

**Aus der Medizinischen Poliklinik - Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München,  
Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff**

**Die Einnahme niedrig dosierter  $\omega$ -3 Fettsäuren und die Genexpression  
und Proteinbildung von PDGF, MCP-1 und VEGF**

**Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von  
Felix Graf von Spiegel zum Diesenberghanxleden  
aus München  
2005**

Mit Genehmigung der Medizinische Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Clemens Freiherr von  
Schacky auf Schönfeld

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. D. Jungst

Mitbetreuung durch den  
Promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Klaus Baumann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2005

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>8</b>
1.1	Allgemein	8
1.2	Pathogenese der Atherosklerose	8
1.3	Die kardioprotektive Wirkung der $\omega$ -3 mehrfach ungesättigte Fettsäuren ( $\omega$ -3 PUFAs)	13
1.3.1	Fischkonsum und die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität	13
1.3.2	Die mediterrane Kost	15
1.3.3	Wirken $\omega$ -3 mehrfach ungesättigte Fettsäuren wirklich kardioprotektiv?	15
1.3.4	Mechanismen des kardioprotektiven Effektes der $\omega$ -3 mehrfach ungesättigten Fettsäuren	16
1.3.4.1	Wachstumsfaktoren und Zytokine.....	16
1.3.4.2	Rheologische Veränderungen durch $\omega$ -3 Fettsäuren .....	17
1.3.4.3	$\omega$ -3 Fettsäuren und arterielle Hypertonie .....	18
1.3.4.4	$\omega$ -3 Fettsäuren und Herzrhythmusstörungen .....	18
1.3.5	Chemische Struktur der $\omega$ -3 mehrfach ungesättigten Fettsäuren	19
1.3.6	Gewählte Dosierung der $\omega$ -3 Fettsäuren	21
1.4	Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und seine Rolle in der Atherogenese	22
1.5	Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) und seine Rolle in der Atherogenese	24
1.6	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und seine Rolle in der Atherosklerose	26
1.7	Fragestellungen	29
1.7.1	Genexpression von MCP-1, PDGF-A und PDGF-B in unstimulierten und stimulierten mononukleären Zellen	29
1.7.2	Proteinbildung von MCP-1 und PDGF-AB durch kultivierte mononukleäre Zellen	29
1.7.3	Serumkonzentrationen von MCP-1, PDGF-AB und VEGF	30
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>31</b>
		3

2.1	Studiendesign	31
2.2	Präparation der mononukleären Zellen	32
2.3	Zellkultur und Stimulation	34
2.4	RNA – Isolation	36
2.5	RT – Assay	36
2.6	3n-PCR mit Oligonukleotidprimern, Elektrophorese, Photographie und Scannen	37
2.7	ELISA	39
2.8	Gaschromatographie	40
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
3.1	VEGF – Konzentration im Serum der Probanden	41
3.2	MCP-1 Konzentration im Serum der Probanden	42
3.3	PDGF-AB Konzentration im Serum der Probanden	43
3.4	PDGF-AB im konditionierten Medium	45
3.5	MCP-1 im konditionierten Medium	47
3.6	Quantitative 3n-rT-PCR	49
3.7	Studienverlauf und Compliancekontrolle	51
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>52</b>
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	52
4.2	Limitationen der gewählten Methodik	53
4.3	Diskussion MCP1	54
4.4	Diskussion PDGF	57
4.5	Diskussion VEGF	59
4.6	EPA/DHA-Dosis	62
4.7	Ergebnisse der Zellstimulationen	62
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>63</b>

<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNISS.....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>80</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Kürzel	Bedeutung
ALA	alpha Linolensäure
BMP	bone morphogenic protein
CCL	Chemocine Ligand
CCR	Chemocine Receptor
cDNA	copy Desoxiribonukleinsäure
DART	Diet And Reinfarction Trial
DHA	Docosahexaensäure
dNTP	Dinukleotidtriphosphat
EPA	Eicosapentaensäure
FCS	fetales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
GISSI-P	Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico – Prevenzione trial
HBEGF	heparin binding epidermal growth factor
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HI	Hirnfarkt
HPLC	high performance liquid chromatography
IGF	Insulin like growth factor
Il-1	Interleukin-1
kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MI	Myokardinfarkt

MNC	mononukleäre Zellen
NaCl	Natriumchlorid
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	platelet derived growth factor
PGE2	Prostaglandin E2
PTCA	Perkutane Koronarangioplastie
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rT-PCR	reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
TNF- $\alpha$	Tumour Nekrose Faktor- $\alpha$
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
$\omega$ -3 PUFA	$\omega$ -3 mehrfach ungesättigte Fettsäure

# **1 Einleitung**

## **1.1 Allgemein**

Der positive Einfluss von  $\omega$ -3 Fettsäuren in der primären und sekundären Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen ist seit über zwanzig Jahren bekannt. (Burr, Fehily et al. 1989) Verschiedenste Mechanismen wurden dafür verantwortlich gemacht, wie in 1.3 ausgeführt. Eine Beeinflussung der Genexpression proatherogener Proteine, wie zum Beispiel PDGF und MCP-1 durch die Einnahme von hoch dosierten  $\omega$ -3 Fettsäuren ist dabei der jüngste Aspekt. (Jendraschak, Kaminski et al. 1993; Kaminski, Jendraschak et al. 1993; Baumann, Hessel et al. 1999)

## **1.2 Pathogenese der Atherosklerose**

Die Atherosklerose in Menschen ist ein über Jahre verlaufender Prozess, dem neben einer genetischen Disposition verschiedene bekannte und unbekannte Risikofaktoren zugrunde liegen. Klinische Folgen der Atherosklerose können koronare Herzkrankheit (KHK), Myokardinfarkt (MI), Hirninfarkt (HI) und chronische periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) sein. Die Atherosklerose steht somit als Todesursache, in den entwickelten Ländern, an erster Stelle. (Ross 1993; Ross 1999; Libby 2000)

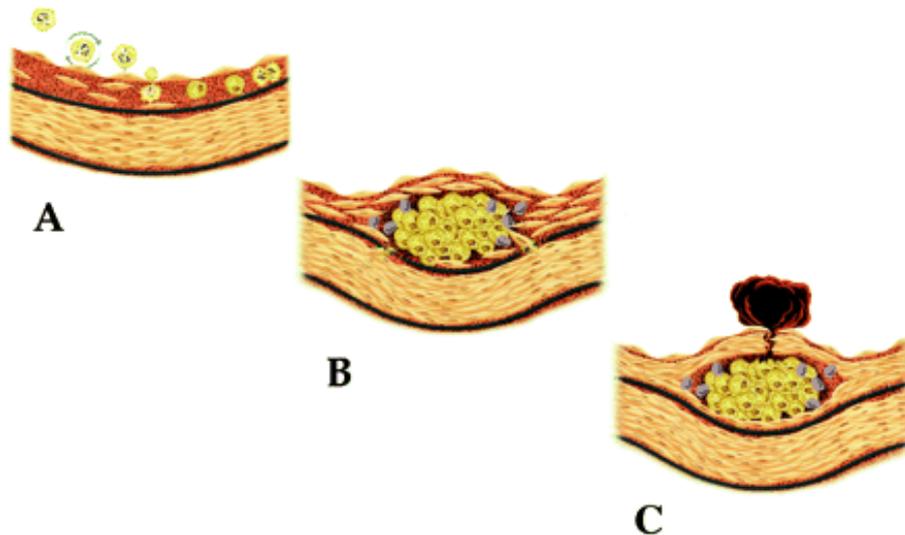


Abb. 1: A Einwandern von Leukozyten in die Intima des Gefäßes. Das Anhaften wird über verschiedene Mediatoren getriggert. Reversibler Kontakt, „Roller“ der Leukozyten über das Endothel, wird über Selektine vermittelt. Anhaften über VCAM-1 u.a.. Das Einwandern wird gesteuert über Chemokine wie beispielsweise MCP-1. B Die eingewanderten Leukozyten nahmen Lipide auf und werden zu Schaumzellen, sichtbar als erste makroskopische Manifestation der Atherosklerose, den „fatty streaks“. Durch die Expression von Wachstumsfaktoren durch die Leukozyten und ortsständigen Endothelzellen, kommt es zu einer Vermehrung von glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix. Es kommt zur Manifestation der Atherome. C Als Folge einer Ruptur der fibrösen Kappe liegt das nekrotische, stark thrombogen wirkende Material der Atherome frei. Über die Ausbildung von Thromben kann es zu einem akuten Verschluss des Gefäßes kommen.

Sehr frühe endotheliale Veränderungen können schon im Jugendalter vorhanden sein und sich über Jahre asymptotisch progredient entwickeln, bis es teilweise zu Komplikationen im Sinne von akuten Ereignissen kommt. So lässt sich auch die Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen in drei Phasen einteilen, Initiation, Progression und Komplikation. Diese zeigen auch unterschiedliche zelluläre und molekularbiologische Pathomechanismen. (Libby 2000)

Das Einwandern mononukleärer Leukozyten (MNC) in die Intima kennzeichnet die Initiation einer atheromatösen Veränderung. Hierbei kommt es zu einem, durch verschiedene von Endothelzellen exprimierte Adhäsionsmoleküle, getriggerten Kontakt zwischen

diesen Zellen und dem Endothel. Die Gruppe der Selektine vermitteln den kurzen, reversiblen Kontakt, den man sich als „Rollen“ der MNC über das Endothel vorstellen kann. (Carlos and Harlan 1994; Frenette and Wagner 1996; Frenette and Wagner 1996; Vora, Fang et al. 1997) Eine andere Gruppe ähneln in ihrer Struktur den Immunglobulinen, sie vermitteln einen stärkeren Kontakt zwischen MNC und Endothel als die Selektine. Ein Mitglied dieser Gruppe, welches in seiner Bedeutung in der frühen Atherogenese gut beschrieben ist, ist das vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). (Cybulsky and Gimbrone 1991) Sind die MNCs adhärent, wandern sie, gesteuert durch Chemokine, per Diapedese in die Arterienwand ein. Von besonderer Bedeutung ist hier das später eingehender beschriebene macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1). (Boring, Gosling et al. 1998; Gu, Okada et al. 1998) Gefördert wird die Expression der Adhäsionsmoleküle und Chemokine unter anderem durch oxidativ veränderte Lipoproteine, (Vora, Fang et al. 1997; Watson, Leitinger et al. 1997) Scherkräfte (Gimbrone, Nagel et al. 1997) oder inflammatorische Proteine, wie beispielsweise Interleukin-1 (Il-1), Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und andere. (De Caterina, Libby et al. 1995) Über verschiedene Rezeptoren der Gruppe der gut erforschten „scavenger receptors“ nehmen die in der Intima angesammelten MNCs Lipide auf, werden zu Schaumzellen und bilden somit die frühen reversiblen makroskopisch sichtbaren Erscheinungen der Atherosklerose, die „fatty streaks“. (Krieger, Acton et al. 1993)

In Folge einer progressiven Vermehrung der glatten Muskelzellen und extrazellulären Matrix kommt es zur Ausbildung von fibrösen Plaques. Dieser Prozess wird über die Ausschüttung verschiedener

Mediatoren, wie platelet derived growth factor (PDGF), aber auch heparin binding epidermal growth factor (HBEGF), fibroblast growth factor (FGF), insulin – like growth factor (IGF) und anderer, durch eingewanderte MNCs und ortsständige Gefäßzellen, gesteuert. (Barrett, Gajdusek et al. 1984; Shimokado, Raines et al. 1985; Walker, Bowen-Pope et al. 1986; Barrett and Benditt 1987; Libby, Warner et al. 1988; Brogi, Winkles et al. 1993; Ross 1999) Die Expression dieser Gene unterliegt teilweise einer Stimulation verschiedener inflammatorischer Cytokine, wie zum Beispiel Interleukin-1 (Il-1). (Raines, Dower et al. 1989) Des weiteren kann nun das manifeste Atherom kalzifizieren. Ebenso wie die vorausgegangenen Vorgänge unterliegt dies auch der Bildung und Ausschüttung verschiedener Mediatoren, wie Osteopontin, bone morphogenic protein (BMP) und anderer. (Fitzpatrick, Severson et al. 1994; Demer and Tintut 1999)

Akute Komplikationen entstehen meist aufgrund einer Thrombose infolge einer Ruptur einer atherosklerotischen Plaque. Dabei kommt es zu einem Kontakt von Plättchen und dem stark thrombogen wirkenden atheromatösen Material. (Falk, Shah et al. 1995; Libby 1995) Einfluss hat hier, neben der Wandspannung, vor allem die Festigkeit der, das Atherom bedeckenden, fibrösen Kappe. Die Festigkeit wird wiederum von der Menge und Homogenität der vorhandenen kollagenen Fasern bestimmt. Einen negativen Einfluss auf die Produktion von kollagenen Fasern in atheromatösen Plaques haben T – Lymphozyten durch ihre abgegebenen inflammatorisch aktiven Proteine, wie beispielsweise Interferon- $\gamma$ . (Amento, Ehsani et al. 1991; van der Wal, Becker et al. 1994; Libby 1995) Des weiteren können auch schon vorhandene kollagene Fasern durch verschiedene Enzyme, wie Elastin, Matrixmetalloproteinasen und

andere, abgebaut werden und somit die Festigkeit der fibrösen Kappe verringern. (Galis, Muszynski et al. 1994; Galis, Sukhova et al. 1994; Dollery, McEwan et al. 1995) Ebenso kann ein Einsprossen von kleinsten Gefäßen, getriggert vor allem durch vascular endothelial growth factor (VEGF), die Stabilität von Kollagenkappen atheromatöser Plaques negativ beeinflussen. (Ware 2001) Am Ende steht dann unter Umständen ein akuter oder chronischer Verschluss des Gefäßes mit all seinen bekannten Folgen.

### **1.3 Die kardioprotektive Wirkung der $\omega$ -3 mehrfach ungesättigte Fettsäuren ( $\omega$ -3 PUFAs)**

#### **1.3.1 Fischkonsum und die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität**

Untersuchungen an grönländischen Eskimos in den siebziger Jahren zeigten eine sehr geringe Morbidität und Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen, gegenüber der Bevölkerung Dänemarks. Unterschiede zeigten sich vor allem in den unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten. Die grönländischen Eskimos ernährten sich hauptsächlich von Robbenfleisch und Fisch. Beide sind reich an  $\omega$ -3 PUFAs, was sich auch im Fettsäurenprofil der Eskimos widerspiegelte. Interpretiert wurde dies als ein thrombozytenaggregationshemmender Effekt der  $\omega$ -3 PUFAs. (Bang, Dyerberg et al. 1971; Dyerberg and Bang 1979; Bang, Dyerberg et al. 1980) Unter den Industrienationen haben Japaner eine einzigartig niedrige Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen. Auch hier wurde die hohe Aufnahme von  $\omega$ -3 PUFAs über frischen Meeresfisch verantwortlich gemacht. (Kagawa, Nishizawa et al. 1982)

In prospektiven Studien wurde die protektive Wirkung des Fischkonsums gegen kardiovaskuläre Erkrankungen untersucht. In der holländischen Stadt Zutphen wurden die Essgewohnheiten von 852 mittelalterlichen Männern untersucht. Nach zwanzig Jahren konnte eine inverse Korrelation zwischen dem Konsum von Fisch und der Mortalität an koronarer Herzkrankheit gefunden werden. Die Mortalität an KHK war bei denen um 50% geringer, die mindestens

50g Fisch pro Tag verzehrten. Daraus wurde geschlossen, dass Fischkonsum einen protektiven Effekt gegen KHK hat. (Kromhout, Bosschieter et al. 1985; Kromhout, Feskens et al. 1995) Durch die Interpretation von Daten der „Chicago Western Electric Study“ wurde die Mortalität an KHK über einen Zeitraum von 30 Jahren an 1822 Männern zwischen 40 – 55 Jahren im Zusammenhang mit deren Essgewohnheiten untersucht. Es wurden drei Gruppen gebildet, bei denen der Fischkonsum 0,1 – 17, 18 – 34 und  $\geq 34$ g pro Tag betragen. In der Gruppe, die  $\geq 34$ g Fisch pro Tag verzehrte, war das Risiko an KHK zu versterben, signifikant niedriger, als in der Gruppe, die am wenigsten Fisch verzehrte (relatives Risiko 0,62). Hauptsächlich lag dies an der verringerten Inzidenz an Myokardinfarkten. (Daviglus, Stamler et al. 1997)

In Folge wurden verschiedene Interventionsstudien initiiert, in denen unter kontrollierten Bedingungen versucht wurde, diesen Zusammenhang zu überprüfen. In der „Diet And Reinfarction Trial“ (DART) wurden 2033 Männer, die einen Myokardinfarkt überlebt hatten, in Gruppen aufgeteilt, die entweder ihre Ernährung nicht umstellen sollten, oder ihren Fettkonsum einschränken und mehr ungesättigten Fettsäuren, oder mehr fetten Fisch oder mehr Ballaststoffe über Getreideprodukte essen sollten. In der Gruppe die Fisch essen sollte konnte eine Reduktion der Gesamtmortalität um 29% gegenüber der Gruppe ohne Umstellung und der Gruppe mit Umstellung auf faserhaltige Ernährung oder fettarme Diät, festgestellt werden. (Burr, Fehily et al. 1989)

### **1.3.2 Die mediterrane Kost**

In Europa gibt es in Bezug auf die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen ein starkes Nord-Süd-Gefälle. Im Mittelmeerraum, vor allem auf Kreta ist die Morbidität und Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen am niedrigsten. (Keys, Menotti et al. 1984) Die mediterrane Ernährung ist reich an  $\alpha$ -Linolensäure, einem Mitglied der  $\omega$ -3 PUFAs. In einer randomisierten Studie konnte durch die Umstellung auf eine mediterrane Kost nach Myokardinfarkt, ein protektiver Effekt gesehen werden. (de Lorgeril, Renaud et al. 1994; Renaud, de Lorgeril et al. 1995)

### **1.3.3 Wirken $\omega$ -3 mehrfach ungesättigte Fettsäuren wirklich kardioprotektiv?**

Sind die kardioprotektiven Effekte der Umstellung der Ernährung auf mediterrane Kost oder fischreiche Ernährung auf die  $\omega$ -3 PUFAs zurückzuführen, oder sind dafür andere Mechanismen verantwortlich. Licht ins Dunkel konnten prospektive, randomisierte, doppel – blind und placebo – kontrollierte Studien bringen, bei denen die normale Ernährung nicht umgestellt wurde und die  $\omega$ -3 PUFAs in konzentrierter Form von Fischölkapseln verabreicht wurden.

