

Aus der Klinik für Innere Medizin m. S. Kardiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Arterioskleroserisiko und Thrombozytenfunktion bei Patienten
mit Phenylketonurie (PKU)

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jens Nee

aus Papenburg / Ems

Gutachter: 1. Priv. – Doz. Dr. med. W. Bocksch
2. Prof. Dr. med. H. Darius
3. Priv. – Doz. Dr. med. A. C. Borges

Datum der Promotion: 14.06.2009

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1	Phenylketonurie.....	6
1.1.1	Definition und Pathogenese	6
1.1.2	Screening Verfahren.....	8
1.1.3	Therapie.....	8
1.2	Omega – 3 und Omega – 6 Fettsäuren	10
1.2.1	Klinische Relevanz der Omega – Fettsäuren	11
1.2.1.1	Kardiovaskuläre Effekte von ω - Fettsäuren.....	12
1.2.1.2	Endothelwirkung von ω - Fettsäuren	12
1.2.1.3	Beeinflussung der Rheologie durch Omega – FS	13
1.2.1.4	Beeinflussung des Blutdrucks durch PUFAs	14
1.2.1.5	Einfluss von ω - 3 Fettsäuren auf den Lipoproteinspiegel.....	14
1.3	Thrombozyten und Hämostase.....	16
1.3.1	Physiologie und Morphologie von Thrombozyten.....	16
1.3.2	Primäre Hämostase.....	17
1.3.3	Adhäsion.....	17
1.3.4	Aggregation	18
1.3.5	Sekundäre Hämostase	19
1.4	Thrombozytäre Membranglykoproteine.....	19
1.4.1	Integrine	19
1.4.2	Konstitutive Membranglykoproteine	20
1.4.3	GP IIb-IIIa	20
1.4.4	GP Ib-V-IX.....	21
1.4.5	Glykoproteine aktivierter Plättchen	21
1.5	Durchflusszytometrie	22
1.6	Arteriosklerose	23
1.7	Bildgebung der Arteriosklerose	25
2	Fragestellung	27
3	Patienten und Methodik	29
3.2	Zusammensetzung und Eigenschaften der Gruppen	29
3.3	B-Mode Sonographie der Carotis.....	30
3.3.1	Blutdruckmessung.....	30

3.3.2	Messung der Intima Media - Dicke (= IMT).....	30
3.3.3	Intraobserver.....	31
3.3.4	Messung der arteriellen Compliance.....	31
3.3.4.1	Messung des β – Stiffness Index.....	32
3.3.4.2	Pulsalitätsindex.....	32
3.4	Durchflusszytometrie.....	34
3.4.1	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	34
3.4.2	Probengewinnung.....	35
3.4.3	Probenkonservierung.....	36
3.4.4	Markierung der Thrombozyten – Zweifachfärbung.....	36
3.4.4.1	Identifikation der Thrombozyten.....	36
3.4.4.2	Markierung des GPIIb-IIIa Komplexes.....	36
3.4.5	Degranulationsmarker.....	37
3.4.5.1	α – Granula.....	37
3.4.5.2	Lysosomen.....	38
3.4.6	CD154 – Induktion von Inflammation.....	38
3.4.7	Verwendete monoklonale Antikörper.....	38
3.4.8	Probenverarbeitung und Durchführung.....	39
3.4.9	Messung.....	39
3.4.10	Darstellung der Messung.....	40
3.4.11	Auswertung.....	41
3.5	Bestimmung der Fettsäuren.....	43
3.6	Statistik.....	43
4	Ergebnisse.....	45
4.2	Vergleich der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe.....	45
4.2.1	Demographische Charakteristika.....	45
4.2.2	Labordaten.....	46
4.2.3	Messergebnisse der Carotis B-Mode Sonographie.....	47
4.2.4	Durchflusszytometrische Untersuchung.....	50
4.2.4.1	GPIIbIIIa - Komplex.....	50
4.2.4.2	Degranulationsmarker.....	52
4.2.4.3	CD154 (CD40L).....	54
4.2.5	Fettsäureprofile.....	56
4.2.5.1	Plasmafettsäureprofile.....	56

4.2.5.2	Fettsäureprofile der Erythrozytenmembran	57
4.3	Vergleich der FS Substituierten mit der nicht mit FS substituierten Patientengruppe.....	58
4.3.1	Demographische Charakteristika	58
4.3.2	Labordaten.....	58
4.3.3	Messergebnisse der Carotis B-Mode Sonographie	59
4.3.4	Durchflusszytometrische Untersuchung	62
4.3.4.2	Ergebnisse für die Degranulationsmarker	64
4.3.4.3	Ergebnisse für CD 154 (CD40L)	66
4.3.5	Fettsäureprofile.....	67
4.3.5.1	Plasmafettsäureprofile	67
4.3.5.2	Fettsäureprofile der Erythrozytenmembran	67
5	Diskussion	68
5.1	Surrogatmarker für früharteriosklerotische Veränderungen und PKU	68
5.2	Fettsäureprofil	70
5.3	Einfluss der Substitution von Omega - Fettsäuren auf Surrogatmarker der früharteriosklerotischen Aktivität und Thrombozytenaktivierung.....	71
5.4	Vergleich mit anderen Studien.....	72
6	Zusammenfassung	77
7	Literaturverzeichnis.....	78
8	Anhang.....	89

1. Einleitung

Phenylketonurie

Definition und Pathogenese

Phenylalanin ist eine essentielle Aminosäure für den Menschen. Es dient als Grundbaustein für die Synthese von Eiweißen. Die Aminosäure ist hauptsächlich u.a. in Fisch, Fleisch, sowie Milch enthalten und kann somit über die Nahrung aufgenommen werden. Auch ist der menschliche Körper in der Lage das Phenylalanin beim physiologischen Abbau von Eiweißen zurück zu gewinnen. Allerdings wird nach einer normalen eiweißhaltigen Mischkost mehr Phenylalanin aufgenommen, als zur Eiweißsynthese benötigt wird [1][2]. Der Mindestbedarf an Phenylalanin beträgt beim Erwachsenen zwischen 0,22 und 0,30 g/Tag.

Überschüssiges Phenylalanin wird ausschließlich zu Tyrosin abgebaut. Der Prozess wird katalysiert durch das Enzym Phenylalaninhydroxylase – einem Schlüsselenzym des Phenylalaninstoffwechsels. Cofaktor hierbei ist das Tetrahydrobiopterin (BH₄) [3] [4]. Das Tyrosin wird nach einigen weiteren Schritten schließlich zu Kohlendioxid, Wasser und Harnstoff abgebaut (energetische Verwertung).

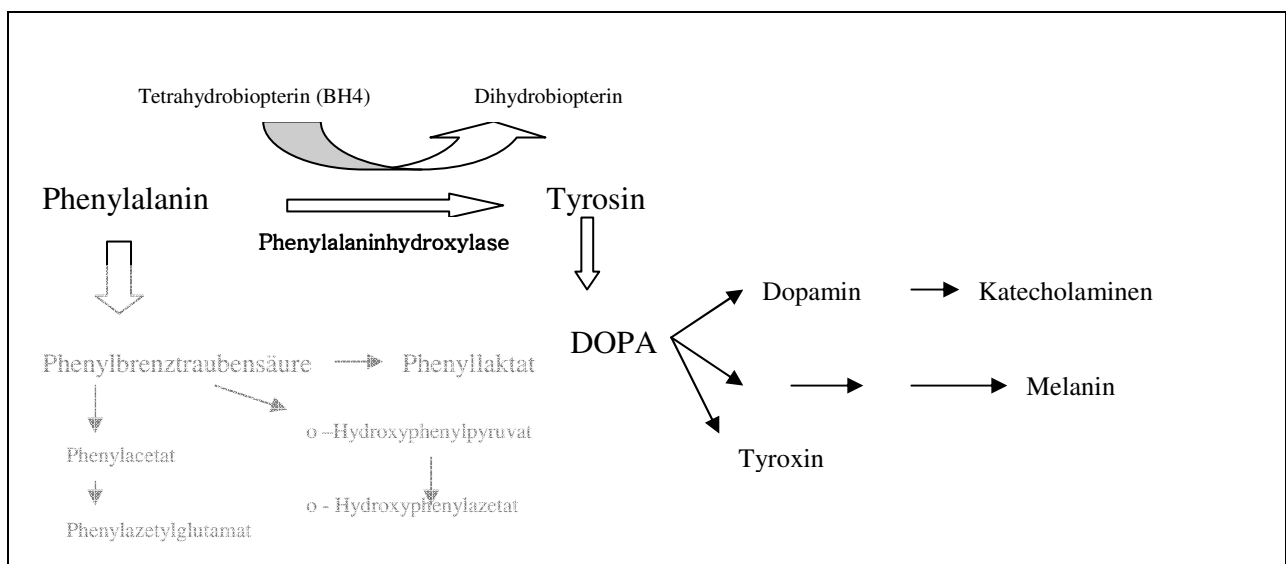


Abbildung 1 - Phenylalanin Stoffwechsel: Abbau überschüssiges Phenylalanin zu Tyrosin. Bei Störung wird Phenylalanin in die normalerweise nicht vorkommende Phenylbrenztraubensäure (grau) umgewandelt (=alternativer Stoffwechselweg) abgewandelt aus Mönch, E. J. (2003) „Kommunikation zwischen Partnern. Phenylketonurie/ Galaktosämie.“ Düsseldorf: Bundesarbeitsgemeinschaft „Hilfe für Behinderte e.V.“[7].

Kommt es nun zu einem vollständigem oder teilweisen Ausfall des Enzymsystems durch einen Defekt der Phenylalaninhydroxylase (PAH) steigt die Konzentration von Phenylalanin an. Tyrosin wird zu einer essentiellen Aminosäure, da es nicht mehr aus Phenylalanin gewonnen werden kann und es keinen anderen physiologischen Syntheseweg gibt. Es entsteht ein Tyrosinmangel. Phenylalanin wird dagegen nun über Alternativstoffwechselwege in normalerweise nicht vorhandenen Substanzen wie u.a in. Phenylpyruvat, Phenyllaktat, sowie Phenylacetat umgewandelt (Abbildung 1) [5]. Diese können nun im Urin ausgeschieden werden, was der Krankheit ihren Namen verleiht: Phenylketonurie - kurz PKU. Bei der PKU handelt es sich schließlich um einen autosomal – rezessiven Gendefekt. Dabei kommt es zu einer Mutation des Phenylalaninhydroxylase – Gens, welches auf dem Chromosom 12q22-q24 lokalisiert ist [6]. Es sind zahlreiche Mutationen des PAH – Gens weltweit bekannt. Die Inzidenz der PKU beträgt 1:10.000 Lebendgeburten [7]. Die Einteilung der Phenylalaninhydroxylasedefekte wird entsprechend der Schweregrad der Störung und zu anderem nach klinischen Beobachtungen vorgenommen [7]. Bei Phenylalaninkonzentrationen über 20mg/dl bei freier Kost und einer Phenylalanintoleranz unter 400 mg/d spricht man von einer klassischen PKU. Die Milde Form liegt vor, wenn die Phenylalaninkonzentration zwischen 10 und 20 mg/dl und die Phenylalanintoleranz bei 400 und 600 mg/d liegt (bei freier Kost). Davon zu unterscheiden ist die Hyperphenylalaninämie, bei der die Phenylalaninkonzentrationen nie über 10 mg/dl liegen (Tabelle 1).

Klassische PKU	Phenylalaninkonzentrationen bei freier Kost > 20 mg/dl, Phenylalanintoleranz < 400 mg/d
Milde PKU	Phenylalaninkonzentrationen bei freier Kost zwischen 10 und 20 mg/dl, Phenylalanintoleranz 400 und 600 mg/d
Hyperphenylalaninämie	Phenylalaninkonzentrationen nie > 10 mg/dl

Tabelle 1 - Einteilung des Phenylalaninhydroxylasedefektes (PAH) in drei Klassen aus Mönch, E. J. (2003) „Kommunikation zwischen Partnern. Phenylketonurie/ Galaktosämie.“ Düsseldorf: Bundesarbeitsgemeinschaft „Hilfe für Behinderte e.V.“ [7].

Erhöhte Phenylalaninkonzentrationen führen unbehandelt während der Gehirnentwicklung bei Säuglingen zu irreversiblen Schädigungen und somit zur mentalen Retardierung. Bei Erwachsenen kommt es dagegen zu reversiblen Funktionseinschränkungen [8]. Hohe Phenylalaninkonzentrationen, aber letztendlich auch die bei der PKU entstehenden Alternativabbauprodukte, blockieren zahlreiche Stoffwechselschritte. Die Folge ist dabei schließlich der mangelnde Aufbau von Gehirnstruktur und eine Energiestoffwechselhemmung

der Zellen des Gehirns. Aus der obigen Abbildung 1 bereits ersichtlich führt letztendlich u.a. auch der Tyrosin – Mangel zur Hemmung der Synthese von Neurotransmittern [9] [10]. Ein weiteres Problem hierbei ist, dass Phenylalanin das gleiche energieabhängige Carrier/Transportersystem zur Überwindung der Blut – Hirschranke verwendet wie einige andere für das Gehirn wichtige Aminosäuren wie u.a. Valin, Tryptophan und Tyrosin. Es kommt bei hohen Phenylalaninkonzentrationen zur einer Verdrängung dieser anderen Transmitter, welche dann die Blut – Hirn – Schranke nicht überwinden können. Zu niedrige Konzentrationen dieser Aminosäuren, vor allem von Tryptophan und des Tyrosin sind im Gehirn festzustellen. Dies führt zu einer nicht ausreichenden Myelinsynthese (Nervenfunktionsstörung), sowie zu einer verminderten Konzentration der Neurotransmitter Dopamin und Serotonin, die wie bereits erwähnt aus Tyrosin synthetisiert werden [11] [12]. Folgen dieser mangelhaften Hirnentwicklung und damit gleichermaßen Folgen einer unbehandelten PKU sind mentale und statomotorische Retardierung mit Mikrozephalie, Krampfleiden und anderen neurologischen Symptomen [13] [8] [14]. Neben den Störungen im Nervensystem kommt es auch zu einer Störung der Proteinsynthese.

Screening Verfahren

Die genannten Folgen einer unbehandelten PKU können durch eine frühzeitige Feststellung der Krankheit durch ein Neugeborenes – Screening und der nachfolgenden Therapie verhindert werden. Das Prinzip zur Identifikation einer PKU – Erkrankung ist die Feststellung einer erhöhten Phenylalaninkonzentration im Blut. Seit Ende der 60er Jahre gehört das PKU Screening zum Standard - Neugeborenen Screening. Das erste Screening Verfahren war der so genannte Bakterieninhibitionstest von Robert Guthrie [15]. Dieser wird allerdings heute wegen seiner geringen Sensibilität nicht mehr empfohlen. Die Methode der Wahl ist heute die so genannte Tandem Massenspektrometrie. Phenylalaninblutkonzentrationen am dritten Lebenstag von über 2,4 ml/dl und eine Phenylalanin/Tyrosin Relation von über 2 gelten hierbei als möglicher Hinweis für das Vorliegen einer PKU.

Therapie

Therapieziel ist eine normale geistige und körperliche Entwicklung des Patienten. Dieses Ziel ist zu erreichen, wenn die Therapie frühzeitig in der Neugeborenenzeit begonnen wird. In diesem Zusammenhang ist eine Korrelation zwischen einem frühzeitigen Beginn und der Intelligenzentwicklung zu beobachten [16]. Die Therapie der PKU besteht aus einer phenylalaninarmen Diät. Das Prinzip ist die Reduktion der Phenylalaninmenge in der Nahrung

auf die für den Körper notwendige Menge [17]. Somit erhält der Körper gerade soviel Phenylalanin über zugeführtes Eiweiß (=Eiweißreduktion), wie er für seine Eiweißsynthese benötigt, darüber hinaus besteht eine strenge Eiweißrestriktion. Prinzipiell muss demnach die zugeführte Phenylalaninmenge gleich der vom Körper zur Eiweißsynthese benötigte Menge sein (Abbildung 2). Falls dieses Verhältnis zugunsten der zugeführten Phenylalaninmenge verändert ist (zugeführte Phenylalaninmenge > notwendige Phenylalaninmenge) kommt es zum so genannten Pooling d.h. die Phenylalaninkonzentration im Blut steigt wieder an. Allerdings ist bei einer reinen phenylalaninarmen Diät durch Eiweißreduktion die damit zugeführte Tyrosinmenge nicht ausreichend zur Bedarfsdeckung. Zugleich kann aber aufgrund des PAH – Defektes kein Tyrosin aus Phenylalanin synthetisiert werden. Aus diesem Grund muss Tyrosin, wie auch andere Aminosäuren getrennt zugeführt werden und zwar in Form von einem phenylalaninfreien, tyrosinangereicherten Aminosäurengemisch. Zusätzlich erfolgt mit der Zuführung des Aminosäuregemisches ebenfalls die Zugabe von Mineralien und Spurenelementen. Die Diät einer klassischen PKU besteht zusammenfassend aus einer phenylalaninreduzierten aber tyrosinangereicherten Diät [18].

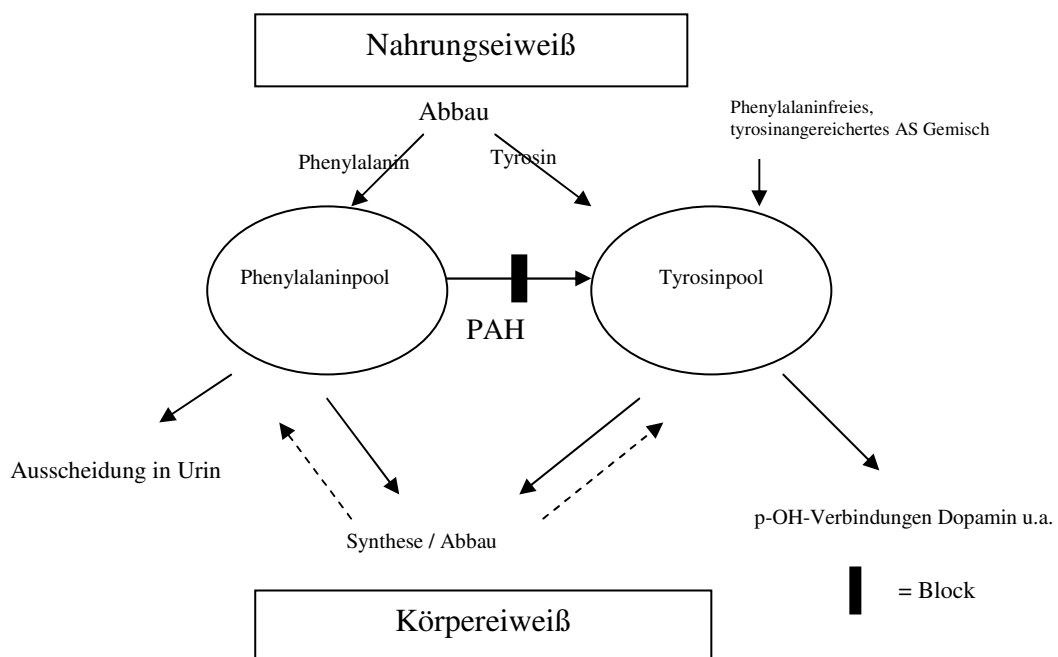


Abbildung 2 - Diätische Behandlung der PKU: Die Diät erfolgt mittels eines phenylalaninfreien, tyrosinangereicherten Aminosäuren (AS) – Gemisches nach Mönch, E. J. (2003) „Kommunikation zwischen Partnern. Phenylketonurie/Galaktosämie.“ Düsseldorf: Bundesarbeitsgemeinschaft „Hilfe für Behinderte e.V.“ [7].

Eine solche phenylalaninreduzierte Ernährung bedeutet ein Verzicht auf eiweißreiche Lebensmittel wie beispielsweise Fleisch, Fisch, Milch, Eier, Getreideerzeugnisse. Es muss jedoch die Energieversorgung des Körpers sichergestellt und der Eiweißabbau verhindert werden. Dies wird durch industriell hergestellte eiweißarme Speziallebensmittel (eiweißarme Mehle, Gebäck, Mixgetränke, Brot, Ei - Ersatz...), sowie die Ernährung mit Kohlenhydraten (Rohrzucker, eiweißfreie zuckerreiche Nahrungsmittel) und Fetten (Öle und Streichfette) ermöglicht. Die phenylalaninarme Diät sollte mindestens bis zur Pubertät eingehalten werden, wobei die Empfehlung gilt, sie lebenslang einzuhalten [19]. International gesehen gibt es jedoch keine allgemeine Übereinkunft hinsichtlich der Indikation, Dauer und Strenge der diätischen Therapie. Auch in der Bundesrepublik gibt es teilweise unterschiedliche Behandlungsvorgaben [20]. Die Diätkontrolle erfolgt über die Bestimmung von Phenylalanin und Tyrosin im Blut.

Es wird allerdings ersichtlich, dass aufgrund dieser umfangreichen Diät Patienten mit PKU somit auf verschiedene Fettsäuren wie u.a. Omega – Fettsäuren ganz oder teilweise verzichten müssen. Der Grund ist im Verzicht auf Fisch und Fleischerzeugnissen, in denen diese Fettsäuren enthalten sind zu sehen. Die Bedeutung dieser Fettsäuren wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine Auswirkung auf das kardiovaskuläre Risiko dieser Diät ist bei Patienten mit PKU in epidemiologischen Studien noch nicht untersucht worden. Eine Erforschung ist von herausragender Bedeutung für die langfristige Möglichkeit neuer Behandlungsstrategien dieser Patienten.

Zunächst einmal soll auf die Rolle der Omega – Fettsäuren im Zusammenhang mit Arteriosklerose und dem damit verbundenen kardiovaskulären Risiko eingegangen werden.

Omega – 3 und Omega – 6 Fettsäuren

Ausgangsverbindung der ω - 3 Fettsäuren (FS) ist die α – Linolensäure, eine essentielle Fettsäure. Zu den weiteren ω – 3 FS zählen unter anderen die Docosahexaensäure (DHA) und die Eicosapentaensäure (EPA). Letztere werden nahezu ausschließlich über maritim fettigen Fisch und die α – Linolensäure über das Öl der Hülsenfrüchte aufgenommen [21] [22]. Nur in geringem Umfang ist die Synthese von EPA und DHA aus α – Linolensäure möglich [23].

Die Linolsäure ist die Ausgangsverbindung der ω - 6 FS, eine ebenfalls essentielle Fettsäure. Ein weiterer Vertreter der ω – 6 FS ist u.a die Arachidonsäure (AA), welche wiederum in kleinem Umfang aus der Ausgangssubstanz der ω - 6 FS hergestellt werden kann. Bei den so genannten Eicosanoiden handelt es sich um bestimmte Folgeprodukte von mehrfach ungesättigten ω - 3 und ω - 6 FS. Die Eicosanoide gelten als regulatorisch wirksame Mediatoren und Effektoren. Sie

vermitteln sowohl pro- als auch antiarteriosklerotische Effekte. Dies erklärt, dass bei vermehrter Zufuhr von ω - 3 FS das Eicosanoidgleichgewicht zu Gunsten vasodilatatorischer, antithrombogener, antiinflammatorischer und antichemotaktischer Wirkung verschoben wird.

Klinische Relevanz der Omega – Fettsäuren

Ursprung für das Interesse der Medizin an der vaskularprotektiven Wirkung von vor allem der ω – 3 FS waren epidemiologische Studien an der Inuit – Bevölkerung Grönlands.

Hierbei wurde beobachtet, dass die Inuit – Bevölkerung trotz vergleichbarer Gesamtfett- sowie einer höheren Cholesterolfuhr niedrigere Triglycerid-, LDL- und VLDL – Plasmaspiegel bei gleichzeitig erhöhten HDL – Werten im Vergleich zu einer dänischen Kontrollgruppe aufwies [24]. Im Vergleich zur dänischen Bevölkerung nehmen die Inuit einen geringeren Anteil gesättigter Fettsäuren aber wesentlich mehr ω – 3 FS zu sich. Zahlreiche Studien folgten. Die so genannte Zutphen – Studie konnte zeigen, dass bereits ein geringer Fischverzehr einen günstigen Effekt hat [25]. Die Multiple Risk Intervention Trial (MRFIT) – Studie, eine Interventionsstudie zur Primärprävention der KHK, konnte nachweisen, dass langkettige ω - 3 FS einen protektiven Effekt hinsichtlich kardiovaskulärer Krankheiten ausüben [26]. Darüber hinaus zeigte die Studie, dass die α – Linolensäure einen positiven Effekt hinsichtlich der Mortalitätsrate besitzt. Die Linolsäure zeigt hierbei keine Effekte.

Allerdings gibt es auch Studien, die einen kardioprotektive Effekt des Fischverzehrs nicht bestätigen konnten. Als Beispiele sind hier die Studie von Ascherio, sowie der Physicians' Health Study zu nennen [27] [28].

Der Vergleich aller Studien zur Primär- und Sekundärprävention zu diesem Thema lässt allerdings den Schluss zu, dass die Aufnahme von 0,5 – 1.0 g/d langkettiger ω - FS der Entstehung einer Arteriosklerose entgegenwirken [29].

Wie bereits aus den obigen Darstellung ersichtlich, spielt die Ernährung bei der Arteriosklerose - Entwicklung eine wichtige Rolle. Es konnte in diesem Zusammenhang der positive Einfluss der ω - 3 FS in der primären und sekundären Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen dargestellt werden. Eine Verringerung der Aufnahme von ω - 3 - PUFAs (Poly unsaturated fatty acids = mehrfach ungesättigte Fettsäuren) kann zu einer Erhöhung des Risikos für Arteriosklerose und damit auch für einen Herzinfarkt führen. Andererseits kann die Aufnahme von langkettigen ω - 3 FS den plötzlichen Herztod und kardiovaskuläre Ereignisse im Sinne der Sekundärprophylaxe vermindern [30] [31] [32]. Im Folgenden soll auf die Mechanismen der kardiovaskulären Effekte von langkettigen ω - 3 FS genauer eingegangen werden.

1.2.1.1 Kardiovaskuläre Effekte von ω - Fettsäuren

Die Zytokine PDGF (platelet derived growth factor) und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) spielen in der Pathogenese der Arteriosklerose eine wichtige Rolle [33] [34]. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass die Einnahme von ω - 3 FS die Genexpression von PDGF - A und PDGF - B in unstimulierten mononukleären Zellen vermindert [35]. Gleiches zeigte ebenfalls eine Interventionsstudie von Baumann et. al. (randomisiert, doppel - blind), in der drei Gruppen gebildet wurden. Sie erhielten eine gewisse Menge an EPA und DHA, ω - 6 und ω - 9 FS oder die gewöhnliche Ernährung. Die Kohorte, die speziell ω - FS erhielt zeigte dabei einen selektiven, signifikanten Abfall an PDGF - A, PDGF - B und MCP - 1 mRNA in den mononukleären Zellen [36].

1.2.1.2 Endothelwirkung von ω - Fettsäuren

Omega - 3 FS wirken als vasodilatatorische Mediatoren, indem sie die proaggregatorische und vasokonstriktive Aktivität des Thromboxans reduzieren. Zugleich werden PGI_3 - Metabolite vermehrt freigesetzt und damit die vasodilatatorischen Prostacycline insgesamt erhöht [37]. Zudem wirken ω - 3 PUFA über das Endothel, indem sie die NO - Synthese erhöhen. Über die Aktivierung der löslichen Guanylat Cyclase (cGAMP) kommt es schließlich am Ende der Signalkaskade zu einer Gefäßrelaxation. Der gleiche cGAMP Signalweg ist auch in Thrombozyten und Monocyten vorhanden. Die Aktivierung der Signalkaskade führt bei Thrombozyten zur Hemmung der Aggregation sowie der endothelialen Adhäsion. Monocyten werden so ebenfalls an einer Adhäsion gehemmt. NO hemmt ebenfalls die Mitogenese, Proliferation und Migration von Zellen [38] [39]. Zudem wurde eine Permeabilitätsverminderung des Endothels durch eine vermehrte Synthese von NO beobachtet. Dadurch können folglich weniger Lipoproteine und Monocyten in die Intima einwandern [40]. Da die ω - 3 FS die Synthese von LTB_4 - Metabolite verringern, können ω - 3 FS auch die Leukozytenadhäsion hemmen und wirken so antiinflammatorisch [41]. Insgesamt wird die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen (Interleukin 2,4,8 und TNF - α) durch die Gabe von ω - 3 FS vermindert, wie auch die Freisetzung von Platelet - activating - factor (PAF). Diese spielen sowohl bei der Thrombozytenaggregation, als auch bei Entzündungsreaktion eine Rolle [42]. Es ist anzunehmen, dass über die beschriebenen hemmenden Wirkungen eine Hemmung auf die entzündliche Komponente der arteriosklerotischen Proliferation durch ω - 3 FS ausgeübt wird.

1.2.1.3 Beeinflussung der Rheologie durch Omega – FS

Wie bereits oben beschrieben vermindern langkettige ω - 3 FS die Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten; sie vermindern ebenfalls die Blutviskosität. So bewirkt die Aufnahme von ω - 3 FS eine Verringerung der Plättchenaggregation und der Plättchenzahl. Insbesondere ist die durch Kollagen- ADP-, Thrombin- und Adrenalin induzierte Thrombozytenaggregation vermindert und die Blutungszeit verlängert [43] [44]. Hierbei zeigte eine randomisierte Studie bei den Patienten mit KHK, die eine gewisse Menge EPA/DHA für einen bestimmten Zeitraum eingenommen haben, eine Reduktion von Thrombomodulin, Gewebsplasminogen Aktivator und des von-Willebrand-Faktors (vWF) [45]. Die Verminderung der Plättchenaggregation und damit der Blutgerinnung führt insgesamt zu einer Verbesserung der Mikrozirkulation. Dieser Effekt ist mit einer Erhöhung des Eicosapentaensäure (EPA)- bei gleichzeitiger Verminderung des Arachidonsäurespiegels (AA) zu begründen. Aus der EPA entsteht u.a. Thromboxan A_3 und Prostaglandin I_3 . Beide Substanzen führen zu einer Verminderung der Thrombozytenaggregation. In diesem Zusammenhang existieren zahlreiche epidemiologische Studien an Eskimos im Vergleich zu anderen Bevölkerungsgruppen. Hierbei konnte innerhalb der Eskimos ein erhöhter Plasma EPA – Spiegel bei gleichzeitiger Verminderung des AA – Spiegels nachgewiesen werden. Diese Bevölkerung hat des Weiteren eine niedrigere Inzidenz an Myokardinfarkten. Die Blutungsneigung ist erhöht [46] [47]. Nachfolgend eine Übersicht zur Beeinflussung der Plättchenfunktion durch langkettige ω - 3 FS.

Plättchenfunktion

Thrombin-, Adrenalin - induzierte Aggregation ↓

Plättchenaggregation, Eicosanoidsynthese und Freisetzung von Intimaproliferation-fördernden Mitogenen ↓

EPA in Phospholipiden ↑,

Plättchenaggregation, TXA_2 ↓

β -Thromboglobulin ↓

Plättchenreaktivität ↓ durch low – dose ω -3-LCP-Ethylester (50-350 mg)

Tabelle 2 – Wirkung von ω - 3 FS auf die Funktion von Plättchen - abgeändert aus: Metz, G. (2000) „Omega-3-Fettsäuren: eine Standortbestimmung zum Millenium“ – Stockdorf: Forum – Medizin – Verl.-Ges. [31].

Neben der Mikrozirkulationsverbesserung kann auch die Blutviskosität durch Eingriff in die Erythropoese beeinflusst werden. Statt Linolsäure und Arachidonsäure werden vermehrt EPA und DHA während der Erythropoese in die Phospholipide der Erythrozytenmembran eingebaut.

Dies führt zur erhöhten Erythrozytendeformierbarkeit und senkt auf diese Weise die Blutviskosität [48].

