

Aus der Chirurgischen Klinik
Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin
Komm. Dir.: Prof. Dr. med. G. Pindur
Universitätsklinikum des Saarlandes

**Über den Einfluss der 677 C→T Methylentetrahydrofolatreduktase
(MTHFR) Mutation auf die Homocysteinkonzentration,
Thrombozytenmorphologie und Thrombozytenfunktion**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2005

vorgelegt von: Anita Ihle
geb. am: 04. Mai 1977 in Laupheim

1. Tag der Promotion: _____
2. Dekan: _____
3. Berichterstatter: _____

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	3
1. ZUSAMMENFASSUNG	4
Deutsch	4
Englisch	6
2. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	8
2.1. Der Homocysteinstoffwechsel	8
2.2. Hyperhomocysteinämie - Entstehung und Auswirkungen	10
2.3. Die thermolabile Variante der Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR)	13
2.4. Einfluss von Folsäure, Vitamin B6 und Vitamin B12 auf den Homocysteinspiegel	14
2.5. Thromboseentstehung und Fragestellung	14
3. PATIENTEN UND METHODIK	17
3.1. Patientenkollektiv	17
3.2. Methodik	18
4. ERGEBNISSE	20
4.1. Vergleichende Analyse normaler/abnormaler Homocysteinspiegel im Gesamtkollektiv sowie in den Kollektiven I (Mutationsträger mit thrombotischem Ereignis) und II (Mutationsträger ohne thrombotisches Ereignis)	20
4.1.1. Homocysteinspiegel im Gesamtkollektiv	20
4.1.2. Homocysteinspiegel bei Patienten mit stattgehabtem thrombembolischem Ereignis	20
4.1.3. Vergleich der Homocysteinwerte von Normalpersonen (Gruppe II) und Patienten (Gruppe I) mit nachgewiesenem MTHFR Defekt unter Berücksichtigung verschiedener Ereignistypen (Einmalereignis, Rezidivereignis, multiples Ereignis)	21

4.1.4. Homocysteinspiegel bei asymptomatischen Mutationsträgern und Patienten unterschiedlichen Manifestationslokalisationen	22
4.2. Einfluss des Schweregrades des MTHFR Defektes (Homozygotie/Heterozygotie) auf den Homocysteinspiegel und die Klinik der Patienten	23
4.2.1. Hyperhomocysteinämie und Allelstatus	23
4.2.2. Einfluss der Ausprägung des MTHFR Defektes (Homozygotie/Heterozygotie) auf Homocysteinspiegel und Manifestationslokalisation	25
4.3. Einfluss erhöhter Homocysteinspiegel auf Thrombozytenmorphologie und Thrombozytenfunktionsparameter	26
4.3.1. Auswirkung erhöhter Homocysteinspiegel auf die spontane Thrombozytenaggregation (PAT III)	26
4.3.2. Beeinflussung der Thrombozytenadhäsion T nach Hellem II [%] durch den Homocysteinspiegel	28
4.3.3. Auswirkung erhöhter Homocysteinspiegel auf das mittlere Plättchenvolumen (MPV)	29
4.4. Auswirkung von Alter, Geschlecht und Ernährungszustand auf die Höhe des Homocysteinspiegels im Serum	30
4.4.1. Homocysteinkonzentration in verschiedenen Altersgruppen und unter geschlechtsspezifischen Gesichtspunkten	30
4.4.2. Homocysteinspiegel, Vitamin B6 und Folsäure	33
5. DISKUSSION	35
6. LITERATURVERZEICHNIS	42
7. DANKSAGUNG	49
8. LEBENSLAUF	50

Abkürzungen

AT III	Antithrombin III
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar (base pair)
CBS	Cystathionin β Synthase
CYS	γ Cystathionase
FAD	Flavin- Adenin- Dinukleotid
HPLC	“high- performance liquid chromatography”
MPV	Mittleres Plättchenvolumen (mean platelet volume)
MS	Methioninsynthase
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase
PAT III	Platelet Aggregation Test III
PLP	Pyridoxalphosphat
SD	Standardabweichung (standard deviation)
THF	Tetrahydrofolat

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Thrombose ist ein multifaktorielles Geschehen. VIRCHOW (1865) beschrieb schon vor mehr als einem Jahrhundert in einer Trias Zustände, die das Entstehen einer Thrombose begünstigen können:

1. veränderte Blutzusammensetzung
2. Gefäßwandveränderungen
3. veränderte Blutströmung

Im Hinblick auf die „veränderte Blutzusammensetzung“ untersuchte ich ein Kollektiv von 65 Patienten mit thrombembolischem Ereignis (Gruppe I) und 35 klinisch asymptomatischen Individuen (Gruppe II). Bei allen Patienten und allen Kontrollpersonen war eine MTHFR Mutation (Defekt des Enzyms Methylentetrahydrofolatreduktase) entweder in homozygoter oder in heterozygoter Form nachgewiesen worden.

Ziel der Untersuchung war es, den Einfluss der MTHFR-Mutation auf die Homocysteinkonzentration, das Auftreten thrombembolischer Komplikationen und die Thrombozytenfunktion zu evaluieren.

Im untersuchten Kollektiv führten Erhöhungen der Homocysteinkonzentration zu keiner signifikanten Risikosteigerung für thrombotische Gefäßkomplikationen, weder im venösen noch im arteriellen Gefäßschenkel (SCHENK et al., 2003). Untersuchte Personen ohne thrombembolisches Ereignis (Gruppe II) wiesen im Mittel einen Homocysteinwert von 15,96 $\mu\text{mol/l}$ ($\pm 6,51$), während bei Patienten mit thrombembolischen Komplikationen (Gruppe I) der Homocysteinmittelwert bei 16,22 $\mu\text{mol/l}$ ($\pm 7,99$) lag. Bei einer isolierten Betrachtung der zahlenmäßig eher kleinen Gruppe der Patienten mit stattgehabtem arteriellem Gefäßereignis und nachgewiesener MTHFR-Mutation ($n=10$), zeigt sich im Vergleich mit Gruppe II eine Tendenz zu höheren Homocysteinwerten mit einem Mittelwert von 19,55 $\mu\text{mol/l}$ (Standardabweichung: 13,70). Das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht ($p>0,05$).

Auch zeigte eine vergleichende Analyse des Allelstatus (Homozygotie/Heterozygotie) des nachgewiesenen MTHFR- Defektes keinen Zusammenhang mit dem gemessenen Homocysteinwert ($\chi^2= 76,715$; $p= 0,392$) (AMES et al., 2003). Unter homozygoten Mutationsträgern zeigte sich ein Mittelwert der Homocysteinserumkonzentration von 16,93 $\mu\text{mol/l}$ ($\pm 7,34$), während heterozygote Mutationsträger im Mittel einen Serumspiegel an Homocystein von 15,77 $\mu\text{mol/l}$ ($\pm 7,36$) aufwiesen. Es konnte ebenfalls kein Zusammenhang

zwischen Allelstatus und Hyperhomocysteinämie hergestellt werden ($\chi^2=0,528$; $p= 0,467$): 53,3% aller homozygoten Mutationsträger wiesen einen Homocysteinspiegel im Serum innerhalb der Normwerte auf, 46,7 % litten unter Hyperhomocysteinämie. Unter den untersuchten Heterozygoten ließ sich bei 61,2% eine Normhomocysteinämie nachweisen, bei den restlichen 38,8% zeigten sich Werte oberhalb des Normwertes (AMES et al., 2003). In beiden Gruppen (I, II) zeigte weder der Nachweis einer MTHFR- Mutation noch erhöhte Homocysteinspiegel einen Einfluss auf die Thrombozytenfunktionsparameter (spontane Aggregation PAT III, Thrombozytenadhäsion ,T' nach Hellem II). Auch unterschied sich der Homocysteinspiegel bei Patienten mit Rezidivereignissen (Mittelwert 17,41 $\mu\text{mol/l} \pm 9,74$) nicht signifikant von Patienten mit Einmalereignis (Mittelwert 16,14 $\mu\text{mol/l} \pm 4,48$) oder der Gruppe der klinisch asymptomatischen Mutationsträgern (Mittelwert 15,9 $\mu\text{mol/l} \pm 6,51$) ($p>0,05$).

Zuletzt untersuchten wir den Einfluss von Alter, Geschlecht und Ernährung auf den Homocysteinspiegel. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Männer in allen Altersgruppen höhere Homocysteinwerte aufwiesen als Frauen. Ebenso stieg in Gruppe I mit höherem Alter auch der Homocysteinserumspiegel an. In Gruppe II zeigten männliche Personen unter 40 Jahren ($n=7$) deutlich höhere Homocysteinserumspiegel (Mittelwert: 21,57 $\mu\text{mol/l} \pm 8,54$) als Männer der selben Gruppe in den Altersklassen 40- 59 Jahre (Mittelwert: 17,82 $\mu\text{mol/l} \pm 9,60$) und > 59 Jahre (Mittelwert: 19,13 $\mu\text{mol/l} \pm 3,02$). Auch die untersuchten weiblichen Personen der Gruppe II unter 40 Jahren zeigten im Mittelwert einen geringfügig höheren Homocysteinserumspiegel (13,36 $\mu\text{mol/l} \pm 3,11$) als Frauen der Gruppe II zwischen 40 und 59 Jahren (13,0 $\mu\text{mol/l} \pm 3,56$).

Die Messung der Plasmaspiegel an Vitamin B6 und Folat sowohl bei Patienten der Gruppe I als auch bei klinisch Gesunden Kontrollpersonen (Gruppe II) zeigte, dass alle 5 Personen mit einem Folsäurespiegel unterhalb des Normwertes eine Hyperhomocysteinämie aufwiesen. 13 Personen der Gruppen I und II wiesen einen Vitamin B6 Spiegel unterhalb des Normwertes auf, lediglich 5 Personen (38,5%) hiervon litten unter Hyperhomocysteinämie.

1. SUMMARY

Thrombosis is a multifactorial event. More than one century ago, VIRCHOW (1865) described conditions in a triade, which could promote the development of thrombosis:

1. changes in blood composition
2. changes in vessel endothelium
3. changes in blood flooding

With regard to changed blood composition I have investigated 100 individuals, 65 patients with thrombotic events (group I) and 35 asymptomatic controls (group II). All patients and all healthy controls had a proved defect of the enzyme encoding for methylenetetrahydrofolate-reductase (MTHFR) either homozygous or heterozygous. The aim of this study was to find out the influence of the mutant defect of methylenetetrahydrofolate-reductase on homocysteine concentration and its influence on platelet function with regard to clinical events.

At the investigated 100 individuals an increased homocysteine level was not associated with a higher risk of thrombotic complications, neither in the venous nor in the arterial vessel system (SCHENK et al., 2003). In group II (healthy people) a homocysteine level of 15,96 $\mu\text{mol/l}$ (mean 15,96 \pm 6,51) was found, whereas in group I homocysteine levels of 16,22 $\mu\text{mol/l}$ (mean 16,22 \pm 7,99) were evaluated. On closer inspection of the small group of patients with arterial vascular disease (n=10), there seems to be a tendency of higher homocysteine levels ranging about 19,55 $\mu\text{mol/l}$ (\pm 13,70), the results were not significant ($p > 0,05$).

Furthermore the fact of being heterozygous or homozygous for MTHFR mutation did not correlate with the measured homocysteine level ($\chi^2 = 76,715$; $p = 0,392$) (AMES et al., 2003). Investigated individuals who were homozygous for the MTHFR mutation had a mean homocysteine level of 16,93 $\mu\text{mol/l}$ (\pm 7,34) whereas heterozygous persons showed a mean homocysteine level of 15,77 $\mu\text{mol/l}$ (\pm 7,36). After introducing a threshold for hyperhomocysteinemia set on 15,0 $\mu\text{mol/l}$ there was no connection found between the allele status and hyperhomocysteinemia ($\chi^2 = 0,528$; $p = 0,467$). 53,3% of all homozygous individuals had a homocysteine level under the threshold of 15 $\mu\text{mol/l}$, 46,7% suffered from hyperhomocysteinemia. Under the investigated heterozygous persons 61,2% showed

homocysteine levels under the threshold of 15 $\mu\text{mol/l}$, 38,8% showed homocysteine levels beyond the threshold (AMES et al., 2003).

In both groups neither the MTHFR variant nor abnormal homocysteine serum level was associated with increased platelet function (spontaneous aggregation [PAT III], adhesion T according to Hellem II). There was no significant difference comparing homocysteine levels in patients with single thrombotic events (mean 16,14 $\mu\text{mol/l} \pm 4,48$) or recurrent thrombosis (mean 17,41 $\mu\text{mol/l} \pm 9,74$) with healthy controls (mean 15,9 $\mu\text{mol/l} \pm 6,51$) ($p > 0,05$).

At last we investigated the influence of age, sex and nutritional status on homocysteine serum levels. We could show that men in all groups of age had higher homocysteine levels than women. In group I the homocysteine serum levels increased as well with higher age, whereas in group II men under the age of 40 ($n=7$) showed higher homocysteine levels (mean: 21,57 $\mu\text{mol/l} \pm 8,54$) than men of the same group at the age between 40 and 59 (mean: 17,82 $\mu\text{mol/l} \pm 9,60$) and older than 59 years (mean: 19,13 $\mu\text{mol/l} \pm 3,02$). In group II also women under the age of 40 showed slightly higher homocysteine serum levels (mean: 13,36 $\mu\text{mol/l} \pm 3,11$) than women older than 40 years (mean: 13,0 $\mu\text{mol/l} \pm 3,56$).

The investigation of vitamin B6 and folic acid plasma levels in group I as well as in group II showed that all 5 individuals with a folic acid plasma level under the threshold of 5 ng/ml suffered from hyperhomocysteinemia. 13 individuals of group I and II had vitamin B6 plasma levels under the threshold 2,6 ng/ml, only 5 persons (38,5%) of these showed homocysteine serum levels over 15 $\mu\text{mol/l}$.

2. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

2.1. Der Homocysteinstoffwechsel

Homocystein ist eine intermediäre Aminosäure, die im Rahmen des Methioninabbaus entsteht. Methionin gehört zu den essentiellen Aminosäuren.

Im Plasma liegt das Gesamt-Homocystein entweder in freier, reduzierter, oder in gebundener, oxidierter, Form vor. 70- 80% der Aminosäure ist über eine Disulfidbrücke an Proteine, vornehmlich Albumin, gebunden. Der Rest liegt entweder als Homocystin- Dimer oder als Homocystein-Cystein Disulfid vor. Weniger als 1% befindet sich im reduzierten Zustand, das heißt in freier Form.

Der intrazelluläre Metabolismus von Homocystein (Fig. 1) verläuft entweder über Remethylierung zu Methionin oder über Transsulfurierung zu Cystein.

