

*Aus der Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München*

*Direktor:*

*Prof. Dr. med. D. Reinhardt*

***Auswirkungen der  
mehrfach ungesättigten Fettsäure Docosahexaensäure  
auf den Fettsäurestatus, die visuelle Signalübertragung und motorische Funktionen  
bei Kindern mit klassischer Phenylketonurie***

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

*vorgelegt von*

***Hannes Reinhardt***

*aus*

*München*

*2007*

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Koletzko

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. U. Welge-Lüssen  
Priv. Doz. Dr. med. K. Bötzel

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. S. Beblo

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Januar 2007

## **DANKSAGUNG**

Mein ausdrücklicher Dank geht zunächst an die Initiatoren dieser Studie, Frau Dr. Skadi Beblo und Herrn Professor Dr. Berthold Koletzko, für die Chance, an diesem Thema wissenschaftlich arbeiten zu können. Des Weiteren bedanke ich mich bei ihnen für die stets wohlwollende Betreuung während der Durchführung der Untersuchungen und der Verfassung meiner Dissertationsschrift.

Eine unverzichtbare Unterstützung bei den klinischen und laborchemischen Untersuchungen bot mir die Stoffwechsellambulanz und das Stoffwechsellabor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals, allen voran Herr Professor Dr. Adalbert Roscher, Frau Dr. Ania Muntau, Herr Dr. Hans Demmelmair, Frau Andrea Vielhauer, Frau Verena Knapp, Schwester Birgit Haas und Schwester Steffi Kuhn. Danke für die sehr angenehme Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich das Friedrich-Baur-Institut in München erwähnen, das so freundlich war, die Apparaturen und Räume zur Durchführung der visuell evozierten Potentiale zur Verfügung zu stellen. Hier war es insbesondere Herr Professor Dr. Wolfgang Müller-Felber, der mir bei Rückfragen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Nicht zuletzt möchte ich allen an dieser Studie beteiligten Kindern und Eltern meinen Dank aussprechen. Ohne ihre konsequente und bereitwillige Mithilfe wäre die erfolgreiche Durchführung dieser Studie natürlich nicht möglich gewesen.

*WIDMUNG*

Für Annette und Max

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- AA Arachidonsäure (20:4n-6)
- Bd dynamische Balance
- BH<sub>4</sub> Tetrahydrobiopterin
- BHT Botylhydroxytoluen
- Bst statische Balance
- DHA Docosahexaensäure (22:6n-3)
- EDTA Ethylen-diamin-tetraazetat
- EEG Elektroenzephalogramm
- EPA Eicosapentaensäure (20:5n-3)
- HCl Salzsäure
- HDL Lipoproteine (hohe Dichte)
- KG Körpergewicht
- LA Linolsäure (18:2n-6)
- LC-PUFA langkettige Polyenfettsäuren
- LDL Lipoproteine (geringe Dichte)
- LF Lauffehler
- LZ Laufzeit
- MQ motorischer Quotient
- MrK motorisch-rhythmische Koordination
- Mü Münzen
- P100 Potential 100
- PAH Phenylalaninhydroxylase
- PKU klassische Phenylketonurie
- ROS Rostock-Oseretzky-Skala
- SEM standard error of mean (Standardfehler)
- UAW unerwünschte Arzneimittelwirkung
- UE unerwartetes Ereignis
- UV Ultraviolett
- VEP visuell evoziertes Potential
- ZNS Zentrales Nervensystem

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>VORWORT</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
2.1	Phenylalaninstoffwechsel, klassische Phenylketonurie (PKU)	2
2.2	Langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (LC-PUFA)	6
2.3	Visuell evozierte Potentiale (VEP)	8
<b>3</b>	<b>UNTERSUCHTE FRAGESTELLUNG</b>	<b>10</b>
<b>4</b>	<b>METHODIK</b>	<b>13</b>
4.1	Studiendesign und Durchführung	13
4.2	Einschlusskriterien	16
4.3	Ausschlusskriterien (analog der ICH-GCP-Kriterien)	16
4.4	Arten des Studienendes	17
<b>5</b>	<b>STUDIENMEDIKATION</b>	<b>18</b>
5.1	Studienmedikation der Gruppe der PKU-Patienten	18
5.2	Studienmedikation der Kontrollgruppe	18
<b>6</b>	<b>STUDIENMATERIALIEN</b>	<b>19</b>
6.1	Chemikalien	19
6.2	Verbrauchsmaterialien	19
6.3	Geräte	20
<b>7</b>	<b>ZIELKRITERIEN</b>	<b>21</b>
7.1	Primäres Zielkriterium	21

<b>7.2</b>	<b>Sekundäre Zielkriterien</b>	<b>21</b>
7.2.1	Funktionsvariablen	21
7.2.2	Laborvariablen	21
7.2.3	Sonstige Kriterien	21
<b>8</b>	<b>NULLHYPOTHESE, ARBEITSHYPOTHESE</b>	<b>22</b>
<b>8.1</b>	<b>Nullhypothese</b>	<b>22</b>
<b>8.2</b>	<b>Arbeitshypothese</b>	<b>22</b>
<b>9</b>	<b>LABORANALYSEN</b>	<b>23</b>
<b>9.1</b>	<b>Reproduzierbarkeit Plasma</b>	<b>23</b>
<b>9.2</b>	<b>Blutentnahme und Aufbereitung der Plasmafettsäuren</b>	<b>23</b>
<b>9.3</b>	<b>Gaschromatographische Analyse</b>	<b>25</b>
<b>10</b>	<b>VEP, ROS: DURCHFÜHRUNG</b>	<b>26</b>
<b>10.1</b>	<b>Durchführung der visuell evozierten Potentiale (VEP)</b>	<b>26</b>
<b>10.2</b>	<b>Durchführung der Rostock-Oseretzky-Skala (ROS)</b>	<b>28</b>
10.2.1	Münzen legen (Mü)	28
10.2.2	Labyrinth durchfahren (LZ, LF)	29
10.2.3	Dynamische Balance (Bd)	30
10.2.4	Statische Balance (Bst)	30
10.2.5	Motorisch-rhythmische Koordination (Mrk)	31
<b>10.3</b>	<b>Auswertung der ROS</b>	<b>32</b>
<b>10.4</b>	<b>Reliabilität der ROS</b>	<b>34</b>
<b>10.5</b>	<b>Schwierigkeit und Trennschärfe der ROS</b>	<b>34</b>
<b>11</b>	<b>ERGEBNISSE UND STATISTIK</b>	<b>35</b>
<b>11.1</b>	<b>Studienteilnehmer</b>	<b>35</b>
11.1.1	PKU-Patienten	35
11.1.2	Kontrollprobanden	35
11.1.3	Dropouts	35
<b>11.2</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>36</b>
<b>11.3</b>	<b>Phenylalanin und Plasmafettsäuren der PKU-Patienten</b>	<b>36</b>
<b>11.4</b>	<b>Rostock-Oseretzky-Skala</b>	<b>38</b>
<b>11.5</b>	<b>Visuell evozierte Potentiale</b>	<b>39</b>

<b>11.6</b>	<b>Tabellen und Diagramme</b>	<b>40</b>
11.6.1	P100-Latenzen: PKU-Patienten und Kontrollprobanden in der Voruntersuchung	40
11.6.2	P100-Latenzen: PKU-Patienten in der Vor- und Nachuntersuchung	41
11.6.3	P100-Latenzen: Kontrollprobanden in der Vor- und Nachuntersuchung	42
11.6.4	ROS: PKU-Patienten und Kontrollprobanden in der Voruntersuchung	43
11.6.5	ROS: MQ-Werte der Patienten- und Kontrollgruppe in der Vor- und Nachuntersuchung	44
11.6.6	ROS: C-Werte der Patienten- und Kontrollgruppe in der Vor- und Nachuntersuchung	45
11.6.7	Plasmafettsäuren der PKU-Patienten in der Vor- und Nachuntersuchung	46
<b>11.7</b>	<b>Erfassung der globalen Verträglichkeit</b>	<b>47</b>
<b>11.8</b>	<b>Unerwartete Ereignisse (UE) und Arzneimittelwirkung (UAW)</b>	<b>47</b>
<b>12</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>48</b>
<b>12.1</b>	<b>Methodik</b>	<b>48</b>
<b>12.2</b>	<b>Rostock-Oseretzky-Skala</b>	<b>49</b>
<b>12.3</b>	<b>Visuell evozierte Potentiale</b>	<b>50</b>
<b>12.4</b>	<b>Fettsäuren und Phenylalanin</b>	<b>51</b>
<b>13</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>53</b>
<b>14</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>56</b>
<b>15</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>63</b>



# 1 VORWORT

Die klassische Phenylketonurie (PKU) ist eine der weltweit häufigsten angeborenen Stoffwechselerkrankungen. Die PKU geht mit abnorm erhöhten Konzentrationen der Aminosäure Phenylalanin im Blutplasma einher. Unbehandelt sind schwere intellektuelle und psychomotorische Entwicklungsstörungen die Folge.

Die Behandlung der PKU sieht für die betroffenen Patienten eine das Leben begleitende, phenylalaninarme Spezialdiät vor. Diese Therapie bewirkt eine Normalisierung der Phenylalaninkonzentration im Blutplasma und verhindert schwere Entwicklungsstörungen; dennoch lassen sich in differenzierten Untersuchungen Leistungsdefizite bei PKU-Patienten feststellen.

Diese Studie untersucht ein neues, ergänzendes Behandlungskonzept, in dessen Mittelpunkt die langkettige, ungesättigte Fettsäure Docosahexaensäure (DHA) steht. Neuere Studien deuten darauf hin, dass diese Fettsäure innerhalb der konventionellen PKU-Diät bislang nicht genügend berücksichtigt wurde.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Phenylalaninstoffwechsel, klassische Phenylketonurie (PKU)

Die essentielle Aminosäure Phenylalanin ist Bestandteil fast aller natürlicher Eiweißquellen. Der Phenylalaningehalt im Blutplasma bei gesunden Menschen beträgt normalerweise zwischen 2 und 4 mg/dl (120-240  $\mu\text{mol/l}$ ). Eine erhöhte Konzentration wird als Hyperphenylalaninämie bezeichnet [56]. Die Hyperphenylalaninämie ist meist Ausdruck eines genetisch bedingten Enzymdefektes, auf Grund dessen sich Phenylalanin im Organismus anstaut. Liegt der Phenylalaningehalt über 20 mg/dl (1200  $\mu\text{mol/l}$ ), handelt es sich in aller Regel um eine besonders schwere Form der Hyperphenylalaninämie, die klassische Phenylketonurie (PKU), die unbehandelt zu schweren geistigen und motorischen Störungen führt [56].

Ursache der PKU ist ein autosomal-rezessiv vererbter Defekt des Enzyms Phenylalaninhydroxylase (PAH) in der Leber [56]. Nur homozygote Träger erkranken klinisch [56]. Als Folge dieses Defektes kann Phenylalanin entsprechend der geringen Restaktivität der PAH in nur sehr geringen Mengen in Tyrosin umgewandelt und so den normalen Stoffwechselwegen zugeführt werden. Einerseits führt dies zu einer Anhäufung schädlicher Metabolite wie Phenylpyruvat, Phenyllaktat und Phenylazetat (die über alternative Stoffwechselwege gebildet werden), andererseits können wichtige Metabolite in nur geringen Mengen gebildet werden, beispielsweise der Farbstoff Melanin und bestimmte Neurotransmitter wie Dopamin und Serotonin [56]. Zusätzlich wird im Zusammenhang mit der PKU über lokale und disseminierte Myelinisierungsschäden im ZNS diskutiert, deren Ursache jedoch bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte [32].

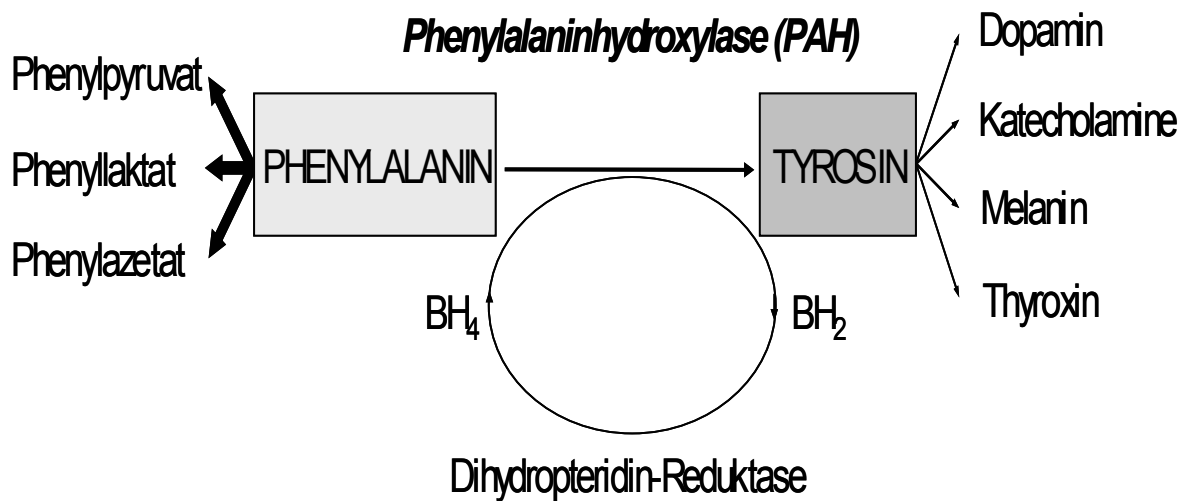


Abbildung 1: Stoffwechselwege des Phenylalanins bei PKU-Patienten (in Anlehnung an [56]): Der gesunde Stoffwechselweg geht vom Phenylalanin in Richtung Tyrosin; Phenylpyruvat, -laktat und -azetat werden in nur sehr geringen Mengen produziert. Bei PKU-Patienten ist dieser Weg, bedingt durch eine deutliche Funktionseinschränkung der Phenylalaninhydroxylase (PAH), jedoch weitestgehend nicht möglich; daher stauen sich im Organismus Phenylketone an und wichtige Metabolite (Tyrosin, Dopamin, Katecholamine, Melanin, Thyroxin) können nicht ausreichend gebildet werden.

Ein typischer Körper- und Uringeruch, dem Geruch von Mäuseurin ähnlich, ist häufig das erste klinische Anzeichen der Erkrankung [56]. Dieser ist in erster Linie durch übermäßig anfallendes Phenylazetat bedingt. Kinder mit PKU zeigen in der Regel auffallend blasse Haut, blaue Augen und helle Körperbehaarung. Dies lässt sich auf eine unzureichende Melaninproduktion zurückführen [56]. Diese Merkmale persistieren, auch bei Eltern mit dunklem Phänotyp. Häufig leiden die Patienten unter diffusen, ekzematösen Hautveränderungen [56].

Nach und nach treten geistige, motorische und somatische Entwicklungsstörungen wie Intelligenzminderung bis hin zum Schwachsinn, aggressives Sozialverhalten, zerebrale Krampfanfälle, Hyperkinesien, Erethismus und Mikrozephalie in den Vordergrund [56]. Die Ursachen hierfür sind multikausal und pathophysiologisch bis heute nicht vollständig geklärt. Die einzige suffiziente Therapie für Patienten mit PKU ist eine lebenslange, stark phenylalaninreduzierte Ernährung [56]. Phenylalanin ist Bestandteil der meisten pflanzlichen und tierischen Eiweißquellen. Entsprechende Nahrungsmittel, beispielsweise Fleisch, Fisch,

Ei, Nudeln, Reis und Nüsse, sind daher nur in sehr geringen Mengen für PKU-Patienten zum Verzehr geeignet [56]. Die Behandlung erlaubt etwa ein Sechstel der für gesunde Personen empfohlenen Menge natürlicher pflanzlicher und tierischer Eiweiße. Diese Mindestmenge an natürlichem Eiweiß ist jedoch sehr wichtig, da es sich bei Phenylalanin um eine essentielle Aminosäure handelt, ohne die der menschliche Organismus nicht überlebensfähig ist [56]. Zusätzlich ist bei PKU-Patienten die Einnahme eines künstlich hergestellten, phenylalaninfreien Aminosäuregemisches indiziert, um einem generellen Eiweißmangel vorzubeugen [56]. In Deutschland richtet sich die tägliche Menge des Aminosäuregemisches, unter Berücksichtigung der individuellen Phenylalanintoleranz, nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung [21]. Zur Therapiekontrolle wird den Patienten regelmäßig Blut entnommen, um die Phenylalaninkonzentration im Plasma zu überprüfen. Ohne therapeutische Maßnahmen führen auf Grund physiologischer Reifungsprozesse besonders die ersten 5-7 Krankheitsjahre zu schweren und permanenten Schäden im ZNS [56]. Bei einer frühzeitig, d.h. innerhalb der ersten Lebenswochen angesetzten und konsequent durchgeführten Diät können PKU-Patienten jedoch ein weitgehend symptom- und beschwerdearmes Leben führen [56].

Um eine frühzeitige Diagnose und Behandlung der Erkrankung zu gewährleisten, wird in den meisten industrialisierten Ländern das Blut der Neugeborenen im Rahmen des Neugeborenen-Screenings hinsichtlich erhöhter Plasmaphenylalaninkonzentrationen untersucht. In Deutschland ist diese Untersuchung seit 1972 gängiger Standard. Der altbewährte Guthrie-Test, ein mikrobiologischer Hemmtest mit einem Tropfen Blut aus der Ferse, wird wegen seiner hohen Zuverlässigkeit, seiner leichten Durchführbarkeit und nicht zuletzt aus Kostengründen in vielen Ländern immer noch häufig verwendet. Fluorometrische und chromatographische Blutanalysen liefern jedoch noch exaktere Ergebnisse, weshalb sie unter anderem in Deutschland inzwischen routinemäßig eingesetzt werden. Liegt die Phenylalaninkonzentration im Plasma über 20 mg/dl, gilt die Diagnose PKU als sehr wahrscheinlich. Ein weiteres Verfahren gibt Aufschluss darüber, ob tatsächlich eine PKU vorliegt, oder ob es sich um eine atypische Phenylketonurie handelt. In diesem Fall liegt ein Mangel an Tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ ) vor, ein Coenzym der PAH, welcher ebenfalls zu stark erhöhten Plasmaphenylalaninkonzentrationen führen kann [56].  $BH_4$  ist zugleich Cofaktor von 2 weiteren Hydroxylasen, der Tyrosin- und Tryptophanhydroxylase. So kommt es bei einem Mangel an  $BH_4$  zu einer Verarmung an Dopamin und Serotonin, die das typische,

parkinsonähnliche Krankheitsbild erklärt. Neben der Senkung der Plasmakonzentration von Phenylalanin steht bei der Behandlung eines BH<sub>4</sub>-Mangels daher die Normalisierung der Neurotransmitter im Vordergrund [56]; BH<sub>4</sub> und Neurotransmittervorstufen (L-DOPA und 5-Hydroxytryptophan) werden direkt substituiert.