1.2.1.4 Beeinflussung des Blutdrucks durch PUFAs

Klinische Studien ergeben Hinweise, dass eine Ernährung mit hohem Anteil langkettiger ω - 3 FS eine antihypertensive Wirkung haben. Es lassen sich einige Metaanalysen finden, welche eine signifikante blutdrucksenkende Wirkung durch langkettige ω - 3 FS unterstreichen [49]. Patienten mit einer arteriellen Hypertonie profitieren dabei am stärksten von dieser Wirkung [50]. Eine dieser Studien wurde mit 69 adipösen Hypertonikern durchgeführt [51]. Sie zeigte, dass die tägliche Fischmahlzeit (~3,65 g ω - FS – LCP) den Blutdruck um 6.0 mmHg systolisch bzw. 3.0 mmHg diastolisch senken kann. Die Blutdrucksenkung ist einerseits auf die Senkung des Fibrinogenspiegels und der Blutviskosität, andererseits ist die Hemmung der Synthese und Wirkung von vasokonstriktiven Mediatoren zurückzuführen. Der Eicosanoidmetabolismus wird hierbei zugunsten vasodilatativ, antiaggregatorischer Mediatoren verschoben. Es handelt sich insgesamt um ein Zusammenwirken der einzelnen Mechanismen, die letztendlich blutdrucksenkend wirken.

1.2.1.5 Einfluss von ω - 3 Fettsäuren auf den Lipoproteinspiegel

Omega – 3 FS senken signifikant den Triglyceridspiegel [52]. Durch Zuführung von ω - 3 FS wird wahrscheinlich zunächst die Lipolyserate freier Fettsäuren reduziert [53]. Dadurch sinkt schließlich die Konzentration der freien Fettsäuren im Plasma und die hepatozelluläre Synthese von Triglyceriden und des VLDL [54]. Es gibt auch Hinweise, dass ω - 3 FS hepatische Enzyme der Triglycerid – Synthese inhibieren [55]. Aufgrund der beschriebenen Mechanismen wird die hepatische VLDL – Partikel – Sekretion vermindert, wodurch dann ebenfalls der Triglyceridspiegel abgesenkt wird [56]. Eine zusätzlich vermehrte Umwandlung von VLDL zu LDL stützt die Senkung des Triglyceridspiegels schließlich und das LDL steigt an [57]. Eine Erklärung hierfür ist die bis zu 70%ige Zunahme der Aktivität der Lipoproteinlipase nach Einnahme von Fischölpräparaten [58]. Die Umwandlung von VLDL zu LDL ist allerdings bislang in erster Linie bei Patienten mit hohen Triglycerid – Ausgangswerten und dementsprechende Fettstoffwechselstörungen beschrieben. Es gibt allerdings auch Studien, die eine Reduktion der LDL – Werte nach Substitution mit ω - 3 FS beschreiben [59]. Erklärt wird diese Beobachtung durch die Hemmung der Cholesterolsynthese [60]. Die Aufnahme von ω - 3

FS führt bezüglich der HDL – Fraktion bei Gesunden zu keinen Effekten. Lediglich wurde ein geringer Anstieg der HDL₂ – Fraktion (antiatherogen) beschrieben [61].

Von besonderem Interesse sind auch die Effekte von ω - 3 FS bezüglich des Lipoprotein(a) [Lp(a)]. Erhöhte Lp(a) – Spiegel, wie sie bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie vorkommen, sind ein eigenständiger Risikofaktor [62]. Lp(a) wirkt atherogen und thrombogen. In einigen Studien wurde eine Senkung von erhöhten Lp(a) – Spiegel durch ω - 3 FS beobachtet. Beobachtet wurde dies bei einer Konzentration von über 20 mg% oder bei einer Langzeitanwendung von ω - 3 FS [63]. Eine Studie mit 35 KHK – Patienten zeigte in diesem Zusammenhang eine Senkung der Lp(a) – Spiegel bei gleichzeitiger Verminderung des Gewebe-Plasminogenaktivator [64]. Nachfolgend zur Übersicht der möglichen Effekte von ω – 3 FS die Tabelle.

Triglyceridspiegel – Senkung	Peripher	Reduktion von Lipolyse und somit der freien FS
	Prähepatisch	Reduktion Konzentration freier FS Verminderte intestinale Bildung von Chylomikronen
	hepatisch	Aktivitätsminderung der lipogenen Enzyme Reduktion der Synthese von TG u. VLDL Verminderte Sekretion VLDL Vermehrte Oxidation v. FS
	posthepatisch	Vermehrte Umwandlung von VLDL zu LDL Verminderter „Kläreeffekt“ nach fettiger Nahrungsaufnahme
Effekte auf das LDL	hepatisch	Verminderte Aktivität der HMG – CoA – Reduktase Cholesterolausscheidung erhöht
	posthepatisch	VLDL zu LDL Umwandlung erhöht Verminderung der LDL – Partikelgröße
	LDL - Rezeptor	Rezeptorenbindung vermindert
Effekte auf HDL		Erhöhung PUFAs Übertragung von VLDL zu HDL

Tabelle 3 - Auswirkungen der Substitution von ω - 3 Fettsäuren auf den Triglyceridspiegel und des LDL Cholesterols sowie der HDL – Fraktion - Zusammenfassung nach Hahn, A., A. Ströhle, et al. (2002). "Wirkstoffe funktioneller Lebensmittel in der Prävention der Arteriosklerose." [65].

1.3 Thrombozyten und Hämostase

1.3.1 Physiologie und Morphologie von Thrombozyten

Thrombozyten finden ihren Ursprung im Knochenmark, wo sie aus Megakaryozyten entstehen. Mit einer durchschnittlichen Zahl von 150.000 – 300.000 / μl befinden sie sich für etwa 7 Tage im peripheren Blut. Ihre tägliche Erneuerungsrate beträgt 20 % der Gesamtplättchenzahl im Blut. Sie haben einen Durchmesser von 2 – 4 μm und sind die kleinsten Zellen des menschlichen Blutes. Thrombozyten besitzen keinen Zellkern; sie sind so genannte „anukleäre Zellen“ [66]. Ihr Austausch erfolgt im retikuloendothelialen System der Leber und Milz. Thrombozyten zirkulieren nicht nur im Blut, sondern ein Teil ist in der Milz gespeichert. Im nichtaktivierten Zustand haben sie eine diskoide Form (durchschnittliche Oberfläche 8 μm^2). Dagegen führt eine Aktivierung zu einer Formveränderung („shape change“): Es kommt zur Ausbildung von Pseudopodien, die Ausstülpungen der Plasmamembran sind. Die Oberfläche dieses formveränderten Thrombozyten beträgt in diesem Zustand 13 μm^2 . Ultrastrukturell können Thrombozyten in vier Bereiche unterteilt werden:

a.) periphere Zone

Die periphere Zone besteht aus einer trilaminären Zellmembran. Extrazellulär besteht diese aus einer Glykokalix (Mukopolysaccharide), Glykoproteine, Phospho- und Glykoproteine sowie Cholesterin und verschiedene Enzyme (beispielsweise Adenylatzyklase, Ca^{2+} - ATPase, Phospholipase). Die Glykoproteine bilden spezifische Oberflächenrezeptoren.

b.) strukturelle Zone

Die strukturelle Zone besteht aus Microtubuli, die submembranös gelegen sind. Sie stellen Tubulinfäden dar. Umgeben sind sie durch ein Netzwerk von Strukturproteinen. Ihre Aufgabe ist es die diskoide Form des nicht aktivierten Thrombozyten aufrecht zu erhalten. Beim aktivierten Thrombozyten sind sie aktiv an der Reorganisation der Zellorganellen beteiligt, so dass es zur oben beschriebenen Pseudopodienausbildung kommen kann. Das Zytoskelett besteht aus Strukturproteinen, hauptsächlich Aktin und Aktin – Bindungsproteine. Das Aktin liegt hierbei in zwei funktionellen Formen vor: globuläre Form (G – Form) und Filament – Form (F – Form). Aktin ist ebenfalls mit Myosin assoziiert. Durch Aktivierung kommt es zur Filamentbildung aus Aktin und Myosin. Sie sind verbunden mit den Zellorganellen und reorganisieren diese während des Aktivierungsvorganges.

c.) Zone der Zellorganellen

Die Zellorganellen befinden sich im Zytoplasma und bestehen zum größten Teil aus Mitochondrien, Glykogenspeicher und Speichergranula. Man unterscheidet drei Formen der Speichergranula: dichte Granula, α -Granula und Lysosomen. Die Granula sind spezifisch für die Plättchen und essentiell für ihre Funktion.

Dichte Granula enthalten niedermolekulare Verbindungen wie ATP, ADP und Serotonin. Diese Verbindungen fördern vor allem die Aggregationsvorgänge. Die α -Granula überwiegen zahlenmäßig die anderen Formen der Speichergranula. Sie beinhalten Proteine, die unterschiedliche biologische Funktionen beeinflussen. Lysosomale Speichergranula enthalten hydrolytische Enzyme.

d.) Membransysteme

Das Membransystem besteht aus einem offenen kanalikulären System („surface connected open canalicular system) und einem dichten tubulären System („dense tubular system“). Das offene kanalikuläre System besteht aus vielen gewundenen Kanälen, die ins Innere des Thrombozyten reichen. Sie sind mit der Plasmamembran verbunden und durch Porenöffnungen auch mit dem Extrazellulärraum. Das dichte tubuläre System ist ein Hauptspeicherort für Ca^{2+} , das für den Metabolismus und Aktivierung des Thrombozyten von Wichtigkeit ist. Sobald die zytoplasmatische Ca^{2+} Konzentration eine bestimmte Schwelle überschreitet, kommt es zur Formveränderung des Thrombozyten (Pseudopodienausbildung) und Degranulation.

1.3.2 Primäre Hämostase

Thrombozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der Hämostase. Unter Hämostase versteht man den Vorgang der Bildung eines Gefäßwandthrombus, der damit zur physiologischen Blutstillung führt [67]. Es handelt sich dabei um ein System, welches sich aus plasmatischen, zellulären und vaskulären Anteilen zusammensetzt. Die Hämostase lässt sich in Primärer, Sekundärer Hämostase und Fibrinolyse unterteilen. Sie beinhaltet also pro- und antithrombotische Bestandteile. Beide stehen in einem physiologischen Gleichgewicht zueinander. Bei Aktivierung des Systems kommt es zu einer Vasokonstriktion und zur einer Bildung eines hämostatischen Pfropfes (Thrombus), sowie zum Gefäßwandumbau und zur Offenhaltung des Gefäßes.

1.3.3 Adhäsion

Der erste Schritt der primären Hämostase ist durch die Adhäsion der Thrombozyten gekennzeichnet. Durch Verletzung der Gefäßwand und damit des Endothels, kommt es zur

Freilegung subendothelialer Strukturen und adhäsiven Glykoproteinen (u.a vWF und Kollagen). Die Thrombozyten interagieren nun über den thrombozytären Rezeptor GP Ib-V-IX mit kollagenimmobilisierten vWF (von Willebrand Faktor), welcher eine zentrale Rolle in der Primären Hämostase spielt. Das Zusammenspiel zwischen diesen beiden Faktoren ermöglicht die Anlagerung von Thrombozyten an die Gefäßwandläsion gegen hohe Scherkräfte; es besteht eine sehr starke Affinität. Dieser erste Kontakt zwischen einem Thrombozyten und Gefäßwandläsion wird als Kontaktphase bezeichnet. Die Phase der Stabilisierung mit einer Stabilisierung der Plättchenadhäsion schließt sich an. Dies gelingt über weitere membranständige Adhäsionsrezeptoren, welche zur Integrinfamilie gehören (Kollagen-, Fibronektin- und Lamininrezeptor). Die Bindung zwischen Kollagen und thrombozytären Kollagenrezeptor führt letztendlich zur Formveränderung der adhären Plättchen, dem „shape change“ – Phase der Aktivierung. Es kommt nun zur Ausbreitung von Pseudopodien zur Abdichtung der Leckage. Adhären, aktivierte Plättchen bilden aus Arachidonsäure Thromboxan A₂ (siehe auch oben). Dies wird schließlich abgegeben, bindet dann an den spezifischen, thrombozytären Thromboxan - Rezeptor, was den Aktivierungsvorgang insgesamt verstärkt. Neben dieser Wirkung des Thromboxans wirkt es wie bereits beschrieben vasokonstriktorisch und verlangsamt dadurch den Blutstrom, was die Thrombusbildung begünstigt. Granulainhaltsstoffe wie beispielsweise das Adhäsionsmolekül P-Selektin [68] und der vWF [69] werden sezerniert (Freisetzungsreaktion, „Release“). Dies führt zur autokrinen Aktivierung und zur parakrinen Stimulation der noch ruhenden Thrombozyten, sowie zur Interaktion der Thrombozyten mit der plasmatischen Gerinnungskaskade. Diese aggregieren nun mit den adhären Plättchen. Diese Interaktion wird erst durch den aktivierten GPIIb – IIIa – Rezeptor ermöglicht, welcher jetzt vermehrt an der thrombozytären Membran exprimiert wird. Die Adhäsion ist beendet, wenn die Thrombozyten vollständig über dem Subendothel ausgebreitet sind, was man auch als Spreading (Spreizung) bezeichnet. Eine Leckage ist somit nun völlig abgedichtet.

1.3.4 Aggregation

Die Aggregation folgt der Adhäsion. Aggregation ist definiert als eine Koadhäsion der Blutplättchen untereinander. Man unterscheidet hier eine primäre von einer sekundären Aggregation. Bei der primären Aggregation kommt es zur Bildung so genannter Fibrinogenbrücken, durch Bindung von divalenten Fibrinogenmolekülen an den GPIIb-IIIa-Rezeptor in Anwesenheit von Calciumionen. Fibrinogenbrücken verbinden Thrombozyten locker miteinander; es bilden sich Plättchenmikroaggregate. Thrombin, Thromboxan A₂, Adrenalin oder ADP als Beispiele für Agonisten aktivieren Thrombozyten. Diese Aktivierung löst eine

zelluläre Signalkaskade aus. Diese führen u.a. zu einer Konformationsänderung des GP IIb-IIIa Rezeptors. Lösliches Fibrinogen ist nun in der Lage an eine spezifische Erkennungssequenz zu binden. Um lösliches Fibrinogen zu binden, ist also die Aktivierung des Thrombozyten notwendig. Die primäre Aggregation ist ein reversibler Abschnitt der Plättchenaggregation [70] [71]. Mit einer Verzögerung von 10 – 30 Minuten kommt es schließlich zu einer irreversiblen Bildung von Plättchenaggregaten durch Freisetzung von Adhäsionsmolekülen und Koagulationsenzymen. Die Fibrinogenbindung an den GPIIb –IIIa Rezeptor ist jetzt stabilisiert.

1.3.5 Sekundäre Hämostase

Der primären Hämostase schließt sich die Sekundäre Hämostase an. Hierbei kommt es nun zur Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade. Einteilen lässt sich die Gerinnungskaskade in einen intrinsischen und einen extrinsischen Weg. Beide münden schließlich in eine Fibrinbildung. Die Faktoren VIII und IX nehmen hierbei eine Schlüsselrolle ein. Ziel ist die Verfestigung des Gefäßwandthrombus.

1.4 Thrombozytäre Membranglykoproteine

Thrombozyten besitzen membranständige Glykoproteine, welche als Oberflächenrezeptoren wirken. Sie ermöglichen die Interaktion zwischen den Blutplättchen, der subendothelialen Matrix (von – Willebrand - Faktor – Rezeptor, Kollagenrezeptor), den plasmatischen Gerinnungsfaktoren (von - Willebrand – Faktor – Rezeptor), den Endothelzellen (GP IIb – IIIa) und den Leukozyten (P – Selektin). Eingeteilt werden diese Glykoproteine nach ihrer Molekülstruktur in Integrine, leuzinreiche Glykoproteine, Selektine und Rezeptoren vom Immunglobulintyp.

1.4.1 Integrine

Die Integrine gehören zu den Adhäsionsrezeptoren und verbinden das Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix. Sie kommen nahezu auf allen Zellen, also ubiquitär vor. Integrine sind nicht - kovalent verbundene Heterodimere. Sie bestehen aus einer α - (determiniert die Spezifität) und einer β - Untereinheit (strukturelle Untereinheit und dient zur Klassifizierung). Integrine interagieren mit zahlreichen anderen Glykoproteinen. Diese Glykoproteine / Liganden (Kollagen, Fibrinogen, Thrombospondin, von – Willebrand Faktor, Fibronectin) weisen eine bestimmte Aminosäuren – Sequenz (z.B. Arginin [R]-Glycin [G] – Aspartat [D] = RGD – Sequenz, Bestandteil z.B. im Fibrinogenmolekül) auf, ohne die eine Erkennung durch die β_1 und β_3 - Integrine und eine Bindung an den Rezeptor nicht möglich wäre. Die RGD – Aminosäuren –

Sequenz ist die zentrale Aminosäure – Sequenz durch die eine Ligandenbindung am β_3 – Integrin ermöglicht wird. Eine Ligandenbindung am Rezeptor erfordert zusätzlich die Anwesenheit einer millimollaren Konzentration von divalenten Kationen wie beispielsweise Ca^{2+} . Bei einer Thrombozytenaktivierung kommt es nun wie bereits erwähnt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und den Bindungsstellen, hingegen ist eine Bindung der Liganden am ruhenden Thrombozyten nicht möglich [72]. Bislang sind fünf verschiedene Integrine auf Thrombozyten beschrieben: innerhalb der β_1 - Klasse ($\alpha_2\beta_1$ = Kollagenrezeptor, $\alpha_5\beta_1$ = Fibronectinrezeptor $\alpha_6\beta_1$ = Lamininrezeptor), und der β_3 – Klasse ($\alpha_{IIb}\beta_3$ = Fibrinogenrezeptor, $\alpha_v\beta_3$ = Vibronectinrezeptor).

1.4.2 Konstitutive Membranglykoproteine

Die so genannten konstitutiven Membranglykoproteine werden am ruhenden und am aktivierten Thrombozyten exponiert. Die GPIIb-IIIa (Fibrinogenrezeptor) und GPIb-V-IX (leuzinreiches Glykoprotein) – Rezeptoren gehören zu dieser Art [73] [74] [75].

Darüber hinaus gibt es andere Glykoproteine wie zum Beispiel das P-Selektin, die nur am aktivierten Thrombozyten exponiert werden.

1.4.3 GP IIb-IIIa

Der GP IIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) – Rezeptor ist ein β_3 – Integrin und ein Bestandteil der thrombozytären Plasmamembran, des offenen kanalikulären Systems und der α – Granula. Dieses Membranglykoprotein findet sich mit durchschnittlich 50.000 Rezeptoren pro Thrombozyten am häufigsten. Hierbei liegen 70 % in der konstitutiven Form auf der Oberfläche exprimiert vor, 30 % werden schließlich nach Aktivierung des Thrombozyten aus intrazellulären Speichern (offenes kanalikuläres System und α – Granula) an die Oberfläche freigesetzt. Die β_3 -Kette (IIIa) hat ein Molekulargewicht von 90 kDa, die α_{IIb} – Kette (IIb) besteht aus einer großen Untereinheit „heavy chain“ (125 kDa) sowie einer kleinen Untereinheit „light chain“ (23 kDa) mit insgesamt 145 kDa Molekulargewicht. Die Aufgabe des Rezeptors ist lösliches Fibrinogen an die Oberfläche vom aktivierten Thrombozyten zu binden (= primäre Aggregation). Physiologisch besitzen Thrombozyten einen ruhenden, nicht aktivierten GPIIb-IIIa – Rezeptor an der Oberfläche [76]. Dieser Funktionszustand wird auch als niedrigaffin bezeichnet. In diesem Zustand kann dieses Glykoprotein nur immobilisiertes, nicht aber lösliches plasmatisches Fibrinogen binden. Bei beispielsweise durch Thrombin oder Thromboxan A_2 aktivierten Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung des GP IIb/IIIa mit Freilegung der

Fibrinogenbindungsstelle. Dieser Funktionszustand wird als hochaffin bezeichnet. Nachfolgend ist nun die Bindung von Fibrinogen möglich. Mit der Bindung von Fibrinogen an den aktivierten Glykoprotein – Rezeptor wird eine weitere Konformationsänderung induziert, wobei es zur Freilegung von kryptischen Epitopen (LIBS – ligandeninduzierte Bindungsstelle) kommt [77]. Als „ligandenbesetzter Funktionszustand“ wird dieser Funktionszustand bezeichnet. Wie bereits beschrieben besitzt Fibrinogen die RGD – Aminosäuren – Sequenz mit der es von GPIIb/IIIa erkannt wird. Ferner besitzt es eine KQAGDV – Aminosäuresequenz im Bereich der γ - Kette [78]. Mit dieser kann es schließlich mit dem GPIIb-IIIa – Rezeptor in Kontakt treten.

1.4.4 GP Ib-V-IX

Ein weiteres konstitutiv vorkommendes Membranglykoprotein an der Thrombozytenmembran ist wie bereits erwähnt das Glykoprotein Ib-V-IX. Aufgrund des häufigen Vorkommen der Aminosäure Leuzin zählt das Glykoprotein zur Klasse der leuzinreichen Glykoproteine. Das GP Ib-V-IX ist der Adhäsionsrezeptor für den von-Willebrand-Faktor (im Folgenden vWF), welche eine herausragende Rolle in der primären Hämostase spielt. Der vWF zirkuliert als Multimer im Plasma; er kann nur in immobilisierter Form mit GP Ib-V-IX interagieren [79]. Er ist darüber hinaus Bestandteil der extrazellulären Matrix und wird in den Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert. Zentrale Aufgabe des GP Ib-V-IX ist die Adhäsion von Thrombozyten an den in den Kollagenfibrillen immobilisierten vWF entgegen der Scherkräfte. Der GP Ib-V-IX Rezeptor besteht aus einer α – (150 kDa) und β – Kette (27 kDa), welche über Disulfidbrücken miteinander kovalent verbunden sind. Neben vWF ist auch die Bindung von Thrombin möglich. Es sind ca. 25.000 dieser Rezeptoren auf Thrombozyten zu finden.

1.4.5 Glykoproteine aktivierter Plättchen

Andere Glykoproteine wie hauptsächlich P – Selektin, GP 53 (lysosomales integrales Membranprotein) und Thrombospondin kommen nur an aktivierten Thrombozyten vor [80] [81]. P – Selektin kommt auf der Thrombozytenoberfläche und auch in Endothelzellen vor. Es wird von Megakaryozyten und Endothelzellen synthetisiert. Gespeichert wird es in den α – Granula (s.o.) der Thrombozyten und den Weibel – Palade – Körperchen der Endothelzellen [82]. P – Selektin spielt eine Hauptrolle in der sekundären Hämostase und bei vaskulären Reparaturvorgängen. Werden Thrombozyten aktiviert, führt dies zu einer Verschmelzung der Granulamembran mit der Zellmembran und zur Expression des P – Selektins auf der Thrombozytenoberfläche sowie auch auf dem Endothel. Gleicher Vorgang gilt auch für GP 53.

Das P – Selektin ermöglicht die Leukozytenanlagerung an einer möglichen Endothelläsion und induziert inflammatorische Reaktionen in den Leukozyten.

1.5 Durchflusszytometrie

Der Nachweis von Membranglykoproteinen auf Thrombozyten ist mittels Durchflusszytometrie möglich. Hierzu können Vollblutproben verwendet werden, welche mit gegen die Glykoproteine gerichtete, bindende Antikörper/Markern inkubiert werden. Diese sind mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert, wodurch eine durchflusszytometrische Messung ermöglicht wird. Dementsprechend können dann Aussagen über den Status der Rezeptoren gemacht werden. Diese Methode ist in dieser Arbeit verwendet worden und im Kapitel „Methode“ genau erklärt.

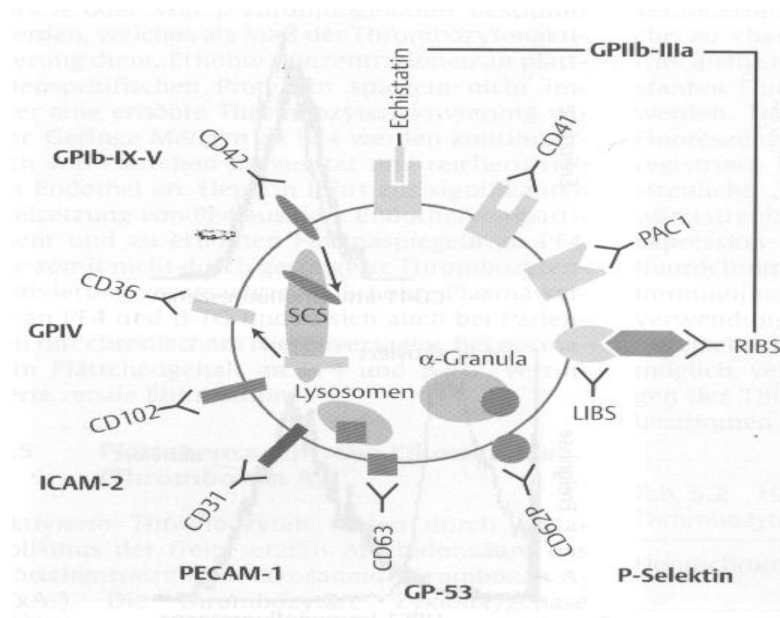


Abbildung 3 - Mittels Durchflusszytometrie ist eine Bestimmung der Membranglykoproteine möglich. Mit Hilfe spezifischer Antikörper können Funktionszustandsänderungen der thrombozytären Membranglykoproteine nachgewiesen werden. CD 41: komplexierter Fibrinogenrezeptor; PAC-1: aktivierter Fibrinogen – Rezeptor; Nachweis einer Degranulation der α – Granula / Lysosomen mittels gegen P – Selektin (CD62P) und gegen GP 53 (CD63) gerichtete Antikörper; Bindung von Anti – CD 42 an GP 1b (nach Gawaz, M. (1999). "Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung." [66].

Oberflächenantigen	Monoklonaler Antikörper	Aussage
GP IIb – IIIa	Anti – 61	Oberflächenexpression der b3 – Kette
	Anti – 41	Oberfläche der a IIb – Kette
	PAC - 1	Nachweis des aktivierten Fibrinogenrezeptors
GP Ib-V-IX	Anti – CD 42	Internalisierung nach Thrombin – Aktivierung
P – Selektin	Anti – CD62P	Degranulation von α – Granula
	Anti – CD63	Degranulation von Lysosomen

Tabelle 4 - Zur durchflusszytometrischen Bestimmung verwendete monoklonale Antikörper und die daraus resultierende Aussagemöglichkeit (nach Gawaz, M. (1999). "Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung." [66].

1.6 Arteriosklerose

Unter Arteriosklerose ist ein proliferativer Prozess der Gefäßwandzellen (glatte Muskulatur, Myozyten) zu verstehen, der über mehrere Zwischenschritte zur Plaquebildung mit der Gefahr einer thrombotischen Gefäßokklusion führen kann [83]. Zu anerkannten Hypothesen der Pathogenese der Arteriosklerose gehören die „Klon – Wachstums“ – Theorie, die „Inkrustations-“ und die „response to injury“ - Hypothese. Vermutlich gibt es allerdings keine einheitliche pathogenetische Kaskade der Artherombildung [83]. Die initiale Endothelläsion kann durch mechanische, chemische (Kohlenmonoxid), immunologische oder auch toxische Größen ausgelöst werden. Dementsprechend gelten als vermutliche Risikofaktoren für die Ausbildung arteriosklerotischer Vorgänge die arterielle Hypertonie, der inhalative Zigarettenkonsum, die Hyperlipidämie, der Diabetes Mellitus und das metabolische Syndrom.

Die Endothelläsion führt zu einer Proliferation der glatten Muskelzellen, mit der Folge der Bildung eines atheromähnlichen Plaques. Begünstigt wird dies durch eine bestehende Hyperlipidämie. Die Endothelschädigung führt zu einer Adhäsion und Emigration von Monozyten in die Intima. Zu dem kommt es zu einer Plättchenadhäsion und zur lokalen Aktivierung des Gerinnungssystems. Monozyten, Thrombozyten und Endothelien setzen nun PDGF (platelet – derived growth factor) frei. Dies stimuliert das Wachstum der glatten Muskelzellen (Myozyten) und die Aggregation weiterer Thrombozyten. Die Herausbildung von Schaumzellen, die in die Arterienwand einwandernden Makrophagen und die Proliferation der Myozyten führt letztendlich zur Bildung eines atheromatösen Plaques. Im besonderen Falle kann

sich aufgrund eines Sauerstoffmangels im Plaques eine zentrale Nekrose bilden. Kalksalze können diese umgeben. Ein späteres Einreißen dieser arteriosklerotischen Läsion ist möglich. Diese wird dann von einem Thrombus abgedeckt.

Die genannte Proliferation der Myozyten, ein Intimaödem und die beschriebenen intraluminären Thromben führen zunächst zu einer Verdickung der Gefäßwand mit Einengung des Gefäßlumens. Dies kann schließlich bis zum völligen Verschluss des Gefäßes führen [84]. Progression und thromboembolische Komplikation der Arteriosklerose werden insbesondere durch ein gestörtes Gleichgewicht zwischen den Arachidonsäurederivaten Prostazyklin und Thromboxan A₂ beeinflusst. Prostazyklin wird innerhalb der Gefäßendothelzelle produziert. Es kann eine Dilatation der glatten Muskulatur bewirken. Eine verminderte Ausschüttung bewirkt eine vermehrte Thrombozytenaggregation. Außerdem verringert Prostazyklin die Adhäsionsfähigkeit von Thrombozyten an der Gefäßwand. Thromboxan A₂ wird in den Thrombozyten produziert. Es handelt sich dabei um ein Antagonist zu Prostazyklin: Es bewirkt eine Konstriktion der glatten Gefäßmuskulatur und eine Plättchenaggregation bei gesteigerter Freisetzung. Arteriosklerotisch geschädigte Gefäße produzieren weniger Prostazyklin und stimulierte Thrombozyten vermehrt Thromboxan A₂. Dies führt zu einer Verschiebung des dynamischen Gleichgewichts dieser beiden Substanzen in Richtung einer erhöhten Thrombozytenaggregation. Dies führt zu einem Circulus vitiosus, dessen Ende eine thrombotische Arterienokklusion sein kann.

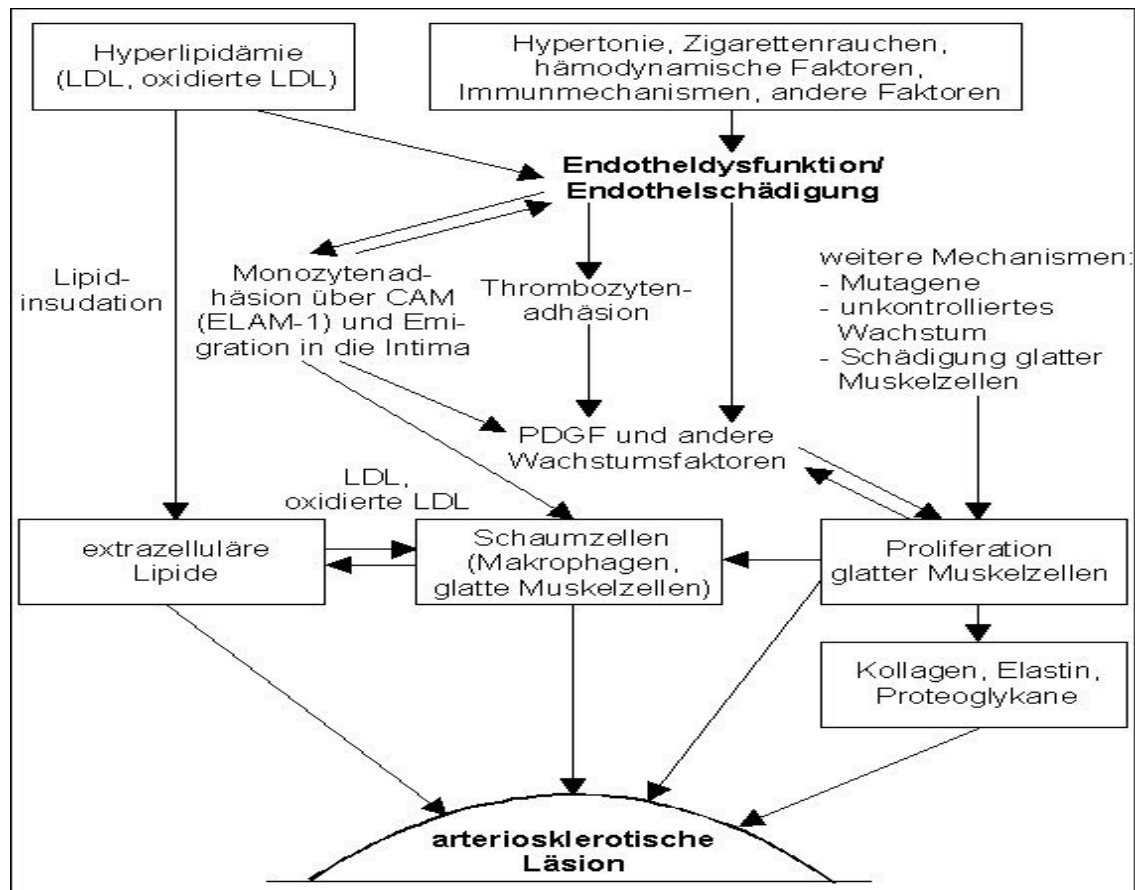


Abbildung 4 - Pathogenese der Arteriosklerose aus: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/medizin/mencke-thomas/HTML/mencke-ch1.html>.

