

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier)

Etablierung einer HPLC-Methode zur Bestimmung von Homocystein im Plasma  
und erste klinische Evaluierung

Birgit Rohland

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation: 1. Privatdozent Dr. P. B. Lupp  
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. B. Pontz

Die Dissertation wurde am 17.12.1999 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 16.02.2000 angenommen.

*Armin,  
Ingrid und Wolfram,  
Max, Tobias, Felizitas und Corinna  
gewidmet*

**B**eim Bau des Münsters in Freiburg wurden drei Steinmetze nach ihrer Arbeit gefragt. Der erste antwortete: „Ich behauete Steine.“ Der zweite entgegnete: „Ich verdiene Geld.“ Der dritte überlegte und sprach: „Ich baue am Dom.“

Quelle unbekannt

	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
1.1	Allgemeine Einführung	2
1.2	Klinische Studien	4
1.3	Physiologie und Pathologie des Homocysteinstoffwechsels	6
1.4	Arterioskleroseentstehung und die Rolle von Homocystein	9
1.5	Gendefekte mit Auswirkung auf den Homocysteinstoffwechsel	10
1.5.1	$\beta$ -Cystathionin-Synthase (CBS)	10
1.5.2	Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR)	11
1.6	Klinische Bedeutung von Vitaminen im Homocysteinstoffwechsel	12
1.6.1	Die im Stoffwechsel von Homocystein relevanten Vitamine: Folsäure, Vitamin B <sub>12</sub> und Vitamin B <sub>6</sub>	12
1.6.2	Therapie der Hyperhomocysteinämie	14
1.6.3	Prophylaxe der Hyperhomocysteinämie	15
1.7	Klinisch-chemische Methoden zur Homocysteinbestimmung	16
1.8	Präanalytik	18
<b>2</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
3.1	Analytischer Teil	20
3.1.1	Reagenzien	20
3.1.2	HPLC	20
3.1.3	Probengewinnung	21
3.1.4	Probenaufarbeitung	21
3.1.4.1	Herstellung der Lösungen	21
3.1.4.2	Aufarbeitung der Proben	22
3.1.5	Kalibrierung	22

## INHALTSVERZEICHNIS

3.1.6	Leistungsdaten der HPLC-Methode (Präzision, Richtigkeit, Linearität, Sensitivität)	23
3.1.7	Andere Methoden	24
3.2	Stabilität der Homocysteinkonzentration in vitro	24
3.2.1	Stabilität in Plasma	24
3.2.2	Stabilität in Vollblut	25
3.2.3	Stabilität in Erythrozyten	25
3.3	Klinische Evaluierung der Homocysteinbestimmung	26
3.3.1	Patientenkollektiv	26
3.3.2	Referenzkollektiv	26
3.3.3	Genträger der thermolabilen MTHFR-Variante (C677T)	27
3.3.4	Statistische Auswertung	28
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>29</b>
4.1	Analytischer Teil	29
4.2	Stabilität der Homocysteinkonzentration in vitro	33
4.2.1	Stabilität in Plasma	33
4.2.2	Stabilität in Vollblut	34
4.2.3	Stabilität in Erythrozyten	36
4.3	Klinische Evaluierung der Homocysteinbestimmung	37
4.3.1	Charakterisierung des Patienten- und des Referenzkollektivs	37
4.3.2	Homocysteinwerte im Vergleich: Patienten- und Referenzkollektiv	39
4.3.3	Der Einfluss verschiedener Faktoren auf den Homocysteinwert	40
4.3.4	Erstellung eines Referenzbereiches	45
4.3.5	Zusammenhang zwischen der Diagnose und der Homocystein- konzentration	48
4.4	Untersuchung von Genträgern der thermolabilen MTHFR-Variante (C677T)	49
4.4.1	Ein Fallbeispiel	49

## INHALTSVERZEICHNIS

4.4.2	Homo- und heterozygote Genträger im Vergleich	51
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>53</b>
5.1	Diskussion der analytischen Methode	53
5.2	Problematik der Probengewinnung	56
5.2.1	Stabilität der Homocysteinkonzentration in verschiedenen Blutabnahmesystemen	56
5.2.2	Abnahmebedingungen	57
5.3	Diskussion der klinischen Evaluierung	59
5.3.1	Fehlermöglichkeiten und Einschränkungen des Aussagewertes	59
5.3.2	Ergebnisse	60
5.3.3	Ermittlung eines Referenzbereiches	63
5.3.4	Genträger der thermolabilen MTHFR-Variante (C677T)	66
5.4	Abschließende Betrachtung	68
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>78</b>
<b>9</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>79</b>

**DANKSAGUNG**

**LEBENS LAUF**

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

BAA	Bauchaortenaneurysma
CBS	$\beta$ -Cystathionin-Synthase
d	Tag
FD	Fluoreszenzdetektion
GC/MS	Gaschromatografie/Massenspektrometrie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KHK	Koronare Herzkrankheit
95%-KI	95-Prozent-Konfidenzintervall
Lp(a)	Lipoprotein(a)
m	männlich
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase
n	Anzahl
NaF	Natrium-Fluorid
p	Signifikanzniveau
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PML	post-methionine load
r	Regressionskoeffizient
RDA	recommended daily allowance
RP	reversed phase
$r_s$	Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient
SBD-F	7-Fluor-benzofurazan-4-sulfonsäure Ammoniumsalz
SH-	Sulfhydryl-
VK	Variationskoeffizient
vs	versus
w	weiblich
$\bar{x} \pm s$	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Allgemeine Einführung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Herzinfarkt, Apoplex und arterielle Verschlusskrankheit sind in Deutschland die häufigsten Todesursachen und die zweithäufigsten Indikationen für medizinische Rehabilitationsbehandlungen.<sup>47</sup> Sie mindern die Lebensqualität vieler Betroffener und stellen gleichzeitig für die Solidargemeinschaft eine große finanzielle Belastung dar. Die Arteriosklerose als Hauptursache dieser Krankheiten ist deswegen Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen.

In etwa 90 % der Fälle besteht ein statistischer Zusammenhang zwischen der Gefäßerkrankung und Risikofaktoren wie Rauchen, Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie. Bei Patienten mit prämaturer Arteriosklerose werden häufig familiäre Fettstoffwechselstörungen diagnostiziert. Oft bleibt die Ursache ihrer Erkrankung aber auch unklar.

Dies zeigt, dass die Erkennung und Charakterisierung bislang unbekannter Risikofaktoren für Arteriosklerose weiterhin eine wissenschaftliche Herausforderung darstellen. Einer dieser Faktoren scheint die Hyperhomocysteinämie zu sein.

Auf die pathobiochemische Bedeutung der Aminosäure Homocystein, die de Vigneaud 1932 als Zwischenprodukt des Methioninstoffwechsels entdeckt hatte, war man erstmals 1962 aufmerksam geworden. Damals beschrieben Carson<sup>11</sup> und Gerritsent<sup>15</sup> unabhängig voneinander die Krankheit Homocystinurie, die durch einen marfanoiden Körperbau mit Hochwuchs und Arachnodaktylie, Linsenluxation, Osteoporose und geistige Retardierung gekennzeichnet ist und häufig schon im Kindesalter zu thromboembolischen Ereignissen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall mit oft tödlichem Ausgang führt. Die Homocysteinkonzentration im Plasma liegt bei den Kranken mit bis zu 400  $\mu\text{mol/L}$ <sup>5,9</sup> weit über der von Gesunden, die etwa 10  $\mu\text{mol/L}$  beträgt.

1969 machte McCully bei der Obduktion von Kindern, die unterschiedliche Stoffwechseldefekte mit dem gemeinsamen Merkmal einer erhöhten Homocysteinausscheidung im Urin gehabt hatten, die Beobachtung, dass diese arteriosklerotische Gefäßveränderungen aufwiesen, wie man sie sonst nur bei älteren Individuen findet. Damit hatte er als erster den

Zusammenhang zwischen erhöhten Homocysteinkonzentrationen im Blut bzw. Urin und Arteriosklerose erkannt und veröffentlichte diese Erkenntnis 1975 als "homocysteine theory of arteriosclerosis".<sup>33</sup>

Erst Mitte der 80er Jahre wurde, u. a. bedingt durch verbesserte und somit empfindlichere analytische Methoden, auch die moderate Hyperhomocysteinämie mit einem erhöhten Arterioskleroserisiko in Verbindung gebracht. Den Durchbruch für die Anerkennung von Homocystein als Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen brachte 1992 die Physicians' Health Study:<sup>54</sup> In einem Untersuchungskollektiv von 22 071 nordamerikanischen Ärzten war hier ein dreifach erhöhtes Herzinfarktisiko für diejenigen Personen gefunden worden, deren Homocysteinwerte über der 95. Perzentile der Gesamtheit lagen, was einer Konzentration von 15,9 µmol/L Plasma entsprach.

Anzeige

NEUIGKEITEN AUS DER WISSENSCHAFT

## Forscher entdecken neue Ursache für allgemeine Arteriosklerose: Homocystein.

**D**iese Nachricht ging überall durch die Presse und sorgte für Aufsehen! In Ernährungswissenschaftlichen Forschungen wurde nämlich eine neue Ursache für Arteriosklerose erkannt: ein erhöhter Homocysteinpiegel. Was ist Homocystein? Eigentlich ein ganz „natürlicher“ Stoff, der vom Körper selbst im Eisenstoffwechsel gebildet wird. Gefährlich wird dieser Stoff, wenn er in zu hoher Konzentration im Blut vorhanden ist, denn dies kann fatale Folgen haben: arterielle Ablagerungen an den Innenwänden der Arterien werden begünstigt.

Was tun? Umfängliche internationale Untersuchungen sind zu einem verblüffenden Ergebnis gekommen!

Mit den Vitaminen Folsäure, B6 und B12 läßt sich der Homocysteinpiegel senken. Sie leisten damit einen wesentlichen Beitrag zur Gesunderhaltung von Herz und Arterien.



Geschützt durch eine gesunde Arterie

### Streß, Nikotin und Alkohol – die Vitamin-Fresser Nr. 1.

Fast Nationaler Verzehrstudie nimmt der überwiegende Teil der Bevölkerung nicht die von der Europäischen Gemeinschaft empfohlene Menge der Vitamine Folsäure, B6 und B12 zu sich. Darüberhinaus verbrauchen Streß, Rauchen oder Trinken zusätzlich Vitamine. Deshalb lautet der Rat der Experten: einmal täglich nehmen, was fehlt.

Gesundheitliche Aufwahrung an Folsäure, Vitamin B6 und B12

Vitamin	Männer	Frauen
Folsäure	87	88
Vitamin B6	63	70
Vitamin B12	27	38

Quelle: BfN, Ernährungserhebung, Nationaler Verzehrstudie 1983-88, modifiziert nach WHO 1991

### Fit über 50 – was Sie dafür tun können.

Nie waren die über 50-jährigen so körperbewußt wie heute. Sport, Bewegung etc. all das gehört heute dazu. Und trotzdem leiden immer mehr Menschen aus dieser Gruppe an Herz- oder Arterienkrankungen. Was können Sie tun?



Ganz einfache Sachen Sie aufpassen für Ihre Arterien, damit gute Durchblutung gewährleistet bleibt. Die B-Vitamine Folsäure, B6 und B12 sind echte Arterien-Fitnessler, die Arteriosklerose vorbeugen und den Blutfluß zum Herzen frei halten.

Homocystein – was ist das? Rufen Sie an heute: Homocystein-Info-Service. Jeden Mittwoch von 16.00 bis 18.00 Uhr. Tel. (089) 62 18 74 12

Abb. 1-1. Anzeige aus der BUNTEN (1996).

Seitdem haben viele weitere Studien den Zusammenhang zwischen erhöhten Homocystein-konzentrationen im Blut und arteriosklerotischen bzw. thromboembolischen Gefäß-erkrankungen bestätigt. Die Anzahl der Veröffentlichungen, die man in der MEDLINE unter dem Stichwort Homocystein findet, ist seit 1992 von 158 auf 567 (im Jahr 1998) gestiegen.

Im Juli 1995 fand in Irland die erste "International Conference on Homocysteine Metabolism" statt,<sup>23</sup> Ende April 1998 die zweite an der Universität von Nijmegen in den Niederlanden.<sup>21</sup>

Ihre große epidemiologische Bedeutung macht die Arteriosklerose auch wirtschaftlich interessant. Wie die Anzeige in der BUNTEN von 1996 (Abbildung 1-1) zeigt, hält die Werbung den Risikofaktor Homocystein für zukunftssträchtig, während er für die meisten Ärzte bisher nur in der wissenschaftlichen Diskussion, nicht aber in der Praxis eine Rolle spielt.

Im Folgenden soll ein Überblick über den derzeitigen Wissensstand zum Thema Homocystein gegeben werden: Physiologie und Pathologie, Studien und bisher entwickelte Therapie- bzw. Präventionsmodelle, Präanalytik und Laborverfahren.

## 1.2 Klinische Studien

Seit 1992 sind fünf große prospektive Studien über Homocystein und dessen Zusammenhang mit arteriosklerotischen Krankheiten veröffentlicht worden. Sie beziehen sich auf einen Beobachtungszeitraum von fünf bis elf Jahren und Kollektive von bis zu 21 826<sup>7</sup> Personen.

So wurde beim 5-Jahres-follow-up der Physicians' Health Study berechnet, wie groß das Risiko war, bei erhöhten Homocysteinwerten einen Herzinfarkt oder Schlaganfall zu erleiden. Dabei wurde für den Herzinfarkt ein relatives Risiko von 3,1 ermittelt,<sup>54</sup> wenn die Homocysteinkonzentration im Blut über der 95. Perzentile der Gesamtheit lag, während für den Schlaganfall kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden konnte.<sup>60</sup>

Die anderen Untersuchungen stammen aus Norwegen,<sup>7,38</sup> Finnland<sup>1</sup> und England.<sup>42</sup> Sie bestätigen mit Ausnahme der finnischen Studie, dass sich arteriosklerotische Gefäßerkrankungen signifikant häufiger bei Probanden mit im Vergleich zum Gesamtkollektiv hohen Homocysteinwerten manifestierten. Das Risiko für Schlaganfall und Herzinfarkt nahm dabei mit steigender Höhe der Homocysteinkonzentration im Blut zu.<sup>38,42</sup>

1995 erschien eine Metaanalyse aus 27 Studien,<sup>10</sup> in der geschätzt wurde, wie stark sich das

Risiko für verschiedene Gefäßerkrankungen bei einem Anstieg der Homocysteinkonzentration um jeweils 5  $\mu\text{mol/L}$  erhöht. Die odds ratio eines 5- $\mu\text{mol/L}$ -Intervalls war demnach für die koronare Herzkrankheit (KHK) 1,5 - 1,9 (95-Prozent-Konfidenzintervall), für zerebro-vaskuläre Erkrankungen 2,0 - 3,0 und für die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) 2,9 - 15,8.

Retrospektive Untersuchungen gibt es mehr als hundert.<sup>56</sup> Sie beschäftigen sich häufig mit Detailfragen oder Untergruppen und haben so einiges zum Verständnis beigetragen:

Malinow et al.<sup>31</sup> und Selhub et al.<sup>48</sup> fanden z. B. einen positiven Zusammenhang zwischen dem sonografisch ermittelten Ausmaß von Karotisstenosen und der Plasmakonzentration von Homocystein.

Wu et al.<sup>64</sup> stießen bei der Untersuchung von 170 Familien, in denen gehäuft Fälle prämaturner KHK aufgetreten waren, auf eine zweigipflige Homocysteinverteilung bei den Fällen, nicht aber bei den Kontrollen. Dies werteten sie als Hinweis auf mögliche genetische Ursachen einer Hyperhomocysteinämie.

Der Zusammenhang von Homocystein und venöser Thrombose, der bis vor kurzem übersehen worden war, gewinnt jetzt immer mehr an Bedeutung. D'Angelo u. Selhub<sup>5</sup> fassten in einem Review zehn Studien zusammen, die sich mit der Beziehung zwischen moderater Hyperhomocysteinämie und dem Auftreten frühzeitiger oder rezidivierender Thrombosen beschäftigen. Acht der Untersuchungen fanden bei den Fällen zwei- bis dreizehnmal häufiger erhöhte Homocysteinwerte als bei den Kontrollen.

In einer Studie mit KHK-Patienten<sup>38</sup> war deren Mortalität bei hohem Homocystein signifikant erhöht, wohingegen keine Korrelation mit dem Ausmaß der Koronarstenose nachgewiesen werden konnte. Dies lässt die Vermutung zu, dass Homocystein eher ein Risikofaktor für die thromboembolischen Komplikationen als für die chronische Entstehung von arteriosklerotischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist.

Die Gruppe der chronisch niereninsuffizienten Patienten erfährt erhöhte Aufmerksamkeit, seit Bostom u. Lathrop<sup>9</sup> bei 83 % ihrer dialysepflichtigen Patienten erhöhte Homocysteinwerte fanden. Dabei ist vermutlich nicht die verminderte Ausscheidung, sondern die mangelhafte Metabolisierung von Homocystein in der Niere für den Anstieg der Konzentration verantwortlich. Weil niereninsuffiziente Menschen aus bisher unbekannter Ursache fünf- bis zehnmal häufiger als die Gesamtbevölkerung einen Herzinfarkt oder Schlaganfall erleiden, hofft man, mit Homocystein nun einen Ansatzpunkt für die Prävention dieser oft tödlichen Komplikationen gefunden zu haben.

Die Mehrzahl aller Studien erkennt Homocystein als unabhängigen Risikofaktor für

arteriosklerotische Gefäßerkrankungen an. Sein Risikopotential soll mit dem von Hyperlipidämie oder Rauchen vergleichbar sein.<sup>17</sup> Übereinstimmend werden das Alter, die Nierenfunktion, die Vitamine Folsäure, B<sub>12</sub> und B<sub>6</sub>, das Geschlecht und der menopausale Status als wichtigste Einflussfaktoren genannt.

Es haben sich drei Personengruppen herauskristallisiert, die besonders für eine Hyperhomocysteinämie prädisponiert sind und deswegen zur Zeit im Mittelpunkt der Homocystein-Forschung stehen:

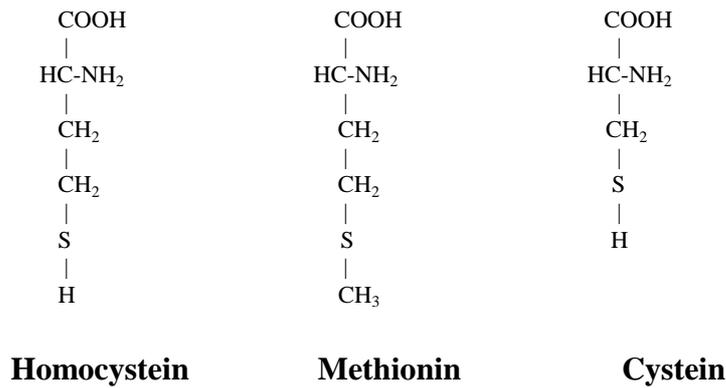
- Personen mit einem Mangel an den Vitaminen Folsäure, B<sub>12</sub> und B<sub>6</sub> - ein Zustand, der besonders in der älteren Bevölkerung infolge von Mangelernährung oder Malabsorption häufig ist (siehe 1.6.1),
- Träger von Genvarianten, bei denen die Aktivität der Homocystein verstoffwechselnden Enzyme herabgesetzt ist (siehe 1.5), und
- niereninsuffiziente bzw. dialysepflichtige Patienten.

### **1.3 Physiologie und Pathologie des Homocysteinstoffwechsels**

Homocystein (Abbildung 1-2) ist eine schwefelhaltige Aminosäure, die nicht an der Proteinsynthese beteiligt ist, sondern im Körper nur als Zwischenprodukt des Methioninstoffwechsels vorkommt.

Pro Tag werden in den Körperzellen eines Erwachsenen etwa 20 000 µmol Homocystein aus Methionin gebildet<sup>13</sup> und normalerweise sofort weiter zu Cystathionin oder zurück zu Methionin umgebaut. Überschüssiges Homocystein wird aus den Zellen in das Blut exportiert, wo man einen Plasmaspiegel von etwa 10 µmol/L findet.

70 - 80 % des Plasma-Homocysteins sind an große Proteine wie Albumin gebunden; 20 - 30 % liegen als Homocystin- oder Homocystein-Cystein-Disulfide und ein geringer Anteil in freier Form vor.



**Abb. 1-2.** Die Strukturformeln der Aminosäuren Homocystein, Methionin und Cystein.

Methionin, die einzige Quelle von Homocystein, ist eine essentielle Aminosäure, von der ein Erwachsener etwa 2 g täglich mit der Nahrung (v. a. Fleisch) zu sich nimmt.<sup>29</sup> Im Körper wird daraus S-Adenosyl-Methionin (SAM) gebildet, der wichtigste Methylgruppendonator in unserem Stoffwechsel. Wenn SAM seine Methylgruppe z. B. bei der Synthese von Nukleinsäuren und Neurotransmittern abgibt, entsteht Homocystein.

Im Stoffwechsel von Homocystein werden der Remethylierungsweg, mit dem Homocystein zu Methionin umgebaut wird, und der Transsulfurierungsweg, bei dem Cystein entsteht, unterschieden (Abbildung 1-3).

Das wichtigste Enzym für die Remethylierung zu Methionin ist die Methionin-Synthase (= 5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein-Methyl-Transferase), die in allen Körperzellen vorkommt.<sup>9,59</sup> Sie benötigt Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub> als Cosubstrat bzw. Cofaktor. Auch die Betain-Homocystein-Methyl-Transferase wandelt Homocystein unter Bildung von Dimethylglycylglycin in Methionin um. Da diese Reaktion aber nur in der Leber stattfindet, und ihre Aktivität auch bei hohem Substratangebot kaum steigt, spielt sie im Homocysteinstoffwechsel eine untergeordnete Rolle.<sup>24</sup>

Der irreversible Abbau von Homocystein zu Cystein wird Transsulfurierung genannt. Zunächst wird mit Hilfe des Enzyms  $\beta$ -Cystathionin-Synthase (CBS) aus Homocystein und Serin Cystathionin gebildet und dieses dann zu Cystein und  $\alpha$ -Ketobutyrat hydrolysiert. Beide Reaktionen sind Vitamin-B<sub>6</sub>-abhängig.

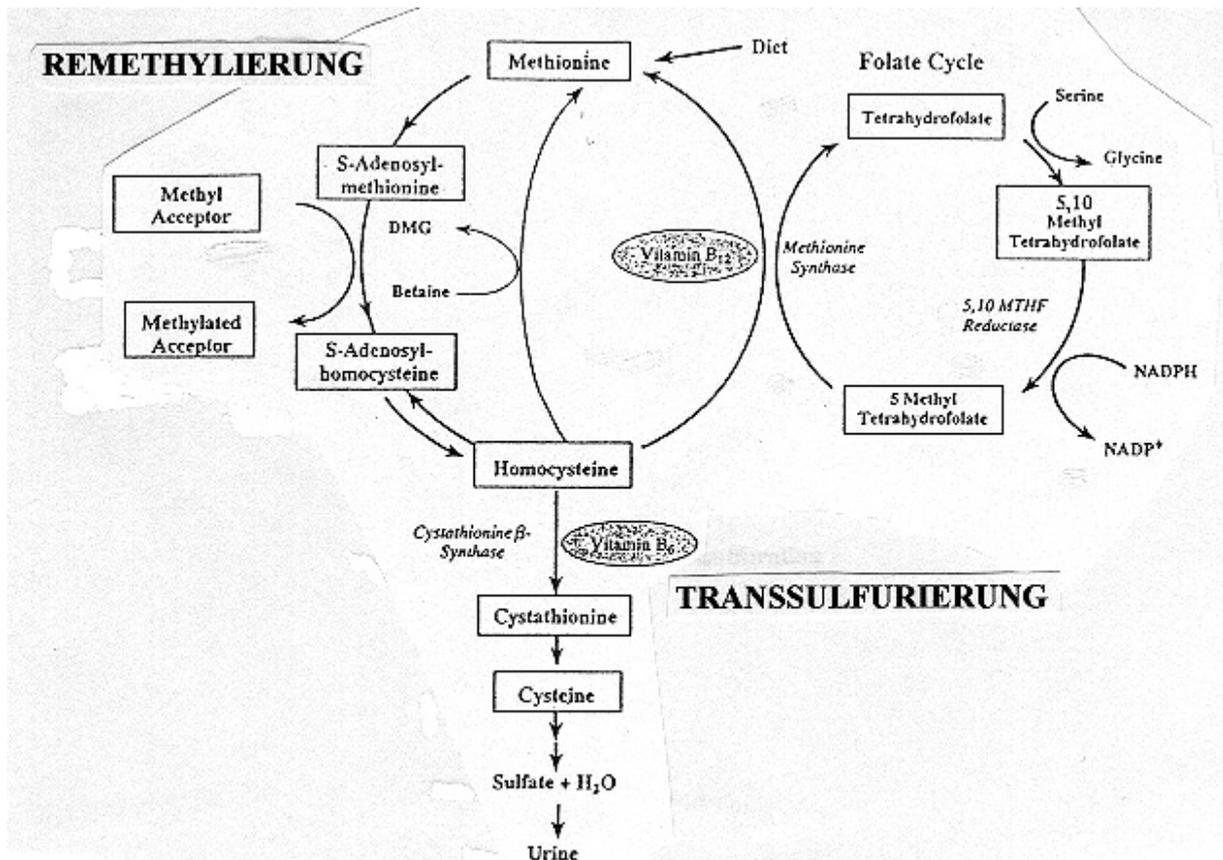


Abb. 1-3. Der Homocysteinestoffwechsel. (ergänzt aus Mayer et al.<sup>32</sup>)

Normalerweise findet die Metabolisierung von Homocystein zu etwa gleichen Teilen über den Weg der Remethylierung und der Transsulfurierung statt. Bei Methioninmangel steigt die Aktivität der Methionin-Synthase, so dass die essentielle Aminosäure Methionin vermehrt aus Homocystein regeneriert und dem Körper zur Verfügung gestellt wird.<sup>29</sup> Die Transsulfurierung dient eher der Elimination von Homocystein aus dem Körper, da das dabei entstehende überschüssige Cystein zu Sulfat oxidiert und dann über die Nieren ausgeschieden werden kann.<sup>9</sup>

Die Ursachen für eine erhöhte HomocysteinKonzentration im Blut sind aus den Stoffwechselfvorgängen abzuleiten (Abbildung 1-3). Bekannt sind bisher eine genetisch bedingte Aktivitäts-minderung der am Homocysteinmetabolismus beteiligten Enzyme ("primäre Hyperhomocysteinämie"), ein Mangel an den Cofaktoren Folsäure, Vitamin B<sub>12</sub> und B<sub>6</sub> und eine ein-geschränkte Nierenfunktion ("sekundäre Hyperhomocysteinämie"). Die Bedeutung der Nieren-funktion für den Homocysteinspiegel ist darauf zurückzuführen, dass die Reaktion der Homocystein abbauenden CBS hauptsächlich in der Niere stattfindet.<sup>9</sup>

#### 1.4 Arterioskleroseentstehung und die Rolle von Homocystein

Die morphologischen Gefäßveränderungen bei Arteriosklerose und deren histopathologischer Verlauf sind gut bekannt. Nicht vollständig geklärt ist aber die Pathogenese bzw., welche Faktoren die entscheidenden für die Entstehung einer Arteriosklerose sind.

