

**Aus dem Klinikum am Steinenberg Reutlingen,
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Kinder- und Jugendmedizin
Chefarzt: Professor Dr. F. K. Trefz**

**Neue Methoden des Therapiemonitorings bei Patienten mit
Propionazidämie und Methylmalonazidämie durch
Quantifizierung der Acylcarnitine im Trockenblut mittels
Tandemmassenspektrometrie
Referenzwerte bei gesunden Erwachsenen unter verschiedenen
Bedingungen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Birgit Klupsch
aus
Waiblingen**

2003

Dekan:

Professor Dr. C. D. Clausen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. F. K. Trefz

2. Berichterstatter:

Professor Dr. M.B. Ranke

Für meine Eltern und alle Patienten, die an einer Propionazidämie oder einer Methylmalonazidämie erkrankt sind.

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	Propionazidämie und Methylmalonazidämie	1
1.1.1	Die Propionazidämie (PPA)	2
1.1.1.1	Die Primärsymptomatik	3
1.1.1.2	Die manifeste klinische Symptomatik	3
1.1.1.3	Laborbefunde	3
1.1.1.4	Die Pathophysiologie der PPA	4
1.1.1.5	Therapie	10
1.1.1.6	Prognose	11
1.1.2	Methylmalonazidämie (MMA)	12
1.1.2.1	Die klinische Symptomatik der MMA	13
1.1.2.2	Laborbefunde bei mut ⁰ -/ mut ⁻ -Defekten der MMA	13
1.1.2.3	Die Pathophysiologie der MMA	14
1.1.2.4	Therapie der Mut ⁰ -Defekte	15
1.1.2.5	Prognose der Mut ⁰ -Defekte	15
1.2	Methoden zur Diagnostik und Therapieüberwachung der PPA und MMA	16
1.3	Carnitin und Acylcarnitine	17
1.3.1	Was ist Carnitin?	17
1.3.2	Carnitinaufnahme	18
1.3.3	Die Aufgaben des Carnitins	18
1.3.4	Carnitinmangelzustände	19
1.3.5	Der Carnitinmangel bei der PPA und der MMA	20
1.3.6	Die verschiedenen Carnitinverbindungen im Blut und der Quotient AC/FC	20
1.3.7	Carnitinsubstitution	21
1.3.8	Carnitingabe bei Patienten mit MMA und PPA	21
1.3.9	Entwicklung der Acylcarnitinmessmethoden	22
2	<u>AUFGABENSTELLUNG UND ZIELE</u>	24

3	<u>MATERIALIEN UND METHODIK</u>	25
3.1	Chemikalien und Lösungen	25
3.1.1	Testsubstanzen	25
3.1.2	Geräte	26
3.2	Bestimmung des freien Carnitins und der Acylcarnitine	26
3.2.1	Funktionsweise des Tandemmassenspektrometers	26
3.3	Probengewinnung	28
3.4	Beschreibung der Probenaufbereitung	29
3.4.1	Quantifizierung der Acylcarnitine im Trockenblut	29
3.4.2	Quantifizierung der Acylcarnitine in den zellulären Blutbestandteilen	29
3.4.3	Quantifizierung der Acylcarnitine im Serum	30
3.5	Die Probenanalyse	30
3.5.1.1	Die Precursor 85 Methode	30
3.5.1.2	Besonderheiten der MRM-Methode	31
3.6	Die Validierung der Messungen des Tandemmassenspektrometers	31
3.6.1.1	Einfluss der Lagerung auf die Proben	31
3.7	Untersuchung bei Gesunden und Patienten mit PPA und MMA	32
3.7.1	Untersuchung bei Patienten	32
3.7.1.1	Übersicht über die untersuchten Patienten	34
3.7.2	Untersuchung bei Gesunden	47
3.7.2.1	Versuchsprotokoll	47
3.8	Berechnungen, Definitionen und Statistik	48
3.8.1	Patientenstudie	48
3.8.1.1	Transformation der Messwerte der Patienten	48
3.8.1.2	Bestimmung des Befindlichkeitsscores	49
3.8.2	Statistik	50
3.8.3	Begriffserklärungen	50
4	<u>ERGEBNISSE</u>	51

4.1	Methodische Ergebnisse: Untersuchung zum Einfluss der Lagerungsdauer auf den C_3/ C_{16}-Acylcarnitinquotienten	51
4.2	Die Ergebnisse der Patientenstudie	52
4.2.1	Patienten mit PPA	53
4.2.1.1	Einzelbeschreibung der Patienten	53
4.2.1.2	Vergleich der PPA-Patienten untereinander	65
4.2.2	Patienten mit MMA	68
4.2.2.1	Einzelbeschreibung der Patienten	68
4.2.2.2	Vergleich der MMA-Patienten untereinander	74
4.2.3	Besteht ein Zusammenhang zwischen den C_3/ C_{16} -Werten und den Konzentrationen des freien Carnitins?	77
4.2.4	Der Quotient C_3/ C_{16} unter einer Therapieoptimierung	77
4.3	Untersuchungen bei Kontrollpersonen	79
4.3.1	Studie 1: Messung der freien Carnitin- und Acylcarnitinkonzentrationen nach Gabe von Carnitin	79
4.3.2	Studie 2: Messung des freien Carnitins und der Acylcarnitine an fünf aufeinanderfolgenden Tagen	82
4.3.3	Studie 3: Messung des freien Carnitins und der Acylcarnitine im Verlauf eines Tages	85
4.3.4	Studie 4: Messung des freien Carnitins und der Acylcarnitine unter einem Glukosetoleranztest	88
4.3.5	Studie 5: Messung des freien Carnitins und der Acylcarnitine nach körperlicher Belastung	92
4.3.6	Studie 6: Messung des freien Carnitins und der Acylcarnitine in zellulären Blutbestandteilen, im Serum und im Vollblut	96
4.3.7	Nüchternkonzentrationen des freien Carnitins und der Acylcarnitine	99
5	<u>DISKUSSION</u>	101
5.1	Diskussion der Methode	102
5.1.1	Die Genauigkeit der Methode	102
5.1.2	Mögliche Fehlerquellen der Messung der Acylcarnitine mit dem Tandemmassenspektrometer und Möglichkeiten zu ihrer Vermeidung	103
5.1.2.1	Reproduzierbarkeit	103
5.1.2.2	Art der Blutprobe	103

5.1.2.3	Blutentnahmetechnik	104
5.1.3	Die Durchführbarkeit der Probengewinnung und des Probenversands	105
5.1.4	Wirtschaftlichkeit der Methode	106
5.2	Diskussion der Untersuchung bei Kontrollpersonen	106
5.2.1	Fluktuation der Carnitin- und Acylcarnitinspiegel	106
5.2.2	Einfluss einer oralen Carnitinsubstitution auf den Stoffwechsel	109
5.2.3	Einfluss von Glukose auf den Carnitinstoffwechsel	112
5.2.4	Freie Carnitin- und Acylcarnitinspiegel unter körperlicher Belastung	113
5.2.5	Propionylcarnitin, Palmitoylcarnitin und der Quotienten C_3/ C_{16} beim Stoffwechselgesunden	116
5.2.6	Acylcarnitine und freies Carnitin in Serum und Blutzellen	117
5.3	Diskussion der Patientenstudie	121
5.3.1	Durchführbarkeit der Studie	121
5.3.2	Aussagekraft des C_3/ C_{16} -Quotienten	122
5.3.2.1	Zusammenhang: Klinik - Quotient C_3/ C_{16}	122
5.3.2.2	Zusammenhang des Quotienten C_3/ C_{16} mit anderen Laborparametern	125
5.3.2.3	Die Rolle des C_3/ C_{16} -Quotienten bei akuten Stoffwechsellentgleisungen und bei einer Therapieoptimierung	126
5.3.3	Unterschiede der Patienten	129
5.3.4	Vergleich Messwerte bei PPA- und MMA-Patienten	132
5.3.5	Quotient freies Carnitin/ C_3 gegenüber dem Quotienten C_3/ C_{16}	133
5.4	Schlussfolgerungen und Ausblicke	134
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	135
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	138
	<u>DANKSAGUNG</u>	155
	<u>LEBENS LAUF</u>	156

Abkürzungsverzeichnis

AC	Acylcarnitin
BMI	Body-Mass-Index
CK	K(C)reatinkinase
CoA	Coenzym A
CPT I	Carnitin-Palmitoyl-Transferase I
CPT II	Carnitin-Palmitoyl-Transferase II
CTG	K(C)ardiotokogramm
C ₂	Acetylcarnitin
C ₃	Propionylcarnitin
C ₄	Butyrylcarnitin
C ₅	Isovalerylcarnitin
C ₁₄	Myristoylcarnitin
C ₁₆	Palmitoylcarnitin
C ₁₈	Stearylcarnitin
C _{18:1}	Oleylcarnitin
FC	freies Carnitin
i.m.	intramuskulär
IQ	Intelligenzquotient
MMA	Methylmalonazidämie
PPA	Propionazidämie
PCC	Propionylcarboxylase
PEG	Perkutane endoskopische Gastrostomie
TC	Gesamtcarnitin
T	Translokase
ZfS Reutlingen	Zentrum für Stoffwechselerkrankungen Reutlingen

1 Einleitung

1.1 Propionazidämie und Methylmalonazidämie

Die Propionazidämie (PPA) und die Methylmalonazidämie (MMA) sind angeborene, autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankungen. Sie gehören zur Untergruppe der Organoazidopathien (75, 102). Es handelt sich um durch Enzymdefekte hervorgerufene Abbaustörungen der verzweigt-kettigen Aminosäuren (Methionin, Valin und Isoleucin), der Aminosäure Threonin, ungeradzahligter Fettsäuren, Cholesterinseitenketten sowie Abbaustörungen der Pyrimidine Uracil und Thymin (102). Bei der PPA ist die Funktion der Propionyl-CoA-Carboxylase (PCC), bei der MMA die Funktion der Methylmalonyl-CoA-Mutase gestört.

