art und Weise können 50-70 % der Methionin-Belastungstests eingespart werden.

Mehrere Autoren berichten von einer ausgeprägten intraindividuellen Variabilität des oralen Methionin-Belastungstests [122,130,131]. Van der Griend et al. [131] geben eine Variabilität von bis zu 20 % an. Die niedrigsten intra- und auch interindividuellen Unterschiede sind 4 Stunden nach Methionin-zufuhr zu messen. Ubbink et al. [122] empfehlen daher die Blutentnahme auf 6 Stunden nach Methionin-Verabreichung zu standardisieren.

Auch die Messung der Plasma-Homocystein-Konzentration ist nicht einheitlich. Homocystein kann mit verschiedenen Methoden bestimmt werden: Fluoreszierender Polarisations-Immunoassay (FPIA), HPLC mit fluoreszierender Detektion (HPLC-FD), HPLC mit elektrochemischer Detektion (HPLC-ED), Aminosäuren-Analyzer mit Ninhydrin-Detektion und Liquid Chromatography-Elektrospray Tandem Mass Spektrometrie (LC-MS/MS). Die verschiedenen Bestimmungsmethoden weisen einen mittleren Unterschied von 13 %

untereinander auf. Auch innerhalb der gleichen Bestimmungsmethode betrug die Abweichungen zwischen den verschiedenen Laboren bei den HPLC-Methoden zwischen 11 und 20 %. Am besten schnitt der FPIA mit 4,4 % Unterschied zwischen verschiedenen Laboren ab [40]. Hanson et al. [40] empfehlen daher, die Bestimmungsmethoden zu standardisieren und im gleichen Labor messen zu lassen.

In mehreren Studien wird ein oraler Methionin-Belastungstest mit verschiedenen Zusätzen kombiniert. Usui et al. [127] verabreichten mehreren gesunden Probanden 100 mg Methionin/kg KG, entweder mit dem Zusatz von 20 mg Folsäure/kg KG oder ohne Zusatz, anschließend maßen sie die Vasodilatation der Arteria brachialis und bestimmten den Plasma-Homocystein-Spiegel. Die Hyperhomocysteinämie bewirkte eine geringere Vasodilatation. Die Zugabe von Folsäure hatte keinen Einfluss auf die Hyperhomocysteinämie, sehr wohl aber auf die Vasodilatation: In der Folsäuregruppe war keine Endotheldysfunktion nachweisbar.

Van den Berg et al. [129] identifizierten mit Hilfe eines Methionin-Belastungstests 72 Probanden mit einer leichten Hyperhomocysteinämie. Diesen Probanden verabreichten sie täglich 250 mg Vitamin B<sub>6</sub> und 5 mg Folsäure. Nach 6 Wochen wiesen 66 der 72 Patienten nach dem Methionin-Belastungstest normale Homocystein-Plasmaspiegel auf. Nach 6 weiteren Wochen normalisierten sich die Plasma-Homocysteinwerte bei drei weiteren Probanden. Den übrigen drei Probanden wurde zusätzlich Vitamin B<sub>12</sub> verabreicht, wodurch sich auch bei diesen Probanden nach 6 Wochen normale Plasma-Homocysteinwerte einstellten. Van der Griend et al. [132] fanden eine negative Korrelation zwischen Folsäure-, Vitamin B<sub>6</sub>-, Vitamin B<sub>12</sub>- und Plasma-Homocystein-Spiegel und empfehlen daher eine tägliche Aufnahme von 0,5 mg Folsäure für Personen, die an einer Hyperhomocysteinämie leiden [130]. Ubbink et al. [123] konnten bei Vitamin-B<sub>6</sub>-defizienten Probanden nach einer 6wöchigen Vitamin-B<sub>6</sub>-Zufuhr von 20 mg/d niedrigere Plasma-Homocystein-Spiegel nach einem Methionin-Belastungstest feststellen als vor der Therapie. Bei Probanden, die zu Studienbeginn einen normalen Vitamin-B<sub>6</sub>-Status

aufwiesen, änderte die Vitamin-B<sub>6</sub>-Supplementation nichts an den Ergebnissen des Methionin-Belastungstests. Miller et al. [81] kommen in einer Studie an Vitamin-B<sub>6</sub>- und Folsäure-defizienten Ratten zu ähnlichen Ergebnissen. Ratten, die für 4 Wochen eine Vitamin-B<sub>6</sub>-arme Diät erhalten hatten, wiesen im Methionin-Belastungstest mit 100 mg Methionin/kg KG erhöhte Plasma-Homocystein-Spiegel auf. Ratten, die eine folsäurearme Diät erhalten hatten, wiesen dagegen normale Plasma-Homocystein-Spiegel auf.

#### **4.1.4 Wahl eines geeigneten Tiermodells**

An der Atherogenese, die sich über viele Jahre erstreckt, sind viele Risikofaktoren beteiligt. Daher ist der Mensch zur Untersuchung der Pathogenese der Atherosklerose wenig geeignet. Im Tiermodell können atherosklerotische Veränderungen jedoch relativ schnell induziert werden [138].

Bei Kaninchen sind atherosklerotische Veränderungen in sehr kurzer Zeit zu beobachten. Bei Gabe eines cholesterinhaltigen Futters (0,2-2 %) kommt es zu einer Hypercholesterinämie, die bereits nach 6 Wochen zu atherosklerotischen Veränderungen führt [31]. Die dabei entstehenden Plaques sind denen des Menschen makroskopisch sehr ähnlich und finden sich bevorzugt im Aortenbogen und im proximalen Anteil der Aorta [22,57,100].

Allerdings weist der Cholesterinmetabolismus beim Kaninchen als Pflanzenfresser einige Unterschiede zum Cholesterinmetabolismus des Menschen auf. Beim Menschen stellt das LDL den Großteil der Lipoproteinfraktion im Plasma dar, beim Kaninchen hingegen das VLDL [31]. Die physiologische Plasma-Gesamtcholesterinkonzentration beim Kaninchen beträgt <50 mg/dl, beim Menschen <200 mg/dl. Durch cholesterinhaltiges Futter werden beim Kaninchen Cholesterinkonzentrationen von bis zu 3000 mg/dl erreicht, wodurch es sehr schnell zu Lipid- und Cholesterinablagerungen in der arteriellen Gefäßwand kommt [21].

#### 4.1.5 Experimentelle Studien am Weißen Neuseelandkaninchen

An Weißen Neuseelandkaninchen wurden mehrere experimentelle Studien durchgeführt, um die Auswirkungen einer Hyperhomocysteinämie auf die Atherogenese zu untersuchen.

Im Jahr 1970 führten McCully und Ragsdale [79] eine Studie durch, bei der den Tieren eine mit Methionin angereicherte Diät (0,29 %), eine pyridoxinarme Diät mit einem Methioningehalt von 0,56 % und eine Diät mit 2 % Cholesterin verabreicht wurde. Zusätzlich wurden den Tieren täglich für 3-5 Wochen 20 bzw. 25 mg/kg KG DL-Homocystein-Thiolacton subcutan injiziert. Nach 35 Tagen wurde die Aorta der Tiere untersucht. Bei den Tieren, die das Homocystein-Thiolacton erhalten hatten, war die Aorta verdickt. Bei diesen Tieren und bei den Tieren, die die pyridoxinarme Diät erhalten hatten, zeigten sich frühe fibröse Plaques. Hatten die Tiere die cholesterinhaltige Diät erhalten zeigten sich Lipidablagerungen in den Plaques. Das Homocystein verursachte Schäden im elastischen Gewebe der Gefäße, Kalzifikationen, eine Ablagerung von Lipiden und Kollagen und eine myointimale Zellhyperplasie.

Donahue et al. [26] versuchten 1974 die Ergebnisse von McCully zu verifizieren, indem sie Weißen Neuseelandkaninchen über 35 Tage 5 oder 25 mg/kg KG Homocystein-Thiolacton subkutan injizierten. Es gelang ihnen allerdings nicht, einen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen nachzuweisen. Beide Gruppen zeigten Läsionen in der Aorta.

McCully und Wilson [80] verabreichten 1975 Weißen Neuseelandkaninchen Homocystein-Thiolacton, DL-Methionin oder Homocysteinsäure parenteral und oral. Sie konnten atherosklerotische Plaques in der Aorta und in den Arterien nachweisen. Bei hohen Dosen von parenteralem Methionin oder Homocystein-Thiolacton starben die Tiere an Lungenembolien oder Lungeninfarkten. Außerdem wurde eine schützende Wirkung von Vitamin B<sub>6</sub> vor Thrombose und Lungenembolie nachgewiesen, jedoch nicht vor atherosklerotischer Plaquebildung.

McCully et al. [78] führten 1990 eine weitere Studie an Weißen Neuseelandkaninchen durch. Sie verabreichten den Tieren atherogene Diäten aus Butter und Maisöl, zusätzlich erhielten die Tiere N-Homocystein-Thiolacton Retinamid Cobalamin, N-Homocystein-Thiolacton Retinamid oder Homocystein-Thiolacton Hydrochlorid. Alle drei Substanzen erhöhten dabei die Atherogenität der Diäten, wobei die Homocystein-Konzentration und die Konzentrationen von Gesamtcholesterin, LDL- und VLDL-Cholesterin mit der Größe der Plaques korrelierten.

Toborek et al. verabreichten 1995 Weißen Neuseelandkaninchen eine mit 0,3 % Methionin angereicherte Diät über einen Zeitraum von 6-9 Monaten [116]. Sie konnten Cholesterinablagerungen und Kalzifikationen in der Aorta der so behandelten Tiere nachweisen. Außerdem waren die Intimaflächen der Versuchstiere etwa 5-mal größer als die der Kontrollgruppe. Die antioxidative Enzymaktivität war in der Aortenwand erhöht und im Plasma vermindert. Die Aktivität der Katalase war gleich geblieben, die Aktivität der Superoxid-dismutase war in Aorta und Erythrozyten erhöht, die der Glutathionperoxidase erniedrigt.

Koyama [59] verabreichte 1995 Weißen Neuseelandkaninchen eine Diät mit 0,2 % Cholesterin, mit 3 % DL-Methionin oder mit 0,2 % Cholesterin + 3 % DL-Methionin. Nach 22 Wochen zeigten die Tiere mit methioninhaltiger Diät größere Fettablagerungen in der Aorta und höhere Homocystein-, Cystein- und Gesamtcholesterinkonzentrationen als die Tiere mit alleiniger cholesterinhaltiger Diät.

Narin et al. [85] führten 2002 einen Versuch mit 40 Weißen Neuseelandkaninchen durch. Sie teilten die Tiere in 4 Gruppen mit jeweils 10 Tieren. Gruppe 1 erhielt 100 mg Methionin/kg KG/d, Gruppe 2 erhielt zusätzlich 30 mg Vitamin B<sub>6</sub>/kg KG/d, Gruppe 3 erhielt zusätzlich 80 mg Vitamin B<sub>12</sub>/kg KG/d und Gruppe 4 zusätzlich 20 mg Folsäure/kg KG/d. Im Verlauf von 60 Tagen wurde den Tieren alle 20 Tage Blut entnommen. Gruppe 4 zeigte im Vergleich zu Gruppe 2 und 3 signifikant niedrigere Plasma-Homocystein-Spiegel. Die zusätzliche Gabe von Folsäure resultierte in reduzierten Plasma-Homocystein-

Spiegeln, die Gabe von Vitamin B<sub>12</sub> zeigte immerhin noch eine geringe Reduktion der Plasma-Homocystein-Spiegel, die Gabe von Vitamin B<sub>6</sub> hatte keine Auswirkungen. Die Autoren schließen daraus, dass eine alleinige Supplementierung mit Folsäure bereits genügen könnte, um die negativen Auswirkungen des Homocysteins zu vermindern.

## **4.2 Bewertung der eigenen Ergebnisse**

### **4.2.1 Auswirkung der verschiedenen Futterzusätze auf Plaquebildung und Lipidspiegel**

Im ersten Teil der vorliegenden Studie wurde untersucht, wie sich eine Hyperhomocysteinämie in Kombination mit einer Hypercholesterinämie auf die Plaqueentstehung und -zusammensetzung sowie die Lipidkonzentration auswirkte.

In der Kontrollgruppe, die Standardkaninchenfutter erhalten hatte, kam es zu keiner Plaquebildung. In Gruppe 2 mit cholesterinhaltigem Futter betrug die Plaquefläche im Median 5,4 mm<sup>2</sup>, in Gruppe 3 mit cholesterin- und methioninhaltigem Futter 2,9 mm<sup>2</sup>. Unter kombinierter Hypercholesterinämie und Hyperhomocysteinämie war die Plaquebildung um 46,3 % geringer als unter alleiniger Hypercholesterinämie. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Die Fläche des Gefäßquerschnitts im Aortenbogen war bei Gruppe 2 12,6 % kleiner als bei Gruppe 3 (15,9 mm<sup>2</sup> vs. 18,2 mm<sup>2</sup>); dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Das vorhandene Restlumen im Aortenbogen war bei Gruppe 3 um 27,5 % kleiner als bei Gruppe 2 (5,0 mm<sup>2</sup> vs. 6,9 mm<sup>2</sup>).