Als Grundmodell hat sich die "Response to injury"-Hypothese durchgesetzt. Diese besagt, dass am Anfang der Atherogenese eine Schädigung des Gefäßendothels durch mechanische, immunologische, toxische oder entzündliche Faktoren steht. In der Folge kommt es zur Akkumulation von Lipiden in der Gefäßintima mit Bildung von Schaumzellen und zur Immigration von Entzündungszellen aus dem Blut und glatten Muskelzellen aus der Media. Das überschießende Wachstum der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand und die Bildung von Grundsubstanz, die schließlich verkalkt, führen zur Entstehung arteriosklerotischer Plaques. An die veränderte Gefäßoberfläche lagern sich Thrombozyten an und bilden Thromben, die das Gefäßlumen weiter einengen. Am Ende steht der Gefäßverschluss durch Plaqueruptur, Thrombose oder Embolie.

Das "Response to injury"-Modell integriert viele der bisher bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren, z. B. oxidiertes LDL oder neuerdings Chlamydien, als gefäßschädigende, Arteriosklerose auslösende Noxen. Man weiß heute, dass auch immunologische Reaktionen, Wachstumsfaktoren (z. B. PDGF) sowie monoklonales Wachstum bei der Entstehung und Progression der Arteriosklerose eine wichtige Rolle spielen.

Die "homocysteine theory of arteriosclerosis" von McCully<sup>33</sup> besagt lediglich, dass die morphologischen Gefäßveränderungen bei Hyperhomocysteinämie denen altersbedingter oder sonstiger Arteriosklerose entsprechen. Der Mechanismus, über den Homocystein arteriosklerose- bzw. thrombosefördernd wirkt, ist aber noch weitgehend unbekannt.

Experimentell wurde eine direkt toxische Wirkung von Homocystein auf kultivierte Endothelzellen nachgewiesen, wahrscheinlich über die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>33</sup> Allerdings wurden für diese Versuche sehr hohe Dosen Homocystein verwendet, obwohl ja gerade auch die moderate Hyperhomocysteinämie als Arteriosklerose-Risikofaktor gilt.<sup>5</sup>

McCully<sup>33,34</sup> konnte zeigen, dass Homocystein die Oxidation von Lipiden und damit deren vermehrte Aufnahme in Makrophagen fördert. Bei hypercholesterinämischen Patienten fand er Homocystein-LDL-Aggregate, über die Homocystein möglicherweise in die Gefäßwand eingeschleust wird, wo es dann oxidative und andere Prozesse beeinflussen könnte. McCully macht das Homocystein-Thiolacton, ein reaktives Intermediärprodukt, für die oxidative Wirkung von Homocystein verantwortlich, z. B. für intrazelluläre Radikalenbildung,

Oxidation von LDL oder abnorme Sulfurierung der Proteoglykane in der Grundsubstanz.

Es konnte gezeigt werden, dass Homocystein die Thrombomodulinexpression auf der Endotheloberfläche und die Aktivierung des antikoagulatorisch wirkenden Protein C hemmt und dadurch auch thrombogen wirkt.<sup>5</sup> Außerdem soll es die Bindung von Lp(a) an Fibrin begünstigen, wodurch die plasminogenvermittelte Fibrinolyse behindert wird.<sup>19</sup>

Trotz dieser und zahlreicher weiterer Einzelergebnisse gibt es insgesamt noch keine schlüssige Vorstellung darüber, wie erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Blut die Entstehung und Progression der Arteriosklerose beeinflussen.

## **1.5 Gendefekte mit Auswirkung auf den Homocysteinstoffwechsel**

Klinische Bedeutung haben hauptsächlich Mutationen der beiden Gene, die die  $\beta$ -Cystathionin-Synthase und die Methylenetetrahydrofolatreduktase codieren (Abbildung 1-3).

Andere seltene Gendefekte mit Auswirkung auf die Homocysteinkonzentration im Blut betreffen Enzyme des Vitamin-B<sub>12</sub>-Stoffwechsels.<sup>5</sup>

### **1.5.1 $\beta$ -Cystathionin-Synthase (CBS)**

Die CBS ist ein Enzym des Transsulfurierungsweges. Wie aus Abbildung 1-3 zu entnehmen ist, reichern sich bei einem Enzymmangel Homocystein und Methionin an, während die Cysteinkonzentration vermindert ist.<sup>63</sup> Das Gen für dieses Enzym liegt auf Chromosom 21. Bisher sind 17 verschiedene Mutationen beschrieben worden,<sup>28</sup> die in Abhängigkeit von der Residualaktivität des Enzyms und der daraus resultierenden Homocysteinkonzentration unterschiedlich schwer ausgeprägte Krankheitsbilder zur Folge haben.

Der homozygot vererbte schwere Enzymmangel ist Ursache für die klassische Homocystinurie, die mit einer Prävalenz von 1 : 332 000<sup>29</sup> auftritt und meist schon in jungen Jahren zum Tode führt.

Ob auch der heterozygot vererbte CBS-Defekt, der mit einer Häufigkeit von 0,3 % in der Gesamtbevölkerung gefunden wird,<sup>29</sup> klinische Bedeutung hat, ist umstritten.<sup>28,34</sup> Die Homocysteinwerte sind dabei lediglich postprandial bzw. nach oraler Methioningabe erhöht, nicht aber im Nüchternblut, da der Transsulfurierungsweg und damit die CBS nur bei hohen

Methioninspiegeln aktiviert wird. Als Methionin-Belastungstest macht man sich diesen Umstand diagnostisch zunutze. Bei einem positiven Testergebnis spricht man von PML- (post-methionine load-) Hyperhomocysteinämie.<sup>8</sup>

Da die CBS Vitamin-B<sub>6</sub>-abhängig ist, versucht man therapeutisch den Enzymmangel durch Vitamin-B<sub>6</sub>-Substitution zu kompensieren. Es ist bekannt, dass es unter den Patienten mit klassischer Homocystinurie Vitamin-B<sub>6</sub>-Responder und -Nonresponder gibt, je nachdem, ob sich ihr Homocysteinspiegel durch Vitaminsubstitution senken lässt oder nicht. Das Ansprechen auf Vitamin B<sub>6</sub> scheint genetisch verankert zu sein, also vom Mutationstyp abzuhängen.<sup>50,63</sup> Die Vitamin-Responder, etwa die Hälfte der Betroffenen,<sup>29,63</sup> haben eine mildere Symptomatik und sind außerdem durch Vitamingabe therapierbar, so dass ihre Prognose besser ist als die der Nonresponder.<sup>50</sup>

### 1.5.2 Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR)

Die MTHFR ist ein Enzym des Folsäurestoffwechsels und hat somit bei der folatabhängigen Remethylierung von Homocystein zu Methionin eine zwar indirekte aber wichtige Funktion. Auch hier lassen sich schwere und leichte Formen des genetisch bedingten Enzymmangels unterscheiden.

Für den schweren MTHFR-Mangel, bei dem die restliche Enzymaktivität nur 0 - 20 % beträgt, kennt man bisher neun Mutationen.<sup>28</sup> Er tritt sehr selten auf, ruft dann aber die schwerste Form der Homocystinurie hervor.<sup>16</sup>

Große epidemiologische Bedeutung hat dagegen die thermolabile Variante der MTHFR, die 1988 erstmals von Kang et al. beschrieben wurde. 1995 wiesen Frosst et al.<sup>28</sup> die dafür verantwortliche Punktmutation nach (C677T), durch die im Enzym die Aminosäure Alanin durch Valin ersetzt wird.

Dieser in rezessivem Erbgang weitergegebene Gendefekt bewirkt eine Verminderung der Enzymaktivität um mehr als die Hälfte,<sup>16</sup> was sich in moderat erhöhten Homocysteinwerten äußert. Mit einer Prävalenz in der Gesamtbevölkerung von 4 - 10 % soll er die häufigste genetisch bedingte Ursache der milden Hyperhomocysteinämie sein.<sup>56</sup> Seine Verbreitung ist regional sehr unterschiedlich und schwankt zwischen 1,4 und 15 %.<sup>5</sup>

Kluijtmans et al.<sup>28</sup> errechneten für homozygote Träger der thermolabilen MTHFR-Variante ein dreifach erhöhtes Risiko, bereits in jungen Jahren eine arteriosklerotische

Gefäßerkrankung zu entwickeln.

## **1.6 Klinische Bedeutung von Vitaminen im Homocysteinestoffwechsel**

Im Stoffwechsel von Homocystein spielen die Vitamine Folsäure, B<sub>12</sub> und B<sub>6</sub> eine große Rolle (Abbildung 1-3). Selhub et al.,<sup>49</sup> die Untersuchungen an 1160 Mitgliedern der Framingham-Population durchführten, machten für zwei Drittel der gefundenen Hyperhomocysteinämiefälle einen Mangel an einem oder mehreren dieser Vitamine verantwortlich.

### **1.6.1 Die im Stoffwechsel von Homocystein relevanten Vitamine:**

#### **Folsäure, Vitamin B<sub>12</sub> und Vitamin B<sub>6</sub>**

##### **Folsäure**

Die Folsäure ist für die Remethylierung von Homocystein zu Methionin als Methylgruppendonor nötig.

Auf die Homocysteinkonzentration im Blut hat sie unter den drei Vitaminen den stärksten Einfluss.<sup>10,49,58</sup> Dabei scheinen die bisher als normal angesehenen Serumkonzentrationen bzw. die von der WHO empfohlene tägliche Einnahmemenge (RDA = recommended daily allowance) von 200 µg nicht auszureichen, um den Homocysteinspiegel im Normbereich zu halten.<sup>49</sup> In seiner Metaanalyse aus 27 Studien ermittelten Boushey et al.<sup>10</sup> einen Tagesbedarf von 400 µg.

Hinsichtlich der Bedeutung des Vitamins Folsäure für die Hyperhomocysteinämie sind zwei Aspekte wichtig:

Erstens ist ein Mangel an diesem Raffinationsprozessen gegenüber empfindlichen Vitamin in der Bevölkerung mit etwa 50 % sehr verbreitet, was dazu geführt hat, dass in Amerika Nahrungsmittel mit Folsäure angereichert werden, weil ein Folatmangel auch Neuralrohrdefekte bei Neugeborenen verursachen kann.<sup>10,36</sup>

Zweitens gibt die Folsäure bei Vorliegen der thermolabilen Variante der MTHFR den Ausschlag, ob dieser Gendefekt phänotypisch überhaupt manifest wird. MTHFR-

Homozygote, deren Folsäurespiegel hoch ist, haben trotz einer um 50 %<sup>16</sup> verminderten Enzymaktivität normale Homocysteinwerte. Sie sind dafür allerdings auf eine höhere Folatzufuhr angewiesen als die Normalbevölkerung.<sup>26</sup>

### **Vitamin B<sub>12</sub>**

Vitamin B<sub>12</sub> dient ebenfalls bei der Remethylierung als Cofaktor. Die Abhängigkeit der Homo-cysteinKonzentration vom Vitamin-B<sub>12</sub>-Spiegel im Blut ist aber nicht so ausgeprägt wie die von der Folsäure.<sup>10,49,58</sup>

Hauptursache eines Vitamin-B<sub>12</sub>-Mangels ist die atrophische Gastritis und der damit verbundene Mangel an Intrinsic-Faktor, der für die Resorption von Vitamin B<sub>12</sub> im Dünndarm nötig ist. Besonders ältere Menschen sind hiervon betroffen.

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

Vitamin B<sub>6</sub> ist Cofaktor bei der Transsulfurierung, durch die Homocystein zu Cystein abgebaut wird.

Seine Bedeutung für die klassische Homocystinurie ist groß, da das Ansprechen auf Vitamin-B<sub>6</sub>-Substitution der entscheidende prognostische Faktor ist (siehe 1.5.1).

Bei der moderaten Hyperhomocysteinämie ist Vitamin B<sub>6</sub> wohl nur für die postprandiale Form, die mit dem Methionin-Belastungstest nachgewiesen wird, wichtig.<sup>5,58</sup> Selhub et al.<sup>49</sup> fanden allerdings auch bei der Nüchtern-Hyperhomocysteinämie einen starken Einfluss von Vitamin B<sub>6</sub>. Hier könnte es epidemiologisch wichtig sein, dass Nikotin ein Vitamin-B<sub>6</sub>-Antagonist ist,<sup>34</sup> und Rauchen deshalb zu erhöhten Homocysteinwerten beitragen könnte.

### 1.6.2 Therapie der Hyperhomocysteinämie

Die Therapie der Hyperhomocysteinämie gleich welcher Ursache erfolgt mit den Vitaminen Folsäure, B<sub>12</sub> und B<sub>6</sub>. Bei den genetisch bedingten Enzymdefekten sollen durch die Gabe von Cofaktoren der Enzymmangel kompensiert bzw. durch Substitution von bestimmten Substanzen andere, Homocystein abbauende Stoffwechselwege aktiviert werden.

Die Behandlung der homozygot vererbten klassischen Homocystinurie (CBS-Defekt) erfolgt deshalb mit Vitamin B<sub>6</sub>. Patienten mit der Vitamin-B<sub>6</sub>-refraktären Form der Homocystinurie erhalten zusätzlich Betain und Folsäure und müssen außerdem methioninhaltige Lebensmittel meiden. Ob der heterozygot vererbte CBS-Defekt bzw. die PML-Hyperhomocysteinämie überhaupt therapiert werden müssen, ist noch unklar, empfohlen werden jedoch im Augenblick 100 mg Vitamin B<sub>6</sub> als Tagesdosis.<sup>58</sup>

Mit Folsäure können die Genträger der thermolabilen Variante der MTHFR und Dialysepatienten erfolgreich behandelt werden. Die derzeit üblichen Dosen liegen zwischen 400 µg<sup>10</sup> und 5 mg<sup>9,29</sup> pro Tag.

In einer plazebokontrollierten Studie zur Therapie der moderaten Hyperhomocysteinämie untersuchten Ubbink et al.,<sup>58</sup> welche Wirkung die Vitamine Folsäure, B<sub>12</sub> und B<sub>6</sub> einzeln oder in Kombination auf die Homocysteinkonzentration im Blut haben. Sie substituierten dazu sechs Wochen lang je 20 hyperhomocysteinämische Personen mit täglich einer Tablette Plazebo, Folsäure (0,65 mg), Vitamin B<sub>12</sub> (0,4 mg), Vitamin B<sub>6</sub> (12,2 mg) oder einer Kombination aus allen drei Vitaminen. Es zeigte sich, dass die Kombinationstherapie die Homocysteinkonzentration am effektivsten (bei 50 % der Untersuchten) senkte. Die Einnahme von Folsäure allein war aber fast ebenso wirksam (Senkung bei 42 %), während die Monotherapie mit Vitamin B<sub>12</sub> oder B<sub>6</sub> nur wenig oder keinen Einfluss auf den Plasmaspiegel von Homocystein hatte.

Die Autoren raten deshalb für die Behandlung der moderaten Hyperhomocysteinämie zu einer Kombinationstherapie von Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub>, wobei das Vitamin Folsäure die homocysteinwirksame Substanz ist, während Vitamin B<sub>12</sub> wegen seiner Wechselwirkungen mit dem Folathaushalt gegeben wird. So ist einerseits Vitamin B<sub>12</sub> notwendig, um die Folsäure in ihre wirksame Form Tetrahydrofolsäure umzuwandeln, weswegen ein Vitamin-B<sub>12</sub>-Mangel zu einem sekundären Folsäuremangel führt. Andererseits birgt die isolierte Folatsubstitution die Gefahr, dass die hämatologische Manifestation eines Vitamin-B<sub>12</sub>-Mangels (perniziöse Anämie) verschleiert und dieser in der Folge nicht erkannt wird. Als Tagesdosis werden von Ubbink et al.<sup>58</sup> 650 µg Folat (3,25fache RDA) und 400 µg Vitamin B<sub>12</sub> (200fache RDA) -

eine Dosis, die einen Mangel an Intrinsic-Faktor kompensiert - empfohlen.

Die Normalisierung der Homocysteinwerte nach Beginn der Substitutionstherapie erfolgt rasch. Joosten et al.<sup>27</sup> schreiben, dass der optimale Effekt am zwölften Tag erreicht sei. Ubbink et al.<sup>58</sup> substituierten ihre Probanden sechs Wochen lang.

Es ist aber zu bedenken, dass Vitamin B<sub>12</sub> ein "Speichervitamin" ist, dessen Mangel zwar erst spät manifest wird, dann aber auf eine schwerwiegende Verarmung des Körpers an diesem Stoff hinweist. Bei einem Vitamin-B<sub>12</sub>-Defizit ist also über einen längeren Zeitraum zu substituieren.

Ist ein Gendefekt Ursache der Hyperhomocysteinämie müssen die Vitamine lebenslang eingenommen werden, um die Homocysteinkonzentration im Normbereich zu halten.

### 1.6.3 Prophylaxe der Hyperhomocysteinämie

Das wichtigste Vitamin für die Prophylaxe der Hyperhomocysteinämie in der Allgemeinbevölkerung ist die Folsäure. 1996 wurde auch ein von Homocystein unabhängiger Zusammenhang zwischen Folatmangel und KHK-Mortalität festgestellt,<sup>36</sup> was die epidemiologische Bedeutung einer ausreichenden Versorgung der Bevölkerung mit diesem Vitamin bestätigt.

Es gibt drei Ansatzpunkte, wie einem Folsäuredefizit vorgebeugt werden kann:

Eine Möglichkeit ist die Anreicherung von Nahrungsmitteln mit Folsäure, wie sie in den USA schon praktiziert wird.<sup>10,34,36</sup> Die Folataufnahme wird dadurch um maximal 100 µg pro Tag gesteigert,<sup>55</sup> was einem Viertel der benötigten Menge entspricht (vgl. 1.6.1).

Desweiteren können Vitamine als Tabletten in kalkulierbarer Dosis und optimal resorbierbarer Darreichungsform zugeführt werden.

Natürlich kann die Folsäureaufnahme auch durch bestimmte Nahrungsmittel gesteigert werden. Wichtig sind dabei frisches Obst und Gemüse, da das Vitamin hitzeempfindlich ist und bei der Aufbereitung vieler Lebensmittel zerstört wird.<sup>34</sup>

Boushey et al.<sup>10</sup> kamen beim Vergleich dieser drei Möglichkeiten zu dem Schluss, dass die Anreicherung von Lebensmitteln mit Folsäure die potenziell größte Wirkung hat, weil damit die gesamte Bevölkerung erreicht werden kann.

Die Prophylaxe und Therapie der Hyperhomocysteinämie mit Vitaminen ist billig und nebenwirkungsarm. Es fehlt allerdings noch der Nachweis, dass die damit erreichte Senkung des

Homocysteinspiegels das Risiko, eine Arteriosklerose zu entwickeln, tatsächlich vermindert.

### 1.7 Klinisch-chemische Methoden zur Homocysteinbestimmung

Die Erstbeschreiber der Homocystinurie<sup>11,15</sup> hatten die Aminosäure 1962 mit dem Natriumcyanidnitroprussidtest (qualitativ) und mit Ionenaustauschchromatografie<sup>52</sup> (quantitativ) im Urin bestimmt. Diese Methoden waren aber wenig sensitiv. Niedrige Konzentrationen, wie man sie man bei Gesunden findet, konnten erst Ende der 70er Jahre mit Aminosäure-Analysern gemessen werden, zunächst nur nach Methioninbelastung,<sup>62</sup> seit 1978 auch im Nüchternblut.<sup>18</sup>

1985 stellte Refsum einen radioenzymatischen Assay vor, der einen Reduktionsschritt bei der Aufarbeitung der Proben beinhaltet.<sup>45</sup> Damit konnte nun das gesamte, die Summe aus protein-gebundenem, in Disulfidform vorliegendem und freiem Homocystein bestimmt werden, während vorher nur das als Disulfid gebundene und das freie Homocystein - die kleinere im Plasma enthaltene Fraktion - erfasst worden waren. Diese Methode stellte einen großen Fortschritt dar, weil die Homocysteinbestimmung damit sensitiver und verlässlicher wurde und Umverteilungsvorgänge im Plasma das Ergebnis nicht mehr beeinflussen konnten (vgl. 1.8).

Seitdem sind verschiedene Verfahren entwickelt worden, die nicht nur die präzise Messung von moderat erhöhten Homocysteinkonzentrationen erlauben, sondern auch wesentlich einfacher in der Handhabung als die alten Methoden sind. Erst durch diese Verbesserungen in der Analytik wurde es möglich, große Studien zuverlässig durchzuführen.

Die bisher veröffentlichten Verfahren arbeiten mit radioenzymatischen Assays,<sup>45</sup> Aminosäure-Analysern,<sup>2</sup> Gaschromatografie/Massenspektrometrie (GC/MS)<sup>53</sup> und Hochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC) mit elektrochemischer (ED)<sup>30</sup> oder Fluoreszenzdetektion (FD).<sup>6,12,13,25,57,61</sup> Seit 1996 ist auch ein vollautomatischer Immunoassay auf dem Markt.<sup>51</sup>

Am häufigsten werden derzeit HPLC-Methoden verwendet.<sup>13</sup> Als Derivatisierungsreagenzien für die Fluoreszenzdetektion haben sich Bromobiman,<sup>25</sup> SBD-F (7-Fluor-benzofurazan-4-sulfonsäure Ammoniumsalz)<sup>22</sup> und ABD-F (4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate)<sup>59</sup> durchgesetzt.

Thiolverbindungen, die mit Bromobiman oder SBD-F umgesetzt wurden, weisen eine hohe

Fluoreszenz auf und ermöglichen so die sensitive Bestimmung von Homocystein mit einem Detektionslimit von etwa 0,5  $\mu\text{mol/L}$  Plasma. Mit beiden Farbstoffen ist neben Homocystein auch die Erfassung anderer Sulfhydryl-haltiger Substanzen wie Cystein, Cysteinylglycin, Glutathion, Acetylcystein u. a. möglich.

Bromobiman ist bei Raumtemperatur reaktiv, so dass die Probenaufarbeitung vereinfacht und die Messung vollautomatisch durchgeführt werden kann.<sup>12</sup> Allerdings entstehen aufgrund der hohen Reaktivität auch viele Störpeaks, die durch ein aufwändiges Eluentensystem von den gewünschten Peaks abgetrennt werden müssen.<sup>25,57</sup>

SBD-F ist dagegen thiol-spezifisch und hat keine Eigenfluoreszenz, so dass bei Verwendung dieses Reagenz' mit einfacheren, isokratischen Eluentensystemen gearbeitet werden kann.<sup>13,57,61</sup> Allerdings bindet es im Gegensatz zu Bromobiman nur bei erhöhten Temperaturen in ange-messener Zeit an die SH-Gruppen (eine Stunde Inkubation bei 60 °C).

ABD-F ist zwar reaktiver und wird deswegen häufig dem SBD-F vorgezogen, doch ist es weniger SH-spezifisch und reagiert z. B. auch mit Aminen.<sup>59</sup>

## 1.8 Präanalytik

Zur Präanalytik zählen alle Veränderungen und Arbeitsschritte, die vor der eigentlichen Messung der Probe stattfinden. Dazu gehören z. B. die Vorbereitung des Patienten, die Durchführung der Blutentnahme, der Proben-transport, die Aufarbeitung und die Lagerung der Probe. Die Stabilisierung der zu messenden Parameter in den Blutproben erfolgt in der Regel durch Verwendung von Blutabnahmesystemen (Monovette®, Vacutainer®) mit bestimmten Zusätzen.

Kritische Bereiche in der präanalytischen Phase der Homocysteinbestimmung sind der Zeitraum zwischen Blutentnahme und Ankunft des Blutes im Labor und die Lagerung der für die Homocysteinbestimmung vorgesehenen Plasmaproben.

Die Stabilität der Homocysteinkonzentration in den gängigen Blutabnahmesystemen stellt ein großes Problem dar. Fiskerstrand et al.<sup>12</sup> ließen z. B. 40 Vollblutproben bei Raumtemperatur stehen und stellten dabei einen durchschnittlichen Anstieg der Homocysteinkonzentration von  $20,1 \pm 11 \%$  in vier und  $62,1 \pm 33 \%$  in 24 Stunden fest. Vester u. Rasmussen<sup>61</sup> fanden eine Zuwachsrate von etwa 10 % pro Stunde.

Stabil sind dagegen sowohl Vollblut auf Eis für etwa vier Stunden<sup>12</sup> als auch abpipettiertes

Plasma für mindestens 24 Stunden.<sup>61</sup>

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf der „International Conference on Homocysteine Metabolism“ in Irland 1995<sup>23</sup> das folgende - aufwändige - Blutabnahmeverfahren als Standard festgesetzt:

Die Entnahme und der Transport des für die Homocysteinbestimmung vorgesehenen (EDTA-) Blutes erfolgen auf Eis. Innerhalb einer Stunde ist die Probe zu zentrifugieren und das Plasma von den Blutzellen zu trennen. Dieses kann dann innerhalb von 24 Stunden (s.o.) aufgearbeitet oder zur späteren Messung eingefroren werden.

Die Homocysteinkonzentration in tiefgefrorenem Plasma ist Monate bis Jahre<sup>59</sup> stabil, selbst wenn die Probe mehrmals aufgetaut wird.<sup>61</sup>

Während der Lagerung der Plasmaproben finden aber Umverteilungsvorgänge statt, die dazu führen, dass die eiweißgebundene Fraktion mit der Dauer der Lagerung größer wird,<sup>59</sup> während die Konzentration des freien und des als Disulfid vorliegenden Homocysteins abnimmt. Nur die Summe der drei Formen, die nach einem Reduktionsschritt gemessen wird, liefert also konstante und vergleichbare Werte. Als Abkürzung für diese Gesamtfraktion, deren Bestimmung inzwischen die Regel ist, wird „tHcy“ verwendet.<sup>46</sup>

## 2 PROBLEMSTELLUNG

Grundlage der Arteriosklerose-Diagnostik ist bislang neben der Eigenanamnese (Rauchen, Stress, Bewegungsmangel), der Familienanamnese und der klinischen Untersuchung (Arcus lipoides, Blutdruck, Adipositas) hauptsächlich die Abklärung des Glucose- und des Fettstoffwechsels (LDL- und HDL-Cholesterin, Triglyceride, Lp(a)). Bei unklaren Fällen muss auch die Schilddrüsenfunktion untersucht und - besonders bei jungen Patienten - an Gerinnungsstörungen und Vaskulitiden gedacht werden.

In den letzten Jahren haben mehrere große Studien wie z. B. die Physicians' Health Study<sup>54</sup> (1992) und das European Concerted Action Project<sup>17</sup> (1997) den Zusammenhang zwischen moderat erhöhten Homocysteinkonzentrationen im Blut und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen belegt. Sie haben zudem gezeigt, dass der Einfluss von Homocystein unabhängig von dem anderer Risikofaktoren ist. Eine Hyperhomocysteinämie soll für fast 10 % der Fälle koronarer Herzkrankheit verantwortlich sein.<sup>54</sup>

Die Homocysteinbestimmung muss nun in die diagnostischen Maßnahmen, die bei Verdacht auf Arteriosklerose durchgeführt werden, Eingang finden.

Mit der Zielsetzung, ein zuverlässiges und robustes Verfahren für die Routine-Diagnostik bereitzustellen, wurde im Rahmen dieser Dissertation eine HPLC-Methode zur Bestimmung von Homocystein im Blut etabliert.

Für die daran anschließende klinische Evaluierung der Messgröße Homocystein wurde ein ausgewähltes Patientenkollektiv aus der Gefäßchirurgie und Kardiologie einem gefäßgesunden Referenzkollektiv gegenübergestellt. Mit Hilfe der Daten sollte ein Referenzbereich festgelegt und ein sinnvolles Schema der klinisch-chemischen Parameter zusammengestellt werden, die im Zusammenhang mit der Homocysteinbestimmung für die Interpretation der Ergebnisse nötig sind.

Die klinische Erprobung sollte auch dazu dienen, präanalytische Probleme der Homocysteinbestimmung, z. B. beim Probentransport und der -lagerung, zu ermitteln und rechtzeitig zu lösen, um Homocystein schließlich als verlässlichen Parameter in die Arteriosklerose-Diagnostik am Klinikum rechts der Isar einführen zu können.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Analytischer Teil

#### 3.1.1 Reagenzien

DL-Homocystein (2-Amino-4-mercaptobutyrssäure), L-Cystein, HFBA (Heptafluorbutyrssäure) und Bromobiman wurden von Sigma Chemical Co. (G-Deisenhofen) bezogen.