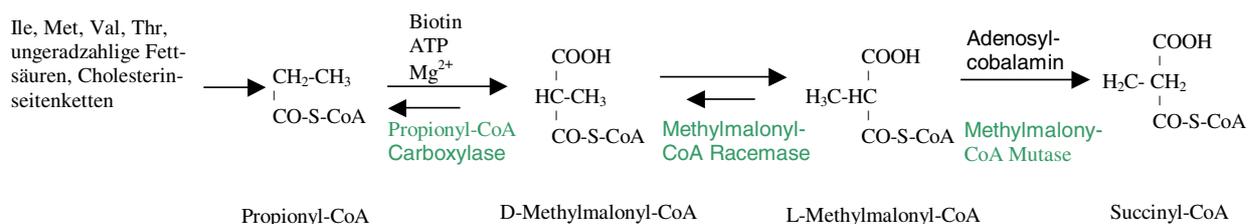


Abb. 1: Darstellung der Abbauschritte von Ile, Met, Val, Thr, den ungeradzahligen Fettsäuren sowie den Cholesterinseitenketten zu Succinyl-CoA mit den dazugehörigen Enzymen und Coenzymen (81, 75, 102).

Beide Krankheiten sind durch die Anreicherung pathologisch erhöhter Stoffwechselprodukte gekennzeichnet. Das Krankheitsbild manifestiert sich durch ketoazidotische Krisen, rezidivierendes Erbrechen, Nahrungsverweigerung, Wachstums- und Gedeihstörungen, neurologische Auffälligkeiten somit teilweise durch eine schwere geistige Retardierung und eine verminderte Lebenserwartung (102, 75).

Die bei beiden Krankheiten entstehende Propionsäure stammt zu 50 % aus Aminosäuren, zu 25 % aus ungeradzahligen Fettsäuren und zu 25 % aus Propionsäure produzierenden Bakterien der natürlichen Darmflora (78, 153, 135, 154). Die Propionsäure wie auch die Methylmalonsäure kommt im gesunden menschlichen Stoffwechsel extrazellulär (Blut, Urin und Liquor) nur in Spuren vor. Beide Substanzen spielen aber intrazellulär in Form von Coenzym A (CoA) -Ethern eine wichtige Rolle (75).

Die Inzidenz der PPA beträgt in Mitteleuropa 1:50.000, die der MMA 1:48.000. Auf Grund ihrer autosomal rezessiven Vererbung treten beide Erkrankungen bevorzugt in Ländern mit häufigen Verwandtenehen auf (z. B. Türkei) (127, 96).

1.1.1 Die Propionazidämie (PPA)

Die Propionazidämie (Mc Kuisick 232.000), die auch Propionazidurie genannt wird, wurde zum ersten Mal 1961 von Childs et al. beschrieben. Ihnen fiel eine Ketoazidose verbunden mit einer Hyperglyzinämie auf, so dass zuerst ein Defekt des Glyzinsystems angenommen wurde (26). 1968 entdeckten Hommes et al. eine erhöhte Konzentration von Propionat im Serum und eine erhöhte Menge an ungeradzahligen Fettsäuren in der Leber. Aus diesem Grund wurde der Defekt in der Propionyl-CoA-Carboxylase (PCC) vermutet (75, 62) (siehe Abb. 1).

Bei der PCC handelt es sich um ein aus zwölf Untereinheiten aufgebautes Enzym, das sechs α - und sechs β -Untereinheiten enthält. Die α -Untereinheit ist auf Chromosom 13, die β -Untereinheit auf Chromosom 3 lokalisiert. Bei betroffenen Patienten kann man Defekte in der α - und β -Untereinheiten unterscheiden. Für beide Untereinheiten sind zahlreiche verschiedene Mutationen bekannt (141). Bei den Defekten im *pccA*-Gen ist die α -Kette des Enzyms betroffen. Diese Mutation äußert sich dadurch, dass bei Heterozygoten die Enzymaktivität nicht vermindert ist. Im Unterschied dazu besitzen Heterozygote mit einem Defekt im *pccB*-Gen, bei der die β -Kette des Enzyms betroffen ist, nur eine Enzymaktivität von 50 %. Die Residualenzymaktivität eines erkrankten Patienten (Homozygotie) schwankt zwischen 1 und 5 % (75, 127). Sie korreliert nach einer Studie von Lehnert et al. nicht mit der Schwere der Erkrankung und ist somit für die Prognose nicht aussagekräftig (75). Das Coenzym der PCC ist Biotin. Es bindet an den Lysinrest des Enzyms (8). Es ist unwahrscheinlich, dass die Funktionsfähigkeit der PCC durch einen Mangel an seinem Coenzym hervorgerufen wird, da bislang in keiner Studie gezeigt werden konnte, dass eine Biotingabe den Zustand von PPA-Patienten verbessern konnte (127, 8). Nur bei dem multiplen Carboxylasedefekt im Rahmen eines Biotinidasedefektes kann mit Biotin therapiert werden.

Die PPA kann klinisch in eine im ersten Lebensmonat auftretende Form (early onset Form) und eine späte Form (late onset Form) eingeteilt werden, wobei erstere häufiger vorkommt (102).

1.1.1.1 Die Primärsymptomatik

Meistens manifestiert sich die early onset Form zu Beginn mit Erbrechen, Nahrungsverweigerung und starkem Gewichtsverlust wenige Tage nach der Geburt. Die late onset Form tritt häufig in Folge eines Infektes auf. Innerhalb weniger Stunden bis Tagen werden die Patienten mehrfach somnolent und apathisch und zeigen Symptome wie Hypothermie, Apnoe oder Tachypnoe, Hypotonie, Exsikkose, Krampfanfälle bis hin zu komatösen Zuständen. Laborchemisch findet man meist eine Ketoazidose, Hyperglyzämie und Hyperammonämie mit Konzentrationen bis zu 1000 µmol/l, eine Anämie, Leukozytopenie sowie eine Thrombozytopenie (87, 75, 99).

1.1.1.2 Die manifeste klinische Symptomatik

Die in der weiteren Entwicklung der Patienten auftretenden klinischen Symptome sind sehr heterogen. Nahezu alle Patienten leiden an einer muskulären Hypotonie, an einer leichten bis schweren geistigen Retardierung, die oft mit einem IQ unter 80 verbunden ist, sowie an Wachstums- und Gedeihstörungen, massiven Essproblemen, einer erhöhten Infektanfälligkeit sowie neurologischen Auffälligkeiten, wie z.B. Hyperkinesien, zerebrale Krampfanfälle, motorische Störungen oder Schwerhörigkeit (75, 102, 79). Eine genaue Auflistung der Symptome kann der Tabelle 1 entnommen werden.

Tab. 1: Symptome des an einer PPA erkrankten Kindes/ Jugendlichen unter Therapie (75, 102, 79)

Ernährung	Entwicklung	Neurologie	Sonstiges
- Inappetenz und Nahrungsverweigerung - Rezidivierendes Erbrechen	- Verzögerte motorische und geistige Entwicklung - Minderwuchs	- Muskuläre Hypotonie -zerebrale Krampfanfälle - Minderung des IQ	- Osteoporose - Seh- und Hörstörungen - Immunschwäche - Pankreatitis - Hepatomegalie - Ketoazidotische Krisen

1.1.1.3 Laborbefunde

Die laborchemischen Auffälligkeiten können Tabelle 2 entnommen werden. Sie zeigen sich bei Patienten in unterschiedlicher Ausprägung wie Lehnert et al. in einer Studie bei 30 Patienten beschreibt: Methylzitat und 2-Methyl-3-Oxovalerylsäure sind in 93 %

bzw. 100 % der Fälle erhöht, 3-Hydroxypropionsäure in 63 % und N-Propionylglyzin in 48 % der Fälle. Eine Ketonurie tritt in 37 % und eine Erhöhung von 3-Oxovaleriansäure in 22 % der Fälle auf (75). Auch hieran zeigt sich die Heterogenität der Erkrankung (41).

