

**Einfluss des Transmethylierungshemmers
3-Deazaadenosin auf den Lipoprotein-
und Homocysteinstoffwechsel von
Apo E-Knockout Mäusen**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
am Fachbereich Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität in Gießen**

**vorgelegt von Marco Dominick geb. Schleich
aus Fulda**

Gießen, 2004

**Aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. Dr. N.Katz**

Gutachter: Prof. Dr. Dr. N.Katz

Gutachter: Prof. Dr. Weiler

Tag der Disputation: 26.01.2005

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	I
II. Abbildungsverzeichnis.....	VII
III. Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
2 Material und Versuchstiere	12
2.1 Material	12
2.1.1 Geräte	12
2.1.2 Chemikalien	12
2.1.3 Verwendete Reagenzien bei der mechanisierten Messung verschiedener Substanzen im Serum bzw. im Leberhomogenat.....	13
2.1.3.1 Bestimmung des Gesamtproteingehalts im Leberhomogenat.....	13
2.1.3.2 Bestimmung des Triglyceridgehalts im Leberhomogenat und im Serum....	13
2.1.3.3 Bestimmung des Cholesteringehalts im Leberhomogenat und im Serum ...	14
2.1.3.4 Bestimmung des HDL-Cholesterins im Serum.....	14
2.1.3.5 Bestimmung des LDL-Cholesterins im Serum	15
2.1.3.6 Bestimmung des Homocysteins im Serum.....	15
2.1.3.7 Bestimmung der GPT (ALT) im Serum.....	15
2.1.3.8 Bestimmung der GOT (AST) im Serum	15
2.1.4 Sonstiges	16

2.2 Versuchstiere	16
2.2.1 Mausmodelle zur Entstehung von Atherosklerose.....	16
2.2.2 Atherosklerose bei Apo E defizienten Mäusen.....	17
2.2.3 Tierhaltung	17
2.3 Western-Diät	17
2.3.1 Atherogene Zusätze in der Diät	18
2.3.2 Rohrnährstoffe in der Diät.....	18
2.3.3 Umsetzbare Energie in der Diät	18
2.3.4 Mineralstoffe in der Diät.....	18
2.3.5 Spurenelemente in der Diät.....	18
2.3.6 Aminosäuren in der Diät	18
2.3.7 Vitamine Zusatz in der Diät	19
2.3.8 Fettsäuren in der Diät.....	19
3 Methodik	21
3.1 Einteilung der Gruppen	21
3.2 Präparation, Explantation der Aorta und des Herzens und Blutentnahme	21
3.3 Bestimmung des Gesamtprotein-, Cholesterin-, Cholesterinester-Triglycerid- und Phospholipidgehalts der Leber	22
3.3.1 Herstellung von Leberhomogenaten	22
3.3.2 Bestimmung des Gesamtproteins im Leberhomogenat	22
3.3.3 Bestimmung des Gesamttriglyceridgehalts im Leberhomogenat	23
3.3.4 Bestimmung des Gesamtcholesterins im Leberhomogenat	23
3.3.5 Extraktion der Gesamtlipide aus dem Leberhomogenat	24
3.3.6 High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC).....	24

3.3.6.1	Auftrennung der Neutrallipide durch HPLTC	25
3.3.6.2	Auftrennung der Phospholipide durch HPTLC.....	26
3.3.7	Fluoreszenzfärbung der HPTLC-Platten.....	27
3.3.7.1	Fluoreszenzscan der Neutrallipide	27
3.3.7.2	Fluoreszenzscan der Phospholipide	28
3.3.8	Phosphatidylcholin- und Phosphatidylethanolamin-Messung mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	28
3.4	Bestimmung der Serums substrate und Enzyme	30
3.4.1	Bestimmung der Triglyceride im Serum.....	30
3.4.2	Bestimmung des Gesamtcholesterins im Serum.....	31
3.4.3	Bestimmung des HDL-Cholesterins im Serum.....	31
3.4.4	Bestimmung des LDL-Cholesterins im Serum	31
3.4.5	Bestimmung des Homocysteins im Serum	32
3.4.6	Bestimmung der Leberenzyme im Serum.....	33
3.4.6.1	Bestimmung der GPT (ALT)	33
3.4.6.2	Bestimmung der GOT (AST).....	33
3.4.6.3	Bestimmung der GGT	34
3.5	Bestimmung des Blutbilds.....	34
3.6	Statistik.....	34
4	Ergebnisse.....	36
4.1	Einfluss einer 3-DZA-Behandlung auf die Aktivität der GOT, GPT und GGT im Serum von Apo E-Knockout Mäusen.....	36
4.1.1	Transaminasen (GOT, GPT).....	38
4.1.2	GGT	38
4.2	Einfluss einer Behandlung mit 3-DZA auf den Leberproteingehalt von Apo E-Knockout Mäusen.....	39

4.3 Einfluss einer 3-DZA-Behandlung auf die Phospholipidsynthese der Leber von Apo E-Knockout Mäusen	40
4.3.1 Bestimmung von Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) mittels Anionenaustausch-HPLC.....	41
4.3.2 Ermittlung des PC/PE Verhältnis nach Auftrennung der Phospholipide mittels Anionenaustausch-HPLC	42
4.3.3 Bestimmung der Hauptphospholipidfraktionen mittels HPTLC und Fluoreszenzmarkierung	43
4.3.4 Ermittlung des PC/PE Verhältnisses nach Auftrennung der Phospholipide mittels HPTLC und Fluoreszenzmarkierung	44
4.4 Einfluss einer Behandlung mit 3-DZA auf den Triglyceridgehalt der Leber von Apo E-Knockout Mäusen	45
4.5 Einfluss einer 3-DZA-Behandlung auf den Cholesteringehalt der Leber von Apo E-Knockout Mäusen.....	47
4.5.1 Einfluss einer Behandlung mit 3-DZA auf das Lebergesamtcholesterin bei Apo E-Knockout Mäusen.....	48
4.5.2 Einfluss einer Behandlung mit 3-DZA auf das freie Cholesterin und die Cholesterinester in der Leber bei Apo E-Knockout Mäusen	49
4.6 Einfluss einer 3-DZA-Behandlung auf Bestandteile im Serum.....	51
4.6.1 Einfluss einer 3-DZA-Behandlung auf die Serumcholesterinkonzentration von Apo E-Knockout Mäusen.....	51
4.6.2 Einfluss einer 3-DZA-Behandlung auf die HDL- und LDL-Konzentrationen im Serum von Apo E-Knockout Mäusen	52
4.6.3 Einfluss von 3-DZA auf die Serumtriglyceridkonzentration von Apo E-Knockout Mäusen	54
4.6.4 Einfluss von 3-DZA auf den Serumhomocysteinspiegel von Apo E-Knockout Mäusen	56
5 Diskussion.....	58
5.1 Vorstellung der Studienergebnisse bezüglich der Plaque-entwicklung und der Expression von ICAM-1 und VCAM-1	58

5.1.1	Einfluss von 3-DZA auf Plaqueanzahl und –fläche bei Apo E-Knockout Mäusen	58
5.1.2	Einfluss von 3-DZA auf die Expression von Endothelzellen-adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) bei Apo E-Knockout Mäusen	60
5.1.3	Einfluss der Western-Diät auf das Körpergewicht unbehandelter und mit 3-DZA behandelter Apo E-Knockout Mäuse	61
	Stoffwechsel von Apo E-Knockout Mäusen und Wirkung von 3-DZA	61
5.2	Leberstoffwechsel bei Apo E-Mangel	62
5.2.1	Lebertriglyceride bei Apo E-Mangel	63
5.2.2	Lebercholesterin bei Apo E-Mangel	63
5.2.3	Gesamtphospholipide bei Apo E-Mangel	64
5.3	Wirkung von 3-DZA auf den Leberstoffwechsel bei Apo E-Knockout Mäusen.....	64
5.3.1	Leberenzyme bei Apo E-Knockout Mäusen unter 3-DZA-Therapie.....	64
5.3.2	Leberprotein bei Apo E-Knockout Mäusen unter 3-DZA-Therapie.....	64
5.3.3	Phospholipidsynthese und VLDL-Sekretion unter 3-DZA-Therapie	65
5.3.4	Lebercholesterin bei Apo E-Knockout Mäusen unter 3-DZA-Therapie	69
5.4	Lipoproteinstoffwechsel bei Apo E defizienten Mäusen	69
5.4.1	Serumcholesterinspiegel bei Apo E-Knockout Mäusen	69
5.4.2	Serumtriglyceridspiegel in Apo E-Knockout Mäusen	70
5.5	Einfluss von 3-DZA auf den Lipoprotein- und Homocysteinmetabolismus.....	71
5.5.1	Serumlipoproteine unter 3-DZA-Therapie bei Apo E-Knockout Mäusen.....	71
5.5.2	Serumhomocystein unter 3-DZA-Therapie bei Apo E-Knockout Mäusen	72
5.6	Einfluss von 3-DZA auf die Entstehung von Atherosklerose	73
5.6.1	Bedeutung des Serumcholesterins bei der Entstehung von Atherosklerose	73
5.6.1.1	Bedeutung des Serumcholesterins bei der Entstehung von Atherosklerose bei Apo E defizienten Mäusen	74

5.6.2	Bedeutung des Serumhomocysteins bei der Entstehung von Atherosklerose	75
5.6.2.1	Bedeutung des Serumhomocysteins bei der Entstehung von Atherosklerose bei Apo E defizienten Mäusen unter 3-DZA-Behandlung.....	76
5.6.3	Bedeutung der Expression der Endothelzellenadhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 bei der Entstehung von Atherosklerose	76
5.6.3.1	Einfluss von Homocystein auf die Expression von VCAM 1.....	77
5.6.3.2	Einfluss von 3-DZA auf die Expression von VCAM-1 und ICAM-1	78
5.6.3.3	Expression der Endothelzellenadhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 bei Apo E-Knockout Mäusen unter 3-DZA.....	78
5.7	Klinische Erfahrungen mit Nukleosidanaloga beim Einsatz in der HIV-Therapie.....	79
5.8	Gesamtbeurteilung	81
6	Zusammenfassung	83
7	Literatur	85
8	Danksagung	97

Anhang : Zusammenfassung, Abstract, Lebenslauf

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Geschätzte Prävalenz der KHK bei US-Amerikanern.....	1
Abbildung 2: Atherosklerose einer Koronararterie	2
Abbildung 3: Strukturformel 3-Deazaadenosin.....	4
Abbildung 4: Reaktionskaskade im Methionin/Homocysteinestoffwechsel.....	6
Abbildung 5: Synthese von Phosphatidylcholin durch Methylierung von Phosphatidylethanolamin	7
Abbildung 6: Synthese und Metabolismus der Lipoproteine	9
Abbildung 7: Chromatogramm der Neutrallipide (Coomassie Blue-Färbung)	26
Abbildung 8: Chromatogramm der Phospholipide (Coomassie Blue-Färbung)	26
Abbildung 9: Scan eines fluoreszenzgefärbten Chromatogramms von Neutrallipiden.....	27
Abbildung 10: Scan eines fluoreszenzgefärbten Chromatogramms von Phospholipiden.....	28
Abbildung 11 : HPLC der Phospholipide	30
Abbildung 12: GPT, GOT und GGT im Serum.....	37
Abbildung 13: Leberproteingehalt unbehandelter und 3-DZA behandelter Apo E-Knockout Mäuse.....	39
Abbildung 14: PC und PE Konzentration in der Leber unbehandelter und 3-DZA behandelter APO E-Knockout Mäuse	41
Abbildung 15: PC/PE Verhältnis der Versuchstiergruppen nach Auftrennung der Phospholipide mittels Anionenaustausch-HPLC	42
Abbildung 16: Anteil der einzelnen Phospholipidfraktionen in den einzelnen Versuchstiergruppen nach HPTLC und Fluoreszenzmarkierung.	43
Abbildung 17: PC/PE Verhältnis nach Auftrennung der Phospholipide mittels HPTLC und Fluoreszenzmarkierung.	44
Abbildung 18: Triglyceridgehalt der Leber von Apo E-Knockout Mäusen mit und ohne 3-DZA-Behandlung.....	46
Abbildung 19: Lebergesamtcholesterin bei Apo E-Knockout Mäusen mit und ohne 3-DZA-Behandlung.....	49
Abbildung 20: Freies Cholesterin und Cholesterinester in der Leber bei APO E- Knockout Mäusen mit und ohne 3-DZA-Behandlung.	50

Abbildung 21: Serumcholesterinspiegel bei Apo E Mäusen mit und ohne 3-DZA-Behandlung.....	52
Abbildung 22: Einfluss einer 3-DZA-Behandlung auf die HDL- und LDL-Konzentrationen im Serum von Apo E-Knockout Mäusen.	53
Abbildung 23: Einfluss von 3-DZA auf die Serumtriglyceridkonzentration von Apo E-Knockout Mäusen.....	55
Abbildung 24: Einfluss von 3-DZA auf den Serumhomocysteinspiegel bei Apo E-Knockout Mäusen.....	56
Abbildung 25: Einfluss von 3-DZA auf die Plaqueanzahl bei Apo E-Knockout Mäusen	58
Abbildung 26: Einfluss von 3-DZA auf die Plaquefläche bei Apo E-Knockout Mäusen	59
Abbildung 27: Einfluss von 3-DZA auf die Expression von Endothelzellen-adhäsionsmolekülen bei Apo E-Knockout Mäusen	60
Abbildung 28: Kompetitive Hemmung der AHH durch 3-DZA.....	73

III. Abkürzungsverzeichnis

3-DZA: 3-Deazaadenosin

AHH: Adenosylhomocysteinhydrolase

Apo E: Apolipoprotein E

ApoE-ko-VLDL/IDL: VLDL und IDL Partikel bei Apo E-Knockout Mäusen =
Überreste von Chylomikronen

GGT: γ -Glutamyl-Transferase

GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

GPT: Glutamat-Pyruvat-Transaminase

HCY: Homocystein

HDL: High Density Lipoproteins

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HPTLC: High Performance Thin Layer Chromatography

HSDA: Sodium N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline

IDL: Intermediate Density Lipoproteins

LDH: Laktatdehydrogenase

LDL: Low Density Lipoproteins

MDH: Malatdehydrogenase

MOPS: 3-Morpholinopropansulfonsäure

PC: Phosphatidylcholin

PE: Phosphatidylethanolamin

PEG: Polyethylenglycol

PEMT: Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase

PI: Phosphatidylinositol

PIPES: Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)

PS: Phosphatidylserin

SAH: S-Adenosylhomocystein

SAM: S-Adenosylmethionin

SM: Sphingomyelin

TRIS: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

VLDL: Very Low Density Lipoproteins

WD: Western-Diät

WO: Wochen

1 Einleitung

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist in den westlichen Industriestaaten die häufigste Todesursache. Etwa 60 Millionen US-Amerikaner leiden an einer KHK [1] und 1998 sind in den USA fast 1 Millionen Menschen an den Folgen gestorben [2].

Geschätzte Prävalenz der KHK bei US-Amerikanern (USA 1988-94)

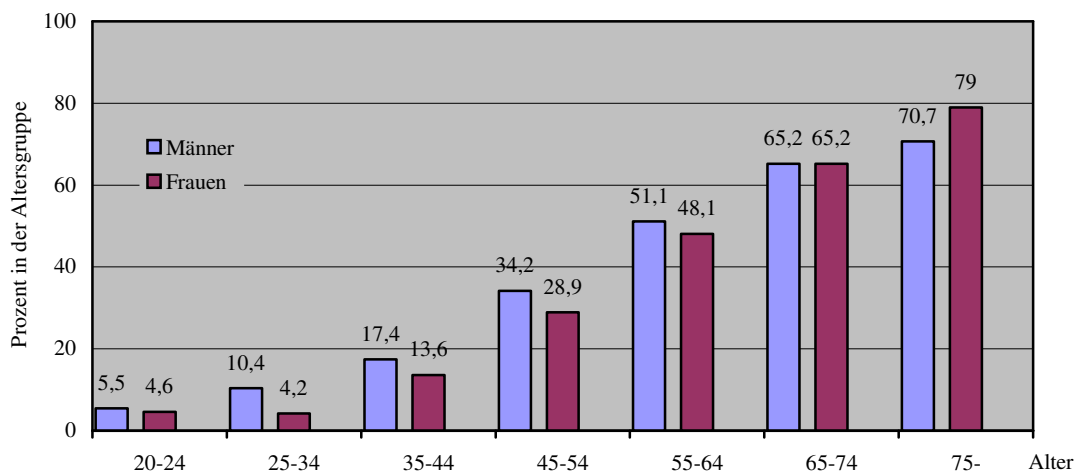


Abbildung 1: Geschätzte Prävalenz der KHK bei US-Amerikanern ab 20 Jahren geordnet nach Alter und Geschlecht (USA 1988-94) Aus: 2001 heart and stroke statistical update, American Heart Association; Quelle: NHANES III (1988-94), CDC/NCHS and the American Heart Association

Ursache dieser koronaren Mangelversorgung ist eine durch morphologisch fassbare Gefäßwandveränderungen (Atherosklerose) bedingte Lumeneinengung der Herzkranzgefäße. Bei Atherosklerose handelt es sich um einen fortschreitenden Prozess, der auch andere Gefäße wie die Aorta oder die Extremitäten versorgende Arterien (arterielle Verschlusskrankheit) betreffen kann. Unter Atherosklerose versteht man laut WHO-Definition die variable Kombination von Intimaveränderungen (der Arterien) bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Kalziumablagerungen (Kalkablagerungen), verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia [3]. Entsprechend der Framinghamstudie unterscheidet man unabhängige Risikofaktoren zur Entstehung von Atherosklerose wie männliches Geschlecht, hohes Lebensalter und familiäre Disposition zu Gefäßerkrankungen

gegenüber den abhängigen Risikofaktoren 1. Ordnung (arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, metabolisches Syndrom, Nikotinabusus) und 2. Ordnung (Lipoprotein (a) ↑, Hyperfibrinogenämie, Antiphospholipid-Antikörper, Bewegungsmangel, emotionaler Stress) [4]. Darüber hinaus wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass eine Korrelation zwischen erhöhten Serumhomocysteinspiegeln und der Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen besteht [5,143].

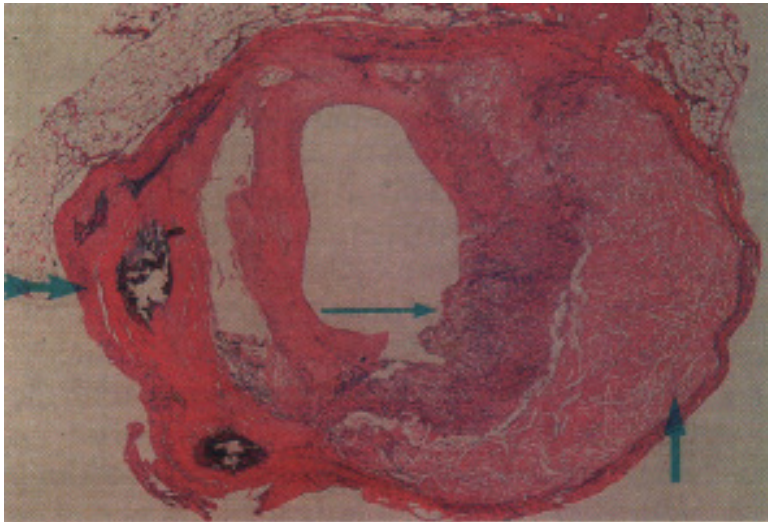


Abbildung 2: Atherosklerose einer Koronararterie. In der Intima befinden sich Makrophagen, die Lipide aufgenommen haben und als Schaumzellen bezeichnet werden (dünner Pfeil). Am rechten Bildrand befindet sich das Atherom. Die Schlitze darin sind auf Cholesterinkristalle zurückzuführen, die während der Präparation ausgewaschen wurden (dicker Pfeil). Am linken Bildrand sieht man Verkalkungen der Adventitia und Media (Doppelpfeil). Färbung: HE, Aus: Bühling, Lepenies, Witt Allgemeine und spezielle Pathologie, S.87

Das diagnostische und therapeutische Vorgehen bei einer KHK umfasst die Aufdeckung und Behandlung von potentiellen Risikofaktoren (Blutdrucknormalisierung, Einstellung des Blutzuckerspiegels, Senkung des Serumcholesterin- und Harnsäurespiegels, Nikotinabstinenz, Gewichtsreduktion), die Gabe von Plättchenaggregationshemmern (ASS, Clopidogrel), lumeneröffnende Maßnahmen (PTCA) sowie die Prophylaxe vor Angina-Pectoris-Anfällen bei KHK (lang und kurz wirksame Nitrate, Betablocker) [6]. Zur Senkung des Homocysteinspiegels wird in den USA die Gabe von Folsäure (400 mg/d) und

Vitamin B12 bzw. der Zusatz von Folsäure in Weizenprodukte empfohlen. Der Mangel an Folsäure oder an Vitamin B 12 führt über ein Ungleichgewicht bei 5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein-Methyltransferasereaktionen (siehe Abb. 4 Methionin/Homocystein-Stoffwechsel) zu einer intrazellulären Homocysteinakkumulation sowie zum Anstieg des Serumhomocysteinspiegels [7]. Bisher besteht die Therapie vorwiegend in der Prophylaxe und der Verhinderung weiterer Progression schon bestehender atherosklerotischer Veränderungen. Eine wirksame medikamentöse Behandlung zur Zurückbildung atheromatöser Plaques existiert im klinischen Einsatz noch nicht. Aufgrund der hohen Kosten von Atherosklerose im Gesundheitssystem der meisten Industriestaaten ist die Erforschung der Pathogenese und möglicher Therapieansätze Inhalt zahlreicher klinischer und experimenteller Studien.

Atherosklerosemodell Apo E-Knockout und Apo E-Genpolymorphismus

Grundlage unserer Studie ist das Modell von Apolipoprotein E-Knockout Mäusen, welche schwere atherosklerotische Läsionen entwickeln. Diese können durch Fütterung einer cholesterinreichen Diät verstärkt werden [8,9].

Bei einigen Patienten, bei denen das Fehlen von Apolipoprotein E (Apo E) beschrieben ist, kommt es zu stark erhöhten Cholesterin- und Triglyceridspiegeln [10,11] im Blut sowie zur Anreicherung von Remnant-Partikeln (Hyperlipidämie Typ III) und damit zur frühzeitigen Entstehung von Atherosklerose [12]. Darüber hinaus gibt es einen Apo E-Genpolymorphismus, der in ursächlicher Beziehung zur Entwicklung von Atherosklerose steht. Es existieren an dem für das Protein kodierenden Genlocus 3 Allele, welche als Apo E2, Apo E3 und Apo E4 bezeichnet werden; hieraus resultiert, dass 6 verschiedene Phänotypen gefunden werden können. Wie Untersuchungen in der Bevölkerung gezeigt haben, stellt Apo E3 das Wildtypallel dar [13]; die Verteilung sieht wie folgt aus: E2/E2: 1%, E3/E3: 63%, E4/E4: 2%, E2/E3: 11%, E2/E4: 3%, E3/E4: 2% [14]. Apo E2 führt zu einer verminderten Clearance von Remnant-Partikeln durch die Leber, während Apo E4 offenbar zur Serumcholesterinerhöhung bei fettreicher Ernährung prädisponiert [15]; die LDL-Spiegel sind leicht erhöht [16,17]. Die Framinghamstudie hat ein erhöhtes

Risiko für die Entstehung einer KHK bei Vorliegen des E2 und des E4 Allels (auch bei Heterozygoten) nachgewiesen [18].

Um die Entstehung von Atherosklerose bei den Apo E defizienten Mäusen weiter zu begünstigen wurden die Versuchstiere 12 und 24 Wochen lang mit einer cholesterinreichen, so genannten „Western-Diät“ gefüttert.

Behandlung mit 3-Deazaadenosin

Parallele Gruppen der Apo E defizienten Mäuse erhielten 3-Deazaadenosin (3-DZA), welches ein strukturelles Analogon des Nucleosids Adenosin ist und sich aus der Purinbase Adenin und dem C₅ – Zucker D-Ribose zusammensetzt. 3-DZA wird durch eine Desadenylierung an Position 3 des Adeningerüsts synthetisch hergestellt. Die chemische Struktur ist in Abbildung 3 dargestellt.

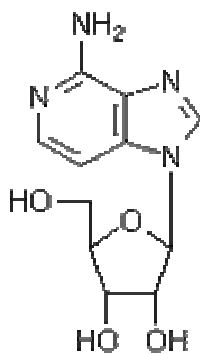


Abbildung 3: Strukturformel 3-Deazaadenosin

Summenformel: C₁₁H₁₂O₄N₄

Relatives Molekulargewicht: 266 Dalton

3-DZA ist ein Wirkstoff, dem eine antivirale Aktivität gegen das Retrovirus HIV zugeschrieben wird [19,20]. Darüber hinaus soll 3-DZA einen immunsuppressiven sowie antiinflammatorischen Effekt [21,22] besitzen, welcher durch eine Hemmung der Chemotaxis und Phagozytose von Monozyten [23-26] zustande kommen soll. Aufgrund der entzündungshemmenden Wirkung wurde 3-DZA bereits in klinischen Studien an Patienten mit rheumatoider Arthritis erfolgreich eingesetzt [27]. Es wird postuliert, dass 3-DZA im Zusammenwirken mit Homocystein eine Apoptose bei humanen Lymphomzellen (HL-60 Zellen) induziert. Man vermutet, dass diese antiproliferative und apoptoseinduzierende Wirkung über eine Hemmung der RNA- und DNA-Synthese verursacht wird [28,29].

Einfluss von 3-DZA auf die Entstehung von Atherosklerose

Am Tiermodell mit C57BL/6-Mäusen, welche eine Atherosklerose verursachende Spezialdiät bekamen, konnte bereits gezeigt werden, dass mit 3-DZA behandelte Tiere deutlich weniger atherosklerotische Läsionen in der Aorta aufwiesen als Kontrolltiere [44]. Man führte dies auf eine immunmodulatorische Wirkung von 3-DZA zurück. 3-DZA vermindert die Expression von Endothelzellenadhäsionsmolekülen (VCAM-1, ICAM-1) und damit kommt es zu einer reduzierten Monozytenadhäsion sowie -infiltration, was beides bei der Pathogenese von Atherosklerose eine wichtige Rolle spielt [45-54]. Im Tiermodell an Ratten, bei welchen durch Lipopolysaccharid ein kardiogener Schock verursacht wurde, konnte ebenso gezeigt werden, dass 3-DZA einen schützenden Effekt vor linksventrikulärer Dysfunktion hervorruft. Dies wurde gleichermaßen über eine verminderte Expression von Endothelzellenadhäsionsmolekülen (VCAM-1, ICAM-1) und einer damit verbundenen reduzierten Monozytenadhäsion sowie -infiltration erklärt [142].

Die Ergebnisse weiterer Untersuchungen führen zu der Annahme, dass 3-DZA seine Wirkung über eine Hemmung von Transmethylierungsreaktionen entfalten kann, die bei einer Vielzahl von Stoffwechselreaktionen wie z.B. im Methionin-/Homocystein- oder im Phospholipidstoffwechsel von zentraler Bedeutung sind (Abb. 5) [30,31].

Einfluss von 3-DZA auf den Methionin/Homocystein-Stoffwechsel

Der Methionin/Homocystein-Stoffwechsel spielt im Zellstoffwechsel eine zentrale Rolle bei der Methylgruppenübertragung. Eine der wichtigen Schlüsselreaktionen ist die Bildung des S-Adenosylmethionins (SAM). SAM entsteht durch den Transfer des Adenosinrests von ATP auf das Schwefelatom des Methionins. Durch die Übertragung der Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf einen Akzeptor wie Phosphatidylethanolamin entsteht S-Adenosylhomocystein (SAH), das durch die Adenosylhomocysteinhydrolase (AHH) in Adenosin und Homocystein gespalten wird. Methionin kann durch den Transfer einer Methylgruppe von 5-Methyltetrahydrofolat auf Homocystein regeneriert werden; Coenzym bei dieser Methylgruppenübertragung ist das vom Vitamin B12 abgeleitete Methylcobalamin [32].

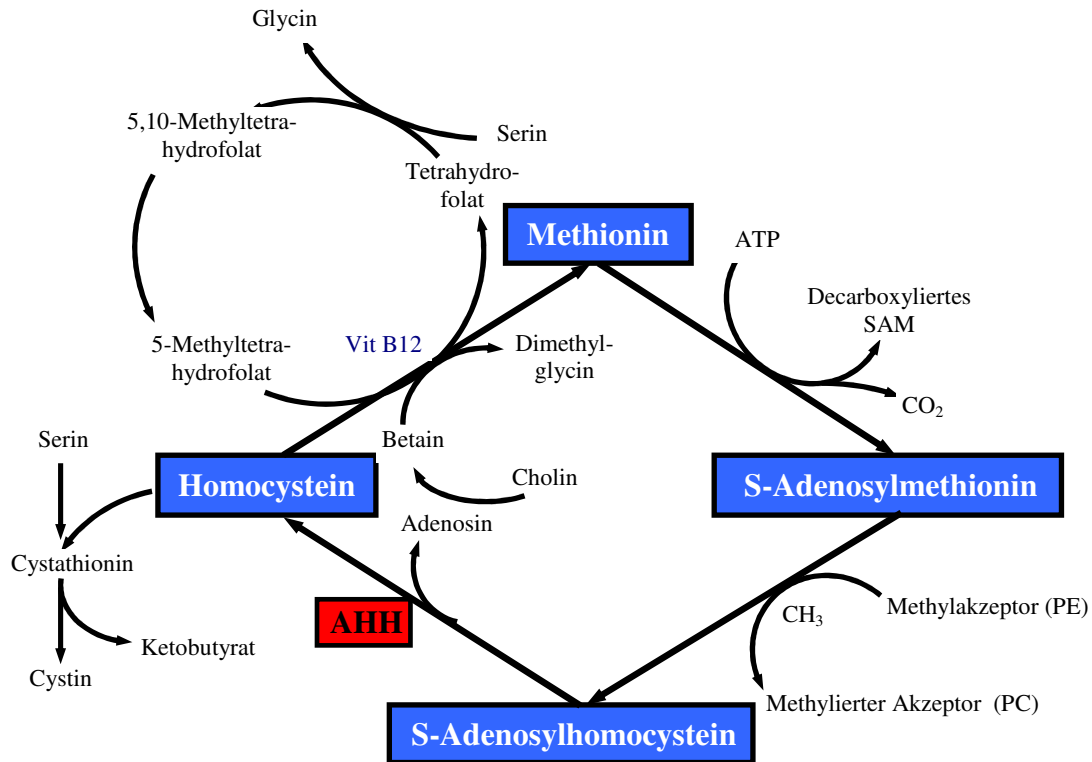


Abbildung 4: Reaktionskaskade im Methionin/Homocysteinstoffwechsel

Adenosinanaloga wie 3-DZA können als kompetitive Inhibitoren der AHH wirken [30].

Die daraus resultierenden metabolischen Veränderungen können sich in zwei Stoffwechselwegen bemerkbar machen:

- (1) **Einfluss einer Hemmung der AHH auf den Ablauf des Homocysteinstoffwechsels**
 Der S-Adosylhomocystein-Stoffwechsel ist bei Wirbeltieren die einzige Quelle für Homocystein [33]; Inhibitoren und Substrate der AHH könnten deswegen zum Mangel dieser Aminosäure in der Zelle führen [34,35]. Weil Homocystein als Akzeptor von Methylgruppen in 5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein-Methyltransferasereaktionen (siehe Abbildung 4) dient, könnten verschiedene folatabhängige Reaktionen beeinflusst werden [33]. Der Mangel am Akzeptor Homocystein könnte daher Ursache für die Hemmung des Zellwachstums in Anwesenheit von Nukleosidanaloga sein [36,37].
- (2) **Einfluss einer Hemmung der AHH auf den Ablauf anderer Methylierungsreaktionen**
 Die Hemmung der AHH führt zur Anhäufung von S-Adosylhomocystein. SAH und einige seiner Analoga wie 3-Dezaadenosylhomocystein, welches bei der

Hemmung der AHH durch 3-DZA entsteht [38], sind kompetitive Inhibitoren von zahlreichen S-Adenosylmethioninabhängigen Transmethylierungsreaktionen [30,31]. Solche Methylierungsreaktionen spielen bei der Phospholipid-, Protein- und RNA-Synthese, sowie bei der Nicotinamidmethylierung und bei der Biosynthese der Katecholamine (Methylierung von Noradrenalin zu Adrenalin) eine Rolle; eine Störung dieses Stoffwechselweges kann unterschiedliche Effekte auf die Zelle haben [39].

Einfluss einer Hemmung der AHH auf den Phospholipidstoffwechsel

Das Enzym Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase (PEMT), welches die Methylierung von Phosphatidylethanolamin (PE) zu Phosphatidylcholin (PC) katalysiert, ist durch das SAM/SAH-Verhältnis beeinflussbar [40]. In dieser Reaktion wird PE durch dreifache Methylgruppenübertragung in PC umgewandelt; als Methylgruppendonator dient SAM [41]. SAH hemmt kompetitiv die PEMT und blockiert somit die Synthese von PE aus PC.

