

**Homocystein und Metaboliten in Assoziation
zur Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen
und Progression des Nierenfunktionsverlustes
bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich – Schiller – Universität Jena

von

Marco Wolf

geboren am 11. Januar 1977 in Pößneck

Gutachter:

1. Prof. Dr. G. Stein, Jena
2. Prof. Dr. R. Fünfstück, Weimar
3. Prof. Dr. G. Kraatz, Greifswald

Tag der öffentlichen Verteidigung: 6. September 2005

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Zusammenfassung	9
2 Einleitung	11
2.1 Homocystein.....	11
2.2 Homocystein und Intermediärstoffwechsel.....	11
2.3 Modulatoren des Homocysteinspiegels.....	15
2.3.1 Geschlecht	15
2.3.2 Alter.....	15
2.3.3 Genetisch determinierte Einflussfaktoren	16
2.3.4 Vitamine	17
2.3.4.1 Vitamin B ₆	17
2.3.4.2 Vitamin B ₁₂	18
2.3.4.3 Folsäure	19
2.3.4.4 Einfluss einer Vitaminsubstitution auf die tHcy-Konzentration	19
2.3.5 Medikamente	22
2.3.6 Lebensgewohnheiten.....	23
2.4 Pathophysiologische Aspekte des Homocysteins.....	26
2.5 Beziehungen zwischen Hyperhomocysteinämie und Atherosklerose.....	28
2.5.1 Allgemeinbevölkerung	28
2.5.2 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz	29
2.6 Homocystein und chronische Niereninsuffizienz.....	30
2.7 Homocysteinbestimmung bei anderen Erkrankungen.....	34
3 Zielstellung der Arbeit	36
4 Material und Methoden	37
4.1 Materialien.....	37
4.1.1 Geräte	37

4.1.2 Chemikalien und Lösungen.....	37
4.2 Methoden.....	38
4.2.1 Probengewinnung.....	38
4.2.2 Probenvorbereitung.....	38
4.2.2.1 Probenvorbereitung zur Messung von Homocystein und Cystathionin.....	39
4.2.2.2 Probenvorbereitung zur Messung von 2-Methylzitronensäure und Methylmalonsäure.....	39
4.2.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung.....	40
4.2.4 Referenzbereiche.....	43
4.2.5 Datenerfassung.....	43
4.2.6 Bestimmung klinisch-chemischer Parameter.....	44
4.2.7 Studienpopulation.....	44
4.2.8 Renale Grunderkrankung.....	44
4.2.9 Definitionen.....	45
4.2.10 Nachbeobachtung.....	46
4.2.11 Statistische Verfahren.....	46
4.2.11.1 Test auf Normalverteilung.....	46
4.2.11.2 Lagemaße und Streuungsmaße.....	46
4.2.11.3 Korrelationen.....	47
4.2.11.4 Gruppenvergleiche.....	47
4.2.11.5 Cox-Regression.....	47
4.2.11.6 Lineare Regression.....	48
5 Ergebnisse.....	49
5.1 Biochemische und klinische Charakteristika der chronisch Niereninsuffizienten.....	49
5.1.1 Konzentrationen von Homocystein und seinen Metaboliten.....	49
5.1.2 Korrelationen von tHcy und seinen Metaboliten untereinander.....	50
5.1.3 Korrelationen von tHcy und seinen Metaboliten mit weiteren Parametern.....	50
5.1.4 Konzentrationsvergleich mit Gesunden.....	51
5.1.5 Geschlechtsunterschiede.....	52
5.1.6 Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI) in der Anamnese.....	52
5.1.7 Patienten mit zerebrovaskulärer Insuffizienz (CVI) in der Anamnese.....	53
5.1.8 Patienten mit Diabetes mellitus.....	53
5.1.9 Kardiovaskuläre Ereignisse.....	54

5.1.9.1 Retrospektive Ergebnisse	54
5.1.9.2 Prospektive Ergebnisse.....	54
5.1.9.2.1 Vergleich der Patienten mit vs. ohne kardiovaskuläres Ereignis (CVD).....	54
5.1.9.2.2 Univariate Cox-Regression	55
5.1.9.2.3 Multivariate Cox-Regression	56
5.1.10 Dialysebeginn.....	56
5.1.10.1 Univariate Cox-Regression	57
5.1.10.2 Multivariate Cox-Regression	58
5.1.11 Konzentrationsvergleich mit Hämodialysepatienten (HD).....	60
5.1.12 Hämodialysepatienten aus dem CNI-Patientenkollektiv.....	61
5.1.13 Determinanten des Homocysteinspiegels im Serum.....	61
6 Diskussion.....	63
6.1 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Gesunde	63
6.2 Progress der Nierenfunktionseinschränkung und Dialysebeginn.....	68
6.3 Hämodialysepatienten	70
6.4 Determinanten des Homocysteins	71
6.5 Schlussfolgerungen	72
7 Literaturverzeichnis	74
8 Dank.....	92
9 Ehrenwörtliche Erklärung	93
10 Lebenslauf	94
11 Anhang	95
11.1 Korrelationen von Homocystein und seinen Metaboliten untereinander.....	95
11.2 Korrelationen von Homocystein mit Folsäure und Vitamin B ₁₂	95
11.3 Messergebnisse der CNI-Patienten	96

Abkürzungsverzeichnis

2-MCA I und II	Diastereomere von 2-Methylzitronensäure/ 2-Methylcitrat
2-MCA_{total}	2-Methylzitronensäure/ 2-Methylcitrat
Abb.	Abbildung
AMI	akuter Myokardinfarkt
AS	Aminosäure(n)
AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
BHMT	Betain-Homocystein-Methyltransferase
BMI	Body-Mass-Index
c	Konzentration
CAPD	kontinuierliche ambulante Peritonealdialyse
Cbl	Cobalamin
CBL	Cystathionin- β -Lyase
CBS	Cystathionin- β -Synthase
Ccr	Kreatinin-Clearance
CD	Oberflächenantigen (cluster of differentiation)
cFN	zelluläres Fibronectin
CI	Konfidenzintervall (confidence interval)
CK-MB	Kreatinkinase - Muscle and Brain
CoA	Koenzym A
CrP	C-reaktives Protein
CVD	kardiovaskuläre Erkrankung(en) / cardiovascular disease(s)
CVI	zerebrovaskuläre Insuffizienz
CYSTA	Cystathionin
d	Tag
EDRF	endothelium derived relaxing factor
EDV	elektronische Datenverarbeitung
EPO	Erythropoietin
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (gas chromatography-mass spectrometry)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Hb	Hämoglobin
Hcy	Homocystein

HD	Hämodialyse
Hk	Hämatokrit
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Koenzym A
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	Hazard Ratio
IL	Interleukin
J.	Jahre
KfH	Kuratorium für Nierentransplantation und Dialyse e.V.
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
Krea	Serumkreatinin
l	Liter
log-Transf.	logarithmische Transformation
Lp(a)	Lipoprotein a
LPL	Lipoproteinlipase
m.	männlich
Max	Maximum
min	Minute
Min	Minimum
MMA	Methylmalonsäure
MS	Methioninsynthase
MSR	Methionin-Synthase-Reduktase
MTBSFA	N-methyl-N(tert-butyl dimethylsilyl)trifluoroacetamid
MTHF	Methyltetrahydrofolsäure
MTHFR	Methyltetrahydrofolsäure-Reduktase
MTX	Methotrexat
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NIDDM	Diabetes mellitus Typ II (non insulin dependent diabetes mellitus)
NO	Stickstoffmonoxid (endothelium derived relaxing factor)
Nos2	NO-Synthase 2
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit

pH	Wasserstoffgewicht pro Liter _{Lösung} (pondus Hydrogenii)
R²	Bestimmtheitsmaß
RK	Regressionskoeffizient
RR	Blutdruck (Riva - Rocci)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SIM	single ion mode
SSZ	Sulfasalazin
Tab.	Tabelle
TF	Gewebefaktor (tissue factor)
tHcy	totales Homocystein (Gesamthomocystein)
THF	Tetrahydrofolsäure
TM	Thrombomodulin
tPA	Gewebsplasminogen-Aktivator (tissue plasminogen activator)
w.	weiblich

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Stoffwechsel von tHcy und seinen Metaboliten (nach Stein et al. 1997).....	14
Abb. 2:	Chromatogramme Homocystein und Cystathionin	41
Abb. 3:	Chromatogramme Methylmalonsäure und 2-Methylzitronensäure	42
Abb. 4:	Altersverteilung der CNI-Patienten (Glockenkurve = Normalverteilung)	45
Abb. 5:	Konzentration von tHcy bei 52 Gesunden vs. 99 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.....	51
Abb. 6:	Konzentration der Metaboliten CYSTA, MMA und 2-MCA _{total} bei 52 Gesunden vs. 99 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.....	51
Abb. 7:	Vergleich der Konzentration von Methylmalonsäure der Patienten mit und ohne Myokardinfarkt in der Anamnese.....	52
Abb. 8:	Vergleich der Konzentrationen der Metaboliten MMA, 2-MCA _{total} und 2-MCA-II der Patienten mit und ohne zerebrovaskulärer Insuffizienz in der Anamnese	53
Abb. 9:	Vergleich der tHcy-Konzentration bei Patienten in der Prädialyse- Phase mit denen nach Beginn der Dialysetherapie.....	56
Abb. 10:	Vergleich der Konzentration der Metaboliten CYSTA, MMA und 2- MCA _{total} bei Patienten in der Prädialyse-Phase mit denen nach Beginn der Dialysetherapie.....	57
Abb. 11:	Prädiktoren für den Dialysebeginn nach multivariater Cox-Regression.....	59
Abb. 12:	Vergleich der tHcy-Konzentration der Dialysepatienten vs. CNI- Patienten	60
Abb. 13:	Vergleich der Konzentrationen der Metaboliten CYSTA, MMA und 2- MCA _{total} der Dialysepatienten vs. CNI-Patienten.....	60
Abb. 14:	Vergleich der Konzentrationen von tHcy, CYSTA, MMA und 2- MCA _{total} der CNI-Patienten vs. HD-Patienten (MW)	61

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Faktoren, die den Homocysteinspiegel beeinflussen	25
Tab. 2:	Ermittelte Referenzintervalle von Homocystein und Metaboliten (n = 52) [Busch 2000]	43
Tab. 3:	Klinische und biochemische Parameter der CNI-Patienten	49
Tab. 4:	Konzentration von Homocystein und Metaboliten bei 99 CNI- Patienten	50
Tab. 5:	Unterschiede der tHcy- und Metabolitenkonzentration bezüglich des Patientengeschlechts	52
Tab. 6:	Univariate Cox-Regression (Zielereignis CVD, n = 11)	55
Tab. 7:	Univariate Cox-Regression (Zielereignis Dialysebeginn, n = 41)	58
Tab. 8:	Multivariate Cox-Regression (Zielereignis Dialysebeginn, n = 41)	59
Tab. 9:	tHcy- Determinanten nach linearer Regression mit schrittweiser Variablenselektion	62

1 Zusammenfassung

Die Hauptursache der Todesfälle in industrialisierten Ländern sind atherosklerotische Erkrankungen [Weiss et al. 1999]. Dabei lassen sich durch traditionelle Risikofaktoren der Atherosklerose, wie Hypercholesterinämie, Hypertonie, Diabetes mellitus und Rauchen, lediglich ca. $\frac{1}{2}$ - $\frac{2}{3}$ der Krankheitsfälle erklären [Wilson et al. 1998]. Aufgrund dessen ist die Suche nach neuen Risikofaktoren, die eventuell prognostische Aussagen ermöglichen und deren Modifikation zur Senkung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität beiträgt, derzeit Gegenstand intensiver Forschung [Ridker et al. 2001].

Zahlreiche Studien präsentieren Homocystein (Hcy) als unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD). Die Bedeutung erhöhter tHcy-Serumkonzentrationen als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor auch bei chronisch niereninsuffizienten Patienten ist aufgrund nur weniger prospektiver Untersuchungen nicht eindeutig geklärt.

In dieser Arbeit wurden die Konzentrationen von Gesamthomocystein (tHcy) und seiner Metaboliten Cystathionin (CYSTA), Methylmalonsäure (MMA) und 2-Methylzitronensäure (2-MCA_{total}) sowie weiterer klinisch-chemischer Parameter bei 99 chronisch niereninsuffizienten Patienten bestimmt und ihr Einfluss auf die kardiovaskuläre Morbidität prospektiv in einem Verlauf von 2 Jahren untersucht.

Die chronisch niereninsuffizienten Patienten wiesen 2,3–6,8-fach erhöhte Konzentrationen für tHcy, MMA, CYSTA und 2-MCA_{total} auf.

Die mittleren Serumkonzentrationen von Vitamin B₁₂ ($352,0 \pm 201,4$ pmol/l) und Folsäure ($7,5 \pm 3,8$ nmol/l) lagen im Normbereich.

Die Korrelationen zwischen tHcy und MMA einerseits und Folsäure und Vitamin B₁₂ andererseits zeigten, dass funktionelle Vitaminmangelzustände erkannt werden können (vgl. 5.1.2).

Es wurde gezeigt, dass bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CNI) die Prävalenz einer moderaten Anämie eine größere Rolle für die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse spielt, als erhöhte tHcy- oder Metaboliten-Spiegel.

Eine Beteiligung von tHcy und den Metaboliten CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} an der Progression einer Niereninsuffizienz (vgl. 5.1.10.2) wurde untersucht.

Auch hier zeigte sich, dass tHcy und seine Metaboliten, im Gegensatz zu erhöhten Kreatininkonzentrationen, einer moderaten renalen Anämie, der Präexistenz eines Diabetes mellitus, erhöhten LDL-Spiegeln sowie zum männlichen Geschlecht, als Prädiktoren der

Progression einer Niereninsuffizienz keine wesentliche Rolle zukommt (vgl. Tab. 8 und Abb. 11). Die Identifikation erhöhter Konzentrationen von 2-MCA_{total} als unabhängiger Progressionsfaktor gewinnt aufgrund der nahezu identischen renalen Clearance von 2-MCA_{total} und Kreatinin die gleiche Bedeutung wie erhöhte Kreatinin-Spiegel. Die Wertigkeit verminderter CYSTA-Spiegel bleibt diesbezüglich unklar.

Vor dem Hintergrund der Zunahme des kardiovaskulären Risikos mit steigenden Homocysteinkonzentrationen sollte der Verlauf der tHcy- und Metabolitenspiegel bis zum Beginn der Hämodialysetherapie aufgezeigt werden. Hierzu wurde von 13 der insgesamt 41 dialysepflichtig gewordenen CNI-Patienten eine zweite Messung von tHcy und seinen Metaboliten vor Beginn der Dialysebehandlung durchgeführt. Dabei konnten neben konstant gebliebenen tHcy-Werten 1,4-1,8-fach erhöhte Konzentrationen der Metaboliten CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} gemessen werden.

Ferner wurde untersucht, inwieweit routinemäßig bestimmte klinisch-chemische Parameter (Kreatinin, LDL-Cholesterin, Fibrinogen, CrP, Albumin, Gesamteiweiß, Vitamin B₁₂, Folsäure) sowie das Patientenalter und die Dauer der Kreatininkonzentration > 150 µmol/l die tHcy-Konzentration vorhersagen können. Es zeigte sich, dass sich die tHcy-Werte teilweise durch einen linearen Zusammenhang mit den im schrittweisen Verfahren selektierten Parametern erklären lässt.

Neben der geringen Patienten- und Ereigniszahl sind die Mediandichotomisierung der Messreihen von tHcy und seinen Metaboliten sowie weiterer klinisch-chemischer Parameter und die Erfassung nur kurzzeitiger Veränderungen des Metabolismus durch die einmalige Messung von tHcy, CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} zu Studienbeginn als Schwachstellen der vorliegenden Arbeit zu nennen.

Anhand der gezeigten Ergebnisse hat tHcy sowohl auf die kardiovaskuläre Morbiditäts- und Mortalitätsrate als auch auf die Progression der CNI keinen Einfluss. Auch die simultane Bestimmung der Metaboliten CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} bringt keinen zusätzlichen Informationsgewinn. Weitere Langzeitstudien mit größeren Patientenzahlen müssen folgen, um tHcy als definitiven Prädiktor einer CVD oder CNI-Progression nachzuweisen oder zu widerlegen.

2 Einleitung

2.1 Homocystein

Hcy ist eine nicht-proteinogene, schwefelhaltige aliphatische α -Aminosäure, welche als Stoffwechselintermediat im C1-Stoffwechsel gebildet wird. Sie wurde erstmals im Jahre 1932 als Produkt der Demethylierung von Methionin von Vigneaud et al. beschrieben [du Vigneaud et al. 1950]. Dreißig Jahre später wiesen Gerritsen et al. tHcy im Urin nach [Gerritsen et al. 1962]. Gleichzeitig berichteten Carson und Neill von Abnormitäten im tHcy-Stoffwechsel bei mental Retardierten in Irland [Carson und Neill 1962]. Bald postulierten mehrere Autoren die mögliche Beteiligung von Abnormitäten des C1-Stoffwechsels an der Pathogenese der Atherosklerose v.a. im Bereich der Koronararterien und der hirnversorgenden Arterien [McCully 1969, McCully und Ragsdale 1970, McCully und Wilson 1975, Wilcken und Wilcken 1976, Wilcken et al. 1983]. Ein klinisches Beispiel stellen Patienten mit Homocystinurie dar. Bei dieser autosomal-rezessiv erblichen Enzymopathie, in deren Verlauf stark erhöhte tHcy-Spiegel zu finden sind, wurde die Existenz sowie die rasche Progredienz atherosklerotischer Gefäßveränderungen, kombiniert mit zentralnervösen Störungen, beschrieben [Mudd et al. 1985]. Diesen Beobachtungen folgend, rückt neben den klassischen Prädiktoren der Atherosklerose, wie Hypercholesterinämie, Hypertonie, Diabetes mellitus und Rauchen, in den letzten Jahren in zunehmendem Maße tHcy als neuer Risikofaktor in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

2.2 Homocystein und Intermediärstoffwechsel

Die essentielle Aminosäure Methionin fungiert in seiner aktivierten Form S-Adenosylmethionin als wichtiger Methylgruppendonator des Intermediärstoffwechsels [Rosenblatt 1995]. Durch Demethylierung des Methionins wird tHcy gebildet, welches über den Weg der Remethylierung oder durch Transsulfierung metabolisiert werden kann.

Die Remethylierung zum Methionin katalysiert das Enzym Methioninsynthase, welches von Methylcobalamin, einer Koenzymform des Vitamin-B₁₂, abhängig ist. Die auf das Homocystein zu übertragende Methylgruppe liefert N⁵-Methyltetrahydrofolsäure (N⁵-MTHF), die aus N⁵, N¹⁰-MTHF durch das Enzym N⁵, N¹⁰-Methyltetrahydrofolsäurereductase (N⁵, N¹⁰-MTHFR) gebildet wird.

Um in die Zellen aufgenommen zu werden und dort die Funktionen als Kofaktor auszuüben, muss die zirkulierende Form der Folsäure zur Tetrahydrofolsäure (THF) demethyliert werden.

Für diese Reaktion ist unter anderem Vitamin B₁₂ nötig. Die Vitamin B₁₂-Depots sind vor allem im Vergleich zu den Folsäurereserven groß und genügen in der Regel für mehrere hundert Tage aufgrund der umfangreichen Reserven in der Leber [Suter et al. 1999]. Zusammenfassend ist von einer größeren Bedeutung der Folsäure für den tHcy-Metabolismus im Vergleich zu Vitamin B₁₂ auszugehen. Entsprechend finden sich bei ungenügender oder suboptimaler Versorgung mit Cobalamin, Folsäure oder beiden Kofaktoren erhöhte Plasma-tHcy-Spiegel [Selhub et al. 1993 und 1995]. Einen weiteren Stoffwechselweg der Remethylierung des Hcy stellt das Enzym Betain-Homocystein-Methyltransferase (BHMT) dar, wobei Betain als Kofaktor fungiert. Das v.a. in der Leber lokalisierte Enzym ist unter physiologischen Bedingungen nur von geringer Bedeutung. Versuche einer therapeutischen Intervention blieben deshalb ohne Erfolg [Wilcken et al. 1983]. Bei niereninsuffizienten Patienten konnte eine Betainsubstitution lediglich einen tHcy-Spiegel-Anstieg nach Methioninbelastung supprimieren [McGregor et al. 2002].

Der zweite Abbauweg ist die Transsulfierung. Dabei verbindet sich Hcy in der ersten Teilreaktion, katalysiert durch das Enzym Cystathionin- β -Synthase (CBS), mit Serin zum CYSTA, welches in der zweiten Teilreaktion, katalysiert durch das Enzym Cystathionin- β -Lyase (CBL), zu Cystein und Homoserin hydrolysiert wird. Nachfolgend tritt Cystein in den Glutathion-Pool ein, Homoserin wird letztlich zu Succinyl-CoA metabolisiert und im Urin ausgeschieden. Beiden Enzymen, sowohl CBS als auch CBL, dient Pyridoxal-5-Phosphat, eine aktivierte Form des Vitamin B₆, als Koenzym. Bei Patienten mit Homocystinurie vom Typ I ist durch einen CBS-Mangel dieser Abbauweg beeinträchtigt, woraus beträchtliche Erhöhungen der tHcy-Spiegel resultieren können [Finkelstein und Martin 1986, Rosenblatt 1995, Bielenberg 1997]. Zusammenfassend kann von einer Bedeutung o.g. Verbindungen zur Erfassung von Vitaminmangelzuständen ausgegangen werden. So gilt tHcy als Marker für einen klinischen sowie subklinischen Mangel an Folsäure und Vitamin B₁₂.

Ausgehend von diesen Überlegungen sucht man Marker, die spezifische Aussagen über einen funktionellen Vitamin-B₁₂-Mangel ermöglichen.

Ein allein von Vitamin-B₁₂ abhängiges Enzym stellt die Methylmalonyl-CoA-Mutase dar. Eine Minderaktivität ist durch die Bestimmung der MMA zu eruieren.

Da dieses Enzym von 5-Desoxyadenosylcobalamin, einer zweiten Koenzymform des Vitamin-B₁₂, abhängig ist, erfasst man somit Cobalaminmangelzustände. Es katalysiert die Reaktion von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA. Da Methylmalonyl-CoA nicht nur zu Succinyl-CoA, sondern auch zu MMA metabolisiert werden kann, steigt deren Konzentration im Serum bei einem Cobalaminmangel an [Allen et al. 1990, Savage et al. 1994]. Eine

angeborene Minderaktivität des Enzyms verursacht eine Form der Methylmalonazidurie, eine zur Gruppe der sog. Organoazidurien zählende Erkrankung, die mit charakteristischen Erhöhungen von MMA und 2-MCA_{total} in Blut, Urin und Fruchtwasser (pränatale Diagnostik) einhergeht [Leupold 1970, Coude et al. 1990].

Ein weiterer, indirekt von der Aktivität dieses Enzyms abhängiger Metabolit, ist die 2-MCA_{total}. Eine Minderaktivität des Enzyms führt zu einer Erhöhung von Propionyl-CoA, welches mit Oxalessigsäure zu 2-MCA_{total} umgewandelt wird, die vermehrt aus der Zelle gelangt und somit zum Anstieg im Plasma führt. Aus dieser indirekten Beziehung ergibt sich jedoch eine geringere Sensitivität bezüglich des Nachweises von Vitamin-B₁₂-Mangelzuständen [Allen et al. 1993, Stein et al. 1997]. Eine potentielle Bedeutung von 2-MCA_{total} versuchte man ursprünglich aus der Konzentrationserhöhung im Blut, Urin und Fruchtwasser bei der hereditären Propionazidämie abzuleiten [Ando et al. 1972, Naylor et al. 1980, Coude et al. 1990, Thompson und Chalmers 1990]. Biotinmangel führt über eine Aktivitätsminderung der Propionyl-CoA-Carboxylase ebenfalls zu erhöhten 2-MCA_{total}-Konzentrationen im Urin [Sweetman et al. 1981].

Intrazelluläre tHcy-Konzentrationen und -Syntheseraten spiegeln sich aufgrund der Zellgängigkeit und des aktiven Auswärtstransportes von tHcy in den Serumkonzentrationen wider [Till 1996]. Es wird davon ausgegangen, dass unter physiologischen Bedingungen etwa 5-10% der totalen zellulären tHcy-Produktion ins Plasma gelangt. Über 65-80% des tHcy sind im Plasma über eine Disulfidbindung proteingebunden, vor allem an Albumin. Etwa 15-30% liegen als freies, oxidiertes Hcy in Form von Homocystein-Thiolacton, Homocystin und gemischten Disulfiden mit Cystein vor. Der Anteil des freien, reduzierten Hcy beträgt 1,5-4% [Dennis et Robinson 1996]. tHcy-Konzentrationen im Serum von 5-15 µmol/l werden als normal angesehen [Ducloux et al. 2000], jedoch ist von einer Erhöhung des atherosklerotischen Risikos bereits bei Konzentrationen > 12 µmol/l auszugehen [Perry et al. 1995]. tHcy-Werte von 16-33 µmol/l werden als milde, 34-100 µmol/l als moderate und > 100 µmol/l als starke Hyperhomocysteinämie angesehen [Ducloux et al. 2000]. Bei manchen Patienten können die Nüchtern-tHcy-Werte normal sein, eine Hyperhomocysteinämie wird erst durch einen positiven Methioninbelastungstest diagnostiziert, d.h. einem Anstieg der Serumkonzentration von tHcy über 30 µmol/l nach oraler Gabe von 100 mg/kg KG L-Methionin [van den Berg und Boers 1996, Freyburger et al. 1997].

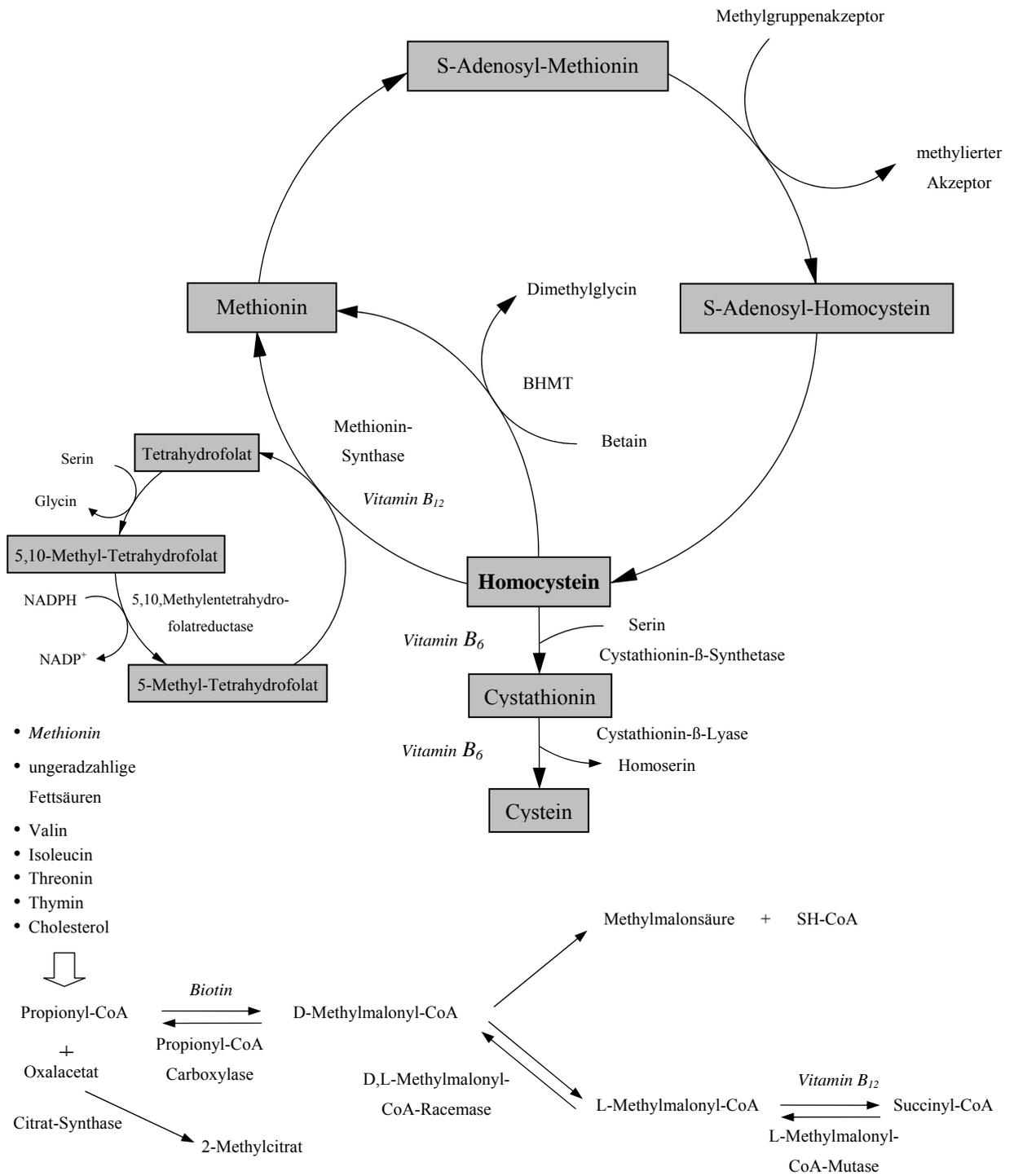


Abb. 1: Stoffwechsel von tHcy und seinen Metaboliten (nach Stein et al. 1997)

2.3 Modulatoren des Homocysteinspiegels

Die tHcy-Plasmakonzentration ist sowohl von unbeeinflussbaren als auch von zahlreichen modulierbaren Faktoren abhängig. Einen Überblick über mögliche Einflussfaktoren der tHcy-Plasmakonzentration liefert Tab. 1. Im Folgenden werden die einzelnen Modulatoren besprochen.

2.3.1 Geschlecht

Männer zeigen im Allgemeinen 20-25% höhere Plasma-tHcy-Konzentrationen als Frauen [Lussier-Cacan et al. 1996, Rasmussen et al. 1996, Schreiner et al. 1997, Nygård et al. 1998, Jacques et al. 2001]. Diese Differenz führt man unter anderem auf eine größere Muskelmasse und eine höhere Kreatinphosphatsynthese bei Männern sowie auf unterschiedliche Raten der Metabolisierung zurück [Malinow 1994]. Bei Frauen ist die hormonelle Versorgungssituation, speziell mit Östrogenen, von Bedeutung. So bewirkt eine Therapie mit oralen Kontrazeptiva oder eine Hormonsubstitutionstherapie eine Abnahme der Plasma-Homocysteinspiegel. Aber auch in anderen Studien führt man den bestehenden Geschlechtsunterschied auf den tHcy-senkenden Effekt des Östrogens zurück [Andersson et al. 1992, Malinow 1994].

2.3.2 Alter

Im Ergebnis vieler Studien steigt der tHcy-Spiegel mit zunehmendem Alter an [Nygård et al. 1998, Jacques et al. 2001]. Verglichen mit Personen, die jünger als 45 Jahre waren, wiesen Personen im Alter von 45-54 Jahren eine um 0,5 $\mu\text{mol/l}$ erhöhte ($p < 0,001$), Personen jenseits des 65. Lebensjahres sogar um 1 $\mu\text{mol/l}$ gesteigerte ($p < 0,001$) tHcy-Konzentration auf [Jacques et al. 2001]. Die Gründe hierfür sind offenbar altersspezifische Veränderungen des Vitamin-Stoffwechsels [Suter und Russel 1989, Russel und Suter 1993], insbesondere die Abnahme der Vitamin B₁₂-Konzentration mit dem Alter und auch eine mögliche Beeinträchtigung des Vitamin B₆-Stoffwechsels.

Die Hauptursache für die langsame aber stetige Abnahme der Cobalaminkonzentration mit zunehmendem Alter sind erworbene Resorptionsstörungen des Vitamin B₁₂ (vgl. 2.3.4.2).

Während des Alterungsprozesses finden sich des Weiteren Veränderungen im Stoffwechsel des Vitamin B₆, wobei eine Störung der Aktivierung des Vitamins durch Phosphorylierung bedeutsam ist [Russel und Suter 1993, Suter und Vetter 1996].

Aufgrund dieses metabolischen Vitaminmangels wird bei älteren Menschen eine tHcy-Bestimmung nach erfolgter Vitaminsubstitution als sinnvoll angesehen [Joosten et al. 1996]. Messungen ohne vorherige Substitution sollten höhere Referenzwerte zugrunde legen. So

fanden Joosten et al. an gesunden, zu Hause lebenden Menschen ($n = 99$) im mittleren Alter von 76 Jahren einen oberen Referenzwert von $21 \mu\text{mol/l}$ für tHcy sowie von $476 \mu\text{mol/l}$ für MMA. In einer anderen Studie an einem Patientengut im mittleren Alter von 75 Jahren ($n = 143$) fand man nach einer Vitamingabe von Vitamin B₁₂ 1 mg, Vitamin B₆ 5 mg, Folsäure 1,1 mg i.m. täglich für 3 Wochen obere Referenzwerte von $12,7 \mu\text{mol/l}$ für tHcy sowie 278 nmol/l für MMA [Joosten et al. 1993 und 1996, Naurath et al. 1995].

Die höhere Rate niereninsuffizienter Patienten und die damit assoziierte Verminderung der tHcy-Ausscheidung könnte ein weiterer Grund für erhöhte tHcy-Spiegel im Alter sein [Suter et al. 1999].

