

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Tübingen  
Abteilung Klinische Pharmakologie  
Leiter: Professor Dr. M. Schwab

**Untersuchung  
zur Veränderung des Methylierungspotenzials  
durch einmalige orale Homocysteinzufuhr  
bei gesunden Freiwilligen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Tobias Johannes Röck  
aus Sigmaringen

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. H. Gleiter

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schwarz

## **Widmung**

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Stand der Wissenschaft	1
1.1.1.	Allgemeine Fakten zu Homocystein	1
1.1.2.	Homocystein-Metabolisierung und Methylierungspotenzial	2
1.1.3.	Hyperhomocysteinämie und deren Ursachen	5
1.1.4.	Homocystein als kardiovaskulärer Risikofaktor	10
1.2.	Zusammenfassung der Studie	11
1.3.	Studienziel	12
2.	Material und Methoden	13
2.1.	Studienprobanden	13
2.2.	Herstellung der Studienmedikation	15
2.3.	Clearance	16
2.4.	Studiendesign und Studienablauf	18
2.4.1.	Studiendesign	18
2.4.2.	Ablauf Studientag: siehe Flow Chart 2.7.2	19
2.4.3.	Standardisierung der Nahrungsaufnahme	20
2.5.	Abnahme, Lagerung und Verarbeitung der Proben	21
2.5.1.	SAM- und SAH-Konzentration in Vollblut	21
2.5.2.	SAM- und SAH-Konzentration in Plasma und Erythrozyten	21
2.5.3.	Methylierungsgrad der DNA in Lymphozyten	23
2.5.4.	Gesamthomocystein-Konzentration im Plasma	24
2.5.5.	Homocystein-Konzentration in Vollblut und Erythrozyten	24
2.5.6.	Homocystein-Konzentration im Urin	25
2.5.7.	Sinistrin-Konzentration im Plasma	25
2.5.8.	Genotypisierung bezüglich Methylenetetrahydrofolatreduktase	26
2.6.	Statistische Auswertung	27
2.6.1.	Primäres Zielkriterium	27
2.6.2.	Sekundäre Zielkriterien	27
2.6.3.	Fallzahlplanung	27
2.6.4.	Auswertungsstrategie	28
2.7.	Allgemeine Bestimmungen	28
2.7.1.	Gesetzliche Bestimmungen	28
2.7.2.	Flow Chart	30
3.	Ergebnisse	32
3.1.	Homocystein-Kinetik	32
3.1.1.	Homocystein-Konzentration in Plasma	32
3.1.2.	Homocystein-Konzentration in Vollblut	32
3.1.3.	Homocystein-Konzentration in Erythrozyten	32
3.1.4.	Homocystein-Ausscheidung im Urin	33
3.2.	Glomeruläre Filtrationsrate	35
3.2.1.	Zeitverlauf der glomerulären Filtrationsrate bei Verum	35
3.2.2.	Zeitverlauf der glomerulären Filtrationsrate bei Placebo	36
3.3.	SAM-Messungen	37
3.3.1.	SAM-Konzentration in Vollblut	37
3.3.2.	SAM-Konzentration in Erythrozyten	38
3.4.	SAH-Messungen	39
3.4.1.	SAH-Konzentration in Vollblut	39
3.4.2.	SAH-Konzentration in Erythrozyten	39

3.4.3.	SAH-Konzentration (Vollblut) in Abhängigkeit von der Homocystein-Konzentration (Plasma)	40
3.4.4.	Zeitverlauf des SAH-Quotienten in Vollblut	41
3.4.5.	Abhängigkeit des SAH-Quotienten (Vollblut) von der Homocystein-Konzentration (Plasma)	42
3.4.6.	SAH-Konzentration (Erythrozyten) in Abhängigkeit der Homocystein-Konzentration (Plasma)	43
3.4.7.	Zeitverlauf des SAH-Quotienten in Erythrozyten	44
3.5.	Methylierungspotenzial	45
3.5.1.	Zeitverlauf des Methylierungspotenzials in Vollblut	45
3.5.2.	Zeitverlauf des Methylierungspotenzials in Erythrozyten	46
3.5.3.	Abhängigkeit des Methylierungspotenzials (Vollblut) von der Homocystein-Konzentration (Plasma)	47
3.6.	DNA-Methylierung	48
3.6.1.	Zeitverlauf der DNA-Methylierung	48
3.6.2.	DNA-Methylierung (Mittelwerte) in Abhängigkeit von der Homocystein-Konzentration (Plasma)	49
3.7.	Genotypisierung: MTHFR	50
3.8.	Unerwünschte Ereignisse	51
4.	Diskussion	53
4.1.	Homocystein als Risikofaktor für Erkrankungen	53
4.1.1.	Gefäßerkrankungen	53
4.1.2.	Osteoporose	55
4.1.3.	Demenz	56
4.2.	Differenzierung des Probandenkollektivs	57
4.3.	Gemessene Zielgrößen	57
4.4.	Homocystein-Ausscheidung im Urin	58
4.5.	MP	59
4.6.	Sicherheitsaspekte	61
4.6.1.	Risiko-Nutzen-Abwägung	61
4.6.2.	Unerwünschte Ereignisse	61
4.6.3.	Geschmack der Homocystein-Lösung	62
4.7.	MTHFR	62
4.7.1.	Zusammenhang zwischen MTHFR und Homocystein-Konzentration in Plasma	62
4.7.2.	Ethnischer Unterschied der C677T-Genotypverteilung	63
4.7.3.	Auswirkungen des C677T-Genotyps in der vorliegenden Studie	64
4.8.	Vitamin B <sub>6</sub> -, B <sub>12</sub> - und Folsäure-Gabe	65
4.9.	Ausblick	65
5.	Zusammenfassung	67
6.	Literaturverzeichnis	69
7.	Danksagung	89
8.	Lebenslauf	90

## Abkürzungen:

□	Homocystein
Δ	Placebo
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AUC	area under the curve
CBS	Cystathionin β-Synthase
CC	homozygoter MTHFR-Wildtyp bzgl. der C677T Mutation
C <sub>max</sub>	maximale Konzentration
C <sub>Plasma</sub>	Konzentration im Plasma
CT	heterozygoter MTHFR-Genotyp bzgl. der C677T Mutation
C <sub>Urin</sub>	Konzentration im Urin
DACH-Länder	Deutschland, Österreich und Schweiz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
γ-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
HBsAg	Hepatitis-B-surface-Antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Körperoberfläche
MCH	mean corpuscular hemoglobin, Hämoglobingehalt
MCV	mean corpuscular volume, Erythrozytenvolumen
MP	Methylierungspotenzial (Quotient: SAM/SAH)
mRNA	messenger-RNA
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase
MW	Mittelwert
NaOH	Natronlauge
PCA	Perchlorsäure
PTT	partial thromboplastin time (Thromboplastinzeit)
RNA	Ribonukleinsäure
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SD	Standardabweichung

SUE	Schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis
t	Zeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
tHcy	Homocystein-Konzentration
$t_{max}$	Zeit bis zum Erreichen der maximalen Konzentration
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon (Thyreotropin)
TT	homozygoter MTHFR-Genotyp bzgl. der C677T Mutation
$U_{Vol}$	Urin-Volumen

# 1. Einleitung

## 1.1. Stand der Wissenschaft

### 1.1.1. Allgemeine Fakten zu Homocystein

Homocystein ist eine schwefelhaltige Aminosäure, die nicht in Nahrungsproteinen vorkommt. Sie besitzt an der Kohlenstoffkette eine zusätzliche Methylgruppe und ist somit ein höheres Homologes der Aminosäure Cystein. Homocystein hat ein Molekulargewicht von 135,2 g/mol.

1932 wurde Homocystein von DeVigineaud in Zusammenhang mit der Transmethylierung von Methionin entdeckt (DeVigineaud et al., 1952). Carson und Neill entdeckten 1962 in Nord-Irland geistig retardierte Kinder, die unter Homocystinurie litten. Diese Krankheit stellte sich wenig später als autosomal rezessiv vererbter Mangel an CBS heraus, der eine Hyperhomocysteinämie im Plasma zur Folge hat (Carson et Neill, 1962; Refsum et al., 1998). Ähnliche Feststellungen machten auch Gerritsen und Waisman zur selben Zeit (Gerritsen und Waisman, 1964).

Ein zweiter genetischer Enzymdefekt, der autosomal rezessiv vererbte Mangel an (thermostabiler) MTHFR, wurde 1972 beschrieben (Mudd et al., 1972). Diese beiden schweren hereditären Enzymdefekte, d.h. der MTHFR- und CBS-Mangel, sind selten. Sie führen bei Homozygotie zur klassischen Homocystinurie, einer Erkrankung, die charakterisiert ist durch Linsenektopie (100%), Oligophrenie (70-80%), Osteoporose sowie Skelettfehlbildungen und gehäufte thromboembolische Ereignisse. Bei solchen Patienten sind die Homocysteinwerte in Plasma massiv erhöht (>400  $\mu\text{mol/l}$ ), wobei der Normbereich bei 5–15  $\mu\text{mol/l}$  liegt (Malinow et al., 1999).

Ein hoher Homocystein-Plasmaspiegel gilt als Risikofaktor für arteriosklerotische Erkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall sowie für Thrombosen und Embolien. Zudem scheint die schwefelhaltige Aminosäure auch mit der Entstehung einer Demenz bzw. der Osteoporose assoziiert zu sein.

Strukturformeln in gewinkelter Schreibweise:

Homocystein (Hcy):

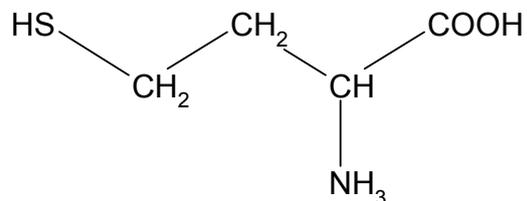


Abb.1: Homocystein ist ein höheres Homologes der Aminosäure Cystein.

Cystein (Cys):

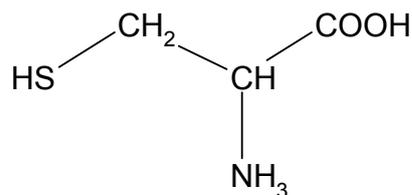


Abb.2: Homocystein kann durch Sulfidgruppenübertragung über Cystathionin in Cystein umgewandelt werden.

Methionin (Met):

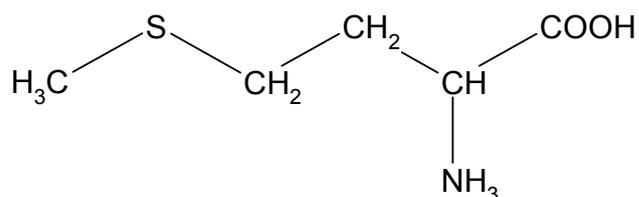


Abb.3: Bei ungenügendem Angebot an Methionin wird Homocystein durch Remethylierung in Methionin zurückverwandelt.

### 1.1.2. Homocystein-Metabolisierung und Methylierungspotenzial

Die Metabolisierung von Homocystein läuft auf zwei unterschiedlichen enzymatischen Wegen ab. Einerseits durch die Transsulfurierung und andererseits durch die Remethylierung.

Bei der Transsulfurierung ist Vitamin B<sub>6</sub> von entscheidender Bedeutung, während Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub> an der Remethylierung von Homocystein entscheidend beteiligt sind.

Homocystein entsteht bei der reversiblen Hydrolyse von SAH in Adenosin und Homocystein. Bei ungenügendem Angebot an Methionin wird Homocystein durch Remethylierung in Methionin zurückverwandelt, was hauptsächlich von der Methioninsynthase geleistet wird, die Cobalamin (Vitamin B<sub>12</sub>) und Folsäure als Coenzym benötigt. Ist das Angebot an Methionin ausreichend, wird Homocystein durch Sulfidgruppenübertragung über Cystathionin in Cystein umgewandelt. Katalysator der Transsulfurierung ist die Cystathionin  $\beta$ -Synthase (CBS), die Pyridoxalphosphat (Vitamin B<sub>6</sub>) als Coenzym benötigt.

S-Adenosylhomocystein (SAH) entsteht bei Transmethylierungsreaktionen aus S-Adenosylmethionin (SAM). Die cytosolischen Konzentrationen von SAH werden von der Aktivität der SAH-Hydrolase kontrolliert. Dieses Enzym besetzt einen wichtigen Knotenpunkt im Zellmetabolismus, der die Prozesse der Transmethylierung, der Transsulfurierung und des ATP-Umsatzes verknüpft. Die SAH-Hydrolase katalysiert die reversible Hydrolyse des SAH in Adenosin und Homocystein. Da SAH ein sehr potenter Hemmstoff der Methyltransferasen ist – durch Produkthemmung der enzymatischen Übertragung von aktivierten Methylgruppen – führt eine Verminderung der SAH-Hydrolase-Aktivität zur Hemmung der Methyltransferasen und damit zu weitreichenden Veränderungen der Zellfunktionen (Ueland, 1982; Perna et al., 2001). Das thermodynamische Gleichgewicht der SAH-Hydrolase Aktivität liegt auf der Seite der SAH-Synthese (de la Haba et Cantoni, 1959; Kloor et al., 1998), jedoch überwiegt bei physiologischen in-vivo-Bedingungen die Hydrolyse, denn Adenosin und Homocystein werden durch weitere Enzyme schnell metabolisiert und damit aus dem Gleichgewicht der SAH-Hydrolyse-Reaktion entfernt (Abb. 4).

Eine dauerhafte Hyperhomocysteinämie im Plasma und im Erythrozyten veranlasst einen intrazellulären Anstieg des S-Adenosylhomocystein (SAH) im Gewebe. Diese Feststellungen machten Perna und Mitarbeiter bei Dialysepatienten, die in zwei Gruppen eingeteilt wurden. Die eine Gruppe enthielt die Patienten mit Hyperhomocysteinämie und die andere diejenigen mit

einem Homocysteingehalt im Normbereich (Perna et al., 1993; Perna et al., 1995).

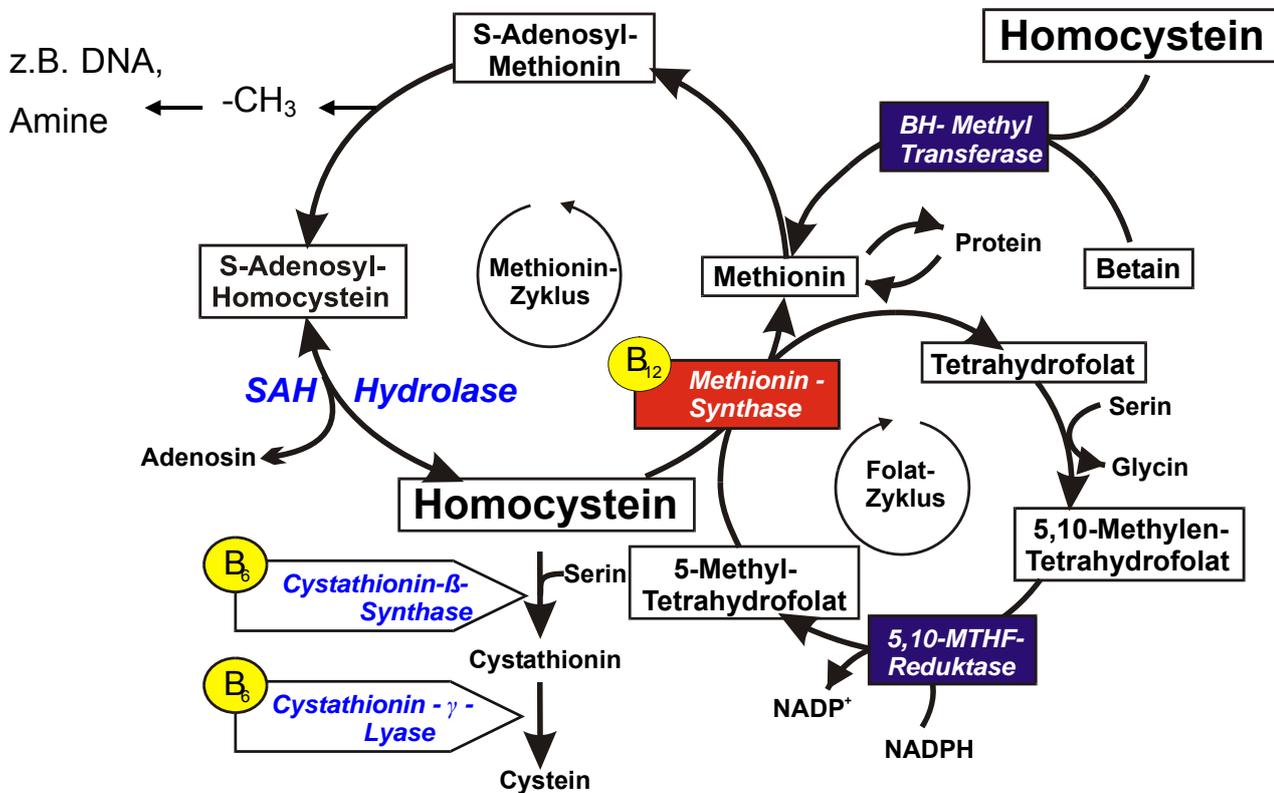


Abb. 4: Homocystein-Metabolismus

Unter pathologischen Bedingungen eines erhöhten ATP-Abbaus und erhöhten Homocystein-Konzentration zeigt sich, dass die intrazellulären Spiegel von Homocystein stark ansteigen (Kloor et al., 2002): Das Methylierungspotenzial fiel in der Niere von Ratten bei kurzdauernder Ischämie und Homocysteinzufuhr auf sehr niedrige Werte ab. Es resultierte eine fast vollständige Blockade der Methyltransferasen. Diese in-vivo-Ergebnisse zeigen die Verknüpfung des Energiestoffwechsels mit den Transmethylierungsreaktionen im Organismus. In welchem Ausmaß diese Verknüpfung auch beim Menschen unter hoher Homocystein-Konzentration durch Homocysteinzufuhr besteht, ist bislang nicht bekannt.

Der Methylierungsprozess von Proteinen ist abhängig von der SAM- und SAH-Konzentration. Je höher die SAM-Konzentration und je geringer die SAH-Konzentration ist, desto aktiver laufen die Methylierungsreaktion ab.

Um die Aktivität der Methylierungsreaktionen zu quantifizieren, wurde das Methylierungspotenzial SAM/SAH definiert. Es wird angenommen, dass Homocystein, als Bestandteil des Methylierungszyklus, ein Modulator des Methylierungspotenzials ist.

Diese Feststellungen machten Yi und Mitarbeiter im Jahr 2000 anhand einer Studie mit 58 gesunden Frauen im Alter von 19-53 Jahren (Durchschnittsalter 37,2 Jahre). 28 hatten einen Homocystein-Plasmaspiegel im Normbereich (Mittelwert  $7,26 \pm 1,11 \mu\text{mol/l}$ ), 30 einen dauerhaft höheren Homocystein-Plasmaspiegel (Mittelwert  $12,30 \pm 1,82 \mu\text{mol/l}$ ).

Es wurde gezeigt, dass eine chronische Hyperhomocysteinämie mit dem Anstieg der SAH-Konzentration und dem Abfall des Methylierungspotenzials korreliert. Dieser Abfall des Methylierungspotenzials wurde anhand der Methylierung der DNA von peripheren Lymphozyten gemessen (Yi et al., 2000). Ein erniedrigtes Methylierungspotenzial stört die physiologischen Mechanismen der Methylierung von Proteinen und von regulatorischen Gensequenzen.

Es wird angenommen, dass das einer der Wege ist, weshalb Homocystein als kardiovaskulärer Risikofaktor gilt.

Jedoch ist nicht bekannt, ob eine kurzzeitige Hyperhomocysteinämie die SAM- und SAH-Konzentration und somit das Methylierungspotenzial verändert.

### 1.1.3. Hyperhomocysteinämie und deren Ursachen

Eine Hyperhomocysteinämie ist laut Definition ein Homocystein-Nüchternplasmaspiegel oberhalb der 95. Perzentile der Normalbevölkerung ( $5-15 \mu\text{mol/l}$ ) (Malinow et al., 1999). Die Hyperhomocysteinämie wird willkürlich entsprechend der Plasma-Konzentration als leicht ( $16-30 \mu\text{mol/l}$ ), mittelschwer ( $31-100 \mu\text{mol/l}$ ) oder schwer ( $>100 \mu\text{mol/l}$ ) klassifiziert (Malinow et al., 1999). Die Prävalenz einer Hyperhomocysteinämie wird auf 5% in der Gesamtbevölkerung und auf 13-47% bei Patienten mit symptomatischer arteriosklerotischer Gefäßerkrankung geschätzt (Hankey und Eikelboom, 1999). Genetische Polymorphismen der Homocystein-metabolisierenden Enzyme oder verminderte Versorgung mit notwendigen Coenzymen gelten als

Hauptursachen einer Akkumulation von Homocystein im Plasma (Perry et al., 1999; Refsum et al., 1998; Welch und Loscalzo, 1998).

### **Vitaminmangel**

Die häufigste Ursache für eine Hyperhomocysteinämie ist die Vitaminunterversorgung des Organismus. Diese kann sich aus mangelnder Zufuhr, verminderter Aufnahme im Magen-Darm-Trakt (Malabsorption), vermehrtem Verbrauch und durch Wechselwirkungen mit Medikamenten und Nahrungsbestandteilen ergeben. Menschen mit einseitigen Ernährungsgewohnheiten (Vegetarier), ältere Menschen, Schwangere, Patienten mit Nierenerkrankungen, Malabsorption (z.B. durch entzündliche Darmerkrankungen) und Tumorpatienten zählen zu den Risikogruppen für klinisch relevante Vitamindefizite. Weiterhin können Alkoholabusus und die Einnahme bestimmter Medikamente zu einem Vitaminmangel führen. Mit Alkohol gefütterte Ratten haben eine signifikant geringere Menge an S-Adenosylmethionin und einen signifikant höheren S-Adenosylhomocysteingehalt in der Leber. Daraus folgt, dass ein chronischer Alkoholgenuss eine Hyperhomocysteinämie verursacht, die auf die Interferenz der Carbonsäure-Metabolisierung bezogen wird (Stickel et al., 2000).

Folatmangel ist der häufigste Vitaminmangel in Europa, begünstigt durch einen Mangel an frischem Obst und Gemüse. Gute Nahrungsquellen für Folat sind beispielsweise grüne Gemüse, Getreideprodukte, Obst, Hefe und Leber (mit Einschränkung). Bis zu 90% der Folate können bei der Verarbeitung von Getreideprodukten und anderen Lebensmitteln verloren gehen (Savage et al., 1994). Weitere Verluste von Folat entstehen durch dessen Hitze-, Lagerungs- und Lichtempfindlichkeit. Die Empfehlungen mehrerer Fachgesellschaften zur Aufnahme von fünf Portionen Obst und Gemüse am Tag (600-700 g) sind kaum realisierbar. Bei einer mittleren täglichen Zufuhr von ca. 400 µg Folatäquivalenten wären alle folatabhängigen Stoffwechselfparameter optimiert. Die tägliche Folataufnahme mit der Nahrung liegt gegenwärtig in den DACH-Ländern (Deutschland, Österreich und Schweiz) durchschnittlich bei deutlich unter 300 µg (197-235 µg für Männer bzw. 168-214 µg für Frauen) (Smith et al.,

2000), so dass ein großer Teil der Normalbevölkerung die erforderliche Menge nicht über die natürliche Ernährung erreicht (Eisenstein et al., 2001).

In einer Untersuchung wurde das Plasma-Homocystein als funktioneller Marker der Folsäure-Versorgung betrachtet. Bei 103 Probanden wurden erhöhte Homocystein-Nüchternplasmaspiegel fast ausschließlich bei Folsäurewerten <4,4 ng/ml gefunden (10 nmol/l = 4,4 ng/ml). Der Normbereich für Folsäure liegt bei 3,0-15,0 ng/ml. Lagen die Folsäure-Spiegel über dem Schwellenwert von 4.4 ng/ml, führte auch eine siebentägige Folsäuresupplementation (5 mg/d) nicht zu einem weiteren Absinken des Plasma-Homocysteinspiegels (Brouwer et al., 1998).

Vitamin B<sub>12</sub> wird in der Regel in bedarfsüberschreitenden Mengen aufgenommen. Dennoch kann bei Risikogruppen ein Defizit vorliegen. Der Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel des älteren Menschen ist häufig Ausdruck einer unzureichenden Resorption durch altersbedingte Verminderung der Magensaftsekretion bzw. einen Mangel an „intrinsic factor“. 30-40% der älteren Menschen können hiervon betroffen sein (Malinow et al., 1999, Butterworth und Tamura, 1989). Vitamin B<sub>12</sub> kann nur von Bakterien synthetisiert werden, weshalb nur tierische Nahrungsmittel (Fisch, Fleisch, Eier und Milchprodukte) gute Nahrungsquellen sind (Refsum et al., 1985). Anders als Folat ist Cobalamin ein verhältnismäßig stabiles Vitamin, welches durch die Nahrungsmittelzubereitung kaum zerstört wird.