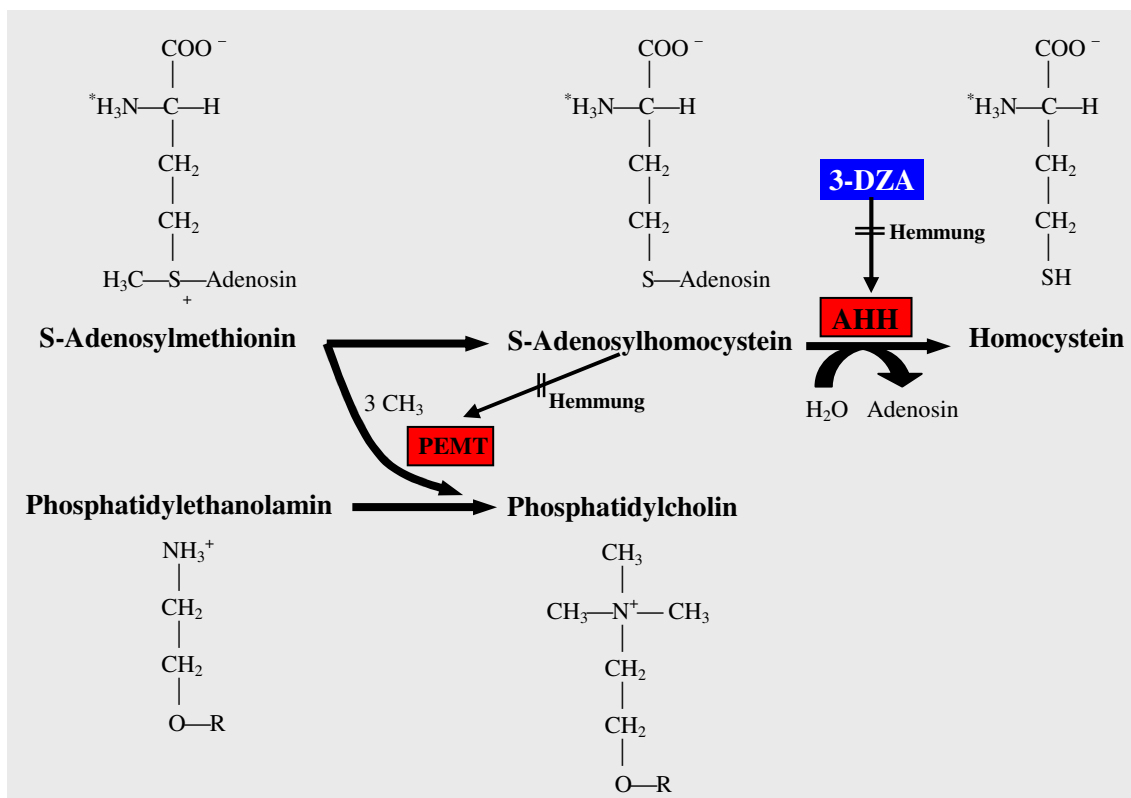


Abbildung 5: Synthese von Phosphatidylcholin durch Methylierung von Phosphatidylethanolamin

3-DZA führt über eine Hemmung der AHH zum Rückstau von SAH, was wiederum eine Hemmung der PEMT zur Folge hat [42]

Die Hemmung dieses Schrittes des Phospholipidstoffwechsels durch 3-DZA kann Einfluss auf den Lipoproteinstoffwechsel haben [43], welcher im Folgenden kurz beschrieben und in Abbildung 6 dargestellt wird.

Lipoproteinstoffwechsel [32]

Lipoproteine dienen dem Transport von Cholesterin, Cholesterinestern und Triglyceriden in den Körperflüssigkeiten. Diese hydrophoben Moleküle befinden sich im Inneren des Lipoproteinpartikels, während die Oberfläche durch die hydrophilen Anteile der Phospholipide und verschiedene Apoproteine gebildet wird. Die Apoproteine haben zwei Funktionen: sie stabilisieren die hydrophoben Lipide und enthalten Signale, die den Transport zu bestimmten Zellen regulieren. Die Lipoproteine werden nach steigender Dichte in Chylomikronen, Chylomikronen Remnants, VLDL (Very Low Density Lipoproteins), LDL (Low Density Lipoproteins) und HDL (High Density Lipoproteins) klassifiziert.

Triglyceride, Cholesterin und andere Lipide aus der Nahrung werden in Form von Chylomikronen vom Darm zum Fettgewebe und zur Leber transportiert. Chylomikronen sind reich an Triglyceriden und werden von Lipoproteinlipasen hydrolysiert, die in den Auskleidungen der Blutgefäße im Muskel und anderen peripheren Geweben lokalisiert sind. Der cholesterinreiche Rest, den man Chylomikronen-Remnant nennt, wird von der Leber aufgenommen.

Von der Leber nicht benötigte Triglyceride und Cholesterin werden in Form von Lipoproteinen sehr geringer Dichte (VLDL) in das Blut abgegeben. Die Triglyceride der VLDLs werden wie die der Chylomikronen von Lipasen hydrolysiert. Die entstehenden, an Cholesterinestern reichen Überreste werden als Lipoproteine mittlerer Dichte (IDL) bezeichnet. Ein Teil dieser Partikel wird von der Leber aufgenommen, der andere zu Lipoproteinen geringer Dichte (LDL) umgewandelt.

LDL-Partikel sind die wichtigsten Cholesterincarrier des Blutes. Die Funktion der LDL-Partikel besteht darin, Cholesterin zu peripheren Geweben zu transportieren und dort die de novo Synthese des Cholesterins zu kontrollieren.

Die Lipoproteine hoher Dichte (HDL) haben eine andere Funktion: sie nehmen Cholesterin auf, das von absterbenden Zellen und abgebauten Membranen an das Blutplasma abgegeben wird. Eine Acyltransferase der HDL-Partikel verestert dieses Cholesterin, das von einem Transferprotein rasch an VLDL oder LDL weitergegeben wird.

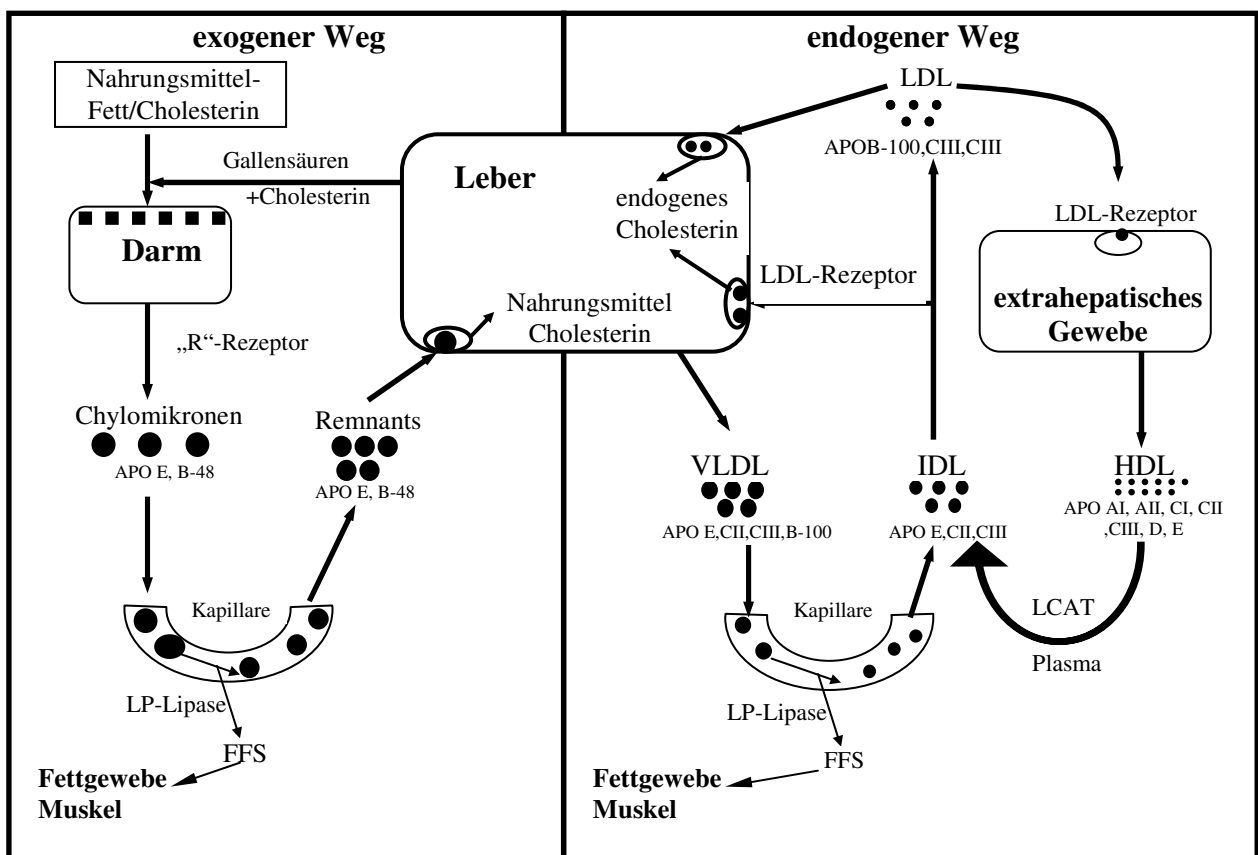


Abbildung 6: Synthese und Metabolismus der Lipoproteine

Wie aus Abbildung 6 zu entnehmen ist, kommt dem Apolipoprotein E (Apo E) eine wichtige Rolle im exogenen und endogenen Weg des Lipoproteinstoffwechsels zu.

Funktion von Apo E im Lipoproteinstoffwechsel

Als Atherosklerosemodell dienten in der vorliegenden Studie Apo E Knockout-Mäuse. Apo E ist ein wichtiger Proteinbaustein der triglyceridreichen Chylomikronen, VLDL und IDL [32]. Es spielt sowohl bei **(a)** der Aufnahme als auch bei **(b)** der Sekretion der Partikel eine Rolle [73,74].

- (a)** Apo E könnte zum einen an der Steuerung der Lipoproteinlipase beteiligt sein [76,77] und fungiert zum anderen als Ligand bei der rezeptorvermittelten Aufnahme der Chylomikronen-Remnants durch die Leber [75]. Die Aufnahme der zirkulierenden Lipoproteine durch Endozytose wird durch die Bindung von Apo E an hepatische Proteoglykane erleichtert. In vitro Studien haben gezeigt, dass Apo E außerdem im intrazellulären Metabolismus und der Verteilung der endozytierten Lipide in Makrophagen und Hepatomzellen mitwirkt [78,79].
- (b)** Auch beim Zusammenbau und der Sekretion von VLDL hat Apo E eine wichtige Funktion. Die Stimulation der VLDL-Synthese bei Ratten steigert gleichzeitig die Apo E-Synthese und -sekretion durch Promotion der Transkription des Apo E Gens [80]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Apo E in reifenden VLDL-Partikeln in Vesikeln des Golgiapparats von Rattenhepatozyten vorhanden ist [81]. An menschlichen Hepatomzellen (HepG2) konnte gezeigt werden, dass der größte Anteil des Apo E mit großen, triglyceridreichen Lipoproteinen verbunden ist, wenn die Lipogenese dieser Zellen stimuliert wird. Dabei ist die Gesamt-Apo E-Synthese und -sekretion jedoch nicht beeinflusst [82]. Die Verbindung zwischen Apo E und triglyceridreichen Lipoproteinen in HepG2 Zellen und Rattenhepatomzellen findet hauptsächlich intrazellulär statt [83]. Darüber hinaus scheint Apo E bei der Verbindung von neu synthetisierten Triglyceriden mit VLDL-Partikeln beteiligt zu sein [84].

Das Fehlen von Apo E führt einerseits durch eine gestörte Aufnahme der Chylomikronen-Remnants zum Aufstau dieser atherogenen Lipoproteine [73,90,160], andererseits kommt es durch eine gestörte VLDL-Sekretion zur Akkumulation von Triglyceriden in der Leber [69].

Zielsetzung der Studie

Hauptziel dieser Studie ist es zu prüfen, ob eine Therapie mit 3-DZA die Entwicklung von Atherosklerose in der Aorta beeinflussen kann.

Es soll untersucht werden, inwieweit eine orale Applikation von 3-DZA in konstanter Dosis über ein bestimmtes Zeitintervall den gestörten Lipoproteinstoffwechsel der Leber und den pathologischen Triglycerid- und Cholesterinspiegel im Blut günstig beeinflussen kann. Der Nachweis atherosklerotischer Läsionen am betroffenen Gefäß und die Bestimmung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 am Gefäßendothel dienen als weitere wichtige diagnostische Kriterien (durchgeführt durch die Abteilung Kardiologie der Medizinischen Klinik I des Uniklinikums Gießen, Arbeitsgruppe Haberbosch). Parallel dazu wird auch geprüft, ob 3-DZA tatsächlich als kompetitiver Hemmstoff im Homocystein- bzw. Phospholipidstoffwechsel wirkt und eine deutliche Senkung des proatherogenen Faktors Homocystein im Blut erreicht werden kann.

Da Nebeneffekte im Sinne von irreversiblen Leberzellschäden durch eine Therapie mit einem antiproliferativ wirkenden Agens wie 3-DZA nicht auszuschließen sind, werden auch die Transaminasen GOT, GPT und die GGT als Marker für die Integrität der Hepatozyten und des Gallengangsystems herangezogen. Der Gehalt an Triglyceriden und Cholesterin in der Leber wurde aufgrund der veränderten Lipoproteinsekretion bei Apo E-Defizienz ebenfalls gemessen. Um eine mögliche Knochenmarkstoxizität festzustellen, wurden Blutbildkontrollen durchgeführt.

2 Material und Versuchstiere

2.1 Material

2.1.1 Geräte

- Analyseautomat Hitachi 917 (Boehringer, Mannheim)
- Analysenwaage Typ BP211D (Sartorius, Göttingen)
- Dreh-Schüttelapparat Rettberg R-01 (MAGV, Rabenau-Londorf)
- Elektronisches Thermometer Typ DT 100P (Behring, Marburg)
- Heizrührer IKAMAG REO und IKAMAG RCT (IKA-Labortechnik, Jahnke + Kunkel, Staufen)
- PH-Einmaßstabkette Typ N6280 und pH-Meter CG 840 (Schott Geräte GmbH, Hofheim)
- Potter Homogenisator Typ RM 14 (Jahnke + Kunkel, Staufen)
- Sartorius Basic Feinwaage Typ BA310P (Sartorius, Göttingen)
- Beckman Appraise Densitometer
- Merck / Hitachi HPLC – System: Pumpe, L-4250 UV/VIS Detektor, D-2500 Chromatogramm Integrator (Merck, Darmstadt)
- Durchflusszytometer Sysmex SE-9000 , (Firma TOA in Kobe/Japan)

2.1.2 Chemikalien

- Acetonitril, gradient grade (Merck, Darmstadt)
- Chloroform (Merck, Darmstadt)
- Cholesterin, frei (Sigma, Deisenhofen)
- Cholesterinoleat (Sigma, Deisenhofen)
- Cholesterinlinoleat (Sigma, Deisenhofen)
- Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma, Deisenhofen)
- Desoxychelat (Sigma, Deisenhofen)
- Diethylether (Merck, Darmstadt)
- Essigsäure, 5% (v/v) (Merck, Darmstadt)
- Ethylacetat (Merck, Darmstadt)

- Fluoreszenzlösung: 15mg 1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien / 100 ml Hexan (Sigma/ Deisenhofen)
- Hexan (Merck, Darmstadt)
- Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Methanol, gradient grade (Merck, Darmstadt)
- Natriumhydroxid (Sigma, Deisenhofen)
- Phosphatidylcholin (Sigma, Deisenhofen)
- Phosphatidylethanolamin (Sigma, Deisenhofen)
- Phosphatidylserin (Sigma, Deisenhofen)
- Phosphatidylinositol (Sigma, Deisenhofen)
- 2-Propanol (Merck, Darmstadt)
- Sphingomyelin (Sigma, Deisenhofen)
- Toluol (Merck, Darmstadt)
- Triethylamin, gradient grade (Sigma, Deisenhofen)
- Triglyceride (Sigma, Deisenhofen)

2.1.3 Verwendete Reagenzien bei der mechanisierten Messung verschiedener Substanzen im Serum bzw. im Leberhomogenat

2.1.3.1 Bestimmung des Gesamtproteingehalts im Leberhomogenat

- Leerwert-Reagenz: Natronlauge: 400 mmol/l; Kalium-Natrium-Tartrat: 89 mmol/l
- Biuret-reagenz: Natronlauge: 400 mmol; Kalium-Natrium-Tartrat: 89 mmol/l; Kaliumjodid: 61 mmol/l; Kupfersulfat 24,3 mmol/l

2.1.3.2 Bestimmung des Triglyceridgehalts im Leberhomogenat und im Serum

- PIPES-Puffer (Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)): 50 mmol/l, pH 6,8; Magnesium²⁺: 40 mmol/l
- Natriumcholat: 0,2 mmol/l
- ATP: 1,4 mmol/l
- 4-Aminophenazon: 0,13 mmol/l
- 4-Chorphenol: 4,7 mmol/l
- Kaliumhexacyanoferrat(II): 1 µmol/l

- Fettalkoholpolyglykoether: 0,65%
- Lipoproteinlipase (pseudomonas spec.) $\geq 5,0$ U/ml
- Glycerokinase (Bacillus stearothermophilus) $\geq 0,19$ U/ml
- Glycerinphosphatoxidase (E.coli) $\geq 2,5$ U/ml
- Peroxidase (Meerrettich) $\geq 0,10$ U/ml

2.1.3.3 Bestimmung des Cholesteringehalts im Leberhomogenat und im Serum

- PIPES-Puffer: 7,5 mmol/l, pH 6,8 ; Magnesium²⁺:10 mmol/l
- Natriumcholat: 0,2 mmol/l
- 4-Aminophenazon: 0,15 mmol/l
- Phenol: 4,2 mmol/l
- Fettalkoholpolyglykoether: 1%
- Cholesterinesterase (Pseudomonas spec.) $\geq 0,15$ U/ml
- Peroxidase (Meerrettich) $\geq 0,25$ U/ml
- Stabilisatoren

2.1.3.4 Bestimmung des HDL-Cholesterins im Serum

- PIPES-Puffer: 3g/dl; pH 7,0
- 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS): 2g/dl, pH 7,7
- α -Cyclodextriensulfat: 0,1g/dl
- Dextransulfat: 0,7g/dl
- Magnesiumsulfat: 7,0g/dl
- HSDA: 0,3g/dl
- Ascorbat-Oxidase (Acremonium sp.) ≥ 3 kU/l
- Peroxidase (Meerrettich) ≥ 5 kU/l
- Stabilisator PEG-Cholinesterase (Pseudomonas spec.) $\geq 0,8$ kU/l
- PEG-Cholesterinoxidase (Pseudomonas spec.) $\geq 5,3$ kU/l
- Peroxidase (Meerrettich) ≥ 16 kU/l
- 4-Aminophenazon: 0,4g/l

2.1.3.5 Bestimmung des LDL-Cholesterins im Serum

- MOPS-Puffer: 50mmol/l, pH 7,0
- α -Cyclodextrinsulfat: 0,1g/l
- $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$: 7,0g/l
- Natrium-N-2-hydroxy-sulfopropyl-3,5-dimethoxyanilin: 0,3g/l
- Ascorbatoxidase (mikrobiell): 3U/l
- Peroxidase (Meerrettich): 10 U/l
- 4-Aminoantipyrin: 0,51g/l
- Cholesterinesterase (*Pseudomonas spec.*) > 0,7 U/l
- Cholesterinoxidase (*Pseudomonas spec.*) > 0,3 U/l
- Peroxidase (Meerrettich) \geq 20 U/l

2.1.3.6 Bestimmung des Homocysteins im Serum

- Dithioreitol und Adenosin in Zitronensäure
- S-Adenosylhomocysteinhydrolase (AHH) (Rind) in Phosphatpuffer mit Proteinstabilisator, Konservierungsmittel: Natriumazid
- S-Adenosyl-Cystein-Fluoreszeintracer in Phosphatpuffer mit Proteinstabilisator, Konservierungsmittel: Natriumazid

2.1.3.7 Bestimmung der GPT (ALT) im Serum

- TRIS-Puffer: 280 mmol/l, pH 7,3
- L-Alanin: 1400 mmol/l
- NADH: 0,53 mmol/l (Hefe)
- LDH \geq 3,5U/ml (Mikroorganismen)
- α -Ketoglutarat: 94mmol/l

2.1.3.8 Bestimmung der GOT (AST) im Serum

- TRIS-Puffer: 400 mmol/l; pH 7,8
- L-Aspartat: 1200 mmol/l
- NADH: 0,911mmol/l (Hefe)
- MDH \geq 2,1U/ml (Schweineherz)

- LDH $\geq 3,0$ U/ml (Mikroorganismen)
- α -Ketoglutarat:75mmol/l

2.1.4 Sonstiges

- Filter 0,5 μ m
- Lichrospher Si 60 F254 HPTLC-Aluminiumplatten (10x 6.5 cm)
- Lichrosorb-NH2 Säule (250 x 4,6 mm), Partikelgrösse 5 μ m von Merck, Darmstadt

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Mausmodelle zur Entstehung von Atherosklerose

Mäuse entwickeln im Gegensatz zum Menschen bei Fütterung einer normalen Diät mit niedrigem Fettgehalt keine atherosklerotischen Läsionen. Trotzdem sind sie ein nützliches Tiermodell, da mit Züchtung so genannter Knockout Mäuse der Einfluss bestimmter Gendefekte auf die Entstehung von Atherosklerose untersucht werden kann. Darüber hinaus kann man die Umweltbedingungen, die Fütterung bestimmter Nahrungsbestandteile, sowie Zusätze zum Futter leicht variieren, so dass die Auswirkung einer bestimmten Ernährung und oralen Therapie nachgeprüft werden kann. Ein weiterer Vorteil von Mausmodellen ist ihre kurze Generationszeit von ca. 9 Wochen [70].

Die ersten Modelle zur Entstehung von Atherosklerose bei Mäusen durch Fütterung fett- und cholesterinreicher Diäten wurden in den 1960er Jahren beschrieben (Thomas und Hartford: 30% Fett, 5% Cholesterin, 2% Natriumcholeat [71], Pagen: 15 % Fett;1,25% Cholesterin; 0,5% Natriumcholeat [72]).

1992 wurden von Andrew Plump mittels homologer Rekombination embryonaler Stammzellen ein Knockout des Apolipoprotein E codierenden Gens erreicht. Dies war das erste Mausmodell in dem alle Atherosklerosestadien zur Ausprägung kommen, die auch beim Menschen zu finden sind. Lediglich Plaquerupturen konnten nicht beobachtet werden.

Für die Studien an den Apo E defizienten Mäusen wurde von Tony Hayek eine Western-Diät entwickelt, welche 21% Fett, 0,15% Cholesterin und 19,5% Casein

enthält. Bei der Fütterung dieser Diät kam es bei Wildtypen zu einer Verdopplung des Serumcholesterinspiegels. Bei den Apo E defizienten Mäusen wurde hingegen eine Verdreifachung des Serumcholesterins beobachtet [55].

2.2.2 Atherosklerose bei Apo E defizienten Mäusen

Apo E hat eine wichtige Funktion in der Chylomikronen- und VLDL-Remnant-Clearance [75]. Es wurde bewiesen, dass Apo E defiziente Mäuse hohe Spiegel an VLDL und IDL im Plasma entwickeln [106,73]. Die Entwicklung von Atherosklerose ist vermutlich durch die verlangsamte Clearance der VLDL und IDL mit verursacht. [106,75]. Damit war dies das erste Knockout Mausmodell, bei dem spontan auch schon bei einer normalen Diät Atherosklerose entsteht.

2.2.3 Tierhaltung

6 Wochen alte, männliche Apo E-Knockout Mäuse (Transgenic Alliance, 69592 L'Arbresle Cedex, Frankreich) wurden in einem Behandlungszeitraum von 12 bzw. 24 Wochen bei Raumtemperatur und natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. In jedem Käfig befanden sich 5 Tiere. Nahrung und Wasser standen zur freien Verfügung, wobei das Wasser täglich erneuert und die Nahrung jeden dritten Tag gewogen und ausgewechselt wurde.

Die Behandlung und Präparation der Mäuse wurde durch Kollegen der Abteilung für Kardiologie der Medizinischen Klinik I des Uniklinikum Gießen durchgeführt.

2.3 Western-Diät

Alle Gruppen erhielten für den gesamten Behandlungszeitraum eine atherogene Diät, die so genannte „Western-Diät“. Die Western-Diät soll eine Verdreifachung des Plasmacholesterinspiegels bei Apo E-Knockout Mäusen verursachen und so die Entstehung von Atherosklerose begünstigen [55].

Die Western-Diät wurde von der Firma Altromin hergestellt und setzt sich folgendermaßen zusammen (Altromin, Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lange Straße 42 - 32791 Lage)

2.3.1 Atherogene Zusätze in der Diät

Cholesterin	10000 mg/kg (1%)
Natriumcholat	20000 mg/kg

2.3.2 Rohnährstoffe in der Diät

Rohfaser	4 %	Mittelwert in %
Rohprotein	17 %	
Rohfett	15 %	
Asche	6 %	
Wasser	10 %	

2.3.3 Umsetzbare Energie in der Diät

14,6 MJ/kg;
3500 Kcal/kg

2.3.4 Mineralstoffe in der Diät

Natrium	0,24 %	Mittelwert in %
Phosphor	0,75 %	
Kalium	0,7 %	
Calcium	0,95 %	
Magnesium	0,07 %	

2.3.5 Spurenelemente in der Diät

Mangan	100 mg/kg Diät	Mittelwert in mg/kg Diät
Eisen	180 mg/kg Diät	
Zink	30 mg/kg Diät	
Kupfer	5 mg/kg Diät	
Jod	0,4 mg/kg Diät	

2.3.6 Aminosäuren in der Diät

Methionin	1 %	Mittelwert in %
Isoleucin	0,7 %	

Histidin	0,5 %
Lysin	1,7 %
Phenylalanin	0,7 %
Leucin	1,4 %
Threonin	0,7 %
Cystin	0,3 %
Arginin	0,9 %
Tyrosin	0,9 %
Tryptophan	0,2 %
Valin	0,3 %

2.3.7 Vitamine Zusatz in der Diät

Vitamin A	15000 IU
Vitamin D3	500 IU
Vitamin E	150 mg
Vitamin K3	10 mg
Vitamin B1	20 mg
Vitamin B2	20 mg
Vitamin B6	15 mg
Vitamin B12	30 µg
Nikotinsäure	50 mg
Panhotensäure	50 mg
Folsäure	10 mg
Biotin	200 µg
Cholin	1000 mg
Vitamin C	20 mg

Zusatz pro kg Diät

2.3.8 Fettsäuren in der Diät

Linolsäure	35000 mg/kg Diät
Ölsäure	10000 mg/kg Diät

Mittelwert in mg/kg Diät

Linolensäure	250 mg/kg Diät
Stearinsäure	1250 mg/kg Diät
Arachinsäure	250 mg/kg Diät

3 Methodik

3.1 Einteilung der Gruppen

Der Versuchsaufbau bestand aus 4 Gruppen, welche alle mit der Western-Diät gefüttert wurden. Die Gruppen 1 und 2 wurden jeweils 12 Wochen, die Gruppen 3 und 4 jeweils 24 Wochen lang gehalten. Gruppe 2 und 4 wurde zusätzlich mit 3-DZA in einer Dosierung von 0,4 mg/g Futter behandelt. Die Futtermenge, welche eine Maus zu sich nimmt beträgt etwa 4,5 g/Tag.

Gruppe 1: 12 Wochen mit Western-Diät

Gruppe 2: 12 Wochen mit Western-Diät und 3-DZA in der Dosierung 0,4 mg/g Futter (ca.1,8 mg 3-DZA/d)

Gruppe 3: 24 Wochen mit Western-Diät

Gruppe 4: 24 Wochen mit Western-Diät und 3-DZA in der Dosierung 0,4 mg/g Futter (ca.1,8 mg 3-DZA/d)

Kontrollgruppe (nur Leber): Wildtypstamm mit normalem Futter ohne 3-DZA

In jeder Gruppe befanden sich 10 Tiere. Zur Messung der Lebertriglycerid-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentrationen wurden uns jeweils 5 Lebern von der Abteilung für Kardiologie der Medizinischen Klinik I des Uniklinikums Gießen zur Verfügung gestellt. Als Kontrollgruppe für die Leberwerte dienten jeweils 5 Lebern von einem Wildtypmäusestamm mit normalem Futter.

3.2 Präparation, Explantation der Aorta und des Herzens und Blutentnahme

Durch die Inhalation von Isofluran wurden die Mäuse nach 12stündiger Nahrungskarenz getötet. Der Bauch- und Brustraum wurden zunächst von ventral eröffnet. Um die Blutgerinnung zu hemmen, wurde in die freiliegende Vena cava inferior in Höhe der Pfordadermündung Heparin injiziert. Danach wurde die Vena cava inzidiert und das austretende Blut mit einer Pipette aufgesaugt. Ein Teil des gewonnen Blutes wurde zur Bestimmung des Blutbildes verwendet, der restliche

Anteil wurde zentrifugiert, um das Serum für die Messung der Blutfette und Transaminasen zu gewinnen.

Im nächsten Schritt wurde die Leber explantiert, mit 0,9 % NaCl-Lösung gespült und bei -80°C asserviert.

Die Tierhaltung sowie die Präparation wurde durch die Abteilung für Kardiologie der Medizinischen Klinik I des Uniklinikums Gießen durchgeführt. Die Leber der Tiere wurde uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.3 Bestimmung des Gesamtprotein-, Cholesterin-, Cholesterinester-Triglycerid- und Phospholipidgehalts der Leber

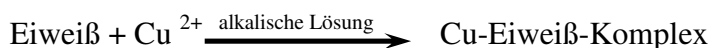
3.3.1 Herstellung von Leberhomogenaten

0,6 g – 1 g zerkleinerte Mäuseleber wurde mit Hilfe eines Glashomogenisierers mit 3,0 ml eiskaltem Aqua bidest. homogenisiert. Das Gesamtvolumen aller Homogenate wurde durch Zugabe von Aqua bidest. auf 5,0 ml aufgefüllt. Danach wurde 0,1 ml Mäuseleberhomogenat für 60 Minuten bei 37 °C mit 0,9 ml 1%igem (v/v) Natrium Desoxycholat in Aqua bidest. inkubiert und Protein-, Triglycerid- und Gesamtcholesterin-Konzentrationen wie nachfolgend beschrieben gemessen.

3.3.2 Bestimmung des Gesamtproteins im Leberhomogenat

Der Gesamtproteingehalt der mit Na-Desoxycholat behandelten Mäuseleberhomogenate wurde mit dem Boehringer Mannheim / Hitachi 917 Analysator mechanisiert unter Verwendung der Biuret Methode [56] bestimmt.

Dabei bildet zweiwertiges Kupfer in alkalischer Lösung mit der Peptidbindung der Eiweiße einen charakteristischen blauen Biuretkomplex. Mit Natrium-Kalium-Tartrat wird die Ausfällung von Kupferhydroxid und mit Kaliumjodid die Autoreduktion des Kupfers verhindert.

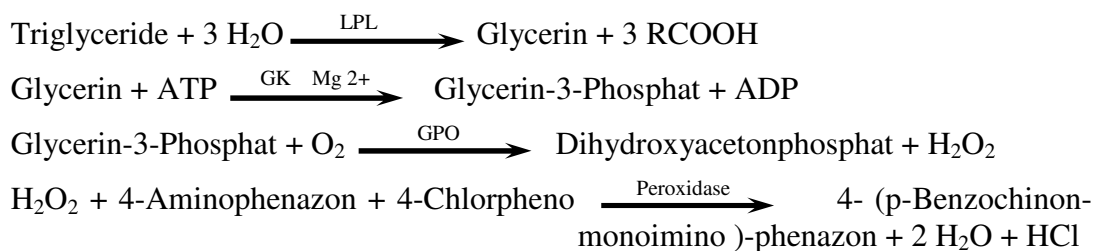


Die Absorption bei einer Wellenlänge von 546 nm ist direkt proportional zur Eiweißkonzentration in der Probe.

3.3.3 Bestimmung des Gesamttriglyceridgehalts im Leberhomogenat

Der Triglyceridgehalts der mit Na-Deoxycholat inkubierten Leberhomogenate wurde mechanisiert mit dem Boehringer Mannheim / Hitachi 917 Analysator nach der Methode von Wahlefeld [57] gemessen; dabei wird eine Lipoproteinlipase von Mikroorganismen zur Hydrolyse der Triglyceride in Glycerin und freie Fettsäuren eingesetzt. Nach einer Phosphorylierung durch ATP folgt eine Oxidation zu Dihydroxyacetonphosphat und Hydrogenperoxyd. Das hervorgebrachte Wasserstoffperoxyd reagiert dann mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol unter Katalysierung durch die Peroxidase in einer Endpunktreaktion zu einem violetten Farbstoff, wobei die Extinktion direkt proportional zur Konzentration der Triglyceride in der Probe ist (Wellenlänge 505 nm).

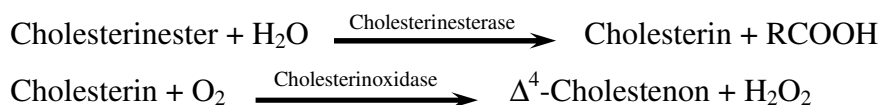
Reaktionsschritte:

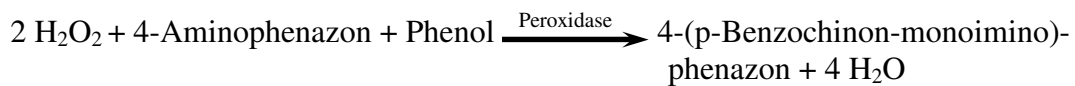


3.3.4 Bestimmung des Gesamtcholesterins im Leberhomogenat

Die Messung des Gesamtcholesteringehalts der Leberhomogenate erfolgte mit dem Boehringer Mannheim/Hitachi 917 Analysator nach der Methode von Roeschlaue [58] und Allain [59]. Durch Hydrolyse der Cholesterinester mit Hilfe einer Cholesterinesterase und Oxidation des Cholesterins mit einer Cholesterinoxidase entsteht Wasserstoffperoxyd. Wasserstoffperoxyd bildet durch Reaktion mit 4-Aminophenazon unter katalytischer Wirkung der Peroxidase einen violetten Farbstoff. Die Farbintensität ist direkt proportional zu der Konzentration des Gesamtcholesterins und wird photometrisch bestimmt (Wellenlänge 505 nm).

Reaktionsschritte:





3.3.5 Extraktion der Gesamtlipide aus dem Leberhomogenat

Zur weiteren Analyse mussten die Lipide aus dem Leberhomogenat extrahiert werden. Dies erfolgte durch 5minütiges kräftiges Schütteln von 1 ml Mäuseleberhomogenat mit 6 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v). Die Suspension wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach 5 Minuten bei 2000 g zentrifugiert, wobei drei Phasen entstanden. Die obere und mittlere Phase wurden vorsichtig abgetrennt. Die verbleibende organische Phase wurde durch einen 0,5 µm Filter gefiltert und bei 37 °C unter Stickstoffeinstrom getrocknet. Die getrockneten Lipide wurden wieder in 1 ml Chloroform / Methanol (2:1, v/v) gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.3.6 High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

Die Neutrallipide sowie die Phospholipide wurden durch die HPTLC voneinander getrennt und quantifiziert. Dabei wird die unterschiedliche Löslichkeit der Lipide in organischen Lösungsmitteln genutzt. Es handelt sich bei der HPTLC um ein chromatographisches Verfahren mit einem mehrstufigen Verteilungsprozess, an dem ein geeignetes Sorptionsmittel als stationäre Phase, Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische als mobile Phase und die Probe beteiligt sind. Die stationäre Phase (Kieselgel) befindet sich dabei als dünne Schicht auf einem geeigneten Träger aus Glas, Kunststoff oder Aluminium. An dieser Schicht erfolgt die Trennung durch Elution mit dem Laufmittel. Die Probe wird an der Startlinie punkt- oder linienförmig aufgetragen. Die Entwicklung des Dünnschichtchromatogramms wird standardmäßig unter Benutzung eines Lösungsmittels (Linearentwicklung) aufsteigend in einer verschlossenen Kammer vorgenommen.