Seit einiger Zeit ist die pränatale Diagnostik der PKU mittels DNA-Analyse möglich. Die dafür notwendige Untersuchung, eine Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie, birgt jedoch Risiken für das ungeborene Kind. Wegen der guten Behandlungsmöglichkeiten der PKU ist die Indikation für einen Schwangerschaftsabbruch sehr umstritten.

Es sind inzwischen über 400 Mutationen des entsprechenden PAH-Gens auf Chromosom 12 bekannt. Die Ausprägung des Stoffwechseldefektes hängt von der Kombination der Mutationen (eine oder mehrere) ab. Entsprechend der Plasmaphenylalaninkonzentration und der Restaktivität der PAH wird zwischen der Hyperphenylalaninämie (Typ 1), der milden PKU (Typ 2) und der klassischen Phenylketonurie (PKU, Typ 3) unterschieden [20].

Form	Plasma-Phe	PAH-Aktivität	Häufigkeit (Lebendgeborene)
Klassische Phenylketonurie (PKU) (Typ 3)	über 20 mg/dl	unter 1%	1 : 12 003
milde PKU (Typ 2)	10-20 mg/dl	1-3%	
Hyperphenylalaninämie (Typ 1)	4-10 mg/dl	3-10%	1 : 18 458
atypische Phenylketonurie (BH <sub>4</sub> -Mangel)	4 bis über 20 mg/dl	100%	1 : 239 262

*Tabelle 1: Formen der PAH-assoziierten Hyperphenylalaninämie. Im Vergleich dazu die BH<sub>4</sub>-assoziierte, atypische Phenylketonurie. Betreffend der Häufigkeit handelt es sich um Durchschnittswerte von 1996 – 1998; Quelle: Deutsche Gesellschaft für das Neugeborenen Screening auf endokrine und metabolische Störungen (DGNS). Anzahl der neu untersuchten Kinder pro Jahr: größer 470 000.*

## 2.2 Langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (LC-PUFA)

Fettsäuren sind aliphatische Monocarbonsäuren, die sich einteilen lassen in gesättigte Fettsäuren mit einfachen Bindungen zwischen den Kohlenstoffatomen und in ungesättigte Fettsäuren mit einer oder mehreren Doppelbindungen. Langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (LC-PUFA) wie Arachidonsäure (AA, C20:4n-6) und insbesondere Docosahexaensäure (DHA, C22:6n-3) sind wichtige Substrate für die Reifung des zentralen Nervensystems, die bereits in der intrauterinen Phase der Entwicklung benötigt werden; bei Säuglingen und bis in das Erwachsenenalter hinein sind LC-PUFA für die weitere Entwicklung und Aufrechterhaltung bestimmter Funktionen des ZNS bedeutend [11, 15, 16, 26]. Sie werden als Bestandteile von Strukturlipiden in Zellmembranen und Myelin benötigt und beeinflussen dadurch Membranfunktionen, die an der Homöostase der einzelnen Zelle sowie an der Kommunikation zwischen den Zellen beteiligt sind. Insbesondere DHA findet sich dort in hohen Konzentrationen [41]. Auch bei der postnatalen Entwicklung des visuellen Reizleitungsapparates scheint DHA eine zentrale Rolle zuzukommen [11, 15, 26].

Weiterhin sind LC-PUFA Vorläufer bei der Synthese von Prostaglandinen, Eicosanoiden und Leukotrienen, denen bei Entzündungsprozessen eine zentrale Rolle zukommt.

LC-PUFA können direkt über die Nahrung aufgenommen und verwertet werden. Hauptlieferanten sind die Muttermilch und tierische Produkte wie Fisch, Fleisch, Innereien und Ei.

Der menschliche Organismus verfügt außerdem über die Möglichkeit, LC-PUFA endogen aus Vorläuferstufen zu produzieren, die vor allem in Pflanzenölen enthalten sind. In Pflanzen entstandene Linolsäure kann vom Körper in Arachidonsäure umgewandelt werden,  $\alpha$ -Linolensäure dient als Substrat bei der Synthese von Docosahexaensäure [53].

Bei Säuglingen und Kleinkindern ist die Möglichkeit der endogenen Produktion von LC-PUFA aus Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure, bedingt durch die Unreife beteiligter Desaturasen und Elongasen, allerdings nur sehr begrenzt möglich; daher sind Säuglinge und Kleinkinder auf die exogene Zufuhr von LC-PUFA angewiesen [33].

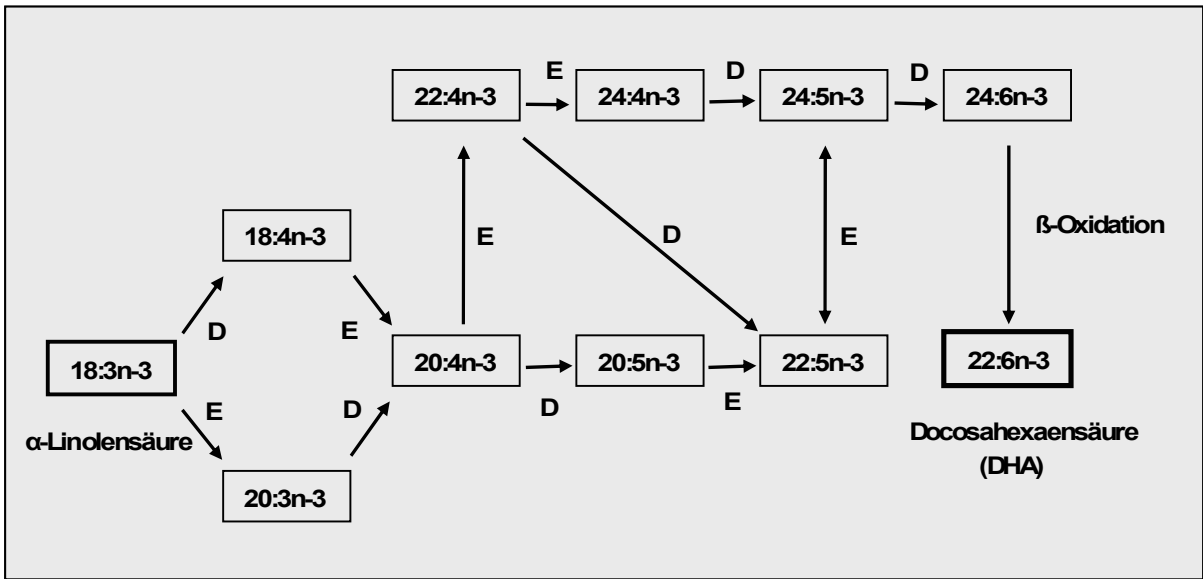


Abbildung 2: Synthese von Docosahexaensäure (DHA) aus  $\alpha$ -Linolensäure (modifiziert nach [53]).  
E = Elongase, D = Desaturase

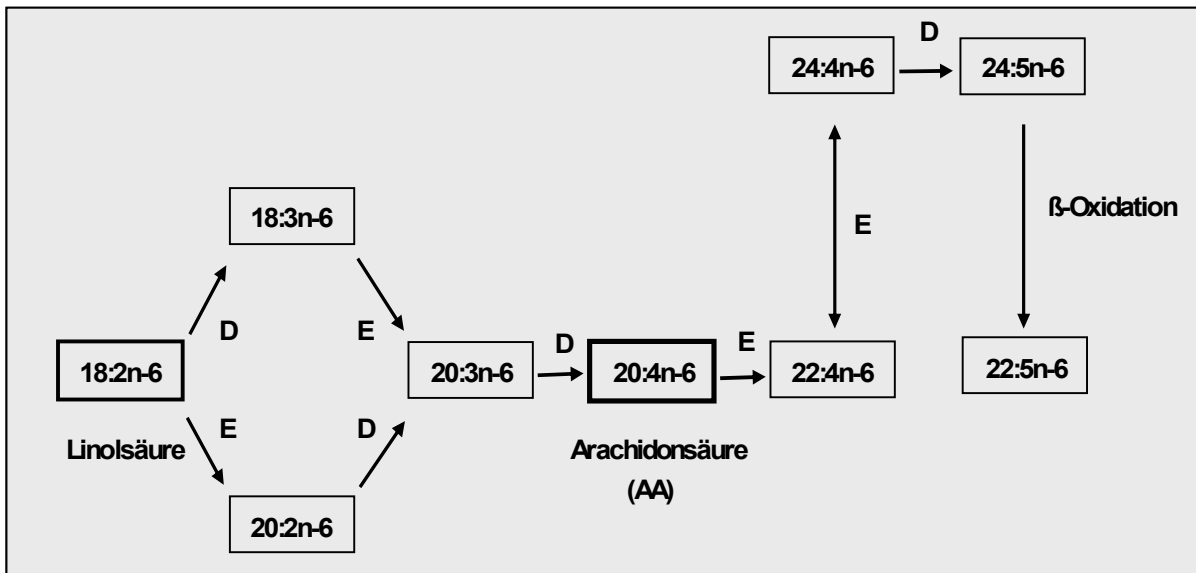


Abbildung 3: Synthese von Arachidonsäure (AA) aus Linolsäure (modifiziert nach [53]).  
E = Elongase, D = Desaturase

## 2.3 Visuell evozierte Potentiale (VEP)

1934 konnten erstmals spezifische Potentialänderungen im EEG nach Applikation von visuellen Reizen festgestellt werden [3]. Diese Potentialänderungen im EEG werden heute visuell evozierte Potentiale (VEP) genannt.

Nach Darbietung eines optischen Reizes entsteht in der Retina ein elektrischer Impuls, der nach Fortleitung über Nervus opticus, Chiasma opticum, Tractus opticus und die primären Sehzentren zur Area striata der okzipitalen Großhirnrinde geleitet wird, und dort ein visuell evoziertes Potential auslöst. Die Zeit (Latenz), die von der Bildung des elektrischen Impulses in der Retina bis zur Reaktion in der Area striata vergeht, beträgt etwa 100 ms. Das über der Area striata abgeleitete Potential wird aus diesem Grund P100 genannt.

Moderne Messgeräte zur Ermittlung der Latenz P100 arbeiten mit Schachbrettmustern, die über einen Bildschirmmonitor dargeboten werden. Schwarz und weiß wechseln dabei mit einer bestimmten Frequenz untereinander die Farben. Entsprechend der Größe der Felder, die sich variieren lässt, wird bei jeder Farbumkehr ein Korrelat der Retina stimuliert. Größere Muster, welche eine gesamt-retinale Stimulation bewirken, bedingen eine geringfügig schnellere Weiterleitung des retinalen Impulses zur okzipitalen Hirnrinde als feine Muster, die vorwiegend den fovealen Bereich stimulieren. Innerhalb der ersten 1-2 Lebensjahre verringert sich die Latenz P100 kontinuierlich, und erreicht schließlich einen über Jahrzehnte stabilen Wert [7, 43]. Im höheren Alter nimmt die Latenz P100, bedingt durch natürliche Abbau- und Alterungsprozesse, wieder etwas zu.



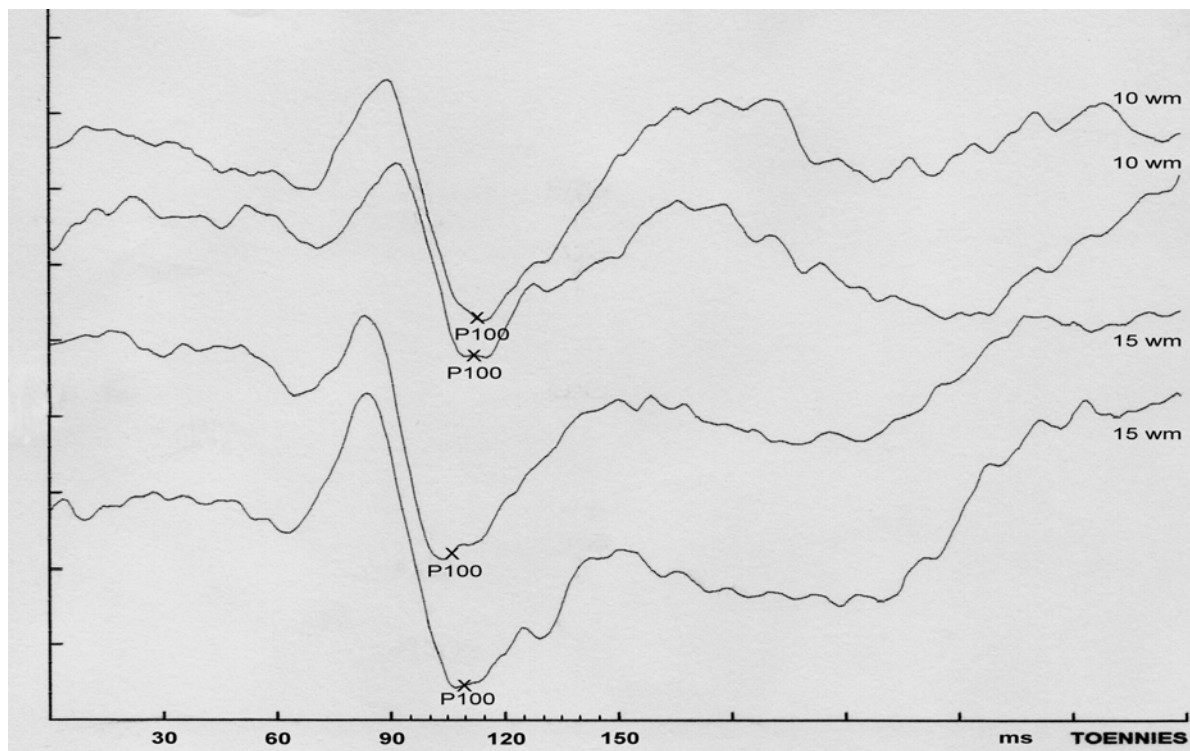


Abbildung 4: typische Kurvenverläufe visuell evozierter Potentiale: hier bei einem gesunden, 9jährigen Mädchen. Oberes Kurvenpaar: wiederholte Messungen mit einer Stimulusgröße von 10 Winkelminuten. Unteres Kurvenpaar: wiederholte Messungen mit einer Stimulusgröße von 15 Winkelminuten. Die Latenz P100 wird im Kurvental als Schnittpunkt der Tangenten definiert, die an das Kurvengefälle und an die Kurvensteigung gelegt werden. Zur Filterung von Unregelmäßigkeiten wurden jeweils 50 Potentialmessungen einer Stimulusgröße durchgeführt und die Werte anschließend gemittelt.

Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass viele Patienten mit PKU verzögerte P100-Latenzen aufweisen; zahlreiche dieser Patienten zeigen zudem signifikante Veränderungen der weißen Substanz im Sinne einer gestörten Myelinisierung [8, 9, 58, 60, 61]. Es ist bekannt, dass eine gestörte Myelinisierung von Nervenfasern zu verzögerten P100-Latenzen visuell evozierter Potentiale führen kann, beispielsweise bei der Multiplen Sklerose. Sie könnte daher auch bei den PKU-Patienten die Ursache der verzögerten Latenzen sein. Die genaue Pathogenese der Myelinisierungsstörungen und verzögerten VEP-Latenzen bei PKU-Patienten ist jedoch unklar.

### 3 UNTERSUCHTE FRAGESTELLUNG

Seit Einführung der eiweißarmen Diät unter Substitution eines phenylalaninfreien Aminosäuregemisches hat sich die Prognose einer klassischen PKU drastisch verbessert. Bei Intelligenztests und in der Schule erreichen diese PKU-Patienten im Durchschnitt geringfügig weniger gute Ergebnisse als ihre gesunden Geschwister [14, 29, 47, 57], jedoch bewegen sich diese Unterschiede im Marginalbereich, so dass nicht von einer echten Beeinträchtigung gesprochen werden kann.

Trotzdem konnten bei vielen Patienten mit PKU, die mit einer frühzeitig eingeleiteten und konsequent durchgeführten Diät behandelt werden, in neuropsychologischen Tests zwar gering ausgeprägte, jedoch signifikante Defizite in kognitiven und psychomotorischen Bereichen festgestellt werden: verschiedene Studien belegen Konzentrations- und Auffassungsschwächen sowie verlängerte Reaktionszeiten und verlangsamtes Rechentempo [13, 54]. Es wurden Defizite in feinmotorischen Bereichen festgestellt, besonders was die Finger-Hand-Augen-Koordination betrifft [5, 53]. Auf elektrophysiologischer Ebene konnten signifikante Verlängerungen der Latenzen P100 visuell evozierter Potentiale ermittelt werden [4]. Die genauen pathophysiologischen Hintergründe dieser Funktionsstörungen konnten bislang nicht geklärt werden. Die Vermutung, dass ehemals vorhandene, therapiebedingte Defizite an biogenen Aminen, bestimmten Vitaminen und Spurenelementen für diese Funktionsstörungen verantwortlich waren, konnte nicht bestätigt werden [1, 2, 6, 12, 24, 49, 59].

Wegweisend für diese Studie waren jüngere Untersuchungen, bei denen niedrige Plasma- und Serumkonzentrationen von langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere von DHA, bei diätetisch eingestellten Patienten mit PKU festgestellt wurden [23, 50, 52].

Ursache für den DHA-Mangel ist vermutlich das unzureichende Angebot innerhalb der PKU-Diät, da die Hauptlieferanten der DHA wie Milch, Fisch, Fleisch, Innereien und Ei wegen des hohen Gehaltes an Phenylalanin von PKU-Patienten weitestgehend gemieden werden müssen. Daher wird angenommen, dass PKU-Patienten, die eine strikte Diät durchführen, prinzipiell einen Mangel an DHA aufweisen. Diese Studie sollte unter anderem diese Überlegung überprüfen. Über die klinische Relevanz eines DHA-Mangels bei Patienten mit PKU ist bisher jedoch wenig bekannt.

Unbestritten gilt DHA als zentraler Baustein von Zellen und Membranen, die im ZNS für die Übertragung auch von visuellen Informationen zuständig sind. Myelinscheiden und synaptosomale Membranen etwa enthalten eine hohe Konzentration an DHA. Mittels Magnet-Resonanz-Tomographie konnte bei vielen PKU-Patienten eine gestörte Myelinisierung nachgewiesen werden [8, 9, 58, 60, 61]. Sollte sich bestätigen, dass es unter einer PKU-Diät zu Imbalancen im Fettsäurestoffwechsel und insbesondere zu einer Unterversorgung an n-3-Fettsäuren (EPA, DHA) kommt, wäre denkbar, dass diese mittel- bis langfristig zu metabolischen Ungleichgewichten an Myelinscheiden und synaptosomalen Membranen führen.

Tierversuche und kontrollierte Studien an gesunden Neugeborenen haben belegt, dass bestimmte langkettige, ungesättigte Fettsäuren, vor allem die DHA, einen positiven Einfluss auf die visuelle Entwicklung haben [45, 51]. Außerdem wurde gezeigt, dass ein Mangel an DHA bei gesunden Probanden eine verzögerte Signalübertragung optischer Reize (P100-Latenzen visuell evozierter Potentiale) hervorrufen kann [10, 11, 31, 34, 35, 40]. Ein positiver Einfluss von LC-PUFA auf die visuelle Reizverarbeitung konnte an gesunden Probanden gezeigt werden [11, 19, 44]. Diese Studie sollte zeigen, inwiefern sich eine Supplementierung von DHA mittelfristig auf den Plasmafettsäurestatus bei PKU-Patienten auswirkt, und ob in der Folge ein positiver Effekt auf die optische Signalübermittlung nachzuweisen ist. Primäres Zielkriterium dieser Studie war daher die P100-Latenz visuell evozierter Potentiale.