Vitamin B<sub>6</sub> kommt besonders in Fleisch, Milch- und Vollkornprodukten, Eigelb, Kartoffeln, Mais, Obst und Gemüse vor (Selhub et al., 1993). Repräsentative Erhebungen zur Vitamin B<sub>6</sub>-Aufnahme liegen aus den DACH-Ländern nicht vor. Aus der Framingham Heart Study geht hervor, dass eine Vitamin-B<sub>6</sub>-Aufnahme von weniger als ca. 1,4 mg/d eine signifikante Homocysteinerhöhung zur Folge hat (Butterworth und Tamura, 1989). Anders als bei Folsäure gehen durch Lagerung und Kochen wegen der besseren Stabilität maximal 10–50% des Vitamins verloren (Selhub et al., 1993).

### **Genetische Einflüsse**

Das Enzym 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) reduziert irreversibel 5,10-Methylen-THF zu 5-Methyl-THF. In den DACH-Ländern sind

ca. 5-15% der Bevölkerung homozygote Träger einer thermolabilen Enzymvariante mit Punktmutation im Nukleotid an Position 677 (MTHFR 677C→T). Diese Nukleotidsubstitution führt zu einem Austausch der Aminosäure Alanin an Position 222 durch Valin und damit zu einer erniedrigten Enzymaktivität. Folge ist eine verminderte Umwandlung von 5,10-Methylen-THF zu 5-Methyl-THF, das als Cofaktor der Methionin-Synthase für die Remethylierung von Homocystein zu Methionin benötigt wird. Der Mangel dieses Cofaktors vermindert den Abbau beziehungsweise die Metabolisierung von Homocystein zu Methionin. Allerdings weisen nur Homozygote (TT) signifikant erhöhte Homocystein-Werte auf (Frosst et al., 1995). Die Enzymaktivität ist bei den Betroffenen um ca. 70% reduziert. Bei ihnen sind die Homocysteinwerte in Plasma auf über 100 µmol/l erhöht. Träger der Mutation reagieren daher besonders sensitiv auf einen Mangel an Folat mit einer Homocysteinerhöhung um ca. 25% (entsprechend ca. 2,6 µmol/l) im Vergleich zu Wildtyp-Allelträgern (Brattström et al., 1998; Hill et al., 1965; Cortes und Motti, 2001). Die Prävalenz der MTHFR-Variante für die homozygote Form liegt zwischen 9-11% bei der europäischen Bevölkerung. Die Inzidenz heterozygoter Träger liegt bei 30-40%, während sie in anderen Bevölkerungen (Asien, Afrika) selten ist.

Neuere Metaanalysen unter Einschluss ausreichend großer Fallzahlen finden für den homozygoten Genotyp im Gegensatz zum heterozygoten Genotyp eine (assoziierte) Risikoerhöhung für kardiovaskuläre Ereignisse von 16-23%, die mit der Homocysteinerhöhung bzw. dem Folatmangel zu erklären ist (O'Callaghan et al., 2002; Kelly et al., 2002; Chen et al., 1999; Schnyder et al., 2001).

Ein weiterer genetischer Enzymdefekt, der autosomal rezessiv vererbte Mangel an (thermostabiler) MTHFR, wurde 1972 beschrieben (Mudd et al., 1972). Dieser schwere hereditäre Enzymdefekt, d.h. der MTHFR-Mangel, ist selten und führt bei Homozygotie zur klassischen Homocystinurie, einer Erkrankung, die charakterisiert ist durch Linsenektopie (100%), Oligophrenie (70-80%), Osteoporose sowie Skelettfehlbildungen und gehäufte thromboembolische

Ereignisse. Bei solchen Patienten sind die Homocysteinwerte in Plasma massiv erhöht ( $>400 \mu\text{mol/l}$ ).

Mutationen im Gen der Cystathionin- $\beta$ -Synthase finden sich bei ca. 1% der Bevölkerung in heterozygoter Form. Träger dieser Mutation haben höhere Homocysteinwerte und ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Gefäßerkrankungen (Martin et al., 1999). Der CBS-Mangel betrifft weltweit durchschnittlich 1/300000 Personen, allerdings mit sehr großen Schwankungen zwischen den Populationen (1/60000 Iren; 1/900000 Japaner). Fälle mit MTHFR-Mangel wurden bis heute nur etwa 25 beschrieben. Diese Feststellungen veranlassten zahlreiche Studien (Ueland et al., 1989), die die verschiedensten Enzymdefekte bekannt machten.

Weitere Mutationen mit möglicher Wirksamkeit im Homocystein-Metabolismus (Methionin-Synthase (Leclerc et al., 1996), Methionin-Synthase-Reduktase (Nallamothe et al., 2000)) sind sehr selten, und deren klinische Relevanz ist bislang kaum erforscht.

### **Chronische Niereninsuffizienz**

Hyperhomocysteinämie wird bei Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz regelmäßig beobachtet (Gupta et Robinson et al., 1997). Jedoch ist der genaue Mechanismus, warum die chronische Niereninsuffizienz zu einer Hyperhomocysteinämie führt, noch nicht bekannt. Die Homocystein-Ausscheidung über die gesunde Niere ist gering, so dass eine Störung der Ausscheidung kaum ursächlich für eine Hyperhomocysteinämie sein kann. Stattdessen wird vermutet, dass die Hyperhomocysteinämie durch den verlangsamten Metabolismus verursacht wird.

### **Alters- und Geschlechtsabhängigkeit**

Die Homocystein-Plasmakonzentration nimmt mit dem Alter zu. Männer haben im jüngeren Alter normalerweise höhere Werte als Frauen. Bei 40-Jährigen beträgt die Geschlechtsdifferenz ca.  $2 \mu\text{mol/l}$ , sie kann mit dem Östrogeneffekt bei Frauen erklärt werden und nimmt in der Menopause rasch ab. Die altersabhängige Homocysteinerhöhung lässt sich zumindest teilweise durch die physiologische Abnahme der Nierenfunktion erklären. Die Zunahme der Homocystein-Konzentration verläuft bis zum 60.-65. Lebensjahr weitgehend

linear, danach deutlich schneller, im Durchschnitt um etwa 10% bzw. 1  $\mu\text{mol/l}$  pro Dekade (Wilcken und Wilcken, 1997; Ubbink et al., 1996).

### **Andere Ursachen für Homocysteinveränderungen**

Zahlreiche Wirkstoffe, Medikamente, Erkrankungen und Lebensstilfaktoren beeinflussen den Homocystein-Stoffwechsel, zumeist als direkte oder indirekte Antagonisten von Kofaktoren und Enzymaktivitäten, aber auch durch Disulfidaustauschreaktionen, Resorptionsstörungen und Enzyminduktion. Beispiele hierfür sind: Theophyllin (Vitamin-B<sub>6</sub>-Antagonist), Lachgas (N<sub>2</sub>O)(Cobaltoxidation) und verschiedene Antifolate (Ubbink et al., 1996; Stanger et al., 2003; Clarke et al., 1999).

#### 1.1.4. Homocystein als kardiovaskulärer Risikofaktor

Homocystein wird als Urämietoxin angesehen und stellt einen unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar (den Heijer et al., 1996; Robinson et al., 1996; Wu et al., 1994). Auf der Basis einer Metaanalyse über 27 epidemiologische Studien wurden bis zu 10% des kardiovaskulären Risikos einer Hyperhomocysteinämie zugewiesen (Boushey et al., 1995).

David Wald vom Southampton General Hospital und Mitarbeiter gelangten im Jahr 2002 durch eine systematische Metaanalyse von 92 Studien mit mehr als 20 000 Probanden zu dem Ergebnis, dass erhöhte Plasma-Homocysteinspiegel kausal mit ischämischen Herzerkrankungen assoziiert sind (Wald et al., 2002). Seit einigen Jahren verdichten sich die Hinweise darauf, dass eine - auch milde - Hyperhomocysteinämie einen unabhängigen Risikofaktor der Atherosklerose darstellen könnte. In einer norwegischen Studie konnte an 587 Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzkrankheit gezeigt werden, dass bei Patienten mit erhöhtem Plasma-Homocystein eine erheblich erhöhte Mortalität gegenüber Patienten mit normalen Plasma-Homocystein-Werten erwartet werden muss (Nygård et al., 1997). Patienten mit einer Plasma-Konzentration <9  $\mu\text{mol/l}$  dienten dabei als Referenzgruppe; das relative Mortalitätsrisiko gegenüber dieser Gruppe lag bei Patienten mit Plasma-Homocystein-Werten zwischen 9,0 und 14,9  $\mu\text{mol/l}$  bei 1,92 (95% Konfidenzintervall: 0,73-5,09), bei Plasma-Homocystein Werten zwischen 15,0 und 19,9  $\mu\text{mol/l}$  bei 2,78 (95%

Konfidenzintervall: 0,86–8,98) und bei Werten  $>20 \mu\text{mol/l}$  bei 4,51 (95% Konfidenzintervall: 1,22–16,6).

Über die Mechanismen, mit denen Homocystein seine toxischen Wirkungen ausübt, ist bisher folgendes bekannt: Der Homocysteinmetabolismus in kardiovaskulären Zellen ist ausschließlich auf die folat- und Vitamin-B<sub>12</sub>-abhängige Remethylierung angewiesen, da in Endothelzellen menschlicher Gefäße bislang keine Transsulfurierung nachgewiesen worden ist. Aufgrund des fehlenden irreversiblen Abbaus von Homocystein zu Cystein kann die Homocysteinsynthese den Zellexport rasch übersteigen und eine spezifische Zellschädigung bis hin zum Zelluntergang verursachen. Das kardiovaskuläre System ist daher, mehr als andere Organe, für Homocysteinerhöhungen besonders empfindlich (Chen et al., 1999; Hankey et Eikelboom, 1999). Ein Überschuss an Homocystein kann die Gefäßmorphologie verändern, entzündliche Prozesse stimulieren, das Endothel und die Gerinnungskaskade aktivieren sowie die Fibrinolyse hemmen. Insgesamt kommt es bei einer Hyperhomocysteinämie zum Verlust der antithrombotischen Endothelfunktion und zur Induktion eines prokoagulatorischen Milieus (Durand et al., 2001; Stanger et al., 2001). Den meisten der bekannten Schädigungen liegen homocysteinvermittelte oxidative Stressbelastungen zugrunde. Hierzu gehören besonders Veränderungen des intrazellulären Redoxpotenzials, die Generierung von freien Radikalen, die Beeinträchtigungen des NO-Systems und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren mit Stimulation von Genexpressionen. Zahlreiche Mechanismen wurden durch in-vivo-Untersuchungen und Versuche mit diätetisch induziertem Folatmangel und physiologischer Homocysteinerhöhung abgesichert.

## 1.2. Zusammenfassung der Studie

Bei der Studie handelt sich um einen prospektiven, randomisierten, placebo-kontrollierten Vergleich mit zweiarmigem cross-over-Design. Es wurden 14 (davon 14 Verum, 13 Placebo) gesunde Freiwillige in die Studie eingeschlossen. Diese bekamen an einem der zwei Studientage eine orale Homocysteinzufuhr von  $65,1 \mu\text{mol/kg KG}$  (im Durchschnitt  $754 \pm 100 \text{ mg}$  bzw.

4909 ± 651 µmol Homocystein) und am anderen 200 ml Placebo (Apfelsaft und Wasser). Ein Studientag bestand aus einem stationären Tag auf der Probandenstation mit vorausgehender Übernachtung und 2 ambulanten Blutentnahmen an den 2 Folgetagen.

Mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) wurden die SAM- und SAH-Konzentrationen in Vollblut, in Plasma und in Erythrozyten bestimmt.

Außerdem wurde mit Hilfe des Cytosin-Extension Assay (Pogribny et al., 1999) die Messung der Methylierungsrate der DNA in den gewonnen peripheren Lymphozyten durchgeführt.

Auch wurde mittels HPLC die Gesamthomocystein-Konzentration in Plasma und die Homocystein-Konzentration in Vollblut gemessen, sowie die Homocystein-Konzentration in Erythrozyten berechnet.

Eine weitere Zielgröße war die Messung der Sinistrin-Clearance als Grundlage für die kumulative Exkretion von Homocystein im Urin.

Die Genotypisierung bezüglich Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) erfolgte über die Pyrosequenzierung im Institut für Medizinische Genetik.

### 1.3. Studienziel

Bisher ist bekannt, dass eine *chronische Hyperhomocysteinämie*, die nicht exogen induziert ist, mit dem Anstieg der SAH-Konzentration und Abfall des MP korreliert. Der Abfall des Methylierungspotenzials wurde anhand der verminderten Methylierung der DNA von peripheren Lymphozyten gemessen (Yi et al., 2000).

In der vorliegenden Studie wurde überprüft, inwieweit eine *kurzzeitige, exogen induzierte Hyperhomocysteinämie* ausreicht, diese Parameter in gesunden männlichen Probanden zu beeinflussen.

Als sekundärer Zielparamester wurde die Menge des unveränderten, renal ausgeschiedenen Homocysteins in Relation zur oral verabreichten Homocystein-Dosis quantitativ bestimmt.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die gemessenen Parameter vom MTHFR-C677T-Genotyp abhängig sind.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Studienprobanden

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte über die Probandendatei der Abteilung Klinische Pharmakologie sowie durch direkte mündliche Ansprache.

Innerhalb von 2 Monaten bis zum Beginn der Studie erfolgte eine Voruntersuchung der Studieninteressenten, bestehend aus Anamnese, körperlicher Untersuchung, Ruhe-EKG und klinisch-chemischer Laboruntersuchung (Blut und Urin; erhobene Parameter: siehe Abb. 5). Im Rahmen dieser Voruntersuchung wurden nur diejenigen Studieninteressenten in die Studie aufgenommen, bei denen die folgenden Einschlusskriterien gegeben waren und keines der genannten Ausschlusskriterien zutraf.

#### **Einschlusskriterien:**

- gesunde Männer zwischen 18 und 30 Jahren
- Nichtraucher
- BMI zwischen 20 – 30 kg/m<sup>2</sup>
- unterschriebene Einverständniserklärung

**Ausschlusskriterien** (die angegebenen Normbereiche gelten für das Zentrallabor der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen):

- bekannte Allergien
- Erhöhung der Homocystein-Plasmakonzentration (>15 µmol/l)
- Mangel an Vitamin B<sub>6</sub> (<3,6 µg/l), Vitamin B<sub>12</sub> (<20 ng/l) oder Folsäure (<300 ng/dl)
- Hyper-/Hypothyreose (TSH <0,4 mU/l oder >2,5 mU/l)
- positive(r) Befund(e) für HBsAg, HCV-/HIV-Ak
- klinisch relevante Auffälligkeiten bei der körperlichen Untersuchung, Ruhe-EKG und beim übrigen klinisch-chemischen Labor (s. Tab. 1)
- Raucher
- Vegetarier

- positives Drogen-Screening
- relevante Vorerkrankungen:  
thromboembolische Ereignisse in der Anamnese  
kardiovaskuläre Erkrankung in der Anamnese
- regelmäßige Medikamenteneinnahme
- Teilnahme an einer klinischen Studie in den letzten 30 Tagen vor dem geplanten Studienbeginn
- mangelnde Compliance

Tab. 1: Gemessene Parameter bei der klinisch-chemischen Laboruntersuchung (im Rahmen der Voruntersuchung)

<b>Blutbild</b>	<b>Klinische Chemie</b>	<b>Urinuntersuchung</b>	<b>Sonstiges</b>
Leukozyten	Natrium	Leukozyten	Vitamin B <sub>6</sub>
Erythrozyten	Kalium	Nitrit	Vitamin B <sub>12</sub>
Hämatokrit	Kreatinin	pH-Wert	Folsäure
Hämoglobin	Gesamteiweiß	Protein	Homocystein
MCV	GOT	Glucose	MTHFR- Genotypisierung
MCH	GPT	Ketonkörper	HBV-Serologie
Thrombozyten	γGT	Urobilinogen	HCV-Serologie
	Bilirubin gesamt	Bilirubin	HIV-Serologie
	CRP	Hämoglobin	
	Quick	Drogen-Screening	
	PTT		
	TSH		

Die demographischen Daten der in die Studie aufgenommenen Probanden sind in Tab. 2 wiedergegeben.

Tab. 2: demographische Daten

Subj.-Nr.	Alter	Größe [cm]	Gewicht [kg]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	KO [m <sup>2</sup> ]
1	22	171	70	23,9	1,82
2	25	182	88	26,6	2,10
3	25	164	63	23,4	1,69
4	21	182	67	20,2	1,87
5	24	182	73	22,0	1,94
6	23	177	73	23,3	1,90
7	26	186	85	24,6	2,10
8	25	179	78	24,3	1,97
9	21	177	76	24,3	1,93
10	23	180	66	20,4	1,84
11	23	187	79	22,6	2,04
12	24	200	98	24,5	2,35
13	22	177	77	24,6	1,94
14	24	177	63	20,1	1,78
MW:		180,1	75,4	23,2	1,95
SD:		8,2	10,0	1,9	0,16
Min:		164	63	20,1	1,69
Max:		200	98	26,6	2,35

## 2.2. Herstellung der Studienmedikation

### L-Homocystein

Am Morgen des jeweiligen Studientages wurde die Homocystein-Lösung nach folgendem Rezept aus L-Homocystein-Thiolacton Hydrochlorid (Molekulargewicht: 153,6 g/mol; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Produktnummer 53527, Reinheit  $\geq 99\%$ ) hergestellt:

- Auflösen von 10 mg/kg KG pulverisiertem L-Homocystein-Thiolacton Hydrochlorid (entspricht 65,1 µmol/kg KG reduziertes Homocystein) in 5 ml 5 M NaOH
- 5 Minuten stehen lassen zum Öffnen des Thiolactonringes
- Hinzufügen von 5 ml 5 M HCl zur Neutralisation
- Einstellen des pH auf 4-5
- Hinzufügen von 90 ml Wasser und 100 ml Apfelsaft zur Geschmacksverbesserung bis zu einem Gesamtvolumen von 200 ml (Mansoor und Guttormsen, 1993).

### Placebo

Am Morgen des jeweiligen Studientages wurde die Placebo-Lösung aus 100 ml Wasser und 100 ml Apfelsaft hergestellt.

### 2.3. Clearance

Für die Clearance-Messung in der vorliegenden Studie wurde **Inutest**<sup>®</sup> (25%-ige Sinistrin-Lösung, Lagerung bei Raumtemperatur) von der Firma Fresenius Kabi GmbH, Graz, Österreich bezogen. Sinistrin ist mit Inulin strukturverwandt, ist jedoch aufgrund der verzweigten Molekularstruktur besser wasserlöslich.

Die Dosierung der Substanz ist abhängig von der Körperoberfläche des Probanden (KO), die mittels einer Formel aus Körpergewicht und Größe ermittelt wird (Du Bois und Du Bois, 1916).

$$KO = \text{Gewicht}^{0,425} \times \text{Größe}^{0,725} \times 0,007184 \text{ m}^2$$

KO            in m<sup>2</sup>

Gewicht    in kg

Größe        in cm

Berechnung der Sinistrinmengen:

1.) Boluslösung Infusionsrate 1000 ml/h:

Inutest<sup>®</sup>        6 ml/m<sup>2</sup> KO

Das Volumen der Inutest<sup>®</sup>-Lösung wurde zu 50 ml 0,9% NaCl-Lösung (Isotonische Natriumchlorid-Lösung, 250 ml, Delta-Pharma, Pfullingen, Bestellnummer: 2044289) dazugegeben.

Die Gesamtmenge der Boluslösung war abhängig von der Körperoberfläche des Probanden und betrug etwa 60-65 ml (Infusionsdauer: ca. 4 min).

2.) Hauptinfusionslösung (250 ml): Infusionsrate: 50 ml/h:

Inutest<sup>®</sup> 25 ml/m<sup>2</sup> KO

Zum Auffüllen des Infusionsvolumens auf 250 ml wurde 0,9% NaCl-Lösung (Isotonische Natriumchlorid-Lösung, 250 ml, Delta-Pharma, Pfullingen, Bestellnummer: 2044289) verwendet.

Gesamtmenge Hauptinfusionslösung: 750 ml liefen über die Gesamtdauer eines Studientages (ca. 14 h).

3.) Zusätzlich erfolgte eine Infusion von halbisotonischer 2,5% Glukoselösung (= halbisotonische Kochsalzlösung, 2,5% Glukose, 0,45% NaCl-Lösung<sup>®</sup>, 500 ml, Delta-Pharma, Pfullingen, Bestellnummer: 3426691) in einer Rate von 3 ml/kg KG für 1 Stunde, anschließend erfolgte die Infusion bilanzadaptiert.

Als renale Clearance einer Substanz ist diejenige Menge Blutplasma definiert, aus der der betreffende Stoff in einer Minute durch die Nierentätigkeit vollständig eliminiert wird. Die Verfahren werden danach unterschieden, ob körpereigene oder -fremde Substanzen Anwendung finden. Sinkt die Clearance ab, d.h. nimmt die Leistung der Niere ab, spricht man von Niereninsuffizienz. Somit wird die genaue Leistung der Nieren über die Clearance ermittelt. Hierzu gibt es verschiedene Verfahren:

1. Kreatinin-Clearance: Kreatinin wird in Relation zur Muskelmasse gebildet und in weitgehend konstanten Mengen pro kg Körpergewicht ausgeschieden. Da Kreatinin glomerulär filtriert und zumindest beim Gesunden von den Tubuluszellen weder rückresorbiert noch sezerniert wird, eignet es sich als endogene Substanz zur Bestimmung der Clearance.

2. Die Inulin-Clearance misst das Filtrationsvermögen der Niere. Hierzu wird dem Patienten Inulin verabreicht und gemessen, wie viel vom verabreichten Stoff pro Zeit wieder ausgeschieden wird. Da Inulin zwar filtriert, nicht aber

rückresorbiert wird, ist die Inulin-Clearance identisch mit der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Für den gesunden Jugendlichen liegt der Wert bei etwa 125 ml/min. Eine Abnahme des Wertes deutet auf eine Störung in der Nierenfunktion hin (Niereninsuffizienz). Mit zunehmendem Alter nimmt die GFR physiologisch auf 60-65 ml/min ab. Dies ist bei der Dosierung von Arzneistoffen, die über die Niere ausgeschieden werden, wichtig, da bei älteren Patienten durch die geringere GFR oft eine Verringerung der Dosis vorgenommen werden muss (Estelberger et al., 1995).

Die Kreatinin-Clearance wird wegen ihrer einfacheren Durchführung in der Klinik der Inulin-Clearance vorgezogen. Es wird die Ausscheidung von Kreatinin gemessen, die annähernd der von Inulin entspricht. Die Kreatinin-Plasmaspiegel schwanken nur wenig, was diese Messung überhaupt erst möglich macht. Vorteilhaft ist weiterhin, dass die Infusion, die bei der Messung der Inulin-Clearance erforderlich ist, entfällt (Delanaye et al., 2003).

Für die Clearance-Messung in der vorliegenden Studie wurde Inutest<sup>®</sup> (25%-ige Sinistrin-Lösung von der Firma Fresenius Kabi GmbH, Graz, Österreich) verwendet. Sinistrin ist mit Inulin strukturverwandt, ist jedoch aufgrund der verzweigten Molekularstruktur besser wasserlöslich.

Berechnung der Clearance:

$$\text{GFR [ml/min]} = \frac{U_{\text{Vol}} [\text{ml}] \cdot C_{\text{Urin}} (\text{Inulin}) [\text{ml/dl}] \cdot 1,73 \text{ m}^2}{C_{\text{Plasma}} (\text{Inulin}) [\text{ml/dl}] \cdot t [\text{min}] \cdot \text{KO} [\text{m}^2]}$$

## 2.4. Studiendesign und Studienablauf

### 2.4.1. Studiendesign

Die Studie wurde nach einem prospektiven, randomisierten, placebo-kontrollierten, zweiarmigen cross-over-Design durchgeführt. Die Randomisierung erfolgte anhand einer vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung erstellten Liste. Durch diese wurde die Reihenfolge Verum-Placebo versus Placebo-Verum für jeden einzelnen Probanden festgelegt.

Die Studie wurde auf der Probandenstation der Abteilung Klinische Pharmakologie, Station 3 Ost, der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt.