1.7 Bildung der Arteriosklerose

Zur Bestimmung früharteriosklerotischer Veränderung ist die B-Mode Sonographie der Art. Carotis Communis ein geeignetes Verfahren [85] [86] [87]. Es handelt sich hierbei um ein nicht – invasives und gut verfügbares Verfahren. Sie liefert u.a. Informationen über die so genannte Intima Media Dicke (IMT = Intima Thickness). Arteriosklerotische Veränderungen betreffen in erster Linie die Tunica intima. Tunica intima und Tunica media haben eine unterschiedliche Impedanz, so dass beide Wandschichten abgrenzbar sind [88]. Aus diesem Grund findet die Messung der Intima Dicke (Tunica intima und Tunica media) zur Bestimmung von arteriosklerotischen Veränderungen Anwendung. Die sonografisch gemessene IMT korreliert hierbei mit der lichtmikroskopischen bestimmten IMT im histologischen Präparat [89] [90]. Insgesamt sind asymptotische, früharteriosklerotische Veränderungen bis hin zu völligen Verschlüssen quantifizierbar. Erstmals vorgestellt 1986 zur Beschreibung von arteriosklerotischen Aortenveränderungen, hat sich diese Methode als Standardmethode der Beurteilung arteriosklerotischer Frühveränderungen und Progressionsänderung der Arteriosklerose etabliert. Das Verfahren besitzt eine sehr gute Validität, sowie eine

Reproduzierbarkeit. Die IMT der Art. Carotis Communis ist ein sensitiver sonomorphologischer Surrogatmarker, der mit einer zerebralen, koronaren oder peripheren Verschlusskrankheit korreliert [91]. Außerdem lässt sich die arterielle Compliance mittels Sonographie bestimmen. Definiert ist diese als ein Quotient aus Volumen und Druckänderung innerhalb einer Arterie [92]. Mit Hilfe der Bestimmung der Compliance lassen sich Aussagen zur Gefäßwandelastizität machen. Es beschreibt die elastisch – dynamische Eigenschaft zentraler Leitungsarterien. Ist die mechanische Gefäßeigenschaften gestört, beeinflusst dies das kardiovaskuläre Risiko. Doppler – sonografisch lässt sich die systolisch – diastolische Gefäßwandbewegung bestimmen, eine Beziehung zwischen Durchmesseränderung und Blutdruckamplitude lässt sich herstellen. Aus dieser Beziehung lässt sich nun die lokale Gefäßwandelastizität bestimmen [93]. In verschiedenen Studien wird dieses Verhältnis durch Indices ausgedrückt. Ein Parameter zur Quantifizierung der Compliance von Gefäßen stellt der β – Stiffness Index dar. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass eine erniedrigte arterielle Compliance zu erhöhten systolischen Blutdruckwerten, einer Zunahme der Blutdruckamplitude und einer linksventrikulären Hypertrophie führen kann [94]. Dabei ist eine hochsignifikante Korrelation zwischen Blutdruckamplitude und koronaren Herztod nachgewiesen [95]. Dopplersonografisch lässt sich außerdem das Strömungsverhalten beschreiben. Hierzu sind verschiedene Indices beschrieben. Von Wichtigkeit in diesem Zusammenhang ist der Pulsalitätsindex nach Gosling. Definiert ist dieser als Quotient aus maximaler systolischer Dopplerfrequenz abzüglich der maximalen enddiastolischen Dopplerfrequenz und mittlere Maximalfrequenz (gesamter Pulszyklus). Eingeführt wurde dieser Index ursprünglich als Indikator einer proximalen Stenose. Hierbei kommt es poststenotisch zu einer Verminderung des Pulsalitätsindex. Mit Hilfe des Pulsalitätsindex lassen sich also grundsätzlich Aussagen zur Pulsalität und zum Gefäßwiderstand (unabhängig vom Winkel des Schallstrahls zum Blutfluss) treffen. Die Sonographie ermöglicht eine präzise Darstellung der kompletten Gefäßwand. Sie ermöglicht die Feststellung von früharteriosklerotischen Prozessen unterschiedlichster Genese und deren präzisen Quantifizierung. Das ist schließlich ein Grund für die Untersuchung von therapeutischen Effekten hinsichtlich der Prävention von Arteriosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen in den verschiedensten Studien [96].

2 Fragestellung

An Phenylketonurie (PKU) erkrankte Patienten haben seit der Geburt eine für die Entwicklung und Funktion des Gehirns notwendige spezielle eiweißreduzierte Diät einzuhalten. Diese einseitige Ernährung mit einem nur geringen Anteil an natürlichen Eiweiß birgt u.a. die Gefahr einer Unterversorgung mit ω - 3 und ω - 6 FS. Zumal – von nur vereinzelt Ausnahmen abgesehen – beispielsweise nie Fisch gegessen werden wird. In der Literatur wird ein Mangel gerade an diesen Fettsäuren als Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten diskutiert. Ein Mangel an speziell diesen Fettsäuren könnte also das Risiko für früharteriosklerotische Veränderungen und somit für kardiovaskuläre Krankheiten erhöhen. Als Surrogatmarker für früharteriosklerotische Veränderungen wurde die Messung der IMT (= Intima – Media – Dicke), des Pulsalitätsindex (= PI) sowie der β – Stiffness – Index verwendet. Außerdem wurde die Thrombozytenaktivierung und das Fettsäureprofil bestimmt. Die Parameter wurden mit einer geeigneten Kontrollgruppe verglichen.

Die genannten Parameter wurden darüber hinaus bei einer Patienten Population gesondert untersucht, welche mit speziellen Fettsäuremischpräparaten (insbesondere ω - FS) substituiert wurde. Im Einzelnen wurde folgende Fragestellungen untersucht:

1. Unterscheiden sich die IMT, Pulsalitätsindex und β – Stiffness Index zwischen den zu untersuchenden Gruppierungen?
2. Liegt eine erhöhte Thrombozytenaktivierung innerhalb der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe vor?
3. Inwiefern unterscheidet sich das Plasmafettsäure – Profil der Patienten mit PKU von der Kontrollgruppe?
4. Gibt es eine signifikante Erniedrigung von ω - 3/6 Fettsäuren im Vergleich zur Kontrollpopulation?
5. Gibt es einen Zusammenhang zwischen einer Plättchenaktivierung und den gemessenen Fettsäuren?

6. Kann der PKU - Patientengruppe insgesamt ein bestimmtes kardiovaskuläres Risiko – Profil zugeordnet werden?

3 Patienten und Methodik

3.2 Zusammensetzung und Eigenschaften der Gruppen

Zu dieser Studie gehören 101 Teilnehmer, die in zwei Gruppen eingeteilt wurden:

1. Zur Patientengruppe gehören 43 Patienten mit nachgewiesener Phenylketonurie (PKU). Eingeschlossen wurden Patienten im Alter zwischen 18 und 38 Jahren. Der Grund für die Altersbegrenzung bis 38 Jahren liegt darin, dass die PKU bereits bei Geburt mit Sicherheit durch das oben beschriebene Geburtsscreening festgestellt wurde. Folglich wurde so sichergestellt, dass diese Patienten bereits mit Geburt die o. g. spezielle - Diät erhielten. Zur Überwachung der Stoffwechsellage stellen sich die Patienten vom Zeitpunkt der Diagnose regelmäßig in der Charité – Campus Virchow – Klinikum vor. Anfangs noch in der Kinderklinik, werden die Patienten im Erwachsenenalter im Interdisziplinären Stoffwechsellzentrum in einer Spezialprechstunde regelmäßig gesehen und die Diät an die aktuelle Stoffwechselsituation angepasst.
2. Die Kontrollgruppe umfasst 58 gesunde Probanden im Alter zwischen 18 und 38 Jahren. Es wurde darauf geachtet, dass sich im Status keine Stoffwechselkrankheiten (z.B. PKU) befanden.

Zur Subgruppenanalyse und damit zur Untersuchung von Unterschieden zwischen Patienten, welche mit ω - Fettsäuren substituiert werden und Patienten ohne eine solche Substitution, wurden die 43 Patienten in zwei Gruppen eingeteilt:

1. In der „Substitutionsgruppe“ nahmen 18 Patienten teil. Diese Patienten erhielten zur ihrer entsprechenden Diät spezielle Produkte die eine Gemisch mit ω - Fettsäuren enthielten
2. In der „Nichtsubstitutionsgruppe“ nahmen 25 Patienten teil. Diese Patienten erhielten nur ihre gewöhnliche Diät.

Generelle Ausschlusskriterien waren:

- Thrombozytenzahl $< 150 \times 10^3/\mu\text{l}$ oder $> 450 \times 10^3/\mu\text{l}$
- erhöhtes Blutungsrisiko
- Hämoglobin – Konzentration $< 8 \text{ g/dl}$
- positive Familien-/Eigenanamnese bezüglich Blutgerinnungsstörungen, Myeloproliferative Erkrankungen, Thrombopenien (z.B. medikamenteninduzierte Thrombopenien)
- Vorliegen einer malignen/konsumierenden Erkrankung
- andere Stoffwechselerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus)
- Einnahme von ADP – Antagonisten (z.B. Clopidogrel) oder anderen nicht – steroidalen Antiphlogistika (z.B. ASS), sowie die Heparin – Applikation 24h vor Studienbeginn

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin genehmigt. Alle Teilnehmer wurden über Inhalt und Zweck der Studie aufgeklärt und gaben dazu ihre schriftliche Einwilligung.

3.3 B-Mode Sonographie der Carotis

3.3.1 Blutdruckmessung

Vor den sonografischen Untersuchungen fand zunächst eine Messung des arteriellen Blutdruckes mit der Methode nach Riva-Rocci statt. Gemessen wurde hierbei in liegender Position und immer zwischen acht und zwölf Uhr. Die Größe der Blutdruckmanschette war zum jeweiligen Oberarmumfang angepasst.

3.3.2 Messung der Intima Media - Dicke (= IMT)

Die Messung der IMT ist ein anerkannter Surrogatmarker für die Feststellung arteriosklerotischer Wandveränderungen. Dabei gilt eine Erhöhung der IMT als direktes Frühzeichen für eine solche Wandveränderung. Ferner geht eine erhöhte IMT mit einem erhöhten Risiko für KHK einher [97] [98]. Werte $> 1 \text{ mm}$ sind bereits als pathologisch anzusehen. Zu beachten ist zudem, dass die IMT mit steigendem Alter linear zunimmt [99]. Die Messungen wurden mit einem Sonographiegerät durchgeführt, welches einen hochauflösenden 8 MHz linear 2D Scanner beinhaltet (System, Five, GE-Vingmed, Solingen, Deutschland). Die zu untersuchenden Personen lagen zur Messung in Rückenlage.

Zunächst wurde die Art. Carotis communis aufgesucht. Die IMT wurde 30 mm proximal der Carotisbifurkation gemessen, insofern keine kalzifizierende Plaques festzustellen waren. Bestimmt wurden 3 Messwerte, aus denen der Mittelwert für die IMT berechnet wurde. Die Bildaufnahmen wurden anschließend digital gespeichert. Zum Untersuchungszeitpunkt waren dem Untersucher die Befunde der durchflusszytometrischen Untersuchung unbekannt.

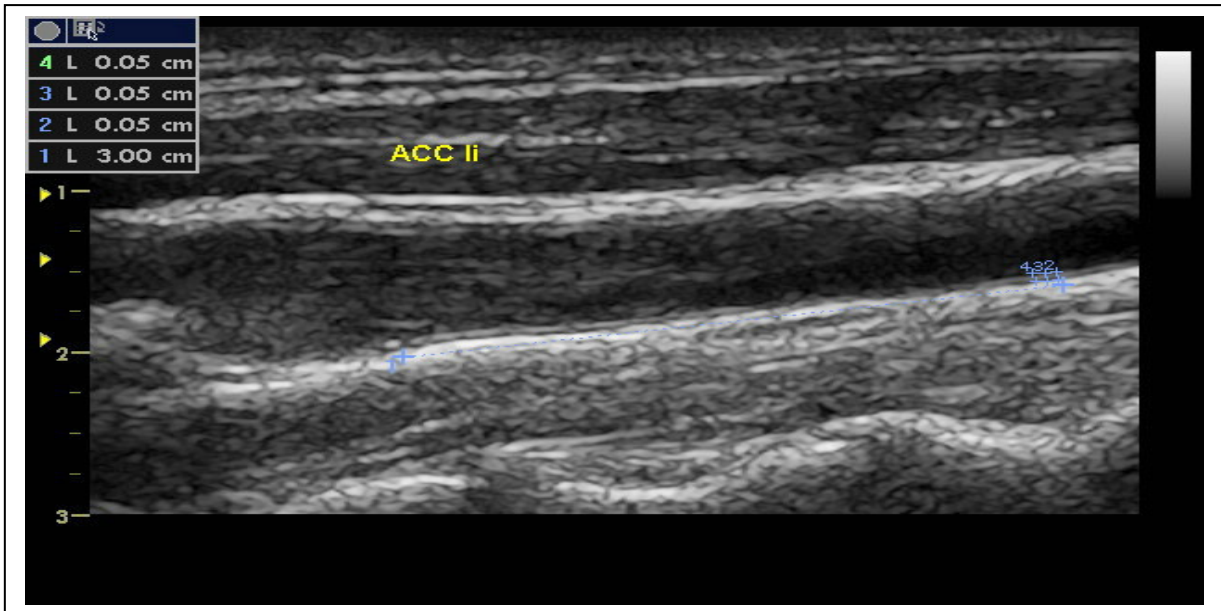


Abbildung 5 - Messung der IMT, 30 mm proximal der Carotisbifurkation. Die IMT stellt sich als echoreiche Struktur dar und lässt sich somit von den ihr umgebenen Strukturen abgrenzen.

3.3.3 Intraobserver

Zur Feststellung der Intraobserver Variabilität des Untersuchers, wurde die Untersuchung der Carotis – Sonographie beim gleichen Patienten in einer Zeitspanne von einem Monat zehnmal wiederholt. Es ergab sich eine errechnete Intraobservervariabilität von $0,03 \pm 0,02$ mm.

3.3.4 Messung der arteriellen Compliance

Das arterielle Gefäßsystem ist in der Lage aus einem intermittierenden Blutfluss, erzeugt durch die einzelnen Myokardkontraktionen, in einen kontinuierlichen Fluss umzuwandeln: Die großen Leitungsarterien speichern die vom Herzen ausgeworfene Ejektionsfraktion in der Systole und geben diese in der Diastole wieder ab. Diese Fähigkeit wird durch die elastisch – dynamische Eigenschaft der Arterien ermöglicht. Diese Eigenschaft wird mit dem Ausdruck der arteriellen Compliance beschrieben: Sonografisch wird die pulsatile Änderung des Gefäßdurchmessers (= diastolisch – systolische Diameterdifferenz) bestimmt. Mathematisch ist Compliance ein Verhältnis, das durch die Änderung in Querschnittsfläche, Volumen oder Durchmesser bezogen auf eine definierte Blutdruckänderungen beschrieben wird, was als Indices ausgedrückt werden kann [100].

3.3.4.1 Messung des β – Stiffness Index

In dieser Arbeit wurde der β – Stiffness als ein Index verwendet. Um den β – Stiffness Index zu berechnen ist es notwendig den systolischen und diastolischen Blutdruck, sowie den systolischen und diastolischen Diameter zu bestimmen. Der β – Stiffness errechnet sich dann nach folgender Formel:

	Psys.:	systolischer RR
	Pdias.:	diastolischer RR
	Dsys.:	systolischer Diameter
	Ddiast.:	diastolischer Diameter

$$\beta = \frac{\ln \frac{P_{sys.}}{P_{diast.}}}{\frac{D_{sys.} - D_{diast.}}{D_{diast.}}}$$

Abbildung 6 – Formel zur Berechnung des β – Stiffness Index. Notwendig ist die Bestimmung des systolischen und diastolischen Blutdruckes, sowie der systolischen und diastolischen Diameter.

Das Druck – Diameter Verhältnis stellt im Vergleich zweier verschieden großer Arterien grundsätzlich ein nicht – lineares Verhältnis dar. Die zu vergleichenden Gefäßwände erzeugen in einer Druck – Diameter Kurvendarstellung nicht-lineare Kurven. Um aber gerade einen quantitativen Vergleich zu ermöglichen ist ein lineares Verhältnis unerlässlich. Dies erreicht man durch eine halblogarithmische Darstellung, was in der Formel oben berücksichtigt wurde. In einer Druck – Diameter Kurve gibt also der β – Stiffness – Index die Steigung der Gerade nach halblogarithmischer Darstellung an: je höher der Index, desto höher ist der Druckunterschied um eine bestimmte Diameterzunahme zu erzeugen, desto steifer ist also das Gefäß. Zur Compliance - Bestimmung wurde der diastolische und systolische Diameter EKG – gesteuert im Längsschnitt in der Art. Carotis Communis sonografisch gemessen. Der diastolische Diameter wurde am Ende der Diastole, der systolische am Maximum der systolischen Diameterzunahme bestimmt.

3.3.4.2 Pulsalitätsindex

Neben dem β – Stiffness Index wurde ebenfalls der Pulsalitätsindex nach Gosling bestimmt. Der Pulsalitätsindex ermöglicht quantitative Aussagen über das Strömungsverhalten innerhalb eines arteriellen Gefäßes. Die Bestimmung des Pulsalitätsindex erfolgt mittels

Dopplersonographie. Bei der Dopplersonographie gibt der Schallkopf im Wechsel kurze Sendeimpulse und zwischen diesen dient derselbe als Empfänger. Der Sendeimpuls trifft in diesem Fall auf die korpuskulären Blutbestandteile wird reflektiert bzw. gestreut und vom Empfänger registriert. Daraus ergibt sich eine Laufzeit, als Maß für die Entfernung der reflektierenden korpuskulären Bestandteile vom Sender bzw. der Annäherung. Es kommt bei der zurückgesendeten Schallstrahlung zu einer Frequenzverschiebung (= Doppler – Verschiebefrequenz) durch die korpuskulären Blutbestandteile: Je größer die Differenz zwischen gesendeter und zurück gestreuter Frequenz ist, desto größer ist die Fließgeschwindigkeit in diesem Fall der korpuskulären Blutbestandteile. Nach folgender Gleichung erfolgt die Berechnung dieser Frequenz:

$$\Delta f = \frac{2 * v * f_0 * \cos \alpha}{c}$$

v = Strömungsgeschwindigkeit des Blutes (cm /s)

f_0 = Mittelwert der Sendefrequenz (Hz)

$\cos \alpha$ = Beschallungswinkel

c = Schallgeschwindigkeit im Gewebe (cm /s)

Δf = Frequenzverschiebung in HZ (Dopplerfrequenz)

Formel gilt für die Verfahren mit kontinuierlicher und mit gepulster Schallaussendung

Die Frequenzverschiebung ist ebenfalls akustisch und auch optisch darstellbar.

Die Bestimmung des Pulsalitätsindex ist unabhängig vom Einstrahlwinkel. Sie betrachtet die Kurve der maximalen Geschwindigkeit. Die Berechnung des Pulsalitätsindex erfolgt über folgende Formel:

$$PI = \frac{\text{maximale systolische Dopplerfrequenz} - \text{maximale enddiastolische Dopplerfrequenz}}{\text{Mittlere Maximalfrequenz eines gesamten Pulszyklus}}$$

Poststenotisch vermindert sich der Index.

3.4 Durchflusszytometrie

3.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Thrombozyten spielen wie bereits beschrieben eine Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose. Aus diesem Grund sollte in diesem Zusammenhang der Funktionszustand von Thrombozyten in dieser Studie untersucht werden. Die Durchflusszytometrie in Kombination mit spezifischen monoklonalen Antikörper ermöglicht die Analyse der Oberflächendichte von thrombozytären Membranglykoproteinen und somit eine Beurteilung des Aktivierungszustand der Blutplättchen [101] [102] [103]. Das Durchflusszytometer besteht aus einer Messeinheit (FACScan), welche aus einem Flüssigkeitssystem (Zufuhr der Zellen) mit Probenansaugvorrichtung, Durchflusszelle, Laserlichtquelle, Sammeloptiken, Lichtverstärker, Sortiergerät und einer Auswerteinheit besteht. Angesaugt über eine Kapillare in eine Meßküvette, gelangen die Zellen einzeln auf einen definierten Weg an einen fokussiertem Laserstrahl (Argonlaser, 488 nm). In Abhängigkeit ihres Zelltyps und der Probenvorbereitung (Einsatz von Immunfluoreszenzen) entstehen charakteristische Lichtstreuphänomene, welche dann mittels Detektoren nachgewiesen werden können. Bestimmt wird das Ausmaß der Vorwärtsstreuung (Forward Scatter, FSC) und der Seitwärtsstreuung (Side – Scatter SSC) des Laserlichtes. Dabei ist das Ausmaß der Vorwärtsstreuung proportional zur Zellgröße; die Seitwärtsstreuung bestimmt die Zellgranularität. Die Bestimmung dieser beiden Eigenschaften ermöglicht die Unterscheidung der Thrombozyten von anderen Zellen einer Vollblutprobe. Weitere Eigenschaften können ermittelt werden, indem die zu untersuchenden Zellen zuvor mit fluoreszierenden, monoklonalen Antikörpern und Farbstoffen inkubiert wurden. Nach Anregung durch den Laserstrahl senden diese so ein Licht spezifischer Wellenlänge aus, was schließlich auch wieder mittels Detektoren registriert werden kann. In Abhängigkeit mit der jeweiligen Stärke des Fluoreszenzsignals können quantitative Aussagen zu den untersuchten thrombozytären Strukturen getroffen werden. In dieser Arbeit wurde zur durchflusszytometrischen Messung ein „FACScan“ –Durchflusszytometer (Argonlaser, 488 nm fluoreszenzanregende Wellenlänge) der Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) verwendet.

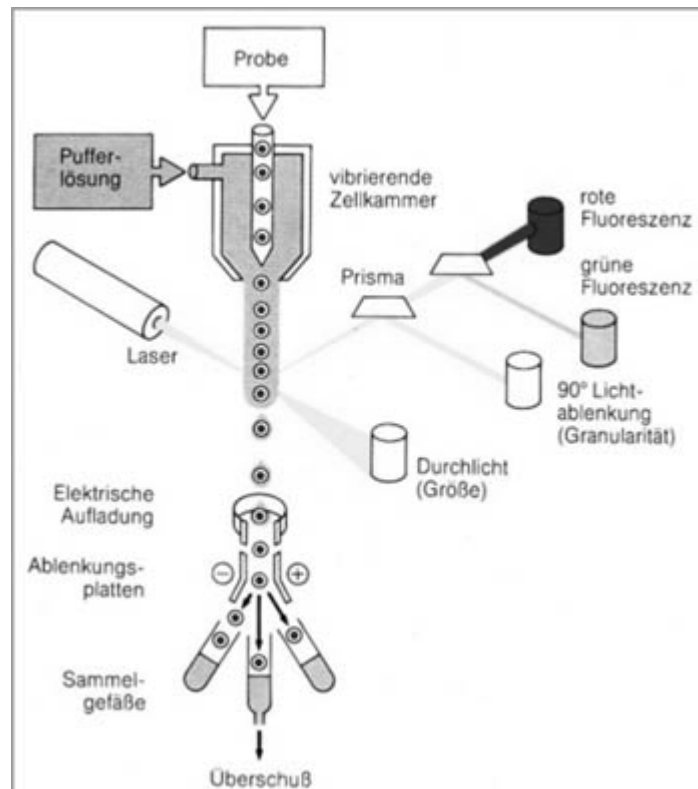


Abbildung 7 - Durchflusszytometrie – Prinzip: In Abhängigkeit ihres Zelltyps und der Probenvorbereitung (Einsatz von Immunfluoreszenzen) entstehen charakteristische Lichtstreuophänomene, welche dann mittels Detektoren nachgewiesen werden können. Bestimmt wird das Ausmaß der Vorwärtsstreuung (Forward Scatter, FSC = proportional zur Zellgröße) und der Seitwärtsstreuung (Side – Scatter SSC = Zellgranularität) des Laserlichtes. (aus: http://www1.medizin.uni-halle.de/imi/pages/zytometrie_fac.php?lang=).

3.4.2 Probengewinnung

Ziel ist die möglichst artefaktfreie Herstellung einer Vollblutprobe: Die Aktivität der Thrombozyten in der gewonnenen Probe sollte möglichst ein Abbild der Thrombozytenaktivierung in vivo sein. Zur Vorbereitung wurde zunächst ein Falcon – Röhren (BD Falcon™, Becton-Dickinson, Heidelberg Deutschland) mit 1 ml der Stabilisierungslösung Cyfix II gefüllt. Dann erfolgt die Blutentnahme bei mäßiger Stauung durch Punktion einer Unterarmvene mittels einem 19 G – Butterfly. Die ersten 3 ml Blut wurden verworfen. Im Anschluss wurden 0,5 ml Vollblut direkt nach Entnahme in das Falcon – Röhren gegeben. Nach zehnminütiger Inkubation wurde die Probe mit 48,5 ml PBS (phosphate buffered saline, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verdünnt und die Fixation durch das Cyfix II beendet. Die so hergestellten Blutproben sind für mindestens 24 Stunden lagerungsstabil und führen zu keiner messbaren in vitro Aktivierung der Thrombozyten [104]. Es war daher möglich den zum Abnahmezeitpunkt bestehenden Status der Thrombozytenaktivierung zu bestimmen. Um die Thrombozytenzahl bestimmen zu können, wurden zusätzlich 5 ml Blut in einer EDTA (Äthylen-diamin-tetra-Essigsäure)- Monovette

gegeben. Die Blutbildbestimmung führte dann das Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Charité durch.

3.4.3 Probenkonservierung

Wie bereits erwähnt wurde Cyfix II als Fixierlösung in dieser Studie verwendet. Cyfix II enthält Methacrolein und konserviert Thrombozyten und Interaktionen von Thrombozyten mit anderen Zellen für durchflusszytometrische Untersuchungen. Eine artifizielle Aktivierung kann hierbei nahezu ausgeschlossen werden. Bereitgestellt wurde die in dieser Arbeit verwendete Lösung freundlicherweise von Herrn Dr. Andreas Ruf, Karlsruhe, Deutschland.

3.4.4 Markierung der Thrombozyten – Zweifachfärbung

Zur weiteren Verarbeitung der gewonnenen Blutproben wurde eine so genannte Zweifachfärbung durchgeführt. Bei dieser Färbung wird die Blutprobe mit zwei verschiedenen Antikörpern inkubiert. Der erste Antikörper (CD 42b), war mit Phycoerythrin (PE) markiert und diente dabei der Thrombozytenidentifikation. Mit Hilfe des zweiten Antikörpers, der FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) sollen dagegen aktivierungsabhängige thrombozytäre Membranglykoproteine nachgewiesen werden.

3.4.4.1 Identifikation der Thrombozyten

Der erste Antikörper (CD 42b – PE) wurde stets zu jedem Ansatz gegeben und diente wie bereits erwähnt der eindeutigen Identifikation der Thrombozyten von anderen Blutzellen einer Vollblutprobe. Der CD 42b-PE Antikörper bindet selektiv an die Ib - Untereinheit des GP Ib-V-IX Komplexes des Thrombozyten. Der GP Ib-V-IX Komplex (von Willbrand-Faktor Rezeptor) ist wie bereits erwähnt, ein spezifischer Rezeptor auf der thrombozytären Oberfläche. Die Rezeptordichte ist abhängig von der Thrombozytenaktivierung. Die Rezeptordichte nimmt mit einer erhöhten Aktivität ab.

3.4.4.2 Markierung des GPIIb-IIIa Komplexes

Der GPIIbIIIa Komplex gehört zu den Adhäsionsrezeptoren (Integrine) und besteht aus einer α -IIb-Kette (= GPIIb) und einer β 3 - Integrin Kette. Dieser Rezeptorkomplex ist wie schon erwähnt nur auf der thrombozytären Oberfläche und auf Megakaryozyten zu finden. Er ist quantitativ der häufigste Rezeptor. Zum Nachweis der Oberflächenexpression der β 3-Kette verwendeten wir den Antikörper anti-CD41. Die Oberflächenexpression der α IIb - Kette wurde dagegen mit dem Antikörper anti-CD61 nachgewiesen. Zur Einschätzung des Aktivitätszustandes des Rezeptors wurde in dieser Studie der Antikörper PAC-1 eingesetzt,

welcher nur an den aktivierten hochaffinen Fibrinogenrezeptor bindet. Der Antikörper erkennt dabei die RGD – Erkennungssequenz (= Fibrinogenbindungsstelle), die nach der Konformationsänderung bei Aktivierung entsteht. Eine Bindung ist nur dann möglich, wenn die Bindungsstelle nicht bereits von Fibrinogen besetzt wurde. Innerhalb von Thrombozyten befindet sich ein Rezeptorenpool u.a. in den α - Granula (siehe unten). So führt eine Thrombozytenaktivierung zu einer Degranulation der α - Granula und in Folge dieser Degranulation kommt es zu einer vermehrten Expression des GPIIb-IIIa Rezeptorenkomplexes. Neben zahlreichen weiteren adhäsiven Proteinen bindet wie bereits erwähnt auch Fibrinogen an den GPIIb-IIIa Rezeptorenkomplex. Dies führt schließlich zu einer Thrombozytenvernetzung und schließlich zu einer Thrombozytenaggregation.

3.4.5 Degranulationsmarker

Grundsätzlich finden sich in den Thrombozyten 3 Granulatypen (s.o.). Es handelt sich dabei um die α – Granula, den Lysosomen und den so genannten dichten Granula mit jeweils den oben beschriebenen Inhaltsstoffen. Nach der Thrombozytenaktivierung gelangen die Granula an die Thrombozytenoberfläche und setzen ihre jeweils spezifischen Inhaltsstoffe durch Exocytose frei. Diesen Vorgang wird als Degranulation bezeichnet und kann durch spezifische Marker jeweils nachgewiesen werden. Dieser Nachweis ermöglicht Aussagen zur Thrombozytenaktivierung: Eine erhöhte Bindung ist ein Hinweis für eine Thrombozytenaktivierung. In dieser Arbeit wurden die α - Granula und Lysosomen näher untersucht.

3.4.5.1 α – Granula

Mit einem Gesamtanteil von 15% des Plättchenvolumens kommen α – Granula innerhalb von Thrombozyten vor. Sie speichern u.a. Fibrinogen, Thrombospondin, GP IIb-IIIa, sowie P-Selektin. Beteiligt sind α – Granula aus diesem Grund an der Thrombozytenaggregation und Zellinteraktion zwischen Thrombozyten und anderen Zellen, sowie der Gerinnung, Fibrinolyse sowie Entzündungs- und Immunreaktionen [105]. Als Degranulationsmarker für α - Granula wurde anti- CD62P eingesetzt. Dieser Antikörper ist in der Lage P-Selektin an der thrombozytären Oberfläche nachzuweisen. P-Selektin ist grundsätzlich auch auf ruhenden Thrombozyten zu finden, aber in einer geringeren Anzahl (<1.000). Nach Stimulation der Thrombozyten kommt es zur Exocytose der α - Granula und zur Abgabe ihres Inhaltes in die Extrazellularräume mit der Folge, dass vermehrt P-Selektin- Proteine (bis 10.000) auf der Thrombozytenoberfläche zu finden sind [70].