Auditive, somatomotorische und sensorische Reizleitungssysteme basieren auf Mechanismen, die denen der optischen Signalübertragung sehr ähnlich sind [28]. Auch bei ihnen ist DHA ein zentraler Baustein. Die Vermutung lag nahe, dass eine Unterversorgung mit DHA nicht nur die optische Signalübermittlung negativ beeinflussen könnte, sondern auch die Signalübermittlung anderer Reizleitungssysteme. Tierversuche konnten einen positiven Effekt von DHA auf die psychomotorische Entwicklung nachweisen [51]. Eine Substitution mit DHA könnte daher auch bei PKU-Patienten eine positive Auswirkung auf psychomotorische Funktionen haben.

Aus diesem Grund wurde eine Testbatterie ausgewählt, die unterschiedliche Reizleitungssysteme in ihrem Zusammenspiel überprüft. Es handelt sich um die Rostock-Oseretzky-Skala (ROS), eine 1978 von Erich Kurth in Rostock entwickelte und seither sehr

bewährte 5teilige Testreihe zum differenzierten Erfassen von Reaktionsvermögen, willkürlichen Bewegungsvorgängen, Feinmotorik und Gleichgewichtssinn [37]. Sie führt auf die erste motometrische Skala überhaupt zurück, die der russische Neurologe Oseretzky vor rund 90 Jahren veröffentlicht hat [46]. Die ROS findet ihre Anwendung ausschließlich in der Altersgruppe der 5jährigen bis 11jährigen, ist schnell durchzuführen und zeichnet sich durch gute Reliabilität und Trennschärfe aus [17, 37, 38].

## 4 METHODIK

### 4.1 Studiendesign und Durchführung

Die Studie wurde, nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München, als prospektiver, monozentrischer, kontrollierter Parallelgruppenvergleich durchgeführt. Teilnehmer der Studie waren auf der einen Seite Kinder mit PKU im Alter zwischen einem und elf Jahren und auf der anderen Seite gesunde Kinder (Kontrollprobanden) im gleichen Altersgefüge. Prüfeinrichtung und Rekrutierungsstätte war die Universitäts-Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital, LMU, München.

Hauptzielkriterien dieser Studie waren die Latenzen P100 visuell evozierter Potentiale und die motorischen Quotienten (MQ) einer psychometrisch-sensomotorischen Untersuchungsreihe (Rostock-Oseretzky-Skala, ROS), vor und nach einer 90tägigen Nahrungsergänzung mit LC-PUFA.

Diese Studie sollte insbesondere überprüfen:

- Status der Plasmaphospholipide, insbesondere der DHA-Konzentration bei PKU-Patienten unter der konventionellen PKU-Diät vor und nach einer 90tägigen, zusätzlichen Intervention mit DHA (DHA-reiche Fischölkapseln).
- Status der visuellen Signalverarbeitung, insbesondere der Latenzen P100 visuell evozierter Potentiale bei diesen PKU-Patienten vor und nach der 90tägigen Intervention. Mögliche Zusammenhänge mit der Plasma-DHA-Konzentration.
- Status der psychomotorischen Koordination bei diesen PKU-Patienten vor und nach der 90tägigen Intervention. Mögliche Zusammenhänge mit der Plasma-DHA-Konzentration.

Die Messung visuell evozierter Potentiale zeichnet sich durch hohe Reliabilität und Objektivität aus. Es existiert kein Lerneffekt. Außerdem sind die zu erwartenden physiologischen Veränderungen innerhalb des für diese Studie veranschlagten Zeitraumes

von 90 Tagen zwischen zwei Messungen minimal. Aus diesen Gründen eignet sich diese Untersuchung ideal als primäres Zielkriterium.

Neben der speziellen Relevanz von DHA hinsichtlich der Latenzen P100 sollten jedoch auch mögliche allgemeine Auswirkungen von DHA auf das ZNS überprüft werden. Die Rostock-Oseretzky-Skala als Testbatterie für grob- und feinmotorische Funktionen sowie Koordination bot sich diesbezüglich als Zielkriterium an, gerade weil sie verschiedene erfassende und verarbeitende Systeme (unter anderem visuelles, sensomotorisches, auditives) des ZNS im Zusammenspiel überprüft. Auch die ROS zeichnet sich durch eine hohe Reliabilität und Objektivität aus.

Alle Patienten und Kontrollprobanden sollten zweimal untersucht werden. Die Nachuntersuchungen der Kontrollprobanden waren notwendig, um mögliche Lerneffekte und physiologische Entwicklungsschritte hinsichtlich der Zielkriterien herauszufiltern. Jede Untersuchung bedurfte der schriftlichen Einwilligung eines Erziehungsberechtigten. Der zeitliche Abstand zwischen erster und zweiter Untersuchung betrug 90 Tage. Während der 90 Tage zwischen den Untersuchungen wurde den PKU-Patienten täglich eine definierte Menge an Docosahexaensäure verabreicht (15 mg/kgKG/d). Träger und Darreichform der DHA waren die Fischölkapseln Ameu® der Firma Omega. Um festzustellen, ob die orale Aufnahme der Fischölkapseln einen Einfluss auf den Plasmafettsäuregehalt der Patienten hat, und um einen möglichen Zusammenhang mit den Ergebnissen der Zielkriterien zu überprüfen, wurde den PKU-Patienten an beiden Untersuchungstagen Blut zur Fettsäureanalyse entnommen. Die visuell evozierten Potentiale wurden bei allen Kindern gemessen. Die ROS wurde aus methodischen Gründen nur bei den Kindern im Alter zwischen fünf und elf Jahren durchgeführt. Um den guten Allgemeinzustand der PKU-Patienten zu überprüfen, wurde bei ihnen eine körperliche Untersuchung und eine zusätzliche Blutanalyse durchgeführt (erweitertes Blutbild).

Die gesunden Probanden der Kontrollgruppe erhielten keine Fettsäuresupplementierung. Wegen medizinisch-ethischer Bedenken konnten bei den Kontrollprobanden jedoch keine Blutentnahmen zur Überprüfung des Fettsäurestatus durchgeführt werden. Auch bei den Kontrollprobanden wurde eine körperliche Untersuchung durchgeführt.

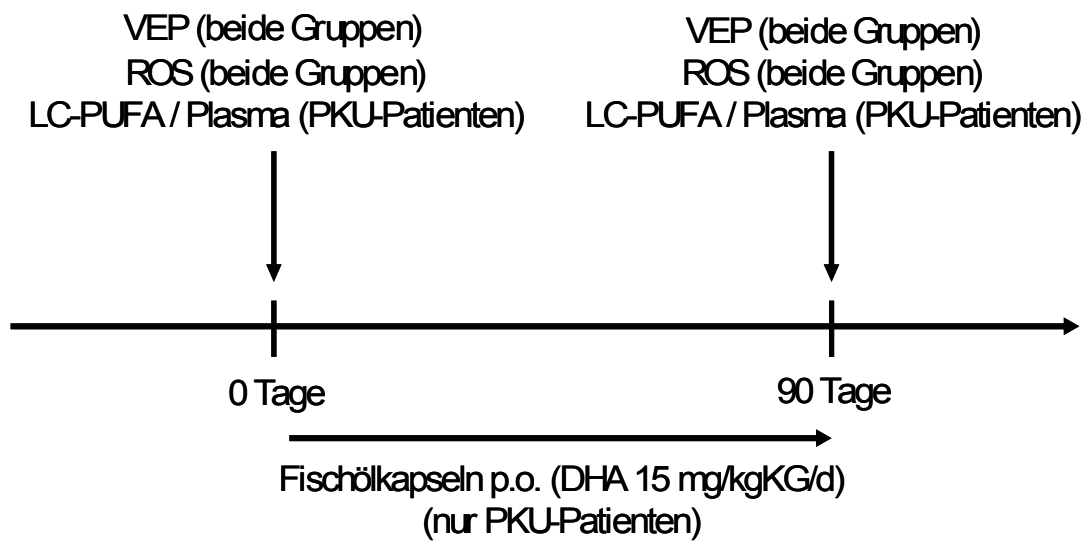


Abbildung 5: Zeitliches Ablaufschema der Studie.

Einschlusskriterien für diese Studie waren die frühzeitige Diagnosestellung der PKU durch das Neugeborenen-Screening und die kontrollierte Therapie im Anschluss. Da deutlich erhöhte Phenylalaninkonzentrationen einen direkten negativen Einfluss auf zentralnervöse Abläufe haben [54, 55], war eine weitere, wichtige Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie die sehr gute Stoffwechseleinstellung für den mittelfristigen Zeitraum vor Beginn dieser Studie. Dies wurde anhand der Plasmaphenylalaninkonzentrationen überprüft, die in den vorausgegangenen 6 Monaten nicht über 6 mg/dl (360  $\mu\text{mol/l}$ ) betragen durfte. Auf diesem Weg sollte verhindert werden, dass schlecht eingestellte PKU-Patienten durch eine kurzfristig verbesserte Compliance hinsichtlich der PKU-Diät innerhalb der Interventionszeit und mit den damit verbundenen veränderten Plasmaphenylalaninkonzentrationen die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen verfälschen [27]. Die Kontrolluntersuchungen innerhalb dieser vorausgehenden 6 Monate wurden in 1-4wöchentlichen Abständen im Dr. von Haunerschen Kinderspital durchgeführt.

Im Folgenden sind die Ein- und Ausschlusskriterien detailliert aufgelistet:

## **4.2 Einschlusskriterien**

- Alter aller Studienteilnehmer (PKU-Patienten und gesunde Kinder) zwischen einem und elf Jahren
- frühzeitige Diagnosestellung der PKU durch das Neugeborenencreening und die kontrollierte Therapie im Anschluss
- sehr gutes Compliance der PKU-Patienten hinsichtlich der PKU-Diät für den Zeitraum von 6 Monaten vor Beginn dieser Studie

## **4.3 Ausschlusskriterien (analog der ICH-GCP-Kriterien)**

- Teilnahme an einer klinischen Studie innerhalb der vergangenen 30 Tage
- Gleichzeitige Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung
- Unfähigkeit, die Kriterien des Prüfplans erfüllen zu können
- Alkohol-, Medikamenten- oder Drogenabhängigkeit sowie neurotische Persönlichkeit
- Psychiatrische Erkrankung oder Suizidgefahr
- Epilepsie
- Blutspende oder Blutverlust von >500 ml in den vergangenen 90 Tagen
- schwere allergische Diathese
- schwere organische Erkrankung
- akute Erkrankung, insbesondere akute Infektionen zum Zeitpunkt der Untersuchung
- jede chronische Krankheit oder Folgen chirurgischer Eingriffe am Verdauungstrakt, die Resorption, Metabolismus oder Ausscheidung des Präparates beeinflussen könnte
- Verweigerung der Zustimmung
- anamnestisch bekannte Krankheiten, die mit einer Verlängerung der Latenz P100 einher gehen können, ausgenommen der PKU
- Störungen der Blutgerinnung
- Erkrankungen, die Behandlung mit gerinnungshemmenden Mitteln erfordern
- andere Stoffwechselerkrankungen als Phenylketonurie
- Regelmäßige Medikamenteneinnahme außer der phenylalaninfreien Aminosäuregemische



- Dystrophie
- andere Diäten neben der PKU-Diät (z.B. vegane Ernährung bei den Kontrollprobanden)
- regelmäßige Verwendung von Nährstoffsupplementen
- bekannte Überempfindlichkeit gegen die Prüfmedikation, andere Fischölpräparate und Hilfsstoffe des Prüfpräparates

#### **4.4 Arten des Studienendes**

- Beendigung der Studie gemäß Protokoll
- Patient nicht zur Erst- und/oder Abschlussuntersuchung erschienen
- Nachträgliche Feststellung, dass Einschluss- und/oder Ausschlusskriterien nicht erfüllt wurden
- Abweichung der Compliance in Bezug auf die Einnahme der Prüfmedikation von mehr als 25%
- Wunsch des Patienten oder seiner Eltern, die Studie abubrechen

## **5 STUDIENMEDIKATION**

### **5.1 Studienmedikation der Gruppe der PKU-Patienten**

Bezeichnung: Aneu® der Firma Omega (Lachsöl in Kapselform)

Zusammensetzung: eine Kapsel (500 mg) enthält an arzneilich wirksamen Bestandteilen: 500 mg Lachsölkonzentrat; 35% davon entfallen auf Omega-3-Fettsäuren, darunter EPA (18%) und DHA (12% = 60 mg pro Kapsel). Sonstige Bestandteile sind Mischtocopherol (entspricht 1 mg Vitamin E als Antioxidanz), Gelatine, Glycerol, gereinigtes Wasser.

### **5.2 Studienmedikation der Kontrollgruppe**

Keine.

## 6 STUDIENMATERIALIEN

### 6.1 Chemikalien

2,6 Di-tert.-butyl-p-kresol (BHT), Fluka 34750, Buchs (Schweiz)

2,7-Dichlorfluoreszein, Merck 9676, Darmstadt

2-Propanol, Merck 1.09634.1000, Darmstadt

Ammoniaklösung 25% p.A., Merck 5432.1000, Darmstadt

Aqua ad iniectabilia, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen

Chloroform p.A., Merck 1.02445.2500, Darmstadt

DC-Platten Kieselgel 60, Merck 1.05721, Darmstadt

Diisopropylether, Baker 8072, Deventer (Holland)

Essigsäure 100% (Eisessig), Merck 1.00063, Darmstadt

Ethanol absolut, Merck 1.00983.2500, Darmstadt

Methanol LiChrosolv, gradient grade, Merck 1.06007.2500, Darmstadt

Methanolische HCl 3N, Supelco 3-3050 Bellefonte (USA)

Natriumcarbonat, Merck, 6392.0500, Darmstadt

Natriumhydrogencarbonat, Merck, 1.06329.1000, Darmstadt

Natriumsulfat, Merck, 1.06649.1000, Darmstadt

n-Heptan, Merck, 1.04379.1000, Darmstadt

n-Hexan LiChrosolv, Merck, 1.04391.1000, Darmstadt

Phosphatidylcholine Dipentadecanoyl, Sigma P7285, Deisenhofen

Phosphatidylethanolamine Diheptadecanoyl, Sigma P 8664, Deisenhofen

### 6.2 Verbrauchsmaterialien

Bördelkappe R11-1.0, Nr. 301014, CS Chromatographie Service, Langerwehe

Dichtscheibe G13, Nr. 300357, CS Chromatographie Service, Langerwehe

Dichtscheibe G15, Nr. 300326, CS Chromatographie Service, Langerwehe

Evoked EEG Electrode Set, NIHON KOHDEN CORPORATION, Tokyo 161, Japan

Federn, Chromacol 500 X MTS-1, Trumbull (USA)

Flasche G4, braun, Nr. 300106, CS-Chromatographie Service, Langerwehe

Flasche R1, braun, Nr. 300005, CS-Chromatographie Service, Langerwehe  
Microvials, Chromacol 1000 02-MTV, Trumbull (USA)  
Pasteurpipetten, Brand 7477 15, Wertheim  
Pipettenspitzen für CP10 und CP100, abimed, Langenfeld  
Pipettenspitzen für Eppendorf-Pipetten, Greiner, Frickenhausen  
Reagenzgläser 3 WKB 135 14/15 mm, WAG 0,8/1,0 mm, Paul, Gilching  
Rollrandfläschchen G1, braun, 300102, CS-Chromatographie Service, Langerwehe  
Sandpaste „skinPure“, NIHON KOHDEN CORPORATION, Tokyo 161, Japan  
Schraubkappe G15, Nr. 300328, CS-Chromatographie Service, Langerwehe  
Ten 20 conductive EEG-Paste, weaver and Co. Aurora, CO 80011, USA

### **6.3 Geräte**

Analysenwaage, Sartorius R-200 D, Göttingen  
Autosampler, Hewlett-Packard 7673 Series, Böblingen  
Bördelzange, Hewlett Packard 8710-0979  
Entwicklungskammer, Desagag, Heidelberg  
Gaschromatograph, Hewlett-Packard 5890 Series 2, Böblingen  
Integrator, Hewlett-Packard, 3396-Series, Böblingen  
Kieselgelplatte, Merck 1925.1000, Darmstadt  
Metallblock-Thermostat, Bachhofer GmbH, Typ 2102 Reutlingen  
Pipette, abimed 1-10 µl, 10-100µl, 50-250 µl, 200-1000 µl, 500-2500 µl  
Pipette, Brand Transferpipette 10-100 µl, Wertheim  
Schliffglasröhrchen  
Thermoplatte S Desaga, Heidelberg  
Ultraschallbad Sonorex Super, Bandelin electronic, Berlin  
UV-Lampe, “no name”, Hongkong  
VEP-Messgerät, Toennis NeuroScreen 1.63, Jaeger-Toennis GmbH, Deutschland  
Vortexer, Janke und Kunkel IKA-Labortechnik VF 2, Heitersheim  
Zentrifuge Universal 30 F, Hetterich, Tuttlingen

## **7 ZIELKRITERIEN**

### **7.1 Primäres Zielkriterium**

- Latenzen P100 visuell evozierter Potentiale

### **7.2 Sekundäre Zielkriterien**

#### 7.2.1 Funktionsvariablen

- sensomotorische Fähigkeiten (MQ-Werte der Rostock-Oseretzky-Skala)

#### 7.2.2 Laborvariablen

- Phospholipid-Fettsäuren im Plasma

#### 7.2.3 Sonstige Kriterien

- Erfassung der globalen Verträglichkeit der Behandlung (5stufiger Score)
- unerwünschte Ereignisse (UE) und unerwünschte Arzneimittelwirkung (UAW)

## **8 NULLHYPOTHESE, ARBEITSHYPOTHESE**

### **8.1 Nullhypothese**

Die Nullhypothese  $H_0$  lautet, dass bei PKU-Patienten unter 90-tägiger Gabe von Fischöl mit einer durchschnittlichen DHA-Dosis von 15mg/kgKG/d im Vergleich zu den Vorwerten keine Verkürzung der Latenzen visuell evozierter Potentiale (P100) erreicht wird:  $P100_0 = P100_{90}$ .

### **8.2 Arbeitshypothese**

Die Arbeitshypothese  $K_1$  lautet, dass bei PKU-Patienten unter 90-tägiger Gabe von Fischöl mit einer durchschnittlichen DHA-Dosis von 15mg/kgKG/d im Vergleich zu den Vorwerten eine Verkürzung der Latenzen visuell evozierter Potentiale (P100) um mindestens 6% eintritt.