7-Fluor-benzofurazan-4-sulfonsäure Ammoniumsalz (SBD-F), N-(2-Mercaptopropionyl)-glycin, Tributylphosphin, N,N-Dimethylformamid, Natriumacetat wasserfrei, Eisessig puriss., Methanol und N-Acetyl-L-cystein waren von Fluka Chemie AG (G-Deisenhofen).

EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat), Borsäure krist. ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), KOH-Plättchen, Perchlorsäure ( $\text{HClO}_4$  70-72 %) und Ethanol (96 % reinst) wurden von Merck AG (G-Darmstadt) geliefert.

#### 3.1.2 HPLC

Die Messungen wurden mit einem Merck Hitachi-System durchgeführt (Pumpe L-6200, LC Controller L-5000, Fluoreszenzdetektor F-1080, Autosampler AS-2000A, Interface D-6000).

Die HPLC-Säule war eine C18-Reversed-Phase-Säule (Merck LiCrospher 100 RP-18;  $4 \times 125$  mm; 5- $\mu\text{m}$ -Partikel) und wurde durch eine Vorsäule (LiChroCART 4-4 von Merck) geschützt.

Die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Extinktionswellenlänge von 385 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 nm gemessen.

Die Peakflächen wurden mit dem HPLC-Manager von Merck aufgezeichnet und quantifiziert. Eluent A war ein Essigsäurepuffer mit Methanolanteil (pH-Wert 4,2). 750 mL 0,1 M Essigsäure wurden mit 300 mL 0,1 M Natriumacetat-Lösung und 25 mL Methanol gemischt und anschließend durch einen 0,2- $\mu\text{m}$ -Sartolon(Polyamid)-Filter (Sartorius AG, G-Göttingen)

filtriert. Eluent B war Methanol. Beide Fließmittel wurden mit Helium entgast.

Das Gradientenprogramm begann mit 100 % Eluent A, reduzierte diesen in drei Minuten auf 92 % und in weiteren zwei Minuten auf 85 %, um dann bis zur achten Minute linear zu 100 % Eluent A zurückzukehren. Die Flussrate betrug 0,9 mL/min und die Laufzeit 15 Minuten.

### 3.1.3 Probengewinnung

Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen (EDTA-S-Monovetten® KE von Sarstedt, G-Nümbrecht) abgenommen, möglichst schnell auf Eis gelegt und innerhalb einer Stunde bei 3000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Plasma wurde sofort abpipettiert und bei - 70 °C eingefroren.

Die Probanden mussten für die Blutabnahme nicht nüchtern sein.

### 3.1.4 Probenaufarbeitung

#### 3.1.4.1 Herstellung der Lösungen

2 M Kaliumborat-Puffer: 12,4 g  $H_3BO_3$  und 11,2 g KOH wurden in jeweils 100 mL Wasser gelöst. Zwei  $H_3BO_3$ -Lösungen wurden mit der KOH-Lösung auf pH 9,5 bzw. 10,5 eingestellt. Anschließend wurden die Puffer mit 186 mg EDTA/100 mL Puffer (= 5 mM) versetzt.

0,1 M Kaliumborat-Puffer: 309 mg  $H_3BO_3$  und 281 mg KOH wurden in je 50 mL Wasser gelöst, wie oben beschrieben auf pH 9,5 eingestellt und dann mit 74,5 mg EDTA/100 mL Puffer (= 2 mM) versetzt.

0,75 M Perchlorsäure: 6,4 mL  $HClO_4$  (71 %) wurden zu 100 mL Wasser gegeben und mit 37,2 mg EDTA/100 mL Lösung (= 1 mM) versetzt.

Tri-n-butyl-phosphin in Dimethylformamid: 2,95 mL Tri-n-butyl-phosphin wurden mit 25 mL Dimethylformamid gemischt.

SBD-F: 15 mg 7-Fluor-benzofurazan-4-sulfonsäure Ammoniumsalz wurden in 10 mL 2 M Kaliumborat-Puffer (pH 9,5) gelöst (= 6,4 mM).

Interner Standard: 3,26 mg N-(2-Mercaptopropionyl)-glycin wurden in 100 mL 0,1 M Kaliumborat-Puffer gelöst (= 0,2 mM).

Homocystein-Standardlösung: 135,2 mg Homocystein wurden in 100 mL 5 mM EDTA-Lösung (pH 7) gelöst.

### **3.1.4.2 Aufarbeitung der Proben**

Für die Probenaufarbeitung wurden zu 100 µL Plasma 20 µL N-(2-Mercaptopropionyl)-glycin als interner Standard gegeben. Anschließend wurden die Thiole 30 Minuten bei 4°C reduktiv mit 20 µL Tri-n-butyl-phosphin-Lösung aus den Protein- und Disulfidbindungen freigesetzt. Zum Ausfällen der Proteine wurde das Gemisch mit 100 µL 0,75 M Perchlorsäure versetzt, gut gemischt (Vortex) und dann fünf Minuten bei 6000 g zentrifugiert.

Vom Überstand wurden 50 µL abgenommen und mit 100 µL 2 M Kaliumborat-Puffer (pH 10,5) versetzt. Nach Zugabe von 50 µL SBD-F wurden die Proben 60 Minuten lang bei 60 °C inkubiert.

Nach dem Abkühlen wurden sie bei 6000 g drei Minuten lang zentrifugiert, um Feststoffpartikel zu entfernen. Dann wurden 100 µL des Gemisches in Merck-Autosampler-Vials überführt. 10 µL davon wurden auf die HPLC-Säule aufgetragen.

### **3.1.5 Kalibrierung**

Mit Hilfe des Standard-Additions-Verfahrens wurde eine Drei-Punkt-Eichkurve erstellt.

Dazu wurden drei Aliquots einer Plasmaprobe (je 100 µL) mit 5, 15 und 40 µL ( $\equiv$  5, 15, 40 µmol/L) der Homocystein-Standardlösung aufgestockt.

Mit den bekannten Konzentrationen der Standardlösungen und dem Verhältnis der Peakflächen von Homocystein und internem Standard wurde eine lineare Regressionsgerade erstellt. Nachdem der Achsabschnitt manuell auf Null gesetzt worden war, berechnete das

Auswertungsprogramm aus der Steigung der Geraden und dem Verhältnis der Peakflächen von Homocystein und internem Standard in den Proben die Homocysteinkonzentration.

### 3.1.6 Leistungsdaten der HPLC-Methode

#### (Präzision, Richtigkeit, Linearität, Sensitivität)

Intravial-Präzision: Eine Probe wurde wiederholt ( $n = 10$ ) injiziert.

Intraassay-Präzision: Eine Probe wurde zehnmal aufgearbeitet und im gleichen HPLC-Lauf vermessen.

Interassay-Präzision: Diese wurde für einen hohen ( $28,2 \pm 3,3 \mu\text{mol/L}$ ) und einen niedrigen ( $12,2 \pm 1,4 \mu\text{mol/L}$ ) Bereich mit jeweils 21 Proben bestimmt. Dafür wurden zwei Pools gemischt, aliquotiert eingefroren und über einen Zeitraum von zehn Monaten in jedem Lauf mitgemessen.

Richtigkeit: Es wurden externe Kontrollen von Chromsystems (Chromsystems Homocystein Plasma Control Level) für zwei Bereiche ( $6,7 - 10,1 \mu\text{mol/L}$  und  $16,2 - 24,3 \mu\text{mol/L}$ ) eingesetzt.

Linearität: Diese wurde mit der Homocystein-Standardlösung ( $5, 10, 20, 40$  und  $80 \mu\text{mol/L}$ ) und mit aufgestockten Plasmaproben ( $5, 10, 20$  und  $40 \mu\text{mol/L}$ ) geprüft.

Detektionslimit (Sensitivität): Hierzu wurde ebenfalls die Homocystein-Standardlösung verwendet.

### 3.1.7 Andere Methoden

Serumkreatinin, Cholesterin und Triglyceride wurden mit Standardmethoden gemessen (Hitachi 747 Boehringer Mannheim). Die Bestimmung von Serumfolat und -Vitamin B<sub>12</sub> erfolgte mit einem automatisierten Lumineszenz-Immunoassay (Access Beckman Instruments GmbH). Für die Messung von Lipoprotein(a) (Lp(a)) wurde der Behring Nephelometer Analyser (BNA) verwendet.

Die Referenzbereiche sind für Kreatinin 0,7 - 1,3 mg/dL (Männer) bzw. 0,5 - 1,1 mg/dL (Frauen), für Folat 3 - 17 ng/mL, für Vitamin B<sub>12</sub> 200 - 950 pg/mL, für Cholesterin 150 - 240 mg/dL, für Triglyceride 70 - 200 mg/dL und für Lp(a) < 30 mg/dL.

## 3.2 Stabilität der Homocysteinkonzentration in vitro

Zahlreiche Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass die Blutproben für die Homocysteinbestimmung auf Eis abzunehmen sind, weil die Homocysteinkonzentration in EDTA-Blut oder Serum bei Raumtemperatur nicht stabil ist. Um Klarheit über die dabei ablaufenden Prozesse zu gewinnen und Möglichkeiten für eine Verbesserung der Präanalytik zu finden, wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

### 3.2.1 Stabilität in Plasma

Zwei EDTA-Plasmaproben mit einer Ausgangskonzentration von 5 bzw. 33 µmol/L Homocystein wurden 24, 48 und 72 Stunden lang bei Raumtemperatur stehengelassen und dann erneut vermessen.

Für jeden Zeitpunkt erfolgten zwei oder drei Homocysteinbestimmungen, aus denen der Mittelwert errechnet wurde. Die Abweichung (Variationskoeffizient) betrug dabei 1 - 11 %.

Aliquots einer weiteren EDTA-Blutprobe wurden zentrifugiert, das Plasma jedoch nicht abpipettiert, sondern über den Zellen bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Homocysteinkonzentration im Plasma wurde nach 0, 1, 2 und 4 Stunden bestimmt.

### 3.2.2 Stabilität in Vollblut

Das Blut von sechs verschiedenen Personen war in EDTA-, Natrium-Fluorid (NaF)- und NaF/Heparin-Röhrchen abgenommen und sofort aliquotiert worden. Die Aliquots wurden 0, 1, 2, 3, 4 und 6 Stunden bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank stehengelassen. Nach dem entsprechenden Zeitintervall wurden die Proben zentrifugiert, das Plasma von den Zellen getrennt und die Homocysteinkonzentration im Plasma bestimmt.

In einem weiteren Versuch wurde das Blut aus den obengenannten Blutabnahmesystemen über einen Zeitraum von 0, 6, 24 und 48 Stunden aliquotiert bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach dem entsprechenden Zeitintervall wurden die Aliquots zentrifugiert und das abpipettierte Plasma bei - 30 °C eingefroren. Die Messung der Proben fand als Dreifachbestimmung in einem Lauf statt. Der Variationskoeffizient lag dabei unter 5 %.

Die EDTA-, Heparin- und NaF-Monovetten wurden von der Firma Sarstedt (G-Nümbrecht) bezogen.

Für das Natrium-Fluorid/Heparin-Abnahmesystem wurde Natrium-Fluorid (NaF) in einer Endkonzentration von 4 g/L zu Heparin-Monovetten gegeben.

### 3.2.3 Stabilität in Erythrozyten

Um den Nachweis einer intraerythrozytären Homocysteinproduktion zu führen, wurden die Erythrozyten mit 0,9-prozentiger NaCl-Lösung aus einer EDTA-Vollblutprobe herausgewaschen und dann in dieser Lösung ("intakte Erythrozyten") oder nach Lyse mit destilliertem Wasser ("lysierte Erythrozyten") aliquotiert bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach 0, 2, 4 und 6 Stunden wurden auch die intakten Erythrozyten lysiert und die jeweilige Homocystein-konzentration der Aliquots bestimmt.

### **3.3 Klinische Evaluierung der Homocysteinbestimmung**

#### **3.3.1 Patientenkollektiv**

Die Blutproben stammten von Patienten der gefäßchirurgischen und der kardiologischen Abteilung des Universitätskrankenhauses rechts der Isar in München. Sie wurden im Zeitraum vom 16.02.1996 bis 24.01.1997 (Gefäßchirurgie) bzw. vom 03.07.1996 bis 12.09.1996 (Kardiologie) gesammelt.

Es wurden nur Patienten in das Kollektiv aufgenommen, die mindestens eine der folgenden Diagnosen aufwiesen: periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) der unteren Extremität oder des Beckens, Stenose oder Verschluss der Arteria carotis, Bauch-aortenaneurysma (BAA) oder koronare Herzkrankheit (KHK).

Von den 231 aufgenommenen Patienten waren 69 Frauen und 162 Männer. Sie waren zwischen 28 und 89 Jahren alt. 121 von ihnen litten an einer pAVK, 94 an einer KHK, 76 an einer Stenose oder einem Verschluss einer oder beider Karotiden und 21 an einem BAA. 60 Patienten hatten zwei, neun hatten drei dieser Diagnosen.

Anamnestische Informationen über Vorerkrankungen und kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Adipositas, Diabetes mellitus und eine positive Familienanamnese bezüglich Gefäßkrankheiten sowie die Laborwerte für Cholesterin, Triglyceride, Lp(a) und Kreatinin wurden teilweise nachträglich aus den Akten und Anamnesebögen herausgesucht und sind nicht vollständig.

#### **3.3.2 Referenzkollektiv**

Die 44 Teilnehmer am Referenzkollektiv waren Krankenhausmitarbeiter (bzw. drei ihrer Kinder; n = 23) und Patienten der Kardiologie (n = 5), der Orthopädischen Ambulanz (n = 8) und der Urologie (n = 8).

Anamnestisch lag bei keinem ein Anhalt für Angina pectoris, Herzinfarkt, pAVK, transitorische ischämische Attacke (TIA) oder Apoplex vor. Bei den Patienten der Urologie und der Orthopädischen Ambulanz wurden die Karotiden auskultiert und die Fußpulse getastet, um eine Gefäßstenose oder einen -verschluss auszuschließen.

Die Probanden durften keine schweren oder konsumierenden Krankheiten haben. Als Ausnahme wurden zwei Patienten mit Prostata-Karzinom akzeptiert, weil ihr PSA (prostata-spezifisches Antigen) -Wert niedrig war, was auf eine geringe Aktivität ihrer Erkrankung hinweist.

Die Kreatininwerte lagen im Referenzbereich. Bei zehn Personen waren sie allerdings nicht bestimmt worden. Jedoch gab es bei diesen Probanden keinen Hinweis auf eine eingeschränkte Nierenfunktion, so dass sie ebenfalls in das Referenzkollektiv eingeschlossen wurden.

### **3.3.3 Genträger der thermolabilen MTHFR-Variante (C677T)**

Bei einem 41jährigen männlichen Teilnehmer am Referenzkollektiv war die extrem hohe Homocysteinkonzentration (bei niedrignormalem Folat) aufgefallen. Mit einer molekularbiologischen Untersuchung\*, die im selben Institut von Dr. B. Müller durchgeführt wurde, konnte bei ihm die thermolabile Variante der MTHFR (C677T) nachgewiesen werden. Der Proband nahm daraufhin verschiedene Vitamintabletten jeweils mindestens einen Monat lang ein und ließ nach einem, zwei, zehn und dreizehn Monaten seine Homocysteinwerte kontrollieren. Die Substitutionspräparate waren Folsan® (5 mg Folsäure pro Tablette), Vitamin B6-Hevert® (100 mg Pyridoxin-HCl) und Folgamma® (25 µg Cyanocobalamin und 1,5 mg Folsäure).

Die molekularbiologische Untersuchung wurde bei elf weiteren Personen mit erhöhten Homocysteinkonzentrationen im Plasma durchgeführt.

---

\* Die Punktmutation C677T wurde mit einer Kombination aus Polymerase-Ketten-Reaktion und Restriktionslängenpolymorphismus (PCR-RFLP) untersucht. Das methodische Vorgehen erfolgte wie von Frosst et al.<sup>14</sup> publiziert.

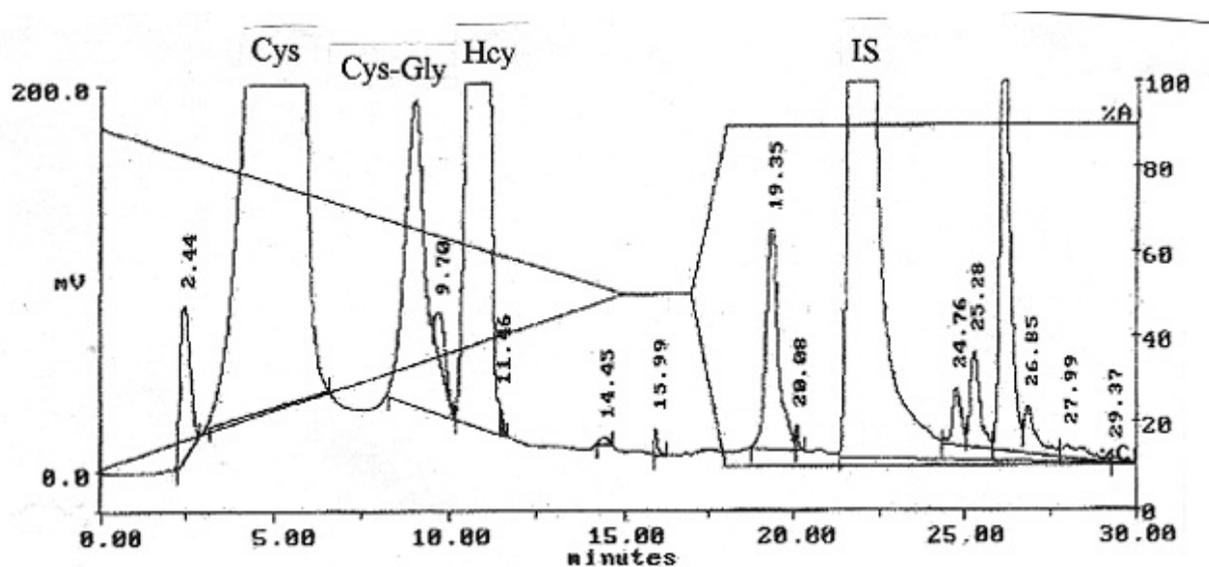
### 3.3.4 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte hauptsächlich mit dem Statistikprogramm ASTUTE für Excel (Microsoft Corporation). Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem Student-t-Test auf ihre Signifikanz geprüft. Um die Mittelwerte von mehr als zwei Kollektiven zu vergleichen, wurde der Kruskal-Wallis-Test als "One-way-ANOVA"-Modell verwendet. Der Zusammenhang verschiedener Faktoren mit der Plasmakonzentration von Homocystein wurde mit dem Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten dargestellt. Die multiple lineare Regressionsanalyse wurde mit dem statistischen Softwarepaket SPSS für Windows (Inc. SPSS) im Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München (IMSE) durchgeführt. Die unabhängigen Variablen waren Folsäure, Alter und Kreatinin, die abhängige Variable war Homocystein. Weil für die Testung eine Normalverteilung erforderlich war, wurden die Homocysteinwerte logarithmiert ( $\log_{10}$ ). Ein statistisch bedeutsamer Unterschied wurde jeweils bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $< 5\%$  angenommen.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Analytischer Teil

Zur Quantifizierung von Homocystein wurde zunächst die Methode von Jacobsen,<sup>25</sup> der mit dem Fluoreszenzreagenz Bromobiman arbeitet, auf unserer HPLC-Anlage etabliert. Mit einem abgewandelten Eluenten-Gradienten-System und einer anderen HPLC-Säule erreichten wir die Auftrennung der Substanzen Cystein, Homocystein und Cysteinylglycin (Abbildung 4-1).



**Abb. 4-1.** Chromatogramm bei Verwendung von **Bromobiman** als Fluoreszenzreagenz.

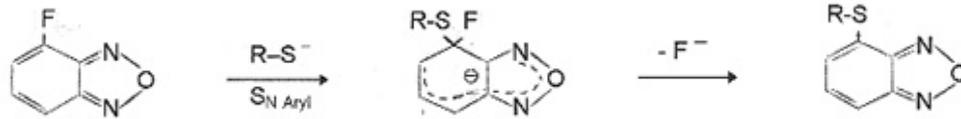
Säule: RP-C8 (2 mm)

Eluenten: Essigsäure-Methanol-Gemisch (A) und reines Methanol (C)

Der Gradient ist eingezeichnet.

**Cys** Cystein **Cys-Gly** Cysteinylglycin **Hcy** Homocystein **IS** Interner Standard  
(Gemisch aus Standardlösungen)

Wegen der zahlreichen durch Bromobiman verursachten Störpeaks wechselten wir zu dem fluoreszierenden Derivatisierungsreagenz SBD-F, das unter basischen Bedingungen thiol-spezifisch reagiert. Abbildung 4-2 zeigt das Reaktionsschema.



**Abb. 4-2.** Die Reaktion von SBD-F (7-Fluor-benzofurazan-4-sulfonsäure Ammoniumsalz) mit Thiolverbindungen.

$S_{N\text{ Aryl}}$  nukleophile Substitution eines Arylrestes  
R Rest

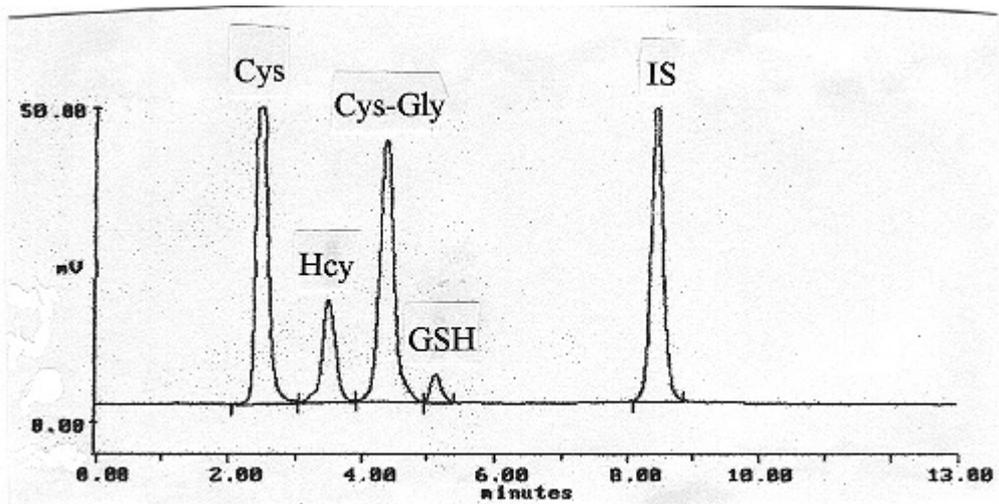
Anfangs wurde zur Auftrennung der SBD-F-Derivate ein Eluentensystem mit dem Ionenpaar-reagenz HFBA in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer und Acetonitril verwendet, mit dem die Peaks sehr gut getrennt werden konnten. Es erwies sich dabei aber als problematisch, dass die Peaks während eines Laufes immer mehr nach hinten drifteten. Dieses Phänomen war vermutlich auf eine schlechte Gleichgewichtseinstellung zwischen der HFBA und dem Säulenmaterial zurückzuführen.

Schließlich etablierten wir die Methode von Fortin u. Genest<sup>13</sup> bzw. Vester u. Rasmussen<sup>61</sup> in leicht modifizierter Form. Mit einem Acetat-Puffer als Eluent war die Trennung der Thiole Cystein, Homocystein, Cysteinylglycin, Glutathion und Mercaptopropionylglycin hier gut reproduzierbar (Abbildung 4-3).

Mit dieser Analytik wurden alle Messungen für die Stabilitätsversuche und die klinische Evaluierung der Homocysteinbestimmung durchgeführt. Jetzt wird sie routinemäßig am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar eingesetzt.

Alle Peaks sind an der Basislinie getrennt. Die Substanzen Cystein, Homocystein, Cysteinylglycin und Glutathion wurden durch den Vergleich mit Standardlösungen identifiziert. Schwefelhaltige Medikamente wie Captopril und Penicillamin werden durch die Methode nicht erfasst.

Als interner Standard können Mercaptopropionylglycin und N-Acetyl-L-Cystein verwendet werden (Abbildung 4-4). Mercaptopropionylglycin wird etwa eine halbe Minute später als Acetylcystein eluiert und ist besser geeignet, da zu diesem Zeitpunkt keine anderen fluoreszierenden Substanzen die Säule verlassen. Unter dem Acetylcystein-Peak fanden wir dagegen häufiger Störpeaks.



**Abb. 4-3.** Chromatogramm bei Verwendung von **SBD-F** als Fluoreszenzreagenz.

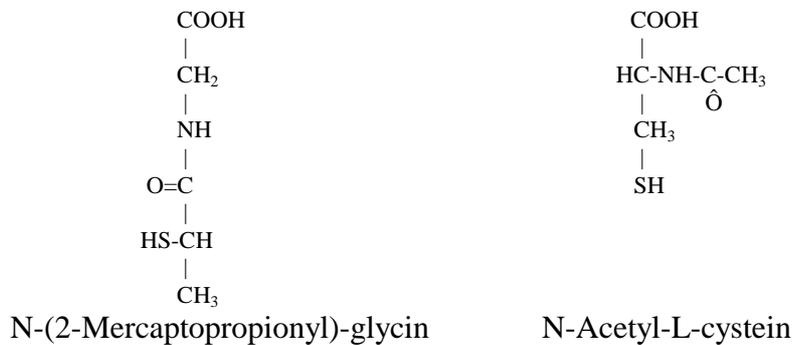
Säule: RP-C18 (4 × 125 mm)

Eluenten: Essigsäure-Methanol-Gemisch und reines Methanol

**Cys** Cystein **Cys-Gly** Cysteinylglycin **Hcy** Homocystein **GSH** Glutathion

**IS** Interner Standard (N-(2-Mercaptopropionyl)-glycin)

(Plasmaaufarbeitung)



**Abb. 4-4.** Die Strukturformeln von N-(2-Mercaptopropionyl)-glycin und Acetylcystein, die beide als interner Standard verwendet werden können.

Der Variationskoeffizient war für die Intraassaypräzision 5,8 % und für die Intravialpräzision 2,1 %. Für die Interassaypräzision betrug er im hohen Messbereich ( $28,2 \pm 3,3 \mu\text{mol/L}$ ) 7,1 % und im niedrigen ( $12,2 \pm 1,4 \mu\text{mol/L}$ ) 6,8 %.

Die Prüfung der Richtigkeit erfolgte mit externen Kontrollen. Die Werte wurden im Mittel um 9 - 11 % zu niedrig gemessen.

Die Linearität ist bei einem linearen Regressionskoeffizienten ( $r^2$ ) von 0,996 bis  $80 \mu\text{mol/L}$  Homocystein mit Standardlösungen gesichert. Mit aufgestockten Plasmaproben des hohen ( $28,2 \pm 3,3 \mu\text{mol/L}$ ) und des niedrigen ( $12,2 \pm 1,4 \mu\text{mol/L}$ ) Messbereichs wurde sie bis  $60 \mu\text{mol/L}$  geprüft ( $r^2 = 0,994$  bzw. 1,000).

Das Detektionslimit, definiert als Signal-to-Noise-Ratio  $> 3$ , liegt bei  $0,5 \mu\text{mol/L}$ .