Tab. 2: Häufige Laborbefunde bei der PPA, (↑: erhöht, ↓: erniedrigt)

Blut/ Plasma		Urin
spezielles Labor	reguläres Labor	
↑ Propionyl-CoA/ Propionsäure	↑ Ammoniak	↑ Glyzin
↑ 3-Hydroxypropionsäure	↓ Blutglucose	↑ 3-Hydroxypropionsäure
↑ N-Propionylglyzin	↓ Wachstumshormone	↑ N-Propionylglyzin
↑ N-Propionylalanin	↓ Blut-pH	↑ N-Propionylalanin
↑ Propionylcarnitin	↓ Leukopenie	↑ Propionylcarnitin
↑ Methylzitat	↓ Thrombozytopenie	↑ Methylzitat
↑ 3-Oxo-valeriansäure	↓ Anämie	↑ 3-Oxo-valeriansäure
↑ 3-Hydroxy-valeriansäure		↑ 3-Hydroxy-valeriansäure
↑ 2-Methyl-3-oxovaleriansäure		↑ 2-Methyl-3-oxovaleriansäure
↑ Butanon, 3-Pentanon		↑ Butanon, 3-Pentanon
↑ 3-Hydroxy 2-methyl-n-valeriansäure		↑ Lysin
↑ 2-Methyl-3-oxobuttersäure		
↑ 3-Hydroxy 2-methylbuttersäure		
↑ 2-Methylbutyrylglyzin		
↑ Tiglylglyzin		
↑ viele ungeradzahlige Fettsäuren		
↑ 2-Methylglutaconsäure		
↓ Carnitin		
↑ Glutamin		
↑ Glyzin		
↑ Lysin		
↑ ungeradzahlige Fettsäuren		

1.1.1.4 Die Pathophysiologie der PPA

Durch den Defekt der PCC kann, wie aus der Reaktionsgleichung der Abbildung 1 zu entnehmen ist, das aus den vier Aminosäuren Isoleucin, Methionin, Valin und Threonin sowie aus ungeradzahligen Fettsäuren, Cholesterinseitenketten, und den Pyrimidinen Uracil und Thymin entstehende Propionyl-CoA nicht weiter abgebaut werden.

Abbildung 2 zeigt die Entstehung der einzelnen aus Propionyl-CoA entstehenden Stoffwechselprodukte (75):

1. Die Hydrolyse des Propionyl-CoA führt zur Bildung von Propionsäure, die bei einer Stoffwechselentgleisung in erheblichen Mengen in sämtlichen Körperflüssigkeiten anzutreffen ist. Auch anaerobe Darmbakterien bilden beim Abbau komplexer Koh-

lenhydrate in einem anaeroben Stoffwechsel Propionsäure und geben sie über den Pfortaderkreislauf an das Blut ab. Normalerweise wird das von Bakterien gebildete Propionat für die Glukoneogenese in der Leber verwendet (22). Die Propionsäure ist für die Hemmung der mitochondrialen Energieproduktion verantwortlich, indem sie eine Hemmung der mitochondrialen Oxidation von Succinat und α -Ketoglutarat bewirkt. Propionyl-CoA hemmt die Succinyl-CoA-Hydrolase sowie die Malatdehydrogenase.

Die Stammzellen des Knochenmarks werden in ihrer Reifung durch die Propionsäure gehemmt. Dies kann sich bei den Patienten in Form einer Anämie, Thrombozytopenie und Neutropenie zeigen (75, 1).

2. Eine β - oder ω -Oxidation des Propionyl-CoA führt zur Bildung von 3-Hydroxypropionsäure.
3. Durch Konjugation mit Glyzin und Alanin entsteht Propionylglyzin/ -alanin.
4. Durch eine Veresterung mit L-Carnitin entsteht Propionylcarnitin (siehe Kap. 1.3).
5. Propionyl-CoA kann wie Acetyl-CoA als Primer in der Fettsäuresynthese fungieren, wodurch ungeradzahlige Fettsäuren entstehen, die in sämtlichen Membranen und Fettdepots gespeichert werden. Die ungeradzahligen Fettsäuren können einen Anteil bis zu 15 % an der Gesamtheit aller im Plasma befindlichen Fettsäuren einnehmen (gesunde: 1 %) (135). Man findet sie z.B. auch in Erythrozytenmembranen und kann sie quantifizieren (132, 27, 156). Eine starke Erhöhung der Propionyl-CoA-Konzentration entsteht durch den Abbau der aus Propionyl-CoA als Primer gebildeten, ungeradzahligen Fettsäuren im katabolen Zustand. Dies kann eine metabolische Entgleisung bewirken (137).
6. Wird Propionyl-CoA an Stelle von Acetyl-CoA in den Zitronensäurezyklus eingeschleust, so entsteht Methylzitat, das pathognomonisch für die PPA ist. Die Bildung des Methylzitrats hat zur Folge, dass Acetyl-CoA keinen Reaktionspartner mehr hat, so mit sich selbst reagiert und den Ketonkörper Acetoacetat bildet. Durch diese Bildung kommt es bei einer Stoffwechselentgleisung unter anderem zu einer Ketoazidose (96).

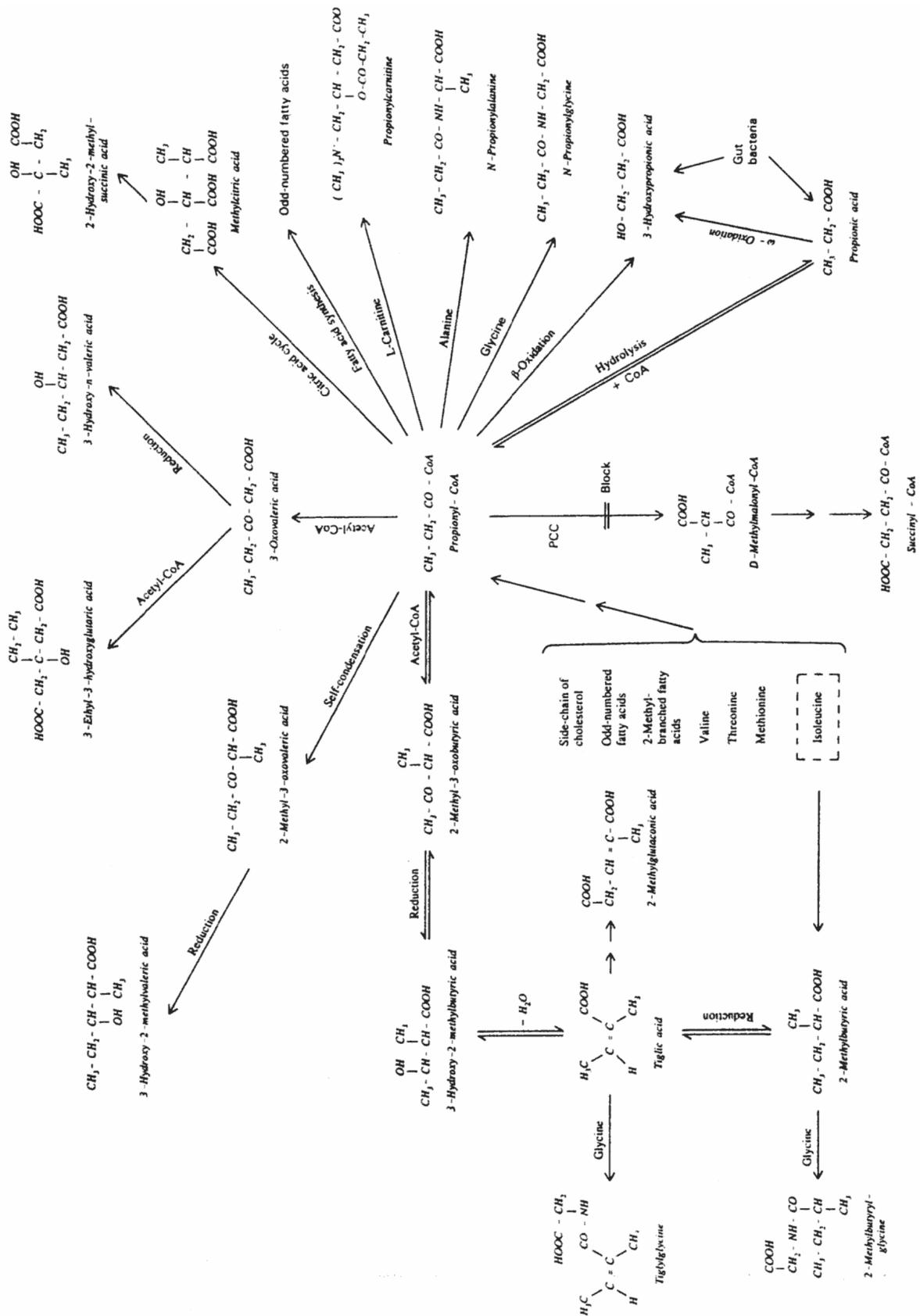


Abb. 2: Abbauwege des Propionylcarnitins bei einem Defekt der Propionylcarboxylase (75)