Hohe Serumkonzentrationen an tHcy im jüngeren Lebensalter finden sich bei Patienten mit hereditärer Homocystinurie und bei chronischer Niereninsuffizienz.

2.3.3 Genetisch determinierte Einflussfaktoren

Erste Hinweise auf die pathologische Bedeutung von tHcy als kardiovaskulärer Risikofaktor stammen von der autosomal rezessiv erblichen Homocystinurie. Bei dieser Erkrankung aus dem Formenkreis der angeborenen Organoazidurien finden sich extrem hohe tHcy-Spiegel von 400 bis $1000 \mu\text{mol/l}$. Man unterscheidet drei Formen der Homocystinurie.

Bei der klassischen homozygoten Form der Homocystinurie liegt ein Mangel der CBS vor. Es konnte eine Thymin-Cytosin-Translokation am Nukleotid 833 ($833\text{T}\rightarrow\text{C}$) bei 50% von 15 nichtverwandten, für einen CBS-Mangel homozygoten Patienten nachgewiesen werden [Kluijtmans et al. 1996]. Inzwischen konnten mehr als 30 verschiedene Mutationen des CBS-Gens identifiziert werden, die mit unterschiedlichen kardiovaskulären Risiken assoziiert sind [Suter et al. 1999]. Heterozygote Varianten der Homocystinurie finden sich je nach Population mit einer Häufigkeit von 0,5-1,5% [Rosenblatt et al. 1995]. Die Folgen der Minderaktivität des Enzyms bestehen in einer Konzentrationserhöhung von tHcy und erniedrigter Konzentration von CYSTA.

Eine weitere Form besteht in einem autosomal-rezessiv vererbten Defekt der N⁵, N¹⁰-MTHFR. Durch eine Punktmutation kommt es zur Änderung der Enzymaktivität, welche zu moderaten Erhöhungen ($> 15\text{-}30 \mu\text{mol/l}$) des tHcy-Spiegels führt. Sie beruht auf einer Substitution von Cytosin durch Thymin am Nukleotid 677 ($677\text{T}\rightarrow\text{C}$) des verantwortlichen Gens, was in der Proteinbiosynthese zum Einbau der Aminosäure Valin anstelle von Alanin führt, wodurch eine thermolabile Form des Enzyms entsteht [Frosst et al. 1995]. Diese Form ist durch eine Temperaturlabilität bei 46°C in vitro charakterisiert. Die Aktivität dieser Variante liegt bei nahezu 50% der normalen Aktivität [Kang et al. 1991, Frosst et al. 1995].

Die Häufigkeit der homozygoten Variante der MTHFR bei Personen mit moderater tHcy-Erhöhung schwankt je nach Population zwischen 10-30% [Till 1996]. Eine sehr seltene Ursache einer Hyperhomocysteinämie ist der schwere MTHFR-Mangel. Man fand bei dieser Form des MTHFR-Mangels weniger als 2% der normalen Enzymaktivität [Kang et al. 1991]. Einer dritten und seltenen Variante der Homocystinurie liegen angeborene Stoffwechselstörungen in der Cobalaminsynthese zugrunde. Bei diesen Mutationen unterscheidet man verschiedene Gruppen. Die Mutationen CblC, CblD und CblF betreffen Methylcobalamin und Adenosylcobalamin [Garovic-Kocic und Rosenblatt 1992, Linnell et al. 1995]. Bei der rezessiv vererbten Cobalamin-Mutationen CblE findet sich eine verminderte zelluläre Bildung oder Akkumulierung von Methylcobalamin mit einem funktionellen Methionin-Synthase-Defekt [Garovic-Kocic und Rosenblatt 1992]. Die CblG-Mutation beinhaltet genetische Defekte der Methioninsynthase (MS) [Feix et al. 2001]. Diese funktionell bedingten Cobalaminmangelzustände können, abhängig von der Koenzymfunktion der aktivierten Vitamine, eine Ursache der kindlichen Methylmalonazidurie und/oder Homocystinurie darstellen [Fowler 1998]. Eine weitere Ursache dieser kombinierten Störungen ist ein Transcobalamin II-Mangel [Barshop et al. 1999].

2.3.4 Vitamine

2.3.4.1 Vitamin B₆

Die Hauptnahrungsquelle dieses Vitamins stellen Fleischprodukte dar. Es ist ebenfalls, jedoch in geringerer Konzentration, in Gemüse und Vollkornprodukten enthalten. Neben der Beteiligung an der Transmethylierung und Decarboxylierung von Aminosäuren (AS), an der Gluconeogenese, an der Sphingolipid- und Neurotransmitterbiosynthese, an der Modulation von Steroidhormonen sowie an immunologischen Prozessen stellt Pyridoxal-5-Phosphat, eine aktivierte Form des Vitamins B₆, als Kofaktor der CBS und auch der CBL einen der wichtigsten Modulatoren der Plasma-tHcy-Spiegel dar [Mudd et al. 1985, Cochran et al. 1990]. Somit resultiert aus einem Vitamin B₆-Mangel eine Minderaktivität dieser Enzyme [Stabler und Allen 1993]. Den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung zufolge sollte die tägliche Vitamin B₆-Aufnahme 1,6 mg betragen [DGE 2000].

In verschiedenen epidemiologischen Studien zeigte sich eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen der Versorgung mit Vitamin B₆ und den Plasma-tHcy-Spiegeln [Selhub et al. 1993, Nygård et al. 1998, Jacques et al. 2001]. Im Metabolismus des Vitamin B₆ finden

sich altersspezifische Veränderungen, zum Beispiel die Reduktion der Aktivierungskapazität des Vitamins durch Phosphorylierung. Dies kann zu einem Anstieg der tHcy-Konzentration im Alter beitragen. Durch eine Therapie mit Vitamin B₆ ließ sich in verschiedenen Studien die Plasma-tHcy-Spiegel senken [Mansoor et al. 1999, McKinley et al. 2001]. Im Allgemeinen sind die Effekte einer Vitamin B₆-Monotherapie auf die tHcy-Konzentration deutlich geringer als die einer Folsäuretherapie [Selhub et al. 1993, Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration 1998].

2.3.4.2 Vitamin B₁₂

Die durch die Deutsche Gesellschaft für Ernährung formulierten Einnahmeempfehlungen für Vitamin B₁₂ lauten 3 µg täglich [DGE 2000]. Analog zu Vitamin B₆ sind auch beim Vitamin B₁₂ die Hauptnahrungsquellen tierischer Herkunft. In pflanzlicher Nahrung fehlt es vollständig [Bächli 1999].

Im Magen wird Vitamin B₁₂ nach Spaltung vom Nahrungseiweiß an neue Proteine gebunden. Diese Verbindung wird im Duodenum durch die Änderung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich und unter Einwirkung der Pankreasenzyme erneut gespalten. Das freigesetzte Cobalamin wird nun an den sog. „intrinsic factor“ gekoppelt, der in den Belegzellen der Magenschleimhaut gebildet wird. Dieser neu gebildete Komplex kann im terminalen Ileum durch einen spezifischen Rezeptor der Enterozyten gebunden und in diese inkorporiert werden. Auch im Blut erfolgt der Transport des Cobalamins proteingebunden über sog. Transcobalamine. Anschließend erfolgt wiederum die Inkorporation dieses Komplexes in die Empfängerzellen über einen spezifischen Rezeptor. Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes führen zu einer Beeinträchtigung der Proteindigestion und Absorption, woraus eine verminderte Aufnahme von Cobalamin und somit die Senkung der Plasmakonzentration dieses Vitamins resultiert.

Plasma-Vitamin-B₁₂-Spiegel nehmen mit zunehmendem Alter ab [Bächli 1999, Suter et al. 1999]. Die häufigste Ursache hierfür ist die chronisch atrophische Gastritis, welche mit einer Achlorhydrie einhergeht und mehrheitlich durch eine Infektion mit *Helicobacter pylori* bedingt ist [Bächli 1999]. Auch die tHcy-Konzentration steigt mit dem Alter an und ein Teil dieses Anstieges basiert vermutlich auf den oben genannten Veränderungen [Suter et al. 1999]. Aufgrund dessen kann bei älteren Menschen durch Supplementierung mit Vitamin B₁₂ eine Senkung des tHcy-Spiegels erreicht werden, wenn auch nicht so effektiv wie durch die Einnahme von Folsäure [Selhub et al. 1993].

2.3.4.3 Folsäure

Folsäure sollte, den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung zufolge, in einer Menge von 400 µg/Tag aufgenommen werden [DGE 2000]. Die wichtigsten Nahrungsquellen sind Blattgemüse, Hefe und Leber. Dort liegt Folsäure in der Polyglutamat-Form vor. Im Jejunum wird nach Spaltung die Monoglutamat-Form absorbiert. Nach dem Erscheinen von Folsäure im Plasma wird es sehr schnell und in der Mehrzahl von Hepatozyten über einen Folsäure-Rezeptor aufgenommen. Intrazellulär erfolgt die Umwandlung in die Polyglutamat-Form. Diese stellt die aktivierte Form von Folsäure dar und verhindert den Austritt von Folsäure aus dem Zytoplasma.

Die Folsäure hat die stärksten Effekte bezüglich der Beeinflussung des tHcy-Spiegels [Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration 1998]. Neben Aufgaben während der Hämatopoese sowie Nucleinsäurebiosynthese wird Folsäure als bedeutender Kofaktor für die Remethylierung des tHcy zu Methionin benötigt, wobei für die Aktivierung der Folsäure auch genügend Cobalamin als Kofaktor vorhanden sein muss [Suter et al. 1999].

2.3.4.4 Einfluss einer Vitaminsubstitution auf die tHcy-Konzentration

Ausgehend von der Vitaminmangelhypothese ist die Vitaminsubstitution zur Therapie der Hyperhomocysteinämie empfohlen worden. Die klinische Relevanz besteht in dem Versuch der konsequenten Senkung eines Risikofaktors der Atherosklerose, dem bei niereninsuffizienten Patienten eine besondere Bedeutung zukommt.

Die Dosierung der einzelnen Vitamine wird unterschiedlich gehandhabt.

Eine orale Aufnahme von Folsäure vermag die tHcy-Konzentration um durchschnittlich 25% (95% CI: 23%-28%; $p < 0,001$) zu reduzieren, wobei die Dosierung in einem Bereich von 0,5–5 mg/d vergleichbare Effekte hat [Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration 1998]. Die zusätzliche Substitution von 0,5 mg Vitamin B₁₂ täglich konnte den tHcy-Spiegel im Schnitt um weitere 7% (95% CI: 3%-10%; $p < 0,001$) senken, die additive Gabe von Vitamin B₆ (bis 16,5 mg/d) blieb ohne Einfluss auf die tHcy-Konzentration.

Eine Monotherapie mit Vitamin B₆ oder Vitamin B₁₂ ergab keinen ausreichenden Therapieerfolg [Brattström et al. 1988 und 1990, Ubbink et al. 1994]. Deshalb stellt sich die Frage, ob eine Differenzierung des Vitaminmangels über die Bestimmung von CYSTA und MMA sinnvoll ist und sich daraus therapeutische Konsequenzen ergeben.

Bei 63 Patienten nach Nierentransplantation und 38 Dialysepatienten konnten erhöhte Werte für tHcy, CYSTA und MMA gemessen werden, wobei die Frequenz erhöhter Metabolitenkonzentrationen deutlich erhöht im Vergleich zur Frequenz erniedrigter

Vitaminkonzentrationen im Serum war [Herrmann et al. 2001]. Aus diesem Grunde kommt neben der tHcy-Messung der Bestimmung seiner Metaboliten im Serum für eine frühzeitige Diagnose eines B-Vitaminmangels besondere Bedeutung zu. Besonders MMA gilt in diesem Zusammenhang als sensitiverer Marker für einen intrazellulären Cobalaminmangel im Vergleich zur Vitamin B₁₂-Serumkonzentration.

Guttormsen et al. untersuchten 19 Patienten mit einer Hyperhomocysteinämie (tHcy-Spiegel: 23,5-142,8 µmol/l) [Guttormsen et al. 1996]. Bei Patienten mit einem Cobalaminmangel, die erhöhte MMA-Werte sowie höhere basale tHcy-Spiegel aufwiesen, führte eine Monotherapie mit Cobalamin zu einer stärkeren Senkung der tHcy-Spiegel im Vergleich zu einer Folsäuremonotherapie bei Patienten mit Folsäuremangel. Der Therapiezeitraum betrug bei beiden Gruppen 2-4 Wochen.

Bei 235 gesunden Probanden ohne vorherige Differenzierung des Vitaminmangels zeigte die orale Gabe von 5 mg Folsäure täglich höhere Abfälle der tHcy-Serumspiegel als die tägliche Therapie mit 1 mg Cobalamin oral ($1,91 \pm 1,6$ µmol/l vs. $0,44 \pm 1,32$ µmol/l) [Rasmussen et al. 1996].

Die tägliche intramuskuläre Gabe von 1 mg Vitamin B₁₂, 1,1 mg Folsäure und 5 mg Vitamin B₆ innerhalb von 8 Tagen an 175 ambulante und 110 hospitalisierte ältere Patienten (65-96 J.) in einer prospektiven, multizentrischen Doppelblindstudie zeigte eine signifikant höhere Anzahl von Patienten mit einer initial erhöhten Konzentration von tHcy und der Metaboliten CYSTA, MMA und 2-MCA_{total}, deren Werte nach Therapie in den Normbereich abfielen, als in der mit Placebo therapierten Gruppe (tHcy: 92% vs. 20%, MMA: 62% vs. 25%, 2-MCA_{total}: 62% vs. 25% und CYSTA: 42% vs. 25%) [Naurath et al. 1995].

Die Ergebnisse einer Substitutionstherapie bei Niereninsuffizienten differieren erheblich.

Eine Therapie mit einer täglichen Gabe von 5 mg Folsäure führte nach 3-monatiger Behandlung zu einer Reduktion des tHcy-Plasmaspiegels von 24,9% im Vergleich zur Placebo-Gruppe [Thambyrajah et al. 2000]. Eine Kombination dieser Therapie mit 50 mg Vitamin B₆ pro Tag erbrachte eine vergleichbare Reduktion der Nüchtern-tHcy-Konzentration [McGregor et al. 2002]. Die zusätzliche Gabe von 4 g Betain täglich suppressierte den tHcy-Anstieg nach Methioninbelastung. Das Ausmaß der Senkung des Nüchtern-tHcy-Spiegels war annähernd gleich zur Therapie ohne Betain [McGregor et al. 2002]. Eine Verbesserung der endothelialen Funktion konnte trotz der Reduktion des tHcy-Spiegels nicht erreicht werden, da die tHcy-Konzentration in ca. 80% der Fälle noch über 12 µmol/l lag [Thambyrajah et al. 2000].

Die tHcy-Spiegel von Dialysepatienten konnten mehrheitlich um 20-40% gesenkt werden [van Guldener et al. 1999, Dierkes et al. 1999a, Arnadottir et al. 2000, Bostom et al. 1996 und 2000, Sunder-Plassman et al. 2000, Hauser et al. 2001, Yango et al. 2001]. Die Therapieansprechbarkeit der mit Peritonealdialyse (CAPD) behandelten Patienten war gegenüber den mit Hämodialyse (HD) behandelten Patienten nicht verschieden [Bostom et al. 1996, Dierkes et al. 1999a]. Die zusätzliche Gabe von Betain (4 g/d) zu einer Folsäuretherapie von 5 mg/d bei CAPD-Patienten ergab keine stärkere Senkung der tHcy-Spiegel [van Guldener et al. 1999]. Eine Therapie mit einer hochdosierten i.v. Gabe von 50 mg Folsäure 1-mal/ Woche sowie der i.v. Gabe von 250 mg Pyridoxin 3-mal/ Woche führte nach 11 Monaten zu einer Normalisierung der tHcy-Werte von hämodialysierten Patienten ($12,3 \pm 5,4$ vs. $37,3 \pm 5,8$ $\mu\text{mol/l}$ vor Therapie) [Touam et al. 1999]. Die Folsäuretherapie war jedoch sowohl per os als auch intravenös einer Behandlung mit äquivalent dosierter Folsäure nicht überlegen [Hauser et al. 2001, Yango et al. 2001, Ducloux et al. 2002]. Analog erwies sich auch eine Therapie mit MTHF gegenüber einer Folsäuretherapie als gleichwertig bezüglich der tHcy-Spiegel-Senkung [Bostom et al. 2000]. Folsäure in einer Dosierung von 30 mg bzw. 60 mg täglich war nicht effektiver als die Applikation von 15 mg Folsäure pro Tag [Sunder-Plassman et al. 2000]. Auch eine Dosierung von 5 mg bzw. 10 mg Folsäure täglich führte zu einer vergleichbaren tHcy-Spiegel-Senkung wie nach dreimaliger Applikation von 5 mg Folsäure pro Woche [Arnadottir et al. 2000].

Trotz einer Vitaminsubstitution und verbesserter Dialysierbarkeit von tHcy sind die tHcy-Werte bei ca. 90% der Dialysepatienten konstant über den kritischen Wert von 12-15 $\mu\text{mol/l}$ erhöht [Shemin et al. 2001, de Vriese et al. 2002]. Aus diesem Grund konnte selbst bei tHcy-senkender Langzeittherapie (5 mg Folsäure/d für 1 Jahr) in dieser Patientengruppe keine Verbesserung endothelialer Funktionsparameter festgestellt werden [van Guldener et al. 1998a].

Nierentransplantierte weisen in ca. 60% der Fälle tHcy-Spiegel über 12 $\mu\text{mol/l}$ auf [Bostom et al. 1997a]. In dieser Population ist aufgrund der besseren Nierenfunktion die supraphysiologische Substitution mit Folsäure und B-Vitaminen weitaus effektiver im Vergleich zu Dialysepatienten. Bei 60 nierentransplantierten Patienten führte die tägliche Gabe von 50 mg Vitamin B₆ und 400 μg Vitamin B₁₂ in Kombination mit steigenden Folsäuremengen (n = 20 0 mg/d; n = 20 0,4 mg/d und n = 20 2,4 mg/d) über 3 Monate mehrheitlich zu einer Reduktion der tHcy-Spiegel unter 12 $\mu\text{mol/l}$ [Beaulieu et al. 1999].

Inwieweit eine Vitamintherapie das kardiovaskuläre Risiko, insbesondere der niereninsuffizienten und dialysierten Patienten, zu senken vermag, ist derzeit noch unklar.

Eine weitere Bedeutung zur Optimierung der Vitamintherapie könnte die Bestimmung der Metaboliten des tHcy-Stoffwechsels zur Differenzierung der betroffenen Stoffwechselwege haben.

2.3.5 Medikamente

Zahlreiche Medikamente können den tHcy-Spiegel im Plasma beeinflussen. Hierzu zählen Substanzen, die mit dem tHcy-Metabolismus interagieren.

Methotrexat (MTX), ein Folsäureantagonist, führt aufgrund der Interaktion mit dem Folsäuremetabolismus und der daraus resultierenden Abnahme der 5-MTHF-Konzentration zu einem Anstieg des tHcy-Spiegels. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, die mit MTX (7,5-15 mg/Woche) oder Sulfasalazin (SSZ, 2-3 g/Tag) bzw. einer Kombination aus beiden Substanzen therapiert wurden, konnte nach einer Behandlungsdauer von 1 Jahr sowohl für die alleinige MTX-Gabe als auch die kombinierte Applikation eine Steigerung der tHcy-Plasmakonzentration nachgewiesen werden (14,1 $\mu\text{mol/l}$ vs. 17,2 $\mu\text{mol/l}$; 14,8 $\mu\text{mol/l}$ vs. 18,8 $\mu\text{mol/l}$) [Haagsma et al. 1999]. Für die alleinige Behandlung mit SSZ zeigte sich lediglich eine temporäre Steigerung des tHcy-Spiegels nach 4 bzw. 8 Wochen (14,1 $\mu\text{mol/l}$ vs. 15,2 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 15,6 $\mu\text{mol/l}$), die nach einem Jahr mit 14,7 $\mu\text{mol/l}$ im Vergleich zum Ausgangswert nicht mehr signifikant war.

Für die Konzentrationserhöhung des tHcy im Rahmen einer Langzeittherapie mit zahlreichen Antiepileptika wurden ähnliche Mechanismen verantwortlich gemacht. Bei Epilepsiepatienten unter Therapie mit Phenytoin, Phenobarbital und Primidon wurde 6 Stunden nach einer Methioninaufnahme von 100 mg/kg KG im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen ein signifikanter Anstieg der tHcy-Konzentration beobachtet (29,6 $\mu\text{mol/l}$, 95% CI: 26,4-33,1 $\mu\text{mol/l}$ vs. 46,6 $\mu\text{mol/l}$, 95% CI: 39,4-55,1 $\mu\text{mol/l}$, $p < 0,0001$). Eine signifikante tHcy-Spiegelsteigerung durch Valproinsäure ließ sich nicht verifizieren [Apeland et al. 2001]. Eine andere Studie derselben Arbeitsgruppe belegte die tHcy-steigernden Effekte durch Carbamazepin [Apeland et al. 2001].

Auch Trimethoprim, als Inhibitor der Dihydrofolsäurereduktase verschiedener Organe, führte bei 7 gesunden Männern nach zweimaliger Einnahme von 300 mg pro Tag zu einer mittleren tHcy-Konzentrationszunahme von 50% [Smulders et al. 1998].

Aufgrund der Interaktion mit Vitamin B₁₂ und Folsäure kann auch eine Therapie mit Metformin zu einem leichten Anstieg der Plasma-tHcy-Konzentration um ca. 10% führen [Suter et al. 1999].

Die Lipidsenker Fenofibrat und Bezafibrat können einen Anstieg der Plasma-tHcy-Konzentration bewirken [Dierkes et al. 1999b, Westphal et al. 2001]. Gemfibrozil, ein Clofibrat-Analogon, hingegen scheint den tHcy-Spiegel im Plasma nicht zu erhöhen und sollte aus diesem Grund als Fibrat der Wahl eingesetzt werden [Westphal et al. 2001].

Östrogene bewirken in Form oraler Kontrazeptiva oder als prämenopausale Hormonsubstitution im Gegensatz zu den bisher in diesem Zusammenhang genannten Substanzen eine Senkung der tHcy-Konzentration im Plasma [van der Mooren et al. 1994, von Eckardstein und Assmann 1998, Morris et al. 2000].

2.3.6 Lebensgewohnheiten

Alkoholabusus ist mit einer Steigerung der tHcy-Plasmakonzentration assoziiert [Blom 1998, Nygård et al. 1998, van der Gaag et al. 2000, Jacques et al. 2001].

Exzessiver Alkoholabusus führt vor allem zu einer Beeinträchtigung der Folsäureversorgung. Des Weiteren verursacht er aber auch Veränderungen des Metabolismus von Vitamin B₆ und Vitamin B₁₂ [Suter et al. 1999]. Daraus resultiert eine Hyperhomocysteinämie bei Alkoholikern [Verhoef et al. 1998]. Chronischer Alkoholkonsum hat auf praktisch alle Nährstoffe einen negativen Einfluss [Suter 1995]. Die alkoholinduzierten Veränderungen des tHcy-Metabolismus sind spezifisch für die zugeführten alkoholischen Getränke [van der Gaag et al. 2000].

Bei Alkoholikern waren die tHcy-Werte zweimal so hoch wie in der Normalpopulation, wobei Biertrinker eine signifikant niedrigere tHcy-Konzentration als Konsumenten von Wein und Spirituosen ($p < 0,001$) aufwiesen [Cravo et al. 1996].

Im Zusammenhang mit einer Koffeinaufnahme konnte ebenfalls eine Zunahme des Plasma-tHcy-Spiegels beobachtet werden [Jacques et al. 2001]. Ab einer täglichen Aufnahmemenge von > 89 mg Koffein wurden tHcy-Spiegel-Steigerungen von $0,4-0,8 \mu\text{mol/l}$ ($p = 0,03$ bis $p < 0,001$) erzielt. Dabei induzierte der tägliche Genuss von mehr als 2 Dosen Cola (à 360 ml Inhalt) eine Zunahme der tHcy-Konzentration um $0,6 \mu\text{mol/l}$ ($p < 0,001$). Um $0,4-0,8 \mu\text{mol/l}$ ($p = 0,03$ bis $p < 0,001$) stieg der tHcy-Plasmaspiegel nach der Zufuhr von > 1 Tasse koffeinhaltigen Kaffees pro Tag. Der tägliche Konsum einer Tasse entkoffeinierten Kaffees hatte eine Abnahme der tHcy-Konzentration um $0,6 \mu\text{mol/l}$ zur Folge.

Zu dem Einfluss von Tee auf die tHcy-Plasmakonzentration existieren divergierende Ergebnisse. Olthof et al. wiesen in einer jüngeren Untersuchung für eine tägliche Aufnahme von 4g Schwarztee eine Steigerung des tHcy-Spiegels um $0,5 \mu\text{mol/l}$ nach [Olthof et al. 2001].

Auch bei Zigarettenrauchern wurden erhöhte tHcy-Spiegel gemessen [Nygård et al. 1998, Jacques et al. 2001]. Der Rauch von > 16 Zigaretten am Tag führte zu einem tHcy-Spiegel-Anstieg von 1,5 µmol/l gegenüber Nichtrauchern ($p < 0,001$) [Jacques et al. 2001]. Raucher zeigen des Weiteren auch Veränderungen im Stoffwechsel anderer Vitamine, beispielsweise einen erniedrigten Vitamin C-Spiegel, was zusätzlich negative Effekte auf verschiedene Komponenten der Gefäßwand haben kann [Harker et al. 1976].

Tab. 1: Faktoren, die den Homocysteinspiegel beeinflussen

genetische Faktoren	
<ul style="list-style-type: none"> • gestörte Transsulfierung • verminderte oder keine CBS-Aktivität (Chromosom 21) • gestörte Remethylierung • MTHFR-Mangel (keine Aktivität oder thermolabile Variante) • Methionin-Synthase-Mangel • Methionin-Synthase-Reduktase-Mangel 	
Alter und Geschlecht	
<ul style="list-style-type: none"> • tHcy-Erhöhung im Alter • tHcy-Spiegel: Männer > Frauen (gleichen Alters) • tHcy-Erhöhung bei postmenopausalen Frauen 	
Nierenfunktion	
<ul style="list-style-type: none"> • gesteigerte tHcy-Spiegel bei Niereninsuffizienz 	
Ernährung	
<ul style="list-style-type: none"> • Folsäure-Mangel • Vitamin B₆-Mangel • Vitamin B₁₂-Mangel 	
Vitaminstoffwechselstörungen	
<ul style="list-style-type: none"> • Transcobalamin – Mangel • rezessiv vererbte Cobalamin-Mutationen (CblA-CblH) 	
Krankheitsstatus	
<ul style="list-style-type: none"> • ausgeprägte Psoriasis: assoziiert mit erhöhten tHcy-Spiegeln (eventuell in Verbindung mit erniedrigten Folsäurespiegeln) • Tumorerkrankungen (ALL, Mamma-Ca, Ovarial-Ca, Pankreas-Ca) • Lebererkrankungen • Anorexia nervosa • Hypothyreose 	
medikamentöse Behandlung	
<u>Chemotherapeutika:</u>	<u>Antiepileptika:</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Methotrexat (verringert 5-MTHF) • Azaribin (6-Azauridin, Vitamin B₆-Antagonist) • Stickstoffoxid (inaktiviert Vitamin B₁₂) • Azathioprin • Trimethoprim 	<ul style="list-style-type: none"> • Phenytoin (beeinflusst den Folsäurestoffwechsel) • Carbamazepin (beeinflusst den Folsäurestoffwechsel)
	<u>Lipidsenker:</u>
	<ul style="list-style-type: none"> • Fenofibrat und Bezafibrat

2.4 Pathophysiologische Aspekte des Homocysteins

Die Mechanismen, durch welche tHcy eine Gefäßschädigung induziert, sind multifaktoriell. Man nimmt an, dass die meisten dieser Effekte konzentrationsabhängig verstärkt werden [Suter et al. 1999]. In experimentellen Versuchen wurde gezeigt, dass tHcy eine Endothelzellschädigung hervorruft, in deren Folge es zu einer Freilegung der subendothelialen Matrix mit anschließender Aktivierung von Thrombozyten kommt [Harker et al. 1974 und 1976]. Ferner konnten eine verminderte vasomotorische Regulation der Gefäße [Celermajer et al. 1993, Lentz et al. 1996] sowie eine verminderte antithrombotische Funktion [Lentz et al. 1996, van den Berg et al. 1995] mit einer Hyperhomocysteinämie in Verbindung gebracht werden. Als mögliche Ursache für die endotheliale Dysfunktion vermutet man eine durch Hcy geförderte oxidative Schädigung des Endothels.

Wenn tHcy ins Plasma gelangt, wird es schnell autooxidiert. Dabei entsteht neben Homocystin und gemischten Disulfiden das Hcy-Thiolacton [Ueland et al. 1996]. Während dieser Reaktion entstehen auch reaktive Sauerstoff-Spezies, wie z.B. Superoxid und Wasserstoffperoxid. Letzteres wird zusammen mit dem Hydroxylradikal, einem Superoxid-abhängig gebildeten Radikal [Rowley und Halliwell 1982], für die Gefäßtoxizität im Rahmen einer Hyperhomocysteinämie verantwortlich gemacht [Welch et al. 1997]. Es wird vermutet, dass eine Hcy-induzierte Endothelzellschädigung hauptsächlich auf die Bildung von Wasserstoffperoxid zurückzuführen ist [Wall et al. 1980, Starkebaum und Harlan 1986].

Das Hydroxylradikal führt zu einer Lipidperoxidation in den Plasmamembranen der Endothelzellen sowie in Lipoproteinpartikeln [Heinecke 1988, Loscalzo 1996]. Das Superoxid-Anion-Radikal, ein weiteres bei der Hcy-Autooxidation anfallendes Radikal, bewirkt eine LDL-Oxidation [Heinecke et al. 1987 und 1988].

Die Arbeitsgruppe um Jakubowski beobachtete in Endothelzellen humaner Umbilikalvenen eine direkt proportional mit der tHcy-Konzentration steigende tHcy-Thiolacton-Produktion [Jakubowski et al. 2000]. Weiterhin wurde festgestellt, dass das chemisch reaktive tHcy-Thiolacton zur Acylierung freier Aminogruppen in Proteinen führt und somit über Bindung an diese Eiweiße inkorporiert wird. Dies führt zum Verlust der biologischen Aktivität der Proteine [Jakubowski et al. 1999]. Das Ausmaß dieser Protein-Homocysteinylierung wuchs mit steigenden tHcy-Konzentrationen und war rückläufig unter erhöhtem Angebot von Folsäure und HDL [Jakubowski et al. 2000].

Man weiß, dass tHcy verschiedene Stufen der Hämostase beeinflussen kann. Es verändert den normalen antithrombotischen Phänotyp des Endothels durch eine Aktivitätssteigerung der Faktoren V [Rodgers und Kane 1986] und XII [Ratnoff 1968, Bots et al. 1997] sowie durch

eine verminderte Aktivität des Protein C [Rodgers und Conn 1990]. Weiterhin hemmt tHcy die Expression von Thrombomodulin [Lentz und Sadler 1991] und Heparansulfat durch das Endothel [Nishinaga et al. 1993] und induziert die Expression des prokoagulatorischen, von Endothelzellen gebildeten „tissue factors“ (TF) [Fryer et al. 1993]. Alle diese Effekte fördern die Thrombinbildung und führen zu einem prothrombotischen Milieu. Nach von Eckardstein haben Patienten mit Homocystinurie oft erniedrigte Antithrombin III-Spiegel [von Eckardstein und Assmann 1998], was für den prothrombotischen Charakter erhöhter tHcy-Spiegel sprechen könnte. tHcy und andere SH-Gruppen enthaltende Verbindungen verstärken die Bindung von Lp(a) an Fibrin und führen so zu gesteigerter Athero- und Thrombogenese [Harpel et al. 1992]. Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit und Hyperhomocysteinämie wiesen eine signifikante Erhöhung des von-Willebrand-Faktors gegenüber normohomocysteinämischen Patienten mit pAVK auf; andere endothelgenerierte Proteine wie Gewebsplasminogen-Aktivator (tPA), Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI-1), zelluläres Fibronectin (cFN) und Thrombomodulin (TM) zeigten keine Konzentrationsunterschiede [de Jong et al. 1997].

Die Aktivität von Leukozyten wird durch tHcy gesteigert [Völksch et al. 1997], was zu erhöhter Vasoaggressivität, Radikalbildung, Adhäsivität und Phagozytose führt. Möglicherweise trägt die mit steigenden tHcy-Spiegeln verstärkte Expression der Oberflächen-Adhäsions-Moleküle CD11b, CD14 und CD18 auf Leukozyten dazu bei [Guo und Dudman 2001]. Ferner könnte daran auch eine gesteigerte, durch tHcy getriggerte, Expression und Sekretion der proinflammatorischen Cytokine MCP-1 und IL-8 [Poddar et al. 2001] sowie der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und E-Selectin humaner Endothelzellen beteiligt sein [Koga et al. 2002].