## 9 LABORANALYSEN

### 9.1 Reproduzierbarkeit Plasma

Die Extraktion der Lipide erfolgte nach einem standardisierten Verfahren [30]. Die einwandfreie Reliabilität der Analysegeräte und der Analyseprozedur der sich anschließenden gaschromatographischen Quantifizierung der Lipidfraktionen wurde in einem Intraassay-Versuch überprüft und sichergestellt; hierzu wurde die 8fach wiederholte Messung einer randomisierten Poolplasmaprobe von 8 PKU-Patienten durchgeführt. Mittelwerte, Standardabweichung und Variationskoeffizienten wurden berechnet. Bei sämtlichen n-3- und n-6-Fettsäuren lag der Variationskoeffizient unter 5%, ebenso bei den einfach ungesättigten und den gesättigten Fettsäuren. Die Wiederfindungsrate der Fettsäuren betrug jeweils zwischen 98% und 99%.

### 9.2 Blutentnahme und Aufbereitung der Plasmafettsäuren

Für die Analyse der Plasmafettsäuren wurde allen PKU-Kindern sowohl in der Voruntersuchung als auch in der Nachuntersuchung (nach 90 Tagen) jeweils 1,5 ml EDTA Blut entnommen. Das EDTA Blut wurde direkt nach der Entnahme 5 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abpipettiert und bis zur weiteren Aufbereitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Um möglichst einheitliche Analysebedingungen zu schaffen (Substrate aus der gleichen Produktionscharge, identische gaschromatographische Säule für alle Proben), wurde mit der weiteren Aufbereitung gewartet, bis die Plasmaproben aller PKU-Patienten gesammelt waren. Zur Wahrung der höchstmöglichen Objektivität wurden sämtliche Proben der Vor- und Nachuntersuchung verblindet aufbereitet und analysiert. Zur Extraktion der Gesamt-Fettsäuren wurden von jedem Patienten 250  $\mu\text{l}$  Plasma in ein Schliffglasröhrchen überführt. Diesen 250  $\mu\text{l}$  Plasma wurde 100  $\mu\text{l}$  innerer Standard beigemischt (innerer Standard: 14,562 mg Phosphatidylcholin-Dipentadecanoyl entsprechend 10 mg Pentadecansäure in 100 ml Methanol/Chloroform 35/15 v/v mit 2,6 Di-tert-butyl-p-kresol BHT 2 g/l. Die Konzentration an C:15 im inneren Standard betrug 10  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ ). Nach Beimischung des inneren Standards wurden 2 ml Hexan/Isopropanol im Verhältnis 3:2 hinzugefügt. Dieses

Gemisch wurde für 1 Minute geschüttelt und anschließend, zum Zwecke einer sauberen Phasentrennung, 7 Minuten lang bei 2300 U/min zentrifugiert. Die obere der beiden Phasen wurde vollständig in ein 4ml Braungläschen überführt und unter Stickstoff eingedampft. Die untere Phase wurde verworfen. Das eingedampfte Gesamt-Fettsäure-Extrakt wurde anschließend noch zwei Mal mit jeweils 2 ml Hexan aufgemischt, geschüttelt, zentrifugiert und wieder mit Stickstoff eingedampft.

Danach wurde das Gesamt-Fettsäure-Extrakt in 400 µl Chloroform/Methanol (1/1, v/v) aufgenommen und auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte (DC-Platte) 1,5 cm vom unteren Rand der Platte entfernt vollständig auf einer Breite von 2 cm so dünn wie möglich aufgetragen. Die Abstände zwischen den Auftragsstellen betragen etwa 3 cm. Jede Auftragsstelle wurde dann separat zweimal mit Chloroform gespült, bevor die Platten entwickelt wurden. Laufmittel war n-Heptan/Diisopropylether/Eisessig 60/40/3 v/v. Die Platten wurden bis 1 cm unter den oberen Rand entwickelt, anschließend auf einer Thermoplatte für 20 Minuten getrocknet und danach mit 2,7 Dichlorfluorescein besprüht. Die Lipidfraktionen wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Phospholipidfraktion wurde vollständig mit einem Spatel ausgekratzt und in 4ml Braungläschen überführt.

Die Umesterung (Transmethylierung) der Lipidfraktion erfolgte nach Beimengung von 1,5 ml methanolischer HCL unter Erhitzung im Thermoblock bei 85°C für 45 Minuten im gut verschlossenen Braungläschen. Nach anschließender Abkühlung für 30 Minuten wurden die Proben mit Natriumsulfat/Natriumhydrogencarbonat/Natriumcarbonat 2/2/1 v/v bis auf einen pH von 7 neutralisiert. Die Separierung der Fettsäure-Methylester gelang, indem die Proben zunächst mit 1 ml Hexan aufgeschüttelt wurden und anschließend die obere Hexanphase abpipettiert und in ein 2ml Braungläschen überführt wurde. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Die gewonnene Hexanphase wurde unter Stickstoff eingedampft, danach vollständig in 50 µl Hexan (BHT 2 g/l als Antioxidanz enthalten) aufgenommen und in ein Microvial überführt. Das Microvial wurde in ein 1ml Braungläschen gesteckt und dieses mit einer Bördelklappe verschlossen. Bis zur Analyse mittels Gaschromatographie wurden die Proben bei -80°C eingefroren.



### 9.3 Gaschromatographische Analyse

Die quantitative Analyse der Proben wurde mittels Gaschromatographie durchgeführt. Die Messungen im Gaschromatographen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säule:	BPX 70-Kapillar-Trennsäule, 50 mm x 0,32 mm (Scientific Glass Engineering 054603, Weiterstadt)
Filmdicke:	0,25 µl (Bicyanopropyl-polisiloxan)
Temperatur Injektor:	250°C
Temperatur Detektor:	250°C
Temperatur Ofen:	130°C
Gasdurchfluss:	mobile Phase (Helium) mit einem Vordruck von 1,0 bar beim Start bei einer Erhöhung um 0,02 bar/min und einem Splitverhältnis von 1:20
Einspritzmenge Plasma:	3 µl
Temperaturprogramm:	nach der Injektion folgte ein kontinuierlicher Temperaturanstieg um 4°C/min bis auf 180°C, danach um 3°C/min bis auf 200°C und anschließend um 1°C/min auf 210°C. Diese Temperatur wurde für 20 Minuten aufrechterhalten. Anschließend wurde auf 130°C heruntergekühlt.

## **10 VEP, ROS: DURCHFÜHRUNG**

### **10.1 Durchführung der visuell evozierten Potentiale (VEP)**

Bei jeder der Untersuchungen waren 3 Personen anwesend: das zu untersuchende Kind, eine vertraute Begleitperson (meistens ein Elternteil) und der Untersucher. Zu Beginn der Untersuchung musste sich das Kind in eine aufrechte Sitzposition auf einen höhenjustierbaren Hocker begeben. Anschließend wurde ein Computerbildschirm in einem Augenabstand von 100 cm aufgestellt und der Hocker auf dem das Kind saß so justiert, dass sich die Bildschirmmitte auf Augenhöhe des Kindes befand. Zur Ableitung visuell evozierter Potentiale mittels des in dieser Studie verwendeten VEP-Messgerätes (Toennis NeuroScreen 1.63, Jaeger-Toennis GmbH, Deutschland) wurden 3 Messelektroden benötigt (aktive, inaktive, Erde). Die Elektrodenpositionen, allesamt an der Kopfhaut des Kindes, wurden zunächst mit einer Sandpaste entfettet und anschließend mit einer speziellen EEG-Paste beschichtet, um die Elektrodenimpedanzen möglichst gering zu halten. Ein optimales Impedanzniveau konnte über das VEP-Messgerät direkt ermittelt werden. Die aktive Elektrode wurde 3 cm zentral über dem Inion, die inaktive Elektrode frontozentral möglichst nahe dem Haaransatz, und die Erdelektrode craniozentral bei der Hälfte des Abstandes Inion-Nasion mit einer Spezialpaste befestigt. Nach diesen Vorbereitungen wurde der Raum völlig abgedunkelt. Insgesamt wurde in 4 Durchgängen gemessen. Die Ableitung erfolgte gemäß den Standards der Deutschen Gesellschaft für klinische Neurophysiologie (DGKN). In allen Durchgängen zeigte sich auf dem Bildschirm ein Schwarz-Weiß-Schachbrettmuster, das mit einer Frequenz von 3,2 Hz seine Farben untereinander vertauschte. Die Größe der einzelnen Felder im ersten Durchgang betrug 5 Winkelminuten (wm). Aufgabe für das Kind war es, die Mitte des Bildschirms zu fixieren. Um dies zu erleichtern, wurde auf der Bildschirmmitte ein pfenniggroßes Stück roter Plastikfolie befestigt. Sofern das Kind ruhig diesen roten Punkt fixierte, konnte bei jeder Farbumkehr ein visuell evoziertes Potential gemessen werden.

Um Artefakte herauszufiltern wurden in jedem Durchgang 50 Farbumkehrungen vorgenommen. Wurde ein Kind unruhig, konnte die Messung kurzfristig abgebrochen, und zu einem späteren Zeitpunkt fortgesetzt werden. Zwischen den einzelnen Durchgängen wurde zu Erholungszwecken ein bis zwei Minuten pausiert. Den Versuchsaufbau betreffend wurde lediglich die Größe der Schachbrettfelder verändert: im zweiten Durchgang betrug sie 10 wm, im dritten 15 wm und im vierten Durchgang 30 wm. Alle Kinder beider Gruppen sollten untersucht werden.

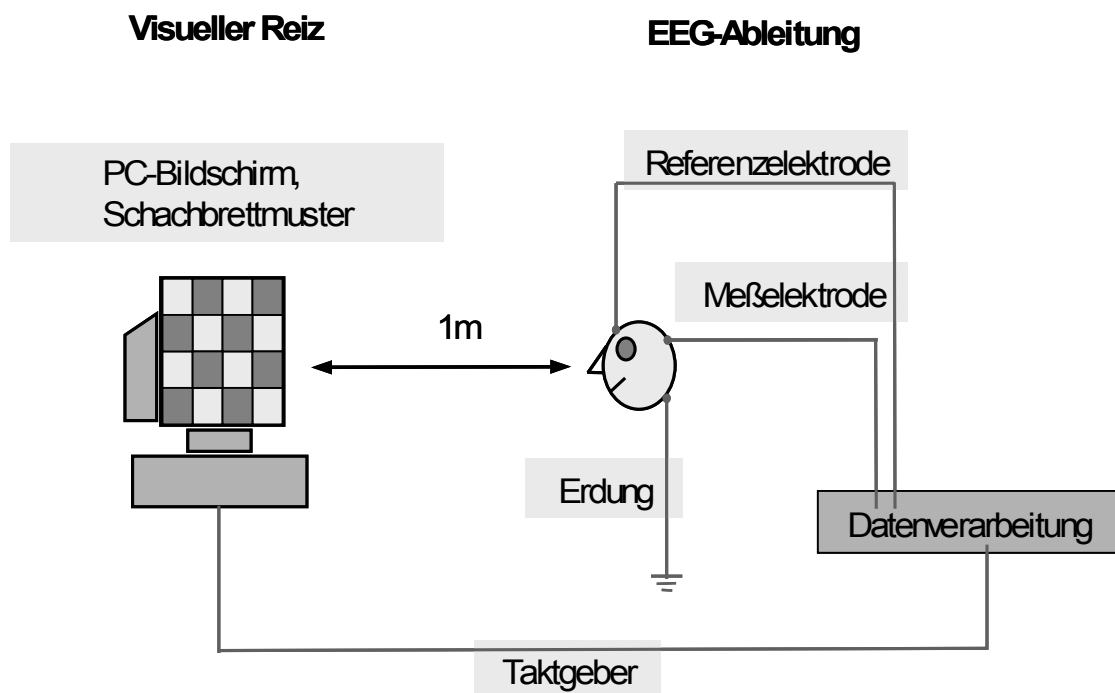


Abbildung 6: schematischer Versuchsaufbau der VEP-Messungen.

## 10.2 Durchführung der Rostock-Oseretzky-Skala (ROS)

Das Maß der Objektivität hängt gerade bei der Untersuchung motorischer Fähigkeiten, die eine Reihe mündlicher Anweisungen an den Probanden beinhaltet, von einer gleich bleibenden Vorgehensweise ab. Die Untersuchung fand daher immer im gleichen Raum statt, die Versuchsaufbauten wurden stets genau ausgemessen, und die Anleitungen des Untersuchers waren knapp und einfach gehalten. Jede Übung wurde zur Veranschaulichung 1 Mal vom Untersucher demonstriert. Im Untersuchungsraum waren jeweils 3 Personen anwesend: das Kind, eine Begleitperson und der Untersucher. Alle Kinder beider Gruppen zwischen 5 und 11 Jahren sollten untersucht werden.

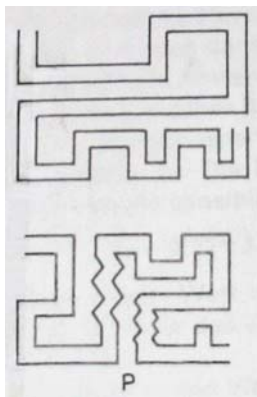
Die Untersuchung gliederte sich in die folgenden 5 Elemente:

### 10.2.1 Münzen legen (Mü)

2 Reihen zu je 10 Münzen (2 cm Durchmesser) wurden hintereinander auf eine glatte Tischfläche gelegt. Beide Reihen lagen parallel zur Tischkante, die erste Reihe in einem Abstand von 4 cm, die zweite Reihe in einem Abstand von 8 cm. Der Abstand zweier Münzen innerhalb einer Reihe betrug 3 cm (Rand zu Rand). Die Aufgabe für das Kind bestand darin, mit der dominanten Hand innerhalb von 15 Sekunden so viele Münzen wie möglich in eine Schachtel (10 cm x 7 cm, 3 cm hoch) zu legen, die in einem Abstand von 20 cm zur Tischkante stand. Es durfte jedoch immer nur eine Münze vom Tisch genommen und in die Schachtel gelegt werden.

### 10.2.2 Labyrinth durchfahren (LZ, LF)

Diese Aufgabe bestand darin, mit einem Kugelschreiber so schnell wie möglich durch ein kleines Labyrinth zu fahren. Die Ränder des Labyrinthes sollten mit dem Kugelschreiber nicht berührt werden. Nach Beendigung der Aufgabe wurden die benötigte Laufzeit (LZ) und die Anzahl der Berührungen (LF = Lauffehler) notiert. Das Labyrinth hatte die Maße 1,8 cm x 2,8 cm und befand sich in der Mitte eines DIN A 4-Blattes auf einem Tisch, vor dem das Kind auf einem Stuhl saß.



*Abbildung 7: Aufgabe der Kinder war es, mit einem Kugelschreiber so schnell und gleichzeitig so genau wie möglich, d.h. ohne die Linien zu berühren, durch das obere Labyrinth zu fahren. Der Untersucher demonstrierte die Aufgabe vorher am unteren Labyrinth.*

### 10.2.3 Dynamische Balance (Bd)

In dieser Aufgabe sollte das Kind nacheinander über 7 Holzleisten balancieren. Die Leisten waren alle gleich lang (2m) und gleich stark (2cm), jedoch unterschiedlich breit (8, 7, 6, 5, 4, 3 und 2cm). Die Kinder sollten in ruhigem Gehtempo, Ferse an Zehen gesetzt, über die Leisten gehen, beginnend mit der breitesten. Die Arme sollten locker am Körper herunter hängen, und durften nicht in die Waagerechte gehoben werden. Sobald das Kind das Gleichgewicht verlor und mit einem Fuß den Boden berührte galt diese Aufgabe als beendet, und alle bis dahin komplett überquerten Holzleisten wurden gewertet.

### 10.2.4 Statische Balance (Bst)

Das Kind sollte nacheinander die im Folgenden beschriebenen Positionen einnehmen und sie für 10 Sekunden halten, ohne das Gleichgewicht zu verlieren.

- a) Zehen-Fersen-Stand (Füße in gerader Linie) mit geöffneten Augen
- b) Zehen-Fersen-Stand (wie a, jedoch mit geschlossenen Augen)
- c) Zehenspitzenstand (Füße direkt nebeneinander, auf den Zehenspitzen) mit geöffneten Augen
- d) Zehenspitzenstand (wie c, jedoch mit geschlossenen Augen)
- e) Stand auf einem Bein, zuerst rechts, dann links. Das jeweils andere Bein im Kniegelenk rechtwinklig gebeugt. Geöffnete Augen
- f) wie e, jedoch mit nach vorne gebeugtem Oberkörper und mit hinter dem Rücken verschränkten Armen
- g) Stand auf einem Bein, auf den Zehenspitzen. Zuerst rechts, dann links

Alle Positionen (a-g) wurden geprüft, für jede erfüllte Position gab es einen Punkt, bei einseitiger Bewältigung einen halben Punkt.

### 10.2.5 Motorisch-rhythmische Koordination (Mrk)

Diese Untersuchung bestand aus 7 Durchgängen. Benötigt wurde ein Metronom, eingestellt auf Tempo 92 (Anschläge/min). Die Aufgabe des Kindes bestand im ersten Durchgang darin, synchron zum 4/4 Takt des Metronoms abwechselnd jeweils mit dem rechten und linken Fuß auf den Boden zu stampfen. In Durchgang 2 bis 7 sollte es diesen Stampfrhythmus beibehalten und gleichzeitig einen vom Untersucher vorgegebenen Rhythmus mit den Händen 4mal in direkter Abfolge nachklatschen. Alle Rhythmen (1-7) wurden geprüft, für jede erfüllte Aufgabe gab es einen Punkt.

- 1) Nur Füße
- 2) Füße und Hände gleichzeitig
- 3) Hände (Füße wie in 1)
- 4) Hände (Füße wie in 1)
- 5) Hände (Füße wie in 1)
- 6) Hände (Füße wie in 1)
- 7) Hände (Füße wie in 1)

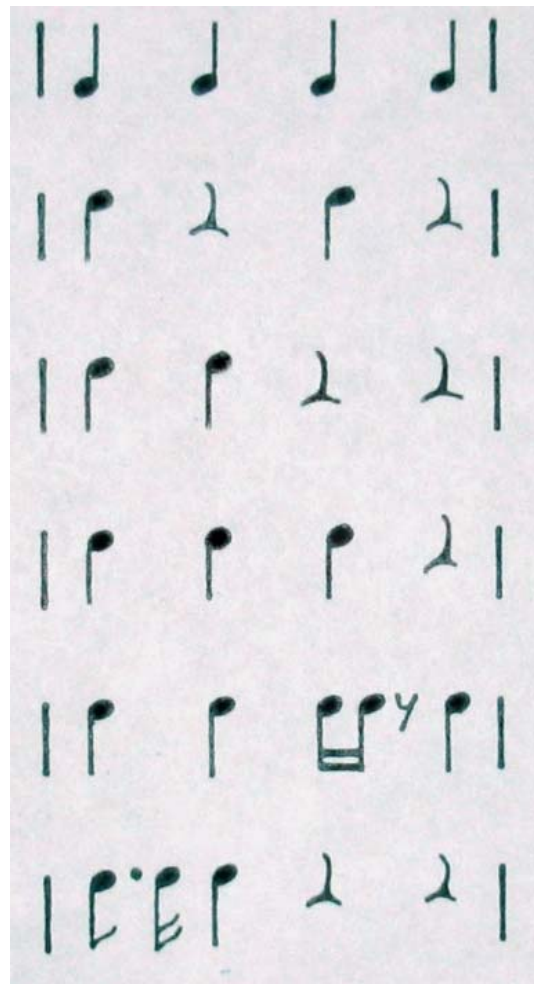


Abbildung 8: Reihenfolge der 7 Rhythmusübungen der MrK.