#### 2.4.2. Ablauf Studientag: siehe Flow Chart 2.7.2

Die Studie bestand aus den Studientagen 0, 1, 2 und 3. Am Tag 0 kamen die Probanden um 17:00 Uhr auf die Probandenstation. Sie erhielten anschließend eine Vollkost-Mahlzeit und blieben stationär bis zum Abend des darauf folgenden Tages (Tag 1).

Ein Studientag dauerte 15,5 Stunden. Während der ersten 7 Stunden befanden sich die Probanden in bequemer sitzender Position, anschließend konnten sich die Probanden auf der Station 3 Ost (vorderer Teil) frei bewegen. Darüber hinaus erfolgte 24 und 48 Stunden nach Gabe der Studienmedikation jeweils eine ambulante Blutentnahme.

Am Abend von Tag 0 durften die Probanden nach 22 Uhr nur noch Flüssigkeit zu sich nehmen. Hierbei waren alkohol- und koffeinhaltige Getränke untersagt.

Am Morgen von Tag 1 wurde an beiden Unterarmen jeweils eine Venenverweilkanüle gelegt, über die Infusionen bzw. Blutentnahmen durchgeführt werden konnten. Diese Kanülen verblieben für die Dauer des Studientages 1 (15,5 Stunden) in der Vene. Zur Blutentnahme nach 24 bzw. 48 Stunden wurde eine Einmalkanüle benützt.

Nach einer Blutentnahme zur Asservierung einer Blutprobe (zur Genotypisierung der Methylentetrahydrofolatreduktase), zur Bestimmung von Basalwerten (SAM/SAH-Konzentrationen in Plasma und Erythrozyten, DNA-Methylierung in peripheren Lymphozyten, Homocystein-Konzentration in Plasma und Vollblut), wurde die Infusion der Markersubstanz Sinistrin begonnen. Nach einer Äquilibrationsphase von 60 Minuten folgte eine Urinsammelperiode über 60 Minuten zur Bestimmung des Clearance-Ausgangswertes vor Homocystein-Gabe. Am Ende jeder Sammelperiode wurde eine Urinprobe zur Bestimmung der Studienparameter durch spontanes Wasserlassen gewonnen, hierbei wurde auf die vollständige Entleerung der

Blase geachtet. Jeweils zur Mitte der Sammelperioden wurde eine Blutprobe entnommen zur Bestimmung der Sinistrin-Konzentrationen im Plasma.

Die Studienmedikation wurde zum Zeitpunkt 0 h (im Anschluss an die Äquibrierungsphase (-2 bis -1 h) und die Leerwert-Clearance (-1 bis 0 h)) innerhalb von 5 Minuten oral eingenommen.

Die weiteren Blutentnahmen, bzw. deren Zeitpunkte, zur Bestimmung der SAM/SAH-Konzentrationen in Plasma und Erythrozyten, des Methylierungsgrads der DNA in peripheren Lymphozyten, der Homocystein-Konzentration in Plasma und Erythrozyten gehen aus Abbildung 6 hervor. Das im Rahmen der Studie abzunehmende Blut hat das Volumen von 175 ml nicht überschritten.

Die anschließenden Urinsammelperioden nach Gabe der Studienmedikation gingen über 1 (0-1 h), 1 (1-2 h), 2 (2-4 h), 2 (4-6 h), 2 (6-8 h) und 4 (8-12 h) Stunden. Am Ende jeder Sammelperiode wurde eine Urinprobe zur Bestimmung der Studienparameter durch spontanes Wasserlassen gewonnen, hierbei wurde auf die vollständige Entleerung der Blase geachtet. Jeweils zur Mitte der Sammelperioden (-0.5 h, 0.5 h, 1.5 h, 3 h, 5 h, 7 h, 10 h) wurde eine Blutprobe zur Bestimmung der Sinistrin-Konzentration im Plasma entnommen.

Es erfolgte zusätzlich eine Infusion von halbisotonischer 2,5% Glukoselösung in einer Rate von 3 ml/kg KG pro Stunde. Darüber hinaus führten die Probanden das in der Vorperiode über das Infusionsvolumen hinaus ausgeschiedene Flüssigkeitsvolumen in Form von Mineralwasser bis zum Ende der aktuellen Urinsammelperiode wieder zu.

Blutdruck und Herzfrequenz wurden stündlich bestimmt. Die Messung des Blutdruckes erfolgt oszillometrisch, die Herzfrequenz wurde pulsatorisch ermittelt.

#### 2.4.3. Standardisierung der Nahrungsaufnahme

6 Stunden nach Gabe der Studienmedikation wurde von den Probanden ein standardisiertes, protein- und vitaminarmes Mittagessen, das 250 ml Französische Spargelcremesuppe, 80 g eifreie Teigwaren, 150 g Tomatensoße und einen 120 g schweren Apfel enthielt (zusammengestellt in Zusammenarbeit

mit der Diätküche des Universitätsklinikums Tübingen), eingenommen. Nach weiteren 4 Stunden erhielten die Probanden ein standardisiertes, protein- und vitaminarmes Abendessen (zusammengestellt in Zusammenarbeit mit der Diätküche des Universitätsklinikums Tübingen) zum vollständigen Verzehr. Dieses beinhaltete 150 g Weißbrot, 15 g Butter, 25 g Erdbeerkonfitüre, 20 g Blütenhonig-Mischung, 120 g Apfel und 250 ml Früchtetee.

In der Gesamtsumme kann das standardisierte Essen als folsäurearm und proteinarm angesehen werden, da Mittag- und Abendessen gemeinsam 86 µg Folsäure und 24,18 g Protein enthielten. Laut Brouwer und Mitarbeiter gilt eine Diät als folsäure- und proteinarm, wenn sie < 200 µg Folsäure und maximal 12 – 15 g Proteine pro Mahlzeit enthält (Brouwer et al., 1999).

## 2.5. Abnahme, Lagerung und Verarbeitung der Proben

### 2.5.1. SAM- und SAH-Konzentration in Vollblut

Zuerst wird 5 ml eisgekühlte 0,6 N Perchlorsäure in ein Polypropylen-Röhrchen vorgelegt.

In dieses Röhrchen lässt man 2 ml Blut aus der Verweilkanüle tropfen.

Die Mischung aus Perchlorsäure (PCA) und Vollblut wird gut geschüttelt. Das Schütteln ergibt eine homogen braune Flüssigkeit.

Diese wird ein paar Minuten auf Eis gelegt, so dass die Perchlorsäure alle Proteine fällen kann.

Anschließend Zentrifugation bei 4000 U/min, 10 min, +4°C.

Kühlung des Überstandes auf Eis (ca. 3 Std. haltbar), anschließend erfolgt die Messung mittels HPLC.

### 2.5.2. SAM- und SAH-Konzentration in Plasma und Erythrozyten

Die Abnahme von 2 ml Blut erfolgt in ein kleines gekühltes EDTA-Röhrchen, das sofort auf Eis gestellt wird. Danach folgt eine Zentrifugation bei 1800 U/min, 5 min, +4°C

#### **Aufbereitung des Plasmas:**

100 µl 30% Trichloressigsäure (TCA) in 1 E-Cup vorlegen, 1 ml Plasma-Überstand dazupipettieren. Anschließend gut schütteln und auf Eis stellen.

Zentrifugation des E-Cups bei 4000 U/min, 10 min, +4°C. Den Überstand in neuen E-Cup pipettieren. Eine Analytik von Plasma auf SAM und SAH konnte nicht durchgeführt werden, da die Werte unterhalb der HPLC-Nachweisgrenze lagen.

#### **Aufbereitung der Erythrozyten:**

Es werden 4 ml kalte 0,6 N Perchlorsäure in ein Polypropylen-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wird 1 ml Erythrozyten-Sediment dazupipettiert. Das Röhrchen gut schütteln und auf Eis stehen lassen.

Zentrifugation des PP-Röhrchens bei 4000 U/min, 10 min, +4°C.

Den Überstand (= Erythrozyten-Zytosol) in neues Polypropylen-Gefäß pipettieren.

Kühlung auf Eis (ca. 3 Std. haltbar), anschließend Messung mittels HPLC.

#### **HPLC**

HPLC steht für High Performance Liquid Chromatography (in den Anfangszeiten dieser Technik auch für "High Pressure Liquid Chromatography"). Es handelt sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem flüssigen Laufmittel, der "mobilen Phase" (auch "Eluent" genannt) auf eine sog. Trennsäule, die die "stationäre Phase" darstellt, gegeben wird. Besteht eine starke Wechselwirkung zwischen einem Bestandteil der zu untersuchenden Substanz und der stationären Phase, verbleibt er relativ lange in der Säule. Wechselwirkt er hingegen stark mit der mobilen Phase, verlässt er die Säule früher. Je nach Stärke dieser Wechselwirkungen erscheinen die Bestandteile der Substanz zu verschiedenen Zeiten (den "Retentionszeiten") am Ende der Trennsäule, wo sie dann mit einem geeigneten Detektor (für SAM, SAH: UV-Detektor und für Homocystein: Fluoreszenz-Detektor) nachgewiesen werden können (Zhloba und Blashko, 2004).

### 2.5.3. Methylierungsgrad der DNA in Lymphozyten

Gewinnung der Lymphozyten:

Zuerst müssen 16 ml Vollblut in 2 große EDTA-Röhrchen abgenommen werden. Bei 6750/ $\mu$ l Leukozyten und 32,5% Lymphozyten (Durchschnittswerte) befinden sich im abgenommenen Vollblut ca. 35 Mio. Lymphozyten; mind. 10 Mio. sind für eine DNA-Analytik erforderlich.

Die Präparation wird zeitnah gemacht, da nicht bekannt ist, ob und wie sich der DNA-Methylierungsgrad beim Stehen der Probe verändert. Arbeit unter dem Abzug ist nur für Gewinnung von Zellkulturen erforderlich. Für DNA-Isolation ist kein Abzug erforderlich.

Präparation der Lymphozyten:

Es wird 20 ml Ficoll-Gradient (Biochrom-AG, Leonorenstr. 2-6, 12247 Berlin Nr. L 6115) in einen 50 ml Gefäß vorgelegt. Abgenommenes EDTA-Blut (2x8 ml) wird zu 16 ml PBS-Puffer ("Dulbecco's") Gibco, Eggenstein 14190-094) dazugegeben und geschwenkt. Das mit PBS-Puffer verdünnte EDTA-Blut wird vorsichtig auf die Ficoll-Lösung draufgeschichtet (Falcon tube mit Ficoll-Lösung schräg halten). Vor allem die ersten 2 Tropfen müssen so langsam wie möglich abgegeben werden.

1. Zentrifugation: 1400 U/min, 30 min, +19°C, ohne Bremse.

Nach der ersten Zentrifugation hat sich ein Lymphozytenring zwischen Plasma-PBS-Puffer Gemisch und dem Ficollgradienten gebildet. Die Erythrozyten und Thrombozyten haben sich in der Spitze des Falcon tubes abgesetzt. Diese Vorgänge kann man anhand der Dichteunterschiede der verschiedenen Substanzen und Zellen erklären.

Der Großteil des oberen Plasmas wird mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und verworfen. Der Lymphozytenring wird an der Grenzschicht Ficoll-Plasma flächig abgesaugt und in einen neuen 50 ml-Falcon tube pipettiert.

Dieser Falcon tube wird mit PBS-Puffer auf ca. 40 ml aufgefüllt und geschwenkt.

2. Zentrifugation (lymphozytenangereichertes Plasma): 2000 U/min, 10 min, +19°C, Bremse kann aktiviert sein.

Der Falcon tube wird 1x kurz umgekippt, um den Überstand zu entfernen.

Ersatzweise kann auch mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe der Überstand vorsichtig abgesaugt werden.

Anschließend wird der Falcon tube mit PBS-Puffer auf ca. 20 ml aufgefüllt und geschwenkt, so dass der Lymphozytenpellet gründlich resuspendiert ist.

3. Zentrifugation: 2000 U/min, 10 min, +19°C, Bremse kann aktiviert sein.

Der Falcon tube wird 1x gekippt um den Überstand zu entfernen. (Der Pellet soll möglichst trocken liegen). Eine zeitnahe DNA-Isolation ist empfehlenswert und für eine einwandfreie DNA-Gewinnung Voraussetzung. Anschließend ist das Einfrieren der DNA möglich.

Nach der DNA-Gewinnung wurde mit Hilfe des Cytosin-Extension Assay (Pogribny et al., 1999) die Messung der DNA-Methylierungsrate der gewonnenen Lymphozyten durchgeführt. Hierbei wird die DNA durch Restriktionsenzyme, die nur an nicht methylierten Stellen schneiden, zerlegt. Anschließend wird radioaktiv markiertes Desoxycytidintriphosphat ( $^3\text{H-dCTP}$ ) mit einer DNA-Polymerase eingebaut. In eigenen Versuchen (unveröffentlicht) konnten in DNA-Mengen von 0,5  $\mu\text{g}$ /Ansatz sehr gut reproduzierbare Inkorporationsraten von  $^3\text{H-dCTP}$  abhängig vom Methylierungsgrad der DNA erreicht werden.

#### 2.5.4. Gesamthomocystein-Konzentration im Plasma

Es wurden 3 ml Vollblut in gekühlte EDTA-Monovetten abgenommen, diese kamen sofort auf Eis und wurden bei 4000 g und +4°C für 10 min zentrifugiert. Anschließend folgte die Aliquotierung und Lagerung bei -25°C bis zur Bestimmung mittels HPLC im Zentrallabor der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen.

#### 2.5.5. Homocystein-Konzentration in Vollblut und Erythrozyten

Eine 20  $\mu\text{l}$  Kapillare wird mit Hilfe eines speziellen Kapillarabnahmesystem (Fa. BIO-RAD, München) mit Vollblut gefüllt. Dieses Vollblut stammt aus dem aufgeschraubten EDTA-Röhrchen, das zur Hämatokrit-Bestimmung abgenommen wurde.

Die Kapillare wird in den dafür vorgesehenen E-Cup, der eine Detergens-Lösung enthält, gegeben und der E-Cup kurz geschüttelt.

Lagerung bei +4°C über max. 3 Tage.

Die Analytik ist nur mit HPLC (Zentrallabor) möglich. Analysen mit Antikörpern (Chemilumineszenz-Detektion) werden durch die Matrix gestört.

Gemessen wird die Homocystein-Konzentration in Vollblut. Die Berechnung der Homocystein-Konzentration in Erythrozyten erfolgt über die Formel:

$$C_{\text{Ery}} = C_{\text{Plasma}} + (C_{\text{Vollblut}} - C_{\text{Plasma}}) / \text{Hämatokrit}$$

Die Proben sollten rasch und vor allem gekühlt weiterverarbeitet werden, damit es nicht zu Verfälschungen der Homocystein Werte kommt. Bei der Beurteilung der Stabilität im Vollblut zeigte sich nach einer Lagerung von 4 Stunden bei Raumtemperatur ein Homocystein-Anstieg um 17% und nach 24 Stunden um 103% im Vergleich zu den sofort zentrifugierten und weiterverarbeiteten Proben (Pfund et al., 1996).

#### 2.5.6. Homocystein-Konzentration im Urin

Es erfolgte die Aliquotierung von 3 x 1,9 ml Urin (zu den Zeitpunkten: pre-dose, +0.5, +1, +2, +3, +4, +6, +8, +12, +24, +48 Stunden nach Gabe der Studienmedikation) und die Lagerung für die maximale Zeitdauer von 6 Monaten bei -25°C bis zur Weiterverarbeitung.

Analytik:

Die kumulative Homocysteinausscheidung im Urin wird mit Hilfe der HPLC durch einen Homocystein-Assay von BIO-RAD (München) bestimmt. Für diese Messung wurde der interne Standard durch Mercaptopropionsäure ersetzt, um Interferenzen mit unbekanntem Urinbestandteilen zu verhindern.

Die Mercaptopropionsäure wird relativ spät eluiert (Retentionzeit: ca. 5 min). Dies hat den Vorteil, dass keine Interferenz mit Urinbestandteilen, die früher eluiert werden, stattfindet (Delabar et al., 1999; Proksch et al., 2005).

#### 2.5.7. Sinistrin-Konzentration im Plasma

Zuerst erfolgte eine Abnahme von 5 ml Vollblut in Serum-Monovetten, daraufhin die Zentrifugation bei 4000 U/min, +4°C für 10 min. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -25°C bis zur vollenzymatischen Bestimmung der Sinistrin-

Konzentration gelagert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Sinistrin-Konzentration im Plasma mit der kolorimetrischen Methode (Extinktion).

#### 2.5.8. Genotypisierung bezüglich Methylentetrahydrofolatreduktase

Pro Proband wird eine einmalige Abnahme von 9 ml Vollblut in EDTA-Monovetten benötigt. Die Monovetten werden bei -25°C für maximal 6 Monate bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die DNA-Isolierung aus peripheren Lymphozyten mittels Qiagen-Kit (QIAamp DNA Blood Kit) wird im Institut für Medizinische Genetik (Universitätsklinikum Tübingen) durchgeführt. Hierfür werden 2 Proben vorbereitet: eine C Allel spezifische Probe (5'-Tet-TCT GCG GGA GcC GAT TTC ATC ATC-Tamra-3') und eine T Allel spezifische Probe (5'-Fam-TCT GCG GGA GtC GAT TTC ATC ATC-Tamra-3').

Der angrenzende Bereich für den Primer bei der PCR der MTHFR C677T ist wie folgt: vorwärts 5'-GGC TGA CCT GAA GCA CTT GAA-3', rückwärts 5'-GCG GAA GAA TGT GTC ATC CT-3'. Die Echtzeit-PCR wird mit einem Wärmeaustauscher (thermal cycler) durchgeführt (GeneAmp, PCR System 9700, Applied Biosystems). Sie verläuft unter folgenden Randbedingungen: initiale Denaturierung bei 95°C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C für 15 s und 60°C für 60 s.

Die Genotypisierung der C677T MTHFR wird mittels TaqMan-Analytik nach Zhang und Mitarbeiter ebenfalls im Institut für Medizinische Genetik (Universitätsklinikum Tübingen) durchgeführt (Zhang et al., 2004). Alle Mitarbeiter und Probanden waren während der Durchführung und Auswertung der Studie bezüglich des MTHFR C677T Genotyps verblindet.

Die MTHFR-Genotypisierung wird durchgeführt, um eventuelle „Ausreißer“ durch den zugrunde liegenden Genotyp erklären zu können (Cortes und Motti, 2001).

## 2.6. Statistische Auswertung

### 2.6.1. Primäres Zielkriterium

Nachweis eines erniedrigten SAM/SAH-Methylierungspotenzials im Vollblut und in Erythrozyten nach oraler Gabe von Homocystein im Vergleich zu Placebo und daraus resultierender Erniedrigung des Methylierungsgrades der DNA peripherer Lymphozyten. Relevant für die Bestimmung der primären Zielparameter sind die Messungen 60 Minuten nach Einnahme von Verum bzw. Placebo.

### 2.6.2. Sekundäre Zielkriterien

- zeitliche Verläufe der SAM- und SAH-Konzentration im Plasma und Erythrozyten sowie des DNA-Methylierungsgrads
- Konzentrationsveränderungen von Homocystein nach oraler Gabe von Homocystein im Plasma, in Erythrozyten und im Urin
- Pharmakokinetik von Homocystein:  $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $t_{1/2}$  und  $AUC_{(0-48\text{ h})}$
- Homocystein-clearance in Bezug zur Sinistrin-Clearance

### 2.6.3. Fallzahlplanung

Grundlage für die Fallzahlschätzung waren Literaturwerte für das Methylierungspotenzial und den DNA-Methylierungsgrad bei Personen mit normalem und erhöhtem Homocysteinplasmaspiegel ( $4,43 \pm 1,48$  bzw.  $2,4 \pm 1,28$  sowie  $8 \cdot 10^3 \pm 4 \cdot 10^3$  bzw.  $22 \cdot 10^3 \pm 10 \cdot 10^3$  dpm/ $\mu\text{g}$  DNA, jeweils Mittelwert und Standardabweichung; Yi et al., 2000). Um eine Senkung des Methylierungspotenzials von 4,43 auf 2,4 mit den oben angegebenen Standardabweichungen signifikant nachzuweisen, sind insgesamt 14 Probanden nötig ( $\alpha$ -Fehler 0,05, Power 90%).

Diese Anzahl reicht auch aus, um eine Erhöhung des DNA-Methylierungsgrades von  $8 \cdot 10^3$  auf  $22 \cdot 10^3$  dpm/ $\mu\text{g}$  DNA mit einem  $\alpha$ -Fehler von 0,05 und einer Power von 90% statistisch signifikant nachzuweisen.

Ergebnisse mit  $p < 0,05$  gelten als statistisch signifikant.

#### 2.6.4. Auswertungsstrategie

Der primäre Zielparameter „Senkung des Methylierungspotenzials bei Probanden mit erhöhtem Homocysteinspiegel gegenüber Probanden mit Homocysteinspiegel im Normbereich 60 Minuten nach Einnahme von Verum bzw. Placebo“ wird mittels ANOVA-Test ausgewertet, da die Daten normalverteilt waren.

ANOVA (=ANalysis Of Variance) ist der englische Begriff für einfaktorielle Varianzanalyse (Rasch et al., 2004).

Bei allen Angaben handelt es sich um den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (MW  $\pm$  SD).

Die Auswertung der sekundären Zielparameter und die Ergebnisse der statistischen Testverfahren, die hierfür verwendet werden, haben rein beschreibenden Charakter.

#### 2.7. Allgemeine Bestimmungen

##### 2.7.1. Gesetzliche Bestimmungen

Außer der Deklaration von Helsinki werden folgende Gesetze und Verordnungen auf die klinische Prüfung angewandt:

- Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (AMG auf dem Stand der 11. AMG-Novelle)
- Grundsätze für die ordnungsgemäße Durchführung der klinischen Prüfung von Arzneimitteln vom Bundesminister für Jugend, Familie, Frauen und Gesundheit (Version vom 9. Dezember 1987)
- Gute Klinische Praxis für die klinische Prüfung von Arzneimitteln in der Europäischen Gemeinschaft in der aktuellen Version (Version vom Juli 2002, <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/013595en.pdf>)

Es handelt sich um eine wissenschaftliche Studie. Das Arzneimittelgesetz §40 findet uneingeschränkte Anwendung. Die Auflagen laut §40 unter Berücksichtigung von §42 werden erfüllt.

Es liegt ein positives Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Tübingen vor (Antragsnr: 155/2002). Die Anforderungen des Datenschutzes waren in vollem Umfang gewährleistet.

## 2.7.2. Flow Chart

Zeit	≤ 30 d vor Studienbeginn	Vorabend 17:00	~-2,5	<-2 h	-2h	-1h	-0,5h	0h	0,25h	0,5h	0,75h	1h	1,5h	2h	3h	4h	5h	6h
Einschlusskriterien	•		•															
Ausschlusskriterien	•		•															
Patientenaufklärung/Einwilligung	•																	
Anamnese	•																	
Körperliche Untersuchung	•																	
Ruhe-EKG	•																	
Labor	•																	
Urin-Stix	•																	
Genotypisierung (MTHFR C677T)	•																	
Ankunft auf der Probandenstation		•																
Blutentnahme Homocystein (Plasma)			•						•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Blutentnahme Homocystein (Vollblut)			•									•		•		•		
Blutentnahme SAM/SAH (Plasma + Ery), Hämatokrit			•									•		•		•		
Blutentnahme Sinistrin (Serum)			•				•			•					•		•	
Blutentnahme Lymphozytengewinnung			•									•						
Urinprobe Homocystein			•							•		•		•	•	•		•
Urinprobe Sinistrin			•					•				•		•		•		•
Hämodynamik RR/Puls			•					•				•		•	•	•		•
Beginn Bolusinfusion				•														
Beginn Hauptinfusion					•													
Urin: nur Volumenmessung						•												
Einnahme Studienmedikation (< 5 min)								•										
Mittagessen																•		
Abendessen		•																

## Flow Chart

Zeit	7h	8h	9h	10h	11h	12h	24h	48h
Einschlusskriterien								
Ausschlusskriterien								
Patientenaufklärung/Einwilligung								
Anamnese								
Körperliche Untersuchung								
Ruhe-EKG								
Labor								
Urin-Stix								
Genotypisierung (MTHFR C677T)								
Ankunft auf der Probandenstation								
Blutentnahme Homocystein (Plasma)		•				•	•	•
Blutentnahme Homocystein (Vollblut)		•					•	•
Blutentnahme SAM/SAH (Plasma + Ery), Hämatokrit		•					•	•
Blutentnahme Sinistrin (Serum)	•			•				
Blutentnahme Lymphozytengewinnung		•					•	•
Urinprobe Homocystein		•				•	•	•
Urinprobe Sinistrin		•				•		
Hämodynamik RR/Puls		•	•	•	•	•		
Beginn Bolusinfusion								
Beginn Hauptinfusion								
Urin: nur Volumenmessung								
Einnahme Studienmedikation								
Mittagessen								
Abendessen						•		

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Homocystein-Kinetik

##### 3.1.1. Homocystein-Konzentration in Plasma

Nach Homocystein-Gabe stieg die Homocystein-Konzentration im Plasma von  $8,9 \pm 1,5 \mu\text{mol/l}$  auf ein Maximum ( $C_{\text{max}}$ ) von  $90,4 \pm 12,3 \mu\text{mol/l}$  zum Zeitpunkt ( $t_{\text{max}}$ )  $34,3 \pm 10,9 \text{ min}$  an. Die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) der Homocystein-Konzentration im Plasma betrug  $257 \pm 41 \text{ min}$ . Nach 48 h lag die Homocystein-Konzentration im Plasma bei  $11,0 \pm 2,0 \mu\text{mol/l}$ . Die übrigen Werte lagen zwischen dem Ausgangswert und dem Maximum. Die  $\text{AUC}_{(0 - 48 \text{ h})}$  nach Homocystein-Gabe betrug in Plasma  $486 \pm 71 \mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$ . Die Werte der Homocystein-Konzentration im Plasma unter Placebo unterlagen einer wesentlich geringeren Schwankung und befanden sich in einem Bereich von  $8,3 \pm 1,6 \mu\text{mol/l}$  bis  $10,8 \pm 2,4 \mu\text{mol/l}$  (Abb. 5).