Für die Remethylierung stehen 5-Methyltetrahydrofolat oder Betain als Methylgruppendonatoren zur Verfügung. Die Reaktion mit 5-Methyltetrahydrofolat als Reaktionspartner des Homocysteins kommt in allen Geweben vor und ist Vitamin B 12 abhängig (Vitamin B 12 als Cofaktor des Enzyms Methioninsynthase), während die Reaktion von Homocystein mit Betain hauptsächlich in der Leber stattfindet und vom Vorhandensein des Vitamins B 12 unabhängig ist. Unter Abgabe einer Methylgruppe entsteht aus 5-Methyltetrahydrofolat Tetrahydrofolat. Dieses reagiert in einer Pyridoxal-5-Phosphat abhängigen Reaktion zu dem Zwischenprodukt Methylentetrahydrofolat. Das Enzym Methylentetrahydrofolatreduktase katalysiert nun die Reaktion von Methylentetrahydrofolat zu Methyltetrahydrofolat, welches wieder mit Homocystein zu Methionin reagieren kann. Das entstandene Methionin steht dann der Aktivierung durch Adenosyltriphosphat (ATP) zu S-Adenosylmethionin zur Verfügung, welches als universeller Methylgruppendonator, zum Beispiel bei der Methylierung von Hormonen, Phospholipiden, Neurotransmittern und Nukleinsäuren dient. Das bei diesen Reaktionen entstehende S-Adenosylhomocystein wird hydrolysiert, wodurch wieder Homocystein entsteht.

In der zweiten zur Verfügung stehenden Reaktion, der Transsulfurierung, kondensiert Homocystein mit Serin in einer irreversiblen Reaktion zu Cystathionin. Diese Reaktion wird durch das Pyridoxal-5-Phosphat- haltige Enzym Cystathionin- β -Synthase katalysiert. Durch die ebenfalls Pyridoxal-5-Phosphat- haltige γ -Cystathionase wird Cystathionin zu α -Ketobutyrat und Cystein hydrolysiert. Überschüssiges Cystein wird zu Taurin und anorganischem Schwefel oxidiert oder mit dem Urin ausgeschieden.

Die Transsulfurierung katabolisiert also überschüssiges Homocystein, welches nicht zum Methylgruppentransfer benötigt wird, und stellt neben Cystein auch Schwefel für die Synthese verschiedener Stoffe, zum Beispiel Heparin, bereit.

Homocystein ist hochtoxisch. Remethylierung und Transsulfurierung reichen nicht aus, um die intrazelluläre Homocysteinkonzentration im nichttoxischen Bereich zu halten. Ein Teil der Aminosäure wird deshalb in unveränderter Form aus der Zelle exportiert und über die Nieren ausgeschieden.

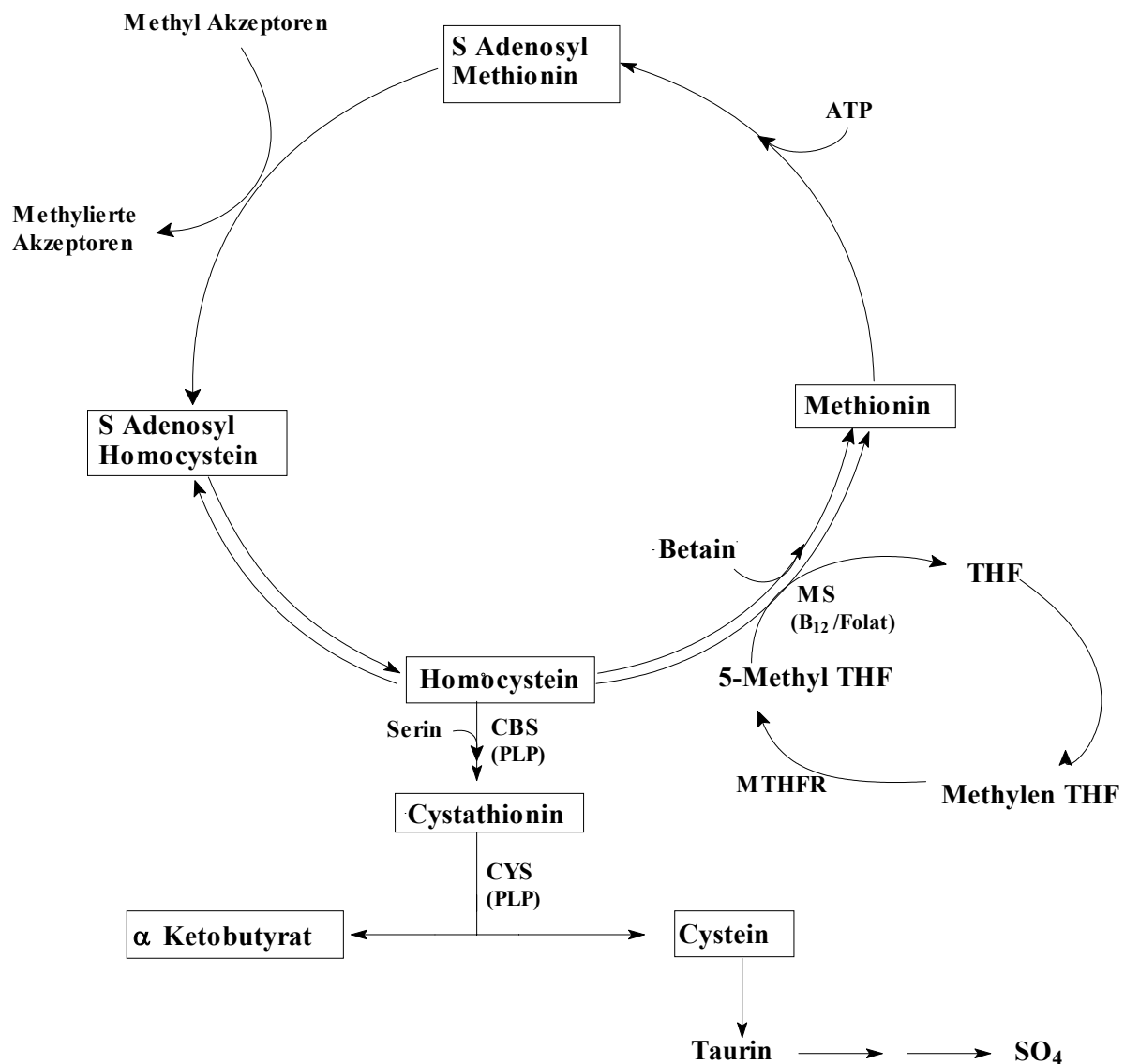


Fig. 1: Homocysteinemetabolismus

MTHFR = Methylen-tetrahydrofolatreduktase	THF = Tetrahydrofolat
MS = Methioninsynthase	PLP = Pyridoxalphosphat
CBS = Cystathionin β Synthase	SO ₄ = anorganischer Schwefel
CYS = γ Cystathionase	B ₁₂ = Vitamin B ₁₂

2.2. Hyperhomocysteinämie - Entstehung und Auswirkungen

Die Hyperhomocysteinämie wird heutzutage als Risikofaktor für thrombembolische Erkrankungen diskutiert (BOUSHEY et al, 1995; GRAHAM et al, 1997).

Die wichtigsten Faktoren, die den Homocysteinspiegel beeinflussen, sind vererbte Enzymdefekte und die Ernährung.

Genetisch bedingte Störungen der Transsulfurierung können bei Mutationen des Chromosoms 21q22 (Cystathionin- β -Synthase) zum Krankheitsbild der Homocystinurie führen. Die Folgen dieser eher seltenen, autosomal rezessiv vererbten Erkrankung in homozygoter Form sind deutlich erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Serum ($>100 \mu\text{mol/l}$) und Urin, weshalb Patienten bereits in jungen Jahren an Thrombosen, Linsenektopie, Skelettdeformierungen, geistiger Retardierung und Atherosklerose leiden. Heterozygote Träger dieses Gendefekts sind phänotypisch unauffällig und finden sich in der europäischen Bevölkerung mit einer Häufigkeit von etwa 1:70. Ihre Serumhomocysteinspiegel sind gering bis mäßiggradig erhöht und erreichen das 2- bis 3 fache der Norm.

Erhöhte Homocysteinspiegel sind nicht zwangsläufig Ausdruck hereditärer Enzymdefekte, sondern können auch Folge eines Mangels an Kofaktoren der Enzyme des Methionin-Homocystein Stoffwechsels sein. So findet sich regelmäßig bei Patienten mit perniziöser Anämie und Vitamin B12- oder Folsäuredefizienz eine milde Hyperhomocysteinämie (STABLER, 1988). Ebenso kamen LINDENBAUM (1988) und BRATTSTRÖM (1988) in ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass ein Mangel an Vitamin B12 den Plasmahomocysteinspiegel erhöht. Auch sind mittels gesunder Ernährung (Obst, Gemüse, Getreideprodukte) Blutspiegelsenkungen möglich.

Bei hohem nutritiven Anfall von Methionin ist ein erhöhter Homocysteinspiegel in erster Linie Folge einer Aktivierung der Cystathionin- β -Synthase, welche durch hohe Methioninspiegel stimuliert wird. Niedrige Plasmaspiegel hingegen aktivieren die Methioninsynthese.

So reflektiert der Nüchternhomocysteinspiegel vor allem die Aktivität der Methioninsynthese, der Methionin Belastungstest vor allem die der Cystathionin- β -Synthase. Es existieren jedoch noch eine Vielzahl weiterer Umstände, welche den Homocysteinspiegel beeinflussen, beziehungsweise erhöhte Homocysteinkonzentrationen bedingen können (Tab. 1).

GENETIK

- Mangel oder verminderte Aktivität der Cystathionin- β -Synthase
- Mangel oder verminderte Aktivität der Methioninsynthase
- Mangel oder verminderte Aktivität der Methylentetrahydrofolatreduktase

ERNÄHRUNG

- Mangel an Vitamin B 6
- Mangel an Vitamin B 12
- Mangel an Folsäure

WEITERE UMSTÄNDE

- Alter (der Homocysteinspiegel steigt mit dem Alter)
Geschlecht (Männer haben einen höheren Homocysteinspiegel als gleichaltrige Frauen)
- Gesundheitszustand (schwere Psoriasis, Krebserkrankungen und chronisches Nierenversagen sind mit erhöhten Homocysteinspiegeln verbunden)
- Medikamenteneinnahme (z.B. erhöhen Methotrexat den Homocysteinspiegel; Penicillamine z.B. senken ihn)

Tab. 1: Faktoren, die den Homocysteinspiegel beeinflussen

Der Normalbereich des Nüchtern-Homocysteinspiegels liegt bei 5-15 $\mu\text{mol/l}$ (DE STEFANO, 1996). Als Hyperhomocysteinämie wird ein Wert über der 90-sten bis 95-ten Perzentile der Verteilung des Gesamt-Homocysteins gesunder Personen angesehen. So spricht man bei Werten zwischen 15 und 30 $\mu\text{mol/l}$ von einer milden, bei Werten zwischen 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ von einer intermediären und bei Werten über 100 $\mu\text{mol/l}$ von einer schweren Hyperhomocysteinämie.

WILCKEN UND WILCKEN (1976) vermuteten als erste einen Zusammenhang zwischen leicht erhöhten Homocysteinspiegeln und Erkrankungen der Koronararterien. Es folgten zahlreiche Studien von BRATTSTRÖM et al., 1984; BOERS et al., 1985; UELAND et al., 1992; MAYER et al., 1996; ALFTHAN et al., 1997, die allesamt eine Hyperhomocysteinämie als unabhängigen Risikofaktor für arterielle Gefäßverschlüsse und insbesondere für Schlaganfälle untersuchten und erkannten.

Studien über den Zusammenhang zwischen Hyperhomocysteinämie und venösen thrombembolischen Ereignissen sind weniger zahlreich und auch widersprüchlich.

Während BRATTSTRÖM et al., 1991, und AMUNDSEN et al., 1991, keine Korrelation zwischen erhöhtem Homocysteinspiegel und thrombotischem Ereignis im venösen Gefäßschenkel feststellen konnten, berichteten andere Untersucher von positiven Verknüpfungen: BIENVENUE et al., 1993, FALCON et al., 1994, und auch FERMO et al., 1995, konnten unter Patienten mit stattgehabtem arteriellem oder venösem thrombembolischem Ereignis in bis zu 30% der Fälle erhöhte Plasmahomocysteinwerte feststellen.

Mitte der neunziger Jahre untersuchten DEN HEIJER et al., 1995, 185 Patienten mit rezidivierenden venösen Thrombosen und fanden bei 25% Homocysteinkonzentrationen, die über der 90-sten Perzentile der Verteilung der Homocysteinspiegel in der Kontrollgruppe lagen. Ein Jahr später stellten SIMIONI et al., 1996, in einer Fall-Kontrollstudie mit 208 Teilnehmern bei 15 von 60 Patienten mit venöser Thrombose (25%) und bei 17 von 148 klinisch unauffälligen Normalpersonen (11,5%) eine Hyperhomocysteinämie fest. Die odds ratio, als Maß für das relative Risiko bei Hyperhomocysteinämie eine tiefe Venenthrombose zu entwickeln, wurde mit 2,6 berechnet.

Diese Daten legen die Hypothese nahe, dass eine Hyperhomocysteinämie nicht nur ein Risikofaktor für arterielle, sondern auch für venöse thrombembolische Ereignisse sein kann.

Der genaue Mechanismus, über den Homocystein zu einer erhöhten Thrombosebereitschaft führt, ist bislang weitestgehend unklar. In-vitro Versuche haben gezeigt, dass Homocystein in hohen Spiegel über eine Endothelzellschädigung mit konsekutiver Endotheldysfunktion und einer Thrombozytenaktivierung zur Thrombenentstehung beitragen kann. Mögliche Auswirkungen der Hyperhomocysteinämie zeigt Tabelle 2 (WUILLEMIN, 1999).

In wieweit diese in- vitro Daten jedoch auf in- vivo Verhältnisse übertragbar sind, muss jedoch offen bleiben.

FÖRDERUNG PROTHROMBOTISCHER EINFLÜSSE

- Aktivierung von Faktor V
- Stimulierung der Gewebefaktor- Expression
- Stimulierung der Proliferation glatter Muskelzellen

HEMMUNG ANTITHROMBOTISCHER EINFLÜSSE

- Hemmung der Protein- C- Aktivierung
- Hemmung der Gewebefibrinogen- Aktivator- Bindung
- Hemmung der Heparansulfat- Expression in den Gefäßen
- Hemmung der NO- Bildung

Tab 2 Hyperhomocysteinämie und potentiell prothrombotische Auswirkungen

2.3. Die thermolabile Variante der Methylenetetrahydrofolatreduktase (MTHFR)

Anfang der neunziger Jahre beschrieben KANG et al., 1991, eine thermolabile Variante der MTHFR, deren Häufigkeit im homozygoten Status mit $\approx 5\%$ der Normalbevölkerung angegeben wurde, aber zwischen den verschiedenen Rassen und ethnischen Gruppen schwankt. Bei 212 Patienten mit Erkrankungen der Koronararterien und bei 202 Kontrollpersonen ohne klinischen Anhalt für das Vorliegen einer Atherosklerose wurde die Hitzestabilität von Lymphozyten- MTHFR bestimmt. Dabei wurden Lymphozyten-Zellextrakte für 5 Minuten bei 46°C inkubiert. Bei Enzymaktivitäten unter 20% nach Hitzeinaktivierung wurde von der thermolabilen Variante gesprochen. 36 Patienten mit Herzbeschwerden (17%) und 10 Kontrollpersonen (5%) wurden als Träger der thermolabilen Variante der MTHFR ermittelt. Die mittlere Homocysteinkonzentration bei Personen mit mutiertem MTHFR Gen ($13,19 \mu\text{mol/l} \pm 5,32$) lag signifikant höher als die bei Personen ohne MTHFR- Mutation ($8,5 \mu\text{mol/l} \pm 2,8$; $p < 0,05$).