Durch Vorlauf mit 2-Propanol und anschließender Lufttrocknung wurden Lichrospher Si 60 F254 HPTLC-Aluminiumplatten (10 cm x 6,5cm) gereinigt. Es wurden 4 µl des Lipidextraktes als 4 mm breiten Streifen 0,5 cm vom Unterrand entfernt auf die HPTLC Platte aufgetragen und für 5 Minuten luftgetrocknet. Danach wurde die Platte aufrecht in eine mit 20 ml Laufmittel gefüllte, verschlossene

Laufkammer gestellt. Durch Verwendung verschiedener Lösungsmittelgemische konnte eine feinere Auftrennung erreicht werden.

3.3.6.1 Auftrennung der Neutrallipide durch HPLTC

Die Neutrallipide (Triglyceride, Cholesterin und Cholesterinester) wurden durch zweifache Entwicklung mit folgenden Lösungsmittelsystemen getrennt:

(1) Hexan / Toluol / Diethylether (20:2:0,8; v/v/v; Trennstrecke 9,5cm)

(2) Methanol / Ethylacetat / Chloroform (9:10:1; v/v/v; Trennstrecke 6,5cm)

Durch Anfärbung der Chromatogramme mit Coomassie Brilliant Blue R250 für 5 Minuten und Auswaschung des Hintergrunds mit 5%iger (v/v) Essigsäure wurde eine dauerhafte Sichtbarmachung der Lipidbanden zur Dokumentation erreicht. Eine colormetrische Messung der mit Coomassie Blue gefärbten Lipidbanden war aufgrund der Nichttransparenz der HPTLC-Aluminiumplatten nicht möglich.

Aufgrund des hohen Triglyceridgehalts der Proben der Gruppen 1-4 mussten diese mit Chloroform/Methanol (2:1; v/v) 1:5 (v/v) verdünnt werden, da es sonst zur Artefaktbildung kam.

Es ergaben sich 4 Banden, wobei es sich bei den obersten 2 Banden um die Cholesterinester Cholesterinlinoleat und -oleat handelte. Die dritte Bande von oben wurde durch die Triglyceride gebildet und kurz darauf folgte das freie Cholesterin.

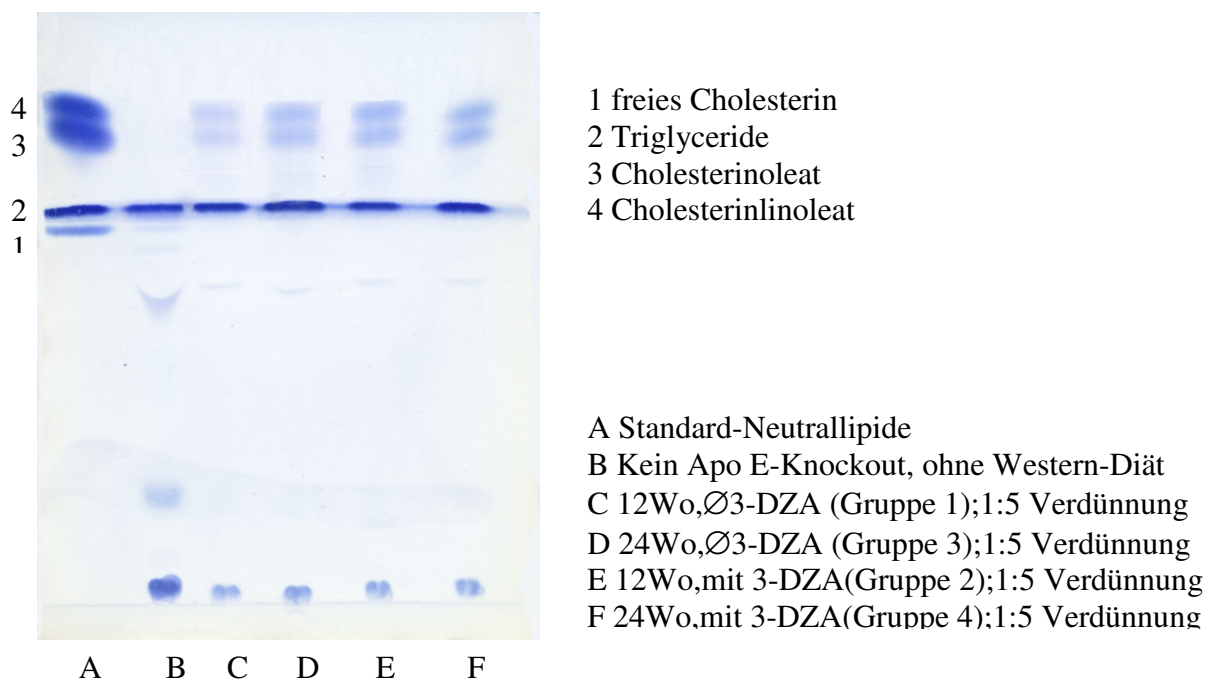


Abbildung 7: Chromatogramm der Neutrallipide (Coomassie Blue-Färbung)**3.3.6.2 Auftrennung der Phospholipide durch HPTLC**

Die Phospholipide (Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol) wurden durch dreifache Entwicklung mit folgenden Lösungsmitteln getrennt:

- (1) Methanol / Ethylacetat / Chloroform (9:10:1, v/v/v; Trennstrecke 9,5cm)
- (2) Methanol / Ethylacetat (16:4, v/v; Trennstrecke 6,5cm)
- (3) Methanol / 2-Propanol / Chloroform / 0,25 M Kaliumchlorid / 1 N NaOH (1:2,5:3:0,5:0,3, v/v/v/v/v; Trennstrecke 4,5cm)

In Laufmittel (1) lösten sich die Neutrallipide am besten, welche hierdurch von den Phospholipiden abgetrennt wurden.

Es entstanden 5 Banden, wobei die oberste durch Phosphatidylinositol gebildet wurde; es folgten Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin und schließlich Sphingomyelin.

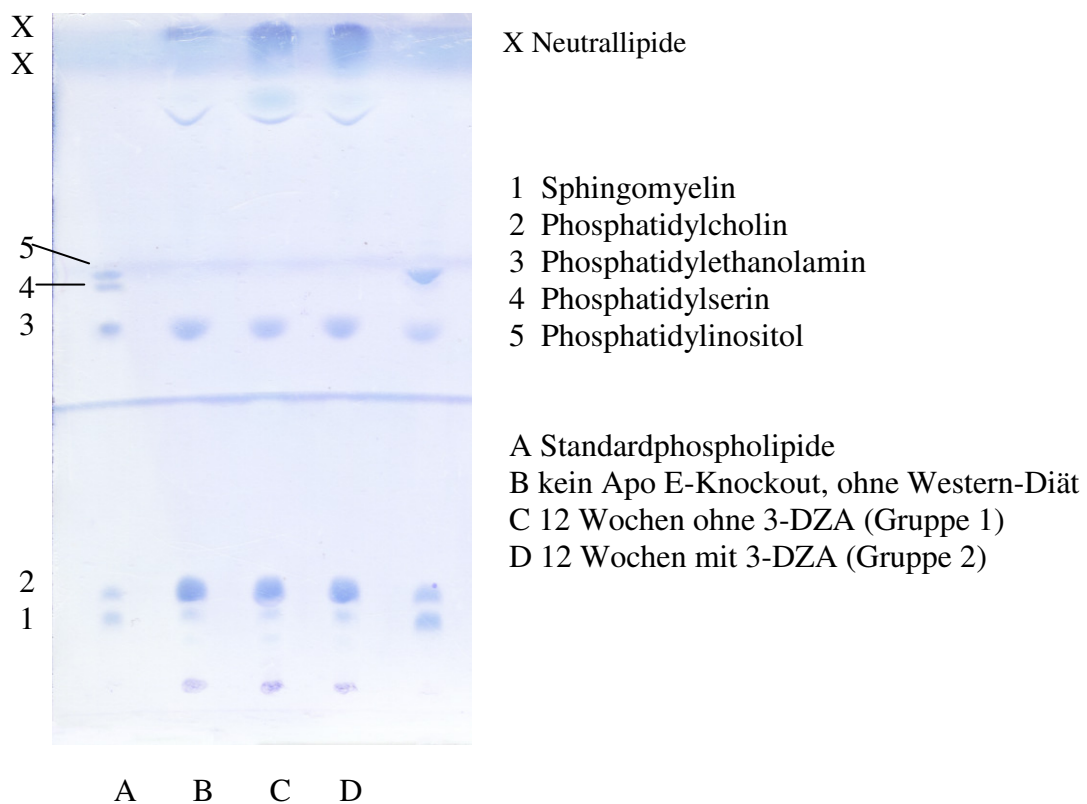


Abbildung 8: Chromatogramm der Phospholipide (Coomassie Blue-Färbung)

3.3.7 Fluoreszenzfärbung der HPTLC-Platten

Zur Lipidmessung wurden die HPTLC Platten nach der Trennung mit einer Fluoreszenzlösung (15 mg 1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien / 100 ml Hexan) für 10 Sekunden angefärbt und man erhielt bei 366 nm UV-Licht blauweiß fluoreszierende Lipidbanden. Nachdem das Hexan verdunstet war, wurde die Fluoreszenz der Lipidbanden auf den Chromatogrammen sofort mit einem Beckman Appraise Densitometer, der mit einer Fluoreszenzoptik ausgestattet ist, gemessen.

Dieser gibt den Anteil der Intensität der einzelnen Lipidbanden an der Gesamtintensität aller Banden prozentual an. Unter Verwendung von Standardlipiden konnte gezeigt werden, dass sich bei gleicher aufgetragener Menge sowohl die Neutrallipide, als auch die Phospholipide gleich stark anfärbten.

3.3.7.1 Fluoreszenzscan der Neutrallipide

Beim Abscannen der fluoreszenzgefärbten HPTLC Platten ergaben sich 3 Peaks, wobei der erste den Anteil des freien Cholesterins, der zweite den Anteil der Triglyceride und der dritte den Anteil des veresterten Cholesterins widerspiegelt. Die Methode wurde verwendet, um den Anteil des freien und des veresterten Cholesterins am Gesamtcholesterin zu bestimmen.

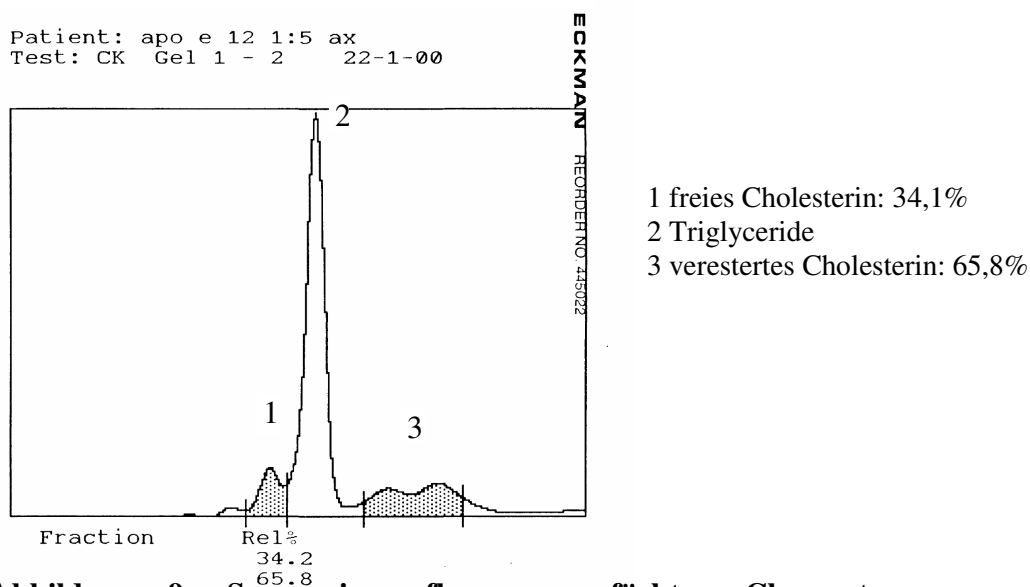


Abbildung 9: Scan eines fluoreszenzgefärbten Chromatogramms von Neutrallipiden Gruppe 1 (siehe Abb.7 Coomassie-Blue Färbung)

3.3.7.2 Fluoreszenzscan der Phospholipide

Durch Abscannen der fluoreszenzgefärbten HPTLC-Platten ergab sich das in Abbildung 10 dargestellte Verteilungsmuster der einzelnen Phospholipidfraktionen.

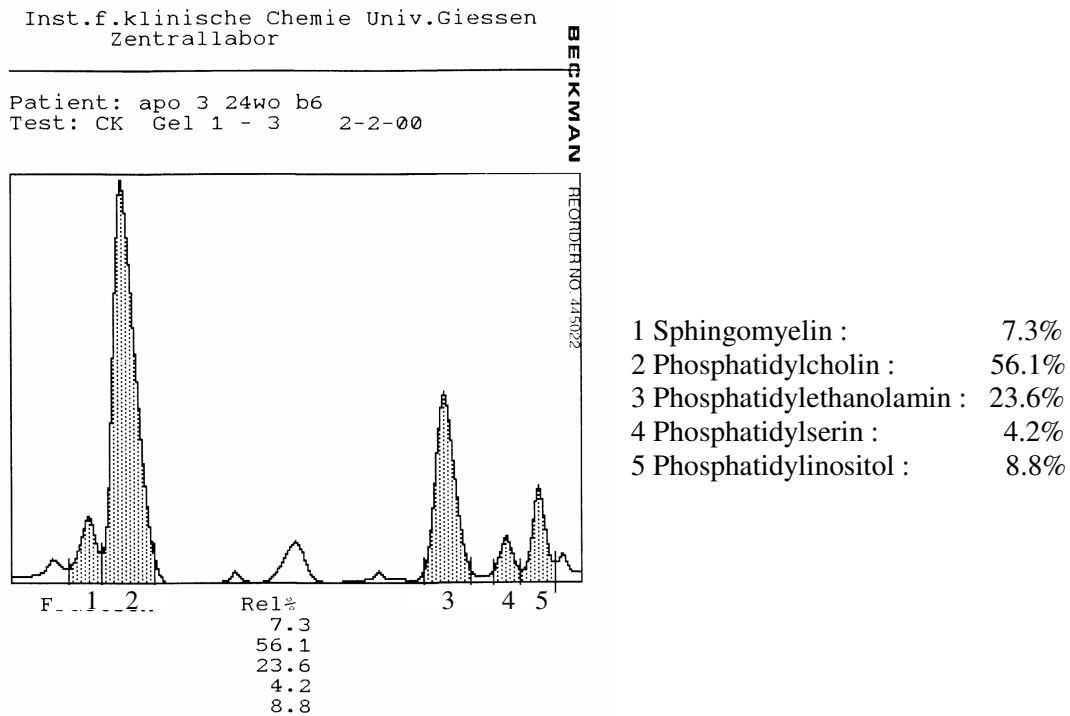


Abbildung 10: Scan eines fluoreszenzgefärbten Chromatogramms von Phospholipiden Gruppe 4 (siehe Abb.8 Coomassie-Blue Färbung)

3.3.8 Phosphatidylcholin- und Phosphatidylethanolamin-Messung mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Zur weiteren Analyse wurden die HPTLC-Platten in einer Jodkammer entwickelt, die Phosphatidylethanolamin- und Phosphatidylcholinbanden mit Hilfe der Standardphospholipide identifiziert und je 2 Banden mit einer Schere ausgeschnitten. Durch Inkubation mit 100 µl Chloroform/Methanol (2:1;v/v) wurden die Phospholipide dann aus der Beschichtung extrahiert.

Die Konzentration von PC und PE wurde mit Hilfe der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) bestimmt. Diese hat sich aus der Säulenchromatographie entwickelt und man nutzt dabei aus, dass die Trennleistung einer Säule mit abnehmender Korngröße der stationären Phase zunimmt. Daher arbeitet man bei der

HPLC mit erheblich feineren Materialien als bei der Gel- oder Säulenchromatographie, wobei die geringere Partikelgröße der Trennmaterialien eine höhere Packungsdichte ermöglicht und damit Anwendung höherer Drücke erfordert, was mit technischem Aufwand verbunden ist. Eine HPLC-Apparatur besteht im einfachsten Fall aus einer Pumpe mit Elutionsmittelreservoir, dem Probenaufgabesystem, der Trennsäule und dem Detektor mit Schreiber.

Die HPLC Analyse mit der unter [60] beschriebenen Methode wurde mit einem Merck/ Hitachi HPLC - System, das mit einem Lösungsmittelreservoir, einer manuellen Probeneinspritzung und einem L-4250 UV/VIS Detektor ausgerüstet ist, durchgeführt. Das System wurde an einen D-2500 Chromatogramm Integrator angeschlossen.

Die Trennung und Quantifizierung der mit HPTLC extrahierten Phospholipidbanden wurde unter isokratischen Bedingungen mit der mobilen Phase aus Acetonitril/Methanol/Triethylamin 0,2% (TEA) (67:22:11,v/v/v) durchgeführt. Es wurden 30 µl der HPTLC Extrakte unter Benutzung einer 5 µm LiChrosorb-NH₂ Säule (250 x 4,6mm) von Merck, Darmstadt eingespritzt. Die TEA Kolbenlösung wurde mit Phosphorsäure auf pH 4,0 angeglichen. Die Flussrate betrug 1,5 ml/min und die Säulentemperatur war 22°C. Die Phospholipide wurden photometrisch bei UV-Licht mit der Wellenlänge 225 nm detektiert.

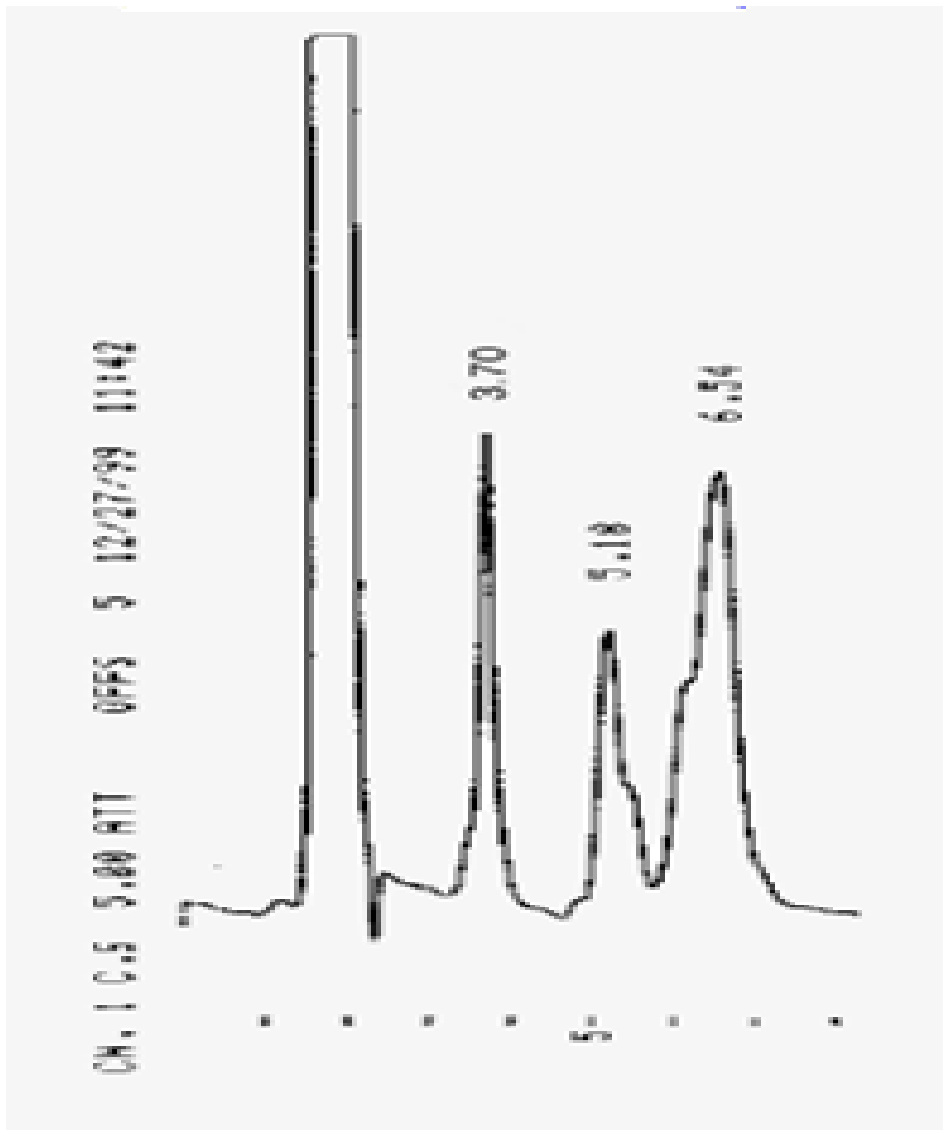


Abbildung 11 : HPLC der Phospholipide (Retentionszeiten: PC:3,70 min; SM: 5,18 min; PE: 6,54 min)

Die Retentionszeit betrug in diesem System für PC 3,70 min, für PE 6,54 min.

3.4 Bestimmung der Serums substrate und Enzyme

3.4.1 Bestimmung der Triglyceride im Serum

Die Bestimmung der Serumtriglyceride erfolgte mit der unter 3.3.3 beschriebenen Methode.

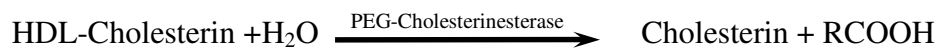
3.4.2 Bestimmung des Gesamtcholesterins im Serum

Die Messung des Gesamtcholesterins im Serum wurde mit der unter 3.3.4 beschriebenen Methode durchgeführt.

3.4.3 Bestimmung des HDL-Cholesterins im Serum

Bei der HDL-Cholesterinbestimmung nutzt man die selektiv unterschiedliche katalytische Aktivität von mit Polyethylenglycol (PEG) modifizierter Cholesterinesterase und Cholesterinoxidase gegenüber den Lipoproteinfraktionen. Dabei nimmt die Reaktionsfähigkeit in folgender Reihenfolge zu: LDL < VLDL = Chylomikronen < HDL. Darüber hinaus bilden LDL, VLDL und Chylomikronen mit α -Cyclodextrinsulfat und Dextransulfat in Gegenwart von Magnesiumionen wasserlösliche Komplexe, welche gegen die PEG-modifizierte Enzyme widerstandsfähig sind. Mit Hilfe der Cholesterinesterase und Cholesterinoxidase, welche über Aminogruppen an PEG gebunden sind, kann man so die HDL-Cholesterinkonzentration selektiv enzymatisch bestimmen [61,62]. In einer durch die Peroxidase katalysierten Endpunktreaktion entsteht ein violetter Farbstoff, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 505 nm photometrisch gemessen wird.

Reaktionsschritte:



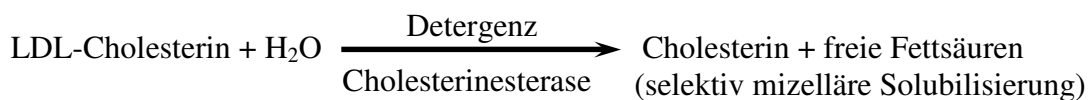
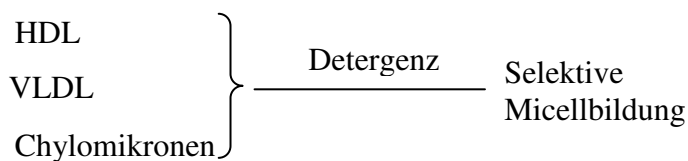
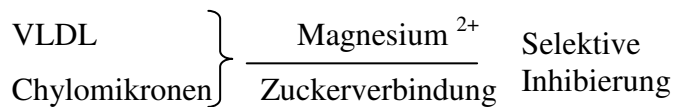
Nach der Spaltung des HDL-Cholesterins folgt die Cholesterinbestimmung wie unter 3.3.4 beschrieben.

3.4.4 Bestimmung des LDL-Cholesterins im Serum

Bei der hier vorliegenden Methode zur direkten Bestimmung des LDL-Cholesterins wird die selektive mizelläre Solubisierung des LDL-Cholesterins mit einem nichtionischen Detergenz und die Wechselwirkung zwischen einer Zuckerverbindung und Lipoproteinen (VLDL und Chylomikronen) ausgenutzt. Bezieht man ein Detergenz in die enzymatische Cholesterinbestimmung mit ein, so gibt es Unterschiede in der relativen Reaktivität des Cholesterins in den verschiedenen Lipoproteinfraktionen. Die Reaktivität zeigt eine Zunahme in folgender Reihenfolge: HDL < Chylomikronen < VLDL < LDL. Die Zugabe von

Magnesium²⁺ bewirkt durch eine Zuckerverbindung eine deutliche Verminderung der enzymatischen Reaktion der Cholesterinmessung in VLDL und Chylomikronen. Die Kombination von Detergenz und Zuckerverbindung ermöglicht so die selektive Bestimmung des LDL-Cholesterins im Serum [63].

Testprinzip:



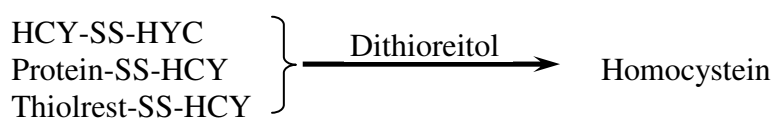
Die weitere Cholesterinbestimmung wurde nach der unter 3.3.4 beschriebenen Methode durchgeführt.

3.4.5 Bestimmung des Homocysteins im Serum

Homocystein erscheint im Serum meist in oxidierter, an Proteine gebundener Form (unter anderem als gemischtes Disulfid an Albumin gebunden). Kleinere Mengen an reduziertem Homocystein und Disulfid-Homocystein (HCY-ss-HCY) sind vorhanden [138-140].

Die Bestimmung des Homocysteins im Serum beruht auf dem Prinzip des Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays. Gebundenes Homocystein (oxidierte Form) wird zu freiem Homocystein reduziert und freies Homocystein wird enzymatisch zu S-Adenosylhomocystein wie nachfolgend beschrieben umgewandelt

Reduktion: Homocystein, gemischtes Disulfid und proteingebundene Formen von Homocystein werden durch Dithioereitol zu freiem Homocystein reduziert.



Enzymatische Umwandlung: Das gesamte freie Homocystein wird durch die S-Adenosylhomocysteinhydrolase (AHH) und überschüssiges Adenosin zu S-Adenosylhomocystein (SAH) umgewandelt.



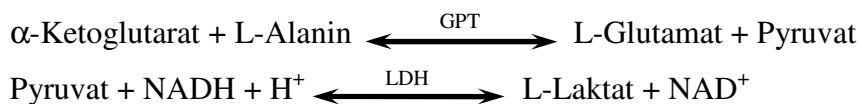
Anti-S-Adenosylhomocysteinantikörper und S-Adenosyl-Fluoreszintracer werden hinzugegeben. SAH und der markierte Fluoreszintracer konkurrieren um die freie Bindungsstelle am monoklonalen Antikörper. Die Intensität des polarisierten Fluoreszenzlichtes wird mit dem optischen Meßsystem für Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay gemessen.

3.4.6 Bestimmung der Leberenzyme im Serum

3.4.6.1 Bestimmung der GPT (ALT)

Bei der hier benutzten Methode zur Bestimmung der Aktivität der Alanin-Amino-Transferase (ALT) bzw. Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) werden die beiden Substrate des Enzyms, α -Ketoglutarat und L-Alanin, mit Serum inkubiert. In der durch die ALT katalysierten Gleichgewichtsreaktion entstehen L-Glutamat und Pyruvat, welches in einer gekoppelten Reaktion durch die Laktatdehydrogenase (LDH) in L-Laktat umgewandelt wird. Bei dieser Reaktion wird NADH^+ zu NAD^+ oxidiert, wobei die Geschwindigkeit der photometrisch gemessenen NADH^+ Abnahme direkt proportional zur Bildungsgeschwindigkeit von Pyruvat und somit der ALT-Aktivität ist (Wellenlänge 340 nm).

Reaktionsschritte:

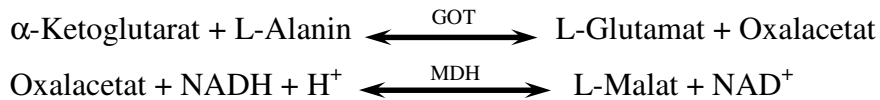


3.4.6.2 Bestimmung der GOT (AST)

Die Aspartat-Amino-Transferase (AST) bzw. Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) gehört ebenfalls wie die ALT (GPT) zur Gruppe der Transaminasen, welche durch den Transfer einer Aminogruppe die Umwandlung von Aminosäuren zu den entsprechenden α -Ketosäuren in beide Richtungen katalysieren. Die AST wandelt

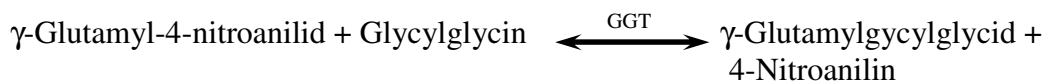
α -Ketoglutarat und L-Aspartat in L-Glutamat und Oxalacetat um. Das anfallende Oxalacetat kann wiederum in einer gekoppelten Reaktion durch die Malatdehydrogenase in L-Malat reduziert werden. In dieser Reaktion wird NADH zu NAD oxidiert, wobei die Konzentrationsänderung photometrisch gemessen werden kann (Wellenlänge 340 nm) [64].

Reaktionsschritte:



3.4.6.3 Bestimmung der GGT

Bei dem kinetischen Testverfahren zur Bestimmung der GGT im Serum wird γ -Glutamyl-4-nitroanilid als Substrat eingesetzt [65]. Die GGT überträgt die γ -Glutamylgruppe des γ -Glutamyl-4-nitroanilid auf das Dipeptid Glycylglycin unter Bildung von γ -Glutamyl-glycylglycid und 4-Nitroanilin, dessen gelbe Farbe bei 405 nm gemessen wird. Die Geschwindigkeit der Absorptionszunahme bei 405 nm ist der Aktivität der GGT proportional [66].



3.5 Bestimmung des Blutbilds

Das Blutbild wurde aus EDTA-Blut durch Widerstandmessverfahren durchflusszytometrisch bestimmt.

3.6 Statistik

Die statistische Auswertung dieser Arbeit wurde mit Hilfe von SPSS für Windows Version 6 durchgeführt. Die Auswahl des statistischen Verfahrens wurde in Zusammenarbeit mit Herrn W. Papst (Abteilung für medizinische Statistik, Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen) getroffen.

Es wurde der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney verwendet. Dieser setzt stetige Verteilungsformen voraus und vergleicht zwei unabhängige Stichproben. Es handelt sich um einen Rangtest, welcher empfindlich gegenüber Medianunterschieden und unempfindlich gegenüber Varianzunterschieden ist. Es

wurden jeweils die 12 Wochen Gruppen sowie die 24 Wochen Gruppen untereinander verglichen, um den Effekt des Medikaments zu bewerten. Um den zeitlichen Verlauf der Entwicklung der Atherosklerose und den Einfluss der Diät auf die Blutfette und die Leberverfettung zu erfassen, wurden die 12 Wochen mit den 24 Wochen Tieren verglichen (jeweils mit und ohne 3-DZA). Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem jeweiligen Signifikanzniveau gekennzeichnet und fett gedruckt. Nicht gekennzeichnete Gruppen weisen keine signifikanten Unterschiede auf.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss einer 3-DZA-Behandlung auf die Aktivität der GOT, GPT und GGT im Serum von Apo E-Knockout Mäusen

Die Transaminasen (GOT und GPT) sind aufgrund ihrer universellen Funktionen im Intermediärstoffwechsel in den Geweben des Körpers weit verbreitet, finden sich jedoch in besonders hohen Konzentrationen in der Leber. Im Gegensatz zur GPT ist die GOT kein leberspezifisches Enzym. Sie kommt in vergleichsweise hoher Aktivität in Myokard und Skelettmuskel vor. Eine Erhöhung der GOT-Aktivität im Serum tritt daher außer bei akuten Lebererkrankungen und akuten Schüben von chronischen Lebererkrankungen vor allem bei Nekrosen der Herz- und Skelettmuskulatur auf. Die GOT ist ein Enzym, welches zu 80% in den Mitochondrien und zu 20% im Zytoplasma vorkommt und somit erst bei sehr schweren Zellschäden freigesetzt wird.

Die GPT hat in der Leber eine sehr hohe spezifische Aktivität und ist damit sehr spezifisch für Leberzellläsionen. Sie ist vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert und wird schon bei relativ geringen Membranpermeabilitätserhöhungen schnell im Serum freigesetzt.

Die Serumaktivität der γ -GT im gesunden wie im pathologischen Zustand wird fast ausschließlich durch die Integrität der Gallengänge bestimmt. Die Erhöhung der γ -GT im Serum gilt als der sensitivste Marker für Läsionen im Gallengangsystem und für schwere hepatobiliäre Erkrankungen wie z.B. einer Cholangitis. In 95% dieser Fälle kommt es zu Aktivitätsanstiegen im Serum, jedoch besteht keine Spezifität für einen bestimmten Typ der hepatobiliären Erkrankung [14].

In der hier vorliegenden Studie wurde geprüft, ob die Behandlung mit 3-DZA einen Einfluss auf die Leberenzyme als Marker für hepatobiliäre Schädigungen hat.