##### 3.1.2. Homocystein-Konzentration in Vollblut

Nach Homocystein-Gabe stieg die Homocystein-Konzentration in Vollblut von  $11,7 \pm 2,6 \mu\text{mol/l}$  auf ein Maximum ( $C_{\text{max}}$ ) von  $72,4 \pm 13,0 \mu\text{mol/l}$  zum Zeitpunkt ( $t_{\text{max}}$ )  $64,3 \pm 16,0 \text{ min}$ . Die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) der Homocystein-Konzentration in Vollblut betrug  $328 \pm 45 \text{ min}$ . Nach 48 h lag die Homocystein-Konzentration in Vollblut bei  $14,6 \pm 4,7 \mu\text{mol/l}$ . Die übrigen Werte lagen zwischen dem Ausgangswert und dem Maximum. Die  $\text{AUC}_{(0 - 48 \text{ h})}$  nach Homocystein-Gabe betrug in Vollblut  $492 \pm 127 \mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$ . Die Werte der Homocystein-Konzentration in Vollblut unter Placebo schwankten kaum und lagen in einem Bereich von  $11,1 \pm 2,3 \mu\text{mol/l}$  bis  $12,0 \pm 2,9 \mu\text{mol/l}$ .

##### 3.1.3. Homocystein-Konzentration in Erythrozyten

Nach Homocystein-Gabe stieg die Homocystein-Konzentration in Erythrozyten von  $15,9 \pm 6,1 \mu\text{mol/l}$  auf ein Maximum ( $C_{\text{max}}$ ) von  $68,4 \pm 29,1 \mu\text{mol/l}$  zum Zeitpunkt ( $t_{\text{max}}$ )  $77,1 \pm 28,1 \text{ min}$ . Die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) der Homocystein-

Konzentration in Erythrozyten betrug  $470 \pm 313$  min. Nach 48 h lag die Homocystein-Konzentration in Erythrozyten bei  $19,5 \pm 12,1$   $\mu\text{mol/l}$ . Die übrigen Werte lagen zwischen dem Ausgangswert und dem Maximum. Die  $\text{AUC}_{(0-48\text{ h})}$  nach Homocystein-Gabe betrug in Erythrozyten  $470 \pm 311$   $\mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$ . Die Werte der Homocystein-Konzentration in Erythrozyten unter Placebo schwankten kaum und lagen in einem Bereich von  $13,6 \pm 6,5$   $\mu\text{mol/l}$  bis  $15,3 \pm 4,6$   $\mu\text{mol/l}$  (Abb.5).

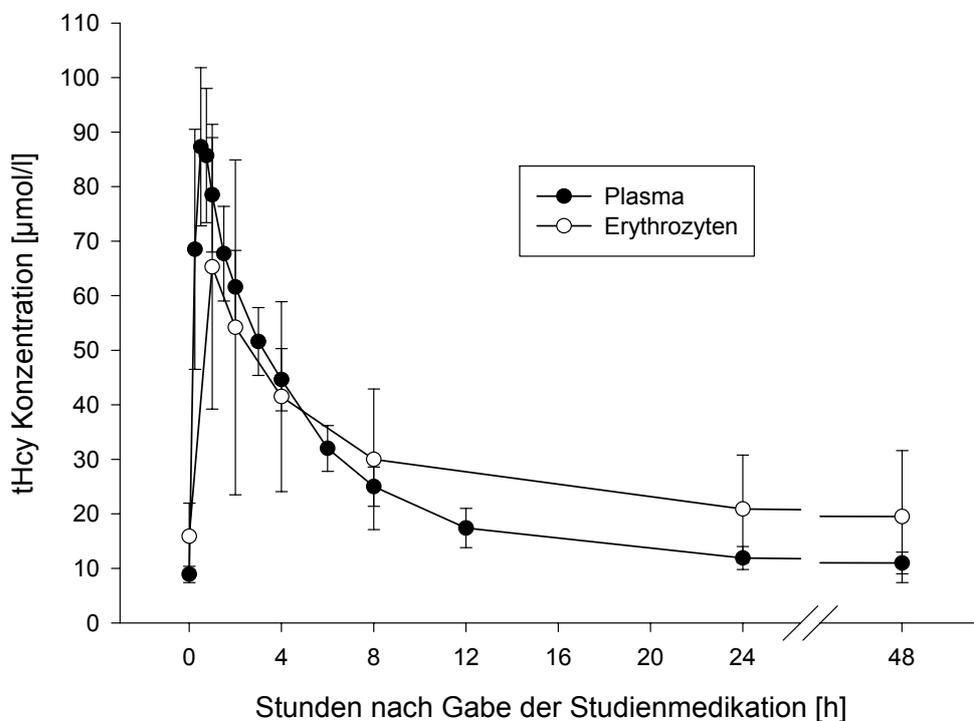


Abb. 5: Zeitverlauf der Homocystein-Konzentration in Plasma und Erythrozyten

### 3.1.4. Homocystein-Ausscheidung im Urin

#### a) Kumulative Homocystein-Ausscheidung im Urin

Von 0 - 12 h nach Homocystein-Gabe wurde eine durchschnittliche Menge von  $110,6 \pm 31,9$   $\mu\text{mol}$  Homocystein im Urin ausgeschieden. Dies entspricht  $2,3 \pm 0,7\%$  der oral verabreichten Homocysteinmenge (Abb. 6).

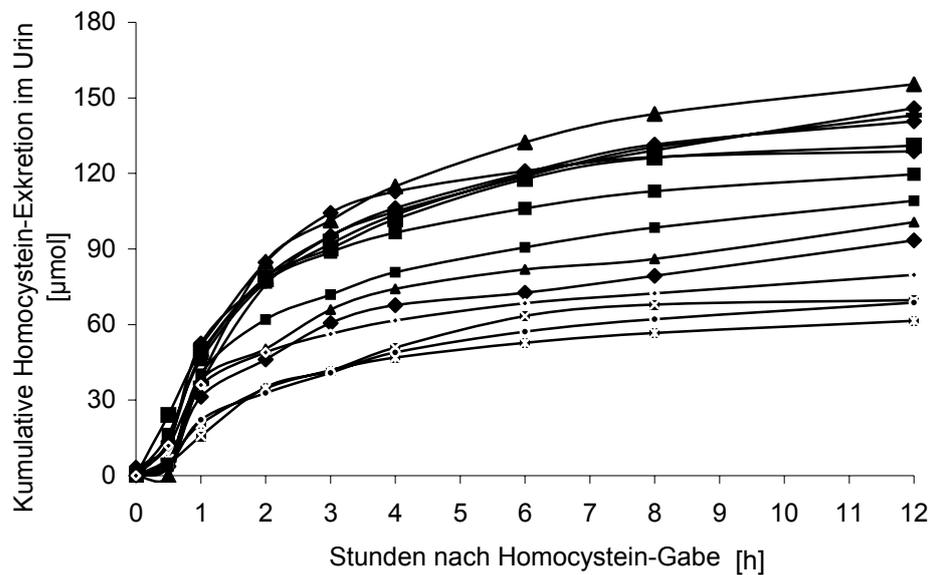


Abb. 6: Kumulative Homocystein-Ausscheidung im Urin

#### b) Renale Homocystein-Clearance

Nach Homocystein-Gabe stieg die renale Homocystein-Clearance von  $0,5 \pm 1,3$  ml/min pro  $1,73 \text{ m}^2$  Körperoberfläche auf ein Maximum von  $10,8 \pm 4,2$  ml/min pro  $1,73 \text{ m}^2$  Körperoberfläche nach 1 h. Danach fiel die renale Homocystein-Clearance und lag 12 h nach Homocystein-Gabe bei  $1,51 \pm 0,83$  ml/min pro  $1,73 \text{ m}^2$  Körperoberfläche (Abb. 7).

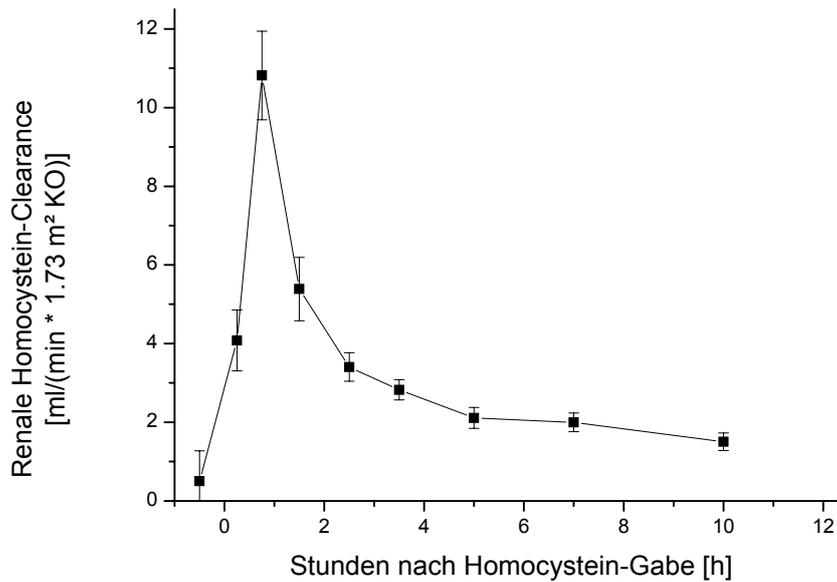


Abb. 7: Renale Homocystein-Clearance nach einmaliger Homocystein-Gabe

### 3.2. Glomeruläre Filtrationsrate

#### 3.2.1. Zeitverlauf der glomerulären Filtrationsrate bei Verum

Nach Homocystein-Gabe stieg die GFR von  $91,3 \pm 14,1$  ml/min pro  $1,73 \text{ m}^2$  Körperoberfläche auf ein Maximum von  $104,9 \pm 13,4$  ml/min pro  $1,73 \text{ m}^2$  Körperoberfläche nach vier Stunden. Danach fiel die GFR auf ein Minimum von  $87,6 \pm 13,7$  ml/min pro  $1,73 \text{ m}^2$  Körperoberfläche bei 6 Stunden. Anschließend stieg die GFR wieder gering. Alle Werte lagen im Normbereich. Es gab keine statistisch signifikanten Steigungen oder Reduktionen gegenüber dem pre-dose Wert (Abb. 8).

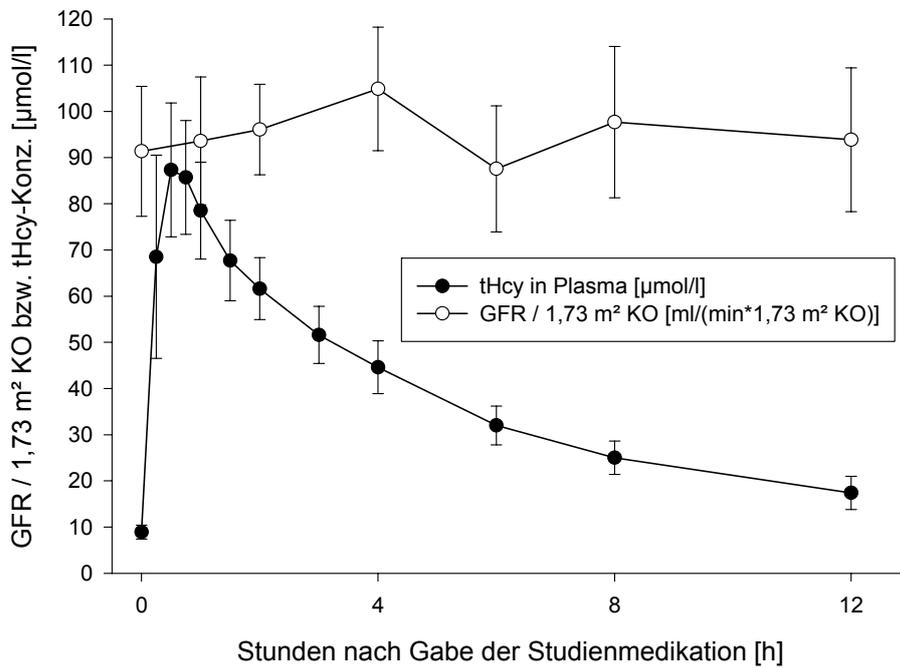


Abb. 8: Zeitverlauf der glomerulären Filtrationsrate bei Verum

### 3.2.2. Zeitverlauf der glomerulären Filtrationsrate bei Placebo

Die Werte der GFR unter Placebo unterlagen einer Schwankung im Bereich von  $84,3 \pm 27,6$  ml/min pro  $1,73 \text{ m}^2$  Körperoberfläche bis  $100,0 \pm 27,5$  ml/min pro  $1,73 \text{ m}^2$  Körperoberfläche. Das Minimum der GFR von  $100,0 \pm 27,5$  ml/min pro  $1,73 \text{ m}^2$  Körperoberfläche liegt bei 4 Stunden. Alle Werte lagen im Normbereich. Es gab keine statistisch signifikanten Steigungen oder Reduktionen gegenüber dem pre-dose Wert (Abb. 9).

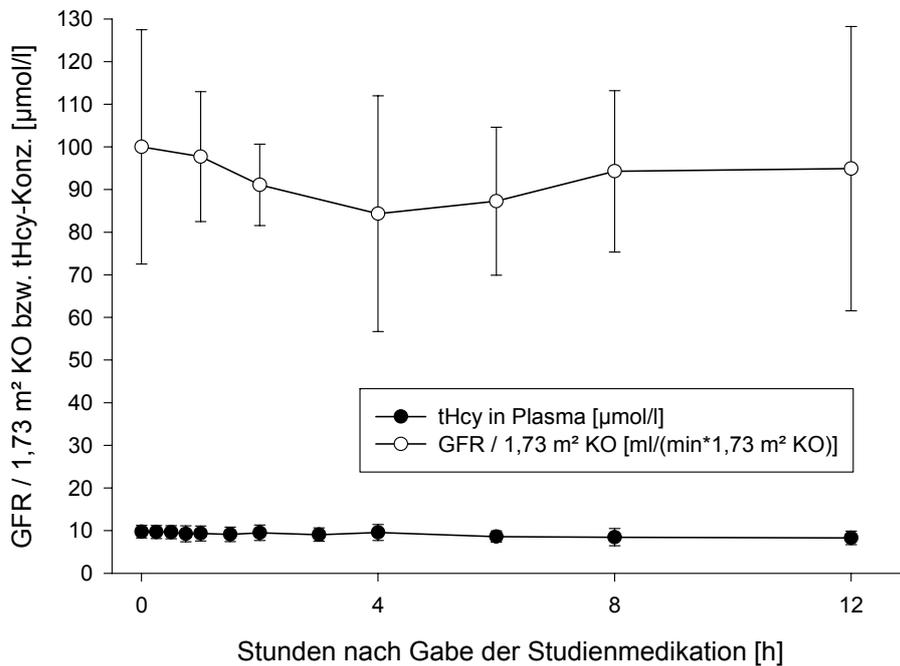


Abb. 9: Zeitverlauf der glomerulären Filtrationsrate bei Placebo

### 3.3. SAM-Messungen

#### 3.3.1. SAM-Konzentration in Vollblut

Nach Homocystein-Gabe stieg die SAM-Konzentration in Vollblut von  $2,03 \pm 0,38 \mu\text{mol/l}$  auf ein Maximum von  $2,23 \pm 0,39 \mu\text{mol/l}$  zum Zeitpunkt 2 h. Danach fiel die SAM-Konzentration in Vollblut wieder und erreichte beinahe wieder den Ausgangswert.

Die Werte der SAM-Konzentration in Vollblut unter Placebo unterlagen einer Schwankung im Bereich von  $1,89 \pm 0,29 \mu\text{mol/l}$  bis  $2,23 \pm 0,28 \text{ nmol/l}$ . Hier ist kein Maximum bzw. Minimum erkennbar.

Die Unterschiede der SAM-Konzentration in Vollblut zwischen Verum und Placebo waren nicht signifikant (Abb. 10).

### 3.3.2. SAM-Konzentration in Erythrozyten

Nach Homocystein-Gabe fiel die SAM-Konzentration in Erythrozyten von  $4,0 \pm 0,87 \mu\text{mol/l}$  auf ein Minimum von  $3,96 \pm 0,95 \mu\text{mol/l}$  zum Zeitpunkt 1 h. Danach stieg die SAM-Konzentration in Erythrozyten wieder an. Die übrigen Werte schwankten zwischen dem Minimum und dem 24 h-Wert, der bei  $4,46 \pm 1,04 \mu\text{mol/l}$  lag.

Die Werte der SAM-Konzentration in Erythrozyten unter Placebo unterlagen einer Schwankung im Bereich von  $4,02 \pm 0,80 \mu\text{mol/l}$  bis  $4,42 \pm 0,74 \mu\text{mol/l}$ . Hier ist kein Maximum beziehungsweise Minimum erkennbar.

Die Unterschiede der SAM-Konzentration in Erythrozyten zwischen Verum und Placebo waren nicht signifikant (Abb. 10).

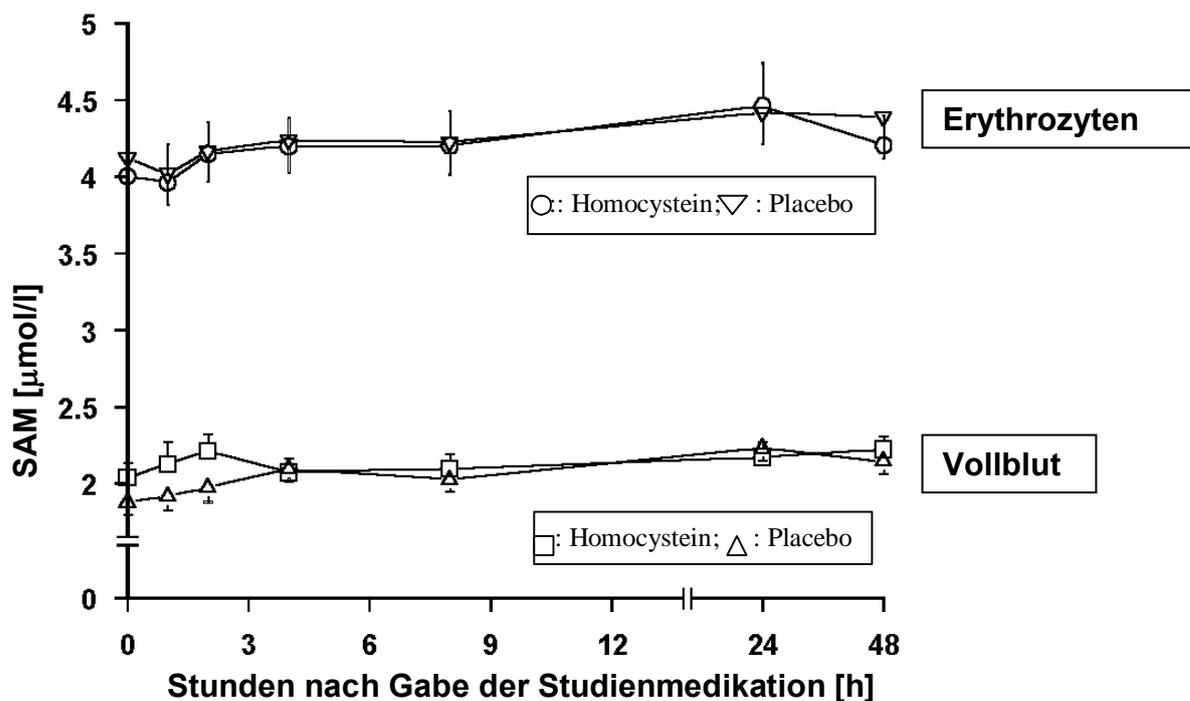


Abb. 10: Zeitverlauf der SAM Konzentration in Erythrozyten bzw. in Vollblut:

### 3.4. SAH-Messungen

#### 3.4.1. SAH-Konzentration in Vollblut

1 h nach Homocystein-Gabe stieg die SAH-Konzentration in Vollblut von  $217,6 \pm 60,6$  nmol/l auf ein Maximum von  $255,7 \pm 79,6$  nmol/l. Danach fiel die SAH-Konzentration in Vollblut auf ein Minimum von  $199,7 \pm 47,9$  nmol/l zum Zeitpunkt 4 h. Die übrigen Werte lagen zwischen Minimum und Maximum und erreichten nach 48 h den Ausgangswert.

Die Werte der SAH-Konzentration in Vollblut unter Placebo unterlagen einer Schwankung im Bereich von  $210,8 \pm 52,5$  nmol/l bis  $235,6 \pm 57,5$  nmol/l. Hier ist kein Maximum bzw. Minimum erkennbar.

Die Unterschiede der SAH-Konzentration in Vollblut zwischen Verum und Placebo waren nicht signifikant (Abb. 11).

#### 3.4.2. SAH-Konzentration in Erythrozyten

1 h nach Homocystein-Gabe stieg die SAH-Konzentration in Erythrozyten von  $323,6 \pm 129$  nmol/l auf ein Maximum von  $353,2 \pm 86$  nmol/l. Danach fiel die SAH-Konzentration in Erythrozyten auf ein Minimum von  $300,6 \pm 99,9$  nmol/l zum Zeitpunkt 4 h. Die übrigen Werte lagen zwischen Minimum und Maximum.

Die Werte der SAH-Konzentration in Erythrozyten unter Placebo unterlagen einer Schwankung im Bereich von  $327,7 \pm 116,9$  nmol/l bis  $360,2 \pm 73,6$  nmol/l. Hier ist kein Maximum bzw. Minimum erkennbar.

Die Unterschiede der SAH-Konzentration in Erythrozyten zwischen Verum und Placebo waren nicht signifikant (Abb. 11).