In der „Study on Prevention of Coronary Atherosclerosis by Intervention with Marine Omega-3 fatty acids (SCIMO)“ wurden 223 mit koronarangiographisch gesicherter Koronarsklerose randomisiert, entweder täglich für vorerst 3 Monate ca. 3,3g und dann ca. 1,65g  $\omega$ -3 PUFAs oder ein in seinem Fettsäurenprofil der

westlichen Ernährung angepasstes Placebo über zwei Jahre zu sich zu nehmen. Nach zwei Jahren wurde eine erneute Koronarangiographie durchgeführt. Hier zeigten sich in der Fischölgruppe gegenüber der Placebogruppe eine statistisch signifikante geringere Progression und verstärkte Regression der Koronarsklerose. (von Schacky, Angerer et al. 1999)

In der GISSI-P Studie an 11.324 Patienten, die kürzlich einen Myokardinfarkt überlebt hatten, wurden vier Gruppen gebildet, die entweder täglich ca. 880mg  $\omega$ -3 PUFAs oder 300mg Vitamin E oder beides oder gar nichts über einen Zeitraum von 3,5 Jahren zu sich nehmen sollten. In den Gruppen, die  $\omega$ -3 PUFAs erhielten, reduzierte sich das Risiko eines primären Endpunktes (Tod, nicht tödlicher Myokardinfarkt und Schlaganfall) um 15% gegenüber der Gruppen, die nur Vitamin E oder gar nichts erhielten. (1999)

In einer weiteren Studie an 360 Patienten mit dem Verdacht auf einen akuten Myokardinfarkt, wurden die Wirkungen von Fischöl, Senföl und Placebo miteinander verglichen. In der Fischölgruppe zeigte sich über einen Beobachtungszeitraum von einem Jahr eine Reduktion aller kardiovaskulären Ereignisse um 29%. (Singh, Niaz et al. 1997)

#### **1.3.4 Mechanismen des kardioprotektiven Effektes der $\omega$ -3 mehrfach ungesättigten Fettsäuren**

##### **1.3.4.1 Wachstumsfaktoren und Zytokine**

In der Atherogenese wurden Faktoren wie PDGF und MCP-1 eine wichtige Rolle zugesprochen (siehe oben). (Ross 1993; Libby 2000)

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass durch die Einnahme von EPA und DHA die Genexpression von PDGF-A und PDGF-B in unstimulierten mononukleären Zellen vermindert wird. (Kaminski, Jendraschak et al. 1993) In einer randomisierten, doppel-blind Interventionsstudie wurden diese Ergebnisse untermauert und erweitert. Es wurden drei Gruppen gebildet, die entweder pro Tag 7g EPA und DHA,  $\omega$ -6 und  $\omega$ -9 Fettsäuren oder gar nichts zu ihrer normalen Ernährung über vier Wochen einnahmen. Den Probanden wurde am Anfang und nach vier Wochen Blut abgenommen, die enthaltenen mononukleären Zellen extrahiert und die gebildeten Mengen an PDGF-A, PDGF-B und MCP-1 mRNA in unstimulierten oder durch Adhärenz stimuliertem Zustand, mittels 3n-rtPCR gemessen. Nur die Gruppe die  $\omega$ -3 Fettsäuren einnahm, zeigte einen selektiven, signifikanten Abfall an PDGF-A, PDGF-B und MCP-1 mRNA. (Baumann, Hessel et al. 1999)

Nach diätetischer Supplementation mit Fischöl verringerte sich die Menge an den inflammatorisch wirkenden Proteinen Interleukin-1 ( $Il-1\alpha$  und  $Il-1\beta$ ) und Tumor Nekrose Faktor (TNF), gemessen in Monocyten aus peripherem Blut. (Endres, Ghorbani et al. 1989; Endres and von Schacky 1996) Die  $\omega$ -3 Fettsäuren wirken jedoch nicht nur auf die mononukleären Zellen, sondern auch auf Endothelzellen. Durch die Zugabe von Fischöl zu kultivierten Endothelzellen wurde spezifisch die Produktion von PDGF erniedrigt (Fox and DiCorleto 1988).

#### **1.3.4.2 Rheologische Veränderungen durch $\omega$ -3 Fettsäuren**

Die Aufnahme von  $\omega$ -3 Fettsäuren bewirkt eine verringerte Plättchenaggregation und Plättchenzahl. Die Blutungszeit wird

verlängert und die Thrombozytenaggregation bei Exposition mit Kollagen und ADP vermindert. (Thorngren and Gustafson 1981; Hay, Durber et al. 1982; von Schacky 1987) Eine randomisierte Studie an Patienten mit KHK zeigte nach täglicher Aufnahme von 5,1g EPA/DHA für 4 Wochen, eine Abnahme des von Willebrand Faktor, Thrombomodulin und Gewebesplasminogen Aktivator. (Johansen, Seljeflot et al. 1999)

EPA und DHA werden zu Lasten von Linolensäure und Arachidonsäure in die Phospholipide der Erythrozytenmembranen eingebaut. Dieser während der Erythropoese stattfindende Prozess führt über eine erhöhte Erythrozytendeformierbarkeit zu reduzierter Blutviskosität. (Kobayashi, Hirai et al. 1981; Lorenz, Spengler et al. 1983; von Schacky, Fischer et al. 1985)

#### **1.3.4.3 $\omega$ -3 Fettsäuren und arterielle Hypertonie**

Ein Meta-Analyse von 31 Placebo-Kontrollierten Studien zeigte eine Senkung des Blutdrucks von systolisch -0,66 mmHg und diastolisch -0,3 mmHg durch die Einnahme von EPA und DHA. Der Effekt scheint am stärksten bei hypertonen Patienten zu sein. (Morris, Sacks et al. 1993)

#### **1.3.4.4 $\omega$ -3 Fettsäuren und Herzrhythmusstörungen**

Verschiedene Studien zeigten einen antiarrhythmischen Effekt der  $\omega$ -3 Fettsäuren. (Burr, Fehily et al. 1989; Siscovick, Raghunathan et al. 1995; Albert, Hennekens et al. 1998) In Tierstudien konnte nachgewiesen werden, dass  $\omega$ -3 Fettsäuren protektiv gegen durch

Ischämie induzierte Arrhythmien wirken. (McLennan, Abeywardena et al. 1988; Billman, Kang et al. 1999).

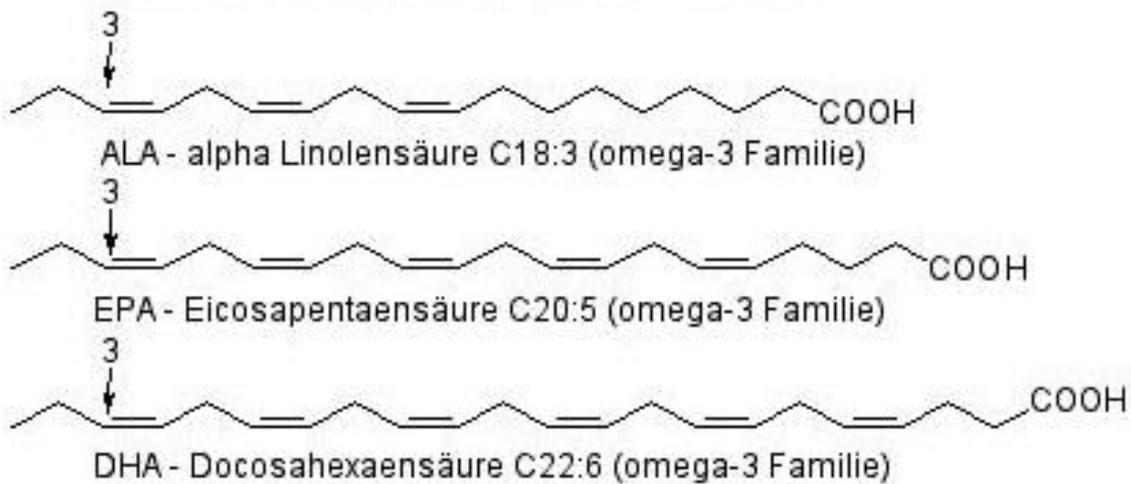
In der DART Studie (Burr, Fehily et al. 1989) war die erniedrigte Gesamtmortalität auch durch eine erniedrigte Inzidenz an Arrhythmien bedingt, so dass angenommen werden kann, dass dieser antiarrhythmogene Effekt der  $\omega$ -3 Fettsäuren auch bei Menschen seine Bedeutung hat.

Dieser antiarrhythmische Effekt wird vermittelt durch eine Modulation von Ionenkanälen, speziell den schnellen Natriumkanälen und L-Typ Kalziumkanälen. (Xiao, Kang et al. 1995; Xiao, Gomez et al. 1997; Xiao, Wright et al. 1998; Xiao, Wright et al. 2000)

### **1.3.5 Chemische Struktur der $\omega$ -3 mehrfach ungesättigten Fettsäuren**

Zur Familie der  $\omega$ -3 Fettsäuren gehören die  $\alpha$ -Linolensäure (ALA) (C18:3,  $\omega$ -3), Docosahexaensäure (DHA) (C 22:6,  $\omega$ -3) und Eicosapentaensäure (EPA) (C 20:5,  $\omega$ -3), siehe Abbildung 2. Mit der Nahrung werden DHA und EPA fast ausschließlich über maritimen fettigen Fisch aufgenommen (Dyerberg, Bang et al. 1975; Dyerberg and Bang 1979). Die  $\alpha$ -Linolensäure wird vor allem über Hülsenfrüchte und deren Öle aufgenommen. (Renaud, de Lorgeril et al. 1995) Für diese Studie wurden Fischölkapseln mit einem EPA – Anteil von 35.4% und einem DHA – Anteil von 21.5% verwendet. Die Fettsäurezusammensetzung der Placebokapseln war der

normalen westlichen Diät angeglichen, siehe Tabelle. 1, die enthaltenen  $\omega$ -6 und  $\omega$ -9 Fettsäuren haben keinen Einfluss auf die Genexpression und Proteinbildung von PDGF und MCP-1. (Baumann, Hessel et al. 1999)



**Abb. 2:** chemische Struktur der  $\omega$ -3 mehrfach ungesättigten Fettsäuren

**Tabelle 1.** Typische Fettsäurezusammensetzung der Studienkapseln in Gewicht % der gesamten Fettsäuren einer Kapsel

Fettsäure	Placebo	Fischöl
C16:0	26.0	0.9
C18:0	4.6	6.0
C18:1 $\omega$ -9	35.8	4.5
C18:2 $\omega$ -6	16.7	0
C18:3 $\omega$ -3	2.1	0.6
C20:4 $\omega$ -6	0	1.4
C20:5 $\omega$ -3	0	35.4
C22:5 $\omega$ -3	0	9.7
C22:6 $\omega$ -3	0	21.5
Andere	14.8	20.0
Peroxide	0.5	0.6

Die Analysen der Fettsäuren wurden freundlicherweise durch den Hersteller der Kapseln, (Lube; Hadsund, Dänemark) zur Verfügung gestellt.

### **1.3.6 Gewählte Dosierung der $\omega$ -3 Fettsäuren**

Die Probanden wurden angewiesen für sechs Wochen täglich 6 Kapseln und für weitere sechs Wochen täglich 3 Kapseln zu ihrer normalen Ernährung einzunehmen. Somit nahmen sie zuerst, bei einem  $\omega$ -3 Fettsäurenanteil von 0,5g pro Kapsel, täglich 3g und dann 1,5g  $\omega$ -3 Fettsäuren zu sich. Die anfängliche hohe Dosierung wurde gewählt um eine Aufsättigung mit  $\omega$ -3 Fettsäuren zu erreichen.

Dieses Dosierungsschema wurde in Anlehnung an SCIMO gewählt. (von Schacky, Angerer et al. 1999) Sie entspricht in etwa der errechneten täglichen Dosierung an  $\omega$ -3 Fettsäuren der Gruppe der DART-Studie, in der eine Reduktion der Gesamtmortalität um 29% erreicht wurde. (Burr, Fehily et al. 1989)

#### **1.4 Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und seine Rolle in der Atherogenese**

Platelet Derived Growth Factor (PDGF) wirkt als Dimer aus zwei Polypeptidketten, A und B. Folglich gibt es drei Isoformen, PDGF-AA, PDGF-BB und PDGF-AB. (Deuel, Pierce et al. 1987; Claesson-Welsh and Heldin 1989; Heldin and Westermark 1999) PDGF wird von vielen verschiedenen Zellen produziert. In Bezug auf die vorliegende Studie sind hierbei, die Makrophagen, die glatten Gefäßmuskelzellen, die Endothelzellen und die Thrombozyten / Megakariozyten hervorzuheben. (Nilsson, Sjolund et al. 1985; Ross, Bowen-Pope et al. 1985; Ross 1989; Ross, Bowen-Pope et al. 1990) Diese Zellen produzieren beide A- und B-Ketten, wobei deren Expression unabhängig voneinander gesteuert wird. (Dirks and Bloemers 1995)

Die drei Isoformen PDGF-AA, PDGF-BB und PDGF-AB wirken auf zwei strukturell ähnliche Rezeptoren, Typ  $\alpha$  und Typ  $\beta$ . Hierbei handelt es sich um transmembranöse Glykoproteine mit Tyrosinkinaseaktivität. (Claesson-Welsh and Heldin 1989; Westermark, Claesson-Welsh et al. 1989; Heldin and Westermark 1999) Da PDGF als Dimer funktioniert, bindet es je zwei Rezeptoren, die dadurch selbst zu Dimeren werden. Der  $\alpha$ -Rezeptor bindet sowohl A- als auch B-Ketten, dagegen bindet der  $\beta$ -Rezeptor nur B-Ketten. (Heldin and Westermark 1999) Generell sind die über die PDGF  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren vermittelten Effekte eine Förderung des Zellwachstums und Chemotaxis auf Fibroblasten und Entzündungszellen. (Ross, Bowen-Pope et al. 1985; Ross 1989; Ross, Bowen-Pope et al. 1990) Auf die Feinheiten der weiteren differenzierten Wirkungen der einzelnen Rezeptoren soll hier nicht

eingegangen werden. Die PDGF  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren werden ebenso wie PDGF von verschiedenen Zellen exprimiert. Hervorzuheben sind hierbei die Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen. (Heldin and Westermark 1999)

PDGF hat wichtige Funktionen in der Embryogenese, speziell in der Entwicklung von Nieren, Blutgefäßen, Lungen und ZNS. In all diesen Organen sind die Bindegewebszellen abhängig von PDGF. Weiterhin ist PDGF in der physiologischen Wundheilung von großer Bedeutung. (Heldin and Westermark 1999)

Pathologische Bedeutung hat PDGF in der Entwicklung von malignen Tumoren, verschiedene Organfibrosen und der Atherosklerose, auf die im folgenden intensiver eingegangen wird. (Heldin and Westermark 1999; Ostman and Heldin 2001) In gesunden Arterien wird PDGF auf niedrigem Niveau exprimiert. In der Situation eines chronisch entzündlichen Prozesses der Atherosklerose kommt es zu einer lokalen Überexpression von PDGF. (Ross, Bowen-Pope et al. 1990; Ross 1993) In glatten Muskelzellen atherosklerotisch veränderter Gefäße wurde eine erhöhte Aktivität von PDGF nachgewiesen. (Libby, Warner et al. 1988; Wilcox, Smith et al. 1988; Ross, Masuda et al. 1990; Wilcox, Nelken et al. 1994) Es konnte nachgewiesen werden, dass lokale Strömungsveränderungen in Gefäßen, wie Scheerkräfte oder verlangsamter Blutfluss zu einer Induktion von PDGF führen. (Kraiss, Geary et al. 1996; Mondy, Lindner et al. 1997) Durch die Applikation von PDGF-Antikörpern konnte die Vermehrung von glatten Muskelzellen in der Neointima nach Verletzung der Gefäße mittels Ballondilatation deutlich verringert werden. (Ferns, Raines et al. 1991)