Thrombozyten zeigen in Gegenwart erhöhter tHcy-Konzentrationen eine verkürzte Überlebenszeit, verbunden mit einem erhöhtem Thrombozyten-Turnover, was zur Induktion intimaler Läsionen führt [Harker et al. 1976]. Eine direkte Stimulation der Thrombozytenaktivierung scheint nicht stattzufinden [Stamler et al. 1993].

tHcy vermindert die Produktion von NO. Dieser Effekt ist unabhängig von der NO-Synthaseaktivität in Endothelzellen. Man geht davon aus, dass eine Senkung der Glutathionperoxidaseaktivität durch tHcy zu einer mangelnden Entgiftung von Peroxiden mit der Folge einer Endothelzelldysfunktion und herabgesetzten Bildung von EDRF (NO) führt [Upchurch et al. 1997]. Endogenes NO reagiert mit Hcy in einer sauerstoffabhängigen Reaktion zu S-Nitroso-Hcy [Stammler et al. 1996]. Hcy gilt auch als wirksames Mitogen für glatte Gefäßwandmuskelzellen. Die Inkubation solcher Zellen mit Hcy führte dosisabhängig

zu deren Proliferation [Tsai et al. 1994]. Dieser Effekt wurde sowohl durch einen Anstieg der mRNA der Zykline D1 und A als auch durch eine von reaktiven Sauerstoffspezies getriggerte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B mit anschließender Induktion der NO-Synthetase 2-Transkription (Nos2) [Welch et al. 1998] oder durch Kombination beider Mechanismen erreicht. Dabei stellte die NF- κ B/rel Aktivität einen essentiellen Stimulus für die Proliferation glatter Muskelzellen dar [Weiss et al. 1999].

Hcy führt durch Beeinflussung biochemischer und biosynthetischer Funktionen der Gefäßwandzellen auch zu einer direkten vaskulären Schädigung. tHcy-Thiolacton als hochreaktives Nebenprodukt der tHcy-Oxidation bildet zusammen mit LDL Aggregate, die von Intima-Makrophagen und Schaumzellen inkorporiert werden und somit die Atheromentstehung unterhalten [Naruszewicz et al. 1994].

2.5 Beziehungen zwischen Hyperhomocysteinämie und Atherosklerose

2.5.1 Allgemeinbevölkerung

Seit den bereits einleitend erwähnten Beobachtungen von McCully im Jahr 1969 belegten mehrere prospektive Studien die Beziehungen zwischen erhöhten tHcy-Konzentrationen und der Inzidenz atherosklerotischer Veränderungen an koronaren, cerebralen und peripheren Gefäßen [Clarke et al. 1991, Boushey et al. 1995, Graham et al. 1997, Nygård et al. 1997, Wald et al. 1998, Bots et al. 1999, Stehouwer et al. 1999].

Boushey et al. zeigten, dass ein Anstieg der tHcy-Plasmakonzentration um 5 μ mol/l das Risiko einer koronaren Herzerkrankung im selben Maße erhöht wie ein Anstieg der Cholesterol-Serumkonzentration um 0,5 mmol/l (20 mg/dl); Odds Ratio für Männer 1,6 (95% CI 1,4-1,7), für Frauen 1,8 (95% CI 1,3-1,9). In 10% der Fälle war das erhöhte Risiko auf eine Hyperhomocysteinämie zurückzuführen [Boushey et al. 1995].

Clarke et al. stellten bei 16 von 38 Patienten (42%) mit zerebrovaskulärer Insuffizienz, bei 7 von 25 Patienten (28%) mit pAVK sowie bei 18 von 60 Patienten (30%) mit koronarer Herzkrankheit eine Hyperhomocysteinämie fest. Unter Berücksichtigung konventioneller Risikofaktoren wurde die Odds Ratio für die Entwicklung einer Gefäßerkrankung unter den hyperhomocysteinämischen Patienten mit 3,2 angegeben [Clarke et al. 1991].

Die Bedeutung erhöhter tHcy-Werte ist vergleichbar mit der des Rauchens oder erhöhter Blutfettwerte [Clarke et al. 1991, Graham et al. 1997].

Im Gegensatz dazu bestand im Ergebnis anderer Studien kein signifikanter Zusammenhang zwischen tHcy und dem CVD-Risiko [Alfthan et al. 1994, Ridker et al. 2001].

Während eines Verlaufes von 9 Jahren erlitten 134 Männer und 131 Frauen von insgesamt 7424 Probanden (40-64 J.) einen Myokardinfarkt bzw. einen Schlaganfall. Erkrankte und Kontrollpersonen wiesen keine signifikanten Unterschiede der tHcy-Spiegel auf. Die logistische Regression zeigte keine signifikante Assoziation zwischen den tHcy und den kardiovaskulären Ereignissen [Alfthan et al. 1994].

In einer prospektiven Studie an 140 Männern nach einem Beobachtungszeitraum von 9 Jahren war tHcy kein Prädiktor einer symptomatischen pAVK (RR = 1,49; 95% CI: 1,20-1,68; p = 0,9) [Ridker et al. 2001].

2.5.2 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

Eine moderate Hyperhomocysteinämie findet sich in 60-85% der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und bei mehr als 90% der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz unter Dialysetherapie [Bostom und Culleton 1999, Shemin et al. 2001, de Vriese et al. 2002]. Bezüglich des kardiovaskulären Risikos handelt es sich vorwiegend um Untersuchungen an Patienten, die sich bereits einer chronischen Dialysetherapie unterziehen müssen [Bostom et al. 1997b, Moustapha et al. 1998, Ducloux et al. 2000].

Bei einer Kreatinin-Clearance (Ccr) von 30-75 ml/min betrug der tHcy-Wert $16,2 \pm 8,1$ $\mu\text{mol/l}$, bei einer Ccr von 10-29,9 ml/min $23,3 \pm 14,7$ $\mu\text{mol/l}$ und bei einer Ccr < 10 ml/min $29,5 \pm 14,4$ $\mu\text{mol/l}$. Die gesunde Kontrollgruppe wies tHcy-Werte von $8,2 \pm 2,2$ $\mu\text{mol/l}$ auf. Patienten, mit einer arteriellen Verschlusskrankheit hatten signifikant höhere tHcy-Werte als Patienten ohne diese Gefäßveränderungen ($30,9 \pm 19,1$ vs. $19,6 \pm 9,7$ $\mu\text{mol/l}$) [Chauveau et al. 1993].

Der Einfluss gesteigerter tHcy-Konzentrationen auf kardiovaskuläre Ereignisse wurde bei 73 Dialysepatienten bestimmt. Die mittlere tHcy-Plasmakonzentration wurde mit $22,3$ $\mu\text{mol/l}$ gemessen. Eine multivariate Cox-Regression demonstrierte erhöhte tHcy-Spiegel mit einem 3-4,4-fach (95% CI: 1,1-8,1 bis 1,6-12,2) erhöhten Risiko für das Auftreten tödlicher und nichttödlicher kardiovaskulärer Erkrankungen. Dabei wurde allerdings ein Vergleich des obersten Quartils (tHcy ≥ 27 $\mu\text{mol/l}$) gegen die Summe der drei unteren Quartile (tHcy ≤ 27 $\mu\text{mol/l}$) durchgeführt [Bostom et al. 1997b].

In einer prospektiven Untersuchung an 167 Dialysepatienten wurden erhöhte tHcy-Konzentrationen (RR = 1,01; p = 0,01) und die Präexistenz eines Diabetes mellitus (RR = 2,38; p < 0,01) als unabhängige CVD-Risikofaktoren ermittelt. Somit steigerte sich das relative Risiko um 1% pro 1 $\mu\text{mol/l}$ tHcy-Anstieg [Moustapha et al. 1998].

Es existieren jedoch auch Studien, in denen sich eine gesteigerte tHcy-Konzentration nicht als unabhängiger Risikofaktor erwies [Ducloux et al. 2000]. Vielmehr konnten traditionelle Risikofaktoren wie das Alter, Diabetes mellitus und erniedrigte Albuminkonzentrationen als unabhängige Risikofaktoren identifiziert werden. Bisläng konnte keine Studie durch die Senkung des tHcy-Spiegels eine Verbesserung des kardiovaskulären Outcome nachweisen [Madore 2003].

2.6 Homocystein und chronische Niereninsuffizienz

Die Genese erhöhter tHcy-Spiegel im Plasma niereninsuffizienter Patienten ist komplex und zusammen mit der zusätzlichen Bestimmung der Metaboliten des tHcy-Stoffwechsels derzeit Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Als mögliche Ursachen diskutiert man eine verminderte renale Hcy-Ausscheidung, einen reduzierten renalen Hcy-Metabolismus sowie eine durch Urämietoxine induzierte Aktivitätsbeeinträchtigung der für den Hcy-Stoffwechsel verantwortlichen Enzyme [Perna et al. 2001].

Der Niere wird eine bedeutende Rolle im Aminosäurestoffwechsel zuteil. Ungebundene AS werden in den Glomeruli frei filtriert und geben somit Aufschluss über die AS-Konzentration im Plasma sowie über die GFR. tHcy liegt mit einer Molekülmasse von 135 Dalton [House et al. 2000] innerhalb der Filtrationsbreite normaler Glomeruli und tritt folglich durch Filtration aus dem Plasma in den Primärharn über. Schätzungsweise 450 mmol AS werden täglich filtriert [Silbernagl 1988]. Der Anteil der täglich filtrierten tHcy-Menge kann bei einer GFR von 180 l/Tag zwischen 18 und 540 µmol schwanken [Perna et al. 2001]. Mehr als 99% aller filtrierten AS werden anschließend entlang der proximalen Nierentubuli rückresorbiert und näherungsweise 5 mmol erscheinen im Sekundärharn [Silbernagl 1988, van Guldener et al. 1998b]. Alternativ hierzu können die AS über die basolaterale Seite der Tubuluszellen ins Zellinnere gelangen. Dies geschieht überwiegend im Bereich der distalen Nierentubuli, um Zellen, deren luminaler AS-Transport vermindert ist, mit Substrat zu versorgen [Silbernagl 1988]. Hcy scheint über diesen Mechanismus aufgenommen zu werden, da bekannt ist, dass Cystin, eine AS die sich zusammen mit Homocystin einen Transporter teilt, ebenfalls über diese Art und Weise rückresorbiert wird [Silbernagl 1988]. Aus zerkleinertem Nierenrindengewebe von Ratten konnte ein Transportersystem identifiziert werden, dass neben Hcy auch Cystin sowie die AS Arginin, Ornithin und Lysin aus dem Primärharn rückresorbiert [Foreman et al. 1982].

Im Rahmen einer Niereninsuffizienz folgt dem prärenalen Anstieg der AS-Konzentration eine gesteigerte AS-Exkretion in den Urin durch eine Zunahme der Filtrationsrate noch intakter

Nephronen [Silbernagl 1988]. Die daraus resultierende Verkürzung der Kontaktzeit zwischen den AS und den Transportsystemen der Tubuluszellen beeinträchtigt zusätzlich deren Fähigkeit zur Reabsorption und Metabolisierung [Kopple et al. 1978, Silbernagl 1988]. Ferner könnte theoretisch auch eine gesteigerte AS-Sekretion der Tubuluszellen zu erhöhten Urin-AS-Spiegeln führen [Friedman et al. 2001]. Diesen Prinzipien folgt auch Hcy, sodass die Hcy-Konzentration des Urins ebenfalls unter Progression des Nierenfunktionsverlustes ansteigen kann [Friedman et al. 2001]. Bei Patienten mit einer Ccr von 19 ml/min und Urin-Hcy-Spiegeln von 1,4 $\mu\text{mol/h}$ wurden schätzungsweise 15% des filtrierte Hcy mit dem Urin ausgeschieden [Guttormsen et al. 1997]. Bei Bestimmungen der Konzentrationsdifferenz von Gesamt- und freiem Hcy über die selektive Katheterisierung der Nierenarterie und -vene wurden arterio-venöse Differenzen von nur 0,43 $\mu\text{mol/l}$ (Gesamt-tHcy) und 0,38 $\mu\text{mol/l}$ (freies tHcy) gemessen [van Guldener et al. 1998b]. Man geht davon aus, dass das frei filtrierte Hcy, analog zu den anderen AS, bei einer Filtrationsfraktion von 20% zum überwiegenden Teil tubulär rückresorbiert wird und nur 1% (6 μmol) täglich mit dem Urin ausgeschieden werden [Bostom et al. 1995, Ueland 1995, Guttormsen et al. 1993 und 1996, Perna et al. 2001]. Die Gesamt-Hcy-Clearance wurde bei 2 niereninsuffizienten Patienten (Krea > 325 $\mu\text{mol/l}$) nach peroraler Hcy-Aufnahme (65 $\mu\text{mol/kg KG}$) mit 31 ml/min vs. 104 ml/min bei 2 Gesunden angegeben [Guttormsen et al. 1997]. Die Plasmahalbwertszeit von tHcy bei Niereninsuffizienten war über 4-mal höher. Eine Folsäuresubstitution bei 6 Niereninsuffizienten zeigte eine Zunahme der tHcy-Clearance von 26 ± 8 auf 28 ± 12 ml/min nach peroraler tHcy-Aufnahme (Gesunde 101 ± 15 ml/min) und eine Abnahme des basalen tHcy-Spiegels um 26,8% [Guttormsen et al. 1993 und 1997]. Der im Rahmen der Niereninsuffizienz verminderten renalen Ausscheidung von tHcy kann demnach nur eine geringe Bedeutung zukommen.

Die zunehmende Fibrosierung der Nieren scheint zu einem fortschreitenden Verlust der Stoffwechsellkapazität zu führen, die unter physiologischen Bedingungen für ~70% der täglichen Hcy-Elimination aus dem Plasma sorgt [Bostom und Lathrop 1997]. Bei Patienten unter Hämodialyse konnte eine um 30% verminderte Remethylierung nachgewiesen werden [van Guldener et al. 1999].

Eine herabgesetzte tubuläre Aufnahme des Hcy im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz scheint dafür verantwortlich zu sein, dass die Hcy-Clearance mit fortschreitendem renalen Funktionsverlust nicht im selben Maße sinkt wie die Kreatinin-Clearance [Hultberg et al. 1993]. Möglicherweise liegt die Störung auf der Ebene des Hcy-Katabolismus, woraus ein prärenal Konzentrationanstieg resultiert.

Den Stoffwechselveränderungen der Urämie kommt eine besondere Bedeutung zu. Die Retention von Endprodukten des Purin- und Eiweißstoffwechsels scheint den Hcy-Abbau über einen Metabolitenaufstau zu hemmen [Friedman et al. 2001].

Mit fortschreitender Niereninsuffizienz steigen sowohl die Spiegel des freien als auch des gebundenen Hcy und somit des tHcy an, wobei der relative Anteil des freien Hcy gleich bleibt oder etwas sinkt [Hultberg et al. 1995, Suliman et al. 1997].

Ein primärer wie sekundärer Vitaminmangel zählt zu den weiteren Ursachen der tHcy-Erhöhung im Plasma niereninsuffizienter Patienten.

So ist die diätetische Einschränkung von kaliumreichen Lebensmitteln von großer Bedeutung, da Früchte und Gemüse eine wichtige Quelle für Folsäure sind.

Des Weiteren werden durch eine Proteinrestriktion Nahrungsmittel eingeschränkt, die reich an Vitamin B₆ und Vitamin B₁₂ sind [Makoff et al. 1996].

Eine Perpetuierung des Vitaminmangels resultiert aus den Verlusten wasserlöslicher Vitamine während der Dialysebehandlung, wobei die Vitaminverluste von der Zusammensetzung des Dialysates, der Dialysemembran, der Dialysefrequenz sowie der Proteinbindung und Konzentration der Vitamine abhängig sind [Stein et al. 1985, Descombes et al. 1993]. Die durch die Dialysebehandlung induzierten täglichen Verluste an Folsäure liegen um 30-60% höher als die Verluste im Urin Gesunder. Dem gegenüber stehen lediglich gering erhöhte Verluste an Vitamin B₆ und Vitamin B₁₂ [Makoff et al. 1996]. Man geht davon aus, dass der Folsäurespiegel bei etwa 50% der Dialysepatienten erniedrigt ist, wobei Patienten mit hocheffizienter Dialyse besonders betroffen sind [Chauveau et al. 1996].

Aufgrund der hohen Plasmaproteinbindung von nahezu 80%, hauptsächlich an Albumin, ist die Dialysierbarkeit von tHcy gering [Stein et al. 1997]. Trotzdem wird der Abfall der tHcy-Konzentration während der Dialysebehandlung zwischen 10% und 50% angegeben [Chauveau et al. 1993]. Dafür scheint die Elimination von Urämietoxinen, die den tHcy-Katabolismus inhibieren, mitverantwortlich zu sein [House et al. 2000]. Dies kann offensichtlich, im Vergleich zu Dialysatoren mit low-flux-Membran (F8), effektiver mit high-flux-Dialysatoren (F80) erfolgen (tHcy-Reduktion_{F80}: 41-44%; tHcy-Reduktion_{F8}: 29-32%, $p < 0,001$), wobei sich nach dreimonatiger Dialysedauer bezüglich der Senkung der tHcy-Konzentration im Vergleich zum Ausgangswert kein signifikanter Unterschied für beide Dialysatortypen nachweisen ließ [House et al. 2000]. Van Tellingen et al. konnten nach gleicher Dialysedauer mit 2 Super-flux-Dialysatoren (F500S und Tricea 150G) eine signifikante Senkung der tHcy-Plasmakonzentration erzielen ($29,6 \pm 9,9 \mu\text{mol/l}$ vs. $21,5 \pm 8,5$

$\mu\text{mol/l}$, $p = 0,007$; $24,4 \pm 8,7 \mu\text{mol/l}$ vs. $15,3 \pm 3,7 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,008$) [van Tellingen et al. 2001].

Von großer Bedeutung ist die Auswirkung von Urämietoxinen, die die Resorption, zelluläre Aufnahme und Aktivierung von Vitaminen herabsetzen. Bei der Mehrzahl der niereninsuffizienten Patienten, wie auch der dialysierten Patienten entwickelt sich eine mangelhafte biochemische Aktivität des Vitamins B₆ [Stein et al. 1985, Descombes et al. 1993]. Diese wurde u.a. auf eine mangelnde Koenzymproduktion (erniedrigte Spiegel von Pyridoxalphosphat) durch einen interferierenden Urämiefaktor zurückgeführt [Makoff et al. 1996].

Die Bestimmung der Folsäureplasmaspiegel zeigt in der Mehrzahl der Fälle normale bis erhöhte Werte [Stein et al. 1985, Descombes et al. 1993] bei erhöhten tHcy-Werten, was für einen herabgesetzten Vitaminmetabolismus spricht. In Gewebekulturen war bei Anwesenheit von urämischem Serum die Aufnahme von Folsäure erniedrigt [Makoff et al. 1996].

Die Vitamin B₁₂-Spiegel bei Niereninsuffizienten sind meist im Normalbereich oder aufgrund einer erhöhten Vitamin B₁₂-Bindungskapazität erhöht [Stein et al. 1985, Chauveau et al. 1993].

Diese Ergebnisse bestätigen die Tatsache, dass ein Mangel an diesen Vitaminen in der Mehrzahl der Fälle durch eine Serumspiegelbestimmung nicht verifiziert werden kann, da es sich um einen intrazellulären, funktionellen Mangel der Vitamine handelt.

Renale Tubuluszellen scheinen eine wichtige Funktion beim Abbau von tHcy über die Transsulfurierung zu spielen [House et al. 1997 und 1998]. So konnten House et al. 78% des Hcy-Abbaus durch isolierte renale kortikale Tubuluszellen auf die Transsulfurierung (Produktion von Cystathionin und Cystein) und nur 2% des Abbaus auf die Remethylierung (Methioninproduktion) zurückführen [House et al. 1997]. Die Transsulfurierung war durch Serin stimulierbar.

Im Untergang von funktionierendem Nierengewebe bei chronischer Niereninsuffizienz mit resultierender eingeschränkter tHcy-Aufnahme- und Metabolisierungsrate scheint, nach tierexperimentellen Untersuchungen [Bostom et al. 1995], ein wesentliches pathogenetisches Prinzip begründet zu sein.

Bei nierentransplantierten Patienten unter immunsuppressiver Therapie sowohl mit Cyclosporin A als auch mit Tacrolimus wurden signifikant erhöhte Plasma-tHcy-Spiegel gegenüber denen mit Azathioprin- bzw. Steroidtherapie ($17,3 \pm 8,1$ bzw. $16,3 \pm 6,9$ vs. $12,3 \pm 5,5 \mu\text{mol/l}$, $p < 0,02$) bestimmt. Die mit Cyclosporin A bzw. Tacrolimus behandelten Patienten wiesen jedoch gegenüber der Azathioprin/Steroid-Gruppe signifikant höhere

Kreatininkonzentrationen auf ($1,6 \pm 0,6$ vs. $1 \pm 0,3$ mg/dl, $p < 0,01$ bzw. $1,9 \pm 0,8$ vs. $1 \pm 0,3$ mg/dl, $p < 0,005$), welche signifikant mit den tHcy-Konzentrationen korrelierten ($r = 0,3$; $p < 0,01$). Folglich ist der Haupteinflussfaktor einer Hyperhomocysteinämie bei nierentransplantierten Patienten der Grad der Niereninsuffizienz, unabhängig von der angewendeten immunsuppressiven Therapie [Mor et al. 2001].

2.7 Homocysteinbestimmung bei anderen Erkrankungen

Der Bestimmung des tHcy und seiner Metaboliten kommt bei vielen Krankheitsbildern sowie im Rahmen ernährungswissenschaftlicher Untersuchungen eine Bedeutung zu (vgl. 2.2 Homocystein und Intermediärstoffwechsel).

Erhöhte Werte von tHcy und MMA wurden bei Patienten nach Magenoperation festgestellt [Sumner et al. 1996]. Allerdings hatten nur 12 der 19 Patienten mit einem Vitamin B₁₂-Mangel erhöhte tHcy-Spiegel.

Auch bei Patienten mit entzündlicher Darmerkrankung (Morbus Crohn und ulzerative Kolitis) fanden sich erhöhte tHcy-Konzentrationen [Romanguolo et al. 2001].

Patienten mit einer Leberzirrhose wiesen gegenüber Kontrollpersonen höhere tHcy-Spiegel auf ($14,1 \pm 1,3$ vs. $8,1 \pm 0,9$ $\mu\text{mol/l}$, $p < 0,03$). Dies kann durch eine mit steigendem Zirrhosegrad (Child-Pugh-Score) zunehmend verringerte Gen-Expression der MS, BHMT und CBS im Lebergewebe erklärt werden [García-Tevijano et al. 2001].

Bei der Thrombangiitis obliterans scheinen erhöhte tHcy-Serumspiegel als nikotin-unabhängiger Risikofaktor eine Rolle zu spielen [Stammler et al. 1996].

Eine neue Studie von Seshadri et al. zeigt tHcy als unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung einer Demenz, speziell für den Morbus Alzheimer (RR = 1,8; 95% CI: 1,3-2,5). Dabei hat eine Erhöhung der tHcy-Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ einen Anstieg des Risikos für die Demenz des Alzheimer-Typs um 40% zu Folge [Seshadri et al. 2002].

Bei Diabetikern gilt die Hyperhomocysteinämie als unabhängiger CVD-Risikofaktor [Fonseca et al. 2004]. In einer prospektiven Studie an 830 Typ 2-Diabetikern (462 Männer und 368 Frauen) wurde nach einem Beobachtungszeitraum von 7 Jahren für Patienten mit tHcy-Werten > 15 $\mu\text{mol/l}$, verglichen mit denen < 15 $\mu\text{mol/l}$, ein RR = 2,21 (95% CI: 1,38–3,54; $p = 0,001$) für das CVD-assoziierte Versterben oder das Auftreten eines nichttödlichen Myokardinfarktes (AMI) errechnet [Soinio et al. 2004]. Eine weitere Untersuchung an Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (NIDDM) zeigte eine Odds Ratio von 1,38 (95% CI: 0,97-1,95) für die Entwicklung einer Mikroalbuminurie je Erhöhung der tHcy-Serumspiegel um 5 $\mu\text{mol/l}$ [Jager et al. 2001]. Die Plasma-tHcy-Konzentration wurde als signifikanter

Prädiktor der Mortalität bei Patienten mit NIDDM, mit oder ohne Albuminurie, angesehen [Stehouwer et al. 1999]. Interessant ist die Tatsache, dass bei Typ 1- und Typ 2-Diabetikern mit normaler Nierenfunktion die tHcy-Plasmaspiegel unter der altersentsprechenden Norm lagen und eine starke Abhängigkeit von der GFR bestand [Wollesen et al. 1999]. Die mittleren tHcy-Werte (95% CI) betragen 11,3 (10,3-12,4) $\mu\text{mol/l}$ bei einer GFR $< 100 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ sowie 9,26 (8,61-9,91) $\mu\text{mol/l}$ bei einer GFR $> 100 \text{ ml/min/1,73 m}^2$. Patienten mit einer Mikroalbuminurie wiesen eher höhere tHcy-Spiegel auf, ein Effekt der Mikroalbuminurie auf die Beziehung von tHcy-Spiegeln und GFR wurde jedoch nicht festgestellt. Die Autoren bewerteten die niedrigeren tHcy-Spiegel als Folge der Hyperfiltration bei Diabetikern und schätzten die GFR als einen unabhängigen Vorhersagewert für die tHcy-Plasmaspiegel bei Diabetikern ein.

3 Zielstellung der Arbeit

Chronisch niereninsuffiziente Patienten weisen eine deutlich gesteigerte kardiovaskuläre Morbidität auf, welche nur eingeschränkt mit der Prävalenz traditioneller, atherosklerotischer Risikofaktoren erklärbar ist. Deshalb erscheint die Klärung der Zusammenhänge zwischen gestörtem tHcy-Metabolismus und atherosklerotischen Folgeerscheinungen bei Patienten mit Nierenfunktionseinschränkung sinnvoll, um neue therapeutische Strategien ableiten zu können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, bei Patienten mit chronischer, nicht dialysepflichtiger Niereninsuffizienz simultan Serumkonzentrationen von tHcy und den Metaboliten CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} zu bestimmen und nach Zusammenhängen zwischen den Konzentrationen der genannten Substanzen und dem kardiovaskulären Risikoprofil sowie der Progression der Niereninsuffizienz zu fahnden. Die Metaboliten sollen speziell funktionelle Vitaminmangelsituationen aufzeigen. Dafür werden folgende Untersuchungen durchgeführt:

Bei Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz werden die Serumkonzentrationen von Gesamthomocystein (tHcy) und den Metaboliten CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung bestimmt.

Die Werte werden mit den Ergebnissen laboreigener Konzentrationsbestimmungen bei einer definierten, altersverteilten Normalpopulation sowie bei Patienten unter chronisch-intermittierender Hämodialyse verglichen.

In einem 2-jährigen Verlauf wird unter Berücksichtigung anamnestischer, klinischer und paraklinischer Parameter, der Einfluss der ermittelten Werte auf die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen sowie auf die Progression der Nierenfunktionseinschränkung bis hin zur Dialysepflichtigkeit untersucht.

Des Weiteren sollen Faktoren gesucht werden, die eine eventuelle Vorhersage der tHcy-Serumkonzentration ermöglichen.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte

<u>Zentrifuge:</u>	Hettich-Universal 30 RF [®] (Hettich GmbH, Tuttlingen)
<u>Vakuumentrifuge:</u>	Eppendorf-concentrator 5301 [®] (Eppendorf GmbH, Hamburg)
<u>Gaschromatograph:</u>	Hewlett-Packard GC 6890 Series [®] (Hewlett Packard Deutschland GmbH, Waldbronn)
<u>Gaschromatographie-Säule:</u>	30 Meter 5% Phenyl-Methyl-Siloxan-Kapillarsäule (Hewlett-Packard-5 MS [®]), Innendurchmesser: 0,25 mm, Filmdicke: 25 µm
<u>Massenspektrometer:</u>	Hewlett-Packard MS 5973 Series [®]
<u>Autosampler:</u>	Hewlett-Packard 7683 Series [®]
<u>EDV:</u>	Hewlett-Packard Kajak 5 [®] -Computer mit Hewlett-Packard MS ChemStation [®] -Software
<u>Probenkühlung:</u>	Umwälzthermostat Julabo F 12 [®] (Julabo GmbH, Seelbach)

4.1.2 Chemikalien und Lösungen

Probenvorbereitung

Die zur Probenvorbereitung benutzten Lösungen wurden mit Essigsäure 99-100% und Methanol der Firma Merck Deutschland KG (Darmstadt) hergestellt. D/L-Homocystein, D/L-Cystathionin und Methylmalonsäure von Sigma-Aldrich Deutschland GmbH (Steinheim) sowie 2-Methylcitrat von CDN-Isotopes (Quebec, Kanada) wurden als Reinsubstanzen zur Methodenevaluierung eingesetzt. Die internen Standards D, L-Homocystin 3,3',3',3,4,4,4',4'-D₈ (Homocystin-D₈), 2-[Methyl D₃]-Methylmalonsäure (MMA-D₃), D,L-[2-Amino-2-Carboxyethyl] Homocystein 3,3,4,4-D₄ (CYSTA-D₄) sowie [Methyl-D₃]-Methylzitrat (MCA-D₃) wurden von Campro Scientific (Andover, USA) sowie CDN-Isotopes (Quebec, Kanada) erworben. Als Reduktionsmittel wurde Dithiothreitol der Fa. Merck benutzt. Als Anionenaustauscher diente das Anionenaustauscherharz AG-MP 1[®] (100-200 mesh, chloride form) von Bio Rad Deutschland GmbH (München).

Derivatisierung

Die Derivatisierung wurde mit N-methyl-N(tert-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamid (MTBSFA) von Macherey-Nagel Deutschland GmbH (Düren) sowie hochreinem Acetonitril (LiChrosolv[®]) oder Ethylacetat (Uvasol[®]) der Fa. Merck durchgeführt.

4.2 Methoden

4.2.1 Probengewinnung

Die Serumproben stammen von Patienten mit nicht dialysepflichtiger chronischer Niereninsuffizienz, die in der Poliklinik für Nephrologie der Klinik für Innere Medizin III der FSU Jena betreut wurden (vgl. 5.1). Es wurden 99 Patienten (34 Frauen und 65 Männer) in die Studie einbezogen. Von 13 dieser Patienten, die im Verlauf des Beobachtungszeitraumes dialysepflichtig wurden, wurde zu Beginn der ambulanten Hämodialysebehandlung im Kuratorium für Hämodialyse und Nierentransplantation e.V. (KfH) in Jena eine zweite Serumprobe entnommen (vgl. 5.1.12). Jeder Patient wurde bezüglich der Studie aufgeklärt und gab seine schriftliche Zustimmung.

Die Blutabnahme erfolgte nach einer mindestens 8-stündigen Nüchternphase (über Nacht) in 10 ml Sarstedt-Serummonovetten[®] (Sarstedt AG, Nümbrecht). Sofort nach Abnahme wurden die Proben im Labor innerhalb einer halben Stunde bei 4°C und 1500 g für 30 min zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde das Serum (~5-6 ml) abgezogen und in 2 ml-Tubes (Sarstedt) bei -80°C gefroren.

4.2.2 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung umfasste folgende Schritte:

Der erste Schritt bestand in der Zugabe der jeweiligen internen Standards und Wasser zu der Serumprobe in einem 1,5 ml Probenfläschchen (Vial) von Varian-Chrompack Deutschland GmbH, Darmstadt. Zur tHcy-Messung erfolgte die Zugabe des Reduktionsmittels Dithiothreitol, um tHcy aus seiner Bindung an Proteine und aus Disulfiden zu lösen. Damit ist die Bestimmung des Gesamtbetrages von tHcy möglich. Dieser Gesamtbetrag des tHcy entspricht nach dem aktuellen Terminologiekonsensus dem Homocystein-total (tHcy) [Mudd et al. 2000]. Die Trennung der Substanzen von der Serummatrix erfolgte mit Hilfe eines Anionenaustauschers auf einer Trennsäule unter Verwendung unterschiedlicher Puffer. Die Elution von der Säule erfolgte in ein 1,5 ml Vial mit konischem Boden von Achroma GmbH (Müllheim). Daran schloss sich eine Trocknung in der Vakuumzentrifuge an. Nach

vollständiger Trocknung folgte die Derivatisierung. Sie beinhaltete die Zugabe von MTBSFA-Lösung und die anschließende Inkubation dieses Gemisches bei 90°C über 30 min im geschlossenen Vial. Dabei erfolgte die Bindung jeweils eines t-butyldimethylsilyl-Restes an die OH-, SH- und NH₂-Gruppen der nachzuweisenden Verbindungen. Damit wird eine „Maskierung“ der reaktiven Hydroxyl-, Sulfhydryl- und Aminogruppen mit der Folge der Stabilisierung der Substanz bei der Überführung in den gasförmigen Zustand erreicht. Des Weiteren kommt es zu einer Hydrophobierung und damit verbundenen besseren Trennbarkeit der Verbindungen. Das Anionenaustauscherharz wurde vor der Verwendung mit 1 N HCL gewaschen und dann mit Methanol gespült, um eine Aktivierung der stationären Phase und eine Reinigung zu erzielen. Danach erfolgte die Trocknung des konditionierten Harzes bei 60°C. Von dem Harz wurden jeweils 100 mg für eine Säule (0,8 x 4 cm Polyprep Columns[®] von Bio Rad Deutschland GmbH, München) eingewogen. Direkt vor Aufgabe der vorbereiteten Serumprobe wurde die Säule mit 1 ml Methanol und nachfolgend mit 3 ml Wasser konditioniert. Die Unterschiede der Probenvorbereitung zur Bestimmung von tHcy/CYSTA sowie MMA/2-MCA_{total} sind im Folgenden aufgeführt:

4.2.2.1 Probenvorbereitung zur Messung von Homocystein und Cystathionin

Pro Vial zur Probenvorbereitung werden nacheinander 50 µl Wasser, welches 19,99 nmol Homocystin-D₈ enthält und 50 µl Wasser mit 377,6 pmol Cys-D₄ als definierte interne Standards, 400 µl Serum, 50 µl einer 1 N NaOH-Lösung, die 10 mg Dithiothreitol/ ml enthält sowie 1 ml Wasser zugegeben. Diese Lösung wird anschließend gut vermischt und für 30 Minuten bei 40°C inkubiert. Danach wird sie mittels Glaspipette auf die zuvor konditionierte Säule gegeben. Nach der Beladung wird die Säule dreimal mit 3 ml Wasser und einmal mit 3 ml Methanol gewaschen. Anschließend erfolgt die Eluation mit 1,1 ml 0,4 N Essigsäure in Methanol in ein 1,5 ml Vial (mit konischer Grundplatte für Mikrovolumina). Das Eluat wird eine Stunde in einer Vakuumzentrifuge bei 45°C getrocknet. Danach folgt die Derivatisierung durch Zugabe von 30 µl einer Lösung aus hochreinem Ethylacetat (Uvasol[®]) und MTBSFA im Verhältnis 2:1 mit anschließender Durchmischung und Inkubation der verschlossenen Vials für 35 min bei 90°C.