Die täglich aufgenommene Cholesterinmenge war bei Gruppe 2 und 3 vergleichbar (0,56 g Cholesterin/d vs. 0,53 g Cholesterin/d). Dennoch war die AUC der Cholesterinkonzentration der Gruppe 2 signifikant höher als bei Gruppe 3. Gruppe 2 wies während des gesamten Versuchsverlaufs höhere Plasma-Cholesterinkonzentrationen auf als Gruppe 3. Folglich könnte die

Hyperhomocysteinämie zu einem geringeren Anstieg des Plasma-Cholesterins geführt haben als eine alleinige Hypercholesterinämie. Koyama et al. [59] berichteten dagegen von erhöhten Plasma-Cholesterinkonzentrationen bei Kaninchen, die Cholesterin in Kombination mit Methionin erhalten hatten, verglichen mit Kaninchen, die nur Cholesterin erhalten hatten. Außerdem konnten sie einen höheren Lipidanteil in den entstandenen Plaques nachweisen. Auch McCully et al. [78] berichteten über einen erhöhten Lipidanteil in den Plaques bei kontinuierlicher Methionin- und Cholesteringabe.

Die in dieser Studie gemessenen Plasma-Cholesterinkonzentrationen in Gruppe 2 und 3 stiegen von ca. 600 mg/dl in Woche 4 bis auf ca. 1800 mg/dl in Woche 16. Damit entsprachen die gemessenen Werte in etwa denen, die in anderen Studien beobachtet wurden. Ameli et al. [2] gaben in ihrer Studie, bei der Weiße Neuseelandkaninchen Futter mit 1 % Cholesterin und verschiedenen LDL-Lösungen erhalten hatten, Cholesterinkonzentrationen von ca. 1000 mg/dl an. Aikawa et al. [1] fanden bei Gabe von Futter mit 0,3 % Cholesterinanteil Plasma-Cholesterinkonzentrationen von ca. 1500 mg/dl. Bei beiden Gruppen kam es zu Plaquebildungen in der Aorta. Bustos et al. [14] konnten mit einer 0,55%igen Cholesterindiät eine Plaquebildung in den Femoralarterien Weißer Neuseelandkaninchen induzieren, Giuriato et al. [34] konnten ab einer Plasma-Cholesterinkonzentration von 700 mg/dl eine beginnende Plaquebildung nachweisen. Sowohl Gruppe 2 als auch Gruppe 3 der eigenen Studie wiesen also Plasma-Cholesterinkonzentrationen auf, die als gesichert atherogen gelten, wobei die Plasma-Cholesterinspiegel der Gruppe 2 konstant über denen der Gruppe 3 lagen.

Die AUC des HDL-Cholesterins und damit dessen Anteil an der Lipidfraktion war bei Gruppe 3 um 32 % höher als bei Gruppe 2. Assmann et al. [6] konnten 1997 in einer prospektiven Studie mit 4849 männlichen Probanden einen erniedrigten Plasma-HDL-Spiegel als Risikofaktor eines Herzinfarkts oder Herztods identifizieren. Badimon et al. [8] konnten an atherosklerotischen Kaninchen nachweisen, dass eine erhöhte HDL-Konzentration die Ausdehnung von schon vorhandenen fatty streaks in der Kaninchen-Aorta reduzieren kann.

Berliner et al. [9] äußerten die Vermutung, dass HDL-assoziierte Enzyme an dieser inversen Relation von HDL-Konzentration und atherosklerotischem Risiko beteiligt seien. Auch Cremer et al. [19] konnten den gefäßprotektiven Effekt eines erhöhten HDL-Spiegels in einer prospektiven Kohortenstudie mit 5790 Probanden beobachten. Ob der in dieser Studie gemessene Unterschied von 32 % zur geringeren Plaquebildung in Gruppe 3 beiträgt, ist jedoch nicht abschließend zu klären.

Im Gegensatz dazu wirkt ein erhöhter Spiegel an LDL-Cholesterin atherogen. Assmann et al. [6]. z. B. wiesen in einer prospektiven Studie mit nahezu 5000 Probanden einen erhöhten LDL-Spiegel als Risikofaktor für Herzinfarkte nach. Andrews et al. [4] konnten nachweisen, dass eine Senkung des LDL-Spiegels im Blut von 40 Probanden, die an einer KHK erkrankt waren, zu einer Reduktion von ischämischen Ereignissen führte. Demer [23] bezeichnete LDL in einer Übersichtsarbeit als einen der Hauptfaktoren für eine Aortensklerose. Als Schwellenwert für eine schnelle Verkalkung von Aortenklappe und Koronarien wird eine LDL-Konzentration von  $>130$  mg/dl angegeben. Dieser für Menschen errechnete Wert wird von den Kaninchen in Gruppe 2 und 3 ab Woche 4 dauerhaft überschritten. Die AUC des LDL-Cholesterins betrug bei Gruppe 3 nur 60 % der AUC von Gruppe 2. Dies ist sicherlich ein ausschlaggebender Faktor für die geringere Plaquebildung bei Gruppe 3.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob die im Futter der Gruppe 3 enthaltene Methioninmenge zur Plaquebildung ausreichend war. Narin et al. [85] konnten mit einer täglichen Dosis von 100 mg Methionin/kg KG und verschiedenen Zusätzen auch nach einer nächtlichen Nüchternphase erhöhte Plasma-Homocystein-Spiegel bei Weißen Neuseelandkaninchen nachweisen. Leider wurden die Gefäße der Kaninchen nicht auf eine Plaquebildung hin untersucht. Toborek et al. [116] konnten mit einer Diät, deren Methioninanteil nur 0,3 % betrug, eine verstärkte Plaquebildung nachweisen. McCully et al. [80] konnten mit einer 0,29 %igen Methionin-Diät und Zugabe von 80 mg Methionin/kg KG eine verstärkte Plaquebildung auslösen.



Bei Betrachtung der AUC des Homocysteins im Plasma fand sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (Gruppe 1  $207 \pm 27,7 \mu\text{mol/l} \cdot 16$  Wochen, Gruppe 2  $172 \pm 39,7 \mu\text{mol/l} \cdot 16$  Wochen, Gruppe 3  $187 \pm 29,6 \mu\text{mol/l} \cdot 16$  Wochen), obwohl Gruppe 3 3-fach mehr Methionin aufgenommen hatte als Gruppe 2. Dies ist vermutlich durch die 12-stündige Nüchternphase vor der Blutentnahme bedingt. Zur Klärung dieser Frage wurden in einem zweiten Studienteil zusätzliche Methionin-Belastungstests durchgeführt; vor allem die Verstoffwechslung von Methionin im Plasma war hierbei von Interesse.

#### 4.2.2 Methionin-Belastungstests

Im zweiten Teil der vorliegenden Studie wurden an zwei Kaninchen Methionin-Belastungstests mit verschiedenen Methionin-Dosen und Zusätzen durchgeführt. Für die Dosierung  $100 \text{ mg Methionin/kg KG}$  allein oder in Kombination mit  $0,2 \text{ mg Folsäure/kg KG}$ , mit  $1,5 \text{ mg Vitamin B}_6/\text{kg KG}$  sowie mit  $0,2 \text{ mg Folsäure/kg KG}$  und  $0,01 \text{ mg Vitamin B}_{12}/\text{kg KG}$  wurden die Plasmaspiegel von Methionin, Homocystein und Cystathionin bestimmt.

Bei alleiniger Methionin-Gabe wurde mit  $299 \mu\text{mol/l}$  der niedrigste Methionin-Peak erreicht. Der zweithöchste Peak wurde bei Zugabe von Folsäure erreicht und lag bei  $571 \mu\text{mol/l}$ , der dritthöchste Peak wurde bei Zugabe von Folsäure und Vitamin  $\text{B}_{12}$  erreicht ( $770 \mu\text{mol/l}$ ). Der höchste Peak lag bei  $948 \mu\text{mol/l}$  und wurde bei Zugabe von Vitamin  $\text{B}_6$  erreicht.

Die Verteilung der Homocystein-Peaks steht in nahezu inversem Verhältnis zu dieser Beobachtung. Hier wird der höchste Peak bei Zugabe von Folsäure erreicht ( $286 \mu\text{mol/l}$ ), der zweithöchste Peak ohne Zusätze bei alleiniger Methionin-Gabe ( $204 \mu\text{mol/l}$ ), der dritthöchste Peak bei Zugabe von Folsäure und Vitamin  $\text{B}_{12}$  ( $145 \mu\text{mol/l}$ ). Der niedrigste Peak von  $127 \mu\text{mol/l}$  wird bei Zugabe von Vitamin  $\text{B}_6$  erreicht. Dieses Ergebnis entspricht den Untersuchungen von Miller et al. [81], die bei Vitamin- $\text{B}_6$ -defizienten Ratten durch Zufuhr von Vitamin  $\text{B}_6$  eine Senkung des Post-MLT-Plasma-Homocystein-Spiegels erreichen konnten. Folsäurezufuhr veränderte dagegen

die Homocystein-Plasmaspiegel nicht. Ob allerdings die beiden Kaninchen, an denen die Belastungstests durchgeführt wurden, auch ein Vitamin-B<sub>6</sub>-Defizit aufwiesen, wurde nicht bestimmt. Die Ergebnisse von Ubbink et al. [123] lassen jedoch vermuten, dass ein solches Defizit vorlag: In deren Versuch führte die Zufuhr von Vitamin B<sub>6</sub> bei Vitamin-B<sub>6</sub>-defizienten Probanden zu einer Senkung des Post-MLT-Plasma-Homocystein-Spiegels, bei Probanden, die normale Vitamin B<sub>6</sub>-Plasmaspiegel aufwiesen, änderte eine vermehrte Zufuhr von Vitamin B<sub>6</sub> nichts an den Ergebnissen des MLT. Guttormsen et al. [38] vertraten deshalb die These, dass das Vitamindefizit (in ihrer Studie Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub>) zu einem verstärkten Export von Homocystein aus dem Gewebe ins Plasma führt und dass die Funktion der Methionin-Synthase eine eher untergeordnete Rolle im Entstehungsmechanismus der Hyperhomocysteinämie spielt.

Usui et al. [127] konnten durch Zugabe von 20 mg/kg KG Folsäure zu 100 mg Methionin/kg KG ebenfalls keine Reduktion des Post-MLT-Plasma-Homocystein-Spiegels erreichen.

Diese Ergebnisse sind jedoch nicht unumstritten. Narin et al. [85] erzielten in einem Langzeitversuch an Weißen Neuseelandkaninchen durch die Zugabe von Vitamin B<sub>6</sub> bei hyperhomocysteinämischen Kaninchen keine Senkung des Homocystein-Spiegels, sehr wohl jedoch durch die Zufuhr von Folsäure.

Van der Griend et al. [131] empfehlen eine tägliche Zufuhr von 0,5 mg Folsäure über die Nahrung, um die Plasma-Homocystein-Konzentration zu senken. Im Jahr 2003 veröffentlichte die DACH-Liga Homocystein ein Konsensuspapier, in dem die tägliche Aufnahme von 0,4 mg Folsäure empfohlen wird [111]. Vermeulen et al. [133] stellten einen protektiven Effekt von Vitamin B<sub>6</sub> und Folsäure bei Patienten, die an einer vorzeitigen Atherosklerose litten, fest. Van den Berg et al. [129] konnten durch Gabe von Vitamin B<sub>6</sub> und Folsäure die Post-MLT-Plasma-Homocystein-Spiegel von hyperhomocysteinämischen Patienten wieder in den Normbereich senken.

Die Cystathionin-Peaks waren in den Gruppen wiederum unterschiedlich verteilt: Der höchste Peak wurde bei Verabreichung von Methionin in Kombination mit Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub> nach 8 h erreicht (31,2 µmol/l), der zweithöchste Peak bei Zusatz von Vitamin B<sub>6</sub> nach 24 h (24,8 µmol/l), der dritthöchste bei Zusatz von Folsäure nach 6 h (10,3 µmol/l) und der niedrigste Peak bei alleiniger Methionin-Gabe nach 4 h (9,1 µmol/l).