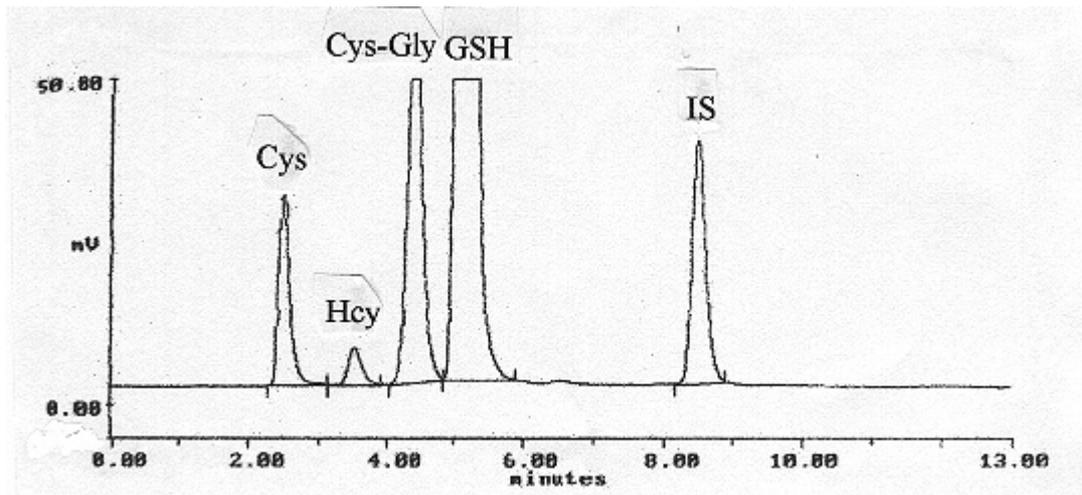
Die Drei-Punkt-Eichkurve wird vor jedem Lauf mit aufgestockten Plasmaproben neu erstellt. Homocystein-Standardlösungen können nicht zur Kalibrierung verwendet werden, da sich die Steigungen der mit Plasma bzw. Standardlösungen ermittelten Kurven durch Matrixeffekte erheblich (um etwa 40 %) unterscheiden.

Eine HPLC-Messung dauert fünfzehn Minuten. Limitiert durch die aufwändige Probenvorbereitung und die Bestückung des Autosamplers mit einer beschränkten Anzahl von Proben können in 24 Stunden etwa 50 Proben vermessen werden.

Auch die anderen Sulfhydryl-haltigen Substanzen Cystein, Cysteinylglycin und Glutathion können mit der beschriebenen Methode quantifiziert werden. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass Glutathion (Cys-Gly-Glu) unter Hitze einwirkung und durch das Enzym  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) in das Dipeptid Cysteinylglycin (Cys-Gly) und in Glutaminsäure (Glu) gespalten wird. Während diese Vorgänge bei der Bestimmung von Homocystein keine Rolle spielen, müsste für die Quantifizierung von Glutathion und Cysteinylglycin die Präanalytik noch entsprechend optimiert werden.

Die HPLC-Analytik ist nicht nur zur Messung von Homocystein im Plasma, sondern auch im lysierten Vollblut geeignet (Abbildung 4-5). Die Peaks von Cystein und Homocystein sind niedriger als im Plasma-Chromatogramm (Abbildung 4-3), da durch die freigesetzte Intrazellulärflüssigkeit eine Verdünnung stattfindet. Glutathion ist dagegen in den Erythrozyten in wesentlich höherer Konzentration als im Plasma enthalten und erzeugt im Lyse-Chromatogramm deshalb einen sehr hohen Peak.

Die Retentionszeiten der einzelnen Peaks entsprechen denen der Plasmaaufarbeitung.



**Abb. 4-5.** Chromatogramm einer lysierten Blutprobe.<sup>†</sup>

Säule: RP-C18 (4 × 125 mm)

Eluenten: Essigsäure-Methanol-Gemisch und reines Methanol

**Cys** Cystein **Cys-Gly** Cysteinylglycin **Hcy** Homocystein **GSH** Glutathion

**IS** Interner Standard (N-(2-Mercaptopropionyl)-glycin)

## 4.2 Stabilität der Homocysteinkonzentration in vitro

### 4.2.1 Stabilität in Plasma

Die in abzentrifugiertem EDTA-Plasma bestimmte Homocysteinkonzentration war im physiologischen Bereich (5 - 33  $\mu\text{mol/L}$ ) bei Raumtemperatur mindestens 48 Stunden lang stabil (Tabelle 4-1). Plasma, das über den Blutzellen belassen wurde, zeigte dagegen nach vier Stunden bei Raumtemperatur einen Anstieg der Homocysteinkonzentration um 73 %.

<sup>†</sup> Reagenzienzusammensetzung des Blutabnahmesystems beschrieben in Probst et al.<sup>43</sup>

**Tabelle 4-1.** Stabilität der Homocysteinkonzentration in EDTA-Plasma bei Raumtemperatur

	Probe 1	Probe 2
Zeit [Stunden]	Homocystein [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Homocystein [ $\mu\text{mol/L}$ ]
0	5,28	33,3
24	5,29	32,3
48	5,33	35,7
72	-	32,5
Variationskoeffizient	0,4 %	4,1 %

#### 4.2.2 Stabilität in Vollblut

In Vollblutproben, die mit verschiedenen Stabilisatoren versetzt waren (EDTA, Natrium-Fluorid (NaF), NaF/Heparin), nahm die Homocysteinkonzentration stark zu, wenn das Blut einige Zeit stehengelassen wurde (Abbildung 4-6 a und b).

In EDTA-Vollblut stieg sie bei Raumtemperatur innerhalb von vier bis sechs Stunden um 26 bis 100 %, in NaF- oder NaF/Heparin-Blut mit 23 bis 88 % etwas weniger stark an. In allen Fällen fiel auf, dass das Ausmaß des Anstiegs von Probe zu Probe sehr variierte.

Der Konzentrationsanstieg von EDTA-Vollblut im Kühlschrank war mit 23 % deutlich geringer.

In den Diagrammen von Abbildung 4-6 sind zum Vergleich auch die Kurven von mit Zitronensäure und EDTA stabilisierten Lysatproben abgebildet.<sup>‡</sup> Die Schwankungen um den Anfangswert lagen hier zwischen - 5 % und + 9 %.

<sup>‡</sup> Vgl. Probst et al.<sup>43</sup>

Dieses Blutabnahmesystem wurde von anderen Mitarbeitern des Instituts entwickelt.

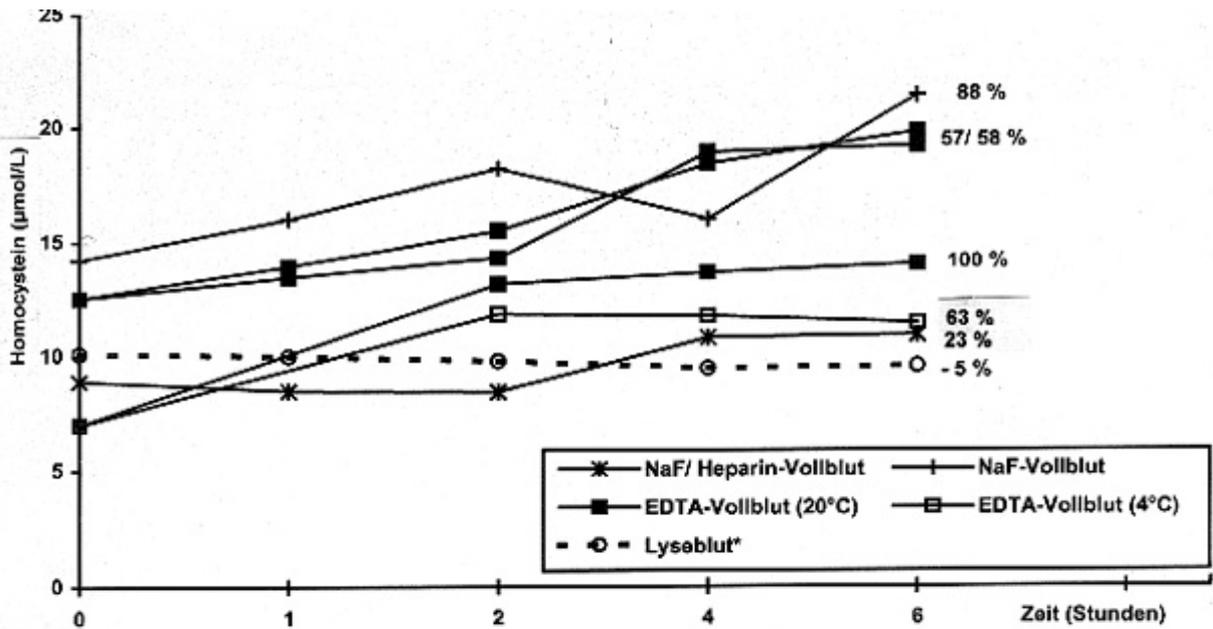


Abb. 4-6 a

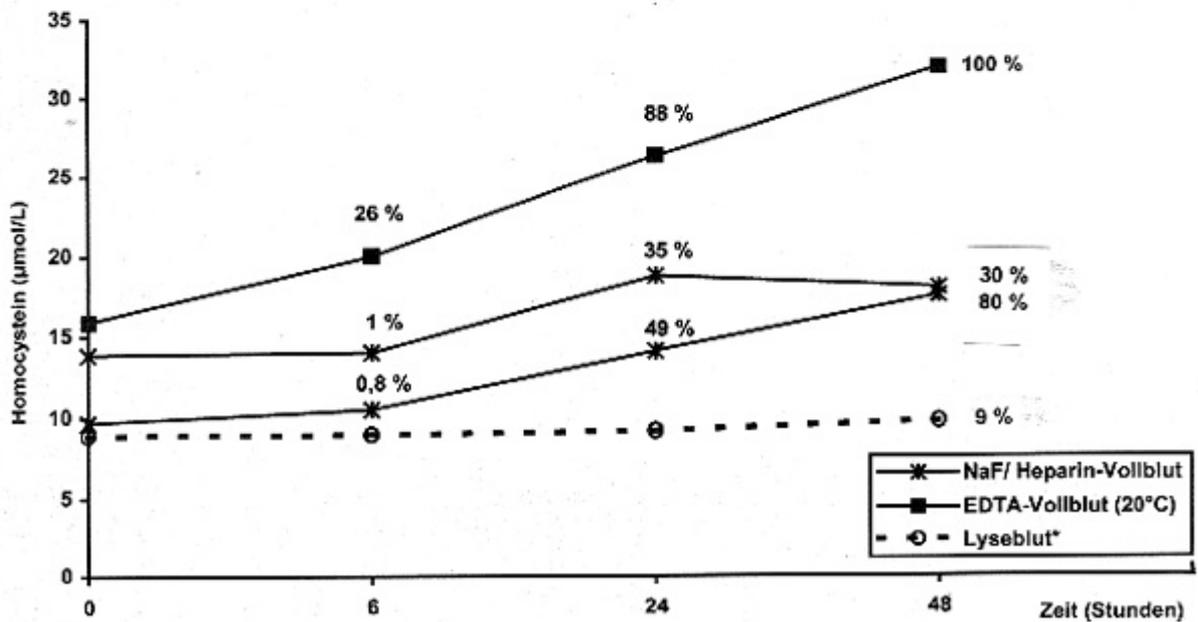


Abb. 4-6 b

Abb. 4-6. Stabilität der Homocysteinkonzentration in verschiedenen Blutabnahmesystemen.

a Konzentrationsänderung in sechs Stunden

b Konzentrationsänderung in 48 Stunden

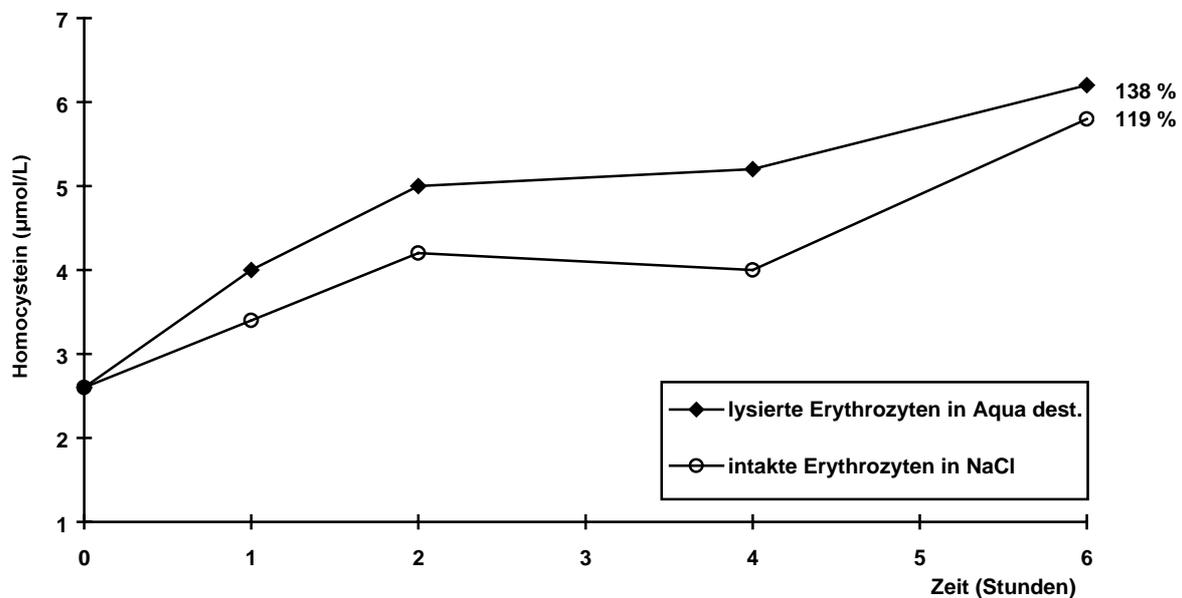
NaF Natrium-Fluorid

\*stabilisiert mit EDTA und Zitronensäure (vgl. Probst et al.<sup>43</sup>)

### 4.2.3 Stabilität in Erythrozyten

In isolierten Erythrozyten bewegte sich der Konzentrationsanstieg von Homocystein mit über 100 % in einem ähnlich hohen Bereich wie der im Vollblut. Dabei schien die Zelle in ihrer Funktion als Kompartiment nicht bedeutend zu sein, denn die Veränderung der Homocystein-konzentration fand gleichermaßen in der Lösung aus lysierten Erythrozyten und in den intakten Erythrozyten statt (Abbildung 4-7).

Die Homocysteinkonzentration in den Erythrozyten betrug etwa 3  $\mu\text{mol/L}$  und war damit niedriger als die im Plasma (etwa 10  $\mu\text{mol/L}$ ), so dass ein Konzentrationsgradient zwischen Blutzellen und -plasma vorlag.



**Abb. 4-7.** Veränderung der Homocysteinkonzentration in isolierten Erythrozyten bei Raumtemperatur.

### 4.3 Klinische Evaluierung der Homocysteinbestimmung

#### 4.3.1 Charakterisierung des Patienten- und des Referenzkollektivs

Für die klinische Evaluierung der Homocysteinbestimmung wurden die Plasmaproben von 231 gefäßchirurgischen bzw. kardiologischen Patienten und 44 gefäßgesunden Probanden untersucht. Die beiden Gruppen wurden einander als Patienten- und Referenzkollektiv vergleichend gegenübergestellt (Tabelle 4-2).

**Tabelle 4-2.** Angaben zum Patienten- und Referenzkollektiv

	Patientenkollektiv	Referenzkollektiv	p <sup>a</sup>
<b>Anzahl: gesamt</b>	231	44	
<b>m</b>	162	23	
<b>w</b>	69	21	
<b>Alter [Jahre]</b>			
x ± s	66,3 ± 11,2	45,8 ± 18,4	< 0,0001
(95%-KI)	(64,9 - 67,8)	(40,2 - 51,4)	
<b>Kreatinin [mg/dL]</b>			
x ± s	1,1 ± 0,7 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,2 <sup>d</sup>	< 0,0001
(95%-KI)	(1,0 - 1,2)	(0,7 - 0,8)	
<b>Folat [ng/mL]</b>			
x ± s	7,7 ± 3,8 <sup>c</sup>	8,1 ± 4,0 <sup>e</sup>	0,5068
(95%-KI)	(7,2 - 8,2)	(6,8 - 9,4)	
<b>Homocystein [µmol/L]</b>			
x ± s	14,1 ± 6,6	11,0 ± 3,9	0,0005
(95%-KI)	(13,2 - 14,9)	(9,8 - 12,2)	

<sup>a</sup> berechnet mit dem Student-t-Test

Die Kreatinin- und Folatwerte konnten nicht von allen Personen erhoben werden.

<sup>b</sup> n = 211; <sup>c</sup> n = 227; <sup>d</sup> n = 34; <sup>e</sup> n = 40

95%-KI 95-Prozent-Konfidenzintervall

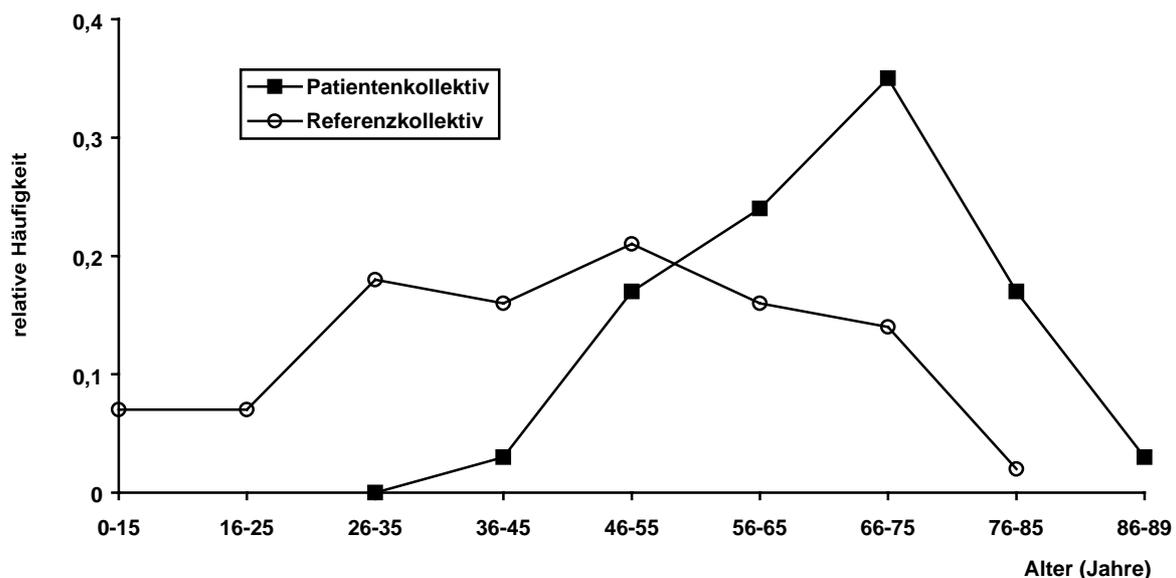
Die Frauen hatten sowohl im Patienten- als auch im Referenzkollektiv einen 12 - 20 % niedrigeren Homocystein-Mittelwert als die Männer. Bei den Patientinnen betrug er  $12,9 \pm 5,9 \mu\text{mol/L}$  (95%-KI 11,5 - 14,3), bei den Teilnehmerinnen am Referenzkollektiv  $9,8 \pm 3,2 \mu\text{mol/L}$  (8,3 - 11,2). Für die Männer waren die Werte  $14,6 \pm 6,8 \mu\text{mol/L}$  (13,6 - 15,7) bzw.  $12,2 \pm 4,1 \mu\text{mol/L}$  (10,4 - 14,0).

Bezüglich des Alters, der Kreatinin- und der Homocysteinwerte (vgl. 4.3.2) unterschieden sich die beiden Kollektive signifikant:

Die Patienten waren im Durchschnitt 20 Jahre älter als die Teilnehmer am Referenzkollektiv, mit einem Häufigkeitsspitzen zwischen 66 und 75 Jahren (Abbildung 4-8). Die Männer waren unter ihnen deutlich überrepräsentiert (70 %). Im Referenzkollektiv war das Verhältnis der Geschlechter dagegen ausgeglichen.

Der Kreatininwert lag nur bei 172 von 231 Patienten im Referenzbereich, während dies für das Referenzkollektiv Aufnahmebedingung war. Doch auch bei diesen 172 Patienten mit guter Nierenfunktion betrug das 95-Prozent-Konfidenzintervall für Kreatinin 0,86 - 0,92 mg/dL, im Referenzkollektiv dagegen 0,72 - 0,83 mg/dL, womit sich die Werte signifikant ( $p = 0,0004$ ) unterschieden.

Die durchschnittlichen Konzentrationen von Serumfolat waren im Patienten- und Referenzkollektiv fast gleich.



**Abb. 4-8.** Altersverteilung im Patienten- und im Referenzkollektiv.

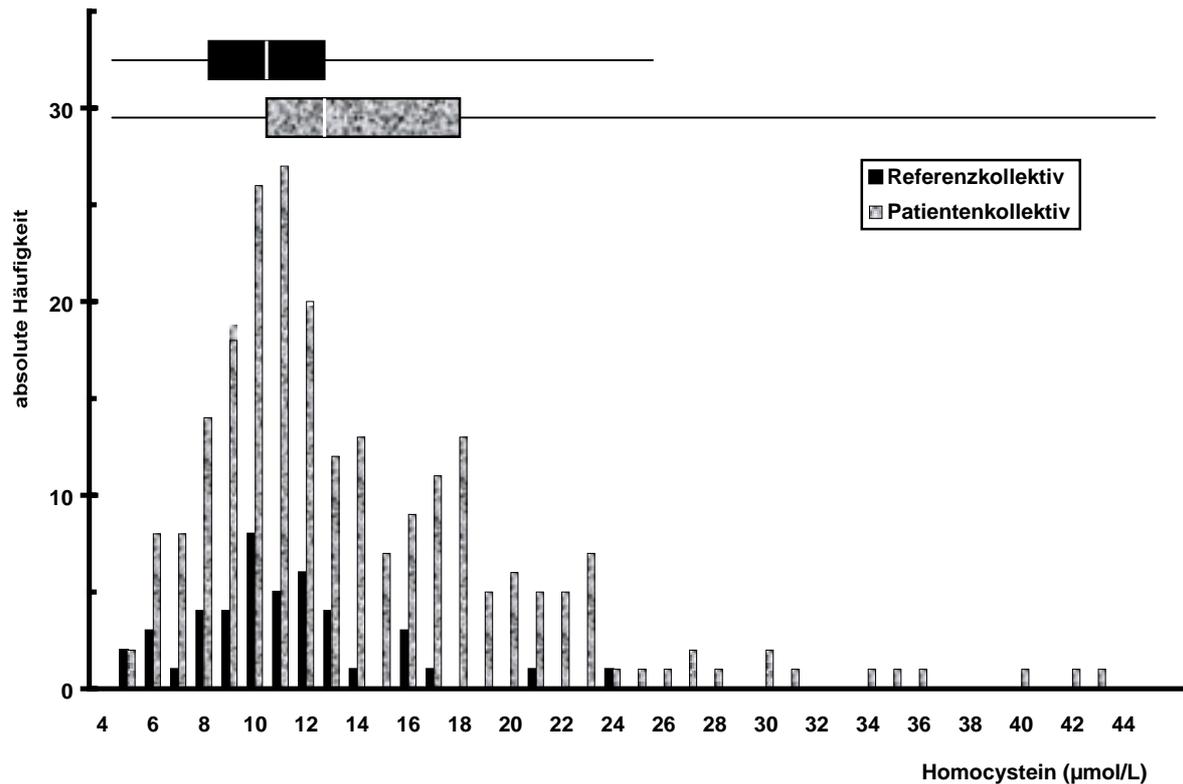
### 4.3.2 Homocysteinwerte im Vergleich: Patienten- und Referenzkollektiv

Die 25-Prozent-Quartile, der Median und die 75-Prozent-Quartile der Homocysteinwerte betragen im Patientenkollektiv 10,0 - 12,1 - 17,3  $\mu\text{mol/L}$  und im Referenzkollektiv 8,7 - 10,6 - 12,4  $\mu\text{mol/L}$  (Abbildung 4-9). Die Spannweite war bei den Patienten sehr groß (5,0 - 42,7  $\mu\text{mol/L}$ ), wobei die Mehrzahl der Werte im Bereich bis 21,2  $\mu\text{mol/L}$  normalverteilt war, und nur 12 % darüber lagen.

Als mögliche Ursachen für diese Extremwerte außerhalb der Normalverteilung wurden das Alter, eine eingeschränkte Nierenfunktion und Gendefekte in Betracht gezogen. Es ergab sich für die Patienten mit Homocysteinwerten bis 21,2  $\mu\text{mol/L}$  ein Altersmittelwert von  $66 \pm 11$  und für die mit Werten über 21,2  $\mu\text{mol/L}$  von  $71 \pm 10$  Jahren. Die Werte unterschieden sich signifikant ( $p = 0,0223$ ). Bezüglich der Kreatininwerte war der Unterschied zwar nicht signifikant, jedoch ebenfalls deutlich vorhanden ( $1,1 \pm 0,6$  vs  $1,4 \pm 0,9$  mg/dL;  $p = 0,0588$ ). Ein Patient mit einer Homocysteinkonzentration von 41,5  $\mu\text{mol/L}$  wurde mit einer molekularbiologischen Untersuchung als homozygoter Genträger für die thermolabile Variante der MTHFR identifiziert. Bei den anderen Patienten konnte diese Untersuchung nicht durchgeführt werden, da keine Vollblutproben zur Verfügung standen.

Die Spannweite der Homocysteinwerte im Referenzkollektiv (5,0 – 24,1  $\mu\text{mol/L}$ ) war wesentlich kleiner als im Patientenkollektiv. Die Werte waren zunächst nicht normalverteilt. Jedoch konnten die beiden höchsten Homocysteinkonzentrationen (20,7 und 24,1  $\mu\text{mol/L}$ ) Probanden zugeordnet werden, die sich ebenfalls als homozygote Genträger für die thermolabile Variante der MTHFR erwiesen. Ohne diese beiden Männer waren die Homocysteinwerte normalverteilt, der Mittelwert im Referenzkollektiv betrug dann  $10,5 \pm 3,0$  statt  $11,0 \pm 3,9$   $\mu\text{mol/L}$ .

Die Homocystein-Mittelwerte des Patienten- und des Referenzkollektivs ( $14,1 \pm 6,6$  vs  $11,0 \pm 3,9$   $\mu\text{mol/L}$ ) unterschieden sich signifikant ( $p = 0,0005$ ). Dies galt auch für die Werte der Frauen ( $12,9 \pm 5,9$  vs  $9,8 \pm 3,2$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $p = 0,0100$ ). Bei den Männern war der Student -t-Test nur signifikant, wenn man die beiden MTHFR-homozygoten Ausreißer im Referenzkollektiv wegließ ( $14,6 \pm 6,8$  vs  $11,2 \pm 2,6$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $p = 0,0021$ ; mit Ausreißern  $14,6 \pm 6,8$  vs  $12,2 \pm 4,1$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $p = 0,0594$ ).