4.2.2.2 Probenvorbereitung zur Messung von 2-Methylzitronensäure und Methylmalonsäure

Pro Vial werden nacheinander 50 µl Wasser mit 362,9 pmol MCA-D₃ und 50 µl Wasser mit 1,54 nmol MMA-D₃ als definierte interne Standards, 400 µl Serum sowie 1 ml Wasser

pipettiert. Diese Lösung wird anschließend gut vermischt. Danach wird die Lösung mittels Glaspipette auf die konditionierte Säule gegeben. Die Säule wird dann einmal mit 3 ml Wasser und anschließend dreimal mit 3 ml 0,01 N Essigsäure in Methanol gewaschen. Anschließend erfolgt die Eluation mit 1,1 ml 3,6 molarer Essigsäure/ 0,1 N HCl in 10% H₂O/ 90% Methanol in ein 1,5 ml Vial (konisch für Mikrovolumina). Das Eluat wird 90 Minuten in einer Vakuumzentrifuge bei einer Temperatur von 45°C getrocknet. Zur Derivatisierung werden die getrockneten Eluate mit einer Lösung aus hochreinem Acetonitril (LiChrosolv[®]) und MTBSFA im Verhältnis 2:1 versetzt und 40 min in verschlossenen Vials bei 90°C inkubiert.

4.2.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung

Zur quantitativen Bestimmung von tHcy und den Metaboliten CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} in den Patientenseren wurde die Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung angewendet. Diese Methode basiert auf den Angaben von Stabler und Allen [Allen et al. 1993, Stabler und Allen 1993] und wurde in modifizierter Art und Weise in unserem Labor etabliert [Busch 2000, Busch et al. 2002]. Die Analysemethode ermittelt das Verhältnis der Menge der unmarkierten, endogenen Substanz unbekannter Konzentration (Serumproben) zu einem, meist mit Deuterium markiertem, internen Standard bekannter Konzentration (sog. stable isotope dilution principle). Die internen Standards dieser Methode sind den zu bestimmenden Analyten chemisch identische Verbindungen, die sich nur durch das Vorhandensein von Deuteriumatomen im Molekül unterscheiden. Die zu analysierenden Substanzgemische wurden gaschromatographisch aufgetrennt. Die massenspektrometrische Detektion erfolgt im SIM-Modus (single ion mode), da für die einzelnen Verbindungen Target-Ionen bekannt sind, die eine hohe Spezifität für das zu messende Agens besitzen. So erhält man für die einzelnen Verbindungen charakteristische Peaks (vgl. Abb. 3 und Abb. 4). Zur Konzentrationsbestimmung der Metaboliten multipliziert man den Quotienten des Verhältnisses der Flächen unter der Kurve (area under curve-AUC) der Target-Ionen von unmarkiertem (endogenem) zu markiertem Metabolit (interner Standard) mit der im Serum vorliegenden Konzentration des internen Standards.

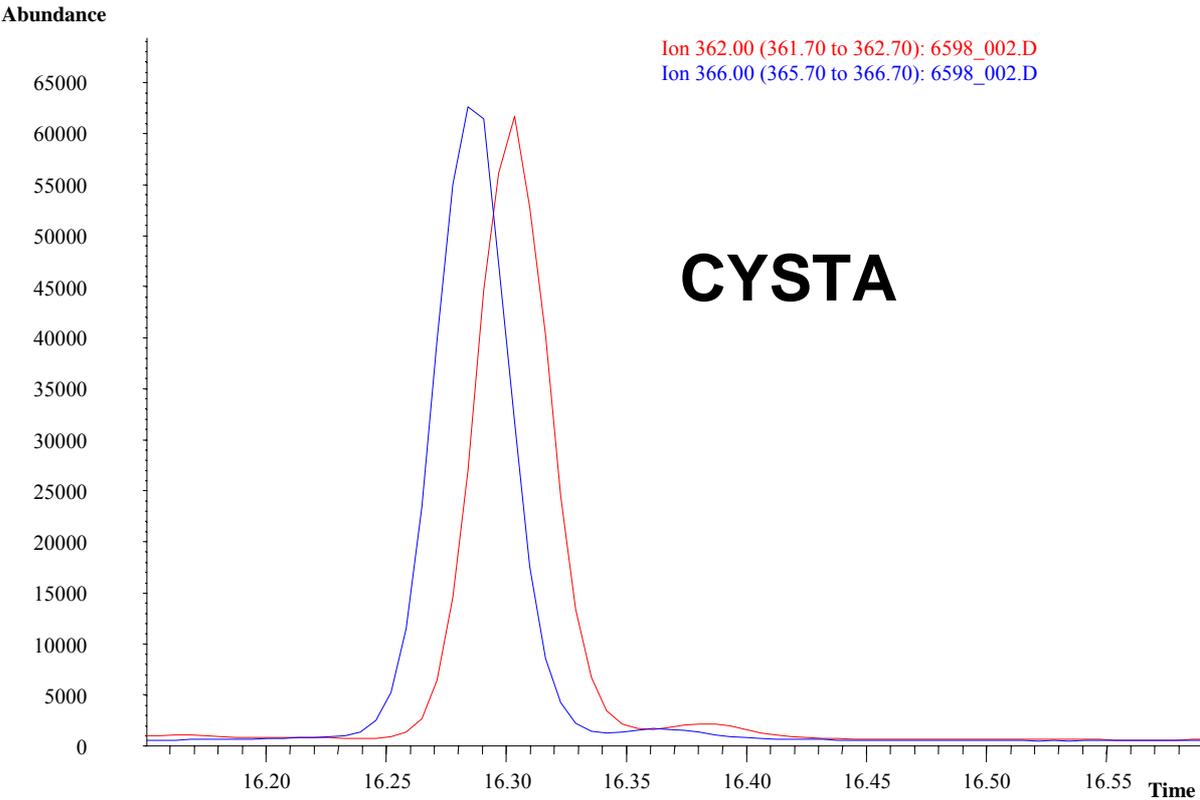
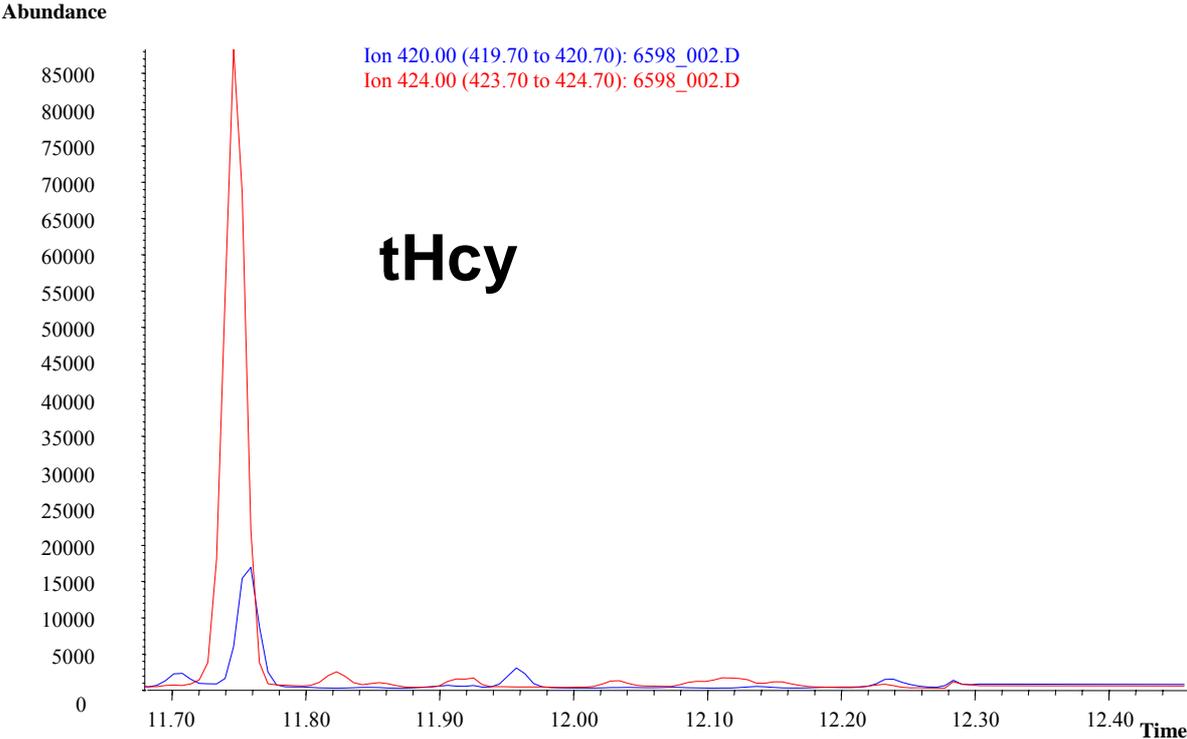


Abb. 2: Chromatogramme Homocystein und Cystathionin

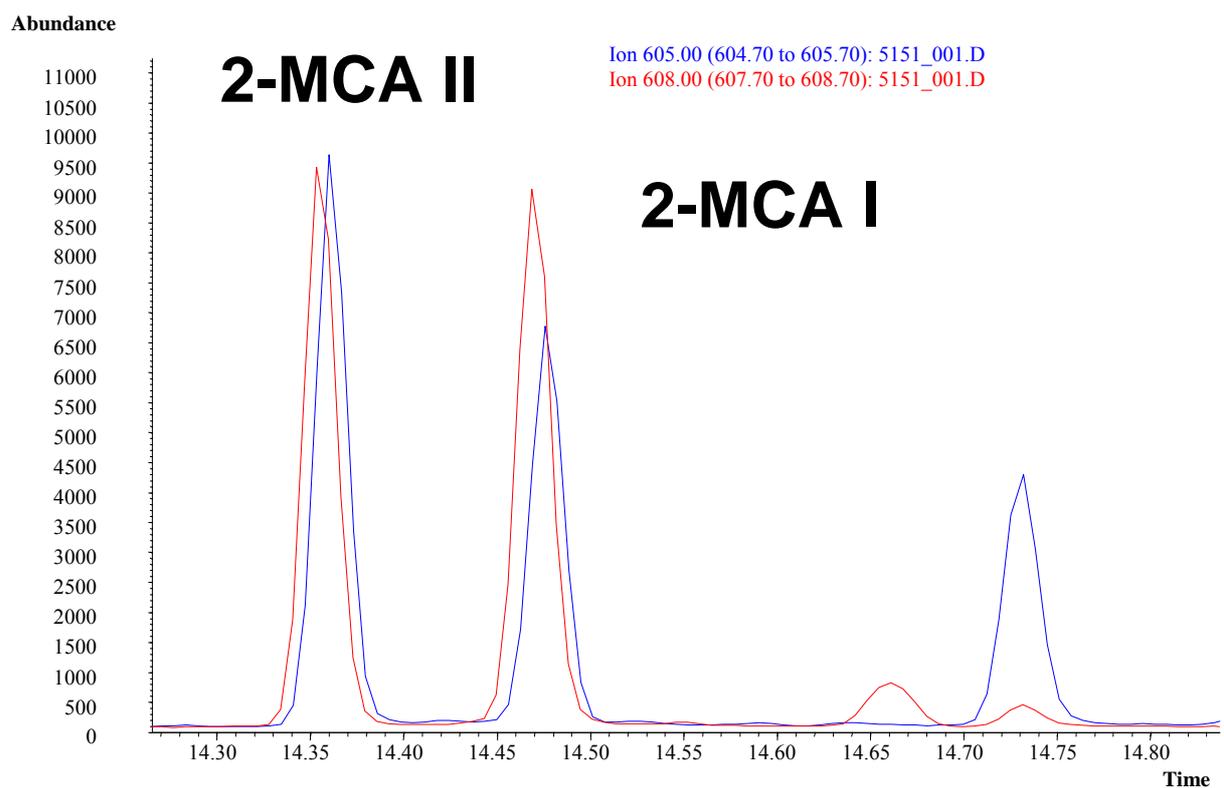
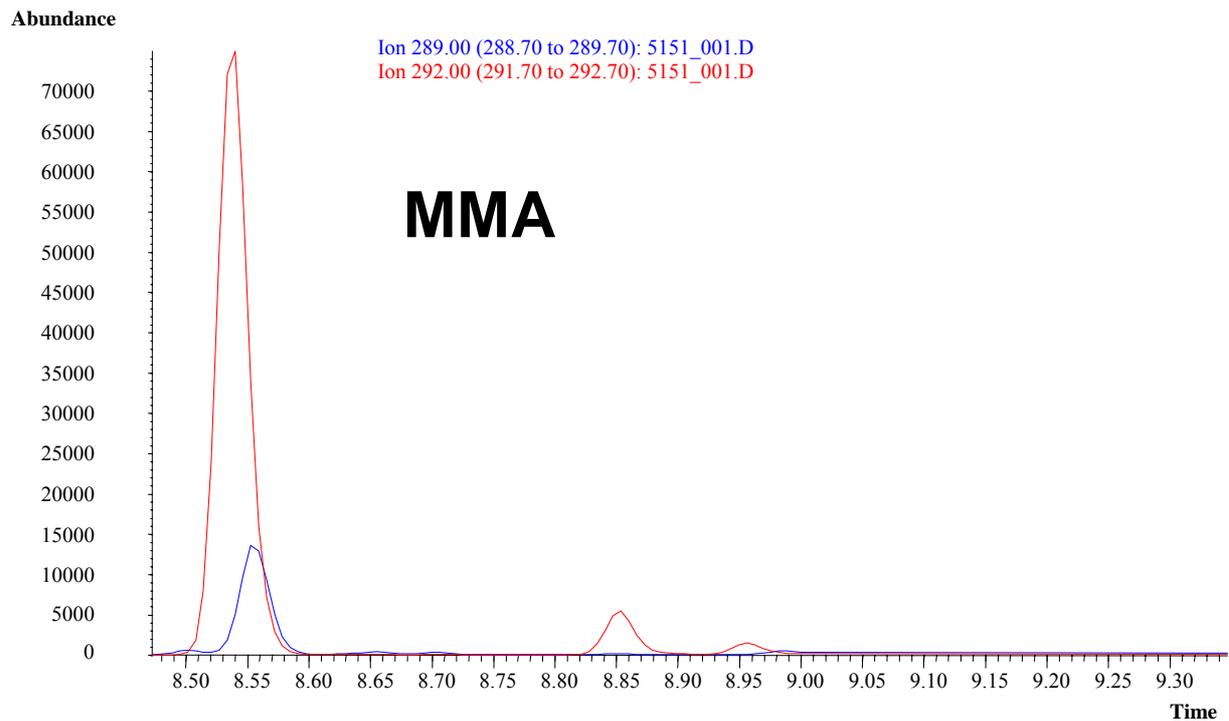


Abb. 3: Chromatogramme Methylnalonsäure und 2-Methylzitroneensäure

4.2.4 Referenzbereiche

Als Vergleichswerte wurden laboreigene Referenzbereiche herangezogen. Diese Werte wurden an einer Gruppe von 52 gesunden Normalpersonen (30 Frauen, 22 Männer, mittleres Alter $41,7 \pm 14,4$ Jahre) ermittelt (vgl. Tab. 2) [Busch 2000] und sind mit den Angaben in der Literatur vergleichbar [Allen et al. 1993, Stabler und Allen 1993, Schreiner et al. 1997, Rossi et al. 1999]. Die Kreatinin-Clearance aller Personen, berechnet nach Cockcroft und Gault, lag im Normbereich. Keine der Personen war akut krank oder bot Anzeichen für eine chronische oder atherosklerotische Erkrankung. Alle Kontrollpersonen hatten mindestens über einen Zeitraum von 3 Monaten keine Vitaminsubstitution erhalten.

Tab. 2: Ermittelte Referenzintervalle von Homocystein und Metaboliten (n = 52) [Busch 2000]

	MW (SD)	Median	Min	Max	95%- Perzentilenbereich (zentral)	MW \pm 2 SD nach log-Transf.
tHcy ($\mu\text{mol/l}$)	9,8 (2,6)	9,4	5,3	18,5	5,6 – 18,1	5,7 – 15,6
CYSTA (nmol/l)	190 (98)	163	69	515	70 – 513	70 – 421
MMA (nmol/l)	173 (46)	176	68	327	72 – 311	92 – 301
2-MCA_{total} (nmol/l)	151 (34)	149	84	258	87 – 243	81 – 266
2-MCA I (nmol/l)	63 (15)	61	37	107	38 – 103	38 – 99
2-MCA II (nmol/l)	87 (22)	84	45	151	47 – 149	51 – 140
2-MCA I/2-MCA II	0,75 (0,15)	0,74	0,42	1,30	0,46 – 1,24	0,49 – 1,08

4.2.5 Datenerfassung

Patientendaten, klinische und apparative Befunde wurden den Patientenakten der Poliklinik für Nephrologie der Klinik für Innere Medizin III der FSU Jena sowie im Kuratorium für Hämodialyse und Nierentransplantation e.V. in Jena entnommen und verschlüsselt auf ein Formblatt übertragen. Diese Daten wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 11.5 für Windows® (SPSS Incorporation Int.) bearbeitet. Erfasst wurden Alter der Patienten, Geschlecht, body mass index (BMI), Diabetes mellitus, Dauer des Diabetes mellitus, Dauer der chronischen Niereninsuffizienz, kardiovaskuläre Erkrankungen (retrospektiv und prospektiv), renale Grunderkrankung, Blutdruck sowie elektrokardiographische und echokardiographische Befunde sowie das Rauchverhalten.

4.2.6 Bestimmung klinisch-chemischer Parameter

Im Institut für klinische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Direktor: Prof. Dr. med. habil. Th. Deufel) wurden folgende Konzentrationen klinisch-chemischer Parameter bestimmt: Triglyceride (mmol/l), LDL (mmol/l), HDL (mmol/l), Gesamtcholesterin (mmol/l), Harnstoff (mmol/l), Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$), Kalium (mmol/l), Calcium (mmol/l), Phosphat (mmol/l), Albumin (g/l), CrP (mg/l), Fibrinogen (g/l), Hämoglobin (mmol/l), Hämatokrit (%), Ferritin ($\mu\text{g/l}$), Parathormon (ng/l), Folsäure ($\mu\text{g/l}$) und Vitamin B₁₂ (pmol/l). Zur Bestimmung dieser Werte kamen automatisierte, standardisierte Labormethoden zum Einsatz.

4.2.7 Studienpopulation

Ab 01. Oktober 1997 wurden über einen Zeitraum von 6 Monaten Patienten in die Studie einbezogen. Es konnten eine 99 niereninsuffiziente Patienten (34 Frauen, 65 Männer) umfassende, altersnormalverteilte ($p = 0,2$; *Kolmogorov-Smirnov-Test*) Patientengruppe in die Studie eingeschlossen werden. Das Durchschnittsalter betrug 58,3 (33-83) Jahre mit einem 95%-Perzentilenbereich von 33,6-81,0 Jahren und mit einem Median von 59,2 Jahren (vgl. Abb. 4).

32 Patienten waren Diabetiker. Außer einem Patienten mit Diabetes mellitus Typ I hatten alle Diabetiker einen Diabetes mellitus Typ II.

Das Vorhandensein einer chronischen Niereninsuffizienz wurde ab einem Kreatininwert $> 150 \mu\text{mol/l}$ definiert. Die mittlere Dauer der Kreatininerhöhung $> 150 \mu\text{mol/l}$ der untersuchten Patientengruppe betrug $46 \pm 54,6$ Monate (Median 35 Monate, 3-274 Monate). Die mittlere Kreatininkonzentration lag bei 381 (151-1107) $\mu\text{mol/l}$.

Kein Patient erhielt Vitamin B₆, Vitamin B₁₂ oder Folsäure. Zur antihypertensiven Therapie wurden bei 92% der Patienten ACE-Hemmer, bei 45% β -Rezeptoren-Blocker und bei 18% Kalzium-Antagonisten eingesetzt. Eine medikamentöse Therapie zur Senkung der Blutfettwerte erhielten 28% der Patienten.

4.2.8 Renale Grunderkrankung

Die Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz waren: Glomerulonephritis ($n = 26$), interstitielle Nephritis ($n = 22$), diabetische Nephropathie ($n = 16$), zystische Nierendegeneration ($n = 3$), hypertensive Nierenerkrankung ($n = 2$) und andere ($n = 30$).

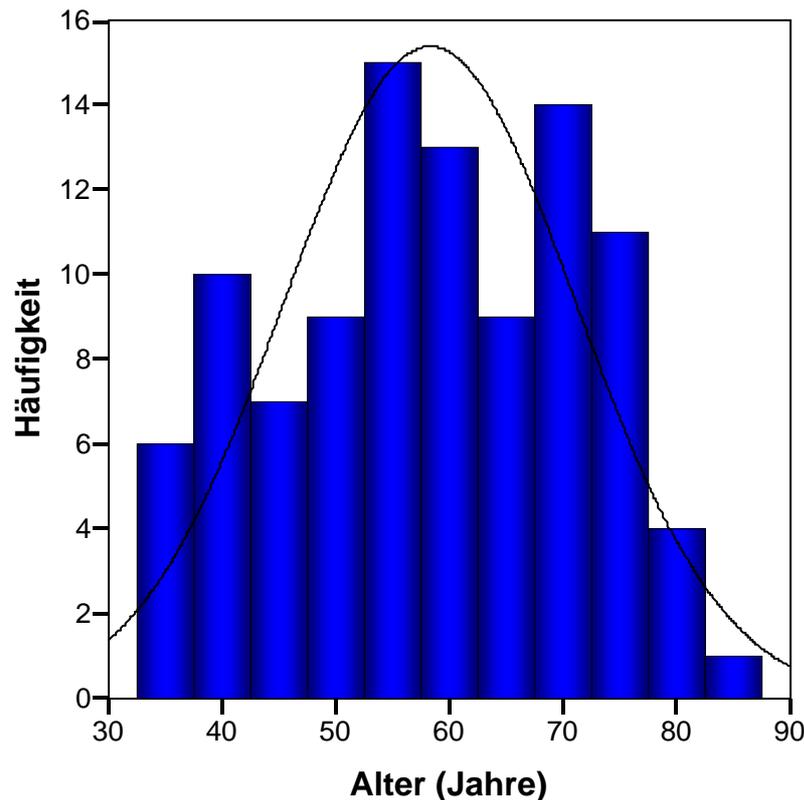


Abb. 4: Altersverteilung der CNI-Patienten (Glockenkurve = Normalverteilung)

4.2.9 Definitionen

Das Vorliegen einer kardiovaskulären Erkrankung zu Studienbeginn war durch das Auftreten einer der folgenden Erkrankungen in der Vergangenheit definiert: Für die Diagnose akuter Myokardinfarkt musste mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt sein: typische EKG-Veränderungen bzw. erhöhte Werte der Herzenzyme (Troponin I, CK-MB). Eine periphere Arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) wurde definiert durch das Auftreten eines Stadium IV nach Fontaine oder Amputationen im Extremitätenbereich. Die Diagnose zerebrovaskuläre Insuffizienz wurde verifiziert durch vorliegende CT-Befunde und/oder typische neurologische Ausfallserscheinungen. Angiographische und/oder doppler-sonographische Gefäßveränderungen ohne klinische Symptome wurden *nicht* als Erkrankung angesehen. Eine Angina pectoris wurde diagnostiziert bei pektanginösen Beschwerden im Sinne einer instabilen Angina pectoris.

Als kardiovaskuläre Risikofaktoren wurden Alter, Hypertonie, anamnestisch bekannte kardiovaskuläre Erkrankungen, Geschlecht, Rauchverhalten, Diabetes mellitus, LDL, HDL, Triglyceride, Fibrinogen, CrP, Kreatinin, Hämoglobin und Albumin sowie Homocystein und seine Metaboliten einbezogen. Diese Parameter wurden zu Beginn der Studie bestimmt und dokumentiert. Die Definition der einzelnen Risikofaktoren wurde wie folgt festgelegt:

- Albumin < 35 g/l
- Alter > Median (59,2 Jahre)
- kardiovaskuläre Erkrankung in der Anamnese
- Blutdruck > 140 mmHg systolisch und/oder > 90 mmHg diastolisch
- CrP > Median (9,2 mg/l)
- Fibrinogen > 4,4 g/l
- Hämoglobin < Median (7,4 mmol/l)
- HDL < 1 mmol/l
- Kreatinin > Median (324 μ mol/l)
- LDL > 3,5 mmol/l
- Rauchen (mehr als 10 Schachteln pro Jahr innerhalb der letzten 5 Jahre)
- Triglyceride > 2,3 mmol/l
- Vorhandensein eines seit mindestens 2 Jahren mit Insulin bzw. oralen Antidiabetika behandelten Diabetes mellitus

4.2.10 Nachbeobachtung

Die Patienten wurden im Mittel $19,6 \pm 13,4$ Monate nachbeobachtet. Der Nachbeobachtungszeitraum endete mit dem Auftreten eines der o.g. kardiovaskulären Ereignisse, dem Beginn der Dialysebehandlung, einem Wechsel des Behandlungszentrums oder mit dem Tod des Patienten.

4.2.11 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Computer-Programmen Microsoft-Excel 10.0[®] (Microsoft Corporation Int.) und SPSS 11.5 für Windows[®] (SPSS Incorporation Int.).

4.2.11.1 Test auf Normalverteilung

Mit dem *Kolmogorov-Smirnov-Test* (Signifikanzkorrektur nach *Lilliefors*) wurden die Werte der Patienten auf Normalverteilung geprüft. Dabei sind Signifikanzwerte von $\alpha > 0,05$ Ausdruck einer Normalverteilung und Signifikanzwerte von $\alpha < 0,05$ sind Hinweis auf eine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung.

4.2.11.2 Lagemaße und Streuungsmaße

Die Lagemaße wurden als Mittelwert bzw. Median (50.Perzentile) und die Streuungsmaße als Standardabweichung (SD) bzw. zentraler 95%-Perzentilenbereich (2,5. bis 97,5 Perzentile)

angegeben. Für Parameter, die keine Normalverteilung aufwiesen, wurden die Wertebereiche als Mittelwert \pm 2SD nach log-Transformation angegeben.

4.2.11.3 Korrelationen

Bei Parametern mit nicht normalverteilten Merkmalen wurde das Korrelationsverfahren nach *Spearman-Rho* angewendet, um Beziehungen zwischen den Parametern darzustellen.

4.2.11.4 Gruppenvergleiche

Der *Mann-Whitney-Test* wurde angewendet um Unterschiede eines Parameters in zwei unabhängigen Gruppen auf Signifikanz zu prüfen.

Um Veränderungen eines Parameters innerhalb einer Gruppe zu bestimmen, wurde der *T-Test für gepaarte Stichproben* genutzt.

Bei beiden Tests wurden p-Werte von $\leq 0,05$ als signifikant angesehen.

4.2.11.5 Cox-Regression

Unter Verwendung des Cox-Regressionsmodells wurde das relative Risiko für die Inzidenz eines kardiovaskulären Ereignisses (AMI, Angina pectoris, CVI, pAVK) in Abhängigkeit von den tHcy- und Metabolitenwerten (CYSTA, MMA und 2-MCA_{total}) sowie den im Kapitel 4.2.9 definierten Risikofaktoren eingeschätzt.

Diese Analyse wurde univariat und multivariat mit schrittweiser Variablenselektion (vorwärts und rückwärts) durchgeführt. Die Risikofaktoren wurden als kategoriale Variablen eingesetzt, weshalb für alle metrischen Parameter eine Mediandichotomisierung durchgeführt wurde. Dazu wurde je nach Parameter entweder Werte oberhalb bzw. unterhalb des Medians als Risikofaktor definiert und jeweils mit der entsprechend konträren Referenzgruppe verglichen. Bei bereits kategorialen Variablen wurde das Vorhandensein eines Risikofaktors mit dem Nicht-Vorhandensein eines Risikofaktors verglichen.

Die Assoziationen zwischen den Risikofaktoren und einem kardiovaskulären Ereignis werden durch das relative Risiko und dem dazugehörigen 95%-Konfidenzintervall beschrieben. Signifikanz wurde bei p-Werten von $\alpha \leq 0,05$ angenommen.

In die multivariate Analyse wurden alle Faktoren einbezogen, die in der univariaten Analyse p-Werte $\leq 0,25$ aufwiesen. Bereits bekannte potentielle Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht, Rauchen und Diabetes mellitus wurden unabhängig von ihrem Signifikanzniveau in der univariaten Analyse in das multivariate Cox-Modell aufgenommen und gesondert in den jeweiligen Tabellen mit einem Stern ausgewiesen. tHcy und seine Metaboliten (CYSTA,

MMA und 2-MCA_{total}) sowie Folsäure und Cobalamin wurden aufgrund der signifikanten Korrelationen untereinander sowie ihrer Bedeutung für die Fragestellung der Studie immer in die multivariate Analyse einbezogen. Dies wurde jedoch schrittweise durchgeführt.

4.2.11.6 Lineare Regression

Die lineare Regression wurde angewendet um Determinanten des tHcy-Spiegels zu identifizieren, d.h. inwieweit andere klinisch-chemische Parameter für die Schätzung der tHcy-Spiegel von Bedeutung sind. Diese Regression wurde mittels schrittweiser Vorwärts- bzw. Rückwärtsselektion durchgeführt. Als signifikant wurden p-Werte $\leq 0,05$ angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Biochemische und klinische Charakteristika der chronisch Niereninsuffizienten

Tab. 3 gibt einen Überblick über die biochemischen und klinischen Parameter der chronisch niereninsuffizienten Patienten.

Tab. 3: Klinische und biochemische Parameter der CNI-Patienten

	MW ± SD	Normbereiche
Alter (Jahre)	58,3 ± 12,9	-
Kreatinin > 150 µmol/l seit (Monate)	46,0 ± 54,6	-
Kreatinin (µmol/l)	381 ± 213	80 – 95
Harnstoff (mmol/l)	21,0 ± 9,1	6 – 8
Albumin (g/l)	38,7 ± 5,0	35 – 55
CrP (mg/l)	23,5 ± 35,9	< 5
Fibrinogen (g/l)	4,9 ± 3,0	1,5 – 4,5
Body mass index (kg/m ²)	28,0 ± 4,8	20 – 25
Gesamtcholesterol (mmol/l)	5,9 ± 1,4	< 5,2
HDL (mmol/l)	1,2 ± 0,4	> 1,1
LDL (mmol/l)	3,7 ± 1,2	< 3,5
Triglyceride (mmol/l)	2,2 ± 1,3	< 2,29
Hb (mmol/l)	7,3 ± 1,5	8 – 12
Hk (%)	35,5 ± 6,8	37 – 50
Ferritin (µg/l)	494,4 ± 1267,2	33 – 266
intaktes Parathormon (ng/l)	214,8 ± 185,4	20 – 65
Folsäure (nmol/l)	7,5 ± 3,8	6,8 – 38,6
Cobalamin (pmol/l)	352,0 ± 201,4	222 – 814
RR systolisch (mmHg)	140 ± 19	< 140
RR diastolisch (mmHg)	83 ± 11	< 90

5.1.1 Konzentrationen von Homocystein und seinen Metaboliten

Aufgrund der divergierenden Ergebnisse des *Kolmogorov-Smirnov-Testes* ($p = 0,017-0,2$) wurde von einer Nicht-Normalverteilung ausgegangen. Der 95%-Perzentilenbereich sowie die Mittelwerte ± 2 SD nach log-Transformation wurden angegeben (vgl. Tab. 4).