7. Findet eine Kondensation mit Acetyl-CoA statt, entsteht 3-Oxovaleriansäure, aus der durch Reduktion 3-Hydroxy-n-valeriansäure entsteht.
8. Eine weitere Kondensation mit Acetyl-CoA kann zur Entstehung von 2-Methyl-3-Oxobuttersäure und die weitere Reduktion zur Bildung von 3-Hydroxy-2-Methylbuttersäure führen.
9. Durch die Selbstkondensation des Propionyl-CoA entsteht 2-Methyl-3-Oxovaleriansäure, die immer nachweisbar ist. Durch die Reduktion dieses Metaboliten entsteht 3-Hydroxy-2-methyl-n-valeriansäure.
10. Isoleucin hat auch weitere alternative Abbauwege, die bei einem PCC-Defekt zu finden sind. Aus Isoleucin entsteht Methylbutyrylsäure. Reagiert sie mit Glyzin, entsteht 2-Methylbutyrylglyzin. Methylbuterylsäure kann wiederum zu Tiglylsäure reagieren, welches durch Reaktion mit Glyzin zu Tiglylglyzin reagiert. Wird Tiglylsäure carboxyliert, entsteht 2-Methylglutaconsäure.
11. Man kann bei der PPA oft ungewöhnliche Ketone, z.B. 3-Pentanon oder Butanon nachweisen. Sie entstehen durch einen nichtenzymatischen Zerfall von 2-Methylacet-essigsäure, 3-Oxovaleriansäure oder 2-Methyl-3-oxovaleriansäure.
12. Die fast immer auftretende Hyperglyzinämie wird als Folge einer durch Propionyl-CoA und seiner Metabolite bewirkten Hemmung des glyzinspaltenden Systems erklärt. Sie könnte aber ebenso durch eine Hemmung der Umwandlung von Glyzin in Serin, durch eine Blockierung der Glyzinkonjugation bzw. durch eine Hemmung der Aufnahme von Glyzin in die Mitochondrien der Leber- und Gehirnzellen in Folge der pathologischen Stoffwechselprodukte verursacht sein (127). Auf Grund des mangelhaften Glyzinabbaus entsteht ein Defizit an C₁-Gruppen. Dies kann zu einem Tetrahydrofolsäuremangel führen. Eine Neurotoxizität des Glyzins wurde bislang nicht gefunden (140).
13. Auch eine Hyperlysinämie kann durch die Hemmung des Lysinabbaus durch Propionyl-CoA und seiner Metaboliten erklärt werden.
14. Die vor allem bei einer Entgleisung massiv auftretende Hyperammonämie ist durch die Hemmung der Carbamoylphosphatsynthetase, ein Schlüsselenzym der Harnstoffsynthese, zu erklären.

Eine Erklärung der neurologischen Auffälligkeiten mit muskulärer Hypotonie, Neigung zu zerebralen Krampfanfällen, akuten Enzephalopathien sowie einem verminderten IQ und Konzentrations- und Gedächtnisproblemen ist bis heute nicht gelungen. Morphologisch fällt ein Hydrozephalus internus, eine leichte kortikale Atrophie und eine Hypoplasie des Corpus callosum auf. Man vermutet, dass die Schädigung des Gehirns vor allem durch die bei Entgleisungen stark erhöhten pathologischen Stoffwechselprodukte, z.B. Ammoniak, sowie durch eine Minderperfusion des Gehirns unter Stoffwechsellinstabilitäten hervorgerufen wird. Durch die ständig erhöhten Stoffwechselprodukte im Liquor ist möglicherweise der Energiestoffwechsel im Gehirn gestört. Die hierbei fehlende Umwandlung von Propionyl-CoA in Succinyl-CoA, die für die Energiegewinnung der Nervenzellen sehr wichtig ist, ist dabei von entscheidender Bedeutung (99). Die im Computertomogramm nachweisbaren hypodensen Zonen in myelinisierten Regionen des Gehirns wie Hirnstamm, Kleinhirn, Stammganglien und Großhirnrinde werden durch Myelinisierungsstörungen hervorgerufen, die durch die Anreicherung der Stoffwechselprodukte entstehen (11).

Van Rooyen et al. gehen davon aus, dass die neurologische Schädigung durch eine von der Propionsäure verursachte Hemmung der β -Ureidopropionidase entsteht. Die Folge hiervon ist ein Mangel an dem Neurotransmitter β -Alanin, der wahrscheinlich zu neurologischen Auffälligkeiten führt (145, 144).

Für das bei PPA-Patienten so häufig beobachtete Erbrechen werden verschiedene Ursachen diskutiert, beispielsweise dass die pathologischen Stoffwechselprodukte durch ihre Wirkung am Stammhirn für den Würgereflex, das Erbrechen sowie den Appetitmangel verantwortlich sind (99). Auch besteht die Möglichkeit, dass das Erbrechen durch eine hohe Propionatkonzentration im Pfortaderblut ausgelöst wird. Begründet wird dies damit, dass tierexperimentell bei Schafen eine Appetitlosigkeit nach Infusion von Propionat in die Portalvene beobachtet wurde (136).

Möglicherweise spielt auch eine Pankreatitis eine Rolle. Bei Stoffwechselentgleisungen werden teilweise erhöhte Amylase- und Lipasewerte gemessen, die für eine akute Pankreatitis sprechen (96).

Der bei Patienten mit PPA beobachtete Haarausfall und die Hypopigmentierung der Haare ist möglicherweise durch einen Selenmangel verursacht. Selen ist ein Spurenelement. Es ist für die Aktivität der Glutathionperoxidase verantwortlich, die den Abbau

von Wasserstoffperoxid und anderen Radikalen katalysiert. Durch die eiweißarme Ernährung der Patienten und den in deutschen Aminosäuresupplementen fehlenden Selenzusatz, wird zu wenig Selen aufgenommen (96, 162). Man kann bei vielen Patienten mit PPA einen Minderwuchs beobachten, der wahrscheinlich durch die proteinarme Ernährung verursacht wird (153). Die Ursache der bei älteren Patienten auftretenden Osteoporose konnte bisher noch nicht erklärt werden.

Eine erhöhte Infektanfälligkeit kann bei 80 % der PPA-Patienten beobachtet werden (3). Dabei handelt es sich häufig um opportunistische Keime wie *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii* wodurch auf eine geschwächte Immunabwehr absehbar ist (161). Im Blutbild fällt oft ein Immunglobulinmangel (IgG, IgM) sowie eine Granulozytopenie auf (107). Möglicherweise kommt es zu einer Hemmung der T- und B-Zellbildung durch Propionyl-CoA sowie zu einer Suppression des Knochenmarks (107). Andere Metabolite scheinen hierbei keinen Einfluss zu haben (3). Die Proteinmangelernährung ist für diesen Effekt nicht verantwortlich, da er bei anderen Patienten mit angeborenen Stoffwechselerkrankungen (mit Ausnahme der MMA), die ebenfalls mit einer reduzierten Proteinzufuhr ernährt werden, nicht beobachtet wurde.

An der Haut manifestiert sich dieses Stoffwechselgeschehen in Form von lamellenartigen oder flächigen perioral und an den Extremitäten befindlichen Erythemen. Sie werden als „Dermatitis azidämia“ bezeichnet und im Zusammenhang mit dem Mangel an speziellen Aminosäuren (vor allem Isoleuzinmangel) und Spurenelementen gesehen (163).

Bisher ungeklärt ist, weshalb die Symptome und der klinische Verlauf bei den einzelnen Patienten so unterschiedlich sind. Mögliche Ursachen könnten im Genotyp (141), der unterschiedlichen Erstmanifestation, der Güte der diätetischen Einstellung und in der unterschiedlichen Besiedlung der Darmschleimhaut mit propionsäurebildenden Bakterien liegen. Nicht zu vernachlässigen ist auch die unterschiedliche Fähigkeit des Organismus, die Propionsäure über alternative Stoffwechselwege abzubauen (127). In einem Fallbericht wurde von Kuhara et al. von einem Geschwisterpaar mit PPA berichtet, die beide gleiche Mengen an Stoffwechselmetaboliten ausgeschieden haben und trotzdem einen unterschiedlichen klinischen Verlauf zeigten (70).

Auffällig ist, dass sich die Stoffwechselsituation mit zunehmendem Alter bei den meisten Patienten bessert. Möglicherweise entwickelt der Körper im Laufe der Zeit alterna-

tive Stoffwechselwege. Ebenso ist es möglich, dass der Körper nicht mehr so sensibel auf die giftigen Stoffwechselprodukte reagiert (99).

1.1.1.5 Therapie

Die Therapie der PPA besteht aus einer strikt eiweißarmen Diät, bei der nur das für Wachstum und Erhalt einer anabolen Stoffwechselsituation nötige Eiweiß über die Nahrung zugeführt wird. Ziel ist, die Menge der vier nicht abbaubaren Aminosäuren so gering wie möglich zu halten. Die zugeführte Gesamteiweißmenge ist altersabhängig und liegt bei 0,5 - 1,5 g Eiweiß pro kg Körpergewicht und pro Tag. Hierbei erhalten die Patienten über die Nahrung zwischen 0,3 - 1,1 g natürliches Eiweiß pro kg Körpergewicht pro Tag und zusätzlich zwischen 0,3 - 0,9 g „Aminosäuresupplement“ pro kg Körpergewicht pro Tag. Bei diesem „Spezialeiweiß“ handelt es sich um eine Aminosäuremischung ohne die Aminosäuren Methionin, Threonin, Valin und Isoleucin und einem Zusatz an Spurenelemente, Vitamine und Mineralien.

Tab. 3: Referenzwerte für die Eiweißzufuhr. Herausgegeben von: DGE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung), ÖGE (Österreichische Gesellschaft für Ernährung) D.A.CH (Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsversorgung), Schweizerische Vereinigung für Ernährung, Empfehlung 2000 (37).