**Abb. 4-9.** Homocysteinverteilung im Patienten- und im Referenzkollektiv. Darstellung als Box-and-Whisker-Diagramm.

### 4.3.3 Der Einfluss verschiedener Faktoren auf den Homocysteinwert

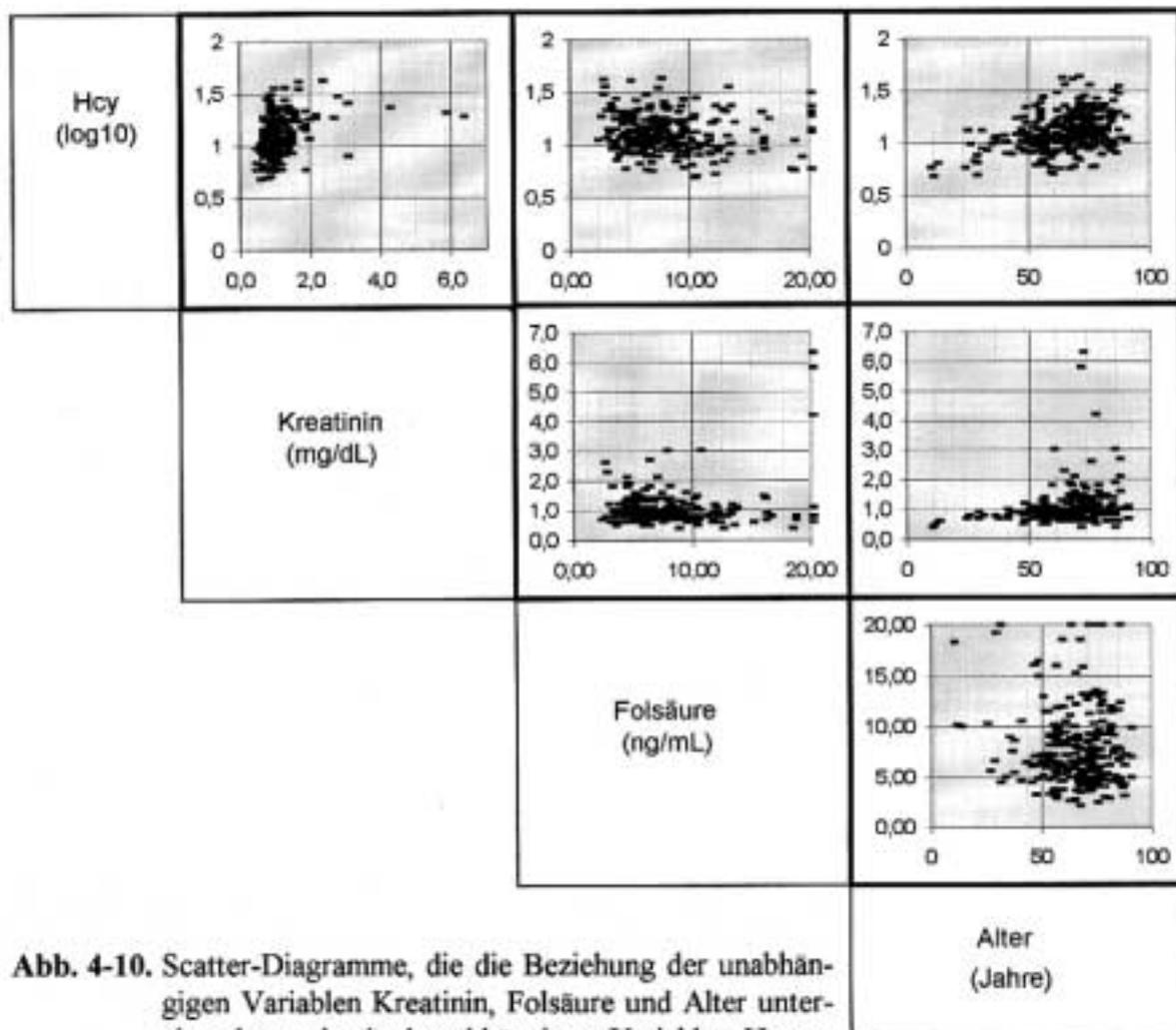
Um den Zusammenhang zwischen dem Alter, der Nierenfunktion (ausgedrückt durch den Kreatininwert), den Folatwerten, den Blutfetten (Cholesterin, Triglyceride, Lp(a)) und der Homocysteinkonzentration in unseren Kollektiven beurteilen zu können, wurde der Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient berechnet (Tabelle 4-3).

Außerdem wurde eine multiple lineare Regressionsanalyse mit Alter, Kreatinin und Folsäure als unabhängigen Variablen und Homocystein als abhängiger Variable durchgeführt (Tabelle 4-4). Zwischen den unabhängigen Variablen bestand dabei keine Korrelation, die das Ergebnis verfälschte (Abbildung 4-10). Dies wurde mit dem statistischen Software-Programm SPSS überprüft.

**Tabelle 4-3.** Die Korrelation verschiedener Faktoren mit den Homocysteinwerten im Plasma

Einflussfaktor	n	$r_s$	p
Alter	275	0,3739	< 0,0001
Kreatinin	245	0,3542	< 0,0001
Folat	267	- 0,1346	0,0279
Vitamin B <sub>12</sub>	39	0,2976	0,0658
Cholesterin	73	- 0,0341	0,7746
Triglyceride	74	- 0,0288	0,8077
Lp(a)	57	- 0,2751	0,0384

Das Patienten- und das Referenzkollektiv wurden gemeinsam ausgewertet (n = 275).  
 $r_s$  Spearmanscher Rangkorrelationskoeffizient



**Abb. 4-10.** Scatter-Diagramme, die die Beziehung der unabhängigen Variablen Kreatinin, Folsäure und Alter untereinander und mit der abhängigen Variablen Homocystein (Hcy) darstellen.

**Tabelle 4-4.** Ergebnisse der multiplen linearen Regression

Unabhängige Variablen*	Regressions- koeffizient (log <sub>10</sub> )	Anstieg der Homocysteinkonzentration pro Einheit der unabhängigen Variablen für einen Homocystein-Bereich von etwa 10 bis 40 µmol/L	p
Kreatinin	0,081324	1,73 - 6,41 µmol/L // mg/dL	0,0001
Alter	0,0036902	0,09 - 0,34 µmol/L // Jahr	0,0001
Folat	- 0,0078367	- 0,18 - (- 0,73) µmol/L // ng/mL	0,0045

\*Die abhängige Variable war Homocystein.

Das Patienten- und das Referenzkollektiv wurden gemeinsam ausgewertet (n = 237).

Für das Modell gilt:  $r^2 = 0,2100$ ;  $p = 0,0001$

Um mit der Regressionsanalyse gültige Ergebnisse zu erzielen, muss die abhängige Variable normalverteilt sein. Dies wurde durch die Logarithmierung (log<sub>10</sub>) der Homocysteinwerte erreicht. Weil damit auch die Regressionskoeffizienten für die jeweiligen unabhängigen Variablen logarithmische Werte hatten, ergab sich keine lineare Beziehung, sondern ein mit der Höhe der Homocysteinkonzentration zunehmender Einfluss der unabhängigen Variablen. So lässt sich z. B. berechnen, dass der Anstieg der Homocysteinkonzentration pro Lebensjahr zwischen 0,09 und 0,34 µmol/L liegt, je nachdem, ob die Ausgangskonzentration 10 oder 40 µmol/L Homocystein beträgt.

Die Rechnung ist folgendermaßen durchzuführen:

Der logarithmierte Regressionskoeffizient für das Alter beträgt 0,00369.

Bei einem Homocystein-Ausgangswert von 10 µmol/L:

$$\begin{aligned} \log_{10}10 &= 1 \\ 1 + 0,00369 &= 1,00369 \\ \text{antilog}_{10}1,00369 &= 10,09 \text{ [}\mu\text{mol/L]} \end{aligned}$$

Bei einem Homocystein-Ausgangswert von 40 µmol/L:

$$\begin{aligned} \log_{10}40 &= 1,6 \\ 1,6 + 0,00369 &= 1,60369 \\ \text{antilog}_{10}1,60369 &= 10,34 \text{ [}\mu\text{mol/L]} \end{aligned}$$

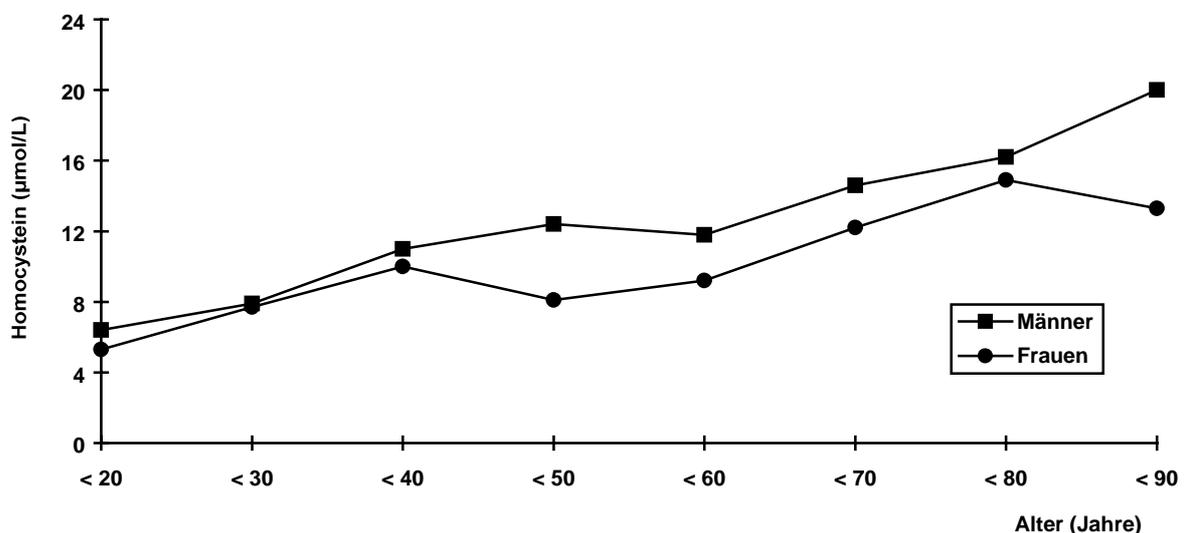
Auf die gleiche Weise kann die Rechnung für Folat und Kreatinin durchgeführt und damit der Einfluss dieser Variablen auf den Homocysteinwert rechnerisch abgeschätzt werden (Tabelle 4-4).

Mit der Regressionsanalyse ist auch die Berechnung eines an die unabhängigen Variablen angeglichenen Homocystein-Mittelwertes möglich (geometrischer Mittelwert). Dieser betrug für das Patientenkollektiv 12,6  $\mu\text{mol/L}$  (95%-KI 12,0 - 13,2) und für das Referenzkollektiv 13,4  $\mu\text{mol/L}$  (95%-KI 11,6 - 15,4). Die Mittelwerte der beiden Kollektive unterschieden sich damit fast nicht mehr ( $p = 0,4335$ ).

### Alter und Geschlecht

Das Alter erwies sich sowohl in der Korrelations- als auch in der Regressionsanalyse als signifikanter Einflussfaktor ( $p = 0,0001$ ). Wie sich mit dem Regressionskoeffizienten (Tabelle 4-4) berechnen lässt, erhöht sich die Homocysteinkonzentration um 0,9 bis 3,4  $\mu\text{mol/L}$ , wenn das Alter um zehn Jahre ansteigt.

Auch das Geschlecht hatte Einfluss auf die Homocysteinkonzentration (Abbildung 4-11). Die Werte waren bei den Frauen durchschnittlich um 12 % (Patientenkollektiv) bzw. 20 % (Referenzkollektiv) niedriger als bei den Männern.



**Abb. 4-11.** Homocystein in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht.

Das Patienten- und das Referenzkollektiv wurden gemeinsam ausgewertet.  
Frauen  $n = 90$ ; Männer  $n = 185$

### **Kreatinin**

Der Zusammenhang bzw. die Abhängigkeit der Homocystein- von den Kreatininwerten war ebenfalls signifikant ( $p = 0,0001$ ). Die Regressionsanalyse (Tabelle 4-4) ergab für einen Anstieg der Kreatininkonzentration um  $0,1 \text{ mg/dL}$  eine Erhöhung des Homocysteinwertes zwischen  $0,2$  und  $0,6 \text{ } \mu\text{mol/L}$ .

Um den Einfluss der Nierenfunktion besser beurteilen zu können, wurde eine Untergruppe aus dem Patientengesamtkollektiv herausgenommen, die nur Patienten enthielt, deren Kreatininwerte innerhalb des Referenzbereiches lagen ( $n = 172$ ). Ihr Homocystein-Mittelwert war mit  $13,0 \pm 5,6 \text{ } \mu\text{mol/L}$  (95%-KI  $12,2 - 13,9 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ) deutlich, aber nicht signifikant niedriger als der aller Patienten ( $14,1 \pm 6,6 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ;  $p = 0,0989$ ). Die Erhöhung im Vergleich zum Referenzkollektiv blieb bei einem Signifikanzniveau von  $0,0220$  erhalten.

### **Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub>**

Der Korrelations- und der Regressionskoeffizient, die die Beziehung von Folsäure und Homocystein beschreiben, waren negativ (Tabelle 4-3 und 4-4). Somit ergab sich rechnerisch bei einem Anstieg des Folatwertes um  $1 \text{ ng/mL}$  eine Abnahme der Homocysteinkonzentration um  $0,2$  bis  $0,7 \text{ } \mu\text{mol/L}$ . Der Einfluss dieses Vitamins war signifikant, jedoch war das Signifikanzniveau ( $p = 0,0279$  bzw.  $0,0045$ ) niedriger als für die Einflussfaktoren Alter und Kreatinin.

Im Referenzkollektiv war auch Vitamin B<sub>12</sub> bestimmt worden. Die Korrelation mit Homocystein war aber nicht signifikant ( $p = 0,0658$ ; Tabelle 4-3).

### **Cholesterin, Triglyceride, Lp(a)**

Für die Beziehung von Lp(a) und Homocystein ergab sich ein signifikanter negativer Korrelationskoeffizient von  $-0,2751$  ( $p = 0,0384$ ). Cholesterin und Triglyceride waren nicht signifikant mit Homocystein korreliert ( $p = 0,7746$  bzw.  $p = 0,8077$ ; Tabelle 4-3).

Neben den oben genannten messbaren Parametern wurde auch das kardiovaskuläre Risikoprofil der Patienten erfasst (Tabelle 4-5).

Patienten, bei denen ein Diabetes mellitus oder ein Bluthochdruck diagnostiziert worden war, wiesen im Durchschnitt höhere Homocysteinwerte als die Gesamtheit der Patienten auf. Beim

Vergleich der Risikogruppen miteinander (Testung mit ANOVA;  $p = 0,0589$ ) oder mit dem Patientenkollektiv insgesamt war aber kein signifikanter Unterschied feststellbar.

**Tabelle 4-5.** Kardiovaskuläre Risikofaktoren im Patientenkollektiv

	n	Homocystein [ $\mu\text{mol/L}$ ] $\bar{x} \pm s$ (95%-KI)	$p^*$
Patienten gesamt	231	$14,1 \pm 6,6$ (13,2 – 14,9)	
Bluthochdruck	127 (55%)	$14,7 \pm 6,8$ (13,5 – 15,9)	0,4309
Rauchen	78 (34%)	$13,1 \pm 5,8$ (11,8 – 14,4)	0,2140
Diabetes mellitus	51 (22%)	$15,6 \pm 7,7$ (13,4 – 17,8)	0,2088
pos. Familienanamnese bez. Gefäßerkrankungen	17 (7%)	$11,8 \pm 6,1$ (8,7 - 15,0)	0,1581

95%-KI 95-Prozent-Konfidenzintervall

\* berechnet mit dem Student-t-Test für den Vergleich mit dem gesamten Patientenkollektiv

#### 4.3.4 Erstellung eines Referenzbereiches

Bei der Interpretation der klinisch-chemischen Befunde ist für den Kliniker im Falle von Homocystein hauptsächlich der obere Grenzwert wichtig. Es gibt verschiedene Möglichkeiten diesen festzulegen, z. B. können die 90. oder 95. Perzentile eines definierten Kollektivs gewählt werden, oder man orientiert sich am Mittelwert und der Standardabweichung des Referenzkollektivs (Tabelle 4-6).

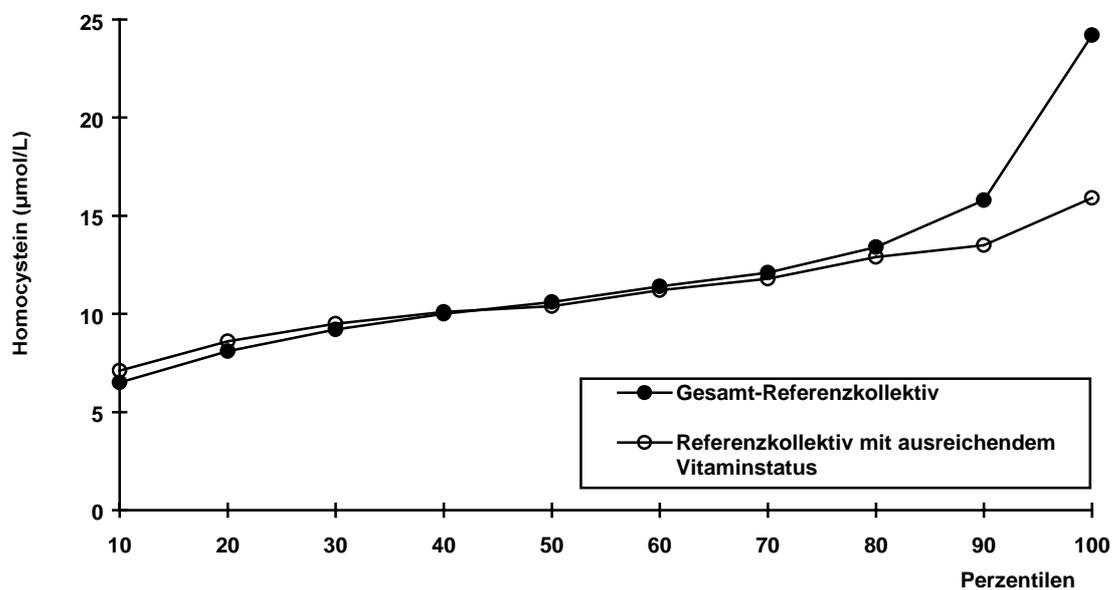
Allgemeine Bedingung für die Aufnahme in das Referenzkollektiv war, dass bei den Probanden anamnestisch und z. T. durch klinische Untersuchung gesichert kein Anhalt für Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder andere schwere Grundleiden vorliegen durfte („Gesamt-Referenzkollektiv“). Weil der Einfluss der Vitamine Folsäure und  $B_{12}$  auf die Homocystein-konzentration bekannt ist, wurde aus dem Gesamt-Referenzkollektiv eine Untergruppe ausgewählt, für die nur Probanden akzeptiert wurden, deren Folatwert  $\geq 4$  ng/mL und Vitamin- $B_{12}$ -Wert  $\geq 250$  pg/mL war, d. h. die Vitaminwerte durften weder außerhalb des Referenzbereiches<sup>§</sup> liegen noch grenzwertig niedrig sein. Diese Aufnahmebedingungen für das „Referenzkollektiv mit ausreichendem Vitaminstatus“ trafen auf 27 von 44 Personen zu.

Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte sich vor allem bei hohen Homocystein-

<sup>§</sup> Referenzbereich für Folsäure: 3 - 17 ng/mL, für Vitamin  $B_{12}$ : 200 - 950 pg/mL

konzentrationen (Abbildung 4-12). Der Maximalwert betrug im „Referenzkollektiv mit ausreichendem Vitaminstatus“ 15,9  $\mu\text{mol/L}$ , im Gesamt-Referenzkollektiv dagegen 24,2  $\mu\text{mol/L}$ . Die beiden Träger der thermolabilen MTHFR-Variante (vgl. 4.3.2), die für ein Referenzkollektiv ohnehin nicht akzeptabel gewesen wären, wurden hier wegen ihrer niedrigen Vitaminwerte ausgeschlossen.

Der Mittelwert für Homocystein betrug im “Referenzkollektiv mit ausreichendem Vitaminstatus”  $10,5 \pm 2,7 \mu\text{mol/L}$  (95%-KI 9,5 - 11,6  $\mu\text{mol/L}$ ) gegenüber  $11,0 \pm 3,9 \mu\text{mol/L}$  im Gesamt-Referenzkollektiv.



**Abb. 4-12.** Homocystein-Perzentilen in zwei verschieden definierten Referenzkollektiven.

“Referenzkollektiv mit ausreichendem Vitaminstatus”: Folat  $\geq 4 \text{ ng/mL}$

Vitamin B<sub>12</sub>  $\geq 250 \text{ pg/mL}$

Die “strengeren” Grenzwerte, d. h. die 90. Perzentile bzw. der Mittelwert zuzüglich einer Standardabweichung, liegen zwischen 13,5 und 15,8  $\mu\text{mol/L}$  Homocystein für Männer und Frauen zusammen. Wenn man die Grenzziehungen großzügiger anlegt (95. Perzentile bzw. Mittelwert zuzüglich zwei Standardabweichungen), erhält man Werte zwischen 15,0 und 17,2  $\mu\text{mol/L}$ .

**Tabelle 4-6.** Obere Grenzwerte für Homocystein, denen unterschiedliche Berechnungsmethoden bzw. verschieden definierte Referenzkollektive zugrunde liegen

	Oberer Grenzwert für Homocystein [ $\mu\text{mol/L}$ ] (Anteil der Patientenergebnisse, die über dem Grenzwert liegen [%])		
	m und w	m	w
Gesamt-Referenzkollektiv 90. Perzentile	15,8 (32,5)	15,9 (31,5)	13,2 (37,7)
Gesamt-Referenzkollektiv 95. Perzentile	17,2 (25,1)	20,5 (16,1)	14,1 (33,3)
Referenzkollektiv mit ausreichendem Vitaminstatus <sup>a</sup> 90. Perzentile	13,5 (41,1)	14,5 (37,7)	13,2 (37,7)
Referenzkollektiv mit ausreichendem Vitaminstatus <sup>a</sup> 95. Perzentile	15,0 (32,9)	15,6 (32,7)	13,5 (36,2)
Gesamt-Referenzkollektiv ohne Homozygote <sup>b</sup> $x \pm 1s$	13,5 (41,1)	13,8 (42,0)	13,0 (43,5)
Gesamt-Referenzkollektiv ohne Homozygote <sup>b</sup> $x \pm 2s$	16,5 (29,0)	16,4 (31,5)	16,2 (27,5)

<sup>a</sup> "Referenzkollektiv mit ausreichendem Vitaminstatus": Folat  $\geq 4 \text{ ng/mL}$   
Vitamin B<sub>12</sub>  $\geq 250 \text{ pg/mL}$

<sup>b</sup> zwei klinisch gesunde Männer, die homozygote Träger der thermolabilen MTHFR-Variante (C677T) sind

Insgesamt entsprechen sich die "strengerer" oder weniger strengen Grenzwerte untereinander recht gut, unabhängig davon, welche Berechnungsmethode angewandt wurde. Dies gilt (allerdings mit größeren Schwankungen für die weniger strengen Grenzwerte) auch, wenn man die beiden Geschlechter getrennt betrachtet. Die Bereiche für die Frauen (13,0 - 13,2 bzw. 13,5 - 16,2  $\mu\text{mol/L}$ ) liegen deutlich niedriger als für die Männer (13,8 - 15,9 bzw. 15,6 - 20,5  $\mu\text{mol/L}$ ).

Bei uns wurde als oberer Grenzwert für Homocystein vorläufig die 95. Perzentile des Referenzkollektivs mit ausreichendem Vitaminstatus" ausgewählt (15  $\mu\text{mol/L}$ ). Die Prävalenz der Hyperhomocysteinämie betrug demnach im Patientenkollektiv 32,9 % und im

Referenzkollektiv 13,6 %.

#### 4.3.5 Zusammenhang zwischen der Diagnose und der Homocysteinkonzentration

Auf 60 Patienten trafen gleichzeitig zwei bzw. auf neun drei der uns interessierenden Diagnosen pAVK, KHK, Karotisstenose und Bauchaortenaneurysma zu (Tabelle 4-7).

Der durchschnittliche Homocysteinwert war bei den Patienten mit einem Bauchaortenaneurysma mit  $15,6 \pm 6,8 \mu\text{mol/L}$  am höchsten. Es folgten die Diagnosen pAVK, Karotisstenose und schließlich KHK mit dem niedrigsten Durchschnittswert ( $14,4 \pm 7,3 \mu\text{mol/L}$ ). Bei der Testung mit ANOVA unterschieden sich die Gruppen aber nicht signifikant ( $p = 0,7937$ ). Auch der Vergleich mit dem gesamten Patientenkollektiv ergab kein signifikantes Ergebnis.

**Tabelle 4-7.** Mittelwerte der Homocysteinkonzentration bei verschiedenen Diagnosen

Diagnose	n	Homocystein [ $\mu\text{mol/L}$ ] x $\pm$ s		p*
pAVK (ohne Einteilung)	19	14,7 $\pm$ 8,1		
pAVK II	55	15,4 $\pm$ 6,8	<b>pAVK gesamt</b> (n = 121) 14,9 $\pm$ 6,8 $\mu\text{mol/L}$	0,2540
pAVK III	21	14,1 $\pm$ 7,0		
pAVK IV	26	14,9 $\pm$ 5,9		
KHK (ohne Einteilung)	23	15,0 $\pm$ 8,5		
KHK (1-Gefäß)	14	12,0 $\pm$ 7,1	<b>KHK gesamt</b> (n = 94) 14,4 $\pm$ 7,3 $\mu\text{mol/L}$	0,7555
KHK (2-Gefäß)	18	13,1 $\pm$ 4,1		
KHK (3-Gefäß)	39	15,4 $\pm$ 7,6		
Karotisstenose einseitig	57	14,8 $\pm$ 7,9	<b>Karotisstenose gesamt</b> (n = 76) 14,9 $\pm$ 7,4 $\mu\text{mol/L}$	0,3970
Karotisstenose beidseitig	19	15,1 $\pm$ 6,0		
Bauchortenaneurysma	21	15,6 $\pm$ 6,8	<b>Bauchortenaneurysma</b> (n = 21) 15,6 $\pm$ 6,8 $\mu\text{mol/L}$	0,3095

\* berechnet mit dem Student-t-Test für den Vergleich mit dem gesamten Patientenkollektiv

55 Patienten hatten schon einen Herzinfarkt und 17 einen Schlaganfall erlitten. Ihre mittleren Homocysteinkonzentrationen betragen  $13,7 \pm 5,9$  bzw.  $14,5 \pm 6,1 \mu\text{mol/L}$  und unterschieden sich nicht signifikant von denen der Patienten ohne Ereignisse ( $p = 0,6255$  bzw.  $0,8341$ ).

#### 4.4 Untersuchung von Genträgern der thermolabilen MTHFR-Variante (C677T)

##### 4.4.1 Ein Fallbeispiel

Bei einer Person im Referenzkollektiv war der extrem hohe Homocysteinwert (42,0  $\mu\text{mol/L}$ ) bei gleichzeitig niedrigem Folsäurepiegel (5 ng/mL) aufgefallen. Die daraufhin durchgeführte molekularbiologische Untersuchung ergab, dass der 41-jährige Mann homozygot für die thermolabile Variante der MTHFR (C677T) ist.

Die Bestimmung von Homocystein, Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub> bei seinen drei Kindern ergab unauffällige Werte (Tabelle 4-8). Auf eine genetische Untersuchung wurde hier verzichtet.