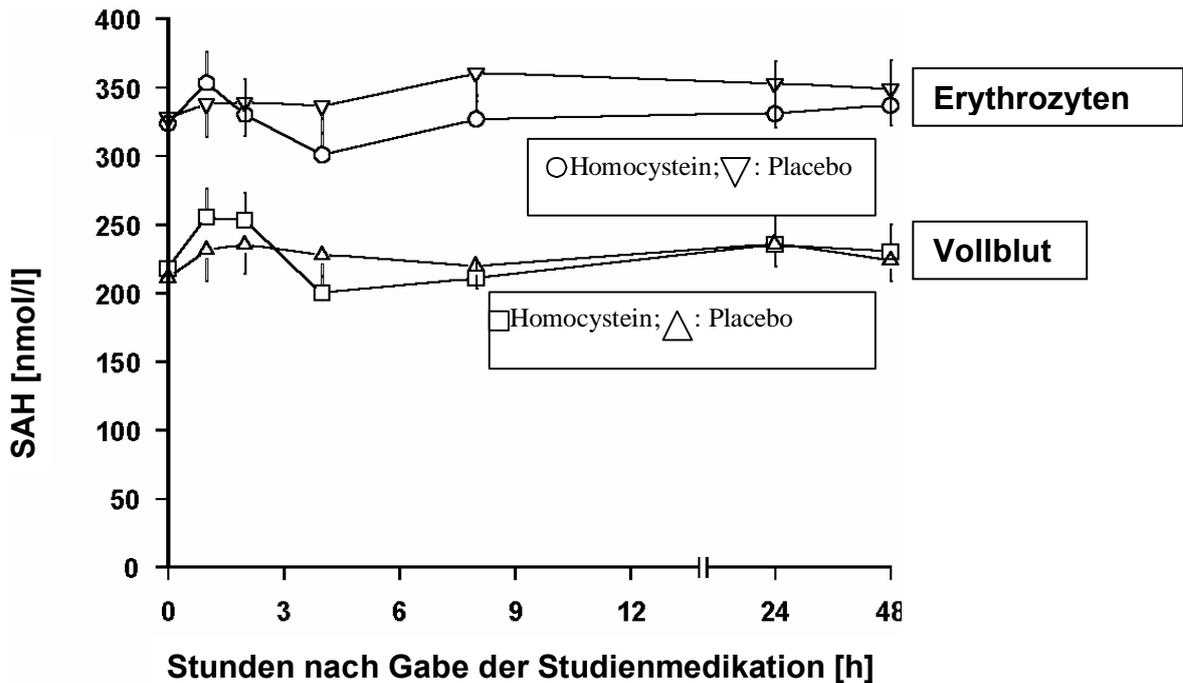


Abb. 11: Zeitverlauf der SAH-Konzentration in Erythrozyten bzw. in Vollblut nach Homocystein-Gabe

### 3.4.3. SAH-Konzentration (Vollblut) in Abhängigkeit von der Homocystein-Konzentration (Plasma)

Die SAH-Werte (Vollblut) wurden mit der jeweiligen zum selben Zeitpunkt vorliegenden Homocystein-Plasmakonzentration korreliert. Diese lagen bei Verum in einem Bereich von  $8,9 \pm 1,5 \mu\text{mol/l}$  bis  $90,4 \pm 12,3 \mu\text{mol/l}$  und bei Placebo in einem Bereich von  $8,3 \pm 1,6 \mu\text{mol/l}$  bis  $10,8 \pm 2,4 \mu\text{mol/l}$ . Hierbei zeigte sich, dass die SAH-Werte unabhängig von der Homocystein-Konzentration zwischen 83,5 und 446,5 nmol/l lagen.

Es bestand bei Verum und Placebo keine signifikante Korrelation zwischen der SAH-Konzentration (Vollblut) und der Homocystein-Konzentration (Plasma) (Abb. 12).

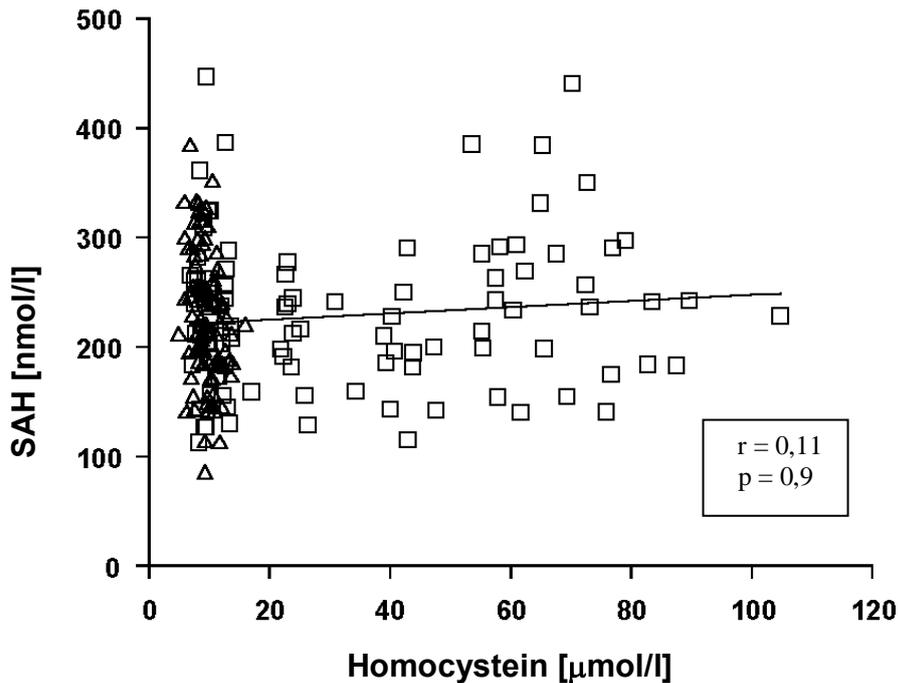


Abb. 12: SAH-Konzentration (Vollblut) in Abhängigkeit von der Homocystein-Konzentration (Plasma)

$\square$ : Homocystein (Verum) ;  $\triangle$ : Placebo

#### 3.4.4. Zeitverlauf des SAH-Quotienten in Vollblut

Der SAH-Vollblut-Quotient ist definiert als SAH-Vollblut-Konzentration zu einem der Zeitpunkte nach Homocystein-Gabe geteilt durch die SAH-pre-dose-Konzentration.

Sowohl bei Verum als auch bei Placebo war eine sehr große Streuung des SAH-Quotienten erkennbar. Der Bereich lag zwischen 0,463 und 2,267 (Verum) bzw. zwischen 0,496 und 2,133 (Placebo). Die Zeitverläufe des SAH-Quotienten in Vollblut bei Verum und Placebo unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abb. 13).

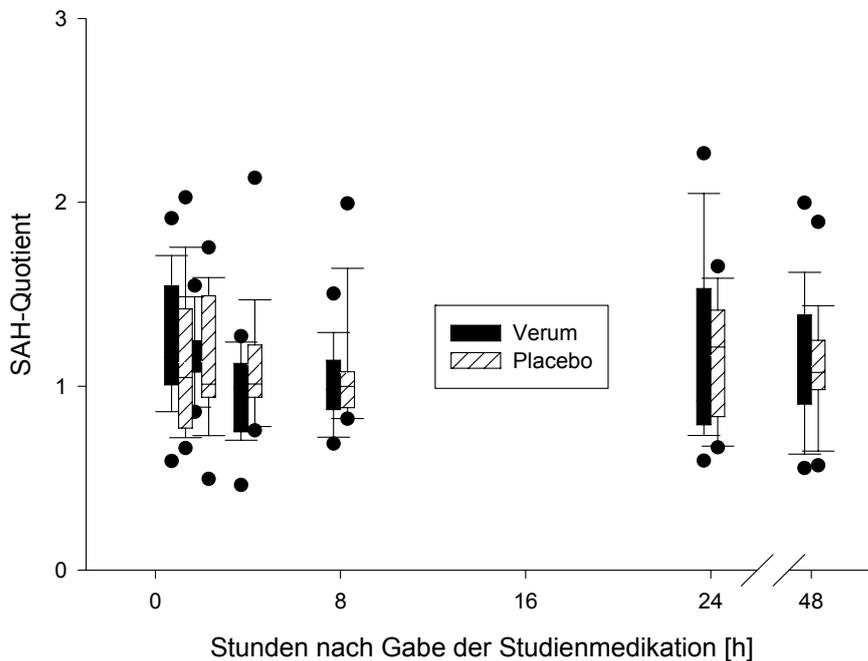


Abb. 13: Zeitverläufe des SAH-Quotienten in Vollblut für n=14 Probanden

### 3.4.5. Abhängigkeit des SAH-Quotienten (Vollblut) von der Homocystein-Konzentration (Plasma)

Der SAH-Vollblut-Quotient ist definiert als SAH-Vollblut-Konzentration zu einem der Zeitpunkte nach Homocystein-Gabe geteilt durch die SAH-pre-dose-Konzentration.

Sowohl bei Verum als auch bei Placebo war eine sehr große Schwankung des SAH-Quotienten erkennbar. Bei Verum liegt der Bereich zwischen 0,463 und 2,267, bei Placebo zwischen 0,496 und 2,133.

Die Werte der SAH-Vollblut-Quotienten wurden mit der jeweiligen zum selben Zeitpunkt vorliegenden Homocystein-Plasmakonzentration korreliert. Diese lagen bei Verum in einem Bereich von  $8,9 \pm 1,5 \mu\text{mol/l}$  bis  $90,4 \pm 12,3 \mu\text{mol/l}$  und bei Placebo in einem Bereich von  $8,3 \pm 1,6 \mu\text{mol/l}$  bis  $10,8 \pm 2,4 \mu\text{mol/l}$ .

Es bestand bei Verum und Placebo keine signifikante Korrelation zwischen dem SAH-Vollblut-Quotienten und der Homocystein-Konzentration (Plasma) (Abb. 14).

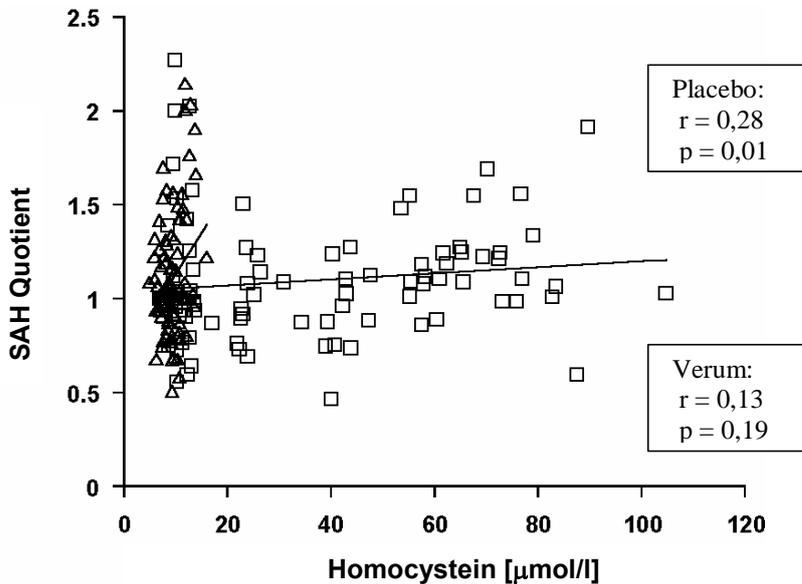


Abb. 14: Abhängigkeit des SAH-Quotienten (Vollblut) von der Homocystein-Konzentration (Plasma)  
 □: Homocystein (Verum); Δ: Placebo

### 3.4.6. SAH-Konzentration (Erythrozyten) in Abhängigkeit der Homocystein-Konzentration (Plasma)

Die SAH-Werte (Erythrozyten) wurden mit der jeweiligen zum selben Zeitpunkt vorliegenden Homocystein-Plasmakonzentration korreliert. Diese lagen bei Verum in einem Bereich von  $8,9 \pm 1,5 \mu\text{mol/l}$  bis  $90,4 \pm 12,3 \mu\text{mol/l}$  und bei Placebo in einem Bereich von  $8,3 \pm 1,6 \mu\text{mol/l}$  bis  $10,8 \pm 2,4 \mu\text{mol/l}$ . Hierbei zeigte sich, dass die SAH-Werte unabhängig von der Homocystein-Konzentration zwischen 93,5 und 710,6 nmol/l lagen.

Es besteht bei Verum und Placebo keine signifikante Korrelation zwischen der SAH-Konzentration (Erythrozyten) und der Homocystein-Konzentration (Plasma) (Abb. 15).

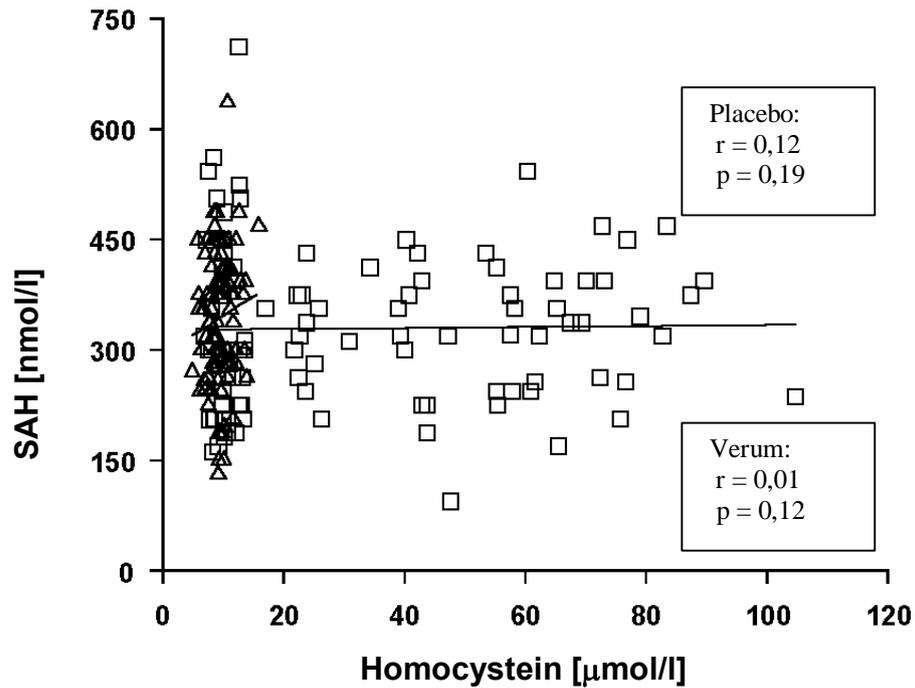


Abb. 15: SAH-Konzentration (Erythrozyten) in Abhängigkeit der Homocystein-Konzentration (Plasma)  
 □: Homocystein (65,1 µmol/kg KG; Verum); △: Placebo

### 3.4.7. Zeitverlauf des SAH-Quotienten in Erythrozyten

Der SAH-Erythrozyten-Quotient ist definiert als SAH-Erythrozyten-Konzentration zu einem der Zeitpunkte nach Homocystein-Gabe geteilt durch die SAH-pre-dose-Konzentration.

Die SAH-Erythrozyten-Quotienten unterlagen einer starken Streuung (Abb. 16). Diese geht bei Verum von 93,5 bis 710,6 nmol/l und bei Placebo von 149,6 bis 486,2 nmol/l.

Die Zeitverläufe des SAH-Quotienten in Erythrozyten bei Verum und Placebo unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abb. 16).

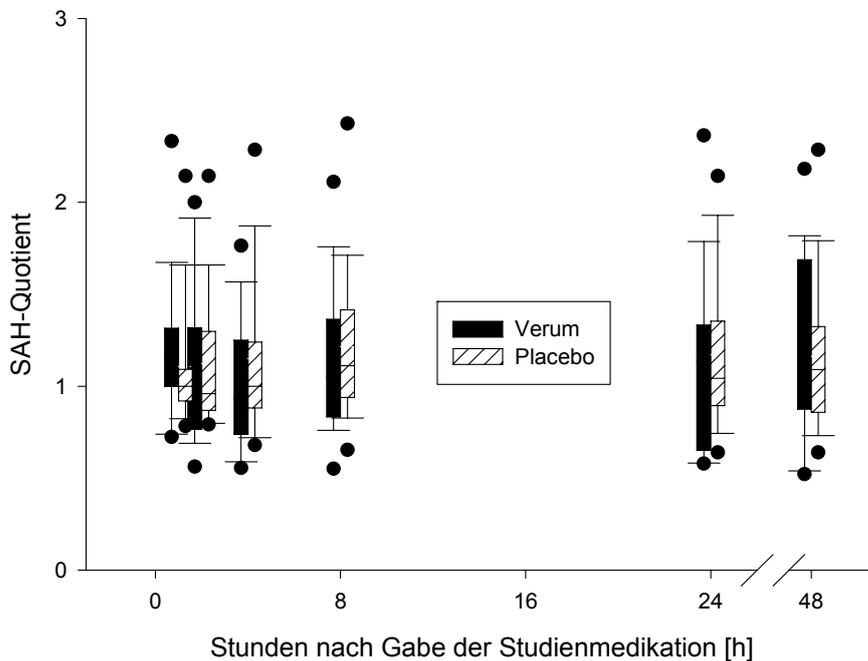


Abb. 16: Zeitverlauf des SAH-Quotienten in Erythrozyten

### 3.5. Methylierungspotenzial

#### 3.5.1. Zeitverlauf des Methylierungspotenzials in Vollblut

Das Methylierungspotenzial in Vollblut schwankte nach Homocystein-Gabe zwischen  $8,8 \pm 2,8$  und  $10,9 \pm 3,5$ . Das Minimum von  $8,8 \pm 2,8$  stellte sich nach einer Stunde ein, wobei das MP anschließend wieder anstieg. Nach vier Stunden erreichte es sein Maximum von  $10,9 \pm 3,5$  und lag nach 48 h wieder beim Ausgangswert.

Bei Placebo schwankte das Methylierungspotenzial in Vollblut zwischen  $9,2 \pm 3,4$  und  $10,2 \pm 3,3$ . Hier ist kein Extrempunkt zu erkennen.

Die Zeitverläufe des Methylierungspotenzials (= SAM/SAH) in Vollblut von Verum und Placebo unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abb. 17).

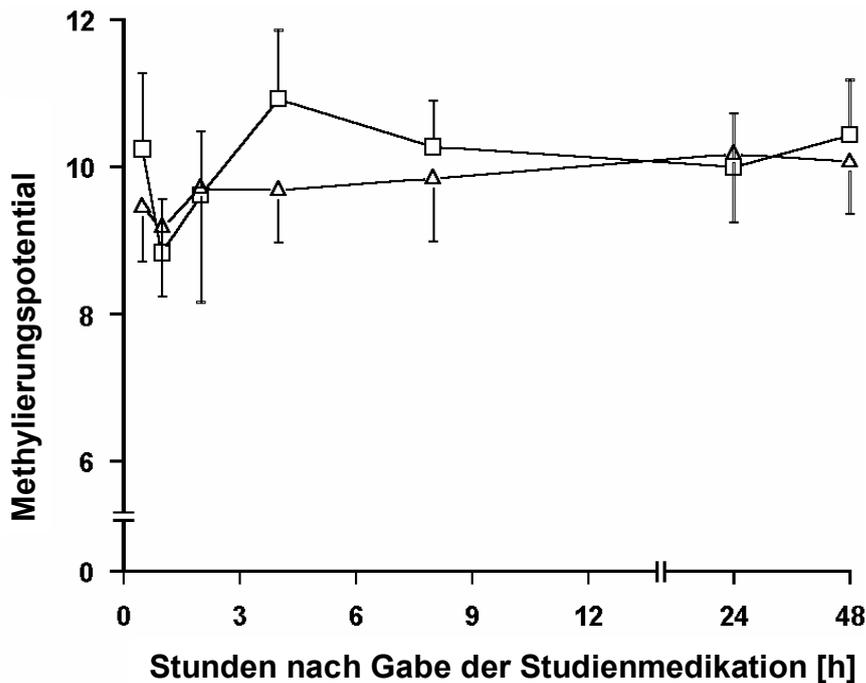


Abb. 17: Zeitverlauf des Methylierungspotenzials in Vollblut

□: Homocystein (Verum); △: Placebo

### 3.5.2. Zeitverlauf des Methylierungspotenzials in Erythrozyten

Nach Homocystein-Gabe fiel das Methylierungspotenzial von  $14,1 \pm 6,1$  auf ein Minimum von  $11,8 \pm 4,4$  zum Zeitpunkt 1 h und erreichte nach 4 h ein Maximum von  $16,7 \pm 11,2$ . Die übrigen Werte lagen zwischen diesen Extremen. Die Werte des Methylierungspotenzials unter Placebo unterlagen einer geringeren Schwankung und befanden sich in einem Bereich von  $12,5 \pm 5,0$  bis  $15,1 \pm 9,4$ . Die Zeitverläufe des Methylierungspotenzials (= SAM/SAH) in Erythrozyten von Verum und Placebo unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abb. 18).

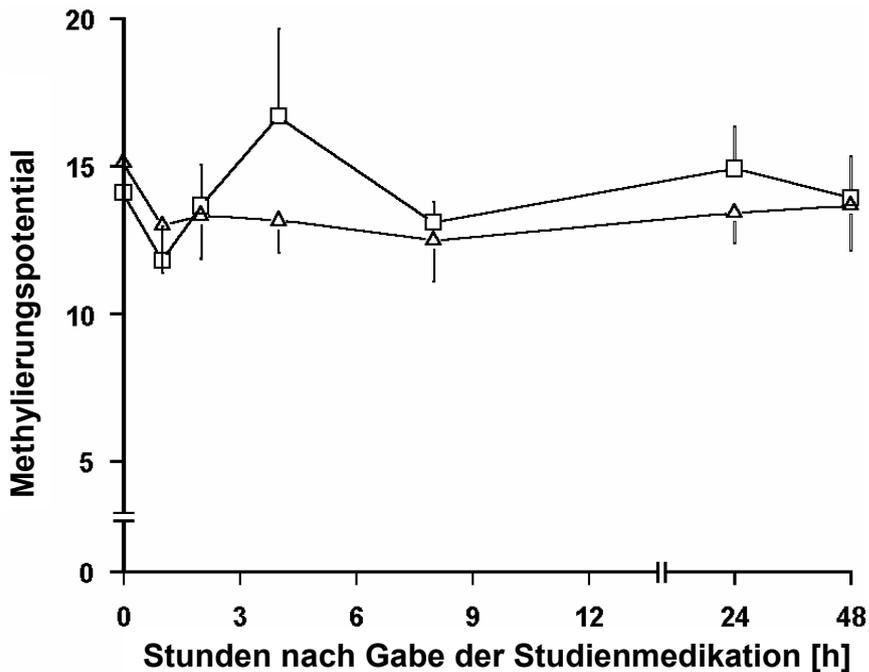


Abb. 18: Zeitverlauf des Methylierungspotenzials in Erythrozyten  
 □: Homocystein (Verum); △: Placebo

### 3.5.3. Abhängigkeit des Methylierungspotenzials (Vollblut) von der Homocystein-Konzentration (Plasma)

Nach Homocystein-Gabe stieg die Homocystein-Konzentration in Plasma von  $8,9 \pm 1,5 \mu\text{mol/l}$  auf ein Maximum von  $90,4 \pm 12,3 \mu\text{mol/l}$ . Die übrigen Werte lagen zwischen dem Ausgangswert und dem Maximum. Die Werte der Homocystein-Konzentration in Plasma unter Placebo unterlagen einer wesentlich geringeren Schwankung und befanden sich in einem Bereich von  $8,3 \pm 1,6 \mu\text{mol/l}$  bis  $10,8 \pm 2,4 \mu\text{mol/l}$ .

Die Homocystein-Konzentration in Plasma befindet sich im folgenden Schaubild auf der x-Achse und das Methylierungspotenzial auf der y-Achse.

Das Methylierungspotenzial berechnet sich aus dem Quotienten SAM/SAH. Somit ergeben sich je sieben Verum- bzw. Placebo-Werte, die im Schaubild aufgetragen wurden. Sie wurden zu den Zeitpunkten 0 (= pre-dose), 1, 2, 4, 8, 24 und 48 Stunden nach Gabe der Studienmedikation (Homocystein versus Placebo) bestimmt.

Das Methylierungspotenzial in Vollblut schwankte nach Homocystein-Gabe zwischen  $8,8 \pm 2,8$  und  $10,9 \pm 3,5$ . Das Methylierungspotenzial in Vollblut schwankte bei Placebo zwischen  $9,2 \pm 3,4$  und  $10,2 \pm 3,3$ .

Zwischen dem Methylierungspotenzial in Vollblut und der Homocystein-Konzentration in Plasma ist weder bei Homocystein-Gabe noch bei Placebo eine signifikante Korrelation erkennbar (Abb. 19).

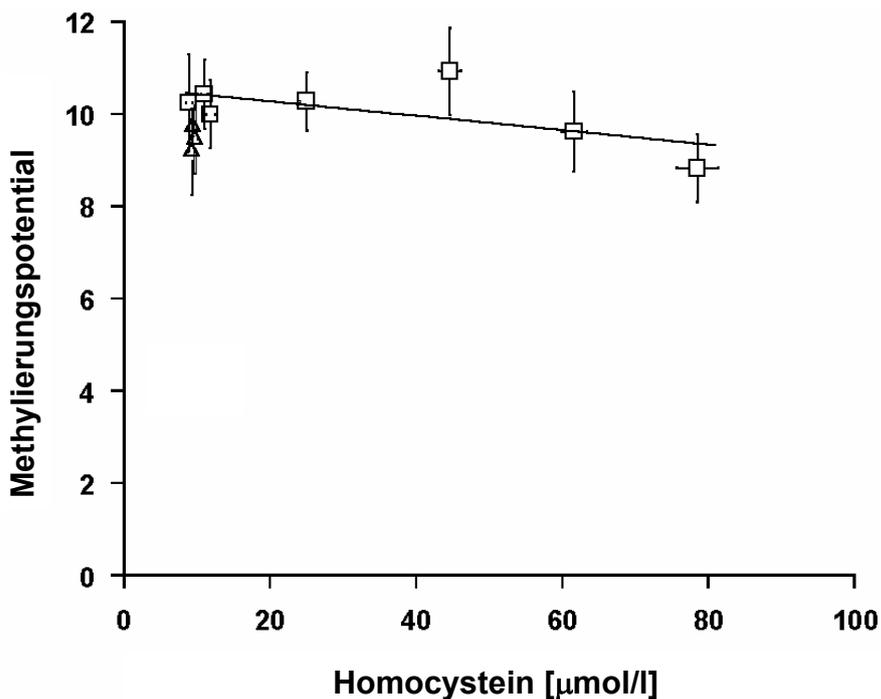


Abb. 19: Abhängigkeit des Methylierungspotenzials (Vollblut) von der Homocystein-Konzentration (Plasma)(Mittelwerte)

□: Homocystein (Verum); △: Placebo

### 3.6. DNA-Methylierung

#### 3.6.1. Zeitverlauf der DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierungen zu den einzelnen Messzeitpunkten schwankten nach Homocystein-Gabe zwischen  $10,5 \cdot 10^3$  dpm/µg DNA und  $27,6 \cdot 10^3$  dpm/µg DNA. Die DNA-Methylierungen unter Placebo schwankten zwischen  $10,6 \cdot 10^3$  dpm/µg DNA und  $28,6 \cdot 10^3$  dpm/µg DNA.