## **1.5 Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) und seine Rolle in der Atherogenese**

MCP-1 oder CCL2, ein monomerisches Polypeptid von 8,7 kDa, ist der Prototyp der CC – Chemokine, welche bei Menschen auf dem Chromosom 17 kodiert werden, und bindet an den CC Chemokine Rezeptor 2 (CCR2). (Yoshimura and Leonard 1991; Yoshimura and Leonard 1992) CCR2 wird vor allem von Monocyten, aber auch basophilen Granulozyten, T – Lymphozyten, dendritischen Zellen, Killerzellen, Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert. MCP-1 wirkt auf diese Zellen chemotaktisch und aktivierend. Die Schlüsselrolle von MCP-1 in der Rekrutierung von Leukozyten erkennt man auch daran, dass besonders Endothelzellen im aktivierten Zustand sehr viel MCP-1 exprimieren und sezernieren. (Yoshimura, Yuhki et al. 1989; Yoshimura and Leonard 1991; Yoshimura and Leonard 1992; Baggiolini, Dewald et al. 1997; Nelson and Krensky 2001)

An kultivierten Endothelzellen konnte auch gezeigt werden, daß sie durch bekannte proatherogene Faktoren wie beispielsweise oxidiertes LDL und Scheerkräfte dazu angeregt werden MCP-1 zu exprimieren. (Cushing, Berliner et al. 1990; Shyy, Hsieh et al. 1994; Reape and Groot 1999)

Vaskuläre glatte Muskelzellen sind eine weitere Quelle von MCP-1 (siehe oben). Durch Angiotensin II, einem sehr potenten Vasokonstriktor, kann die Expression von MCP-1 direkt gesteigert werden. (Chen, Tummala et al. 1998)

MCP-1 ist ein wichtiger Faktor in normalen, aber auch in pathologischen akut und chronisch entzündlichen Prozessen, wie atheroskerotischen Gefäßveränderungen (Ross 1999; Libby 2000). Beispielsweise konnte in atherosklerotisch veränderten, jedoch nicht

in normalen arteriellen Gefäßen eine Überexpression von MCP-1 nachgewiesen werden. In den atherosklerotischen Plaques waren vor allem die makrophagenreichen Bereiche reich an MCP-1. (Nelken, Coughlin et al. 1991; Yla-Herttuala, Lipton et al. 1991) Die überaus wichtige Rolle von MCP-1 in der Atherogenese konnte in verschiedenen Mausmodellen nachgewiesen werden. Apolipoprotein-E-Knockout-Mäusen, dem gängigen Mausmodell für Atherosklerose, wurden nach totaler Knochenmarckeradikation MCP-1 überexpmierendes Knochenmarck transplantiert. Sie zeigten gegenüber der Kontrollgruppe eine massiv gesteigerte Atherogenese bei gleichem Niveau von Plasmafettsäure, Plasmalipoprotein oder Körpergewicht. (Aiello, Bourassa et al. 1999) Entsprechend zeigten Apolipoprotein-E-Knockout-Mäuse, bei denen gleichzeitig das Gen für CCR2 (s.o.) ausgeschaltet war, eine ebenso verringerte Atherogenese. Die atherosklerotischen Plaques waren nicht nur kleiner, es waren auch noch weniger Makrophagen in ihnen vorhanden. Dies unterstützt zusätzlich die These, daß MCP-1, das wichtigste Chemokin in der Rekrutierung von Monocyten in der Atherogenese ist, und daß die Menge an vorhandenen Makrophagen die Größe der atherosklerotischen Plaques bestimmt. (Boring, Gosling et al. 1998; Dawson, Kuziel et al. 1999) Durch eine Anti-MCP-1-Gentherapie in demselben Mausmodell wurde ebenso eine verringerte Bildung von atherosklerotischen Plaques erreicht. (Ni, Egashira et al. 2001)

Die Bedeutung von MCP-1 zeigt sich nicht nur in chronischen Gefäßveränderungen, sondern auch in akuten Ereignissen, wie Restenosierung dilatierter Koronargefäße. Cipollone et al. zeigten, daß das im Plasma der Patienten gemessene MCP-1 nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) bei den

Patienten signifikant höher war, bei denen es zu einer Restenosierung des Gefäßes kam. (Cipollone, Marini et al. 2001)

## **1.6 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und seine Rolle in der Atherosklerose**

VEGF, ein 34-46kDa homodimerisches Glykoprotein, ist in 20% seiner Aminosäuresequenz mit PDGF identisch. (Keck, Hauser et al. 1989; Leung, Cachianes et al. 1989) Die VEGF mRNA kommt in hauptsächlich vier alternativ gespaltenen Formen vor. Somit entstehen vier in ihrer Länge unterschiedliche Translationprodukte, bestehend aus 121, 165, 189 oder 206 Aminosäuren. Die häufigste Isoform ist VEGF<sub>165</sub>. VEGF bindet an zwei homologe auf Endothelzellen exprimierte transmembranäre Rezeptoren, dem Flt-1 und FLK-1/KDR, mit intrazellulärer Tyrosinkinase-Aktivität. (de Vries, Escobedo et al. 1992; Terman, Dougher-Vermazen et al. 1992) Der Rezeptor Flt-1 wird auch auf Makrophagen exprimiert und führt über dessen Stimulation zu einer Mobilisierung und Aktivierung aus dem Knochenmark und im peripheren Blut. (Shen, Clauss et al. 1993)

Die physiologische als auch die pathologische Bedeutung von VEGF und seiner Rezeptoren zeigt sich in ihrer angiogenetischen Wirkung. In der embryonalen Entwicklung sind sie unabdingbar für die normale Entwicklung von Gefäßen. (Shalaby, Rossant et al. 1995) In der Wundheilung wird die Einsprossung von Kapillaren durch VEGF gesteuert. (Detmar, Brown et al. 1994; Detmar, Yeo et al. 1995; Frank, Hubner et al. 1995) In ischämischen Gebieten bewirkt VEGF eine Neubildung von Gefäßen und eine gesamte Verbesserung der Durchblutung. Somit ist nicht verwunderlich, dass

die Hypoxie der stärkste Reiz für die lokale Expression von VEGF ist. (Shweiki, Itin et al. 1992; Banai, Shweiki et al. 1994; Brogi, Wu et al. 1994)

In der Tumorangio-genese scheint VEGF eine bedeutende Rolle zu spielen. In einigen malignen Tumoren wurde eine positive Korrelation in der Bildung von VEGF zur Vaskularisation des Tumors nachgewiesen. (Guidi, Abu-Jawdeh et al. 1995; Mattern, Koomagi et al. 1996; Suzuki, Hayashi et al. 1996) Des Weiteren zeigten Patienten mit VEGF positiven Tumoren eine schlechtere Prognose als solche mit VEGF negativen. (Viglietto, Maglione et al. 1995) In verschiedenen Tumor-Maus-Modellen wurden VEGF neutralisierende Antikörper appliziert und es zeigte sich eine deutlich geringere Wachstumsrate der Tumore. (Kim, Li et al. 1993; Warren, Yuan et al. 1995)

Ebenso sind proliferative Augenerkrankungen, z.B. diabetischen proliferative Retinopathie oder AMD-assoziierte subretinale Neovaskularisation, mit erhöhten lokalen VEGF-Konzentrationen assoziiert. (Adamis, Miller et al. 1994; Aiello, Avery et al. 1994; Malecaze, Clamens et al. 1994) Erhöhte lokale Konzentrationen wurden auch im Pannusgewebe an rheumatoider Arthritis leidenden Patienten, gemessen. (Koch, Harlow et al. 1994; Thomas 1996; Ferrara and Davis-Smyth 1997)

Die Rolle von VEGF in der Atherosklerose wird kontrovers diskutiert. Die Förderung der Angiogenese in ischämischen Arealen, wie bei der Koronarsklerose oder pAVK scheint ein logischer Gedanke. In einigen Tierexperimenten wurde nach chirurgischer Unterbindung einer Extremitätenarterie durch die intramuskuläre oder intraarterielle Applikation von rekombinantem VEGF<sub>165</sub> eine deutliche Gefäßneubildung und somit eine verbesserte

Durchblutung in der betroffenen Extremität erreicht. (Ferrara, Houck et al. 1992; Ferrara and Davis-Smyth 1997) Hiernach folgten Studien mit entweder intramuskulärer oder intraarterieller Applikation von entweder rekombinantem VEGF<sub>165</sub> oder VEGF<sub>165</sub> kodierender Plasmide, bei Patienten mit KHK oder pAVK. In einigen Studien zeigten sich Verbesserungen der klinischen Situation, in anderen placebokontrollierten Studien zeigte sich jedoch keine Verbesserung gegenüber der Placebogruppe. (Sinnaeve, Varenne et al. 1999) Demgegenüber legten andere Studien eine mögliche Rolle von VEGF und seiner Rezeptoren in der Atherogenese nahe. Inoue et al. (Inoue, Itoh et al. 1998) wiesen erhöhte Konzentrationen von VEGF und seiner Rezeptoren in atherosklerotisch veränderten, aber nicht in normalen Koronarien nach. Des weiteren kam es bei intraperitonealer oder intramuskulärer Applikation von rekombinantem VEGF<sub>165</sub> in Mäusen und Kaninchen zu einer verstärkten Mobilisation von Makrophagen im Knochenmark und im peripheren Blut, sowie zu einer deutlich verstärkten Progression von atherosklerotischen Plaques. (Celletti, Hilfiker et al. 2001; Celletti, Waugh et al. 2001)

## **1.7 Fragestellungen**

### **1.7.1 Genexpression von MCP-1, PDGF-A und PDGF-B in unstimulierten und stimulierten mononukleären Zellen**

Durch die Anreicherung der Nahrung männlicher gesunder Probanden mit hoch dosierten  $\omega$ -3 Fettsäuren (7g pro Tag), wurde in isolierten mononukleären Zellen, die entweder unstimuliert oder durch Adhärenz stimuliert waren, eine erniedrigte Genexpression von MCP-1, PDGF-A und PDGF-B mittels rT-PCR gemessen. (Jendraschak, Kaminski et al. 1993; Kaminski, Jendraschak et al. 1993; Baumann, Hessel et al. 1999) Ziel dieser Studie ist es, zu prüfen, ob dieser Effekt auf eine niedrige Dosierung der applizierten  $\omega$ -3 Fettsäuren (für sechs Wochen 3g pro Tag und für weitere sechs Wochen 1,5g pro Tag), übertragbar ist.

### **1.7.2 Proteinbildung von MCP-1 und PDGF-AB durch kultivierte mononukleäre Zellen**

Hat die Anreicherung der Nahrung männlicher gesunder Probanden mit niedrig dosierten  $\omega$ -3 Fettsäuren (für sechs Wochen 3g pro Tag und für weitere sechs Wochen 1,5g pro Tag), einen Einfluss auf die Proteinbildung von MCP-1 und PDGF-AB durch kultivierte mononukleäre Zellen, gemessen in den weiter unten beschriebenen Stimulationssystemen?

### **1.7.3 Serumkonzentrationen von MCP-1, PDGF-AB und VEGF**

Sind die in vitro gewonnenen Ergebnisse auch auf in vivo übertragbar, im Sinne einer Beeinflussung der im Serum der Probanden gemessenen Konzentrationen von MCP-1, PDGF-AB und VEGF?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studiendesign**

Rekrutiert wurden vierzehn männliche Freiwillige, deren Anamnese, Befund nach Routineuntersuchung und Laborparameter keinen Hinweis auf eine gesundheitliche Beeinträchtigung ergaben, hierbei wurde besonders die Frage nach allergischen Erkrankungen berücksichtigt, die alle Probanden verneinen konnten. Keiner der Freiwilligen nahm zwei Wochen vor und während der Studie Medikamente zu sich. Die Probanden wurden mündlich und schriftlich eingehend über Ablauf und Ziel der Untersuchung aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis mit Unterschreiben des Aufklärungsbogens. Die Probanden wurden paarweise durch Lube (Hadsund, Dänemark) randomisiert, und nahmen ergänzend zu ihrer normalen Diät für sechs Wochen, täglich sechs und für weitere sechs Wochen täglich drei 0,5g Kapseln mit entweder Fischöl-Konzentrat oder Placebo ein. Folglich nahmen sieben Probanden ein Fischöl-Konzentrat und sieben zur Kontrolle ein dem üblichen Fettsäurenprofil westlicher Ernährung angeglichenes Präparat als Placebo. Die Compliance wurde durch das gaschromatographisch bestimmte Fettsäurenprofil der Erythrozyten kontrolliert. Blut wurde am Anfang, nach sechs und nach zwölf Wochen abgenommen. Die Laborparameter wurden im klinikeigenen Labor untersucht. Mit Rücksicht auf die Randomisierung waren alle beteiligten Untersucher hinsichtlich der Gruppenzuordnung der Probanden nicht informiert. Bewilligt wurde die Studie durch die Ethikkommission der

medizinischen Fakultät der Ludwigs – Maximilians – Universität, München, Deutschland.

## **2.2 Präparation der mononukleären Zellen**

Die mononukleären Zellen wurden aus peripherem Blut mittels Dextran-Sedimentation und Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma, St.Louise USA) isoliert.

Nach nächtlichem Fasten wurde den Probanden eine Kubitalvene mit einer 1,5mm Dialyse-Kanüle (HOSPAL Industrie, Meyzieu Frankreich) punktiert und das Blut in fünf, mit 7,5ml ACD-Puffer als Antikoagulanzen angefüllte 50ml Falcon Tubes, frei laufend abgenommen (Free Flow Technique). Für die Aufbereitung von 500ml ACD-Puffer wurden 12,5g 85mM Na-Citrat (Sigma, St.Louise USA), 10g 111mM Dextrose ( $\alpha$ D-Glukose) (Merck, Darmstadt Deutschland), 7,45g 71mM Citric Acid (Sigma, St.Louise USA) und 500ml steriles H<sub>2</sub>O (Pharmacia & Upjohn, Erlangen Deutschland) verarbeitet.

Zusätzlich wurde eine Falcon Tube um autologes Serum für die Zellkulturen zu gewinnen mit 20ml Blut gefüllt und per Multi-Adapter, S-Monovetten (beide Sarstedt, Nürnbrecht Deutschland) aufgezogen und das Blut labortechnisch untersucht.

Die gefüllten Falcon Tubes wurden bei Raumtemperatur und 1000rpm für 15 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die untere Phase mit 0,9% NaCl (Fresenius, Bad

Homburg Deutschland) auf 50ml angefüllt. Die Lösung wurde in sterile Messzylinder aufgeteilt, mit dem halben Volumen 3,66% Dextran T 500 (Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden) vermischt und für 45min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Für die Aufbereitung von 3,66% Dextran T 500 (Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden) wurde 36,6g Dextran T 500 mit 1000ml 0,9% NaCl verwendet. Der Überstand wurde mit sterilen Plastikpipetten (Eppendorf, Hamburg Deutschland) in 50ml Falcon Tubes (Falcon, New Jersey GB) transferiert und bei 4°C und 1200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die gesamte wässrige Phase wurde mit einer, an eine Wasserstrahlpumpe angebrachten Pasteur-Pipette (Brand, Wertheim Deutschland) abgezogen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 15ml kaltem 0,9% NaCl (Fresenius, Bad Homburg Deutschland) aufgenommen. Das Pellet wurde durch mehrmaliges ein und aussaugen mit einer sterilen TR Pipette (Sarstedt, Nürnbrecht Deutschland) in Suspension gebracht. Mit einer sterilen TR Pipette wurde die Suspension über 10ml kaltes Histopaque-1077 (Sigma, St.Louise USA) in neuem Falcon Tube (Falcon, New Jersey GB) geschichtet und bei 4°C und 1300rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Die MNC, sichtbar als weißlicher Schleier an der Phasengrenze, wurde mit einer sterilen, silikonisierten Pasteur – Pipette (Brand, Wertheim Deutschland) in ein neues Falcon Tube transferiert und bei 4°C und 1300rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe verworfen. Die noch verbliebenen Erythrozyten wurden nun lysiert, indem die Zellen in 6ml H<sub>2</sub>O aufgenommen wurden. Um eine Zerstörung der MNC zu vermeiden wurde nach 25 Sekunden 2ml NaCl 3.5% zugegeben. Zur Suspension wurde nun 10 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) (Gibco BRL, Paisley GB) zugegeben und bei 4°C und 1200rpm für 5

Minuten zentrifugiert. Ein kleiner Teil der Zellen wurde nun in einem Tropfen FCS (fetales Kälberserum) (Biochrom, Berlin Deutschland) aufgenommen und auf Objektträger ausgestrichen. Im klinikeigenem Labor wurde die Probe nach Giemsa gefärbt und die Zellen spezifiziert. Der restliche Anteil der Zellen wurde nun wieder mit 5ml PBS in Suspension gebracht und dann wie folgt weiterbearbeitet. 10 µl der Suspension wurde mit 190µl Thrombo Plus (Sarstedt, Nürmbrecht Deutschland) (1/20) verdünnt. Hiervon wurde nun 10µl auf eine Neubauer-Kammer aufgetragen und die Zellzahl ausgezählt.