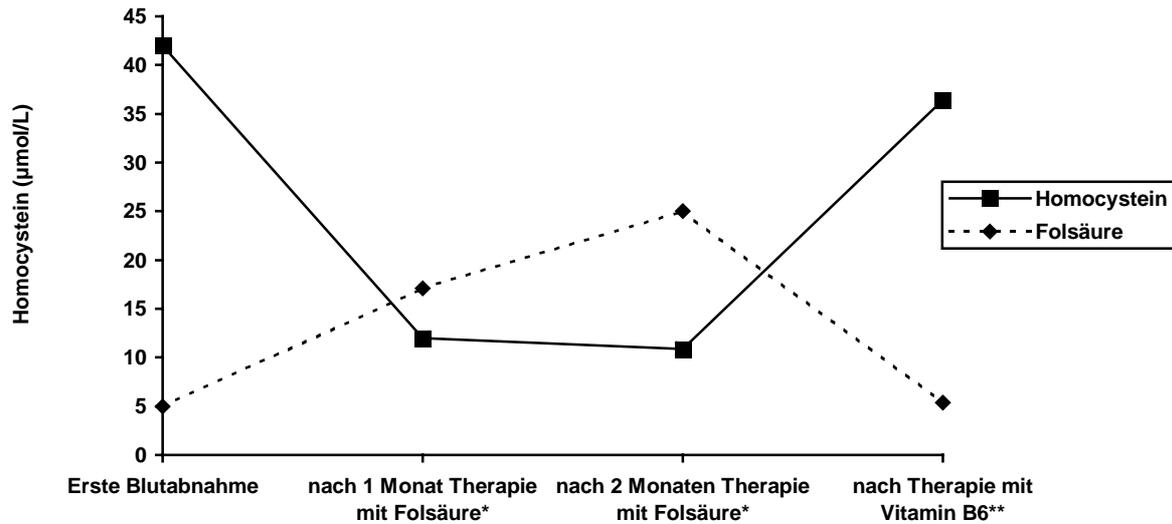
**Tabelle 4-8.** Homocystein-, Vitamin- und Nierenfunktionswerte der drei Kinder eines homozygoten Genträgers für die thermolabile Variante der MTHFR

Alter [Jahre]	Geschlecht	Homocystein [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Folat im Serum [ng/mL]	Vit.B <sub>12</sub> im Serum [pg/mL]	Kreatinin [mg/dL]
9	w	5,8	18,3	492	0,4
10	w	4,8	10,2	563	0,5
12	m	6,4	10,0	443	0,6

Die Familienanamnese ergab, dass der Vater des Probanden mit 65 Jahren an einem Herzinfarkt verstorben ist. Mütterlicherseits liegt eine Hypercholesterinämie vor.

Bei dem Mann selbst sind bisher noch keine Symptome aufgetreten, die auf eine Arteriosklerose hindeuten könnten. Die dopplersonografische Untersuchung seiner Karotiden ergab einen normalen Befund.

Als Therapie nahm der Proband zunächst mehrere Monate Folsan® mit einer Dosis von 5 mg Folsäure täglich ein, dann etwa einen Monat lang 100 mg Vitamin B<sub>6</sub>-Hevert® pro Tag und seitdem Folgamma®, bei dem die Tagesdosis 25  $\mu\text{g}$  Cyanocobalamin (Vitamin B<sub>12</sub>) und 1,5 mg Folsäure beträgt. In monatlichen Abständen wurden seine Homocystein-, Folat- und Vitamin-B<sub>12</sub>-Werte im Plasma bzw. Serum kontrolliert (Abbildung 4-13).



**Abb. 4-13.** Veränderung der Homocysteinwerte eines homozygoten Genträgers der thermolabilen Variante der MTHFR unter Folsäure- bzw. Vitamin-B<sub>6</sub>-Substitution.

\* Folsan® (5 mg/d)

\*\* Vitamin B<sub>6</sub>-Hevert® (100 mg/d)

Der Vitamin-B<sub>12</sub>-Spiegel lag in diesem Zeitraum zwischen 231 und 368 pg/mL.

Die Homocysteinkonzentration wurde vom Folatspiegel stark beeinflusst. Die durch normale Ernährung zugeführte Menge an Folsäure reichte bei diesem Mann offensichtlich nicht aus, um den Homocysteinwert im Normalbereich zu halten. Dies wurde v. a. beim Wechsel der Vitaminsubstitution von Folat zu Vitamin B<sub>6</sub> deutlich. Der Homocysteinwert war bei der vierten Messung - etwa einen Monat, nachdem der Proband das Folsäurepräparat abgesetzt hatte, - fast zu dem hohen "Ausgangswert" zurückgekehrt (jetzt 36,4 µmol/L, anfangs 42,0 µmol/L). Andererseits konnte durch medikamentöse Folatsubstitution die Homocysteinkonzentration innerhalb eines Monats in den Referenzbereich gesenkt werden (auf 12 µmol/L, nach zwei Monaten auf 10,9 µmol/L). Dabei wirkte eine Dosis von 1,5 mg Folsäure pro Tag genauso effektiv wie 5 mg.

#### 4.4.2 Homo- und heterozygote Genträger im Vergleich

Elf der gefäßchirurgischen Patienten mit erhöhten Homocysteinwerten, bei denen eine molekularbiologische Untersuchung durchgeführt worden war, erwiesen sich als Träger der thermolabilen Variante der MTHFR (C677T). Sechs der Patienten waren heterozygot, fünf homozygot für die Enzymvariante (Tabelle 4-9).

Es stellte sich die Frage, ob die hetero- und homozygoten Genträger anhand des Phänotypes (also anhand der Höhe des Homocystein- und evtl. der Vitaminwerte) zu unterscheiden sind.

**Tabelle 4-9.** Daten von elf gefäßchirurgischen Patienten, die Träger der thermolabilen Variante der MTHFR sind (C677T)

Geschlecht	Alter [Jahre]	Homocystein [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Folat [ $\text{ng/mL}$ ]	Vitamin B <sub>12</sub> [ $\text{pg/mL}$ ]	Genetik
m	66	18,6	8,5	222	he
m	85	25,3	7,6	113	he
m	57	19,1	8,0	480	he
m	66	28,0	2,5	117	he
m	65	23,7	7,3	280	he
w	75	38,2	4,2	213	he
m*	74	20,7	4,2	130	ho
m*	51	24,2	3,2	423	ho
m	64	41,5	2,6	458	ho
m	49	68,1	1,9	201	ho
w	76	39,4	3,1	639	ho

\* die beiden Teilnehmer am Referenzkollektiv (vgl. 4.3.2)

he heterozygot für die thermolabile Variante der MTHFR

ho homozygot für die thermolabile Variante der MTHFR

Referenzbereiche: Kreatinin 0,7 - 1,3 mg/dL

Folsäure 3-17 ng/mL

Vitamin B<sub>12</sub> 250-900 ng/mL

Die mittlere Homocysteinkonzentration war bei den Heterozygoten mit  $25,5 \pm 7,2 \mu\text{mol/L}$  deutlich, aber nicht signifikant niedriger als bei den Homozygoten, bei denen sie  $38,8 \pm 18,8 \mu\text{mol/L}$  betrug ( $p = 0,1951$ ). Allerdings fanden sich in beiden Gruppen sowohl mäßig erhöhte Werte um  $20 \mu\text{mol/L}$  als auch sehr hohe um  $40 \mu\text{mol/L}$ . Die herausstechend hohe Homocysteinkonzentration von  $68,1 \mu\text{mol/L}$  stammte von einem homozygoten Genträger.

Auffällig waren die extrem niedrigen Folatspiegel der homozygoten im Vergleich zu den

heterozygoten Genträgern. Die mittleren Konzentrationen betragen  $3,0 \pm 0,8$  bzw.  $6,4 \pm 2,4$  ng/mL, womit sie sich signifikant unterschieden ( $p = 0,0177$ ). Für die Vitamin-B<sub>12</sub>-Werte ließ sich dagegen keine Tendenz erkennen, weder im Vergleich mit den Heterozygoten noch mit dem Referenzkollektiv.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Diskussion der analytischen Methode

Die hier vorgestellte HPLC-FD-Methode wird seit Januar 1998 im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar routinemäßig zur Bestimmung von Homocystein im Plasma und Vollblutlysate eingesetzt.

In den letzten Jahren sind schon ähnliche HPLC-Verfahren beschrieben worden, die ebenfalls mit dem Reagenz SBD-F und Fluoreszenzdetektion arbeiten, so z. B. von Araki u. Sako,<sup>6</sup> Ubbink et al.,<sup>57</sup> Vester u. Rasmussen<sup>61</sup> und Fortin u. Genest.<sup>13</sup> Wir hatten im Rahmen der Methodenetablierung auch andere HPLC-Verfahren ausprobiert, die aber gegenüber dem letztlich eingeführten einige Nachteile aufwiesen.

So wurde anfangs eine Säule mit kleinerem Innendurchmesser (2 mm gegenüber 4 mm) verwendet, um die Sensitivität zu erhöhen und gleichzeitig den Eluentenverbrauch bei der Substanztrennung zu minimieren. Da die Sensitivität bei der Derivatisierung mit einem spezifischen Reagenz wie Bromobiman oder SBD-F aber auf jeden Fall ausreicht, um die physiologischerweise im Blut enthaltene Menge an Homocystein zu bestimmen, wurde aus Gründen der leichteren Handhabbarkeit auf eine 4-mm-Säule gewechselt. Die Unempfindlichkeit der 4-mm-Säule überwiegt den Nachteil des nun erhöhten Eluentenverbrauches, zudem der Eluent zum größten Teil aus einem wässrigen Acetat-Puffer besteht.

Als Fluoreszenzreagenz wurde zunächst Bromobiman nach der Methode von Jacobsen et al.<sup>25</sup> eingesetzt. Dabei entstand aber eine große Anzahl von Störpeaks, weil das sehr reaktive Bromobiman auch Alkohole, Phenole, Aminogruppen und Verunreinigungen derivatisiert, fluoreszierende Hydrolyseprodukte hervorbringt und eine Eigenfluoreszenz aufweist.<sup>6</sup> Die Störpeaks konnten mit verschiedenen Eluenten-Gradienten-Systemen nur schlecht von den gewünschten Peaks abgetrennt werden (Abbildung 4-1). Deswegen wechselten wir bald zu SBD-F, welches spezifisch Sulfhydrylgruppen derivatisiert und selbst nicht fluoresziert.

Die nun etablierte Methode stellt eine Weiterentwicklung der von Fortin u. Genest<sup>13</sup> bzw. Vester u. Rasmussen<sup>61</sup> veröffentlichten Verfahren dar. Wesentliche Veränderungen sind der Ersatz des isokratischen Eluenten- durch ein Gradientensystem mit kurzzeitig hohem Methanolanteil, die Erniedrigung des Eluentenflusses und die Verminderung des benötigten

Probenvolumens.

Der Gradient hat neben der Erzeugung schärferer Peaks (besonders beim internen Standard; Abbildung 4-3) den Vorteil, dass die Säule bei jeder Probeninjektion gründlich gereinigt wird. Eine Verschlechterung der Säulenqualität durch schlecht eluierbare Substanzen wird so während des Analysenlaufes verhindert. Der niedrigere Fluss spart im Vergleich zu den Methoden von Fortin u. Genest<sup>13</sup> und Vester u. Rasmussen<sup>61</sup> 10 bzw. 25 % Fließmittel, was die Entsorgungskosten dieses wässrigen Lösungsmittelgemisches verringert. Das niedrige Probenvolumen von 100 µl Plasma bzw. Vollblutlysate vereinfacht die Probenaufarbeitung und vermindert den Reagenzienverbrauch.

Das vorliegende System ist verlässlich und reagiert im Vergleich zu anderen Verfahren wenig auf pH-Schwankungen<sup>12,57</sup> oder andere geringfügige Veränderungen der Eluentenzusammensetzung.

Die Intraassay-Präzision mit einem Variationskoeffizienten (VK) von 5,8 % und die Interassay-Präzision, für die der VK 6,8 % für den niedrigen und 7,1 % für den hohen Messbereich beträgt, sind ausreichend gut. Dies gilt aber nur, wenn die Eichkurve bei jedem Lauf neu erstellt wird, da sich tagesabhängige Unterschiede in der Steigung von bis zu 30 % ergaben.

Die Ursache für die tendenziell zu niedrige Messung der externen Richtigkeits-Kontrollen ist höchstwahrscheinlich in der Verwendung unterschiedlicher Standardmaterialien zu suchen. Diese mangelnde Standardisierung bestätigte die Notwendigkeit, einen eigenen Referenzbereich zu erstellen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das hier vorgestellte Laborverfahren für die Homocysteinbestimmung gut geeignet ist. Die Methode ist thiol-spezifisch und sensitiv (Detektionslimit 0,5 µmol/L), zuverlässig, präzise und für Laborpersonal mit HPLC-Erfahrung einfach zu handhaben. Die maximal mögliche Probenanzahl von etwa 40 pro Tag ist derzeit ausreichend.

Zwei der bisher veröffentlichten Methoden kommen ohne vorausgehende Probenaufarbeitung aus.<sup>12,51</sup> Dies erlaubt eine vollautomatische Homocysteinbestimmung, was v. a. bei hohem Probenaufkommen interessant sein könnte.

Fiskerstrand et al.<sup>12</sup> arbeiten mit einer vollautomatischen HPLC-Anlage und dem Fluoreszenz-reagenz Bromobiman, das auch bei Raumtemperatur reaktiv ist. Mit dieser Methode können 70 Proben pro Tag gemessen werden. Sie ist allerdings sehr empfindlich für leichte Veränderungen in der Zusammensetzung der Reagenzien für den Eluenten.

Mit dem 1996 von Shipchandler u. Moore vorgestellten Immunoassay<sup>51</sup> können 20 Proben in

der Stunde verarbeitet werden. Den Vorteilen der einfachen Handhabung und des großen Probendurchlaufs steht allerdings der hohe Preis gegenüber. Bei der HPLC-Bestimmung sind die Sachkosten wesentlich geringer. Der personelle Aufwand ist größer, was aber wegen der relativ geringen Probenanzahl im Augenblick keine Rolle spielt.

Der Homocystein-Immunoassay hat im Vergleich zu den anderen Verfahren den Nachteil, dass er weitere Sulfhydryl-Verbindungen des Blutes wie Cystein und Glutathion nicht quantifizieren kann, im Gegensatz zu den HPLC-Methoden, bei denen spezifisch die SH-Gruppe mit Derivatisierungsreagenz umgesetzt wird, oder der GC/MS, mit der derzeit auch schon Methionin, Cystathionin, Methylmalonsäure und andere Verbindungen, die mit dem Homocystein-stoffwechsel in Verbindung stehen, gemessen werden können.<sup>59</sup> Die Bestimmung von Cystein ist z. B. dann interessant, wenn bei erhöhten Homocysteinwerten Verdacht auf Vitamin-B<sub>6</sub>-Mangel oder CBS-Defekt besteht, weil der Quotient von Cystein und Homocystein die Aktivität des Transsulfurierungsweges widerspiegelt.<sup>6</sup>

Wenn Homocystein in absehbarer Zeit als Parameter der Arteriosklerose- oder Thrombose-Diagnostik anerkannt wird, wird sich wohl der bei hohem Probenaufkommen leistungsfähigere Immunoassay durchsetzen. Im Augenblick sind jedoch die HPLC-Verfahren weit verbreitet und werden auch im Rahmen großer Untersuchungen wie z. B. der Framingham-Studie<sup>54,60</sup> für die Messung von Homocystein verwendet.

Im August 1999 wurde eine Studie veröffentlicht, in der die Homocysteinbestimmung vierzehn internationaler Laboratorien bezüglich Präzision und Wiederfindung verglichen wurde.<sup>42a</sup> Dabei kamen acht analytische Verfahren zur Anwendung. Als beste Methoden erwiesen sich die HPLC-FD mit TCEP (Tris-(2-Carboxyethyl)-Phosphin) als Reduktions- und SBD-F als Derivatisierungsreagenz und der Immunoassay von Abbott.<sup>51</sup>

Kontrollwerte waren die Messergebnisse der GC/MS. Die Autoren betonen aber, dass bisher keine endgültig evaluierte Referenzmethode für die Homocysteinbestimmung existiert.

Insgesamt zeigten sich in der Studie gravierende Unterschiede in der Messgenauigkeit, sowohl im Vergleich der Laboratorien als auch der Methoden. Gefordert werden deshalb eine Standardisierung der Verfahren und der Referenzmaterialien sowie häufigere externe Qualitätskontrollen.

## 5.2 Problematik der Probengewinnung

### 5.2.1 Stabilität der Homocysteinkonzentration in verschiedenen Blutabnahmesystemen

Die Tatsache, dass sich die Homocysteinkonzentration stark ändert, wenn man Vollblutproben einige Stunden bei Raumtemperatur stehen lässt, wird in vielen Veröffentlichungen erwähnt,<sup>12,24,35,59,61</sup> und konnte auch von uns bestätigt werden. Wir fanden in EDTA-Blut einen Anstieg um bis zu 100 % in sechs Stunden, und auch in mit Natrium-Fluorid oder Heparin stabilisiertem Blut betrug er bis zu 88 % (Abbildung 4-6).

Von Møller u. Rasmussen<sup>35</sup> stammt die bisher einzige Veröffentlichung zum Thema 'Stabilisierung der Homocysteinkonzentration in Vollblutproben'. Sie verwendeten ein Gemisch aus Heparin und Natrium-Fluorid (NaF) mit einer Endkonzentration von 4 g NaF/L und konnten damit einen signifikanten Konzentrationsanstieg für die Dauer von zwei Stunden nach der Blutentnahme verhindern. Allgemein empfohlen wird sonst die Blutabnahme auf Eis und die möglichst schnelle Abtrennung des Plasmas von den Blutzellen, das dann etwa 24 Stunden bei Raumtemperatur stabil ist.<sup>12,25,59,61</sup>

Bei den Stabilitätsversuchen mit Vollblutproben fiel auf, dass das Ausmaß der Veränderung der Homocysteinkonzentration von Probe zu Probe sehr unterschiedlich und damit nicht vorherseh- oder berechenbar war. Fiskerstrand et al.<sup>12</sup> zeigten anhand von 40 Proben, dass nur der relative Konzentrationsanstieg verschieden, der absolute aber - unabhängig von der Ausgangskonzentration - ziemlich konstant ist.

In isolierten Erythrozyten, die bei Raumtemperatur stengelassen wurden, fanden wir eine prozentual größere Zunahme der Homocysteinkonzentration mit der Zeit als in Vollblutproben (130 % vs maximal 100 %, vgl. Abbildung 4-7). Die Homocysteinkonzentration war dabei in den Erythrozyten niedriger als im Plasma, so dass von einem Konzentrationsgradienten zwischen Blutzellen und -plasma auszugehen ist.

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass Homocystein wohl intraerythrozytär produziert und dann aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten in das Plasma exportiert wird. Da die Zellmasse (= Hämatokrit) und damit die Homocysteinproduktion bei allen Blutproben ähnlich ist, wird die Verfälschung der Plasmawerte umso größer sein, je geringer die Homocysteinkonzentration ist.

Dieses Modell macht auch verständlich, warum herkömmliche Stabilisatoren wie EDTA oder Natrium-Fluorid den Konzentrationsanstieg von Homocystein im Vollblut nicht verhindern

können, denn sie inhibieren nur plasmatische, nicht aber intrazelluläre Enzyme.

Hiervon ausgehend entstand die Idee, die Blutzellen zu lysieren, um damit einerseits den Transport von Homocystein aus den Zellen heraus unwirksam, und andererseits die nun freigesetzten intrazellulären Enzyme den stabilisierenden Reagenzien besser zugänglich zu machen. Andere Mitarbeiter des Instituts<sup>43</sup> entwickelten ein Gemisch aus Zitronensäure und EDTA, mit dem die Homocysteinkonzentration im Lysat tatsächlich 48 Stunden bei Raumtemperatur konstant blieb (Abbildung 4-6). Auch weitere Versuche mit einer größeren Probenanzahl bestätigten die sehr gute Stabilität von Homocystein in lysiertem Vollblut.<sup>43</sup>

Die Vorteile einer ausreichend langen Stabilisierung von Homocystein in der Zeitspanne zwischen Blutabnahme und Aufarbeitung im Labor sind zahlreich. Für den in der Klinik tätigen Arzt ist es eine große Arbeitserleichterung, das Blut nicht mehr auf Eis legen und für einen raschen Transport in das Labor sorgen zu müssen. Im ambulanten Bereich wird die Untersuchung des Risikofaktors Homocystein dadurch überhaupt erst möglich. Die Vereinfachung der Probengewinnung verringert außerdem die Fehlermöglichkeiten im präanalytischen Bereich und erhöht damit die Aussagekraft der gemessenen Werte.

Die Probenaufarbeitung und -messung mit der HPLC-FD sind für Plasma- und Lysatproben praktisch gleich (Abbildungen 4-3 und 4-5). Lediglich der Eluentengradient muss etwas abgeändert werden, da eine bessere Trennung des großen Glutathion-Peaks von den anderen Substanzen notwendig ist. Außerdem empfiehlt es sich, die Säule nach jeder Serie (ca. 30 - 40 Proben) gründlich zu spülen, da die Lysatproben Blutbestandteile enthalten, die sich auf der Säule anreichern und dann zu Peakveränderungen führen können.

### 5.2.2 Abnahmebedingungen

Die Blutentnahme für die klinische Erprobung erfolgte teilweise an nicht nüchternen Probanden.

Aus der Literatur geht hervor, dass der individuelle Homocysteinwert nur wenig<sup>29,59</sup> oder gar nicht<sup>32,37</sup> von der Nahrungsaufnahme beeinflusst wird. Der Eiweiß- (Methionin-) gehalt scheint dabei die entscheidende Rolle zu spielen, denn in verschiedenen Untersuchungen zeigte sich nach dem Frühstück keine Veränderung der Homocysteinkonzentration,<sup>29</sup> während der Verzehr einer proteinreichen vollen Mahlzeit zu einer Erhöhung um bis zu 15 % mit einem Maximum nach sechs bis acht Stunden führte.<sup>59</sup>

Die Blutproben für unsere Untersuchung wurden in der Regel zwischen 8 und 10 Uhr vormittags von Patienten gewonnen, die ein kohlenhydratreiches, aber proteinarmes (Krankenhaus-) Frühstück zu sich genommen hatten. Eine gravierende Verfälschung der Werte durch hohe Eiweißaufnahme ist also ausgeschlossen.

Wie bei den meisten bisher veröffentlichten Untersuchungen an Patienten wurde auch bei uns kein Methionin-Belastungstest durchgeführt. Es ist auch noch nicht geklärt, ob dieser notwendig ist, bzw. welche Indikationen für ihn bestehen, da sich der Nüchtern- und der PML- (post-methionine load-) Wert häufig proportional zueinander verhalten.<sup>17,37</sup>

Allerdings wären in der NHLBI Family Heart Study<sup>8</sup> über 40 % und im European Concerted Action Project<sup>17</sup> 27 % der Probanden ohne den Methionin-Belastungstest nicht als hyperhomocysteinämisch klassifiziert, also "übersehen" worden. Die klinische Relevanz der PML-Hyperhomocysteinämie wurde in der letztgenannten Studie<sup>17</sup> untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Nüchtern- und die PML-Hyperhomocysteinämie sowohl unabhängig voneinander das Arteriosklerose-Risiko um den Faktor 1,5 bzw. 1,6 erhöhen als auch multiplikativ wirken und dann eine Gefäßerkrankung 2,5-mal wahrscheinlicher machen.

Die Pathophysiologie legt nahe, dass es sich um zwei verschiedene Ursachen der Hyperhomocysteinämie handelt, wobei erhöhte Nüchternwerte wohl Störungen der Remethylierung (Folsäure- und Vitamin-B<sub>12</sub>-Mangel oder MTHFR-Defekt) widerspiegeln, während Defekte des Transsulfurierungsweges (Vitamin-B<sub>6</sub>-Mangel und CBS-Defekt) hauptsächlich nach Methionin-Belastung offensichtlich werden. Insofern haben Mayer et al.<sup>32</sup> zwar recht, wenn sie eine einmalige Nüchternprobe für den "most cost-effective test" halten, jedoch bleibt so möglicherweise eine große Risikogruppe unberücksichtigt.

Die Ergebnisse unserer klinischen Erprobung beziehen sich nur auf Nüchternwerte, so dass die von uns berechnete Prävalenz der Hyperhomocysteinämie bei Gefäßpatienten (33 %) möglicherweise zu niedrig angesetzt ist.

### 5.3 Diskussion der klinischen Evaluierung

#### 5.3.1 Fehlermöglichkeiten und Einschränkungen des Aussagewertes

Eine große Fehlerquelle liegt sicherlich im präanalytischen Bereich, bedingt durch die zeitabhängige Instabilität der Homocysteinkonzentration in den Blutabnahmeröhrchen.

Unsere Vorgabe an die Stationen war ein maximales Zeitintervall von einer Stunde vom Zeitpunkt der Blutentnahme bis zur Abtrennung des Plasmas von den Blutzellen im Labor. Es war allerdings nicht möglich, die Einhaltung dieser Vorgabe zu überprüfen, so dass eine Erhöhung einzelner Homocysteinwerte durch Fehler im präanalytischen Bereich nicht auszuschließen ist.

Die Vorgehensweise bei der Patientenuntersuchung war retrospektiv im Sinne einer Fall-Kontroll-Studie, d. h. bereits erkrankte Personen wurden "definiert gesunden" gegenübergestellt und bezüglich ihrer Homocysteinwerte verglichen. Das Ergebnis stellt also eine Momentaufnahme dar, deren Aussage darauf beschränkt ist, ob Gefäßkranke höhere Homocysteinwerte als Gefäßgesunde haben. Rückschlüsse auf einen ursächlichen Zusammenhang von Homocystein und Arteriosklerose lässt die Untersuchung nicht zu.

Die beiden untersuchten Gruppen unterschieden sich stark bezüglich ihrer Anzahl und Altersverteilung (Tabelle 4-2, Abbildung 4-8). So waren z. B. 56 % der Patienten, aber nur 16 % der Teilnehmer am Referenzkollektiv älter als 65 Jahre. Auch waren die Kreatinin-Mittelwerte der Kollektive selbst dann noch signifikant verschieden, wenn nur Patienten mit normalen Kreatininwerten, die innerhalb des Referenzbereiches lagen, ausgewählt wurden. Dieser Effekt ist zumindest teilweise auf den altersabhängigen Anstieg der Kreatininkonzentration zurückzuführen, möglicherweise auch auf eine Schädigung der Nieren durch die Grundkrankheit Arteriosklerose.

Ein „Pair-Matching“, also eine individuelle Zuordnung von "Fällen" zu "Kontrollen" war deshalb nicht möglich. Stattdessen wurden das Patienten- und das Referenzkollektiv in ihrer Gesamtheit miteinander verglichen.

### 5.3.2 Ergebnisse

Unsere Untersuchung an Patienten mit arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen ergab für sie im Vergleich mit einem gefäßgesunden Referenzkollektiv signifikant höhere Homocysteinwerte ( $14,1 \pm 6,6$  vs  $11,0 \pm 3,9$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $p = 0,0005$ ). Allerdings war eine Überlappung der beiden Kollektive, gemessen am Mittelwert und der Standardabweichung ihrer Homocystein-Konzentration, festzustellen. Die multiple lineare Regressionsanalyse, in der die Homocystein-Mittelwerte rechnerisch an die Einflussfaktoren Alter, Folat und Kreatinin angeglichen wurden, hob den Unterschied zwischen den Kollektiven sogar völlig auf. Die Aussagekraft dieser Rechnung wird jedoch dadurch eingeschränkt, dass sich das Patienten- und das Referenzkollektiv bezüglich der unabhängigen Variablen Alter und Kreatinin und der Anzahl der Teilnehmer stark unterschieden. Der Wert der multiplen linearen Regressionsanalyse ist deshalb eher in der Bewertung der Einfluss-Stärke der einzelnen Faktoren zu sehen.