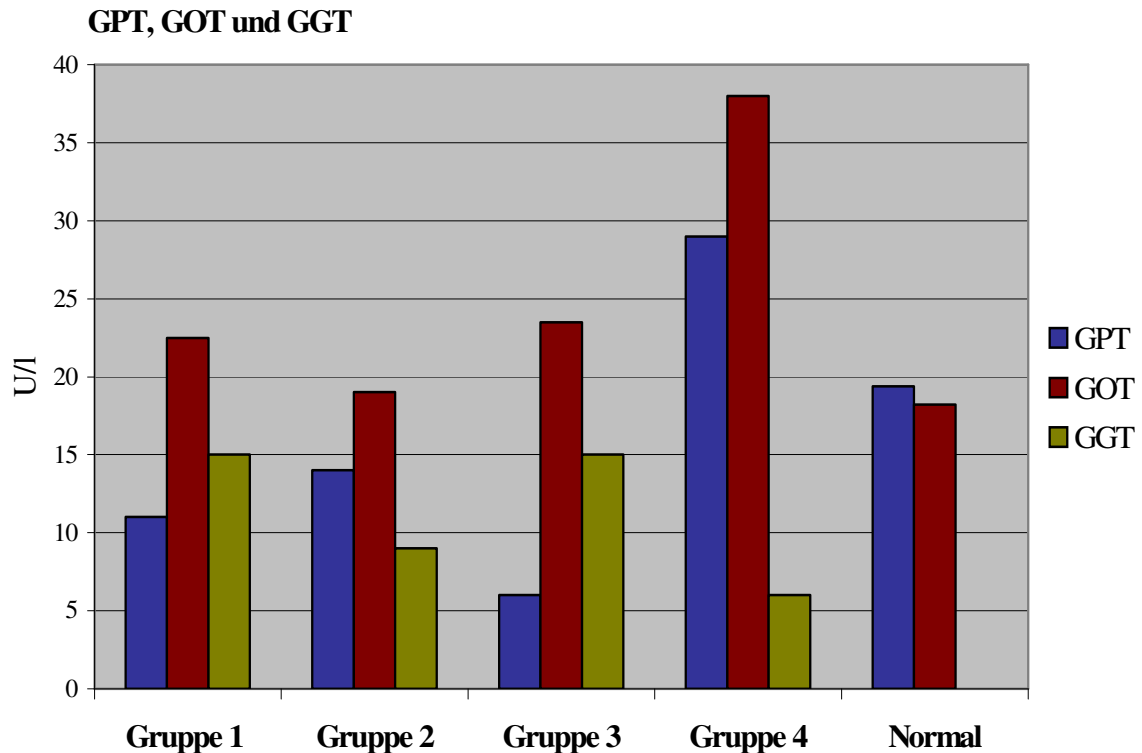


Abbildung 12: GPT, GOT und GGT im Serum unbehandelter und 3-DZA behandelter Apo E-Knockout Mäuse. Die Transaminasen und die GGT wurden nach dem Versuch aus Pfortaderblut bestimmt. Die Normalwerte sind der Literatur [68] entnommen und gelten für BALB/cAnN Mäuse. Aufgrund einiger Ausreißer wurde der Median angegeben.

	Gruppe 1 12 Wo WD ohne DZA GOT: n=8 GPT: n=8 GGT: n=8	Gruppe 2 12 Wo WD mit 3-DZA; GOT: n=9 GPT: n=9 GGT: n=10	Gruppe 3 24 Wo WD ohne 3-DZA GOT: n=8 GPT: n=8 GGT: n=7	Gruppe 4 24 Wo WD mit 3-DZA GOT: n=9 GPT: n=9 GGT: n=9	Normal ²⁾ ohne WD ohne 3-DZA
GOT [U/l]	22,5 ¹⁾	19 ¹⁾	23,5 ¹⁾	38 ¹⁾	18,2 ²⁾
GPT [U/l]	11 ¹⁾	14 ¹⁾	6 ¹⁾	29 ¹⁾	19,4 ²⁾
GGT [U/l]	15 ¹⁾	9 ¹⁾	15 ¹⁾	6 ^{1),3)}	0 ²⁾

¹⁾ Median,

²⁾ Literaturwerte [68]

³⁾ $p < 0,01$ verglichen mit Gruppe 3

4.1.1 Transaminasen (GOT, GPT)

Aufgrund einiger Ausreißer bei den Transaminasen, besonders in der 12-Wochen-Gruppe ohne 3-DZA, ist der Median ein besser geeigneter Lageparameter beim Vergleich der verschiedenen Gruppen als der Mittelwert. Der Median ist stabil gegenüber Ausreißern, welche bei der relativ geringen Anzahl von Versuchstieren den Mittelwert stark beeinflussen [67].

Bei der GOT zeigte sich innerhalb der 12-Wochen-Gruppen kein Unterschied (22,5 U/l ohne 3-DZA vs. 19,0 U/l mit 3-DZA). Die Werte entsprachen den aus der Literatur entnommenen Normalwerten (18,2 U/l) [68]. Die 24-Wochen-Gruppe mit 3-DZA (38,0 U/l) dagegen hatte eine gegenüber der Gruppe ohne Medikament (23,5 U/l) leicht erhöhte GOT, wobei diese Erhöhung nicht signifikant war ($p=0,27$). Die GPT war im Vergleich der 12 Wochen Gruppen nicht verschieden (11,0 U/l ohne 3-DZA vs. 14,0 mit 3-DZA). Sie lag leicht unter den in der Literatur angegebenen Normalwerten (19,4 U/l). Bei der 24-Wochen-Gruppe mit 3-DZA war die GPT erhöht (29,0 U/l vs. 6 U/l, $p=0,09$).

4.1.2 GGT

Die GGT zeigte sowohl nach 12 als auch nach 24 Wochen ein Absinken unter 3-DZA (12 Wochen: 15 U/l ohne 3-DZA vs. 9 U/l mit 3-DZA, $p = 0,15$; 24 Wochen: 15,0 U/l ohne 3-DZA vs. 6 U/l mit 3-DZA; $p<0,01$). In der Literatur wurden Normwerte für die GGT bei Mäusen als unter der Nachweisgrenze liegend beschrieben [68].

4.2 Einfluss einer Behandlung mit 3-DZA auf den Leberproteingehalt von Apo E-Knockout Mäusen

Der Proteingehalt wurde in den Leberhomogenaten gemessen.

Leberprotein

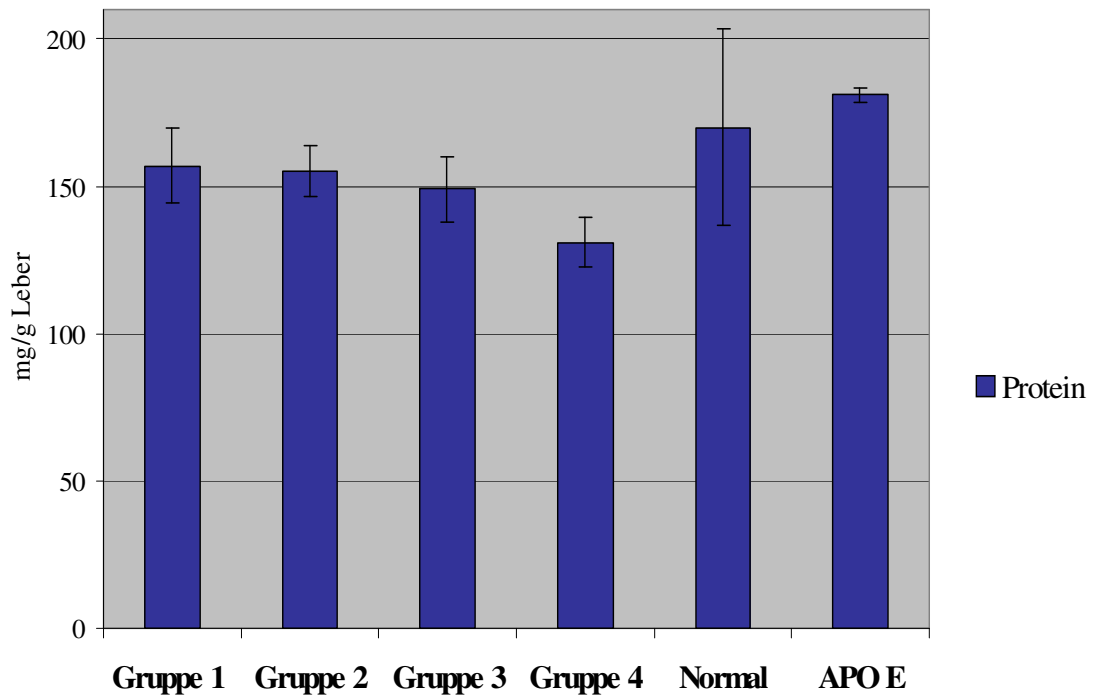


Abbildung 13: Leberproteingehalt un behandelter und 3-DZA behandelter Apo E-Knockout Mäuse. Die Angaben beziehen sich jeweils auf 1g Leber (Einheit: mg/g Leber). Die Normalwerte wurden bei Wildtypen bestimmt, welche weder Apo E defizient waren noch mit der Western-Diät gefüttert wurden. Die Werte für die Apo E Mäuse ohne Western-Diät wurden der Literatur entnommen [69].

	Gruppe 1 12 Wo WD ohne 3-DZA n=5	Gruppe 2 12 Wo WD mit 3-DZA n=5	Gruppe 3 24 Wo WD ohne 3-DZA n=5	Gruppe 4 24 Wo WD mit 3-DZA n=5	Normal ohne WD ohne 3-DZA n=5	Apo E ¹⁾ ohne WD ohne 3-DZA
Protein [mg/g Leber]	157 ± 12,6	155 ± 6,7	149 ± 11,2	131 ± 8,2	170 ± 33,4	181 ± 2,3 ¹⁾

¹⁾ Literaturwert [69]

Bei Apo E-Knockout Mäusen mit einer herkömmlichen Diät entsprach der Leberproteingehalt mit 181 mg/g Leber (Literaturwert [69]) in etwa dem der Normaltiere (170 mg/g Leber).

Der Proteingehalt in den Leberhomogenaten der Gruppen 1-3 war gegenüber den Normaltieren leicht erniedrigt; bei der Gruppe, die 24 Wochen mit 3-DZA behandelt wurde, fiel ein stärkerer Rückgang auf 131 mg/g Leber auf.

4.3 Einfluss einer 3-DZA-Behandlung auf die Phospholipidsynthese der Leber von Apo E-Knockout Mäusen

Phospholipide kommen in allen biologischen Membranen vor. Sie entstehen durch Veresterung der Phosphorylgruppe von Phosphatidat (Diacylglycerin-3-phosphat) mit der Hydroxylgruppe eines Alkohols (Serin, Ethanolamin, Cholin, Glycerin oder Inositol). Sphingomyelin ist das einzige Membranphospholipid, das kein Derivat des Glycerins ist; an dessen Stelle tritt Sphingomyelin. Aufgrund dieser Struktur sind Phospholipide amphipathische Moleküle mit einem hydrophilen (phosphorylierter Alkohol) und einem hydrophoben (Fettsäureketten) Anteil und bilden daher in wässrigem Medium leicht bipolare Schichten (Bilayer) [32].

Das darin am meisten vorkommende Phospholipid ist das Phosphatidylcholin (PC in menschlichen Membranen ~ 60 %, bei Ratten ~ 75 %) [108]. Die anderen Phospholipide sind wie folgt verteilt: Sphingomyelin (SM) 5%, Phosphatidylserin (PS) 3%, Phosphatidylinositol (PI) 7%, Phosphatidylethanolamin (PE) 25%.

4.3.1 Bestimmung von Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) mittels Anionenaustausch-HPLC

Die Phospholipide PC und PE sind mittels HPLC aus den Lipidextrakten gemessen worden.

Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE)

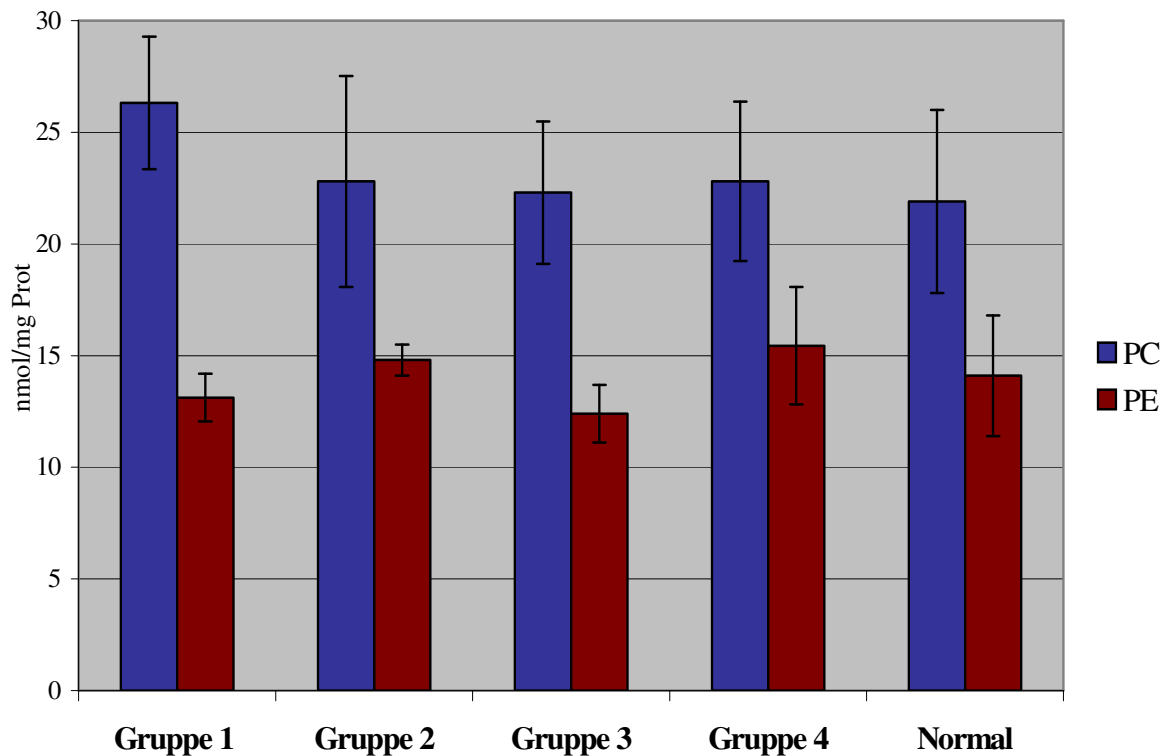


Abbildung 14: PC und PE Konzentration in der Leber unbehandelter und 3-DZA behandelter APO E-Knockout Mäuse. Die Angaben beziehen sich jeweils auf Protein (Einheit: nmol/mg Protein). Die Normalwerte wurden bei Mäusen bestimmt, welche weder Apo E defizient waren noch mit der Western-Diät gefüttert wurden.

	Gruppe 1 12 Wo WD ohne 3-DZA n=5	Gruppe 2 12 Wo WD mit 3-DZA n=5	Gruppe 3 24 Wo WD ohne 3-DZA n=5	Gruppe 4 24 Wo WD mit DZA n=5	Normal ohne WD ohne 3-DZA n=5
PC [nmol/mg Protein]	26,3 ± 3	22,8 ± 4,7	22,3 ± 3,2	22,3 ± 3,19	21,9 ± 4,1
PE [nmol/mg Protein]	13,1 ± 1,1	14,8 ± 0,7	12,4 ± 1,3	15,4 ± 2,6	14,1 ± 2,7

Wie aus der Abbildung 14 hervorgeht, war die Konzentration von PC in den Lipidextrakten bei den 12 Wochen Mäusen ohne 3-DZA gegenüber den anderen

Gruppen etwas erhöht (26,3nmol/mg Protein). Die Versuchsgruppen zeigten keine signifikant unterschiedlichen PC-Konzentrationen der Lipidextrakte.

Im Vergleich dazu stieg der PE-Gehalt bei den mit 3-DZA behandelten Tieren nicht signifikant an (13,1 nmol/mg Protein vs. 14,8 nmol/mg Protein nach 12 Wochen; 12,4 nmol/mg vs. 15,4 nmol/mg Protein nach 24 Wochen).

4.3.2 Ermittlung des PC/PE Verhältnis nach Auftrennung der Phospholipide mittels Anionenaustausch-HPLC

Das Verhältnis von PC zu PE gibt den Methylierungsindex an und soll anzeigen, ob eine Methylierungshemmung unter 3-DZA stattgefunden hat.

PE/PC (HPLC)

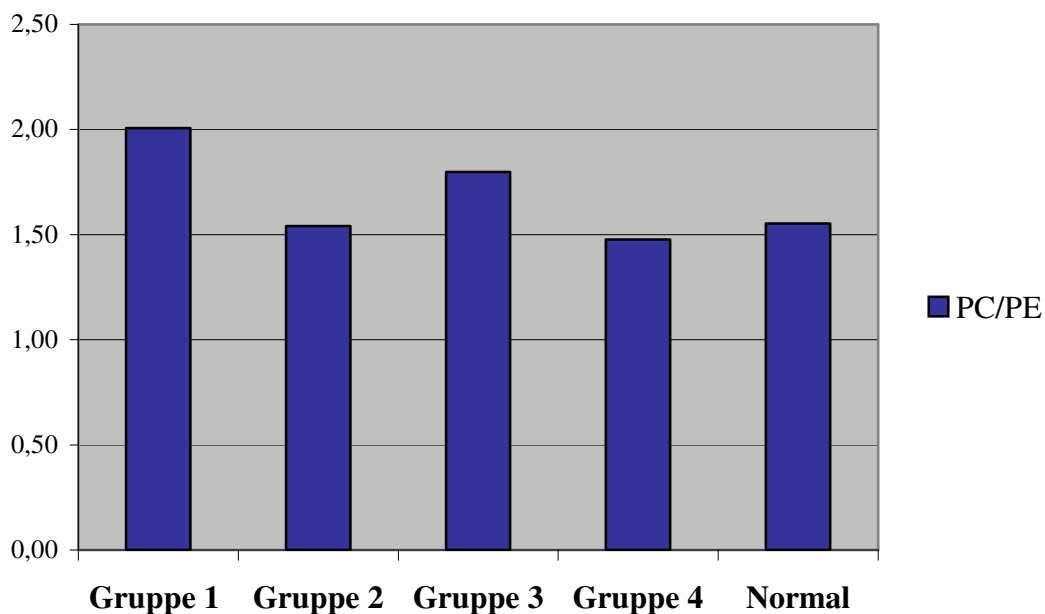


Abbildung 15: PC/PE Verhältnis der Versuchstiergruppen nach Auftrennung der Phospholipide mittels Anionenaustausch-HPLC. Der PC/ PE Quotient wurden aus dem Phospholipidgehalt, welcher durch die HPLC ermittelt wurde (siehe Abb.14) errechnet und gibt den Methylierungsindex an. Die Normalwerte wurden bei Mäusen bestimmt, welche weder Apo E defizient waren noch mit der Western-Diät gefüttert wurden.

	Gruppe 1 12 Wo WD ohne 3-DZA n=5	Gruppe 2 12 Wo WD mit 3-DZA n=5	Gruppe 3 24 Wo WD ohne 3-DZA n=5	Gruppe 4 24 Wo WD mit DZA n=5	Normal ohne WD ohne 3-DZA n=5
PC / PE (Methylierungs- index)	2,01	1,55	1,80	1,45	1,55

Wie aus Abbildung 15 hervorgeht, konnte ein leichter Abfall des Methylierungsindex unter 3-DZA-Behandlung beobachtet werden, was hauptsächlich auf die Erhöhung der PE-Spiegel zurückzuführen war. Bei den 12-Wochen-Tieren nahm das PC/PE Verhältnis unter 3-DZA von 2,01 auf 1,55, bei den 24-Wochen-Tieren von 1,80 auf 1,45 ab.

4.3.3 Bestimmung der Hauptphospholipidfraktionen mittels HPTLC und Fluoreszenzmarkierung

Das Verteilungsmuster der Hauptphospholipide wurde nach dünn-schicht-chromatographischer Auftrennung und anschließender Fluoreszenzmarkierung der Einzelkomponenten fluoreszenz-densitrometrisch ausgewertet (siehe 3.3.7.2).

Phospholipide

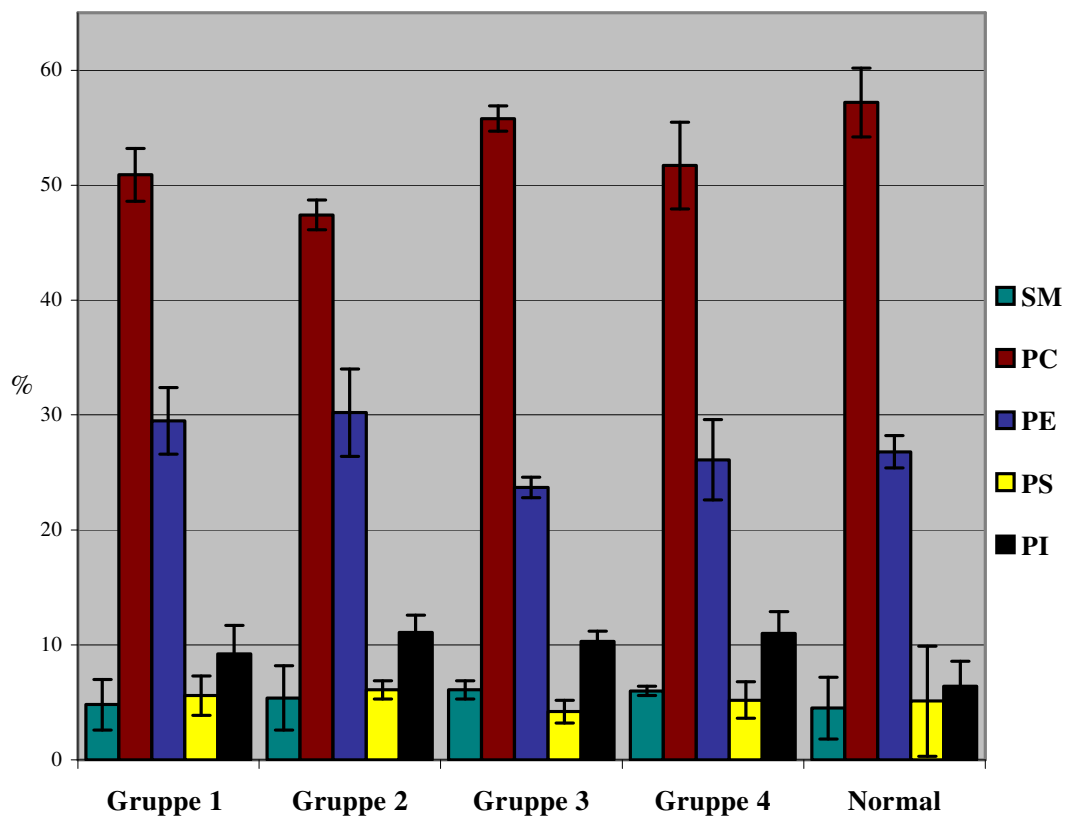


Abbildung 16: Anteil der einzelnen Phospholipidfraktionen in den einzelnen Versuchstiergruppen nach HPTLC und Fluoreszenzmarkierung. Die Normalwerte wurden bei Mäusen bestimmt, welche weder Apo E defizient waren noch mit der Western-Diät gefüttert wurden.

	Gruppe 1 12 Wo WD ohne 3-DZA n=5	Gruppe 2 12 Wo WD mit 3-DZA n=5	Gruppe 3 24 Wo WD ohne 3-DZA n=5	Gruppe 4 24 Wo WD mit DZA n=5	Normal ohne WD ohne 3-DZA n=5
SM %	4,8 ± 2,2	5,4 ± 2,8	6,1 ± 0,8	6 ± 0,4	4,5 ± 2,7
PC %	50,9 ± 2,3	47,4 ± 1,3	55,8 ± 1,1	51,7 ± 3,8	57,2 ± 3
PE %	29,5 ± 2,9	30,2 ± 3,8	23,7 ± 0,9	26,1 ± 3,5	26,8 ± 1,4
PS %	5,6 ± 1,7	6,1 ± 0,8	4,2 ± 1	5,2 ± 1,6	5,1 ± 4,8
PI %	9,2 ± 2,5	11,1 ± 1,5	10,3 ± 0,9	11 ± 1,9	6,4 ± 2,2

Mit Hilfe der HPTLC konnte man in der Leber unter 3-DZA eine leichte Abnahme des PC-Anteils sowie eine Zunahme des Anteils an PE am Gesamphospholipidgehalt feststellen. PS und SM bleiben relativ konstant, die Schwankungen dabei sind nicht signifikant. Bei PI lässt sich bei den Apo E-Knockout Mäusen gegenüber den Wildtyp-/Normaltieren ein Anstieg erkennen.

4.3.4 Ermittlung des PC/PE Verhältnisses nach Auftrennung der Phospholipide mittels HPTLC und Fluoreszenzmarkierung

Aus dem durch die HPTLC ermittelten Anteil der einzelnen Phospholipide lässt sich ebenfalls der Methylierungsindex (PC/PE Verhältnis) errechnen.

PC/PE (HPTLC)

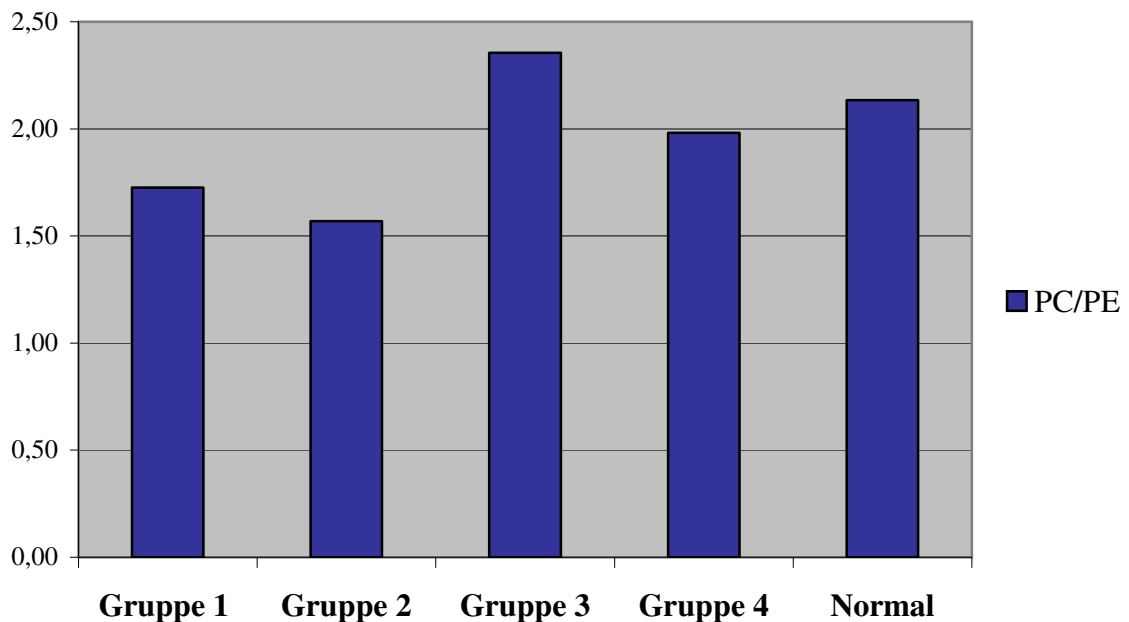


Abbildung 17: PC/PE Verhältnis nach Auftrennung der Phospholipide mittels HPTLC und Fluoreszenzmarkierung. Der PC/ PE Quotient wurde

aus dem Phospholipidanteil, welcher durch die HPTLC ermittelt wurde, (siehe Abb.16) errechnet und gibt den Methylierungsindex an. Die Normalwerte wurden bei Mäusen bestimmt, welche weder Apo E defizient waren noch mit der Western-Diät gefüttert wurden.

	Gruppe 1 12 Wo WD ohne 3-DZA n=5	Gruppe 2 12 Wo WD mit 3-DZA n=5	Gruppe 3 24 Wo WD ohne 3-DZA n=5	Gruppe 4 24 Wo WD mit DZA n=5	Normal ohne WD ohne 3-DZA n=5
PC / PE (Methylierungs- index)	1,73	1,57	2,35	1,98	2,13

Obwohl die Werte, welche mit Hilfe der HPTLC-Methode gemessen wurden, mit denen der genaueren HPLC nicht direkt vergleichbar sind, konnte man auch hier ein leichtes Absinken des Methylierungsindex bei den mit 3-DZA behandelten Apo E-Knockout Mäusen beobachten. Bei den 12 Wochen Tieren sank das Verhältnis von PC zu PE von 1,73 auf 1,57, bei den 24 Wochen Tieren von 2,35 auf 1,98.

4.4 Einfluss einer Behandlung mit 3-DZA auf den Triglyceridgehalt der Leber von Apo E-Knockout Mäusen

Im Gegensatz zum Glykogenstoffwechsel findet in der Leber normalerweise keine Triglyceridspeicherung statt. Die in der Leber synthetisierten VLDL-Triglyceride werden zum größten Teil zum weißen Fettgewebe transportiert und dort durch gewebständige Lipoproteinlipasen gespalten. Die freigesetzten Fettsäuren werden in die Adipozyten transportiert und dort mit α -Glycerophosphat reesteriert und als Triglyceride eingelagert. Die gesunde menschliche Leber enthält 20 - 40 mg Triglyceride pro g Leberfeuchtgewicht. Ein Anstieg auf 50 - 100 mg/g entspricht einer beginnenden, 100 - 250 mg/g einer mäßigen und 200 - 500 mg/g einer schweren Leberverfettung (steatosis hepatis) [14].

Der Triglyceridgehalt wurde in den Leberhomogenaten gemessen.

Lebertriglyceride

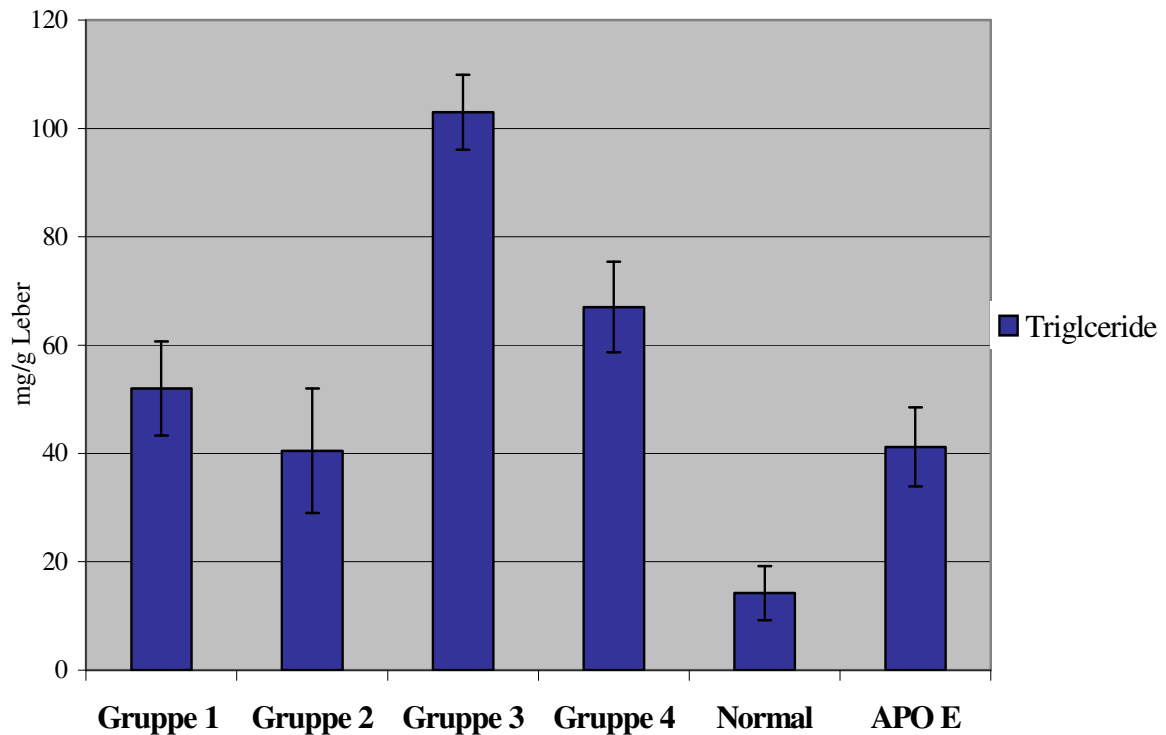


Abbildung 18: Triglyceridgehalt der Leber von Apo E-Knockout Mäusen mit und ohne 3-DZA-Behandlung. Die Angaben beziehen sich jeweils auf 1g Leber (Einheit: mg/g Leber). Die Normalwerte wurden bei Wildtypen bestimmt, welche weder Apo E defizient waren noch mit der Western Diät gefüttert wurden. Die Werte für die Apo E-Knockout Mäuse ohne Western-Diät (APO E) wurden der Literatur entnommen [69].

	Gruppe 1 12 Wo WD ohne 3-DZA n=5	Gruppe 2 12 Wo WD mit 3-DZA n=5	Gruppe 3 24 Wo WD ohne 3-DZA n=5	Gruppe 4 24 Wo WD mit 3-DZA n=5	Normal ohne WD ohne 3-DZA n=5	APO E ¹⁾ ohne WD ohne 3-DZA
Tri- glyceride [mg/g Leber]	52 ± 8,7	40,5 ± 11,5	103 ± 6,9	67 ± 8,4²⁾	14,2 ± 5,0	41,2 ± 7,3 ¹⁾

1) Literaturwert [69]

2) $p < 0,05$ verglichen mit Gruppe 3

Wie aus Abbildung 18 hervorgeht, war der Triglyceridgehalt der Leber von Apo E-Knockout Mäusen, welche mit Normaldiät gefüttert wurden, etwa 3fach höher als im Vergleich zur Normaltier-/Wildtier-Gruppe mit normaler Diät [69]. Er lag bei 40,5 mg/g Leberfeuchtgewicht.

Bei den mit der Western-Diät gefütterten Apo E-Knockout Mäuse kam es schon nach 12 Wochen (Gruppe 1) zu einem deutlichen Anstieg der Lebertriglyceridwerte auf 52 mg/g Leberfeuchtgewicht. Nach einer 24 Wochen dauernden Western-Diät (Gruppe 3) hatte sich der Lebertriglyceridgehalt etwa verdreifacht und lag bei 103 mg/g Leberfeuchtgewicht.

Unter Therapie mit 3-DZA konnte sowohl bei der 12-Wochen- als auch bei der 24-Wochen-Versuchstiergruppe der Lebertriglyceridgehalt deutlich gesenkt werden. Bei der 12 Wochen 3-DZA-Versuchstiergruppe (Gruppe 2) zeigte sich eine Reduktion (-22%) von 52 mg/g auf 40,5 mg/g Leberfeuchtgewicht ($p=0,46$). Bei der 24 Wochen 3-DZA-Versuchstiergruppe (Gruppe 4) ließ sich ein noch deutlicherer Rückgang von 103 mg/g auf 67 mg/g Leberfeuchtgewicht beobachten ($p < 0,05$).

Insgesamt zeigte sich jedoch, dass 3-DZA weder bei der 12 Wochen noch bei der 24 Wochen dauernden Begleittherapie mit 3-DZA die durch eine Western-Diät induzierte Leberverfettung vollständig verhindert werden kann.