### **2.3 Zellkultur und Stimulation**

Die Zellsuspension wurde nun entsprechend mit DMEM Medium (Sigma, St.Louise USA) auf 500.000 mononukleäre Zellen pro ml eingestellt und mit 2mmol L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin (alle Sigma, St.Louise USA) und 5% autologem Serum supplementiert. Das Serum wurde initial bei der Blutabnahme aus 20ml Blut folgenderweise gewonnen. 20ml Blut wurde für eine Stunde ruhen gelassen, das Serum mit einer sterilen Pasteur-Pipette abgenommen und bei 3000g und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurde es steril filtriert und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

Auf acht Sechs-Loch-Platten (Falcon, New Jersey GB) wurde je Loch 2ml der Zellsuspension, folglich je 1 Mio. mononukleäre Zellen aufgebracht. Je viermal wurde noch 20ng rekombinantes MCP-1 (R&D Systems, Minneapolis USA), 20pg rekombinantes Il1-β (Sigma, St.Louise USA), 20ng rekombinantes Il1-β (Sigma,

St.Louise USA), 20ng LPS (Sigma, St.Louise USA), 2ng rekombinantes PDGF-BB (R&D Systems, Minneapolis USA) und nichts zur zusätzlichen Stimulation beigegeben. (siehe Tabelle 2). Die Hälfte der Platten wurden nun für 20 Stunden, die andere Hälfte für 48 Stunden in einem 37°C Brutschrank inkubiert.

Tabelle 2. Beschreibung der Stimulationsansätze

Stimulus	Dauer in Stunden	Menge pro ml Zellsuspension
Adhärenz	20 und 48	
+ rekombinantes MCP-1	20 und 48	10ng
+ rekombinantes Il-1 $\beta$	20 und 48	10pg und 10ng
+ LPS	20 und 48	10ng
+ rekombinantes PDGF-BB	20 und 48	1ng

Nach 20 oder 48 Stunden wurde die Stimulation beendet und das Material zur späteren Analyse entsprechend getrennt. Das konditionierte Medium wurde mit Pipetten abgenommen in Eppendorf Reagenzgefäßchen (Eppendorf, Hamburg Deutschland) gegeben, mittels Zentrifugation bei 6000rpm für 1 Minute von den Zellen getrennt, nochmals abgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Analyse eingefroren. Die an den Platten anhaftenden Zellen wurden mit kaltem PBS (Phosphate Buffered Saline) (Gibco BRL, Paisley GB) gewaschen, mit Cell – Scrapern (Greiner, Frickenhausen Deutschland) abgelöst, in Eppendorf Reagenzgefäßchen (Eppendorf, Hamburg Deutschland) gegeben und abzentrifugiert.

## **2.4 RNA – Isolation**

Es folgte eine Zell-Lyse und RNA Isolation mittels S.N.A.P. Total RNA Isolation Kit (Invitrogen, Carlsbad USA) entsprechend dem Herstellerprotokoll. Der isolierten RNA wurde 250µl Isopropanol (Merck, Darmstadt Deutschland) beigegeben und alles bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur RT – PCR eingefroren.

## **2.5 RT – Assay**

Die RNA Proben wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13000rpm für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen, 200µl Ethanol 70% (Apotheke des Innenstadtlinikums, München Deutschland) dem Pellet beigegeben, erneut bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13.000rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet 5 Minuten lang getrocknet. Das Pellet wurde nun in 30µl  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. 20µl der Suspension wurde nun mit 10µl Transkriptionspuffer (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg USA), 8µl  $\text{H}_2\text{O}$ , 2.5µl oligo (dT) Primern (Roche, Mannheim Deutschland), 2.5µl dNTP (Promega, Madison USA), 2µl RNase Inhibitor (Roche, Mannheim Deutschland) und 2µl DTT (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg USA) supplementiert. Die Ansätze wurden nun für zwei Minuten bei  $60^{\circ}\text{C}$  inkubiert, die kondensierte Flüssigkeit abzentrifugiert, wieder auf Eis gebracht und der Reaktionsansatz mit 1µl RNase Inhibitor (Roche, Mannheim Deutschland) und 2µl M – MLV reverse Transkriptase (200U/µl) (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg USA) vervollständigt. Bis jetzt wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Nun wurden die Ansätze bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 1.5 Stunden

inkubiert und abschließend für 3 Minuten auf 95°C erhitzt. Die kondensierte Flüssigkeit wurde abzentrifugiert und die Ansätze bis zur PCR im Kühlschrank bei 7°C gelagert. Die jeweils restlichen 10µl RNA wurden mit 25µl Ethanol versetzt und bei –80°C eingefroren.

## **2.6 3n-PCR mit Oligonukleotidprimern, Elektrophorese, Photographie und Scannen**

Zum Nachweis und zur Quantifizierung der mRNA Expression wurde die von Kaminski et al. (Jendraschak, Kaminski et al. 1993; Kaminski, Jendraschak et al. 1993) entwickelte 3n-PCR verwendet. Hierbei werden nicht überlappende ineinander gesetzte (nested) Primer und nicht markierte dNTPs verwendet. Diese Methode ist mehrfach publiziert und in der Arbeitsgruppe etabliert. Erst werden ein externes Segment und dann das entsprechende symmetrische interne Subsegment amplifiziert. Diese Technik dient einer Erhöhung der Spezifität der Amplifizierung des gesuchten Segmentes.

Benutzt wurden 20-mer Oligonukleotidprimer für humanes  $\beta$ -Actin, platelet derived growth factor (PDGF)-A, PDGF-B und monocyte chemoattractant protein 1 (MCP)-1, die entsprechend bekannter cDNA Sequenzen (Tabelle 3) synthetisiert und mittels high performance liquid chromatography (HPLC) aufgereinigt wurden (PE Biosystems, Weiterstadt Deutschland). Externe und interne Primer wurden um eine Base versetzt gewählt, sodass schließlich Segmente mit Längen von 239bp ( $\beta$ -Actin), 175bp (PDGF-A), 227bp (PDGF-B) und 195bp (MCP-1) entstehen.

Zur Amplifikation wurde ein totales Reaktionsvolumen von 50µl mit 10µmol/l desoxy-Ribonuklotid-Tri-Phosphat (dNTP) (Promega, Madison USA) , 1U Taq Polymerase, (beide Roche, Mannheim Deutschland) und 0.4-1.5µmol/l entsprechende Oligonukleotidprimer erreicht.

Tabelle 3. Beschreibung der amplifizierten Sequenzen

<b>Sequenz</b>	<b>Position des Segmentes</b>	<b>Länge des amplifizierten Segmentes</b>
β-Actin (e)	789-1069	
β-Actin (i)	810-1048	239
PDGF-A (e)	437-728	
PDGF-A (i)	534-708	175
PDGF-B (e)	983-1251	
PDGF-B (i)	1004-1230	227
MCP-1 (e)	93-331	
MCP-1 (i)	115-309	195

Position der Basen bezieht sich auf publizierte cDNA Sequenzen. (Ponte, Ng et al. 1984; Rao, Igarashi et al. 1986; Furutani, Nomura et al. 1989; Kraiss, Geary et al. 1996) Um Verwechslungen mit genomischer DNA zu vermeiden überdecken alle Primer mindestens ein Intron. (e) bedeutet externes amplifiziertes Segment; (i) bedeutet internes amplifiziertes Segment.

In einem Wasserbad Thermocycler (Biomed, Theres, Deutschland) wurde folgender Amplifikationszyklus durchgeführt: Jeweils aufeinander folgend für 30 Sekunden 94°C, 55°C und 72°C. In der ersten Runde (äußere Primer) wurden 15 Zyklen und in der zweiten Runde (innere Primer) 20 Zyklen durchgeführt. Auf beide Runden folgte eine abschließende zwei minütige Elongation bei 72°C.

20µl des Amplifikationsproduktes wurden mit 4µl Ladepuffers, bestehend aus 30% Glycerol und 0.25% Bromphenolblau (beides Sigma, St. Loius USA), versetzt und auf einem mit Ethidiumbromid

1.5% gefärbtem Agarose Gel (beides Sigma, St. Louis USA) in einer mit TBE-Puffer (Apotheke des Innenstadt-Klinikums, München Deutschland) angefüllten Elektrophoresekammer (Bio Rad, Hercules USA) bei 80V elektrophoretisch getrennt. Die Laufstrecke betrug ca. 8cm. Als Größenmarker diente pBR322 (Sigma, St. Louis USA), welcher cDNA-Fragmente von ca. 100 - 600 Basenpaaren enthält.

Das Gel wurde dann unter UV-Licht bei einer Blendenweite von 4.5 und einer Belichtungszeit von ca. 10 Sekunden auf Polaroid-Negativ-Film (Polaroid Typ 665 Positiv / Negativ Black & White Instant Pack Film) (Sigma, St. Louis USA) fotografiert (Polaroid MP4 Land Camera) (Polaroid, Cambridge USA). Das Negativ wurde dem Herstellerprotokoll folgend in einer Natriumsulfid-Lösung 18% (Sigma, St. Louis USA) entwickelt.

Die Negative wurden mittels einem Scanner digital eingescannt und die Banden mittels Scion Image (PC Version von NIH-Image) densitometrisch gemessen. Die gemessenen Werte wurden auf das jeweils entsprechende  $\beta$ -Actin Signal in Verhältnis gesetzt. Bei  $\beta$ -Actin handelt es sich um ein housekeeping Gen, es wird konstant exprimiert und nicht modifiziert. Weiterhin diente es als Positivkontrolle für die PCR.

## **2.7 ELISA**

Serum und das konditionierte Medium eines Probanden wurde nach Abschluss des Interventionszeitraumes gleichzeitig mittels ELISA – Technik, dem Herstellerprotokoll folgend quantitativ auf PDGF-AB, MCP-1 und VEGF (nur Serum) (alle Quantikine ELISA – Kits, R&D Systems, Minneapolis USA) analysiert.

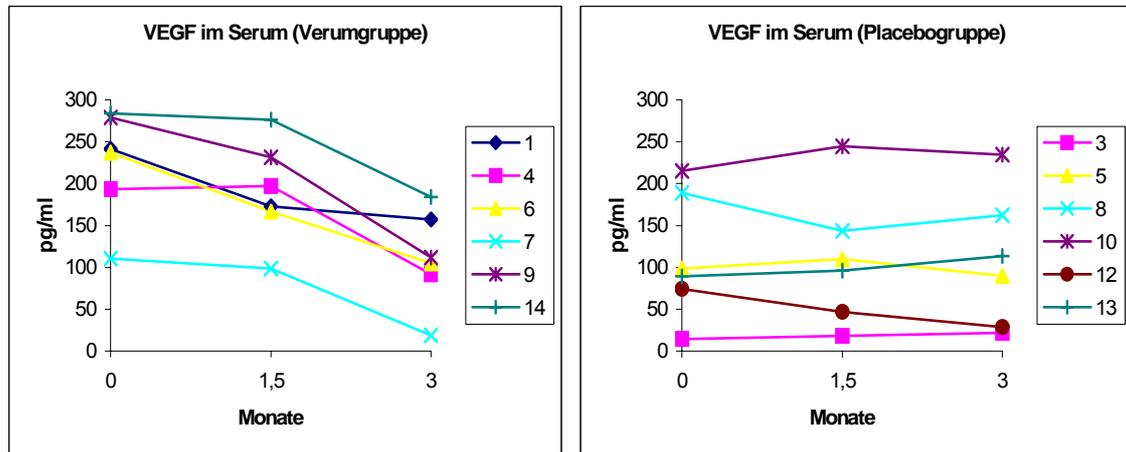
## **2.8 Gaschromatographie**

Anhand der Veränderung der Zusammensetzung der Plasmaphospholipide wurde die Compliance der Probanden kontrolliert. (Baumann, Hessel et al. 1999)

Die Fettsäurenkonzentrationen wurden mit der im Labor etablierten Gaschromatographie-Methode bestimmt. (Kaminski, Jendraschak et al. 1993)

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 VEGF – Konzentration im Serum der Probanden

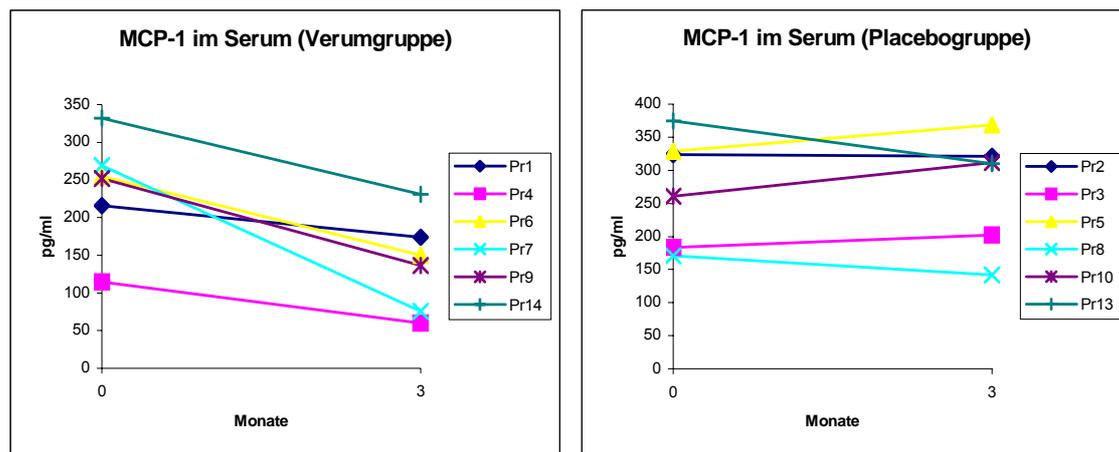


**Figur 1:** Dargestellt sind die mittels ELISA gemessenen Konzentrationen von VEGF im Serum der Probanden, aufgeteilt in Placebo und Verumgruppe. In der Placebogruppe zeigte sich keine verwertbare Veränderung über den Zeitraum der Studie. In der Verumgruppe zeigte sich nach Einnahme von 3g/d Pikasol<sup>®</sup> über sechs Wochen bei drei Probanden ein deutlicher Abfall, bei weiteren zwei nur ein geringer Abfall und in einem Fall sogar ein geringer Anstieg der gemessenen Konzentrationen. Nach Einnahme von 1,5g/d Pikasol<sup>®</sup> über weitere sechs Wochen zeigte sich bei fünf Probanden der Verumgruppe ein weiterer deutlicher Abfall, bei einem nur ein geringer zusätzlicher Abfall der gemessenen Konzentrationen von VEGF im Serum.

Mittels ELISA konnte zu jedem Zeitpunkt, bei allen Probanden VEGF im Serum gemessen werden. Hier zeigte sich eine deutliche Varianz in den interindividuellen Konzentrationen (Fig.1). In beiden Gruppen wurde je ein Proband aus technischen Gründen ausgeschlossen. Durchgängig zeigten die Probanden starke Konzentrationsschwankungen der gemessenen Wachstumsfaktoren und Cytokine, die sich deutlich gegenüber den anderen Probanden abgrenzten, sodaß von einem Meßfehler ausgegangen werden kann. In der Verumgruppe verringerte sich die im Serum gemessene Konzentration von VEGF nach 1,5 Monaten durchschnittlich um

14±13% und nach 3 Monaten um 54±18% (P<0.05) gegenüber den gemessenen Ausgangskonzentrationen. In der Placebogruppe veränderten sich die Konzentrationen von VEGF im Serum der Probanden sowohl nach 1,5 und nach 3 Monaten im Durchschnitt nicht nennenswert, -1±24% und +1±39%. Abschließend kann gesagt werden, daß sich durch die Einnahme von 3 g/d Fischöl für 1.5 Monate und 1.5 g/d für weitere 1.5 Monate die Konzentration von VEGF im Serum der Probanden im Durchschnitt um mehr als die Hälfte verringerte.

### 3.2 MCP-1 Konzentration im Serum der Probanden

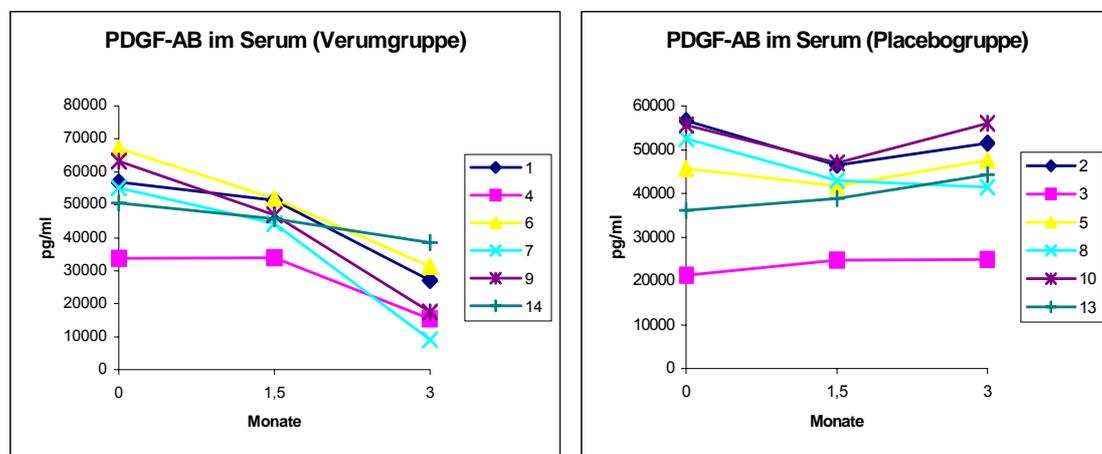


**Figur 2:** Dargestellt sind die mittels ELISA gemessenen Konzentrationen von MCP-1 im Serum der Probanden vor und nach der Einnahme von erst 3g / Tag für ein und einhalb Monate und dann 1,5g / Tag für weitere ein und einhalb Monate Fischöl. Veränderung in Verumgruppe gegenüber Ausgang P≤0.05.