Tab. 4: Konzentration von Homocystein und Metaboliten bei 99 CNI-Patienten

	MW (SD)	Median	Min	Max	95%- Perzentilenbereich (zentral)	MW \pm 2 SD nach log-Transf.
tHcy ($\mu\text{mol/l}$)	22,3 (8,6)	20,9	5,6	67,0	8,4 – 38,8	9,5 – 45,2
CYSTA (nmol/l)	1285 (974)	1018	148	5057	239 – 4249	247 – 4111
MMA (nmol/l)	563 (350)	481	140	2367	168 – 1583	164 – 1428
2-MCA_{total} (nmol/l)	778 (395)	720	203	2446	232 – 2095	261 – 1837
2-MCA I (nmol/l)	382 (206)	347	104	1316	116 – 1055	123 – 923
2-MCA II (nmol/l)	399 (195)	343	114	1130	127 – 1038	139 – 923
2-MCA I/2-MCA II	0,97 (0,27)	0,90	0,62	2,20	8,4 – 38,8	0,51 – 1,59

5.1.2 Korrelationen von tHcy und seinen Metaboliten untereinander

In der Gruppe der niereninsuffizienten Patienten war tHcy mit CYSTA ($r = 0,477$, $p < 0,001$), MMA ($r = 0,478$, $p < 0,001$), 2-MCA_{total} ($r = 0,524$, $p < 0,001$), 2-MCA I ($r = 0,549$, $p < 0,001$), 2-MCA II ($r = 0,478$, $p < 0,001$) signifikant korreliert.

CYSTA korrelierte signifikant ($p < 0,001$) mit MMA ($r = 0,598$), 2-MCA_{total} ($r = 0,632$), 2-MCA I ($r = 0,624$) sowie mit 2-MCA II ($r = 0,62$).

MMA korrelierte signifikant ($p < 0,001$) mit 2-MCA_{total} ($r = 0,661$), 2-MCA I ($r = 0,648$) sowie mit 2-MCA II ($r = 0,615$).

2-MCA_{total} korrelierte stark positiv mit seinen Diastereomeren 2-MCA I ($r = 0,956$, $p < 0,001$) und MCA II ($r = 0,964$, $p < 0,001$).

5.1.3 Korrelationen von tHcy und seinen Metaboliten mit weiteren Parametern

Korrelationen mit dem Alter ergaben signifikante Ergebnisse für tHcy ($r = 0,310$; $p = 0,002$), CYSTA ($r = 0,410$; $p < 0,001$), MMA ($r = 0,292$; $p = 0,003$), 2-MCA_{total} ($r = 0,367$; $p < 0,001$), 2-MCA I ($r = 0,378$; $p < 0,001$), 2-MCA II ($r = 0,316$; $p = 0,001$).

Negative Korrelationen bestanden zwischen der Folsäurekonzentration und tHcy ($p = -0,342$; $p = 0,001$).

Vitamin B₁₂ korrelierte sowohl negativ mit tHcy ($-0,240$; $p = 0,017$) als auch mit MMA ($r = -0,295$; $p = 0,019$).

Die Kreatininkonzentration korrelierte signifikant ($p < 0,001$) mit tHcy ($r = 0,525$), CYSTA ($r = 0,528$), MMA ($r = 0,553$), 2-MCA_{total} ($r = 0,793$), 2-MCA I ($r = 0,792$), 2-MCA II ($r = 0,745$) sowie mit dem Quotienten aus 2-MCA I und 2-MCA II ($r = 0,288$; $p = 0,004$).

5.1.4 Konzentrationsvergleich mit Gesunden

Ein Vergleich der ermittelten Werte mit denen einer altersgleichen Normalpopulation (vgl. 4.2.4) zeigte bei den CNI-Patienten im Mittel 2,3-fach erhöhte tHcy-Konzentrationen, 6,8-fach erhöhte CYSTA-Konzentrationen, 3,3-fach erhöhte MMA-Konzentrationen, sowie 5,2-fach erhöhte Konzentrationen von 2-MCA_{total} (vgl. Abb. 5 und Abb. 6). Bei 80% (n = 79) der CNI-Patienten wurden Serumkonzentrationen von tHcy über dem oberen Referenzwert der Vergleichspopulation von 15,6 $\mu\text{mol/l}$ gemessen.

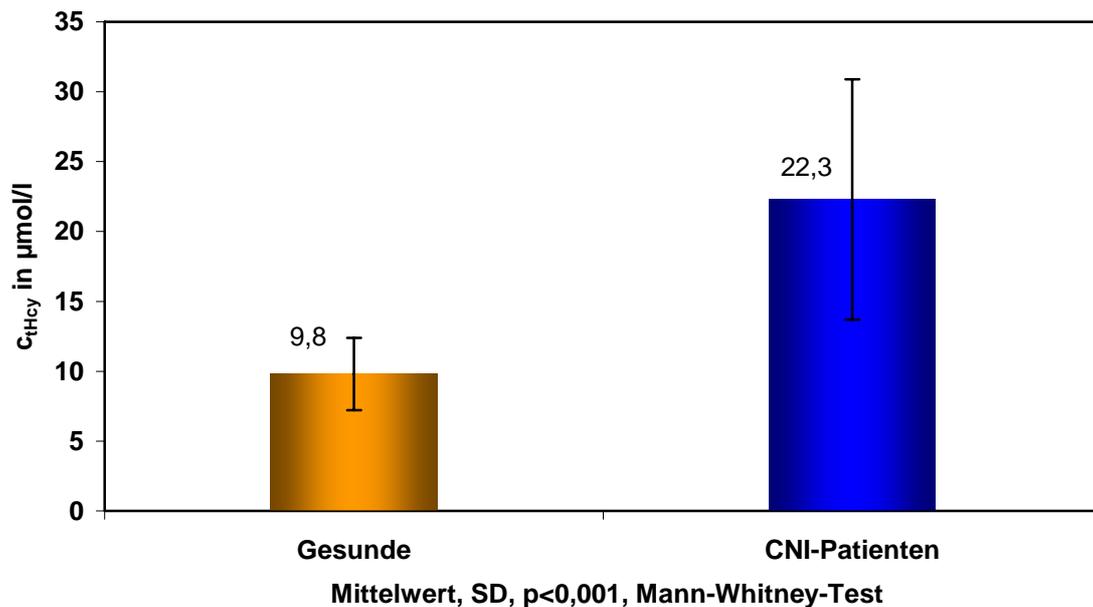


Abb. 5: Konzentration von tHcy bei 52 Gesunden vs. 99 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

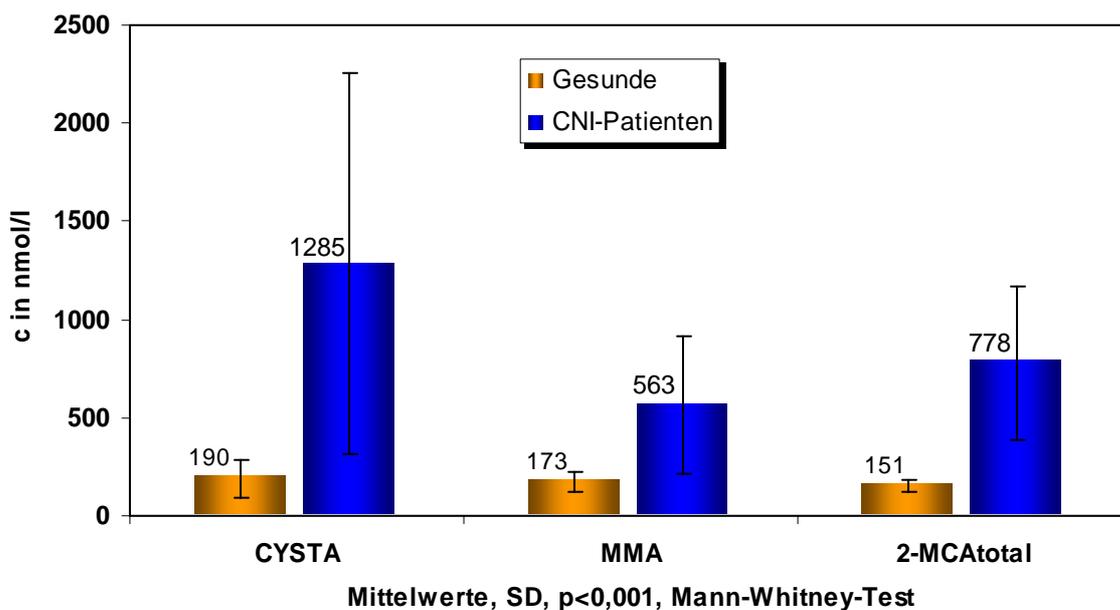


Abb. 6: Konzentration der Metaboliten CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} bei 52 Gesunden vs. 99 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

5.1.5 Geschlechtsunterschiede

Frauen (n = 34) wiesen im Vergleich männlichen Patienten (n = 65) eine nicht signifikant höhere Konzentration an tHcy auf. Signifikant höhere Werte bestanden hingegen für die CYSTA- und MMA-Spiegel bei Frauen. Die Patientinnen waren im Mittel 5 Jahre älter als die Männer (vgl. Tab. 5).

Tab. 5: Unterschiede der tHcy- und Metabolitenkonzentration bezüglich des Patientengeschlechts

	gesamt (MW ± SD)	weiblich (MW ± SD)	männlich (MW ± SD)	Signifikanz (Mann-Whitney)
Alter (Jahre)	58,3 ± 12,9	63,5 ± 13,1	55,6 ± 11,9	p = 0,003
tHcy (µmol/l)	22,3 ± 8,6	24,9 ± 10,3	20,9 ± 7,3	p = 0,069
CYSTA (nmol/l)	1285 ± 974	1660 ± 1067	1089 ± 868	p = 0,002
MMA (nmol/l)	563 ± 350	625 ± 297	530 ± 373	p = 0,021
2-MCA_{total} (nmol/l)	778 ± 395	436 ± 268	354 ± 160	p = 0,077

5.1.6 Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI) in der Anamnese

Patienten, welche in der Vergangenheit einen AMI erlitten hatten (n = 6), wiesen im Vergleich zu Patienten ohne AMI in der Vorgeschichte (n = 93) erhöhte Konzentrationen von tHcy und seinen Metaboliten auf. Ein signifikanter Konzentrationsunterschied mit 950 vs. 538 nmol/l (p = 0,039) bestand lediglich für MMA (vgl. Abb. 7). Die Unterschiede der mittleren

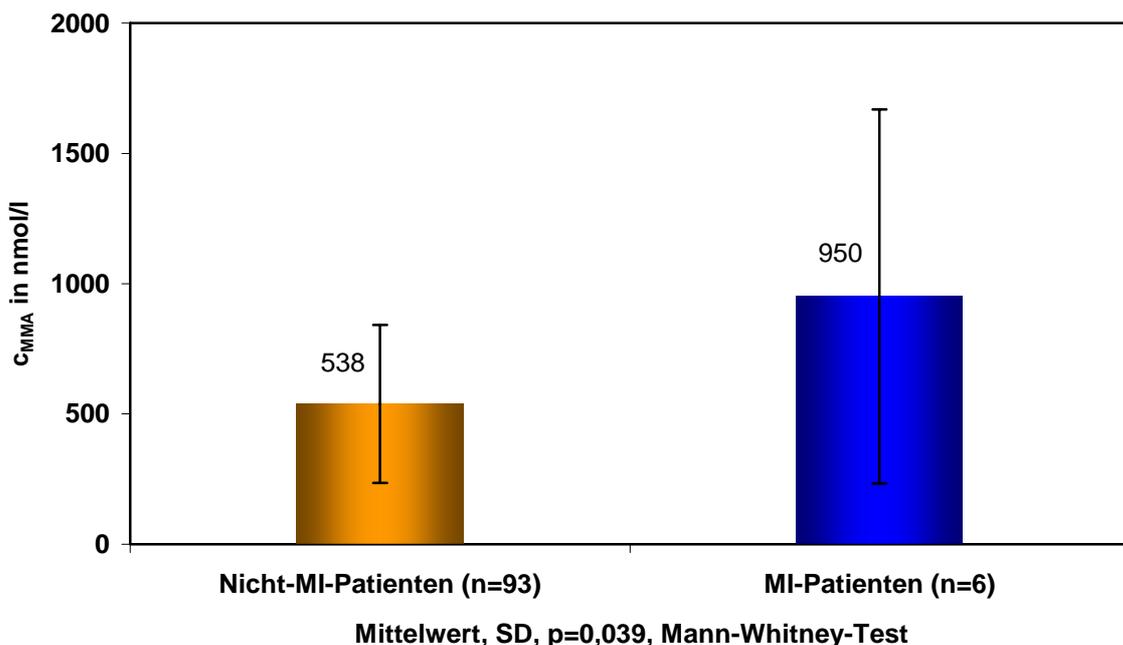


Abb. 7: Vergleich der Konzentration von Methylmalonsäure der Patienten mit und ohne Myokardinfarkt in der Anamnese

Serumspiegel von tHcy (26,8 vs. 22,0 $\mu\text{mol/l}$), CYSTA (1312 vs. 1283 nmol/l) und 2-MCA_{total} (909 vs. 762 nmol/l) waren statistisch nicht signifikant.

5.1.7 Patienten mit zerebrovaskulärer Insuffizienz (CVI) in der Anamnese

Bei Patienten, bei denen in der Vergangenheit bereits eine zerebrale Durchblutungsstörung bestand ($n = 8$), wurden erhöhte tHcy- und Metabolitenspiegel im Vergleich zu den Patienten bei denen zum Studienbeginn noch keine CVI bestand, bestimmt. Dabei zeigten sich für MMA mit 761 vs. 545 nmol/l ($p = 0,047$) und 2-MCA_{total} mit 1055 vs. 753 nmol/l ($p = 0,02$) sowie 2-MCA-II mit 562 vs. 385 nmol/l ($p = 0,009$) signifikante Konzentrationsunterschiede (vgl. Abb. 8). Die Unterschiede der Plasmaspiegel von tHcy (25,6 vs. 22,0 $\mu\text{mol/l}$) und CYSTA (1301 vs. 1107 nmol/l) waren statistisch nicht signifikant.

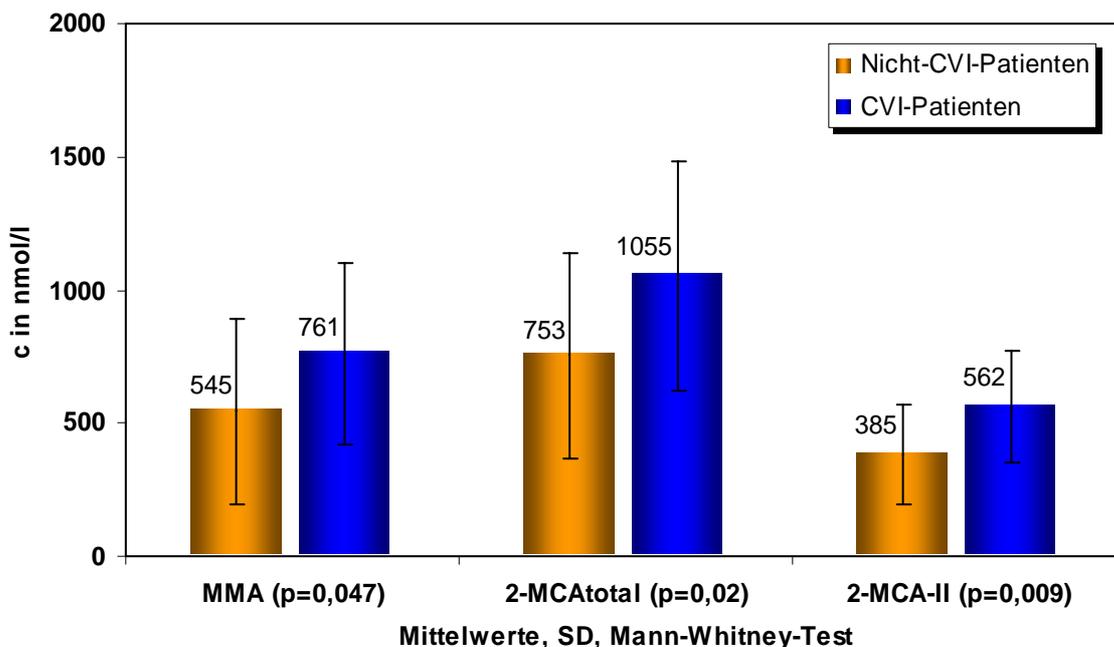


Abb. 8: Vergleich der Konzentrationen der Metaboliten MMA, 2-MCA_{total} und 2-MCA-II der Patienten mit und ohne zerebrovaskulärer Insuffizienz in der Anamnese

5.1.8 Patienten mit Diabetes mellitus

32 Patienten der untersuchten Gruppe (13 Frauen und 19 Männer) hatten einen Diabetes mellitus, wobei die durchschnittliche Dauer des Diabetes mellitus zum Zeitpunkt des Studienbeginns 138 Monate (1-348 Monate) betrug. Bis auf einen Patienten mit Diabetes mellitus Typ I handelte es sich ausschließlich um Typ II-Diabetiker. Das mittlere Alter der Patienten betrug $61,7 \pm 12,5$ Jahre. Dabei hatten zu Studienbeginn bereits 1 Patient (3,1%) einen akuten Myokardinfarkt, 3 Patienten (9,4%) eine Angina pectoris, 1 Patient (3,1%) eine

zerebrovaskuläre Insuffizienz und 2 Patienten (6,3%) eine periphere arterielle Verschlusskrankheit. 25 Patienten (78,1%) hatten keine kardiovaskuläre Erkrankung.

Nach Studienbeginn trat bei 4 Patienten (12,6%) eine kardiovaskuläre Erkrankung auf, bei 2 Patienten (6,3%) ein akuter Myokardinfarkt. Bei 1 Patient trat eine Angina pectoris auf und bei 1 Patient eine periphere arterielle Verschlusskrankheit.

Hinsichtlich der Konzentrationen von tHcy und seiner Metaboliten bestanden lediglich für CYSTA signifikante Unterschiede ($p = 0,006$), wobei Diabetiker höhere Werte (1689 ± 1086 nmol/l) im Vergleich zu Nichtdiabetikern (1093 ± 860 nmol/l) aufwiesen. Dabei waren die Diabetiker mit einem durchschnittlichen Alter von 61,7 Jahren im Mittel 5 Jahre älter als die Patienten ohne Diabetes mellitus. Dieser Altersunterschied erwies sich jedoch mit $p = 0,059$ als nicht signifikant. Ferner bestand mit $r = 0,334$ ($p = 0,062$) auch keine signifikante Korrelation der Konzentration von CYSTA mit dem Alter innerhalb der Diabetikergruppe.

5.1.9 Kardiovaskuläre Ereignisse

5.1.9.1 Retrospektive Ergebnisse

Zu Studienbeginn lag bereits bei 21 Patienten (21,2%) eine vaskuläre Erkrankung vor. Sieben dieser Patienten waren Diabetiker. Diese Erkrankungen teilen sich auf in akuten Myokardinfarkt ($n = 6$), Angina pectoris ($n = 3$), zerebrovaskuläre Insuffizienz ($n = 7$) und periphere arterielle Verschlusskrankheit ($n = 4$). Bei einem Patient lag sowohl eine zerebrovaskuläre Insuffizienz als auch eine periphere arterielle Verschlusskrankheit vor.

5.1.9.2 Prospektive Ergebnisse

Während eines mittleren Beobachtungszeitraumes von $19,6 \pm 13,4$ Monaten trat bei 11 Patienten (11,1%) eine vaskulär bedingte Erkrankung auf. 4 Patienten (4%) erlitten einen akuten Myokardinfarkt. Die übrigen 7 Patienten bekamen eine Angina pectoris ($n = 1$), eine zerebrovaskuläre Insuffizienz ($n = 5$) sowie eine periphere arterielle Verschlusskrankheit Stadium IV ($n = 1$).

5.1.9.2.1 Vergleich der Patienten mit vs. ohne kardiovaskuläres Ereignis (CVD)

Patienten, bei denen im Beobachtungszeitraum eine CVD auftrat zeigten im Vergleich zu denen ohne stattgehabte CVD vergleichbare mittlere tHcy-Serumkonzentrationen ($22,3 \pm 8,8$ $\mu\text{mol/l}$ vs. $22,7 \pm 7,8$ $\mu\text{mol/l}$; MW, $p = n. s.$). Auch für die Metaboliten-Spiegel konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

5.1.9.2.2 Univariate Cox-Regression

In der univariaten Analyse konnte für eine Hämoglobinkonzentration $< 7,4$ mmol/l ein erhöhtes CVD-Risiko mit einem RR = 7,1 (95% CI: 1,52-33,24; $p = 0,013$) ermittelt werden. Auch das Geschlecht war mit einem signifikant erhöhten relativen Risiko, eine kardiovaskuläre Erkrankung im Beobachtungszeitraum zu erleiden, verbunden. Frauen hatten mit einem RR = 3,78 (95% CI: 1,11-12,93; $p = 0,034$) ein höheres Risiko im Vergleich zu männlichen Patienten (vgl. Tab. 6).

Tab. 6: Univariate Cox-Regression (Zielereignis CVD, $n = 11$)

Risikofaktor	RR	95% CI	p-Wert
Hämoglobin $< 7,4$ mmol/l	7,095	1,515 – 33,237	0,013*
Geschlecht (Frauen vs. Männer)	3,783	1,107 – 12,931	0,034*
Albumin < 35 g/l	3,266	0,948 – 11,260	0,061*
2-MCA _{total} $>$ Median (720 nmol/l)	2,675	0,771 – 9,283	0,121*
vorbestehende CVD	2,365	0,625 – 8,949	0,205*
Alter $>$ Median (59,2 Jahre)	2,171	0,634 – 7,433	0,217*
Folsäure $<$ Median (6,5 μ g/l)	1,863	0,568 – 6,116	0,305*
C-reaktives Protein $>$ Median (9,2 mg/l)	1,446	0,440 – 4,750	0,543
Fibrinogen $>$ Median (4,40 g/l)	1,357	0,412 – 4,466	0,615
Kreatinin $>$ Median (324 μ mol/l)	1,310	0,393 – 4,366	0,660
MMA $>$ Median (481 nmol/l)	1,136	0,345 – 3,744	0,834*
RR $>$ 140/90 mmHg	1,107	0,324 – 3,784	0,871
Diabetes mellitus	1,090	0,288 – 4,125	0,899
CYSTA $>$ Median (1018 nmol/l)	1,061	0,322 – 3,490	0,923*
Homocystein $>$ Median (20,9 μ mol/l)	0,974	0,296 – 3,200	0,965*
Triglyceride $>$ 2,3 mmol/l	0,968	0,283 – 3,308	0,959
Cobalamin $<$ Median (314 pmol/l)	0,886	0,270 – 2,908	0,842*
Gesamtcholesterin $>$ 5,2 mmol/l	0,876	0,256 – 2,997	0,832
LDL $>$ 3,5 mmol/l	0,739	0,225 – 2,425	0,618
Rauchen	0,723	0,156 – 3,351	0,679*
HDL $<$ 1 mmol/l	0,630	0,136 – 2,918	0,555

* in die multivariate Analyse eingeschlossene Risikofaktoren

5.1.9.2.3 Multivariate Cox-Regression

Im Ergebnis dieser Analyse blieb der Risikofaktor Anämie als alleiniger signifikanter Prädiktor für eine kardiovaskuläre Erkrankung bestehen. Patienten, deren Hämoglobinwert kleiner oder gleich 7,4 mmol/l war, hatten mit einem RR = 7,1 (95% CI: 1,52–33,24; p = 0,013) ein signifikant erhöhtes Risiko im Vergleich zu Patienten mit Hämoglobinkonzentrationen über 7,4 mmol/l. Es wurden eine Vor- sowie eine Rückwärtsselektion der Risikofaktoren durchgeführt. Beide Verfahren lieferten übereinstimmende Ergebnisse. Die jeweils aufeinander folgend durchgeführten Analysen mit Einschluss von tHcy, CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} zeigten identische Ergebnisse.

5.1.10 Dialysebeginn

Innerhalb des Beobachtungszeitraumes wurden 41 Patienten (41,4%) dialysepflichtig. Sie wiesen erhöhte tHcy- und Metabolitenspiegel auf. Im Vergleich zu den restlichen CNI-Patienten zeigten sich für tHcy mit 25,2 vs. 20,3 µmol/l (p = 0,004), CYSTA mit 1660 vs. 1020 nmol/l (p < 0,001) und 2-MCA_{total} mit 976 vs. 637 nmol/l (p < 0,001) signifikante Konzentrationsunterschiede (vgl. Abb. 9 und Abb. 10). Die Unterschiede der Serumspiegel von MMA (600 vs. 537 nmol/l) waren statistisch nicht signifikant (p = 0,051).

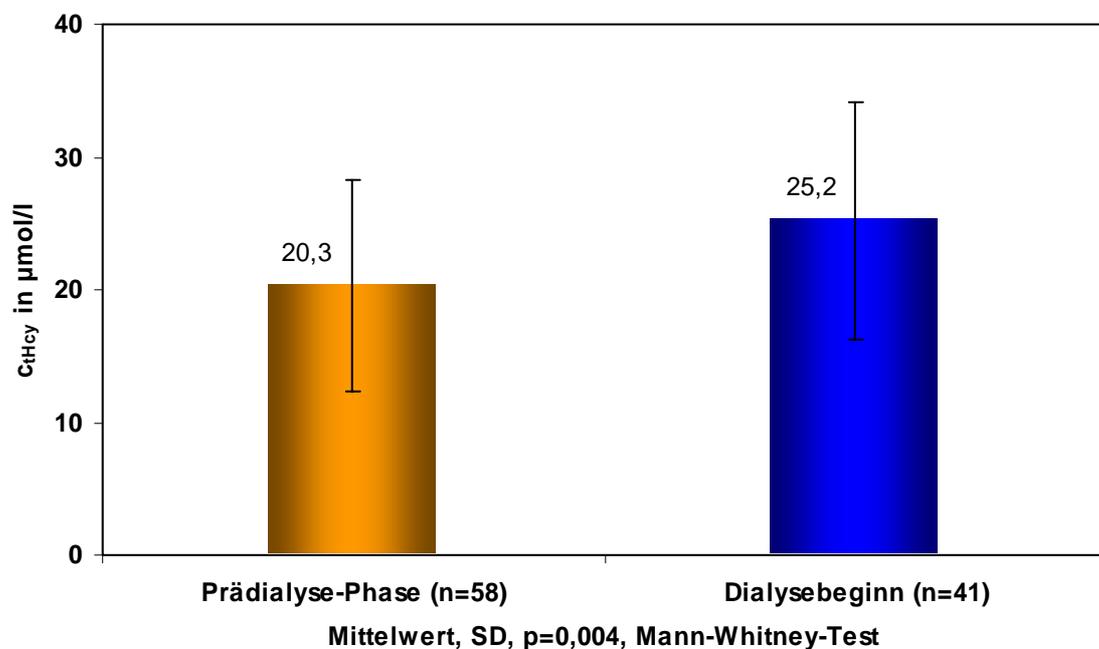


Abb. 9: Vergleich der tHcy-Konzentration bei Patienten in der Prädialyse-Phase mit denen nach Beginn der Dialysetherapie

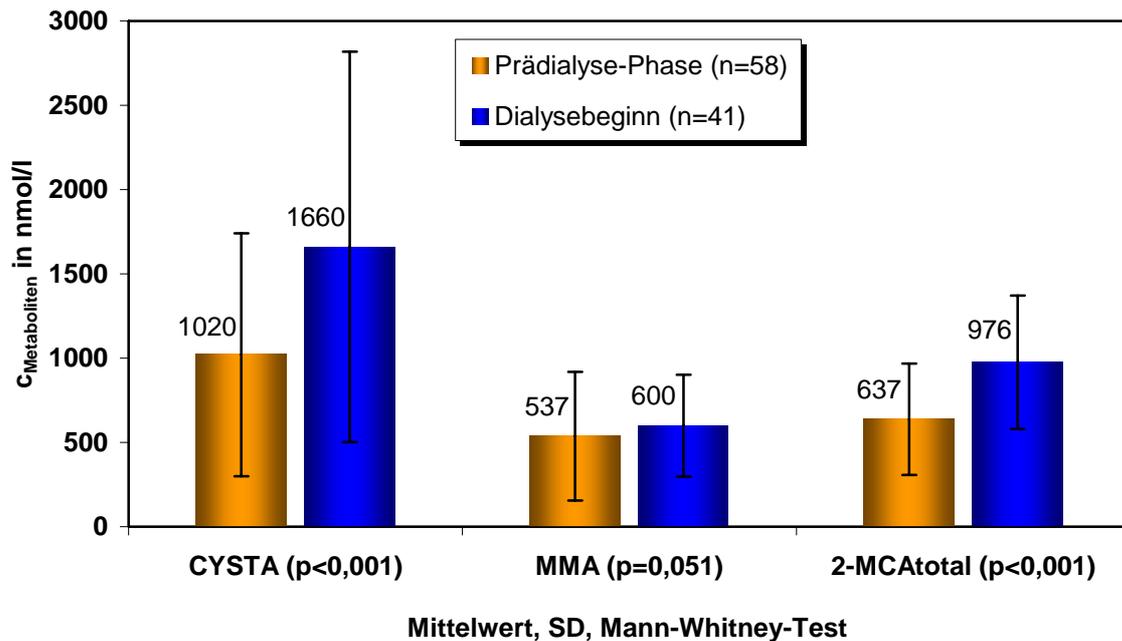


Abb. 10: Vergleich der Konzentration der Metaboliten CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} bei Patienten in der Prädialyse-Phase mit denen nach Beginn der Dialysetherapie

5.1.10.1 Univariate Cox-Regression

In der univariaten Analyse wurde ein signifikant erhöhtes relatives Risiko im Beobachtungszeitraum dialysepflichtig zu werden für Kreatinin-Spiegel > 324 $\mu\text{mol/l}$ (RR = 12,47; 95% CI: 5,15-30,20; p < 0,001), für Hb-Konzentrationen < 7,4 nmol/l (RR = 4,42; 95% CI: 2,22-8,78; p < 0,001), für tHcy-Spiegel > 20,9 $\mu\text{mol/l}$ (RR = 2,11; 95% CI: 1,12-4,00; p = 0,021), für Konzentrationen an 2-MCA_{total} > 720 nmol/l (RR = 5,45; 95% CI: 2,64-11,25; p < 0,001), für CYSTA-Spiegel > 1018 nmol/l (RR = 2,50; 95% CI: 1,31-4,77; p = 0,006), Fibrinogen-Spiegel > 4,40 g/l (RR = 1,88; 95% CI: 1,00-3,54; p = 0,05), für MMA-Spiegel > 481 nmol/l (RR = 2,46; 95% CI: 1,30-4,66; p = 0,006), für Albumin-Konzentrationen < 35 g/l (RR = 2,33; 95% CI: 1,81-4,60; p = 0,015), für LDL-Spiegel > 3,5 mmol/l (RR = 2,26; 95% CI: 1,15-4,44; p = 0,018) sowie für ein Alter > 59,2 Jahre (RR = 2,03; 95% CI: 1,08-3,82; p = 0,027) und für einen Diabetes mellitus (RR = 1,99; 95% CI: 1,07-3,71; p = 0,031) bzw. eine kardiovaskuläre Erkrankung in der Anamnese (RR = 2,19; 95% CI: 1,12-4,28; p = 0,022) ermittelt (vgl. Tab. 7).