Alter	Proteinmenge (g/kg Referenzgewicht/Tag)	Alter	Proteinmenge (g/kg Referenzgewicht/Tag)
0-≦1 Monat	2,7	1-≦ 4 Jahre	1,0
1-≦2 Monate	2,0	4-≦ 7 Jahre	0,9
2-≦4 Monate	1,5	7-≦15 Jahre	0,9
4-≦6 Monate	1,3	15-≦19 Jahre	♂:0,9, ♀:0,8
6-≦12 Monate	1,1	19-≦21 Jahre	0,8

In Tabelle 3 werden die Referenzwerte für die Proteinaufnahme gesunder Patienten angegeben. Um einen Katabolismus zu vermeiden ist die Hyperalimentation ein grundsätzliches Therapieziel. Auf Grund der Essstörungen ist man fast immer auf eine Sondenernährung, am besten über eine perkutane endoskopische Gastrostomie (PEG) angewiesen (99). Des weiteren erhalten die Patienten L-Carnitin in der Dosierung 50 - 100 mg pro kg Körpergewicht pro Tag (75, 164). Eine Antibiotikatherapie z.B. mit Metronidazol reduziert die im Darm befindlichen Bakterien, wodurch die Propionsäurebelastung des Organismus reduziert werden kann (22, 79, 136). Zur Vermeidung eventueller Mangelzustände an Vitaminen und Spurenelementen wird eine Supplementie-

rung empfohlen (z.B. Seravit[®] der Firma SHS Heilbronn). Die weitere Therapie ist auf die jeweiligen Symptome der Patienten abgestimmt.

Eine längere Nahrungskarenz muss bei PPA-Patienten unter allen Umständen vermieden werden, da sie zu einer katabolen Stoffwechsellage führt. Aus diesem Grund sollten die Patienten möglichst häufig kleine Mengen an Nahrung zu sich nehmen. Gute Erfolge konnte man sowohl durch eine nächtliche Sondierung mittels Nahrungspumpe als auch durch kleinere Fütterungsintervalle erzielen, da hierbei die Gefahr eines möglichen katabolen Zustands vermindert wird (153).

In Einzelfällen wurde eine Lebertransplantation vorgenommen. Das Ergebnis der bisher durchgeführten Transplantationen war allerdings, dass die Ausscheidung der für die PPA typischen Stoffwechselprodukte immer noch erhöht war und krankheitsspezifische Probleme weiter existierten. Ebenso bereitete die nötige Immunsuppression den Patienten große Schwierigkeiten und führte in einigen Fällen sogar zum Tod (79).

Die Akuttherapie einer PPA, insbesondere bei massiv erhöhten Ammoniakkonzentrationen ist eine Peritonealdialyse (49) oder besser einer Hämodialyse bzw. Hämoperfusion. Die konservative Akuttherapie besteht in einer parenteralen, eiweißarmen hyperalimentativen Ernährung und symptomatischen Behandlung.

1.1.1.6 Prognose

Es ist schwierig, für die PPA eine Prognose zu stellen, da keine Langzeitbeobachtungen bzw. Studien vorliegen. Die Erstmanifestation der PPA wurde nach einer Studie von Lehnert et al. vor 1986 von nur 64 % der Kinder überlebt (75). Rousson et al. berichteten, dass von 19 Patienten nach den ersten Lebensjahre nur fünf der Patienten noch lebten (119). Durch eine bessere Früherkennung und Behandlung hat sich die Prognose sicher verbessert. Auch die Langzeitprognose der Erkrankung ist bedingt durch Therapieverbesserungen wahrscheinlich positiver. Die Prognose ist im Vergleich zu anderen Stoffwechselerkrankungen wie z.B. für die Phenylketonurie oder die Ahornsiruperkrankung schlechter (77).

Die Langzeitfolgen bestehen in geistiger Retardierung, Minderwuchs und Osteoporose. In Einzelfällen gibt es sehr gute Verläufe, so hatte ein Kind in den ersten Lebensjahren große Probleme und war mit zehn Jahren vollständig leistungsfähig und hatte einen IQ von 105 (84).

Ein Durchbruch in der Behandlung der PPA könnte eine vielleicht in der Zukunft mögliche gentechnische Korrektur des Gendefektes darstellen.

1.1.2 Methylmalonazidämie (MMA)

Die Methylmalonazidämie (MMA) (Mc Kuisick 251.000) wurde 1967 von Oberholzer und Stock entdeckt (101). Sie beschrieben Patienten mit schwerer metabolischer Ketoazidose, hohen Konzentrationen an Methylmalonat in Blut und Urin und einer Entwicklungsretardierung. Man vermutete einen Defekt der Methylmalonyl-CoA-Mutase (127). Bei der MMA finden sich verschiedene Defekte, die sich darin zeigen, dass L-Methylmalonyl-CoA nicht zu Succinyl-CoA umgewandelt wird.

Defekte des Apoenzyms Methylmalonyl-CoA-Mutase, einem Dimer aus zwei identischen Untereinheiten, finden sich als mut^0 - und mut^- -Defekt. Bei einem mut^0 -Defekt ist die Mutase nicht nachweisbar, während bei einem mut^- -Defekt noch eine Restenzymaktivität (2 - 75 %) vorhanden ist. Das Gen der Methylmalonyl-CoA-Mutase ist auf Chromosom 6 lokalisiert (97).

Die Methylmalonyl-CoA Mutase benötigt als Coenzym Adenosylcobalamin. Enzymdefekte mit einer defekten Adenosylcobalaminbildung oder Patienten mit Vitamin B₁₂-Mangel haben eine reduzierte Methylmalonyl-CoA Mutase Aktivität. Abbildung 3 zeigt die verschiedenen Formen: Ein Mangel an mitochondrialer Cobalaminreduktase (cbl A) oder an mitochondrialer Cobalamin Adenosyltransferase (cbl B).

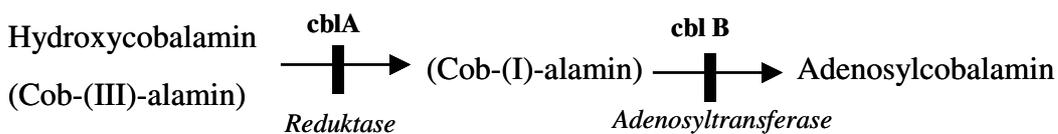


Abb. 3: Die intramitochondriale Bildung des Adenosylcobalamins aus Hydroxycobalamin mit den zu einer Methylmalonazidämie führenden Stoffwechseldefekten cbl A und cbl B.

Es führen noch drei weitere Enzymdefekte neben einer MMA auch zu einer Homocystinurie: Ein cbl C-, cbl D- oder cbl F-Defekt führt zu einer reduzierten Adenosylcobalamin- und Methylcobalaminsynthese, die eine mangelhafte Aktivität der Methylmalonyl-CoA-Mutase sowie der Methioninsynthetase bewirken. Patienten mit einer cbl C Mutation sind hierbei schwerer betroffen. Die genauen Stoffwechseldefekte bei cbl C und cbl D Mutation sind bisher nicht bekannt. Es handelt sich wahrscheinlich um einen De-

fekt in einem frühen Schritt der Cobalaminsynthese. Bei dem cbl F Defekt liegt die Ursache wahrscheinlich in einem verminderten Transport von Cobalamin aus den Lysosomen (97, 127). Auf diese Defekte soll nicht näher eingegangen werden.

Klinisch relevant ist der Nachweis einer Vitamin B₁₂-abhängigen Variante, da diese Patienten mit hohen Dosen von Hydroxycobalamin behandelt werden können und damit eine symptomatische Heilung erreicht wird (10, 127).

Die MMA kann in eine früh auftretende Form, vor Ende des ersten Lebensmonats (early onset Form) und eine spät auftretende Form (late onset Form) unterschieden werden. Baumgartner et al. konnten in ihren Untersuchungen an 77 Patienten feststellen, dass bei einem mut⁰-Defekt die Patienten zu 70 % eine early onset Form hatten, der Prozentsatz der mut⁻ Defekte lag hierbei bei 50 %, der einer cbl A/ B bei 45 % (10).

1.1.2.1 Die klinische Symptomatik der MMA

Klinisch ist eine MMA von einer PPA nicht zu unterscheiden. Im Langzeitverlauf zeigt sich bei der MMA eine chronische Niereninsuffizienz neben den für die PPA bekannten Symptomen. Histologisch findet sich eine Nephritis, funktionell zunächst eine tubuläre, dann eine glomeruläre Funktionsstörung. Infolgedessen wurden bei einigen Patienten Hypertonien beobachtet (10, 79). Bei der MMA können infarktartige Veränderungen der Basalganglien beobachtet werden.

Neurologisch finden sich bei Patienten mit einer MMA ebenfalls einige Unterschiede. Es werden vermehrt sogenannte „stroke like episodes“ beschrieben, wie dies auch bei zwei der hier untersuchten Patienten der Fall war. In der Bildgebung des Gehirns (CT, MRT) finden sich infarktartige Basalganglienveränderungen, eine Hypomyelinisierung sowie eine Hypodensität des Globus pallidum. Etwa die Hälfte der Patienten mit MMA (mut⁰) weisen einen IQ kleiner 80 auf. Die Entwicklung scheint bei Patienten mit einer mut⁻ oder einer Vitamin B₁₂-abhängigen Form besser zu sein (10, 146).