1995 beschrieben sowohl FROSST et al., 1995, als auch ENGBERSEN et al., 1995, eine thermolabile Variante der MTHFR, deren spezifische Aktivität im homozygoten Zustand auf 50% des Normalwertes reduziert ist und zu leicht erhöhten Homocysteinwerten führt. FROSST et al., 1995, zeigten in ihrer Untersuchung weiter, dass es sich bei der zugrundeliegenden Mutation um einen Austausch der Basen Cytosin gegen Thymin auf dem

Chromosom 1p36,3 handelt (bp 677 C → T), der darin resultiert, dass das betroffene Codon GCC in GTC geändert wird und demzufolge in der Aminosäuresequenz des Enzyms die Aminosäure Alanin, welche durch das Codon GCC codiert wird, nun durch Valin, dem das Codon GTC zugrunde liegt, ersetzt wird.

MATHEWS et al., 1998, schlossen aus Studien mit analogen MTHFR Mutanten aus Bakterien, dass die Aktivitätsminderung aufgrund des Verlustes eines FAD Coenzym resultiert.

2.4. Einfluss von Folsäure, Vitamin B 6 und Vitamin B 12 auf den Homocysteinspiegel

Folsäure, Vitamin B 6 und Vitamin B 12 spielen eine bedeutende Rolle im Homocysteinestoffwechsel, da sie entweder als Koenzym oder als Kosubstrat für die am Stoffwechsel beteiligten Enzyme fungieren.

Wie an anderer Stelle bereits beschrieben, ist die Remethylierung von Homocystein zu Methionin durch die Methionin-Synthase Folat und Vitamin B 12 abhängig, während die Transsulfurierung an das Vorhandensein von Vitamin B 6 gebunden ist. Niedrige Plasmaspiegel der einzelnen Vitamine allein können den Homocysteinserumspiegel ansteigen lassen, während eine Supplementierung der Vitamine erhöhte Homocysteinserumspiegel senken kann (UBBINK et al, 1993).

2.5 Thromboseentstehung und Fragestellung

Morphologisch werden zwei Arten von Thromben unterschieden:

- Abscheidungsthrombus (weißer Thrombus)

Hierbei kommt es zur Anheftung von Plättchen und Bildung von Aggregaten an der verletzten Gefäßwand. Abscheidungsthromben kommen hauptsächlich im arteriellen Gefäßschenkel vor. Die zur Ausbildung eines ‚Abscheidungsthrombus‘ notwendige hohe Anzahl von Thrombozyten wird in Arterien aufgrund der Schergeschwindigkeit (= Quotient aus Strömungsgeschwindigkeit und Gefäßdurchmesser) an die verletzte Gefäßwand gedrängt.

- Gerinnungsthrombus (roter Thrombus)

Bei den meisten venösen Thromben handelt es sich um Gerinnungsthromben. Der Aufbau des ‚Gerinnungsthrombus‘ ähnelt dem einer stehenden Blutsäule: zwischen den entstandenen Fibrinfäden sind überwiegend Erythrozyten eingeschlossen, was dem Thrombus die charakteristische Farbe verleiht.

Ätiologisch wird zwischen genetischen beziehungsweise erworbenen Ursachen einer Thrombose unterschieden.

Als Hyperkoagulabilität wird das erhöhte Potential eine Thrombose zu entwickeln bezeichnet. Dabei ist das Gleichgewicht der Hämostase zugunsten der prokoagulatorischen Seite verschoben:

- durch Aktivierung prokoagulatorischen Mechanismen
- oder durch Hemmung antikoagulatorischer Aktivität

Unter dem Begriff „hereditäre Thrombophilie“ versteht man den Zustand der erhöhten Thrombosebereitschaft aufgrund genetischer Veränderungen. Hierzu zählen unter anderem der AT III Mangel, Protein C und Protein S Mangel, die APC Resistenz (Faktor V Mutation Leiden), die Prothrombinmutation sowie die MTHFR Mutation. Die Prävalenz thrombophiler Risikoindikatoren in der Normalbevölkerung wird in der Literatur wie folgt angegeben (s. Tab. 3)

Referenz (n Patienten)	AT %	PC %	PS %	F V Leiden %	F II G20210A %	MTHFR (CC) %
Miletich et al. (5, 420)		0,4				
Poort et al. (474)					2,3	
Ridker et al. (704)				6		
Rosendaal et al. (474)				3		
Svensson und Dahlbäck (130)				7		
Tait et al. (9, 670)	0,02		0,2			
Arruda et al. (296)						4
Kang et al. (202)						5

Tab 3: Prävalenz thrombophiler Risikoindikatoren in der Normalbevölkerung

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass eine mäßige Erhöhung des Homocysteinserumspiegels einen unabhängigen Risikofaktor für atherothrombotische Gefäßerkrankungen darstellt (FALCON et al., 1994; FERMO et al., 1995; MAYER et al., 1996; ALFTHAN et al., 1997). Dabei scheint das Homocystein die Thrombogenese mittels verschiedener Mechanismen zu fördern. Details sind jedoch ungeklärt. Insbesondere bleibt offen, was sich ursächlich als hauptverantwortlicher thrombogener Effekt einer Hyperhomocysteinämie erweist.

Ziel dieser Arbeit sollte sein, einen Beitrag zur Bedeutung der 677 C->T Mutation des MTHFR- Gens im Rahmen der Thrombophilie zu liefern. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob in einem Kollektiv von 100 Personen eine Korrelation zwischen dem nachgewiesener MTHF Defekt und einer Erhöhung des Homocysteinserumspiegels besteht. Des weiteren wurde nach Aufteilung des Kollektives in Patienten mit thrombembolischem Ereignis (Gruppe I) und asymptomatischen Personen (Gruppe II) untersucht, ob sich die Höhe des Homocysteinserumspiegels in den beiden Gruppen signifikant unterschied. Ebenfalls sollte geklärt werden, ob die Schwere der Ausprägung des MTHFR Defektes (Homozygotie/Heterozygotie) Auswirkungen auf die Höhe der Homocysteinserumkonzentration zeigt. Auch der Einfluss der MTHFR Mutation beziehungsweise der Homocysteinserumkonzentration auf Thrombozytenfunktion und Thrombozytenmorphologie sollte analysiert werden. Ebenso wurde versucht, den Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Höhe des Homocysteinserumspiegels darzustellen.

3. PATIENTEN UND METHODIK

3.1. Patientenkollektiv

Wir untersuchten 100 Personen mit nachgewiesener MTHFR Mutation (weiblich vs männlich: 54:46; mittleres Alter 42,8 Jahre \pm 16,02 Jahre), die sich in der hämostaseologischen Ambulanz des Universitätsklinikums des Saarlandes vorstellten. Bei 30 Personen fand sich eine homozygote Variante des MTHFR Defektes, während die restlichen 70 Personen die Mutation in heterozygoter Form aufwiesen.

Wir teilten die 100 untersuchten Personen in zwei Gruppen ein:

Gruppe I (n= 65; mittleres Alter 44,8 Jahre \pm 15,9 Jahre; w:m= 35:30) Patienten mit stattgehabtem thrombembolischen Ereignis und Gruppe II (n= 35; mittleres Alter 39,1 Jahre \pm 15,8 Jahre; w:m= 19:16) asymptomatische Personen. Wir untersuchten die beiden Kollektive bezüglich des Einfluss' des nachgewiesenen MTHFR Defektes auf die Thrombozytenfunktion (spontane Aggregationstendenz [PAT III] und Retention T nach Hellem II), die Thrombozytenmorphologie (MPV) und den Homocysteinspiegel unter Berücksichtigung des dem Defekt zugrundeliegenden Schweregrades (Homozygotie/ Heterozygotie).

Zusätzlich zum Homocysteinspiegel wurden die Plasmaspiegel von Vitamin B 6 und Folsäure ermittelt. Dabei wurde gruppenspezifisch der Einfluss der beiden Faktoren auf die Homocysteinkonzentration analysiert.

Gruppe I wurde unterteilt in Patienten mit ausschließlich venösem Gefäßereignis (n=50), Patienten mit ausschließlich arteriellem Gefäßereignis (n=12) und Patienten mit sowohl venösem als auch arteriellem Gefäßereignis (n=3). Des weiteren unterschieden wir Patienten mit einem Ereignis (Einmalereignis= ein Ereignis im venösen oder arteriellen Gefäßschenkel (n=31; venöses Ereignis: 21; homozygot vs heterozygot: 6:15; arterielles Ereignis: 10; homozygot vs heterozygot 2:8), Patienten mit rezidivierenden Ereignissen (Rezidivereignis = zwei oder mehrere Ereignisse in demselben Gefäßsystem (n=31; venöses Ereignis: 29; homozygot vs heterozygot: 9:20; arterielles Ereignis: 2; homozygot vs heterozygot 0:2) und schließlich Patienten mit multiplen Ereignissen (multiple Ereignisse = Mehrfachereignisse in unterschiedlichen Gefäßsystemen (n=3 homozygot vs heterozygot: 1:2)). Ziel einer solchen

differenzierten Betrachtung war die Frage, ob sich Patienten der verschiedenen Gruppen signifikant bezüglich des Schweregrades der Mutation (homozygot/heterozygot) oder des Plasmaspiegels an Homocystein unterscheiden.

Des Weiteren nahmen wir eine geschlechtsspezifische Unterteilung der Gruppen I und II vor und nach weiterer Unterteilung in drei Altersklassen analysierten wir diese Kollektive bezüglich des Homocysteinspiegels.

3.2. Methodik

Der Homocystein- Normwert wurde mit $<15\mu\text{mol/l}$ definiert. Die Bestimmung erfolgte mittels HPLC.

Der Nachweis des Vorliegens einer MTHFR- Mutation erfolgte mit Hilfe von Spezialfilter-Testkarten, auf die ein Blutstropfen aufgetragen wurde. Die DNA Analyse des getrockneten Blutstropfen erfolgte aus ausgestanzten Filterpapierscheiben (Durchmesser 3 mm) (SCHRÖDER et al., 1996)

Bestimmungsmethoden der Vitamin- und Folsäurekonzentrationen:

Die Bestimmungen der Vitaminkonzentrationen erfolgten mittels kompetitiver Radioliganden Assays: endogenes Vitamin wird von den Bindungsproteinen des Serums extrahiert und dann mit einer definierten Menge von Isotopen- markierten Vitamin und Vitamin bindendem Protein versetzt. Anschließend werden die freie und gebundene Vitamin Fraktion voneinander getrennt. Die Radioaktivität in der freien Fraktion ist umgekehrt proportional der Vitaminkonzentration in der Probe.

Bei der Folsäurebestimmung wurde der Liganden Assay angewandt. Hierbei wird der Probe eine denaturierende Substanz zugesetzt, die zur Entfernung des proteingebundenen Folats von seiner Bindungsstelle führt. Das jetzt frei vorliegende Folat konkurriert dann mit einer markierten Folsäure um ein in definierter Menge zugegebenes Bindungsprotein. Nach Entfernung des zugegebenen Bindungsproteins wird die Menge des ungebundenen, markierten Folats gemessen. Diese verhält sich invers zur Folatkonzentration der Probe.

Thrombozytenfunktionsparameter:

Spontane Thrombozytenaggregation [PAT III] (Normalwert: Winkel α 0°-9°)

Im PAT III wird die Plättchenaggregation ohne Zusatz eines Auslösers photometrisch ermittelt und als Kurve mittels angeschlossenen Schreiber erfasst.

Plättchenreiches Plasma wird bei 37° C in einer Küvette rotiert. Die Aggregation wird photometrisch erfasst und mittels angeschlossenen Schreiber registriert. In der Auswertung der entstandenen Kurve beschreibt der Winkel α die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten (BREDDIN et al., 1975)

Thrombozytenadhäsion T nach Hellem II (Normalwert: Retention 3% -38%)

Antikoaguliertes Vollblut (EDTA Blut) wird mit einer Pumpe durch eine Glasperlensäule gedrückt und der Plättchenverlust in Prozent durch Bestimmung der Plättchenzahl vor und nach der Passage ermittelt. Bei der Säule handelt es sich um einen mit Glasperlen genormten Durchmessers gefüllten Plastikschauch. Der genormte Durchmesser der Glasperlen führt zu einer definierten Oberfläche. Es wird unter den Bedingungen einer schnellen Blutströmung gemessen.

Mean Platelet Volume (MPV; Normalbereich: 8-13 fl)

Blutbild- und Differentialblutwerte wurden mit einem Sysmex Counter (Sysmex™ K- 1000) analysiert. Die Bestimmung des MPV erfolgte nach der Partikel Verteilungsanalyse.

Deskriptiv wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und die Varianz ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des χ^2 Tests und der Korrelation nach Pearson.

4. ERGEBNISSE

4.1 Vergleichende Analyse normaler/abnormer Homocysteinspiegel im Gesamtkollektiv sowie in den Kollektiven I (Mutationsträger mit thrombotischem Ereignis) und II (Mutationsträger ohne thrombotisches Ereignis)

4.1.1 Homocysteinspiegel im Gesamtkollektiv

Im Gesamtkollektiv (Gruppe I und Gruppe II) lag der Mittelwert der bestimmten Homocysteinkonzentration bei 16,13 $\mu\text{mol/l}$, also nur geringfügig über dem Grenzwert von 15 $\mu\text{mol/l}$. Der niedrigst gemessene Homocysteinwert lag bei 6 $\mu\text{mol/l}$, der höchst gemessene bei 41,8 $\mu\text{mol/l}$. Als Median ergab sich ein Wert von 14 $\mu\text{mol/l}$, die Standardabweichung lag bei 7,49, die Varianz bei 56,1.

In dem Kollektiv von 100 Personen mit nachgewiesener MTHFR- Mutation fand sich bei 40 Untersuchten (41,2%) eine Hyperhomocysteinämie (Mittelwert: 22,80 $\mu\text{mol/l}$; \pm 7,29) wohingegen bei 57 Personen (58,8%) eine MTHFR- Mutation nicht mit erhöhten Homocysteinsersumspiegeln einherging (Mittelwert: 11,45 $\mu\text{mol/l}$; \pm 2,27). Bei 3 untersuchten Personen musste aufgrund fraglich inadäquater Probenaufbereitung (Lagerung/Transport) vom Vorliegen nicht valider Ergebnisse ausgegangen werden. Diese wurden in die statistische Auswertung nicht miteinbezogen.