3.4.5.2 Lysosomen

Lysosomen gehören ebenfalls zu den thrombozytären, intrazellulären Zellorganellen. Sie speichern u.a. Hydrolasen (s.o.). Nach Aktivierung des Thrombozyten kommt es zu einer Expression von intralysosomalen Membranproteinen auf der Thrombozytenoberfläche. Der benötigte Stimulus hierzu muss stärker sein als zur Stimulation der anderen Granulatypen. Drei der intralysosomalen Membranproteine sind detaillierter untersucht: LIMP-CD63, Lamp-1 und Lamp-2 [106]. GP 53 ist ein Membranglykoprotein, welches sich in ruhenden Zellen nahezu ausschließlich in den Lysosomen befindet. Nach Thrombozytenaktivierung gelangt es durch die Exocytose auf die Oberfläche von Thrombozyten. Ein Nachweis dieses Glykoproteins ist somit ebenfalls ein Nachweis vermehrter Thrombozytenaktivierung. Mit Hilfe des Antikörpers anti-CD63 ist der Nachweis von GP53 auf der Thrombozytenoberfläche möglich. Der Antikörper ist damit zum Nachweis einer Thrombozytenaktivierung verwendbar [107].

3.4.6 CD154 – Induktion von Inflammation

Des Weiteren erfolgte der Nachweis des Rezeptor CD154 (CD40L), einem Protein der TNF – Familie. Passende Liganden des Rezeptors sind u.a. auf Endothelzellen und Makrophagen nachzuweisen. Kommt es zu einer Bindung zwischen CD154 und Endothelzellen, werden IL-8 und MCP-1 ausgeschüttet. Dies verursacht eine Chemotaxis von Leukozyten und Neutrophilen. Außerdem erfolgt ebenfalls eine Exprimierung von Adhäsionsmolekülen. Über diesen Signalweg können Thrombozyten inflammatorisch auf die Gefäßwand wirken. Zum Nachweis dieses Rezeptors wurde in dieser Studie der Antikörper anti-CD40L verwendet.

3.4.7 Verwendete monoklonale Antikörper

Im Folgenden sind noch einmal die verwendeten Antikörper, das Fluochrom und der jeweilige Hersteller aufgeführt.

Antikörper	Fluochrom	Hersteller
CD42b	PE ¹	Immunotech, Marseille, Frankreich
IgG	FITC ²	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD41	FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD62P	FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD63	FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD61	FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD40L	FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich

PAC1 FITC Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland

¹Phycoerytrin, ²Fluoscein-Isothiocyanat

Tabelle 5 – Liste der verwendeten Antikörper, das Fluochrom und der Hersteller.

3.4.8 Probenverarbeitung und Durchführung

Jede gewonnene Probe wurde mit den erwähnten, insgesamt sieben Antikörpern nach folgendem Schema gefärbt:

Ansatz	Erster Antikörper	Zweiter Antikörper	Eigenschaft /Oberflächenantigen des Zweiten Antikörpers
1	anti – CD42b	5 µl IgG	keine Spezifität
2	anti – CD42b	5 µl CD41	aIIb-Kette (GPIIb-IIIa)
3	anti – CD42b	5 µl CD62P	P-Selektin
4	anti – CD42b	5 µl CD63	GP53 (lysosomales Membranprotein)
5	anti – CD42b	5 µl PAC-1	Bindung an aktivierten GPIIb-IIIa Rezeptor
6	anti – CD42b	5 µl CD61	β3-Kette (GPIIb-IIIa)
7	anti – CD42b	1 µl CD40L+4 µl PBS ³	CD40L (TNF-Familien Protein)

¹ PBS (Phosphate buffered saline, Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Tabelle 6 – Schema zur Färbung der jeweiligen Probe.

Zunächst wurden FACS - Rörchen (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) dem Ansatz entsprechend beschriftet und mit 5 µl CD42b-PE mittels Eppendorfpipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) befüllt. Anschließend wurde dann nach dem folgendem Schema die Ansätze um die entsprechenden Antikörper ergänzt. In jeder Ansatzserie war stets eine isotypische Negativkontrolle mit FITC – markierten unspezifischen Maus-IgG1-Antikörper wie im Schema angegeben vorhanden. Zu allen Ansätzen wurden nun 40 µl Vollblut (Cyfix II stabilisiert s.o.) gegeben. Bei Raumluft und unter Lichtausschluss erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten. Die Antikörperbindung wurde danach durch Zugabe von 500 µl einer 0,2% - igen Para-Formaldehyd-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gestoppt. Die Probe ist nun für zwei Tage bei Kühlung konserviert.

3.4.9 Messung

In dieser Arbeit wurde zur durchflusszytometrischen Messung ein „FACScan“ – Argonlaser - Durchflusszytometer (488 nm fluoreszenzanregende Wellenlänge) der Fa. Becton Dickinson

(Heidelberg, Deutschland) verwendet. Vor Beginn der eigentlichen Messung fand zunächst eine Eichung des Geräts mit Standard – Fluoreszenz - Mikrobead (CaliBRITE[®], Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) statt. Die Datenauswertung erfolgte mit der Software „FACScan“ (Fa. Becton - Dieckenson, Heidelberg, Deutschland). Die Messungen wurden grundsätzlich mit niedrigster Flussrate durchgeführt, denn bei hohen Flussraten besteht die Möglichkeit, dass sich Erythrozyten zur selben Zeit wie Thrombozyten am Analysepunkt befinden [108]. Dies würde zur Verfälschung der Messwerte führen. Bei jeder Messung erfolgte die Zählung von 5.000 Zellen, bei einer Rate von 100-200 Ereignissen pro Sekunde.

3.4.10 Darstellung der Messung

In durchflusszytometrischen Untersuchung ist das Ausmaß der Vorwärtsstreuung (FSC) proportional zur Zellgröße; die Seitwärtsstreuung (SSC) bestimmt die Zellgranularität. Aufgrund der Bestimmung dieser Eigenschaften ist eine Identifikation von Thrombozyten einer Vollblutprobe möglich. In der Zweiparameter-Darstellung (Dot-Plot) kann dies dargestellt werden.

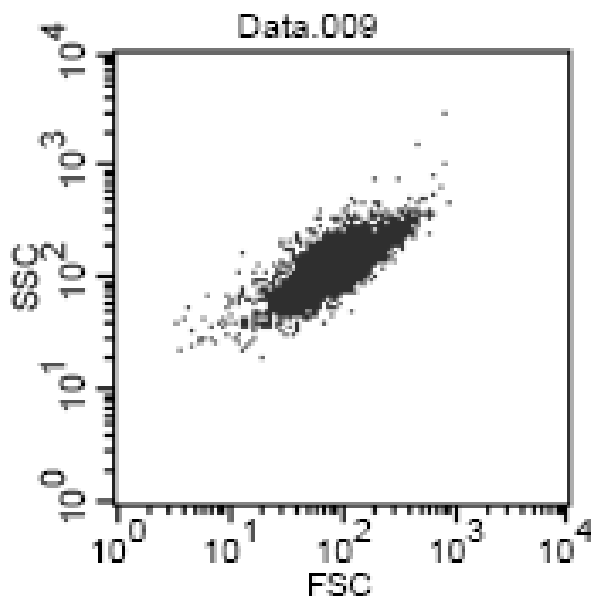


Abbildung 8 - Zweiparameter Darstellung (Dot – Plot) von Thrombozyten einer Vollblutprobe.

In dieser Studie sollen ausschließlich Aussagen über Eigenschaften von Thrombozyten gemacht werden. Aus diesem Grund muss die Thrombozytenpopulation vor der eigentlichen durchflusszytometrischen Messung ausgewählt werden. Dazu wird die Thrombozyten –

Population mit einem Rahmen umgrenzt, was dann als Gating bezeichnet wird.

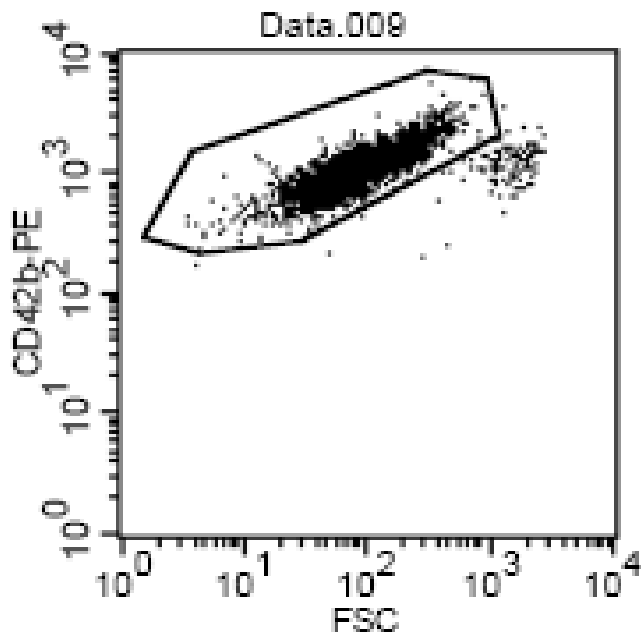


Abbildung 9 - Die obere Population repräsentiert Thrombozyten (CD 42b – PE positiv, eindeutig selektierte Thrombozyten), dagegen repräsentiert die untere Population Erythrozyten, Leukozyten und assoziierte Thrombozyten.

Nachfolgend wurde dann zur eigentlichen Thrombozyten – Analyse 5000 gefärbte Thrombozyten herangezogen und zwar exakt aus dem oben beschriebenen, umrahmten Bereich. So konnten von diesen hiernach die Eigenschaften bezüglich anderer Fluoreszenzen bestimmt werden. Nach diesem Muster wurden dann die verschiedenen Ansätze mit den jeweiligen verwendeten Antikörper (isotypische Negativkontrolle mit Maus – IgG - Antikörper, CD41, CD61, PAC1, CD62p, CD63, CD40L) nacheinander analysiert.

3.4.11 Auswertung

Zur Auswertung wurden nach der erwähnten Thrombozytenanalyse in einem Dot – Plot zwei Fluoreszenzen gegeneinander aufgetragen. Diese Darstellung ermöglicht nun die Untersuchung in Bezug auf die thrombozytären Membranglykoproteine einer stattgefundenen Degranulation.

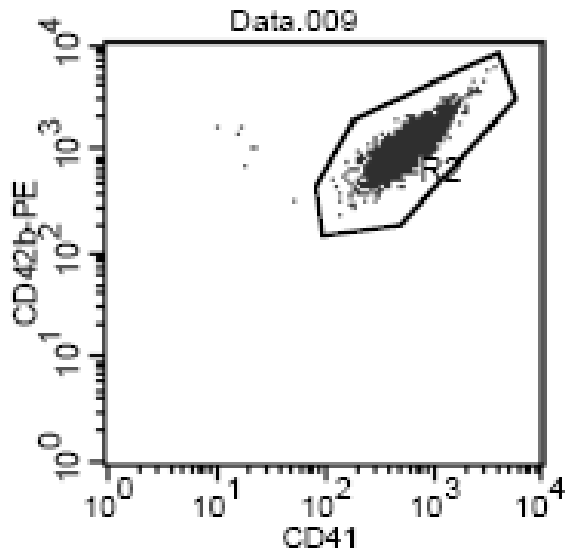


Abbildung 10 – Histogramm - Darstellung zur Untersuchung von Membranglykoproteinen auf der Thrombozytenoberfläche bzw. Degranulation. Hier die Darstellung der CD41 Expression gegen CD42b.

Die quantitative Darstellung der gemessenen FITC – Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Histogramms (Einparameter – Darstellung) vorgenommen. Hierbei wird die Fluoreszenzstärke (X – Achse) gegen die Ereignishäufigkeit (Y – Achse) aufgetragen. Die Intensität der Ereignisse stellt sich ähnlich einer Gauß’schen Verteilungskurve dar.

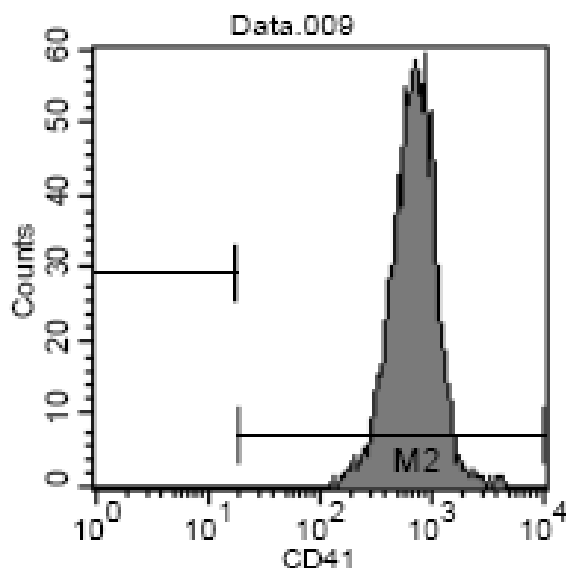


Abbildung 11 - Einparameter – Darstellung zur quantitativen Auswertung – Fluoreszenzstärke als logarithmische Darstellung auf der X – Achse gegen die Ereignishäufigkeit auf der Y – Achse.

Die „FACScan“ - Softwareprogramm errechnet nun den Mittelwert der gemessenen Fluoreszenz (= MIF = mean intensity of fluorescence), sowie die den Prozentsatz

antikörperpositiver Thrombozyten (% positive Thrombozyten). Bei Antigenen, die auch auf ruhenden Thrombozyten vorkommen wie CD42b, CD41, CD61, verwendeten wir die relative mittlere Immunfluoreszenz (MIF = mean intensity of fluorescence) zur quantitativen Beschreibung der Antikörperbindung. Die Glykoproteine CD 62P, PAC1, CD63, CD40L werden ausschließlich auf aktivierten Thrombozytenoberflächen exponiert. Für diese Antikörper diente uns der Prozentsatz Antikörper positiver Thrombozyten als Maß der Antigen – Oberflächenexpression (Abbildung 12).

Histogram Statistics

File: Data.005	Log Data Units: Linear Values
Sample ID: [REDACTED]	Patient ID:
Patient Name:	Case Number:
Acquisition Date: 20-Oct-5	Gate: G2
Gated Events: 4928	Total Events: 5000
X Parameter: FL1-H PAC1 (Log)	

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Median	Peak Ch
All	1, 9910	4928	100.00	98.56	4.75	3.65	1
M1	1, 17	4898	99.39	97.96	3.97	3.65	1
M2	19, 9910	29	0.59	0.58	136.09	80.58	378

Abbildung 12 - Tabellarische Darstellung als Beispiel die Darstellung der PAC 1 – positiven Thrombozytenpopulation (% Total)

3.5 Bestimmung der Fettsäuren

Die Bestimmung der einzelnen Fettsäuren erfolgte nach der Methode von Morrison und Smith (1964), modifiziert nach Eder et al. (1991). Sie erfolgte im Serum und im Lipidextrakt der Erythrozytenmembran. Der Lipidextrakt wurde in einen Schüttelinkubator nach der Methode von Hara und Radin (1978), modifiziert nach Eder und Kirchgasser (1993), bearbeitet. Die letztendliche Analyse fand schließlich im Institut für Ernährungswissenschaften der landwirtschaftlichen Fakultät der Martin – Luther – Universität Halle – Wittenberg statt. Sie wurde uns freundlicherweise vom Interdisziplinären Stoffwechsel - Zentrum der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie der Charité – Universitätsmedizin Campus Virchow – Klinikum zu Verfügung gestellt.

3.6 Statistik

Der Kolmogorov - Smirnov Test ergab, dass die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung keiner Gauß'schen Normalverteilung entsprach. Aus diesem Grund wurden nicht - parametrische Testverfahren angewandt. Unter Berücksichtigung einer zweiseitigen Fragestellung wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p) mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ als hochsignifikant gewertet

wurde. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Nutzung des Statistikprogramms SPSS 10.0 Windows. Im Einzelnen wurden folgende statistische Berechnungen durchgeführt:

1. Bestimmung der klinischen Daten in Mittelwerten, Standardabweichungen, Standardfehler des Mittelwertes, absolute und relative Häufigkeiten.
2. Im statistischen Vergleich der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung wurde die 25igste Perzentile, der Median und die 75igste Perzentile verwendet.
3. Durchführung des Mann - Whitney - U Tests für unverbundene Stichproben zur Feststellung von Unterschieden zwischen Patienten- und Kontrollgruppe, sowie im Vergleich zwischen der nicht - substituierten Patientengruppe und substituierter Gruppe.
4. Binäre Korrelationsberechnung nach Pearson zur Prüfung der Zusammenhänge der Aktivität der Thrombozyten mit verschiedenen Einflussfaktoren.

4 Ergebnisse

4.2 Vergleich der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe

4.2.1 Demographische Charakteristika

Bei Betrachtung der Ergebnisse soll zunächst auf die demographischen Daten eingegangen werden. Im Rahmen dieser Studie wurde 43 Patienten mit manifester PKU untersucht, darunter waren 21 (48.8 %) weibliche und 22 (51.2 %) männliche Patienten. In der Kontrollgruppe waren 58 Personen eingeschlossen, 39 (67.2 %) weiblichen und 19 (32.76 %) männlichen Geschlechts. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 28.07 ± 0.96 Jahre im Vergleich zum Durchschnittsalter der Kontrollgruppe mit 26.22 ± 0.5 Jahren. In der Patientengruppe war der Raucheranteil mit 8 (18.6 %) im Vergleich zum Raucheranteil in der Kontrollgruppe mit 14 (24.14 %) niedriger. Der durchschnittliche mittlere Blutdruck lag bei 97.32 ± 1.74 mmHg in der Patientengruppe, in der Kontrollgruppe lag dieser bei 94.55 ± 1.20 mmHg.

Der BMI betrug innerhalb der PKU – Patientengruppe durchschnittlich 24.30 ± 0.69 kg/m² im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der dieser bei 21.96 ± 0.31 kg/m² lag. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von $p = 0.009$ in diesem Vergleich. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die demographischen Daten der untersuchten Gruppen.

	PKU (n=43)	Kontrollgruppe (n=58)	p value ³
Frauen, n (%)	21 (48.8)	39 (67.2)	0.064
Alter (yr) ¹ , \pm SEM ²	28.07 (\pm 0.96)	26.22 (\pm 0.5)	0.434
Raucher, n (%)	8 (18.6)	14 (24.14)	0.546
mittlerer Blutdruck (mmHg), \pm SEM	97.32 (\pm 1.74)	94.55 (\pm 1.20)	0.189
BMI (kg/m ²), \pm SEM	24.30 (\pm 0.69)	21,96 (\pm 0,31)	0.009

¹Mittelwert ² \pm Standardfehler des Mittelwertes; ³ $p < 0.05$

Tabelle 7 – Demographische Daten der Populationen.

4.2.2 Labordaten

Des Weiteren wurden die Labordaten der beiden Gruppen miteinander verglichen. Eine Übersicht hierzu gibt die folgenden Tabelle:

	PKU (n=43)	Kontrollgruppe (n=58)	p value ³
Thrombozyten (nl) ± SEM	255.125 ¹ (± 10.20) ²	239.464 (±6.68)	0.167
Leukozyten (nl) ± SEM	6.808 (± 0.34)	5.925 (±0.23)	0.031
Kreatinin (mg/dl) ± SEM	0.77 (± 0.04)	n.b.	./.
Gesamt – Cholesterin (mg/dl) ± SEM	160 (± 4.8)	168 (± 4.26)	0.167
• HDL (mg/dl) ± SEM	51.75 (± 2.43)	63.11 (± 2.23)	0.003
• LDL (mg/dl) ± SEM	84.25 (± 4.23)	89.96 (± 3.79)	0.374
Triglyceride (mg/dl) ± SEM	108.68 (± 8.9)	88.21 (± 5.34)	0.017

¹Mittelwert ²± Standardfehler des Mittelwertes; ³ p < 0.05

Tabelle 8 - Labordaten der Populationen.

Die durchschnittliche Thrombozyten – Zahl war in beiden Gruppen nicht unterschiedlich und lag in der PKU – Gruppe bei 255.125 ± 10.20 /nl und in der Kontrollgruppe bei 239.464 ± 6.68 /nl. Hinsichtlich der Leukozytenzahl zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p= 0.031$). Dieser lag mit 6.808 ± 0.34 /nl höher in der Patientenkohorte im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der die durchschnittliche Leukozytenzahl 5.925 ± 0.23 /nl betrug. Das durchschnittliche Gesamtcholesterin war vergleichbar und beträgt in der PKU – Gruppe 160 ± 4.8 mg/dl, in der Kontrollgruppe 168 ± 4.26 mg/dl. Das durchschnittliche HDL – Cholesterin war jedoch in der Patientengruppe mit einem Wert von 51.75 ± 2.43 mg/dl signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (63.11 ± 2.23 mg/dl) mit einem Signifikanzniveau von 0.003. Das durchschnittliche LDL – Cholesterin lag bei 84.25 ± 4.23 mg/dl innerhalb der Patientengruppe und bei 89.96 ± 3.79 mg/dl in der Kontrollgruppe.

Der durchschnittliche Triglycerid - Wert lag mit 108.68 ± 8.9 mg/dl höher im Vergleich zum Kontrollkollektiv, wo der durchschnittliche Wert bei 88.21 ± 5.34 mg/dl ($p=0,017$) lag.

4.2.3 Messergebnisse der Carotis B-Mode Sonographie

Mittels der Carotis B-Mode Sonographie wurden die Intima – Media Dicke (IMT), der β - Stiffness Index (Stiffness) und der Pulsalitätsindex (PI) der Art. Carotis Communis (ACC) zwischen den Gruppen verglichen. Betrachtet werden soll hierbei der durchschnittliche Gesamtmittelwert. IMT, Stiffness und PI wurden jeweils in der linken und rechten ACC gemessen. Hieraus wurde ein Mittelwert gebildet. Die durchschnittliche Intima media Dicke unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Der durchschnittliche Wert lag bei 0.44 ± 0.01 mm in beiden Gruppen. Der durchschnittliche gemessene β – Stiffness – Index lag in der PKU Gruppe bei 4.44 ± 0.37 , in der Kontrollkohorte lag dieser Wert bei $4,40 \pm 0.31$. Im Vergleich unterschieden sich die bestimmten Pulsalitätsindizes zwischen der Kontrollgruppe und der PKU – Gruppe nicht signifikant. Der durchschnittliche Wert lag hierbei in der Patientenkohorte bei 1.92 ± 0.1 . In der Kontrollgruppe lag der Vergleichswert bei $2.20 \pm 0,06$.

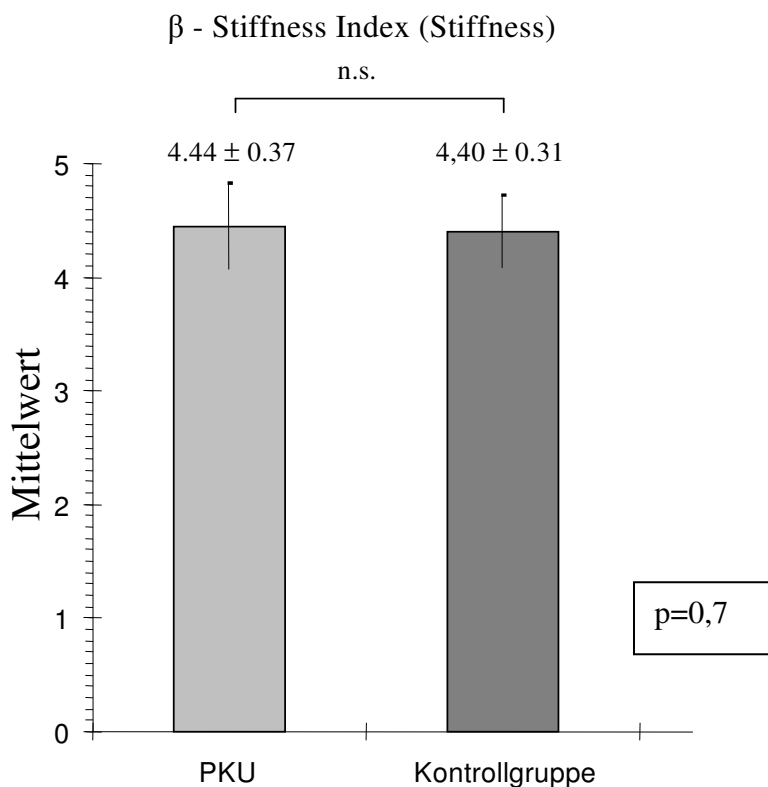


Abbildung 13: Balkendiagramm - Der durchschnittliche gemessene β – Stiffness – Index lag in der PKU Gruppe bei 4.44 ± 0.37 , in der Kontrollkohorte lag dieser Wert bei $4,40 \pm 0.31$.

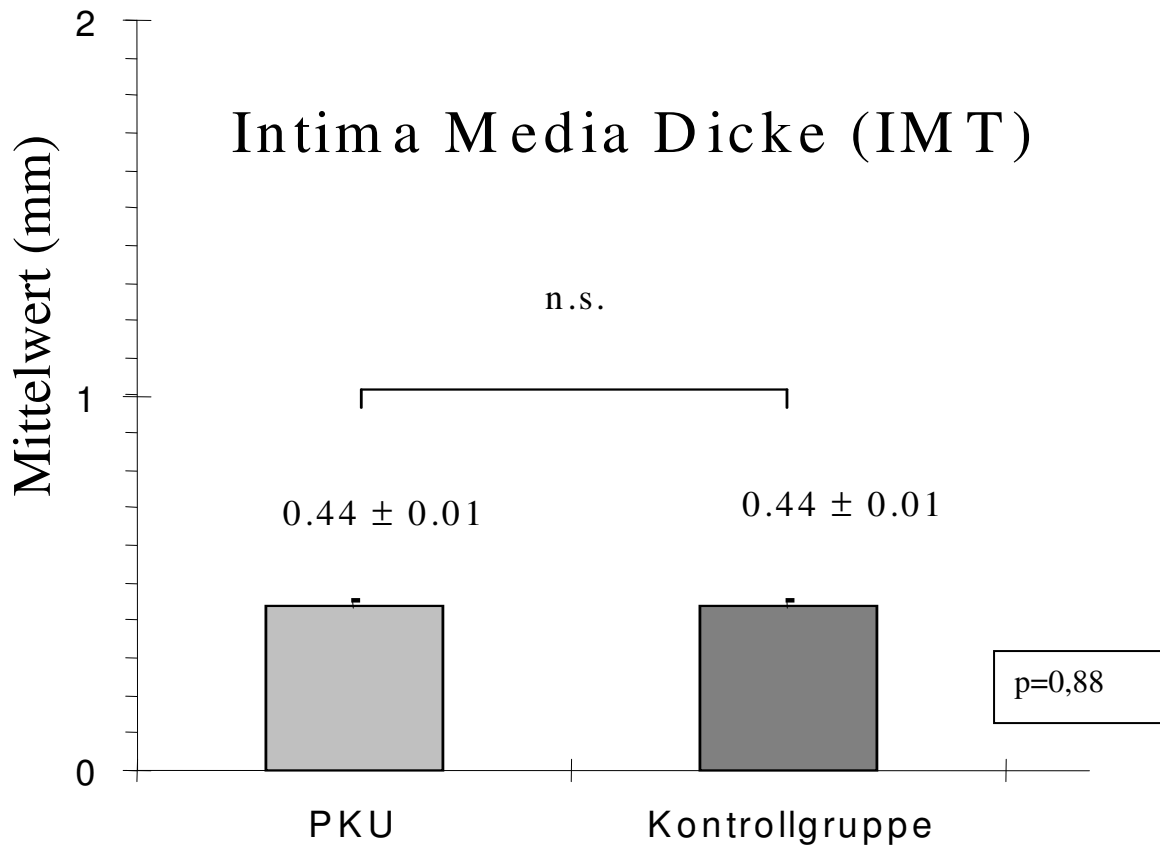


Abbildung 14: Balkendiagramm - Der durchschnittliche IMT - Wert lag bei 0.44 ± 0.01 mm in beiden Gruppen.

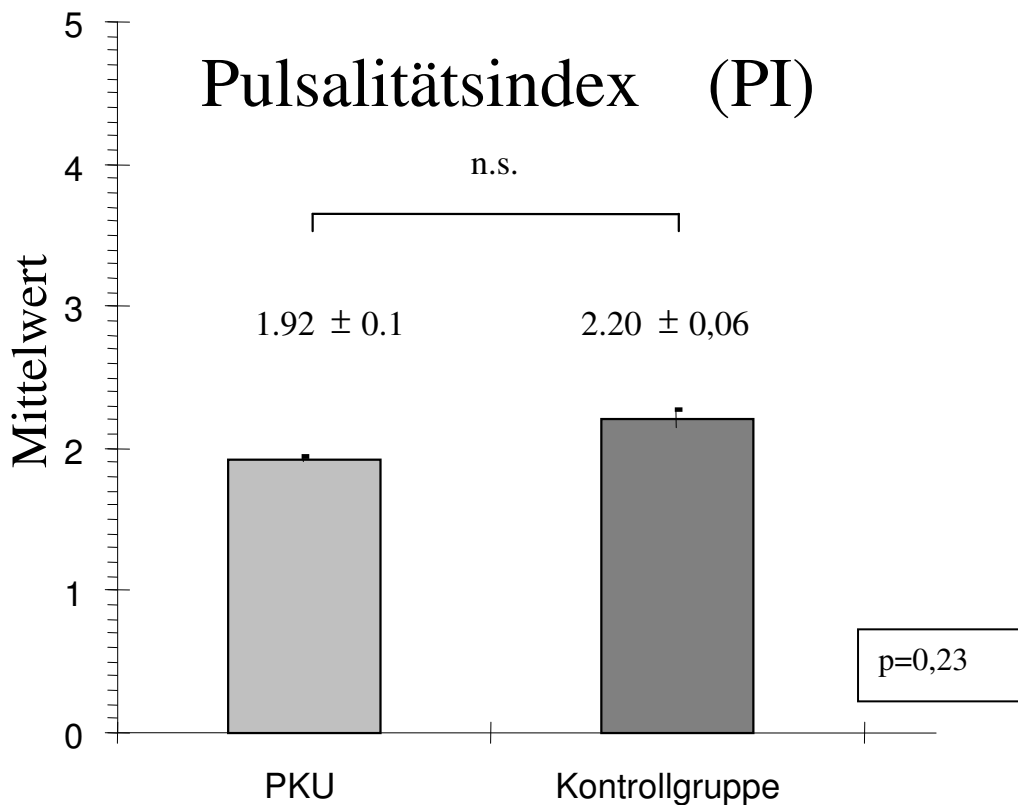


Abbildung 15: Balkendiagramm - Der durchschnittliche Wert (Mittelwert) lag hierbei in der Patientenkohorte bei 1.92 ± 0.1 . In der Kontrollgruppe lag der Vergleichswert bei $2.20 \pm 0,06$.

Zur Übersicht die folgende Tabelle:

	PKU (n=43)	Kontrolle (n=58)	p value ³
IMT			
• Links (mm), SEM	0.43 ¹ (± 0.02) ²	0.43 (± 0.01)	0.53
• Rechts (mm), SEM	0.46 (± 0.01)	0.46 (± 0.01)	0.87
• Mittelwert (mm), SEM	0.44 (± 0.01)	0.44 (± 0.01)	0.88
Stiffness			
• Links, SEM	3.32 (± 0.52)	4.52 (± 0.62)	0.5
• Rechts, SEM	5.27 (± 0.80)	4.67 (± 0.54)	0.46
• Mittelwert, SEM	4.44 (± 0.37)	4.40 (± 0.31)	0.7
PI ACC			
• Links, SEM	1.89 (± 0.1)	2.00 (± 0.06)	0.54
• Rechts, SEM	1.95 (± 0.12)	2.20 (± 0.07)	0.06
• Mittelwert (links/rechts), SEM	1.92 (± 0.1)	2.20 (± 0.06)	0.23

¹Mittelwert ²± Standardfehler des Mittelwertes; ³ p < 0.05

Tabelle 9 – Messergebnisse der Carotis B – Mode Sonographie.