Die Zeitverläufe der DNA-Methylierungen bei Verum und Placebo unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abb. 20).

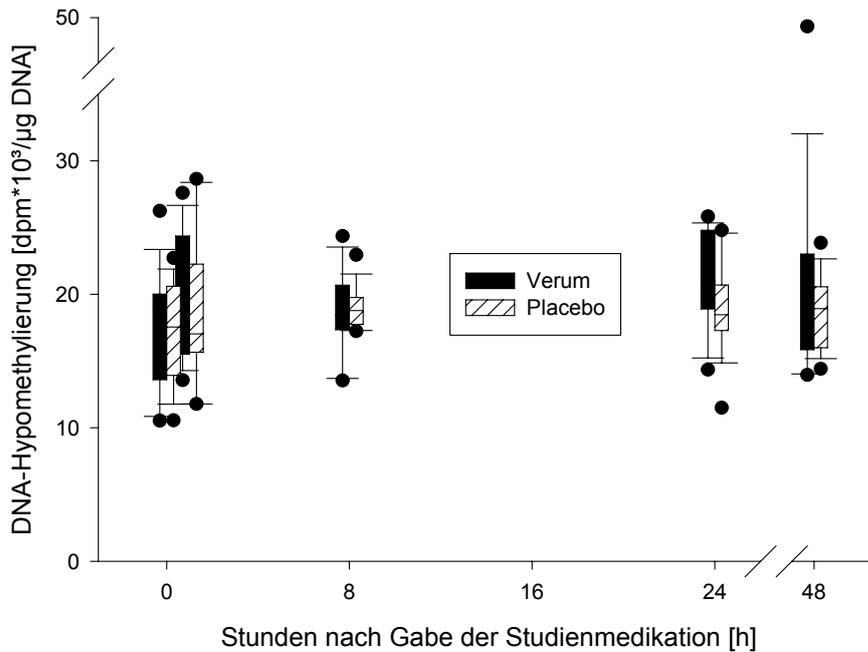


Abb. 20: Zeitverlauf der DNA-Methylierung (Mittelwerte)

### 3.6.2. DNA-Methylierung (Mittelwerte) in Abhängigkeit von der Homocystein-Konzentration (Plasma)

Die Mittelwerte der DNA-Methylierung zu den einzelnen Messzeitpunkten schwankten nach Homocystein-Gabe zwischen  $17,5 \pm 4,7 \cdot 10^3$  dpm/µg DNA und  $21,9 \pm 10,0 \cdot 10^3$  dpm/µg DNA. Nach Homocystein-Gabe stieg die DNA-Methylierung von  $17,5 \pm 4,7 \cdot 10^3$  dpm/µg DNA auf  $20,1 \pm 4,8 \cdot 10^3$  dpm/µg DNA, dann fiel sie auf  $18,7 \pm 3,3 \cdot 10^3$  dpm/µg DNA, stieg nochmals auf  $21,0 \pm 3,9 \cdot 10^3$  dpm/µg DNA und stieg dann auf einen 48 Stunden Wert von  $21,9 \pm 10,0 \cdot 10^3$  dpm/µg DNA.

Die Werte der DNA-Methylierung unter Placebo schwankten zwischen  $17,2 \pm 3,9 \cdot 10^3$  dpm/µg DNA und  $19,0 \pm 1,7 \cdot 10^3$  dpm/µg DNA.

Die Werte der DNA-Methylierung wurden mit der jeweiligen zum selben Zeitpunkt vorliegenden Homocystein-Plasmakonzentration korreliert. Diese lagen bei Verum in einem Bereich von  $8,9 \pm 1,5 \mu\text{mol/l}$  bis  $90,4 \pm 12,3 \mu\text{mol/l}$  und bei Placebo in einem Bereich von  $8,3 \pm 1,6 \mu\text{mol/l}$  bis  $10,8 \pm 2,4 \mu\text{mol/l}$ . Es besteht bei Verum und Placebo keine signifikante Korrelation zwischen der DNA-Methylierung und der Homocystein-Konzentration (Plasma) (Abb. 21).

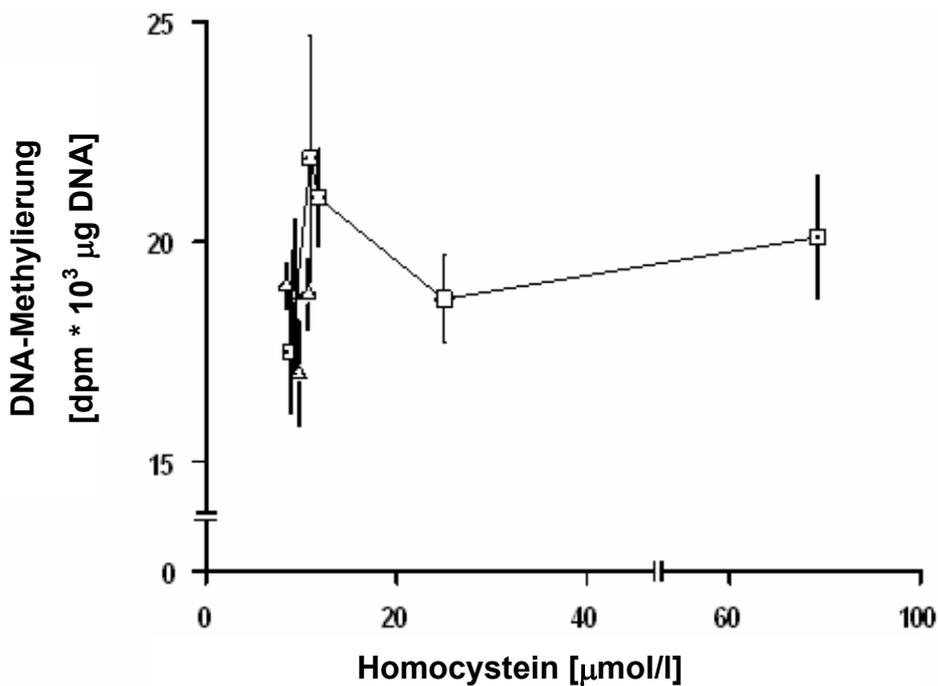


Abb. 21: DNA-Methylierung (Mittelwerte) in Abhängigkeit der Homocystein-Konzentration (Plasma):

□: Homocystein (Verum); Δ: Placebo

### 3.7. Genotypisierung: MTHFR

Die 14 Studienprobanden wurden auf Mutationen der MTHFR an der Position 677 genotypisiert. 7 Probanden (50%) waren Träger des heterozygoten Genotyps (CT), während die anderen 7 (50%) homozygote Träger des Wildtypallels waren (CC).

Es gab keinerlei signifikante Unterschiede bei den Parametern Homocystein-Konzentration, SAM-Konzentration, SAH-Konzentration und DNA-Methylierung zwischen dem CC- und CT-Genotyp der MTHFR mit einer Ausnahme.

Die SAM-Konzentration in Erythrozyten bei CT-Genträgern war, im Vergleich zu der vom CC-Wildtyp, signifikant erhöht ( $p < 0,0001$ ). Dieser Unterschied wurde nicht nur bei allen einzelnen Messzeitpunkten bei Verum und Placebo gefunden, sondern auch während der oralen Homocysteinaufnahme (Abb. 22).

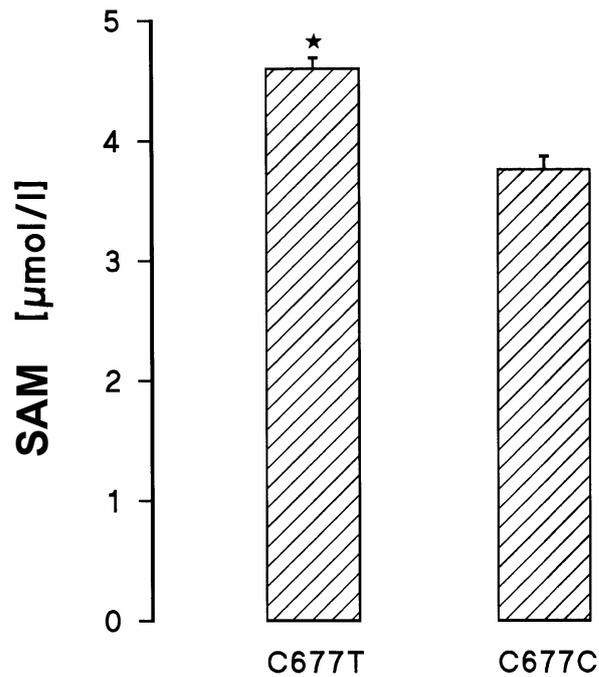


Abb. 22: SAM-Konzentration in Erythrozyten, bezogen auf den MTHFR-Genotyp

### 3.8. Unerwünschte Ereignisse

1. Mit Ausnahme eines Probanden, der über Kopfschmerzen nach Gabe der Studienmedikation (Verum) berichtete, wurden keinerlei unerwünschte Ereignisse im Rahmen der Homocystein-Gabe bekannt.

2. Sinistrinunverträglichkeit

Ein Proband reagierte 4 Minuten nach Beginn der Sinistrin-Infusion mit einer allergischen Reaktion. Diese äußerte sich in Atemnot und Rötung der Haut im Gesichts- und Brustbereich. Nach intravenöser Gabe von Dimetinden (Fenistil®) und Prednisolon (Solu-Decortin®) bildeten sich die Symptome zurück (Fux et al., 2004).

Bei diesem Probanden wurde kein Homocystein verabreicht. Er wurde aus der Studie ausgeschlossen und durch einen anderen Probanden ersetzt.

## 4. Diskussion

### 4.1. Homocystein als Risikofaktor für Erkrankungen

#### 4.1.1. Gefäßerkrankungen

Sehr viele Studien kamen zu dem Ergebnis, dass ein Anstieg der totalen Homocystein-Konzentration das Risiko für koronare Herzerkrankungen erheblich erhöhen kann (Bostom et al., 1995a; Stampfer et al., 1992; Arnesen et al., 1995; Boushey et al., 1995; Graham et al., 1997).

Parallel hierzu konnte durch andere Studien belegt werden, dass der TT-Genotyp mit einem höheren Atheroskleroserisiko assoziiert ist (Morita et al., 1997; Gulec et al., 2001; Kluijtmans et al., 1996; Gardemann et al., 1999).

Neben den Studien, die auf einen Zusammenhang des C677T-Genotyps im MTHFR-Gen mit dem Vorkommen atherosklerotischer Erkrankungen hindeuten, gibt es auch zahlreiche Arbeiten, die dem widersprechen beziehungsweise keinerlei Assoziation dieses Polymorphismus mit dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen finden konnten (Magoni und Padovani, 2002; Verhoef et al., 1997; Ma et al., 1996; van Bockxmeer et al., 1997; Christensen et al., 1997).

Es wird angenommen, dass Homocystein ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen ist (Hankey und Eikelboom, 1999; Nygård et al., 1997). Eine Hyperhomocysteinämie erhöht die Entstehung einer frühzeitigen Arteriosklerose in der normalen Bevölkerung mit einer Prävalenz von 5–7%. Jedoch muss noch eine kausale Beziehung zwischen einer Hyperhomocysteinämie und kardiovaskulären Erkrankungen belegt werden. Klinische Studien, die diese Frage untersuchen, sind in Arbeit (Perna et al., 2004b).

Die kürzlich veröffentlichte „Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP)“-Studie ist die erste prospektive, randomisierte Studie, die die Wirkung einer vitaminreichen Diät auf die Sekundärprävention des Schlaganfalls untersucht hat. In 56 Zentren in den USA, Kanada und Schottland beteiligten sich 3680

Patienten, die einen leichten Schlaganfall erlitten hatten. Da Menschen, die bereits einen Schlaganfall erlitten haben, ein hohes Risiko für einen weiteren Insult haben, sollte sich in dieser Population eine positive Wirkung von Vitaminen am ehesten nachweisen lassen.

Die eine Gruppe der Patienten erhielt einmal täglich hoch dosierte Vitamintabletten mit 25 mg Vitamin B<sub>6</sub>, 0,4 mg Vitamin B<sub>12</sub> und 2,5 mg Folsäure. In der Vergleichsgruppe erhielten die Teilnehmer die gleichen Vitamine, aber in deutlich niedrigerer Dosierung: 200 µg Vitamin B<sub>6</sub>, 6 µg Vitamin B<sub>12</sub> und 20 µg Folsäure.

Die erhoffte sekundärpräventive Wirkung der vitaminreichen Diät blieb aus, obwohl diese die Homocystein-Konzentration um 2 µmol/l senkte. Primärer Endpunkt war ein erneuter Hirninfarkt. Dieser ereignete sich innerhalb der Beobachtungszeit von 2 Jahren bei 9,2% der Teilnehmer der Hochdosisgruppe, aber nur bei 8,8% der Teilnehmer, welche die Vitamine in einer niedrigeren Dosierung eingenommen hatten. Auch beim sekundären Endpunkt, der Senkung aller kardiovaskulären Ereignisse (Schlaganfall, koronare Herzkrankheit oder Tod), gab es keine Unterschiede (Toole et al., 2004). Dieses Ergebnis lässt die Frage aufkommen, ob die Homocystein-Konzentration überhaupt als ein geeigneter Surrogatparameter für das kardiovaskuläre Risiko angesehen werden kann.

Es wurde vorgeschlagen, die DNA-Hypomethylierung als verantwortlichen Faktor, der das Wachstum glatter Muskelzellen unter einer Hyperhomocysteinämie fördert, anzusehen (Tsai et al., 1994). Bostom und Culleton zählten weitere Möglichkeiten auf, mit der eine Hyperhomocysteinämie das Arterioskleroserisiko ansteigen lässt. Demnach begünstigt die Hyperhomocysteinämie den endothelialen Zelltod, beeinflusst positiv die LDL-Oxidation, lässt die Thrombozytenaggregation ansteigen, verhindert die Oberflächenexpression von Thrombomodulin und Protein C und verbessert die Lipoprotein-Fibrin-Bindung (Bostom und Culleton, 1999). Jedoch bleibt der Pathomechanismus, wie Homocystein die Arteriosklerose im lebenden Organismus begünstigt, unklar.

Erhöhte Mengen an Homocystein in Plasma stellen einen Risikofaktor für okklusive Gefäßerkrankungen (Clarke et al., 1991; Boers et al., 1985) bzw. für Venenthrombosen dar (D'Angelo et al., 1997; den Heijer et al., 1996). Demgegenüber reduziert eine geringere Homocystein-Plasmakonzentration die Inzidenz von atherothrombotischen Krankheiten (Hankey und Eikelboom, 1999).

#### 4.1.2. Osteoporose

Eine erhöhte Homocystein-Konzentration in Plasma könnte einen schlechten Ernährungszustand widerspiegeln – oder, bei Frauen nach der Menopause, ein Defizit an Östrogenen. Letzteres hebt ebenfalls die Homocystein-Konzentration in Plasma an und ist außerdem eine wichtige Ursache der Osteoporose (Raisz, 2004; Stone et al., 2004). Außerdem soll eine hohe Homocystein-Plasmakonzentration ein unabhängiger Risikofaktor für osteoporotische Knochenbrüche bei Personen über 55 Jahren sein, wie zwei im New England Journal of Medicine publizierte Untersuchungen aus den Niederlanden und den USA belegen. In den Arbeiten hatten Personen, deren Homocystein-Konzentration in Plasma im statistisch obersten Viertel lag, gegenüber jenen im untersten Viertel ein doppelt so hohes Risiko für eine Knochenfraktur. Dieses (relative) Frakturrisiko war in der US-Studie für Männer sogar vierfach erhöht (Raisz, 2004; van Meurs et al., 2004). Ähnliche Feststellungen machten auch Joyce mit Mitarbeitern (2004). In dieser Studie wurden 2406 Männer und Frauen untersucht, die mindestens 55 Jahre alt waren. Es wurde festgestellt, dass eine Hyperhomocysteinämie einen starken und unabhängigen Risikofaktor für Knochenbrüche bei älteren Männern und Frauen darstellt (Joyce et al., 2004).

Die logische Konsequenz aus der Studie besteht nach Ansicht von Raisz in der Durchführung einer Interventionsstudie, in der ein Teil der Patienten mit Folsäure substituiert würde. Wenn es unter dieser Behandlung zu einem Absinken der Frakturrate käme, würde dies für einen Zusammenhang zwischen hohen Homocystein-Spiegeln und der Osteoporose sprechen.

#### 4.1.3. Demenz

Homocystein scheint auch mit der Entstehung einer Demenz assoziiert zu sein. Jedoch stellt sich hier die Frage, ob der Anstieg der Homocystein-Konzentration im Plasma dem Demenzbeginn vorausgeht oder das Resultat einer demenzbedingten Mangelernährung bzw. eines Vitaminmangels ist. Um dies feststellen zu können, wurden Studien an Patienten mit frisch diagnostizierter Demenz durchgeführt.

Die Stichprobe für die Untersuchung von Seshadri und Mitarbeiter bildeten insgesamt 1092 demenzfreie Probanden (667 Frauen und 425 Männer, Durchschnittsalter 76 Jahre) aus der Framingham-Studie. Untersucht wurde der Zusammenhang zwischen der vor Beginn der Studie gemessenen Homocystein-Konzentration in Plasma und den acht Jahre zuvor gemessenen Homocystein-Werten und dem Risiko für eine neu diagnostizierte Demenz während der Verlaufskontrolle.

Im Verlauf der Studie entwickelte sich bei 111 Patienten eine Demenz; davon wurde 83-mal die Alzheimer-Erkrankung diagnostiziert. Es wurde gezeigt, dass bei älteren Personen eine erhöhte Konzentration von Homocystein im Plasma mit einem signifikant erhöhten Risiko für die Ausbildung von M. Alzheimer oder anderen Formen der Demenz assoziiert ist. Es wurde über den 8-Jahres-Zeitraum beobachtet, dass ein Anwachsen der Homocystein-Konzentration in Plasma um 5  $\mu\text{mol}$  das Risiko für M. Alzheimer um 40% erhöht. Bei einer Homocystein-Konzentration in Plasma von über 14  $\mu\text{mol/l}$  erhöhte sich das Risiko sogar um fast das Doppelte.

Damit wurde nachgewiesen, dass eine erhöhte Homocystein-Konzentration im Plasma im Alter ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung der Demenz bzw. Alzheimer-Erkrankung ist (Seshadri et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass die erhöhte Homocystein-Konzentration in Plasma nicht durch eine schlechte Ernährung und einen Vitaminmangel bei dementen Patienten bedingt ist, sondern dass diese bereits vorher bestanden. Es wird vermutet, dass ein direkt toxischer Effekt des Homocysteins für die Schädigung der Neuronen mitverantwortlich ist. Jedoch sind genaue metabolische Vorgänge noch nicht bekannt. Die Homocystein-Konzentration in Plasma kann durch die Einnahme

von Folsäure gesenkt werden. Deshalb müssen randomisierte Studien in Zukunft zeigen, ob eine solche Intervention das Demenz- bzw. das Alzheimerisiko beeinflussen kann.

#### 4.2. Differenzierung des Probandenkollektivs

In der vorliegenden Studie wurden physiologische, genomische und funktionelle Untersuchungen an gesunden Versuchspersonen im Alter zwischen 21 und 26 Jahren durchgeführt.

Es wurden 14 (davon 14 Verum, 13 Placebo) gesunde Freiwillige in die Studie eingeschlossen. Die Probandengruppe sollte möglichst homogen sein. Dies gilt auch für den Body Mass Index (BMI), der zwischen 20 und 30 kg/m<sup>2</sup> liegen sollte. In der vorliegenden Studie lag er zwischen 20,0 und 26,6 kg/m<sup>2</sup>.

#### 4.3. Gemessene Zielgrößen

In der gegenwärtigen Studie sollte beurteilt werden, ob eine kurzzeitige Hyperhomocysteinämie das Methylierungspotenzial und die DNA-Methylierung senkt, wie es Yi und Mitarbeiter (2000) bei einer chronischen Hyperhomocysteinämie festgestellt haben.

Sie beobachteten anhand einer Studie mit 58 gesunden Frauen im Alter von 19-53 Jahren (Durchschnittsalter 37,2 Jahre), dass Homocystein, als Bestandteil des Methylierungszyklus, ein Modulator des MP ist. 28 Frauen hatten einen Homocystein-Plasmaspiegel im Normbereich (Mittelwert  $7,26 \pm 1,11$  µmol/l), 30 einen dauerhaft höheren Homocystein-Plasmaspiegel (Mittelwert  $12,30 \pm 1,82$  µmol/l). Es ist gezeigt worden, dass eine chronische Hyperhomocysteinämie mit dem Anstieg der SAH-Konzentration und dem Abfall des Methylierungspotenzials korreliert (Yi et al., 2000).

In der vorliegenden Studie wurde eine akute transiente Hyperhomocysteinämie bei 14 gesunden Freiwilligen durch orale Gabe von L-Homocystein (65,1 µmol/kg KG) herbeigeführt. Dabei erfolgte die Herstellung und Verabreichung der Studienmedikation entsprechend der Studie von Guttormsen und Mitarbeiter (Guttormsen et al., 1993).

Die gemessenen Werte für  $C_{\max}$ ,  $t_{\max}$  und  $t_{1/2}$  in Plasma (MW  $\pm$  SD:  $90,4 \pm 12,3$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $34,3 \pm 10,9$  min und  $257 \pm 41$  min) waren vergleichbar mit den Ergebnissen von Guttormsen und Mitarbeiter (MW  $\pm$  SD:  $57,4 \pm 10,1$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $59 \pm 22,4$  min und  $223 \pm 45$  min).

In der vorliegenden Studie ist  $t_{\max}$  früher erreicht als bei Guttormsen und Mitarbeiter. Der Grund hierfür ist die Homocystein-Konzentrations-Messung im Plasma nach 0,75 h (= 45 min), wenn die Konzentration sehr nah bei  $C_{\max}$  liegt. Zusätzlich wurde gezeigt, dass  $C_{\max}$  der Homocystein-Konzentration in Erythrozyten ( $68,4 \pm 29,1$   $\mu\text{mol/l}$ ) niedriger als in Plasma war und zu einem späteren Zeitpunkt als bei Guttormsen und Mitarbeiter ( $t_{\max}$ :  $77,1 \pm 28,1$  min) erreicht wurde.

Entsprechend früherer Studien ist der Einfluss von proteinarmer Diät (bei den Freiwilligen) auf postprandiale Veränderungen der Homocysteinkonzentration vernachlässigbar (Guttormsen et al. 1994; Ubbink et al., 1992).

#### 4.4. Homocystein-Ausscheidung im Urin

In Studien mit Menschen und Tieren wurde gezeigt, dass die Ausscheidung von Homocystein im Urin sehr gering ist (Bostom et al., 1995a; Perna et al., 2004a). Der Grund für die geringe Homocystein-Exkretion ist der Homocystein-Metabolismus im Körper, bei dem es remethyliert und transsulfuriert wird (Brosnan et al., 2004; Perna et al., 2004a) und seine starke Bindung an Plasmaproteine (ca. 80%) (Refsum et al., 1985).

Die Nierenfunktion ist eine wichtige Determinante im Bezug auf die Homocystein-Konzentration in Plasma. Eine leichte bis starke Hyperhomocysteinämie wurde bei einer Vielzahl von Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz beobachtet. Es wurde gezeigt, dass eine abfallende Nierenfunktion mit einer höheren Homocystein-Konzentration assoziiert werden kann (Bostom und Culleton, 1999). Aufgrund des geringen Anteils von renal ausgeschiedenem Homocystein scheint eine Einschränkung dieser Exkretion bei Niereninsuffizienz kaum eine Rolle für die Entstehung einer Hyperhomocysteinämie zu spielen. Somit ist eine Störung des Metabolismus anzunehmen.