4.1.2 Homocysteinspiegel bei Patienten mit stattgehabtem thrombembolischem Ereignis

In der Gruppe der Patienten mit thrombembolischem Ereignis (Gruppe I; n = 65; mittleres Alter: 44,8 \pm 15,9 Jahre; Frauen: Männer = 35:30) lag bei 27 Patienten (42,2%) eine Hyperhomocysteinämie mit Werten über 15 $\mu\text{mol/l}$ vor (Mittelwert: 23,32 $\mu\text{mol/l}$; \pm 7,52). 37 Patienten der Gruppe I (57,8%) zeigten keine erhöhten Homocysteinwerte (Mittelwert: 11,05 $\mu\text{mol/l}$; \pm 2,42).

Die klinischen Manifestationen in der Gruppe der Patienten mit thrombembolischem Ereignis (Gruppe I) verteilten sich wie folgt: Phlebothrombosen n= 53, Lungenembolien n= 19, Hirninfarkte n= 10 und Myokardinfarkte n= 4. Seltene Organvenenthrombosen (n= 11) wie Sinusvenenthrombosen, Zentralarterienthrombose, Zentralvenenthrombose und Mesenterialvenenthrombosen blieben in den weiteren Untersuchungen unberücksichtigt.

4.1.3 Vergleich der Homocysteinwerte von Normalpersonen (Gruppe II) und Patienten (Gruppe I) mit nachgewiesenem MTHFR Defekt unter Berücksichtigung verschiedener Ereignistypen (Einmalereignis, Rezidivereignis, multiples Ereignis)

Wir untersuchten Homocysteinserumkonzentrationen in den beschriebenen Gruppen (kein Ereignis, Einmalereignis, Rezidivereignis und multiples Ereignis) mit der Zielsetzung den Homocysteinserumspiegel mit Art, Umfang, Lokalisation und Schweregrad eines thrombembolischen Ereignisses zu korrelieren.

Die mittlere HomocysteinKonzentration der asymptomatischen Mutationsträger (Gruppe II) lag bei 15,96 $\mu\text{mol/l}$ ($\pm 6,51$) und somit geringfügig höher als die von Patienten mit Rezidivereignis (Mittelwert: 15,11 $\mu\text{mol/l}$; $\pm 6,04$). Sowohl Patienten mit multiplem Ereignis (Mittelwert: 17,41 $\mu\text{mol/l}$; $\pm 9,74$) als auch Patienten mit einem einmaligem Ereignis (Mittelwert: 16,14 $\pm 4,48$) zeigten höhere HomocysteinKonzentrationen im Serum. Der Mittelwert der HomocysteinKonzentration aller Patienten aus Gruppe I lag bei 16,22 $\mu\text{mol/l}$ ($\pm 7,99$)(Abb. 1)

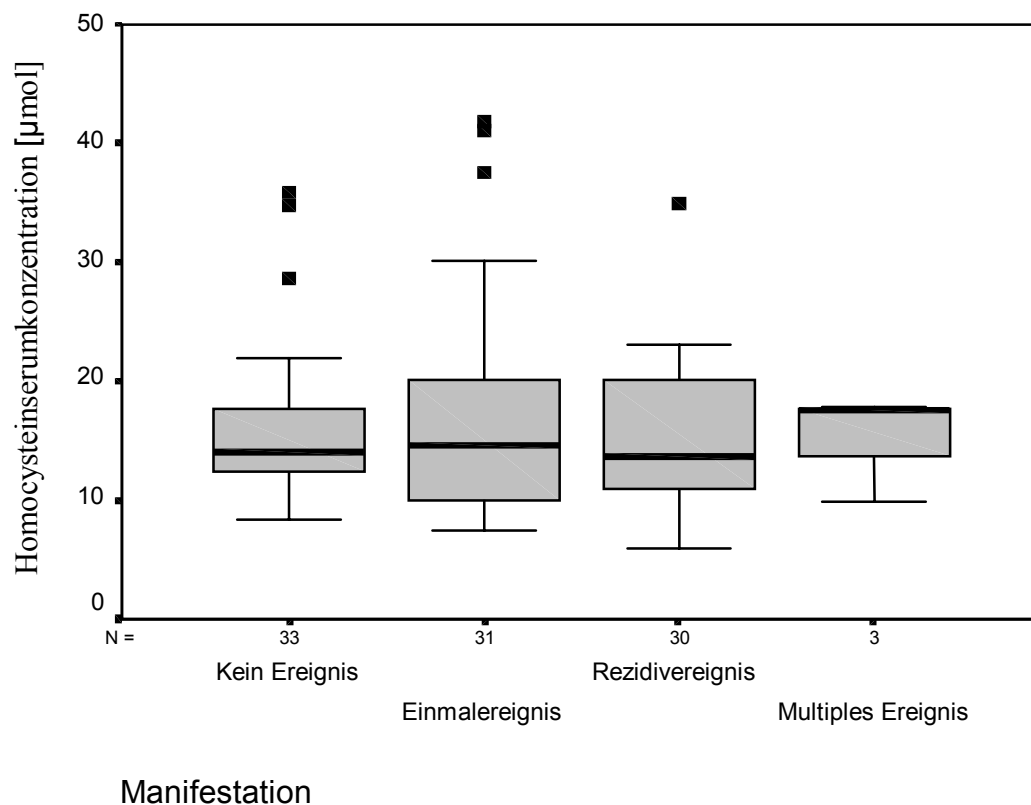


Abb. 1: Vergleich der Homocysteinwerte bei asymptomatischen Mutationsträgern und Patienten mit MTHFR Defekt unter Berücksichtigung unterschiedlicher Ereignistypen

4.1.4 Homocysteinserumspiegel bei asymptomatischen Mutationsträgern und Patienten mit unterschiedlichen Manifestationslokalisationen

In einer weiteren Untersuchung verglichen wir die mittleren Homocysteinserumspiegel von ‚Normalpersonen‘ und Patienten mit venösem, arteriellem oder arteriovenösem Ereignis (Abb. 2). Untersuchte Personen, die eine MTHFR Mutation entweder in homozygoter oder heterozygoter Form aufwiesen, jedoch bisher kein thrombembolisches Ereignis aufwiesen (n= 33), zeigten einen mittleren Homocysteinwert von 15,95 $\mu\text{mol/l}$ (\pm 6,51). Patienten mit thrombotischem Ereignis im venösen Gefäßschenkel (n=51) wiesen einen geringeren mittleren Homocysteinserumspiegel auf als Mutationsträger ohne vaskuläres Ereignis, nämlich 15,64 $\mu\text{mol/l}$ (\pm 6,58). Auch in der vergleichsweise kleinen Gruppe von Patienten mit stattgehabtem arteriovenösem Ereignis (n=3), lag der mittlere Homocysteinserumspiegel mit 15,07 $\mu\text{mol/l}$ (\pm 4,48) unter dem asymptomatischer Mutationsträger.

Lediglich Patienten mit einem Gefäßereignis im arteriellen Gefäßschenkel (n=10) wiesen mit 19,55 $\mu\text{mol/l}$ (\pm 13,70) geringfügig höhere Homocysteinserumspiegel im Serum auf als die drei anderen untersuchten Gruppen. (Tab.: 4)

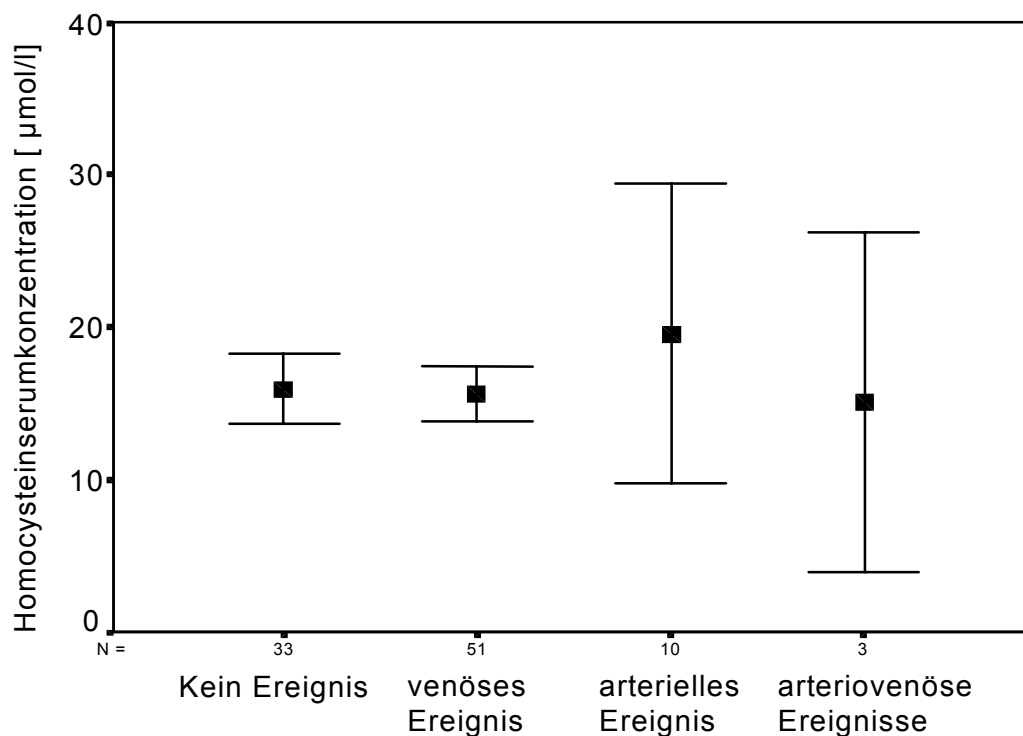


Abb. 2: Vergleich der unterschiedlichen Homocysteinwerte bei MTHFR- Mutationsträgern der verschiedenen Manifestationslokalisationen.

	Venöses Ereignis	Arteriell Ereignis	Arteriovenöses Ereignis	Kein Ereignis
Mittelwert	15,64 µmol/l	19,55 µmol/l	15,07 µmol/l	15,96 µmol/l
Standardabweichung	6,58	13,70	4,48	6,51

Tab. 4: Homocysteinkonzentrationen bei den verschiedenen Manifestationslokalisationen

4.2. Einfluss des Schweregrades des MTHFR Defektes (Homozygotie/ Heterozygotie) auf den Homocysteinspiegel und die Klinik der Patienten

Wir überprüften den Einfluss von homozygotem und heterozygotem Allelstatus des Enzymdefektes der Methylentetrahydrofolatreduktase auf den Homocysteinwert im Serum von 97 Patienten (Σ Patienten Gruppe I und II. (Abb. 3)

Hierbei zeigte sich bei homozygoten Allelträgern eine Homocysteinkonzentration im Serum von im Mittel 16,93 µmol/l (n= 30; \pm 7,34; Median: 14,25; Varianz: 61,46); bei den untersuchten heterozygoten Mutationsträgern (n= 67) fand sich ein Mittelwert von 15,77 µmol/l Homocystein im Serum (Standardabweichung: 7,36; Median: 13,70; Varianz: 54,18). Wir gingen der Frage nach, ob Patienten mit homozygotem MTHFR Defekt höhere Homocysteinspiegel aufweisen als heterozygote Allelträger. Im Chi- Quadrat-Test konnte jedoch mit $\chi^2= 76,715$; p= 0,392 keine Signifikanz nachgewiesen werden.

4.2.1. Hyperhomocysteinämie und Allelstatus

Aus Tabelle 5 geht hervor, dass der Anteil der Patienten/Personen mit einer Hyperhomocysteinämie unter den homozygoten Mutationsträgern geringfügig höher war als unter den Heterozygoten. 53,3% aller Homozygoten wiesen eine Normhomocysteinämie auf, lediglich 46,7% zeigten erhöhte Homocysteinwerte. Unter allen untersuchten Heterozygoten ließ sich bei 61,2% eine Normhomocysteinämie nachweisen, und bei 38,8 % eine Hyperhomocysteinämie

Im dazugehörigen Chi- Quadrat- Test konnte jedoch keine signifikante Korrelation des Allelstatus' mit einer Hyperhomocysteinämie nachgewiesen werden $\chi^2= 0,528$ p=0,467.

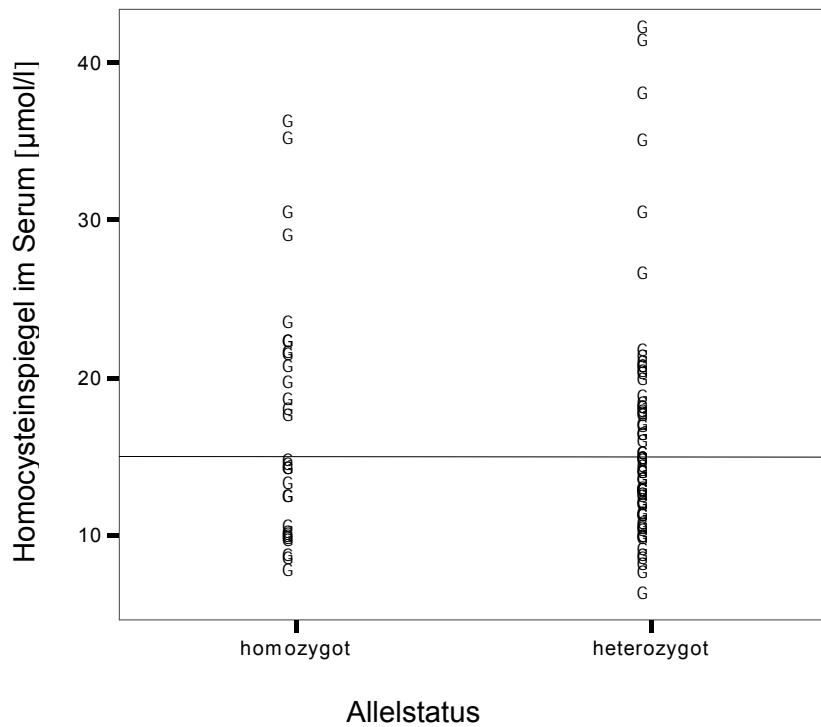


Abb. 3: Darstellung der mittleren Homocysteinwerte bei homozygoten und heterozygoten Mutationsträger. Die Grenzlinie dient der Unterscheidung zwischen Normhomocysteinämie (< 15 mmol/l) und Hyperhomocysteinämie

Kreuztabelle: Allelstatus * Hyperhomocysteinämie [$\geq 15 \mu\text{mol/l}$]

		Normohomocysteinämie	Hyperhomocysteinämie	Gesamt
Allelstatus	homozygot (n) %	16 53,3	14 46,7	30 100
	heterozygot (n) %	41 61,2	26 38,8	67 100
Gesamt	(n) %	57 58,8	40 41,2	97 100

Tab. 5: Untersuchung des Homocysteinspiegels im Serum von 97 Mutationsträgern in Abhängigkeit des jeweiligen Allelstatus'. Dargestellt ist der jeweiligen Anteil an Personen mit normaler und abnormen Homocysteinkonzentration unter Berücksichtigung homozygoter und heterozygoter Allelträger .

4.2.2. Einfluss der Ausprägung des MTHFR Defektes (Homozygotie/Heterozygotie) auf Homocysteinspiegel und Manifestationslokalisierung

In einem weiteren Schritt untersuchten wir, ob der Allelstatus der MTHFR Variante auf die Lokalisation eines thrombembolischen Ereignisses (Manifestationslokalisierung) Einfluss nimmt, beziehungsweise ob eine Einflussnahme der Höhe des Homocysteinwertes auf die Klinik (Ausprägung thrombotischer Ereignisse: venös, arteriell, arteriovenös) existiert.