### 10.3 Auswertung der ROS

Während der Entwicklung der ROS durch Kurth wurde bald klar, dass die Ergebnisse (Rohpunktwerte) in den einzelnen Untertests auf die verschiedenen Altersstufen bezogen keiner Normalverteilung entsprachen. Erst durch Verteilungsnormalisierungen, die auf die Flächentransformation von Gutjahr [25] zurückgeht, gelang es, eine Prozentrangverteilung zu berechnen, die sich als Normalverteilung darstellen ließ. Da die Merkmalswerte teilweise in nur 7 Stufen variieren können, entschied man sich für eine relativ grobe Einstufung, die C-Skala (Werte zwischen 0 und 10). Dadurch erreichte man, unabhängig vom Alter der Probanden, vergleichbare Werte für alle Untertests, die es gestatteten, auch qualitative Unterschiede motorischer Leistungen zu beschreiben. Durch die Zusammenfassung und Überführung aller Werte der C-Skala in eine weitere Skala, die statistisch genau so definiert ist wie der Abweichungs-IQ (Mittelwert = 100), erhielt man eine relative Bewertung der gesamten erbrachten Leistung eines Probanden im Sinne einer Normalverteilung. Die Verfasser der ROS gaben dieser Bewertung die Bezeichnung MQ (motorischer Quotient).

Aufgabe	Rohwert	C-Wert (C)
Münzen legen ( <i>Mü</i> )	16 (Münzen)	6
Laufzeit Labyrinth ( <i>LZ</i> )	23 (Sekunden)	5
Lauffehler Labyrinth ( <i>LF</i> )	3 (Fehler)	5
dynamische Balance ( <i>Bd</i> )	5 (Holzleisten)	5
statische Balance ( <i>Bst</i> )	5,5 (Figuren)	6
motorisch-rhythmische Koordination ( <i>MrK</i> )	6 (Rhythmen)	6
C-Wert Gesamt ( <i>CGes</i> )		33
motorischer Quotient ( <i>MQ</i> )	107	

*Tabelle 2: Beispielwerte bei einem gesunden, 11jährigen Jungen. Der errechnete MQ ist mit 107 leicht überdurchschnittlich (der Mittelwert liegt bei 100), liegt aber noch innerhalb der ersten Standardabweichung.*



C-Wert	Mü	LZ	LF	Bd	Bst	Mrk
0	0-12	über 40	über 9	2	2,5	1
1		40-33	9	3	3	1,5
2	13	32-30	8		3,5	2-2,5
3		29-26	7-6	4	4	3
4	14	25-24	5-4		4,5	3,5
5	15	23-22	3	5	5	4-5
6	16	21-19			5,5	5,5-6
7	17	18-16	2	6	6	6,5
8	18	15	1	7	6,5	7
9					7	
10	19-20	unter 15	0			

*Tabelle 3: Umrechnung der Rohwerte in die C-Werte der jeweiligen Übung. Für jedes Lebensjahr von 5-11 Jahren gibt es eine eigene Umrechnungstabelle. Die hier abgebildete Tabelle gilt nur für 11jährige Jungen.*

CGes	MQ	CGes	MQ	CGes	MQ	CGes	MQ	CGes	MQ
1	28	11	52	21	77	31	102	41	127
2	30	12	55	22	80	32	105	42	129
3	33	13	57	23	82	33	107	43	132
4	35	14	60	24	85	34	109	44	134
5	38	15	62	25	87	35	112	45	137
6	40	16	65	26	90	36	114	46	139
7	43	17	67	27	92	37	117	47	142
8	45	18	70	28	95	38	119	48	144
9	48	19	72	29	97	39	122	49	147
10	50	20	75	30	100	40	124	50	149

*Tabelle 4: Umrechnung des CGes-Wertes in den motorischen Quotienten (MQ) für alle relevanten Altersstufen. Der statistische Mittelwert (MQ = 100) entspricht immer einem CGes-Wert von 30.*

## 10.4 Reliabilität der ROS

Da es sich bei der ROS um eine heterogen aufgebaute Testserie handelt, die unter anderem Schnelligkeitsanforderungen enthält, eignet sie sich insbesondere zur Testwiederholung. Zur genauen Prüfung der Reliabilität führte Kurth eine Stichprobenuntersuchung an 8jährigen Konzentrationsgestörten Kindern (n=21) sowie an 8jährigen Kindern aus der Standardisierungspopulation (n=49) durch, die nach 6 Wochen wiederholt wurde [37]. Unter Berücksichtigung unterschiedlicher Varianzen nach Lienert [38] ergab sich nach Korrektur eine sehr zuverlässige Reliabilität des CGes-Wertes von 0,92. Sämtliche Korrelationskoeffizienten waren sowohl vor als auch nach der Korrektur auf dem 0,1%-Niveau hochsignifikant.

## 10.5 Schwierigkeit und Trennschärfe der ROS

Ziel bei der Entwicklung der ROS war es unter anderem, die Aufgabenschwierigkeiten so zu verteilen, dass eine möglichst breite Streuung auf allen Altersstufen erreicht wird, um sowohl gute als auch weniger gute Probanden noch ausreichend differenzieren zu können. Für die Errechnung eines Gesamtschwierigkeitsindex der 3 Untertests mit Einzelaufgaben (Bd, Bst, Mrk) wurde unter Berücksichtigung der Formel von Dahl die Formel von Lienert angewendet [17, 38]. Danach ergaben sich für alle Altersstufen bei den Untertests Bd, Bst und MrK aufsteigende Schwierigkeitsindizes von etwa 20 bis 70 nach Lienert, wobei die MrK-Aufgaben die relativ höchsten Anforderungen an die Probanden stellten. Aufgrund fehlender echter richtig-falsch-Dichotomie der übrigen Aufgaben Mü, LZ und LF wurde bei ihnen auf die Angabe solcher Werte verzichtet. Hinsichtlich der Trennschärfe ergaben sich für die Untertests Bd und Bst Korrelationskoeffizienten um 0,5. Von den 21 Korrelationskoeffizienten waren 17 statistisch signifikant oder hochsignifikant [37]. Lediglich 3 Werte, die sich auf die MrK beziehen, fielen durch ihre niedrige Höhe heraus.

# 11 ERGEBNISSE UND STATISTIK

## 11.1 Studienteilnehmer

### 11.1.1 PKU-Patienten

Unter Berücksichtigung sämtlicher Ein- und Ausschlusskriterien wurden 38 PKU-Patienten in die Studie aufgenommen, von denen 36 vollständig das Studienprotokoll beendeten (Durchschnittsalter  $6,3 \pm 0,55$  Jahre, 19 Mädchen, 17 Jungen).

Die Befunde der körperlichen Untersuchung und die Blutanalysen (erweitertes Blutbild) belegten sowohl in der Voruntersuchung als auch in der Nachuntersuchung den guten Allgemeinzustand aller PKU-Patienten. Es ergaben sich hieraus keine Hinweise auf eine akute oder schwere chronische Erkrankung.

### 11.1.2 Kontrollprobanden

Die Gruppe der Kontrollprobanden rekrutierte sich überwiegend aus gesunden Geschwistern teilnehmender PKU-Patienten bzw. aus deren Freundes- und Bekanntenkreis. So konnte gewährleistet werden, dass beide Gruppen auch bezüglich ethnischer Herkunft und sozialer Schicht der Teilnehmer ein ähnliches Gefüge aufwiesen. Unter Berücksichtigung sämtlicher Ein- und Ausschlusskriterien konnten 30 gesunde Kinder (Anamnese, körperliche Untersuchung) in die Studie aufgenommen werden (Durchschnittsalter  $6,57 \pm 0,50$  Jahre, 15 Mädchen, 15 Jungen).

### 11.1.3 Dropouts

Insgesamt wurden im Verlauf der Intervention 2 von 38 PKU-Patienten aus der Studie ausgeschlossen. Eine 5jährige PKU-Patientin mit Neurodermitis musste das Studienprotokoll aufgrund täglicher Einnahme von zusätzlichem Nachtkerzenöl vorzeitig beenden; dieses Öl ist reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, daher hätte dessen zusätzliche Einnahme zu einer Verfälschung der Ergebnisse bei den Zielparametern führen können. Ein 4jähriger PKU-Patient musste aus der Studie genommen werden, da er die Einnahme der Fischölkapseln

verweigerte. Seitens der Kontrollprobanden wurden keine Zwischenfälle berichtet, die den Ausschluss aus der Studie erfordert hätten.

## **11.2 Statistische Auswertung**

Der statistische Vergleich beider Gruppen (PKU-Patienten, Kontrollprobanden) erfolgte bei der Rostock-Oseretzky-Skala mittels ANOVA (analysis of variance, Korrektur nach Bonferroni) und mit dem t-Test nach Student (Student's t-test). Die Berechnung von Behandlungseffekten nach Gabe von DHA bei den PKU-Patienten und der Vergleich mit den unbehandelten Kontrollprobanden wurde mit MANOVA (multivariate analysis of variance) für wiederholte Messungen (2 Gruppen, 2 Zeitpunkte) durchgeführt. Darüber hinaus wurden die Veränderungen über die Zeit innerhalb der beiden Gruppen mit dem t-Test für gepaarte Stichproben (paired t-test) auf statistische Signifikanz überprüft.

Die Analyse der Daten aus den Messungen der visuell evozierten Potentiale im Vergleich zwischen PKU-Patienten und Kontrollprobanden erfolgte mittels t-Test nach Student. Um Behandlungseffekte nach Gabe von DHA auf statistische Signifikanz zu überprüfen, wurde der t-Test für gepaarte Stichproben angewendet.

Zur Überprüfung von signifikanten Veränderungen der Fettsäurekonzentrationen im Blutplasma nach Gabe von DHA-haltigen Fischölkapseln wurde der t-Test für gepaarte Stichproben angewendet (nur PKU-Patienten, es erfolgte keine Fischölgabe und Fettsäureanalyse bei den Kontrollprobanden).

Die Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS 11.0 für Windows. Bei allen Untersuchungen wurde statistische Signifikanz für  $p < 0,05$  angenommen.

## **11.3 Phenylalanin und Plasmafettsäuren der PKU-Patienten**

Alle PKU-Patienten waren sowohl zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung als auch für den Zeitraum der Intervention therapeutisch sehr gut eingestellt. Dies wurde anhand der Plasmaphenylalaninkonzentrationen überprüft, die bei allen PKU-Patienten auch während dieser Studie im angesetzten Rahmen von unter 6 mg/dl (360  $\mu$ mol/l) lag. Die mittlere Phenylalanintoleranz der PKU-Patienten betrug zu Studienbeginn 13,9 mg/kgKG/d und blieb im Verlauf konstant.

Tabelle 11 zeigt die Konzentrationen der Fettsäuren der Plasmaphospholipide an beiden Untersuchungstagen. Die Wiederfindungsrate der Fettsäuren in der Voruntersuchung betrug 98,66%. Der Anteil an gesättigten Fettsäuren war hier mit 44,93% am höchsten, nacheinander gefolgt von den Anteilen der n-6-PUFA (36,19%), einfach ungesättigten Fettsäuren (n-7- und n-9, 13,62%) und n-3-PUFA (3,95%).

Bei den n-6-PUFA dominierte die Linolsäure (18:2n-6, 21,47%) vor der Arachidonsäure (20:4n-6, 9,26%). Der Anteil der restlichen n-6-PUFA betrug nur 5,4%. Bei den n-3-PUFA überwog die Docosahexaensäure (22:6n-3, 2,37%). Die Konzentration der Eicosapentaensäure (20:5n-3) betrug lediglich 0,4%. Die restlichen n-3-PUFA lagen in jeweils minimalen Konzentrationen vor (insgesamt 1,18%).

Im Vergleich zu verfügbaren Daten von gesunden Kindern derselben ethnischen Zugehörigkeit [18] zeigten die PKU-Patienten eine ähnliche Zusammensetzung der Plasmaphospholipide. Etwas niedrigere Konzentrationen ließen sich bei den PKU-Patienten im Vergleich zur Referenzpopulation jedoch für die Gesamt-n-3-Fettsäuren nachweisen. Insbesondere der Anteil für die Docosahexaensäure war bei den PKU-Patienten (2,37%) niedriger als bei der Referenzpopulation (2,62%). Dafür lagen die Konzentrationen der Gesamt-n-6-Fettsäuren bei den PKU-Patienten (36,19%) etwas höher als bei gesunden Kindern (32,82%). Auch die Konzentration der  $\alpha$ -Linolensäure (18:3n-3) war bei den PKU-Patienten etwas höher. Das Verhältnis von n-3- zu n-6-Fettsäuren ist damit etwas niedriger als bei gesunden Probanden.

Bei der Nachuntersuchung betrug die Wiederfindungsrate der Fettsäuren 98,76%. Somit lag die Wiederfindungsrate der Plasmafettsäuren sowohl in der Voruntersuchung (98,66%) als auch in der Nachuntersuchung auf einem sehr hohen Niveau.

Insgesamt führte die 90tägige Intervention mit Fischölkapseln bei den PKU-Patienten zu einer deutlich veränderten Zusammensetzung der Plasmaphospholipide. Die größten Unterschiede waren bei den langkettigen, mehrfach-ungesättigten Fettsäuren, insbesondere bei den n-3-PUFA zu verzeichnen. Der Anteil an Docosahexaensäure erhöhte sich von ursprünglich 2,37% auf 7,05% und der Anteil von Eicosapentaensäure von 0,4% auf 3,31%. Insgesamt stieg der Anteil der n-3-PUFA um 8,34% auf 12,42%. Gleichzeitig sank der Anteil der n-6-PUFA um insgesamt 7,27% auf 28,66%. Der Anteil an Arachidonsäure fiel von 9,26% auf 6,76%, und der Anteil von Linolsäure von 21,47% auf 18,37%. Für die oben genannten Veränderungen gilt Hochsignifikanzniveau ( $p < 0,001$ ).

Nahezu unverändert hingegen gestaltete sich die Zusammensetzung der einfach ungesättigten (n-7- und n-9) und der gesättigten Fettsäuren im Vergleich zur Voruntersuchung. Es konnte kein relevanter total mean-change festgestellt werden.

## 11.4 Rostock-Oseretzky-Skala

Die Ergebnisse aller PKU-Patienten und Kontrollprobanden, die sowohl an der Voruntersuchung als auch an der Nachuntersuchung teilnahmen, sind in Tabelle 9 und 10 dargestellt: der motorische Quotient (MQ) der PKU-Patienten lag in der Voruntersuchung zwar im Normbereich, jedoch signifikant unterhalb der erbrachten Leistungen der Kontrollgruppe (PKU-Patienten: MQ = 107, Kontrollprobanden: MQ = 116;  $p = 0,03$ ; MANOVA).

Mit Ausnahme der Prüfung Labyrinth Zeit (LZ; PKU = 8,1 und Kontrollen = 8,1; C-Wert) erzielten die Kontrollprobanden in der Voruntersuchung in jedem Untertest bessere Ergebnisse als die PKU-Patienten. Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,046$ , MANOVA) zwischen den beiden Gruppen waren wie folgt festzustellen: Münzen (Mü; PKU = 6,2 und Kontrollen = 6,7; C-Wert) und dynamische Balance (Bd; PKU = 4,1 und Kontrollen = 5,4; C-Wert). In den verbleibenden Untertests (LF, Bst, Mrk) ließen sich deutliche, jedoch nicht signifikante Unterschiede feststellen.

In der Nachuntersuchung erzielten die Kontrollprobanden durchschnittlich einen MQ von 115 (Tabelle 9) und konnten somit im Vergleich zur Voruntersuchung (MQ = 116) ihre Gesamtleistung nicht verbessern. Das Ergebnis lag sogar geringfügig darunter, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Dennoch ist zu beachten, dass es bei einigen Untertests (Tabelle 10) zu deutlichen Leistungsunterschieden kam. So verbesserten sich die Kontrollprobanden bei der motorisch rhythmischen Koordinationsübung (Mrk) von 4,5 auf 5,6 Punkte (C-Wert), verschlechterten sich aber bei der dynamischen Balance von 5,4 auf 4,0 Punkte.

Bei den PKU-Patienten ist eine signifikante Steigerung bezüglich der Gesamtleistung erkennbar. Der motorische Quotient (MQ) verbesserte sich bei ihnen von ursprünglich 107 in der Voruntersuchung auf 115 in der Nachuntersuchung ( $p = 0,011$ ). Auch innerhalb der Untertests sind deutliche, teils signifikante Leistungssteigerungen erkennbar. Die größten Unterschiede sind bei den Münzen (Mü, von 6,2 auf 7,9 Punkte) und der motorisch-

rhythmischen Koordination (MrK, von 3,9 auf 5,2 Punkte) zu verzeichnen. Geringfügige Verschlechterungen zeigten sich bei den Tests Labyrinth Zeit (LZ) und statische Balance (Bst).

Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ließen sich in der Nachuntersuchung weder in Bezug auf die Gesamtleistung (MQ) noch auf die Untertests feststellen. Somit erzielten beide Gruppen in der Nachuntersuchung vergleichbar gute Ergebnisse.

## 11.5 Visuell evozierte Potentiale

Die Latenzen P100 der PKU-Patienten in der Voruntersuchung waren im Durchschnitt bei allen Mustergrößen signifikant länger als die der Kontrollgruppe (Tabelle 5). Das bedeutet, dass es bei PKU-Patienten länger dauert, bis ein Lichtreiz der Retina zur okzipitalen Sehrinde gelangt, als bei Stoffwechselgesunden. Der größte Unterschied zeigte sich bei der Mustergröße 5 Winkelminuten; hier betrug die Differenz 9,8 ms (PKU-Patienten: P100 = 133,9 ms, Kontrollgruppe: P100 = 124,1 ms;  $p = 0,000017$ ). Die geringsten Unterschiede waren bei den Mustergrößen 10 (Differenz = 3,1 ms;  $p = 0,046$ ) und 30 Winkelminuten (Differenz = 3,0 ms;  $p = 0,018$ ) zu verzeichnen.

Die Latenzen P100 der PKU-Patienten verkürzten sich nach der 90tägigen Behandlungszeit (DHA 15 mg/kgKG/d) im Durchschnitt bei allen Mustergrößen (Tabelle 6). Das heißt, dass es zu einer beschleunigten Reizleitung kam. Signifikanzniveau wurde bei den Mustergrößen 5 Winkelminuten (P100 Voruntersuchung: 133,0 ms, P100 Nachuntersuchung: 129,4 ms;  $p = 0,013$ ) und 15 Winkelminuten (P100 Voruntersuchung: 117,7 ms, P100 Nachuntersuchung: 116,5 ms;  $p = 0,014$ ) erreicht. Die Verkürzungen bei den Mustergrößen 10 und 30 Winkelminuten waren nicht signifikant. Die P100-Latenzen der Kontrollprobanden, die an der Nachuntersuchung teilnahmen (Tabelle 7), zeigten sich im Vergleich zu der Voruntersuchung dagegen nahezu unverändert. Es kam zu diskreten Verlängerungen der Latenzen bei 5, 10 und 15 Winkelminuten und zu geringfügigen Verkürzungen bei 30 Winkelminuten. Diese waren jedoch nicht signifikant.