In Tierstudien wurden eine signifikante renale Aufnahme und ein renaler Metabolismus von Homocystein gezeigt (House et al., 1998). Der Homocystein-Metabolismus in der Niere des Menschen erscheint marginal (van Guldener et al., 1999). Die Hyperhomocysteinämie bei Patienten mit chronischem Nierenversagen (CRF) beruht hauptsächlich auf der Verschlechterung des Remethylierungswegs (Stam et al., 2004). Deshalb wird für die Hyperhomocysteinämie die Verminderung des Metabolismus außerhalb der Niere als Hauptgrund bei Nierenfunktionsstörung gesehen (Madore, 2003). Jedoch sind die genauen Mechanismen noch nicht klar erforscht (Perna et al. 2004a).

In der vorliegenden Studie erhielt jeder Freiwillige  $754 \pm 100$  mg (=  $4909 \pm 651$   $\mu$ mol) Homocystein als orale Einmalgabe. Ab Einnahme bis 12 h nach Homocystein-Gabe wurde  $2,3 \pm 0,7\%$  der oral verabreichten Homocystein-Gabe im Urin ausgeschieden. Das Ergebnis entspricht dem von Guttormsen et al. (1996), die an 19 Freiwilligen mit normaler Nierenfunktion und oral herbeigeführter Hyperhomocysteinämie ähnliches feststellten. Dort hatten die Freiwilligen nach 24 h über den Urin  $6,5 \pm 3,0\%$  der oral verabreichten Homocystein-Gabe ausgeschieden.

Das Ergebnis der vorliegenden Studie zeigt, dass die Homocystein-Ausscheidung im Urin während der akuten Hyperhomocysteinämie von ca. 10% bis auf 60% der berechneten filtrierte Homocystein-Menge ansteigt. Dieser Befund zeigt, dass die tubuläre Aufnahme von Homocystein durch basische Aminosäuren-Transporter sättigbar ist.

#### 4.5. MP

Während der akuten transienten Hyperhomocysteinämie, die in der vorliegenden Studie induziert wurde, veränderten sich weder SAH-Konzentration noch das MP. Ein Grund für diese Beobachtung könnte der schnelle Katabolismus von Homocystein durch die Remethylierung zu Methionin und die Transsulfurierung zu Cystathionin sein (Finkelstein, 2000).

Deshalb scheint eine längere und dauerhafte Anhebung der Homocystein-Konzentration notwendig zu sein, um eine Veränderung der SAM- und SAH-

Konzentration und folglich auch des MP herbeizuführen. Andere vorherige Studien zeigten, dass eine milde chronische Hyperhomocysteinämie, die nicht durch eine orale Homocystein-Gabe herbeigeführt wurde, die SAH-Konzentration ansteigen und das MP abfallen lässt (Perna et al., 1995; Jacob et al., 1998).

Yi und Mitarbeiter beobachteten anhand ihrer Studie, dass bei Versuchspersonen mit einem dauerhaft höheren Homocystein-Plasmaspiegel im Gegensatz zu Versuchspersonen mit einem Homocystein-Plasmaspiegel, der im Normbereich lag, die DNA-Methylierung in peripheren Lymphozyten um das 2-fache erhöht war. Ähnlich verhielt es sich mit der SAH-Konzentration, die bei der Gruppe mit dauerhaft höherem Homocystein-Plasmaspiegel 2,6-fach höher war als bei der Gruppe mit einer Homocystein-Konzentration im Normbereich. Demzufolge ist gezeigt worden, dass eine chronische Hyperhomocysteinämie mit dem Anstieg der SAH-Konzentration und dem Abfall des Methylierungspotenzials korreliert (Yi et al., 2000).

Die vorliegende Studie hingegen hat deutlich gezeigt, dass eine akute transiente Anhebung der Homocystein-Konzentration keine Wirkung auf die DNA-Methylierung hat. Diese Beobachtung zeigt, dass die DNA-Methylierung sowie andere Mechanismen, die an der DNA ablaufen, einem langsamen Zeitablauf unterliegen und dass die DNA ihren Zustand nur in der Replikationsphase ändert. Eine kurzzeitige Veränderung (24 h) des Methylierungspotentials in HepG2-Zellen führte nicht zu einer Veränderung der DNA-, jedoch zu einer Veränderung der mRNA-Methylierung (Hermes et al., 2004). Ob jedoch die spezifische Methylierung von regulatorischen Gensequenzen durch eine kurzzeitige Veränderung des MP oder der Homocystein-Konzentration verändert werden kann, muss in weiteren Studien herausgefunden werden.

## 4.6. Sicherheitsaspekte

### 4.6.1. Risiko-Nutzen-Abwägung

Bei der Abwägung des Risiko-Nutzen-Verhältnisses ist man schnell zum Erkenntnis gekommen, dass für den Menschen ungefährliche Erprobungsmöglichkeiten wie Untersuchungen an Zellkulturen oder Tierversuchen ausgeschöpft sind. Diese Ergebnisse lassen sich auch nicht auf die physiologischen Verhältnisse beim Menschen übertragen.

Im Tierversuch, insbesondere mit Ratten, würden sich darüber hinaus Schwierigkeiten bei der Durchführung der Studie und Herbeiführung der akuten transienten Hyperhomocysteinämie ergeben. Bei Ratten kann nicht genügend Blut für die Bestimmung der Zielparameter im Zeitverlauf entnommen werden. Darüber hinaus wäre eine Intubation in Narkose erforderlich, wobei mit hämodynamischen Einflüssen zu rechnen ist, welche Änderungen der Konzentration der Untersuchungsparameter bewirken könnten. Somit ist es erforderlich, die akute transiente Hyperhomocysteinämie an gesunden Probanden durchzuführen.

### 4.6.2. Unerwünschte Ereignisse

Bezüglich der Sicherheit einer akuten transienten Hyperhomocysteinämie, die durch orale Homocystein-Gabe herbeigeführt wurde, scheint diese Prozedur sicher und unbedenklich zu sein, gerade weil weder das Methylierungspotential noch die DNA-Methylierung verändert werden. Es sind keine nachteiligen Ereignisse oder Auswirkungen auf die Freiwilligen eingetreten. Demnach scheint die Homocystein-Gabe in dem verabreichten Dosisbereich (65,1 µmol/kg KG) unbedenklich zu sein, und sie wird vom Organismus gut toleriert.

Auch die Gabe von Sinistrin als Markersubstanz ist mit einem sehr kleinen Risiko für die Probanden verbunden. Bei unserer Studie reagierte ein Proband 4 Minuten nach Beginn der Sinistrin-Infusion mit einer leichten allergischen Reaktion (noch bevor Homocystein verabreicht worden war). Nach intravenöser Gabe von Dimetinden (Fenistil®) und Prednisolon (Solu-Decortin®) bildeten sich

die Symptome zurück (Fux et al., 2004). Solche anaphylaktischen Ereignisse scheinen sehr selten zu sein, oder aber es wird zu wenig darüber berichtet („underreporting“), so dass von einer Dunkelziffer auszugehen ist. Der betroffene Proband wurde aus der Studie ausgeschlossen und durch einen anderen Probanden ersetzt.

Es wurden während der Studie alle Maßnahmen getroffen, um die Unversehrtheit der Probanden zu gewährleisten.

#### 4.6.3. Geschmack der Homocystein-Lösung

Die Probanden beschrieben den Geschmack der Homocystein-Lösung wie folgt:

- leicht salzig
- schweflig / nach faulen Eiern schmeckend bzw. riechend
- schleimig / schmierig
- eigenartig
- eklig

Der oft als salzig beschriebene Geschmack, welcher jedoch kein Hindernis beim Trinken der Homocystein-Lösung darstellte, ist aus der Zusammensetzung der Studienmedikation zu erklären. Die 10 mg/kg KG pulverisiertes L-Homocystein-Thiolacton Hydrochlorid wurde in 5 ml 5 M NaOH in Lösung gebracht, danach gab man zur Neutralisation 5 ml 5 M HCl hinzu. Es bildete sich NaCl (Kochsalz) und Wasser.

#### 4.7. MTHFR

##### 4.7.1. Zusammenhang zwischen MTHFR und Homocystein-Konzentration in Plasma

Rozen und Mitarbeiter verglichen in vitro die MTHFR-Enzymaktivität von heterozygoten (CT) und homozygoten (TT) Genotypträgern mit dem Wildtyp

(CC). Dabei stellten sie fest, dass die Heterozygoten CT eine 65%-ige Enzymaktivität und Homozygote TT eine 30%-ige Enzymaktivität des Wildtyps CC besitzen. (Rozen et al., 1997).

Bei einer Meta-Analyse mit 11162 KHK-Patienten und 12758 Kontrollpersonen aus 40 Studien wurde gezeigt, dass Individuen mit dem TT-Genotyp eine um 16% bzw. mit dem CT-Genotyp eine um 6% höhere Wahrscheinlichkeit haben, an einer KHK zu erkranken als Individuen mit dem CC-Genotyp. Die Studie zeigte außerdem, dass ein verminderter Gehalt an Folsäure, und somit eine höhere Homocystein-Konzentration im Plasma, mit dem Auftreten einer KHK assoziiert ist (Klerk et al., 2002). Weitere Studien sind zum selben Ergebnis gekommen. Der homozygote TT-Typ ist mit einer erhöhten Homocystein-Konzentration assoziiert, was sich besonders deutlich bei Folsäure-Mangel ausprägen kann (Jacques et al., 1996; Tokgozoglu et al., 1999; Frosst et al., 1995).

#### 4.7.2. Ethnischer Unterschied der C677T-Genotypverteilung

Von Todesco und Mitarbeiter wurden die Ergebnisse mehrerer Studien verglichen. Daraus ist ersichtlich, dass schon in der gesunden Kontrollpopulation verschiedener ethnischer Gruppen signifikante Unterschiede in der TT-Verteilung vorliegen können. Die TT-Häufigkeit kann von 0 bis 30% variieren (Todesco et al., 1999). In den DACH-Ländern sind ca. 5-15% der Bevölkerung homozygote TT-Genträger. Weitere Studien haben ergeben, dass 24-40% der Europäer (van der Put et al., 1997), 26-37% der japanischen (Papapetrou et al., 1997; Sohda et al., 1997) und ca. 11% der afroamerikanischen Bevölkerung TT-Genotypträger sind (Stevenson et al., 1997).

So liegt die Prävalenz in der schwarzen amerikanischen Bevölkerung nur bei 1%, in der weißen Bevölkerung in Europa, Nordamerika und Australien jedoch bei 8-20%. In Europa scheint es einen Nord-Süd-Anstieg der Prävalenz für den homozygoten TT-Genotyp zu geben (Botto und Yang, 2000).

Manche Bevölkerungen, beispielsweise Mexikaner (Mutchinick et al., 1999) und Menschen aus der Toskana von Italien (Abbate et al., 1999) zeigen Frequenzen

>30% für den TT-Genotyp. Afrikaner hingegen zeigen 0% homozygote TT-Genträger und 91% des Wildtyp-Allels in der Bevölkerung (Rajkovic et al., 2000). Außerdem haben Afroamerikaner in den USA 1-2% TT- und 85% CC-Genträger (McAndrew et al., 1996).

Schneider und Mitarbeiter haben 881 Individuen, die nicht verwandt miteinander waren, aus 16 weltweiten ethnischen Gruppen genau auf diese Punktmutation untersucht (Schneider et al., 1998). Sie kamen zu ähnlichen Ergebnissen wie Rajkovic, Abbate und Mutchinick und Mitarbeiter.

Somit gibt es in der Frequenz des Auftretens der homozygoten Form des C677T-Polymorphismus je nach ethnischer Gruppe und geografischer Herkunft sehr große Unterschiede.

#### 4.7.3. Auswirkungen des C677T-Genotyps in der vorliegenden Studie

Weil der MTHFR-Genotyp verantwortlich für die Homocystein-Konzentration sein kann, wurden die Freiwilligen auf Mutationen der MTHFR an der Position 677 genotypisiert. Die Verteilung der C677T Mutation in der vorliegenden Studie zeigte zufällig ein 50:50 Verhältnis vom heterozygoten Genotyp (CT) zum homozygoten Wildtyp (CC). Dieses Ergebnis verwundert einerseits, auf Grund der kleinen Stichprobe, andererseits jedoch ist in Deutschland genau eine solche Verteilung unter der kaukasischen Bevölkerung zu erwarten.

Stern und Mitarbeiter beobachteten, dass homozygote Genträger (TT) im Gegensatz zum Wildtyp (CC) eine verminderte Fähigkeit besitzen, Methylgruppen an der DNA zu binden. Somit ist die DNA von homozygoten Genträgern (TT) hypomethyliert (Stern et al., 2000).

Im Gegensatz dazu gab es bei den Ergebnissen der vorliegenden Studie keinerlei signifikante Unterschiede bei den Parametern Homocystein-Konzentration, SAM-Konzentration, SAH-Konzentration und DNA-Methylierung zwischen dem CC- und CT-Genotyp der MTHFR mit einer Ausnahme:

Die SAM-Konzentration in Erythrozyten bei CT-Genträgern war, im Vergleich zu der vom CC-Wildtyp, signifikant leicht erhöht ( $p < 0,0001$ ). Dieser Unterschied wurde nicht nur bei allen einzelnen Messzeitpunkten bei Verum und Placebo

gefunden, sondern auch während der oralen Homocysteinaufnahme. Die Bedeutung dieses erstmalig beobachteten Phänomens ist bislang unklar.

#### 4.8. Vitamin B<sub>6</sub>-, B<sub>12</sub>- und Folsäure-Gabe

Wird bei einem Patienten ein erhöhter Homocysteinwert gefunden, so sollten, nach sorgfältiger Erfragung auffälliger Medikamente, ein Mangel an Vitamin B<sub>12</sub> oder Folsäure, eine Hypothyreose, eine Hypercholesterinämie und ein Lupus erythematodes ausgeschlossen werden. Allenfalls sind Hinweise auf eine maligne Erkrankung zu suchen (Kolde, 1998). Die beste Vorbeugung ist der Verzehr von Nahrungsmitteln, die reich an Vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> und Folsäure sind. Hierunter fallen Vollkornprodukte, Blattgemüse, Kartoffeln, Fisch, Fleisch, Nüsse und Obst wie Bananen, Zitrusfrüchte, Trauben, Kirschen und Erdbeeren. In den USA sind viele Frühstücksgetreideprodukte mit Folsäure, Vitamin B<sub>12</sub> und Vitamin B<sub>6</sub> angereichert. Ursprünglich sollten durch diese Anreicherungen vor allem Fehlbildungen des ungeborenen Kindes – z.B. Neuralrohrdefekte – verhindert werden. In den USA, in Kanada und in Ungarn wird Folsäure in Grundnahrungsmitteln wie Mehl und Salz gemischt, um die Unterversorgung der Bevölkerung mit dem lebenswichtigen Vitamin zu mildern. Aus der Sicht der Wissenschaft mag dies als problematisch betrachtet werden, da für eine eventuelle Untersuchung mit Folsäure-Gabe praktisch keine reine Placebo-Gruppe mehr gebildet werden kann.

#### 4.9. Ausblick

In Bezug auf weitere Forschungsprojekte über den Einfluss von Homocystein auf das Methylierungspotential stellt sich die Frage, wie eine chronische Hyperhomocysteinämie durch exogene Zufuhr von Homocystein herbeigeführt werden kann. Auf Grund des schnellen Katabolismus von Homocystein, mit einer Halbwertszeit von etwa 4 Stunden, wird es schwer durchführbar sein, eine chronische und beständige Hyperhomocysteinämie im Plasma durch orale Gabe von Homocystein über mehrere Tage aufrecht zu erhalten. Die intravenöse Gabe von Homocystein würde auch sehr schwierig werden, weil es

hierüber kaum Daten gibt und die Lagerung des instabilen Homocysteins schwierig ist.

Die Herbeiführung einer Hyperhomocysteinämie zur Untersuchung des MP durch Gabe von Methionin würde auch keinen Sinn machen, weil eine durch Methionin herbeigeführte Homocysteinämie die SAM- und SAH-Konzentrationen, die in Menschen mit einer angeborenen bzw. natürlichen Hyperhomocysteinämie vorherrschen, nicht repräsentieren kann.

Deshalb ist es sinnvoller, den Einfluss von Vitaminen, wie z.B. den von Folsäure, Vitamin B<sub>6</sub> und Vitamin B<sub>12</sub>, auf klinisch relevante Parameter bei einer chronischen Hyperhomocysteinämie zu messen, anstelle den Einfluss einer Hyperhomocysteinämie auf Surrogatparameter wie beispielsweise das MP. Thambyrajah und Mitarbeiter demonstrierten in einer placebo-kontrollierten Studie anhand von 100 Patienten mit Niereninsuffizienz (Serumkreatinin >130 µmol/l) und Homocystein-Plasmakonzentrationen von >12 µmol/l, dass eine tägliche Gabe von 5 mg Folsäure die zu hohe Homocystein-Konzentration zwar erniedrigt, jedoch nicht in den Normbereich bringt. Die Senkung der Homocystein-Konzentration war nicht mit einer Wirkung auf die Endothelfunktion assoziiert. Diese Ergebnisse haben somit die Theorie der Routine-Einnahme von Folsäure zur Verhinderung und Behandlung vaskulärer Krankheiten in Risikogruppen nicht unterstützt (Thambyrajah et al., 2000).

## 5. Zusammenfassung

Homocystein ist ein Vorläufer von SAM und ein Metabolit von SAH. Der Quotient aus SAM/SAH wird als Methylierungspotenzial (MP) bezeichnet, welches das Übertragen von Methylgruppen in der Zelle anzeigt.

Eine chronische Erhöhung der Homocystein-Konzentration im Plasma korreliert mit dem Anstieg der SAH-Konzentration, dem Abfall des MP und der Verminderung der DNA-Methylierung. Jedoch ist bisher der Einfluss einer akuten transiente Hyperhomocysteinämie auf das MP nicht bekannt gewesen.

In der vorliegenden Studie wurde eine akute transiente Hyperhomocysteinämie bei 14 gesunden Freiwilligen durch eine orale Einmalgabe von L-Homocystein ( $65,1 \mu\text{mol/kg KG}$ ) in einer prospektiven, randomisierten, placebo-kontrollierten, zweiarmigen cross-over-Studie induziert.

Innerhalb von 48 h nach Gabe der Studienmedikation wurden systematisch die Kinetik von Homocystein in Blut und Urin, das MP im Blut sowie die DNA-Methylierung in peripheren Lymphozyten untersucht.

Die Homocystein-Konzentration in Plasma erreichte ein Maximum ( $C_{\text{max}}$ ) bei  $34 \pm 11$  min (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) nach oraler Gabe von L-Homocystein und nahm mit einer Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von  $257 \pm 41$  min ab. Nur 2,3% des oral verabreichten Homocysteins wurden über 12 Stunden im Urin ausgeschieden. Nach Homocystein-Gabe wurden keine Änderungen der SAH-Konzentration und des MP in Vollblut und in Erythrozyten festgestellt. Die DNA-Methylierung in Lymphozyten hat sich unter diesen Bedingungen ebenfalls nicht geändert.

Es wurden keine Unterschiede in den Auswirkungen der Homocystein-Gabe zwischen den verschiedenen 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) Genotypen gefunden. Jedoch waren bei den C677T Gen-Trägern (CT; n=7) die SAM-Konzentrationen in Erythrozyten signifikant höher als bei den CC-Genotypträgern (n=7).

Obwohl eine chronische Hyperhomocysteinämie auf das MP und die DNA-Methylierung wirkt, reicht eine akute transiente Hyperhomocysteinämie, bei der die Homocystein-Konzentration im Plasma für 8 h über  $20 \mu\text{mol/l}$  liegt, nicht

aus, um das MP zu verändern oder eine DNA-Hypomethylierung in peripheren Lymphozyten zu induzieren.

## 6. Literaturverzeichnis

Abbate, R., Sardi, I., Pepe, G., Marcucci, R., Brunelli, T., Prisco, D., Fatini, C., Capanni, M., Simonetti, I., Gensini, G.F. (1998) The high prevalence of thermolabile 5-10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in Italians is not associated to an increased risk for coronary artery disease (CAD).  
Thromb. Haemost., 79, 727-730

Arnesen, E., Refsum, H., Bonna, K.H., Ueland, P.M., Forde, O.H., Nordrehaug, J.E. (1995) Serum total homocysteine and coronary heart disease.  
Int. J. Epidemiol., 24, 704-709

Barber, R., Shalat, S., Hendricks, K., Joggerst, B., Larsen, R., Suarez, L., Finnell, R. (2000) Investigation of folate pathway gene polymorphisms and the incidence of neural tube defects in a Texas hispanic population.  
Mol. Genet. Metab., 70, 45-52

Boers, G.H., Smals, A.G., Trijbels, F.J., Fowler, B., Bakkeren, J.A., Schoonderwaldt, H.C., Kleijer, W.J., Kloppenborg, P.W. (1985) Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease.  
N. Engl. J. Med., 313, 709-715

Bostom, A., Brosnan, J.T., Hall, B., Nadeau, M.R., Selhub, J. (1995a) Net uptake of plasma homocysteine by the rat kidney in vivo.  
Atherosclerosis, 116, 59-62

Bostom, A.G., Culleton, B.F. (1999) Hyperhomocysteinemia in Chronic Renal Disease.  
J. Am. Soc. Nephrol., 10, 891-900

Bostom, A.G., Selhum, J., Jacques, P.F., Nadeau, M.R., Williams, R.R., Ellison, R.C. (1995b) Methionine intolerance with normal fasting total plasma homocysteine: initial results from the NHLBI Family Heart Study.

Ir. J. Med. Sci., 164s, 3

Botto, L.D., Yang, Q. (2000) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review.

Am. J. Epidemiol., 151, 862-877

Boushey, C.J., Beresford, S.A., Omenn, G.S., Motulsky, A.G. (1995) A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes.

JAMA, 274, 1049-1057

Brattström, L., Wilcken, D.E., Ohrvik, J., Brudin, L. (1998) Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis.

Circulation, 98, 2520-2526

Brosnan, J.T., Jacobs, R.L., Stead, L.M., Brosnan, M.E. (2004) Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism.

Acta. Biochim. Pol., 51, 405-413

Brouwer, D.A., Welten, H.T., Reijngoud, D.J., van Doormaal, J.J., Muskiet, F.A. (1998) Plasma folic acid cutoff value, derived from its relationship with homocyst(e)ine.

Clin. Chem. 44, 1545-1550

Brouwer, I.A., van Dusseldorp, M., West, C.E., Meyboom, S., Thomas, C.M., Duran, M., van het Hof, K.H., Eskes, T.K., Hautvast, J.G., Steegers-Theunissen, R.P. (1999) Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial.

J. Nutr., 129(6), 1135-1139

Butterworth, C.E, Tamura, T. (1989) Folic acid safety and toxicity: a brief review.

Am. J. Clin. Nutr., 50, 353–358

Carson, N.A.J., Neill, D.W. (1962) Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland.

Arch. Dis. Child., 37, 505-513

Chen, P., Poddar, R., Tipa, E.V., Dibello, P.M., Moravec, C.D., Robinson, K., Green, R., Kruger, W.D., Garrow, T.A., Jacobsen, D.W. (1999) Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease.

Adv. Enzyme. Regul., 39, 93–109

Christensen, B., Frosst, P., Lussier-Cacan, S., Selhub, J., Goyette, P., Rosenblatt, D.S., Genest, J. Jr., Rozen, R. (1997) Correlation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 17, 569-573

Clarke, R., Daly, L., Robinson, K., Naughten, E., Cahalane, S., Fowler, B., Graham, I. (1991) Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease.

N. Engl. J. Med., 324(17), 1149-1155

Clarke, R., Shipley, M., Lewington, S., Youngman, L., Collins, R., Marmot, M., Peto, R. (1999) Underestimation of risk associations due to regression dilution in long-term follow-up of prospective studies.

Am. J. Epidemiol., 150, 341–353

Cortes, C., Motti, C. (2001) MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease.

Public. Health. Nutr., 4, 493-497

D'Angelo, A., Mazzola, G., Crippa, L., Fermo, I., Viganò D'Angelo, S. (1997) Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolic disease.

Haematologica, 82, 211-219

Delabar, U., Kloor, D., Luippold, G., Mühlbauer, B. (1999) Simultaneous determination of adenosine, S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine in biological samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography.

J. Chromatogr., B724, 231-238

de la Haba, G., Cantoni, G.L. (1959) The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosin and homocysteine.