1.1.2.2 Laborbefunde bei mut⁰-/ mut⁻-Defekten der MMA

Bei der MMA findet sich eine stark erhöhte Ausscheidung von Methylmalonsäure. Die Reaktionen der Methylmalonyl-CoA-Racemase und der PCC sind reversibel. Dadurch wird aus dem sich anreichernden Methylmalonyl-CoA teilweise wieder Propionyl-CoA rückgebildet. Infolgedessen reichert sich bei der MMA ebenfalls Propionyl-CoA samt

seiner pathognomonischen Metabolite an, jedoch in einer unterschiedlichen Ausprägung. So können einige der auch bei der PPA gefundenen Metabolite nachgewiesen werden (127, 102).

1.1.2.3 Die Pathophysiologie der MMA

Die bei einer Stoffwechsellage auftretende Azidose wird nicht allein durch den Säurecharakter der Methylmalonsäure erklärt. Man geht davon aus, dass in einer solchen katabolen Stoffwechselsituation durch die große Menge an Methylmalonyl-CoA kein freies CoA für den Fettsäuretransport ins Mitochondrium und damit für die Energiebildung zur Verfügung steht und dadurch die Fettsäureoxidation gestört wird. Außerdem führt das Methylmalonyl-CoA zu einer Hemmung der Pyruvatcarboxylase und interferiert somit mit der Glukoneogenese (31). Durch beide Effekte kommt es zu einer Hypoglykämie.

Halperin et al. postulierte, dass die Methylmalonsäure den transmitochondrialen Transport von Malat, ein Schlüsselschritt der Glukoneogenese, hemmt, was dann ebenfalls zu einer Hypoglykämie führt (55).

Die Veränderungen der Basalganglien, die sich durch extrapyramidale Störungen zeigen, können eventuell dadurch erklärt werden, dass die Basalganglien in ihrer Energiegewinnung stark von der Succinatdehydrogenasereaktion abhängig sind, die durch Methylmalonsäure gehemmt wird. Dadurch erleiden die Basalganglien bei einer Entgleisung einen großen Schaden.

Da die Methylmalonsäure kompetitiv die Succinatdehydrogenase des Gehirns und der Leber hemmt (Methylmalonsäurekonzentration $> 1 \text{ mol: } 50 \%$), werden die Wege im Zitronensäurezyklus blockiert, die aus Aminosäuren Glukose produzieren. So entsteht bei Entgleisungen eine besonders starke Hypoglykämie des Gehirns. Eine aerobe Glucoseoxidation ist auf Grund der hohen Methylmalonsäurekonzentration nicht möglich. Es bildet sich Laktat, und demzufolge ist der Energiegewinn der Zellen geringer. Da die Methylmalonyl-CoA-Mutase auch die β -Hydroxybutyratdehydrogenase hemmt, kann der Ketonkörper β -Hydroxybutyrat vom Gehirn ebenfalls nicht zur Energieproduktion verwendet werden. Dadurch kommt es zu einer Schädigung des Gehirns (134).

Auch die MMA ist durch eine Immunschwäche gekennzeichnet, wobei die Infektionsrate signifikant niedriger ist als bei der PPA (3). Für diese Immunschwäche ist die Me-

thylmalonsäure verantwortlich. Es konnte in vitro nachgewiesen werden, dass sie konzentrationsabhängig das Wachstum der Knochenmarkszellen hemmt und die Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten und Monozyten beeinträchtigt. Im Blutbild wurden außerdem stark erniedrigte B-Lymphozytenkonzentrationen gemessen, ebenso erniedrigte Immunglobulinkonzentrationen (IgG, IgM), eine Neutropenie, Thrombozytopenie und Leukozytopenie (161, 3).

1.1.2.4 Therapie der Mut⁰-Defekte

Die Therapie der MMA ist weitgehend mit der Therapie der PPA identisch. Ein Therapieunterschied tritt bei einer Vitamin B₁₂-abhängigen MMA auf, da diesen Patienten regelmäßig Cobalamin verabreicht wird und anschließend keine oder eine nur geringe Proteinrestriktion nötig ist. Ney et al. untersuchte in einer Studie die Abhängigkeit der Methylmalonsäurekonzentration in Abhängigkeit von der aufgenommenen Proteinmenge. Sie stellten eine für jeden Patienten individuelle Proteinmenge fest, die nicht überschritten werden durfte, da ansonsten die Methylmalonsäureausscheidung massiv anstieg. Diese Proteinmenge war mehr vom Gewicht als vom Alter abhängig (95).

1.1.2.5 Prognose der Mut⁰-Defekte

Wie schon bei der Beschreibung der Symptomatik erwähnt, sind Patienten mit einer mut⁰-Variante stärker erkrankt als Patienten mit anderen Varianten. Sie haben eine weitaus geringere Lebenserwartung und ein viel schlechteres Outcome, vor allem im Vergleich zu Patienten mit einer mut⁻ oder cbl A/ B-Variante, die eventuell auf eine Hydroxycobalamigabe gut ansprechen (10, 98).

Die Prognose ist, ebenso wie für die PPA, individuell verschieden. Es gibt selbst bei der schweren mut⁰-Form Patienten mit guter Entwicklung. Wasserstein et al. berichten von einer Patientin mit Vitamin B₁₂-unabhängiger mut⁻ Variante, die bei leichter Niereninsuffizienz, chronischer Pankreatitis, Optikusatrophie und geistig normaler Entwicklung (College), im Alter von 20 Jahren ein gesundes Baby zur Welt brachte (155). In der Literatur wurden auch benigne Formen einer MMA beschrieben, deren Ätiologie jedoch unklar ist (131).

Auch bei der MMA erhofft man sich, in Zukunft eine Gentherapie einsetzen zu können. In vitro konnten schon Erfolge verzeichnet werden, in dem T-Zellen und CD³⁴⁺-Zellen von MMA-Patienten durch einen rekombinanten Retrovirus mit der c-DNA der Me-

thylmalonyl-CoA-Mutase, einer funktionstüchtigen fremden Zelle transduziert wurden. Die Zellen waren daraufhin in der Lage im Kulturmedium befindliche Methylmalonsäure abzubauen. Momentan wird nach noch geeigneteren in vitro Modellen gesucht, da T-Zellen nur begrenzt in der Lage sind, Methylmalonsäure abzubauen (23, 24).

1.2 Methoden zur Diagnostik und Therapieüberwachung der PPA und MMA

Methode der Wahl zur Quantifizierung der für die PPA und MMA pathognomonischen Metabolite im Urin ist die Gaschromatographie, oder besser die Gaschromatographie in Verbindung mit der Massenspektrometrie (GC/MS). Die Einführung dieser Methoden in der Medizin war die Voraussetzung zur Entdeckung der Erkrankungen aus dem Bereich der Organoazidurien. Für die MMA gibt es einen einfachen (jedoch auch unspezifischen) Farbttest zum Nachweis der Methylmalonsäure im Urin.

Im Gegensatz zu Erkrankungen aus dem Bereich der Aminoazidopathien (z.B. Phenylketonurie, Ahornsiruperkrankung) ist die Überwachung der therapeutischen Einstellung der MMA und PPA schwieriger und nicht einheitlich. Die medikamentöse und diätetische Einstellung der PPA und MMA spiegelt sich nicht eindeutig im klinischen Verlauf wieder (mündliche Mitteilung F. Trefz). Deshalb ist es wichtig, einen laborchemischen Parameter zu finden, der die Konzentrationen der im Körper befindlichen pathologischen Stoffwechselmetabolite wiedergibt und somit die Güte der Einstellung anzeigt.

Während bei der PPA bei einer guten Stoffwechseleinstellung außer Methylzitat andere pathognomonische Metabolite kaum erhöht sind, ist bei der MMA die Ausscheidung der Methylmalonsäure und anderer pathognomonischer Metabolite im Urin auch unter Behandlung wenig verändert bzw. fluktuiert stark und wird damit zur Überwachung der Stoffwechseleinstellung kaum angewandt.

Die Messung der freien Propionsäure und Methylmalonsäure im Plasma ist aussagekräftiger, erfordert jedoch eine venöse Blutentnahme und ist methodisch (vor allem die Bestimmung der Propionsäure) schwierig und kaum etabliert.

Die bei starken Stoffwechselentgleisungen auftretende Hyperammonämie kann durch Messung des Ammoniakspiegels nachgewiesen werden. Diese Messung ist ebenfalls aufwendig und wird meist nur bei stationären Aufenthalten durchgeführt.

Wendel et al. bestimmten ungeradzahlige Fettsäuren in der Erythrozytenmembran. Da ungeradzahlige Fettsäuren Propionyl-CoA als Primer haben, sind sie vor allem bei Patienten mit schlecht eingestellten Stoffwechsel erhöht (156).

Zum jetzigen Zeitpunkt existiert keine Methode, die bezüglich der Probengewinnung (möglichst zu Hause, ohne Arztbesuch) und Probenanalyse einfach und schnell durchführbar ist und eine Beurteilung der optimalen Stoffwechseleinstellung zulässt.