## 11.6 Tabellen und Diagramme

### 11.6.1 P100-Latenzen: PKU-Patienten und Kontrollprobanden in der Voruntersuchung

VEP Winkelminuten	P100 (ms) Patienten			P100 (ms) Kontrollen			p (one tail)
	Mittel	SEM	n	Mittel	SEM	n	
5'	133,9	1,6	30	124,1	1,3	24	0,000017
10'	119,6	1,2	22	116,5	1,3	19	0,046
15'	117,6	1,3	22	112,9	1,2	19	0,0059
30'	112,5	1,0	31	109,5	1,0	26	0,018

Tabelle 5: P100-Latenzen visuell evozierter Potentiale bei PKU-Patienten und gesunden, gleichaltrigen Kontrollprobanden in der Voruntersuchung.

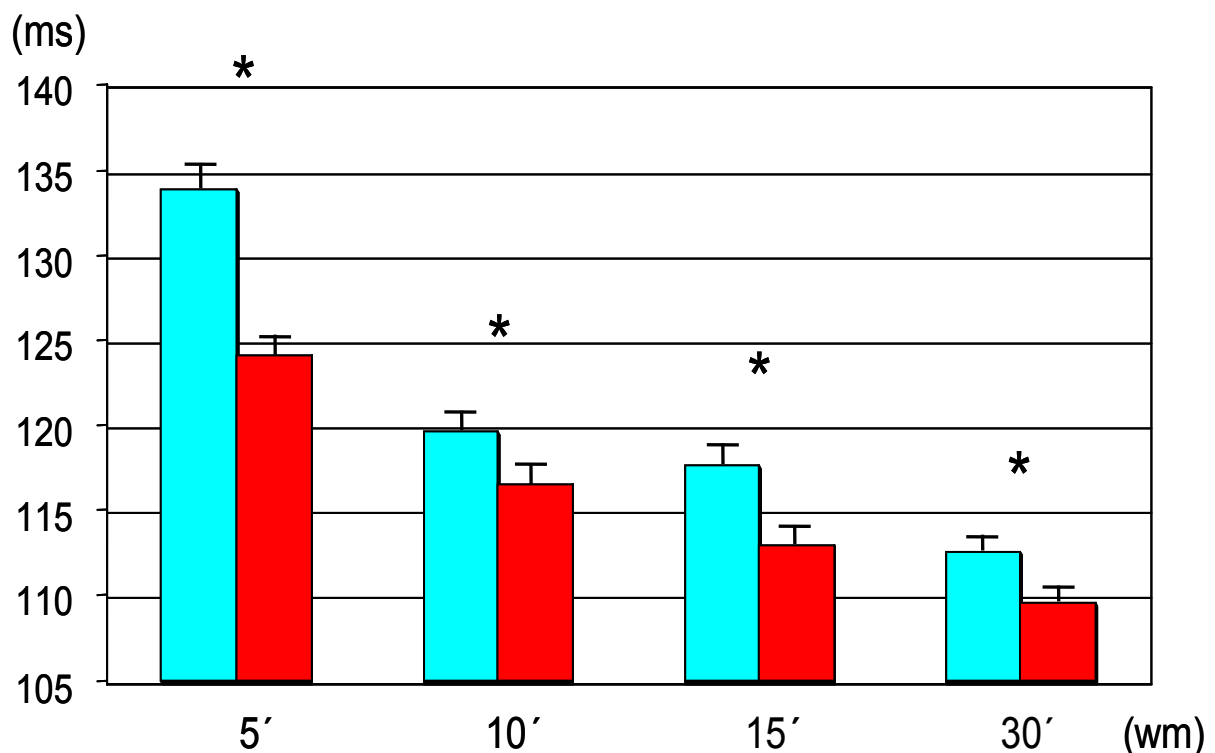


Diagramm 1: P100-Latenzen der PKU-Patienten und Kontrollprobanden in der Voruntersuchung.

■ PKU-Patienten      ■ Kontrollprobanden      (\*  $p < 0,05$ )



### 11.6.2 P100-Latenzen: PKU-Patienten in der Vor- und Nachuntersuchung

VEP Winkelminuten	5'		10'		15'		30'		Plasmaphenylalanin (mg/dl)	
n	26		22		21		30		30	
P100 (ms) Patienten	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM
Voruntersuchung	133,0	1,4	119,6	1,2	117,7	1,4	112,3	1,0	4,43	0,24
Nachuntersuchung	129,4	1,2	118,2	1,4	116,5	1,4	111,4	1,3	4,51	0,35
p (one tail)	0,013		0,16		0,014		0,17		0,40	

Tabelle 6: P100-Latenzen visuell evozierter Potentiale und Phenylalaninkonzentrationen im Plasma vor und nach 3monatiger Supplementierung mit Fischöl. Nur PKU-Patienten, die sowohl an der Vor- als auch an der Nachuntersuchung teilgenommen haben.

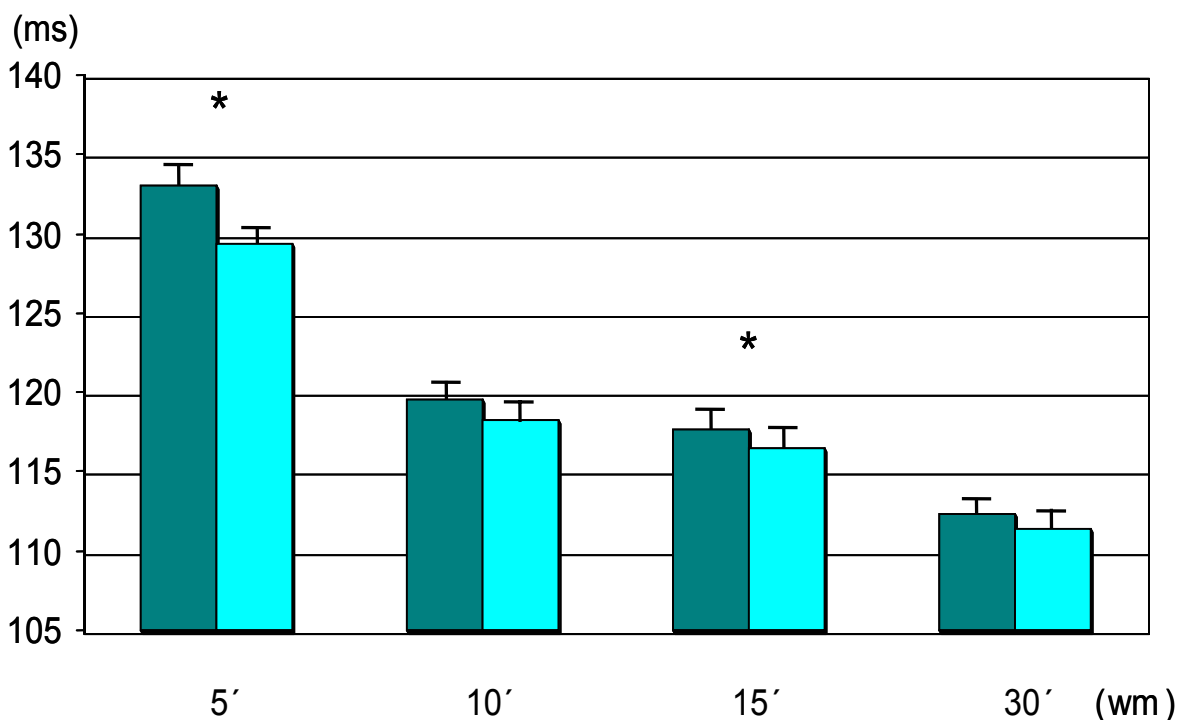


Diagramm 2: P100-Latenzen der PKU-Patienten in der Vor- und Nachuntersuchung.

■ Voruntersuchung      ■ Nachuntersuchung      (\*  $p < 0,05$ )

### 11.6.3 P100-Latenzen: Kontrollprobanden in der Vor- und Nachuntersuchung

VEP Winkelminuten	5'		10'		15'		30'	
n	9		12		12		12	
P100 (ms) Kontrollen	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM
Voruntersuchung	126,7	3,0	117,8	1,7	113,2	1,7	109,8	1,9
Nachuntersuchung	127,5	2,2	118,2	1,6	114,0	1,8	109,4	1,7
p	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	

Tabelle 7: P100-Latenzen aller Kontrollprobanden, die sowohl an der Vor- als auch an der Nachuntersuchung teilgenommen haben.

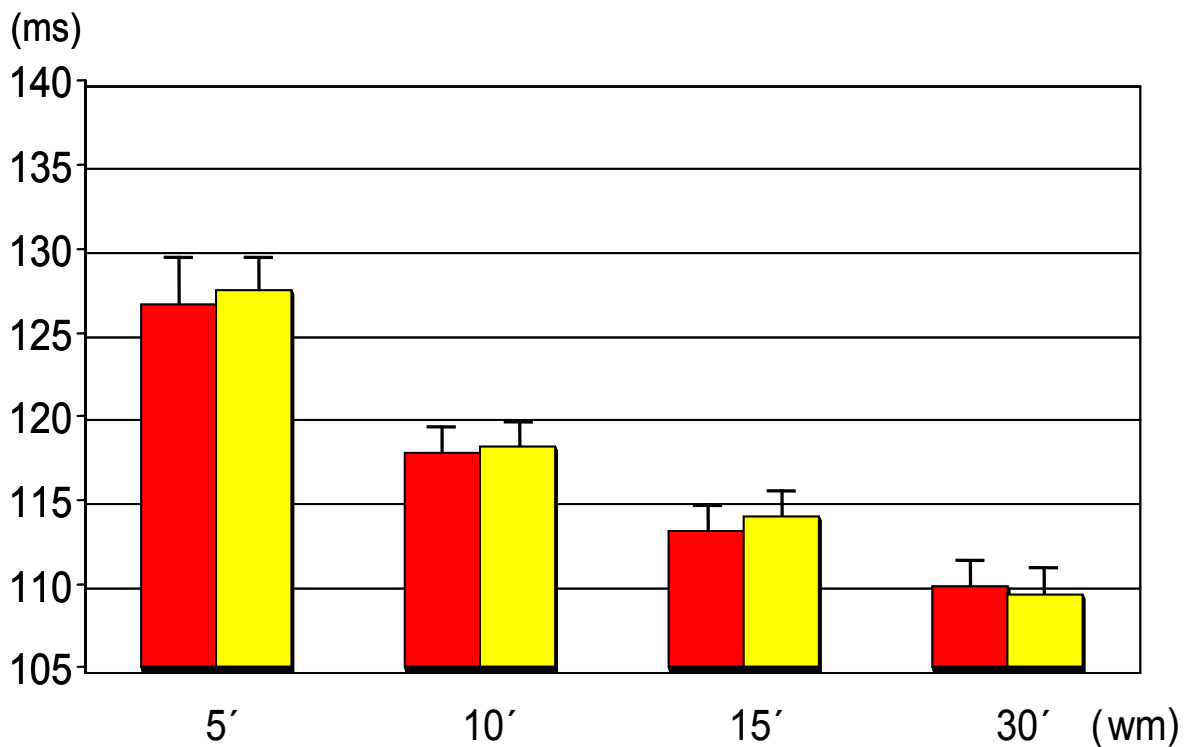


Diagramm 3: P100-Latenzen der Kontrollprobanden in der Vor- und Nachuntersuchung.

■ Voruntersuchung      ■ Nachuntersuchung

#### 11.6.4 ROS: PKU-Patienten und Kontrollprobanden in der Voruntersuchung

	C-Werte PKU n = 24	C-Werte Kontrollen n = 22	p (ANOVA)
Münzen (Mü)	6,2 ± 0,4	7,4 ± 0,5	0,061
Labyrinth Zeit (LZ)	8,1 ± 0,5	7,4 ± 0,4	n.s.
Labyrinth Fehler (LF)	4,7 ± 0,4	6,1 ± 0,4	0,030
dynamische Balance (Bd)	4,1 ± 0,5	5,5 ± 0,5	0,042
statische Balance (Bst)	6,0 ± 0,5	6,9 ± 0,5	n.s.
motorisch-rhythmische Koordination (MrK)	3,9 ± 0,5	4,9 ± 0,6	n.s.
CGes	33,0 ± 1,3	38,2 ± 1,4	0,009
MQ	107 ± 3,25	119 ± 3,54	0,010

Tabelle 8: Ergebnisse bei der ROS in der Voruntersuchung: PKU-Patienten und Kontrollprobanden.

11.6.5 ROS: MQ-Werte der Patienten- und Kontrollgruppe in der Vor- und Nachuntersuchung

	PKU (n = 24)		Kontrollen (n = 11)	
	Vorunter- suchung	Nachunter- suchung	Vorunter- suchung	Nachunter- suchung
MQ	107 ± 3,25	115 ± 3,54	116 ± 3,96	115 ± 5,16
<i>p</i> (MANOVA)	0,027			
<i>p</i> (paired <i>t</i> -test)	0,011		n.s.	

Tabelle 9: motorische Quotienten (MQ) aller PKU-Patienten und Kontrollprobanden, die sowohl an der Voruntersuchung als auch an der Nachuntersuchung teilgenommen haben.

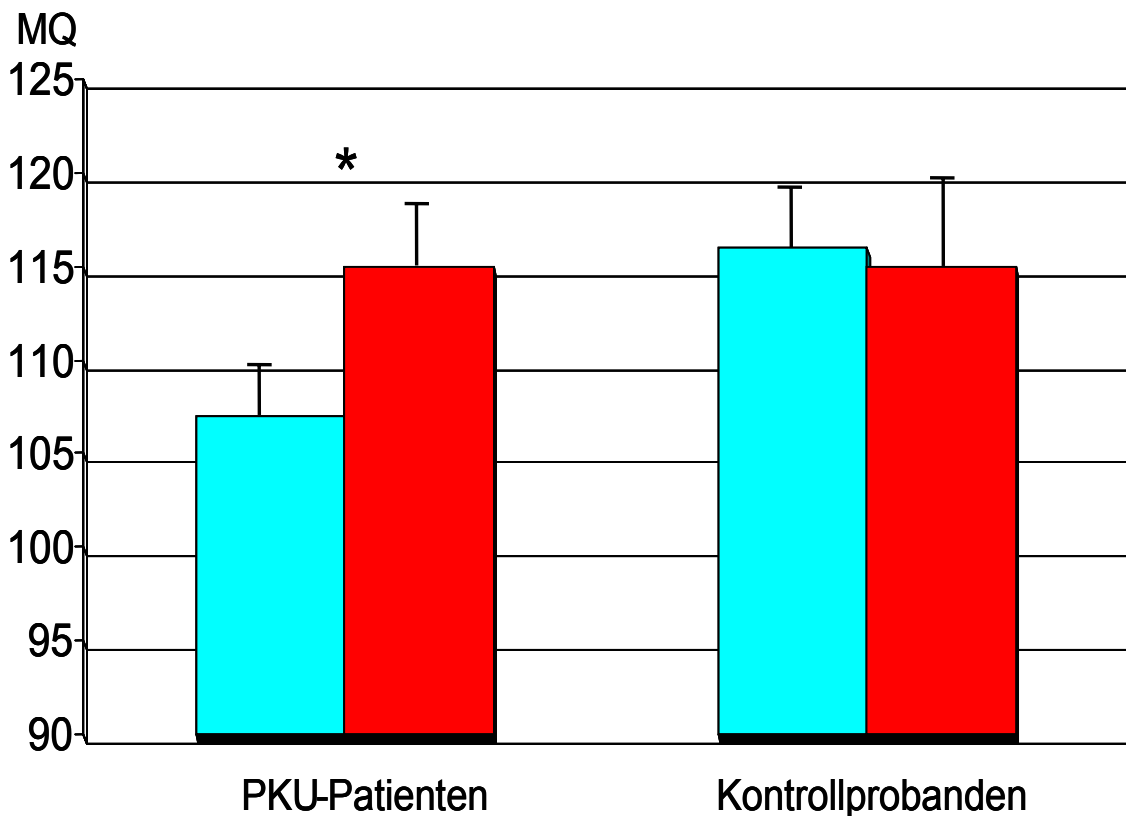


Diagramm 4: motorische Quotienten (MQ) bei PKU-Patienten und Kontrollprobanden in der Vor- und Nachuntersuchung.