Tab. 7: Univariate Cox-Regression (Zielereignis Dialysebeginn, n = 41)

Risikofaktor	RR	95% CI	p-Wert
Kreatinin > Median (324 µmol/l)	12,474	5,152 – 30,202	< 0,001*
2-MCA_{total} > Median (720 nmol/l)	5,451	2,641 – 11,252	< 0,001*
Hämoglobin < 7,4 mmol/l	4,415	2,222 – 8,775	< 0,001*
CYSTA > Median (1018 nmol/l)	2,496	1,305 – 4,774	0,006*
MMA > Median (481 nmol/l)	2,459	1,296 – 4,664	0,006*
Albumin < 35 g/l	2,332	1,181 – 4,602	0,015*
LDL > 3,5 mmol/l	2,261	1,151 – 4,442	0,018*
vorbestehende CVD	2,189	1,120 – 4,275	0,022*
Homocystein > Median (20,9 µmol/l)	2,114	1,117 – 4,000	0,021*
Alter > Median (59,2 Jahre)	2,033	1,083 – 3,816	0,027*
Diabetes mellitus	1,987	1,065 – 3,706	0,031*
Fibrinogen > Median (4,40 g/l)	1,882	1,000 – 3,541	0,050*
C-reaktives Protein > Median (9,2 mg/l)	1,700	0,913 – 3,166	0,094*
HDL < 1 mmol/l	1,682	0,894 – 3,165	0,107*
RR > 140/90 mmHg	1,641	0,884 – 3,046	0,117*
Folsäure < Median (6,5 µg/l)	1,566	0,847 – 2,895	0,153*
Cobalamin < Median (314 pmol/l)	1,214	0,657 – 2,244	0,536*
Geschlecht (Männer vs. Frauen)	1,157	0,590 – 2,271	0,671*
Gesamtcholesterin > 5,2 mmol/l	0,767	0,408 – 1,443	0,411
Triglyceride > 2,3 mmol/l	0,744	0,384 – 1,441	0,381
Rauchen	0,539	0,226 – 1,284	0,163*

* in die multivariate Analyse eingeschlossene Risikofaktoren

5.1.10.2 Multivariate Cox-Regression

In dieser Analyse wurden eine Kreatinin-Konzentration > 324 µmol/l (RR = 8,99; 95% CI: 3,23-25,03; p < 0,001), ein Hämoglobinspiegel < 7,4 mmol/l (RR = 5,75; 95% CI: 2,55-12,96; p < 0,001), Diabetes mellitus (RR = 4,71; 95% CI: 2,20-10,10; p < 0,001), Serumspiegel von 2-MCA_{total} > 720 nmol/l (RR = 3,98; 95% CI: 1,55-10,26; p = 0,004), LDL-Spiegel > 3,5 mmol/l (RR = 2,40; 95% CI: 1,15-5,02; p = 0,02) und das männliche Geschlecht (RR = 2,21; 95% CI: 1,07-4,57; p = 0,033) als signifikante Prädiktoren für das Erreichen einer terminalen

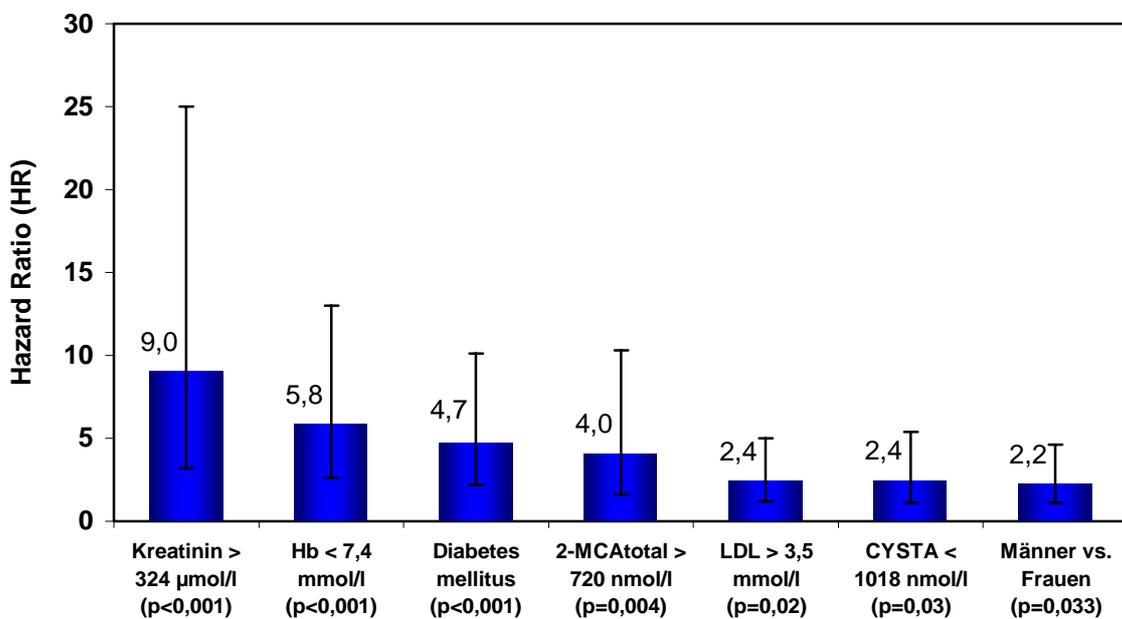
Niereninsuffizienz mit Dialysepflichtigkeit ermittelt. Des Weiteren stellten CYSTA-Spiegel < 1018 nmol/l (RR = 2,43; 95% CI: 1,09-5,37; $p = 0,03$) einen Prädiktor dar.

Vor- und Rückwärtsselektion der Risikofaktoren lieferten die gleichen Ergebnisse. Die jeweils aufeinander folgend durchgeführten Analysen mit Einschluss von tHcy, CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} zeigten identische Ergebnisse (vgl. Tab. 8 und Abb. 11).

Tab. 8: Multivariate Cox-Regression (Zielereignis Dialysebeginn, $n = 41$)

Risikofaktor	RR	95% CI	p-Wert
Kreatinin $>$ Median (324 μ mol/l)	8,989	3,228 – 25,032	$< 0,001$
Hämoglobin $<$ Median (7,4 mmol/l)	5,747	2,548 – 12,960	$< 0,001$
Diabetes mellitus	4,710	2,197 – 10,095	$< 0,001$
2-MCA _{total} $>$ Median (720 nmol/l)	3,982	1,546 – 10,259	0,004
CYSTA $<$ Median (1018 nmol/l)	2,421	1,092 – 5,367	0,030
LDL $>$ 3,5 mmol/l	2,401	1,148 – 5,021	0,020
Geschlecht (Männer vs. Frauen)	2,209	1,068 – 4,570	0,033

Prädiktoren für den Dialysebeginn



Hazard Ratio=Relatives Risiko, 95% CI

Abb. 11: Prädiktoren für den Dialysebeginn nach multivariater Cox-Regression

5.1.11 Konzentrationsvergleich mit Hämodialysepatienten (HD)

Um das Ausmaß der Beeinflussung der Serumkonzentrationserhöhung von tHcy und den Metaboliten aufgrund der chronischen, nicht dialysepflichtigen Niereninsuffizienz im Vergleich zu terminal Niereninsuffizienten abschätzen zu können, wurden aus den Seren von 84 Patienten unter chronisch-intermittierender, ambulanter Hämodialysetherapie die Spiegel von tHcy, CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} ermittelt und zum Vergleich herangezogen [Scheibner 2003]. Dabei zeigten sich bei Dialysepatienten im Mittel rund 1,8-fach erhöhte

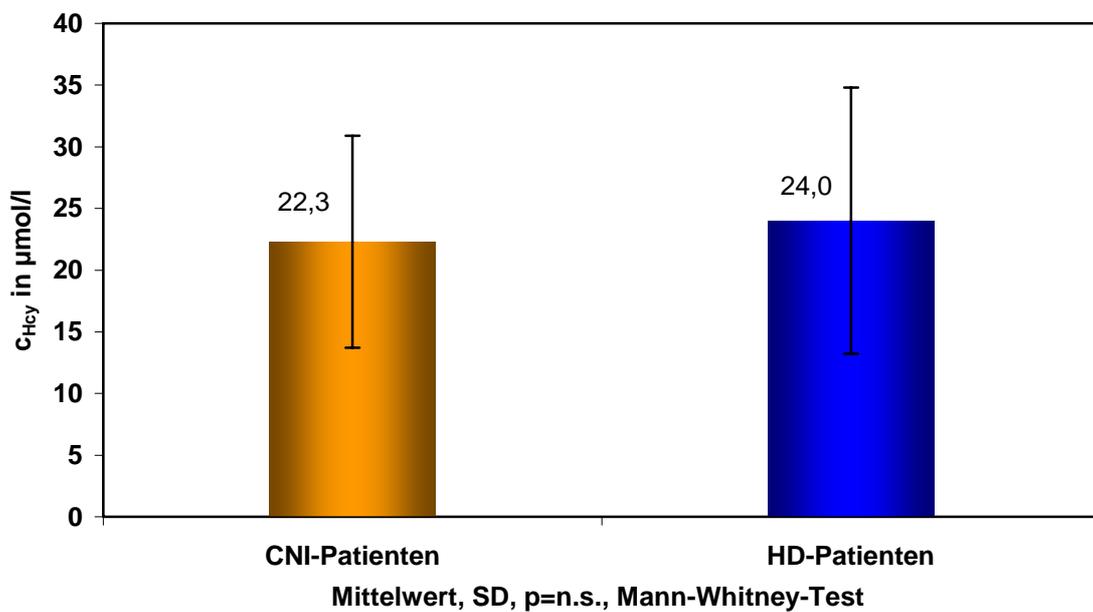


Abb. 12: Vergleich der tHcy-Konzentration der Dialysepatienten vs. CNI-Patienten

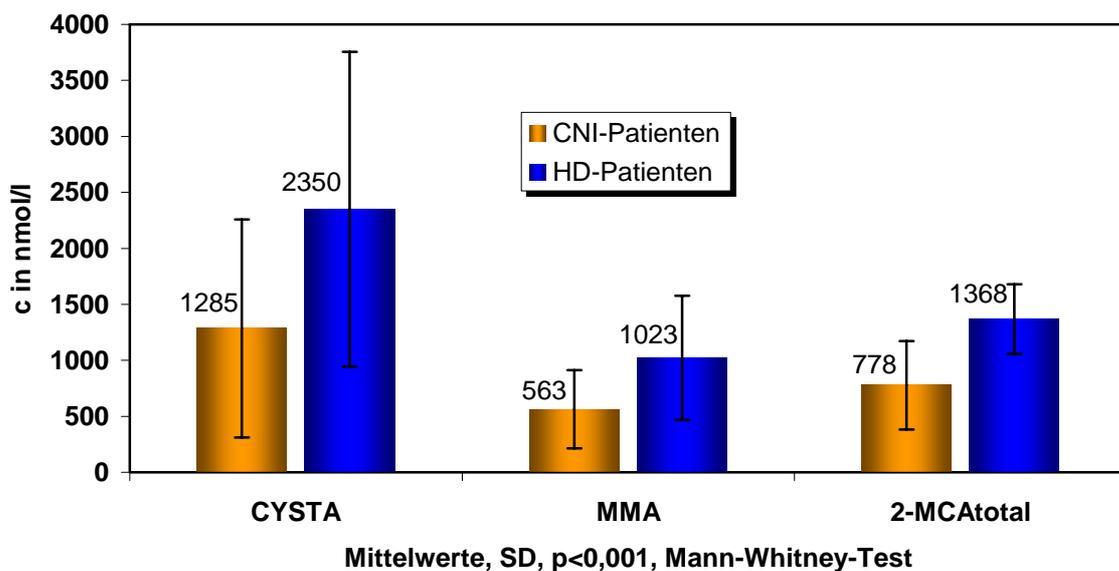


Abb. 13: Vergleich der Konzentrationen der Metaboliten CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} der Dialysepatienten vs. CNI-Patienten

Konzentrationen von CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} ($p < 0,001$). Die tHcy-Serumkonzentration war lediglich um 7,6% auf 24,0 $\mu\text{mol/l}$ ($p = 0,21$) gesteigert (vgl. Abb. 12 und Abb. 13).

5.1.12 Hämodialysepatienten aus dem CNI-Patientenkollektiv

Bei 13 der 41 während des Beobachtungszeitraumes dialysepflichtig gewordenen Patienten erfolgte direkt zum Beginn der Hämodialysetherapie eine weitere Messung von tHcy und seiner Metaboliten. Der Zeitraum zwischen beiden Messungen lag im Mittel bei 3,1 Jahren (2,0 bis 3,9 Jahre). Mit Ausnahme von tHcy, welches bei einer mittleren Konzentration von 23,9 $\mu\text{mol/l}$ konstant blieb, stiegen sämtliche Metabolitenspiegel an (vgl. Abb. 14). Für CYSTA wurde mit dem Faktor 1,8 der stärkste, wenn auch nicht signifikante, Anstieg der mittleren Serumkonzentration (1779 vs. 3147 nmol/l, $p = 0,216$) ermittelt. Sowohl für MMA (622 vs. 889 nmol/l, $p = 0,001$) als auch für 2-MCA_{total} (881 vs. 1242 nmol/l, $p = 0,016$) zeigte sich eine ca. 1,4-fache Konzentrationserhöhung.

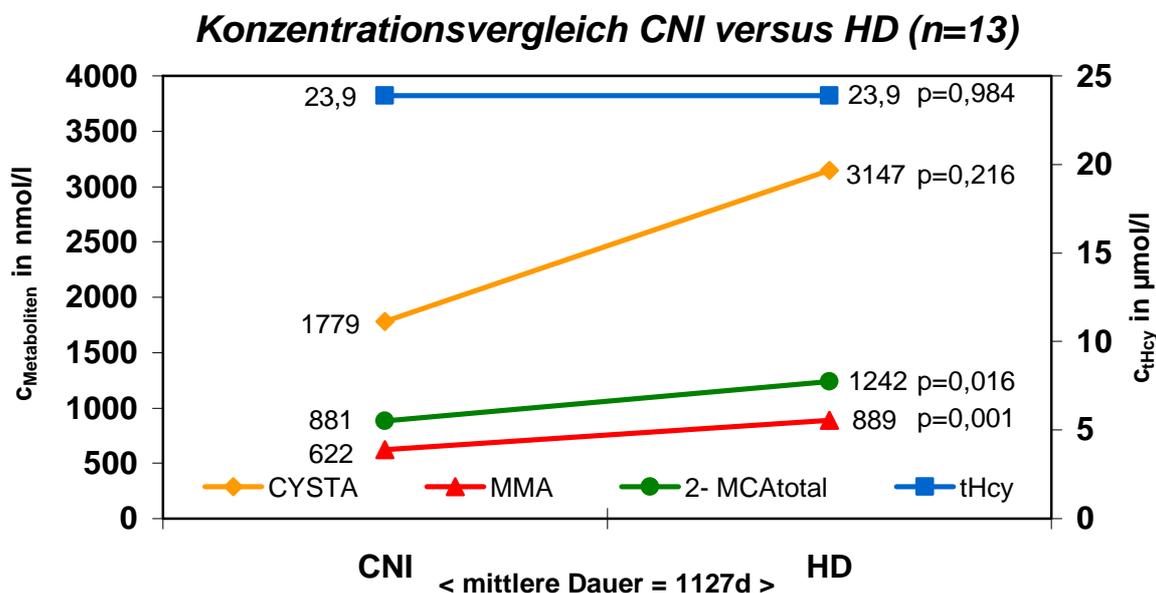


Abb. 14: Vergleich der Konzentrationen von tHcy, CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} der CNI-Patienten vs. HD-Patienten (MW)

5.1.13 Determinanten des Homocysteinspiegels im Serum

Mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse wurde versucht, mögliche Prädiktoren für erhöhte tHcy-Werte abzuleiten. Dazu wurde der Einfluss routinemäßig bestimmter, klinisch-chemischer Parameter wie Serumkreatinin, LDL-Cholesterin, Fibrinogen, CrP, Albumin,

Gesamteiweiß, Vitamin B₁₂, Folsäure sowie des Alters und der Dauer der Kreatininkonzentration > 150 µmol/l auf die tHcy-Spiegel beschrieben.

Als wesentliche Prädiktoren des tHcy-Spiegels konnten LDL-Cholesterin (RK = 1,433; R² = 0,314; p = 0,021), Gesamteiweiß (RK = 0,229; R² = 0,314; p = 0,025), das Patientenalter (RK = 0,162; R² = 0,314; p = 0,007) sowie Kreatinin (RK = 0,017; R² = 0,314; p = 0,006) und Folsäure (RK = -0,725; R² = 0,314; p < 0,001) ermittelt werden. Vorwärtsselektion und Rückwärtsselektion lieferten identische Ergebnisse (vgl. Tab. 9)

Somit lassen sich ca. 31% der Variabilität der tHcy-Werte durch einen linearen Zusammenhang mit den im schrittweisen Verfahren selektierten Parametern erklären.

Tab. 9: tHcy- Determinanten nach linearer Regression mit schrittweiser Variablenselektion

Parameter	Regressionskoeffizient	R²	p-Wert
LDL-Cholesterin	1,433	0,314	0,021
Gesamteiweiß	0,229	0,314	0,025
Alter	0,162	0,314	0,007
Kreatinin	0,017	0,314	0,006
Folsäure	-0,725	0,314	< 0,001

6 Diskussion

6.1 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Gesunde

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz weisen aufgrund ihres hohen Risikoprofils eine ca. 10- bis 20-fach erhöhte kardiovaskuläre Mortalitätsrate im Vergleich zur Normalbevölkerung auf [Klusmann et al. 2000, Perna et al. 2001]. Die zugrunde liegenden Ursachen sind noch nicht eindeutig geklärt. Erhöhte tHcy-Werte scheinen eine Ursache für die Risikopotenzierung bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zu sein [Bostom et al. 1997b, Moustapha et al. 1998, Ducloux et al. 2000].

Neben erhöhten tHcy-Werten wurden bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz erhöhte Konzentrationen von CYSTA und MMA gemessen [Herrmann et al. 2001]. 2-MCA_{total} ist in diesem Zusammenhang ein zusätzlich interessanter Metabolit. Basierend auf einer Methode von Stabler und Allen [Allen et al. 1993, Stabler und Allen 1993] erfolgte durch Busch erstmals die Validierung eines quantitativen Assays für 2-MCA_{total} und seiner Diastereomere 2-MCA-I und 2-MCA-II im Serum [Busch 2000, Busch et al. 2002]. Anhand dieser Methode wurden bereits bei Niereninsuffizienten unter chronischer Hämodialysetherapie zusätzlich zu gesteigerten tHcy- und CYSTA-Werten simultan erhöhte MMA- und 2-MCA_{total}-Serumkonzentrationen bestimmt [Busch 2000, Scheibner 2003]. Ob neben der tHcy-Spiegelsteigerung erhöhten Metabolitenkonzentrationen eine eigenständige pathogenetische Bedeutung zukommt ist unklar. Jedoch gelten erhöhte Spiegel von CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} im Vergleich zu tHcy wahrscheinlich als sensitivere Marker eines gestörten intrazellulären Vitaminmetabolismus [Herrmann et al. 2001].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Serumkonzentrationen von tHcy, CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} bei 99 niereninsuffizienten Patienten im Stadium der kompensierten Retention bestimmt. Als Vergleichswerte dienten laboreigene Referenzbereiche, die an einer Gruppe von 52 gesunden Personen ermittelt (siehe Tab. 2 unter 4.2.4) wurden.

Es ergaben sich bei den CNI-Patienten im Vergleich zu Gesunden 2,3-fach erhöhte tHcy-Konzentrationen, 3,3-fach erhöhte MMA-Konzentrationen, 6,8-fach erhöhte CYSTA-Konzentrationen sowie 5,2-fach erhöhte Konzentrationen von 2-MCA_{total} (vgl. Abb. 5 und Abb. 6). Legt man den tHcy-Wert der 97,5. Perzentile (15,6 µmol/l) unserer gesunden Vergleichspopulation zugrunde, wird bei 80% (n = 79) der untersuchten CNI-Patienten eine Hyperhomocysteinämie diagnostiziert. Die Übersichtsarbeit von de Vriese et al. belegte eine Prävalenz der Hyperhomocysteinämie bei chronisch Niereninsuffizienten von mehr als 85% [de Vriese et al. 2002].

In der Literatur werden bei Männern signifikant höhere tHcy-Spiegel als bei Frauen beschrieben [Lussier-Cacan et al. 1996, Rasmussen et al. 1996, Schreiner et al. 1997, Nygård et al. 1998, Jacques et al. 2001]. Unsere Ergebnisse zeigen hingegen signifikant höhere tHcy- und Metabolitenspiegel bei Frauen, was durch das signifikant höhere Alter der Frauen in unserer Studie ($63,5 \pm 13,1$ Jahre vs. $55,6 \pm 11,9$ Jahre, $p = 0,003$) erklärt werden kann, da mit zunehmendem Alter die tHcy-Konzentration steigt [Nygård et al. 1998, Jacques et al. 2001].

Die tHcy-Konzentrationen sind u.a. auf eine verminderte Metabolisierung von tHcy in der Niere aufgrund funktioneller Mangelzustände der Vitamine B₆ und B₁₂ sowie Folsäure bei chronischer insbesondere terminaler Niereninsuffizienz zurückzuführen [Friedman et al. 2001]. Da nur 1 % der täglich produzierten tHcy-Menge mit dem Urin ausgeschieden wird, ist die renale Elimination offensichtlich nicht der entscheidende Faktor für die Entstehung einer Hyperhomocysteinämie [Chauveau et al. 1993]. Möglicherweise führt das urämische Milieu zu einer Inhibition von Reaktionsschritten im tHcy-Stoffwechsel [Friedman et al. 2001].

Die normalen Mittelwerte für Vitamin B₁₂ und Folsäure im Zusammenhang mit den erhöhten tHcy- und Metabolitenkonzentrationen könnten bei den chronisch niereninsuffizienten Patienten auf einen funktionellen Vitaminmangel hinweisen. Auch andere Studien zeigen in der Mehrzahl der Fälle normale oder erhöhte Folsäureplasmaspiegel in Verbindung mit gesteigerten tHcy-Werten [Chauveau et al. 1993, Stein et al. 1985]. Die Vitamin B₁₂-Spiegel sind meist im Normbereich oder aufgrund einer erhöhten Vitamin B₁₂-Bindungskapazität erhöht [Descombes et al. 1993, Stein et al. 1985].

Die Mehrzahl der Patienten mit Folsäuremangel wiesen gesteigerte tHcy-Serumspiegel auf. Bei nahezu allen Patienten mit einem Vitamin B₁₂-Mangel wurden erhöhte MMA- und tHcy-Konzentrationen sowie gesteigerte 2-MCA_{total}-Konzentrationen ermittelt [Allen et al. 1990 und 1993, Naurath et al. 1995]. Erhöhte CYSTA-Spiegel wies die Mehrheit von Patienten mit kombiniertem Folsäure- und Vitamin B₁₂-Mangel auf [Stabler und Allen 1993]. Im Tierversuch wurden bei Ratten mit einem Vitamin B₆-Mangel gesteigerte CYSTA-Konzentrationen gemessen [Stabler et al. 1994].

Um bei unserem Krankengut die erhöhten Serumkonzentrationen von tHcy und seinen Metaboliten korrekt interpretieren zu können, muss jedoch die renale Clearance von CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} berücksichtigt werden, die 50% bis max. 99% der Clearance von Kreatinin entspricht [Wilson et al. 1998]. So beträgt die CYSTA-Clearance 50,9% der Kreatinin-Clearance [Stabler und Allen 1993]. Die renale Clearance von MMA entspricht etwa 70% der Kreatinin-Clearance [Allen et al. 1993], so dass die Wertigkeit erhöhter MMA-

Spiegel als Marker eines Vitamin B₁₂-Mangels bei Niereninsuffizienten in Frage gestellt wurde [Bächli 1999]. Für 2-MCA_{total} wurde eine Clearance analog der Kreatinin-Clearance ermittelt [Allen et al. 1993]. Im Gegensatz dazu ist die Clearance von tHcy mit einem Anteil von 0,1–0,4% der Kreatinin-Clearance sehr gering [Stabler und Allen 1993].

Henning et al. stellte an chronisch niereninsuffizienten Patienten klare Beziehungen der Metaboliten untereinander sowie zu Kreatinin fest. Es bestanden signifikant positive Korrelationen von tHcy mit CYSTA ($r = 0,59$; $p < 0,0001$), MMA ($r = 0,64$; $p = 0,0001$) und 2-MCA_{total} ($r = 0,64$; $p < 0,0001$). Zudem korrelierte Kreatinin positiv mit tHcy ($r = 0,68$; $p < 0,0001$), CYSTA ($r = 0,73$, $p < 0,0001$), MMA ($r = 0,77$; $p < 0,0001$) und 2-MCA_{total} ($r = 0,81$; $p < 0,0001$) [Henning et al. 1999].

Unter den von uns beobachteten CNI-Patienten waren die Korrelationen von tHcy mit CYSTA ($r = 0,477$; $p < 0,001$), MMA ($r = 0,478$; $p < 0,001$) und 2-MCA_{total} ($r = 0,524$; $p < 0,001$) sowie von Kreatinin mit tHcy ($r = 0,525$; $p < 0,001$), CYSTA ($r = 0,528$; $p < 0,001$), MMA ($r = 0,553$; $p < 0,001$) etwas schwächer ausgeprägt. Lediglich Kreatinin und 2-MCA_{total} korrelierten mit $r = 0,793$ ($p < 0,001$) im Vergleich zu Hennings Beobachtungen etwas stärker.

Die Beziehungen zwischen tHcy, Folsäure ($r = -0,342$; $p < 0,001$) und Vitamin B₁₂ ($r = -0,240$; $p = 0,017$) sowie MMA und Cobalamin ($r = -0,235$; $p = 0,019$) bei unseren Patienten weisen jedoch darauf hin, dass die Stoffwechselfzusammenhänge durchaus widerspiegelt werden und somit eine potentielle Abhängigkeit der Konzentrationsanstiege von funktionellen Vitaminmangelzuständen besteht.

In dieser Arbeit sollte neben der Bedeutung von tHcy als potentieller Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse (AMI, Angina pectoris, CVI und pAVK) auch der Einfluss von CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} bei den CNI-Patienten untersucht werden. Ein direkter atherogener Effekt dieser Verbindungen konnte bislang nicht demonstriert werden, jedoch kann ihre vitaminabhängige und renal determinierte Konzentrationserhöhung, die eng mit dem Homocysteinestoffwechsel verbunden ist, ein Hinweis auf eine mögliche Risikofaktorenkonstellation sein.

Bei den 99 CNI-Patienten traten innerhalb des Beobachtungszeitraumes 11 kardiovaskuläre Ereignisse auf.

In der univariaten Cox-Regressionsanalyse wurden eine Anämie mit Hämoglobinwerten $> 7,4$ mmol/l (RR = 7,1; 95% CI: 1,52-33,24; $p = 0,013$) sowie das weibliche Geschlecht (RR = 3,78; 95% CI 1,11-12,93; $p = 0,034$) als alleinige Risikofaktoren für die Inzidenz

kardiovaskulärer Erkrankungen bei den CNI-Patienten ermittelt (vgl. 5.1.9.2.2). Das Geschlecht gilt bereits neben anderen Faktoren als traditioneller und unabhängiger Prädiktor für eine kardiovaskuläre Erkrankung bei chronisch Niereninsuffizienten [Levin 2003]. Jedoch besteht dabei für Männer im Vergleich zu weiblichen Patienten ein erhöhtes CVD-Risiko. Die inverse Risikokonstellation innerhalb der CNI-Patienten könnte aus dem im Mittel 5,2 Jahre höheren Alter der Frauen ($63,5 \pm 13,1$) im Vergleich zu den männlichen Patienten ($58,3 \pm 12,9$ Jahre) resultieren, da mit zunehmendem Alter das CVD-Risiko ansteigt [Ducloux et al. 2000, Levin 2003]. Dem postmenopausalen Östrogenmangel könnte in diesem Zusammenhang ebenfalls eine Bedeutung zukommen [Barnabei et al. 1999].

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse zeigte die Anämie mit Hämoglobinkonzentrationen unter 7,4 mmol/l (RR = 7,1; 95% CI: 1,52-33,24; p = 0,013) als unabhängigen Risikofaktor für die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei unseren CNI-Patienten (vgl. 5.1.9.2.3). Sie ist eine anerkannte und häufige Komplikation des chronischen Nierenfunktionsverlustes und hat bereits neben dem traditionellen Risikoprofil einen Stellenwert bei chronisch niereninsuffizienten Patienten als CVD-Risikofaktor [Madore 2003, Uhlig et al. 2003]. Einige Autoren sehen deshalb die Therapie der Anämie bei Patienten in der Prädialyse-Phase als geeignetes Mittel, eine Steigerung der körperlichen Leistungsfähigkeit, der Arbeitsfähigkeit, der Lebensqualität sowie eine Senkung der Mortalität herbeizuführen. Der positive Einfluss der Anämiebehandlung scheint selbst nach Beginn der Dialysetherapie anzuhalten [Fink et al. 2001, Xue et al. 2002]. Trotz dieser Vorteile erreichen 79% der Patienten das Stadium der terminalen Niereninsuffizienz mit Hb-Konzentrationen > 11 g/dl, und lediglich 22% der Patienten erhalten Erythropoietin (EPO) vor Beginn der Dialysephase [Perlman et al. 2003]. Deshalb wird derzeit weltweit in mehreren Studien der Effekt einer Steigerung des Hämoglobinwertes mittels EPO auf die kardiovaskuläre Risikoreduktion überprüft. Insbesondere ist der ideale Zeitpunkt des Therapiebeginns interessant. So vergleicht beispielsweise die CREATE-Studie mit insgesamt ca. 600 CNI-Patienten den Erfolg eines sofortigen Therapiebeginns mit EPO (Ziel- Hb 13-15 g/dl) mit dem Start einer EPO-Therapie nach dem die Hb-Konzentration bereits auf Werte unter 10,5 g/dl (Ziel- Hb 10,5-11,5 g/dl) gesunken ist, um eventuell neue Behandlungsstrategien ableiten zu können [Macdougall 2003].

Im Ergebnis mehrerer Studien gilt die Hyperhomocysteinämie als ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen der Allgemeinbevölkerung [Allen et al. 1990, Clarke et al. 1991, Boushey et al. 1995, Blankenberg et al. 2003]. Zur Beurteilung der Bedeutsamkeit gesteigerter tHcy-Konzentrationen bei Patienten mit

chronischer Niereninsuffizienz existieren nur wenige prospektive Untersuchungen. Dabei handelt es sich meistens um Untersuchungen an Patienten, die sich bereits einer chronischen Dialysetherapie unterziehen müssen [Bostom et al. 1997b, Moustapha et al. 1998, Ducloux et al. 2000].

Die Arbeitsgruppe um Bostom zeigte den Einfluss gesteigerter tHcy-Konzentrationen für kardiovaskuläre Ereignisse bei 73 Dialysepatienten auf. Die mittlere tHcy-Plasmakonzentration betrug, wie auch bei unseren CNI-Patienten, 22,3 $\mu\text{mol/l}$. Eine multivariate Cox-Regression demonstrierte erhöhte tHcy-Spiegel mit einem 3-4,4-fach (95% CI: 1,1–8,1 bis 1,6–12,2) erhöhten Risiko für das Auftreten tödlicher und nichttödlicher kardiovaskulärer Erkrankungen. Dabei wurde allerdings ein Vergleich des obersten Quartils (tHcy $\geq 27 \mu\text{mol/l}$) gegen die Summe der drei unteren Quartile (tHcy $\leq 27 \mu\text{mol/l}$) durchgeführt [Bostom et al. 1997b].

Eine prospektive Studie von Moustapha et al. an 167 Dialysepatienten zeigte erhöhte tHcy-Konzentrationen (RR = 1,01; p = 0,01) und das Vorhandensein eines Diabetes mellitus (RR = 2,38; p < 0,01) als unabhängige CVD-Risikofaktoren. Das relative Risiko erhöhte sich um 1% pro 1 $\mu\text{mol/l}$ tHcy-Anstieg [Moustapha et al. 1998].

Im Unterschied zu diesen Analysen zeigte sich bei den von uns untersuchten CNI-Patienten sowohl retrospektiv als auch prospektiv für Patienten mit höheren tHcy-Werten im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen keine Risikoerhöhung. Da jedoch die tHcy-Konzentration bei mehr als 80% der Patienten über den kritischen Wert von 12 – 15 $\mu\text{mol/l}$ erhöht war, kann durchaus eine Risikopotenzierung in diesem Patientengut subsumiert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gehen jedoch mit einer Arbeit von Ducloux et al. konform, in der sich eine gesteigerte tHcy-Konzentration nicht als unabhängiger Risikofaktor erwies. Vielmehr wurden traditionelle Risikofaktoren wie das Alter, Diabetes mellitus und erniedrigte Albuminkonzentrationen als unabhängige Risikofaktoren identifiziert [Ducloux et al. 2000]. Des Weiteren war in einer prospektiven Studie an 140 Männern nach einem Verlauf von 9 Jahren tHcy kein Prädiktor einer symptomatischen pAVK (RR = 1,49 95% CI: 1,20–1,68; p = 0,9) [Ridker et al. 2001]. Auch prospektive Versuche, mit Hilfe einer tHcy-Spiegel-Senkung Surrogat-Endpunkte der Atherosklerose (z.B. Gefäßwanddicke) positiv zu beeinflussen, blieben bislang ohne Erfolg [van Guldener et al. 1998a, Dierkes et al. 1999a, van Dijk et al. 2001]. Eine prospektiv-randomisierte Studie an 510 Niereninsuffizienten verglich den Effekt verschiedener Dosierungen von Folsäure (1 mg vs. 5 mg vs. 10 mg täglich) auf die Inzidenz eines kardiovaskulären Ereignisses und auf die Mortalität über einen Zeitraum von 2 Jahren. Es ergaben sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede (log-rank p = 0,47).

Eine hohe tHcy-Konzentration war mit einer erniedrigten CVD-Ereignisrate und einer geringeren Mortalität vergesellschaftet [Wrone et al. 2004].

Für das Abweichen unserer Ergebnisse von denen anderer Untersucher könnte die Mediandichotomisierung der Messreihen von tHcy und seinen Metaboliten anstelle einer Aufteilung in Quartile zur Definition von Risikogruppen ursächlich sein. Dies war aufgrund der geringen Patientenzahl, die aus einer Aufteilung der CNI-Patienten in Quartile resultierte, nicht möglich. Als zusätzliche Ursache kommt die insgesamt zu geringe Anzahl kardiovaskulärer Ereignisse in unserer Patientengruppe in Betracht. Da in den Daten von Scheibner eine Ereignisrate von 41,7% beobachtet wurde [Scheibner 2003], ist anzunehmen, dass die Mehrheit der vaskulär bedingten Akutereignisse in der Phase der Dialysebehandlung auftritt und somit der Analyse bei CNI-Patienten im Stadium der kompensierten Retention entgeht.