J. Biol. Chem., 2434, 606-608

Delanaye, P., Chapelle, J.P., Ferir, A.M., Gielen, J., Krzesinski, J.M., Rorive, G. (2003) Evaluation of glomerular filtration rate in clinical practice.

Rev. Med. Liege., 58, 95-100

DeVigneaud, V.E. (1952) Trail of research in sulfur chemistry and metabolism, and related fields.

Ithaca, N.Y.: Cornell University Press

Du Bois, D., Du Bois, E.F. (1916) A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known.

Arch. Int. Med., 17, 863-871

Durand, P., Prost, M., Loreau, N., Lussier-Cacan, S., Blache, D. (2001)

Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease.

Lab. Invest., 81, 645–672

Eisenstein, E.L., Shaw, L.K., Anstrom, K.J., Nelson, C.L., Hakim, Z.,

Hasselblad, V., Mark, D.B. (2001) Assessing the clinical and economic burden of coronary artery disease: 1986–1998.

Med. Care, 39, 824–835

Estelberger, W., Petek, W., Zitta, S., Mauric, A., Horn, S., Holzer, H.,

Pogglitsch, H. (1995) Determination of the glomerular filtration rate by identification of sinistrin kinetics.

Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 33, 201-209

Finkelstein, J.D. (2000) Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals.

Semin. Thromb. Hemost., 26, 219-225

Frosst, P., Blom, H.J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C.A., Matthews, R.G.,

Boers, G.J., den Heijer, M., Kluijtmans, L.A., van den Heuvel, L.P. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase.

Nat. Genet., 10, 111-113

Fux, R., Biedermann, T., Sander-Wiecker, T., Mörike, K., Gleiter, C.H. (2004)

Anaphylaxis to intravenous sinistrin.

Ann. Pharmacother., 38, 2175-2176

Goyette, P., Sumner, J.S., Milos, R. (1994) Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification.

Nat. Genet., 7, 195-200

Gerritsen, T., Waisman, H.A. (1964) Homocysteinuria, an error in the metabolism of methionine.

Pediatrics, 33, 413-420

Graham, I.M., Daly, L.E., Refsum, H.M., Robinson, K., Brattstrom, L.E., Ueland, P.M., Palma-Reis, R.J., Boers, G.H., Sheahan, R.G., Israelsson, B., Uiterwaal, C.S., Meleady, R., McMaster, D., Verhoef, P., Witteman, J., Rubba, P., Bellet, H., Wautrecht, J.C., de Valk, H.W., Sales Luis, A.C., Parrot-Rouland, F.M., Tan, K.S., Higgins, I., Garcon, D., Andria, G. (1997) Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project.

JAMA, 277, 1775-1781

van Guldener, C., Kulik, W., Berger, R., Dijkstra, D.A., Jakobs, C., Reijngoud, D.J., Donker, A.J., Stehouwer, C.D., de Meer, K. (1999) Homocysteine and methionine metabolism in ESRD: A stable isotope study.

Kidney Int., 56, 1064-71

Gupta, A., Robinson, K. (1997) Hyperhomocysteinaemia and end-stage renal disease.

J. Nephrol., 10, 77-84

Guttormsen, A.B., Mansoor, A.M., Fiskerstrand, T., Ueland, P.M., Refsum, H. (1993) Kinetics of plasma homocysteine in healthy subjects after peroral homocysteine loading.

Clin. Chem., 39, 1390-1397

Guttormsen, A.B., Schneede, J., Fiskerstrand, T., Ueland, P.M., Refsum, H.M. (1994) Plasma concentrations of homocysteine and other aminothiol compounds are related to food intake in healthy human subjects. *J. Nutr.*, 124, 1934-1941

Guttormsen, A.B., Schneede, J., Ueland, P.M., Refsum, H. (1996) Kinetics of total plasma homocysteine in subjects with hyperhomocysteinemia due to folate or cobalamin deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.*, 63, 194-202

Guttormsen, A.B., Ueland, P.M., Svarstad, E., Refsum, H. (1997) Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure. *Kidney Int.*, 52, 495-502

Hankey, G.J., Eikelboom, J.W. (1999) Homocysteine and vascular disease. *Lancet*, 354, 407-413

Hanson, N.Q., Aras, O., Yang, F., Tsai, M.Y. (2001) C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. *Clin. Chem.*, 47, 661-666

den Heijer, M., Koster, T., Blom, H.J., Bos, G. M.J., Briët, E., Reitsma, P.H., Vandenbroucke, J.P., Rosendaal, F.R. (1996) Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep vein thrombosis. *N. Engl. J. Med.*, 334, 759-768

Hermes, M., Osswald, H., Mattar, J., Kloor, D. (2004) Influence of an altered methylation potential on mRNA methylation and gene expression in HepG2 cells. *Exp. Cell. Res.*, 294, 325-334

Hill, A.B. (1965) The environment and disease: association or causation?  
Proc. R. Soc. Med., 58, 295–300

House, J.D., Brosnan, M.E., Brosnan, J.T. (1998) Renal uptake and excretion of homocysteine in rats with acute hyperhomocysteinemia.  
Kidney Int., 54, 1601-1607

Jacob, R.A., Gretz, D.M., Taylor, P.C., James, S.J., Pogribny, I.P., Miller, B.J., Henning, S.M., Swendseid, M.E. (1998) Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women.  
J. Nutr., 128, 1204-1212

Jacques, P.F., Bostom, A.G., Williams, R.R., Ellison, R.C., Eckfeldt, J.H., Rosenberg, I.H., Selhub, J., Rozen, R. (1996) Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations.  
Circulation, 93, 7-9

Kang, S.S., Wong, P.W., Susmano, A., Sora, J., Norusis, M., Ruggie, N. (1991) Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease.  
Am. J. Hum. Genet., 48(3), 536-545

Kelly, P.J., Rosand, J., Kistler, J.P., Shih, V.E., Silveira, S., Plomaritoglou, A., Furie, K.L. (2002) Homocysteine, MTHFR 677C\_T polymorphism, and risk of ischemic stroke: results of a meta-analysis.  
Neurology, 59, 529–536

Klerk, M., Verhoef, P., Clarke, R., Blom, H.J., Kok, F.J., Schouten, E.G., MTHFR Studies Collaboration Group (2002) MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis.

JAMA, 288, 2023-2031

Kloor, D., Delabar, U., Mühlbauer, B., Luippold, G., Oßwald, H. (2002) Tissue levels of S-adenosylhomocysteine in the rat kidney. Effects of ischemia and homocysteine.

Biochem. Pharmacol., 7082, 1-7

Kloor, D., Fuchs, S., Petroktistis, F., Delabar, U., Mühlbauer, B., Quast, U., Oßwald, H. (1998) Effects of ions on adenosine-binding and enzyme activity of purified S-adenosylhomocysteinehydrolase from bovine kidney.

Biochem. Pharmacol., 56, 1493-1496

Kluijtmans, L.A., van den Heuvel, L.P., Boers, G.H., Frosst, P., Stevens, E.M., van Oost, B.A., den Heijer, M., Trijbels, F.J., Rozen, R., Blom, H.J. (1996) Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease.

Am. J. Hum. Genet., 58, 35-41

Kolde, H.J. (1998) Der Risikofaktor Homocystein. Der Zusammenhang zwischen B-Vitaminen, schwefelhaltigen Aminosäuren und Gefässerkrankungen.

Mta, 13, 10–12

Leclerc, D., Campeau, E., Goyette, P., Adjalla, C.E., Christensen, B., Ross, M., Eydoux, P., Rosenblatt, D.S., Rozen, R., Gravel, R.A. (1996) Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders.

Hum. Mol. Genet., 5, 1867–1874

Ma, J., Stampfer, M.J., Hennekens, C.H., Frosst, P., Selhub, J., Horsford, J., Malinow, M.R., Willett, W.C., Rozen, R. (1996) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians.  
Circulation, 94, 2410-2416

Madore F. (2003) Uremia-related metabolic cardiac risk factors in chronic kidney disease.  
Semin. Dial., 16, 148-156

Magoni, M., Padovani, A. (2002) Plasma homocysteine concentration, C677T MTHFR genotype, and 844ins68bp CBS genotype in young adults with spontaneous cervical artery dissection and atherothrombotic stroke.  
Stroke, 33, 664-669

Mansoor, M.A., Guttormsen, A.B., Fiskerstrand, T., Refsum, H., Ueland, P.M., Svardal, A.M. (1993) Redox status and protein binding of plasma aminothiols during the transient hyperhomocysteinemia that follows homocysteine administration.  
Clin. Chem., 39, 980-985

Malinow, M.R., Bostom, A.G., Krauss, R.M. (1999) Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association.  
Circulation, 99, 178-182

Martin, J.A., Smith, B.L., Mathews, T.J., Ventura, S.J. (1999) Births and deaths: preliminary data for 1998.  
Nat. Vital. Stat. Rep., 47, 1-48

McAndrew, P.E., Brandt, J.T., Pearl, D.K., Prior, T.W. (1996) The incidence of the gene for thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in African Americans.

Thromb. Res., 83, 195–198

Motti, C., Gnasso, A., Bernardini, S., Massoud, R., Pastore, A., Rampa, P., Federici, G., Cortese, C. (1998) Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Correlation with homocysteine and other risk factors for vascular disease.

Atherosclerosis, 139, 377–383

Mudd, S.H., Uhlendorf, B.W., Freeman, J.M., Finkelstein, J.D., Shih, V.E. (1972) Homocystinuria associated with decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 46, 905-912

Mutchinick, O.M., Lopez, M.A., Luna, L., Waxman, J., Babinsky, V.E. (1999) High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. Mol. Genet. Metab., 68, 461–467

van Meurs, J.B., Dhonukshe-Rutten, R.A., Pluijm, S.M., van der Klift, M., de Jonge, R., Lindemans, J., de Groot, L.C., Hofman, A., Witteman, J.C., van Leeuwen, J.P., Breteler, M.M., Lips, P., Pols, H.A., Uitterlinden, A.G. (2004) Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture.

N. Engl. J. Med., 350, 2033-2041

Nallamothe, B.K., Fendrick, A.M., Rubenfire, M., Saint, S., Bandekar, R.R., Omenn, G.S. (2000) Potential clinical and economic effects of homocyst(e)ine lowering.

Arch. Intern. Med., 160, 3406–3412

Nygård, O., Nordrehaug, J.E., Refsum, H., Ueland, P.M., Farstad, M., Vollset, S.E. (1997) Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease.

N. Engl. J. Med., 337, 230-236

O'Callaghan, P., Meleady, R., Fitzgerald, T., Graham, I. (2002) European COMAC group. Smoking and plasma homocysteine.

Eur. Heart. J., 23, 1580–1586

Papapetrou, C., Lynch, S.A., Burn, J., Edwards, Y.H. (1996) Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects.

Lancet, 348, 58

Perna, A.F., Ingrosso, D., de Santo, N.G., Galetti, P., Zappia, V. (1995) Mechanism of erythrocyte accumulation of methylation inhibitor S-adenosylhomocysteine in uremia.

Kidney Int., 47, 247-253

Perna, A.F., Ingrosso, D., Satta, E., Lombardi, C., Acanfora, F., de Santo, N.G. (2004a) Homocysteine metabolism in renal failure.

Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care., 7, 53-57

Perna, A.F., Ingrosso, D., Satta, E., Lombardi, C., Galletti, P., D'Aniello, A., de Santo, N.G. (2004b) Plasma protein aspartyl damage is increased in hemodialysis patients: studies on causes and consequences.

J. Am. Soc. Nephrol., 15, 2747-2754

Perna, A.F., Ingrosso, D., Satta, E., Romano, M., Cimmino, A., Galetti, P., Zappia, V., de Santo, N.G. (2001) Metabolic consequences of hyperhomocysteinemia in uremia.

Am. J. Kidney. Dis., 38, 85-90

Perna, A.F., Ingrosso, D., Zappia, V., Galetti, P., Capasso, G., de Santo, N.G. (1993) Enzymatic methyl esterification of erythrocyte membrane proteins is impaired in chronic renal failure: Evidence for high levels of the natural inhibitor S-adenosylhomocysteine.

J. Clin. Invest. 91, 2497-2503

Perry, D.J. (1999) Hyperhomocysteinaemia

Baillière's Best Pract. Res. Clin. Haematol., 12, 451-477

Pfund, A., Wendland, G., Geisen, C., Höpp, H.W. (10/1999) Verlässlichkeit der Homocystein-Messung.

Herz Kreislauf (Medizinische Klinik III der Universitätsklinik zu Köln)

[http://www.pflaum.de/hk.dir/1999/a\\_381-99.html](http://www.pflaum.de/hk.dir/1999/a_381-99.html)

Pogribny, I., Yi, P., James, S.J. (1999) A sensitive new method for rapid detection of normal methylation patterns in global DNA and within CpG islands. Biochem. Biophys. Res. Commun., 262, 624-628

Proksch, B., Jelesnianski, S., Oberrauch, W., Fux, R., Gleiter, C.H. (2005) Adaption of a high performance liquid chromatographic method for quantitative determination of homocysteine in urine after L-homocysteine-thiolactone hydrochloride loading.

J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.

Raisz, L.G. (2004) Homocysteine and osteoporotic fractures--culprit or bystander?

N. Engl. J. Med., 350(20), 2089-2090

Rajkovic, A., Mahomed, K., Rozen, R., Malinow, M.R., King, I.B., Williams, M.A. (2000) Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C→T polymorphism, plasma folate, vitamin B<sub>12</sub> concentrations, and risk of preeclampsia among black African women from Zimbabwe.

Mol. Genet. Metab., 69, 33–39

Rasch, B., Friese, M., Hofmann, W., Naumann, E. (2004) Quantitative Methoden Band 1 und 2.

Refsum, H., Helland, S., Ueland, P.M. (1985) Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine.

Clin. Chem., 31, 624–628

Refsum, H., Ueland, P.M., Nygård, O., Vollset, S.E. (1998) Homocysteine and cardiovascular disease.

Annu. Rev. Med., 49, 31-62

Robinson, K., Gupta, A., Dennis, V., Arheart, K., Chaudhary, D., Green, R., Vigo, P., Mayer, E.L., Selhub, J., Kutner, M., Jacobsen, D.W. (1996) Hyperhomocysteinemia confers an independent increased risk of atherosclerosis in end-stage renal disease and is closely linked to plasma folate and pyridoxine concentrations.

Circulation, 94, 2743-2748

Rozen, R. (1997) Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR).

Thromb. Haemost., 78, 523-526

Savage, D.G., Lindenbaum, J., Stabler, S.P., Allen, R.H. (1994) Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies.

Am. J. Med., 96, 239–246

Schneider, J.A., Rees, D.C., Liu, Y.T., Clegg, J.B. (1998) Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation.

Am. J. Hum. Genet., 62, 1258-1260

Schnyder, G., Roffi, M., Pin, R., Flammer, Y., Lange, H., Eberli, F.R., Meier, B., Turi, Z.G., Hess, O.M. (2001) Decreased rate of coronary restenosis after lowering of plasma homocysteine levels.

N. Engl. J. Med., 345, 1593–1600

Selhub, J., Jacques, P.F., Wilson, P.W., Rush, D., Rosenberg, I.H. (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population.

J. Am. Med. Assoc., 270, 2693–2698

Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., D'Agostino, R.B., Wilson, P.W., Wolf, P.A. (2002) Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease.

N. Engl. J. Med., 346, 476-483

Smith, S.C. Jr., Greenland, P., Grundy, S.M. (2000) AHA Proceedings Conference. Prevention conference V: Beyond secondary prevention: Identifying the high-risk patient for primary prevention: executive summary.

Circulation, 101, 111–116

Sohda, S., Arinami, T., Hamada, H., Yamada, N., Hamaguchi, H., Kubo, T. (1997) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia.

J. Med. Genet., 34, 525–526

Stam, F., van Guldener, C., ter Wee, P.M., Kulik, W., Smith, D.E., Jakobs, C., Stehouwer, C.D., de Meer, K. (2004) Homocysteine clearance and methylation flux rates in health and end-stage renal disease: association with S-adenosylhomocysteine.

Am. J. Physiol. Renal Physiol., 287, F215-223

Stam, F., van Guldener, C., Ter Wee, P.M., Jakobs, C., de Meer, K., Stehouwer, C.D. (2005) Effect of folic acid on methionine and homocysteine metabolism in end-stage renal disease.

Kidney Int., 67, 259-264

Stampfer, M.J., Malinow, M.R., Willett, W.C., Newcomer, L.M., Upson, B., Ullmann, D., Tishler, P.V., Hennekens, C.H. (1992) A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians.

JAMA, 268, 877-881

Stanger, O., Herrmann, W., Pietrzik, K., Fowler, B., Geisel, J., Dierkes, J., Weger, M. (2003) Konsensuspapier der D.A.CH.-Liga Homocystein über den rationellen klinischen Umgang mit Homocystein, Folsäure und B-Vitaminen bei kardiovaskulären und thrombotischen Erkrankungen – Richtlinien und Empfehlungen.

J. Kardiol., 10, 190–199

Stanger, O., Weger, M., Renner, W., Konetschny, R. (2001) Vascular dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia. Implications for atherothrombotic disease.

Clin. Chem. Lab. Med., 39, 725–733

Stern, L.L., Mason, J.B., Selhub, J. (2000) Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene.

Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 9, 849-853

Stevenson, R.E., Schwartz, C.E., Du, Y.-Z., Adams, M.J. Jr. (1997) Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies between whites and blacks.

Am. J. Hum. Genet., 60, 229-230

Stickel, F., Choi, S.W., Kim, Y.I., Bagley, P.J., Seitz, H.K., Russell, R.M., Selhub, J., Mason, J.B. (2000) Effect of chronic alcohol consumption on total plasma homocysteine level in rats.

Alcohol Clin. Exp. Res., 24(3), 259-264

Stone, K.L., Bauer, D.C., Sellmeyer, D., Cummings, S.R. (2004) Low serum vitamin B<sub>12</sub> levels are associated with increased hip bone loss in older women: a prospective study.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 89, 1217-1221

Thambyrajah, J., Landray, M.J., McGlynn, F.J., Jones, H.J., Wheeler, D.C., Townend, J.N. (2000) Does folic acid decrease plasma homocysteine and improve endothelial function in patients with predialysis renal failure?

Circulation, 102, 871-875

Todesco, L., Angst, C., Litynski, P., Loehrer, F., Fowler, B., Haefeli, W.E. (1999) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma homocysteine and age.

Eur. J. Clin. Invest., 29, 1003-1009

Tokgozoglu, S.L., Alikasifoglu, M., Unsal, Atalar, E., Aytemir, K., Ozer, N., Ovunc, K., Usal, O., Kes, S., Tuncbilek, E. (1999) Methylene tetrahydrofolate reductase genotype and the risk and extent of coronary artery disease in a population with low plasma folate.  
Heart, 81, 518-522

Toole, J.F., Malinow, M.R., Chambless, L.E., Spence, J.D., Pettigrew, L.C., Howard, V.J., Sides, E.G., Wang, C.H., Stampfer, M. (2004) Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial.  
JAMA, 291, 565-575

Tsai, J.C., Perrella, M.A., Yoshizumi, M., Hsieh, C.M., Haber, E., Schlegel, R., Lee, M.E. (1994) Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis.  
Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 6369-6373

Ubbink, J.B., van der Merwe, A., Delport, R., Allen, R.H., Stabler, S.P., Riezler, R., Vermaak, W.J. (1996) The effect of a subnormal vitamin B-6 status on homocysteine metabolism.  
J. Clin. Invest., 98, 177-184

Ubbink, J.B., Vermaak, W.J., van der Merwe, A., Becker, P.J. (1992) The effect of blood sample aging and food consumption on plasma total homocysteine levels.  
Clin. Chim. Acta., 207, 119-128

Ueland, P.M. (1982) Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteinehydrolase.  
Pharmacol. Rev., 34, 223-253

van Bockxmeer, F.M., Mamotte, C.D., Vasikaran, S.D., Taylor, R.R. (1997) Methylenetetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. *Circulation*, 95, 21-23

van der Put, N.M., Eskes, T.K., Blom, H.J. (1997) Is the common 677C→T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. *Q.J.M.*, 90, 111-115

Verhoef, P., Kok, F.J., Kluijtmans, L.A., Blom, H.J., Refsum, H., Ueland, P.M., Kruyssen, D.A. (1997) The 677C→T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: associations with plasma total homocysteine levels and risk of coronary atherosclerotic disease. *Atherosclerosis*, 132, 105-113

Wald, D.S., Law, M., Morris, J.K. (2002) Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *B.M.J.*, 325, 1202-1206

Welch, G.N., Loscalzo, J. (1998) Homocysteine and atherothrombosis. *N. Engl. J. Med.*, 338, 1042-1050

Whitehead, A.S., Gallagher, P., Mills, J.L., Kirke, P.N., Burke, H., Molloy, A.M., Weir, D.G., Shields, D.C., Scott, J.M. (1995) A genetic defect in 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *Q.J.M.*, 88, 763-766

Wilcken, D.E., Wilcken, B. (1997) The natural history of vascular disease in homocystinuria and the effects of treatment. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 20, 295–300

Wu, L.L., Wu, J., Hunt, S.C. (1994) Plasma homocysteine as a risk factor for early familial coronary artery disease.

Clin. Chem., 40, 552-561

Yi, P., Melnyk, S., Pogribna, M., Pogribny, I.P., Hine, R.J., James, S.J. (2000) Increase in plasma homocysteine associated with parallel increase in plasma-S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation.

J. Biol. Chem., 275, 29318-29323

Zhloba, A.A., Blashko, E.L. (2004) Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection.

J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci., 800, 275-80

Zhang, Z., Liu, W., Jia, X., Gao, Y., Hemminki, K., Lindholm, B. (2004) Use of pyrosequencing to detect clinically relevant polymorphisms of genes in basal cell carcinoma.

Clin. Chim. Acta., 342, 137-143

## **7. Danksagung**

Herrn Professor C. H. Gleiter danke ich für die Bereitstellung des Themas und für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seinem Institut durchführen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Richard Fux für die Einführung in das Thema, seine tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Studientage sowie der Entstehung dieser Arbeit, sein offenes Ohr zu jeder Zeit und das stets angenehme Arbeitsklima sowie die Korrektur und Durchsicht der Dissertation.

Frau PD Dr. Doris Kloor danke ich für die vielen Anregungen während der Erstellung dieser Arbeit, für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und dafür, dass sie mir mit Rat und Tat immer aufmunternd zur Seite gestanden hat.

Des Weiteren danke ich ganz herzlich Dr. Almut Grenz für ihre freundliche und liebevolle Hilfsbereitschaft.

Für die freundliche Aufnahme und die vielfältige Unterstützung, die mir während meiner Arbeit entgegengebracht wurde, bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Tobias Röck  
Geburtsdatum: 10. April 1981  
Geburtsort: Sigmaringen, Deutschland  
Eltern: Günter Röck, Luzia Röck geb. Fecker  
Geschwister: Frank und Daniel Röck  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

1987 - 2000 Grundsule Scheer und Gymnasium Mengen  
06/2000 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst

07/2000 – 05/2001 Benedikt-Reiser-Haus Mengen

### Studium

04/2001 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
03/2003 Ärztliche Vorprüfung  
09/2003 Beginn der wissenschaftlichen Arbeit am Institut für Klinische Pharmakologie der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. C.H. Gleiter  
26. Oktober 2007 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Praktika

08/2003 Famulatur an der Klinischen Pharmakologie der Universität Tübingen

08 – 09/2004	Famulatur an der Augenklinik der Universität Tübingen
02 – 03/2005	Famulatur an der BG Unfallklinik Tübingen
06/2005	Beginn mit der Tätigkeit als Studentische Hilfskraft an der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen
02 – 05/2006	Praktisches Jahr Chirurgie Stadtspital Triemli Zürich
06 – 08/2006	Praktisches Jahr Innere Medizin Universitätsspital Zürich
08 – 10/2006	Praktisches Jahr Innere Medizin Universität Tübingen
10/2006 – 01/2007	Praktisches Jahr Augenklinik Universität Tübingen

**Sprachen:** Deutsch (Muttersprache), Englisch, Französisch

**Interessen:** Gitarrespielen, Jagen, Volleyball, Stocherkahnfahren

### **Publikationen**

Fux R., Kloor D., Hermes M., Rock T., Proksch B., Grenz A., Delabar U., Bucheler R., Igel S., Morike K., Gleiter C.H., Osswald H. (2005)

Effect of acute hyperhomocysteinemia on methylation potential of erythrocytes and on DNA methylation of lymphocytes in healthy male volunteers

Am. J. Physiol. Renal. Physiol., 289(4), F786-792

Bramkamp M., Rock T., Schneemann M., Binggeli C., Kucher N. (2007)

Radiotherapy and the heart

Lancet, 369(9574):1762