■ Voruntersuchung     
 ■ Nachuntersuchung     
 (\*  $p < 0,05$ )

### 11.6.6 ROS: C-Werte der Patienten- und Kontrollgruppe in der Vor- und Nachuntersuchung

		C-Werte PKU n = 24	C-Werte Kontrollen n = 11	p (MANOVA)
Münzen (Mü)	Voruntersuchung	6,2 ± 0,4	6,7 ± 0,9	0,046
	Nachuntersuchung	7,9 ± 0,4	7,1 ± 0,5	
Labyrinth Zeit (LZ)	Voruntersuchung	8,1 ± 0,5	8,1 ± 0,6	n.s.
	Nachuntersuchung	7,5 ± 0,5	8,6 ± 0,7	
Labyrinth Fehler (LF)	Voruntersuchung	4,7 ± 0,4	5,7 ± 0,7	n.s.
	Nachuntersuchung	5,0 ± 0,5	5,1 ± 0,8	
dynamische Balance (Bd)	Voruntersuchung	4,1 ± 0,5	5,4 ± 0,8	0,004
	Nachuntersuchung	4,7 ± 0,4	4,0 ± 0,7	
statische Balance (Bst)	Voruntersuchung	6,0 ± 0,5	6,5 ± 0,9	n.s.
	Nachuntersuchung	5,9 ± 0,4	5,8 ± 1,0	
motorisch-rhythmische Koordination (MrK)	Voruntersuchung	3,9 ± 0,5	4,5 ± 0,6	n.s.
	Nachuntersuchung	5,2 ± 0,5	5,6 ± 0,6	
CGes	Voruntersuchung	33,0 ± 1,3	36,8 ± 1,6	0,03
	Nachuntersuchung	36,2 ± 1,4	36,2 ± 2,2	

*Tabelle 10: C-Werte der ROS bei jenen PKU-Patienten und Kontrollprobanden, die sowohl an der Voruntersuchung als auch an der Nachuntersuchung teilgenommen haben.*

### 11.6.7 Plasmafettsäuren der PKU-Patienten in der Vor- und Nachuntersuchung

n= 35			Vor- untersuchung	Nach- untersuchung	Mean change	p (paired t-test)	
gesättigte FS		14:0	0,34 ± 0,02	0,33 ± 0,01	- 0,01 ± 0,08	n.s.	
		16:0	25,73 ± 0,27	25,63 ± 0,16	- 0,14 ± 1,6	n.s.	
		18:0	15,6 ± 0,24	15,25 ± 0,15	- 0,43 ± 1,16	0,04	
		20:0	0,54 ± 0,02	0,57 ± 0,02	+ 0,03 ± 0,12	n.s.	
		22:0	1,43 ± 0,05	1,48 ± 0,04	+ 0,05 ± 0,27	n.s.	
		24:0	1,3 ± 0,05	1,38 ± 0,04	+ 0,08 ± 0,23	0,04	
		total	44,93 ± 0,32	44,63 ± 0,14			
einfach ungesättigte FS		16:1n7	0,43 ± 0,03	0,35 ± 0,02	- 0,08 ± 0,13	0,001	
		18:1n9	9,48 ± 0,34	8,53 ± 0,26	- 0,99 ± 1,71	0,002	
		18:1n7	1,19 ± 0,05	1,20 ± 0,04	+ 0,02 ± 0,19	n.s.	
		20:1n9	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,01	- 0,03 ± 0,05	0,003	
		20:3n9	0,21 ± 0,02	0,13 ± 0,01	- 0,09 ± 0,1	<0,001	
		22:1n9	0,10 ± 0,01	0,17 ± 0,02	+ 0,06 ± 0,11	0,002	
		24:1n9	2,23 ± 0,08	2,63 ± 0,08	+ 0,41 ± 0,47	<0,001	
		total	13,62 ± 0,42	13,05 ± 0,32			
n-6-PUFA	(Linolsäure)	18:2n6	21,47 ± 0,57	18,37 ± 0,54	- 2,97 ± 3,06	< 0,001	
	(AA)	18:3n6	0,12 ± 0,01	0,07 ± 0,01	- 0,05 ± 0,07	<0,001	
		20:2n6	0,35 ± 0,01	0,28 ± 0,01	- 0,07 ± 0,08	<0,001	
		20:3n6	3,35 ± 0,12	2,20 ± 0,08	- 1,13 ± 0,68	<0,001	
		20:4n6	<b>9,26 ± 0,23</b>	<b>6,76 ± 0,16</b>	- 2,41 ± 1,15	<0,001	
		22:2n6	0,56 ± 0,02	0,63 ± 0,02	+ 0,07 ± 0,11	0,001	
		22:4n6	0,58 ± 0,02	0,20 ± 0,01	- 0,37 ± 0,11	<0,001	
		22:5n6	0,50 ± 0,03	0,15 ± 0,01	- 0,34 ± 0,14	<0,001	
		total	36,19 ± 0,49	28,66 ± 0,50	- 7,27 ± 3,0	<0,001	
n-3-PUFA	(α-Linolensäure)	18:3n3	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01	- 0,0 ± 0,10	n.s.	
	(EPA)	18:4n3	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	- 0,0 ± 0,03	n.s.	
		20:3n3	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00	- 0,01 ± 0,04	n.s.	
		20:5n3	<b>0,4 ± 0,03</b>	<b>3,31 ± 0,19</b>	+ 2,86 ± 1,08	<0,001	
		22:5n3	0,94 ± 0,04	1,82 ± 0,06	+ 0,86 ± 0,31	<0,001	
		(DHA)	22:6n3	<b>2,37 ± 0,10</b>	<b>7,05 ± 0,24</b>	+ 4,64 ± 1,21	<0,001
			total	3,95 ± 0,15	12,42 ± 0,45	+ 8,34 ± 2,26	<0,001

Tabelle 11: Plasmafettsäuren (% wt/wt, Phospholipidfraktion) bei PKU-Patienten vor und nach 90-tägiger Supplementierung mit Fischöl. AA = Arachidonsäure, EPA = Eicosapentaensäure, DHA = Docosahexaensäure. Deutlich fällt bei der Nachuntersuchung eine Verschiebung zu Lasten der n-6-PUFA und zu Gunsten der n-3-PUFA (insbesondere EPA und DHA) auf.

## **11.7 Erfassung der globalen Verträglichkeit**

In einem Fragebogen wurde die subjektive Verträglichkeit der Fischölkapseln ermittelt. Von den 36 Patienten, die das Studienprotokoll erfolgreich beendeten, vertrugen demnach 30 Patienten (83 %) die Kapseln sehr gut, 4 gut und 2 mäßig. Auf der 5stufigen Skala wurde von keinem der Patienten die Verträglichkeit als schlecht oder sehr schlecht bewertet.

## **11.8 Unerwartete Ereignisse (UE) und Arzneimittelwirkung (UAW)**

Während der Studiendauer wurde von 5 Patienten über eine einmalige Episode akuter Durchfallssymptomatik berichtet. Das Beschwerdebild war jeweils von kurzer Dauer, sodass die Studie bei diesen Patienten nicht abgebrochen werden musste. Anschließend wurde von keinem dieser Patienten über weitere Durchfallepisoden berichtet. Da zudem in jedem Fall gleichzeitig mindestens ein weiteres Familienmitglied von ähnlichen Beschwerden betroffen war, ist ein Zusammenhang mit der Einnahme der Fischölkapseln unwahrscheinlich.

Bei einem Patienten trat zu Beginn der Studie für wenige Tage leichte Übelkeit nach Einnahme der Kapseln auf, die aber nach einigen Tagen spontan sistierte. Auch dieser Patient konnte die Studie unverändert fortsetzen.

## 12 DISKUSSION

### 12.1 Methodik

Grundsätzlich wäre es wünschenswert gewesen, die Untersuchungen Placebo-kontrolliert durchzuführen. Aufgrund der limitierten Anzahl an PKU-Patienten, die unter Berücksichtigung der Einschluss- und Ausschlusskriterien über das Dr. von Haunersche Kinderspital verfügbar waren, fiel die Entscheidung jedoch zugunsten einer offenen, kontrollierten Pilotstudie im Sinne eines Therapiever suches. Zudem wäre wegen der leicht erkennbaren Geruchs- und Geschmackseigenschaften der Fischölkapseln eine Placebo-kontrollierte Studie schwer zu realisieren gewesen.

Um eine möglichst hohe Objektivität während der Untersuchungen zu gewährleisten, wurde besonders darauf geachtet, die Bedingungen für jeden einzelnen Teilnehmer in den Vor- und Nachuntersuchungen gleich zu halten. So wurde stets im selben Raum untersucht, die Versuchsaufbauten genau ausgemessen und nach Möglichkeit die Nachuntersuchung zur selben Tageszeit durchgeführt wie die Voruntersuchung. Die Untersuchungsräume für die Messung der visuell evozierten Potentiale und die Durchführung der Rostock-Oseretzky-Skala wurden zunächst abgedunkelt. Zusätzlich kamen künstliche Lichtquellen zum Einsatz, um ideale Lichtverhältnisse zu gewährleisten. Da bei der Durchführung der Rostock-Oseretzky-Skala auch die Art und Weise der Instruktion einen Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse haben kann, wurde besonders darauf geachtet, die Anweisungen für jeden Teilnehmer gleich zu halten. Dazu wurde ein schriftlich verfasster Text verlesen. Bei Nachfragen wurde zunächst noch einmal der Text vorgelesen, danach individuell geantwortet. Die Aufbereitung und Analyse der Plasmafettsäuren sowie die Auswertung der visuell evozierten Potentiale erfolgte verblindet. So konnte einer bewussten oder unbewussten Manipulation der Ergebnisse vorgebeugt werden.



## 12.2 Rostock-Oseretzky-Skala

In der Voruntersuchung zeigten die Kontrollprobanden deutlich bessere Ergebnisse als die PKU-Patienten. Der motorische Quotient (MQ) belief sich bei den PKU-Patienten auf 107 und bei den Kontrollprobanden, die anschließend auch an der Nachuntersuchung teilnahmen auf 116. Damit lagen die PKU-Patienten signifikant hinter den Kontrollprobanden. Dennoch erzielten beide Gruppen in der Voruntersuchung ein überdurchschnittlich hohes Ergebnis. Dies kann unterschiedliche Gründe haben. Die Referenzwerte mit einem durchschnittlichen MQ von 100 basieren auf Untersuchungen, die von Kurth 1978 durchgeführt wurden. Möglicherweise trägt die zunehmende Technologisierung unserer Gesellschaft dazu bei, dass die Studienteilnehmer beispielsweise Reaktions- und Schnelligkeitsanfordernde Aufgaben besonders gut lösen.

In den Nachuntersuchungen erzielten beide Gruppen wiederum überdurchschnittliche Ergebnisse. Die Kontrollprobanden erreichten 115 Punkte und die PKU-Patienten ebenfalls 115 Punkte. Drei Aspekte wurden deutlich: 1) Die PKU-Patienten verbesserten sich erheblich um 8 Punkte auf 115 Punkte in der Nachuntersuchung. 2) Die PKU-Patienten erzielten in der Nachuntersuchung dasselbe Ergebnis wie die Kontrollprobanden. 3) Die Kontrollprobanden bestätigten in der Nachuntersuchung das Ergebnis der Voruntersuchung und verbesserten sich somit nicht.

Es stellt sich die Frage, welche Einflüsse bei der Durchführung der Rostock-Oseretzky-Skala eine Rolle gespielt haben, die zu einer Verbesserung der Ergebnisse bei den PKU-Patienten beigetragen haben könnten: beispielsweise Lerneffekte, Placeboeffekte oder physiologische Entwicklungsschritte. Der Parallelgruppenvergleich mit den Kontrollprobanden, deren Werte in der Nachuntersuchung im Vergleich zur Voruntersuchung nahezu unverändert blieben, spricht gegen einen Lerneffekt. Zudem konnte bereits Kurth zeigen, dass Testwiederholungen in einem hohen Maß zu gleich bleibenden Ergebnissen führen [37], und somit die hohe Reliabilität der Testbatterie nachweisen. Einigen PKU-Patienten, und insbesondere den Eltern aller PKU-Patienten war bewusst, dass innerhalb der Studiendauer eine die Leistung möglicherweise steigernde Substanz verabreicht wurde. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Familien bezüglich der Studienanforderungen hoch motiviert waren. So kann ein gewisser Placeboeffekt nicht ausgeschlossen werden. Daher wäre zu überlegen, in einer weiteren, Placebo-kontrollierten, multizentrischen Studie diese Untersuchungen zu wiederholen.

Ein physiologischer Entwicklungsschritt kommt nur sehr bedingt in Frage. Studien belegen zwar, dass die motorischen Fähigkeiten individuell sehr unterschiedlich und in der Regel nicht vor Erreichen der Pubertät ausgereift sind [22, 36]; die vergleichsweise niedrigen MQ-Werte der PKU-Patienten in der Voruntersuchung könnten daher durch eine Entwicklungsverzögerung bedingt sein, und belegen nicht zwangsläufig ein strukturelles Defizit. Allerdings erscheint die Interventionszeit von 3 Monaten zu kurz, um diese deutlich ausgeprägte Verbesserung der motorischen Funktionen allein durch die physiologische fortschreitende psychomotorische Entwicklung zu erklären. Außerdem erfolgt die psychomotorische Entwicklung von Kindern in Schüben mit sehr heterogener Kinetik, in Abhängigkeit vom Lebensalter. Die untersuchten Kinder mit PKU befanden sich in einer Altersspanne von 6 Jahren. Physiologische Sprünge in der psychomotorischen Entwicklung sollten damit ausgeglichen werden und keinen Effekt auf die Untersuchungsergebnisse haben. Damit legen die Ergebnisse dieser Studie unter Berücksichtigung von Signifikanz- und Varianzwerten nahe, dass es sich um ein prinzipielles Defizit bei PKU-Patienten handelt.

### **12.3 Visuell evozierte Potentiale**

Die Ergebnisse dieser Studie belegen des Weiteren eine erhebliche Verzögerung bei der Weiterleitung optischer Signale bei PKU-Patienten unter der herkömmlichen PKU-Diät. Dies ergibt sich aus dem Vergleich mit der Gruppe von Kontrollprobanden, die bei allen getesteten Mustergrößen in der Voruntersuchung signifikant kürzere Latenzen visuell evozierter Potentiale aufwiesen. Die tägliche Supplementierung mit Fischölkapseln über 3 Monate führte bei den PKU-Patienten zu deutlichen Verkürzungen aller P100-Latenzen. Die Verkürzungen der P100-Latenzen waren für die getesteten Mustergrößen 5 Winkelminuten (von 133,0 ms auf 129,4 ms) und 15 Winkelminuten (von 117,7 ms auf 116,5 ms) bei nahezu gleich bleibendem Varianzniveau ( $SEM \leq 1,4$ ) sogar hochsignifikant ( $p \leq 0,014$ ). Die Testergebnisse können also nicht auf einzelne PKU-Patienten mit extremen Unterschieden der P100-Latenzen in der Vor- und Nachuntersuchung zurückgeführt werden. Vielmehr handelt es sich bei den verlängerten P100-Latenzen um ein Defizit, das alle untersuchten PKU-Patienten in einem ähnlichen Ausmaß betrifft. Bei den Kontrollprobanden konnten keine signifikanten Veränderungen gemessen werden. Es wurden geringfügige Verlängerungen bei den Mustergrößen 5, 10 und 15 Winkelminuten verzeichnet und eine diskrete Verkürzung bei 30 Winkelminuten.

Ein physiologischer Entwicklungsschritt kommt bei den PKU-Patienten nur sehr bedingt in Frage. Studien an gesunden Probanden haben gezeigt, dass sich die P100-Latenzen nur innerhalb der ersten beiden Lebensjahre verändern, anschließend jedoch bis ins hohe Alter stabil bleiben [7, 43]. Dagegen spricht zudem der Parallelgruppenvergleich mit den Kontrollprobanden, deren Werte in der Nachuntersuchung im Vergleich zu den Werten in der Voruntersuchung so gut wie unverändert blieben. Aus diesem Grund kann auch ein Lerneffekt praktisch ausgeschlossen werden. Ein Placeboeffekt kommt nicht in Betracht, da es sich bei den Latenzen P100 um ein Korrelat der Nervenleitgeschwindigkeit handelt, also um einen objektiv messbaren Wert, der auf willkürlicher Ebene nicht beeinflussbar ist.

## **12.4 Fettsäuren und Phenylalanin**

Hauptbestandteil der Fischölkapseln Ameu® der Firma Omega (je 500mg) waren die mehrfach ungesättigten Omega-3-Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA, 20:5n-3, 18%) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6n-3, 12%). Die tägliche Dosierung für die PKU-Patienten während der 90tägigen Interventionszeit belief sich auf 15 mg/kgKG DHA. Die Aufbereitung der Plasmafettsäuren erfolgte unmittelbar vor und nach dieser Interventionszeit.

Nach der Interventionszeit konnten deutliche, teilweise signifikante Veränderungen der Zusammensetzung der Plasmafettsäuren beobachtet werden. So verdreifachte sich die Konzentration von DHA von 2,37% auf 7,05% und die Konzentration von EPA stieg um das Achtfache von 0,4% auf 3,31%. Gleichzeitig sank die Konzentration von Arachidonsäure (AA, 20:4n-6) um ein Drittel von 9,26% auf 6,76%, und die von Linolsäure (LA, 18:2n-6) um ein Sechstel von 21,47% auf 18,37%.

Deutlich zu erkennen ist eine Verschiebung zu Lasten der Omega-6-Fettsäuren mit einer Senkung der Konzentration um ein Fünftel von 36,19% auf 28,66% und zugunsten der Omega-3-Fettsäuren mit einer Verdreifachung der Konzentration von 3,95% auf 12,42%. Für alle hier erwähnten Veränderungen gilt Hochsignifikanzniveau. Aus diesen Daten kann auf eine sehr gute Compliance seitens der PKU-Patienten geschlossen werden. Die vollständig zurückgebrachten leeren Medikamentenverpackungen (inklusive aller Blister) bestätigen zusätzlich die gute Compliance.

Wünschenswert wäre ein direkter Vergleich des Plasmafettsäurestatus der PKU-Patienten mit den gesunden Kontrollprobanden gewesen. Dieses Bestreben konnte jedoch bei der

Ethikkommission leider nicht durchgesetzt werden. Es gibt zu diesem Thema bereits verschiedene Studien, allerdings mit teils unterschiedlichen Ergebnissen. Eine in Deutschland durchgeführte Studie [18] zeigt eine Zusammensetzung von Plasmalipiden bei gesunden Probanden, die sich im Rahmen der in dieser Studie gemessenen Konzentrationen der PKU-Patienten in der Voruntersuchung bewegt. Im Vergleich dazu zeigen andere Studien [23, 52] bei PKU-Patienten niedrige Konzentrationen für n-3-PUFA, insbesondere für DHA und EPA, und relativ hohe Konzentrationen für n-6-PUFA, insbesondere für AA. Diese Studien wurden nicht in Deutschland durchgeführt. Es ist fraglich, ob sie sich deshalb für einen direkten Vergleich eignen, da bekannt ist, dass verschiedene Ernährungsgewohnheiten unterschiedlicher Bevölkerungsgruppen zu unterschiedlichen Zusammensetzungen der Plasmafettsäuren führen können. Ein hoher Gehalt an Olivenöl in der Nahrung mit seinem hohen Anteil an n-6-Fettsäuren und einem relativ niedrigen Anteil an n-3-Fettsäuren kann beispielsweise eine deutliche Verschiebung der Plasmaphospholipide in Richtung n-6-Fettsäuren bewirken. Für eine objektive Beurteilung sollte deshalb im Rahmen einer Studie eine direkte Vergleichsmessung der Plasmafettsäuren zwischen PKU-Patienten und gesunden Probanden angestrebt werden.

Erhöhte Phenylalaninkonzentrationen im Blutplasma haben eine negative Wirkung auf zentralnervöse Funktionen, wie zum Beispiel die Konzentrationsfähigkeit und die Aufmerksamkeitsspanne [13, 54]. Diese Fähigkeiten stehen mit den untersuchten Parametern dieser Studie in engem Zusammenhang. Ein wichtiges Einschlusskriterium für die Studie war daher die sehr gute Stoffwechseleinstellung der PKU-Patienten mit einer Plasmaphenylalaninkonzentration von durchschnittlich  $<6$  mg/dl ( $360 \mu\text{mol/l}$ ) über die vorausgehenden 6 Monate vor der Erstuntersuchung. Auch während der Studie wurden die Phenylalaninkonzentrationen im Plasma in durchschnittlich 14tägigen Abständen überprüft. So sollte vermieden werden, dass diätetisch ungünstig eingestellte PKU-Patienten durch ein kurzfristig verbessertes Therapieverhalten nach der Voruntersuchung die Ergebnisse der Nachuntersuchung verfälschen [54, 55]. Die mittleren Phenylalanintoleranzen der PKU-Patienten und die Phenylalaninkonzentrationen im Plasma blieben während der Interventionszeit konstant. Ein verfälschender Einfluss auf die erhobenen Daten kann somit ausgeschlossen werden und die Ergebnisse sind mit der Interventionstherapie in Zusammenhang zu bringen.