Aus Abbildung 8 wird ersichtlich, dass sich weder die Homocysteinkonzentration noch der ermittelte Allelstatus signifikant auf die Manifestationslokalisierung auswirkt.

Der Mittelwert der Homocysteinserumkonzentration und die Standardabweichung bei den verschiedenen Manifestationslokalisationen verteilen sich wie folgt (Tab.: 6):

..

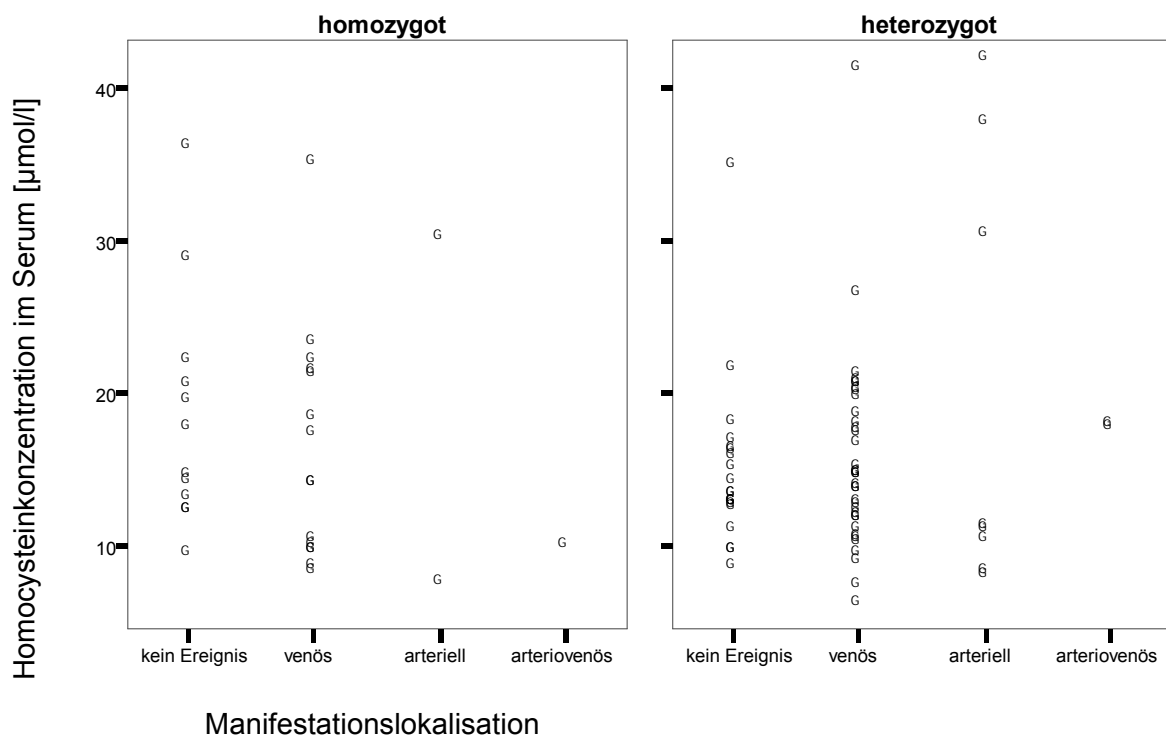


Abb. 8: Einfluss des Allelstatus' auf die Manifestationslokalisierung und den gemessenen Homocysteinwert

Allelstatus Lokalisation	homozygot	heterozygot	
Kein Ereignis	18,24 $\mu\text{mol/l}$ (7,70)	14,65 $\mu\text{mol/l}$ (5,49)	$p > 0,5$
Venöses Ereignis	16,10 $\mu\text{mol/l}$ (7,49)	15,44 $\mu\text{mol/l}$ (6,28)	$p > 0,5$
Arteriell Ereignis	18,75 $\mu\text{mol/l}$ (16,05)	19,75 $\mu\text{mol/l}$ (14,30)	$p > 0,5$
Arteriovenöses Ereignis		17,65 $\mu\text{mol/l}$ (0,21)	

Tab. 7: Unterschiedliche Homocysteinkonzentrationen (Mittelwerte) und Standardabweichung in Klammern in Abhängigkeit von Allelstatus und Manifestationslokalisierung

4.3. Einfluss erhöhter Homocysteinspiegel auf Thrombozytenmorphologie und Thrombozytenfunktionsparameter

Wir untersuchten nun den Einfluss einer mit normalen oder pathologisch erhöhten Homocysteinwerten einhergehenden MTHFR- Mutation auf die Thrombozytenfunktion in einem statistisch auswertbaren Gesamtkollektiv von 80 Patienten, sowie getrennt für Patienten nach stattgehabtem thrombotischem Ereignis und asymptomatischen Trägern der Mutation.

4.3.1. Auswirkung erhöhter Homocysteinspiegel auf die spontane Thrombozytenaggregation (PAT III)

Hierbei zeigte sich im Gesamtkollektiv (Gruppe I und II) keine signifikante Beeinflussung der Thrombozytenaggregation im PAT III durch das Vorliegen einer heterozygoten oder homozygoten MTHFR Mutation (s. Abb. 9). Auch fand sich keine signifikante Abhängigkeit einer gesteigerten Thrombozytenaggregation von der Höhe des Homocysteinspiegels (Korrelation nach Pearson: -0,227). In einigen Fällen fand sich eine Hyperreaktivität der

Thrombozyten, die unabhängig von Homozygotie oder Heterozygotie der Mutation und unabhängig von einer Hyperhomocysteinämie auftrat.

Der Mittelwert der gemessenen Winkel α im PAT III lag bei 11,77 Grad , der niedrigst gemessene Wert lag bei 1,5 Grad, der höchst gemessene Wert bei 30 Grad.

Auch fand sich in der Gruppe der Patienten (Gruppe I) unabhängig von der Art der Betroffenheit des Gefäßsystems (venös, arteriell, arteriovenös) nicht häufiger eine gesteigerte Thrombozytenaggregation (Winkel $\alpha > 9^\circ$).

Das aus dem Diagramm ersichtliche Ergebnis wird durch den Chi-Quadrat-Test bestätigt ($\chi^2= 19,753$; $p= 0,981$).

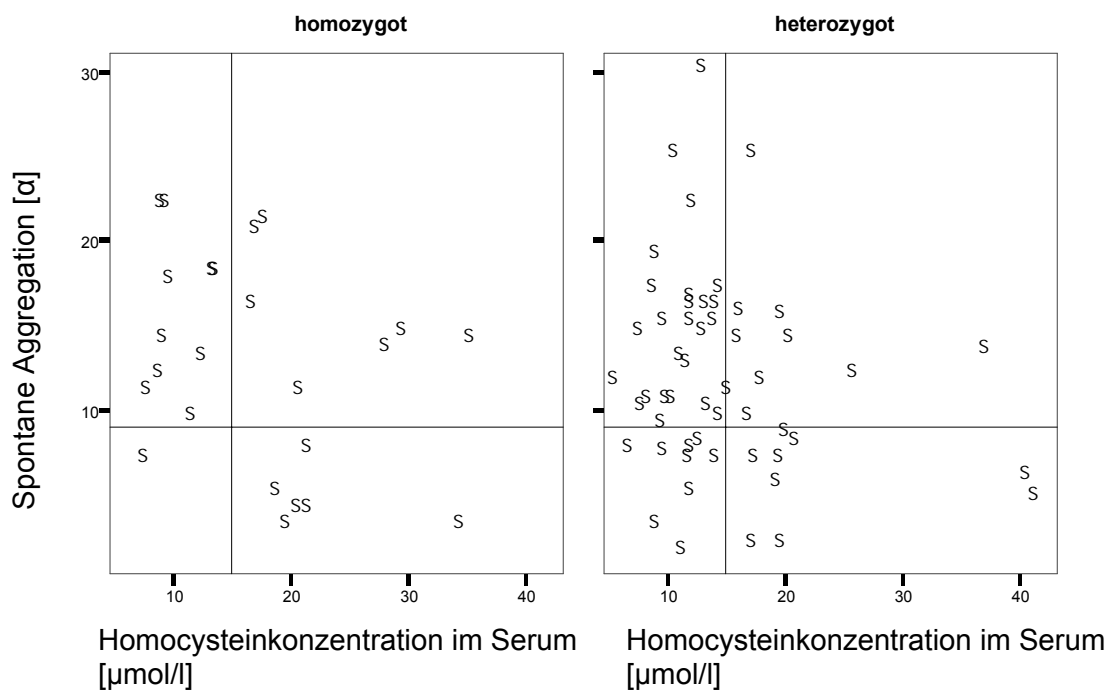


Abb. 9: Zusammenhang der Homocysteinkonzentration im Serum und des gemessenen Winkels α als Parameter der spontanen Thrombozytenaggregation. In der Abbildung sind homozygote von heterozygoten Mutationsträgern getrennt dargestellt.

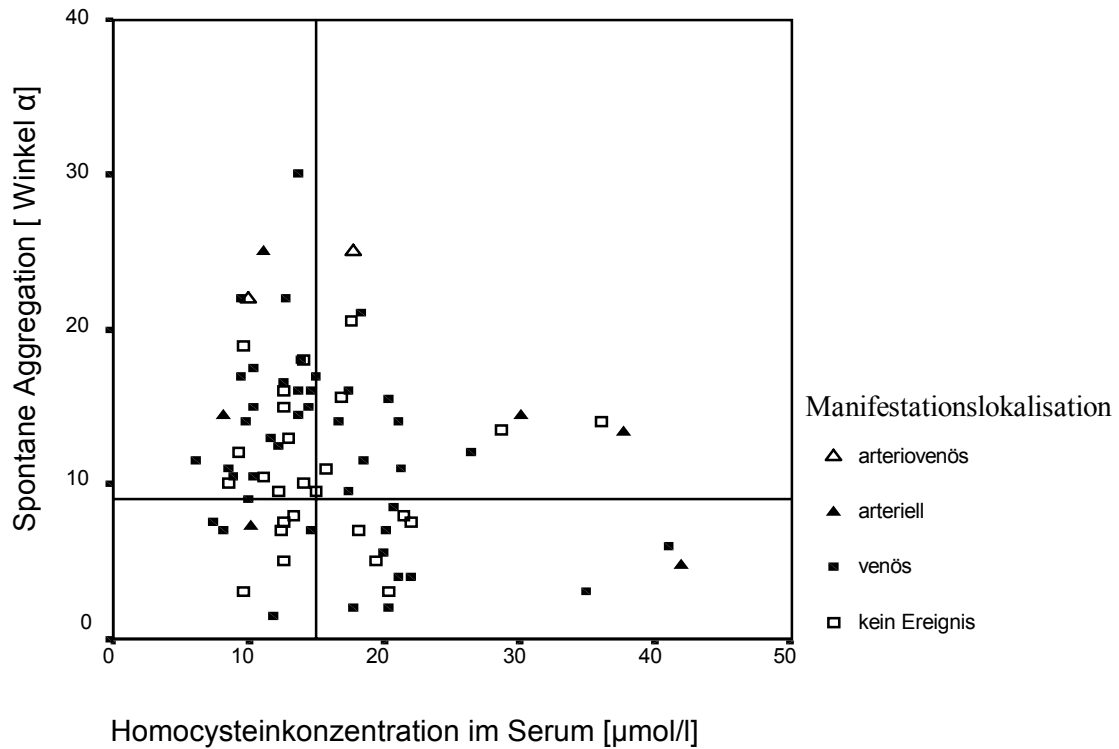


Abb. 10: Darstellung des Zusammenhangs Homocysteinkonzentration und spontane Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Manifestationslokalisation

4.3.2. Beeinflussung der Thrombozytenadhäsion T nach Hellem II [%] durch den Homocysteinserumspiegel

Die Höhe des Homocysteinspiegels (Normohomocysteinämie /Hyperhomocysteinämie) und auch der Allelstatus der nachgewiesenen MTHFR- Mutation (Homozygotie/Heterozygotie) beeinflussten die Thrombozytenadhäsion nicht signifikant. Mit wenigen Ausnahmen fanden sich normale Werte. Eine erhöhte Thrombozytenadhäsivität war weder signifikant mit einem homozygoten Allelstatus korreliert, noch mit einer Hyperhomocysteinämie. Der Mittelwert der gemessenen Adhäsivität T nach Hellem II lag bei 18,74%. Die in einem Fall mit 75% gemessene Thrombozytenadhäsivität ist mit relativer Wahrscheinlichkeit auf eine Voraktivierung der Thrombozyten zurückzuführen zumal diese sich auch als nicht reproduzierbar darstellte. (Abb. 11)

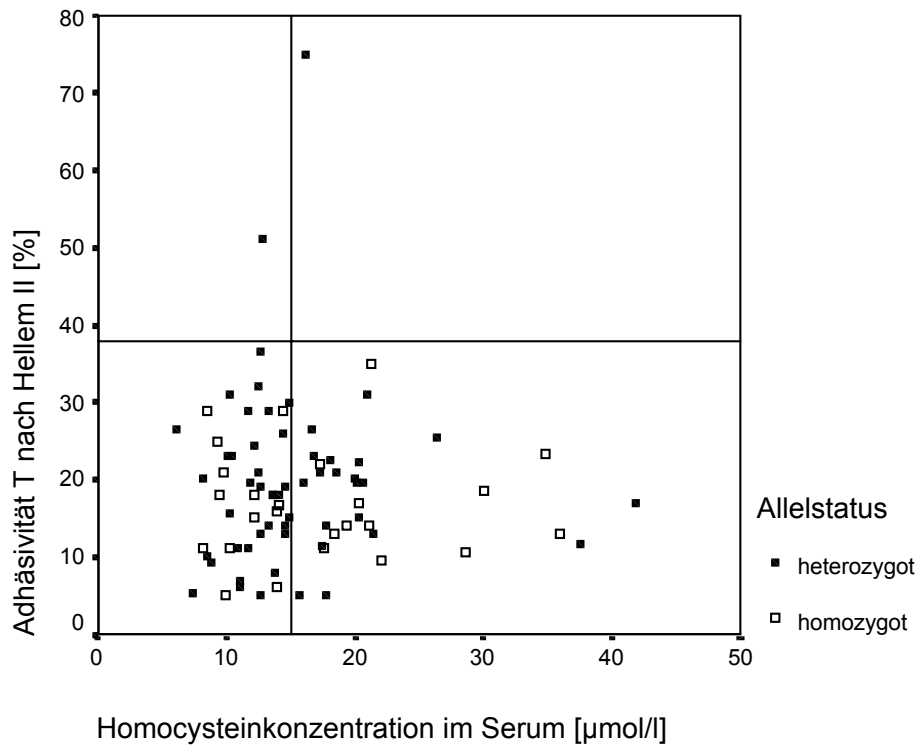


Abb. 11: Zusammenhang von Homocysteinkonzentration, Allelstatus und Adhäsivität T nach Hellem II

4.3.3. Auswirkung erhöhter Homocysteinspiegel auf das Mittlere Plättchenvolumen (MPV)

Ebenso wie die Adhäsivität T nach Hellem II und die spontane Aggregation zeigte sich auch das Mittlere Thrombozytenvolumen (mean platelet volume; MPV) von der Höhe der Homocysteinkonzentration im Serum unbeeinflusst.