6.2 Progress der Nierenfunktionseinschränkung und Dialysebeginn

Von den 99 CNI-Patienten kam es während des Beobachtungszeitraumes bei insgesamt 41 Patienten (41,4%) zum Fortschreiten der Niereninsuffizienz bis zur Dialysepflichtigkeit. Alle diese Patienten wiesen im Vergleich zu den restlichen CNI-Patienten erhöhte tHcy- und Metabolitenspiegel auf. Signifikante Konzentrationsunterschiede ergaben sich für tHcy mit 25,2 vs. 20,3 $\mu\text{mol/l}$ ($p = 0,004$), CYSTA mit 1660 vs. 1020 nmol/l ($p < 0,001$) und 2-MCA_{total} mit 976 vs. 637 nmol/l ($p < 0,001$; vgl. Abb. 9 und Abb. 10). Die Unterschiede der Serumspiegel von MMA (600 vs. 537 nmol/l) waren statistisch nicht signifikant ($p = 0,051$). Diese Konzentrationsunterschiede sind zum Teil durch den fortschreitenden Nierenfunktionsverlust mit einhergehender GFR-Abnahme erklärbar. Doch legen die durch das Clearanceverhalten nicht vollends erklärbaren Konzentrationsunterschiede von CYSTA (Clearance 50,9% der Ccr), MMA (Clearance 70% der Ccr), tHcy (Clearance 0,1-0,4% der Ccr) und MCA (Clearance 100% der Ccr) eine Bedeutung, sowohl des funktionellen Vitaminmangels als auch des anzunehmenden metabolischen Funktionsverlustes der Niere nahe [Allen et al. 1993, Stabler und Allen 1993]. Um die Bedeutung dieser Parameter für den Nachweis einer Progredienz der Niereninsuffizienz zu untersuchen, wurde versucht, diese anhand eines Cox-Regressionsmodells zu beschreiben. Neben den genannten Substanzen wurden bereits aus der Literatur bekannte Risikofaktoren in die multivariate Analyse integriert (vgl. Tab. 7) [McClellan und Flanders 2003].

Nicht unerwartet wurde mit dem Serumkreatinin der führende Parameter zum Nachweis eines GFR-Verlustes als unabhängiger Prädiktor des Dialysebeginns gefunden (RR = 8,99; 95% CI:

3,23-25,03; $p < 0,001$). In einer Studie an insgesamt 1513 Patienten mit Diabetes mellitus Typ II und Nephropathie fungierte das Serumkreatinin als signifikanter und unabhängiger Prädiktor (RR = 2,1; 95% CI: 1,7-2,5; $p < 0,0001$) [Keane et al. 2003].

Eine Anämie mit Hämoglobinwerten $< 7,4$ mmol/l stellte mit einer RR = 5,75 (95% CI: 2,55-12,96; $p < 0,001$) den nächst stärkeren Progressionsfaktor der CNI mit Endpunkt terminale Niereninsuffizienz dar. Auch andere Untersuchungen konnten eine Anämie als Prädiktor einer progredienten Niereninsuffizienz demonstrieren [Rossert et al. 2002]. Dabei wird eine durch Hypoxie und oxidativen Stress stimulierte Fibroblastenaktivität als Pathomechanismus vermutet. Dies führt durch die gesteigerte Produktion der extrazellulären Matrix zu einer interstitiellen Fibrose und endet schließlich mit Tubulusschäden. Ein therapeutischer Ansatz könnte an dieser Stelle die Gabe von rekombinantem humanem Erythropoietin sein, das sich u.a. durch antioxidative Effekte auszeichnet [Rossert et al. 2002].

Mit einem RR = 4,71 (95% CI: 2,20-10,10; $p < 0,001$) konnte die Präexistenz eines Diabetes mellitus als weiterer CNI-Prädiktor ermittelt werden. Dies geht konform mit dem Ergebnis einer Studie aus den USA an 23534 Patienten mit einem Nachbeobachtungszeitraum von 20 Jahren (RR = 7,5; 95% CI: 4,8-11,7; $p < 0,001$) [Haroun et al. 2003].

Ferner stellten Konzentrationen von LDL-Cholesterin $> 3,5$ mmol/l im Ergebnis der multivariaten Cox-Regressionsanalyse einen unabhängigen Risikofaktor dar (RR = 2,40; 95% CI: 1,15-5,02; $p = 0,02$). Unter Kenntnis der pathophysiologischen Bedeutung anomaler Konzentrationen zirkulierender Lipoproteine für die Progression einer präexistenten Niereninsuffizienz wurde in einer Metaanalyse mit 13 prospektiv-kontrollierten Studien der Effekt einer Lipidsenkertherapie auf das Fortschreiten des Nierenfunktionsverlustes untersucht [Fried et al. 2001]. Dabei wies die therapierte Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikant geringeren Verlust der GFR auf (0,156 ml/min/Monat; 95% CI: 0,026-0,285 ml/min/Monat; $p = 0,008$). Diese Ergebnisse belegen den Progressionseffekt gesteigerter LDL-Spiegel.

Neben den beschriebenen Faktoren zeichnete das männliche Geschlecht mit einem RR = 2,21 (95% CI: 1,07-4,57; $p = 0,033$) für die Zunahme der Niereninsuffizienz verantwortlich. Eine vergleichbare Aussage lieferte eine Metaanalyse mit 68 Studien und insgesamt 11345 Patienten [Neugarten et al. 2000]. Gründe hierfür sahen die Autoren v.a. in hormonellen Abweichungen zwischen den Geschlechtern sowie der differierenden Muskelmasse.

tHcy und MMA konnten im Ergebnis der multivariaten Analyse nicht als unabhängige Prädiktoren der CNI identifiziert werden, obwohl sich im univariaten Regressionsmodell sowohl für tHcy-Spiegel $> 20,9$ $\mu\text{mol/l}$ (RR = 2,11; 95% CI: 1,12-4,00; $p = 0,021$) als auch

für MMA-Spiegel > 481 nmol/l (RR = 2,46; 95% CI: 1,30-4,66; $p = 0,006$) Hinweise für die Beteiligung an der Progression renaler Erkrankungen ergaben.

Im Gegensatz dazu wurden Plasmaspiegel von 2-MCA_{total} > 720 nmol/l mit einem RR = 3,98 (95% CI: 1,55-10,26; $p = 0,004$) als signifikanter und unabhängiger CNI-Progressionsfaktor bestimmt. In der Literatur wurde eine derartige Beziehung bislang nicht beschrieben. Jedoch ist bekannt, dass die renale Clearance von 2-MCA_{total} nahezu identisch der Kreatinin-Clearance ist [Allen et al. 1993]. Dies wird durch die signifikante Korrelation von 2-MCA_{total} mit der Kreatininkonzentration ($r = 0,793$; $p < 0,001$) innerhalb unserer Patientengruppe bestätigt. Somit gleicht 2-MCA_{total} in Bezug auf seine Funktion als CNI-Prädiktor der Serumkreatininkonzentration.

Entgegen unseren Erwartungen wurden CYSTA-Spiegel < 1018 nmol/l (RR = 2,43; 95% CI: 1,09-5,37; $p = 0,03$) als CNI-Progressionsfaktor identifiziert. Dies könnte jedoch auf eine zunehmende Erschöpfung der Transsulfurierungskapazität mit dem Erreichen einer terminalen Niereninsuffizienz hindeuten. Welche Bedeutung sich daraus für das Fortschreiten der CNI ergeben kann ist noch unklar.

Wie bereits während der Diskussion der vorausgegangenen Analyseergebnisse erwähnt, ist auch hier die Mediandichotomisierung der Messreihen von tHcy und seinen Metaboliten sowie weiterer klinisch-chemischer Parameter anstelle einer Aufteilung in Quartile zur Definition von Risikogruppen als Schwachstelle anzuführen. Somit wurden metrische Daten lediglich in Form kategorialer Variablen verwendet (vgl. 4.2.11.5).

6.3 Hämodialysepatienten

Bei insgesamt 41 Patienten (41,4%) führte die progressive renale Erkrankung zum Erreichen des Stadiums der Dialysepflichtigkeit. Im Plasma dieser Patienten wurden, verglichen mit dem der übrigen CNI-Patienten, erhöhte tHcy- und Metabolitenspiegel gemessen (vgl. Abb. 9 und Abb. 10). Direkt zu Beginn der Hämodialysetherapie konnte bei insgesamt 13 dieser Patienten (31,7%) eine zweite Messung von tHcy und seiner Metaboliten erfolgen. Der Zeitraum zwischen beiden Messungen lag im Mittel bei 3,1 Jahren (2,0 bis 3,9 Jahre). Neben tHcy, welches bei einer mittleren Konzentration von 23,9 $\mu\text{mol/l}$ konstant blieb, konnte für CYSTA eine ca. 1,8-fache und somit die stärkste, wenn auch nicht signifikante, mittlere Konzentrationserhöhung (3147 vs. 1779 nmol/l, $p = 0,216$) ermittelt werden. Für MMA (889 vs. 622 nmol/l, $p = 0,001$) als auch für 2-MCA_{total} (1242 vs. 881 nmol/l, $p = 0,016$) wurde jeweils eine ca. 1,4-fache Konzentrationserhöhung bestimmt (vgl. Abb. 14). Bei Kenntnis der renalen Clearance von CYSTA, MMA und 2-MCA_{total}, die 50–99% der Kreatinin-Clearance

beträgt und somit auch eine Dialysierbarkeit erklärt [Wilson et al. 1998], sind die ermittelten Ergebnisse verständlich. Auch die gleich bleibenden tHcy-Werte sind auf die renale Clearance mit einem Anteil von lediglich 0,1–0,4% der Kreatinin-Clearance zurückzuführen [Stabler und Allen 1993].

Obwohl CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} gut dialysierbar sind [Allen et al. 1993, Stabler und Allen 1993], weisen HD-Patienten höhere Metabolitenkonzentrationen als unsere CNI-Patienten auf [Scheibner 2003]. Gleiches gilt bei schlechter Dialysierbarkeit für tHcy. Äußerst komplexe und multifaktorielle Stoffwechselveränderungen der Urämie haben dabei wahrscheinlich eine Schlüsselrolle. Urämietoxine führen sowohl zur direkten als auch über die Beeinflussung am Metabolismus beteiligter Vitamine und Proteine zur indirekten Modulation des tHcy-Katabolismus (vgl. 2.6). Hinzu kommt die im Verlauf zunehmende Fibrosierung der Nieren, die zu einem fortschreitenden Verlust der Stoffwechsellkapazität zu führen scheint. So konnte bei HD-Patienten eine um 30% verminderte Remethylierung nachgewiesen werden [van Guldener et al. 1999]. Zusätzlich wird durch die Verluste wasserlöslicher Vitamine während der Dialysebehandlung ein Vitaminmangel unterhalten [Stein et al. 1985, Descombes et al. 1993].

Aufgrund der genannten Befunde liegt die Vermutung nahe, dass die Zusammenhänge zwischen gestörtem tHcy-Metabolismus und atherosklerotischen Folgeerscheinungen bei Dialysepatienten von größerer Bedeutung sind, als bei chronisch Niereninsuffizienten im Stadium der kompensierten Retention. So konnte beispielsweise tHcy bei Dialysepatienten mit präexistenter CVD als kardiovaskulärer Risikofaktor identifiziert werden (RR = 3,38; 95% CI: 1,17-9,74; p = 0,024) [Scheibner 2003]. Dies könnte auf eine Verstärkung bereits bestehender atherosklerotischer Gefäßveränderungen sowie eine Begünstigung der thrombotischen Diathese durch eine Hyperhomocysteinämie in dieser Patientengruppe hindeuten.

6.4 Determinanten des Homocysteins

Aufgrund der derzeit äußerst zeit- und kostenintensiven Bestimmung von tHcy und seinen Metaboliten mittels GC-MS-Kopplung ergibt sich die Frage, ob routinemäßig ermittelte klinisch-chemische Parameter erhöhte tHcy-Werte vorhersagen können. Jaques et al. konnten anhand der Framingham Offspring Cohort neben dem Serumkreatininspiegel auch Folsäure und das Patientenalter als unabhängige Determinanten für tHcy ermitteln [Jaques et al. 2001]. Bei unseren Patienten konnten 31% der Variabilität der tHcy-Werte durch einen linearen Zusammenhang mit den im schrittweisen Verfahren selektierten Parametern erklärt werden.

In partieller Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Jaques et al. wurden LDL-Cholesterin (RK = 1,433; $R^2 = 0,314$; $p = 0,021$), Gesamteiweiß (RK = 0,229; $R^2 = 0,314$; $p = 0,025$), das Patientenalter (RK = 0,162; $R^2 = 0,314$; $p = 0,007$) sowie Kreatinin (RK = 0,017; $R^2 = 0,314$; $p = 0,006$) und Folsäure (RK = -0,725; $R^2 = 0,314$; $p < 0,001$) als statistisch signifikant identifiziert (vgl. Tab. 9).

6.5 Schlussfolgerungen

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass mit 80% bei der Mehrzahl der chronisch niereninsuffizienten Patienten eine Hyperhomocysteinämie vorliegt. Ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen im Vergleich zur Normalbevölkerung lässt sich jedoch allein aus dieser Tatsache nicht ableiten.

Die Metaboliten CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} waren bei allen Patienten erhöht. Dafür ist neben einem funktionellen Mangel von Vitamin B₆, B₁₂ und Folsäure, induziert durch eine gestörte metabolische Aktivität der Niere, die verminderte Filtration dieser Substanzen in den Urin verantwortlich.

Die bereits als unabhängiger Risikofaktor bekannte renale Anämie spielte offensichtlich, neben traditionellen Risikofaktoren in unserem Krankengut, eine größere Rolle für das kardiovaskuläre Outcome bei Präodialyse-Patienten als erhöhte tHcy- oder Metabolitenkonzentrationen.

Obwohl die Patienten, die das Terminalstadium der CNI erreichten erhöhte Werte von tHcy, CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} aufwiesen und nach der univariaten Cox-Regressionsanalyse Hinweise auf die Beteiligung dieser Substanzen an der Progression der Niereninsuffizienz bestanden, wurden nur traditionelle Faktoren wie eine erhöhte Kreatininkonzentration, eine moderate renale Anämie, Diabetes mellitus, erhöhte LDL-Spiegel sowie das männliche Geschlecht als Progressionsmarker der Niereninsuffizienz ermittelt.

Erhöhte tHcy- und Metabolitenwerte bei Dialysepatienten lassen vermuten, dass die Zusammenhänge zwischen gestörtem tHcy-Metabolismus und atherosklerotischen Folgeerscheinungen in dieser Patientengruppe von größerer Bedeutung sind.

Anhand der gezeigten Daten ist zu schlussfolgern, dass der Hyperhomocysteinämie in Kombination mit erhöhten Serumkonzentrationen der Metaboliten CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} bei chronisch niereninsuffizienten Patienten im Präodialysestadium als Risikofaktor für eine kardiovaskuläre Erkrankung sowie für die Progression der Niereninsuffizienz keine wesentliche Rolle zukommt. Stattdessen sollte die Korrektur traditioneller und

modifizierbarer Risikofaktoren einen festen Platz im therapeutischen Regime einnehmen. In diesem Zusammenhang muss bereits der Ausgleich einer moderaten Anämie besonders betont werden.

Als mögliche Schwachstellen dieser Arbeit sind die geringe Anzahl an Patienten sowie kardiovaskulären Ereignissen in unserer Patientengruppe zu nennen. Dies könnte auf der Tatsache basieren, dass die Mehrheit der vaskulär bedingten Akutereignisse in der Phase der Dialysebehandlung auftritt und somit der Analyse bei Patienten im Prädialysestadium entgehen.

Als ein weiteres Problem ist die Mediandichotomisierung der Messreihen von tHcy und seinen Metaboliten sowie weiterer klinisch-chemischer Parameter anstelle einer Aufteilung in Quartile zur Definition von Risikogruppen zu nennen. Somit ließen sich metrische Daten lediglich in Form kategorialer Variablen verwenden, woraus sich u.U. die Diskrepanz unserer Ergebnisse zu denen anderer Untersucher erklären lässt.

Nicht zuletzt sei einschränkend auf die Erfassung lediglich kurzzeitiger Veränderungen des Metabolismus durch die einmalige Messung von tHcy, CYSTA, MMA und 2-MCA_{total} als Ausgangswerte zu Studienbeginn hingewiesen.

7 Literaturverzeichnis

1. Alfthan G., Pekkanen J., Jauhiainen M., Pitkaniemi J., Karvonen M. and Tuomiletho J.: Relation of serum homocysteine and lipoprotein(a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective Finnish population based study. *Atherosclerosis* 1994; 106: 9-19
2. Allen R.H., Stabler S.P. and Savage D.G., Lindenbaum J.: Diagnosis of cobalamin deficiency: Usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. *Am J Hem* 1990; 34: 90-98
3. Allen R.H., Stabler S.P., Savage D.G., Lindenbaum J.: Elevation of 2-methylcitric acid I and II levels in serum, urine, and cerebrospinal fluid of patients with cobalamin deficiency. *Metabolism* 1993; 42: 978-988
4. Andersson A., Brattström L., Israelsson B., Isaksson A., Hamfelt A. and Hultberg B.: Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 79-87
5. Ando T., Rasmussen K., Wright J.M. and Nyhan W.L.: Isolation and identification of methylcitrate, a major metabolite product of propionate in patients with propionic acidemia. *J Biol Chem* 1972; 247: 2200-2204
6. Apeland T., Mansoor M.A. and Strandjord R.E.: Antiepileptic drugs as independent predictors of total homocysteine levels. *Epilepsy Research* 2001; 47: 27-35
7. Apeland T., Mansoor M.A. and Strandjord R.E.: Folate, homocysteine and methionine loading in patients on carbamazepine. *Acta Neurol Scand* 2001; 103: 294-299
8. Arnadottir M., Gudnason V. and Hultberg B.: Treatment with different doses of folic acid in haemodialysis patients: Effects on folate distribution and aminothiols concentrations. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 524-528
9. Bächli E.: Diagnose eines Vitamin B12-Mangels: nur scheinbar ein Kinderspiel. *Schweiz Med Wochenschr* 1999; 129: 861-872
10. Barnabei V.M., Phillips T.M. and Hsia J.: Plasma homocysteine in women taking hormone replacement therapy: The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. *J Womens Health Gend Based Med* 1999; 8: 1167-1172

11. Barshop B.A., Wolff J., Nyhan W.L., Yu A., Prodanos C., Jones G., Sweetman L., Leslie J., Holm J. and Green R.: Transcobalamin II deficiency presenting with methylmalonic aciduria and homocystinuria and abnormal absorption of cobalamin. *Am J Med Genet.* 1990;35: 222-228
12. Beaulieu A.J., Gohh R.Y., Han H., Hakas D., Jaques P.F., Selhub J. and Bostom A.G.: Enhanced reduction of fasting homocysteine levels with supraphysiologic versus standard multivitamin dose folic acid in renal transplant recipients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2918-2921
13. Bielenberg J.: Thrombosen durch Estrogene. *MMP* 1997; 11: 315-319
14. Blankenberg S., Rupprecht H.J., Bickel C., Torzewski M., Hafner G., Tiret L., Smieja M., Cambien F., Meyer J. and Lackner K.J.: Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Eng J Med* 2003; 349: 1605-1613
15. Blom H.J.: Determinants of plasma homocysteine. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 188-189
16. Bostom A.G. and Culleton B.F.: Hyperhomocysteinemia in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 891-900
17. Bostom A.G. and Lathrop L.: Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: Prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int* 1997; 52: 10-20
18. Bostom A.G., Brosnan J.T., Hall B., Nadeau M.R. and Selhub J.: Net uptake of plasma homocysteine by the rat kidney in vivo. *Atherosclerosis* 1995; 116: 59-62
19. Bostom A.G., Gohh R.Y., Beaulieu A.J., Nadeau M.R., Hume A.L., Jaques P.F., Selhub J. and Rosenberg I.C.H.: Treatment of hyperhomocysteinemia in renal transplant recipients. *Ann Intern Med* 1997a; 127: 1089-1092
20. Bostom A.G., Shemin D., Bagley P., Massy Z.A., Zanabli A., Christopher K., Spiegel P., Jacques P.F., Dworkin L. and Selhub J.: Controlled comparison of L-5-methyltetrahydrofolate versus folic acid for the treatment of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *Circulation* 2000; 101: 2829-2832
21. Bostom A.G., Shemin D., Lapane K.L., Hume A.L., Yoburn D., Nadeau M.R., Bendich A., Selhub J. and Rosenberg I.C.H.: High dose B-vitamin treatment of hyperhomocysteinemia in dialysis patients. *Kidney Int* 1996; 49: 147-152

22. Bostom A.G., Shemin D., Verhoef P., Nadeau M.R., Jacques P.F., Selhub J., Dworkin L. and Rosenberg I.H.: Elevated fasting total plasma homocysteine levels and cardiovascular disease outcomes in maintenance dialysis patients: a prospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997b; 17: 2554-2558
23. Bots M.L., Launer L.J., Lindemans J., Hofman A. and Grobbee D.E.: Homocysteine, atherosclerosis and prevalent cardiovascular disease in the elderly: The Rotterdam Study. *J Int Med* 1997; 242: 339-347
24. Boushey C.J., Beresford S.A.A., Omenn G.S. and Motulsky A.G.: A quantitative assessment of plasma homocystein as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1995; 274: 1049-1057
25. Brattström L.E., Israelsson B., Jepson J.-O. and Hultberg B.L.: Folic acid - an innocuous means to reduce plasma homocysteine. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; 48: 215-221
26. Brattström L.E., Israelsson B., Norrving B., Bergquist D., Thörne J., Hultberg B. and Hamfelt A.: Impaired homocysteine metabolism in early-onset cerebral and peripheral occlusive arterial disease: Effects of pyridoxine and folic acid treatment. *Atherosclerosis* 1990; 81: 51-60
27. Busch M.: Etablierung und Evaluierung der quantitativen Bestimmung von Homocystein und den Metaboliten Cystathionin, Methylmalonsäure und 2-Methylzitronensäure im Serum mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Dissertation an der FSU Jena, 2000
28. Busch M., Stein G., Poppitz W., Hein G. and Müller A.: Validated capillary gas chromatographic-mass spectrometric assay to determine 2-methylcitric acid I and II levels in human serum by using a pulsed splitless injection procedure. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 775: 215-223
29. Carson N.A.J. and Neill D.W.: Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 1962; 37: 505-513
30. Celermajer D.S., Sorensen K. and Raylls M.: Impaired endothelial function occurs in the systemic arteries of children with homozygous homocystinuria but not in their heterozygous parents. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22: 854-858
31. Chauveau P., Chadeaux B., Coudé M., Aupetit J., Hannedouche T.H., Kamoun P. and Jungers P.: Hyperhomocysteinemia, a risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients. *Kidney Int* 1993; 43: 72-77

32. Chauveau P., Chadeaux B., Kolko A., Bonete R., Bandin O., Aupetit J., Kamoun P. and Jungers P.: Homocysteine and folate concentrations in hemodialyzed patients: Effect of folate supplementation and dialyses membranes (Abstract).
J Am Soc Nephrol 1996; 7: 1475
33. Clarke R., Daly L., Robinson K., Naughten E., Cahalane S., Fowler B.: Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease.
N Engl J Med. 1991; 324: 1149-1155
34. Cochran F.B., Sweetman L., Schmidt K., Barsh G., Kraus J. and Packman S.: Pyridoxine-unresponsive homocystinuria with an unusual clinical course.
Am J Genet 1990; 35: 519-522
35. Coude M., Chadeaux B., Rabier D. and Kamoun P.: Early amniocentesis and amniotic fluid organic levels in the prenatal diagnosis of organic acidemias.
Clin Chim Acta 1990; 187: 329-332
36. Cravo M.L., Gloria L.M., Selhub J., Nadeau M.R., Camilo M.E., Resende M.P., Cardoso J.N., Leitao C.N. and Mira F.C.: Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status.
Am J Clin Nutr 1996; 63: 220-224
37. de Jong S.C., Stehouwer C.D.A., van den Berg M., Vischer U.M., Rauwerda J.A. and Emeis J.J.: Endothelial marker proteins in hyperhomocysteinemia.
Thromb Haemost 1997; 78: 1332-1337
38. de Vriese A.S., Verbeke F., Schrijvers B.F. and Lameire N.H.: Is folate a promising agent in the prevention and treatment of cardiovascular disease in patients with renal failure? *Kidney Int* 2002; 61: 1199-1209
39. Dennis V.W. and Robinson K.: Hyperhomocysteinaemia and vascular disease in end-stage renal disease. *Kidney Int* 1996; 52 (Suppl 57): 11-17
40. Descombes E., Hanck A.B. and Fellay G.: Water soluble vitamins in chronic hemodialysis patients and need for supplementation.
Kidney Int 1993; 43: 1319-1328
41. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung (2000). Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Umschau Braus, Frankfurt am Main

42. Dierkes J., Domröse U., Ambrosch A., Bosselmann H.P., Neumann K.H. and Luley C.: Response of hyperhomocysteinemia to folic acid supplementation in patients with end-stage renal disease. *Clin Nephrol* 1999a; 51:108-115
43. Dierkes J., Westphal S. and Luley C.: Serum homocysteine increases after therapy with fenofibrate or bezafibrate. *Lancet* 1999b; 354: 219-220
44. du Vigneaud V., Ressler C. and Rachele J.R.: The biological synthesis of "labilemethyl groups". *Science* 1950; 112: 267-271
45. Ducloux D., Aboubakr A., Motte G., Toubin G., Fournier V., Chalopin J.M., Drüecke T. and Massy Z.A.: Hyperhomocysteinaemia therapy in haemodialysis patients: folinic versus folic acid in combination with vitamin B6 and B12. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 865-870
46. Ducloux D., Motte G. and Chalopin J.M.: Homocysteine in Renal Disease. *Clin. Lab.* 2000; 46: 141-151
47. Feix A., Fritsche-Polans R., Kletzmayer J., Vychtil A., Hörl W.H., Sunder-Plassmann G. and Födinger M.: Increased prevalence of combined MTR and MTHFR genotypes among individuals with severely elevated total homocysteine plasma levels. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 956-962
48. Fink J.C., Blahut S.A., Reddy M. and Light P.D.: Use of erythropoietin before the initiation of dialysis and its impact on mortality. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 348-355
49. Finkelstein J.D. and Martin J.J.: Methionine metabolism in mammals: adaption to methionin excess. *J Biol Chem* 1986; 261 :1582-1587
50. Fonseca V., Desouza C., Asnani S. and Jialal I.: Nontraditional risk factors for cardiovascular disease in diabetes. *Endocrine Reviews* 2004; 25: 153-175
51. Foreman J.W., Wald H., Blumberg G., Pepe L.M. and Segal S.: Homocystine uptake in isolated rat renal cortical tubules. *Metabolism* 1982; 31: 613-619
52. Fowler B.: Genetic defects of folate and cobalamin metabolism. *Eur J Paediatrics* 1998; 157 Suppl 2: 60-66
53. Freyburger G., Labrousche S., Sassoust G., Rouanet F., Javorschi S. and Parrot F.: Mild hyperhomocysteinemia and hemostatic factors in patients with arterial vascular disease. *Thromb Haemost* 1997; 77: 466-471
54. Fried L.F., Orchard T.J. and Kasiske B.L.: Effect of lipid reduction on progression of renal disease: a meta-analysis. *Kidney Int* 2001; 59: 260-269
55. Friedman A.N., Bostom A.G., Selhub J., Levey A.S. and Rosenberg I.H.: The kidney and homocysteine metabolism. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2181-2189

56. Frosst P., Blom H.J., Milos R., Goyette P., Sheppard C.A., Matthews R.G., Boers G.J.H., den Heijer M., Kluijtmans L.A.J., van den Heuvel L. and Rozen R.: A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-113
57. Fryer R.H., Wilson B.D., Gubler D.B., Fitzgerald L.A. and Rodgers G.M.: Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1327-1333
58. García-Tevijano E.R., Berasain C., Rodríguez J.A., Corrales F.J., Arias R., Martín-Duce A., Caballería J., Mato J.M. and Avila M.A.: Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis: mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis. *Hypertension* 2001; 38: 1217-1221
59. Garovic-Kocic V. and Rosenblatt D.S.: Methionin auxotrophy in inborn errors of cobalamin metabolism. *Clin Invest Med* 1992; 15: 395-400
60. Gerritsen T., Vaughn J.G. and Wisman H.A.: The identification of homocysteine in the urine. *Biochem Biophys Res Commun* 1962; 9: 493
61. Guo X. and Dudman N.P.: Homocysteine induces expressions of adhesive molecules on leukocytes in whole blood. *Chin Med J* 2001; 114: 1235-1239
62. Graham I.M., Daly L.E., Refsum H.M., Robinson K., Brattstrom L.E., Ueland P.M.: Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997; 277: 1775-1781
63. Guttormsen A.B., Mansoor M.A., Fiskerstrand T., Ueland P.M. and Refsum H.: Kinetics of plasma homocysteine in healthy subjects after peroral homocysteine loading. *Clin Chem* 1993; 39: 1390-1397
64. Guttormsen A.B., Schneede J., Ueland P.M. and Refsum H.: Kinetics of total plasma homocysteine in subjects with hyperhomocysteinaemia due to folate or cobalamin deficiency. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 194-202
65. Guttormsen A.B., Ueland P.M., Svarstad E. and Refsum H.: Kinetic basis of hyperhomocysteinaemia in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 1997; 52: 495-502
66. Haagsma C.J., Bloom H.J., van Riel P.L., van't Hof M.A., Giesendorf B.A.J., van Oppenraaij-Emmerzaal D. and van de Putte L.B.A.: Influence of sulphasalazine, methotrexate, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 79-84

67. Harker L.A., Ross R., Slichter S.J., Scott C.R. and Ross R.: Homocystinemia: vascular injury and arterial thrombosis. *N Eng J Med* 1974; 291: 537-543
68. Harker L.A., Ross R., Slichter S.J. and Scott C.R.: Homocystine-induced arteriosclerosis: The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976; 58: 731-741
69. Haroun M.K., Jaar B.K., Hoffman S.C., Comstock G.W., Klag M.J. and Coresh J.: risk factors for chronic kidney disease: a prospective study of 23,534 men and women in Washington County, Maryland. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2934–2941
70. Harpel P.C., Chang V.T. and 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* 1992; 89: 10193-10197
71. Hauser A., Hagen W., Rehak P.H., Buchmeyer H., Födinger M., Papagiannopoulos M., Bieglmayer C., Apsner R., Koller E., Ignatescu M.C., Hörl W.H. and Sunder-Plassman G.: Efficacy of folinic versus folic acid for the correction of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 758-765
72. Heinecke J.W., Rosen H., Suzuki L.A. and Chait A.: The role of sulfur-containing amino acids in superoxid production and modification of low-density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 10098-10103
73. Heinecke J.W.: Superoxide-mediated oxidation of low-density lipoprotein by thiols. In Cerutti P.A., Fridovich I., McCord J.M.: *Oxy-radicals in molecular biology and pathology*. New York: R. Liss, 1988: 443-457
74. Henning B.F., Riezler R., Tepel M., Langer K., Raidt H., Graefe U. and Zidek W.: Evidence of altered homocysteine metabolism in chronic renal failure. *Nephron* 1999; 83: 314-322
75. Herrmann W., Schorr H., Geisel J. and Riegel W.: Homocysteine, cystathionine, methylmalonic acid and B-vitamins in patients in renal disease. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 739-746
76. Homocysteine Lowering Trialists` Collaboration: Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomized trials. *BMJ* 1998; 316: 894-898

77. House A.A., Wells G.A., Donnelly J.G., Nadler S.P. and Hébert P.C.: Randomized trial of high-flux vs. low-flux haemodialysis: effects on homocysteine and lipids. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1029-1034
78. House J.D., Brosnan M.E. and Brosnan J.T.: Characterization of homocysteine metabolism in the rat kidney. *Biochem J* 1997; 328: 287-292
79. House J.D., Brosnan M.E. and Brosnan J.T.: Renal uptake and excretion of homocysteine in rats with acute hyperhomocysteinemia. *Kidney Int* 1998; 54: 1601-1607
80. Hultberg B., Anderson A. and Sterner G.: Plasma homocysteine in renal failure. *Clin Nephrol* 1993; 40: 230-234
81. Hultberg B., Andersson A. and Arnadottir M.: Reduced, free and total fractions of homocysteine and other thiol compounds in plasma from patients with renal failure. *Nephron* 1995; 70: 62-67
82. Jacques P.F., Bostom A.G., Wilson P.W.F., Rich S., Rosenberg I.H. and Selhub J.: Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 613-621
83. Jager A., Kostense P.J., Nijpels G., Dekker J.M., Heine R.J., Bouter L.M., Donker A.J.M. and Stehouwer C.D.A.: Serum homocysteine levels are associated with the development of (micro)albuminuria: The Hoorn Study. *Arterioscl Vasc Thromb Biol* 2001; 21: 74-81
84. Jakubowski H., Zhang L., Bardeguet A. and Aviv A.: Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: Implications for atherosclerosis. *Circ Res* 2000; 87: 45-51
85. Jakubowski H.: Homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J* 1999; 13: 2277-2283
86. Joosten E., Lesaffre R. and Riezler R.: Are different reference intervals for methylmalonic acid and total homocysteine necessary in elderly people? *Eur J Haematol* 1996; 57: 222-226
87. Joosten E., van den Berg A., Riezler R., Naurath H.J., Lindenbaum J., Stabler S.P. and Allen R.H.: Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B12, folate and vitamin B6 occur commonly in elderly people. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 468-76
88. Kang S.S., Wong P.W.K., Susmano A., Sora J., Norusis M. and Ruggie N.: Thermolabile methyltetrahydrofolate reductase: An inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 536-545