Insgesamt betrachtet hatte die alleinige Gabe von Methionin im Rahmen eines MLT die geringsten Auswirkungen. Durch die Vitaminzusätze scheinen die Stoffwechselfvorgänge aktiviert zu werden. Durch die geringe Anzahl der untersuchten Tiere sind jedoch Einflüsse durch intra- und interindividuelle Schwankungen nicht auszuschließen.

#### **4.2.3 Problematik der Studie und Schlussfolgerung**

Die Belastungstests mit den verschiedenen Zusätzen und den davon ableitbaren Aussagen zum Methionin-Homocystein-Metabolismus entsprechen den bekannten Stoffwechselwegen des Menschen. Eine atherosklerose-fördernde Wirkung einer mit Methionin angereicherten Diät und der dadurch induzierten Hyperhomocysteinämie konnte in dieser Studie jedoch nicht festgestellt werden.

Eine Schwierigkeit bei der Interpretation dieser Studie besteht darin, dass keine postprandialen Homocystein-Spiegel bestimmt wurden. So ist es nicht möglich, die langfristige Methioninapplikation unmittelbar mit der kurzfristigen Methioninapplikation der Belastungstests zu vergleichen. Geht man allerdings von einer Wachphase von 12 h aus und dass die Tiere in dieser Zeit ca. 4-mal Futter zu sich nehmen, so ergibt sich für die Tiere der Gruppe 3 bei einer durchschnittlichen täglichen Futteraufnahme von ca. 93 g/d eine Methioninaufnahme von 930 mg/d. Pro Mahlzeit entspricht dies einer Methioninaufnahme von 233 mg. Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 3520 g der Tiere der Gruppe 3 bei Versuchsende entspricht dies einer Methioninaufnahme von 66,2 mg Methionin/kg KG pro Mahlzeit. Diese Methioninmenge liegt im Bereich des in dieser Studie durchgeführten Methionin-

Belastungstests mit 50 mg Methionin/kg KG, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Maximalwerte der Homocystein-Konzentration jeweils ca. 2 h postprandial erreicht werden. Aufgrund der bei dieser Methionin-Menge gemessenen Plasma-Konzentration ist von einer Homocystein-Konzentration von ca. 70  $\mu\text{mol/l}$  auszugehen, die postprandial mehrmals pro Tag erreicht wurde. Nach einer 12-stündigen Nüchternphase entsprechen die gemessenen Plasma-Homocystein-Konzentrationen nahezu dem Normalwert. Da die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten fressen, ist ein Versuchsaufbau mit Bestimmung der unmittelbaren postprandialen Homocysteinkonzentration nur mit kontinuierlicher Beobachtung der Tiere möglich.

Auffallend bei der hier vorliegenden Studie ist ein Abfall des Vitamin B<sub>6</sub> bei allen 3 Gruppen im Versuchsverlauf. Ubbink et al. [123] konnten bei Vitamin-B<sub>6</sub>-defizienten Probanden höhere Post-MLT-Plasma-Homocystein-Spiegel feststellen als bei Nicht-Vitamin-B<sub>6</sub>-defizienten Kontrollpersonen. Miller et al. [81] kamen in einer Arbeit an Vitamin-B<sub>6</sub>-defizienten Ratten zu ähnlichen Ergebnissen. Ob der sinkende Vitamin-B<sub>6</sub>-Spiegel in dieser Studie einen Einfluss auf die Homocysteinkonzentration und damit auf die Plaquebildung hatte, kann nicht ausgeschlossen werden. In einer weiteren Studie sollte der Vitamin-B<sub>6</sub>-Spiegel und zusätzlich auch der Folsäure-Spiegel laufend kontrolliert werden. In dieser Studie bleibt die Rolle der Vitamine fraglich.

Eine weitere Verbesserung der Belastungstests wäre durch eine engmaschigere Blutkontrolle während der Belastungstests bis zur Normalisierung der jeweiligen Plasmaspiegel zu erreichen. Ubbink et al. [122] schlagen für einen Methionin-Belastungstest am Menschen eine standardisierte Homocystein-Bestimmung nach 6 Stunden vor. Um differenzierte Aussagen über den Methionin-Homocystein-Stoffwechsel zu treffen, ist jedoch eine häufigere Bestimmung notwendig; zusätzlich könnte der 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat-Gehalt des Urins bestimmt werden, um die Sättigung der Remethylierungskapazität von Homocystein zu Methionin zu kontrollieren.

Durch die Zufütterung von Methionin wurden in dieser Studie keine erhöhten Plasma-Homocysteinspiegel bei Messung nach 12-stündiger Nüchternphase

vor der Blutentnahme erreicht. Wie die durchgeführten Methionin-Belastungstests zeigten, müssen mehrmals pro Tag Homocysteinkonzentrationen vorgelegen haben, die einer intermediären Hyperhomocysteinämie entsprechen. Dennoch konnte keine verstärkte Plaquebildung nachgewiesen werden. Eine Hyperhomocysteinämie als ursächlicher Faktor der Atherosklerose ist deshalb aufgrund dieser Ergebnisse fraglich.

## 5 Zusammenfassung

Durch Atherosklerose ausgelöste Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems sind in Deutschland für ca. 50 % der Todesfälle verantwortlich. Die Risikofaktoren, die zur Bildung einer Atherosklerose führen, sind zahlreich: Lebensalter, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Hypertonie oder Verhaltensweisen wie Rauchen und Bewegungsmangel. Als weiterer Risikofaktor der Atherosklerose wird die Hyperhomocysteinämie diskutiert.

Homocystein wird im Intermediärstoffwechsel aus der essentiellen Aminosäure Methionin, welche mit der Nahrung aufgenommen wird, gebildet. Das entstandene Homocystein kann entweder zu Methionin remethyliert oder zu Cystathionin verstoffwechselt werden. Eine Hyperhomocysteinämie kann durch einen genetischen Defekt der am Abbau beteiligten Enzyme Cystathionin- $\beta$ -Synthase, Methionin-Synthetase oder Methylentetrahydrofolat-Reduktase entstehen, ebenso durch chronische Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus, starken Kaffeeconsum oder Rauchen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob eine artifizell induzierte Hyperhomocysteinämie direkt an der Atherogenese beteiligt ist.

Dazu wurden 24 Versuchstiere in drei Gruppen randomisiert. Jeweils acht Tiere erhielten während des gesamten Versuchs normales Kaninchenfutter, Futter mit einem Cholesterinanteil von 0,5 % oder Futter mit 0,5 % Cholesterin und 1 % Methionin.

Die Bestimmung der Blutparameter erfolgte jeweils nach einer 12-stündigen Nüchternphase zu Versuchsbeginn, nach 4, 8 und 12 Wochen und bei Versuchsende. Das Körpergewicht der Tiere wurde wöchentlich kontrolliert, ebenso die aufgenommene Futtermenge und somit auch die aufgenommene Cholesterin- und Methioninmenge.

Am Versuchsende wurde den Kaninchen der Gefäßbaum von der A. carotis bis zur A. femoralis entnommen. An definierten Abschnitten des Gefäßbaums

wurden die Plaquefläche, die Gesamtgefäßfläche und der Anteil der Plaque an der Gefäßfläche bestimmt. Zusätzlich wurde der Anteil von Makrophagen und Endothelzellen in den Plaques bestimmt.

Außerdem wurden an zwei Tieren orale Methionin-Belastungstests durchgeführt. Die Kaninchen erhielten dazu verschiedene Methionin-Dosen mit und ohne Zusatz von Vitaminen. Anschließend erfolgten über einen Zeitraum von 24 Stunden hinweg Blutentnahmen, bei denen der Verlauf der Plasmakonzentration von Methionin, Homocystein und Cystathionin beobachtet wurde.

Im Verlauf des Versuchs nahmen die Tiere aller drei Gruppen weniger Nahrung zu sich; der Rückgang war bei den Tieren der Gruppe 2 und 3 signifikant höher als bei den Tieren der Gruppe 1. Dies spiegelte sich im Verlauf des Körpergewichts wider: die Tiere der Gruppe 1 wogen bei Versuchsende ca. 16 % mehr als die Tiere der Gruppen 2 und 3. Parallel zur sinkenden Futteraufnahme sank die Cholesterin- und Methioninaufnahme zum Versuchsende hin ab. Die Tiere der Gruppe 2 nahmen während des Versuchs durchschnittlich 0,56 g Cholesterin pro Tag auf, die Tiere der Gruppe 3 0,53 g. Da auch das Normalfutter geringe Spuren von Methionin als essentieller Aminosäure enthielt, nahmen die Tiere der Gruppe 1 während des Versuchs durchschnittlich 0,42 g Methionin täglich auf, die Tiere der Gruppe 2 0,30 g und die Tiere der Gruppe 3 0,93 g. Die drei Gruppen unterschieden sich jeweils signifikant voneinander.

Bei Betrachtung der Area under the curve (AUC) des Cholesterins im Plasma zeigte sich der höchste Wert in Gruppe 2 (23515 mg/dl\*16 Wochen) und unterschied sich damit signifikant von Gruppe 3 (14548 mg/dl\*16 Wochen). In Gruppe 1 betrug die AUC des Cholesterins 451 mg/dl\*16 Wochen.

Bei der AUC des Homocysteins, gemessen nach einer 12-stündigen Nüchternphase vor der Blutentnahme, konnten keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen festgestellt werden.

Bei den Tieren der Gruppe 1 fanden sich bei Auswertung der Gefäßschnitte erwartungsgemäß keine Plaques. Die Plaquebildung in den Aortenbögen der Tiere der Gruppen 2 und 3 unterschied sich nicht signifikant voneinander ( $5,4 \text{ mm}^2$  [ $4,0-7,5 \text{ mm}^2$ ] vs.  $2,9 \text{ mm}^2$  [ $1,8-6,2 \text{ mm}^2$ ]). Die Gefäßfläche der Aortenbögen war bei den Tieren der Gruppe 1 am geringsten ( $15,6 \text{ mm}^2$ ) und unterschied sich von der Gefäßfläche der Tiere der Gruppe 2 ( $18,2 \text{ mm}^2$ ) signifikant. Der Aortenbogen der Tiere der Gruppe 3 wies die geringste Lumenfläche auf:  $5,0 \text{ mm}^2$  [ $4,9-6,2 \text{ mm}^2$ ], gefolgt von Gruppe 2 ( $6,9 \text{ mm}^2$  [ $6,1-7,7 \text{ mm}^2$ ]) und Gruppe 1 ( $9,8 \text{ mm}^2$  [ $9,1-10,3 \text{ mm}^2$ ]). Der Unterschied war zwischen allen drei Gruppen signifikant.

Bei den Belastungstests wurde bei einer Dosis von  $100 \text{ mg Methionin/kg KG}$  unabhängig von den Vitaminzusätzen das Maximum des Plasma-Methionin-Spiegels nach 2 Stunden erreicht. Nach 24 Stunden hatte sich die Methionin-Plasma-Konzentration nahezu normalisiert.

Bei  $100 \text{ mg Methionin/kg KG}$  in Kombination mit Folsäure wurde ein höherer Maximalwert der Plasma-Homocystein-Konzentration erreicht als bei alleiniger Methioningabe; bei Zugabe von Vitamin B<sub>6</sub> bzw. Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub> waren die Maximalwerte niedriger. Bei allen drei Zusätzen wurde das Maximum später erreicht.

Bei Verabreichung von verschiedenen Methionin-Dosen zwischen  $25$  und  $500 \text{ mg Methionin/kg KG}$  zeigte sich, dass die Verabreichung von  $25 \text{ mg Methionin/kg KG}$  eine nur geringe Veränderung der Plasma-Homocystein-Konzentration bewirkte. Die verschiedenen Maxima stiegen jeweils mit der Konzentration des Methionins an, zwischen  $250$  und  $500 \text{ mg Methionin/kg KG}$  unterschieden sich die Maxima jedoch kaum. Hier scheint ein Grenzwert erreicht zu sein.

Aufgrund der bei diesen Belastungstests gewonnenen Daten ist von einer Homocystein-Konzentration von ca.  $70 \mu\text{mol/l}$  auszugehen, die postprandial von den Kaninchen des ersten Versuchsteils mehrmals pro Tag erreicht wurde.



Zusätzlich wurde der Verlauf der Plasma-Cystathionin-Konzentration bei Verabreichung von 100 mg Methionin/kg KG allein oder mit Zusätzen verfolgt. Hier zeigte sich, dass die Kombination von Methionin, Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub> zu einem höheren und auch verspäteten Anstieg des Plasma-Cystathionin-Spiegels führte. Die Kombination von Methionin und Vitamin B<sub>6</sub> führte zu einem noch weiter verzögerten Anstieg.