4.2.4 Durchflusszytometrische Untersuchung

4.2.4.1 GPIIb/IIIa - Komplex

Zunächst einmal sollen die durchflusszytometrischen Ergebnisse hinsichtlich des GPIIb/IIIa – Komplexes (CD41, CD61, PAC1) betrachtet werden. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von CD41 zwischen der Patienten- und der Kontrollkohorte (Angabe in mittlere Intensität der Immunfluoreszenz; Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 649.88 (583.60; 715.98) vs. 647.01 (577.89; 703.69), [p=0.53]. Die gleiche Aussage gilt hinsichtlich des CD61 (Angabe in mittlere Intensität der Immunfluoreszenz; Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 394.65 (284.67; 440.90) vs. 378.69 (238.17; 414.16), [p=0.26]. Um Aussagen über die Aktivität des GPIIb/IIIa – Komplexes machen zu können wurde der Antikörper PAC1 eingesetzt. Es ergab sich keine signifikante Erhöhung hinsichtlich dieses Antikörpers im Vergleich der PKU mit der Kontrollgruppe (PAC1% positiver Thrombozyten, Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 0.46 (0.32; 0.68) vs. 0.55 (0.42; 0.71), [p=0,29].

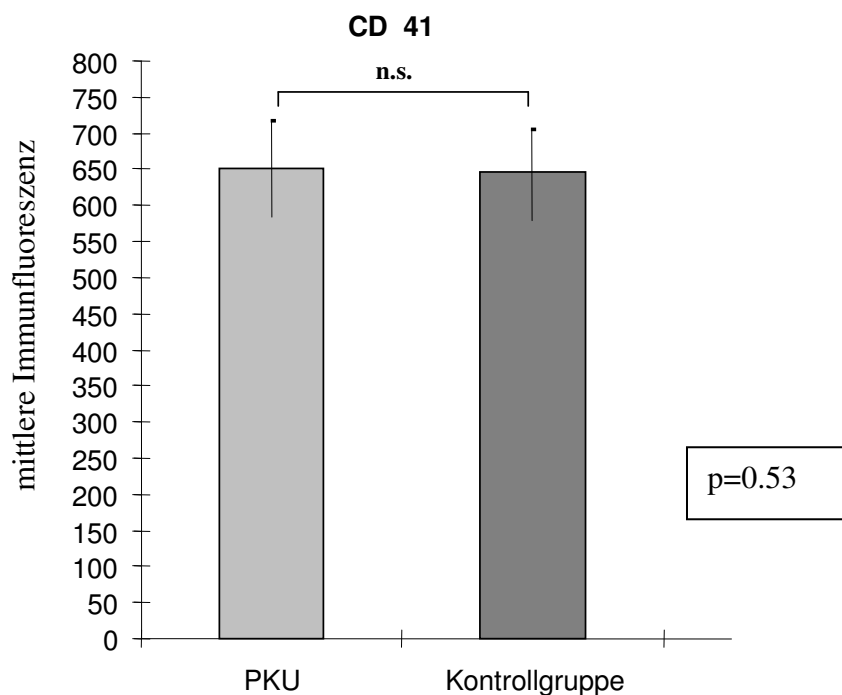


Abbildung 16: Darstellung als Histogramm - Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von CD41 zwischen der Patienten- und der Kontrollkohorte (Angabe in mittlere Intensität der Immunfluoreszenz; Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 649.88 (583.60; 715.98) vs. 647.01 (577.89; 703.69) [p=0.53].

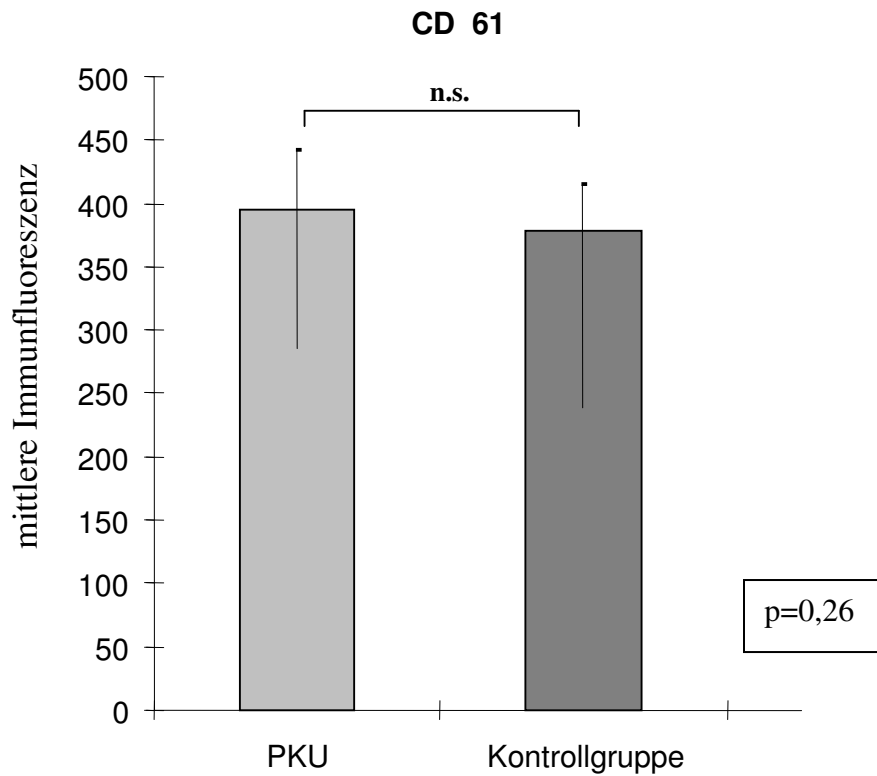


Abbildung 17: Darstellung als Histobar - CD61 (Angabe in mittlere Intensität der Immunfluoreszenz; Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 394.65 (284.67; 440.90) vs. 378.69 (238.17; 414.16), [p=0.26] ohne signifikanten Unterschied.

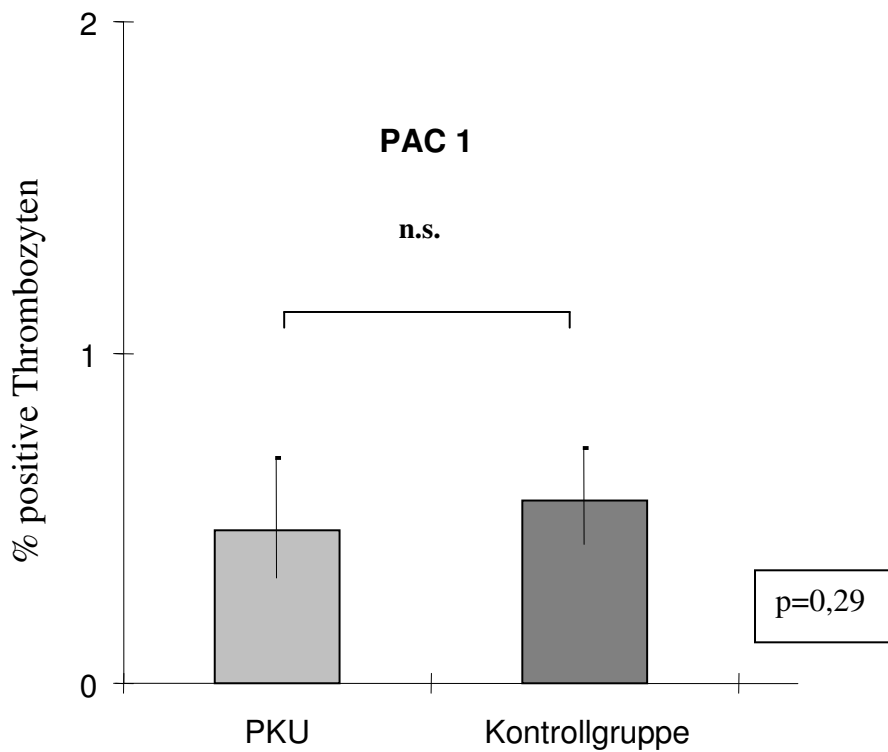


Abbildung 18: Darstellung als Histobar - PAC1% positiver Thrombozyten, Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 0.46 (0.32; 0.68) vs. 0.55 (0.42; 0.71), [p=0,29] – kein signifikanter Unterschied.

4.2.4.2 Degranulationsmarker

Nachfolgend sollen die durchflusszytometrischen Ergebnisse der Degranulationsmarker (CD 62P, CD 63) betrachtet werden. Die Expression von P-Selektin unterscheidet sich nicht zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe (CD 62P% positiver Thrombozyten, Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 2.00 (1.60; 2.70) vs. 2.09 (1.57; 2.83), [p=0.86]. Auch gibt es keinen signifikanten Unterschied bei der Expression von CD63 (Lysosomen) zwischen den erwähnten Gruppierungen (Angabe in mittlere Intensität der Immunfluoreszenz; Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 12.47 (11.03; 14.84) vs. 13.23 (11.61; 15.25), [p=0,3].

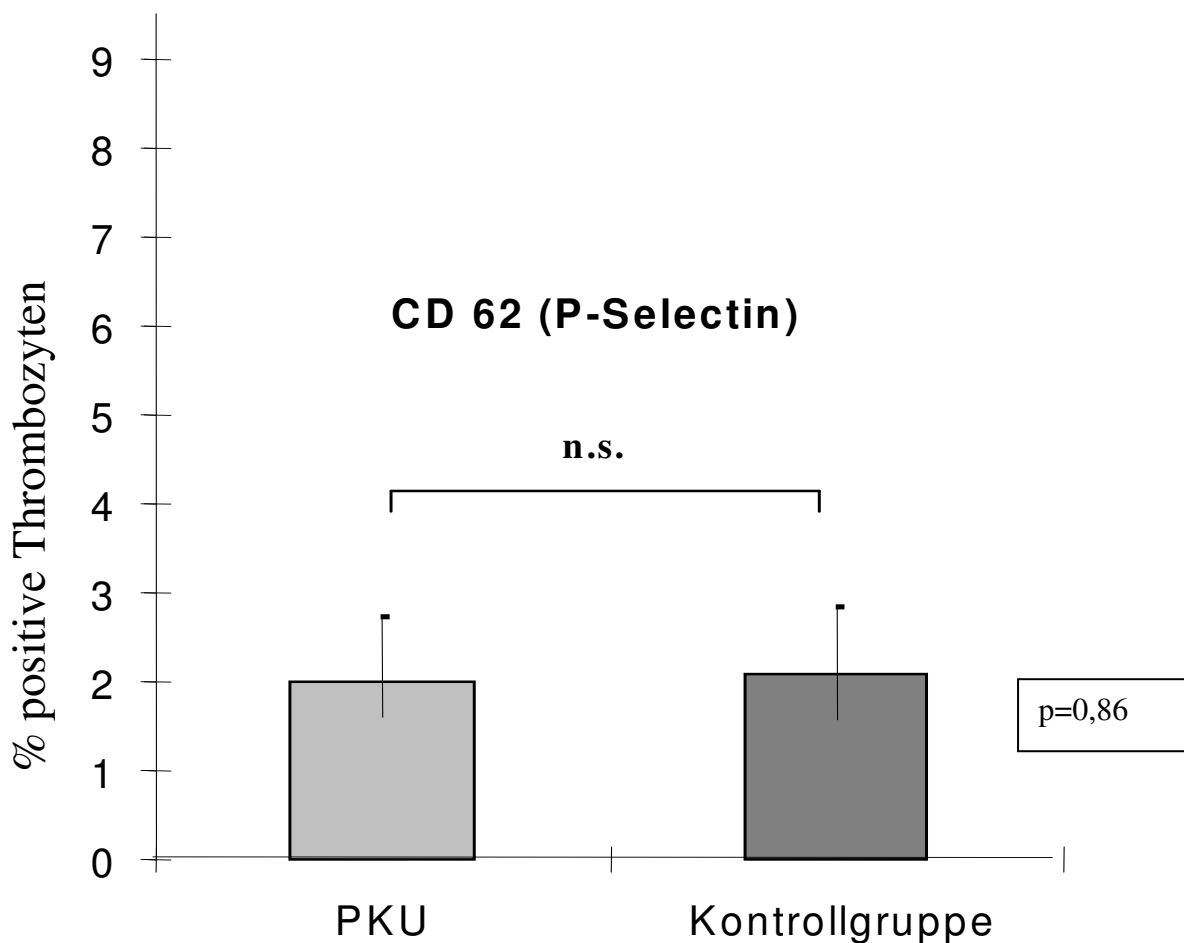


Abbildung 19: Darstellung als Histogramm - Die Expression von P-Selektin unterscheidet sich nicht zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe (CD 62P% positiver Thrombozyten, Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 2.00 (1.60; 2.70) vs. 2.09 (1.57; 2.83), [p=0.86].

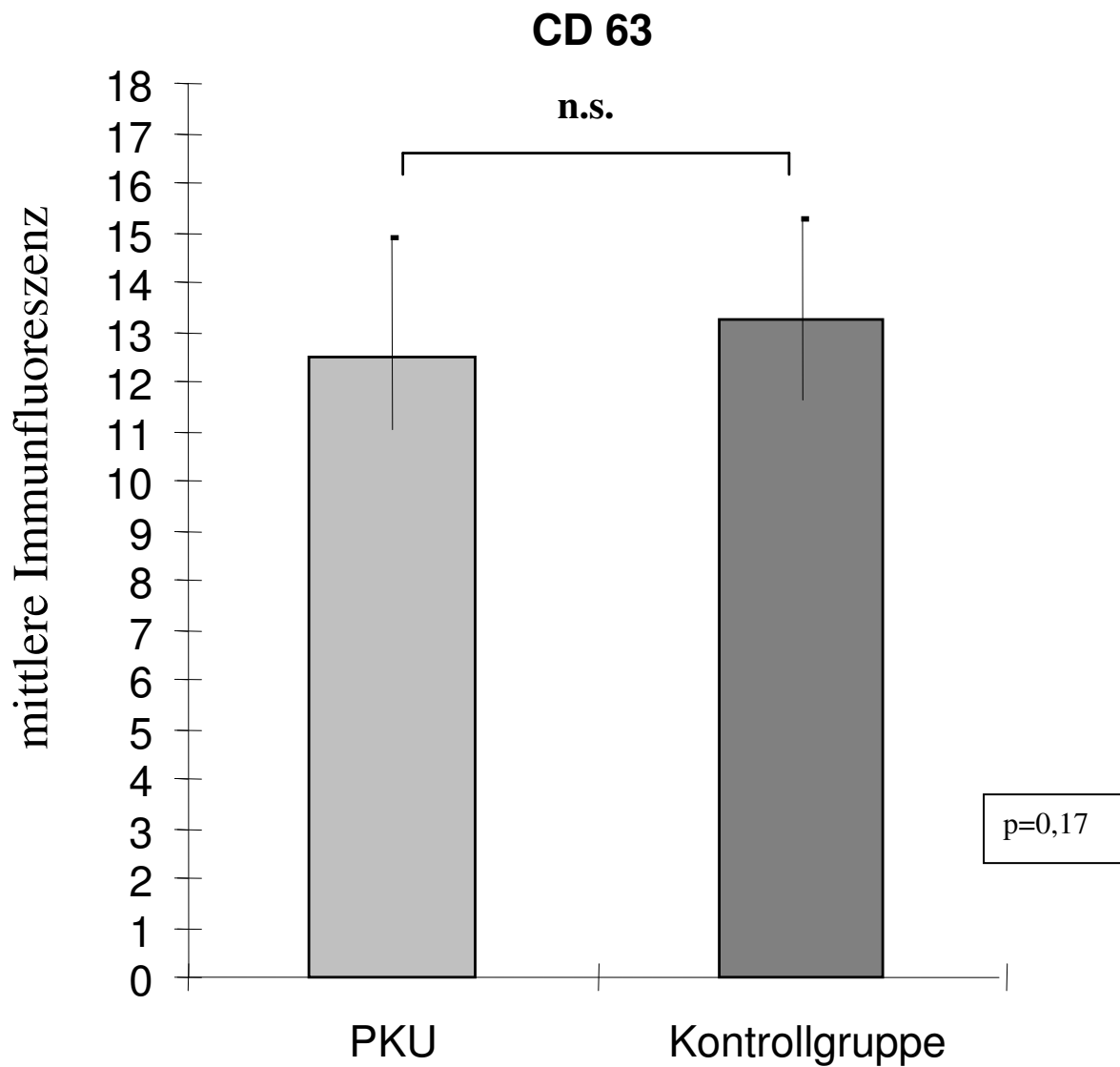


Abbildung 20: Darstellung als Histogramm - Expression von CD63 (Lysosomen) zwischen den erwähnten Gruppierungen (Angabe als mittlere Immunfluoreszenz; Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 12.47 (11.03; 14.84) vs. 13.23 (11.61; 15.25), [p=0,3] ohne signifikanten Unterschied.

4.2.4.3 CD154 (CD40L)

Bei der Expression von CD 40L war kein signifikanter Unterschied PKU- und Kontrollkohorte zu beobachten (CD 40L% positiver Thrombozyten, Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 16.31 (13.10; 18.70) vs. 16.49 (13.52; 19.30), [p=0,62].

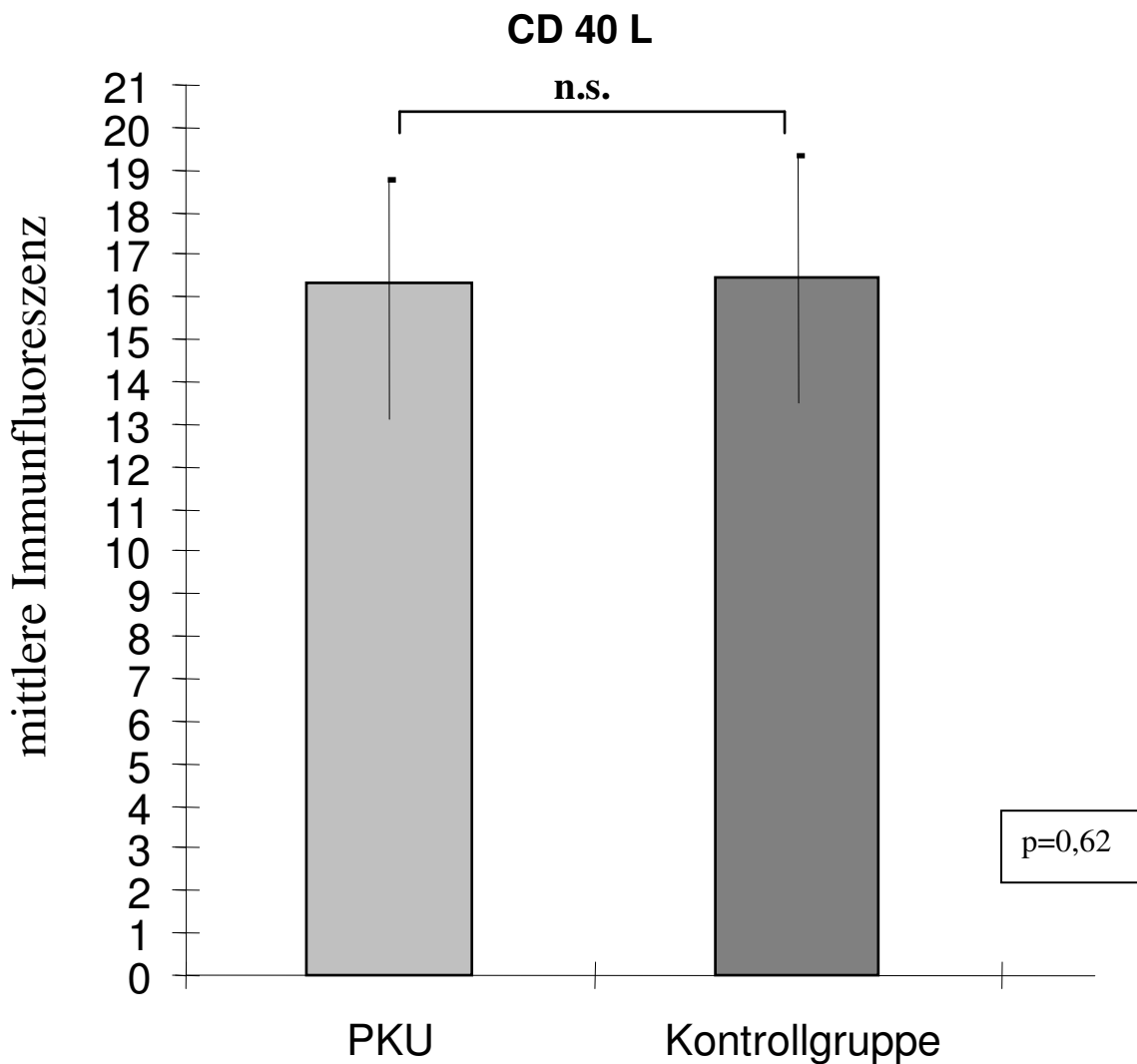


Abbildung 21: Darstellung als Histogramm - Kein signifikanter Unterschied zwischen PKU- und Kontrollkohorte zu beobachten (Angabe als mittlere Immunfluoreszenz, Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 16.31 (13.10; 18.70) vs. 16.49 (13.52; 19.30), [p=0,62].

Zur Zusammenfassung der einzelnen durchflusszytometrischen Ergebnissen der jeweiligen Antikörper soll die folgende Übersicht dienen:

	PKU (n=43)	Kontrollgruppe (n=58)	p value ⁴
CD 42b mean	997.33 ¹ (664.80; 1202.20) ² ± 52.67 ³	1104.99 (950; 1229)	0.06
CD 41 mean	649.88 (583.60; 715.98) ± 19.04	647.01 (577.89; 703.69) ± 36	0.53
CD 62p %	2.00 (1.60; 2.70) ± 0.21	2.09 (1.57; 2.83) ± 0,25	0.86
CD 62p mean	8.1 (7.14; 10.02) ± 0,42	8.57 (7.25; 11.47) ± 0,58	0.21
PAC 1 %	0.46 (0.32; 0.68) ± 0.21	0.55 (0.42; 0.71) ± 0,07	0.29
PAC 1 mean	3.83 (3.15; 4.41) ± 0.22	4.02 (3.60; 4.39) ± 0,15	0.1
CD 63 mean	12.47 (11.03; 14.84) ± 0.83	13.23 (11.61; 15.25) ± 0,91	0.3
CD 63 %	7.16 (6.22; 9.10) ± 0.66	6.46 (5.08; 9.05) ± 0,48	0.17
CD 61	394.65 (284.67; 440.90) ± 18.53	378.69 (238.17; 414.16) ± 13,34	0.26
CD 40 L mean	16.31 (13.10; 18.70) ± 16.31	16.49 (13.52; 19.30) ± 3,34	0.62
CD 40 L %	9.10 (5.96; 11.50) ± 0,59	7.22 (5.34; 10.05) ± 0,59	0.1

¹Median; ²25igste und 75igste Perzentile; ³Standardfehler des Mittelwertes; ⁴p < 0.05

Tabelle 10 – Messergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung.

Es liegen damit keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität der Thrombozyten zwischen den einzelnen Gruppierungen vor.

4.2.5 Fettsäureprofile

4.2.5.1 Plasmafettsäureprofile

Bei der Betrachtung der Ergebnisse des Fettsäureprofils soll zunächst das im Serum bestimmte Profil angesehen werden. Die durchschnittliche ω -6 Fettsäure Menge lag innerhalb der PKU-Gruppe bei 32.37 (\pm 0.59) amount % und bei der Kontrollgruppe bei 32.53 (\pm 0.58) amount %. Der durchschnittliche ω -3 Fettsäure Wert betrug 4.09 (\pm 0.13) amount % für die PKU Gruppe, in der Kontrollgruppe 4.3 (\pm 0.12) amount %. Der Gehalt an ω -6 und ω -3 Fettsäuren im Serum der beiden Gruppierungen unterschied sich nicht signifikant: $p= 0.73$ (ω -6) und $p= 0.40$ (ω -3). Das Verhältnis ω -3 zu ω -6 Fettsäuren lag in der PKU – Gruppe bei 1:8.41 (\pm 0.44) und in der Kontrollgruppe bei 1:8.02 (\pm 0.36) und unterschied sich damit ebenfalls nicht signifikant ($p= 0.63$). Im Vergleich des Gehaltes an gesättigten Fettsäuren viel jedoch ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf: 32.71 (\pm 0.34) vs. 34.49 (\pm 0.34) amount %, $p= 0.001$. Ebenfalls signifikant war der Unterschied im Vergleich der Gruppierungen hinsichtlich des bestimmten Wertes für einfach ungesättigte Fettsäuren (= EUF): 27.06 (\pm 0.62) vs. 25.19 (\pm 0.4) amount %, $p= 0.02$. Im Gehalt an mehrfach – ungesättigten Fettsäuren (= MUF) unterschieden sich die Seren der Kohorten nicht signifikant. Hier lag der durchschnittlich bestimmte Wert der PKU – Gruppe bei 1,22 (\pm 0,14) amount % und in der Kontrollgruppe bei 1,02 (\pm 0,09) amount %. Nachfolgend das Fettsäureprofil (im Serum) der untersuchten Gruppen in der Übersicht:

	PKU (n=43)	Kontrolle (n=58)	p value ³
ω -6 ¹ , amount %	32,37 (\pm 0,59) ²	32,53 (\pm 0,58)	0,73
ω -3, amount %	4,09 (\pm 0,13)	4,3 (\pm 0,12)	0,40
Verhältnis ω -3 / ω -6, amount %	1:8,41 (\pm 0,44)	1:8,02 (\pm 0,36)	0,63
gesättigte Fettsäure, amount %	32,71 (\pm 0,34)	34,49 (\pm 0,34)	0,001
EUF – Serum, amount %	27,06 (\pm 0,62)	25,19 (\pm 0,4)	0,02
MUF – Serum, amount %	1,22 (\pm 0,14)	1,02 (\pm 0,09)	0,54

¹Mittelwerte ² \pm Standardfehler des Mittelwertes; ³ $p < 0.05$

Tabelle 11 - Ergebnisse der Bestimmung der Fettsäure im Serum.

4.2.5.2 Fettsäureprofile der Erythrozytenmembran

Des Weiteren wurden die Fettsäureprofile in der Erythrozytenmembran bestimmt. Der ω - 6 Fettsäure Gehalt lag hier bei 26.39 (\pm 1.29) amount % in der Patienten- und bei 26.61 (\pm 1.08) amount % in der Kontrollkohorte und unterschied sich damit nicht signifikant ($p= 0.94$). Der durchschnittliche ω -3 Wert betrug für die PKU – Gruppe 8.22 (\pm 0.24) und für die Kontrollgruppierung 8.41 (\pm 0.22) amount %. Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant ($p= 0.52$). Im Verhältnis ω -3 zu ω -6 Fettsäuren ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kohorten: 1:3.30 (\pm 0.19) vs. 1:3.26 (\pm 0,17); [$p= 0,54$]. Der durchschnittlich gemessene Wert der gesättigten Fettsäuren lag in der Patientengruppierung bei 39.54 (\pm 1.15) amount %, sowie in der Kontrollgruppe bei 39.30 (\pm 0.92) amount %. Sie unterschied sich nicht signifikant ($p=0.98$). Der durchschnittliche Wert für die bestimmten EUF in der Erythrozytenmembran betrug für den Patientenzweig 16.02 (\pm 0.56) amount % und für den Kontrollzweig 15.96 (\pm 0.45) amount %. Ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p= 0.98$). Gleiches gilt im Vergleich für die durchschnittlich gemessene Menge an MUF ($p= 0.83$): 4.16 (\pm 0,17) vs. 4.08 (\pm 0,14) amount %.

Zur Übersicht die Fettsäureprofile bestimmt in der Erythrozytenmembran:

	PKU (n=43)	Kontrolle (n=58)	p value ³
ω -6 ¹ , amount %	26,39 (\pm 1,29) ²	26,61 (\pm 1,08)	0,94
ω -3, amount %	8,22 (\pm 0,24)	8,41 (\pm 0,22)	0,52
Verhältnis ω -3 / ω - 6, amount %	1:3,30 (\pm 0,19)	1:3,26 (\pm 0,17)	0,54
gesättigte Fettsäure, amount %	39,45 (\pm 1,15)	39,30 (\pm 0,92)	0,98
EUF – Erymembran, amount %	16,02 (\pm 0,56)	15,96 (\pm 0,45)	0,98
MUF – Erymembran, amount %	4,16 (\pm 0,17)	4,08 (\pm 0,14)	0,83

¹Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes; ³ $p < 0.05$

Tabelle 12 - Ergebnisse der Bestimmung der Fettsäure aus der Erythrozytenmembran.

Die Tabelle zeigt keine signifikanten Unterschied im Fettsäureprofil der untersuchten Einheiten.

4.3 Vergleich der FS Substituierten mit der nicht mit FS substituierten Patientengruppe

4.3.1 Demographische Charakteristika

Bei der folgenden Gegenüberstellung der demographischen Charakteristika zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der beiden Kohorten.

	Substituiert (n=18)	Nicht - Substituiert (n=25)	p value³
Frauen, n (%)	8 (44)	13 (52)	0,63
Alter (yr) ¹ ± SEM ²	28,17 (± 1,45)	28 (± 1,31)	0,89
Raucheranteil n (%)	17,6 (± 0,1)	20 (± 0,08)	0,85
mittlerer Blutdruck mmHg ± SEM	96,33 (± 2,84)	97,96 (± 2,25)	0,52
BMI ± SEM	24,06 (± 0,95)	24,47 (±0,98)	0,81

¹Mittelwerte ²± Standardfehler des Mittelwertes; ³ p < 0.05

Tabelle 13 – Demographische Charakteristika (Substitution vs. Nicht – Substituiert).

4.3.2 Labordaten

Im Vergleich der Laborparameter zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Tyrosin - Konzentration zwischen der Substitutionsgruppe und der nicht substituierten Gruppe (p= 0.04): 1.19 (±0.16) vs. 0.75 (±0.07). Die weiteren Daten unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Nachfolgend eine Übersicht der einzelnen Parameter:

	Substituiert (n=18)	Nicht – Substituiert (n=25)	p value³
Thrombozyten (nl) ± SEM	237.471 ¹ (± 12,92) ²	268.173 (± 14,6)	0,09
Leukozyten (nl) ± SEM	6.891 (± 0,42)	6.746 (± 0,52)	0,56
Kreatinin (mg/dl) ± SEM	0,82 (± 0,03)	0,73 (± 0,07)	0,82
Gesamt – Cholesterin (mg/dl) ± SEM	161,47 (± 0,82)	158,91 (± 5,9)	0,94
• HDL (mg/dl) ± SEM	53,82 (± 3,19)	50,22 (± 3,54)	0,35

• LDL (mg/dl) \pm SEM	83,23 (\pm 5,67)	85 (\pm 6,15)	0,64
Triglyceride (mg/dl) \pm SEM	112,71 (\pm 14,45)	105,7 (\pm 11,43)	0,83
Phenylalanin (mg/dl) SEM	16,71 (\pm 1,21)	16,37 (\pm 1,41)	0,82
Tyrosin (mg/dl) SEM	1,19 (\pm 0,16)	0,75 (\pm 0,07)	0,04

¹Mittelwerte ² \pm Standardfehler des Mittelwertes; ³ p < 0.05

Tabelle 14 - Labordaten (Substitution vs. Nicht – Substituiert).

4.3.3 Messergebnisse der Carotis B-Mode Sonographie

Im Vergleich der Messergebnisse der Carotis-B-Sonographie fiel zwischen den beiden Gruppen (nicht - substituiert vs. substituiert) ein signifikanter Unterschied (p= 0.04) der Intima – Media Dicke auf: 0.43 (\pm 0.02) mm vs. 0.48 (\pm 0,01) mm. Es zeigt sich darüber hinaus keine weiteren signifikanten Unterschiede bezüglich der übrigen Ergebnisse (Tabelle 15).

	Nicht - Substitution (n= 25)	Substitution (n=18)	p value ³
IMT			
• Links (mm) ¹ , SEM ²	0,41 (\pm 0,02)	0,47 (\pm 0,01)	0,04
• Rechts (mm), SEM	0,45(\pm 0,02)	0,49 (\pm 0,02)	0,21
• Mittelwert (mm), SEM	0,43 (\pm 0,02)	0,48 (\pm 0,01)	0,04
Stiffness			
• Links ,SEM	4 (\pm 0,42)	2,29 (\pm 1,11)	0,60
• Rechts, SEM	5,14 (\pm 0,68)	5,49 (\pm 1,8)	0,96
• Mittelwert, SEM	4,57 (\pm 0,47)	4,18 (\pm 0,59)	0,59
PI ACC			
• Links, SEM	1,98 (\pm 0,12)	1,76 (\pm 0,16)	0,49
• Rechts, SEM	1,87 (\pm 0,13)	2,08 (\pm 0,24)	0,47
• Mittelwert (links/rechts), SEM	1,92 (\pm 0,12)	1,94 (\pm 0,18)	0,67

¹Mittelwerte ² \pm Standardfehler des Mittelwertes; ³ p < 0.05

Tabelle 15 - Messergebnisse der Carotis B – Mode Sonographie (Substitution vs. Nicht – Substituiert).