Mittels ELISA konnte zu jedem Zeitpunkt MCP-1 im Serum der Probanden gemessen werden. Hier zeigte sich eine deutliche Varianz in den interindividuellen Konzentrationen (Fig. 2). In beiden Gruppen zeigten sich bei je einem Fall gegenüber den anderen Fällen in ihrem Verlauf stark divergierende Messwerte. Da auch beide Fälle zum gleichen Zeitpunkt verarbeitet wurden, wurde ein

Messfehler angenommen und somit die Fälle ausgeschlossen. In der Verumgruppe verringerte sich die im Serum gemessenen Konzentrationen nach drei Monaten im Durchschnitt um  $43 \pm 17\%$  gegenüber den Ausgangskonzentrationen. In der Placebogruppe veränderten sich die Konzentrationen an MCP-1 im Durchschnitt nicht nennenswert,  $1 \pm 16\%$ . Die Abnahme der MCP-1 Konzentrationen ist nach drei Monaten signifikant,  $P \leq 0.05$ . Abschließend kann gesagt werden, dass sich durch die Einnahme von 3g / Tag Fischöl für ein und einhalb Monate und 1,5g / Tag für weitere ein und einhalb Monate die Konzentration von MCP-1 im Serum der Probanden im Durchschnitt um mehr als zwei fünftel verringerte.

### 3.3 PDGF-AB Konzentration im Serum der Probanden

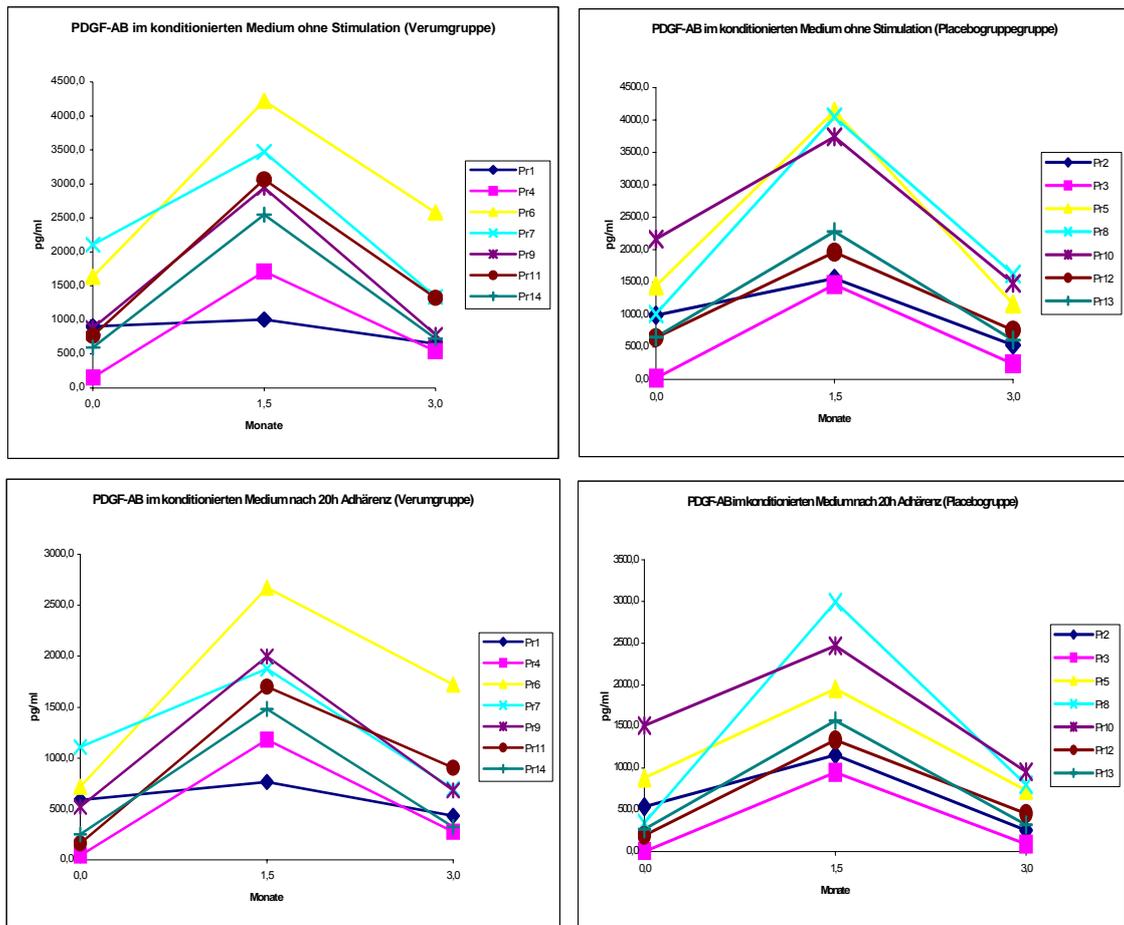


**Figur 3:** Dargestellt sind die mittels ELISA gemessenen Konzentrationen von PDGF-AB im Serum der Probanden vor und nach der Einnahme von erst 3g / Tag für ein und einhalb Monate und dann 1,5g / Tag für weitere ein und einhalb Monate Fischöl. Veränderung in Verumgruppe nach drei Monaten gegenüber Ausgang  $P \leq 0.05$ .

Mittels ELISA konnte zu jedem Zeitpunkt PDGF-AB im Serum der Probanden gemessen werden. Hier zeigte sich eine deutliche Varianz in den interindividuellen Konzentrationen (Fig. 3). In beiden

Gruppen zeigten sich bei je einem Fall gegenüber den anderen Fällen in ihrem Verlauf stark divergierende Messwerte. Da auch beide Fälle zum gleichen Zeitpunkt verarbeitet wurden, wurde ein Messfehler angenommen und somit die Fälle ausgeschlossen. In der Verumgruppe verringerten sich die im Serum gemessenen Konzentrationen nach ein und einhalb Monaten im Durchschnitt um  $15\pm 10\%$  und nach drei Monaten im Durchschnitt um  $57\pm 20\%$  gegenüber den Ausgangskonzentrationen. In der Placebogruppe veränderten sich die Konzentrationen an PDGF-AB im Durchschnitt nicht nennenswert, nach ein und einhalb Monaten  $-6\pm 14\%$  und nach drei Monaten um  $2\pm 16\%$ . Die Abnahme der PDGF-AB Konzentrationen ist nach drei Monaten signifikant,  $P\leq 0.05$ . Abschließend kann gesagt werden, dass sich durch die Einnahme von 3g / Tag Fischöl für ein und einhalb Monate und 1,5g / Tag für weitere ein und einhalb Monate die Konzentration von PDGF-AB im Serum der Probanden im Durchschnitt um mehr als die Hälfte verringerte.

### 3.4 PDGF-AB im konditionierten Medium

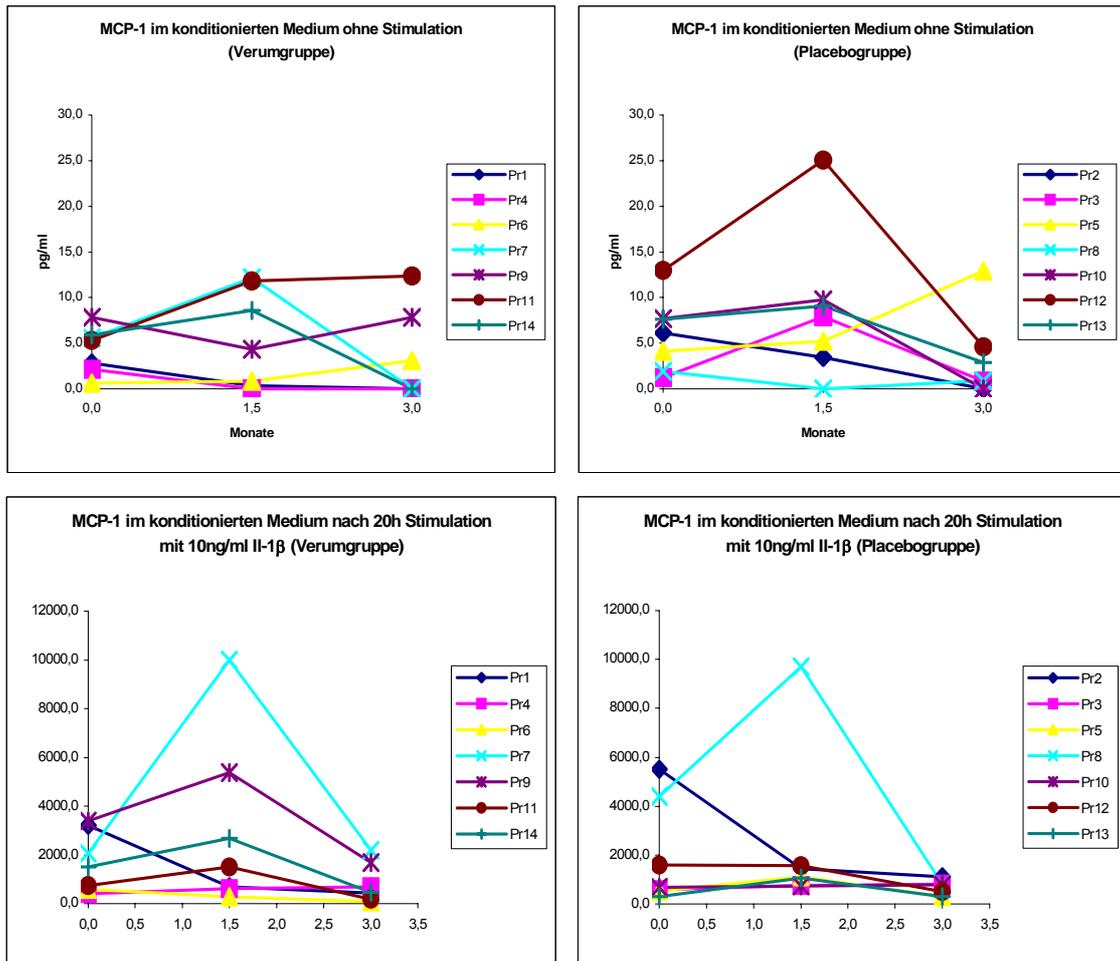


**Figur 4.** Gegenübergestellt sind die Veränderungen der im konditionierten Medium der MNC gemessenen PDGF-AB Mengen, einmal ohne Stimulation und einmal mit Stimulation durch Adhärenz für 20h. Da die interindividuellen Schwankungen sehr groß waren, wurden die Verläufe der gemessenen Werte einzeln je Proband dargestellt. Zwischen Placebo- und Verumgruppe zeigte sich kein signifikant unterschiedlicher Verlauf der gemessenen Werte über den Studienzeitraum.

PDGF-AB konnte in allen konditionierten Medien aller Proben von MNC ohne Stimulation oder in verschiedenen Stimulationsansätzen (siehe Tab. 2) nachgewiesen werden. Interindividuell wurden deutlich unterschiedliche Mengen des untersuchten Wachstumsfaktors nachgewiesen. Zwischen Verum- und Placebogruppe zeigten sich keine signifikant unterschiedlichen Veränderungen der nachgewiesenen Mengen über den Studienzeitraum. Nach 1.5 Monaten war in beiden Gruppen das

Niveau deutlich angestiegen und sank nach 3 Monaten wieder auf das ungefähre Ausgangsniveau. (siehe Fig. 4). Diese Ergebnisse sind am ehesten Folge von methodischen Fehlern. Die gesammelten Proben wurden bis zur Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Tiefkühltruhe war während dieses Zeitraumes einmal über ein Wochenende kaputt gegangen, so dass sich die Proben über mehrere Stunden ungleichmäßig erwärmten. Eventuell liegt darin eine Ursache in diesen nicht interpretierbaren Ergebnissen.

### 3.5 MCP-1 im konditionierten Medium



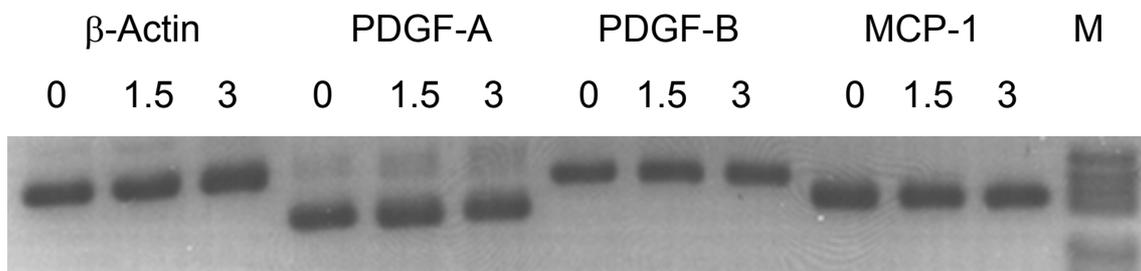
**Figur 5.** Gegenübergestellt sind die Veränderungen der im konditionierten Medium der MNC gemessenen MCP-1 Mengen, einmal ohne Stimulation und einmal mit Stimulation durch 10ng/ml II-1β für 20h. Da die interindividuellen Schwankungen sehr groß waren, wurden die Verläufe der gemessenen Werte einzeln je Proband dargestellt. Zwischen Placebo- und Verumgruppe zeigte sich kein signifikant unterschiedlicher Verlauf der gemessenen Werte über den Studienzeitraum.

MCP-1 konnte teilweise im konditionierten Medium der MNC vor allem ohne Stimulation nicht nachgewiesen werden und war hier auch nur in geringeren Mengen nachweisbar als in den verschiedenen Stimulationsansätzen (siehe Tab. 2). Interindividuell zeigten sich auch hier deutliche Schwankungen der nachgewiesenen Mengen des Cytokins. In beiden Gruppen zeigten sich bei einigen Probanden gegenüber dem Ausgangswert, nach 1.5

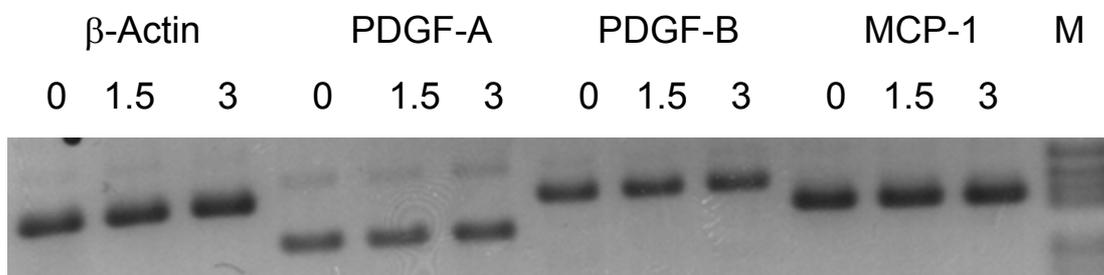
und nach 3 Monaten des Interventionszeitraumes erniedrigte Werte, bei einigen blieben sie konstant und vereinzelt stiegen sie sogar an. (siehe Fig. 5). Insgesamt konnte keine statistisch signifikante Aussage getroffen werden. Als Ursache sehen wir methodische Fehler, wie oben beschrieben.

### 3.6 Quantitative 3n-rT-PCR

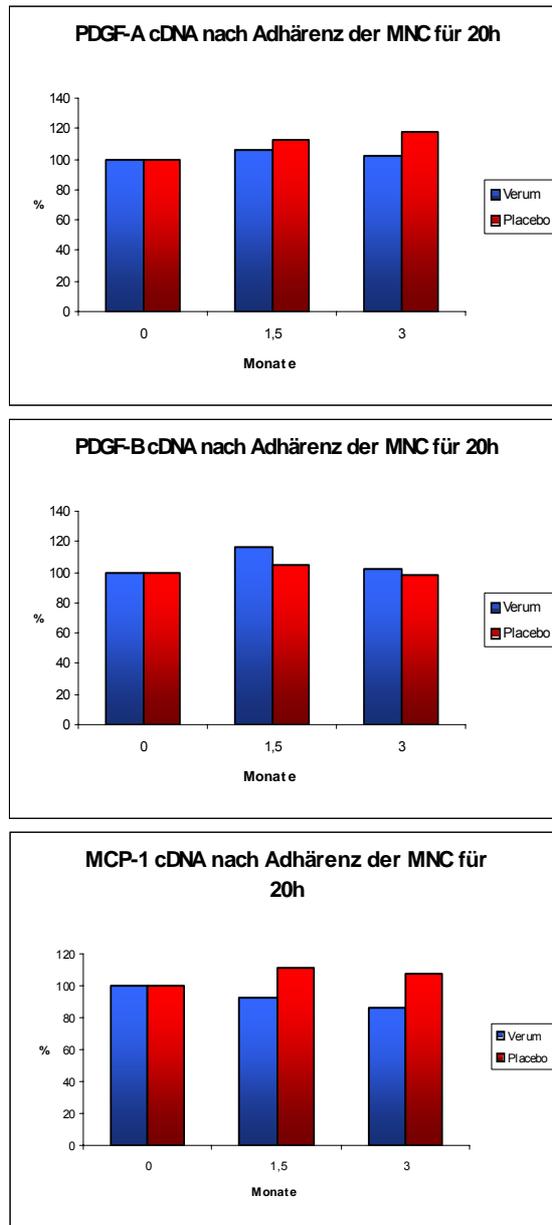
Sowohl bei fehlender Stimulation der MNCs, als auch in verschiedenen Stimulationsmodellen (siehe Tab. 2) änderten sich die quantitativ gemessenen PDGF-A cDNA Mengen über den Studienzeitraum in beiden Gruppen nicht signifikant. (siehe Fig. 6 und Abb. 3 und 4) Angesichts der Ergebnisse der Proteinbestimmungen der konditionierten Medien (s.o.), die methodische Fehler nahe legen, werden die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen auch als nicht interpretierbar gewertet.