In der hier vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die Messung von Acylcarnitinen im Trockenblut mit Hilfe der Tandemmassenspektrometrie für ein Stoffwechselmonitoring geeignet ist. Für das bessere Verständnis folgt eine Beschreibung der Rolle des Carnitins und der Acylcarnitine im Stoffwechsel.

1.3 Carnitin und Acylcarnitine

1.3.1 Was ist Carnitin?

Carnitin (β -Hydroxy- γ -Triaminomethylaminobuttersäure) wurde im Jahre 1905 erstmals aus Fleischextrakt isoliert (52, 72), seine Struktur wurde 1927 aufgedeckt (139). 25 Jahre später wurde seine physiologische Funktion geklärt.

1952 berichtete Carter et al., dass Carnitin mit dem Wachstumshormon B_T identisch sei, welches beim Mehlwurm *Tenebrio molitor* als Wachstumsfaktor identifiziert wurde, und dessen Mangel zu einer tödlichen Verfettung des Mehlwurms führt (13, 14, 118).

Carnitin besitzt an seiner β -OH-Gruppe die Möglichkeit, Ester mit Karbonsäuren zu bilden. Diese Bindungen besitzen hohe Bindungsenergie, man nennt sie Acylcarnitine (AC) (17).

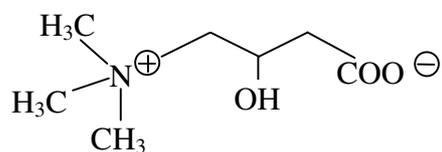


Abb. 4: Strukturformel L-Carnitin

1.3.2 Carnitinaufnahme

Carnitin wird dem Körper hauptsächlich über die Nahrung zugeführt. Es ist vor allem in tierischen Produkten, am meisten in Fleisch enthalten. Pflanzliche Produkte wie Reis und Soja enthalten Carnitin allenfalls in geringen Mengen (126).

Der menschliche Körper kann Carnitin aus den Aminosäuren Methionin und Lysin selbst synthetisieren (6). Neben diesen Aminosäuren wird noch zusätzlich Fe^{2+} , Vitamin C, Niacin und Pyridoxin benötigt (15). Man konnte feststellen, dass der Körper die Carnitineigensynthese bei durch die Nahrung ausreichenden Carnitinzufuhr einstellt (126).

Bei Neugeborenen ist Carnitin als Vitamin anzusehen, da die Desoxycarnitinhydroxylase, ein für die Carnitinsynthese nötiges Enzym, in diesem Alter nahezu inaktiv ist. Aus diesem Grund können Neugeborene, die nicht ausreichend Carnitin zugeführt bekommen, einen Mangel entwickeln (123).

Da die Carnitinkonzentration in den meisten Geweben höher ist als im Serum, muss von einer aktiven Carnitinaufnahme in das Gewebe ausgegangen werden. Die Carnitinaufnahme in die Zellen ist nicht immer gleich und ist von dem jeweiligen Hormon- und Stoffwechselstatus sowie von den einzelnen Organen abhängig (47).

Die täglich benötigte Carnitinmenge einer gesunden Person liegt bei $1,43 \mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht beim Erwachsenen und $11 \mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht bei Säuglingen (126).

1.3.3 Die Aufgaben des Carnitins

Die zuerst entdeckte Aufgabe des Carnitins ist der Transport von im Zytosol aktivierten langkettigen Fettsäuren (FS-CoA) in das Mitochondrium und die damit verbundene Bereitstellung zur β -Oxidation.

Die Reaktion der aktivierten Fettsäuren mit Carnitin findet mit Hilfe der Carnitin-Palmitoyl-Transferase I (CPT I) statt. Die so gebildeten Acylcarnitine werden durch die Carnitin-Acylcarnitintranslokase (T) im Austausch gegen freies Carnitin durch die Mitochondrienmembran transportiert. Im Mitochondrium wird Carnitin wieder regeneriert, indem die Fettsäuren durch die Carnitin-Palmitoyl-Transferase II (CPT II) auf CoA-SH übertragen werden. Carnitin gelangt durch die CPT I ins Zytosol, wo es erneut mit aktivierten Fettsäuren reagieren kann (125).

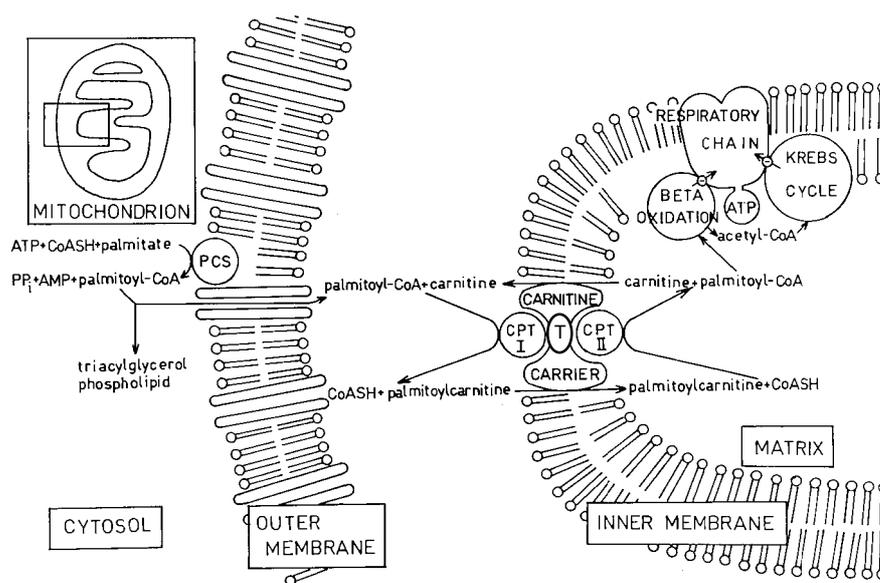


Abb. 5: Transport der langkettigen Fettsäuren vom Zytosol über die innere und äußere Mitochondrienmembran in das Mitochondrium CPT I: Carnitin-Palmitoyl-Transferase I, CPT II: Carnitin-Palmitoyl-Transferase II, T: Translokase (126)

Außerdem gibt es auch noch Transferasen für kurzkettige und mittelkettige Fettsäuren. Die Carnitin-Acetyl-Transferase (CAT) ist in der Lage, Acetylgruppen sowie andere CoA-Verbindungen von verzweigten und kurzkettigen Fettsäuren, die im Mitochondrium nicht verwertet werden können, auf Carnitin zu übertragen. Die so gebildeten Acetyl- und kurzkettigen Acylcarnitine können das Mitochondrium und die Zelle verlassen und über die Niere ausgeschieden werden. Damit findet eine Regeneration von CoA-SH statt (124). Carnitin ist darüber hinaus am Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren beteiligt sowie zur Membranstabilisierung notwendig.

1.3.4 Carnitinmangelzustände

Bei den Carnitinmangelzuständen unterscheidet man einen primären von einem sekundären Carnitinmangel. Der primäre Carnitinmangel wird wiederum in einen systemischen (Carnitinsynthesestörung) und einen myopathischen Mangel (zellulärer Aufnahmedefekt) unterteilt (124, 38). Der sekundäre Carnitinmangel kann durch vielfältige Ursachen entstehen: z.B. bei akuten Erkrankungen, bei gesteigertem renalen Verlust, vegetarischer Ernährung, längerfristiger parenteraler Ernährung u.s.w. In Kombination mit Stoffwechselerkrankungen wie z.B. bei Defekten der Atmungskettenenzyme, Dehydrogenasen und bei Organoazidopathien kommt ein sekundärer Carnitinmangel häufig vor (126).

1.3.5 Der Carnitinmangel bei der PPA und der MMA

Wie im Kapitel 1.1 erwähnt, führen diese beiden Erkrankungen zu einer Akkumulation von Propionyl-CoA im Mitochondrium. Auf Grund einer starken Instabilität des Methylmalonyl-CoA (R. Baumgartner, Basel, persönliche Mitteilung) sind bei einer MMA nur geringe Mengen an Methylmalonyl-CoA nachzuweisen, so dass Methylmalonylcarnitin nahezu nicht gebildet wird. Auch im Trockenblut ist Methylmalonylcarnitin mittels Tandemmassenspektrometrie bei Patienten mit MMA nur in Spuren nachweisbar (F. Trefz, persönliche Mitteilung). Carnitin reagiert mit Propionyl-CoA. Es entsteht Propionylcarnitin und CoA-SH. Das so gebildete Propionylcarnitin kann die Mitochondrienmembran passieren und wird über die Nieren ausgeschieden. Über diesen Weg ist der Organismus in der Lage, diese sich im Stoffwechsel anreichernden Acylcarnitine auszuscheiden. Bei der PPA wird bis zu 80 % der Propionsäure in Form von Propionylcarnitin ausgeschieden (22). Bei diesen Patienten entsteht auf diese Weise ein Carnitinverlust. Bei einer Stoffwechselsituation, in der besonders viel Carnitin zum weiteren Ausschleusen von Propionyl-CoA benötigt wird, stellt sich demzufolge ein sekundärer Carnitinmangel ein. Dies führt zu einer reduzierten Fettsäureaufnahme ins Mitochondrium und damit zu einer gestörten Energieproduktion der Zelle (105, 126).