Höhere Plättchenvolumina fanden sich weder bei Patienten mit thrombotischem Ereignis noch bei den asymptomatischen Mutationsträgern (s. Abb.: 12). Der Mittelwert der Plättchenvolumina lag bei 11,25 fl, insgesamt schwankten die Messwerte zwischen 6 und 13,8 fl. Es fand sich keine signifikante Korrelation zwischen gemessenem Homocysteinspiegel und dem Ausmaß des Plättchenvolumens.

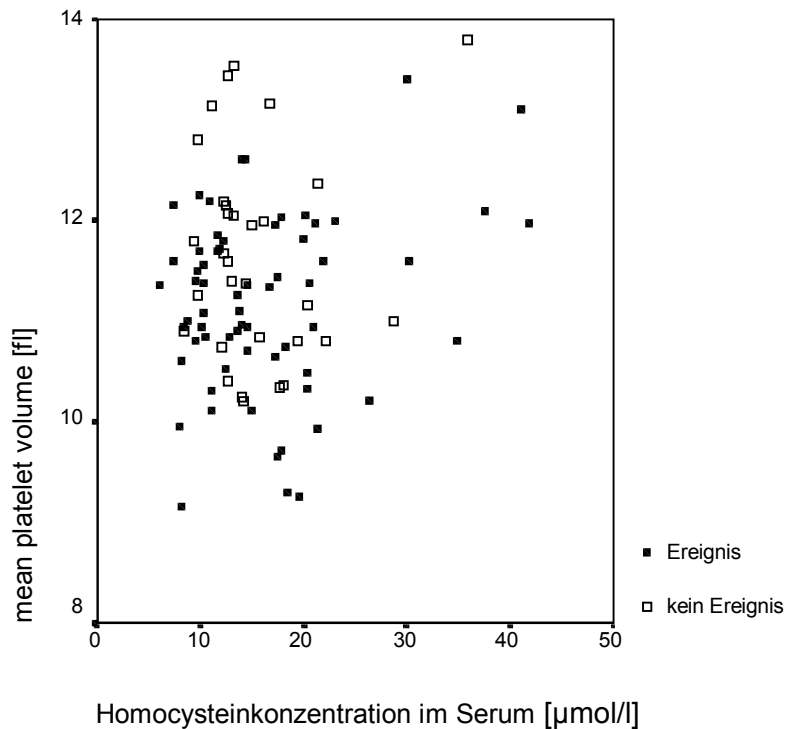


Abb. 12: Abhängigkeit des mittleren Thrombozytenvolumens (MPV) vom gemessenen Homocysteinspiegel

4.4. Auswirkung von Alter, Geschlecht und Ernährungszustand auf die Höhe des Homocysteinspiegels im Serum

4.4.1. Homocysteinkonzentration in verschiedenen Altersgruppen und unter geschlechtsspezifischen Gesichtspunkten

Wir randomisierten nun das Patientenkollektiv nach Alter und Geschlecht, da mit zunehmendem Alter aufgrund reduzierter Vitaminzufuhr, eingeschränkter Nierenfunktion und verminderter Enzymaktivität mit erhöhten Homocysteinspiegeln gerechnet werden darf.

Wir untersuchten die Frage, ob höheres Alter unter der Voraussetzung des Vorliegens einer MTHFR- Mutation mit einer Hyperhomocysteinämie ($\geq 15 \mu\text{mol/l}$) eher einhergeht und verglichen dabei die Patienten differenziert auch nach Geschlecht.

Sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen zeigte sich nach Einteilung in Altersgruppen (<30 Jahre, 30-59 Jahre, >59 Jahre) mit zunehmendem Alter ein Anstieg der Homocysteinkonzentration (Abb.: 13).

Auch wurde deutlich, dass die männliche Bevölkerung in jeder Altersgruppe diskret höhere Werte zeigte als die entsprechende Altersgruppe der untersuchten Frauen.

Der höchste Anteil an Hyperhomocysteinämien lag sowohl bei den männlichen Untersuchten mit 53,33% als auch bei den weiblichen Untersuchten mit 42,86% in der Altersgruppe der über 59- jährigen. In der Gruppe der unter 30- jährigen fand sich sowohl bei den männlichen Untersuchten als auch unter den Frauen der geringste Anteil an abnorm hohen Homocysteinsersumspiegeln: 40 % der Männer unter 30 Jahren zeigten eine Hyperhomocysteinämie, bei den weiblichen Untersuchten unter 30 Jahren wiesen lediglich 16,66% Homocysteinwerte über 15 μ mol/l im Serum auf. 44% der Männer zwischen 30 und 59 Jahren zeigten Homocysteinspiegel über 15 mmol/l auf, während in derselben Altersgruppe bei den weiblichen Untersuchten der Anteil der Hyperhomocysteinämien bei 33% lag.

Insgesamt wiesen 69,2% der Frauen einen physiologischen Homocysteinwert mit Spiegeln unter 15 μ mol/l auf. 30,8% zeigten Werte über 15 μ mol/l.

Bei den Männern war der Anteil der Personen mit physiologischem Homocysteinspiegel mit 46,6% deutlich geringer als bei den Frauen. Über die Hälfte aller untersuchten Männer, nämlich 53,34%, wiesen eine Hyperhomocysteinämie auf.

Weiterhin untersuchten wir nun die Gruppen I (Patienten; n= 65) und II (asymptomatische Mutationsträger; n=35) getrennt und unterteilten die Kollektive erneut geschlechtsspezifisch in drei Altersklassen. Fallzahlbedingt wurden die Grenzen der Altersklassen geändert (Abb.: 14; Abb.: 15)

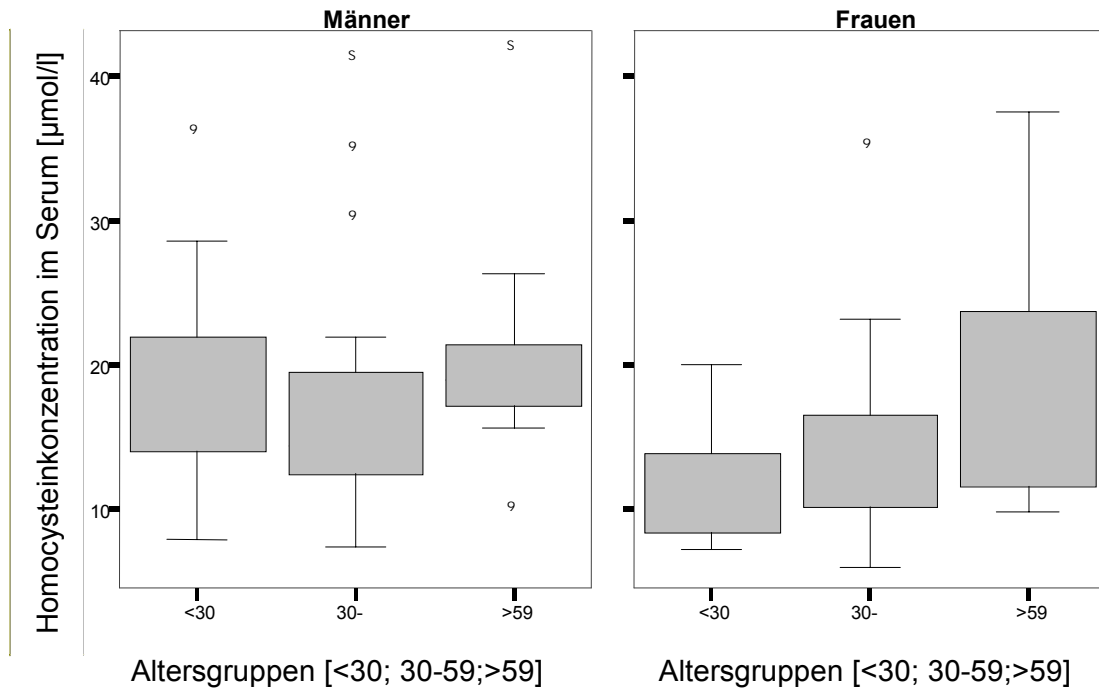


Abb. 13: Homocysteinkonzentrationen im Serum in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht

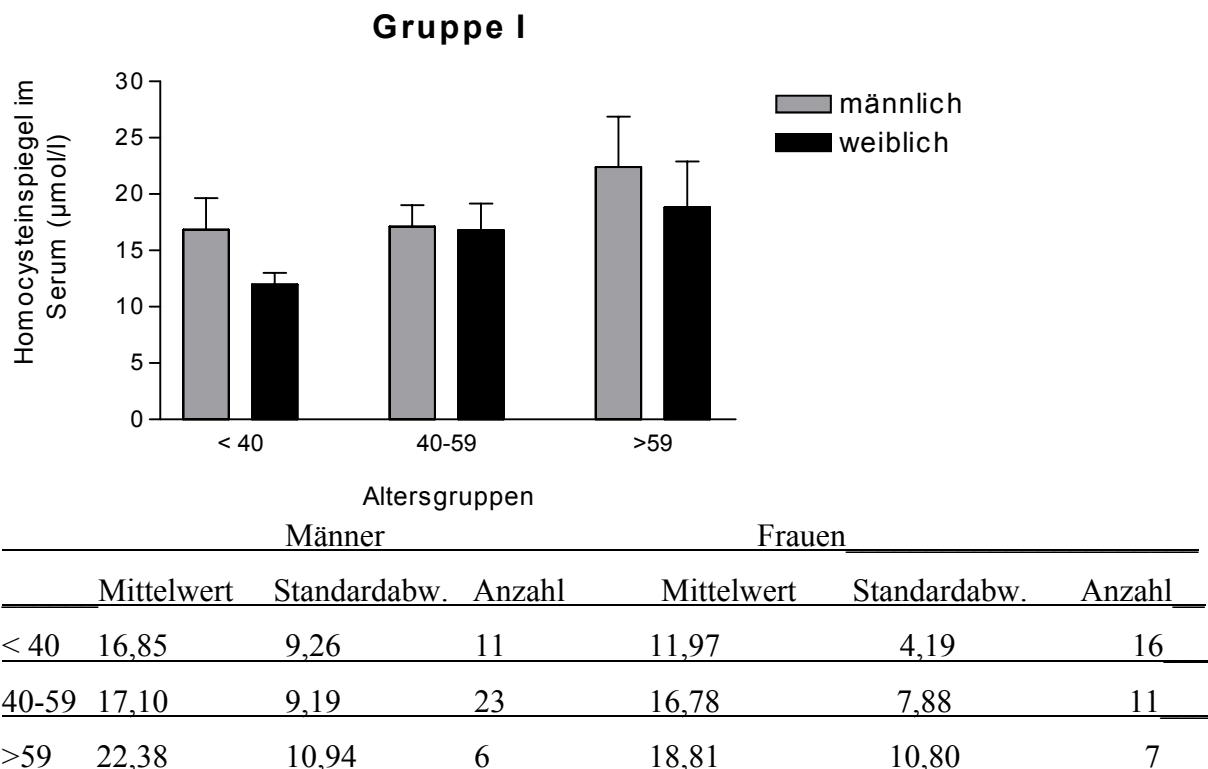
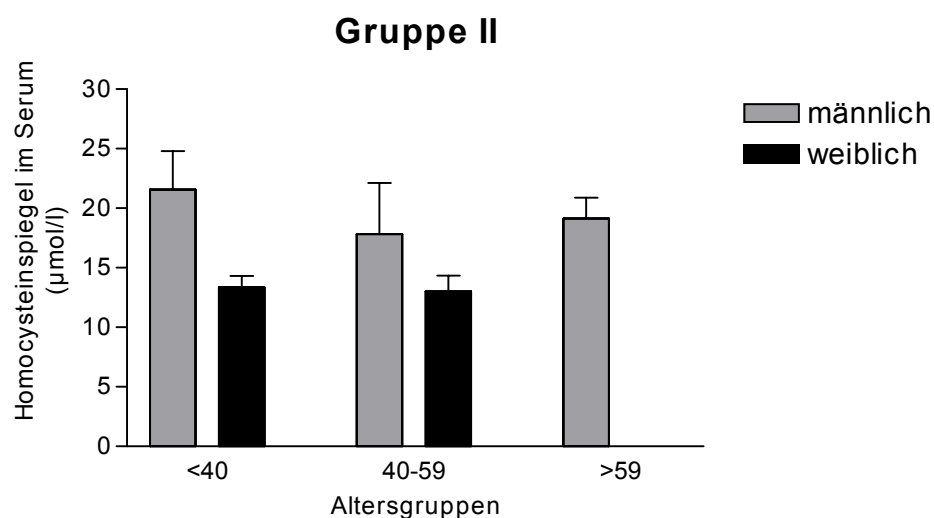


Abb. 14: Darstellung der Homocysteinwerte bei Patienten mit stattgehabtem thrombembolischem Ereignis differenziert nach Altersklassen und Geschlecht



	Männer			Frauen		
	Mittelwert	Standardabw	Anzahl	Mittelwert	Standardabw	Anzahl
<40	21,57	8,54	7	13,36	3,11	11
40-59	17,82	9,60	5	13,00	3,56	7
>59	19,13	3,02	3			

Abb.: 15 Darstellung der Homocysteinwerte bei asymptomatischen Kontrollpersonen differenziert nach Altersklassen und Geschlecht

4.4.2. Homocysteinspiegel, Vitamin B6 und Folsäure

Ziel der nächsten Untersuchung war es, den Einfluss eines Vitamin B6 und Folsäuremangels, sowie den Einfluss des Nikotinabusus' auf den Homocysteinwert darzustellen.

Von 94 Patienten, bei denen Vitamin B6 Messungen durchgeführt wurden, fanden sich in 13 Fällen ein Vitaminspiegel unter dem Referenzwert von 5 ng/ml im Plasma (Referenzbereich: 5-30 ng/ml im Plasma). 5 Personen dieser Gruppe (38,5%) wiesen Homocysteinwerte über 15 mmol/l auf, 8 Personen (61,5%) einen physiologischen Wert. Bei den 81 Personen, deren Vitamin B6- Spiegel nicht unterhalb des Referenzwertes lag, stellte sich bei 40,7% eine Hyperhomocysteinämie heraus, 59,3% wiesen unauffällige Homocysteinkonzentrationen auf.

Unter den 94 Personen, deren Folsäurestatus erhoben wurde, zeigten lediglich 5 Personen einen Folsäurewert, der unterhalb des Referenzwertes von 2,6 ng/ml im Serum lag (Referenzbereich: 2,6-14,6 ng/ml im Serum). Auffällig ist die Tatsache, dass jeder dieser 5 Personen eine Hyperhomocysteinämie aufwies. Unter den restlichen 89 Personen mit Folsäurespiegeln im Normbereich, fand sich in 34 Fällen (38,2%) ein Homocysteinwert über 15 µmol/l, in 55 Fällen (61,8%) war der Homocysteinwert unauffällig.