**Abb. 3:** Expression von β-Actin, PDGF-A, PDGF-B und MCP-1 bei einem Probanden der Verumgruppe, zum Zeitpunkt 0, 1.5 und 3 Monaten. Exemplarisch herausgenommen ein Stimulationsansatz mit 10ng/ml MCP-1 über 20 Stunden. In den restlichen Stimulationsansätzen zeigten sich ebenso konstante cDNA Muster. M beschreibt den Marker. Die Proben wurden entsprechend oben geschilderter Methodik analysiert.



**Abb. 4:** Expression von β-Actin, PDGF-A, PDGF-B und MCP-1 bei einem Probanden der Placebogruppe, zum Zeitpunkt 0, 1.5 und 3 Monaten. Exemplarisch herausgenommen ein Stimulationsansatz mit 10ng/ml MCP-1 über 20 Stunden. In den restlichen Stimulationsansätzen zeigten sich ebenso konstante cDNA Muster. M beschreibt den Marker. Die Proben wurden entsprechend oben geschilderter Methodik analysiert.



**Figur 6:** Veränderungen der Expressionsniveaus von PDGF-A, PDGF-B und MCP-1 in MNCs der Probanden, im Vergleich von Verum- zu Placebogruppe, gegenüber des Ausgangsniveaus (0 Monate) nach 1.5 und 3 Monaten nach Interventionsbeginn. Exemplarisch dargestellt sind die Expressionsniveaus unter dem Einfluß einer zwanzig Stunden dauernden Stimulation durch Adhärenz. Ebenso nicht signifikant waren die Veränderungen in den übrigen Stimulationsmodellen. Die gelelektrophoretisch aufgetrennten cDNA Banden wurden entsprechend der oben geschilderten Methodik gemessen, analysiert und statistisch ausgewertet.

### 3.7 Studienverlauf und Compliancekontrolle

Alle Probanden nahmen bis zum Ende der Studie teil. Die Einnahme der Kapseln wurde von allen Probanden gut toleriert. Es traten keine Nebenwirkungen auf. Die Anzahl der zurückgegebenen Kapseln wies auf eine exakte Einnahme hin. Dies wurde durch die Analyse der Zusammensetzung der Plasmaphospholipide bestätigt. (siehe Tab. 3) Die Plasmakonzentrationen von Cholesterin, LDL, HDL, Triglyceriden und anderen Routineparametern waren bei allen Probanden vor und nach der Studie im Normbereich und zeigten keine signifikanten Veränderungen durch die diätetische Intervention.

Tab.: 3 Fettsäurezusammensetzung im Plasma vor (0 Monate) nach 1,5 Monaten und nach 3 Monaten Einnahme von Placebo oder Fischölkapseln.

Fettsäure / Zeitpunkt	Placebogruppe	Verumgruppe
C18:1 $\omega$ -9		
0 Mo.	12,4 $\pm$ 2,5	12,0 $\pm$ 0,9
1,5 Mo.	11,3 $\pm$ 1,2	9,8 $\pm$ 0,9
3 Mo.	12,3 $\pm$ 1,3	10,1 $\pm$ 1,3
C18:2 $\omega$ -6		
0 Mo.	22,9 $\pm$ 2,5	22,4 $\pm$ 1,9
1,5 Mo.	24,8 $\pm$ 2,8	18,1 $\pm$ 2,5
3 Mo.	24,1 $\pm$ 2,6	21,0 $\pm$ 3,3
C20:4 $\omega$ -6		
0 Mo.	8,9 $\pm$ 1,1	8,3 $\pm$ 1,3
1,5 Mo.	8,5 $\pm$ 0,9	7,7 $\pm$ 1,1
3 Mo.	8,5 $\pm$ 1,0	8,6 $\pm$ 1,7
C20:5 $\omega$ -3		
0 Mo.	1,3 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,5
1,5 Mo.	1,0 $\pm$ 0,8	5,0 $\pm$ 1,7
3 Mo.	0,7 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 2,4
C22:5 $\omega$ -3		
0 Mo.	0,9 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,2
1,5 Mo.	0,8 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,3
3 Mo.	0,8 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,3
C22:6 $\omega$ -3		
0 Mo.	3,2 $\pm$ 0,7	2,7 $\pm$ 0,7
1,5 Mo.	3,3 $\pm$ 1,6	5,2 $\pm$ 1,0
3 Mo.	2,9 $\pm$ 0,8	5,1 $\pm$ 1,6

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser randomisierten, Placebo-Kontrollierten doppelblinden Interventionsstudie erhielten vierzehn gesunde, männliche Probanden über einen Zeitraum von sechs Wochen täglich sechs Kapseln mit insgesamt 3g  $\omega$ -3 Fettsäuren, oder sechs Kapseln eines dem westlichen Fettsäureprofil angeglichenen Placebopräparates und für weitere sechs Wochen drei Kapseln mit insgesamt 1,5g  $\omega$ -3 Fettsäuren, oder sechs Kapseln des Placebopräparates.

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass niedrig dosierte  $\omega$ -3 Fettsäuren als Nahrungsergänzung einen Einfluss auf die Konzentrationen von PDGF-AB, MCP-1 und VEGF im Serum der Probanden haben. Es zeigten sich signifikant erniedrigte Mengen von PDGF-AB, MCP-1 und VEGF im Plasma der Probanden die niedrig dosierte  $\omega$ -3 Fettsäuren, gegenüber den Probanden, die ein Placebopräparat zu sich nahmen.

Aufgrund von den oben geschilderten methodischen Problemen sind die Ergebnisse der vielen Zellstimulationen nicht interpretierbar. Somit können in dieser Studie die Ergebnisse der Proteinbestimmungen im Serum der Probanden nicht durch Ergebnisse der ex vivo Untersuchungen mit ELISA und PCR untermauert werden.

## **4.2 Limitationen der gewählten Methodik**

Die Anzahl von sieben Probanden pro Gruppe ist sicherlich an der unteren statistisch relevanten Grenze, ist jedoch die gleiche, die in der vorausgegangenen Studie von Baumann et al. (Baumann, Hessel et al. 1999) gewählt wurde. Eventuell wäre bei einer deutlich höheren Probandenzahl ein statistisch relevanter Effekt in den Ergebnissen der Genexpression und Proteinbildung von PDGF und MCP-1 der MNCs zu sehen gewesen.

Mittels unserer Zellpräparation erhielten wir thrombozytenfreie MNCs. (Jendraschak, Kaminski et al. 1993; Kaminski, Jendraschak et al. 1993) Zur Aktivierung der MNCs wählten wir etablierte Stimulationsmodelle, wie Adhärenz an Polystyren und Zugabe von LPS. (Leonard and Yoshimura 1990; Shaw, Doherty et al. 1990; Gruss, Brach et al. 1994; Heinel, Singleton et al. 1995; Martin, Bootcov et al. 1995) Zur Aktivierung von MNCs ex vivo bedarf es der Anwesenheit von Serumfaktoren. (McNally and Anderson 1994) Die isolierten MNCs der Probanden wurden somit in Medium mit 5% autologem Serum für 20 und 48 Stunden mittels Adhärenz oder noch zusätzlichen Stimulantien aktiviert. Mittels 3n-PCR ist es möglich minimale Mengen an mRNA nachzuweisen und zu quantifizieren. (Jendraschak, Kaminski et al. 1998) PDGF-A, PDGF-B und MCP-1 mRNA war in unstimulierten MNCs reproduzierbar und konstant nachzuweisen und reagierte vorhersehbar und reproduzierbar unter Stimulation. (Daten nicht dargestellt) (Jendraschak, Kaminski et al. 1998; Baumann, Hessel et al. 1999) Mittels ELISA konnten die Produkte PDGF-AB und MCP-1 im konditionierten Medium der MNCs konstant und reproduzierbar

quantitativ nachgewiesen werden. Unter Stimulation reagierten sie konstant und reproduzierbar. (Daten nicht dargestellt) Somit haben wir gezeigt, dass die Gene für PDGF-A, PDGF-B und MCP-1 konstant und reproduzierbar exprimiert werden. Ebenso konstant und reproduzierbar, konnten wir die Produkte PDGF-AB und MCP-1 im konditionierten Medium nachweisen. Des Weiteren reagieren deren Genexpression und Proteinbildung auf Stimulation in konstanter, vorhersehbarer und reproduzierbarer Weise.

### **4.3 Diskussion MCP1**

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass durch die tägliche Einnahme von geringen Mengen  $\omega$ -3 Fettsäuren über drei Monate die im Serum der Probanden gemessenen Konzentrationen an PDGF-AB, MCP-1 und VEGF signifikant gegenüber den Ausgangswerten erniedrigt sind. (Siehe Fig. 2) Die Einnahme eines in seinem Fettsäureprofil (Siehe Tab. 1) der westlichen Ernährung angeglichenen Placebos, zeigte wie erwartet keinen Effekt. (Baumann, Hessel et al. 1999) In der Studie von Baumann et al. zeigte sich durch die Einnahme von  $\omega$ -3 Fettsäuren, aber nicht von  $\omega$ -6 oder  $\omega$ -9 Fettsäuren ein suppressiver Effekt auf die Genexpression von PDGF-A, PDGF-B und MCP-1 in unstimulierten und stimulierten humanen mononukleären Zellen. Aufgrund von methodischen Problemen konnten wir diese Ergebnisse in der vorliegenden Studie nicht in vitro nachvollziehen.

In der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie von Baumann et al. (Baumann, Hessel et al. 1999), wurde durch die Einnahme von sehr hohen Mengen an  $\omega$ -3 Fettsäuren (7g pro Tag) eine Erniedrigung

der Genexpression von PDGF-A, PDGF-B und MCP-1 durch isolierte mononukleäre Zellen der Probanden nachgewiesen. Ein Einfluss auf die Proteinbildung von PDGF-AB und MCP-1 wurde aus methodischen Gründen jedoch nicht untersucht.

In der „Study on Prevention of Coronary Atherosclerosis by Intervention with Marine Omega-3 fatty acids (SCIMO) konnte, mittels koronarangiographischer Kontrolle, ein moderater positiver Einfluß auf den Verlauf bestehender Atherosklerose der Herzkranzgefäße durch die Einnahme von täglich 3g eines 55% Konzentrates von EPA und DHA, nachgewiesen werden. Zusätzlich hatten die Patienten die Fischöl erhielten weniger kardiovaskuläre Ereignisse. (von Schacky, Angerer et al. 1999) In der GISSI Studie erhielten Patienten die kürzlich einen Myokardinfarkt überlebt hatten, täglich ein Gramm eines 85% Konzentrates von EPA und DHA zusätzlich zu ihrer normalen Therapie. Das Risiko eines fatalen kardiovaskulären Ereignisses senkte sich hier um 17 Prozent. (1999; Stone 2000) Diese Dosierungen entsprechen ungefähr den Mengen an DHA und EPA die man über zwei wöchentliche Portionen fettigen Fisches aufnehmen würde. In der „Diet and Reinfarction Trial“ (DART) Studie wurde durch zwei wöchentliche Fischportionen eine Erniedrigung der Gesamtmortalität von 29%, in Patienten die einen Myokardinfarkt überlebten, erreicht. (Burr, Fehily et al. 1989; Burr, Sweetham et al. 1994)

Die Aufnahme niedriger Dosen  $\omega$ -3 Fettsäuren hat somit zweifelsohne einen antiatherogenen Effekt. Trotzdem die Ergebnisse der in vitro Genexpression und Proteinbildung von MCP-1 durch mononukleäre Zellen in dieser Studie nicht interpretierbar sind, wie in der Studie von Baumann et al. (Baumann, Hessel et al. 1999) gesehen, sehen wir den antiatherogenen Wirkmechanismus

der  $\omega$ -3 Fettsäuren über eine Beeinflussung der Genexpression von MCP-1, PDGF-A, PDGF-B, VEGF und anderen proatherogenen Faktoren. Dies wird durch unsere Ergebnisse, einer signifikanten Erniedrigung der MCP-1, PDGF-AB und VEGF Konzentration im Serum der Probanden, die Fischöl aber nicht Placebo erhielten, unterstützt.

Ziel dieser Studie war es nicht, den genauen Mechanismus der beschriebenen Wirkungen von  $\omega$ -3 Fettsäuren zu ergründen. Dazu bedarf es weiterer Forschung mit zielgerichteter Fragestellung.

Interessanterweise wurden einigen Medikamenten den  $\omega$ -3 Fettsäuren gleichende Wirkungen zugeschrieben. Beispielsweise konnte durch die Gabe von  $17\beta$ -Estradiol, bei Kaninchen eine Verringerung der MCP-1 Genexpression und Proteinbildung in den Aorten derselben nachgewiesen werden. (Pervin, Singh et al. 1998) Weiterhin wurde bei bestimmten Statinen nicht nur ein cholesterinsenkender Effekt nachgewiesen, sondern v. a. ein immunmodulatorischer im Sinne einer Senkung der im Serum der Probanden gemessenen MCP-1 Konzentrationen. (Martinez-Gonzalez, Alfon et al. 2001; Grip, Janciauskiene et al. 2002; Rezaie-Majd, Maca et al. 2002)

#### 4.4 Diskussion PDGF

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass durch die tägliche Einnahme von geringen Mengen  $\omega$ -3 Fettsäuren über drei Monate die im Serum der Probanden gemessenen Konzentrationen an PDGF-AB signifikant gegenüber den Ausgangswerten erniedrigt sind. (Siehe Fig.:3) Die Einnahme eines in seinem Fettsäureprofil der westlichen Ernährung angeglichenen Placebos, zeigte wie erwartet keinen Effekt. (Baumann, Hessel et al. 1999)

In der Studie von Baumann et al. zeigte sich durch die Einnahme von  $\omega$ -3 Fettsäuren, aber nicht von  $\omega$ -6 oder  $\omega$ -9 Fettsäuren ein suppressiver Effekt auf die Genexpression von PDGF-A und PDGF-B in unstimulierten und stimulierten humanen mononukleären Zellen. Aufgrund von methodischen Problemen konnten wir diese Ergebnisse in der vorliegenden Studie nicht in vitro nachvollziehen.

In der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie von Baumann et al., (Baumann, Hessel et al. 1999) wurde durch die Einnahme von sehr hohen Mengen an  $\omega$ -3 Fettsäuren (7g pro Tag) eine Erniedrigung der Genexpression von PDGF-A und PDGF-B durch isolierte mononukleäre Zellen der Probanden, nachgewiesen. Ein Einfluss auf die Proteinbildung von PDGF-AB wurde aus methodischen Gründen jedoch nicht untersucht.

In zwei weiteren Studien konnte durch die hoch dosierte Gabe von  $\omega$ -3 Fettsäuren (7g pro Tag) ein suppressiver Effekt auf die Genexpression von PDGF-A und PDGF-B nachgewiesen werden. (Jendraschak, Kaminski et al. 1993; Kaminski, Jendraschak et al. 1993)

In einer Studie von Wallace et al. gab es durch die Einnahme von weniger als 1g  $\omega$ -3 Fettsäuren pro Tag für acht Wochen keinen

Einfluss auf die Serumkonzentration von PDGF. (Wallace, McCabe et al. 2000) In der vorliegenden Studie zeigte sich nach sechs Wochen Einnahme von 3g pro Tag nur eine minimale Suppression der PDGF-AB Serumkonzentration von 15%, jedoch nach weiteren sechs Wochen Einnahme von 1,5g pro Tag eine signifikante Erniedrigung der Serumkonzentration von PDGF-AB von 57% gegenüber dem Ausgangswert. Möglich wäre somit, dass es einen Schwellenwert gibt, der zwischen 1g und 1,5g täglicher Aufnahme von  $\omega$ -3 Fettsäuren liegt, sodass ein Effekt auf die Serumkonzentration von PDGF sichtbar wird. Einleuchtend wäre auch ein zeitabhängiger Faktor, vor allem in Anbetracht dessen, dass trotz relativ hoher Einnahme von 3g pro Tag nach sechs Wochen nur ein minimaler Effekt, aber nach weiteren sechs Wochen unter Einnahme von nur 1,5g ein sehr deutlicher Effekt auf die Serumkonzentration von PDGF vorhanden ist. Eventuell wäre es bei Wallace et al. nach einer längeren Studiendauer doch unter der gewählten Dosierung zu einem Effekt gekommen.