Durch die Zufütterung von Methionin wurden in dieser Studie keine erhöhten Plasma-Homocysteinspiegel bei Messung nach 12-stündiger Nüchternphase vor der Blutentnahme erreicht. Wie die durchgeführten Methionin-Belastungstests zeigten, müssen mehrmals pro Tag Homocysteinkonzentrationen vorgelegen haben, die einer intermediären Hyperhomocysteinämie entsprechen. Dennoch konnte keine verstärkte Plaquebildung nachgewiesen werden. Eine Hyperhomocysteinämie als ursächlicher Faktor der Atherosklerose ist deshalb aufgrund dieser Ergebnisse fraglich.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton SK, Brinckerhoff CE, Sukhova GK, Libby P: Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma. A potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation* 1998;97:2433-2444.
2. Ameli S, Hultgårdh-Nilsson A, Regnström J, Calara F, Yano J, Cercek B, Shah PK, Nilsson J: Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1074-1079.
3. Andersson A, Hultberg B, Lindgren A: Redox status of plasma homocysteine and other plasma thiols in stroke patients. *Atherosclerosis* 2000;151:535-539.
4. Andrews TC, Raby K, Barry J, Naimi CL, Allred E, Ganz P, Selwyn AP: Effect of cholesterol reduction on myocardial ischemia in patients with coronary disease. *Circulation* 1997;95:324-328.
5. Aronow WS, Ahn C: Association between plasma homocysteine and peripheral arterial disease in older persons. *Coronary Artery Dis* 1998;9:49-50.
6. Assmann G, Schulte H, Cullen P: New and classical risk factors – the Münster Heart Study (PROCAM). *Eur J Med Res* 1997;2:237-242.
7. Aviram M: Macrophages and LDL oxidation. *Atherosclerosis* 1997;130:S2.
8. Badimon JJ, Badimon L, Fuster V: Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest* 1990;85:1234-1241.
9. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ: Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995;91:2488-2496.
10. Bostom AG, Silbershatz H, Rosenberg IH, Selhub J, D'-Agostino RB, Wolf PA, Jacques PF, Wilson PWF: Nonfasting plasma total homocysteine levels and all-cause and cardiovascular disease mortality in elderly Framingham men and women. *Arch Intern Med* 1999;159:1077-1080.

11. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG: A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995;274:1049-1057.
12. Bräsen JH, Niendorf A: Atherosklerose. Formale Pathogenese, Klassifikation und funktionelle Bedeutung. *Pathologe* 1997;18:218-227.
13. Brönstrup A, Pietrzik K: Bedeutung von Homocystein bei der Entstehung von Atherosklerose – Ist eine Supplementierung von Vitaminen sinnvoll? *Ernähr Umsch* 1996;43:80-87.
14. Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, Díaz C, Hernández G, Egido J: HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:2057-2064.
15. Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid OA, Kooner JS: Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia. An effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation* 1999;99:1156-1160.
16. Chao CL, Kuo TL, Lee YT: Effects of methionine-induced hyperhomocysteinemia on endothelium-dependent vasodilation and oxidative status in healthy adults. *Circulation* 2000;101:485-490.
17. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I: Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991;324:1149-1155.
18. Cottington EM, LaMantia C, Stabler SP, Allen RH, Tangerman A, Wagner C, Zeisel SH, Mudd SH: Adverse event associated with methionine loading test: a case report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1046-1050.
19. Cremer P, Nagel D, Mann H, Labrot B, Müller-Berninger R, Elster H, Seidel D: Ten-year follow-up results from the Goettingen Risk, Incidence and Prevalence Study (GRIPS). I. Risk factors for myocardial infarction in a cohort of 5790 men. *Atherosclerosis* 1997;129:221-230.
20. D'Angelo A, Selhub J: Homocysteine and thrombotic disease. *Blood* 1997;90:1-11.
21. De Meyer GR, Herman AG: Vascular endothelial dysfunction. *Prog Cardiovasc Dis* 1997;39:325-342.
22. De Meyer GRY, Bult H, Kockx MM, Herman AG: The effect of chronic treatment with NO donors during intimal thickening and fatty streak formation. *BioFactors* 1997;6:209-215.

23. Demer LL: Cholesterol in vascular and valvular calcification. *Circulation* 2001;104:1881-1883.
24. Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM: Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation* 1997;95:1760-1763.
25. Dimmeler S, Hermann C, Zeiher AM: Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis? *Eur Cytokine Netw* 1998;9:697-698.
26. Donahue S, Struman JA, Gaull G: Arteriosclerosis due to homocyst(e)inemia. Failure to reproduce the model in weanling rabbits. *Am J Pathol* 1974;77:167-163.
27. Duell PB, Malinow MR: Homocyst(e)ine: an important risk factor for atherosclerotic vascular disease. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:28-34.
28. Duell PB, Malinow MR: Lipid and metabolism - homocyst(e)inemia and risk of atherosclerosis: A clinical approach to evaluation and management. *Endocrinologist* 1998;8:170-177.
29. Durand P, Lussier-Cacan S, Blache D: Acute methionine load-induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis, and macrophage-derived tissue factor activity in rats. *FASEB J* 1997;11:1157-1168.
30. Eikelboom JW, Lonn E, Genest J, Jr., Hankey G, Yusuf S: Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999;131:363-375.
31. Finking G, Hanke H: Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis* 1997;135:1-7.
32. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992;326:242-250.
33. Futterman LG, Lemberg L: Inflammation in plaque rupture: an active participant or an invited guest? *Am J Crit Care* 1998;7:153-161.
34. Giuriato L, Scatena M, Chiavegato A, Zanellato AM, Guidolin D, Pauletto P, Sartore S: Localization and smooth muscle cell composition of atherosclerotic lesions in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 1993;13:347-359.

35. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS: Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:333-337.
36. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, Palma Reis RJ, Boers GH, Sheahan RG, Israelsson B, Uiterwaal CS et al.: Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997;277:1775-1781.
37. Guttormsen AB, Mansoor AM, Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum H: Kinetics of plasma homocysteine in healthy subjects after peroral homocysteine loading. *Clin Chem* 1993;39:1390-1397.
38. Guttormsen AB, Schneede J, Ueland PM, Refsum H: Kinetics of total plasma homocysteine in subjects with hyperhomocysteinemia due to folate or cobalamin deficiency. *Am J Clin Nutr* 1996;63:194-202.
39. Guttormsen AB, Ueland PM, Svarstad E, Refsum H: Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 1997;52:495-502.
40. Hanson NQ, Eckfeldt JH, Schwichtenberg K, Aras O, Tsai MY: Interlaboratory variation of plasma total homocysteine measurements: results of three successive homocysteine proficiency testing surveys. *Clin Chem* 2002;48:1539-1545.
41. Haynes WG: Hyperhomocysteinemia, vascular function and atherosclerosis: effects of vitamins. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002;16:391-399.
42. Heinecke JW: Cellular mechanisms for the oxidative modification of lipoproteins: implications for atherogenesis. *Coron Artery Dis* 1994;5:205-210.
43. Heinecke JW: Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:268-274.
44. Henderson A: Coronary heart disease: overview. *Lancet* 1996;348 (Suppl 1):s1-s4.
45. Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, Ferran LJ, Kohl B, Rao V, Kisiel W, Stern DM et al.: Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest* 2001;107:675-683.
46. Holvoet P, Collen D: Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J* 1994;8:1279-1284.

47. Holvoet P, Collen D: Thrombosis and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:320-328.
48. Hultberg B, Andersson A, Isaksson A: Metabolism of homocysteine, its relation to the other cellular thiols and its mechanism of cell damage in a cell culture line (human histiocytic cell line U-937). *Biochim Biophys Acta* 1995;1269:6-12.
49. Hultberg B, Andersson A, Isaksson A: The cell-damaging effects of low amounts of homocysteine and copper ions in human cell line cultures are caused by oxidative stress. *Toxicology* 1997;123:33-40.
50. Ikeda U, Ikeda M, Minota S, Shimada K: Homocysteine increases nitric oxide synthesis in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1999;99:1230-1235.
51. Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PWF, Rosenberg IH: The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999;340:1449-1454.
52. Kang SS, Wong PW, Cook HY, Norusis M, Messer JV: Protein-bound homocyst(e)ine. A possible risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1986;77:1482-1486.
53. Kang SS, Wong PWK, Malinow MR: Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 1992;12:279-298.
54. Kannel WB: Overview of atherosclerosis. *Clin Ther* 1998;20 (Suppl B):B2-B17.
55. Keil U: Prävention der klassischen Risikofaktoren. Eine bevölkerungsmedizinische und gesundheitspolitische Aufgabe. *Arzneim-Forsch /Drug Res* 1990;40:388-394.
56. Kinlay S, Ganz P: Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am J Cardiol* 1997;80:111-116.
57. Kitajima S, Sakuma S, Morimoto M: Macroscopic distribution of coronary atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. *Exp Anim* 1998;47:221-227.
58. Konecky N, Malinow MR, Tunick PA, Freedberg RS, Rosenzweig BP, Katz ES, Hess DL, Upson B, Leung B, Perez J, Kronzon I: Correlation between plasma homocyst(e)ine and aortic atherosclerosis. *Am Heart J* 1997;133:534-540.
59. Koyama J: The influence of methionine and its metabolites on the progression of atherosclerosis in rabbits. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 1995;62:596-604.

60. Krupkova-Meixnerova L, Vesela K, Vitova A, Janosikova B, Andel M, Kozich V: Methionine-loading test: evaluation of adverse effects and safety in an epidemiological study. *Clin Nutr* 2002;21:151-156.
61. Lentz SR, Malinow MR, Piegors DJ, Bhopatkar-Teredesai M, Faraci FM, Heistad DD: Consequences of hyperhomocyst(e)inemia on vascular function in atherosclerotic monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2930-2934.
62. Lentz SR, Sadler JE: Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum. *Blood* 1993;81:683-689.
63. Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM, Malinow MR, Heistad DD: Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996;98:24-29.
64. Libby P: The increasing significance of the unstable atheroma. *Newsletter of the International Atherosclerosis Society* 1999;8:2-3.
65. Lobo A, Naso A, Arheart K, Kruger WD, Abou GT, Alsous F, Nahlawi M, Gupta A, Moustapha A, van-Lente F, Jacobsen DW et al.: Reduction of homocysteine levels in coronary artery disease by low-dose folic acid combined with vitamins B6 and B12. *Am J Cardiol* 1999;83:821-825.
66. Loscalzo J: The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996;98:5-7.
67. Loskutoff DJ, Sawdey M, Keeton M, Schneiderman J: Regulation of PAI-1 gene expression in vivo. *Thromb Haemost* 1993;70:135-137.
68. Maggi E, Chiesa R, Melissano G, Castellano R, Astore D, Grossi A, Finardi G, Bellomo G: LDL oxidation in patients with severe carotid atherosclerosis. A study of in vitro and in vivo oxidation markers. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1892-1899.
69. Majors A, Ehrhart LA, Pezacka EH: Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2074-2081.
70. Mansoor MA, Bergmark C, Svardal AM, Lonning PE, Ueland PM: Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. Homocysteine and peripheral vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:232-240.

71. Mansoor MA, Guttormsen AB, Fiskerstrand T, Refsum H, Ueland PM, Svardal AM: Redox status and protein binding of plasma aminothiols during the transient hyperhomocysteinemia that follows homocysteine administration. *Clin Chem* 1993;39:980-985.
72. Marcus AJ, Safier LB, Hajjar KA, Ullman HL, Islam N, Broekman MJ, Eiroa AM: Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase. Thromboregulation by endothelial cells. *J Clin Invest* 1991;88:1690-1696.
73. Martin MJ, Hulley SB, Browner WS, Kuller LH, Wentworth D: Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet* 1986;2:933-936.
74. Matthias D, Becker CH, Riezler R, Kindling PH: Homocysteine induced arteriosclerosis-like alterations of the aorta in normotensive and hypertensive rats following application of high doses of methionine. *Atherosclerosis* 1996;122:201-216.
75. Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K: Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:517-527.
76. McCully KS: Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-128.
77. McCully KS: Chemical pathology of homocysteine. I. Atherogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 1993;23:477-493.
78. McCully KS, Olszewski AJ, Vezeridis MP: Homocysteine and lipid metabolism in atherogenesis: effect of the homocysteine thiolactonyl derivatives, thioretinaco and thioretinamide. *Atherosclerosis* 1990;83:197-206.
79. McCully KS, Ragsdale BD: Production of arteriosclerosis by homocysteinemia. *Am J Pathol* 1970;61:1-11.
80. McCully KS, Wilson RB: Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 1975;22:215-227.
81. Miller JW, Nadeau MR, Smith D, Selhub J: Vitamin B-6 deficiency vs folate deficiency: comparison of responses to methionine loading in rats. *Am J Clin Nutr* 1994;59:1033-1039.
82. Miner SES, Evrovski J, Cole DEC: Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem* 1997;30:189-201.