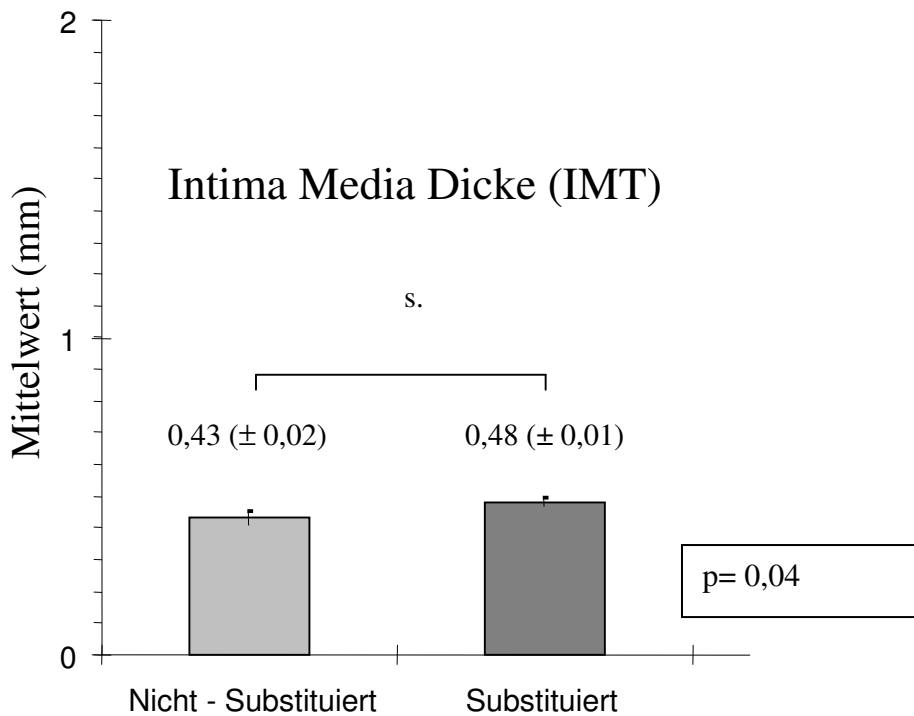
Graphik - Ergebnisse der Carotis – B- Sonographie

Abbildung 22: Histogramm - Ein signifikanter Unterschied im Vergleich der IMT konnte festgestellt werden. Dieser betrug 0,43 ($\pm 0,02$) in der Vergleichsgruppe und 0,48 ($\pm 0,01$) in der Substitutionsgruppe ($p= 0,04$).

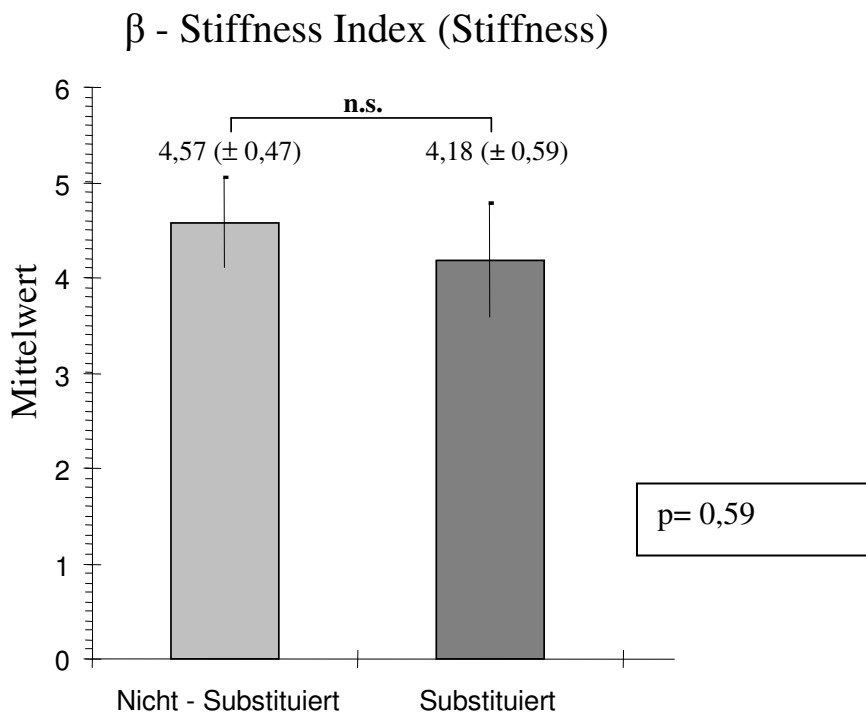


Abbildung 23: Histogramm - Graphische Darstellung der Ergebnisse der Carotis B – Sonographie: Der β – Stiffness Index unterschied sich nicht zwischen der Vergleichsgruppe und der Substitutionsgruppe: Kontrollgruppe 4,57 ($\pm 0,47$) vs. Substitutionsgruppe 4,18 ($\pm 0,59$) [$p=0,59$].

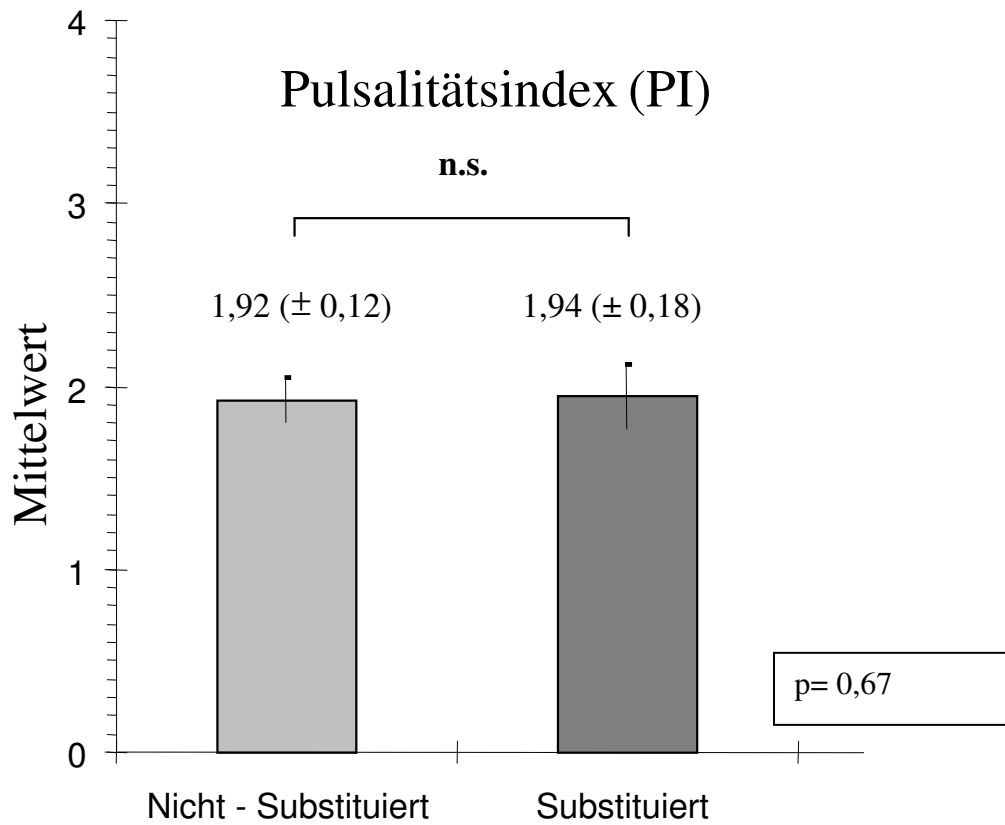


Abbildung 24: Histogramm - Graphische Darstellung der Ergebnisse der Carotis B – Sonographie: der PI unterschied sich nicht zwischen der Vergleichsgruppe und der Substitutionsgruppe: Kontrollgruppe 1,92 (± 0,12) vs. Substitutionsgruppe 1,94 (± 0,18) [p=0,67].

4.3.4 Durchflusszytometrische Untersuchung

Im Vergleich der durchflusszytometrischen Thrombozytenanalyse zwischen der Substitutionsgruppe und der nicht substituierten Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Zur Übersicht die nachfolgende Tabelle (Tabelle 16):

	Nicht – Substitution (n=25)	Substitution (n=18)	p value³
CD 41 mean	¹ 649,88 (597,82;718,11) ² ± 17,73	655,42 (575,02;715,59) ± 38,96	0,71
CD 42b mean	929,49 (657,19;1205,50) ± 65,71	1061,48 (772,04;1169,79) ± 88,82	0,62
CD 62p %	2,02 (1,45;2,68) ± 0,20	1,99 (1,84;3,90) ± 0,40	0,43
CD 62p mean	8,07 (7,06;9,81) ± 0,59	8,69 (7,23;10,62) ± 0,59	0,45
PAC 1 %	0,44 (0,29;0,66) ± 0,15	0,55 (0,39;0,81) ± 0,46	0,35
PAC 1 mean	3,59 (3,1;4,00) ± 0,19	4,09 (3,22;4,89) ± 0,43	0,1
CD 63 mean	12,23 (10,95;14,20) ± 1,12	12,79 (11,20;15,19) ± 1,27	0,56
CD 63 %	6,70 (5,93;7,29) ± 0,74	6,30 (5,67; 8,90) ± 0,61	0,97
CD 61	393,30 (307,47;445,94) ± 21,76	395,76 (214,34;446,66) ± 33,15	0,94
CD 40 L mean	14,63 (12,90;17,97) ± 1,12	16,78 (14,32;22,25) ± 2,00	0,19
CD 40 L %	9,1 (5,9;11,10) ± 0,62	9,11 (6,35;14,10) ± 1,12	0,3

¹Median (25igste und 75igste Perzentile),²± Standardfehler des Mittelwertes,³ < 0.05

Tabelle 16 – Messergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung (Substituiert vs. Nicht – Substituiert).

4.3.4.1 Ergebnisse für den GPIIb/IIIa - Komplex

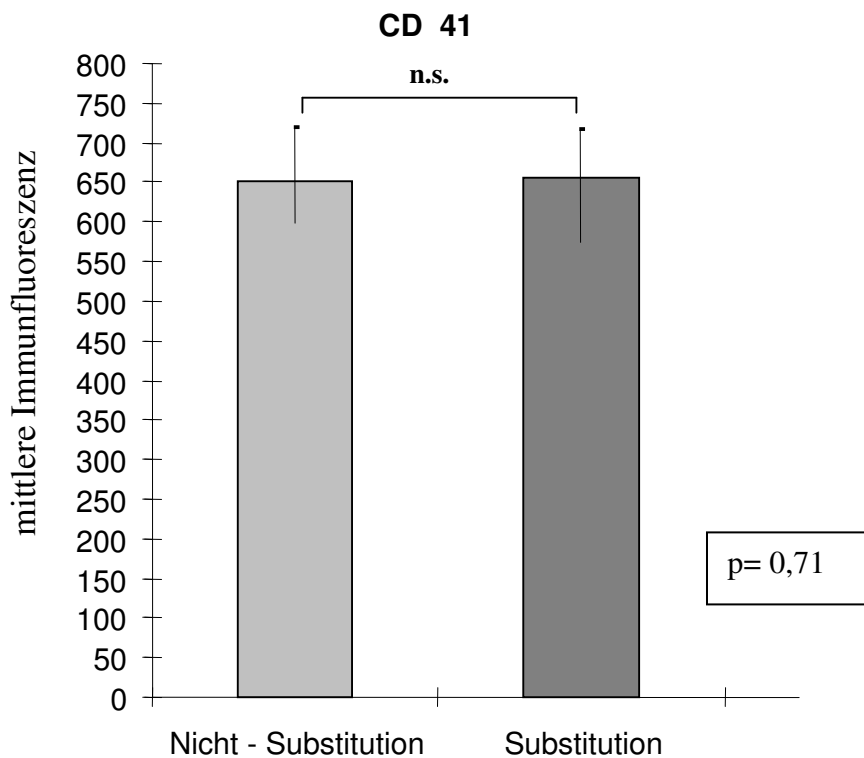


Abbildung 25: Darstellung als Histogramm - Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von CD41 (Angabe in mittlere Immunfluoreszenz CD 41; Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 649,88 (597,82;718,11) vs. 655,42 (575,02;715,59) [p=0,71].

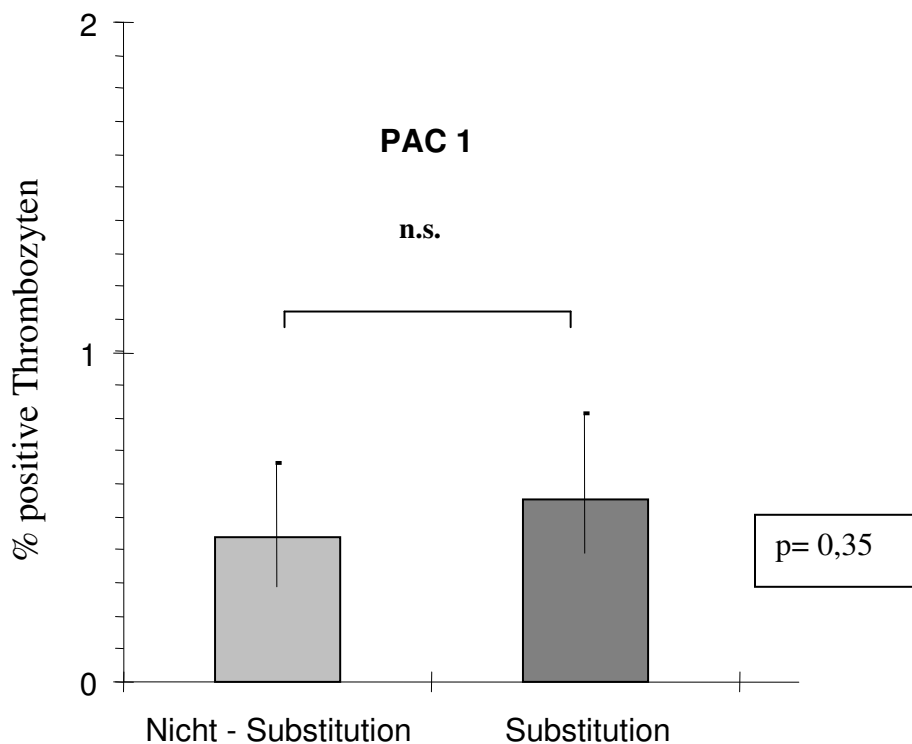


Abbildung 26: Darstellung als Histogramm - Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von PAC 1 (Angabe in PAC 1% positive Thrombozyten; (Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 0,44 (0,29;0,66) vs. 0,55 (0,39;0,81) [p=0,35].

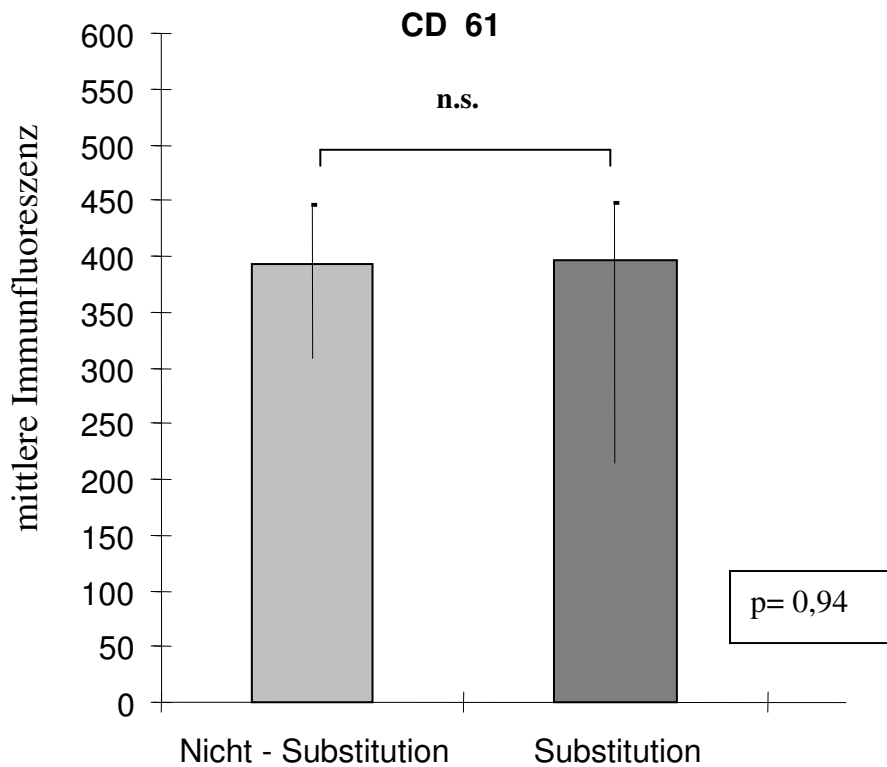


Abbildung 27: Darstellung als Histobar - Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von CD61 (Angabe in mittlere Intensität der Immunfluoreszenz (Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 393,30 (307,47;445,94) vs. 395,76 (214,34;446,66) [p=0,94].

Ergebnisse für die Degranulationsmarker

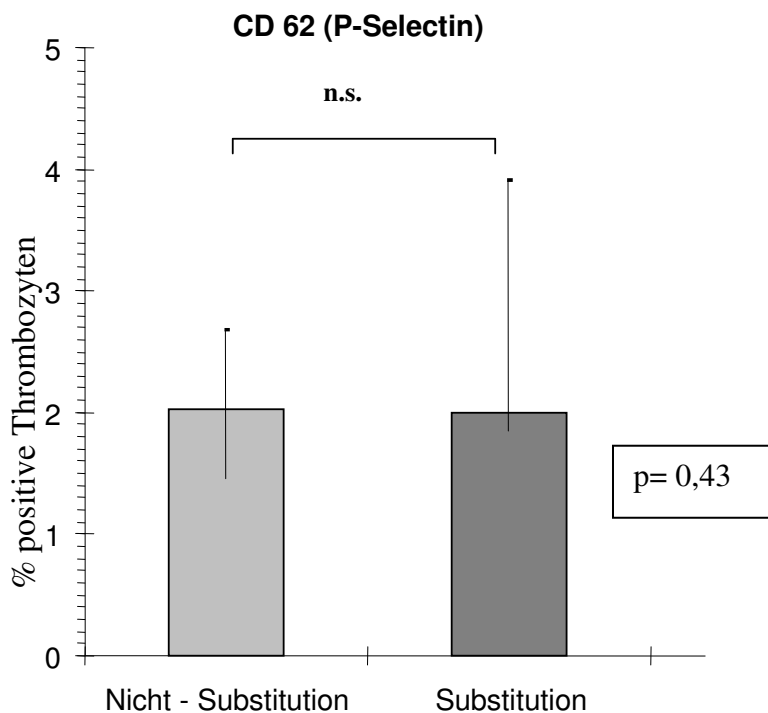


Abbildung 28: Darstellung als Histobar - Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von CD62 (Angabe in CD 62% positiver Thrombozyten; (Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 2,02 (1,45;2,68) vs. 1,99 (1,84;3,90) [p=0,43].

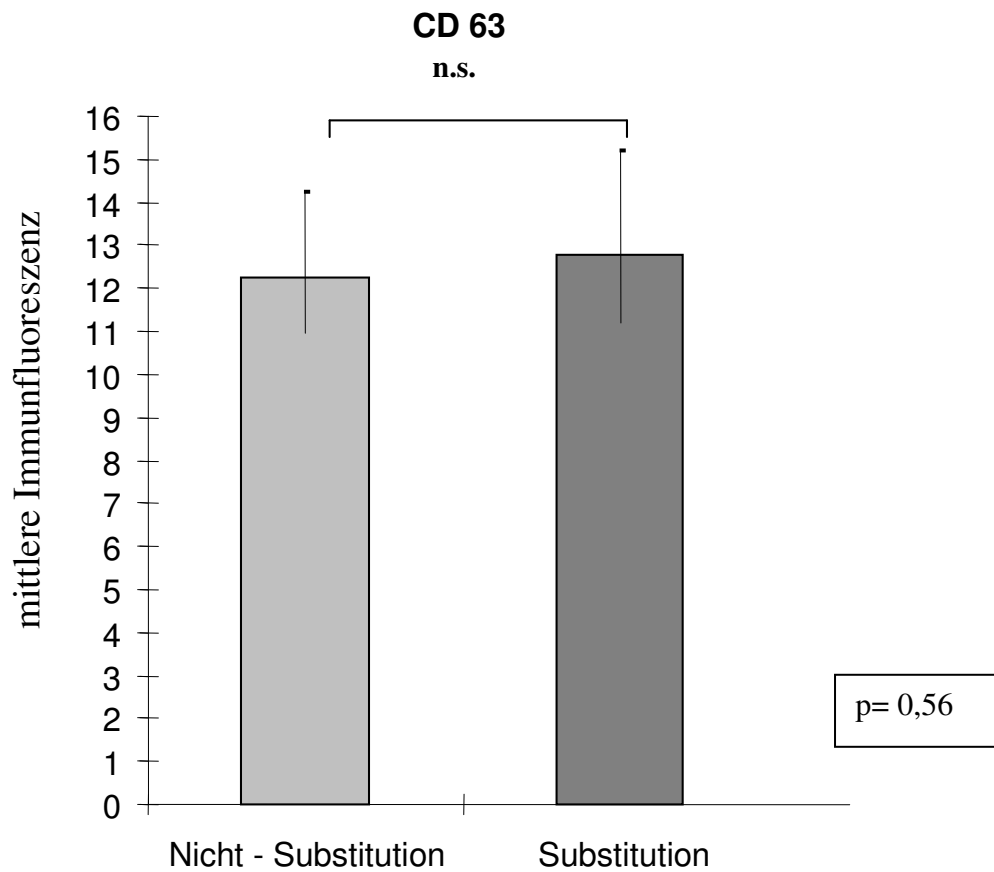


Abbildung 29: Darstellung als Histogramm - Es ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von CD 63 zwischen den Gruppen (Angabe als mittlere Immunfluoreszenz; Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 12,23 (10,95;14,20) vs. 12,79 (11,20;15,19) [p=0,56].

Ergebnisse für CD 154 (CD40L)

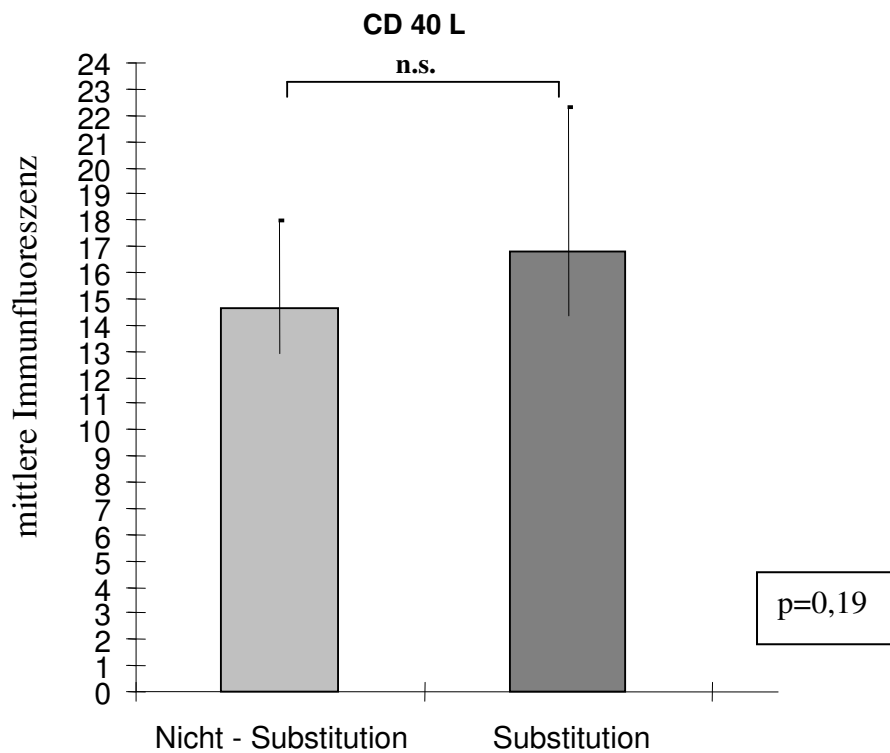


Abbildung 30: Darstellung als Histogramm - Kein signifikanter Unterschied zwischen der Vergleichs- und der beobachteten Gruppe (Angabe in mittlere Immunfluoreszenz CD 40L, Median, [25igste und 75igste Perzentile]: 14,63 (12,90;17,97 vs. 16,78 (14,32;22,25), [p= 0,19].

4.3.5 Fettsäureprofile

4.3.5.1 Plasmafettsäureprofile

Das im Serum bestimmte Plasmafettsäureprofil der zu untersuchenden Populationen unterschied sich nicht signifikant hinsichtlich ihres Gehaltes an den bestimmten Fettsäuren. Zur Übersicht das jeweilige Profil (gemessen im Serum):

	NICHT - Substituierte (n=25)	Substituierte (n=18)	p value ³
ω -6 Fettsäuren ¹ , amount % ²	33,13 (\pm 0,79)	31,31 (\pm 0,86)	0,30
ω -3 Fettsäure, amount %	3,93 (\pm 0,17)	4,3 (\pm 0,2)	0,28
Verhältnis ω -3/ ω -6 FS, amount %	1 : 9,03 (\pm 0,67)	1: 7,54 (\pm 0,41)	0,09
Gesättigte Fettsäuren , amount %	32,73 (\pm 0,46)	32,7 (\pm 0,5)	0,90
Einfach ungesättigte Fettsäuren, amount %	26,40 (\pm 0,66)	27,96 (\pm 1,14)	0,34
Mehrfach ungesättigte Fettsäuren, amount %	1,15 (\pm 0,17)	1,30 (\pm 0,25)	0,59

¹Zahlen als Mittelwerte, ² \pm Standardfehler des Mittelwertes oder als absolute Werte, ³ p < 0.05

Tabelle 17 – Ergebnisse der Messung der Fettsäuren im Serum (Substituiert vs. Nicht – Substituiert).

4.3.5.2 Fettsäureprofile der Erythrozytenmembran

Das Fettsäureprofil in der Erythrozytenmembran wies ebenfalls kein signifikanten Unterschied im Vergleich der Gruppen auf.

	NICHT - Substituierte (n=25)	Substituierte (n=18)	p value ³
ω -6 Fettsäuren ¹ , amount % ²	25,48 (\pm 1,95)	27,63 (\pm 1,50)	0,58
ω -3 Fettsäure, amount %	8,20 (\pm 0,23)	8,25 (\pm 0,48)	0,97
Verhältnis 3 zu 6, amount %	1 : 3,20 (\pm 0,28)	1 : 3,45 (\pm 0,25)	0,63
Gesättigte Fettsäuren, amount %	41 (\pm 1,57)	37,30 (\pm 1,53)	0,11
Einfach ungesättigte Fettsäuren, amount %	15,56 (\pm 0,77)	16,65 (\pm 0,82)	0,40
Mehrfach ungesättigte Fettsäuren, amount %	4,34 (\pm 0,22)	3,91 (\pm 0,28)	0,17

¹Mittelwerte, ² \pm Standardfehler des Mittelwertes, ³ p < 0.05

Tabelle 18 - Bestimmung der Fettsäuren in der Erythrozytenmembran (Substituiert vs. Nicht – Substituiert).

5 Diskussion

Die vorliegende Studie untersuchte erstmalig das Risiko für früharteriosklerotische Veränderungen sowie die Thrombozytenfunktion bei Patienten mit Phenylketonurie. Als Surrogatmarker für früharteriosklerotische Veränderungen dienten die Intimamediadicke (IMT), der Pulsatilitätsindex (PI), sowie der β – Stiffness - Index der Arteria carotis communis. Zudem wurde der Einfluss der Substitution von Omega – FS auf diese Surrogatmarker und die Thrombozytenfunktion untersucht.

Es konnten hierbei keine früharteriosklerotische Veränderungen und auch keine erhöhte arteriothrombotische Aktivität bei Patienten mit Phenylketonurie festgestellt werden.

Ein Vergleich zwischen mit Omega – FS substituierten Patienten und solche ohne eine entsprechende Substitution wurde des Weiteren durchgeführt und zeigte, dass die substituierten Omega – FS keinen positiven Einfluss auf die gemessenen Parameter hatten.

5.1 Surrogatmarker für früharteriosklerotische Veränderungen und PKU

Zur Diagnostik und Quantifizierung von früharteriosklerotischen Veränderungen wurde in dieser Studie die Carotis – B Sonographie verwendet. Mit Hilfe dieser Methode konnten die Intima – Media Thickness (IMT), die β – Stiffness sowie der Pulsatilitätsindex bestimmt werden. Die IMT – Messungen unterschieden sich nicht signifikant und waren im Mittel gleich. Auch die Messungen der β – Stiffness, sowie der Pulsatilitätsindex der Art. Carotis communis zeigten keine Unterschiede im Vergleich der beiden Gruppen zueinander.

Vorteil der Carotis – B - Sonographie ist, dass früharteriosklerotische Veränderungen hoch auflösend dargestellt werden und quantifiziert werden können. Hierbei sind alle Stadien der Arteriosklerose von der Früh – bis zur Spätphase berücksichtigt [109]. Limitierend ist, dass es sich um eine punktuelle Messung handelt. Eine Messung im weiteren Verlauf zur vergleichenden Verlaufskontrolle wäre allerdings möglich. Außerdem ist die Arteriosklerose ungleichmäßig in den Gefäßen verteilt und zudem liegt eine uneinheitliche Ausprägung vor. Die Messung der IMT fand an genau definierter Stelle in der A. carotis communis statt, unabhängig, ob sich hier die stärkste arteriosklerotische Veränderung befindet. Es bleibt zu erwähnen, dass die sonographische Plaques Messung mit kardiovaskulären Risikofaktoren korreliert. Die Methode ist ein Surrogatmarker der Arteriosklerose [110] [111] [112] [113] [114]. Außerdem besteht eine Beziehung zwischen dem Grad der Koronarsklerose eines Patienten und der IMT [115] sowie

wiederum ein Zusammenhang zwischen der IMT und dem Risiko für kardiovaskuläre / apoplektische Ereignisse [116]. Damit ist die IMT – Messung mittels Sonographie ein geeignetes Verfahren um früharteriosklerotische Veränderungen nachzuweisen. Ein Zusammenhang zwischen β – Stiffness und der subklinischen aortalen Arteriosklerose ist ebenfalls in der Literatur beschrieben [117]. Damit ist ebenfalls auch die Bestimmung der β – Stiffness ein geeignetes Verfahren zum Nachweis früharteriosklerotischer Veränderungen.

Neben der dopplersonographischen Analyse wurde auch die Aktivierung der Thrombozyten bestimmt. Es zeigte sich hierbei hinsichtlich der Expression von CD 41, CD 61 (GP IIB/IIIa – Komplex) keine signifikante unterschiedliche Expression. Insbesondere gab es keine unterschiedliche Aktivität bezüglich des GP IIB/IIIa – Komplexes, welche mit Bestimmung des Antikörpers PAC1 untersucht wurde.

Die von den Thrombozyten sezernierten Degranulationsmarkern CD62P, CD63 unterschieden sich hinsichtlich ihrer Expression nicht. Durch Bindung zwischen CD 154 (CD 40L) der Thrombozyten und Endothelzellen wird eine Signalkaskade ausgelöst, welche eine inflammatorische Wirkung auf die Gefäßwand besitzt. Auch bezüglich dieses Rezeptors konnte keine erhöhte Aktivierung innerhalb der PKU – Gruppe nachgewiesen werden. Es lässt sich daher durchflusszytometrisch keine erhöhte Aktivierung auf den unterschiedlichen Ebenen der Thrombozytenaktivierung nachweisen.