## 4.5 Diskussion VEGF

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass durch die tägliche Einnahme von geringen Mengen  $\omega$ -3 Fettsäuren über drei Monate die im Serum der Probanden gemessenen Konzentrationen an VEGF signifikant gegenüber den Ausgangswerten erniedrigt sind. (Siehe Fig. 1) Die Einnahme eines in seinem Fettsäureprofil der westlichen Ernährung angeglichenen Placebos, zeigte wie erwartet keinen Effekt. (Baumann, Hessel et al. 1999)

Ein Einfluss von  $\omega$ -3 Fettsäuren auf die Konzentration von VEGF im menschlichen Serum ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beschrieben worden. Lediglich in einer Studie an postmenopausalen Frauen wurde ein Einfluss auf die Konzentration von VEGF im Serum bei Menschen beschrieben. Hier hatte eine Hormonersatztherapie eine Verringerung der Konzentration von VEGF im Serum der Probanden zur Folge. (Sumino, Nakamura et al. 2000)

In einer weiteren Studie an Patienten mit KHK wurde durch die Gabe von Atorvastatin eine Reduktion von VEGF im Plasma erreicht. Es zeigte sich eine Reduktion von ungefähr 39%. (Franz Alber, Dulak et al. 2002)

Wilson et al. wiesen an Schweinen, die eine cholesterinreiche Ernährung und Medikation mit Simvastatin erhielten, eine geringere Dichte an Vasa vasorum in den arteriosklerotischen Plaques der Koronargefäße, gleichzeitig war die Expression von VEGF gegenüber den Schweinen erniedrigt, die nur eine cholesterinreiche Ernährung erhielten. (Wilson, Herrmann et al. 2002)

In Studien an Mäusen mit induzierten menschlichen Mammakarzinomen, konnte durch die Gabe von DHA zur Nahrung

ein reduziertes Wachstum und Metastasierung des Tumors beobachtet werden. Dem zugrunde lag am wahrscheinlichsten eine verringerte Vaskularisation des Tumors. In der Studie von Rose et al. (Rose and Connolly 1999; Rose and Connolly 2000) wurde dies als Folge einer verringerten Bildung von angiogenetisch wirkenden Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE) und 15-HETE interpretiert. Eine verringerte Bildung von VEGF im Tumor konnte hier nicht nachgewiesen werden. In anderen Studien wurde demgegenüber eine reduzierte Konzentration an VEGF, immunhistochemisch im Tumor nachgewiesen. (Mukutmoni-Norris, Hubbard et al. 2000) Da Eicosanoide die Bildung von VEGF fördern können, lag der Schluss nahe, dass die erniedrigte Bildung von VEGF unter der Applikation von  $\omega$ -3 Fettsäuren eine Folge der erniedrigten Bildung der Eicosanoiden ist.

Mukutmoni et al. (Mukutmoni-Norris, Hubbard et al. 2000) wiesen jedoch auch nach, dass peritoneale Makrophagen von Mäusen, die Fischöl mit ihrer Nahrung erhielten, trotz Induktion endogener Prostaglandin-Bildung mittels in vitro Stimulation mit LPS, signifikant weniger VEGF mRNA und tendenziell weniger des Proteinproduktes produzieren, als die Kontrollgruppe. Dies lässt den Schluss zu, dass alternative Mechanismen für den VEGF supprimierenden Effekt verantwortlich sein können.

Ein möglicher Mechanismus wäre eine direkte Beeinflussung der Genexpression wie schon bei PDGF und MCP-1 vermutet wird. (Jendraschak, Kaminski et al. 1993; Kaminski, Jendraschak et al. 1993; Baumann, Hessel et al. 1999)

Obwohl einige Autoren einen gentherapeutischen Einsatz von VEGF in den Gefäßkrankheiten propagieren (Sinnaeve, Varenne et al.

1999; O'Brien and Simari 2000; Khurana, Martin et al. 2001), gibt es starke Anhalte auf proatherogene Wirkungen. (Inoue, Itoh et al. 1998; Celletti, Hilfiker et al. 2001; Celletti, Waugh et al. 2001)

Ein proatherogenetischer Mechanismus von VEGF wäre möglicherweise, dass durch VEGF Vasa Vasorum in den fibrotischen Kappen der atherosklerotischen Plaques induziert werden. Hierdurch werden dieselben instabil, und können rupturieren, wodurch proatherogenetisches Material frei liegt und es zu einem akuten Verschluss des Gefäßes kommt. (Ware 2001)

In der Studie von Thies et al. wurden 162 Patienten, die eine Endarterektomie einer Karotisarterie erwarteten, randomisiert, Fischöl-Kapseln, Sonnenblumenöl-Kapseln oder gar nichts zu ihrer normalen Diät zu sich zu nehmen. Die mittlere Dauer von Beginn der Supplementation bis Operation war 42 Tage. In der histologischen Untersuchung an den Arterien zeigte sich in der Fischölgruppe eine deutlich geringere Anzahl von Makrophagen im arteriosklerotischen Plaque und deutlich dickere fibröse Kappen auf denselben, als in den beiden anderen Gruppen. Die Autoren zogen den Schluss, dass  $\omega$ -3 Fettsäuren die Stabilität der atherosklerotischen Plaques verstärken und somit die fatalen kardiovaskulären Ereignisse vermindern. (Thies, Garry et al. 2003)

In wieweit VEGF in der Atherogenese und Ausbildung von fatalen kardiovaskulären Ereignissen schlussendlich eine Rolle spielt, muss noch endgültig geklärt werden. Aus unseren Ergebnissen kann man einen weiteren möglichen antiatherogenetischen Wirkmechanismus der  $\omega$ -3 Fettsäuren erkennen. Ob aber ein direkter Einfluss auf die Genexpression vorhanden ist, oder andere Mechanismen eine Rolle spielen, bedarf weiterer Untersuchungen.

#### **4.6 EPA/DHA-Dosis**

Die Probanden wurden angewiesen für sechs Wochen täglich 6 Kapseln und für weitere sechs Wochen täglich 3 Kapseln zu ihrer normalen Ernährung einzunehmen. Somit nahmen die Probanden der Verumgruppe zuerst, bei einem  $\omega$ -3 Fettsäurenanteil von 0,5g pro Kapsel, täglich 3g und dann 1,5g  $\omega$ -3 Fettsäuren zu sich. Die anfängliche hohe Dosierung wurde gewählt um eine Aufsättigung mit  $\omega$ -3 Fettsäuren zu erreichen.

Dieses Dosierungsschema wurde in Anlehnung an SCIMO gewählt. (von Schacky, Angerer et al. 1999) Sie entspricht in etwa der errechneten täglichen Dosierung an  $\omega$ -3 Fettsäuren der Gruppe der DART-Studie, in der eine Reduktion der Gesamtmortalität um 29% erreicht wurde. (Burr, Fehily et al. 1989) Die effektive Dosis in Bezug auf klinische Endpunkte, liegt wohl zwischen 0,5 und 2g täglich. (Angerer and von Schacky 2000) Höhere Dosen zeigten keine deutlicheren Effekte. (Sacks, Stone et al. 1995) Auch die von der American Heart Association empfohlenen Dosen liegen zwischen 0,6 – 2g täglich. (Leaf, Kang et al. 2003)

#### **4.7 Ergebnisse der Zellstimulationen**

Die Ergebnisse der Zellstimulationen sind nicht interpretierbar. Angesichts der guten Ergebnisse der Untersuchungen im Serum der Probanden sind hier am ehesten methodische Probleme für diese Ergebnisse verantwortlich. Ein möglicher Grund kann sein, dass diese Proben in einer Tiefkühltruhe bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Verarbeitung

gelagert waren und diese über ein Wochenende ausfiel. Die Folge war, dass die Proben über 48 Stunden aufgetaut waren. Eventuell sind weitere oder andere methodische Probleme verantwortlich, die jetzt aber nicht mehr nachvollzogen werden können.

## **5 Zusammenfassung**

In der Pathogenese, Progression und den akuten Ereignissen der Atherosklerose haben die Wachstumsfaktoren VEGF und PDGF und das Chemokin MCP-1 große Bedeutung. Durch Veränderung der Ausbildung dieser Proteine könnte der Lauf der durch Atherosklerose bedingten Erkrankungen positiv beeinflusst werden. Untersuchungen von Medikamenten oder Nahrungsbestandteilen die einen Einfluss auf die Genexpression dieser Proteine haben sind somit von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von diätetisch zugeführten, niedrig dosierten  $\omega$ -3 Fettsäuren auf die Serumspiegel von VEGF, PDGF-AB und MCP-1 und die Expression und Proteinbildung von MCP-1 und PDGF unter dem Einfluss von alleiniger Adhärenzstimulation oder Zugabe von verschiedenen gängigen Stimulanzen in mononukleären Zellen untersucht. In der Atherogenese spielen mononukleäre Zellen eine zentrale Rolle. Da  $\omega$ -3 Fettsäuren einen positiven Effekt in den durch Atherosklerose bedingten Krankheiten haben und vorausgegangene Studien sehr hohe, in der Praxis nicht mögliche Dosierungen gewählt wurden, ist eine Studie zu deren Einfluss, in niedriger, jedoch wirksamer Dosierung, auf die Expression von VEGF, PDGF-AB und MCP-1

von großer Bedeutung. Dafür wurde eine randomisierte, doppelblinde, Placebo kontrollierte Interventionsstudie an 14 männlichen gesunden Freiwilligen durchgeführt. Die Probanden der Verumgruppe erhielten zusätzlich zu ihrer normalen Ernährung für sechs Wochen täglich 3g und dann für weitere sechs Wochen 1,5g  $\omega$ -3 Fettsäuren. Die anfängliche hohe Dosierung wurde gewählt um eine Aufsättigung mit  $\omega$ -3 Fettsäuren zu erreichen. Die Probanden der Placebogruppe erhielten entsprechend Placebokapseln die in ihrem Fettsäurenprofil der westlichen Ernährung angepasst waren.

Die Expressionsänderungen der genannten Proteine wurden in den Zellstimulationen auf der Genomebene mittels der etablierten 3n-rT-PCR als auch auf der Proteinebene mittels ELISA gemessen. Aufgrund von o.g. methodischen Problemen waren diese Ergebnisse jedoch angesichts der großen Mühen leider nicht verwertbar. Die Konzentrationen von VEGF, PDGF-AB und MCP-1 im Serum der Probanden wurden mittels ELISA gemessen. Hier zeigten sich deutliche interindividuelle Schwankungen. Die Konzentration von VEGF im Serum der Probanden der Verumgruppe senkte sich nach 3 Monaten durchschnittlich um  $54\pm 18\%$  gegenüber den Ausgangswerten. Die Konzentration von VEGF im Serum der Placebogruppe änderte sich im Durchschnitt nicht, jedoch schwankten die Werte. Die Konzentration von PDGF-AB senkte sich im Serum der Verumgruppe nach 3 Monaten durchschnittlich um  $57\pm 20\%$ . Die Konzentration von PDGF-AB veränderte sich in der Placebogruppe über den Untersuchungszeitraum nicht relevant. In der Verumgruppe senkte sich die Konzentration von MCP-1 im Serum der Probanden nach 3 Monaten im Durchschnitt um  $43\pm 17\%$ . In der Placebogruppe war

keine nennenswerte Veränderung vorhanden. Diese Ergebnisse waren statistisch relevant.

Bei gesunden Probanden beeinflussen niedrig dosierte  $\omega$ -3 Fettsäuren die Regulation von VEGF, PDGF-AB und MCP-1. Somit wird die antiatherosklerotische Wirkung von  $\omega$ -3 Fettsäuren über die Beeinflussung der Genexpression und Proteinbildung proatherogener Faktoren auch in niedrigen Dosierungen bestätigt. Ein Einfluss von  $\omega$ -3 Fettsäuren auf VEGF wurde hier erstmals beim Menschen beschrieben.

## 6 Literaturverzeichnis

- (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.
- Adamis, A. P., J. W. Miller, et al. (1994). "Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy." Am J Ophthalmol **118**(4): 445-50.
- Aiello, L. P., R. L. Avery, et al. (1994). "Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders." N Engl J Med **331**(22): 1480-7.
- Aiello, R. J., P. A. Bourassa, et al. (1999). "Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(6): 1518-25.
- Albert, C. M., C. H. Hennekens, et al. (1998). "Fish consumption and risk of sudden cardiac death." Jama **279**(1): 23-8.
- Amento, E. P., N. Ehsani, et al. (1991). "Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb **11**(5): 1223-30.
- Angerer, P. and C. von Schacky (2000). "n-3 polyunsaturated fatty acids and the cardiovascular system." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **3**(6): 439-45.
- Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1997). "Human chemokines: an update." Annu Rev Immunol **15**: 675-705.
- Banai, S., D. Shweiki, et al. (1994). "Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis." Cardiovasc Res **28**(8): 1176-9.
- Bang, H. O., J. Dyerberg, et al. (1971). "Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos." Lancet **1**(7710): 1143-5.
- Bang, H. O., J. Dyerberg, et al. (1980). "The composition of the Eskimo food in north western Greenland." Am J Clin Nutr **33**(12): 2657-61.
- Barrett, T. B. and E. P. Benditt (1987). "sis (platelet-derived growth factor B chain) gene transcript levels are elevated in human

- atherosclerotic lesions compared to normal artery." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(4): 1099-103.
- Barrett, T. B., C. M. Gajdusek, et al. (1984). "Expression of the sis gene by endothelial cells in culture and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(21): 6772-4.
- 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.
- Billman, G. E., J. X. Kang, et al. (1999). "Prevention of sudden cardiac death by dietary pure omega-3 polyunsaturated fatty acids in dogs." Circulation **99**(18): 2452-7.
- Boring, L., J. Gosling, et al. (1998). "Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis." Nature **394**(6696): 894-7.
- Brogi, E., J. A. Winkles, et al. (1993). "Distinct patterns of expression of fibroblast growth factors and their receptors in human atheroma and nonatherosclerotic arteries. Association of acidic FGF with plaque microvessels and macrophages." J Clin Invest **92**(5): 2408-18.
- Brogi, E., T. Wu, et al. (1994). "Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only." Circulation **90**(2): 649-52.
- 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.
- Burr, M. L., P. M. Sweetham, et al. (1994). "Diet and reinfarction." Eur Heart J **15**(8): 1152-3.
- Carlos, T. M. and J. M. Harlan (1994). "Leukocyte-endothelial adhesion molecules." Blood **84**(7): 2068-101.
- Celletti, F. L., P. R. Hilfiker, et al. (2001). "Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor165 on progression of atherosclerotic plaque." J Am Coll Cardiol **37**(8): 2126-30.
- Celletti, F. L., J. M. Waugh, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression." Nat Med **7**(4): 425-9.
- Chen, X. L., P. E. Tummala, et al. (1998). "Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells." Circ Res **83**(9): 952-9.
- Cipollone, F., M. Marini, et al. (2001). "Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis

- after coronary angioplasty." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(3): 327-34.
- Claesson-Welsh, L. and C. H. Heldin (1989). "Platelet-derived growth factor. Three isoforms that bind to two distinct cell surface receptors." Acta Oncol **28**(3): 331-4.
- Cushing, S. D., J. A. Berliner, et al. (1990). "Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(13): 5134-8.
- Cybulsky, M. I. and M. A. Gimbrone, Jr. (1991). "Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis." Science **251**(4995): 788-91.
- Daviglus, M. L., J. Stamler, et al. (1997). "Fish Consumption and the 30-Year Risk of Fatal Myocardial Infarction." N Engl J Med **336**(15): 1046-1053.
- Dawson, T. C., W. A. Kuziel, et al. (1999). "Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Atherosclerosis **143**(1): 205-11.
- De Caterina, R., P. Libby, et al. (1995). "Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines." J Clin Invest **96**(1): 60-8.
- 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.
- de Vries, C., J. A. Escobedo, et al. (1992). "The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor." Science **255**(5047): 989-91.
- Demer, L. L. and Y. Tintut (1999). "Osteopontin. Between a rock and a hard plaque." Circ Res **84**(2): 250-2.
- Detmar, M., L. F. Brown, et al. (1994). "Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis." J Exp Med **180**(3): 1141-6.
- Detmar, M., K. T. Yeo, et al. (1995). "Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells." J Invest Dermatol **105**(1): 44-50.
- Deuel, T. F., G. F. Pierce, et al. (1987). "Platelet-derived growth factor/sis in normal and neoplastic cell growth." J Cell Physiol Suppl **Suppl 5**: 95-9.
- Dirks, R. P. and H. P. Bloemers (1995). "Signals controlling the expression of PDGF." Mol Biol Rep **22**(1): 1-24.