83. Moustapha A, Naso A, Nahlawi M, Gupta A, Arheart KL, Jacobsen DW, Robinson K, Dennis VW: Prospective study of hyperhomocysteinemia as an adverse cardiovascular risk factor in end-stage renal disease *Circulation* 1998;97:138-141.
84. Nappo F, De Rosa N, Marfella R, De Lucia D, Ingrosso D, Perna AF, Farzati B, Giugliano D: Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA* 1999;281:2113-2118.
85. Narin F, Narin N, Akcakus M, Ustidal M, Karakucuk I, Halici C: The effect of folic acid, vitamin B6 and vitamin B12 on the homocysteine levels in rabbits fed by methionine-enriched diets. *Tohoku J Exp Med* 2002;198:99-105.
86. Nishio E, Watanabe Y: Homocysteine as a modulator of platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells: a possible role for hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol* 1997;122:269-274.
87. Nygård O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE: Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997;337:230-236.
88. Obermann K, Graf v.d.Schulenburg J-M, Mautner GC: Ökonomische Analyse der Sekundärprävention der koronaren Herzkrankheit mit Simvastatin (Zocor®) in Deutschland. *Med Klin* 1997;92:686-694.
89. Omland T, Samuelsson A, Hartford M, Herlitz J, Karlsson T, Christensen B, Caidahl K: Serum homocysteine concentration as an indicator of survival in patients with acute coronary syndromes. *Arch Intern Med* 2000;160:1834-1840.
90. Pels K, Schoebel F-C, Stein D, Jax TW, Heins M, Behnke R, Reinauer H, Strauer B-E, Leschke M: Homocystein. Bedeutung für Schweregrad und Ausmaß der Koronarsklerose bei angiographisch definierter koronarer Herzkrankheit. *Münch med Wschr* 1997;139:149-153.
91. Penn MS, Chisolm GM: Oxidized lipoproteins, altered cell function and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1994;108 (Suppl):S21-S29.
92. Pietrzik K, Prinz-Langenohl R, Dierkes J: Die Beeinflussung des Homocysteinspiegels durch nutritive Gaben der Vitamine B12, B6 und Folsäure. *Vitaminspur* 1995;10:150-154.
93. Raines EW, Ross R: Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 1993;69 (Suppl):S30-S37.

94. Ray JG: Meta-analysis of hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thromboembolic disease. *Arch Intern Med* 1998;158:2101-2106.
95. Refsum H, Ueland PM, Nygård O, Vollset SE: Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998;49:31-62.
96. Resch K-L, Till U, Riezler R, Pütter S: Homocystein. Störungen des B<sub>6</sub>-, B<sub>12</sub>- und Folsäure-Metabolismus. Beziehungen zwischen Homocysteinämie und atherosklerotischen, neurologischen und geriatrischen Erkrankungen. *Ponte Press, Bochum* 1994.
97. Rimm EB, Willett WC, Hu FB, Sampson L, Colditz GA, Manson JE, Hennekens C, Stampfer MJ: Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA* 1998;279:359-364.
98. Robinson K, Gupta A, Dennis V, Arheart K, Chaudhary D, Green R, Vigo P, Mayer EL, Selhub J, Kutner M, Jacobsen DW: Hyperhomocysteinemia confers an independent increased risk of atherosclerosis in end-stage renal disease and is closely linked to plasma folate and pyridoxine concentrations. *Circulation* 1996;94:2743-2748.
99. Rosenfeld ME, Khoo JC, Miller E, Parthasarathy S, Palinski W, Witztum JL: Macrophage-derived foam cells freshly isolated from rabbit atherosclerotic lesions degrade modified lipoproteins, promote oxidation of low-density lipoproteins, and contain oxidation-specific lipid-protein adducts. *J Clin Invest* 1991;87:90-99.
100. Rosenfeld ME, Tsukada T, Gown AM, Ross R: Fatty streak initiation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 1987;7:9-23.
101. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809.
102. Ross R: Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
103. Ross R: Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999;138:S419-S420.
104. Sawdey MS, Loskutoff DJ: Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in vivo. Tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 1991;88:1346-1353.

105. Selhub J, D'Angelo A: Hyperhomocysteinemia and thrombosis: acquired conditions. *Thromb Haemost* 1997;78:527-531.
106. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, O'Leary DH, Wolf PA, Schaefer EJ, Rosenberg IH: Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med* 1995;332:286-291.
107. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH: Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993;270:2693-2698.
108. Siri PW, Verhoef P, Kok FJ: Vitamins B-6, B-12, and folate: Association with plasma total homocysteine and risk of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Nutr* 1998;17:435-441.
109. Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D: A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1989;264:2599-2604.
110. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, Tishler PV, Hennekens CH: A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992;268:877-881.
111. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M: DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1392-1403.
112. Statistisches Bundesamt: Statistisches Jahrbuch 2004 für die Bundesrepublik Deutschland. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2004.
113. Steinberg D: Antioxidants and atherosclerosis. A current assessment. *Circulation* 1991;84:1420-1425.
114. Stolzenberg SR, Miller ER, Maguire MG, Selhub J, Appel LJ: Association of dietary protein intake and coffee consumption with serum homocysteine concentrations in an older population. *Am J Clin Nutr* 1999;69:467-475.
115. Sydow K, Böger RH: Homocyst(e)in, endotheliale Dysfunktion und kardiovaskuläres Risiko. Pathomechanismen und therapeutische Optionen. *Z Kardiol* 2001;90:1-11.

116. Toborek M, Kopieczna-Grzebieniak E, Drózd M, Wieczorek M: Increased lipid peroxidation as a mechanism of methionine-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 1995;115:217-224.
117. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R, Lee ME: Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6369-6373.
118. Tsai JC, Wang H, Perrella MA, Yoshizumi M, Sibinga NE, Tan LC, Haber E, Chang TH, Schlegel R, Lee ME: Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1996;97:146-153.
119. Tsai MY: Moderate hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *J Lab Clin Med* 2000;135:16-25.
120. Tyagi SC: Homocysteine redox receptor and regulation of extracellular matrix components in vascular cells. *Am J Physiol* 1998;274:C396-C405.
121. Ubbink JB: The role of vitamins in the pathogenesis and treatment of hyperhomocyst(e)inaemia. *J Inherit Metab Dis* 1997;20:316-325.
122. Ubbink JB, Becker PJ, Delport R, Bester M, Riezler R, Vermaak WJ: Variability of post-methionine load plasma homocysteine assays. *Clin Chim Acta* 2003;330:111-119.
123. Ubbink JB, van der MA, Delport R, Allen RH, Stabler SP, Riezler R, Vermaak WJ: The effect of a subnormal vitamin B-6 status on homocysteine metabolism. *J Clin Invest* 1996;98:177-184.
124. Ubbink JB, Vermaak WJ, van-der-Merwe A, Becker PJ: Vitamin B-12, vitamin B-6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr* 1993;57:47-53.
125. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH: Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993;39:1764-1779.
126. Ungvari Z, Pacher P, Rischák K, Szollár L, Koller A: Dysfunction of nitric oxide mediation in isolated rat arterioles with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1899-1904.
127. Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T: Endothelial dysfunction by acute hyperhomocyst(e)inaemia: restoration by folic acid. *Clin Sci (Lond)* 1999;96:235-239.

128. van de Laak MF, Grobbee DE, van der Griend R, de Valk HW, Algra A, Banga JD, van der Graaf Y: A 2-step strategy to reduce the need for methionine-loading tests to diagnose hyperhomocysteinemia. *J Lab Clin Med* 2003;142:121-127.
129. van den Berg M, Franken DG, Boers GH, Blom HJ, Jakobs C, Stehouwer CD, Rauwerda JA: Combined vitamin B6 plus folic acid therapy in young patients with arteriosclerosis and hyperhomocysteinemia. *J Vasc Surg* 1994;20:933-940.
130. van der Griend R, Biesma DH, Banga JD: Hyperhomocysteinaemia as a cardiovascular risk factor: an update. *Neth J Med* 2000;56:119-130.
131. van der Griend R, Biesma DH, Banga JD: Postmethionine-load homocysteine determination for the diagnosis hyperhomocysteinaemia and efficacy of homocysteine lowering treatment regimens. *Vasc Med* 2002;7:29-33.
132. van der Griend R, Haas FJ, Duran M, Biesma DH, Meuwissen OJ, Banga JD: Methionine loading test is necessary for detection of hyperhomocysteinemia. *J Lab Clin Med* 1998;132:67-72.
133. Vermeulen EG, Stehouwer CD, Twisk JW, van den Berg M, de Jong SC, Mackaay AJ, van Campen CM, Visser FC, Jakobs CA, Bulterjys EJ, Rauwerda JA: Effect of homocysteine-lowering treatment with folic acid plus vitamin B6 on progression of subclinical atherosclerosis: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2000;355:517-522.
134. von Eckardstein A, Assmann G: Homocystein und Atherogenese. *Internist* 1998;39:214-215.
135. von Eckardstein A, Malinow MR, Upson B, Heinrich J, Schulte H, Schonfeld R, Kohler E, Assmann G: Effects of age, lipoproteins, and hemostatic parameters on the role of homocyst(e)inemia as a cardiovascular risk factor in men. *Arterioscler Thromb* 1994;14:460-464.
136. Welch GN, Upchurch-GR J, Farivar RS, Pigazzi A, Vu K, Brecher P, Keaney-JF J, Loscalzo J: Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular smooth-muscle cells by NF-kappa B-dependent transcriptional activation of Nos2. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110:22-31.
137. Wiesner G, Grimm J, Bittner E: Zum Herzinfarktgeschehen in der Bunderepublik Deutschland. Prävalenz, Inzidenz, Trend, Ost-West-Vergleich. *Gesundheitswesen* 1999;61:S72-S78.

138. Wissler RW, Vesselinovitch D. Differences between human and animal atherosclerosis. In: Schettler G, Weizel A, editors. *Atherosclerosis III*. Berlin: Springer, 1974: 319-325.
139. Woo KS, Chook P, Lolin YI, Cheung ASP, Chan LT, Sun YY, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS: Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 1997;96:2542-2544.
140. Yoo JH, Park JE, Hong KP, Lee SH, Kim DK, Lee WR, Park SC: Moderate hyperhomocyst(e)inemia is associated with the presence of coronary artery disease and the severity of coronary atherosclerosis in Koreans. *Thromb Res* 1999;94:45-52.
141. Yoo J-H, Chung C-S, Kang S-S: Relation of plasma homocyst(e)ine to cerebral infarction and cerebral atherosclerosis. *Stroke* 1998;29:2478-2483.

## 7 Anhang

**Tab. A1:** Durchschnittliche Futteraufnahme (g/d) über die gesamte Versuchsdauer (Median mit 25%- und 75%-Quartil)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
Woche 1	151 [124-170]	129 [101-147]	103 [44-104]
Woche 2	163 [151-183]	157 [137-178]	130 [102-143]
Woche 3	163 [153-196]	152 [117-159]	135 [117-142]
Woche 4	142 [124-164]	98 [84-127]	108 [70-119]
Woche 5	146 [135-166]	125 [106-134]	125 [102-131]
Woche 6	138 [124-142]	113 [100-131]	105 [86-125]
Woche 7	157 [137-191]	109 [105-127]	98 [93-99]
Woche 8	136 [127-143]	94 [76-100]	76 [68-93]
Woche 9	131 [108-143]	100 [94-110]	97 [91-104]
Woche 10	130 [106-156]	82 [77-88]	74 [68-77]
Woche 11	141 [127-151]	109 [91-121]	96 [92-104]
Woche 12	143 [122-169]	86 [69-89]	77 [72-83]
Woche 13	131 [116-157]	84 [65-94]	90 [77-98]
Woche 14	135 [108-160]	86 [80-90]	80 [72-93]
Woche 15	109 [82-114]	62 [45-66]	55 [51-60]
Woche 16	109 [94-113]	77 [45-81]	75 [60-77]
Futterauf- nahme pro Tag	138 [122-154] <sup>2,3</sup>	98,5 [91,1-110] <sup>1</sup>	92,6 [89,2-101] <sup>1</sup>

Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

**Tab. A2:** Durchschnittliche Cholesterinaufnahme (g/d) über die gesamte Versuchsdauer (Median mit 25%- und 75%-Quartil)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
Woche 1	0	0,65 [0,50-0,73]	0,51 [0,22-0,52]
Woche 2	0	0,79 [0,68-0,89]	0,65 [0,51-0,72]
Woche 3	0	0,76 [0,58-0,79]	0,68 [0,58-0,71]
Woche 4	0	0,49 [0,42-0,64]	0,54 [0,35-0,60]
Woche 5	0	0,63 [0,53-0,67]	0,63 [0,51-0,66]
Woche 6	0	0,57 [0,51-0,66]	0,52 [0,43-0,63]
Woche 7	0	0,55 [0,52-0,64]	0,49 [0,46-0,50]
Woche 8	0	0,47 [0,38-0,50]	0,38 [0,34-0,46]
Woche 9	0	0,50 [0,46-0,55]	0,48 [0,45-0,52]
Woche 10	0	0,41 [0,39-0,44]	0,37 [0,34-0,39]
Woche 11	0	0,55 [0,46-0,61]	0,48 [0,46-0,52]
Woche 12	0	0,43 [0,35-0,45]	0,38 [0,36-0,42]
Woche 13	0	0,42 [0,33-0,47]	0,45 [0,38-0,49]
Woche 14	0	0,44 [0,40-0,45]	0,40 [0,36-0,47]
Woche 15	0	0,31 [0,23-0,34]	0,28 [0,26-0,30]
Woche 16	0	0,39 [0,22-0,41]	0,38 [0,30-0,39]
Cholesterin- aufnahme pro Tag	0	0,56 [0,52-0,63]	0,53 [0,51-0,57]



**Tab. A3:** Durchschnittliche Methioninaufnahme (g/d) über die gesamte Versuchsdauer (Median mit 25%- und 75%-Quartil)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
Woche 1	0,45 [0,37-0,51]	0,39 [0,30-0,44]	1,03 [0,44-1,04]
Woche 2	0,49 [0,45-0,55]	0,47 [0,41-0,53]	1,30 [1,02-1,43]
Woche 3	0,49 [0,46-0,59]	0,45 [0,35-0,48]	1,35 [1,17-1,42]
Woche 4	0,43 [0,37-0,49]	0,29 [0,25-0,38]	1,08 [0,70-1,19]
Woche 5	0,44 [0,40-0,50]	0,37 [0,32-0,40]	1,25 [1,02-1,31]
Woche 6	0,41 [0,37-0,43]	0,34 [0,30-0,39]	1,05 [0,86-1,25]
Woche 7	0,47 [0,41-0,57]	0,33 [0,31-0,38]	0,98 [0,93-0,99]
Woche 8	0,41 [0,38-0,43]	0,28 [0,23-0,30]	0,76 [0,68-0,93]
Woche 9	0,39 [0,32-0,43]	0,30 [0,28-0,33]	0,97 [0,91-1,04]
Woche 10	0,39 [0,32-0,47]	0,24 [0,23-0,26]	0,74 [0,68-0,77]
Woche 11	0,42 [0,38-0,45]	0,33 [0,27-0,36]	0,96 [0,92-1,04]
Woche 12	0,43 [0,37-0,51]	0,26 [0,21-0,27]	0,77 [0,72-0,83]
Woche 13	0,39 [0,35-0,47]	0,25 [0,20-0,28]	0,90 [0,77-0,98]
Woche 14	0,40 [0,32-0,48]	0,26 [0,24-0,27]	0,80 [0,72-0,93]
Woche 15	0,33 [0,25-0,54]	0,19 [0,14-0,20]	0,55 [0,51-0,60]
Woche 16	0,33 [0,28-0,34]	0,23 [0,08-0,24]	0,75 [0,60-0,77]
Methionin- aufnahme pro Tag	0,42 [0,36-0,46] <sup>2,3</sup>	0,30 [0,27-0,33] <sup>1,3</sup>	0,93 [0,89-1,01] <sup>1,2</sup>

Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

**Tab. A4:** Körpergewicht (g) im Versuchsverlauf (Median mit 25%- und 75%-Quartil)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
Woche 0	3310 [3195-3945]	3430 [3160-3440]	3320 [3120-3520]
Woche 1	3530 [3225-3595]	3480 [3185-3670]	3520 [3380-3580]
Woche 2	3590 [3280-3655]	3490 [3210-3685]	3400 [3280-3460]
Woche 3	3610 [3340-3760]	3510 [3295-3745]	3480 [3360-3620]
Woche 4	3680 [3420-3890]	3580 [3345-3840]	3380 [3260-3660]
Woche 5	3790 [3465-4005]	3500 [3365-3880]	3460 [3420-3640]
Woche 6	3830 [3520-4000]	3510 [3390-3880]	3580 [3300-3640]
Woche 7	3870 [3515-3930]	3570 [3405-3945]	3560 [3300-3660]
Woche 8	3940 [3535-4140]	3500 [3445-3915]	3560 [3260-3600]
Woche 9	3890 [3600-4015]	3490 [3360-3940]	3580 [3260-3580]
Woche 10	4010 [3600-4180]	3490 [3390-4040]	3580 [3280-3640]
Woche 11	4010 [3700-4315]	3490 [3405-3925]	3560 [3240-3600]
Woche 12	4030 [3680-4335]	3570 [3415-4055]	3600 [3460-3680]
Woche 13	4130 [3775-4455]	3600 [3390-3910]	3580 [3340-3680]
Woche 14	4080 [3765-4470]	3520 [3415-3885]	3580 [3520-3680]
Woche 15	4150 [3795-4500]	3530 [3365-3830]	3560 [3520-3620]
Woche 16	4210 [3880-4650] <sup>2,3</sup>	3520 [3380-3880] <sup>1</sup>	3520 [3440-3560] <sup>1</sup>
Differenz Anfangs- und Endgewicht	760 [-15-1290]	270 [-50-565]	240 [40-420]

Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

**Tab. A5:** Plasma-Cholesterin-Konzentration (mg/dl) im Versuchsverlauf (Mittelwert mit Standardabweichung)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
Woche 0	32,9 ± 9,5	42,9 ± 18,6	34,4 ± 13,0
Woche 4	37,6 ± 7,2	1264 ± 470	619 ± 362
Woche 8	20,9 ± 7,7	1758 ± 542	912 ± 247
Woche 12	25,1 ± 3,4	1921 ± 556	1313 ± 290
Woche 16	25,8 ± 6,4	1826 ± 660	1552 ± 358
AUC †	451 ± 76,0	23515 ± 6217 <sup>3</sup>	14548 ± 3891 <sup>2</sup>

AUC = Area under the curve

† nur Gruppe 2 mit 3 verglichen

Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

**Tab. A6:** Lipoproteinfraktionen (mg/dl) im Versuchsverlauf (Mittelwert mit Standardabweichung)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>HDL-Cholesterin</b>			
Woche 0	11,4 ± 3,8	15,1 ± 5,1	14,3 ± 3,7
Woche 4	12,0 ± 3,8	14,4 ± 4,4	16,7 ± 2,6
Woche 8	11,7 ± 2,5	16,8 ± 5,7	22,3 ± 5,1
Woche 12	8,7 ± 3,0	15,0 ± 6,4	23,3 ± 4,8
Woche 16	10,0 ± 3,4	9,7 ± 3,6	15,6 ± 6,1
AUC *	172 ± 40,1 <sup>2,3</sup>	234 ± 63,9 <sup>1</sup>	309 ± 56,7 <sup>1</sup>
<b>LDL-Cholesterin</b>			
Woche 0	11,1 ± 9,1	13,9 ± 10,3	9,7 ± 6,4
Woche 4	30,7 ± 9,4	318 ± 83,6	200 ± 89,7
Woche 8	4,7 ± 4,5	344 ± 106	203 ± 59,6
Woche 12	4,9 ± 2,0	402 ± 218	231 ± 94,4
Woche 16	9,8 ± 3,0	804 ± 418	488 ± 129
AUC †	203 ± 33,8	5899 ± 1843 <sup>3</sup>	3536 ± 448 <sup>2</sup>

**Tab. A6:** Fortsetzung

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>VLDL-Cholesterin</b>			
Woche 0	10,3 ± 2,9	13,9 ± 12,6	6,9 ± 1,8
Woche 4	10,0 ± 12,7	931 ± 435	402 ± 278
Woche 8	4,8 ± 4,7	1396 ± 547	687 ± 227
Woche 12	11,4 ± 4,8	1504 ± 485	1058 ± 276
Woche 16	6,0 ± 4,3	1012 ± 421	1048 ± 364
AUC †	129 ± 46,4	17380 ± 5827 <sup>3</sup>	10702 ± 3533 <sup>2</sup>

\* Statistik mit logarithmierten Daten

AUC = Area under the curve

† nur Gruppe 2 mit 3 verglichen

Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

**Tab. A7:** Triglyceride (mg/dl) im Versuchsverlauf (Mittelwert mit Standardabweichung)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
Woche 0	69,8 ± 32,7	101 ± 127	53,0 ± 13,0
Woche 4	86,8 ± 61,1	85,5 ± 46,8	43,3 ± 13,6
Woche 8	97,1 ± 59,8	103 ± 41,8	50,6 ± 25,6
Woche 12	70,5 ± 45,6	136 ± 71,1	70,4 ± 15,9
Woche 16	63,6 ± 36,5	302 ± 255	102 ± 63,8
AUC †	1285 ± 769 <sup>2</sup>	2108 ± 942 <sup>1,3</sup>	968 ± 205 <sup>2</sup>

AUC = Area under the curve

† Gruppen einzeln miteinander verglichen

Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

**Tab. A8:** NEFA ( $\mu\text{Eq/ml}$ ) im Versuchsverlauf (Mittelwert mit Standardabweichung)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
Woche 0	1301 $\pm$ 529	1393 $\pm$ 1471	971 $\pm$ 319
Woche 4	1251 $\pm$ 698	2700 $\pm$ 1171	1578 $\pm$ 465
Woche 8	1818 $\pm$ 1029	3972 $\pm$ 1193	2347 $\pm$ 747
Woche 12	1499 $\pm$ 965	2242 $\pm$ 705	1992 $\pm$ 604
Woche 16	1262 $\pm$ 528	1405 $\pm$ 616	1908 $\pm$ 509
AUC †	23396 $\pm$ 11691 <sup>2</sup>	41250 $\pm$ 13304 <sup>1,3</sup>	29428 $\pm$ 5190 <sup>2</sup>

AUC = Area under the curve

† Statistik mit logarithmierten Daten, Gruppen einzeln miteinander verglichen  
Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

**Tab. A9:** Homocystein ( $\mu\text{mol/l}$ ) im Versuchsverlauf (Mittelwert mit Standardabweichung)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
Woche 0	13,9 $\pm$ 2,5	14,4 $\pm$ 5,2	14,2 $\pm$ 4,8
Woche 4	13,6 $\pm$ 1,5	10,0 $\pm$ 3,2	13,0 $\pm$ 2,8
Woche 8	12,7 $\pm$ 2,4	8,7 $\pm$ 0,9	10,4 $\pm$ 1,5
Woche 12	12,1 $\pm$ 3,5	9,1 $\pm$ 2,4	9,6 $\pm$ 2,6
Woche 16	13,0 $\pm$ 3,1	16,3 $\pm$ 8,6	13,4 $\pm$ 2,5
AUC	207 $\pm$ 27,7	172 $\pm$ 39,7	187 $\pm$ 29,6

AUC = Area under the curve

**Tab. A10:** Vitaminkonzentrationen im Versuchsverlauf (Mittelwert mit Standardabweichung)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>Vitamin E (µmol/l)</b>			
Woche 0	5,3 ± 12,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
Woche 4	4,6 ± 8,0	69,6 ± 48,7	41,0 ± 27,4
Woche 8	7,1 ± 9,4	63,6 ± 35,5	18,3 ± 16,4
Woche 12	14,8 ± 21,9	80,7 ± 39,6	57,6 ± 6,6
Woche 16	7,8 ± 1,7	90,5 ± 38,9	71,7 ± 20,9
AUC *	128 ± 55,3 <sup>2,3</sup>	933 ± 450 <sup>1,3</sup>	516 ± 144 <sup>1,2</sup>
<b>Vitamin B<sub>6</sub> (µg/l)</b>			
Woche 0	242 ± 42,9	200 ± 54,6	228 ± 47,0
Woche 4			
Woche 8	96,6 ± 22,1	89,1 ± 45,3	83,1 ± 24,0
Woche 12	137 ± 27,6	82,2 ± 26,7	97,2 ± 19,0
Woche 16	104 ± 12,9	59,0 ± 23,3	50,6 ± 15,0
AUC	2306 ± 333 <sup>2</sup>	1840 ± 401 <sup>1</sup>	1900 ± 323