5. DISKUSSION

Das Vorhandensein einer MTHFR Mutation ist nicht zwangsläufig mit einer Hyperhomocysteinämie oder einer Hyperreaktivität der Thrombozyten verknüpft. Dabei scheint auch der Schweregrad der Ausprägung des Defektes (Homozygotie/ Heterozygotie) keinen Einfluss auf die Höhe des Homocysteinspiegels, die Aggregabilität oder Adhäsivität der Thrombozyten zu haben. Auch beeinflusst der MTHFR Defekt nicht die Thrombosebereitschaft, dies betrifft sowohl den venösen als auch den arteriellen Gefäßschenkel.

Bei lediglich 41,2 % der untersuchten Mutationsträger fand sich eine Hyperhomocysteinämie mit Werten über 15 $\mu\text{mol/l}$, die verbleibenden 58,8% der Mutationsträger wiesen Werte im Normbereich auf. Der Anteil der Personen mit Hyperhomocysteinämie betrug unter den homozygoten Mutationsträgern 46,7%, unter den heterozygoten Mutationsträgern lediglich 38,8 %. Im Chi- Quadrat- Test konnte keine signifikante Korrelation des Allelstatus' mit einer Hyperhomocysteinämie nachgewiesen werden ($\chi^2= 0,528$ $p=0,467$). Unsere Ergebnisse stehen aber im Widerspruch zu den Ergebnissen einer Untersuchung von FROSST et al., 1995, die herausfanden, dass homozygote Träger der Mutation signifikant höhere Homocysteinplasmaspiegel aufwiesen als Personen, die das mutierte Allel nicht besaßen (CC Genotyp). Auch KANG et al. (1991) zeigten in einer Untersuchung eine Assoziation zwischen der thermolabilen Variante einer MTHFR Mutation und einer signifikanten Erhöhung des Homocysteinspiegels. Jedoch ergab sich auch aus ihren Untersuchungen, dass nicht bei allen Trägern der Mutation eine Hyperhomocysteinämie zu diagnostizieren war. Sie vermuteten weiter, dass die C677T MTHFR Mutation aufgrund verschiedener Interaktionen mit nicht genetisch determinierten Faktoren, z.B. niedriger Serumfolat Spiegel, Einfluss auf die Entstehung einer Hyperhomocysteinämie nehmen könnte

Auch bei homozygoten Trägern der Mutation (n= 30) lag der Mittelwert der Homocysteininkonzentration mit 16,93 $\mu\text{mol/l}$ nur wenig über dem Grenzwert von 15 $\mu\text{mol/l}$, sodass der Einfluss einer MTHFR Mutation auf die Homocysteinserumspiegel als eher gering einzustufen ist, zumal auch der Mittelwert der Homocysteinwerte unter heterozygoten Mutationsträgern mit 15,77 $\mu\text{mol/l}$ nur geringfügig niedriger lag. Im χ^2 Test konnte keine signifikante Korrelation erhöhter Homocysteinwerte mit dem Allelstatus (Homozygotie/ Heterozygotie) nachgewiesen werden ($\chi^2= 76,715$; $p = 0,392$).

Demgegenüber stehen die Ergebnisse, die BRATTSTRÖM (1998) in einer Metaanalyse zeigte: hier führte die T/T MTHFR Mutation zu $\sim 2,6\mu\text{mol/l}$ höheren mittleren Homocysteinserumspiegeln als bei C/C Genotypen. Eine Untersuchung des Folsäurespiegels jedoch wurde nicht durchgeführt.

Der Mechanismus, mit dem eine Hyperhomocysteinämie zu Atherosklerose und erhöhtem Risiko für venöse Thrombosen führen kann, sind mannigfaltig:

bei in vitro Untersuchungen konnte ein Einfluss des Homocysteins sowohl auf das antikoagulatorische als auch auf das fibrinolytische System gezeigt werden z. B.: Inhibition der Prostacyclinsynthese, Faktor V Aktivierung, Inhibition der Protein C Aktivierung, Vermehrte Plättchenadhäsion, Suppression der Heparan- Sulfat Expression (Boushey, 1995; RODGERS, 1990; FRYER, 1993). Die hierbei angewendeten Konzentrationen an Homocystein überstiegen die bei einer MTHFR Mutation gefundenen Konzentrationen jedoch um ein Vielfaches und es bleibt die Frage, ob diese Ergebnisse auf die bei einer MTHFR Mutation gefundenen Werte übertragbar sind

Die Unterteilung der Gruppe I in die Untergruppen ‚venöses Ereignis‘, ‚arterielles Ereignis‘ sowie ‚arteriovenöses Ereignis‘ erfolgte zur Klärung der Frage, ob eine Hyperhomocysteinämie eher als Risikofaktor für ein arterielles Ereignis oder ein venöses Ereignis darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem arteriellen Ereignis ($19,55\ \mu\text{mol/l} \pm 13,70$) im Vergleich zu Patienten ohne Ereignis ($15,95\ \mu\text{mol/l} \pm 6,51$) oder einer anderen Manifestationslokalisation (venös: $15,64\ \mu\text{mol/l} \pm 6,58$; arteriovenös: $15,07\ \mu\text{mol/l} \pm 4,48$) leicht höhere Serumspiegeln an Homocystein aufwiesen, sodass anzunehmen ist, dass die Hyperhomocysteinämie als Risikofaktor im arteriellen Schenkel von eher größerer Bedeutung zu sein scheint als im venösen Gefäßsystem. Der Unterschied der Messwerte zwischen den Gruppen war jedoch nicht signifikant. Die mittleren Homocysteinspiegel waren in allen Untergruppen nahezu gleich.

Verschiedene Studien zeigten bereits, dass eine milde Hyperhomocysteinämie gehäuft bei Patienten mit arterieller Verschlusskrankheiten zu finden ist. BOUSHEY et al., 1995, fanden heraus, dass jeder Anstieg des Serumhomocysteins um $5\ \mu\text{mol/l}$ oberhalb des Normbereichs mit einer odds ratio für Männer von 1,6 (95% Konfidenzintervall 1,4 bis 1,7) und für Frauen von 1,8 (95% Konfidenzintervall; 1,3 bis 1,9) einhergeht.

Es wurden aber auch Studien veröffentlicht, die auf keinen Zusammenhang zwischen einer C677T MTHFR Mutation und der damit einhergehenden Erhöhung der Homocysteinspiegel bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung oder Myokardinfarkt hinwiesen (HSU, 2002).

Im Bezug auf den Einfluss des Homocysteins im venösen Gefäßsystem liegen kontroverse Daten vor: BRATTSTRÖM (1991) zum Beispiel fand keinen signifikanten Unterschied in den verschiedenen Homocysteinserumspiegeln bei 42 Patienten mit stattgehabter venöser Thrombose und 42 Kontrollpersonen und auch DE STEFANO (1998) konnte eine homozygote 677 C→T Mutation nicht mit einem erhöhten Risiko für thrombotische Erkrankungen assoziieren. In Dänemark untersuchten KLUIJTMANS et al., 1998, 471 Patienten mit tiefer Venenthrombose und 474 gesunde Kontrollpersonen. Unter den Patienten waren 47 (10%) homozygot für die thermolabile Variante der MTHFR, in der Kontrollgruppe waren es ebenfalls 47 (9,9%). Die odds ratio wurde mit 1,01 angegeben. Im selben Jahr führten DE STEFANO et al., 1998, eine Studie an 194 Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose und 198 Kontrollpersonen durch, und ermittelten die Häufigkeit des Auftretens einer 677 C→T Mutation in der italienischen Bevölkerung. 19% der Patienten und 17,6% der Kontrollpersonen wiesen eine Homozygotie hinsichtlich der thermolabilen Variante des Enzyms Methylentetrahydrofolatreduktase auf. Hier betrug die odds ratio 1,09. Ebenso zeigten LU et al., 2002, dass ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten thrombembolischer Ereignisse und dem Vorhandensein einer C677T MTHFR Mutation in der chinesischen Bevölkerung fehlte. Diese Aussagen stehen im Einklang mit den Ergebnissen unserer Untersuchung.

DEN HEIJER (1995 und 1996) hingegen sah in einer milden Hyperhomocysteinämie einen unabhängigen Risikofaktor für die tiefe Venenthrombose. Auch scheinen die Ergebnisse einer Studie von ARRUDA et al., 1997, darauf hinzuweisen, dass die MTHFR TT Mutation als unabhängiger Risikofaktor für venöse Thrombosen anzusehen ist. Sie untersuchten 74 Patienten, mit arteriellen thrombotischen Komplikationen. 14 (19%) waren homozygot, während von 127 Venenthrombose-Patienten 14 (11%) das mutierte MTHFR Gen in homozygoter Form aufwiesen. Bei dieser Untersuchung wurde die odds ratio für thrombotische Ereignisse im venösen Gefäßschenkel mit 2,93 angegeben. Um die MTHFR-Mutation als eigenständigen Risikofaktor für venöse Thrombosen zu identifizieren, wurden aus der Gruppe der 127 Patienten mit tiefer Venenthrombose 27 Patienten mit bekannter hereditärer Thrombophilie (Faktor V Leiden, Dysfibrinogenämie, Protein C-, Protein S-,

Faktor VIII- oder Antithrombin III Mangel) ausgeschlossen. Die neu errechnete odds ratio betrug nun 2,63.

Vergleicht man das Kollektiv der Patienten aus Gruppe I (Patienten mit thrombotischem Ereignis) mit der Gruppe der asymptomatischen Mutationsträger (Gruppe II), so zeigen die Gruppe I-Patienten nur geringfügig höhere Homocysteinserumwerte.

Der mittlere Homocysteinwert von Patienten der Gruppe I lag mit 16,22 $\mu\text{mol/l}$ nur leicht über dem Mittelwert von der Kontrollgruppe (Personen mit nachgewiesener MTHFR Mutation ohne thrombembolisches Ereignis) mit 15,95 $\mu\text{mol/l}$, was auf einen wenig bedeutsamen Stellenwert der Hyperhomocysteinämie als Risikofaktor für thrombembolische Ereignisse hinweist. BRATTSTRÖM (1998) konnte in einer Metaanalyse von 1998 aufzeigen, dass eine MTHFR Mutation nicht mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten verknüpft ist.

Die vergleichende Analyse der Homocysteinkonzentrationen im Serum bei den verschiedenen klinischen Manifestationsformen (Patienten ohne klinisches Ereignis, Patienten mit Einmalereignis, Patienten mit Rezidivereignis, Patienten mit multiplem Ereignis) ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den Homocysteinkonzentrationen und dem Ereignis. Bei allen Gruppen unterschieden sich die Messwerte für Homocystein nur geringfügig voneinander, sowohl bei den Patientengruppen mit Einmalereignis, Rezidivereignis und multiplem Ereignis, als auch bei der Patientengruppe mit Ereignis im Vergleich mit der Gruppe der asymptomatischen Mutationsträgern. Es ist also aufgrund der vorliegenden Daten nicht davon auszugehen, dass die Höhe des gemessenen Homocysteinspiegels einen Einfluss auf die Art/Ausprägung der klinischen Manifestation (Thrombose) hat.

Betrachtet man den Einfluss der 677 C→T MTHFR Mutation auf die Thrombozyten-funktionsparameter, so scheinen sowohl die spontane Aggregation PAT III, gemessen mit dem Winkel α , als auch die Adhäsion T nach Hellem II (%), weder vom Vorliegen einer Mutation noch von der Höhe des gemessenen Homocysteinspiegels signifikant beeinflusst:

Die MTHFR Mutation geht nicht notwendigerweise mit einer Hyperaggregabilität der Thrombozyten einher. In 54 Fällen ging eine MTHFR Mutation mit gesteigerter

Plättchenaggregation einher, 46 Mutationsträger hingegen wiesen normale Werte auf. Die Hyperhomocysteinämie korrelierte nicht mit einer gesteigerten Plättchenaggregation (Korrelation nach Pearson $r = -0,227$ $p = 0,047$).

Auch die Plättchenadhäsion wurde weder vom Allelstatus noch von der Höhe des Homocysteinspiegels beeinflusst.

Es ist also davon auszugehen, dass die Thrombozytenfunktion, gemessen anhand der spontanen Aggregation und anhand der Adhäsion T nach Hellem II von erhöhten Homocysteinspiegeln unbeeinflusst bleibt. Auch ließen sich erhöhte Blutplättchenvolumina nicht signifikant mit erhöhten Homocysteinwerten korrelieren.

Den Einfluss von Folat, Vitamin B6 und Vitamin B12- allesamt Kofaktoren der am Methioninstoffwechsel beteiligten Enzyme- auf den Homocysteinspiegel zu klären, war Ziel zahlreicher Studien. Ein Vitamin B 6 Mangel resultiert bei Menschen nicht in einer Hyperhomocysteinämie (MILLER et al., 1992), wohingegen ein Mangel an Vitamin B 12 oder Folsäure beachtliche Hyperhomocysteinämien auslösen kann, die jedoch durch Gabe der jeweils mangelnden Substanz wieder behoben werden kann (KANG et al., 1987, BRATTSTRÖM et al., 1988). MORIYAMA et al., 2002, zeigten in einer Untersuchung von 324 Männern und 641 Frauen den starken Einfluss des Serumfolatspiegels auf die gemessenen Homocysteinwerte und wiesen gleichzeitig darauf hin, dass hohe Spiegel an Vitamin B12, unabhängig von der Höhe des Folatspiegels, den Einfluss der MTHFR Mutation auf den Homocysteinspiegel schwächen. JAQUES et al., 1995, zeigten in einer Studie, dass bei Patienten mit homozygoter MTHFR TT Mutation die Nüchtern- Homocysteinspiegel im Vergleich zu Heterozygoten oder Personen ohne MTHFR- Defekt nur leicht erhöht waren, sofern der Folsäurespiegel über 15,4 nmol/l lag (Referenzbereich für Erwachsene im Plasma: 4,0-20 nmol/l). Handelte es sich aber hingegen um Personen mit einem Folsäurespiegel unter 15,4 nmol/l, fanden sich bei homozygoten Trägern um bis zu 24% höhere Homocysteinspiegel als bei Heterozygoten oder Gesunden.

In unserer Untersuchung zeigten alle 5 Personen mit Folatspiegeln unter dem Referenzwert von 2,6 ng/ml eine Hyperhomocysteinämie. Wenn auch dieses Ergebnis aufgrund der geringen Fallzahl nur eingeschränkt zu verwerten ist, so unterstützt es doch die vorliegenden Studienergebnisse. Auch ROBINSON et al. (1997) sahen eine negative Korrelation zwischen HomocysteinKonzentration und Folsäurespiegel.