Die Verteilung der Homocysteinwerte in den beiden Kollektiven lässt eine differenziertere Betrachtung zu. Dabei fällt auf, dass der größere Teil der Patientenwerte (88 %) ebenso wie die Homocysteinwerte des Referenzkollektivs normalverteilt war. Der Mittelwert dieser Gruppe mit Homocysteinwerten bis  $21,2$   $\mu\text{mol/L}$  lag bei  $12,3$   $\mu\text{mol/L}$  und damit über dem des Referenzkollektivs, der  $11,0$   $\mu\text{mol/L}$  betrug. 12 % der Patientenwerte lagen jenseits der Normalverteilung und waren teils extrem hoch (höchster Wert  $42,7$   $\mu\text{mol/L}$ ). Es zeigte sich also im Patientenkollektiv eine Verschiebung zu den hohen Werten hin, die auch durch den vom Median ( $12,1$   $\mu\text{mol/L}$ ) stark abweichenden Mittelwert ( $14,1$   $\mu\text{mol/L}$ ) repräsentiert wird. Im Referenzkollektiv entsprachen sich Mittelwert und Median dagegen weitgehend ( $11,0$  und  $10,6$   $\mu\text{mol/L}$ ). Auch wenn sowohl das Durchschnittsalter als auch das -kreatinin bei den Patienten mit Homocysteinwerten über  $21,2$   $\mu\text{mol/L}$  signifikant höher als bei denen mit Werten bis  $21,2$   $\mu\text{mol/L}$  waren, können die Homocystein-Extremwerte jenseits der Normalverteilung nicht allein mit dem Einfluss dieser Faktoren erklärt werden. Eher ist an eine zweite Verteilung zu denken, die eine Gruppe von Patienten repräsentiert, deren Hyperhomocysteinämie eine andere Ursache als der der Mehrheit der Patienten zugrunde liegt (vgl. 5.3.4).

Eine geringe Trennschärfe bezüglich des Homocysteinwertes zwischen Patienten und Kontrollen fand sich auch in vielen anderen Studien, die trotzdem zur Anerkennung von Homocystein als signifikanten Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen führten.<sup>7,17,54</sup> Nur zwei der großen Studien konnten keinen<sup>1</sup> bzw. nur einen schwachen, nicht signifikanten<sup>60</sup> Zusammenhang zwischen der Homocystein-Konzentration im Blut und Gefäßerkrankungen

feststellen. Insgesamt zeigt sich aber, dass die Grenze zwischen "normal" und "nicht normal" bei dem Parameter Homocystein schwer zu ziehen und damit auch der Nachweis, dass Homocystein eine kausale Beziehung zur Entstehung oder Progression der Arteriosklerose aufweist, schwierig zu erbringen ist.

Wird ein neuer möglicher Risikofaktor für eine Krankheit entdeckt, muss dessen Unabhängigkeit von bzw. Wechselwirkung mit den schon bekannten Einflussfaktoren abgeklärt werden. Im Falle von Homocystein ist dies nicht einfach, weil die klassischen kardiovaskulären Risiko-faktoren Rauchen, Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie ebenso wie die Volkskrankheit Arteriosklerose in unserer Wohlstandsgesellschaft sehr verbreitet sind.

Da für unsere Auswertung viele Daten nachträglich aus Krankenakten herausgesucht wurden, war eine vollständige Erhebung des kardiovaskulären Risikoprofils nicht möglich. So waren z. B. bei nur wenigen Patienten die Harnsäure-, Cholesterin-, Triglycerid- und Lp(a)-Werte bestimmt worden, und eine Adipositas war häufig nicht durch Gewichts- und Größenmessung objektiviert. Angaben über die Diagnosen Hypertonie und Diabetes mellitus, über Nikotinabusus und eine positive Familienanamnese bezüglich Gefäßerkrankungen lagen dagegen für alle Patienten vor (Tabelle 4-5).

In unserem Untersuchungskollektiv wurde lediglich für Lp(a) eine signifikante Korrelation mit der Homocysteinkonzentration im Plasma gefunden ( $p = 0,0384$ ). Diese war allerdings negativ, was den Ergebnissen anderer Autoren widerspricht. Zwischen den Cholesterin- bzw. Triglycerid- und den Homocysteinwerten bestand kein Zusammenhang (Tabelle 4-3).

Von McCully<sup>33</sup> und Harpel et al.<sup>19</sup> wurden experimentelle und klinische Untersuchungen durchgeführt, die das atherogenetische Zusammenwirken von Blutfetten bzw. Lp(a) und Homocystein erklären.

McCully<sup>33</sup> vermutet, dass Homocystein die Lp(a)-Konzentration erhöht, indem es LDL derart modifiziert, dass dieses mit der "kringle"-Domäne des apo(a)-Proteins unter Bildung von Lp(a) reagiert. Diese sogenannte Homocysteinylierung soll auch die Aggregation der Lipoproteine und deren Aufnahme Makrophagen fördern. Außerdem soll Homocystein selbst über eine Bindung an LDL in die Gefäßwände eingeschleust werden und dort verstärkte Oxidationsprozesse initiieren.

Harpel et al.,<sup>19</sup> die den Zusammenhang von Lp(a) und Homocystein experimentell untersucht haben, fanden heraus, dass Homocystein auch in niedriger Konzentration die Affinität von Lp(a) zu Fibrin vergrößert. Da apo(a) aber mit Plasminogen um die gleiche Bindungsstelle an Fibrin konkurriert, verhindert eine Besetzung durch apo(a) die plasminogenvermittelte

Spaltung dieses Bestandteils von Blutgerinnseln. Diese Vorgänge könnten eine biochemische Erklärung für den Zusammenhang zwischen Homocystein und Thrombophilie darstellen.

Was die anderen kardiovaskulären Risikofaktoren betrifft, so hatten bei unserer Untersuchung Patienten mit Bluthochdruck oder Diabetes mellitus im Mittel höhere Homocysteinwerte als die Gesamtheit und diejenigen mit Nikotinabusus oder einer positiven Familienanamnese bezüglich Gefäßerkrankungen. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

In der Literatur werden gelegentlich Zusammenhänge mit Bluthochdruck,<sup>17,31,39</sup> Rauchen<sup>17,39</sup> und Cholesterin<sup>39,64</sup> beschrieben. Bei den 16 176 gesunden Teilnehmern der Hordaland Homo-cysteine Study<sup>39</sup> fand man z. B. eine starke Assoziation der HomocysteinKonzentration mit Rauchen, und zwar hauptsächlich bei aktiven Rauchern, aber kaum bei Personen, die das Rauchen aufgegeben hatten. Die HomocysteinKonzentration stieg dabei fast proportional mit der Anzahl der täglich konsumierten Zigaretten an. Auch das Geschlecht, das Alter, eine bestehende Hypercholesterinämie, Bluthochdruck und Bewegungsmangel waren in dieser Untersuchung mit dem Homocysteinwert im Plasma korreliert. Im European Concerted Action Project,<sup>17</sup> das 1550 Personen umfasste, war das relative Risiko, eine arteriosklerotische Gefäß-erkrankung zu entwickeln, mehr als multiplikativ vergrößert, wenn zusätzlich zur Hyperhomo-cysteinämie auch noch ein Bluthochdruck oder Nikotinabusus vorlagen. Erhöhte Homo-cysteinwerte allein stellten aber sowohl in dieser als auch in vielen anderen Studien<sup>7,38,42,48,54</sup> immer auch ein unabhängiges Risiko für Arteriosklerose dar.

Für die verschiedenen Diagnosen AVK, KHK, Karotisstenose und Bauchortenaneurysma konnten wir keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Homocysteinwertes feststellen. Innerhalb der Gruppe von KHK-Patienten stieg er allerdings mit der Anzahl der stenosierten Gefäße an (Tabelle 4-7), ein Trend, der auch von Pels et al.<sup>41</sup> bestätigt wird, die 334 Patienten koronarangiografisch untersuchten und zusätzlich deren HomocysteinKonzentrationen bestimmten. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Nygård,<sup>38</sup> der in seiner Untersuchung an KHK-Patienten eine nur schwache Korrelation des Homocysteinwertes mit dem Ausmaß der Koronarsklerose fand, aber eine starke mit der Mortalität und der Wahrscheinlichkeit, einen Herzinfarkt zu erleiden. Er zog daraus den Schluss, dass Homocystein eher ein Risikofaktor für die akuten Komplikationen (z. B. Herzinfarkt) als für die chronische Entstehung der Arteriosklerose sein könnte. Interessant sind diese Vermutungen auch deshalb, weil die Hyperhomocysteinämie in letzter Zeit vermehrt mit thromboembolischen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wird,<sup>11,20</sup> ein Aspekt, der in unserer Untersuchung unberücksichtigt blieb.

### 5.3.3 Ermittlung eines Referenzbereiches

Um den Referenzbereich für einen klinisch-chemischen Parameter festzulegen, wird üblicherweise ein gesundes bzw. ein die Allgemeinbevölkerung repräsentierendes Kollektiv, in dem die Werte normalverteilt vorliegen, zu Hilfe genommen. Die 90. oder 95. Perzentile<sup>49,54</sup> oder der Mittelwert mit ein oder zwei Standardabweichungen<sup>27</sup> liefern dann den oberen Grenzwert für diesen Parameter. Voraussetzung für die Probanden unseres Referenzkollektives, dessen Homocysteinwerte die Grundlage für den Referenzbereich liefern sollten, war eine leere Anamnese und teilweise ein durch klinische Untersuchung gesicherter Ausschluss einer Gefäßerkrankung. Als weiteres Einschlusskriterium wurde eine normale Nierenfunktion, repräsentiert durch eine normale Kreatininkonzentration im Serum, gefordert.

Die Auswertung der Daten ergab eine signifikante Korrelation des Homocysteinwertes mit der Kreatinin- und der Folsäurekonzentration im Serum ( $p < 0,0001$  bzw.  $p = 0,0279$ ; Tabelle 4-3), dem Alter ( $p < 0,0001$ ) und dem Geschlecht (Abbildung 4-11). Die Regressionsanalyse (Tabelle 4-4) erlaubte dabei auch eine Abschätzung der Einfluss-Stärke in Zahlen. Nach unseren Ergebnissen erhöht sich der Homocysteinwert bei einem Anstieg der Kreatininkonzentration um 1 mg/dL um 1,7 bis 6,4  $\mu\text{mol/L}$  und bei einem Anstieg des Alters um 10 Jahre um 0,8 bis 3,4  $\mu\text{mol/L}$ ; steigt die Folsäurekonzentration um 10 ng/dL, so fällt der Homocysteinwert um 2 bis 7  $\mu\text{mol/L}$ . (Die angegebenen Bereiche gelten für Homocysteinwerte zwischen 10 und 40  $\mu\text{mol/L}$ .) Da diese Einflüsse auch bei Gesunden festzustellen sind, muss diskutiert werden, inwieweit das Alter, das Geschlecht, der Kreatinin- und der Folsäurewert bei der Erstellung eines Referenzbereiches für Homocystein zu berücksichtigen sind.

In den meisten Veröffentlichungen werden das Serum-Kreatinin und das Vitamin Folsäure als die wichtigsten die Homocysteinkonzentration beeinflussenden Parameter beschrieben. Bei Wu et al.<sup>64</sup> war z. B. Kreatinin der stärkste Einflussfaktor, danach folgten die Vitamine Folsäure und B<sub>12</sub>, die Harnsäure, das Geschlecht und zuletzt die Plasmaproteine. Das Alter war in dieser Untersuchung nicht signifikant mit dem Homocysteinspiegel korreliert.

Andere Autoren fanden zwar einen deutlichen Anstieg von Homocystein mit dem Alter - oft auch unabhängig von der Konzentration der B-Vitamine im Serum - ,<sup>27,44,49</sup> Joosten et al.<sup>27</sup> konnten jedoch zeigen, dass nach einer dreiwöchigen Vitaminsubstitution die Homocysteinwerte der älteren Personen das gleiche Niveau wie die der jungen erreichten. Das bedeutet, dass erhöhte Homocysteinwerte bei alten Menschen zwar häufig, aber nicht als normal anzusehen sind! Die Ursache könnte ein funktioneller Vitaminmangel bei alten Menschen im Sinne einer Verwertungsstörung sein, der sich in der Serumkonzentration der

Vitamine nicht widerspiegelt.<sup>27</sup> Altersgebundene Referenzintervalle für Homocystein sind also nicht sinnvoll - ganz im Gegenteil. Homocystein könnte - ähnlich wie Methylmalonsäure<sup>27</sup> - als Marker für den tatsächlichen Vitaminbedarf dienen, mit höherer Aussagekraft als die Serumwerte der Vitamine selbst.

Die Kreatininwerte sind, auch bei Nierengesunden, stark mit den Homocysteinwerten korreliert. Dafür gibt es zwei verschiedene Gründe: Erstens ist die Bildung von Homocystein aus Methionin an die Kreatin-Kreatinin-Synthese gekoppelt, und zweitens findet der Abbau von Homocystein zu Cystein durch die  $\beta$ -Cystathionin-Synthase in der Niere statt<sup>9</sup> und ist damit bei Einschränkung der Nierenfunktion vermindert. Diese biologischen Mechanismen machen es nötig, den Kreatininwert bei der Beurteilung des Homocysteinwertes immer mit einzubeziehen.

Die Verknüpfung der Homocystein- mit der Kreatin-Kreatinin-Synthese bedingt, dass Frauen wegen ihrer geringeren Muskelmasse etwa 20 % (Abbildung 4-9)<sup>32,44</sup> niedrigere Homocystein-werte als Männer haben. Ein weiterer Grund für diesen geschlechtsspezifischen Unterschied scheint auch der weibliche Hormonhaushalt zu sein, denn bei schwangeren und prämeno-pausalen Frauen wurden geringere Homocysteinkonzentrationen als bei postmenopausalen gefunden.<sup>29</sup> Andersson et al.<sup>3</sup> konnten in einer Untersuchung von 169 Personen diese Abhängigkeit der Homocysteinkonzentration vom Geschlecht und dem Hormonstatus allerdings nicht bestätigen, und Refsum et al.,<sup>46</sup> die an 11 425 Teilnehmern der Hordaland-Studie den Einfluss des Geschlechts bei hohen und niedrigen Homocysteinkonzentrationen getrennt untersucht hatten, stellten einen Zusammenhang nur für den niedrigen Bereich fest. Die Ergebnisse sprechen dafür, die Homocystein-Grenzwerte prämenopausal geschlechts-spezifisch festzulegen, wohingegen für ältere Personen keine Unterscheidung notwendig zu sein scheint.

Von vielen Autoren wird die Folsäure für den wichtigsten Prädiktor der Homocysteinkonzentration gehalten. Eine folatwirksame Vitamineinnahme beeinflusst - im Gegensatz zum Geschlecht - den Homocysteinspiegel über die gesamte Verteilung.<sup>46</sup> Da 60 - 80 % der Bevölkerung dieses Vitamin nicht in ausreichender Menge konsumieren,<sup>10</sup> muss man davon ausgehen, dass auch klinisch gesunde Probanden ein Folatdefizit haben können. Deswegen ist die Berücksichtigung des Folsäurespiegels bei der Erstellung eines Referenzbereiches für Homocystein eine *conditio sine qua non*.

Der Einfluss von Vitamin B<sub>12</sub> auf die Homocysteinkonzentration ist wohl geringer als der der Folsäure. Bei den von uns untersuchten 39 Proben war die Korrelation nicht signifikant ( $p = 0,0658$ ; Tabelle 4-3). Weil Vitamin B<sub>12</sub> aber wie die Folsäure bei der Remethylierung

von Homocystein zu Methionin als Cofaktor benötigt wird, ist es für den Nüchternwert wichtig und sollte deshalb miteinbezogen werden.

Wir berücksichtigten den Vitaminstatus im Referenzkollektiv, indem Probanden mit Folat- und Vitamin-B<sub>12</sub>-Werten außerhalb oder am unteren Ende des Referenzbereiches ausgeschlossen wurden. Der Homocystein-Mittelwert im Referenzkollektiv betrug dann  $10,5 \pm 2,7$  statt  $11,0 \pm 3,9$   $\mu\text{mol/L}$ , wenn lediglich Anamnese, klinische Untersuchung und ein normaler Kreatininwert Einschlusskriterien waren.

Rasmussen et al.<sup>44</sup> haben bisher die überzeugendste Untersuchung zur Erstellung eines Referenzbereiches für Homocystein durchgeführt. 235 Personen nahmen dafür ein bis zwei Wochen lang Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub> ein. Beim Vergleich der Ausgangswerte von Homocystein mit denen nach Substitution konnten "weak" und "strong responders" unterschieden werden, je nachdem wie stark die Homocysteinkonzentration gesunken war. Die Forschergruppe definierte die Grenzwerte dann ausgehend von den "weak responders" vor der Substitution, da diese am ehesten ein normales und gesundes Kollektiv mit normalen Vitamin-spiegeln repräsentieren. Es ergab sich folgender alters- und geschlechtsgebundener Referenzbereich: Der Grenzwert für Personen unter 30 Jahren betrug  $8,1$   $\mu\text{mol/L}$ , für Frauen und Männer bis 60 Jahre  $7,9$  bzw.  $11,2$   $\mu\text{mol/L}$  und für über 60-jährige  $11,9$   $\mu\text{mol/L}$ . Dies sind im Vergleich zu den bisher als obere Grenze empfohlenen  $15$   $\mu\text{mol/L}$ <sup>34,39,59</sup> sehr niedrige Werte.

Wenn man von unseren Daten die 95. Perzentile des "Referenzkollektives mit ausreichendem Vitaminstatus" (d. h. Folsäure  $> 4$   $\text{ng/mL}$  und Vitamin B<sub>12</sub>  $> 250$   $\text{pg/mL}$ ) nimmt, erhält man einen oberen Grenzwert von  $15$   $\mu\text{mol/L}$  für beide Geschlechter zusammen,  $13,5$   $\mu\text{mol/L}$  für Frauen und  $15,6$   $\mu\text{mol/L}$  für Männer (Tabelle 4-6). Die Werte liegen in einem ähnlichen Bereich wie die bei großen Studien gefundenen<sup>38,42,54</sup> und um einiges höher als die von Rasmussen et al.<sup>44</sup> festgelegten. Der von uns schließlich eingeführte obere Grenzwert beträgt  $15$   $\mu\text{mol/L}$ . Für prämenopausalen Frauen kann er bei  $13,5$   $\mu\text{mol/L}$  angesetzt werden.

Standardisierte und allgemein anerkannte Referenzwerte konnten bisher noch nicht erstellt werden, einerseits wegen der Bandbreite unterschiedlicher Messverfahren, andererseits wegen der Schwierigkeit, Referenzkollektive zu definieren. Auch ist noch umstritten, ob die Beziehung zwischen der Homocysteinkonzentration im Blut und dem Anstieg des Risikos für Gefäßerkrankungen linear ist, oder ob die Gefährdung erst ab einem bestimmten Schwellenwert beginnt.

Die Mehrzahl der Autoren sprechen von einem "graded risk"<sup>7,31,38,42</sup> oder "dose-response-effect"<sup>17</sup> ohne Schwellenwert. So erbrachtet eine Metaanalyse aus 27 Studien einen Anstieg

des Risikos um 60 - 80 % für jede Erhöhung des Homocysteinwertes um 5  $\mu\text{mol/L}$ .<sup>10</sup> Die Ergebnisse der Physicians' Health Study<sup>54</sup> legen dagegen nahe, dass das Risiko, einen Herzinfarkt zu erleiden, erst ab einem Homocysteinwert steigt, der die 95. Perzentile des Gesamtkollektives überschreitet (15,9  $\mu\text{mol/L}$ ).

### 5.3.4 Genträger der thermolabilen MTHFR-Variante (C677T)

Bei unserer Untersuchung von elf Genträgern der thermolabilen MTHFR-Variante hatten wir den Eindruck, dass diese eine eigene Gruppe unter den Personen mit Hyperhomocysteinämie darstellen, denn wenn wir Blutproben mit auffälligen, d. h. Homocysteinkonzentrationen über 20  $\mu\text{mol/L}$  zur molekularbiologischen Untersuchung gaben, war das Ergebnis stets positiv für die thermolabile Variante der MTHFR (Tabelle 4-9). Anscheinend sind solch hohe Werte durch "bloßen" Vitaminmangel nicht zu erreichen. Oberhalb dieses "auffälligen" Wertes von etwa 20  $\mu\text{mol/L}$  war die Homocysteinverteilung im Patientenkollektiv auch nicht mehr normalverteilt (Abbildung 4-7). Die Extremwerte jenseits der Normalverteilung, die immerhin 12 % der Patienten umfassten, ließen uns an eine zweite Verteilung innerhalb des Patientenkollektivs denken.

Wu et al.<sup>64</sup> waren die ersten, denen eine Bimodalität in der Homocysteinverteilung ihrer Patienten aufgefallen war, wobei der zweite Gipfel zweieinhalb Standardabweichungen über dem Mittelwert lag (bei etwa 25  $\mu\text{mol/L}$ ) und etwa 10 % der Untersuchten umfasste. Sie vermuteten eine genetische Ursache für diese extreme Homocysteinerhöhung, ohne aber den Nachweis durch Genanalyse zu führen, wie er von uns jetzt teilweise erbracht worden ist.

Die beiden hyperhomocysteinämischen Gruppen - also die mit genetisch bedingter und die mit Vitaminmangel-Hyperhomocysteinämie - unterscheiden sich aber nicht nur im Ausmaß ihrer Homocysteinerhöhung, sondern auch im Ansprechen auf Folat. Unser Fallbeispiel eines für die thermolabile MTHFR-Variante homozygoten Mannes zeigte deutlich, dass der Homocysteinwert mit einer hochdosierten (5 mg/d) Folsäuresubstitution innerhalb eines Monats effektiv gesenkt werden kann, aber bei Weglassen der Vitamingabe ebenso schnell auf den extrem erhöhten Ausgangswert zurückkehrt (Abbildung 4-12). Auch hatten die homozygoten Genträger in unserer Untersuchung eine im Vergleich zu den heterozygoten und der Gesamtheit der Patienten signifikant niedrigere mittlere Folatkonzentration ( $3,0 \pm 0,8$  vs  $6,4 \pm 2,4$  ng/mL,  $p = 0,0177$ ; alle Patienten  $7,7 \pm 3,8$  ng/mL), was auf einen erhöhten

Verbrauch an diesem Vitamin hindeuten könnte. Das bedeutet, dass MTHFR-Homozygote einen höheren Folatbedarf wie die Gesamtbevölkerung haben,<sup>26</sup> der durch die normale Ernährung nicht ausreichend gedeckt wird. Sie benötigen also eine Dauersubstitution, um die verminderte MTHFR-Aktivität durch einen Überschuss an dem Cofaktor Folsäure zu kompensieren. Während für die Therapie der Vitaminmangel-Hyperhomocysteinämie wohl 650 µg Folsäure pro Tag ausreichen,<sup>58</sup> werden für die genetisch bedingte 5 mg Tagesdosis empfohlen.<sup>29</sup> Unser Proband erreichte auch mit 1,5 mg Folsäure täglich eine Senkung des Homocysteinwertes in den Referenzbereich.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass ein stark erhöhter Homocysteinwert bei gleichzeitig niedrigem Folat einen homozygot vererbten Defekt der MTHFR (thermolabile Variante) als Ursache für die Hyperhomocysteinämie wahrscheinlich macht. Es ist deshalb zu überlegen, ob nicht die Einführung eines zweiten Grenzwertes bei etwa 25 µmol/L sinnvoll wäre, ab welchem an das Vorliegen der Enzymvariante gedacht und in jedem Fall der Folatspiegel im Blut kontrolliert werden sollte. Bei der entsprechenden Konstellation (hohes Homocystein und niedriges Folat) könnte dann möglicherweise auf eine molekulargenetische Untersuchung verzichtet und gleich so therapiert werden, als wäre der Gendefekt nachgewiesen worden, nämlich mit einer Folat-Dauersubstitution.

Die klinische Bedeutung des heterozygoten Erbgangs ist unklar. Bisher geht man von einer autosomal rezessiven Vererbung aus.<sup>28</sup> In unserer Untersuchung hatten die heterozygoten Genträger durchaus auffällige Werte (bis 38 µmol/L), jedoch nie so extrem hohe wie die homozygoten (Tabelle 4-9). Die mittlere Homocysteinkonzentration war bei den Homozygoten mit  $38,8 \pm 18,8$  µmol/L deutlich, aber nicht signifikant höher als bei den Heterozygoten, bei denen sie  $25,5 \pm 7,2$  µmol/L betrug ( $p = 0,1951$ ). Die Folatspiegel unterschieden sich dagegen signifikant (s.o.).

Kluijtmans et al.<sup>28</sup> konnten zeigen, dass Geno- und Phänotyp gut korrelieren, also heterozygote eine im Vergleich zu homozygoten Genträgern und Personen mit der normalen Enzymvariante mittlere Enzymaktivität haben. Unterschiedliche Folatspiegel in Abhängigkeit vom Genstatus konnte diese Forschergruppe zwar nicht feststellen, jedoch waren nur bei den Homozygoten Homocystein und Folsäure miteinander korreliert.

Jacques et al.<sup>26</sup> haben ebenfalls im Zusammenhang mit der C677T-Mutation die Abhängigkeit der Homocystein- von der Folsäurekonzentration im Blut untersucht. Dabei waren die heterozygoten Genträger nicht von den Trägern des normalen Enzyms zu unterscheiden: Beide Gruppen hatten unabhängig vom Folsäurespiegel einen ähnlichen Homocystein-Mittelwert, und bei beiden war dieser bei niedrigem Folat leicht erhöht. Die homozygoten Genträger

hatten dagegen signifikant höhere Homocysteinwerte, wenn ihr Folat Spiegel niedrig war, während sie bei hohen Folatwerten ebenfalls nicht von den anderen Genotypen zu unterscheiden waren. Jacques et al.<sup>26</sup> sprachen deshalb von der "crucial role", die die Folsäure für die Entwicklung einer Hyperhomocysteinämie bei Trägern der thermolabilen MTHFR-Variante spielt, indem sie die Ausprägung des Phänotypus' bei unterschiedlichem Genotypus bestimmt.

#### 5.4 Abschließende Betrachtung

Nach dem derzeitigen Wissensstand ist es sehr wahrscheinlich, dass sich die Homocysteinbestimmung neben der Ermittlung anderer Risikofaktoren wie Rauchen, Bluthochdruck, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus in der Diagnostik von Herz-Kreislauf-Erkrankungen etablieren wird. Voraussetzung dafür sind eine zuverlässige und unkomplizierte Präanalytik und Bestimmungsmethode.

Während mit der HPLC-Analytik ein geeignetes Messverfahren zur Verfügung gestellt werden konnte, erwies sich der präanalytische Bereich der Homocysteinbestimmung als sehr problematisch. Die Instabilität der Homocysteinkonzentration in Vollblut bei Raumtemperatur machte ein umständliches Abnahmeverfahren notwendig und stellte außerdem die Glaubhaftigkeit der gemessenen Werte in Frage. Mit der Entwicklung des Lysat-Blutabnahme-systems von Probst et al.<sup>43</sup> konnte dieses Problem jetzt gelöst und die routinemäßige Bestimmung des Risikofaktors Homocystein - auch im ambulanten Bereich, wo die Transportwege länger sind - ermöglicht werden.

Die klinische Erprobung hat deutlich gemacht, dass die Kreatinin-, Folat- und Vitamin-B<sub>12</sub>-Werte stark mit der Homocysteinkonzentration korreliert sind und deshalb in den klinisch-chemischen Befund miteinbezogen werden müssen. Die Ermittlung der sonstigen Risikofaktoren für Arteriosklerose und Thrombose durch Anamnese (familiäre Belastung, Rauchen, Diabetes, Stress), klinische Untersuchung (Adipositas, Fußpulse, Bluthochdruck, Krampfadern) und Laborwerte (Cholesterin, Triglyceride, Lp(a), Harnsäure, APC-Resistenz) ist dafür nicht nötig, da Homocystein ein unabhängiger Risikofaktor ist. In der medizinischen Gesamtbeurteilung sollten diese Faktoren allerdings schon Beachtung finden, da sie für dieselben Erkrankungen wie Homocystein prädisponieren und somit das Risiko zusätzlich erhöhen.