\* Statistik mit logarithmierten Daten

AUC = Area under the curve

Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

**Tab. A11:** Transaminasen (U/l) und  $\gamma$ -GT (U/l) im Versuchsverlauf (Mittelwert mit Standardabweichung)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>GOT</b>			
Woche 0	6,9 ± 1,7	6,6 ± 2,0	6,3 ± 1,5
Woche 4	6,8 ± 1,8	10,5 ± 5,6	12,1 ± 3,8
Woche 8	8,9 ± 2,5	10,9 ± 4,2	11,4 ± 3,7
Woche 12	7,4 ± 1,3	18,3 ± 9,4	15,6 ± 5,4
Woche 16	7,1 ± 2,2	12,3 ± 5,9	16,3 ± 3,5
AUC *	120 ± 17,6 <sup>2,3</sup>	196 ± 48,4 <sup>1</sup>	202 ± 45,1 <sup>1</sup>

Tab. A11: Fortsetzung

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>GPT</b>			
Woche 0	18,5 ± 7,6	17,1 ± 4,9	19,4 ± 5,7
Woche 4	17,3 ± 6,8	20,8 ± 9,5	28,3 ± 5,2
Woche 8	19,3 ± 9,4	11,1 ± 6,4	22,4 ± 7,0
Woche 12	20,3 ± 8,5	15,5 ± 9,2	24,1 ± 12,5
Woche 16	18,9 ± 10,7	13,1 ± 4,4	31,3 ± 17,7
AUC	301 ± 127	250 ± 94,8 <sup>3</sup>	401 ± 103 <sup>2</sup>
<b>γ-GT</b>			
Woche 0	4,3 ± 0,7	4,1 ± 1,1	3,9 ± 0,7
Woche 4	3,8 ± 0,9	12,3 ± 15,3	6,4 ± 6,6
Woche 8	2,3 ± 0,9	2,0 ± 2,1	12,6 ± 13,5
Woche 12	4,0 ± 0,8	13,3 ± 28,8	13,7 ± 17,7
Woche 16	4,1 ± 0,6	21,4 ± 28,3	19,6 ± 31,2
AUC *	56,8 ± 10,6	161 ± 150	178 ± 142

\* Statistik mit logarithmierten Daten

AUC = Area under the curve

Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

**Tab. A12:** Kleines Blutbild im Versuchsverlauf (Mittelwert mit Standardabweichung)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>Hämatokrit (%)</b>			
Woche 0	39,2 ± 2,0	39,0 ± 2,0	37,9 ± 2,5
Woche 4	40,2 ± 1,8	36,6 ± 2,4	35,8 ± 2,5
Woche 8	39,4 ± 1,7	33,9 ± 3,1	34,0 ± 0,9
Woche 12	38,6 ± 1,7	31,7 ± 2,3	31,4 ± 1,4
Woche 16	36,6 ± 1,9	26,6 ± 2,9	29,3 ± 1,4
AUC	624 ± 24,8 <sup>2,3</sup>	540 ± 33,5 <sup>1</sup>	539 ± 16,1 <sup>1</sup>
<b>Erythrozyten (10<sup>4</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>			
Woche 0	6,2 ± 0,4	6,2 ± 0,3	6,2 ± 0,5
Woche 4	6,3 ± 0,3	5,9 ± 0,4	5,9 ± 0,3
Woche 8	6,3 ± 0,3	5,4 ± 0,4	5,6 ± 0,2
Woche 12	6,1 ± 0,4	5,0 ± 0,3	5,1 ± 0,2
Woche 16	5,8 ± 0,4	3,9 ± 0,7	4,7 ± 0,3
AUC	98,5 ± 4,7 <sup>2,3</sup>	85,7 ± 4,8 <sup>1</sup>	88,1 ± 2,4 <sup>1</sup>
<b>Hämoglobin (g/dl)</b>			
Woche 0	13,7 ± 0,5	13,7 ± 0,7	13,4 ± 0,9
Woche 4	13,9 ± 0,6	13,2 ± 0,9	12,9 ± 0,8
Woche 8	13,5 ± 0,6	12,3 ± 1,0	12,3 ± 0,3
Woche 12	13,3 ± 0,6	11,3 ± 0,7	11,3 ± 0,4
Woche 16	12,4 ± 0,7	9,1 ± 1,1	10,2 ± 0,7
AUC	215 ± 8,8 <sup>2,3</sup>	193 ± 11,3 <sup>1</sup>	193 ± 5,7 <sup>1</sup>
<b>MCV (fl)</b>			
Woche 0	63,1 ± 1,0	62,8 ± 1,8	61,1 ± 2,2
Woche 4	63,9 ± 2,3	61,9 ± 1,2	60,7 ± 2,1
Woche 8	63,0 ± 2,3	62,4 ± 1,8	61,3 ± 1,8
Woche 12	63,6 ± 2,6	63,4 ± 2,3	61,1 ± 2,0
Woche 16	63,6 ± 2,6	69,1 ± 5,1	63,1 ± 1,9
AUC	1015 ± 33,2	1014 ± 25,8	981 ± 22,1



Tab. A12: Fortsetzung

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>MCHC (g/dl)</b>			
Woche 0	35,0 ± 0,7	35,1 ± 0,7	35,3 ± 0,4
Woche 4	34,5 ± 0,3	35,9 ± 0,3	36,0 ± 0,5
Woche 8	34,3 ± 0,4	34,6 ± 4,9	36,1 ± 0,6
Woche 12	34,4 ± 0,4	35,8 ± 0,8	36,2 ± 1,5
Woche 16	33,8 ± 0,9	34,3 ± 0,7	34,7 ± 1,4
AUC *†	551 ± 5,1 <sup>2,3</sup>	571 ± 6,7 <sup>1</sup>	573 ± 11,1 <sup>1</sup>
<b>MCH (pg)</b>			
Woche 0	22,2 ± 0,6	21,9 ± 0,5	21,6 ± 0,7
Woche 4	22,0 ± 0,7	22,2 ± 0,4	21,8 ± 0,4
Woche 8	21,6 ± 0,8	22,6 ± 0,5	22,0 ± 0,5
Woche 12	21,9 ± 0,7	22,6 ± 0,5	22,1 ± 0,4
Woche 16	21,5 ± 0,7	23,6 ± 1,5	21,8 ± 0,4
AUC	349 ± 10,5 <sup>2</sup>	360 ± 6,0 <sup>1</sup>	350 ± 5,7
<b>Leukozyten (Zahl/µl)</b>			
Woche 0	5728 ± 1011	5338 ± 1488	5293 ± 1009
Woche 4	6037 ± 647	7510 ± 2196	7651 ± 1868
Woche 8	5858 ± 1268	7414 ± 2484	7433 ± 2222
Woche 12	6554 ± 852	8830 ± 3329	7817 ± 1782
Woche 16	7471 ± 985	7554 ± 1787	7841 ± 2031
AUC ‡	101018 ± 14338	110211 ± 19909	117874 ± 26681
<b>Thrombozyten (100/µl)</b>			
Woche 0	357 ± 77,5	364 ± 57,0	361 ± 124
Woche 4	332 ± 74,0	302 ± 76,9	285 ± 67,0
Woche 8	315 ± 58,3	307 ± 37,2	298 ± 52,6
Woche 12	317 ± 58,3	348 ± 64,8	321 ± 62,0
Woche 16	338 ± 78,9	417 ± 70,8	434 ± 121
AUC	5228 ± 997	5394 ± 705	5207 ± 925

\* Statistik mit logarithmierten Daten

† ein Tier der Gruppe 2 wurde von der Statistik ausgeschlossen

‡ ein Tier der Gruppe 2 wurde von der Statistik ausgeschlossen

AUC = Area under the curve

Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

**Tab. A13:** Konzentration der Elektrolyte (mmol/l) im Plasma (Mittelwert mit Standardabweichung)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>Natrium</b>			
Woche 0	142 ± 1,8	142 ± 1,7	142 ± 2,8
Woche 4	140 ± 2,3	138 ± 2,8	140 ± 2,0
Woche 8	139 ± 2,9	135 ± 1,5	137 ± 1,3
Woche 12	140 ± 1,2	136 ± 1,6	137 ± 3,0
Woche 16	140 ± 1,7	135 ± 2,6	136 ± 1,5
AUC *	2240 ± 25,6 <sup>2,3</sup>	2184 ± 22,3 <sup>1,3</sup>	2212 ± 10,0 <sup>1,2</sup>
<b>Kalium</b>			
Woche 0	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,2
Woche 4	6,4 ± 7,5	3,9 ± 0,4	3,7 ± 0,2
Woche 8	3,4 ± 0,5	3,7 ± 0,1	3,7 ± 0,4
Woche 12	3,6 ± 0,1	3,7 ± 0,2	3,7 ± 0,2
Woche 16	3,5 ± 0,2	3,7 ± 0,1	3,7 ± 0,3
AUC *	56,9 ± 2,2 <sup>2</sup>	59,9 ± 1,3 <sup>1</sup>	58,9 ± 3,1
<b>Calcium</b>			
Woche 0	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,1 ± 0,2
Woche 4	3,4 ± 0,1	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,1
Woche 8	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,1
Woche 12	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,2
Woche 16	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,4 ± 0,1
AUC	52,8 ± 1,0	53,0 ± 1,7	52,3 ± 1,4

\* Statistik mit logarithmierten Daten

AUC = Area under the curve

Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

**Tab. A14:** Gerinnungsparameter im Versuchsverlauf (Mittelwert mit Standardabweichung)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>INR</b>			
Woche 0	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Woche 4	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,5	0,9 ± 0,0
Woche 8	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Woche 12	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2
Woche 16	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2
AUC	19,3 ± 1,2	19,6 ± 2,6	18,2 ± 1,2
<b>TPZ (Quick, %)</b>			
Woche 0	78,4 ± 8,4	81,0 ± 10,6	87,9 ± 15,8
Woche 4	102 ± 15,5	102 ± 32,1	119 ± 1,9
Woche 8	85,4 ± 9,9	82,8 ± 18,0	104 ± 14,8
Woche 12	70,8 ± 11,9	68,5 ± 14,2	78,1 ± 21,7
Woche 16	56,4 ± 13,8	72,5 ± 18,3	62,0 ± 14,9
AUC	1303 ± 123	1321 ± 225	1507 ± 150
<b>PTT (sec)</b>			
Woche 0	133 ± 49,9	115 ± 59,6	144 ± 33,0
Woche 4	100 ± 60,2	128 ± 56,8	106 ± 54,4
Woche 8	146 ± 40,3	160 ± 0,0	160 ± 0,0
Woche 12	160 ± 0,0	143 ± 46,0	139 ± 55,2
Woche 16	145 ± 42,4	131 ± 48,8	150 ± 17,7
AUC	2180 ± 374	2218 ± 304	2211 ± 369

**Tab. A14:** Fortsetzung

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>Fibrinogen (mg/dl)</b>			
Woche 0	227 ± 130	289 ± 59,1	326 ± 134
Woche 4	295 ± 53,0	291 ± 54,5	351 ± 50,1
Woche 8	397 ± 255	197 ± 29,5	239 ± 44,4
Woche 12	308 ± 46,0	203 ± 40,4	211 ± 45,2
Woche 16	254 ± 111	164 ± 37,5	178 ± 30,7
AUC *	4963 ± 1224 <sup>2</sup>	3668 ± 433 <sup>1</sup>	4211 ± 575

\* Statistik mit logarithmierten Daten

AUC = Area under the curve

Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

**Tab. A15:** Enzymaktivitäten im Versuchsverlauf (Mittelwert mit Standardabweichung)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>AP (U/l)</b>			
Woche 0	142 ± 44,4	186 ± 56,0	145 ± 50,3
Woche 4	106 ± 41,6	115 ± 38,3	87,4 ± 44,3
Woche 8	58,4 ± 11,0	71,8 ± 34,2	62,6 ± 15,7
Woche 12	59,1 ± 18,2	58,8 ± 16,9	54,9 ± 20,5
Woche 16	49,9 ± 14,3	64,1 ± 25,2	66,3 ± 36,6
AUC	1259 ± 366	1482 ± 410	1242 ± 374