Die durchflusszytometrische Messung wurde als Test für die Thrombozytenfunktion, die Aktivitätsbestimmung und zur Analyse der Interaktionen zwischen Thrombozyten mit anderen Zellen eingesetzt [118] [119] [120] [121] [122]. Angewandt wurde diese Methode bereits in zahlreichen Studien, wo sie sich zur Bearbeitung unterschiedlichster Fragestellungen bewährt hat [123] [124] [125]. Die durchflusszytometrische Messung der Aktivierung von Thrombozyten ist eine direkte Analyse von Thrombozyten mit einer hohen Sensitivität und einer minimalen artifiziellen Zellaktivierung. Grundsätzlich besteht allerdings stets die Gefahr der artifiziellen Thrombozytenaktivierung in vitro durch Gewinnung und Verarbeitung der benötigten Vollblutproben zur Untersuchung von Thrombozyten. Die ersten gewonnenen Milliliter einer Vollblutprobe wurden in dieser Studie daher stets verworfen. Da es bei der Aufbewahrung von Blutplättchen in Glas – Behältnissen zur Aktivierung gekommen wäre, wurden die jeweiligen Proben in dieser Studie in so genannte Falcon – Röhrchen, welche aus Kunststoff bestehen, aufbewahrt. Es wurde nur Vollblutproben verwendet, die zuvor mit der Cyfix II – Lösung konserviert und stabilisiert wurden. Die auf diese Weise vorbereiteten Proben wurden schließlich schnellst möglichst untersucht.

Ein Vorteil der auf diese Weise durchgeführten Analyse von Thrombozytenaktivierung ist, dass nur eine geringe Blutmenge benötigt wird und zudem genaue Aussagen zu den einzelnen thrombozytären Rezeptoren gemacht werden können. Thrombozytenstörungen sind durch diese Methode erkennbar.

Durch eine durchflusszytometrische Analyse der Thrombozytenaktivierung sind jedoch nur Aussagen über zirkulierende Thrombozyten möglich. Bereits sequestrierte Thrombozyten können hinsichtlich ihrer Aktivität nicht beurteilt werden.

Insgesamt lies sich mit den in dieser Studie verwendeten Surrogatmarkern keine früharteriosklerotischen Veränderungen bei Patienten mit Phenylketonurie nachweisen und ebenfalls kein erhöhtes arteriosklerotisches Risiko verifizieren. Allerdings handelt es sich um punktuelle Messungen, die jedoch als Verlaufsparemeter für eine Follow Up Studie dienen könnten.

5.2 Fettsäureprofil

Zusätzlich wurde in dieser Studie das Fettsäureprofil der Patienten mit PKU mit dem eines Kontrollkollektivs nach der Methode von Morrison und Smith (1964), modifiziert nach Eder et al. (1991) analysiert. Die Bestimmung erfolgte sowohl im Serum und im Lipidextrakt der Erythrozytenmembran. In dieser Studie soll die Ernährungsweise der Teilnehmer nicht ausführlich in Einzelheiten betrachtet werden, viel mehr das Fettsäuremuster und vor allem die ω -3 und ω -6 Fettsäuren in Zusammenhang mit der arteriothrombotischen Aktivität.

Auffallend war, dass sich trotz der phenylalaninreduzierten Diät der PKU – Patienten die gemessenen Konzentrationen an ω -3 und ω -6 Fettsäuren nicht im Vergleich zur Kontrollgruppe unterschieden. Trotz unterschiedlicher Ernährungsweise war das Verhältnis der ω -3 zu ω -6 Fettsäuren (i. S.) in beiden Gruppe 1:8. Auffallend war jedoch der Nachweis eines signifikant erniedrigten Gehaltes an gesättigten Fettsäuren (i. S.) in der PKU – Gruppe. Dieser jedoch nur geringe Unterschied könnte auf einen verminderten Konsum von tierischen Fetten zurückzuführen sein, ist aber in dieser Höhe klinisch nicht relevant. Eine ebenfalls leicht höhere Konzentration von einfach ungesättigten Fettsäuren ist in der PKU – Gruppe im Serum festzustellen. In der Gegenüberstellung der gemessenen Konzentrationen an mehrfach ungesättigten FS unterschieden die Gruppen sich nicht. Zusätzlich zur Analyse des Serum bezüglich der Fettmuster wurden die Fettsäuremuster aus der Erythrozytenmembran bestimmt. Vorteil dieser Methode ist, dass sich die gemessenen Konzentrationen auf einen bestimmten Zeitraum, nämlich auf die Vitalphase von ca. 120 Tagen eines Erythrozyten beziehen lassen.

Hierbei ließ sich im untersuchten Material kein Unterschied zwischen dem bestimmten Fettsäuremuster der PKU – Patienten und der Kontrollgruppe finden. Das Verhältnis $\omega - 3 / \omega - 6$ FS lag in beiden Gruppen in diesem Fall bei 1:3. Ein angegebenes Verhältnis aus der Literatur gibt es bei dieser Messmethode nicht.

Insgesamt lässt sich sagen, dass sich trotz der phenylalaninarmen Diät der Patienten mit PKU, welche ein Verzicht vor allem auf tierisches Fett mit sich bringt, die Fettsäureprofile zwischen den Gruppen nicht wesentlich voneinander unterschied und es nicht zu einem Mangel insbesondere der Omega – FS kam. Das könnte vor allem auch an einem Compliance – Mangel hinsichtlich der Diäteinhaltung der PKU – Patienten liegen. Mit Messung der Phenylalanin- und Tyrosinwerte wird die Einhaltung der Diät in der Behandlung der Patienten - und somit auch in dieser Studie - überwacht. Die Phenylalanin – Werte lagen während des gesamten Untersuchungszeitraumes allerdings im Normbereich (Zielwert/Normbereich für Phenylalanin in der untersuchten Altersgruppe: 0,7 – 20 mg/dl bei täglicher Einnahme ihrer Aminosäuremischungen), somit kann die Compliance als ausreichend bezeichnet werden [126]. Allerdings ist der genannte Normbereich für den Phenylalanin - Wert in der Bundesrepublik Deutschland im Vergleich zu dem in anderen Staaten relativ hoch. Beispielsweise gilt in den USA und Großbritannien ein empfohlener Normwert von 12 mg/dl bzw. 11,7 mg/dl.

5.3 Einfluss der Substitution von Omega - Fettsäuren auf Surrogatmarker der früharteriosklerotischen Aktivität und Thrombozytenaktivierung

Über den beschriebenen Vergleich hinaus wurde in einer zweiten Untersuchung eine Gruppe von PKU – Patienten untersucht, welche mit einem Omega – Fettsäure Mischpräparat substituiert wurde. Diese Gruppe wurde mit einer PKU – Population verglichen, welche die konventionell phenylalaninarme Diät erhielt. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass eine Substitution von Omega – FS die IMT und Thrombozytenaktivierung gegenüber der Gruppe der nicht substituierten nahezu nicht beeinflusst. Der IMT – Mittelwert (Mittelwert aus der IMT links + rechts) war in der Nicht – Substitutionsgruppe sogar signifikant ($p= 0,04$) niedriger. Hinsichtlich der Bestimmung der β – Stiffness und der Pulsalitätsindex – Messung gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppierungen. Auch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mittels durchflusszytometrische Thrombozytenanalyse bestimmt werden.

Erstaunlicherweise hatte die Substitution der Omega – Fettsäure Mischpräparate keinen Effekt auf die Fettsäureprofile: Es gab keine Unterschiede bezüglich der Fettsäureprofile im Serum, aber auch in der Erythrozytenmembran zwischen den Gruppen.

Der Effekt der Substitution mit Omega – Fettsäuren ist in den Messungen nicht nachweisbar. Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf eine mangelnde Compliance zurückzuführen, so dass die Substitutionspräparate nicht eingenommen wurden. Dagegen spricht allerdings ein signifikant erhöhter Tyrosin – Wert in der Substitutionsgruppe, was als Hinweis für eine gute Compliance zu werten ist. Ein anderer Grund für diese Beobachtung könnte in der Konzentration der Omega – FS in den Mischpräparate (durchschnittlicher Inhalt: 16,5 g Omega-6-FS und 4,43 g Omega-3-FS) zu finden sein. Möglicherweise ist dieser Gehalt zu gering. Eine andere mögliche Ursache könnte die fehlenden /geringere Verstoffwechslung dieser Präparaten sein oder die zu kurze Einnahmedauer.

5.4 Vergleich mit anderen Studien

Es gibt zahlreiche Studien, welche die Wirkung von Nahrungsfetten und -fettsäuren bezüglich der primären und sekundären Wirkung einer KHK untersuchten. So hat die so genannte Seven Country Study einen Zusammenhang zwischen Ernährung, insbesondere der Fettaufnahme und kardiovaskulären Ereignissen (Herzinfarkt) herstellen können [127]. Anfang der 70er Jahre wurden ein Zusammenhang zwischen der Zufuhr von langkettigen ω - 3 Fettsäuren und einer geringeren Häufigkeit von kardiovaskulären Ereignissen bei Eskimos [128] beobachtet.

Prospektive Kohortenstudien und randomisierte, kontrollierte Interventionsstudien sind zur Untersuchung der Wirksamkeit von Nahrungsfettsäuren bezüglich der Prävention der KHK nötig. Zahlreiche dieser Studien wurden in der Vergangenheit durchgeführt, in Übersichtsarbeiten dargestellt und diskutiert [129] [130] [131].

Einen besonderen Stellenwert wird in diesen Arbeiten den langkettigen ω - 3 Fettsäuren zugeschrieben, welche in Fisch vorhanden sind.

Es lässt sich eine inverse Beziehung zwischen Fischkonsum und Koronarsterblichkeit herstellen [132]. Prospektive Bevölkerungsstudien zeigen einen signifikanten Präventiveffekt bezüglich einer Koronarsterblichkeit (Tabelle 19) . Auch in mehreren Fall – Kontroll – Studien konnte dies bestätigt werden.

Kromhout et. al. [133] konnten zeigen, dass schon kleine Fischmengen das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bei Senioren um 50% gegenüber Personen, die kein Fisch essen, senken. Diese schützenden Effekte kleinerer Fischmahlzeiten sind jedoch erst nach längerer Zeit

nachweisbar – der Schutzeffekt bezüglich der Herztodrate sprach nach 5 Jahren an und eine deutliche Steigerung war schließlich erst innerhalb der letzten 12 Jahre zu beobachten. In der von uns durchgeführten Studie ist erstens der Substitutionszeitraum ein kleinerer und zweitens wurde ein industriell hergestelltes Mischpräparat eingenommen. Dies könnte möglicherweise für den mangelnden Effekt der Substitution in dieser Studie sein. Es könnte durchaus möglich sein, dass die Verstoffwechslung der genannten industriellen Mischpräparate eine andere als die des nativen Fisches ist. Möglicherweise war auch der Einnahmezeitraum der Präparate in unserer Studie zu kurz. Zu dem ist zu erwähnen, dass es sich bei der von uns durchgeführten Studie um eine punktuelle Messung handelt und nicht um eine Verlaufsbeobachtung wie in vielen anderen Studien.

Gestützt wird die Aussage, dass die Einnahme der Omega – Fettsäuren über einen kurzen Zeitraum zu keinem deutlichen Effekt führt, durch einige Studien. Kothny et. al [134] führten in diesem Zusammenhang eine Studie durch, in der sogar hoch dosierte Omega – 3 FS supplementiert wurden. Es zeigte sich hierbei kein kurzzeitiger Effekt.

Ebenfalls konnten Sacks et al. keinen Effekt durch die 2 jährige Gabe von industriell hergestellten Fischölkapseln an 59 Patienten nachweisen [135]. Möglicherweise könnte der mangelnde Effekt auf die Form der Zufuhr – industriell hergestellte Fischölkapseln und kein Fisch - zurückzuführen sein. Eine mögliche Erklärung, welche auf das Ergebnis unserer Studie ebenfalls übertragen werden kann, denn wie bereits erwähnt wurden auch in unserer Studie industrielle Mischpräparate verwendet.

Allerdings lässt sich das nicht eindeutig bestätigen, denn eine signifikante, wenn auch nur eine geringe Reduktion einer Arteriosklerose konnten von Schacky et. al. [136] in einer Studie nachgewiesen werden. In dieser wurden 223 Patienten mit Fischöl – Kapseln substituiert. Zunächst mit einer Dosis von 6g/Tag über 3 Monate und im Anschluss 3g/ Tag über 21 Monate. Kardiovaskuläre Ereignisse wurden seltener beobachtet.

Die so genannte Physicians' Health Study [137] konnte in diesem Kontext eine Risikominderung für einen plötzlichen Herztod für Patienten nachweisen, die mindestens einmal wöchentlich eine Fischmahlzeit zu sich genommen haben. Insgesamt verminderte sich das Risiko um 52 % im Vergleich zu Patienten, die weniger als einmal im Monat Fisch aßen. In dieser Studie konnte kein Einfluss bezüglich des Risiko ein Myokardinfarkt oder ein nicht – plötzlicher Herztod zu erleiden nachgewiesen werden. Auch konnte kein Zusammenhang zwischen Fischverzehr/ Omega – 3 FS und der kardiovaskulär – bedingten Mortalität hergestellt werden.

In der so genannten DART – Studie [138] wurden Reinfarkte und Herztod an Patienten untersucht, die bereits einen Herzinfarkt erlitten hatten. Durch Fischverzehr konnte die

Gesamtmortalität im Vergleich zu Patienten bei denen das Verhältnis PUFA/gesättigte Fettsäure auf 1.0 eingestellt wurde oder die einen erhöhten Ballaststoffanteil aufnahmen, gesenkt werden. Diese Studie konnte zeigen, dass bereits nach vierjähriger Diät eine deutliche Verminderung des Risikos für nicht – fatale Myokardinfarkte zu erzielen ist.

Eine indische Infarkt – Überlebensstudie [139] untersuchte den Einfluss von alpha-Linolensäure und EPA auf Mortalität und kardiale Parameter im akuten Infarktstadium im Placebovergleich. Hierbei konnte eine Reduktion der Rate an nichttödlichen Infarkten mit EPA und LNA erzielt werden. Die Myokardmortalität wurde ausschließlich durch EPA signifikant beeinflusst.

Eine in diesem Kontext weiter zu nennende Studie ist die italienische GISSI – Interventionsstudie [140]. Hierbei wurden 11.324 Patienten, welche 3 Monate zuvor einen Myokardinfarkt erlitten hatten, eingeschlossen und in verschiedene Gruppierungen eingeteilt. Eine Studien - Gruppe erhielt hierbei eine Substitution von Fischölkapseln (1 g/Tag omega – 3 – LCP), eine andere Population wurde mit Vit. E. substituiert und eine Gruppierung erhielt Vit. E. und Fischölkapseln. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Fischöl – Substitution als Sekundärprävention positive Effekte erzielt: Kardiovaskuläre Ereignisse waren in der Studiengruppe welche mit Fischölkapseln substituiert wurde seltener festzustellen, Mortalität und das Risiko an plötzlichen Herztod zu sterben sanken im Vergleich zu den anderen Gruppierungen deutlich. Zusammengefasst gesagt, erzielte die Omega – 3 FS Substitution in dieser Studie ein Schutz vor kardiovaskulären Ereignissen und Arrhythmien als Sekundärprophylaxe. Es handelte sich bei den letztgenannten Studien im Gegensatz zu der von uns durchgeführten Studie um Studien zur Sekundärprävention.

Die MRFIT – Studie ist eine Interventionsstudie zur Primärprävention und konnte allerdings einen signifikanten protektiven Effekt von Omega – 3 LCP zeigen [141]. Allerdings fand sich hierbei kein Effekt der LA (Linolsäure = ω - 6 FS) bezüglich der Mortalitätsrate, jedoch ein positiver Trend durch die Einnahme von LNA (Alpha- Linolensäure = ω - 3 FS).

Bei Betrachtung dieser Studie und der anderen genannten Studien zur Sekundärprävention zeigt sich eine Entwicklungsverzögerung/-verhinderung letztendlich der Arteriosklerose, sowie eine Senkung des Risikos einen plötzlichen Herztod zu erleiden durch die Einnahme von 0,5 – 1 g/d.

Die folgende Übersicht zeigt Studien zum Einfluss von ω - 3 FS auf KHK und Koronarsterblichkeit (nach Metz Omega - 3 Fettsäuren eine Standortbestimmung zum Millennium). Es lassen sich positive Studien, aber auch negative Studien bezüglich einer Wirkung von v.a. Omega – 3 Fettsäuren auf das Fortschreiten einer Arteriosklerose finden.

Studie	Typ	Personen	Endpunkt	Ergebnis	Literatur
Zutphen	KS	852	tödlicher MI	+	142
Rotterdam	KS	272	tödlicher MI	+	143
Schweden	KS	10966	tödlicher MI	+	144
USA	KS	20551	tödlicher MI	+	145
Bergen	KS	11000	KHK/Mortalität	-	146
Hawai	KS	7615	KHK/Mortalität	-	147
USA	KS	44895	KHK/Mortalität	-	148
Chicago	KS	1822	tödlicher MI	+	149
Seattle	FKS	827	Primärer Herzstillstand	+	150
Norditalien	FKS	287	tödlicher MI	+	151
Edinburgh	FKS	650	AP	+	152
			MI	-	
DART	IVSP	2033	tödlicher MI	+	153
Lyon	IVSP	600	tödlicher MI	+	154, 155
Indien	IVSP	242	tödlicher MI	+	156
GISSI	IVSP	11324	KHK, tödlicher MI	+	157
MRFIT	IVPP	12866	Tödlicher MI	+	158

Tabelle 19: Studien zum Einfluss von ω - 3 FS auf KHK und Koronarsterblichkeit über die Nahrung (nach Metz, G. (2000). "Omega-3-Fettsäuren. Eine Standortbestimmung zum Millenium." Forum Medizin, Stockdorf – [134]): + für positiven Effekt, - für negativen Effekt; KS = Kohortenstudie, FKS = Fall – Kontroll – Studie, IVSP = Interventionsstudie zur Sekundärprävention, IVPP = Interventionsstudie zur Primärprävention.

Zusammengefasst lässt sich bei Betrachtung der Studienlage sagen, dass zahlreiche Studien kritisch zu betrachten sind. Methodische Schwächen wie die unterschiedliche Ernährungsweisen, das Fehlen von vergleichbaren Kontrollgruppen und Störfaktoren werden oft nicht ausreichend berücksichtigt. Dies trifft insbesondere für ältere Studien zu.

Im Vergleich unserer Studie mit anderen Studien zum Thema, muss auch beachtet werden, dass es sich bei unserer Studienpopulation um Patienten der Stoffwechselkrankheit PKU handelt. Die Studienpopulation der anderen Studien sind grundsätzlich Nicht – PKU erkrankte.

Gerade unsere Studienpopulation eignet sich sehr gut für eine Untersuchung bezüglich der Auswirkung von Omega – Fettsäuren. Das Risikoprofil der Patientengruppe hinsichtlich früharteriosklerotischen Veränderungen, wie eine Hypercholesterinämie und auch die Ernährung

mit tierischem Fetten ist sehr gering. Es ist ein sehr gutes Modell um den isolierten Einfluss von Omega – Fettsäuren bezüglich Arteriosklerose untersuchen zu können.

Das junge Durchschnittsalter birgt hierbei keine besondere Problematik. Tuzcu et al. [159] konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass sich früharteriosklerotische Veränderungen schon bei jungen Individuen finden lassen.

Die von uns durchgeführte vorliegende Studie könnte als Grundlage für eine Follow – up Studie dienen, die nach einem gewissen Zeitraum alle früharteriosklerotischen Surrogatmarker und die Thrombozytenfunktion erneut untersucht. Das hätte den Vorteil, dass man eine

Verlaufsbeobachtung über mehrere Jahre der gemessenen Parameter zu Verfügung hätte.

Wünschenswert wäre zudem ein zuverlässigerer Marker als die Phenylalanin-/ Tyrosinspiegel zur Kontrolle der Compliance hinsichtlich der Diät. Da aufgrund unserer Ergebnisse kein positiver Effekt der Substitution mit Omega – FS nachgewiesen werden konnte, kann zu diesem Zeitpunkt diese derzeit nicht allgemein empfohlen werden.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie untersuchte erstmalig das Risiko für früharteriosklerotische Veränderungen sowie die Thrombozytenfunktion bei Patienten mit Phenylketonurie. Als Surrogatmarker für früharteriosklerotische Veränderungen dienten die Intimamediadicke (IMT), der Pulsatilitätsindex (PI), sowie der β – Stiffness-Index der Arterie carotis communis. Zudem wurde der Einfluss der Substitution von Omega – FS auf diese Surrogatmarker und die Thrombozytenfunktion untersucht.

Es konnten keine früharteriosklerotischen Veränderungen bei diesen Patienten nachgewiesen werden. Die gemessenen Surrogatmarkern (IMT, PI oder β – Stiffness – Index) waren im Vergleich zur Kontrollgruppe bei PKU Patienten nicht erhöht. Auch zeigte sich keine gesteigerte Thrombozytenaktivierung bei den PKU - Patienten. Die Fettsäuremuster im Serum der PKU Patienten unterschieden sich hinsichtlich der Konzentrationen der Omega – 3 und 6 - Fettsäuren nicht im Vergleich zur Kontrollgruppe, trotz der phenylalaninarmen Diät und damit Verzicht auf Fischprodukte. Die gesättigten Fettsäuren (i. S.) waren im Vergleich signifikant vermindert, die einfach ungesättigten Fettsäuren (i.S.) dagegen signifikant erhöht bei den PKU Patienten. Dies könnte ein Hinweis auf eine vorwiegend durch pflanzliche Fette basierende Versorgung mit Fettsäuren sein. Das Fettsäuremuster gemessen in der Erythrozytenmembran zeigte überhaupt keine signifikanten Unterschiede.

Auch eine Substitution mit einem Gemisch von Omega -3 und Omega – 6 FS zeigte keinen positiven Effekt weder auf die arteriosklerotischen Surrogatmarkern noch auf die Plättchenaktivierung. Erstaunlicherweise schlug sich diese auch nicht auf das Fettsäure – Profil nieder. Es konnte kein unterschiedliches Verhältnis Omega 3/Omega 6 Fettsäuren zwischen der Substitutionsgruppe und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Aufgrund der von uns gefundenen Ergebnisse konnte in der PKU Gruppe kein Hinweis für eine erhöhte arteriosklerotische Aktivität gefunden werden. Eine Substitution von Omega- 3 bzw. 6 Fettsäuren kann demnach für diese Patienten derzeit nicht allgemein empfohlen werden, da kein günstiger Effekt nachgewiesen werden konnte. Limitierend an der von uns durchgeführten Studie ist natürlich, dass sie eine punktuelle Messung darstellt.

Verlaufsbeobachtungen über mehrere Jahre dieser Messungen wären für die Zukunft wünschenswert zur definitiven Klärung, ob die Substitution mit Fettsäuren einen günstigen Effekt auf diese gemessene Surrogatmarker und insbesondere auf das kardiovaskuläre Risiko haben.

7 Literaturverzeichnis

- 1 (1976). "American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition: special diets for infants with inborn errors of amino acid metabolism." Pediatrics **57**(5): 783-92.
- 2 Young, V. R. and P. L. Pellett (1987). "Protein intake and requirements with reference to diet and health." Am J Clin Nutr **45**(5 Suppl): 1323-43.
- 3 Thony, B., Z. Ding, et al. (2004). "Tetrahydrobiopterin protects phenylalanine hydroxylase activity in vivo: implications for tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia." FEBS Lett **577**(3): 507-11.
- 4 Kaufman, S. (1963). "The Structure of the Phenylalanine-Hydroxylation Cofactor." Proc Natl Acad Sci U S A **50**: 1085-93..
- 5 Monch, E., J. Kneer, et al. (1990). "Examination of urine metabolites in the newborn period and during protein loading tests at 6 months of age--Part 1." Eur J Pediatr **149** Suppl 1: S17-24.
- 6 Lidsky, A. S., M. L. Law, et al. (1985). "Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(18): 6221-5.
- 7 Mönch, E. J. (2003). "Kommunikation zwischen Partnern. Phenylketonurie/Galaktosämie. Düsseldorf: Bundesarbeitsgemeinschaft „Hilfe für Behinderte e.V.“.
- 8 Harms, E., U. Wendel (2001) Störungen des Stoffwechsels von Aminosäuren und organischen Säuren, 341 in: Lentze, M.J., Schulte, F.J., Schaub, J., Spranger, J.: Pädiatrie: Grundlagen und Praxis; Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio, Springer
- 9 Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria (1993), Phenylketonuria due to phenylalanine hydroxylase deficiency: an unfolding story BMJ, **306** (6870), 115-9.
- 10 Daniel, P. M., S. R. Moorhouse, et al. (1976). "Amino acid precursors of monoamine neurotransmitters and some factors influencing their supply to the brain." Psychol Med **6**(2): 277-86.
- 11 Hommes, F. A. (1989). "The role of the blood-brain barrier in the aetiology of permanent brain dysfunction in hyperphenylalaninaemia." J Inherit Metab Dis **12**(1): 41-6.
- 12 Sourkes, T.L. (1974). "Effect of alpha-methyl-tryptophan on tryptophan, 5 – hydroxy-tryptamine and protein metabolism in the brain". In: Aromatic Amino Acids in Brain. Ciba Foundation Symposium 22 (New Series) Elsevier, Amsterdam, pp. 361-378
- 13 Bickel, H., J. Gerrard, et al. (1954). "The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenyl-ketonuric child." Acta Paediatr **43**(1): 64-77.

- 14 Pietz, J. (1998). "Neurological aspects of adult phenylketonuria." Curr Opin Neurol **11**(6): 679-88.
- 15 Guthrie, R. (1961). "Blood screening for phenylketonuria." [letter] JAMA, **25**, 178(8), 863
- 16 Smith, I., M. G. Beasley, et al. (1991). "Effect on intelligence of relaxing the low phenylalanine diet in phenylketonuria." Arch Dis Child **66**(3): 311-6.
- 17 Bickel, H., J. Gerrard, et al. (1954). "The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenyl-ketonuric child." Acta Paediatr **43**(1): 64-77.
- 18 Mönch, E. J., et al. (2002). "Diagnostik und Therapie angeborener Stoffwechselstörungen." SPS Verlagsgesellschaft, Heilbronn.
- 19 Burgard, P., H. J. Bremer, et al. (1999). "Rationale for the German recommendations for phenylalanine level control in phenylketonuria 1997." Eur J Pediatr **158**(1): 46-54.
- 20 Weglage, J. (2002). "Diätbehandlung bei Phenylketonurie." Hofgreffe Verlag GmbH + Co.
- 21 Dyerberg, J., H. O. Bang, et al. (1975). "Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos." Am J Clin Nutr **28**(9): 958-66.
- 22 Renaud, S., M. de Lorgeril, et al. (1995). "Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease." Am J Clin Nutr **61**(6 Suppl): 1360S-1367S.
- 23 Williams, S., M. Miller, et al. (2008) "Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives." Atherosclerosis **197**(1):12-24.
- 24 Bang, H. O., J. Dyerberg, et al. (1971). "Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos." Lancet **1**(7710): 1143-5.
- 25 Kromhout, D., E. B. Bosschieter, et al. (1985). "The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease." N Engl J Med **312**(19): 1205-9.
- 26 The Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group (1990) mortality rates after 10,5 years for participants in the multiple risk factor intervention trial: findings related to a priori hypotheses of the trial. J. AM. Med. Ass. **263**, 1795-1801. [Erratum. JAMA **263** (1990), 3151]
- 27 Ascherio, A., E. B. Rimm, et al. (1995). "Dietary intake of marine n-3 fatty acids, fish intake, and the risk of coronary disease among men." N Engl J Med **332**(15): 977-82.
- 28 Morris, M. C., J. E. Manson, et al. (1995). "Fish consumption and cardiovascular disease in the physicians' health study: a prospective study." Am J Epidemiol **142**(2): 166-75.
- 29 Metz, G. (2000). "Omega – 3 – Fettsäuren: eine Standortbestimmung zum Millenium." – Stockdorf: Forum Medizin-Verl.-Ges., 2000, ISBN 3-910075-38-X
- 30 Marchioli, R. (2003). "[Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases]." Minerva Cardioangiol **51**(5): 561-76.

- 31 (1999). "Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico." Lancet **354**(9177): 447-55.
- 32 Rissanen, T., S. Voutilainen, et al. (2000). "Fish oil-derived fatty acids, docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid, and the risk of acute coronary events: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study." Circulation **102**(22): 2677-9.
- 33 Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." Nature **362**(6423): 801-9.
- 34 Libby, P. (2000). "Changing concepts of atherogenesis." J Intern Med **247**(3): 349-58.
- 35 Kaminski, W. E., E. Jendraschak, et al. (1993). "Dietary omega-3 fatty acids lower levels of platelet-derived growth factor mRNA in human mononuclear cells." Blood **81**(7): 1871-9.
- 36 Baumann, K. H., F. Hessel, et al. (1999). "Dietary omega-3, omega-6, and omega-9 unsaturated fatty acids and growth factor and cytokine gene expression in unstimulated and stimulated monocytes. A randomized volunteer study." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(1): 59-66.
- 37 Simopoulos, A. P. (1997). "Omega-3 fatty acids in the prevention-management of cardiovascular disease." Can J Physiol Pharmacol **75**(3): 234-9.
- 38 Stankevicius, E., E. Kevelaitis, et al. (2003). "[Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors]." Medicina (Kaunas) **39**(4): 333-41.
- 39 Simon, B. C., B. Noll, et al. (1999). "[Endothelial dysfunction--assessment of current status and approaches to therapy]." Herz **24**(1): 62-71.
- 40 Wever, R. M., T. F. Luscher, et al. (1998). "Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase." Circulation **97**(1): 108-12.
- 41 Henzen, C.H. (1995). "Fischöl – heilsame Quintessenz der Eskimodiät?" Schweiz Rundsch Med Praxis **84**: 11-13.
- 42 Drevon, C. A. (1992). "Marine oils and their effects." Nutr Rev **50**(4 (Pt 2)): 38-45.
- 43 Thorngren, M. and A. Gustafson (1981). "Effects of 11-week increases in dietary eicosapentaenoic acid on bleeding time, lipids, and platelet aggregation." Lancet **2**(8257): 1190-3.
- 44 von Schacky, C. (1987). "Prophylaxis of atherosclerosis with marine omega-3 fatty acids. A comprehensive strategy." Ann Intern Med **107**(6): 890-9.
- 45 Johansen, O., I. Seljeflot, et al. (1999). "The effect of supplementation with omega-3 fatty acids on soluble markers of endothelial function in patients with coronary heart disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(7): 1681-6.