Der Einfluss des Vitamin B6 auf die Höhe des Homocysteinspiegels wird als geringer angesehen, was sich auch in unserer Untersuchung widerspiegelte: 61,5% der Personen mit Vitamin B6 Spiegeln unter dem Referenzwert von 5 ng/ml wiesen eine Hyperhomocysteinämie auf, während unter den Personen mit normalem Vitaminserumspiegel immerhin noch 40,7% an erhöhten Homocysteinwerten litten. Aber auch ROBINSON et al. (1997) zeigten einer multizentrischen Fall- Kontrollstudie mit 1550 Teilnehmern eine inverse Korrelation von Homocysteinserumspiegeln und Vitamin B6 Konzentration

BRATTSTRÖM et al., 1988, zeigten bereits Ende der achtziger Jahre, dass zwar die Gabe von Folsäure, nicht aber die Gabe von Vitamin B 6 oder Vitamin B 12 normale Homocysteinspiegel bis zu 30% senken kann.

CURTIS et al., 1994, untersuchten in einer Studie inwieweit erhöhtes Homocystein als Vorhersagewert für Vitamin B 12- oder Folsäuremangel gelten kann. Unter 151 Patienten mit erniedrigtem Vitamin B 12- Spiegeln stellten sie bei 37 (25%) erhöhte Plasmahomocysteinwerte fest. Unter 131 Patienten mit erniedrigtem Folatspiegel mit jedoch normalem Serum Vitamin B 12 wiesen 35 (27%) einen erhöhten Plasmahomocysteinspiegel auf. Sie untersuchten weiter bei 35 Patienten den Einfluss einer Substitutionstherapie mit Vitamin B 12 und Folat auf die Homocysteinwerte. Von 22 Patienten mit normalen Homocysteinwerten sprach einer (5%) auf die Therapie an, wohingegen 12 von 13 Patienten (92%) mit erhöhtem Plasmahomocystein auf die Therapie ansprachen.

In diesen Studien wurde gezeigt, dass eine Vitaminsubstitutionstherapie erhöhte Plasmahomocysteinwerte senken kann Offen bleibt jedoch, welchen Einfluss das auf die Morbidität beziehungsweise Mortalität in Verbindung mit einer Hyperhomocysteinämie hat.

Zur Beurteilung der Frage, ob der Homocysteinwert von Alter und Geschlecht abhängig ist teilten wir das Kollektiv von 100 Mutationsträgern nach Geschlecht getrennt in drei Altersgruppen ein: <30 Jahre, 30- 59 Jahre und >59 Jahre.

Mit zunehmendem Alter stieg der gemessene Homocysteinspiegel im Serum an, wobei Männer in allen drei Altersgruppen zu höheren Homocysteinwerten neigten als die untersuchten Frauen.

Unsere Untersuchungsergebnisse werden durch die anderer Studien unterstützt, die sich ebenfalls mit dem Einfluss von Alter, Geschlecht und Ernährungszustand auf den Homocysteinplasmaspiegel befassten. SASSI et al. (2002) zeigten in einer Untersuchung 147 offensichtlich gesunder Probanden, dass Frauen signifikant niedrigere Homocysteinspiegel aufwiesen als die untersuchten Männer. Auch RASMUSSEN et al. (1996) fanden bei

Männern höhere Plasmahomocysteinspiegel als bei Frauen. Erklärt wurden diese Ergebnisse mit geringerer Muskelmasse und unterschiedlichem Hormonstatus von Frauen gegenüber Männern. Der zunehmende Homocysteinspiegel im Alter wird allgemein durch eine verringerte Enzymaktivität, eingeschränkte Nierenleistung und reduzierte Vitaminszufuhr bei unausgeglichener Ernährung erklärt. Auch Medikamenteneinnahme wie z.B. Carbamazepine, Thiazide und Theophylline und bestimmte Erkrankungen, z.B. Tumorerkrankungen und Diabetes mellitus, erhöhen den Homocysteinspiegel. Der Anstieg des Homocysteinspiegels speziell bei älteren Frauen wurde in mehreren Studien dem Wegfall des homocysteinsenkenden Effekts von Östrogenen zugeschrieben.

Eine differenzierte vergleichende Betrachtung der Homocysteinwerte nach zusätzlicher Unterteilung des Kollektivs in die Gruppen I und II zeigte in keiner der 3 Altersgruppen, weder bei den untersuchten Männern noch bei den untersuchten Frauen, eine eindeutige Tendenz zu höheren Homocysteinwerten in der Gruppe der Patienten mit stattgehabtem thrombembolischem Ereignis.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Alfthan G, Aro A, Gey KF (1997) Plasma homocysteine and cardiovascular disease mortality. *Lancet* 349: 397
2. Ames M, Stephan B, Ihle A, Seyfert UT, Schenk JF (2003) Evidence of C677T methylenetetrahydrofolate reductase ("MTHFR") and hyperhomocysteinemia (H) – causal or casual coexisting risk factors? *ISTH Birmingham 2003*,P0368 (CD)
3. Amundsen T, Ueland PM, Waage A (1995) Plasma homocysteine levels in patients with deep venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1321-1323
4. Arruda VR, von Zuben PM, Chiaparini LC, Annichino- Bizzacchi JM, Costa FF (1997) The mutation Ala 677→Val in the methylene tetrahydrofolate gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. *Thromb Haemost* 77: 818-821
5. Bienvenue T, Ankri A, Chadeaux B, Montalescot G, Kamoun P (1993) Elevated total plasma homocysteine, a risk factor for thrombosis. Relation to coagulation and fibrinolytic parameters. *Thrombosis Research* 70: 123-9
6. Boers GHJ, Smalls AGH, Trijbels FJM, Fowler B, Bakkeren JAJM, Schoonderwaldt HC, Kleijer WJ, Kloppenborg WC (1985) Heterozygosity For Homocystinuria In Premature Peripheral And Cerebral Occlusive Arterial Disease. *N Engl J Med* 313: 709-715
7. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG (1995): A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 274: 1049- 1057
8. Brattström LE, Hardebo JE, Hultberg BL (1984) Moderate Homocysteinemia- A Possible Risk Factor For Arteriosclerotic Cerebrovascular Disease. *Stroke* 15: 1012-1016

9. Brattström LE, Wilchen DEI, Ohrvik J, Brudin L. (1998) Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinaemia but not to vascular disease- the result of a meta- analysis. *Circulation* 98: 2520-2526

10. Brattström LE, Israelsson B, Jeppson JO, Hultberg BL (1988) Folic acid- An innocuous means to reduce plasma homocysteine. *Scan J Clin Lab Invest* 48: 215-221

11. Brattström LE, Israelsson B, Lindgarde F, Hultberg BL (1988) Higher total plasma homocysteine in vitamin B 12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine- β -synthase deficiency. *Metabolism* 37: 175-178

12. Brattström LE, Tengborn L, Lagerstedt C, Israelsson B, Hultberg B (1991) Plasma Homocysteine in Venous Thrombembolism. *Haemostasis* 21: 51-57

13. Breddin K, Grun H, Krzywanek HJ, Schremmer WP (1975) Zur Messung der spontanen Thrombozytenaggregation. Plättchenaggregationstest III Methodik. *Klin Wschr* 53: 81-89

14. Curtis D, Sparrow R, Brennan L, van der Weyden M (1994) Elevated serum homocysteine as a predictor for vitamin B 12 or Folate deficiency. *Eur J Haematol* 52: 227-232

15. De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, Serra FG, Voso MT, Casorelli I., Rossi E, Leone G (1998) Prevalence of the 677 C to T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene in itatlian patients with venous thrombotic disease. *Thromb Haemost* 79: 686-687

16. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM (1996) Inherited Thrombophilia: Pathogenesis, Clinical Syndromes and Management. *Blood* 87: 3531-3544

17. Den Heijer M, Blom H.J, Gerrits WBJ, Rosendaal FR, Haak HL, Wijermans PW, Bos GMJ (1995) Is hyperhomocysteinaemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet* 345: 882-885

18. Den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GMJ, Briet E, Reitsma PH, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR (1996) Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep vein thrombosis. *N Eng J Med* 334: 759-762
19. Engbersen AMT, Franken DG, Boers GHJ, Stevens EMB, Trijbels FJM, Blom HJ (1995) Thermolabile 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 56: 142-150
20. Falcon CR, Cattaneo M, Panzeri D, Martinelli I, Manucci PM (1994) High prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arterioscl Thromb* 14: 1080-1083
21. Fermo I, Vigano D'Angelo S, Paroni R, Mazzola G, Calori G, D'Angelo A (1995) Prevalence of moderate hyperhomocysteinemia in patients with early-onset venous and arterial occlusive disease. *Ann Intern Med* 123: 747-753
22. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Mathews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Huvel, Rozen R (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10: 111-113
23. Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM (1993) Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Atheroscler Thromb* 13: 1327-1333
24. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattström LE, Ueland PM, Palma-Reis RJ, Boers GHJ, Sheahan RG, Israelson B, Uiterwaal CS, Meleady R, McMaster D, Verhoef P, Witteman J, Rubba P, Bellet H, Wautrecht JC, deValck HW, Sales Luís AC, Parrot- Roulaud FM, Soon Tan K, Higgins I, Garcon D, Medrano MJ, Candito M, Evans AE, Andria G (1997) Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 277: 1775-1781

25. Jaques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg EH, Selhub J, Rozen R (1995) Relation between Folate Status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 93: 7-9
26. Kang SS, Wong PWK, Norusis M (1987) Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 36: 458-462
27. Kang SS, Wong PWK, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N (1991) Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 48: 536-545
28. Kluijtmans LAJ, den Heijer M, Reitsma PH, Heil SG, Blom H.J, Rosendaal FR (1998) Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase and factor V Leiden in the risk of deep- vein thrombosis. *Thromb Haemost* 79: 254-258
29. Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG (1988) Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* 318: 1720-1728
30. Lu Y, Zhao Y, Liu G, Wang X, Liu Z, hen B, Hui R (2002) Factor V gene G1691A mutation, prothrombin gee G20210A mutation annd MTHFFR gene C677T mutation are not risk factors for pulmonary thrombembolism in Chinese population. *Thrombosis Research* 106: 7-12
31. Mathews RG, Sheppard C, Goulding C (1998) MTHFR and methionine synthase: biochemistry and molecular biology. *Eur J Pediatr* 157: 54-59
32. Miletich JP, Sherman L, Broze G (1987) Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* 317: 991-996
33. Miller J, Ribaya-Mercado J, Russell R, Shepard D, Morrow F, Cochary E, Sadowski J, Gershoff S, Selhub J (1992) Effect of vitamin B 6 deficiency on fasting plasma homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr* 55: 1154-1160

34. Moriyama Y, Okamura T, Kajinami K, Iso H, Inazu A, Kawashiri M, Mizuno M, Takeda Y, Sakamoto Y, Kimura H, Suzuki H, Mabuchi H (2002) Effects of serum B vitamins on elevated plasma homocysteine levels associated with the mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene in Japanese. *Atherosclerosis* 164: 321- 328
35. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM (1996) A common genetic variation in the 3'- untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 88: 3698-3703
36. Rasmussen K, Møller J, Lynbak M, Holm Pedersen AM, Dybkær L (1996) Age- and gender-specific reference intervals for total homocysteine and methylmalonic acid in plasma before and after vitamin supplementation. *Clinical Chemistry* 42: 630-636
37. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpainter K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP (1995) Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 332: 912-917
38. Rodgers GM, Conn MT (1990) Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* 75: 895-901
39. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH (1995) High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 85: 1504-1508
40. Sassi S, Cosmi B, Palareti G, Legnani C, Grossi G, Musolesi S, Coccheri S (2002) Influence of age, sex and vitamin status on fasting and post methionin load plasma homocysteine levels. *Haematologica* 87: 957-964
41. Schenk JF, Koenig J, Ihle A, Mörsdorf S, Stephan B, Herrmann FH, Wenzel E, Pindur G (2001) Hyperhomocysteinemia – Involvement of genetic abnormalities and influence on platelet function. *Thromb Haemost; Suppl.*: 645

42. Schröder W, Koesling M, Wulff K, Wehnert M, Herrmann FH (1996) Large scale screening for factor V Leiden mutation in North-Eastern German population. *Haemostasis* 26: 233-236
43. Simioni P, Prandoni P, Burlina A, Tormene D, Sardella C, Ferrari V, Benedetti L, Girolami A (1996) Hyperhomocysteinemia and deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost* 76: 883-886
44. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J (1988) Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography- mass spectrometry. *J Clin Invest* 81: 466-474
45. Svensson PJ, Dahlbäck B (1994) Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 330: 517-522
46. Tait RC, Walker ID, Perry DJ, Islam S, Daly ME, McCall F, Conkie JA, Carrell RW (1994) Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. *Br J Haematol* 87: 106-112
47. Ubbink JB, Hayward Vermak WJ, van der Merve A, Becker PJ (1993) Vitamin B-12, vitamin B-6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr* 57: 47-53
48. Ueland PM, Refsum H, Brattstrom LE (1992) Plasma homocysteine and cardiovascular disease, in Francis RBJ (ed) *Atherosclerotic Cardiovascular Disease, Hemostasis and Endothelial Function*. New York, NY, Dekker: 183-236
49. Virchow R (1865) *Thrombose und Embolie. Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin*. Berlin Marxisch 219
50. Wilcken DEL, Wilcken B (1976) The Pathogenesis of Coronary Artery Disease: A Possible Role For Methionine Metabolism. *J Clin Invest* 57: 1079-1082

51. Wuillemin WA, Solenthaler M (1999) Hyperhomocysteinämie: Risikofaktor für arterielle und venöse thrombotische Erkrankungen. *VASA* 28: 151-155

52. Robinson K, Arheart K, Refsum HM, Brattström LE, Boers GHJ, Ueland PM, Rubba P, Palma-Reis RJ, Meleady R, Daly L, Wittman J, Graham I (1998) Low circulating folate and vitamin B6 concentrations. *Circulation* 97: 437- 443

7. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. J. F. Schenk, für die Bereitstellung des Themas sowie für all die Hilfestellung und Anregungen, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Auch danke ich Herrn Dr. Stephan, der mir auch in organisatorischen Fragen hilfreich zur Seite stand.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. König, Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und medizinische Informatik für seine Hilfestellung im Umgang mit der Statistik, und meinem Kommilitonen Michael Ames für seine Unterstützung bei der statistischen Datenauswertung.

8. LEBENS LAUF

Persönliche Informationen

- Name: Anita Ihle
- Ebertstraße 27
72072 Tübingen
Tel.: 07071/ 407551
e-mail: anita.ihle@web.de

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsdatum: 04. Mai 1977
- Geburtsort: Laupheim
- Eltern:
Vater: Dionysius Ihle
Mutter: Gertrud Ihle, geb. Lange
- Geschwister:
Martin Ihle, geb. am 19.07.1971
Ulrike Ihle, geb. am 13.09.1974

Schulische Laufbahn

Grundschule Aulendorf
August 1983 bis Juni 1987

Gymnasium Aulendorf
September 1987 bis Juni 1996

Allgemeine Hochschulreife am 25. Juni 1996

Studium

Immatrikulation für das Fach Humanmedizin an der Universität des Saarlandes, medizinische Fakultät Homburg/ Saar
Wintersemester 1996
Abschluss des Studiums im Oktober 2002

Arbeitsstelle

Anstellung ab dem 01.03.2003 an den Universitätskliniken Tübingen,
Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin (Direktor: Prof. Dr.
med. K. Unertl)