- Dollery, C. M., J. R. McEwan, et al. (1995). "Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease." Circ Res **77**(5): 863-8.
- Dyerberg, J. and H. O. Bang (1979). "Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos." Lancet **2**(8140): 433-5.
- Dyerberg, J. and H. O. Bang (1979). "Lipid metabolism, atherogenesis, and haemostasis in Eskimos: the role of the prostaglandin-3 family." Haemostasis **8**(3-5): 227-33.
- 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.
- Endres, S., R. Ghorbani, et al. (1989). "The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells." N Engl J Med **320**(5): 265-271.
- Endres, S. and C. von Schacky (1996). "n-3 polyunsaturated fatty acids and human cytokine synthesis." Curr Opin Lipidol **7**(1): 48-52.
- Falk, E., P. K. Shah, et al. (1995). "Coronary plaque disruption." Circulation **92**(3): 657-71.
- Ferns, G. A., E. W. Raines, et al. (1991). "Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF." Science **253**(5024): 1129-32.
- Ferrara, N. and T. Davis-Smyth (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor." Endocr Rev **18**(1): 4-25.
- Ferrara, N., K. Houck, et al. (1992). "Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins." Endocr Rev **13**(1): 18-32.
- Fitzpatrick, L. A., A. Severson, et al. (1994). "Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis." J Clin Invest **94**(4): 1597-604.
- Fox, P. L. and P. E. DiCorleto (1988). "Fish oils inhibit endothelial cell production of platelet-derived growth factor-like protein." Science **241**(4864): 453-6.
- Frank, S., G. Hubner, et al. (1995). "Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing." J Biol Chem **270**(21): 12607-13.
- Franz Alber, H., J. Dulak, et al. (2002). "Atorvastatin decreases vascular endothelial growth factor in patients with coronary artery disease." J Am Coll Cardiol **39**(12): 1951-5.
- Frenette, P. S. and D. D. Wagner (1996). "Adhesion molecules--Part 1." N Engl J Med **334**(23): 1526-9.

- Frenette, P. S. and D. D. Wagner (1996). "Adhesion molecules--Part II: Blood vessels and blood cells." N Engl J Med **335**(1): 43-5.
- Furutani, Y., H. Nomura, et al. (1989). "Cloning and sequencing of the cDNA for human monocyte chemotactic and activating factor (MCAF)." Biochem Biophys Res Commun **159**(1): 249-55.
- Galis, Z. S., M. Muszynski, et al. (1994). "Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion." Circ Res **75**(1): 181-9.
- Galis, Z. S., G. K. Sukhova, et al. (1994). "Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques." J Clin Invest **94**(6): 2493-503.
- Gimbrone, M. A., Jr., T. Nagel, et al. (1997). "Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology." J Clin Invest **100**(11 Suppl): S61-5.
- Grip, O., S. Janciauskiene, et al. (2002). "Atorvastatin activates PPAR-gamma and attenuates the inflammatory response in human monocytes." Inflamm Res **51**(2): 58-62.
- Gruss, H. J., M. A. Brach, et al. (1994). "Regulation of MCP-1/JE gene expression during monocytic differentiation." J Immunol **153**(11): 4907-14.
- Gu, L., Y. Okada, et al. (1998). "Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice." Mol Cell **2**(2): 275-81.
- Guidi, A. J., G. Abu-Jawdeh, et al. (1995). "Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia." J Natl Cancer Inst **87**(16): 1237-45.
- Hay, C. R., A. P. Durber, et al. (1982). "Effect of fish oil on platelet kinetics in patients with ischaemic heart disease." Lancet **1**(8284): 1269-70.
- Heinel, L. A., D. Singleton, et al. (1995). "Monocyte adherence to the subendothelial basement membrane increases interleukin-8 gene expression and antigen release." Inflammation **19**(5): 517-27.
- Heldin, C. H. and B. Westermark (1999). "Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor." Physiol Rev **79**(4): 1283-316.
- Inoue, M., H. Itoh, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions:

- possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis." Circulation **98**(20): 2108-16.
- Jendraschak, E., W. E. Kaminski, et al. (1993). "Growth factor mRNA profiles in unstimulated human mononuclear cells: identification of genes which are constitutively and variably expressed." Biochem Biophys Res Commun **196**(1): 25-31.
- Jendraschak, E., W. E. Kaminski, et al. (1998). "IGF-1, PDGF and CD18 are adherence-responsive genes: regulation during monocyte differentiation." Biochim Biophys Acta **1396**(3): 320-35.
- 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.
- Kagawa, Y., M. Nishizawa, et al. (1982). "Eicosapolyenoic acids of serum lipids of Japanese islanders with low incidence of cardiovascular diseases." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) **28**(4): 441-53.
- 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.
- Keck, P. J., S. D. Hauser, et al. (1989). "Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF." Science **246**(4935): 1309-12.
- Keys, A., A. Menotti, et al. (1984). "The seven countries study: 2,289 deaths in 15 years." Prev Med **13**(2): 141-54.
- Khurana, R., J. F. Martin, et al. (2001). "Gene therapy for cardiovascular disease: a case for cautious optimism." Hypertension **38**(5): 1210-6.
- Kim, K. J., B. Li, et al. (1993). "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo." Nature **362**(6423): 841-4.
- Kobayashi, S., A. Hirai, et al. (1981). "Reduction in blood viscosity by eicosapentaenoic acid." Lancet **2**(8239): 197.
- Koch, A. E., L. A. Harlow, et al. (1994). "Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis." J Immunol **152**(8): 4149-56.
- Kraiss, L. W., R. L. Geary, et al. (1996). "Acute reductions in blood flow and shear stress induce platelet-derived growth factor-A expression in baboon prosthetic grafts." Circ Res **79**(1): 45-53.
- Krieger, M., S. Acton, et al. (1993). "Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors." J Biol Chem **268**(7): 4569-72.

- 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.
- 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.
- Leaf, A., J. X. Kang, et al. (2003). "Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils." Circulation **107**(21): 2646-52.
- Leonard, E. J. and T. Yoshimura (1990). "Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)." Immunol Today **11**(3): 97-101.
- Leung, D. W., G. Cachianes, et al. (1989). "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen." Science **246**(4935): 1306-9.
- Libby, P. (1995). "Molecular bases of the acute coronary syndromes." Circulation **91**(11): 2844-50.
- Libby, P. (2000). "Changing concepts of atherogenesis." J Intern Med **247**(3): 349-58.
- Libby, P., S. J. Warner, et al. (1988). "Production of platelet-derived growth factor-like mitogen by smooth-muscle cells from human atheroma." N Engl J Med **318**(23): 1493-8.
- Lorenz, R., U. Spengler, et al. (1983). "Platelet function, thromboxane formation and blood pressure control during supplementation of the Western diet with cod liver oil." Circulation **67**(3): 504-11.
- Malecaze, F., S. Clamens, et al. (1994). "Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy." Arch Ophthalmol **112**(11): 1476-82.
- Martin, D. K., M. R. Bootcov, et al. (1995). "Human macrophages contain a stretch-sensitive potassium channel that is activated by adherence and cytokines." J Membr Biol **147**(3): 305-15.
- Martinez-Gonzalez, J., J. Alfon, et al. (2001). "HMG-CoA reductase inhibitors reduce vascular monocyte chemotactic protein-1 expression in early lesions from hypercholesterolemic swine independently of their effect on plasma cholesterol levels." Atherosclerosis **159**(1): 27-33.
- Mattern, J., R. Koomagi, et al. (1996). "Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma." Br J Cancer **73**(7): 931-4.

- McLennan, P. L., M. Y. Abeywardena, et al. (1988). "Dietary fish oil prevents ventricular fibrillation following coronary artery occlusion and reperfusion." Am Heart J **116**(3): 709-17.
- McNally, A. K. and J. M. Anderson (1994). "Complement C3 participation in monocyte adhesion to different surfaces." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 10119-23.
- Mondy, J. S., V. Lindner, et al. (1997). "Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression in response to altered blood flow in vivo." Circ Res **81**(3): 320-7.
- 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.
- Mukutmoni-Norris, M., N. E. Hubbard, et al. (2000). "Modulation of murine mammary tumor vasculature by dietary n-3 fatty acids in fish oil." Cancer Lett **150**(1): 101-9.
- Nelken, N. A., S. R. Coughlin, et al. (1991). "Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques." J Clin Invest **88**(4): 1121-7.
- Nelson, P. J. and A. M. Krensky (2001). "Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection." Immunity **14**(4): 377-86.
- Ni, W., K. Egashira, et al. (2001). "New Anti-Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Therapy Attenuates Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice." Circulation **103**(16): 2096-2101.
- Nilsson, J., M. Sjolund, et al. (1985). "Arterial smooth muscle cells in primary culture produce a platelet-derived growth factor-like protein." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(13): 4418-22.
- O'Brien, T. and R. D. Simari (2000). "Gene therapy for atherosclerotic cardiovascular disease: a time for optimism and caution." Mayo Clin Proc **75**(8): 831-4.
- Ostman, A. and C. H. Heldin (2001). "Involvement of platelet-derived growth factor in disease: development of specific antagonists." Adv Cancer Res **80**: 1-38.
- Pervin, S., R. Singh, et al. (1998). "Estradiol suppresses MCP-1 expression In vivo : implications for atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(10): 1575-82.
- Ponte, P., S. Y. Ng, et al. (1984). "Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA." Nucleic Acids Res **12**(3): 1687-96.
- Raines, E. W., S. K. Dower, et al. (1989). "Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA." Science **243**(4889): 393-6.

- Rao, C. D., H. Igarashi, et al. (1986). "Structure and sequence of the human c-sis/platelet-derived growth factor 2 (SIS/PDGF2) transcriptional unit." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(8): 2392-6.
- Reape, T. J. and P. H. Groot (1999). "Chemokines and atherosclerosis." Atherosclerosis **147**(2): 213-25.
- 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.
- Rezaie-Majd, A., T. Maca, et al. (2002). "Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(7): 1194-9.
- Rose, D. P. and J. M. Connolly (1999). "Antiangiogenicity of docosahexaenoic acid and its role in the suppression of breast cancer cell growth in nude mice." Int J Oncol **15**(5): 1011-5.
- Rose, D. P. and J. M. Connolly (2000). "Regulation of tumor angiogenesis by dietary fatty acids and eicosanoids." Nutr Cancer **37**(2): 119-27.
- Ross, R. (1989). "Platelet-derived growth factor." Lancet **1**(8648): 1179-82.
- Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." Nature **362**(6423): 801-9.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-26.
- Ross, R., D. F. Bowen-Pope, et al. (1985). "Platelets, macrophages, endothelium, and growth factors. Their effects upon cells and their possible roles in atherogenesis." Ann N Y Acad Sci **454**: 254-60.
- Ross, R., D. F. Bowen-Pope, et al. (1990). "Platelet-derived growth factor and its role in health and disease." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **327**(1239): 155-69.
- Ross, R., J. Masuda, et al. (1990). "Cellular interactions, growth factors, and smooth muscle proliferation in atherogenesis." Ann N Y Acad Sci **598**: 102-12.
- 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.
- Shalaby, F., J. Rossant, et al. (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." Nature **376**(6535): 62-6.
- Shaw, R. J., D. E. Doherty, et al. (1990). "Adherence-dependent increase in human monocyte PDGF(B) mRNA is associated

- with increases in c-fos, c-jun, and EGR2 mRNA." J Cell Biol **111**(5 Pt 1): 2139-48.
- Shen, H., M. Clauss, et al. (1993). "Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes." Blood **81**(10): 2767-73.
- Shimokado, K., E. W. Raines, et al. (1985). "A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF." Cell **43**(1): 277-86.
- Shweiki, D., A. Itin, et al. (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." Nature **359**(6398): 843-5.
- Shyy, Y. J., H. J. Hsieh, et al. (1994). "Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4678-82.
- 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.
- Sinnaeve, P., O. Varenne, et al. (1999). "Gene therapy in the cardiovascular system: an update." Cardiovasc Res **44**(3): 498-506.
- 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.
- Stone, N. J. (2000). "The Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardio (GISSI)-Prevenzione Trial on fish oil and vitamin E supplementation in myocardial infarction survivors." Curr Cardiol Rep **2**(5): 445-51.
- Sumino, H., T. Nakamura, et al. (2000). "Serum level of vascular endothelial growth factor is decreased by hormone replacement therapy in postmenopausal women without hypercholesterolemia." Atherosclerosis **148**(1): 189-95.
- Suzuki, K., N. Hayashi, et al. (1996). "Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma." Cancer Res **56**(13): 3004-9.
- Terman, B. I., M. Dougher-Vermazen, et al. (1992). "Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor." Biochem Biophys Res Commun **187**(3): 1579-86.
- Thies, F., J. M. Garry, et al. (2003). "Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic

- plaques: a randomised controlled trial." Lancet **361**(9356): 477-85.
- Thomas, K. A. (1996). "Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent." J Biol Chem **271**(2): 603-6.
- 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.
- van der Wal, A. C., A. E. Becker, et al. (1994). "Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology." Circulation **89**(1): 36-44.
- Viglietto, G., D. Maglione, et al. (1995). "Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines." Oncogene **11**(8): 1569-79.
- von Schacky, C. (1987). "Prophylaxis of atherosclerosis with marine omega-3 fatty acids. A comprehensive strategy." Ann Intern Med **107**(6): 890-9.
- 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.
- von Schacky, C., S. Fischer, et al. (1985). "Long-term effects of dietary marine omega-3 fatty acids upon plasma and cellular lipids, platelet function, and eicosanoid formation in humans." J Clin Invest **76**(4): 1626-31.
- Vora, D. K., Z. T. Fang, et al. (1997). "Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression." Circ Res **80**(6): 810-8.
- Walker, L. N., D. F. Bowen-Pope, et al. (1986). "Production of platelet-derived growth factor-like molecules by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(19): 7311-5.
- Wallace, J. M., A. J. McCabe, et al. (2000). "The effect of low-dose fish oil supplementation on serum growth factors in healthy humans." Eur J Clin Nutr **54**(9): 690-4.
- Ware, J. A. (2001). "Too many vessels? Not enough? The wrong kind? The VEGF debate continues." Nat Med **7**(4): 403-4.
- Warren, R. S., H. Yuan, et al. (1995). "Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis." J Clin Invest **95**(4): 1789-97.

- Watson, A. D., N. Leitinger, et al. (1997). "Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo." J Biol Chem **272**(21): 13597-607.
- Westermarck, B., L. Claesson-Welsh, et al. (1989). "Structural and functional aspects of the receptors for platelet-derived growth factor." Prog Growth Factor Res **1**(4): 253-66.
- Wilcox, J. N., N. A. Nelken, et al. (1994). "Local expression of inflammatory cytokines in human atherosclerotic plaques." J Atheroscler Thromb **1 Suppl 1**: S10-3.
- Wilcox, J. N., K. M. Smith, et al. (1988). "Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization." J Clin Invest **82**(3): 1134-43.
- Wilson, S. H., J. Herrmann, et al. (2002). "Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa vasorum in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering." Circulation **105**(4): 415-8.
- Xiao, Y. F., A. M. Gomez, et al. (1997). "Suppression of voltage-gated L-type Ca<sup>2+</sup> currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 4182-7.
- Xiao, Y. F., J. X. Kang, et al. (1995). "Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na<sup>+</sup> channels of neonatal rat ventricular myocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11000-4.
- Xiao, Y. F., S. N. Wright, et al. (1998). "Fatty acids suppress voltage-gated Na<sup>+</sup> currents in HEK293t cells transfected with the alpha-subunit of the human cardiac Na<sup>+</sup> channel." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2680-5.
- Xiao, Y. F., S. N. Wright, et al. (2000). "Coexpression with beta(1)-subunit modifies the kinetics and fatty acid block of hH1(alpha) Na(+) channels." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(1): H35-46.
- Yla-Herttuala, S., B. A. Lipton, et al. (1991). "Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(12): 5252-6.
- Yoshimura, T. and E. J. Leonard (1991). "Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)." Adv Exp Med Biol **305**: 47-56.
- Yoshimura, T. and E. J. Leonard (1992). "Human monocyte chemoattractant protein-1: structure and function." Cytokines **4**: 131-52.

Yoshimura, T., N. Yuhki, et al. (1989). "Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE." FEBS Lett **244**(2): 487-93.

## Danksagung

Dem Direktor der Medizinischen Poliklinik, Klinikum Innenstadt der Ludwigs-Maximilians-Universität München, Herrn Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff danke ich für die Möglichkeit der Erstellung dieser Dissertation in seinem Haus.

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Clemens Freiherr von Schacky auf Schönfeld, möchte ich für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die konstruktive Hilfe bei der Durchsicht dieser Arbeit danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. med. Klaus Baumann und Frau Rosemarie Kiefl für die wertvollen Ratschläge bei der Erstellung dieser Arbeit.

## 7 Lebenslauf

Name	Felix Guido Ferdinand Graf von Spiegel zum Diesenberg-Hanxleden
Geburtsdatum:	10.01.1975
Geburtsort:	München
1981 – 1985	Grundschule Rottach-Egern
1985 – 1991	Staatliches Gymnasium Tegernsee
1991 – 1994	Jesuitisches Aloisiuskolleg Bonn-Bad Godesberg, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Oktober 1994 – Februar 1998	Medizin an der Friedrich Schiller Universität Jena
September 1996	Physikum
September 1997	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
April 1998 – Juni 2002	Medizin an der Ludwig – Maximilians Universität München
September 2000	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Juni 2002	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
August 2002 – Januar 2004	AIP in der Abteilung für Plastische, Rekonstruktive und Handchirurgie Zentrum für Brandverletzte am Städtischen Klinikum München Bogenhausen
Seit März 2004	Assistenzarzt in der Abteilung für Plastische, Rekonstruktive und Handchirurgie Zentrum für Brandverletzte am Städtischen Klinikum München Bogenhausen