4.5 Einfluss einer 3-DZA-Behandlung auf den Cholesteringehalt der Leber von Apo E-Knockout Mäusen

Der Gesamtcholesterin-Pool im menschlichen Organismus beträgt ca. 2000 mg/Tag. Um diesen Cholesterin-Pool konstant zu halten, müssen Verbrauch und Zufuhr ausgeglichen sein. Wichtigstes Regulativ auf ein gesteigertes Angebot mit der Nahrung ist die Drosselung der endogenen Cholesterinsynthese, wobei 2 Organsysteme, nämlich Leber (85%) und Darmtrakt (12%) zusammen 97% der körpereigenen Cholesterinsynthese bestreiten. Die endogene Synthese unterliegt vielfältigen, regulatorischen Einflüssen wie Hunger oder der diurnalen Rhythmik. Hierbei stellt die HMG-CoA-Reduktase das entscheidende Enzym dar. Bei einer Halbwertszeit von nur 3 Stunden erfolgt die Regulation der HMG-CoA-Reduktase über Repression bzw. Induktion der Enzymsynthese in Abhängigkeit vom Cholesterinangebot an die Zelle. Dabei sind offenbar in Leber und Darm unterschiedliche Mechanismen wirksam. Im Hepatozyt wird die Enzymsynthese der HMG-CoA-Reduktase nur durch das in Form von LDL zugeführte Cholesterin induziert, während die Mucosazelle ihre HMG-CoA-Reduktaseaktivität nicht durch

die Cholesterin-, sondern vielmehr durch die Gallensäurekonzentration im Darmlumen beeinflusst wird.

Das mit der Nahrung zugeführte oder im Darm gebildete Cholesterin geht durch Resorption und Weitertransport letztlich in den Pool des Lebercholesterins ein. Der Cholesteringehalt einer menschlichen Leber liegt zwischen 2 mg/g und 4 mg/g Feuchtgewicht. Von der Leber aus erfolgt eine Sekretion des Cholesterins in die Galle und eine Abgabe in das periphere Blut als VLDL- oder HDL-Cholesterin (siehe Einleitung) [14].

Bei einem Missverhältnis zwischen dem aus der Nahrung und der endogenen Synthese stammenden Cholesterinangebots einerseits sowie dem Cholesterinbedarf des Organismus und der Abbaurate zu Gallensäuren andererseits muss es zur Ablagerung bzw. Speicherung von Cholesterin in den Zellen kommen. [137].

4.5.1 Einfluss einer Behandlung mit 3-DZA auf das Lebergesamtcholesterin bei Apo E-Knockout Mäusen

Der Gesamtcholesteringehalt wurde in den Leberhomogenaten gemessen.

Lebergesamtcholesterin

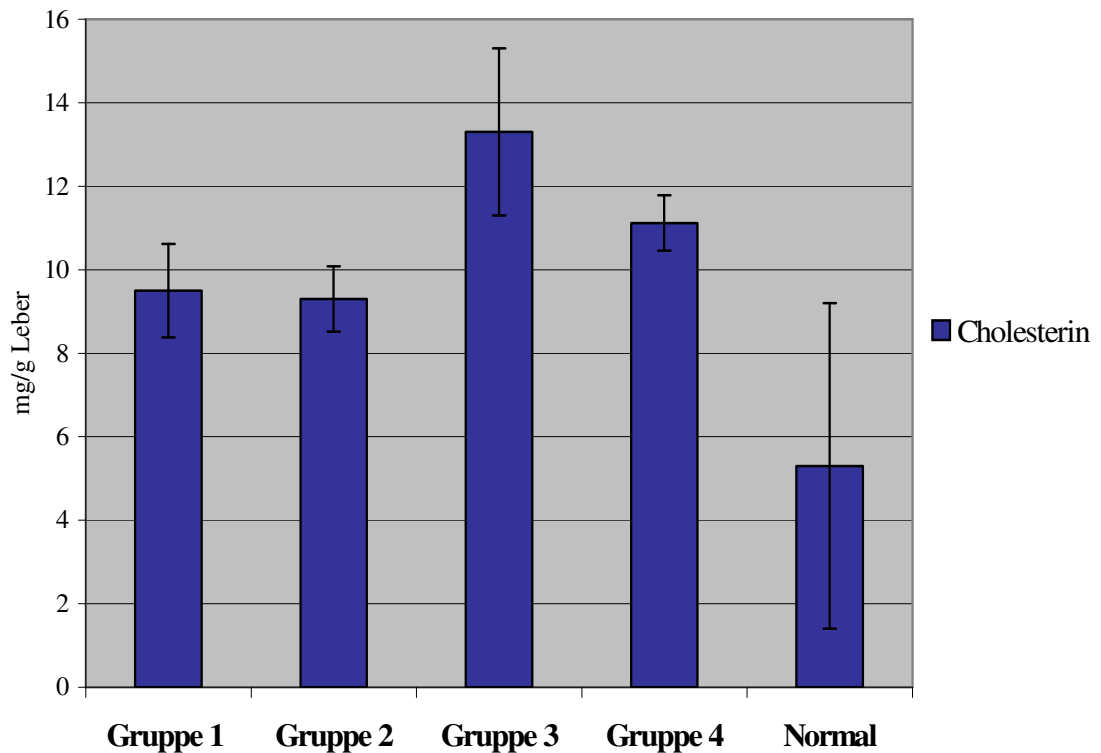


Abbildung 19: Lebergesamtcholesterin bei Apo E-Knockout Mäusen mit und ohne 3-DZA-Behandlung. Die Angaben beziehen sich jeweils auf 1g Leber (Einheit: mg/g Leber). Die Normalwerte wurden bei Wildtypen bestimmt, welche weder Apo E defizient waren noch mit der Western-Diät gefüttert wurden.

	Gruppe 1 12 Wo WD ohne 3-DZA n=5	Gruppe 2 12 Wo WD mit 3-DZA n=5	Gruppe 3 24 Wo WD ohne 3-DZA n=5	Gruppe 4 24 Wo WD mit 3-DZA n=5	Normal ohne WD ohne 3-DZA n=5
Cholesterin [mg/g]	9,5 ± 1,1	9,3 ± 0,8	13,3 ± 2	11,1 ± 0,7¹⁾	5,3 ± 3,9

¹⁾ p < 0,05 verglichen mit Gruppe 3

Die Ergebnisse in Abbildung 19 zeigen, dass im Vergleich zur Normaltier-Gruppe, welche eine Normaldiät erhielt, die Aufnahme einer fett- und cholesterinreichen Western-Diät nach 12 Wochen (Gruppe 1) und insbesondere nach 24 Wochen (Gruppe 3) zu einer deutlichen Erhöhung des Lebercholesteringehaltes führte. Eine Begleittherapie mit 3-DZA hatte in der 12-Wochen-Versuchstiergruppe mit 3-DZA (Gruppe 2) keine signifikante Reduktion des Lebercholesteringehaltes zur Folge. Dagegen konnte bei der 24 Wochen-Versuchstiergruppe mit 3-DZA (Gruppe 4) ein signifikanter Abfall (p < 0,05) von 13,3 mg/g auf 11,1 mg/g Leberfeuchtgewicht beobachtet werden. Im gesamten zeitlichen Verlauf zeigte sich also bei den mit einer fett- und cholesterinreichen Diät gefütterten Tieren eine weniger stark ausgeprägte Cholesterinakkumulation in der Leber unter einer Begleittherapie mit 3-DZA.

4.5.2 Einfluss einer Behandlung mit 3-DZA auf das freie Cholesterin und die Cholesterinester in der Leber bei Apo E-Knockout Mäusen

Um zu prüfen, ob das in der Leber akkumulierte Cholesterin als freies oder mit Fettsäuren verestertes Cholesterin eingelagert wurde, wurden die Lipidextrakte der Versuchstierlebern mittels HPTLC aufgetrennt und der Anteil der nachzuweisenden Komponenten über Fluoreszenzmarkierung bestimmt (siehe 3.3.6.1 und 3.3.7.1). Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

Lebercholesterin/-cholesterinester

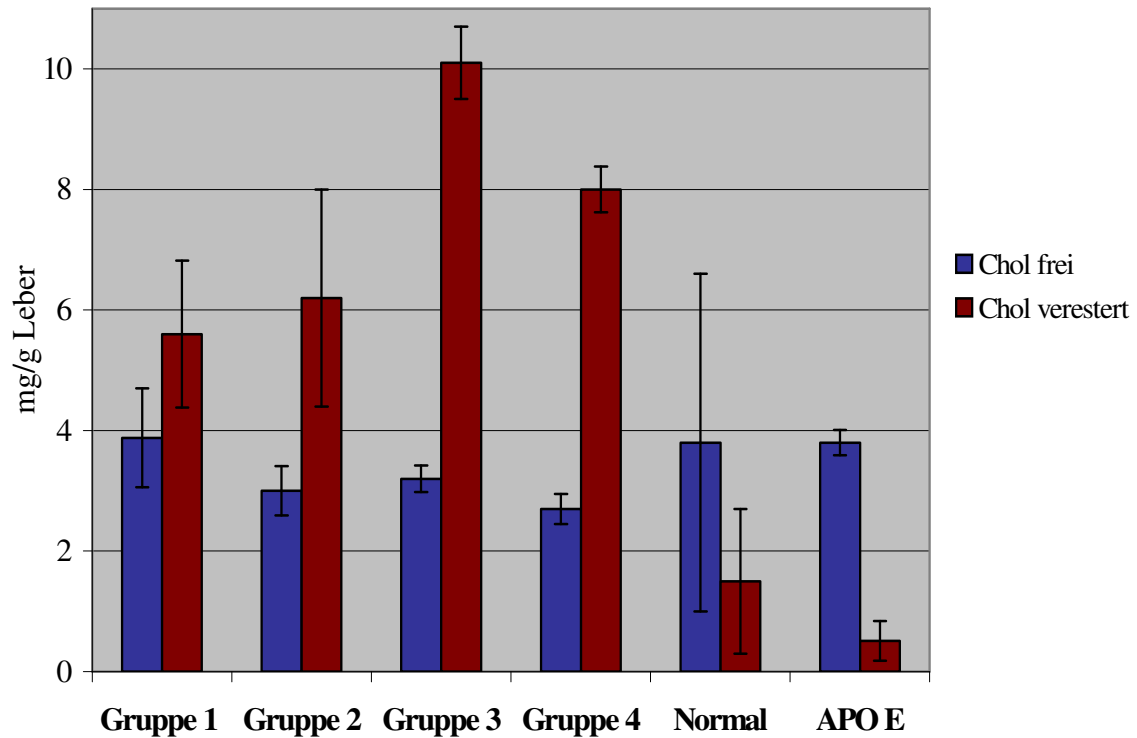


Abbildung 20: Freies Cholesterin und Cholesterinester in der Leber bei APO E-Knockout Mäusen mit und ohne 3-DZA-Behandlung. Die Angaben beziehen sich jeweils auf 1g Leber (Einheit: mg/g Leber). Die Normalwerte wurden bei Wildtypen bestimmt, welche weder Apo E defizient waren noch mit der Western-Diät gefüttert wurden. Die Werte für die Apo E-Knockout Mäuse ohne Western-Diät (APO E) wurden der Literatur entnommen [69]. APO E: Apo E-Knockout Mäuse ohne Western-Diät.

	Gruppe 1 12 Wo WD ohne 3-DZA n=5	Gruppe 2 12 Wo WD mit 3-DZA n=5	Gruppe 3 24 Wo WD ohne 3-DZA n=5	Gruppe 4 24 Wo WD mit 3-DZA n=5	Normal ohne WD ohne 3-DZA n=5	APO E ¹⁾ ohne WD ohne 3-DZA
Chol frei [mg/g Leber]	3,9 ± 0,8	3 ± 0,4	3,2 ± 0,2	2,7 ± 0,3	3,8 ± 2,8	3,8 ± 0,2 ¹⁾
Chol verestert [mg/g Leber]	5,6 ± 1,2	6,2 ± 1,8	10,1 ± 0,6	8 ± 0,4 ²⁾	1,5 ± 1,2	0,5 ± 0,3 ¹⁾

¹⁾ Literaturwert [69]

²⁾ p < 0,05 verglichen mit Gruppe 3

Die Auftrennung von freiem und verestertem Cholesterin mittels HPTLC und Fluoreszenzmarkierung zeigte, dass der bei den mit der Western-Diät gefütterten

Tieren erhöhte Gesamtcholesterinwert hauptsächlich auf eine Akkumulation von Cholesterinestern zurückzuführen war. Das freie Cholesterin war gegenüber den Normaltieren / Wildtypen und den Apo E-Knockout Mäusen ohne Western-Diät nicht signifikant verändert. Bei der 24 Wochen Gruppe (Gruppe 4) kam es jedoch unter Begleittherapie mit 3-DZA zu einer Reduktion des veresterten Cholesterins von 10,1 mg/g Leber auf 8 mg/g Leber ($p < 0,05$). Dieser durch 3-DZA Begleittherapie verursachte Rückgang des veresterten Cholesterins in der Leber ließ sich aber noch nicht nach einer 12wöchigen Versuchsdauer beobachten.

4.6 Einfluss einer 3-DZA-Behandlung auf Bestandteile im Serum

4.6.1 Einfluss einer 3-DZA-Behandlung auf die Serumcholesterinkonzentration von Apo E-Knockout Mäusen

Um zu überprüfen, ob eine 12- bzw. 24-wöchige Begleittherapie mit 3-DZA auch eine Senkung des Serumcholesterinspiegels induzieren kann, wurde das Pfortaderblut der Versuchstiere gewonnen und das Gesamtcholesterin nach der beschriebenen Methode analysiert.

Serumcholesterin

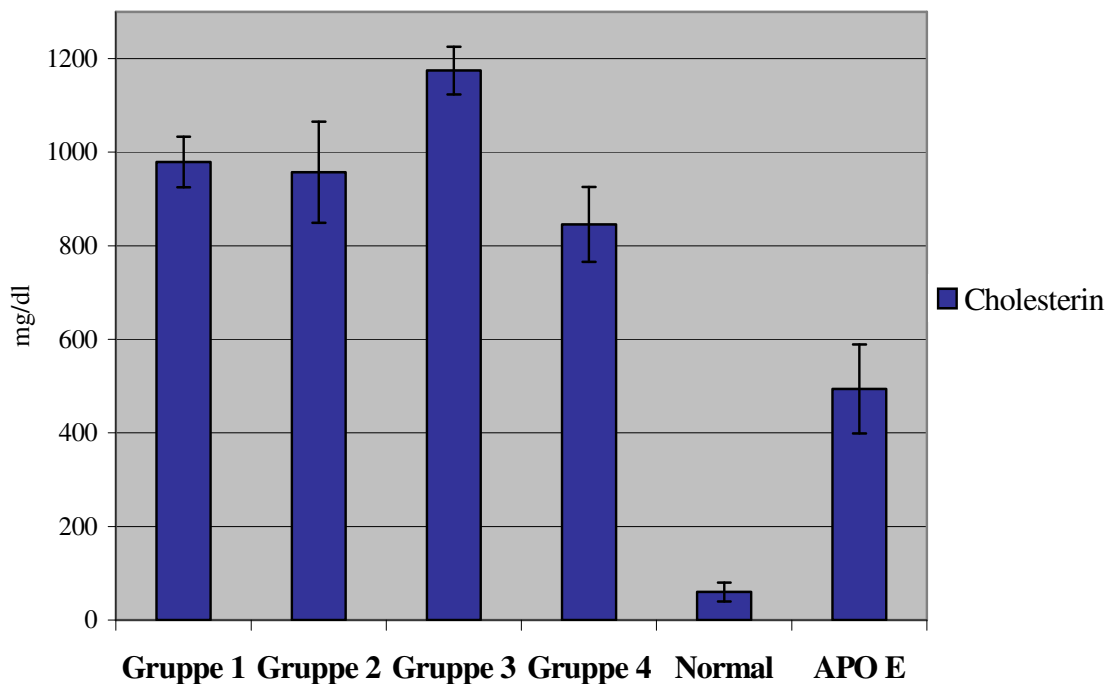


Abbildung 21: Serumcholesterinspiegel bei Apo E Mäusen mit und ohne 3-DZA-Behandlung. Das Gesamtcholesterin wurde nach dem Tod der Tiere bestimmt. Normal: Wildtypen; APO E : Apo E-Knockout Mäuse ohne Western-Diät (Literaturwerte [55])

	Gruppe 1 12 Wo WD ohne 3-DZA n=10	Gruppe 2 12 Wo WD mit 3-DZA n=10	Gruppe 3 24 Wo WD ohne 3-DZA n=9	Gruppe 4 24 Wo WD mit 3-DZA n=9	Normal ohne WD ohne 3- DZA	APO E ¹⁾ ohne WD ohne 3-DZA
Chol- esterin [mg/dl]	979,3 ± 54	957,1 ± 108	1174,6 ± 51	845,4 ± 80 ²⁾	60 ± 20 ¹⁾	494 ± 95 ¹⁾

¹⁾ Literaturwert [55]

²⁾ $p < 0,01$ verglichen mit Gruppe 3

Die dabei gewonnenen Befunde sind in Abbildung 22 zusammengestellt. Sie zeigen, dass wie beim Lebercholesterin, die Aufnahme einer fett- und cholesterinreichen Diät nach 12 (Gruppe 1) und nach 24 Wochen (Gruppe 3) zu einem deutlichen Anstieg des Serumcholesterins im Vergleich zur Normaltier-/Wildtypgruppe und Apo E-Knockout Mäusen führte, die mit einer normalen Diät gefüttert wurden (Literaturwerte [55]).

Erhielten die mit Western-Diät gefütterten Tiere eine Therapie mit 3-DZA, so war bei der 24-Wochen-Versuchstiergruppe (Gruppe 4) eine signifikante Absenkung des Serumcholesterinspiegels ($p < 0,01$) von 1174,6 mg/dl auf 845,5 mg/dl zu beobachten. Im Falle der 12-Wochen-Versuchstiergruppe (Gruppe 2) hingegen ließ sich kein cholesterinsenkender Effekt von 3-DZA nachweisen.

Die hier gewonnenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass unter einer verlängerten Behandlung mit 3-DZA der serumcholesterinsteigernde Effekt der Western-Diät deutlich abgesenkt werden kann.

4.6.2 Einfluss einer 3-DZA-Behandlung auf die HDL- und LDL-Konzentrationen im Serum von Apo E-Knockout Mäusen

Das Gesamtcholesterin wurde durch die unter 3.4.3 und 3.4.4 beschriebene Methode in seine Anteile, die Lipoproteinfraktionen HDL- und LDL-Cholesterin, aufgetrennt.

Lipoproteine

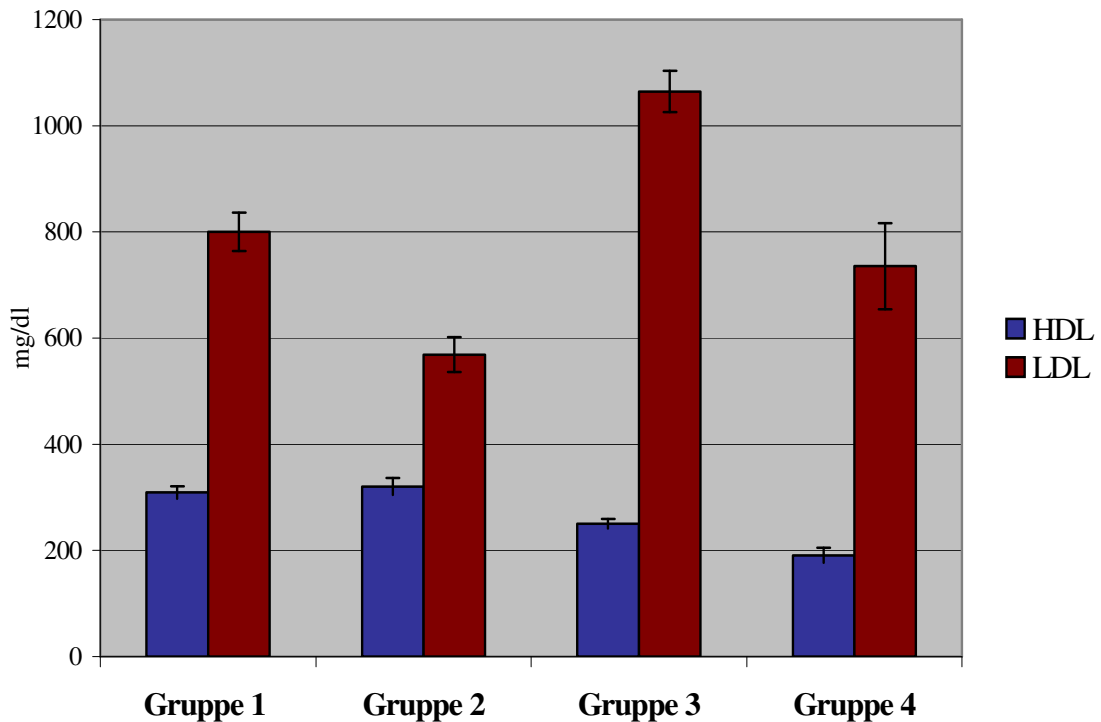


Abbildung 22: Einfluss einer 3-DZA-Behandlung auf die HDL- und LDL-Konzentrationen im Serum von Apo E-Knockout Mäusen. Im Diagramm ist der HDL- bzw. LDL-Spiegel im Serum der verschiedenen Gruppen nach dem Versuch dargestellt.

	Gruppe 1 12 Wo WD ohne 3-DZA n=10	Gruppe 2 12 Wo WD mit 3-DZA n=10	Gruppe 3 24 Wo WD ohne 3-DZA n=9	Gruppe 4 24 Wo WD mit 3-DZA n=9
HDL-Cholesterin [mg/dl]	309,1 ± 12	320,5 ± 16	250 ± 9	190,8 ± 14¹⁾
LDL-Cholesterin [mg/dl]	800,2 ± 36	568,8 ± 33 ¹⁾	1064,6 ± 39	735,6 ± 81¹⁾

¹⁾ p < 0,01 verglichen mit Gruppe 3

Die Verminderung des Gesamtcholesterins im Serum (Abbildung 21) unter 3-DZA spiegelt sich in der LDL- aber auch in der HDL-Fraktion wider. Die HDL-Fraktion im Serum zeigte bei den 12-Wochen-Versuchstiergruppen (Gruppe 1 und 2) keinen signifikanten Unterschied. Die HDL-Cholesterinkonzentrationen lagen bei 309,1 mg/dl bzw. 320 mg/dl. Im Vergleich dazu kam es bei den beiden 24-Wochen-Versuchstiergruppen (Gruppe 3 und 4) zu einem Abfall (p < 0,01) der HDL-

Cholesterinkonzentration unter 3-DZA von 250,9 mg/dl auf 190,8 mg/dl. Im zeitlichen Verlauf sanken die HDL-Cholesterinspiegel sowohl bei den Tieren, die mit 3-DZA behandelt wurden, als auch bei denen ohne 3-DZA ($p < 0,01$).

Die LDL-Cholesterinkonzentration im Serum nach einer 12-wöchigen Western-Diät lag bei 800 mg/dl (Gruppe 1). Nach 24 Wochen Western-Diät stieg die LDL-Cholesterinkonzentration noch weiter an und betrug 1064 mg/dl (Gruppe 3). Die LDL-Cholesterinkonzentrationen wiesen aber unter der Co-Medikation mit 3-DZA einen starken Rückgang auf ($p < 0,01$). Nach 12 Wochen sanken sie von 800,2 mg/dl auf 568,8 mg/dl (Gruppe 1 und 2), nach 24 Wochen von 1064,4 mg/dl auf 735,6 mg/dl (Gruppe 3 und 4).

Die hier gewonnen Befunde lassen daher vermuten, dass unter 3-DZA als Begleittherapie der LDL-Cholesterin-steigernde Effekt einer Western-Diät deutlich abgeschwächt werden kann.

4.6.3 Einfluss von 3-DZA auf die Serumtriglyceridkonzentration von Apo E-Knockout Mäusen

Exogene Triglyceride werden im Blut in der Form von Chylomikronen transportiert, während sich die Triglyceride endogener Herkunft überwiegend in der VLDL-Fraktion befinden. Der Serumtriglyceridspiegel ergibt sich also hauptsächlich dem Bestand dieser beiden Fraktionen [14]. Um zu untersuchen, ob eine 12- bzw. 24-wöchige Begleittherapie mit 3-DZA ebenfalls eine Senkung des Serumtriglyceridspiegels induzieren kann, wurde das Pfortaderblut gewonnen und die Triglyceridkonzentration im Serum bestimmt.

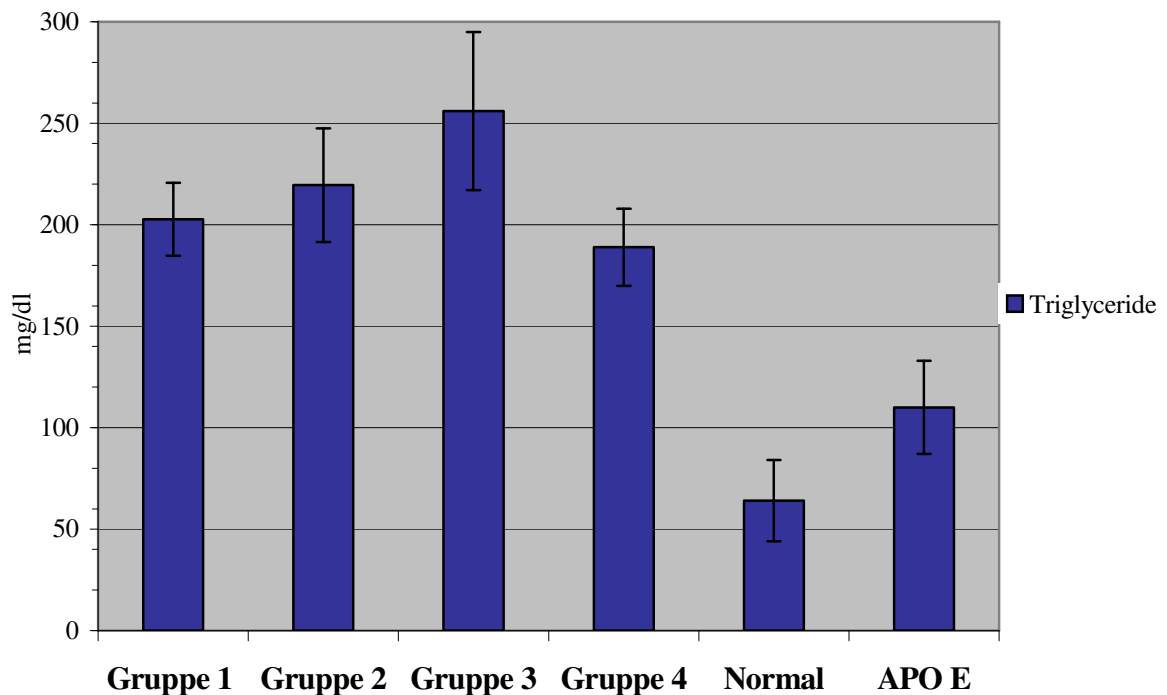
Serumtriglyceride

Abbildung 23: Einfluss von 3-DZA auf die Serumtriglyceridkonzentration von Apo E-Knockout Mäusen. Der Triglyceridgehalt wurde nach dem Tod der Tiere bestimmt. Normal: Wildtypen; APO E: Apo E-Knockout Mäuse ohne Western-Diät (Literaturwerte [55])

	Gruppe 1 12 Wo WD ohne 3-DZA n=10	Gruppe 2 12 Wo WD mit 3-DZA n=10	Gruppe 3 24 Wo WD ohne 3-DZA n=9	Gruppe 4 24 Wo WD mit 3-DZA n=9	Normal ¹⁾ ohne WD ohne 3-DZA	AP0 E ¹⁾ ohne WD ohne 3-DZA
Tri- glyceride [mg/dl]	202,7 ± 18	219,8 ± 28	256 ± 39	188 ± 19	64 ± 20 ¹⁾	110 ± 23 ¹⁾

¹⁾ Literaturwert [55]

Wie aus Abbildung 23 zu entnehmen ist, liegt die Konzentration der Serumtriglyceride bei Apo E- Knockout Mäusen mit Standarddiät etwa doppelt so hoch wie beim Wildtyp (Literaturwert [55]). Dagegen waren die Triglyceridspiegel der mit der Western-Diät gefütterten Apo E-Knockout Mäuse (Gruppe 1 und 3) gegenüber den Apo E Mäusen ohne Diät wiederum ungefähr doppelt so hoch.

Nach einer 12wöchigen Western-Diät und Begleittherapie mit 3-DZA ließ sich jedoch kein triglyceridsenkender Effekt des Medikaments beobachten. Der Wert der unbehandelten Versuchstiergruppe (Gruppe 1) lag bei 202,7 mg/dl, der Wert der mit 3-DZA behandelten Mäuse (Gruppe 2) betrug 219,8 mg/dl. Im Gegensatz dazu

zeigte sich bei den länger gefütterten Tieren unter 3-DZA eine Reduktion des Triglyceridspiegels von 256 mg/dl auf 188,9 mg/dl (Gruppe 3 und 4, $p=0,12$).

Die hier dargestellten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass 3-DZA wahrscheinlich erst nach einer langfristigen Therapie einen günstigen Einfluss auf die Serumtriglyceridkonzentration hat.

4.6.4 Einfluss von 3-DZA auf den Serumhomocysteinspiegel von Apo E-Knockout Mäusen

Ein erhöhter Homocysteinspiegel im Blut ist ein bedeutender Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose [5]. Da 3-DZA als kompetitiver Inhibitor zellulärer Transmethylierungsreaktionen gilt (siehe Einleitung Abb.4), ist ein Einfluss dieses Inhibitors auch auf die Homocysteinsynthese und damit auf den Serumspiegel denkbar. Um dieser Vorstellung nachzugehen, wurde das Pfortaderblut der Versuchstiere gewonnen und die Homocysteinkonzentration im Serum bestimmt.

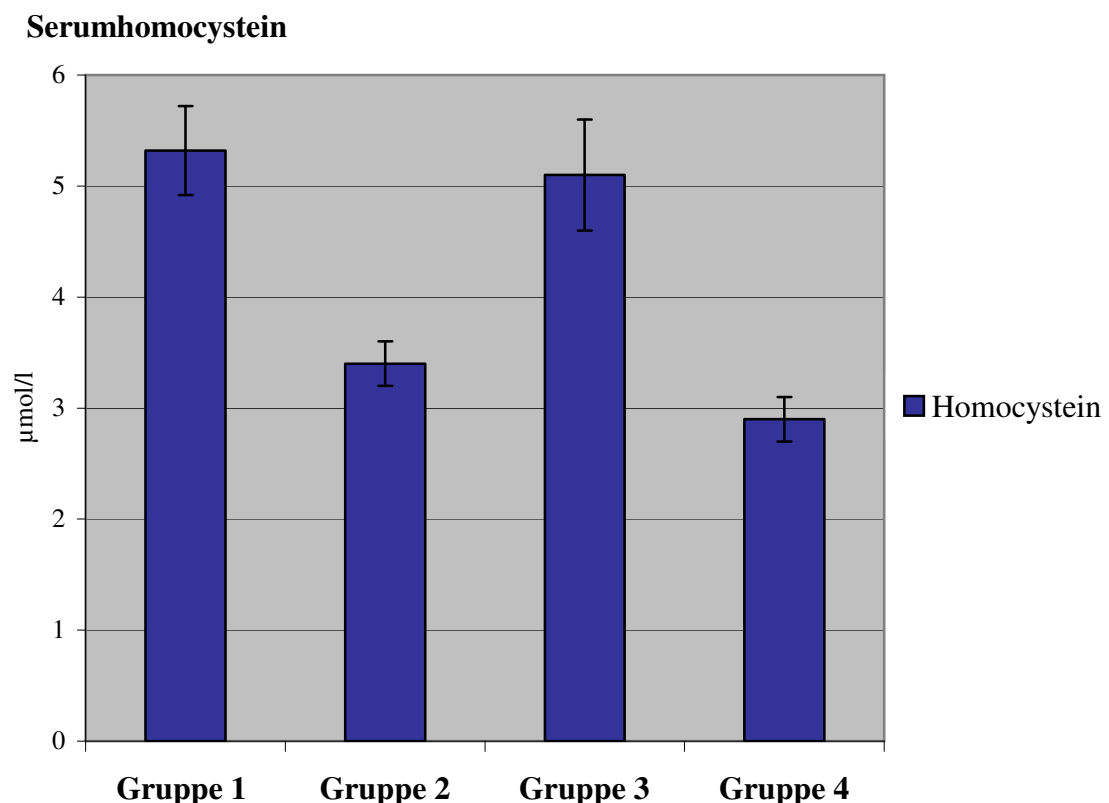


Abbildung 24: Einfluss von 3-DZA auf den Serumhomocysteinspiegel bei Apo E-Knockout Mäusen in (in Zusammenarbeit mit der Abteilung Kardiologie des Uniklinikums Gießen)

	Gruppe 1 12 Wo WD ohne 3-DZA n=9	Gruppe 2 12 Wo WD mit 3-DZA n=10	Gruppe 3 24 Wo WD ohne 3-DZA n=9	Gruppe 4 24 Wo WD mit 3-DZA n=9
Homocystein [μmol/l]	5,3 ± 0,4	3,4 ± 0,2¹⁾	5,1 ± 0,5	2,9 ± 0,2¹⁾

¹⁾ p < 0,01 verglichen mit Gruppe 1 bzw. Gruppe 3

Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung Kardiologie der Medizinischen Klinik I des Uniklinikums Gießen gewonnen.

Es zeigt sich ein deutlicher Rückgang des Serumhomocysteinspiegels unter 3-DZA Begleittherapie (p < 0,01). Nach 12 Wochen ist dieser Wert bei den behandelten Tieren von 5,3 μmol/l auf 3,4 μmol/l abgesunken (Gruppe 1 und 2), nach 24 Wochen kommt es zu einem Abfall von 5,1 μmol/l auf 2,9 μmol/l (Gruppe 3 und 4).

5 Diskussion

5.1 Vorstellung der Studienergebnisse bezüglich der Plaqueentwicklung und der Expression von ICAM-1 und VCAM-1

Die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich der Plaqueentwicklung und der Expression der Endothelzellenadhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sollen im Folgenden vorgestellt werden. Es handelt sich hierbei um unveröffentlichte Studienergebnisse, die mir freundlicherweise von den Doktoranden Ina Jeide und Ralf Schilling aus der Kardiologischen Abteilung des Uniklinikums Gießen zur Verfügung gestellt wurden.

5.1.1 Einfluss von 3-DZA auf Plaqueanzahl und -fläche bei Apo E-Knockout Mäusen

Die Aorta der Apo E-Knockout Mäuse wurde histologisch aufgearbeitet und die Anzahl sowie die Fläche der Plaques nach einer modifizierten, von Paigen beschriebenen Methode [44,141] planimetrisch ausgemessen.