Wenn bei der Homocysteinbestimmung aus praktischen Gründen kein Methionin-

Belastungstest durchgeführt wird, muss klar zwischen Nüchtern- und PML-Hyperhomocysteinämie unterschieden werden. Man sollte sich in der Auswertung der Tatsache bewußt sein, dass erhöhte Homocysteinwerte nach Methionin-Belastung wahrscheinlich einen eigenen Risikofaktor mit ebenso hoher Prävalenz wie die Nüchtern-Hyperhomocysteinämie darstellen,<sup>8,17</sup> und so möglicherweise eine ganze Risikogruppe unentdeckt bleibt, wenn nur die Nüchtern-Werte untersucht werden. Die klinische Relevanz der PML-Hyperhomocysteinämie ist aber noch nicht vollständig geklärt, so dass dieses Gebiet weiterer Untersuchungen bedarf.

Im Vordergrund des Interesses steht jetzt die Therapie und damit die Frage, ob Personen mit erhöhten Homocysteinwerten von einer Senkung durch Folatsubstitution profitieren, indem die Entstehung oder das Fortschreiten einer Arteriosklerose (oder Thromboseneigung) verhindert wird. Um dies zu klären, sollte z. B. die Rezidivhäufigkeit von Patienten der Gefäßchirurgie mit und ohne Substitution beobachtet werden. Eine andere Zielgruppe könnten Genträger der thermolabilen MTHFR-Variante und deren Familien sein.

Wenn der Nutzen der Therapie bewiesen werden kann, ist auch an ein Screening für diesen kardiovaskulären Risikofaktor zu denken, einerseits von Kindern, um die genetisch bedingte Hyperhomocysteinämie frühzeitig zu erkennen, und andererseits von älteren Personen, um funktionelle Vitaminmangelzustände auszuschließen.

Die Hauptzielgruppe für eine Untersuchung auf Hyperhomocysteinämie stellen im Augenblick Patienten mit prämaturer Arteriosklerose, unklaren rezidivierenden Thrombosen oder einer auffälligen Familienanamnese bezüglich Gefäßerkrankungen dar.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Erhöhte Plasmakonzentrationen der Aminosäure Homocystein scheinen ein epidemiologisch wichtiger, unabhängiger Risikofaktor für Arteriosklerose zu sein. Dies haben mehrere große Studien, z. B. die Physicians' Health Study (1992) und das European Concerted Action Project (1997) gezeigt.

Mit der Zielsetzung, die diagnostischen Möglichkeiten der Arteriosklerose-Risikoerfassung am Klinikum rechts der Isar zu verbessern, wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation eine HPLC-Methode zur Bestimmung von Homocystein im Blut etabliert.

Für die Messung mit der HPLC wird Homocystein zunächst reduktiv aus seiner Bindung an Plasmaproteine gelöst und dann nach einem Fällungsschritt mit dem thiol-spezifischen Fluoreszenzreagenz SBD-F (7-Fluor-benzofurazan-4-sulfonsäure Ammoniumsalz) umgesetzt. Die Auftrennung der im Plasma vorhandenen Thiol-Verbindungen Cystein, Homocystein, Cysteinylglycin und Glutathion erfolgt auf einer reversed-phase-C18-Säule mit einem Acetat-Puffer als Eluent. Die Methode ist analytisch sensitiv (Detektionslimit 0,5 µmol/L), präzise (Variationskoeffizient der Interassaypräzision 7 %) und aufgrund des Reaktionsverhaltens von SBD-F thiol-spezifisch. Bei einer Laufzeit von 15 Minuten pro Probe und der entsprechenden Aufarbeitungszeit des Plasmas können etwa 40 Proben am Tag gemessen werden.

Für die Praxis der Homocysteinbestimmung stellt die mangelhafte Stabilität der Homocystein-konzentration in den Blutabnahmesystemen ein großes Problem dar. In unseren Versuchen hatte die Lagerung von nicht zentrifugiertem Vollblut bei Raumtemperatur innerhalb von sechs Stunden eine Erhöhung der Plasma-Homocysteinkonzentration um 23 bis 100 % zur Folge, selbst wenn das Blut mit verschiedenen Stabilisatoren wie EDTA oder Natrium-Fluorid ver-setzt war. Im Plasma war die Homocysteinkonzentration dagegen mindestens 48 Stunden lang bei Raumtemperatur stabil. Der Konzentrationsanstieg im Vollblut ist wohl auf die intra-erythrozytäre Produktion von Homocystein und dessen aktive Ausschleusung aus den Zellen in das Plasma zurückzuführen, was an isolierten Erythrozyten eindrücklich gezeigt werden konnte.

Durch Lagerung der Vollblutprobe auf Eis kann die Homocysteinkonzentration für kurze Zeit (ca. eine Stunde) stabil gehalten werden. Für eine korrekte Homocysteinbestimmung muss deshalb die Blutentnahme in EDTA-Monovetten auf Eis erfolgen, und die Probe innerhalb

einer Stunde der Zentrifugation und Abtrennung des Plasmas von den Blutzellen zugeführt werden.

Im Rahmen einer klinischen Erprobung wurden 231 Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit, Karotisstenose, Bauchaaortenaneurysma oder koronarer Herzkrankheit einem Referenzkollektiv von 44 gefäßgesunden Personen gegenübergestellt. Die Homocystein-Mittelwerte der beiden Kollektive -  $14,1 \pm 6,6 \mu\text{mol/L}$  und  $11,0 \pm 3,9 \mu\text{mol/L}$  - unterschieden sich signifikant ( $p = 0,0005$ ). Die Homocystein-Konzentration im Plasma war signifikant mit dem Alter ( $p < 0,0001$ ), dem Geschlecht, den Kreatinin- ( $p < 0,0001$ ) und den Folsäurewerten ( $p = 0,0279$ ) korreliert. Mit den unterschiedlichen Diagnosen oder anderen kardiovaskulären Risikofaktoren bestand kein Zusammenhang.

Als oberer Grenzwert für den Referenzbereich wurden  $15 \mu\text{mol/L}$  Homocystein im Plasma festgelegt. Dieser Wert gilt für alle Personen mit Ausnahme der prämenopausalen Frauen, für die er  $13,5 \mu\text{mol/L}$  beträgt. Die Prävalenz der Hyperhomocysteinämie war demnach im Patientenkollektiv 32,9 % und im Referenzkollektiv 13,6 %.

Zwölf Personen, die durch extrem erhöhte Homocysteinwerte aufgefallen waren, konnten mit einer molekularbiologischen Untersuchung als Genträger der thermolabilen Variante der Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) identifiziert werden, einer Enzymvariante des Folatstoffwechsels, die aufgrund ihrer verminderten Aktivität zu erhöhten Homocystein-Konzentrationen im Blut führt. Als Folge dieser Untersuchung wurde empirisch ein Markerwert bei  $25 \mu\text{mol/L}$  Homocystein eingeführt, bei dessen Überschreiten das Vorliegen des MTHFR-Defekts als Ursache der Hyperhomocysteinämie wahrscheinlich ist und molekularbiologisch überprüft werden sollte.

Die Verlaufskontrolle eines homozygoten Genträgers für die thermolabile MTHFR-Variante zeigte das gute Ansprechen dieser Personen auf Substitution mit Folsäure. Der stark erhöhte Homocysteinwert ( $42 \mu\text{mol/L}$ ) sank bei Einnahme von 1,5 mg Folsäure pro Tag innerhalb eines Monats in den Referenzbereich ( $10 \mu\text{mol/L}$ ). Nach Absetzen der Substitutionstherapie kehrte er jedoch ebenso rasch zum erhöhten Ausgangswert zurück.

Die Einführung des Parameters Homocystein in die Arteriosklerose-Diagnostik kann helfen, die Ursache bislang ungeklärter Fälle prämaturner Arteriosklerose aufzudecken. Durch Substitution von Folsäure ist möglicherweise eine nebenwirkungsarme Therapie bzw. Prophylaxe der Hyperhomocysteinämie möglich.

**7 LITERATURVERZEICHNIS**

1. Alfthan, G., Pekkanen, J., Jauhiainen, M., Pitkaniemi, J., Karvonen, M., Tuomilehto, J., Salonen, J.T., Ehnholm, C.  
Relation of serum homocysteine and lipoprotein(a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective Finnish population based study.  
*Atherosclerosis* 106 (1994) 9-19
2. Andersson, A., Brattström, L., Isaksson, A., Israelsson, B., Hultberg, B.  
Determination of homocysteine in plasma by ion-exchange chromatography.  
*Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 49 (1989) 445-450
3. Andersson, A., Brattström, L., Israelsson, B., Isaksson, A., Hamfelt, A., Hultberg, B.  
Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status.  
*Eur. J. Clin. Invest.* 22 (1992) 79-87
4. Andersson, A., Isaksson, A., Brattström, L., Hultberg, B.  
Homocysteine and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn derivatisation.  
*Clin. Chem.* 39 (1993) 1590-1597
5. Angelo, A. di, Selhub, J.  
Homocysteine and thrombotic disease.  
*Blood* 90 (1997) 1-11
6. Araki, A., Sako, Y.  
Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.  
*J. Chromatogr.* 422 (1987) 43-52
7. Arnesen, E., Refsum, H., Bonna, K.H., Ueland, P.M., Forde, O.H., Nordrehaug, J.E.  
Serum total homocysteine and coronary heart disease.  
*Int. J. Epidemiol.* 24 (1995) 704-709
8. Bostom, A.G., Jacques, P.F., Nadeau, M.R., Williams, R.R., Ellison, R.C., Selhub, J.  
Post-methionine load hyperhomocysteinemia in persons with normal fasting total plasma homocysteine: initial results from the NHLBI Family Heart Study.  
*Atherosclerosis* 116 (1995) 147-151
9. Bostom, A.G., Lathrop, L.  
Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes.  
*Kidney Int.* 52 (1997) 10-20
10. Boushey, C.J., Beresford, S.A.A., Omenn, G.S., Motulsky, A.G.  
A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes.  
*JAMA* 274 (1995) 1049-1057
11. Carson, N.A.J., Neill, D.W.  
Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland.  
*Arch. Dis. Child.* 37 (1962) 505-513

12. Fiskerstrand, T., Refsum, H., Kvalheim, G., Ueland, P.M.  
Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability.  
*Clin. Chem.* 39 (1993) 263-271
13. Fortin, L.-J., Genest, J.  
Measurement of homocyst(e)ine in the prediction of arteriosclerosis.  
*Clin. Biochem.* 28 (1995) 155-162
14. Frosst, P., Blom, H.J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C.A., Matthews, R.G., Boers, G.J., den Heijer, M., Kluijtmans, L.A., Heuvel, L.P.v.d., et al.  
A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase.  
*Nat. Genet.* 10 (1995) 111-113
15. Gerritsen, T., Vaughn, J.G., Waisman, H.A.  
The identification of homocystine in the urine.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9 (1962) 493-496
16. Goyette, P., Frosst, P., Rosenblatt, D.S., Rozen, R.  
Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency.  
*Am. J. Hum. Genet.* 56 (1995) 1052-1059
17. Graham, I.M., Daly, L.E., Refsum, H.M., Robinson, K., Brattström, L.E., Ueland, P.M., Palma-Reis, R.J., Boers, G.H.J., Sheahan, R.G., Israelsson, B., Uiterwaal, C.S., Meleady, R., McMaster, D., Verhoef, P., Witteman, J., Rubba, P., Bellet, H., Wautrecht, J.C., Valk, H.W.d., Sales Luís, A.C., Parrot-Roulaud, F.M., Kok Soon Tan, Higgins, I., Garcon, D., Medrano, M.J., Candito, M., Evans, A.E., Andria, G.  
Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European concerted action project.  
*JAMA* 277 (1997) 1775-1781
18. Gupta, V.J., Wilcken, D.E.L.  
The detection of cysteine-homocysteine mixed disulphide in plasma of normal fasting man.  
*Eur. J. Clin. Invest.* 8 (1978) 205-207
19. Harpel, P.C., Chang, V.T., Borth, W.  
Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein(a) to fibrin: a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 10193-10197
20. Heijer, M.d., Koster, T., Blom, H.J., Bos, G.M.J., Briet, E., Reitsma, P.H., Vandenbroucke, J.P., Rosendaal, F.R.  
Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis.  
*N. Engl. J. Med.* 334 (1996) 759-762
21. Homocysteine Metabolism 2nd International Conference. Nijmegen, The Netherlands, 26-29 April 1998.  
Abstracts.  
*Neth. J. Med.* 52 (1998) Suppl.: S1-63
22. Imai, K., Toyooka, T., Watanabe, Y.  
A novel fluorogenic reagent for thiols: Ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate.  
*Anal. Biochem.* 128 (1983) 471-473
23. International Conference on Homocysteine Metabolism, From Basic Science to Clinical Medicine. Ireland, July 2-6, 1995. Abstracts.  
*Ir. J. Med. Sci.* 164 (1995) Suppl. 15: 2-36

24. Jacobsen, D.W.  
Cardiovascular disorders (risk assessment).  
*Anal. Chem.* 65 (1993) 367-373
25. Jacobsen, D.W., Gatautis, V.J., Green, R., Robinson, K., Savon, S.R., Secic, M., Ji Ji, Otto, J.M., Taylor, L.M. Jr.  
Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects.  
*Clin. Chem.* 40 (1994) 873-881
26. Jacques, P.F., Bostom, A.G., Williams, R.R., Ellison, R.S., Eckfeldt, J.H., Rosenberg, I.H., Selhub, J., Rozen, R.  
Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations.  
*Circulation* 93 (1996) 7-9
27. Joosten, E., Lesaffre, R., Riezler, R.  
Are different reference intervals for methylmalonic acid and total homocysteine necessary in elderly people?  
*Eur. J. Haematol.* 57 (1996) 222-226
28. Kluijtmans, L.A.J., van den Heuvel, L.P.W.J., Boers, G.H.J., Frosst, P., Stevens, E.M.B., van Oost, B.A., den Heijer, M., Trijbels, F.J.M., Rozen, R., Blom, H.J.  
Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease.  
*Am. J. Hum. Genet.* 58 (1996) 35-41
29. Malinow, M.R.  
Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases (Frontiers in medicine).  
*J. Intern. Med.* 236 (1994) 603-617
30. Malinow, M.R., Kang, S.S., Taylor, L.M., Wong, P.W.K., Coull, B., Inahara, T., Mukerjee, D., Sexton, G., Upton, B.  
Prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with peripheral arterial occlusive disease.  
*Circ. Res.* 79 (1989) 1180-1188
31. Malinow, M.R., Nieto, F.J., Szklo, M., Chambless, L.E., Bond, G.  
Carotid artery intimal-medial wall thickening and plasma homocyst(e)ine in asymptomatic adults. The atherosclerosis risk in community study.  
*Circulation* 87 (1993) 1107-1113
32. Mayer, E.L., Jacobsen, D.W., Robinson, K.  
Homocysteine and coronary atherosclerosis.  
*JACC* 27 (1996) 517-527
33. McCully, K.S.  
Chemical pathology of homocysteine. I. Atherogenesis.  
*Ann. Clin. Lab. Sci.* 23 (1993) 477-493
34. McCully, K.S.  
Homocysteine and vascular disease.  
*Nat. Med.* 2 (1996) 386-389
35. Møller, J., Rasmussen, K.  
Homocysteine in plasma: stabilization of blood samples with fluoride.  
*Clin. Chem.* 41 (1995) 758-759
36. Morrison, H.I., Schaubel, D., Desmeules, M., Wigle, D.T.  
Serum folate and risk of fatal coronary heart disease.  
*JAMA* 275 (1996) 1893-1896

37. Nehler, M.R., Taylor, L.M. Jr., Porter, J.M.  
Homocysteinemia as a risk factor for atherosclerosis: a review.  
*Cardiovasc. Pathol.* 6 (1997) 1-9
38. Nygård, O., Nordrehaug, J.E., Refsum, H., Ueland, P.M., Farstad, M., Vollset, S.E.  
Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease.  
*N. Engl. J. Med.* 337 (1997) 230-236
39. Nygård, O., Vollset, S.E., Refsum, H., Stensvold, I., Tverdal, A., Nordrehaug, J.E., Ueland, P.M., Kvåle, G.  
Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study.  
*JAMA* 274 (1995) 1526-1533
40. Olszewski, A.J., McCully, K.S.  
Homocysteine content of lipoproteins in hypercholesterolemia.  
*Atherosclerosis* 88 (1991) 61-68
41. Pels, K., Schoebel, F.-C., Stein, D., Jax, T.W., Heins, M., Behnke, R., Reinauer, H., Strauer, B.-E., Leschke, M.  
Homocystein. Bedeutung für Schweregrad und Ausmaß der Koronarsklerose bei angiographisch definierter koronarer Herzkrankheit.  
*Münch. med. Wschr.* 139 (1997) 149-153
42. Perry, I.J., Refsum, H., Morris, R.W., Ebrahim, S.B., Ueland, P.M., Shaper, A.G.  
Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men.  
*Lancet* 346 (1995) 1395-1398
- 42a. Pfeiffer, C.M., Huff, D.L., Smith, S.J., Miller, D.T., Gunter, E.W.  
Comparison of plasma total homocysteine measurements in 14 laboratories: an international study.  
*Clin. Chem.* 45 (1999) 1261-1268
43. Probst, R., Brandl, R., Blümke, M., Neumeier, D.  
Stabilization of homocysteine concentration in whole blood.  
*Clin. Chem.* 44 (1998) 1-3
44. Rasmussen, K., Møller, J., Lyngbak, M., Holm Pedersen, A.-M., Dybkjær, L.  
Age- and gender-specific reference intervals for total homocysteine and methylmalonic acid in plasma before and after vitamin supplementation.  
*Clin. Chem.* 42 (1996) 630-636
45. Refsum, H., Helland, S., Ueland, P.M.  
Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine.  
*Clin. Chem.* 31 (1985) 624-628
46. Refsum, H., Nygård, O., Kvåle, G., Ueland, P.M., Vollset, S.E.  
The Hordaland Homocysteine Study: the opposite tails odds ratios reveal differential effects of gender and intake of vitamin supplements at high and low plasma total homocysteine concentrations.  
*J. Nutr.* 126 (1996) 1244S-1248S
47. Seidel, H.-J.  
Soziologie (Epidemiologie).  
In: „Ökologisches Stoffgebiet“,  
Reinhardt, G., Seidel, H.-J., Sonntag, H.-G., Gaus, W., Hingst, V., Mattern, R., Hippokrates Verlag  
Stuttgart, 1995, 2. Auflage, 165
48. Selhub, J., Jacques, P.F., Bostom, A.G., D'Agostino, R.B., Wilson, P.W.F., Belanger, A.J., O'Leary, D.H., Wolf, P.A., Schaefer, E., Rosenberg, I.H.  
Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis.  
*N. Engl. J. Med.* 332 (1995) 286-291

49. Selhub, J., Jacques, P.F., Wilson, P.W.F., Rush, D., Rosenberg, I.H.  
Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population.  
*JAMA* 270 (1993) 2693-2698
50. Shih, V.E., Fringer, J.M., Mandell, R., Kraus, J.P., Berry, G.T., Heidenreich, R.A., Korson, M.S., Levy, H.L., Ramesh, V.  
A missense mutation (1278T) in the cystathionine  $\beta$ -synthase gene prevalent in pyridoxine-responsive homocystinuria and associated with mild clinical phenotype.  
*Am. J. Hum. Genet.* 57 (1995) 34-39
51. Shipchandler, M.T., Moore, E.G.  
Rapid, fully automated measurement of plasma homocyst(e)ine with the Abbott Imx Analyzer.  
*Clin. Chem.* 41 (1995) 991-994
52. Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S.  
Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids.  
*Anal. Chem.* 30 (1958) 1190-1206
53. Stabler, S.P., Lindenbaum, J., Savage, D.G., Allen, R.H.  
Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency.  
*Blood* 81 (1993) 3403-3413
54. Stampfer, M.J., Malinow, M.R., Willett, W.C., Newcomer, L.M., Upson, B., Ullmann, D., Tishler, P.V., Hennekens, C.H.  
A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians.  
*JAMA* 268 (1992) 877-881
55. Stampfer, M.J., Rimm, E.B.  
Folate and cardiovascular disease. Why we need a trial now.  
*JAMA* 275 (1996) 1929-1930
56. Tsai, M.Y.  
Laboratory assessment of mild hyperhomocysteinemia as an independent risk factor for occlusive vascular diseases.  
*Clin. Chem.* 42 (1996) 492-493
57. Ubbink, J.B., Vermaak, W.J.H., Bissbort, S.  
Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum.  
*J. Chromatogr.* 565 (1991) 441-446
58. Ubbink, J.B., Vermaak, W.J.H., van der Merwe, A., Becker, P.J., Delport, R., Potgieter, H.C.  
Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans.  
*J. Nutr.* 124 (1994) 1927-1933
59. Ueland, P.M., Refsum, H., Stabler, S.P., Malinow, M.R., Andersson, A., Allen, R.H.  
Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications.  
*Clin. Chem.* 39 (1993) 1764-1779
60. Verhoef, P., Hennekens, C.H., Malinow, M.R., Kok, F.J., Willett, W.C., Stampfer, M.J.  
A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of ischemic stroke.  
*Stroke* 25 (1994) 1924-1930
61. Vester, B., Rasmussen, K.  
High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum.  
*Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 29 (1991) 549-554

62. Wilcken, D.E.L., Wilcken, B.  
The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism.  
*J. Clin. Invest.* 57 (1976) 1079-1082
63. Wilcken, D.E.L., Wilcken, B., Dudman, N.P.B., Tyrrell, P.A.  
Homocystinuria - the effects of betaine in the treatment of patients not responsive to pyridoxine.  
*N. Engl. J. Med.* 309 (1983) 448-453
64. Wu, L.L., Wu, J., Hunt, S.C., James, B.C., Vincent, G.M., Williams, R.R., Hopkins, P.N.  
Plasma homocyst(e)ine as a risk factor for early familial coronary artery disease.  
*Clin. Chem.* 40 (1994) 552-561

## 8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1-1.** Anzeige aus der BUNTEN (1996). S.3
- Abb. 1-2.** Die Strukturformeln der Aminosäuren Homocystein, Methionin und Cystein. S.7
- Abb. 1-3.** Der Homocysteinstoffwechsel. (ergänzt aus Mayer et al.<sup>32</sup>) S.8
- Abb. 4-1.** Chromatogramm bei Verwendung von **Bromobiman** als Fluoreszenzreagenz. S.29
- Abb. 4-2.** Die Reaktion von SBD-F (7-Fluor-benzofurazan-4-sulfonsäure Ammoniumsalz) mit Thiolverbindungen. S.30
- Abb. 4-3.** Chromatogramm bei Verwendung von **SBD-F** als Fluoreszenzreagenz. S.31
- Abb. 4-4.** Die Strukturformeln von N-(2-Mercaptopropionyl)-glycin und Acetylcystein, die beide als interner Standard verwendet werden können. S.31
- Abb. 4-5.** Chromatogramm einer lysierten Blutprobe. S.33
- Abb. 4-6.** Stabilität der Homocysteinkonzentration in verschiedenen Blutabnahmesystemen.
- a** Konzentrationsänderung in sechs Stunden S.35
  - b** Konzentrationsänderung in 48 Stunden
- Abb. 4-7.** Veränderung der Homocysteinkonzentration in isolierten Erythrozyten bei Raumtemperatur. S.36
- Abb. 4-8.** Altersverteilung im Patienten- und im Referenzkollektiv. S.38
- Abb. 4-9.** Homocysteinverteilung im Patienten- und im Referenzkollektiv. Darstellung als Box-and-Whisker-Diagramm. S.40
- Abb. 4-10.** Scatter-Diagramme, die die Beziehung der unabhängigen Variablen Kreatinin, Folsäure und Alter untereinander und mit der abhängigen Variablen Homocystein (Hcy) darstellen. S.41
- Abb. 4-11.** Homocystein in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht. S.43
- Abb. 4-12.** Homocystein-Perzentilen in zwei verschieden definierten Referenzkollektiven. S.46
- Abb. 4-13.** Veränderung der Homocysteinwerte eines homozygoten Genträgers der thermolabilen Variante der MTHFR unter Folsäure- bzw. Vitamin-B<sub>6</sub>-Substitution. S.50

## 9 TABELLENVERZEICHNIS

- Tabelle 4-1.** Stabilität der Homocysteinkonzentration in EDTA-Plasma bei Raumtemperatur  
*S. 34*
- Tabelle 4-2.** Angaben zum Patienten- und Referenzkollektiv *S.37*
- Tabelle 4-3.** Die Korrelation verschiedener Faktoren mit den Homocysteinwerten im Plasma  
*S.41*
- Tabelle 4-4.** Ergebnisse der multiplen linearen Regression *S.42*
- Tabelle 4-5.** Kardiovaskuläre Risikofaktoren im Patientenkollektiv *S.45*
- Tabelle 4-6.** Obere Grenzwerte für Homocystein, denen unterschiedliche Berechnungsmethoden bzw. verschieden definierte Referenzkollektive zugrunde liegen *S.47*
- Tabelle 4-7.** Mittelwerte der Homocysteinkonzentration bei verschiedenen Diagnosen *S.48*
- Tabelle 4-8.** Homocystein-, Vitamin- und Nierenfunktionswerte der drei Kinder eines homozygoten Genträgers für die thermolabile Variante der MTHFR *S.49*
- Tabelle 4-9.** Daten von elf gefäßchirurgischen Patienten, die Träger der thermolabilen Variante der MTHFR sind (C677T) *S.51*

## **DANKSAGUNG**

Herrn PD Dr. Luppä danke ich für die Bereitstellung des Themas meiner Dissertation, für die prompte Durchsicht meines Skripts und seine konstruktive Kritik.

Ich danke allen Personen ganz herzlich, die mir beim Erlernen der analytischen Methoden und der Durchführung der Messungen geholfen haben, insbesondere meinem Betreuer Dr. Reiner Probst und den chemisch-technischen Assistenten Herrn Matthias Blümke und Frau Christine Kopp. Ich habe mich in meiner Zeit am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie sehr wohlfühlt.

Weiterhin geht mein Dank an Herrn Dr. Brandl, Funktionsoberarzt in der Gefäßchirurgie am Klinikum rechts der Isar, der Mitinitiator der klinischen Erprobung war, und die Probengewinnung und Akteneinsicht stets unterstützte.

Mein Dank gilt auch Herrn Dipl.-Statistiker Michael Scholz vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München (IMSE), der mich äußerst hilfsbereit bei der Auswertung meiner Daten unterstützt hat.

Herrn Dr. B. Müller vom Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie danke ich für die Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen.

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name: Birgit Ulrike Rohland  
Geburtsdatum/ -ort: 3. April 1974 in Würzburg  
Konfession: evangelisch-lutherisch  
Eltern: Dres. med. Ingrid und Wolfram Rohland, Kinderärzte  
Geschwister: Max (geb. 1983)  
Tobias (geb. 1986)  
Felizitas (geb. 1991)  
Corinna (geb. 1993)

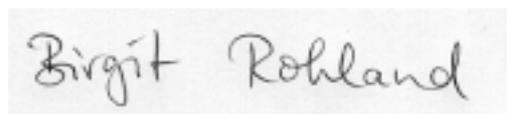
## Schulbildung

1980-1984 Gustav-Walle-Volksschule in Würzburg  
1984 Siebold-Gymnasium in Würzburg  
1985 Gymnasium bei St. Anna in Augsburg  
1986-1993 Dom-Gymnasium Freising (neusprachlicher Zweig)  
1993 Abitur (Leistungskurse: Mathematik und Französisch)

## Studium

1993-1998 Studium der Humanmedizin an der TU München  
1995 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)  
1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
1998 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
1998/99 Wechsel an die LMU München  
1998/99 Praktisches Jahr:  
Chirurgie und Geburtshilfe u. Gynäkologie im Klinikum Rosenheim  
Innere Medizin im Kreiskrankenhaus Traunstein  
11.11.1999 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Seit 15.12.1999 arbeite ich als Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Innere Medizin (Prof. Dr. H. P. Emslander) am Kreiskrankenhaus Erding.



Birgit Rohland