- 46 Crawford, M.A., P.A. Stevens (1981). "Essential fatty acids, diet and heart disease." in: New trends in nutrition, lipid research and cardiovascular diseases, Publisher: AR Liss 217 - 228.
- 47 (1999). "Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico." Lancet **354**(9177): 447-55.
- 48 Kobayashi, S., A. Hirai, et al. (1981). "Reduction in blood viscosity by eicosapentaenoic acid." Lancet 2(8239): 197.
- 49 Appel, L. J., E. R. Miller, 3rd, et al. (1993). "Does supplementation of diet with 'fish oil' reduce blood pressure? A meta-analysis of controlled clinical trials." Arch Intern Med **153**(12): 1429-38.
- 50 Morris, M. C., F. Sacks, et al. (1993). "Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials." Circulation **88**(2): 523-33.
- 51 Bao, D. Q., T. A. Mori, et al. (1998). "Effects of dietary fish and weight reduction on ambulatory blood pressure in overweight hypertensives." Hypertension **32**(4): 710-7.
- 52 Harris, W. S. (1999). "Nonpharmacologic treatment of hypertriglyceridemia: focus on fish oils." Clin Cardiol **22**(6 Suppl): II40-3.
- 53 Drevon, C. A. (1992). "Marine oils and their effects." Nutr Rev 50(4 (Pt 2)): 38-45.
- 54 Singer, P. (1994). "Was sind, wie wirken Omega-3-Fettsäuren?" Frankfurt/M, Umschau Zeitschriftenverlag Breidenstein GmbH
- 55 Schmidt E.B. (1997). "n-3 fatty acids and the risk of coronary heart disease. " Dan Med Bull **44**(1): 1-22.
- 56 Simopoulos, A. P. (1997). "Omega-3 fatty acids in the prevention-management of cardiovascular disease." Can J Physiol Pharmacol **75**(3): 234-9.
- 57 Nestel, P. J. (2000). "Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function." Am J Clin Nutr **71**(1 Suppl): 228S-31S.
- 58 Harris, W. S., G. Lu, et al. (1997). "Influence of n-3 fatty acid supplementation on the endogenous activities of plasma lipases." Am J Clin Nutr **66**(2): 254-60.
- 59 Harris, W. S. (1989). "Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review." J Lipid Res **30**(6): 785-807.
- 60 Nestel, P. J. (2000). "Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function." Am J Clin Nutr 71(1 Suppl): 228S-31S.
- 61 Nettleton, J.A. (1995). "Omega-3 fatty acids and heart disease." in: Nettleton, J.A. (ed) "Omega-3 fatty acids and health." New York, Chapman und Hall

- 62 Wiklund, O., B. Angelin, et al. (1990). "Apolipoprotein(a) and ischaemic heart disease in familial hypercholesterolaemia." Lancet **335**(8702): 1360-3.
- 63 Schmidt, E. B., I. C. Klausen, et al. (1991). "The effect of ω -3 fatty acids on lipoprotein(a)." World Rev. Nutr. Diet. **66**, 529 (abstract).
- 64 Herrmann, W., J. Biermann, et al. (1995). "Comparison of effects of N-3 to N-6 fatty acids on serum level of lipoprotein(a) in patients with coronary artery disease." Am J Cardiol **76**(7): 459-62.
- 65 Hahn, A., A. Ströhle, et al. (2002). "Wirkstoffe funktioneller Lebensmittel in der Prävention der Arteriosklerose." Ernährungs - Umschau **49**;5: 175.
- 66 Gawaz, M. (1999). "Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung." Stuttgart; New York: Thieme.
- 67 Gawaz, M., F. J. Neumann, et al. (1999). "Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy." Circulation **99**(1): E1-E11.
- 68 Furie, B. and B. C. Furie (1995). "The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1." Thromb Haemost **74**(1): 224-7.
- 69 Konstantopoulos, K., T. W. Chow, et al. (1997). "Shear stress-induced binding of von Willebrand factor to platelets." Biorheology **34**(1): 57-71.
- 70 Gawaz, M. P., J. C. Loftus, et al. (1991). "Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIB-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions." J Clin Invest **88**(4): 1128-34.
- 71 Ruggeri, Z. M. (1994). "New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation." Semin Hematol **31**(3): 229-39.
- 72 Clemetson, K. J. (1988). "Biochemistry of platelet membrane glycoproteins." Prog Clin Biol Res **283**: 33-75.
- 73 Clemetson, K. J. (1997). "Platelet GPIb-V-IX complex." Thromb Haemost **78**(1): 266-70.
- 74 Ruggeri, Z. M. (1991). "The platelet glycoprotein Ib-IX complex." Prog Hemost Thromb **10**: 35-68.
- 75 Pytela, R., M. D. Pierschbacher, et al. (1986). "Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp--specific adhesion receptors." Science **231**(4745): 1559-62.
- 76 Bennett, J. S., S. J. Shattil, et al. (1988). "Interaction of fibrinogen with its platelet receptor. Differential effects of alpha and gamma chain fibrinogen peptides on the glycoprotein IIb-IIIa complex." J Biol Chem **263**(26): 12948-53.

- 77 Ginsberg, M. H., A. L. Frelinger, et al. (1990). "Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of membrane glycoprotein IIb-IIIa with conformation-specific monoclonal antibodies." Blood 76(10): 2017-23.
- 78 Calvete, J. J., W. Schafer, et al. (1992). "Localization of the cross-linking sites of RGD and KQAGDV peptides to the isolated fibrinogen receptor, the human platelet integrin glycoprotein IIb/IIIa. Influence of peptide length." Eur J Biochem 206(3): 759-65.
- 79 Ruggeri, Z. M. (1991). "The platelet glycoprotein Ib-IX complex." Prog Hemost Thromb 10: 35-68.
- 80 Ott, I., F. J. Neumann, et al. (1996). "Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina." Circulation 94(6): 1239-46.
- 81 Holmsen, H. (1994). "Significance of testing platelet functions in vitro." Eur J Clin Invest 24 Suppl 1: 3-8.
- 82 Dunlop, L. C., M. P. Skinner, et al. (1992). "Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein." J Exp Med 175(4): 1147-50.
- 83 Klaus, A. (1999). "Arteriosklerose." in: TIM, Thiemes Innere Medizin. 1. Aufl. Stuttgart; New York, Thieme 1999; 6-8.
- 84 Creutzig, A. (1994). "Chronische arterielle Verschlusskrankheit der Extremitäten (AVK)." in: Classen M, Diehl V, Kochsiek K (Hrsg.): Innere Medizin. 3. Aufl. München - Wien - Baltimore; Urban & Schwarzenberg, 1994; 1021-1031.
- 85 Pignoli, P., E. Tremoli, et al. (1986). "Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging." Circulation 74(6): 1399-406.
- 86 O'Leary, D. H. and J. F. Polak (2002). "Intima-media thickness: a tool for atherosclerosis imaging and event prediction." Am J Cardiol 90(10C): 18L-21L..
- 87 Ebrahim, S., O. Papacosta, et al. (1999). "Carotid plaque, intima media thickness, cardiovascular risk factors, and prevalent cardiovascular disease in men and women: the British Regional Heart Study." Stroke 30(4): 841-50.
- 88 Wikstrand, J. and I. Wendelhag (1994). "Methodological considerations of ultrasound investigation of intima-media thickness and lumen diameter." J Intern Med 236(5): 555-9.
- 89 Barenbrock, M. et al. (1994). "Nachweis hochdruckbedingter Gefäßveränderungen durch Ultraschall." Münch Med Wochenschrift 136: 723-727/136: 723-727.
- 90 Pignoli, P., E. Tremoli, et al. (1986). "Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging." Circulation 74(6): 1399-406
- 91 Ranke, M. et al. (1995). "Angiology update." Med Klinik 15;94(5):251-63.

- 92 Glasser, S. P. (2000). "On arterial physiology, pathophysiology of vascular compliance, and cardiovascular disease." Heart Dis **2**(5): 375-9.
- 93 Reneman, R. S., T. van Merode, et al. (1986). "Cardiovascular applications of multi-gate pulsed Doppler systems." Ultrasound Med Biol **12**(5): 357-70.
- 94 O'Rourke, M. (1990). "Coupling between the left ventricle and arterial system in hypertension." Eur Heart J **11 Suppl G**: 24-8.
- 95 Darne, B., X. Girerd, et al. (1989). "[Electric left ventricular hypertrophy and pulsatile component of arterial pressure in a population study]." Arch Mal Coeur Vaiss **82**(3): 299-303.
- 96 Hodis, H. N. and W. J. Mack (2002). "Atherosclerosis imaging methods: assessing cardiovascular disease and evaluating the role of estrogen in the prevention of atherosclerosis." Am J Cardiol **89**(12A): 19E-27E; discussion 27E.
- 97 Burke, G. L., G. W. Evans, et al. (1995). "Arterial wall thickness is associated with prevalent cardiovascular disease in middle-aged adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study." Stroke **26**(3): 386-91..
- 98 Chambless, L. E., G. Heiss, et al. (1997). "Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993." Am J Epidemiol **146**(6): 483-94.
- 99 Homma, S., N. Hirose, et al. (2001). "Carotid plaque and intima-media thickness assessed by b-mode ultrasonography in subjects ranging from young adults to centenarians." Stroke **32**(4): 830-5.
- 100 Glasser, S. P. (2000). "On arterial physiology, pathophysiology of vascular compliance, and cardiovascular disease." Heart Dis **2**(5): 375-9
- 101 Shattil, S. J., M. Cunningham, et al. (1987). "Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry." Blood **70**(1): 307-15.
- 102 Faraday, N., P. Goldschmidt-Clermont, et al. (1994). "Quantitation of soluble fibrinogen binding to platelets by fluorescence-activated flow cytometry." J Lab Clin Med **123**(5): 728-40.
- 103 Ginsberg, M. H., A. L. Frelinger, et al. (1990). "Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of membrane glycoprotein IIb-IIIa with conformation-specific monoclonal antibodies." Blood **76**(10): 2017-23.
- 104 Ruf, A. and H. Patscheke (1995). "Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression." Semin Thromb Hemost **21**(2): 146-51.
- 105 Harrison, P. and E. M. Cramer (1993). "Platelet alpha-granules." Blood Rev **7**(1): 52-62.
- 106 Metzelaar, M. J. and H. C. Clevers (1992). "Lysosomal membrane glycoproteins in platelets." Thromb Haemost **68**(4): 378-82.

- 107 Metzelaar, M. J., P. L. Wijngaard, et al. (1991). "CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells." J Biol Chem **266**(5): 3239-45.
- 108 Ault, K.A. et al. (1992). "Analysis of platelets." in: Laerum OD, Bjerknes R (Hrsg.): Flow cytometry in hematology. London - San Diego - New York; Academic Press, 153-16.
- 109 Kastelein, J. J., E. de Groot, et al. (2004). "Atherosclerosis measured by B-mode ultrasonography: effect of statin therapy on disease progression." Am J Med **116 Suppl 6A**: 31S-36S.
- 110 Burke, G. L., G. W. Evans, et al. (1995). "Arterial wall thickness is associated with prevalent cardiovascular disease in middle-aged adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study." Stroke **26**(3): 386-91.
- 111 Chambless, L. E., G. Heiss, et al. (1997). "Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993." Am J Epidemiol **146**(6): 483-94.
- 112 Geroulakos, G., D. O'Gorman, et al. (1994). "Carotid intima-media thickness: correlation with the British Regional Heart Study risk score." J Intern Med **235**(5): 431-3.
- 113 Hodis, H. N., W. J. Mack, et al. (1998). "The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events." Ann Intern Med **128**(4): 262-9.
- 114 Salonen, R. and J. T. Salonen (1991). "Determinants of carotid intima-media thickness: a population-based ultrasonography study in eastern Finnish men." J Intern Med **229**(3): 225-31.
- 115 Hulthe, J., J. Wikstrand, et al. (1997). "Atherosclerotic changes in the carotid artery bulb as measured by B-mode ultrasound are associated with the extent of coronary atherosclerosis." Stroke **28**(6): 1189-94.
- 116 O'Leary, D. H. and J. F. Polak (2002). "Intima-media thickness: a tool for atherosclerosis imaging and event prediction." Am J Cardiol **90**(10C): 18L-21L.
- 117 Herrington, D. M., W. V. Brown, et al. (2004). "Relationship between arterial stiffness and subclinical aortic atherosclerosis." Circulation **110**(4): 432-7.
- 118 Abrams, C. S., N. Ellison, et al. (1990). "Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans." Blood **75**(1): 128-38.
- 119 Li, N., A. H. Goodall, et al. (1997). "A sensitive flow cytometric assay for circulating platelet-leucocyte aggregates." Br J Haematol **99**(4): 808-16.
- 120 Marti, G. E., L. Magruder, et al. (1988). "Flow cytometric analysis of platelet surface antigens." Cytometry **9**(5): 448-55.
- 121 Michelson, A. D., M. R. Barnard, et al. (2000). "Evaluation of platelet function by flow cytometry." Methods **21**(3): 259-70.

- 122 Redlich, H., J. Vickers, et al. (1997). "Formation of platelet-leukocyte conjugates in whole blood." Platelets **8**(6): 419-25.
- 123 Gawaz, M., F. J. Neumann, et al. (1999). "Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy." Circulation **99**(1): E1-E11.
- 124 Ruf, A. and H. Patscheke (1995). "Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression." Semin Thromb Hemost **21**(2): 146-51.
- 125 Shattil, S. J., M. Cunningham, et al. (1987). "Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry." Blood **70**(1): 307-15.
- 126 Bremer, H.J., P. Bürdel, et al. (1997). "Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS)." Monatsschr Kinderheilkunde **145**: 961-962.
- 127 Keys, A. (1997). "Coronary heart disease in seven countries. 1970." Nutrition **13**(3): 250-2; discussion 249, 253.
- 128 Dyerberg, J., H. O. Bang, et al. (1975). "Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos." Am J Clin Nutr **28**(9): 958-66.
- 129 Stamler, J. and R. Shekelle (1988). "Dietary cholesterol and human coronary heart disease. The epidemiologic evidence." Arch Pathol Lab Med **112**(10): 1032-40.
- 130 Truswell, A. S. (1994). "Review of dietary intervention studies: effect on coronary events and on total mortality." Aust N Z J Med **24**(1): 98-106.
- 131 Caggiula, A. W. and V. A. Mustad (1997). "Effects of dietary fat and fatty acids on coronary artery disease risk and total and lipoprotein cholesterol concentrations: epidemiologic studies." Am J Clin Nutr **65**(5 Suppl): 1597S-1610S.
- 132 Metz, G. (2000). "Omega-3-Fettsäuren. Eine Standortbestimmung zum Millenium." Forum Medizin, Stockdorf
- 133 Kromhout, D., E. J. Feskens, et al. (1995). "The protective effect of a small amount of fish on coronary heart disease mortality in an elderly population." Int J Epidemiol **24**(2): 340-5.
- 134 Kothny, W., P. Angerer, et al. (1998). "Short term effects of omega-3 fatty acids on the radial artery of patients with coronary artery disease." Atherosclerosis **140**(1): 181-6.
- 135 Sacks, F. M., P. H. Stone, et al. (1995). "Controlled trial of fish oil for regression of human coronary atherosclerosis. HARP Research Group." J Am Coll Cardiol **25**(7): 1492-8.

- 136 von Schacky, C., P. Angerer, et al. (1999). "The effect of dietary omega-3 fatty acids on coronary atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Ann Intern Med **130**(7): 554-62.
- 137 Albert, C. M., C. H. Hennekens, et al. (1998). "Fish consumption and risk of sudden cardiac death." Jama **279**(1): 23-8.
- 138 Burr, M. L., A. M. Fehily, et al. (1989). "Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART)." Lancet **2**(8666): 757-61.
- 139 Singh, R. B., M. A. Niaz, et al. (1997). "Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival--4." Cardiovasc Drugs Ther **11**(3): 485-91.
- 140 (1999). "Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico." Lancet **354**(9177): 447-55.
- 141 Dolecek, T. A. and G. Granditis (1991). "Dietary polyunsaturated fatty acids and mortality in the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT)." World Rev Nutr Diet **66**: 205-16.
- 142 Ascherio, A., E. B. Rimm, et al. (1995). "Dietary intake of marine n-3 fatty acids, fish intake, and the risk of coronary disease among men." N Engl J Med **332**(15): 977-82.
- 143 Kromhout, D., E. J. Feskens, et al. (1995). "The protective effect of a small amount of fish on coronary heart disease mortality in an elderly population." Int J Epidemiol **24**(2): 340-5.
- 144 Norell, S. E., A. Ahlbom, et al. (1986). "Fish consumption and mortality from coronary heart disease." Br Med J (Clin Res Ed) **293**(6544): 426
- 145 Albert, C. M., C. H. Hennekens, et al. (1998). "Fish consumption and risk of sudden cardiac death." Jama **279**(1): 23-8.
- 146 S. E. Vollset, I. Heuch et al. (1985). "Fish consumption and mortality from coronary heart disease (letter)" N Engl J Med **313**, 820-821.
- 147 Curb, J.D., D. M. Reed (1985): "Fish consumption and mortality from coronary heart disease." N Engl J Med **313** (13): 821 - 822
- 148 Ascherio, A., E. B. Rimm, et al. (1995). "Dietary intake of marine n-3 fatty acids, fish intake, and the risk of coronary disease among men." N Engl J Med **332**(15): 977-82.
- 149 Daviglius, M. L., J. Stamler, et al. (1997). "Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction." N Engl J Med **336**(15): 1046-53.

- 150 Siscovick, D. S., T. E. Raghunathan, et al. (1995). "Dietary intake and cell membrane levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest." Jama **274**(17): 1363-7.
- 151 Gramenzi, A., A. Gentile, et al. (1990). "Association between certain foods and risk of acute myocardial infarction in women." Bmj **300**(6727): 771-3.
- 152 Wood, D. A., R. A. Riemersma, et al. (1987). "Linoleic and eicosapentaenoic acids in adipose tissue and platelets and risk of coronary heart disease." Lancet **1**(8526): 177-83.
- 153 Burr, M. L., A. M. Fehily, et al. (1989). "Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART)." Lancet **2**(8666): 757-61.
- 154 de Lorgeril, M., S. Renaud, et al. (1994). "Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease." Lancet **343**(8911): 1454-9.
- 155 de Lorgeril, M., P. Salen, et al. (1999). "Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study." Circulation **99**(6): 779-85.
- 156 Singh, R. B., M. A. Niaz, et al. (1997). "Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival--4." Cardiovasc Drugs Ther **11**(3): 485-91.
- 157 (1999). "Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico." Lancet **354**(9177): 447-55.
- 158 (1990). "Mortality rates after 10.5 years for participants in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. Findings related to a priori hypotheses of the trial. The Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group." Jama **263**(13): 1795-801.
- 159 Tuzcu E.M. S.R. Kapadia et al. (2001). "High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound." Circulation **103**(22):2705-10

8 Anhang

I. Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ACC	Arteria Carotis Communis
ADP	Adenosindiphosphat
Art.	Arteria
ASS	Acetylsalicylsäure
BH4	Tetrahydrobiopterin
BMI	Body mass index
B-Mode	Brightness mode
CD	Cluster of Differentiation
DHA	Docosahexaensäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPA	Eicosapentaensäure
EUF	einfach – ungesättigte Fettsäuren
Fa.	Firma
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fall – Kontroll – Studie
FS	Fettsäuren
FSC	Forward Light Scatter
GP	Glykoprotein
HB	Hämoglobin
HDL	High Density Lipoprotein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IMT	Intima - Media Thickness
IVPP	Interventionsstudie zur Primärprävention
IVSP	Interventionsstudie zur Sekundärprävention,
KHK	Koronare Herzkrankheit
KS	Kohortenstudie
LCP	long-chain-polyunsaturated
LDL	Low density lipoprotein
LIBS	Ligandeninduzierte Bindungsstelle
LIMP	Lysosomale integrale Membranproteine

LNA	Alpha-Linolensäuren
Lp(a)	Lipoprotein(a)
LTB4	Leukotriene B4
MCP-1	Monocyte chemoattractant Protein-1
MIF	Mittlere Immunfluoreszenz
MUF	mehrfach – ungesättigten Fettsäuren
n.b.	nicht bestimmt
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Platelet – activating – factor
PAF	Paraaminoformaldehyd
PAH	Phenylalaninhydroxylase
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PF4	Plättchen-Faktor 4
PI	Pulsalitätsindex
PKU	Phenylketonurie
PUFA	Poly unsaturated fatty acids = Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RR	Riva-Rocci
s.o.	siehe oben
SCS	Surface connected system
SEM	Standard error of the mean
SSC	Sideward Light Scatter
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
u.a.	unter anderen
VLDL	Very low density lipoprotein
VWF	von-Willebrand-Faktor (vWF)

II. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1- Phenylalanin Stoffwechsel: Abbau überschüssiges Phenylalanin zu Tyrosin. Bei Störung wird Phenylalanin in die normalerweise nicht vorkommende Phenylbrenztraubensäure (grau) umgewandelt (=alternativer Stoffwechselweg) abgewandelt aus Mönch, E. J. (2003) „Kommunikation zwischen Partnern. Phenylketonurie/ Galaktosämie.“ Düsseldorf: Bundesarbeitsgemeinschaft „Hilfe für Behinderte e.V.“ [7].
- Abbildung 2- Diätische Behandlung der PKU: Die Diät erfolgt mittels eines phenylalaninfreien, tyrosinangereicherten Aminosäuren (AS) – Gemisches nach Mönch, E. J. (2003) „Kommunikation zwischen Partnern. Phenylketonurie/Galaktosämie.“ Düsseldorf: Bundesarbeitsgemeinschaft „Hilfe für Behinderte e.V.“ [7].
- Abbildung 3- Mittels Durchflusszytometrie ist eine Bestimmung der Membranglykoproteine möglich. Mit Hilfe spezifischer Antikörper können Funktionszustandsänderungen der thrombozytären Membranglykoproteine nachgewiesen werden. CD 41: komplexierter Fibrinogenrezeptor; PAC-1: aktivierter Fibrinogen – Rezeptor; Nachweis einer Degranulation der α – Granula / Lysosomen mittels gegen P – Selektin (CD62P) und gegen GP 53 (CD63) gerichtete Antikörper; Bindung von Anti – CD 42 an GP 1b (nach Gawaz, M. (1999). "Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung.") [66].
- Abbildung 4- Pathogenese der Arteriosklerose aus: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/medizin/mencke-thomas/HTML/mencke-ch1.html>.
- Abbildung 5- Messung der IMT, 30 mm proximal der Carotisbifurkation. Die IMT stellt sich als echoreiche Struktur dar und lässt sich somit von den ihr umgebenen Strukturen abgrenzen.
- Abbildung 6- Formel zur Berechnung des β – Stiffness Index. Notwendig ist die Bestimmung des systolischen und diastolischen Blutdruck, sowie den systolischen und diastolischen Diameter
- Abbildung 7- Durchflusszytometrie – Prinzip: In Abhängigkeit ihres Zelltyps und der Probenvorbereitung (Einsatz von Immunfluoreszenzen) entstehen charakteristische Lichtstreuophänomene, welche dann mittels Detektoren

nachgewiesen werden können. Bestimmt wird das Ausmaß der Vorwärtsstreuung (Forward Scatter, FSC = proportional zur Zellgröße) und der Seitwärtsstreuung (Side – Scatter SSC = Zellgranularität) des Laserlichtes. (aus: http://www1.medizin.uni-halle.de/imi/pages/zytometrie_fac.php?lang=).

- Abbildung 8- Zweiparameter Darstellung (Dot – Plot) von Thrombozyten einer Vollblutprobe.
- Abbildung 9- Die obere Population repräsentiert Thrombozyten (CD 42b – PE positiv, eindeutig selektiert Thrombozyten), dagegen repräsentiert die untere Population Erythrozyten, Leukozyten und assoziierte Thrombozyten.
- Abbildung 10- Histogramm - Darstellung zur Untersuchung von Membranglykoproteinen auf der Thrombozytenoberfläche bzw. Degranulation. Hier die Darstellung der CD41 Expression gegen CD42b.
- Abbildung 11- Einparameter – Darstellung zur quantitativen Auswertung – Fluoreszenzstärke als logarithmische Darstellung auf der X – Achse gegen die Ereignishäufigkeit auf der Y – Achse.
- Abbildung 12- Tabellarische Darstellung als Beispiel die Darstellung der PAC 1 – positiven Thrombozytenpopulation (% Total).
- Abbildung 13- Balkendiagramm - Der durchschnittliche gemessene β – Stiffness – Index lag in der PKU Gruppe bei 4.44 ± 0.37 , in der Kontrollkohorte lag dieser Wert bei $4,40 \pm 0.31$.
- Abbildung 14- Balkendiagramm - Der durchschnittliche IMT - Wert lag bei 0.44 ± 0.01 mm in beiden Gruppen.
- Abbildung 15- Balkendiagramm - Der durchschnittliche Wert lag hierbei in der Patientenkohorte bei 1.92 ± 0.1 . In der Kontrollgruppe lag der Vergleichswert bei $2.20 \pm 0,06$.
- Abbildung 16- Darstellung als Histobar - Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von CD41 zwischen der Patienten- und der Kontrollkohorte (Angabe in mittlere Intensität der Immunfluoreszenz; Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 649.88 (583.60; 715.98) vs. 647.01 (577.89; 703.69) [p=0.53].
- Abbildung 17- Darstellung als Histobar - CD61 (Angabe in mittlere Intensität der Immunfluoreszenz; Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 394.65 (284.67; 440.90) vs. 378.69 (238.17; 414.16), [p=0.26] ohne signifikanten Unterschied.

- Abbildung 18- Darstellung als Histogramm - PAC1% positiver Thrombozyten, Median, [25igste und 75igste Perzentile]: 0.46 (0.32; 0.68) vs. 0.55 (0.42; 0.71), [p=0,29] – kein signifikanter Unterschied.
- Abbildung 19- Darstellung als Histogramm - Die Expression von P-Selektin unterscheidet sich nicht zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe (CD 62P% positiver Thrombozyten, Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 2.00 (1.60; 2.70) vs. 2.09 (1.57; 2.83), [p=0.86].
- Abbildung 20- Darstellung als Histogramm - Expression von CD63 (Lysosomen) zwischen den erwähnten Gruppierungen (Angabe als mittlere Immunfluoreszenz; Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 12.47 (11.03; 14.84) vs. 13.23 (11.61; 15.25), [p=0,3] ohne signifikanten Unterschied.
- Abbildung 21- Darstellung als Histogramm - Kein signifikanter Unterschied zwischen PKU- und Kontrollkohorte zu beobachten (Angabe als mittlere Immunfluoreszenz, Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 16.31 (13.10; 18.70) vs. 16.49 (13.52; 19.30), [p=0,62].
- Abbildung 22- Histogramm - Ein signifikanter Unterschied im Vergleich der IMT konnte festgestellt werden. Dieser betrug 0,43 (\pm 0,02) in der Vergleichsgruppe und 0,48 (\pm 0,01) in der Substitutionsgruppe (p= 0,04).
- Abbildung 23- Histogramm - Graphische Darstellung der Ergebnisse der Carotis B – Sonographie: Der β – Stiffness Index unterschied sich nicht zwischen der Vergleichsgruppe und der Substitutionsgruppe: Kontrollgruppe 4,57 (\pm 0,47) vs. Substitutionsgruppe 4,18 (\pm 0,59) [p=0,59].
- Abbildung 24- Histogramm - Graphische Darstellung der Ergebnisse der Carotis B – Sonographie: der PI unterschied sich nicht zwischen der Vergleichsgruppe und der Substitutionsgruppe: Kontrollgruppe 1,92 (\pm 0,12) vs. Substitutionsgruppe 1,94 (\pm 0,18) [p=0,67].
- Abbildung 25- Darstellung als Histogramm - Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von CD41 (Angabe in mittlere Immunfluoreszenz CD 41; Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 649,88 (597,82;718,11) vs. 655,42 (575,02;715,59) [p=0,71].

- Abbildung 26- Darstellung als Histogramm - Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von PAC 1 (Angabe in PAC 1% positive Thrombozyten; (Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 0,44 (0,29;0,66) vs. 0,55 (0,39;0,81)) [p=0,35].
- Abbildung 27- Darstellung als Histogramm - Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von CD61 (Angabe in mittlere Intensität der Immunfluoreszenz (Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 393,30 (307,47;445,94) vs. 395,76 (214,34;446,66) [p=0,94].
- Abbildung 28- Darstellung als Histogramm - Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von CD62 (Angabe in CD 62% positiver Thrombozyten; (Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 2,02 (1,45;2,68) vs. 1,99 (1,84;3,90) [p=0,43].
- Abbildung 29- Darstellung als Histogramm - Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von CD 63 zwischen den Gruppen (Angabe als mittlere Immunfluoreszenz; Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 12,23 (10,95;14,20) vs. 12,79 (11,20;15,19) [p=0,56].
- Abbildung 30- Darstellung als Histogramm - Kein signifikanter Unterschied zwischen der Vergleichs- und der beobachteten Gruppe (Angabe in mittlere Immunfluoreszenz CD 40L, Median, [25igste und 75igste Perzentile]): 14,63 (12,90;17,97 vs. 16,78 (14,32;22,25), [p= 0,19].

III. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1- Einteilung des Phenylalaninhydroxylasedefektes (PAH) in drei Klassen aus Mönch, E. J. (2003) „Kommunikation zwischen Partnern. Phenylketonurie/ Galaktosämie.“ Düsseldorf: Bundesarbeitsgemeinschaft „Hilfe für Behinderte e.V.“[7].
- Tabelle 2- Wirkung von ω - 3 FS auf die Funktion von Plättchen - abgeändert aus: Metz, G. (2000) „Omega-3-Fettsäuren: eine Standortbestimmung zum Millennium“ – Stockdorf: Forum – Medizin – Verl.-Ges. [31].
- Tabelle 3- Auswirkungen der Substitution von ω - 3 Fettsäuren auf den Triglyceridspiegel und des LDL Cholesterols sowie der HDL – Fraktion - Zusammenfassung nach Hahn, A., A. Ströhle, et al. (2002). "Wirkstoffe funktioneller Lebensmittel in der Prävention der Arteriosklerose." [65].

- Tabelle 4- Zur durchflusszytometrischen Bestimmung verwendete monoklonale Antikörper und die daraus resultierende Aussagemöglichkeit (nach Gawaz, M. (1999). "Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung.") [66].
- Tabelle 5- Liste der verwendeten Antikörper, das Fluochrom und der Hersteller.
- Tabelle 6- Schema zur Färbung der jeweiligen Probe.
- Tabelle 7- Demographische Daten der Populationen.
- Tabelle 8- Labordaten der Populationen.
- Tabelle 9- Messergebnisse der Carotis B – Mode Sonographie.
- Tabelle 10- Messergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung.
- Tabelle 11- Ergebnisse der Bestimmung der Fettsäure im Serum.
- Tabelle 12- Ergebnisse der Bestimmung der Fettsäure aus der Erythrozytenmembran.
- Tabelle 13- Demographische Charakteristika (Substitution vs. Nicht – Substituiert).
- Tabelle 14- Labordaten (Substitution vs. Nicht – Substituiert).
- Tabelle 15- Messergebnisse der Carotis B – Mode Sonographie (Substitution vs. Nicht – Substituiert).
- Tabelle 16- Messergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung (Substituiert vs. Nicht – Substituiert).
- Tabelle 17- Ergebnisse der Messung der Fettsäuren im Serum (Substituiert vs. Nicht – Substituiert).
- Tabelle 18 - Bestimmung der Fettsäuren in der Erythrozytenmembran (Substituiert vs. Nicht – Substituiert).
- Tabelle 19- Studien zum Einfluss von ω - 3 FS auf KHK und Koronarsterblichkeit über die Nahrung (nach Metz, G. (2000). "Omega-3-Fettsäuren. Eine Standortbestimmung zum Millenium." Forum Medizin, Stockdorf – [134]): + für positiven Effekt, - für negativen Effekt; ; KS = Kohortenstudie, FKS = Fall – Kontroll – Studie, IVSP = Interventionsstudie zur Sekundärprävention, IVPP = Interventionsstudie zur Primärprävention.

IV. Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. W. Bocksch danke ich für die Überlassung dieses Themas, seinem fachlichen Rat, seiner Geduld und Unterstützung in allen Belangen.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. S. Fateh - Moghadam für die ständige Diskussionsbereitschaft, Beratung und Unterstützung, einschließlich der Einarbeitung in die Durchflusszytometrie.

Es geht natürlich auch ein großer Dank an das Team der kardiologischen Funktionsdiagnostik. Einen besonderen Dank gilt auch dem Team der PKU – Sprechstunde, insbesondere Herrn Prof. Dr. E. Mönch und sein Team.

Auch möchte ich Herrn Prof. Dr. Riess und Mitarbeitern für die Bereitstellung der Laborräumlichkeiten und Überlassen der notwendigen Geräte danken.

Meiner Lebenspartnerin Ines Becker danke ich für den Rückhalt und für die Unterstützung, die sie mir während der Fertigstellung dieser Arbeit gegeben hat.

V. Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

VI. Erklärung an Eides statt

„Ich, Jens Nee, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: **Arterioskleroserisiko und Thrombozytenfunktion bei Patienten mit Phenylketonurie (PKU)** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

24.07.2008

Jens Nee

VII. Instrumenten Setting – flow cytometry

Thrombozytenmessung:

Detectors/Amps:				
Parameter	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E00	1.00	Log
P2	SSC	330	1.00	Log
P3	FL1	600	1.00	Log
P4	FL2	570	1.00	Log
P5	FL3	150	1.00	Lin

Threshold:

Parameter: FSC; Value: 50; Compensation: FL1 – 0,1% FL2; FL2 – 45% FL1; FL2 – 0,0% FL; FL3 – 0,0% FL2

Thrombozyten-/Leukozytenmessung:

Detectors/Amps:				
Parameter	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E00	1.00	Lin
P2	SSC	329	1.00	Lin
P3	FL1	575	1.00	Log
P4	FL2	500	1.00	Log
P5	FL3	581	1.00	Log

Threshold:

Parameter: FSC; Value: 72; Compensation: FL1 – 1,3% FL2; FL2 – 20% FL1; FL2 – 1,1% FL3; FL3 – 16,6% FL2