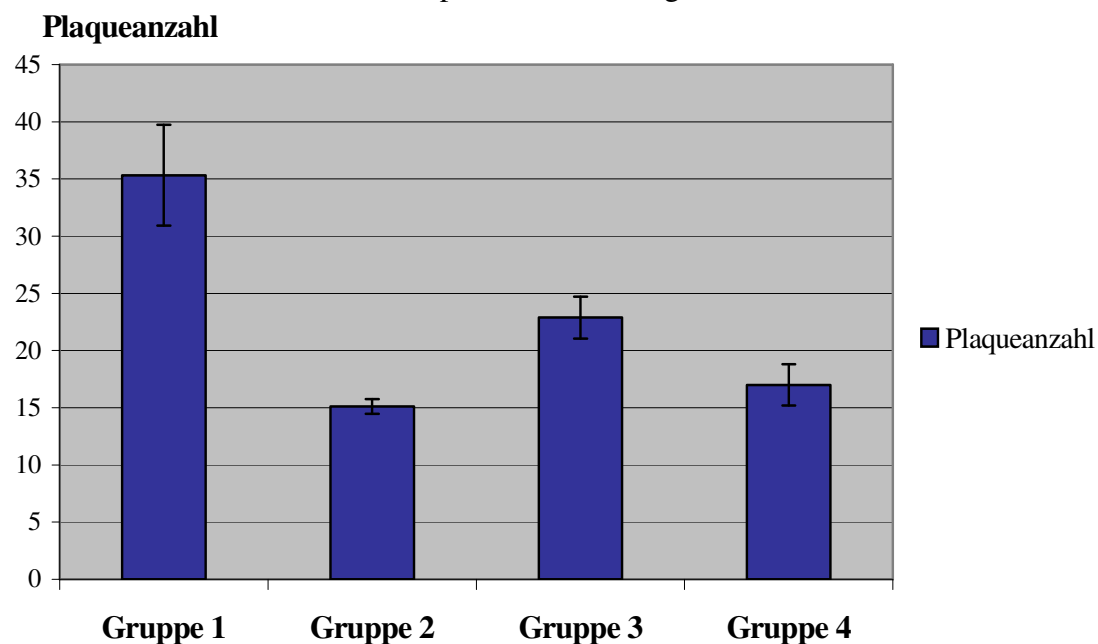


Abbildung 25: Einfluss von 3-DZA auf die Plaqueanzahl bei Apo E-Knockout Mäusen (Abteilung Kardiologie der Med. Klinik I der Universität Gießen)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
¹⁾ p < 0,01	12 Wo WD ohne 3-DZA n=9	12 Wo WD mit 3-DZA n=10	24 Wo WD ohne 3-DZA n=9	24 Wo WD mit 3-DZA n=9
Plaqueanzahl	35,3 ± 4,4	15,1 ± 0,6¹⁾	22,8 ± 1,8	17 ± 1,8¹⁾

Bei der Auswertung der Plaqueanzahl zeigte sich, dass es unter der Medikation mit 3-DZA zu einer signifikanten ($p < 0,01$) Reduktion der Anzahl atherosklerotischer Läsionen kam. Nach 12-wöchiger 3-DZA-Therapie (Gruppe 1 und Gruppe 2) nahm die Plaqueanzahl um 57 %, nach 24-wöchiger Therapie (Gruppe 3 und Gruppe 4) um 25 % ab.

Plauefläche

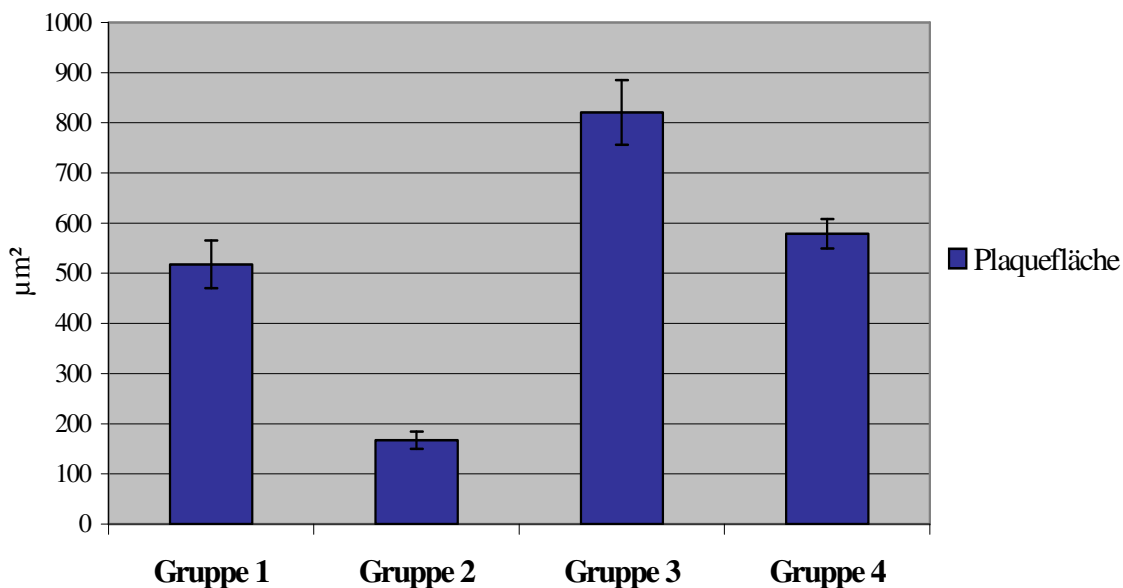


Abbildung 26: Einfluss von 3-DZA auf die Plauefläche bei Apo E-Knockout Mäusen (Abteilung Kardiologie der Medizinischen Klinik I der Universität Gießen)

	Gruppe 1 12 Wo WD ohne 3-DZA n=9	Gruppe 2 12 Wo WD mit 3-DZA n=10	Gruppe 3 24 Wo WD ohne 3-DZA n=9	Gruppe 4 24 Wo WD mit 3-DZA n=9
¹⁾ $p < 0,01$				
Plauefläche [μm^2]	517,6 ± 47,5	167 ± 17,3¹⁾	820,5 ± 64,5	578,9 ± 29,5¹⁾

Bei der planimetrischen Ausmessung der atherosklerotischen Plaques fiel zunächst auf, dass die Fläche (Abbildung 26) im zeitlichen Verlauf zunahm. Bei den nicht behandelten Tieren (Gruppe 1 und Gruppe 3) war von Woche 12 bis Woche 24 eine Vergrößerung von $517,6 \mu\text{m}^2$ auf $820,5 \mu\text{m}^2$, bei den mit 3-DZA behandelten Tieren (Gruppe 2 und Gruppe 4) von $167 \mu\text{m}^2$ auf $578,9 \mu\text{m}^2$ zu beobachten. Die Behandlung mit 3-DZA führte zu einem signifikanten ($p < 0,01$) Rückgang der Plauefläche. Bei den 12-Wochen-Versuchstiergruppen (Gruppe 1 und Gruppe 2)

war dieser mit einer Abnahme von 68 % deutlicher als bei den 24-Wochen-Versuchstiergruppen (Gruppe 3 und Gruppe 4) mit –30 %.

5.1.2 Einfluss von 3-DZA auf die Expression von Endothelzellenadhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) bei Apo E-Knockout Mäusen

Die Endothelzellenadhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 spielen bei der Monozytenadhäsion und –infiltration und damit bei der Pathogenese von Atherosklerose eine Rolle [47-54]. Sie wurden immunhistochemisch angefärbt und mikroskopisch ausgewertet [44]. Die Ergebnisse wurden uns aus der Abteilung Kardiologie der Medizinischen Klinik I der Universität Gießen zur Verfügung gestellt.

Endothelzellenadhäsionsmoleküle

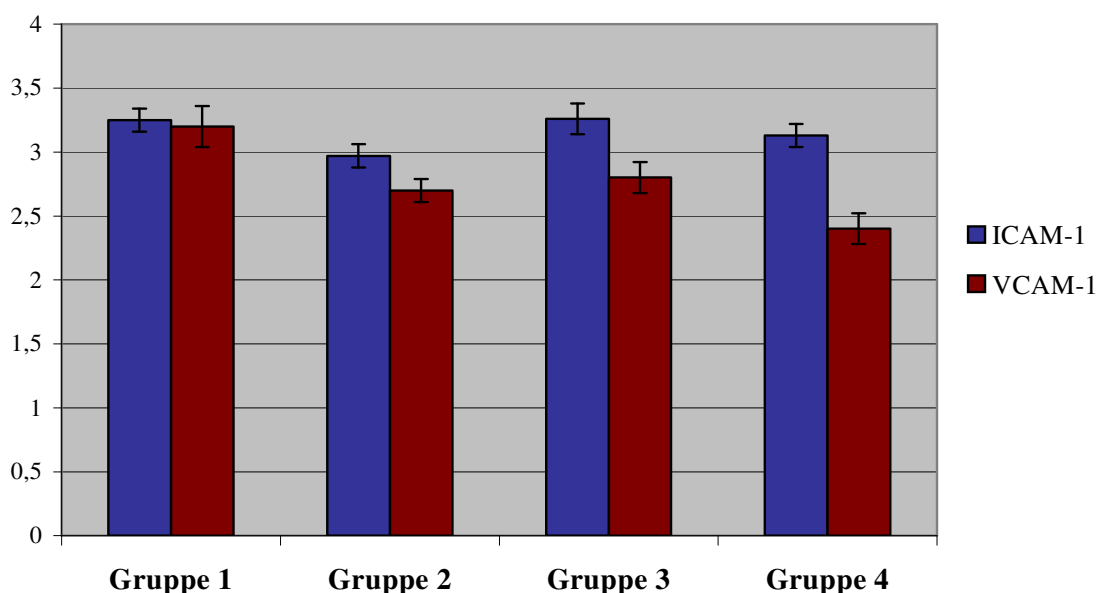


Abbildung 27: Einfluss von 3-DZA auf die Expression von Endothelzellenadhäsionsmolekülen bei Apo E-Knockout Mäusen (Abteilung Kardiologie der Medizinischen Klinik I der Universität Gießen)

¹⁾ p < 0,05	Gruppe 1 12 Wo WD ohne 3-DZA, n=9	Gruppe 2 12 Wo WD mit 3-DZA, n=10	Gruppe 3 24 Wo WD ohne 3-DZA, n=9	Gruppe 4 24 Wo WD mit 3-DZA, n=9
ICAM-1	3,25 ± 0,09	2,97 ± 0,09	3,26 ± 0,12	3,13 ± 0,09
VCAM-1	3,2 ± 0,16	2,7 ± 0,09¹⁾	2,8 ± 0,12	2,4 ± 0,12¹⁾

3-DZA bewirkte sowohl nach 12 als auch nach 24 Wochen eine Reduktion der Endothelzellenadhäsionsmoleküle. ICAM-1 nahm nach 12 Wochen von 3,25 auf 2,97, nach 24 Wochen von 3,26 auf 3,13 ab (nicht signifikant). VCAM-1 zeigte eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) nach 12 Wochen von 3,2 auf 2,7, nach 24 Wochen von 2,8 auf 2,4.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlung mit 3-DZA zu einer deutlichen Verminderung atherosklerotischer Veränderungen führte. Ein Mechanismus war die antiinflammatorische Wirkung von 3-DZA, die sich in einer Verminderung der Expression der Endothelzellenadhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 widerspiegelt.

5.1.3 Einfluss der Western-Diät auf das Körpergewicht unbehauelter und mit 3-DZA behauelter Apo E-Knockout Mäuse

Das Körpergewicht der Kontroll- und mit 3-DZA behandelten Tiere wurde jeweils vor der Behandlung (KG 1) und nach der 12- bzw. 24-Wochen-Behandlung mit 0,4 mg/g Futter 3-DZA (KG2) bestimmt.

Zu Beginn des Versuchs war das Körpergewicht in den 4 Gruppen etwa gleich. Im Zeitverlauf der Behandlung nahmen die Mäuse an Gewicht zu, was zum einen auf das normale Wachstum sowie auf die Fütterung der kalorienreichen Diät zurückzuführen ist. Im Vergleich der mit 3-DZA behandelten Tiere zu den Tieren, welche das Medikament nicht bekamen, bestand kein signifikanter Unterschied im Körpergewicht. 3-DZA hatte in diesem Versuch also keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Tiere (Abteilung Kardiologie der Medizinischen Klinik I der Universität Gießen).

Stoffwechsel von Apo E-Knockout Mäusen und Wirkung von 3-DZA

In zahlreichen vorangegangenen Studien wurden die Folgen untersucht, welche ein Apo E-Mangel auf die Lipoproteinsynthese der Leber und die Lipoproteinkonzentration im Plasma hat. Die wichtigsten Befunde werden im Folgenden vorgestellt und mit den eigenen Ergebnissen verglichen. Zunächst soll

auf den Lebermetabolismus, dann auf den Lipoproteinstoffwechsel und schließlich auf die Entstehung von Atherosklerose bei Apo E-Mangel und die Einwirkung der 3-DZA-Therapie eingegangen werden.

5.2 Leberstoffwechsel bei Apo E-Mangel

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Apo E defiziente Mäuse große Mengen an Triglyceriden (+ 292 %) und freiem Cholesterin (+ 56 %) in ihrer Leber anreichern, während der Cholesterinester- und Phospholipidgehalt nur wenig beeinflusst ist. Die Anhäufung der Triglyceride befindet sich hauptsächlich periportal [84].

Anhand verschiedener Modelle ((a) Zellkultur (b) perfundierte Leber (c) in vivo (d) Gentransfer) wurde die Auswirkung der Apo E Defizienz auf die VLDL-Sekretion der Leber untersucht und folgende Erkenntnisse gewonnen:

- (a) In Zellkulturen von Apo E defizienten Hepatozyten zeigt sich im Vergleich zu Wildtypen eine verminderte VLDL-Triglyceridsekretion, die nicht durch eine niedrigere intrazelluläre Triglyceridsynthese oder Hemmung in der Cholesterinbiosynthese verursacht wird [84]. Darüber hinaus haben die Apo E defizienten Zellen signifikant erhöhte Triglycerid- und Cholesteringehalte [84]. Diese Beobachtungen konnten auch durch in vivo Studien bestätigt werden [69].
- (b) Perfundierte Lebern Apo E defizienter Mäuse zeigen im Vergleich zu Lebern von Kontrolltieren ebenfalls eine verringerte VLDL-Produktion. Dabei wiesen die einzelnen VLDL-Partikel einen normalen Triglyceridgehalt auf [84].
- (c) Bei Apo E defizienten Mäusen ist die hepatische VLDL-Triglyceridproduktion reduziert. Dies wird nicht auf die Hypercholesterinämie, sondern auf das Fehlen von Apo E zurückgeführt. Knochenmarktransplantierte Mäuse, die kein Apo E in der Leber exprimieren, besitzen jedoch normale Plasmacholesterinspiegel. Bei diesen wird Apo E durch Makrophagen und andere Knochenmarkzellen synthetisiert, welches sich mit den Lipoproteinen verbindet [84, 92, 93].

(d) Über einen Adenovirus als Vektor wurde bei Apo E defizienten Mäusen das humane Apo E3-Gen eingeschleust (APOE/apoe^{-/-}-Mäuse). Bei diesen Tieren wird Apo E3 in der Leber und in geringerem Ausmaß in Gehirn, Milz und Lunge ähnlich wie bei nicht Apo E defizienten Mäusen expremiert. Die Plasmacholesterinspiegel bei den APOE/apoe^{-/-}-Mäusen sind im Vergleich zu den Apo E defizienten Mäusen reduziert, aber gegenüber den Wildtypen immer noch erhöht. Die hepatische Triglyceridanreicherung kann durch die Einführung des Apo E3-Gens komplett rückgängig gemacht werden. Auch die VLDL-Triglyceridproduktion ist bei den APOE/apoe^{-/-}-Mäusen normalisiert [94].

5.2.1 Lebertriglyceride bei Apo E-Mangel

Die in anderen Veröffentlichungen aufgrund der gestörten VLDL-Sekretion beschriebene Triglyceridakkumulation in der Leber [69] konnte in unserer Studie ebenfalls festgestellt werden. Der Triglyceridgehalt beträgt bei Apo E defizienten Mäusen unter normaler Diät ungefähr das 3-fache von Wildtypen. In diesem Bereich lagen auch die Werte bei den 12 Wochen lang gefütterten Tieren (Gruppe 1 und 2); bei diesen scheint die fettreiche Western-Diät keine zusätzliche Anhäufung von Triglyceriden zu bewirken. Nach 24wöchiger Fütterung hingegen scheint die Diät eine Zunahme der Leberverfettung zu verursachen; der Triglyceridgehalt war gegenüber den 12 Wochen Mäusen aufs Doppelte erhöht (siehe Abbildung 18).

Es ist zu vermuten, dass die Leberverfettung bei den Apo E defizienten Mäusen in der vorliegenden Studie durch eine gestörte VLDL-Sekretion, sowie durch eine vermehrte Zufuhr von Triglyceriden mit der Versuchskost verursacht worden ist.

5.2.2 Lebercholesterin bei Apo E-Mangel

In der Literatur wird beschrieben, dass Apo E-Knockout Mäuse ohne Western-Diät freies Cholesterin (+56%) akkumulieren, während die Cholesterinester in der Leber unverändert bleiben [69]. Im vorliegenden Versuch zeigte sich dagegen, dass die Speicherung vor allem in Form von verestertem Cholesterin erfolgte und im

Zeitverlauf zunahm. Das freie Cholesterin war gegenüber Wildtypen mit normaler Diät nicht erhöht (Abbildung 19).

Da der Lebercholesterinestergehalt im Zeitverlauf zunahm, dürfte dies am ehesten durch die Western-Diät hervorgerufen worden sein.

5.2.3 Gesamtphospholipide bei Apo E-Mangel

Der Gesamtphospholipidgehalt wird laut Literaturangaben durch das Fehlen von Apo E nur wenig beeinflusst [69]. Dies bestätigte sich, wenn man die den größten Anteil bildenden Phospholipide PC und PE betrachtet: bei den Wildtypen lag die Konzentration bei 36,0 nmol/mg Protein, bei den 12 Wochen Mäusen 39,4 nmol/mg Protein und bei den 24 Wochen Mäusen bei 34,7 nmol/mg Protein.

5.3 Wirkung von 3-DZA auf den Leberstoffwechsel bei Apo E-Knockout Mäusen

5.3.1 Leberenzyme bei Apo E-Knockout Mäusen unter 3-DZA-Therapie

Die Leberenzyme geben keinen Anhalt dafür, dass es durch 3-DZA in der gewählten Dosis zur akuten Leberzellschädigung gekommen ist.

Die leicht erhöhten Transaminasen bei der Gruppe, welche 24 Wochen mit 3-DZA behandelt wurde, könnten Ausdruck einer chronischen Schädigung sein (Abbildung 12). Warum es zum Absinken der GGT gekommen ist und ob dies klinische Relevanz besitzt, ist unklar. Das Abfallen könnte Ausdruck eines verbesserten Galleabflusses sein.

5.3.2 Leberprotein bei Apo E-Knockout Mäusen unter 3-DZA-Therapie

Es kommt unter 3-DZA zu einer verminderten Synthese verschiedener Proteine in Makrophagen [23] und in perfundierten Lebern [39], sowie zur Hemmung des Zellwachstums [37]. 3-Deazaadenosylhomocystein, welches bei Hemmung der AHH durch 3-DZA entsteht [38], hemmt die Genexpression bei Leukämiezellen (HL-60 Zellen) [136].

Der in unserer Studie festgestellte Rückgang des Leberproteingehalts bei den 24 Wochen lang behandelten Tieren könnte durch eine durch 3-DZA beeinträchtigte Proteinbiosynthese verursacht worden sein (Abbildung 13).

5.3.3 Phospholipidsynthese und VLDL-Sekretion unter 3-DZA-Therapie

Die Leber ist beim Säugetier das wichtigste Organ für die Synthese und Sekretion von Plasmalipoproteinen. Die Außenhülle der reifen Lipoproteine enthält Phospholipide, wobei beim Menschen der Anteil von Phosphatidylcholin (PC) 60% und bei der Ratte 75% beträgt [108]. VLDL-Partikel von Ratten besitzen demnach einen besonders hohen Phosphatidylcholin-Anteil.

Generell werden VLDL-Partikel an der luminalen Seite des Endoplasmatischen Retikulums aus Apo B und den Lipidkomponenten synthetisiert [109-111]. Die Sekretionsrate von Apo B enthaltenden Lipoproteinen ist eng mit dem zellulären Gehalt an Cholesterinestern [113,114] und Triglyceriden [115] verbunden. Die Funktion von Apo E bei der VLDL-Sekretion wurde bereits beschrieben (siehe Einleitung S.9). Auf die besondere Bedeutung des PC soll im Folgenden eingegangen werden.

Es gibt in der Leber zwei Wege für die Biosynthese von PC: (a) über CDP-Cholin und (b) über die Methylierung von PE. Um eine Aussage über den Einfluss der verschiedenen Synthesewege auf die VLDL- Lipoproteinsekretion der Leber zu machen, kann man diese hemmen.

- (a) Ein Syntheseweg für PC läuft über CDP-Cholin, welcher ungefähr 70-80% der PC-Synthese ausmacht [41] und über die Aktivität der Cytidyltransferase reguliert wird [116].

Eine effektive Methode, den CDP-Weg zu hemmen, ist die Cholin-Deprivation [117]. Dabei kommt es während des Cholinmangels schnell zur Triglyceridanreicherung in der Leber und zur Reduktion der Triglyceride und anderer Lipide im Plasma [118]. Untersuchungen an kultivierten Hepatozyten zeigen, dass die aktive Synthese von Phosphatidylcholin für die hepatische VLDL-Sekretion benötigt wird. Der inhibitorische Effekt eines Cholinmangels

auf die VLDL-Sekretion kann zum Teil durch die gesteigerte Methylierung von PE kompensiert werden [119].

- (b) Der andere Syntheseweg für PC läuft über die Methylierung von Phosphatidylethanolamin (PE) durch dreifache Methylgruppenübertragung von S-Adenosylmethionin (siehe Einleitung, Abbildung 5).

Zum Einfluss der Hemmung der Phospholipidmethylierung (siehe Einleitung Abbildung 5) durch 3-DZA [42] und andere Methylierungshemmer gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben:

- (1) **Vance et al.** [120] haben gezeigt, dass die Methylierung von Phosphatidylethanolamin (PE) in Leberzellkulturen für die Lipoproteinsekretion anscheinend nicht benötigt wird, wenn die Synthese von PC über CDP-Cholin in ausreichendem Maß gewährleistet ist. Dies konnte anhand der Hemmung der Methylierungsreaktionen mit 3-DZA gezeigt werden. Die Biosynthese von PC über die Methylierung von Ethanolamin wird in mit 3-DZA (10 μmol) inkubierten Hepatozyten um 95% gehemmt. Trotz der Methylierungshemmung wird die Sekretion keines der Apoproteine in die VLDL, LDL oder HDL Fraktion beeinflusst. Auch die Menge von PC, welches in das Medium, in die VLDL oder in die HDL sezerniert wird, ist nicht verändert. PE dagegen reichert sich in den mit 3-DZA behandelten Zellen an. Die in den Lipoproteinen enthaltene Menge nimmt zu, was die Blockierung des Methylierungsweges für die PC Synthese widerspiegelt [120].
- (2) Im Gegensatz dazu vermuten **Nishimaki et al.** [43], dass die PC-Synthese über die Methylierung von PE eine entscheidende Rolle bei der VLDL-Sekretion in Rattenhepatozyten spielen könnte. Sie zeigten, dass die VLDL-Sekretion durch 3-DZA vermindert wird. Diese Reduktion tritt nur dann ein, wenn die aktive Synthese von PC über die Methylierung von PE durch Zugabe von Ethanolamin ins Medium aufrechterhalten wird. Ohne Ethanolamin im Medium ist die PEMT-Aktivität sehr niedrig und hier hat 3-DZA keinen Effekt. Die durch 3-DZA verminderte VLDL-Sekretion geht

mit einem erhöhten intrazellulären Triglyceridspiegel einher (Rückstau der Triglyceride, welche nicht sezerniert werden können). Dies weist darauf hin, dass die endogene Triglyceridsynthese nicht beeinflusst wird und auch nicht Ursache für die geringere VLDL-Produktion sein kann. Darüber hinaus hat man festgestellt, dass PE-Methylierungshemmer die PC-Konzentration in der VLDL-Fraktion reduzieren, während der zelluläre PC-Spiegel nicht verändert wird. Dies deutet auf eine höhere Empfindlichkeit der VLDL-Sekretion auf Veränderungen in der PC-Synthese (Verlagerung vom Methylierungs- auf den CDP-Cholinweg) als auf Änderungen der zellulären PC-Konzentration hin. Die Hemmung der Methylierung führt zu erhöhten PE-Spiegeln in der Zelle, welche Nishimaki et al. nicht als Ursache für die verminderte VLDL-Sekretion sehen [43].

- (3) Die Hemmung der Phospholipidmethylierung wurde von **Sugiyama et al.** [121] auch im Tierexperiment untersucht: Die Behandlung von Ratten mit Eritadenin, welches ebenfalls wie 3-DZA ein Inhibitor der S-Adenosylhomocysteinhydrolase ist, hat gezeigt, dass bei diesen Versuchstieren das PC/PE Verhältnis in den Lebermikrosomen im Vergleich zu Kontrolltieren abfällt. Auch das S-Adenosylmethionin/S-Adenosylhomocystein Verhältnis ist erniedrigt.

Darüber hinaus zeigen die mit Eritadenin gefütterten Ratten einen niedrigeren Plasmacholesterinspiegel. Eritadenin verursacht eine Leberverfettung, welche durch Zugabe von hohen Mengen Cholin zu der Diät verhindert werden kann. Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen PC/PE Verhältnis und Plasmacholesterinspiegel, woraus man schließen kann, dass der veränderte Phospholipidmetabolismus in der Leber eine Ursache für die Senkung des Plasmacholesterinspiegels sein könnte [121].

In unserer Studie war bei den 12 Wochen lang behandelten Tieren unter 3-DZA ein Rückgang der PC-Konzentration festzustellen (Abbildung 15). Dagegen zeigte der PC-Gehalt der Lebern bei den 24 Wochen lang behandelten Mäusen unter 3-DZA trotz der Methylierungshemmung keinen Abfall. Anscheinend konnte hier die PC-

Synthese über einen gesteigerten CDP-Cholin-Weg aufrechterhalten werden. Dies deckt sich mit den Veröffentlichungen von Vance et al. (siehe oben (1)) [120] und Nishimaki et al. (siehe oben (2)) [43]. Die Verlagerung vom Methylierungs- auf den CDP-Cholin-Weg ist nach Nishimaki et al. Ursache für eine verminderte VLDL-Sekretion [43].

Der Anstieg der PE Konzentration (Abbildung 15) in der Leber kann durch die Blockierung der Methylierung erklärt werden. PE wird somit nicht in PC umgewandelt und es kommt so zu einem Aufstau. Eine Zunahme der PE Konzentration durch 3-DZA wurde wie oben schon beschrieben auch von Nishimaki et al. [43] und Vance et al. [120] beobachtet. Lebertriglyceride bei Apo E-Knockout Mäusen unter 3-DZA-Therapie

Die hier gefundenen Ergebnisse legen nahe, dass unter 3-DZA die in der Literatur beschriebene hepatische Methylierungshemmung von PC zu PE stattgefunden hat, was sich auch im reduzierten PC / PE Verhältnis äußert (Abbildung 15 und 17).

Warum 3-DZA eine Abnahme des Fettgehalts in den Lebern bei Apo E Defizienz verursacht, ist hierdurch nicht zu erklären. Der verminderte Proteingehalt in den Lebern von Gruppe 4 (24 Wochen mit 3-DZA) spricht ebenfalls gegen eine Abnahme der Leberverfettung; Proteinmangelernährung (Kwashiorkor) führt über eine gestörte Apolipoproteinsynthese zur Entwicklung einer Fettleber [6].

Der Rückgang der Triglyceridakkumulation unter 3-DZA (siehe Abbildung 18) lässt sich nur schwer mit den Befunden aus anderen Veröffentlichungen in Einklang bringen. Nishimaki et al. (siehe oben (2)) beschreiben eine Zunahme des Triglyceridgehalts in Leberzellen unter Blockierung der Phospholipidmethylierung durch 3-DZA, welche vermutlich durch eine reduzierte VLDL-Ausschleusung ausgelöst wird [43]. Eritadenin, welches wie 3-DZA ein Inhibitor der S-Adenosylhomocysteinhydrolase (AHH) ist, verursacht bei Ratten ebenfalls eine Leberverfettung, wenn der Nahrung nicht ausreichend Cholin beigelegt wird [121] (siehe oben (3) Sugiyama et al.).

5.3.4 Lebercholesterin bei Apo E-Knockout Mäusen unter 3-DZA-Therapie

Die Verringerung der Cholesterinesterakkumulation in der Leber unter 3-DZA (Abbildung 20) lässt sich mit den bisherigen Vorstellungen nicht begründen. Eine mögliche Erklärung für die Cholesterinsenkung könnte ein verbesserter Galleabfluss sein, für den auch das Absinken der GGT sprechen würde.

5.4 Lipoproteinstoffwechsel bei Apo E defizienten Mäusen

Im Apo E-Knockout Maus Modell konnte die Bedeutung von Apo E bei der Kontrolle und Regulation des Serumcholesterinspiegels gezeigt werden [90,91]. Apo E defiziente Mäuse zeigen bei Fütterung einer Standarddiät nämlich deutlich erhöhte Plasmacholesterinspiegel, während ihre Triglyceridspiegel kaum verändert sind [69]. Der erhöhte Cholesterinspiegel wird durch eine Anhäufung von VLDL- und IDL-Partikeln in der Blutbahn verursacht [55]. Die VLDL- und IDL-Partikel bei Apo E-Defizienz (ApoE-ko-VLDL/IDL) enthalten vorwiegend Apo B48 und sind mit Cholesterin und Cholesterinestern angereichert, während die Triglyceride im Vergleich zu Chylomikronen vermindert sind [55]. Bei den ApoE-ko-VLDL/IDL handelt es sich hauptsächlich um Überreste von Chylomikronen aus dem Darm [90], welche bei Fehlen von Apo E von der Leber nur erschwert aufgenommen werden können. Daher unterliegen sie einer verzögerten Clearance.

5.4.1 Serumcholesterinspiegel bei Apo E-Knockout Mäusen

In der Literatur werden bei Apo E defizienten Mäusen, welche eine Western-Diät erhielten, Gesamtcholesterinspiegel von ~1800 mg/dl im Serum beschrieben [55]. In der vorliegenden Studie lagen die Cholesterinwerte bei ~1100 mg/dl (siehe Abbildung 21). Die erhöhte Cholesterinkonzentration ist zum einen durch das Fehlen von Apo E bedingt [69] und wird zum anderen durch die Fütterung der Western-Diät noch verstärkt [55]. Diese Spezialdiät bewirkt bei Apo E-Knockout Mäusen eine Verdreifachung des Cholesterinspiegels gegenüber der Fütterung einer normalen Diät [55].

Bei der Auftrennung des Cholesterins in die verschiedenen Lipoproteinfraktionen weichen die von uns gemessenen Werte stark von den in der Literatur dargestellten

Befunden ab. Der Hauptteil des Cholesterins wurde in der hier vorliegenden Studie in der LDL-Fraktion gemessen (~ 75%) (Abbildung 23). Es fiel auf, dass die Summe des LDL- und des HDL-Cholesterins die des gemessenen Gesamtcholesterins überstieg. Die hier verwandten Methoden zur Lipoproteinmessung nutzen die Komplexbildung von Lipoproteinen mit einer Zuckerverbindung, die selektive Mizellbildung (LDL Bestimmung, siehe 3.4.4) sowie die selektiv unterschiedliche Aktivität modifizierter Enzyme (HDL Bestimmung, siehe 3.4.3). Diese Fällungsreaktionen werden im Wesentlichen durch das Apoproteinmuster bestimmt. Die VLDL- und IDL-Partikel bei Apo E Defizienz (ApoE-ko-VLDL/IDL) enthalten vorwiegend Apo B 48, sowie Apo A-I und Apo A-IV [55]. Die veränderte Apoproteinzusammensetzung könnte Grund für eine Fehlmessung in den hier verwandten Analyseverfahren sein. Es ist zu vermuten, dass die durch das Fehlen von Apo E veränderten ApoE-ko-VLDL/IDL-Partikel unter diesen Versuchsbedingungen als LDL- oder HDL-Cholesterin gemessen wurden.

In der von Plump und Breslow veröffentlichten Studie [55] wird beschrieben, dass sich bei mit der Western-Diät gefütterten Apo E Mäusen ~89% des Cholesterins in der VLDL- und IDL-Fraktion befinden, in der LDL nur ~8% und in der HDL-Fraktion 3%. Die Trennung wurde dort mittels Ultrazentrifugation und Dichtemessung vorgenommen (LDL: $1,019 < d < 1,063 \text{ g/cm}^3$; HDL: $1,063 < d < 1,21 \text{ g/cm}^3$; VLDL + IDL-Cholesterin = Gesamtcholesterin – LDL-Cholesterin – HDL-Cholesterin). Dieses Verfahren orientiert sich also an der eigentlichen Definition von Lipoproteinen, nämlich die Einteilung nach der Dichte, und kommt somit dem wirklichen Anteil der Fraktionen näher.

Eine Aussage darüber, wie die Aufteilung des Cholesterins in die verschiedenen Lipoproteinfraktionen in unserem Versuch war, lässt sich also wegen der angewandten Analyseverfahren nicht eindeutig treffen.

5.4.2 Serumtriglyceridspiegel in Apo E-Knockout Mäusen

Unsere Ergebnisse zeigen weiterhin, dass auch die Serumtriglyceride wie das Cholesterin zum einen bedingt durch die Apo E Defizienz sowie durch Fütterung der fettreichen Western-Diät erhöht waren (siehe Abbildung 23). In der von Plump und

Breslow veröffentlichten Studie allerdings hat die Western-Diät keinen Einfluss auf den Triglyceridgehalt [55].

5.5 Einfluss von 3-DZA auf den Lipoprotein- und Homocysteinmetabolismus

5.5.1 Serumlipoproteine unter 3-DZA-Therapie bei Apo E-Knockout Mäusen

In unserer Studie wurden unter 3-DZA bei den 24-Wochen Tieren signifikant erniedrigte Gesamtcholesterin- (siehe Abbildung 21) sowie Triglyceridspiegel (siehe Abbildung 24) im Serum gefunden.