89. Keane W.F., Brenner B.M., de Zeeuw D., Gunfeld J.-P., McGill J., Mitch W.E., Ribeiro A.B., Shahinfar S., Simpson R.L., Snapinn S.M. and Toto R.: The risk of developing end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes and nephropathy: The RENAAL Study. *Kidney Int* 2003; 63: 1499–1507
90. 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 Heijder M., Trijbels F.J.M., Rozen R. and Blom H.J.: Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 35-41
91. Klusmann A., Ivens K., Schadewaldt P., Grabensee B. und Heering P.: Ist Homocystein ein Risikofaktor für das Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz? *Med Klin* 2000 Apr 15; 95(4): 189-194
92. Koga T., Claycombe K. and Meydani M.: Homocysteine increases monocyte and T-cell adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 2002; 161: 365-374
93. Kopple J.D., Jones M., Fukuda S. and Swendseid M.: Amino acid and protein metabolism in renal failure. *Am J Clin Nutr* 1978; 31: 1532-1540
94. Lentz S.R. and Sadler J.E.: Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 1991; 88: 1906-1914
95. Lentz S.R., Sobey C.H.G., Piegors D.J., Bhopatkar M.Y., Faraci F.M., Malinow M.R. and Heistad D.D.: Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest* 1996; 98: 24-29
96. Leupold D.: Methylmalonic aciduria - Classification, diagnosis and therapy. *Klin Wochenschrift* 1977; 55: 1966-1982
97. Levin A.: Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease prior to dialysis. *Seminars in Dialysis* 2003; 16: 101-105
98. Loscalzo J.: The Oxidant Stress of Hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest* 1996; 98: 5-7
99. Lussier-Cacan S., Xhignesse M., Piolot A., Selhub J., Davignon J. and Genest J. Jr.: Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 587-593
100. Macdougall I.C.: CREATE: new strategies for early anemia management in renal insufficiency. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18 (Suppl. 2): 13ii-16ii

101. Madore F.: Uremia-related metabolic cardiac risk factors in chronic kidney disease. *Seminars in Dialysis* 2003; 16: 148-156
102. Makoff R., Dwyer J. and Rocco M.V.: Folic Acid, Pyridoxine, Cobalamin, and Homocysteine and Their Relationship to Cardiovascular Disease in End-Stage Renal Disease. *Journal of Renal Nutrition* 1996; 6: 2-11
103. Malinow M.R.: Homocysteine and arterial occlusive diseases. *J Int Med* 1994; 236: 603-617
104. Mansoor M.A., Kristensen O., Hervig T., Bates C.J., Pentieva K., Vefring H., Osland A., Berge T., Drablos P.A., Hetland O. and Rolfsen S.: Plasma total homocysteine response to oral doses of folic acid and pyridoxine hydrochloride (vitamin B6) in healthy individuals. Oral doses of vitamin B6 reduce concentrations of serum folate. *Scand J Clin Lab Invest* 1999 ; 59 : 139-146
105. McClellan W.M. and Flanders W.D.: Risk factors for progressive chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: S65–S70
106. McCully K.S. and Ragsdale B.D.: Production of atherosclerosis by homocysteinemia. *Am J Pathol* 1970; 61: 1-12
107. McCully K.S. and Wilson R.B.: Homocysteine theory of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1975; 22: 215-227
108. McCully K.S.: Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-123
109. McGregor D.O., Warwick J.D., Robson R.A., Lever M., George P.M. and Chambers S.T.: Betain supplementation decreases post-methionin hyperhomocysteinemia in chronic renal failure. *Kidney Int* 2002; 61: 1041-1046
110. McKinley M., McNulty H., McPartlin J., Strain J.J., Pentieva K., Ward M., Weir D.G. and Scott J.M.: Low-dose vitamin B-6 effectively lowers fasting plasma homocysteine in healthy elderly persons who are folate and riboflavin replete. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 759-764
111. Mor E., Helfmann S., Lustig S., Bar-Nathan N., Yussim A. and Sela B.A.: Homocysteine levels among transplant recipients: Effect of immunosuppressive protocols. *Transplantation Proceedings* 2001; 33: 2945-2946
112. Morris M.S., Jacques P.F., Selhub J. and Rosenberg I.H.: Total homocysteine and estrogen status indicators in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol* 2000; 152: 140-148

113. Moustapha A., Naso A., Nahlawi M., Gupta A., Arheart K.L., Jacobsen D.W., Robinson K. and Dennis V.W.: Prospective study of hyperhomocysteinemia as an adverse cardiovascular risk factor in end-stage renal disease.
Circulation 1998; 97: 138-141
114. Mudd S.H., Finkelstein J.D., Refsum H., Ueland P.M., Malinow R., Lentz S.R., Jacobsen D.W., Brattström L., Wilcken B., Wilcken D.E.L., Blom H.J., Stabler S.P., Allen R.H., Selhub J. and Rosenberg I.H.: Homocysteine and its disulfide derivatives a suggested consensus terminology.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 1704-1706
115. Mudd S.H., Skovby F. and Levy H.L.: The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 1-31
116. Naruszewicz M., Mirkiewicz E. and Olszewski A.J.: Thiolation of low density lipoprotein by homocysteine thiolactone causes increased aggregation and altered interaction with cultured macrophages. *Nutr Metb Cardiovasc Dis* 1994; 4: 70-77
117. Naurath H.J., Joosten E., Riezler R., Stabler S.P., Allen R.H. and Lindenbaum J.: Effects of vitamin B12, folate, and vitamin B6 supplements in elderly people with normal serum vitamin concentrations. *Lancet* 1995; 346: 85-89
118. Naylor G., Sweetman L., Nyhan W.L., Hornbeck C., Griffiths J., Morch L. and Brandange S.: Isotope dilution analysis of methylcitric acid in amniotic fluid for the prenatal diagnosis of propionic and methylmalonic acidemia.
Clin Chim Acta 1980; 107: 175-183
119. Neugarten J., Acharya A. and Silbiger S.R.: Effect of gender on the progression of nondiabetic renal disease: a meta-analysis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 319-329
120. Nishinaga M., Ozawa T. and Shimada K.: Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; 92: 1381-1386
121. Nygård O., Nordrehaug J.E., Refsum H., Ueland P.M., Farstad M. and Vollset S.E.: Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease.
N Engl J Med. 1997; 337: 230-236
122. Nygård O., Refsum H., Ueland P.M. and Vollset S.E.: Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine study.
Am J Clin Nutr 1998; 67: 263-270

123. Olthof M.R., Hollmann P.C., Zock P.L. and Katan M.B.: Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentration in humans. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 532-538
124. Perlman R.L., Kiser M., Finkelstein F., Eisele G., Roys E., Liu L., Burrows-Hudson S., Port F., Messana J.M., Bailie G., Rajagopalan S. and Saran R.: The longitudinal chronic kidney disease study: a prospective cohort study of predialysis renal failure. *Seminars in Dialysis* 2003; 16: 418-423
125. Perna A.F., Ingrosso D., Satta E., Romano M., Cimmino A., Galletti P., Zappia V. and de Santo N.G.: Metabolic consequences of hyperhomocysteinemia in uremia. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 85-90
126. Perry I.J., Refsum H., Morris R.W., Ebrahim S.B., Ueland P.M. and Shaper A.G.: Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 1995; 346: 1395-1398
127. Poddar R., Sivasubramanian N., DiBello P.M., Robinson K. and Jacobsen D.W.: Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant Protein-1 and Interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation* 2001; 103: 2717-2723
128. Rasmussen K., Møller J., Lyngbak M., Pedersen A.M.H. and Dybkjær L.: Age- and gender-specific reference intervals for total homocysteine and methylmalonic acid in plasma before and after vitamin supplementation. *Clin Chem* 1996; 42: 630-636
129. Ratnoff O.D.: Activation of Hageman factor by L-homocystine. *Science* 1968; 162: 1007-1009
130. Ridker P.M., Stampfer M.J. and Rifai N.: Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* 2001 16; 285: 2481-2485
131. Rodgers G.M. and Conn M.T.: Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein c activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 895-901
132. Rodgers G.M. and Kane W.H.: Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest* 1986; 77: 1909-1916
133. Romangnuolo J., Fedorak R.N., Dias V.C., Bamforth F. and Teltscher M.: Hyperhomocysteinemia and inflammatory bowel disease: prevalence and predictors in a cross-sectional study. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2143-2149

134. Rosenblatt D.S.: Inherited disorders of folate transport and metabolism In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., eds.: The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw Hill Inc., 1995: 3111-3128
135. Rossert J.A., McClellan W.M., Roger S.D., Verbeelen D.L. and Hörl W.H.: Contribution of anemia to progression of renal disease: a debate. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 (Suppl.1): 60-66
136. Rossi E., Beilby J.P., McQuillan B.M. and Hung J.: Biological variability and reference intervals for total plasma homocysteine. *Ann Clin Biochem* 1999; 36: 56-61
137. Rowley D.A. and Halliwell B.: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radical in the presence of thiol compounds. *FEBS Lett* 1982; 138: 33-36
138. Russel R.M. and Suter P.M.: Vitamine requirements of the elderly: An update. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 4-11
139. Savage D.G., Lindenbaum J., Stabler S.P. and Allen R.H.: Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determination for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med* 1994; 96: 239-246
140. Scheibner T.: Beziehungen von Homocystein und Metaboliten zur Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei Patienten unter chronischer Hämodialysetherapie. Dissertation an der FSU Jena, 2003
141. Schreiner R., Göbel-Schreiner B., Durst C., Casper R. and Walch S.: Homocysteine: Reference Values. *Clin Lab* 1997; 43: 1121-1124
142. 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.J. and Rosenberg I.C.H.: Association Between Plasma Homocysteine Concentrations and Extracranial Carotid-Artery Stenosis. *N Engl J Med* 1995; 332: 286-291
143. Selhub J., Jacques P.F., Wilson P.W.F., Rush D. and Rosenberg I.C.H.: Vitamin Status and Intake as Primary Determinants of Homocysteinemia in an Elderly Population. *JAMA* 1993; 270: 2693-2698
144. Seshadri S., Beiser A., Selhub J., Jacques P.F., Rosenberg I.H., D'Agostino R.B., Wilson P.W.F. and Wolf P.A.: Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and alzheimer's disease. *N Eng J Med* 2002; 346: 476-483
145. Shemin D., Bostom A.G. and Selhub J.: Treatment of Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 2001; 38 (Suppl 1): S91-S94

146. Silbernagl S.: The renal handling of amino acids and oligopeptides.
Physiol Rev 1988; 68: 911-1007
147. Smulders Y.M., de Man A.M.E., Stehouwer C.D.A. and Slaats E.H.: Trimethoprim and fasting plasma homocysteine. Lancet 1998; 352: 1827-1828
148. Soinio M., Marniemi J., Laakso M., Lehto S. and Rönnemaa T.: Elevated plasma homocysteine level is an independent predictor of coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes mellitus. Ann Intern Med 2004; 140: 94-100
149. Stabler S.P. and Allen R.H.: Elevations of serum cystathionine and homocysteine in vitamin B6, folate and cobalamin deficient rats. Blood 1994; 84: 118a
150. Stabler S.P., Lindenbaum J., Savage D.G. and Allen R.H.: Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency.
Blood 1993; 81: 3404-3413
151. Stamler J.S., Osborne J.A., Jaraki O., Rabbani L.E., Mullins M., Singel D. and Loscalzo J.: Adverse Vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen.
J Clin Invest 1993; 91: 308-318
152. Stammler F., Diehm C., Hsu E., Stockinger K. und Amendt K.: Prävalenz der Hyperhomocysteinämie bei der Thrombangiitis obliterans.
Dtsch. med. Wschr. 1996; 121: 1417-1423
153. Starkebaum G. and Harlan J.M.: Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. J Clin Invest 1986; 77: 1370-1376
154. Stehouwer C.D.A., Gall M.A., Hougaard P., Jakobs C. and Parving H.-H.: Plasma homocysteine concentration predicts mortality in non-insulin-dependent diabetic patients with and without albuminuria. Kidney Int 1999; 55: 308-314
155. Stein G., Busch M., Müller A. und Poppitz W.: Homocystein und seine Metaboliten – Diagnostische Relevanz und therapeutische Konsequenzen.
Spektrum der Nephrologie 1997; 10: 3-15
156. Stein G., Sperschneider H. and Koppe S.: Vitamin levels in chronic renal failure and need for supplementation. Blood Purification 1985; 3: 52-62
157. Suliman M.E., Anderstam B., Lindholm B. and Bergstrom J.: Total, free, and protein-bound sulphur amino acids in uraemic patients.
Nephrol Dial Transplant 1997; 12: 2332-2338

158. Sumner A.E., Chin M.M., Abrahm J.L., Berry G.T., Gracely E.J., Allen R.H. and Stabler S.P.: Elevated methylmalonic acid and total homocysteine levels show high prevalence of vitamin B12 deficiency after gastric surgery.
Ann Intern Med 1996; 124: 469-476
159. Sunder-Plassman G., Födinger M., Buchmeyer H., Papagiannopoulos M., Wojcik J., Kletzmayer J., Enzenberger B., Janata O., Winkelmayr W., Paul G., Auringer M., Barnas U. and Hörl W.H.: Effect of high dose folic acid therapy on hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients: Results of the Vienna Multicenter Study. J Am Soc Nephrol 2000; 11: 1106-1116
160. Suter P.M. and Russell R.M.: Vitamine nutriture and requirements of the elderly.
Vol. 6 New York, N.Y.: Plenum Press 1989: 245-291
161. Suter P.M. and Vetter W.: The role of vitamins in ageing and the ageing process.
Age & Nutrition 1996; 7: 86-95
162. Suter P.M., Häsler E., Locher R. und Vetter W.: Homozystein: Ein kardiovaskulärer Risikofaktor? Praxis 1999; 88: 259-272
163. Suter P.M.: Alkohol-Toxizität und Ernährung. In: Seitz H.K., Lieber C.S., Simanowski U., eds.: Handbuch Alkohol, Alkoholbedingte Organschäden.
Joh. Ambros. Barth Verl 1995: 325-348
164. Sweetman L., Surh L., Baker H., Peterson R.M. and Nyhan W.L.: Clinical and metabolic abnormalities in a boy with dietary deficiency of biotin.
Pediatrics 1981; 68: 553-558
165. Thambyrajah J., Landray M.J., McGlynn F.J., Jones H.J., Wheeler D.C. and Townend J.N.: Does folic acid decrease plasma homocysteine and improve endothelial function in patients with predialysis renal failure?
Circulation 2000; 102: 871-875
166. Thompson G.N. and Chalmers R.A.: Increased urinary metabolite excretion during fasting in disorders of propionate metabolism. Pediatr Res 1990; 27: 413-416
167. Till U.: Homocystein als Metabolit und seine Wirkung auf Blut- und Gefäßwandzellen. Akt Ernähr Med 1996; 21: 246-248
168. Touam M., Zingraff J., Jungers P., Chadeaux-Vekemans B., Drüeke T. and Massy Z.A.: Effective correction of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients by intravenous folinic acid and pyridoxine therapy. Kidney Int 1999; 56: 2292-2296

169. Tsai J.C., Perrella M.A., Yoshizumi M., Hsieh C.M., Haber E., Schlegel R. and Lee M.E.: Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6369-6373
170. Ubbink J.B., Vermaak W.J.H., van der Merwe A., Becker P.J., Delport R. and Potgieter H.C.: Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans. *J Nutr* 1994; 124: 1927-1933
171. Ueland P.M., Mansoor M.A., Guttormsen A.B., Müller F.R., Aukrust P., Refsum H. and Svardal A.M.: Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocystein and other aminothiols in plasma comprise the redox thiol status – a possible element of the extracellular antioxidant defense system. *J Nutr* 1996; 126: 1281-1284
172. Ueland P.M.: Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem* 1995; 41: 340-342
173. Uhlig K., Levey A.S. and Sarnak M.J.: Traditional cardiac risk factors in individuals with chronic kidney disease. *Seminars in Dialysis* 2003; 16: 118-127
174. Upchurch G.R. Jr., Welch G.N., Fabian A.J., Freedman J.E., Johnson J.L., Keaney J.F. Jr. and Loscalzo J.: Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997; 272: 17012-17017
175. van den Berg M. and Boers G.H.J.: Homocystinuria: what about mild hyperhomocysteinemia. *Postgrad Med J* 1996; 72: 513-518
176. van den Berg M., Boers G.H. and Franken D.G.: Hyperhomocysteinemia and endothel dysfunction in young patients with peripheral arterial occlusive disease. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 176-181
177. van der Gaag M., Ubbink J.B., Sillanaukee P., Nikkari S. and Hendriks H.F.J. : Effect of consumption of red wine, spirits, and beer on serum homocysteine. *Lancet* 2000; 355: 1522
178. van der Mooren M.J., Wouters M.G.A.J., Blom H.J., Schellekens L.A., Eskes T.K.A.B. and Rolland R.: Hormone replacement therapy may reduce high serum homocysteine in postmenopausal women. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 733-736
179. van Dijk R.A.J.M., Rauwerda J.A., Steyn M., Twisk J.W.R. and Stehouver C.D.A.: Long-term homocysteine-lowering treatment with folic acid plus pyridoxine is associated with decreased blood pressure but not with improved brachial artery endothelium-dependent vasodilation or carotid artery stiffness – a 2-year, randomized, placebo-controlled trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 2072-2079

180. van Guldener C., Janssen M.J.F.M., Lambert J., ter Wee P.M., Jakobs C., Donker A.J.M. and Stehouwer C.D.A.: No change in impaired endothelial function after long-term folic acid therapy of hyperhomocysteinemia in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998a; 13: 106-112
181. van Guldener C., Donker J.M., Jakobs C., Teerlink T., de Meer K. and Stehouwer C.D.A.: No net renal extraction of homocysteine in fasting humans. *Kidney Int* 1998b; 54: 166-169
182. van Guldener C., Kulik W., Berger R., Dijkstra D.A., Jakobs C., Reijngoud D.J., Donker A.J.M., Stehouwer C.D.A. and de Meer K.: Homocysteine and methionine metabolism in ESRD: A stable isotope study. *Kidney Int* 1999; 56: 1064-1071
183. van Tellingen A., Grooteman M.P.C., Bartels P.C.M., van Limbeek J., van Guldener C., Ter Wee P.M. and Nubé M.J.: Long-term reduction of plasma homocysteine levels by super-flux dialysers in haemodialysis patients. *Kidney Int* 2001; 59: 342-347
184. Verhoef P., Stampfer M.J. and Rimm E.B.: Folate and coronary heart disease. *Corr Opin Lipidol* 1998; 9: 17-22
185. Völksch H., Lorenz B., Götzrath M., Fink H.S., Heller R., Herzberg V. und Till U.: Homocystein steigert die Funktion humaner polymorphkerniger Leukozyten. Vortrag und Abstr., 6.Atherosklerosesymposium Erfurt, 20./21.Juni 1997
186. von Eckardstein A. und Assmann G.: Homocystein und Atherogenese. *Der Internist* 1998; 39: 214-215
187. Wald N.J., Watt H.C., Law M.R., Weir D.G., Mc Partlin J. and Scott J.M.: Homocysteine and ischemic heart disease: results of a prospective study with implications regarding prevention. *Arch Int Med* 1998; 158: 862-867
188. Wall R.T., Harlan J.M., Harker L.A. and Striker G.E.: Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: A model for the study of vascular injury. *Thrombosis Research* 1980; 18: 113-121
189. Weiss N., Pietrzik K. und Keller C.: Atheroskleroserisikofaktor Hyperhomocyst(e)inämie: Ursachen und Konsequenzen. *Dtsch med Wschr* 1999; 124: 1107-1113
190. Welch G.N., Upchurch G.R. Jr. and Loscalzo J.: Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 811: 48-58

191. Welch G.N., Upchurch G.R., Farivar R.S., Pigazzi A., Vu K., Brecher P., Kaeney J.F. and Loscalzo J.: Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular smooth-muscle cells bei NF- κ B-dependent transcriptional activation of Nos2. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 22-31
192. Westphal S., Dierkes J. and Luley C.: Effects on fenofibrate and gemfibrozil on plasma homocysteine. *Lancet* 2001; 358: 39-40
193. Wilcken D.E.L. and Wilken B.: The pathogenesis of coronary artery disease: a possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976; 57: 1079-1082
194. Wilcken D.E.L., Reddy S.G. and Gupta V.J.: Homocysteinemia, ischemic heart disease, and the carrier state for homocystinuria. *Metabolism* 1983; 32: 363-370
195. Wilcken D.E.L., Wilcken B., Dudman N.P.B. and Tyrell P.A.: Homocystinuria - the effects of betaine in the treatment of patients not responsive to pyridoxine. *N Eng J Med* 1983; 309: 448-453
196. Wilson P.W.F., D'Agostino R.B., Levy D., Belanger A.M., Silberhartz H. and Kannel W.B.: Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; 97: 1837-1847
197. Wollesen F., Brattström L., Refsum H., Ueland P.M., Berglund L. and Berne C.: Plasma total homocysteine and cysteine in relation to glomerular filtration rate in diabetes mellitus. *Kidney Int* 1999; 55: 1028-1035
198. Wrono E.M., Hornberger J.M., Zehnder J.L., McCann L.M., Coplon N.S. and Fortmann S.P.: Randomized trial of folic acid for prevention of cardiovascular events in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 420-426
199. Xue J.L., St. Peter W.L., Ebben J.P., Everson S.E. and Collins A.J.: Anemia treatment in the pre-ESRD period and associated mortality in elderly patients. *Am J Kidney Dis* 2002; 40: 1153-1161
200. Yango A., Shemin D., Hsu N., Jacques P.F., Dworkin L., Selhub J. and Bostom A.G.: L-Folinic acid versus folic acid for the treatment of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2001; 59: 324-327

8 Dank

In besonderem Maße möchte ich mich bei Herrn *Prof. Dr. med. habil. G. Stein* für die Überlassung des Themas und die außerordentlich engagierte Unterstützung bei der Bearbeitung bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn *Dr. med. M. Busch* für die freundschaftliche Begleitung während der gesamten Erstellung der Arbeit. Seine Geduld und Hilfsbereitschaft, auch in hektischen Zeiten, trug wesentlich zum Gelingen bei.

Ebenso gilt mein Dank Herrn *Dr. rer. nat. A. Müller* und Frau *A. Schubert* für die Anleitung bei der Durchführung der Arbeit.

Meinem Studienfreund und Kollegen Herrn *Dr. med. Th. Scheibner* danke ich für seine Hilfe bei der Laborarbeit und Auswertung des Materials recht herzlich.

Außerdem möchte ich mich bei Frau *A. Brandstädt* für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung bedanken.

Nicht zuletzt soll auch den Schwestern der nephrologischen Ambulanz, des Kuratorium für Nierentransplantation und Dialyse e.V. sowie der Station 3 in der Klinik für Innere Medizin gedankt sein, welche mir bei der Datenerfassung zur Seite standen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Lebensgefährtin und Freundin *J. Taut* für die entgegengebrachte Geduld und Hilfsbereitschaft bedanken. Unzählige Gespräche mit ihr bildeten die Quelle zum Schöpfen neuen Mutes und halfen die Zweifel am erfolgreichen Abschluss der Promotion zu zerstreuen.

Ein großes Dankeschön gebührt auch meiner Familie, deren Erziehung und Fürsorge, jedoch auch Besorgnis, eine wertvolle Grundlage bildeten.

9 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. habil. G. Stein, Herr Dr. rer. nat. A. Müller, Herr Dr. med. M. Busch, Herr Dr. med. Th. Scheibner, Frau A. Brandstädt,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Gera, den 14.04.2004



Marco Wolf

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Wolf, Marco
Geburtsdatum: 11.01.1977
Geburtsort: Pößneck
Eltern: Holger Wolf, Elektroinstallateur
Petra Wolf, geb. Matthes; Invalidenrentnerin

Bildungsgang:

09/83 – 08/91 Polytechnische Oberschule „Karl Marx“ Neustadt an der Orla
09/91 – 08/95 Staatliches Gymnasium Neustadt an der Orla
21.06.1995 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife – Abitur
09/95 – 09/96 Freiwilliges Soziales Jahr in der Urologischen Klinik Gera
10/96 Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena (FSU)
22.09.1998 Ärztliche Vorprüfung an der FSU
21.09.1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der FSU
19.09.2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der FSU
10/01 – 09/02 Pflichtassistent im Praktischen Jahr:
1. Terial in der Klinik und Poliklinik für Urologie der FSU,
Direktor: Prof. Dr. med. habil. J. Schubert
2. Terial in Department für Innere Medizin (Abt. Nephrologie) des
Kantonsspital Aarau (CH),
Chefarzt: Priv.-Doz. Dr. med. habil. A. Bock
3. Terial in der Klinik für Chirurgie des Waldklinikum Gera,
Chefarzt: Priv.-Doz. Dr. med. habil. Th. Manger
07.11.2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der FSU
22.11.2002 Approbation für die Tätigkeit als Arzt im Praktikum
seit 01.01.2003 Arzt im Praktikum in der Klinik und Poliklinik für Urologie der FSU

Gera, den 14.04.2004


Marco Wolf

11 Anhang

11.1 Korrelationen von Homocystein und seinen Metaboliten untereinander

Spearman – Rho

n = 99	tHcy	CYSTA	MMA	2-MCA _{total}	2-MCA-II	2-MCA-I
CYSTA	r = 0,477** p < 0,001					
MMA	r = 0,478** p < 0,001	r = 0,598** p < 0,001				
2-MCA_{total}	r = 0,524** p < 0,001	r = 0,632** p < 0,001	r = 0,661** p < 0,001			
2-MCA-II	r = 0,478** p < 0,001	r = 0,620** p < 0,001	r = 0,615** p < 0,001	r = 0,964** p < 0,001		
2-MCA-I	r = 0,549** p < 0,001	r = 0,624** p < 0,001	r = 0,648** p < 0,001	r = 0,956** p < 0,001	r = 0,873** p < 0,001	
2-MCA-I/ 2-MCA-II	r = 0,268** p = 0,007	r = 0,169 p = 0,095	r = 0,271** p = 0,007	r = 0,173 p = 0,086	r = -0,032 p = 0,750	r = 0,401** p < 0,001

** Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (2-seitig)

11.2 Korrelationen von Homocystein mit Folsäure und Vitamin B₁₂

Spearman – Rho

n = 99	tHcy	CYSTA	MMA	2-MCA _{total}	2-MCA-II	2-MCA-I
Folsäure	r = -0,342** p = 0,001	r = -0,016 p = 0,874	r = -0,065 p = 0,523	r = 0,025 p = 0,804	r = 0,021 p = 0,833	r = 0,051 p = 0,617
Vitamin B₁₂	r = -0,240* p = 0,017	r = -0,062 p = 0,545	r = -0,235* p = 0,019	r = -0,094 p = 0,353	r = -0,125 p = 0,216	r = -0,067 p = 0,510

** Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (2-seitig)

* Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant (2-seitig)

11.3 Messergebnisse der CNI-Patienten

PN	tHcy µmol/l	CYSTA nmol/l	MMA nmol/l	2-MCA _{total} nmol/l	2-MCA I nmol/l	2-MCA II nmol/l	2-MCA-I/ 2-MCA-II	Geschlecht	Alter (Jahre)	Krea > 150 µmol/l (Monate)
1	37,7	962	965	945	474	471	0,89	m	50	54
2	20,2	1197	991	1179	565	614	0,91	m	66	6
3	13,4	551	204	528	218	310	1,22	w	60	79
4	31,3	3636	587	1144	619	526	0,82	w	55	44
5	16,4	1054	850	879	397	483	0,83	m	61	178
6	12	1717	277	673	293	380	0,9	w	33	35
7	26,9	633	303	744	350	394	2,2	m	45	85
8	19,1	1018	742	884	421	462	1,07	w	83	59
9	20	812	710	909	499	409	0,89	w	68	32
10	20,9	832	323	577	261	316	1,02	m	68	22
11	8,9	3289	253	236	106	129	0,8	m	54	53
12	26,4	2497	795	616	291	325	1,04	m	36	163
13	5,6	1357	344	365	251	114	0,97	m	63	79
14	28,4	1563	989	1053	544	509	1,18	w	65	35
15	18,8	435	459	536	252	284	0,75	m	69	48
16	13	1118	543	933	472	461	0,9	w	54	88
17	7,9	373	204	521	231	290	1,16	m	48	159
18	29,4	1691	883	922	471	451	1,11	m	75	26
19	30,5	992	481	1053	518	535	0,75	m	69	81
20	18,3	683	410	592	320	272	0,69	w	51	42
21	16,7	3608	734	729	313	416	0,72	w	79	48
22	25,4	5057	532	1028	487	541	0,79	m	60	33
23	22,4	4179	1429	2446	1316	1130	1,74	w	62	1
24	35,7	3717	655	2190	1152	1038	1,35	w	68	18
25	20,1	462	360	401	172	229	1,02	w	50	46
26	12,9	286	326	472	193	279	0,68	m	67	16
27	13,1	339	231	354	148	206	0,83	m	33	3
28	29,4	1690	528	1097	483	613	0,73	m	55	154
29	20,1	1061	510	700	445	255	0,76	m	69	1
30	34,3	1546	2367	761	437	324	0,9	m	68	4
31	13,6	587	252	606	306	300	0,85	m	64	120
32	34,7	962	586	922	374	548	0,66	w	62	25
33	13,1	442	268	720	326	395	0,93	m	50	5
34	29,4	1165	458	740	312	428	0,94	m	47	91
35	17	1553	621	1123	485	638	1,13	m	61	70
36	31,4	1060	472	1053	499	554	1,01	m	72	178
37	27,1	1080	709	904	417	488	0,94	w	77	1
38	12,9	475	213	317	126	191	0,89	w	55	9
39	21,2	1572	1354	2005	967	1038	0,83	w	75	57
40	21,9	455	698	615	298	318	0,81	m	37	12
41	24,3	667	496	456	242	215	0,75	m	35	50
42	28,6	2019	750	1524	764	760	1,03	m	51	33
43	19,8	871	454	582	283	299	0,9	w	73	3
44	15,2	761	1255	567	267	301	0,81	w	33	12
45	10,6	199	374	282	128	155	0,85	m	42	203
46	16,8	444	327	527	236	291	1,49	m	42	244
47	24,5	1664	580	994	427	567	0,84	w	56	19
48	27,9	676	259	825	419	405	0,89	m	54	18
49	17,3	630	396	437	207	230	0,7	m	53	10

PN	tHey µmol/l	CYSTA nmol/l	MMA nmol/l	2-MCA _{total} nmol/l	2-MCA I nmol/l	2-MCA II nmol/l	2-MCA-I/ 2-MCA-II	Geschlecht	Alter (Jahre)	Krea > 150 µmol/l (Monate)
50	18,9	447	319	563	251	312	1,09	m	55	58
51	24,2	1664	491	621	285	336	1,53	m	59	11
52	20,8	683	185	203	303	203	0,85	m	37	40
53	17,8	448	323	609	279	330	1,19	m	67	129
54	26,6	696	521	637	300	338	0,96	w	55	5
55	27,6	2509	487	1220	504	716	0,85	w	68	1
56	30,8	2925	473	549	321	296	1,95	w	76	77
57	31,1	805	1754	902	545	357	1,1	m	73	1
58	14,6	737	277	611	281	330	1,34	m	55	104
59	27,7	494	309	391	213	179	1,46	w	58	7
60	16,2	1118	363	828	405	423	1,15	m	61	61
61	18,7	2105	599	1043	479	564	1,15	w	69	46
62	18,3	616	287	911	602	309	0,76	m	64	96
63	13,6	1958	513	720	377	343	0,62	m	57	16
64	35,6	2548	541	628	360	268	0,8	w	78	5
65	20,1	985	914	1314	780	534	0,85	m	59	47
66	15,5	646	690	383	205	178	0,83	m	44	2
67	24,4	712	379	497	266	231	0,92	m	45	21
68	11,3	409	253	360	156	204	0,9	m	44	5
69	24,5	3045	713	474	182	292	0,79	w	52	1
70	18,8	1031	389	470	209	261	0,91	m	73	6
71	22,6	4321	506	1032	473	559	0,93	m	72	44
72	9,7	148	220	229	104	125	0,92	m	39	20
73	26,4	900	471	931	447	484	1,04	m	76	8
74	11,6	288	140	358	170	188	0,79	m	41	42
75	27,4	1852	652	900	397	503	1,18	w	82	31
76	16,5	520	308	294	140	153	0,77	m	59	24
77	29,4	1693	543	1305	627	678	0,68	m	52	18
78	22,3	1075	1276	751	359	392	1,12	m	50	76
79	18,6	2226	749	1562	798	764	0,94	w	66	1
80	39,9	2003	700	1216	536	680	1,2	w	74	137
81	27,6	1195	332	727	393	334	0,91	m	71	17
82	21	463	312	505	219	285	0,89	m	37	20
83	11,3	499	153	366	149	218	0,89	m	53	65
84	25,6	1460	764	493	260	233	0,84	m	67	78
85	67	1718	1043	956	464	492	1,45	w	74	1
86	19,7	700	335	363	198	165	0,84	m	69	1
87	24	1175	1055	1255	598	657	0,76	m	42	39
88	18,8	970	671	906	426	480	0,99	m	61	2
89	17,5	484	237	344	162	182	1,54	m	46	13
90	25,8	1648	639	1083	494	589	0,99	m	58	59
91	37,3	1363	285	820	485	334	0,78	m	63	1
92	27,6	1642	478	759	347	411	0,71	w	78	14
93	24,1	576	387	659	285	374	0,77	m	41	52
94	19,9	707	341	394	196	198	0,99	w	53	47
95	32,8	1317	706	873	530	343	1,54	m	46	274
96	19,8	1426	869	1286	641	645	0,99	m	43	48
97	21,4	728	421	574	252	322	0,78	w	61	74
98	28	783	433	634	264	370	0,71	w	40	1
99	15,6	1146	398	801	349	452	0,77	m	40	10