## 13 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Nach Durchführung dieser Studie kann folgendes festgestellt werden:

- 1) Kinder mit PKU im Alter von 1-11 Jahren, die bislang konsequent mit der herkömmlichen, phenylalaninarmen Diät behandelt wurden, zeigen im Vergleich zu einer gleichaltrigen, gesunden Population signifikant verlängerte Latenzen visuell evozierter Potentiale. Das bedeutet eine deutliche Verzögerung bei der Weiterleitung optischer Signale im Zentralen Nervensystem.
- 2) Nach einer 90tägigen, zusätzlichen Intervention mit Fischölkapseln (15 mg/kgKG Docosahexaensäure (DHA) pro Tag) verkürzten sich die Latenzen der PKU-Patienten deutlich, teilweise sogar hochsignifikant. Eine völlige Normalisierung konnte jedoch nicht erreicht werden. Physiologische Entwicklungsschritte und Lerneffekte konnten aufgrund gleich bleibender Ergebnisse bei den Kontrollprobanden ausgeschlossen werden. Auch Placeboeffekte können bei der Messung visuell evozierter Potentiale nahezu ausgeschlossen werden.
- 3) Bei diesen PKU-Patienten konnte nach der Interventionszeit eine deutliche, teilweise signifikante Veränderung bezüglich der Zusammensetzung der Plasmaphospholipide festgestellt werden: die Konzentration von Docosahexaensäure verdreifachte sich, ebenso die Konzentration der Gesamt-n-3-PUFA. Gleichzeitig sank die Konzentration von Arachidonsäure um ein Drittel und die der n-6-PUFA um ein Fünftel.
- 4) Kinder mit PKU im Alter von 5-11 Jahren aus demselben Kollektiv zeigen im Vergleich zu einer gleichaltrigen, gesunden Population deutliche, teilweise signifikante Defizite im psychomotorischen Bereich.
- 5) Nach der 90tägigen Behandlungszeit mit DHA konnten diese PKU-Patienten ihre Leistungen im psychomotorischen Bereich deutlich, teilweise sogar signifikant steigern. Die Untersuchungsergebnisse sind nach der Intervention mit denen der gesunden Population vergleichbar. Ein Lerneffekt oder ein physiologischer Entwicklungsschritt konnte aufgrund gleich bleibender Ergebnisse bei den Kontrollprobanden ausgeschlossen werden. Ein Placeboeffekt könnte eine Rolle gespielt haben. Weiterführende, Placebo-kontrollierte Studien wären daher wünschenswert.

Nach der 90tägigen Interventionszeit mit Fischölkapseln (15 mg/kgKG/d DHA) konnten erhebliche Leistungssteigerungen bei PKU-Patienten beobachtet werden. Die P100-Latenzen visuell evozierter Potentiale verkürzten sich bei allen getesteten Mustergrößen, bei den Mustergrößen 5 und 15 Winkelminuten sogar signifikant. Bei der Untersuchung von Motorik und Feinmotorik (ROS) konnten sich die PKU-Patienten ebenfalls deutlich, teils signifikant verbessern. Die Konzentration von DHA im Blutplasma der PKU-Patienten erhöhte sich ebenfalls signifikant. Klinisch spricht diese Studie daher eindeutig für einen positiven Einfluss von DHA bei PKU-Patienten. Diverse Untersuchungen untermauern zudem einen positiven Effekt mittel- und langfristiger Substituierung von LC-PUFA, insbesondere von DHA, auf die visuelle Reizübertragung [4] und auf somatomotorisch evozierte Potentiale [39]. In einer anderen Studie konnte ein pro-myelinisierenden Effekt von DHA bei generalisierten, peroxisomalen Erkrankungen nachgewiesen werden [42].

Sinnvoll wäre es, in weiteren Untersuchungen die Ergebnisse der vorliegenden Studie zu verifizieren. Hierzu wäre ein größer und längerfristig angelegter, multizentrischer Parallelgruppenvergleich zwischen betroffenen Patienten und einer gesunden Population wünschenswert. Zudem sollte überlegt werden, den DHA-Gehalt in künftigen Studien auch in anderen relevanten Kompartimenten zu messen. Plasmaproben eignen sich ideal für die Beurteilung einer kurz- bis mittelfristigen Substitution von Fettsäuren, wie sie in dieser Studie durchgeführt wurde. Um eine längerfristige Applikation von DHA umfassender bewerten zu können, wären beispielsweise Analysen von Erythrozytenmembranen möglich.

Weiterhin wären Untersuchungen hinsichtlich Applikation und langfristiger Dosierung von DHA notwendig. Die in dieser Studie verabreichte Konzentration ist auf Dauer zu hoch, da sich unter anderem unerwünschte Imbalancen im n-6-Fettsäurestoffwechsel und hier insbesondere im Stoffwechsel der Arachidonsäure einstellen. Da Arachidonsäure Substrat der Prostaglandin- und Leukotriensynthese ist, die bei entzündlichen Prozessen eine wichtige Rolle einnehmen, sollte die Konzentration im Bereich Stoffwechselgesunder verbleiben und sich nicht wie in dieser Studie signifikant verringern. Alternativ wäre eine zusätzliche Substitution mit Arachidonsäure möglich.

Auch die Darreichungsform der n-3-PUFA könnte überdacht werden. Fischölkapseln, wie sie in dieser Studie zusätzlich zur PKU-Diät verabreicht wurden, komplizieren die Therapie, was sich möglicher Weise negativ auf die Compliance der Patienten auswirkt: die Kapseln sind sehr groß, was zu Schwierigkeiten bei der Verabreichung insbesondere bei den sehr jungen Patienten führt. Außerdem sind die Patienten mit PKU durch die Einnahme des

phenylalaninfreien Aminosäuregemisches und der strikten eiweißarmen Diät schon enorm belastet. Ideal wäre es, die Fettsäuren microverkapselt dem üblichen, phenylalaninfreien Aminosäuregemisch zuzusetzen. Lebensmitteltechnologisch wäre dies bereits möglich.

Über langfristige Effekte einer zusätzlichen DHA-Substitution kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. In einer anderen Studie wurde bereits von einer vollständigen Normalisierung von VEP-Latenzen bestimmter Mustergrößen bei PKU-Patienten nach Gabe von DHA berichtet [4]. Dies spricht für einen anhaltenden Effekt von DHA.

Im Ergebnis belegt diese Studie eindeutig den positiven Effekt einer zusätzlichen DHA-Supplementierung bei PKU-Patienten. Weiterführende Studien sollten daher unbedingt durchgeführt werden.

## 14 LITERATURVERZEICHNIS

1. Acosta PB, Fernhoff PM, Warshaw HS, et al. Zinc status and growth of children undergoing treatment for phenylketonuria. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 1982;5:107-110.
2. Acosta PB, Stepnick-Gropper S, Clarke-Sheehan N, et al. Trace element status of PKU children ingesting an elemental diet. *Jpen: Journal of Parenteral & Enteral Nutrition* 1987;11:287-292.
3. Adrian E.D., Matthews B.H.C.: The Berger rhythm: Potential changes from the occipital lobes in man. *Brain* 57: 356 (1934)
4. Agostoni C, Massetto N, Biasucci G, et al. Effects of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on fatty acid status and visual function in treated children with hyperphenylalaninemia. *Journal of Pediatrics* 2000;137:504-509.
5. Arnold GL, Kramer BM, Kirby RS, et al. Factors affecting cognitive, motor, behavioral and executive functioning in children with phenylketonuria. *Acta Paediatrica* 1998;87:565-570
6. Artuch R, Vilaseca MA, Moreno J, Lambruschini N, Cambra FJ, Campistol J. Decreased serum ubiquinone-10 concentrations in phenylketonuria. *American Journal of Clinical Nutrition* 1999;70:892-895.
7. Aso K, Watanabe K, Negoro T, et al. Developmental changes of pattern reversal visual evoked potentials. *Brain & Development* 1988;10:154-159.
8. Bick U, Fahrendorf G, Ludolph AC, Vassallo P, Weglage J, Ullrich K. Disturbed myelination in patients with treated hyperphenylalaninaemia: evaluation with magnetic resonance imaging. *Eur J Pediatr* 1991;150:185-189.



9. Bick U, Ullrich K, Stober U, et al. White matter abnormalities in patients with treated hyperphenylalaninaemia: magnetic resonance relaxometry and proton spectroscopy findings. *Eur J Pediatr* 1993;152:1012-1020.
10. Birch EE, Garfield S, Hoffman DR, Uauy R, Birch DG. A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. *Developmental Medicine & Child Neurology* 2000;42:174-181.
11. Birch EE, Hoffman DR, Uauy R, Birch DG, Prestidge C. Visual acuity and the essentiality of docosahexaenoic acid and arachidonic acid in the diet of term infants. *Pediatric Research* 1998;44:201-209.
12. Bodley JL, Austin VJ, Hanley WB, Clarke JT, Zlotkin S. Low iron stores in infants and children with treated phenylketonuria: a population at risk for iron-deficiency anaemia and associated cognitive deficits. *Eur J Pediatr* 1993;152:140-143.
13. Burgard P, Rey F, Rupp A, Abadie V, Rey J. Neuropsychologic functions of early treated patients with phenylketonuria, on and off diet: results of a cross-national and cross-sectional study. *Pediatric Research* 1997;41:368-374.
14. Burgard P, Schmidt E, Rupp A, Schneider W, Bremer HJ. Intellectual development of the patients of the German Collaborative Study of children treated for phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1996;155 Suppl 1:S33-38.
15. Carlson SE, Cooke RJ, Werkman SH, Tolley EA. First year growth of preterm infants fed standard compared to marine oil n-3 supplemented formula. *Lipids* 1992;27:901-907.
16. Chen Y, Houghton LA, Brenna JT, Noy N. Docosahexaenoic acid modulates the interactions of the interphotoreceptor retinoid-binding protein with 11-cis-retinal. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:20507-20515.
17. Dahl G. Zur Berechnung des Schwierigkeitsindex bei quantitativ abgestufter Aufgabenbewertung. *Diagnostica* 1971;17:139-142

18. Decsi T, Koletzko B. Fatty acid composition of plasma lipid classes in healthy subjects from birth to young adulthood. *European Journal of Pediatrics* 1994;153:520-525
19. Decsi T, Koletzko B. Role of long-chain polyunsaturated fatty acids in early human neurodevelopment. *Nutritional Neuroscience* 2000;3:293-306
20. Deutsche Gesellschaft für das Neugeborenen-Screening auf endokrine und metabolische Störungen
21. Deutsche Gesellschaft für Ernährung. DGE-Ernährungsbericht 1996. 1996;
22. Forssberg H, Eliasson AC, Kinoshita H, Johansson RS, Westling G. Development of human precision grip. I: Basic coordination of force. *Exp Brain Res* 1991;85:451-457
23. Galli C, Agostoni C, Mosconi C, Riva E, Salari PC, Giovannini M. Reduced plasma C-20 and C-22 polyunsaturated fatty acids in children with phenylketonuria during dietary intervention. *Journal of Pediatrics* 1991;119:562-567.
24. Gropper SS, Acosta PB, Clarke-Sheehan N, et al. Trace element status of children with PKU and normal children. *Journal of the American Dietetic Association* 1988;88:459-465.
25. Gutjahr W. Die Messung psychischer Eigenschaften. Berlin 1971
26. Heird WC, Prager TC, Anderson RE. Docosahexaenoic acid and the development and function of the infant retina. *Current Opinion in Lipidology* 1997;8:12-16.
27. Horwitz RI, Horwitz SM. Adherence to treatment and health outcomes. *Archives of Internal Medicine* 1993;153:1863-1868.
28. Jones SJ, Turano G, Kriss A, Shawkat F, Kendall B, Thompson AJ. Visual evoked potentials in phenylketonuria: association with brain MRI, dietary state, and IQ. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 1995;59:260-265.

29. Koch R, Azen C, Friedman EG, Williamson ML. Paired comparisons between early treated PKU children and their matched sibling controls on intelligence and school achievement test results at eight years of age. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 1984;7:86-90.
30. Kolarovic L, Fournier NC: A comparison of extraction methods for the isolation of phospholipids from biological sources. *Analyt Biochem* 1986; 156: 244-250
31. Koletzko B. Lipid supply for infants with special needs. *European Journal of Medical Research* 1997;2:69-73.
32. Koletzko B, Aggett PJ, Bindels JG, et al. Growth, development and differentiation: a functional food science approach. [*British Journal of Nutrition* 1998;80 Suppl 1:S5-45.
33. Koletzko B, Demmelmair H, Hartl W, et al. The use of stable isotope techniques for nutritional and metabolic research in paediatrics. *Early Human Development* 1998;53 Suppl:S77-97.
34. Koletzko B, Rodriguez-Palmero M. Polyunsaturated fatty acids in human milk and their role in early infant development. *Journal of Mammary Gland Biology & Neoplasia* 1999;4:269-284.
35. Koletzko B, Sinclair A. Long-chain polyunsaturated fatty acids in diets for infants: choices for recommending and regulating bodies and for manufacturers of dietary products. *Lipids* 1999;34:215-220.
36. Kultz-Buschbeck JP, Stolze H, Johnk K, Boczek-Funcke A, Illert M. Development of prehension movements in children: a kinematic study. *Exp Brain Res* 1998;122:424-432.
37. Kurth E. *Motometrische Rostock-Oseretzky-Skala*. Psychodiagnostisches Zentrum, Sektion Psychologie der Humboldt-Universität (1985); (Abst)
38. Lienert GA. *Tetstaufbau und Testanalyse*. Weinheim 1967

39. Ludolph AC, Vetter U, Ullrich K. Studies of multimodal evoked potentials in treated phenylketonuria: the pattern of vulnerability. *Eur J Pediatr* 1996;155 Suppl 1:S64-8.
40. Marangoni F, Agostoni C, Lammardo AM, Giovannini M, Galli C, Riva E. Polyunsaturated fatty acid concentrations in human hindmilk are stable throughout 12-months of lactation and provide a sustained intake to the infant during exclusive breastfeeding: an Italian study. *British Journal of Nutrition* 2000;84:103-109.
41. Martinez M, Mougan I. Fatty acid composition of human brain phospholipids during normal development. *Journal of Neurochemistry* 1998;71:2528-2533.
42. Martinez M, Vazquez E. MRI evidence that docosahexaenoic acid ethyl ester improves myelination in generalized peroxisomal disorders [see comments]. *Neurology* 1998;51:26-32.
43. McCulloch DL, Skarf B. Development of the human visual system: monocular and binocular pattern VEP latency. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1991;32:2372-2381.
44. Neuringer M. Infant vision and retinal function in studies of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids: methods, results and implications. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000;71:256-267
45. Neuringer M, Connor WE, Lin DS, Barstad L, Luck S. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986;83:4021-4025.
46. Oseretzky NI. Eine metrische Stufenleiter zur Untersuchung der motorischen Begabung bei Kindern. *Z. Kinderforsch.* 1925;30:300-314
47. Pietz J, Benninger C, Schmidt H, Scheffner D, Bickel H, Long-term development of intelligence (IQ) and EEG in 34 children with phenylketonuria treated early. *Eur J Pediatr* 1988;147:361-367

48. Pietz J, Dunckelmann R, Rupp A, et al. Neurological outcome in adult patients with early treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1998;157:824-830
49. Pietz J, Landwehr R, Kutscha A, et al. Effect of high-dose tyrosine supplementation on brain function in adults with phenylketonuria. *Journal of Pediatrics* 1995;127:936-943.
50. Poge AP, Maumann K, Muller E, Leichsenring M, Schmidt H, Bremer HJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids in plasma and erythrocyte membrane lipids of children with phenylketonuria after controlled linoleic acid intake. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 1998;21:373-381
51. Reisbick S, Neuringer M, Hasnain R, Connor WE. Home cage behavior of rhesus monkeys with long-term deficiency of omega-3 fatty acids. *Physiology & Behavior* 1994;55:231-239.
52. Sanjurjo P, Perteagudo L, Rodriguez Soriano J, et al. Polyunsaturated fatty acid status in patients with phenylketonuria. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 1994;17:704-709.
53. Sauerwald T.U., Hachey D.L., Jensen C.L., Heird W.C.: New insights into the metabolism of long chain polyunsaturated fatty acids during infancy. *Eur J Med Res* 2: 88 – 92 (1997)
54. Schmidt E, Burgard P, Rupp A. Effects of concurrent phenylalanine levels on sustained attention and calculation speed in patients treated early for phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1996;155 Suppl 1:S82-6.
55. Schmidt E, Rupp A, Burgard P, et al. Sustained attention in adult phenylketonuria: the influence of the concurrent phenylalanine-blood-level. *Journal of Clinical & Experimental Neuropsychology* 1994;16:681-688.
56. Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, Woo SLC. The hyperphenylalaninemias. In: Scriver RC, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1998:1015-1075.

57. Stemerink BA, Kalverboer AF, van der Meere JJ, et al. Behaviour and school achievement in patients with early and continuously treated phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 2000;23:548-562.
58. Ullrich K, Moller H, Weglage J, et al. White matter abnormalities in phenylketonuria: results of magnetic resonance measurements. *Acta Paediatrica* 1994;Supplement. 407:78-82.
59. Ullrich K, Weglage J, Oberwittler C, et al. Effect of L-dopa on visual evoked potentials and neuropsychological tests in adult phenylketonuria patients. *Eur J Pediatr* 1996;155 Suppl:S74-77.
60. Weglage J, Bick U, Schuierer G, et al. Progression of cerebral white matter abnormalities in early treated patients with phenylketonuria during adolescence. *Neuropediatrics* 1997;28:239-240. Letter.
61. Weglage J, Schuierer G, Kurlemann G, Bick R, Ullrich K. Different degrees of white matter abnormalities in untreated phenylketonurics: findings in magnetic resonance imaging. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 1993;16:1047-1048.

**Hannes Nikolaus Reinhardt**

<b>Geburtsdatum</b>	13. Mai 1970
<b>Geburtsort</b>	München
<b>Stand</b>	verheiratet; Ehefrau Annette, geborene Neuerburg
<b>Eltern</b>	Gabriele und Wolf Reinhardt
<b>Kinder</b>	Maximilian Reinhardt
<b>1976-1980</b>	Ludwig-Uhland-Grundschule in Neu-Isenburg
<b>1980-1990</b> <b>1987-1988</b>	Freiherr-vom-Stein-Gymnasium in Frankfurt/Main, Abitur 12monatiger Schüleraustausch in Michigan, USA
<b>1990-1991</b>	Grundwehrdienst in Giessen
<b>1991-1994</b>	Studium der Zahnmedizin an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz
<b>1995-2002</b>	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München; Approbation am 15. April 2004
<b>Oktober 2002- Juni 2005</b>	Arzt im Praktikum und anschließend Assistenzarzt an der Artemed-Fachklinik in München
<b>seit Juni 2005</b>	Assistenzarzt an der Artemed-Fachklinik in Bad Oeynhausen
<b>1999-2006</b>	Promotionsstudie an dem Dr. von Haunerschen Kinderspital, Ludwig-Maximilians-Universität, München, bei Herrn Prof. Dr. Koletzko im Rahmen des Themas „Einfluss von langkettigen Omega-3-Fettsäuren auf Funktionen des ZNS bei Kindern mit Phenylketonurie“; diverse Postervorträge