Untersuchungen an Normaltieren (C57BL/J6-Mäuse), die ebenfalls mit einer Atherosklerose verursachenden Diät (Cholesteringehalt 1%) gefüttert wurden, zeigen keine signifikant veränderte Serumcholesterinkonzentration unter Behandlung mit 3-DZA [44]. In der Literatur wird die Wirkung von 3-DZA kontrovers diskutiert. Zum einen wird behauptet, dass es keinen Einfluss auf die Lipoproteinsekretion hat (Vance, siehe 5.3.3(b)(1) [120]) zum anderen wird dargestellt, dass die VLDL-Sekretion durch die Leber unter 3-DZA vermindert wird (Nishimaki, siehe 5.3.3(b)(1)[43]). Da bei Apo E defizienten Mäusen die hepatische VLDL-Sekretion an sich schon reduziert ist und die erhöhten IDL- und VLDL-Spiegel von einer beeinträchtigten Clearance von Remnant-Partikeln (ApoE-ko-VLDL/IDL) aus dem Darm herrührt [55], sieht es eher nicht so aus, dass die Erniedrigung des Serumcholesterins und der -triglyceride alleine auf einen Rückgang der VLDL-Sekretion durch die Leber zurückzuführen ist. Dass die Clearance der sich anreichernden Partikel durch 3-DZA erhöht wird, scheint ebenfalls unwahrscheinlich.

Man könnte vielmehr vermuten, dass die Sekretion der Chylomikronen durch den Darm durch 3-DZA verringert wird. Hierbei könnten ähnliche Mechanismen wie bei der VLDL-Sekretion in der Leber zur Wirkung kommen: eine Methylierungshemmung von PE zu PC könnte analog zum Leberstoffwechsel eine verminderte Ausschleusung von Chylomikronen durch die Enterozyten zur Folge haben, da weniger PC zum Einbau in die Partikel zur Verfügung steht. Dies müsste dann zu einer Verfettung des Darms führen. Auch dem reduzierten Triglycerid- und Cholesteringehalt der Lebern (Abbildung 18 und 19) könnte eine verminderte Sekretion von Chylomikronen zu Grunde liegen, da die Leber den prähepatisch geringeren Anfall von Lipoproteinpartikel (ApoE-ko-VLDL/IDL) vermutlich besser verarbeiten kann und so eine reduzierte Fett-Akkummulation in der Leber stattfindet. Diese Fragestellung sollte durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Bisher wurden dazu keine Daten publiziert.

5.5.2 Serumhomocystein unter 3-DZA-Therapie bei Apo E-Knockout Mäusen

In einer Publikation werden Serumhomocysteinspiegel bei Normaltieren von 6,4 $\mu\text{mol/l}$ beschrieben. In dieser Studie ist die Serumhomocysteinkonzentration bei Apo E-Knockout Mäusen mit normaler Diät signifikant auf 4,9 $\mu\text{mol/l}$ erniedrigt [153]. In diesem Bereich befanden sich auch die von uns gemessenen Werte bei Apo E-Knockout Mäusen mit Western-Diät (5,3 $\mu\text{mol/l}$ und 5,1 $\mu\text{mol/l}$, Abbildung 24). In einer anderen Veröffentlichung wurde bei Apo E-Knockout Mäusen mit einer Standarddiät ein Serumhomocysteinspiegel von 2,5 $\mu\text{mol/l}$ gefunden [154]; im Vergleich dazu sind die von uns gemessenen Konzentrationen bei Fütterung der Western-Diät erhöht.

Da 3-DZA als kompetitiver Inhibitor zellulärer Transmethylierungsreaktionen gilt, ist ein Einfluss dieses Inhibitors auch auf die Homocysteinsynthese und damit auf den Serumspiegel denkbar. Am Modell perfundierter Lebern kommt es durch 3-DZA zur deutlich verminderten Homocysteinsynthese [39].

Der in unserer Studie signifikant erniedrigte Serumhomocysteinspiegel ($p < 0,01$, siehe Abbildung 24) unter 3-DZA-Therapie ist über eine kompetitive Hemmung der AHH (siehe Einleitung, Abbildung 28) zu erklären.

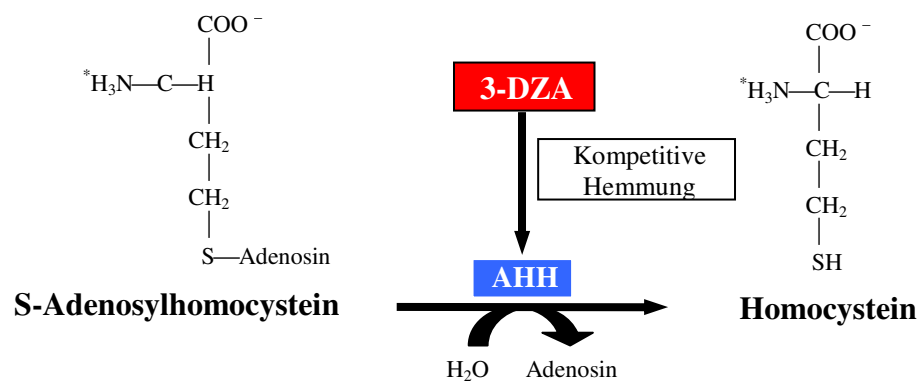


Abbildung 28: Kompetitive Hemmung der AHH durch 3-DZA

5.6 Einfluss von 3-DZA auf die Entstehung von Atherosklerose

Bereits im Modell von C57BL/6J Mäusen, die mit einer cholesterinreichen, Atherosklerose verursachenden Diät gefüttert wurden, konnte eine durch 3-DZA fast vollständig unterdrückte Atherosklerosebildung nachgewiesen werden [44]. Auch in unserem Modellsystem der Apo E-Knockout Mäuse war eine deutlich verminderte ($p < 0,01$) Anzahl und Fläche von Plaques festzustellen (siehe Abbildung 25 und 26). Im Folgenden soll auf die verschiedenen Aspekte der Atheroskleroseentstehung eingegangen werden. Dabei spielt sowohl der metabolische Gesichtspunkt einer Hypercholesterinämie (siehe 5.6.1) und Hyperhomocysteinämie (siehe 5.6.2) als auch die entzündliche Komponente der Leukozytenadhäsion und -infiltration und die Expression der Endothelzellenadhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 (siehe 5.6.3) eine Rolle.

5.6.1 Bedeutung des Serumcholesterins bei der Entstehung von Atherosklerose

Ein frühes Stadium bei Atherosklerose ist die massive Anreicherung von Cholesterinestern im Zytoplasma von Schaumzellen, welche von Makrophagen abstammen [95]. Bei Makrophagen ist bekannt, dass sie chemisch veränderte LDL, wie acetylierte LDL und oxidierte LDL über den Scavenger-Rezeptor aufnehmen [96]. Die Liganden werden rezeptorvermittelt endozytiert und dann über Endosomen den Lysosomen übergeben [97]. In den Lysosomen wird der Proteinanteil der veränderten LDL proteolytisch abgespalten, die Cholesterinester durch die

saure Cholesterinhydrolase (ACEH) in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Ein Teil des freien Cholesterins wird dann über lysosomale Membranen zur Plasmamembran transportiert [98], der Rest wird zum Endoplasmatischen Retikulum gebracht, wo das freie Cholesterin durch die Acyl-CoEnzym A-Cholesterinacyltransferase (ACAT) reverestert wird [99]. Dies führt möglicherweise zur Akkumulation von Cholesterinestern als Lipidtropfen im Zytoplasma und damit zur Transformation von Makrophagen in Schaumzellen.

Unter den veränderten LDLs wird das oxidierte LDL als besonders risikoreich angesehen. Es reichert sich leicht in menschlichen und atherosklerotischen Plaques von Kaninchen an und begünstigt die Ruptur der Plaques [100,101]. Neben oxidiertem LDL reichert sich im Plasma von Patienten mit genetisch bedingter Typ III Hyperlipidämie oder bei Tieren, denen eine Diät mit hohem Cholesteringehalt gefüttert wird, in der β -Fraktion wanderndes VLDL (β -VLDL) an. Dies stellt ein weiteres atherogenes Lipoprotein dar, welches über einen vom Scavenger-Rezeptor-Pfad abweichenden Weg Makrophagen in Schaumzellen umwandeln kann [102,103]. Weitere Studien haben gezeigt, dass Apo E ein Ligand für die rezeptorvermittelte Aufnahme und die lysosomale Spaltung von β -VLDL durch Makrophagen ist. Dies weist darauf hin, dass die durch β -VLDL begünstigte Bildung von Schaumzellen Apo E abhängig ist [104,105].

Beim Menschen gilt ein langfristig erhöhter Serumcholesterinspiegel als potentieller Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose. Dabei stellt ein hoher LDL Spiegel ein erhöhtes Risiko dar, während ein hoher HDL-Spiegel durch die Funktion der HDL-Lipoproteinvesikel im Cholesterinrücktransport zur Leber eher gefäßprotektiv wirkt [6]. Eine medikamentöse Senkung des Cholesterinspiegels beispielsweise durch HMG-CoA-Reduktasehemmer kann das Fortschreiten von Atherosklerose unterdrücken und so das Risiko für das Erleiden eines Herzinfarktes senken [159].

5.6.1.1 Bedeutung des Serumcholesterins bei der Entstehung von Atherosklerose bei Apo E defizienten Mäusen

Apo E nimmt eine zentrale Rolle in der Chylomikronen- und VLDL-Remnant-Clearance ein [75]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Apo E defiziente Mäuse

hohe Spiegel an VLDL und IDL (ApoE-ko-VLDL/IDL) im Plasma entwickeln [73,106]. Bei diesen Lipoproteinpartikeln handelt es sich um Überreste von Chylomikronen aus dem Darm [90]. Die Prädisposition für die Entwicklung von Atherosklerose bei Apo E-Knockout Mäusen ist vermutlich durch die verlangsamte Clearance der ApoE-ko-VLDL/IDL verursacht, da das Ausmaß oxidativer Veränderungen dieser Lipoproteinen unter der verzögerten Clearance deutlich ansteigen kann [75,106].

Es konnte auch gezeigt werden, dass die ApoE-ko-VLDL/IDL zu einer signifikanten Akkumulation von Cholesterinestern in Peritonealmakrophagen über einen Apo E unabhängigen Weg führen [107]. Bei dieser durch ApoE-ko-VLDL/IDL erzeugten Umwandlung von Makrophagen in Schaumzellen ist es unwahrscheinlich, dass der Weg über den Scavenger-Rezeptor eine Rolle spielt. Hierbei scheinen andere, bislang noch unbekannte Rezeptoren beteiligt zu sein [107].

Der unter 3-DZA erniedrigte Cholesterinspiegel im Serum (siehe Abbildung 21, 5.3.3) leistet sicherlich einen Beitrag zur Verringerung der atherosklerotischen Läsionen. Die Wirkung scheint erst nach längerer Behandlung aufzutreten und damit ein Späteffekt der Behandlung zu sein. Ob die atherogenen Lipoproteine ApoE-ko-VLDL/IDL durch 3-DZA tatsächlich verringert wurden, ließ sich letztendlich nicht klären, ist aber wahrscheinlich (siehe 5.4 und 5.5.1).

5.6.2 Bedeutung des Serumhomocysteins bei der Entstehung von Atherosklerose

Ein erhöhter Homocysteinspiegel im Serum ist ein bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung atheromatöser Veränderungen der Gefäße. Neuere Studien haben gezeigt, dass eine direkte Gefäßtoxizität dieses Metaboliten auf das Endothel und glatte Muskelzellen sowie eine Beeinträchtigung der Thrombololyse besteht [5]. Langzeitschäden der Gefäßoberfläche werden durch die Bildung sehr reaktiver Sauerstoffradikale, wie Superoxidanionen und Wasserstoffperoxyd, und eine verminderte Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) im Endothel verursacht [144-146]. Andere Untersuchungen zeigen, dass ein erhöhter Plasmahomocysteinspiegel die Proliferation glatter Muskelzellen aktiviert [147] sowie die Oxidation von LDL

steigert [148]. Die erhöhte Thromboseneigung wird durch eine verstärkte Plättchenaggregation [144,149], eine gesteigerte Bildung von Tissue-Faktor [149] und eine Aktivierung der Gerinnungsfaktoren V,X,XII, verbunden mit einer reduzierten Aktivierung von Protein C und Thrombomodulin, herbeigeführt [150-152].

5.6.2.1 Bedeutung des Serumhomocysteins bei der Entstehung von Atherosklerose bei Apo E defizienten Mäusen unter 3-DZA-Behandlung

Der Einfluss einer Hyperhomocysteinämie auf die Genese von Atherosklerose bei Apo E defizienten Mäusen wurde durch Fütterung einer Diät, welche mit Methionin angereichert und arm an Vitamin B6, B12 und Folsäure war, geprüft. Diese Tiere haben gegenüber Apo E-Knockout Mäusen mit normaler Diät (2,4 $\mu\text{mol/l}$) aufs 19 fache erhöhte Serumhomocysteinspiegel (47,3 $\mu\text{mol/l}$) und eine aufs Doppelte vergrößerte Fläche atherosklerotischer Läsionen. Die Hyperhomocysteinämie kann durch Anreicherung der Diät mit Vitamin B6, B12 und Folsäure auf 18,4 $\mu\text{mol/l}$ reduziert werden; auch die Zunahme der Plaquefläche wird hierdurch auf 40% reduziert [154]. In dieser Studie konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Homocysteinspiegel und der Zunahme atherosklerotischer Läsionen nachgewiesen werden. Die Senkung der Homocysteinkonzentration durch Zugabe der Vitamine B6, B12 und Folsäure lässt sich durch die Reaktionskaskade im Methionin/Homocysteinstoffwechsel (siehe Abbildung 4) erklären.

Die Behandlung mit 3-DZA führte zu einer signifikanten ($p < 0,01$) Abnahme des Serumhomocysteinspiegels um etwa 40% (siehe Abbildung 24). 3-DZA trägt damit zu einer deutlichen Verringerung der Atheroskleroseentwicklung bei Apo E-Knockout Mäusen auch unter atherogener Diät bei.

5.6.3 Bedeutung der Expression der Endothelzellenadhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 bei der Entstehung von Atherosklerose

Die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel und die folgende Migration in die Gefäßwand spielen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Atherosklerose,

welche als chronische, leichtgradige Entzündung aufgefasst werden kann [161]. Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten sind in allen Stadien der Plaqueentwicklung zu finden und lösen einen lokalen Entzündungsprozess aus. Von Makrophagen abstammende Schaumzellen (Entstehung siehe 5.6.1) reichern sich im Plaque an und führen zur Instabilität mit möglich folgender Plaqueruptur, Thrombose oder akutem Gefäßverschluss [95, 155,156]. Es wird vermutet, dass die Hemmung der Leukozytenadhäsion und -migration vor der Plaqueentwicklung schützen kann [45, 46, 47]. Die zelluläre Adhäsion und Migration wird über verschiedene Moleküle der Selektin-, Integrin- und Immunglobulinfamilie wie VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) und ICAM-1 (inercellular cell adhesion molecule) vermittelt. Frühere Studien haben gezeigt, dass eine gesteigerte Expression von VCAM-1 und ICAM-1 auf der Oberfläche des Endothels und glatter Muskelzellen in menschlichen Plaques und in experimentellen Atherosklerosemodellen vorliegt [48-53]. In einer Studie an C57BL/6 Mäusen mit homozygotem ICAM-1 Knockout konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression dieses Moleküls und der Genese von atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden [157].

5.6.3.1 Einfluss von Homocystein auf die Expression von VCAM 1

In Versuchen an kultivierten, humanen Aortenendothelzellen, welche mit 100 µmol/l Homocystein inkubiert wurden, sollte die Auswirkung einer erhöhten Homocysteinkonzentration auf die Expression von VCAM-1 und die Monozytenadhäsion nachgeprüft werden. Dabei wird eine 5 fach erhöhte VCAM-1 mRNA Expression sowie eine aufs 4,5 fache gesteigerte Monozytenadhäsion gegenüber ohne Homocystein inkubierten Zellen gefunden [160]. Auch bei Apo E-Knockout Mäusen, denen über eine methioninreiche Diät eine Hyperhomocysteinämie induziert wurde (siehe 5.6.2), wurde eine beträchtlich gesteigerte VCAM-1 Expression festgestellt [154].

Die Wirkungsweise, wie Homocystein Einfluss auf die VCAM-1 Expression nimmt, ist unbekannt. Es wird spekuliert, dass es zu einer Störung der endothelialen NO-Synthese durch erhöhte Homocysteinkonzentrationen kommt [87-89], was wiederum

die Gefäßfunktion beeinträchtigt [86,88]. Die herabgesetzte NO-Bioverfügbarkeit und die gestörte Gefäßfunktion könnte Ursache für die verringerte VCAM-1 Expression sein [160].

5.6.3.2 Einfluss von 3-DZA auf die Expression von VCAM-1 und ICAM-1

3-DZA ist ein entzündungshemmender Wirkstoff und vermindert die Chemotaxis und Phagozytose von Monozyten [23-26]. Der Wirkmechanismus läuft über eine Hemmung zellulärer Methylierungsreaktionen (siehe Einleitung S.7) [23,158], ist letztendlich aber noch nicht genau geklärt. In einer Studie an C57BL/6J Mäusen, denen eine cholesterinreiche und Atherosklerose verursachende Diät gefüttert wurde, konnte eine durch 3-DZA fast vollständig unterdrückte VCAM-1 und ICAM-1 Expression sowie eine supprimierte Monozytenadhäsion und -infiltration nachgewiesen werden. Auch die Bildung atherosklerotischer Läsionen war durch 3-DZA fast vollständig unterdrückt [44].

5.6.3.3 Expression der Endothelzellenadhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 bei Apo E-Knockout Mäusen unter 3-DZA

In unserer Studie an Apo E-Knockout Mäusen konnte eine reduzierte Expression der Endothelzellenadhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) unter 3-DZA nachgewiesen werden (siehe Abbildung 27, Abteilung für Kardiologie, Medizinische Klinik I, Uniklinikum Gießen). Ursache dafür könnte zum einen der erniedrigte Homocysteinspiegel sein (siehe 5.6.3.1) [154,160], aber auch die immunmodulatorische Wirkung von 3-DZA (siehe 5.6.3.2) [23-26,44] leistet vermutlich einen Beitrag zur verminderten Expression der Endothelzellenadhäsionsmoleküle. Folge der reduzierten Expression ist eine Hemmung der Monozytenadhäsion sowie -infiltration [44], was wiederum schützende Effekte vor der Plaqueentwicklung hat [45, 46, 47].

5.7 Klinische Erfahrungen mit Nukleosidanaloga beim Einsatz in der HIV-Therapie

Nukleosidanaloga wie Didanosin und Zidovudin (Retrovir, Azidothymidin) haben sich im klinischen Einsatz bei der HIV-Therapie bewährt [112]. Bei dieser wird in der „Highly active anti-retroviral therapy“ (HAART) eine Kombination von Nicht-Nukleosidischen Reverse-Transcriptase-Hemmern, Nukleosidischen Reverse-Transcriptase-Hemmern (NRTI) und HIV-Proteaseinhibitoren verwendet [122]. Die Therapie mit dem Nukleosidanalogen Didanosin ist reich an Nebenwirkungen: beschrieben sind unter anderem das Auftreten einer akuten Pankreatitis, periphere Polyneuropathie und Knochenmarkstoxizität [112]. Auch die Therapie mit Zidovudin hat eine Knochenmarksdepression als Nebenwirkung, außerdem kommen Übelkeit, Kopfschmerzen, Hautausschlag, Bauchschmerzen, Fieber, Myalgien, Parästhesien, Erbrechen, Schlaflosigkeit und Appetitlosigkeit vor [85].

In unserer Studie zeigte sich ein signifikanter Rückgang der Leukozyten (- 45 %) und Lymphozytenzahl (- 39 %) unter der Therapie mit 3-DZA. Auch die Zahl Thrombozyten und Erythrozyten nahm ab (Ergebnisse der Abteilung für Kardiologie Medizinische Klinik I, Uniklinikum Gießen).

Es scheint also unter 3-DZA zu einer mäßiggradigen Knochenmarksdepression gekommen zu sein.

Darüber hinaus wurde unter der Therapie mit Nukleosidanaloga eine Veränderung des Fettstoffwechsels beobachtet: es kommt zum Lipodystrophiesyndrom (Schwund von subkutanem Fettgewebe, abdominale Fettleibigkeit, Insulinresistenz und Hyperlipidämie) [123]. Die Therapie scheint also unterschiedliche Effekte auf das Fettgewebe in verschiedenen Körperregionen zu haben (subkutan vs. intraabdominal). Obwohl die Funktion des Fettgewebes in den beiden Kompartimenten unterschiedlich ist [125], ist die molekularbiologische Differenzierung der Adipozyten noch nicht beschrieben. Es besteht eine Ähnlichkeit des Lipodystrophiesyndroms mit der Multiplen Symmetrischen Lipomatose (Madelung Adenolipomatose) [126,127]. Dieser liegt als wesentlichem Faktor eine vererbte mitochondriale Dysfunktion zu Grunde [128]. Es kommt dabei durch eine

Mutation in der mitochondrialen DNA zur Beeinträchtigung der Funktion der Cytochrom C Oxidase [129 -133]. NRTIs können die DNA-Polymerase γ , welche als einzige für die Replikation von m-DNA in Mitochondrien verantwortlich ist, hemmen [134,135]. Die so entstehende mitochondriale Toxizität könnte Ursache für das Lipodystrophiesyndrom unter NRTIs sein [124].

Nukleosidanaloga haben also unterschiedliche Effekte auf die Fettakkumulation in verschiedenen Körpergeweben. Man kann spekulieren, dass 3-DZA bei Apo E defizienten Mäusen ähnlich wie beim Lipodystrophiesyndrom eine Wirkung auf die Fettspeicherung in den Zellen besitzt und so Einfluss auf die Triglyceridakkumulation in der Leber nehmen könnte.

Der klinische Einsatz von Nukleosidanaloga in der HIV-Therapie hat gezeigt, dass eine Therapie mit diesen beim Menschen möglich ist, wenn auch zum Teil sehr schwerwiegende Nebenwirkungen auftreten können. Der Einsatz von 3-DZA ist in der Atherosklerose -Therapie beim Menschen also durchaus denkbar, wobei eine sorgfältige Abwägung zwischen Nutzen und Risiko vorzunehmen ist.

5.8 Gesamtbeurteilung

Bei den mit 3-DZA behandelten Mäusen konnte im Vergleich zu den unbehandelten eine verminderte Anzahl und eine kleinere Fläche der atherosklerotischen Läsionen festgestellt werden (siehe Abbildung 25 und 26, Abteilung für Kardiologie der Medizinische Klinik I, Uniklinikum Gießen). Bei der Pathogenese von Atherosklerose spielen sowohl metabolische Faktoren wie Hypercholesterinämie (siehe 5.6.1) und Hyperhomocysteinämie (siehe 5.6.2) als auch eine entzündliche Komponente (VCAM-1, ICAM-1 siehe 5.6.3) eine Rolle. 3-DZA wirkt wie oben beschrieben auf die verschiedenen Stoffwechselwege:

- Der erniedrigte Gesamtcholesterinspiegel im Serum (siehe Abbildung 21) leistet einen Beitrag zur Verringerung der atherosklerotischen Läsionen. Dieser scheint erst nach längerer Behandlung aufzutreten und damit ein Späteneffekt der Behandlung zu sein. Die Entstehung von Atherosklerose bei Apo E defizienten Mäusen ist hauptsächlich auf die gestörte Clearance von ApoE-ko-VLDL/IDL-Partikeln zurückzuführen [107]. Man konnte nicht genau differenzieren, ob tatsächlich das ApoE-ko-VLDL/IDL-Cholesterin durch 3-DZA verringert wurde, es ist aber wahrscheinlich (5.4, 5.5.1 und 5.6.1). Der Wirkmechanismus, mit dem 3-DZA Einfluss auf die Lipoproteinsynthese nimmt, läuft anscheinend über eine Methylierungshemmung von Phospholipiden (siehe 5.3.3 und 5.5.1).
- Auch die über eine Hemmung der AHH verursachte Reduktion des Serumhomocysteinspiegels unter 3-DZA (siehe 5.5.2, 5.6.2 und Abbildung 24) geht mit einem verringerten Atheroskleroserisiko einher [5].
- Außerdem konnte eine reduzierte Expression der Endothelzellen-adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) (siehe Abbildung 27) unter der Behandlung mit 3-DZA nachgewiesen werden (siehe 5.6.3.2 und 5.6.3.3, Abteilung für Kardiologie der Medizinische Klinik I, Uniklinikum Gießen), was wiederum schützende Effekte vor der Plaquentwicklung hat [45,46,47]. Ursache der verminderten Expression könnte der reduzierte Homocysteinspiegel

(siehe 5.6.2) [154,160] oder die immunmodulatorische Wirkung von 3-DZA (siehe 5.6.3.2) sein [23-26,44].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 3-DZA über eine Methylierungshemmung verschiedene Zellfunktionen beeinflusst und so zu verminderter Entstehung von atherosklerotischen Läsionen beiträgt.

Der Mechanismus, wie 3-DZA einen positiven Einfluss auf die Fett- und Cholesterinesterakkumulation in der Leber bei Apo E-Knockout Mäusen nimmt, konnte nicht erklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Man kann spekulieren, dass hierbei eine verminderte Sekretion von Chylomikronen durch den Darm eine Rolle spielt, welche durch eine Hemmung der Phospholipidmethylierung verursacht sein könnte (siehe 5.5.1).

Aufgrund dieser Ergebnisse stellt 3-DZA ein interessantes Pharmakon in der Therapie und Prophylaxe der Atherosklerose dar und der klinische Einsatz ist durchaus denkbar (siehe 5.7). Es bedarf aber sicherlich noch der Durchführung weiterer experimenteller und klinischer Studien, um mehr über den Wirkmechanismus und die Verträglichkeit von 3-DZA zu erfahren.

6 Zusammenfassung

3-Deazaadenosin (3-DZA), ein strukturelles Analogon des Adenosins, gilt als Inhibitor von Transmethylierungsreaktionen. Es konnte daher angenommen werden, dass 3-DZA über eine Hemmung des Enzyms S-Adenosylhomocysteinhydrolase (AHH) die Synthese von Homocystein aus S-Adenosylhomocystein wirksam beeinflussen kann. Darüber hinaus war auch ein hemmender Einfluss auf Transmethylierungsreaktionen des Phospholipidstoffwechsels, welche für die hepatische Synthese von Lipoproteinen wichtig sind, denkbar. Um den Mechanismus einer antiatherosklerotischen Wirkung von 3-DZA zu klären, wurden Apo E-Knockout Mäuse, die sehr früh eine Hypercholesterinämie und Atherosklerose entwickeln, als Modellsystem verwendet.

Die Versuchstiere wurden mit einer atherogenen Diät (Western-Diät) 12 oder 24 Wochen lang gefüttert. Die Parallelgruppen erhielten gleichzeitig 3-DZA. Nach dem Töten der Tiere wurde der Gehalt an Triglyceriden, Cholesterin und an den Phospholipiden Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin im Leberhomogenat bestimmt. Im Serum wurden die Konzentrationen an Triglyceriden, Cholesterin und Homocystein gemessen.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei Apo E-Knockout Mäusen die atherogene Diät zu einer drastischen Erhöhung des Triglycerid- und Cholesteringehaltes in der Leber führt. Gleichzeitig kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Triglyceride und des Cholesterins im Serum.

Unter Therapie mit 3-DZA kann ein deutlicher Rückgang der Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie beobachtet werden, was sich besonders bei der Gruppe zeigt, welche 24 Wochen lang behandelt wurde. Darüber hinaus führt die Behandlung mit 3-DZA zu einer weniger stark ausgeprägten Triglycerid- und Cholesterineinlagerung in der Leber. Außerdem fällt eine Verschiebung der hepatischen Phospholipidmethylierung, gemessen am Phosphatidylcholin/Phosphatidylethanolamin Verhältnis, auf. Damit steht für die Synthese hepatischer Lipoproteine und für den Einbau von Phospholipiden in die Hülle der Vesikel weniger Phosphatidylcholin zur Verfügung. 3-DZA scheint also

sowohl die hepatische Lipoproteinsynthese bzw. –ablagerung als auch die Freisetzung von Lipoproteinvesikeln ins Blut zu beeinflussen. Ein weiterer wichtiger Einfluss der 3-DZA-Therapie ist der deutlich gesenkte Homocysteinspiegel im Serum.

Planimetrische Untersuchungen der Aorta der Apolipoprotein E-Knockout Mäuse (Medizinische Klinik I, Abteilung für Kardiologie Uniklinikum Gießen, Arbeitsgruppe Haberbosch) zeigen eine deutliche Reduktion der Plauefläche und –anzahl unter 3-DZA-Therapie. 3-DZA kann also sowohl über eine deutliche Reduzierung des Homocysteins und eine gleichzeitige Senkung des Triglycerid- und Cholesterinspiegels im Blut einen wirksamen therapeutischen Langzeiteffekt als antiatherogenes Medikament ausüben. Neben diesem günstigen Einfluss auf Homocystein-, Triglycerid- und Cholesterinstoffwechsel spielt auch noch eine hemmende Wirkung von 3-DZA auf die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, wie ICAM-1 und VCAM-1, eine bedeutende Rolle (Medizinische Klinik I, Abteilung für Kardiologie Uniklinikum Gießen, Arbeitsgruppe Haberbosch). Eine verminderte Expression dieser Adhäsionsmoleküle führt wahrscheinlich über eine Reduzierung der Adhäsion und Infiltration von Entzündungszellen am Gefäßendothel zu einer Potenzierung des antiatherogenen Effektes von 3-DZA.

Aufgrund der hier gewonnenen und den aus der Literatur bekannten Ergebnissen wäre ein möglicher Einsatz von 3-DZA bei der Behandlung der Atherosklerose durchaus denkbar.

7 Literatur

- [1] **National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES III)** (1988—94), *CDC/NCHS and the American Heart Association*
- [2] **American Heart Association** (2001) heart and stroke statistical update,
- [3] **Bühling, Lepenies, Witt.** (1992) Allgemeine und spezielle Pathologie, *Urban & Schwarzenberg*
- [4] **Gerold Herold** (2001) Innere Medizin, *Herold 2001* , S.187
- [5] **Welch GN, Loscalzo:** Homocystien and atherothrombosis. *N Engl J Med* 338: 1042,1998
- [6] **Classen, Diehl, Kochsiek (1998)** : „Innere Medizin“ 4.Auflage, S.942; *Urban & Schwarzenberg 1998, S. 654,1122*
- [7] **Jacques PF et al.** (1999) The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocystein concentrations. *N Engl J Med*, 340: 1449-54
- [8] **van Ree JH, van den Broek WJAA, Dahlmans VEH, Groot PHE, Vidgon Hart M, Frants RR, Wieringa B et al.** (1994) Diet induced hypercholesterinemia and atherosclerosis in heterogous apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*; 111 : 25-37
- [9] **Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N.** (1992) Spontaneous hypercholesterinemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*; 71:849-859
- [10] **Schaefer EJ, Gregg RE, Ghiselli G, Forte TM, Ordovas JM , Zoch LA, Brower Jr HB.** (1986) Familial apolipoprotein E deficiency *J.Clin.Invest* 78 : 1206-1219
- [11] **Mabuchi H, Itoh H, Takeda M, Kajinami K, Wakasugi T, Koizumi J, Taekada R et al.** A young type III hyperlipidemic patient associated with apolipoprotein E deficiency. *Metabolism* 1989; 98:115-119
- [12] **Ghisell G, Schaefer EJ, Gascon P, Brewer HB Jr., ibid. 214 , 1239 (1981); Schaefer EJ et al. , J.Clin.Invest. 78 , 1206(1986); Mabuchi H et al. Metabolism 38, 115 (1989); Fazio S ,(1993) Trends Cardiovasc.Med 3, 191**
- [13] **Mahley RW, Rahl SC Jr.** Type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): the role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In: Scriver CR , Besudet AL , Sly WS Valle D . *The metabolic basis of inherited disease. Ed 6. New York : Mc Graw Hill , 1989 :1195-1213*
- [14] **Greiling H, Gressner AM.** Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3.Auflage (1995) S.327;428-429;461;316; 305-308
- [15] **Tikkanen MJ , Huttunen JK , Ehnholm C and Pietinen P.** Apolipoprotein E*4 homozygosity predisposes to serum cholesterol deviation during high fat diet. *Arteriosclerosis* 12: 285-288 (1992)

- [16] **Davignon J, Gregg RE and Sing CF** (1988). Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 8:1-21
- [17] **Wilson PWF, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM , Wolf PA and Schäfer EJ** (1994). Apolipoprotein E Allels, Dyslipidemia and coronary heart decease. *JAMA*. 272:1666-1671
- [18] **Lahoz C, Schaefer EJ, Cupples LA, Wilson PW, Levy D, Osgood D, Parpos S, Pedro-Botet J, Daly JA, Ordovas JM**. Apolipoprotein E genotype and cardiovascular disease in the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 2001 Feb 15;154 (3):529-3
- [19] **Flexner CW, Hildreth JE, Kunzel RW and Drachman DB** (1992) 3-Deazaadenosine and inhibition of HIV. *Lancet* 339,438
- [20] **Mayers DL, Mikovits JA, Joshi B.**(1995) Anti-human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) activities of 3-deazaadenosine analogs: increased potency against 3'-azido-3'-deoxythymidine-resistant HIV-1 strains. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 92,215-219
- [21] **Medzihradsky JL, Zimmerman TP, Wolberg G** (1982) Immunosuppressive effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaadenosine (1982) *J.Immunopharmacol.*4, 29-41
- [22] **Krenitsky TA, Rideout JL, Chao EY, Koszalka GW, Gurney F, Crouch RC, Cohn NK, Wolberg G, Vinegar R.** (1986) Imidazo[4,5-c]pyridines (3-deazapurines) and their nucleosides as immunosuppressive and antiinflammatory agents. *J.Med.Chem.*29, 138-143
- [23] **Aksamit RA, Backlund PS, Cantoni GL** (1983) Chemotaxis and the synthesis of specific proteins are inhibited by 3-DZA and other nucleoside analogs in a mouse macrophage cell line. *J.Biol.Chem* 258;20-23
- [24] **Aksamit RR, Falk W, Cantoni GL** (1982) Inhibition of chemotaxis by 3-deazaadenosylhomocysteine in a mouse macrophage cell line. *J Biol. Chem.* 1982; 257:621-625
- [25] **Garcia CI, Mato JM, Vasaanthakumar G, Wiesmann WP, Schiffman E, Chiang PK** (1983). Paradoxical effects of adenosine on neutrophil chemotaxis. *J Biol.Chem* ; 258;4345-4349
- [26] **Medzihadradsy JL.** (1984) Regulatory role for the immune complex in modulation of phagocytosis by 3_deazaadenosine. *J Immunol.*; 133:946-949
- [27] **Jurgensen CH, Huber BE, Zimmerman TP, Wolberg G.** (1990) 3-deazaadenosine inhibits leukocyte adhesion and ICAM-1 biosynthesis in tumor necrosis factor-stimulated human endothelial cells. *J.Immunol.*144, 653-661
- [28] **Endresen PC, Eide TJ, Aarbakke J** (1993) Cell death initiated by 3-deazaadenosine in HL-60 cells is apoptosis and is partially inhibited by homocysteine. (1993) *Biochem.Pharmacol.* 46,1893-1901