Tab. A15: Fortsetzung

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>LDH (U/l)</b>			
Woche 0	30,6 ± 14,5	31,1 ± 9,1	46,1 ± 22,2
Woche 4	41,8 ± 23,4	25,9 ± 6,8	53,7 ± 25,6
Woche 8	51,4 ± 30,7	31,8 ± 19,9	38,6 ± 29,4
Woche 12	43,6 ± 33,4	72,8 ± 47,2	77,1 ± 41,5
Woche 16	41,0 ± 21,3	68,3 ± 28,0	71,8 ± 51,2
AUC	690 ± 187	720 ± 152	914 ± 218
<b>CK (U/l)</b>			
Woche 0	356 ± 148	345 ± 135	555 ± 281
Woche 4	446 ± 319	264 ± 101	546 ± 331
Woche 8	747 ± 536	482 ± 198	457 ± 245
Woche 12	464 ± 263	709 ± 450	769 ± 354
Woche 16	499 ± 434	555 ± 329	704 ± 650
AUC	8337 ± 3393	7619 ± 1718	9607 ± 2274
<b>Amylase (U/l)</b>			
Woche 0	154 ± 21,0	151 ± 22,2	149 ± 10,6
Woche 4	156 ± 19,6	173 ± 25,2	166 ± 17,2
Woche 8	158 ± 22,8	192 ± 29,3	181 ± 12,9
Woche 12	149 ± 22,8	200 ± 26,3	199 ± 23,6
Woche 16	142 ± 18,3	196 ± 30,5	204 ± 29,2
AUC	2457 ± 324 <sup>2,3</sup>	2955 ± 373 <sup>1</sup>	2893 ± 230 <sup>1</sup>
<b>Pankreas-Amylase (U/l)</b>			
Woche 0	153 ± 20,7	151 ± 22,4	149 ± 10,0
Woche 4	149 ± 18,6	167 ± 24,2	159 ± 16,2
Woche 8	156 ± 22,5	189 ± 28,5	179 ± 12,6
Woche 12	148 ± 22,6	199 ± 26,2	198 ± 23,9
Woche 16	137 ± 17,6	188 ± 29,4	196 ± 28,2
AUC	2408 ± 321 <sup>2,3</sup>	2893 ± 365 <sup>1</sup>	2829 ± 222 <sup>1</sup>

**Tab. A15:** Fortsetzung

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>Lipase (U/l)</b>			
Woche 0	149 ± 50,0	149 ± 27,2	146 ± 38,4
Woche 4	179 ± 42,6	328 ± 116	249 ± 18,6
Woche 8	131 ± 27,1	826 ± 369	484 ± 292
Woche 12	165 ± 29,1	1891 ± 834	1179 ± 750
Woche 16	139 ± 25,6	2843 ± 1689	1536 ± 706
AUC *	2474 ± 455 <sup>2,3</sup>	18164 ± 7739 <sup>1</sup>	11012 ± 5425 <sup>1</sup>

\* Statistik mit logarithmierten Daten

AUC = Area under the curve

Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

**Tab. A16:** Nierenfunktionsparameter (mg/dl) im Versuchsverlauf (Mittelwert mit Standardabweichung)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>Harnstoff</b>			
Woche 0	43,8 ± 5,5	42,1 ± 9,0	48,7 ± 8,5
Woche 4	42,4 ± 6,3	37,8 ± 6,6	45,0 ± 5,4
Woche 8	36,0 ± 7,6	37,6 ± 9,0	41,9 ± 9,8
Woche 12	41,4 ± 5,2	42,4 ± 9,3	47,4 ± 8,9
Woche 16	36,8 ± 4,7	39,9 ± 4,2	49,6 ± 8,0
AUC	640 ± 79,1	635 ± 110	734 ± 113

**Tab. A16:** Fortsetzung

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>Kreatinin</b>			
Woche 0	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Woche 4	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Woche 8	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Woche 12	1,1 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,2
Woche 16	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,8 ± 0,1
AUC	17,3 ± 2,5 <sup>3</sup>	20,2 ± 2,4	23,0 ± 2,2 <sup>1</sup>

AUC = Area under the curve

Hochgestellte Zahlen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an.

**Tab. A17:** Albumin- und Gesamteiweiß-Konzentration (g/dl) im Versuchsverlauf (Mittelwert mit Standardabweichung)

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>Albumin</b>			
Woche 0	5,5 ± 0,3	5,3 ± 0,3	5,3 ± 0,3
Woche 4	5,5 ± 0,3	5,4 ± 0,4	5,3 ± 0,2
Woche 8	5,1 ± 0,2	4,8 ± 0,3	5,0 ± 0,3
Woche 12	5,4 ± 0,2	5,0 ± 0,3	5,0 ± 0,3
Woche 16	5,0 ± 0,2	4,3 ± 0,7	4,8 ± 0,4
AUC	81,7 ± 3,8	79,9 ± 4,1	84,5 ± 3,4

**Tab. A17:** Fortsetzung

	<b>Gruppe 1 Kontrolle</b>	<b>Gruppe 2 Chol</b>	<b>Gruppe 3 Chol+Meth</b>
<b>Gesamteiweiß</b>			
Woche 0	5,5 ± 0,3	5,3 ± 0,3	5,4 ± 0,3
Woche 4	5,6 ± 0,3	5,6 ± 0,4	5,6 ± 0,2
Woche 8	5,6 ± 0,4	5,3 ± 0,5	5,5 ± 0,2
Woche 12	5,4 ± 0,2	5,2 ± 0,5	5,3 ± 0,3
Woche 16	5,3 ± 0,3	5,3 ± 0,6	5,3 ± 0,3
AUC	87,6 ± 3,5	85,7 ± 5,5	87,1 ± 3,5

AUC = Area under the curve

**Tab. A18:** Plasma-Methionin-Konzentration (µmol/l) beim Belastungstest mit 100 mg Methionin/kg KG

<b>Zeitpunkt</b>	<b>MLT-01</b>	<b>MLT-02</b>
0 h	39,6	35
2 h	289	308
4 h	174	250
6 h	187	169
24 h	25,7	25,3



**Tab. A19:** Plasma-Methionin-Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) beim Belastungstest mit 100 mg Methionin/kg KG und 0,2 mg Folsäure/kg KG

Zeitpunkt	MLT-01	MLT-02
0 h	38,3	36,0
2 h	712	430
4 h	439	274
6 h	266	196
8 h	182	131
24 h	34,9	31,2

**Tab. A20:** Plasma-Methionin-Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) beim Belastungstest mit 100 mg Methionin/kg KG und 1,5 mg Vitamin B<sub>6</sub>/kg KG

Zeitpunkt	MLT-01	MLT-02
0 h	45,3	57,4
2 h	1003	892
4 h	753	774
6 h	614	512
8 h	470	386
24 h	64,4	58

**Tab. A21:** Plasma-Methionin-Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) beim Belastungstest mit 100 mg Methionin/kg KG, 0,2 mg Folsäure/kg KG und 0,01 mg Vitamin B<sub>12</sub>/kg KG

Zeitpunkt	MLT-01	MLT-02
0 h	40,1	37,4
2 h	783	756
4 h	699	632
6 h	576	514
8 h	492	418
24 h	70,3	61,4

**Tab. A22:** Plasma-Homocystein-Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) beim Belastungstest mit 25 mg Methionin/kg KG

<b>Zeitpunkt</b>	<b>Tier 1</b>	<b>Tier 2</b>
0 h	11,4	10,7
2 h	19,7	16,3
4 h	13,7	16,0
6 h	15,4	16,3
8 h	17,8	15,4
24 h	17,0	10,7

**Tab. A23:** Plasma-Homocystein-Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) beim Belastungstest mit 50 mg Methionin/kg KG

<b>Zeitpunkt</b>	<b>Tier 1</b>	<b>Tier 2</b>
0 h	11,7	16,4
2 h	43,1	83,8
4 h	28,4	43,7
6 h	23,0	26,1
8 h	25,4	19,6
24 h	15,9	9,0

**Tab. A24:** Plasma-Homocystein-Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) beim Belastungstest mit 100 mg Methionin/kg KG

<b>Zeitpunkt</b>	<b>Tier 1</b>	<b>Tier 2</b>
0 h	16,3	10,1
2 h	254	153
4 h	220	152
6 h	94,8	81,3
24 h	17,8	11,6

**Tab. A25:** Plasma-Homocystein-Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) beim Belastungstest mit 250 mg Methionin/kg KG

Zeitpunkt	Tier 1	Tier 2
0 h	21,5	11,4
2 h	214	283
4 h	382	503
6 h	499	618
24 h	35,4	53,7

**Tab. A26:** Plasma-Homocystein-Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) beim Belastungstest mit 500 mg Methionin/kg KG

Zeitpunkt	Tier 1	Tier 2
0 h	23,2	14,6
2 h	267	363
4 h	344	470
6 h	397	553
8 h	458	639
24 h	80,4	494

**Tab. A27:** Plasma-Homocystein-Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) beim Belastungstest mit 100 mg Methionin/kg KG und 0,2 mg Folsäure/kg KG

Zeitpunkt	Tier 1	Tier 2
0 h	12,7	11,6
2 h	174	187
4 h	264	308
6 h	192	220
8 h	102	136
24 h	18,3	14,0

**Tab. A28:** Plasma-Homocystein-Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) beim Belastungstest mit 100 mg Methionin/kg KG und 1,5 mg Vitamin B<sub>6</sub>/kg KG

Zeitpunkt	Tier 1	Tier 2
0 h	35,7	14,6
2 h	127	58,6
4 h	149	75,0
6 h	167	86,2
8 h	164	74,7
24 h	25,8	14,0

**Tab. A29:** Plasma-Homocystein-Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) beim Belastungstest mit 100 mg Methionin/kg KG, 0,2 mg Folsäure/kg KG und 0,01 mg Vitamin B<sub>12</sub>/kg KG

Zeitpunkt	Tier 1	Tier 2
0 h	38,8	17,1
2 h	126	66,1
4 h	157	104
6 h	155	122
8 h	159	130
24 h	33,5	27,2

**Tab. A30:** Plasma-Cystathionin-Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) beim Belastungstest mit 100 mg Methionin/kg KG

Zeitpunkt	Tier 1	Tier 2
0 h	2,7	6,2
2 h	7,2	9,3
4 h	9,3	8,8
6 h	9,2	8,8
24 h	6,3	7,3

**Tab. A31:** Plasma-Cystathionin-Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) beim Belastungstest mit 100 mg Methionin/kg KG und 0,2 mg Folsäure/kg KG

Zeitpunkt	Tier 1	Tier 2
0 h	3,1	2,1
2 h	6,0	5,4
4 h	11,2	9,0
6 h	6,9	13,7
8 h	7,5	5,1
24 h	7,2	3,3

**Tab. A32:** Plasma-Cystathionin-Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) beim Belastungstest mit 100 mg Methionin/kg KG und 1,5 mg Vitamin B6/kg KG

Zeitpunkt	Tier 1	Tier 2
0 h	9,5	13,1
2 h	8,4	10,3
4 h	14,1	15,7
6 h	20,3	18,8
8 h	9,6	9,9
24 h	27,2	22,3

**Tab. A33:** Plasma-Cystathionin-Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) beim Belastungstest mit 100 mg Methionin/kg KG, 0,2 mg Folsäure/kg KG und 0,01 mg Vitamin B12/kg KG

Zeitpunkt	Tier 1	Tier 2
0 h	10,2	7,5
2 h	15,0	8,9
4 h	20,8	13,0
6 h	11,3	16,9
8 h	42,7	19,7
24 h	36,1	25,7

## Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. F.W. Schmahl für die freundliche Überlassung des Themas und die Bereitstellung der ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. U. Brehme. Sie war mir jederzeit eine kompetente Ansprechpartnerin und stand mir während der gesamten Arbeit mit Rat und Tat zur Seite. Ohne ihre unschätzbare Hilfe wäre die Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen.

Herzlicher Dank gebührt auch den Mitarbeiterinnen des klinischen Labors des Instituts für Arbeits- und Sozialmedizin, Frau A. Glückman, Frau M. Holz, Frau G. Kaletta und Frau J. Schatz, für ihre Hilfe bei den histologischen und immunhistologischen Färbungen. Bedanken möchte ich mich auch bei Frau H. M. Steffl-Altenhoff für ihre Hilfe bei der Literaturrecherche.

Weiterer Dank geht an Dr. R. Lehmann und seine Mitarbeiter des klinisch-chemischen Zentrallabors, Abteilung IV, der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen.

Dank gebührt auch Dr. K. Bellstedt, Kinderklinik der Universität Jena, und Prof. Dr. U. Till, Institut für Pathobiochemie, Erfurt, Jena, für die Bestimmung der Aminosäuren.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, insbesondere an meine Frau Sabine, die während der Dauer dieser Arbeit so manche Stunde auf meine Anwesenheit verzichten musste. Trotz allem standen mir alle jederzeit mit aufmunternden und manchmal auch mahnenden Worten zur Seite. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit niemals fertig geworden.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Andreas Michael Reck
Geburtsdatum	28.07.1975
Geburtsort	Ravensburg

## Schulbildung

1982-1986	Grundschule Hohentengen
1986-1995	Gymnasium Mengen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Studium

ab 1996	Studium der Medizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
1999	Ärztliche Vorprüfung
2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003/2004	Praktisches Jahr im Kreiskrankenhaus Sigmaringen (Wahlfach: Gynäkologie und Geburtshilfe)
14.05.2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## Beruflicher Werdegang

2004	AiP in der Gynäkologischen Abteilung des Paracelsus-Krankenhauses Ruit
seit Oktober 2004	Assistenzarzt in der Gynäkologischen Abteilung des Paracelsus-Krankenhauses Ruit