- [29] **Kim IK, Li CC, Young HA** (1997) Apoptosis of L1210 Leukemia Cells Induced by 3-Deazaadenosine Analogs: Differential Expression of c-myc, NF-Kappa B and Molecular Events. *J.Biomed.Sci.4*, 83-90
- [30] **Hershfield MS** (1979) Apparent suicide inactivation of human lymphoblast S-Adenosylhomocysteine hydrolase by 2'-deoxyadenosine and adenine arabinoside. *J.Biol.Chem. 254* : 22-25
- [31] **Ueland PM** (1982) Pharmacological and biochemical aspect of S-Adenosylhomocysteine and S-Adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol.Rev. 34* -.223-253
- [32] **Streyl L**. Biochemie (1995),4.Auflage S.760,734-738
- [33] **Cnatonni GL** (1986) The centrality of S-Adenosylhomocysteinase in the regulation of the biological utilization of S-Adenosylmethionine. In: Borchart RT, Creveling CR, Ueland PM (eds.), *Biological Methylation and Drug Design*. pp. 227-238. Clifton NJ : Human Press.
- [34] **Svardal A, Djurhuus R, Refsum H and Ueland PM** (1986) Disposition of homocysteine in rat hepatocytes and in non-transformed and malignant mouse embryo fibroblasts following exposure to inhibitors of S-adenosylhomocysteine catabolism. *Cancer Res. 46*:5095-5100
- [35] **Svardal A, Djurhuus R and Ueland PM** (1986) Disposition of homocysteine and 3-deazaadenosyl-homocysteine in cells exposed to 3-deazaadenosine. *Mol.Pharmacol.30*: 154-158
- [36] **Kim IK, Aksamitt RR, Cantoni GL** (1982) Mechanism of the cytostatic activity of 3-deazaaristeromycin, an Inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *J.Biol.Chem. 257* : 14726-14729
- [37] **Wolfson G, Chisholm J, Tashijan Jr. AH, Fish S and Abeies RH** (1986) Neplanocin A. Actions on S-adenosylhomocysteine hydrolase and on hormone synthesis by GH4C1 cells. *J.Biol.Chem.261* : 4492-4498
- [38] **Aksamit RR, Falk W, Cantoni GL** (1982) Inhibition of chemotaxis by S-3-deazaadenosyl-homocysteine in a mouse macrophage cell line. *J.Biol.Chem.257*,621-625
- [39] **Duerre JA** (1988) Effect of 3-DZA on methionin metabolism in isolated perfused livers. *Biochem.Pharmacol.28*:1897-1902
- [40] **Hoffmann DR, Marion DW, Conratzer WE and Duerre JA** (1980). S-Adenosylmethionin- and S-Adenosylhomocystein metabolism in isolated rat liver. *J.Biol.Chem.255*: 10822-10827
- [41] **Sundler R and Akesson B** (1975) Regulation of phospholipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. Effect of different substrates. *J.Biol.Chem. 250*, 3359-3367
- [42] **Pritchard PH, Chiang PK, Cantoni GL, and Vance** (1982) Inhibition of phosphatidylethanolamin N-methylation by 3-deazaadenosine stimulates the

- synthesis of phosphatidylcholin via the CDP-cholin pathway. *J.Biol.Chem.* 257: 6362-6367
- [43] **Nishimaki-Mogami T, Suzuki K, Takahashi A** (1996) The role of phosphatidylethanolamine methylation in the secretion of very low density lipoproteins by cultured rat hepatocytes: rapid inhibition of phosphatidylethanolamine by bezafibrate increases the density of apolipoprotein B-48 containing lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1304 ; 21-31
- [44] **Walker G , Langheinrich AC , Dennhauser E , Bohle RM , Dreyer T , Kreuzer J , Tillmanns H , Braun-Dullaues RC , Haberbosch W** (1999) 3-deazaadenosine prevents adhesion molecule expression and atherosclerotic lesion formation in the aortas of C57BL/6J mice. *Arterioscl.Thromb. Vase.* 19 : 2673-2679
- [45] **Springer TA** (1994) Traffic Signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 76 : 301-314
- [46] **Steinberg D, Witztum JL** (1990) Lipoproteins and atherosclerogenesis: current concepts *JAMA.* 264 : 3047-3052
- [47] **Jang Y, Lincoff AM , Plow EF, Topol EJ** (1994) Cell adhesion molecules in coronary artery disease . *J.Am.CoU.Cardiol.* 24 : 1591-1601
- [48] **Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson TR** (1992) Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am.J.Pathol.:* 140: 665-673
- [49] **Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr** (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251: 788-791
- [50] **Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr., Libby P** (1994). An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1 , a cytokine-regutable mononuclear leukocyte adhesion molecule , in rabbit aortic endothelium . *Arterioscler.Thromb.* 13:197-204
- [51] **Richardson M , Hadcock SJ , DeReske M , Cybulsky MI** (1994) Increased expression in vivo of VCAM-1 and E-selectin by the aortic endothelium of normolipidemic and hyperlipidemic diabetic rabbits. *Arterioscl.Thromb.* 14: 760-769
- [52] **Qiao JH , Xie PZ , Fishbein MC , Kreuzer J , Drake TA Demer LL , Lusis AJ** (1994). Pathology of atheromatous lesions in inbred and genetically engineered mice: genetic determination of arterial calcification . *Arterioscler.Thromb.* 14 : 1480-1497
- [53] **van der Wal , Das PK, Tigges AJ , Becker AE** (1992) Adhesion molecule on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am.J.Pathol.* 141: 1427-1433

- [54] **O'Brien KD, Allen MD, MC Donald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J et. al** (1993). Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques: implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J.Clin.Invest.* 92: 945-951
- [55] **Plump AS, JD Smith, T Hayek , K Aalto-Setälä, A Walsh and JL Breslow** (1992) Severe hypercholesterolemia and arteriosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell.*71:343-353
- [56] **Bode CH, Goebel H und Stähler E** (1968) *Z.Klin.Chem. Biochemie.*6, 418-422
- [57] **Wahlefeld AW** (1974) in Bergmeyer , H.U. eds. *Methods of Enzymatic Analysis, 2nd English ed. , New York, Academic Press inc. pp. , 1878-1882*
- [58] **Roeschlau P, Bernt E und Gruber W** (1974) Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Z.Klin.Biochemie.* 12 , 226
- [59] **Allain CC , Poon LS , Chen CS , Richmaon W and Fu PC** (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol., *Clin.Chem.*20, 470-480
- [60] **Mawatari S und Murakami K.** Analysis of membrane phospholipid peroxidation by isocratic high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection.(1998) *Analytical Biochemistry* 264 , 118 – 123
- [61] **Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T et al.** Direct measurement of HDL-cholesterol in serum with polyethylene glycol modified enzymes and sulfated cyclo-dextrin. *Clin.Chem* 1995;41:717-723
- [62] **Matsuzaki Y, Kawaguchi E, Morita Y et al.** (1996) Evaluation of two kinds of reagents for direct determination of HDL-Cholesterol. *J Anal Bio S ;* 19 419-427
- [63] **Armstrong V, Deidel D.** Evaluation of a commercial kit for the determination of LDL-Cholesterol in serum bases on precipitation of LDL with dextran-sulfate. *Ärztl. Lab* (1985) 31:325—330
- [64] **Bergmeyer HU, Horder M, Rej R.** Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes; *J Clin Chem Clin Biochem* 1986; 24: 481-489
- [65] **Szasz** (1969) G A kinetic photometric method for serum γ -glutamyltranspeptidase. *Clin.Chem.* 15: 124-136
- [66] **Shaw LM, Stromme JH, London JL, Theodorsen L** : IFFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes, part 4; IFCC Method for γ -glutamyltransferase. *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.*21:633-646;1983.
- [67] **Sachs L,** *Angewandte Statistik, S.155, Springer Verlag 1992*
- [68] **Linden, Trautschold.** (1986) Catalytic enzyme activity concentration in plasma of different species; *J.Clin.Chem.Biochem/Vol.24, No.1*

- [69] **Kuipers F, J.M van Ree, MH Hofker, H Wolters, G Int, Veld, R Havinga, RJ Vonk, HMG Princen and LM Havekes** (1996) Altered lipid metabolism in apolipoprotein E-deficient mice does not affect cholesterol balance across the liver. *Hepatology*.24:241-247
- [70] **Smith JD.** Mouse models of atherosclerosis (1998); *Laboratory Animal Science, Vol.48* 573-9
- [71] **Thompson JS** (1969), Atheromata in an inbred strain of mice,; *J.Atheroscler.Res*,10:113-122
- [72] **Paigen B, Morrow C, Brandon C** (1985); Variation in susceptibility of atherosclerosis among inbred strain of mice; *Atherosclerosis* 57:65-73
- [73] **Ji ZS, S Fazio, YL Lee and RW Mahley** (1994) Secretion-capture role for apolipoprotein E in remnant lipoprotein metabolism involving cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J.Biol.Chem.* 269 : 2764-2772
- [74] **Choi SY, MC Komaromy, J Chen, LG Fong, and AD Cooper** (1994) Acceleration of uptake of LDL but not chylomicrons or chylomicron remnants by cells that secrete apo E and hepatic lipase. *J.Lipid Res*.35: 848-859
- [75] **Mahley RW** (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240 : 622--630
- [76] **Jong MC, VEH Dahlmans, PJJ van Gorp, ML Breuer, MJTM.Mol, A van der Zee, RR Frants, MH Hofkker and LM Havekes** (1996) Both lipolysis and hepatic uptake of VLDL are impaired in transgenic mice coexpressing human apolipoprotein E*3Leiden and human apolipoprotein C1. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 16:934-940
- [77] **Rensen PCN and TJC van Berkel** (1996) Apolipoprotein effectively inhibits lipoproteinlipase-mediated lipolysis of chylomicron-like triglycerid-rich lipid emulsions in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.* 271: 14791-14799
- [78] **Schwieglshohn B, JF Presley ,M Gorecki, T Vogel, YA Carpentier, FR Maxfield and R.J.Deckelbaum** (1995) Effects of apolipoprotein E on intracellular metabolism of model triglyceride-rich particles are distinct from effects on cell particle uptake. *J.Biol.Chem.* 270:1761-1769
- [79] **Lombardi P, M Mulder, H van der Boom , RR Frants and LMHavekes** (1993) Inefficient degradation of triglycerid-rich-lipoprotein by HepG2 cells is due to a retarded transport to the lysosomal compartment. *J.Biol.Chem.*268: 26113-26119
- [80] **Strobl W, NL Gorder, GA Fienup, YC Lin-Lee, AM Gotto and W Patsch** (1989) Effect of sucrose diet on apolipoprotein biosynthesis in rat liver. Increase in apolipoprotein-E gene transcription. *J.Biol.Chem.*264:1190-1194
- [81] **Hamilton RL, JS Wong, LSS Guo, S Krisans and RJ Havel** (1990) Apolipoprotein E localization in rat hepatocytes by immunogold labeling of cryothin sections. *J.Lipid.Res.*31:1589-1603

- [82] **Fazio S, Z Yao, BJ McCarthy and SC Rall Jr** (1992) Syntheses and secretion of apolipoprotein E occur independently of synthesis and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins in HepG2 cells. *J.Biol.Chem.*267:6941-6945
- [83] **Fazio S and Z Yao** (1995) The enhanced association of apolipoprotein E with apolipoprotein B-containing lipoproteins in serum-stimulated hepatocytes occurs intracellularly. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*15:593-600
- [84] **Kuipers F, Jong MC, Lin Y, Eck M, Havinga R, Bloks V, Verkade HJ, Hofker MH, Moshage H, Berkel TJ, Vonk RJ, Havekes LM** (1997) Impaired secretion of very low density lipoprotein-Triglycerids by Apolipoprotein E-deficient Mouse Hepatocytes. *J.Clin.Invest.* 100 (11): 2915-2922
- [85] **Acosta EP, Page LM, Fletcher CV.** (1996) Clinical pharmacokinetics of zidovudine. An update. *Clin Pharmacokinet.* 1996 Apr;30(4):251-62
- [86] **Chao CL Kuo TL, Lee YT.** (2000) Effects of methionine-induced hyperhomocysteinemia on endothelium-dependent vasodilation and oxidative status in healthy adults. *Circulation.* 2000; 101: 485–490
- [87] **Ungvari Z, Pacher P, Rischak K, Szollar L, Koller A.** (1999) Dysfunction of nitric oxide mediation in isolated rat arterioles with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1899–1904
- [88] **Pruefer D, Scalia R, Lefer AM.** (1999) Homocysteine provokes leukocyte-endothelium interaction by downregulation of nitric oxide. *Gen Pharmacol.* 1999; 33: 487–498
- [89] **Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, Goligorsky MS** (2000). Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol.* 2000;
- [90] **Plump AS and JL Breslow** (1995) Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annu.Rev.Nutr.*15 : 495-518
- [91] **Breslow JL** (1996) Mouse models of atherosclerosis. *Science.*272:685-688
- [92] **Linton MF, JB Atkinson and S Fazio** (1995) Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation, *J.Clin.Invest.*96: 1118-1124
- [93] **Boisvert WA, J Spangenberg and LK Curtiss** (1995) Treatment of severe hypercholesterinemia in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation, *J.Clin.Invest.*96 : 1118-1124
- [94] **Mensenkamp AR, Jong MC, van Goor H, van Luyn MJA, Bloks V, Havinga R, Voshold PJ, Hofker MH, van Dijk KW, Havekes LM, Kuipers F** (1999). Apolipoprotein E participates in the Regulation of Very low density Lipoprotein-Triglyceride secretion by the liver. *J.Biol.Chem.* 274 :35711-35718

- [95] **Ross R** (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362 , 801-809
- [96] **Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC and Witztum JL** (1998) Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N.Engl.J.Med.* 320, 915-924
- [97] **Mori T, Takahashi K, Naito M, Kodama T, Hakamues H, Sakai M,** (1994) Endocytic pathway of scavenger receptors via trans-Golgi system in bovine alveolar macrophages *Lab.Invest.* 71 , 409-416
- [98] **Liscum L and Underwood KW** (1995) Intracellular cholesterol transport and compartmentation *J.Biol.Chem.* 270 , 15443-15446
- [99] **ChangTY , Chang CC and Cheng D** (1997) Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *AnnuRev.Biochem.* 66 ,613-638
- [100] **Palinski W, Rosenfeld ME, YläHerttuala S, Gurtner GC, Socher SS,** (1989) Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc.Natl.Acta.Sci.USA* 86, 1372—1376
- [101] **Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D.** (1989) Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J.Clin.Invest.*84 , 1086-1095
- [102] **Goldstein JL , Ho YK , Brown MS, Innerarity TL and Mahley RW** (1980) Cholesteryl ester accumulation in macrophages resulting from receptor-mediated uptake and degradation of hypercholesterolemic canine beta-very low density lipoproteins. *J.Biol.Chem.* 255, 1839-1848
- [103] **Mahley RW, Innerarity TL, Brown MS, Ho YK and Goldstein JL** (1980) Cholesteryl ester synthesis in macrophages: stimulation by beta-very low density lipoproteins from cholesterol-fed animals of several species. *J.Lipid.Res.*21, 970-980
- [104] **Innerarity TL, Arnold KS, Weisgraber KH and Mahley RW** (1986) Apolipoprotein E is the determinant that mediates the receptor uptake of beta-very low density lipoproteins by mouse macrophages *Arteriosclerosis* 6, 114-122
- [105] **Bates SR, Coughlin BA, Mazzone T, Borensztajn J and Getz GS** (1987) Apoprotein E mediates the interaction of beta-VLDL with macrophages. *J.Lipid.Res.* 28 787-797
- [106] **Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N** (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258 , 486-471
- [107] **Hakamata H, Sakaguchi H, Zhang C, Sakashita N** (1998) The very low- and intermediate-density lipoprotein fraction isolated from apolipoprotein E-knockout mice transforms macrophages to foam cells through an apolipoprotein E-independent pathway. *Biochemistry* 37 ,13720-13727

- [108] **Vance JE and Vance DE** (1985) The role of phosphatidylcholine biosynthesis in the secretion of lipoproteins from hepatocytes. *Can.J.Biochem.CeU.Biol.* 63,870-881
- [109] **Boren J, Wettesten M, Sjoberg A, Thorlin T, Bondjers G, Wiklund O, Olofsson SO.** (1990) The assembly and secretion of apoB 100 containing lipoproteins in Hep G2 cells. Evidence for different sites for protein synthesis and lipoprotein assembly. *J.Biol.Chem.* 265 ; 10556-10564
- [110] **Rusinol A, Verkade H and Vance JE** (1993) Assembly of rat hepatic very low density lipoproteins in the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 268 , 3555-3562
- [111] **Cartwright U, Hebbachi AM and Higgins JA.** (1993) Transit and sorting of apolipoprotein B within the endoplasmic reticulum and Golgi compartments of isolated hepatocytes from normal and orotic acid-fed rats. *J.Biol.Chem.* 268 ; 20937-20952
- [112] **Faulds D, Brogden RN.** (1992) Didanosine. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential in human immunodeficiency virus infection. *Drugs.* 1992 Jul;44(1):94-116.
- [113] **Dashti N** (1992) The effect of low density lipoproteins, cholesterol, and 25-hydroxycholesterol on apolipoprotein B gene expression in HepG2 cells. *J.Biol.Chem.* 267 ; 7160-7169
- [114] **Tanaka M, Jingami H, Otani H, Cho M, Ueda Y, Arai H et.al.** (1993) Regulation of apolipoprotein B production and secretion in response to the change of intracellular cholesteryl ester contents in rabbit hepatocytes. *J.Biol.Chem.* 268 ; 12713-12718
- [115] **Wu X, Sakata N, Lui E, Ginsberg HN** (1994) Evidence for a lack of regulation of the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoprotein from HepG2 cells by cholesteryl ester. *J.Biol.Chem.* 269 ; 12375-12382
- [116] **Vance.DE and Choy.PC** (1979) *Trends Biochem.Sci.* 4 , 145-148
- [117] **Best CH and Huntsmann ME** (1932) *J.Physiol.* 75 , 405-412
- [118] **Mookerjea S, Park CE, Kuksis A.** Lipd profiles of plasma lipoproteins of fasted and fed normal and choline-deficient rats.(1975) *Lipids* 10 , 374-382
- [119] **Yao Z and Vance DE** (1988) The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J.Biol.Chem.* 263 , 2998-3004
- [120] **Vance JE, Nguyen TM, Vance DE** (1986) The biosynthesis of phosphatidylcholine by methylation of phosphatidylethanolamine derived from ethanolamine is not required for lipoprotein secretion by cultured rat hepatocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 875 , 501-509

- [121] **Sugiyama K, Akachi T, Yamakawa A** (1995) Hypocholestermic action of eritadenine is mediated by a modification of hepatic phospholipid metabolism in rats. *J. of nutritional Biochem.* 1995. 6 (2).80-87
- [122] **Havir DV, Lange JM.** New antiretrovirals and new combinations (1998) *AIDS* 12, S.165-174)
- [123] **Schooley RT** (1999) Longer term immunologic effects and side effects of successful antiretroviral therapy *Clin.Infect.Dis*,29,12-18
- [124] **Brinkman K, Smeitink JA, Romijn JA Reiss P.** (1999) Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy *Lancet*;354:1112-15
- [125] **Arner P.** (1998) Not all fat is alike. *Lancet*; 351:1301-02
- [126] **Hengel RL, Watts NB, Lennox JL.**(1997) Benign symmetric lipomatose associated with protease inhibitors. *Lancet*: 350; 1506
- [127] **Teplitzky V, Halabe A.** Fat distribution in AIDS. *N.Engl.J....*340;369-70
- [128] **Berkovic SF , Anderman F, Shoubridge et al.** Mitochondrial dysfunction in multiple symmetrical lipomatoses. *Am N ...*566-69
- [129] **Larsson NG, Tulinius MH, Holme E, et al.** (1992) Segregation and manifestations of the mtDNA tRNA(Lys)A-G(8344) mutation of myoclonus epilepsy and ragged red fibers (MERRF) syndrome. *Am J Hum Genet* 1992;51:1201-12
- [130] **Silvestri G,Ciafaloni E, Santorelli FM.** (1993) Clinical features associated with the A-G transition at nucleotide 8344 of mtDNA (MerRF mutation). *Neurology* 1993; 43:1200
- [131] **Klopstock T, Naumann M,Schalke B et al.** (1994) Multiple symmetric lipomatosis: abnormalities in the Complex IV and multiple deletions in mitochondrial DNA. *Neurology* 1994;44: 862-66
- [132] **Campos Y, Martin MA, Navarro C, Gordo P, Arenas J.** Single largescale mitochondrial DNA deletion in a patient with mitochondrial myopathy associated with multiple symmetric lipomatosis. *Neurology* 1996;47: 1012-14
- [133] **Becker-Wegerich P, Steuber M, Olbrisch R, Ruzicka T, Auburger G, Hofhaus G.** (1998) Defects of mitochondrial respiratory chain in multiple symmetric lipomatosis. *Arch.Dermatol.Res*;290:652-55
- [134] **Lewis W,Dalakas MC.**Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nat Med* 1995; 1:417-22
- [135] **Brinkaman, ter Hofstede HJM, Burger DM, Smeitnik JA, Koopmans PP.** (1998) Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS* 1998: 1735-44
- [136] **Duerre JA, Buttz HR, Ackerman JJ.** Effect of methylation inhibitors on gene expdpression in HL-60 cells. *Biochem.CellBiol.* 70. 703-711

-
- [137] **Packard CJ, Shepherd J.** (1982) The hepatobiliary axis and lipoprotein metabolism: effect of bile acid sequestrants and ileal bypass surgery. *J.Lipid.Res* 1982; 23:1081-1098
- [138] **Malinow, MR.** (1994) Plasma Homocysteine and arterial occlusive diseases : A Mini-Review. *Clin.Chem* 1994; 40: 173-6
- [139] **Ueland PM,** (1995) Homocystein Species as Components of Plasma Redox Thiol Status. *Clin. Chem.* ; 41:340-2
- [140] **Finkelstein JD** (1990) Methionin Metabolism in Mammals. *J Nutr Biochem*; 1;228-37
- [141] **Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchel D, Williams RA.** (1987) Quantitativ assessment of atherosklerotic lesion in mice. *Atherosclerosis*, 68,231-240
- [142] **Haberbosch W, Tillmanns H, Kummer W, Braun-Dullaeus RC et. al.** (2002) protective effekt of 3-deazaadenosine in a rat model of lipopolysaccharide induced myocardial dsyfunktion . *Shock, Vol 19,Nr3*, 245-251
- [143] **Eikelboom JW, Lonn E, Genest J, Hankey G and Yusuf S** (1999). Homocystein and cardiovascular disease: a critical review of the epidemologic evidence. *Ann. Intern.Med.* 131: 363-375
- [144] **Harker, L.A., Slichter, S.J., Scott, C.R., and Ross, R.** (1974). Homocystinemia. Vascular injury and arterial thrombosis. *N. Engl. J. Med.* 291:537-543.
- [145] **Loscalzo, J.** (1996). The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J. Clin. Invest.* 98:5-7
- [146] **Stamler, J.S. et al.** (1993). Adverse effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J. Clin. Invest.* 91:308-318
- [147] **Lubec, B. et al.**(1996). Homocysteine increases cyclin-dependent kinase in aortic rat tissue. *Circulation.* 94:2620-2625.
- [148] **Hirano, K. et al.**(1994). Homocysteine induces iron-catalyzed lipid peroxidation of low density lipoprotein that is prevented by alpha-tocopherol. *Free Radic. Res.* 21:267-276.
- [149] **Durand, P., Lussier-Cacan, S., and Blache, D.** (1997). Acute methionine load-induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis, and macrophage-derived tissue factor. *FASEB J.* 11:1157-1168.

- [150] **Rodgers, G.M., and Kane, W.H.** (1986). Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J. Clin. Invest.* 77:1909-1916
- [151] **Rodgers, G.M., and Conn, M.T.** (1990). Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood.* 75:895-901
- [152] **Lentz, S.R., and Sadler, J.E.** (1991). Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J. Clin. Invest.* 88:1906-1914
- [153] **Moghadasian MH, McManus BH, Nguyen LB, Shefer S et.al** (2001) Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans; *The FASEB Journal.* 2001;15:2623-2630
- [154] **Marion A. Hofmann, Evanthia Lalla, Yan Lu, Michelle Ryu Gleason et.al.** (2001) Hyper-homocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model *J Clin Invest, March 2001, Volume 107, Number 6, 675-683*
- [155] **Alexander RW.**(1994) Inflammation and coronary artery disease [editorial; comment]. *N Engl J Med.* 1994;331:468–469.
- [156] **Entman ML, Ballantyne CM.** (1994) Inflammation in acute coronary syndromes [editorial; comment]. *Circulation.* 1993;88:800–803.
- [157] **Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, Lin AH, Melchior EP, Bullard DC, Beaudet AL.** (1997) Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1517–1520
- [158] **Pike MC, Snyderman R.** (1982) Transmethylation reactions regulate affinity and functional activity of chemotactic factor receptors on macrophages. *Cell.* 1982;28:107–114
- [159] **Sheperd J, Cobbe SM, Ford I** (1995) Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterinemia . *New England Journal of medicine* 333; 1301-07
- [160] **Silverman MD, Tumuluri R, Davis M, Lopez G** (2002) Homocysteine Upregulates Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Cultured Human Aortic Endothelial Cells and Enhances Monocyte Adhesion *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2002;22:587
- [161] **Ross R.** (1999) Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340: 115–126

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die an meiner Promotion mitgearbeitet und mich unterstützt haben.

Insbesondere sind dies:

Dr. Maria Speth für die Betreuung der Doktorarbeit

Prof.Dr.Dr. Nobert Katz als Doktorvater

Prof.Dr. Werner Haberbosch für die Bereitstellung der Lebern

Den Doktoranden Raf Schilling und Ina Jeide

W.Papst für die Hilfe bei der statistischen Auswertung

Den beteiligten MTA's aus dem Institut für Klinische Chemie

Steffen Kreis für die Hilfe bei der optischen Ausarbeitung

Frauke Schüder für die Hilfe beim Korrekturlesen

Meiner Familie

Und meiner Freundin Judith

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Hamburg, den 7.2.2004

Marco Schleich

Anhang

Einfluss des Transmethylierungshemmers 3-Deazaadenosin auf den Lipoprotein- und Homocysteinestoffwechsel von Apo E-Knockout Mäusen

Aus dem Institut für klinische Chemie und Pathobiochemie
und Medizinische Klinik II, Abteilung Kardiologie
Klinikum der Justus - Liebig- Universität Gießen

Maria Speth, Marco Schleich, Gerhard Walker, Alexander Langheinrich,
Werner Haberbosch, Harald Tillmanns, Norbert Katz

Zusammenfassung

3-Deazaadenosin (3-DZA), ein strukturelles Analogon des Adenosins, gilt als Inhibitor von Transmethylierungsreaktionen. Es konnte daher angenommen werden, dass 3-DZA über eine Hemmung des Enzyms S-Adenosylhomocysteinhydrolase (AHH) die Synthese von Homocystein aus S-Adenosylhomocystein wirksam beeinflussen kann. Darüber hinaus war auch ein hemmender Einfluss auf Transmethylierungsreaktionen des Phospholipidstoffwechsels, welche für die hepatische Synthese von Lipoproteinen wichtig sind, denkbar. Um den Mechanismus einer antiatherosklerotischen Wirkung von 3-DZA zu klären, wurden Apo E-Knockout Mäuse, die sehr früh eine Hypercholesterinämie und Atherosklerose entwickeln, als Modellsystem verwendet.

Die Versuchstiere wurden mit einer atherogenen Diät (Western-Diät) 12 oder 24 Wochen lang gefüttert. Die Parallelgruppen erhielten gleichzeitig 3-DZA. Nach dem Töten der Tiere wurde der Gehalt an Triglyceriden, Cholesterin und an den Phospholipiden Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin im Leberhomogenat bestimmt. Im Serum wurden die Konzentrationen an Triglyceriden, Cholesterin und Homocystein gemessen.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei Apo E-Knockout Mäusen die atherogene Diät zu einer drastischen Erhöhung des Triglycerid- und Cholesteringehaltes in der Leber

führt. Gleichzeitig kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Triglyceride und des Cholesterins im Serum.

Unter Therapie mit 3-DZA kann ein deutlicher Rückgang der Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie beobachtet werden, was sich besonders bei der Gruppe zeigt, welche 24 Wochen lang behandelt wurde. Darüber hinaus führt die Behandlung mit 3-DZA zu einer weniger stark ausgeprägten Triglycerid- und Cholesterineinlagerung in der Leber. Es fällt außerdem eine Verschiebung der hepatischen Phospholipidmethylierung, gemessen am Phosphatidylcholin/Phosphatidylethanolamin Verhältnis, auf. Damit steht für die Synthese hepatischer Lipoproteine und für den Einbau von Phospholipiden in die Hülle der Vesikel weniger Phosphatidylcholin zur Verfügung. 3-DZA scheint also sowohl die hepatische Lipoproteinsynthese bzw. -ablagerung als auch die Freisetzung von Lipoproteinvesikeln ins Blut zu beeinflussen. Ein weiterer wichtiger Einfluss der 3-DZA-Therapie ist der deutlich gesenkte Homocysteinspiegel im Serum.

Planimetrische Untersuchungen der Aorta der Apolipoprotein E-Knockout Mäuse (Medizinische Klinik I, Abteilung für Kardiologie am Uniklinikum Gießen, Arbeitsgruppe Haberbosch) zeigen eine deutliche Reduktion der Plaquesfläche und -anzahl unter 3-DZA-Therapie. 3-DZA kann also sowohl über eine deutliche Reduzierung des Homocysteins und eine gleichzeitige Senkung des Triglycerid- und Cholesterinspiegels im Blut einen wirksamen therapeutischen Langzeiteffekt als antiatherogenes Medikament ausüben. Neben diesem günstigen Einfluss auf Homocystein-, Triglycerid- und Cholesterinstoffwechsel spielt auch noch eine hemmende Wirkung von 3-DZA auf die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, wie ICAM-1 und VCAM-1, eine bedeutende Rolle (Medizinische Klinik I, Abteilung für Kardiologie am Uniklinikum Gießen, Arbeitsgruppe Haberbosch). Eine verminderte Expression dieser Adhäsionsmoleküle führt wahrscheinlich über eine Reduzierung der Adhäsion und Infiltration von Entzündungszellen am Gefäßendothel zu einer Potenzierung des antiatherogenen Effektes von 3-DZA.

Aufgrund der hier gewonnenen und den aus der Literatur bekannten Ergebnissen wäre ein möglicher Einsatz von 3-DZA bei der Behandlung der Atherosklerose durchaus denkbar.

Investigations on the anti-atherosclerotic effect of 3-Deazaadenosine on Apo E - deficient mice

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
and Medizinische Klinik II, Abteilung Kardiologie
Klinikum der Justus - Liebig- Universität Gießen

Maria Speth, Marco Schleich, Gerhard Walker, Alexander Langheinrich,
Werner Haberbosch, Harald Tillmanns and Norbert Katz

Abstract

3-Deazaadenosine (3-DZA), a structural analogue of adenosine, has been identified as an anti-inflammatory drug inhibiting monocyte chemotaxis and phagocytosis. As recently reported 3-DZA completely prevented fatty streak formation and inhibited the expression of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in C57BL/6J mice placed on an atherogenic diet. In the presence of the drug monocyte adhesion and infiltration as well as neointima formation in the proximal ascending aorta were completely blocked. Therefore 3-DZA has been expected as a novel pharmacological approach in the prevention and treatment of atherosclerosis.

In order to gain more insight into the mechanism underlying the potent anti-atherosclerotic effect of the agent, Apo E-knockout mice which are qualified for the development of premature hypercholesterolemia and atherosclerosis were used as an atherosclerotic model. The animals were placed on an atherogenic diet for a period of 12 or 24 weeks without or with 3-DZA and hepatic triglyceride, cholesterol and phospholipid synthesis as well as serum triglyceride, cholesterol and homocysteine levels were analyzed.

The results show that Ingestion of an atherogenic diet over a time period of 12 or 24 weeks markedly increased the hepatic triglyceride and cholesterol content as well as total serum triglyceride and cholesterol levels. This was accompanied by a

remarkable rise of blood homocysteine concentration. On the other hand, application of 3-DZA during the 12 or 24 weeks of atherogenic diet could depress hyperhomocysteinemia to about 36% and 40 %, respectively. Concomitantly, 3-DZA supplementation of the diet decreased significantly the hepatic methylation index as judged by the phosphatidylcholine (PC) phosphatidylethanolamine (PE) ratio. The hepatic cholesterol and triglyceride content as well as serum triglyceride and cholesterol levels were significantly reduced by 3-DZA application. Compared to the prompt influence of 3-DZA on transmethylation and homocysteine levels , the lowering effect of the agent on triglyceride as well as cholesterol levels in liver and blood was only relevant after the long term interval of treatment. It is suggested therefore, that inhibition of homocysteine synthesis mediated by 3-DZA is one of the first events in the anti-atherosclerotic action of the drug.

In regard to its anti-proliferative effect on endothelial cells mediated by the inhibitory action on endothelial VCAM-1 and ICAM-1 expression 3-DZA (Medizinische Klinik I, Abteilung für Kardiologie Uniklinikum Gießen, Arbeitsgruppe Haberbosch) may represent a multifunctional agent in the prevention of premature atherosclerotic lesions.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Marco Willi Dominick geb. Schleich

Adresse: Im Winkel 6b, 21244 Buchholz in der Nordheide

Geburtsdatum und Ort: 30.8.1975 in Fulda

Familienstand: verheiratet, ein Kind

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1982 -1986 Besuch der Grundschule in Neuhof (Kreis Fulda)

1986 - 1995 Besuch des Freiherr-vom-Stein Gymnasiums in Fulda mit
Abschluss Abitur

Ersatzdienst

1995 - 1996 Pflege und Betreuung von Menschen mit geistiger und körperlicher
Behinderung im Rudolf-Pabst Haus in Schlüchtem

Studium

1996 - 2003 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in
Gießen

9/1998 Ärztliche Vorprüfung

8/1999 Erstes Staatsexamen

3/2002 Zweites Staatsexamen

2002 -2003 Praktisches Jahr Uniklinikum Gießen und Klinikum Wetzlar

11/2003 Drittes Staatsexamen

Promotion

1999- 2004 Prof.Dr.Dr.N.Katz am Institut für Klinische Chemie in
Zusammenarbeit mit der Medizinischen Klinik I / Abteilung
Kardiologie des Universitätsklinikums Gießen

Beruflicher Werdegang

ab 3/2004 AIP/Assistenzarzt Innere Medizin im Krankenhaus Buchholz