1.3.6 Die verschiedenen Carnitinverbindungen im Blut und der Quotient AC/FC

Das im Plasma befindliche Carnitin kann eingeteilt werden in: freies Carnitin (FC), Acylcarnitin (AC) und Gesamtcarnitin (TC) ($TC = FC + AC$). Die AC wiederum können in kurzkettige, mittelkettige und langkettige AC unterteilt werden.

Durch die Betrachtung des Verhältniswertes AC/FC im Blut kann auf das Verhältnis Acyl-CoA/CoA-SH im Mitochondrium geschlossen werden, da beides im Gleichgewicht zueinander steht. Dadurch kann die intrazelluläre Stoffwechsellage einer Person gut beurteilt werden. Reichern sich im Mitochondrium Acyl-CoA-Gruppen an, ist der AC/FC-Quotient erhöht (129, 33). Normalerweise besteht das im Plasma enthaltene Carnitin zu 10 - 20 % aus AC, der Rest ist FC. Der AC-Anteil steigt bei den Organoazidurien auf einen Anteil von 30 - 100 % an (156). Die AC wiederum bestehen zu 20 % aus langkettigen und zu 80 % aus kurzkettigen AC (6). Der Anteil der kurzkettigen AC steigt bei den Organoazidurien ebenfalls erheblich an. Ein Quotient AC/FC kleiner als

0,4 findet man bei Gesunden (Durchschnitt: 0,25). Hierbei handelt es sich um einen bezüglich Stoffwechselveränderungen sehr empfindlichen Quotienten (17). Auch die Organoazidurien zeigen charakteristische Veränderungen dieses Quotienten. Durch die Erhöhung der AC-Konzentration bei gleichzeitigem Carnitinmangel liegt er meist über 1.

Der Quotient zeigt frühzeitig einen Zustand verminderter Carnitinverfügbarkeit an, da er erhöht ist, bevor eine reduzierte Serumcarnitinkonzentration nachgewiesen werden kann.

Laut Schwahn et al. sind 50 % aller propionsäurehaltigen Verbindungen Propionylcarnitin. Bekommt ein Patient Metronidazol, das die propionsäurebildenden Bakterien des Darms reduziert, steigt der Prozentsatz sogar auf 78 % an. Er postuliert die Hypothese, dass Propionyl-CoA, bei hohem Carnitingehalt, aus extrahepatischen Körperzellen vorwiegend als Propionylcarnitin renal ausgeschieden wird. „Hepatisch“ gebildetes Propionyl-CoA und die durch die Darmmukosa aufgenommene und von der Darmflora gebildete freie Propionsäure dagegen wird zu anderen Metaboliten (z.B. 3-Hydroxypropionat) umgewandelt (Informationsblatt: B. Schwahn 1998, Stoffwechsellagung Innsbruck).

1.3.7 Carnitinsubstitution

Zur Carnitinsubstitution sind Carnitinpräparate in Tropfenform, als Sirup, in Tablettenform sowie als Injektionslösung erhältlich. Man verwendet ausschließlich L-Carnitin, während man früher das D, L Racemat verwendete, das aber nachgewiesener Weise Mangelzustände verstärkt (90).

Carnitin kann bei sämtlichen Formen von Carnitinmangelzuständen eingesetzt werden. Es wurde beobachtet, dass sich die renale Carnitinausscheidung bei chronischer Gabe von 85 % auf 99,6 % erhöht. Dadurch besteht die Gefahr, dass bei Patienten nach plötzlichem Absetzen des Carnitins schwere Mangelzustände entstehen (126).

1.3.8 Carnitingabe bei Patienten mit MMA und PPA

Bei Patienten mit PPA und MMA geht man davon aus, dass eine Carnitingabe indiziert ist, weil dadurch die Bildung von 2-Methylzitat und 2-Methyl-3-Oxovalerian-Säure sowie von anderen Propionyl-CoA-Metaboliten zugunsten einer verstärkten Propionyl-

carnitinbildung reduziert wird. Die verminderte 2-Methyl-Zitrat-Bildung ist für den Patienten vorteilhaft, da durch 2-Methyl-Zitrat die Zitratsynthese, die Aconitase, die Isozitratdehydrogenase und die Phosphofruktokinase gehemmt werden. Dies kann zur gesteigerten Ketogenese und Hyperglyzinämie führen (18). Es wurde ebenfalls festgestellt, dass bei Patienten mit einer MMA die verstärkte Ketonkörperbildung unter einer Carnitingabe reduziert wird. Man vermutet, dass durch die vermehrte Propionylcarnitinbildung die den Zitratzyklus hemmenden Metabolite in geringerem Ausmaß entstehen, und somit ein normaler Energiestoffwechsel ablaufen kann (122, 160, 115). Die Effekte einer Langzeitgabe von 100 - 200 mg pro kg Körpergewicht pro Tag L-Carnitin zeigen sich in reduzierten Plasmatriglyzeriden, einer ungestörten Oxidation der langkettigen Fettsäuren und damit in einer verbesserten Energiegewinnung der Zelle. Die Patienten profitieren dadurch mit einem verstärkten Wachstum, einer Verbesserung des neurologischen Statuses, des Muskeltonuses und der Hautkonsistenz, einer erhöhte Proteinverträglichkeit sowie eine bessere Infektbeherrschung (47, 156). Das Auftreten ketoazidotischer Dekompensationen kann durch eine Carnitingabe nicht verhindert werden, Carnitin dient jedoch als „Stoffwechselfuffer“ und kann bis zu einem bestimmten Ausmaß Propionyl-CoA abfangen (18, 42).

1.3.9 Entwicklung der Acylcarnitinmessmethoden

Schon seit 1958 ist man bemüht, Carnitin sowie seine Ester zu bestimmen. Einen Überblick über die verschiedenen Methoden zur Acylcarnitinbestimmung liefert Tabelle 4. In Tabelle 5 sind die Vorteile der AC-Messung zur Diagnose und Therapieoptimierung beschrieben.

Tab. 4: Fortschritte und Weiterentwicklung der Acylcarnitinmessung (130, 36, 117, 148, 83, 48, 93, 66, 108, 91, 149)

Photometrische Methoden	Bromthymolblau als Farbreagenz für Carnitin. Reaktion mit Carnitinacyltransferase und anschließende Messung der enthaltenen Acylcarnitine und des freien Carnitins. Trennung in langkettige und kurzkettige Acylcarnitine möglich doch ungenau.
Dünnschichtchromatographie	Selektive Bestimmung von Octanoylcarnitin möglich.
HPLC-Technik (high performance liquid chromatography)	Einbau radioaktiver Isotope in die Acylcarnitine. Die gemessene Menge an Radioaktivität lässt Rückschlüsse auf die Verbindung zu, teuer und zeitaufwendig.
GC/MS-Verfahren (Gaschromatographie/ Massenspektrometrie)	Trennung der Probe mit Hilfe der Gaschromatographie, anschließende Messung durch die Massenspektrometrie, erstmals Messung aller Acylcarnitine möglich, doch zeitaufwendig und arbeitsintensiv.
MS/MS-Verfahren (Messung durch Tandemmassenspektrometrie)	Messung der Proben mit nur einem Messvorgang möglich. Einsatz im Neugeborenencreening.

Tab. 5: Vorteile der Acylcarnitinmessung

Forderungen an die Acylcarnitinmessung:	Nutzen :
<ul style="list-style-type: none"> • Konzentrationsbestimmung der einzelnen Acylcarnitine, mit hoher Sensitivität und Spezifität. • Zeit zwischen Probenentnahme und Messergebnis muss gering gehalten werden. • Preisgünstige und automatisierte Messung. • Messung der Acylcarnitine im Blut und nicht im Urin. 	<ul style="list-style-type: none"> • Stoffwechselerkrankungen können voneinander unterschieden werden. Exakte Konzentrationsbestimmung für Therapiekontrolle wichtig. • Bei Stoffwechseldekompensationen muss das Ergebnis rasch vorliegen, damit eine adäquate Therapie schnell durchgeführt werden kann. • Kosten dürfen das Budget nicht überschreiten. • Ergebnisse sind trotz Nahrung und Medikamentengabe sowie Ketonkörperausscheidung bei Entgleisung geringen Schwankungen unterworfen.

2 Aufgabenstellung und Ziele

Ziel dieser Untersuchung soll sein, mit Hilfe einer besseren Methode zur Überprüfung der Stoffwechselsituation die Behandlung von Patienten mit PPA und MMA zu verbessern und damit Lebenserwartung, Lebensqualität und geistige Entwicklung dieser Patienten zu steigern.

Die Fragestellungen sind im Einzelnen:

- 1) Wie verhalten sich freies Carnitin und Acylcarnitine bei gesunden Probanden unter verschiedenen Bedingungen?
- 2) Eignet sich die beim Neugeborenen screening etablierte Methode der Messung der Acylcarnitine mit Hilfe der Tandemmassenspektrometrie zur quantitativen Bestimmung des Propionylcarnitins im Blut?
- 3) Ist die Konzentration des Quotienten Propionylcarnitin/ Palmitoylcarnitin (C_3/ C_{16}), zur Überwachung der medikamentösen und diätetischen Behandlung von Patienten mit PPA und MMA geeignet?

3 Materialien und Methodik

3.1 Chemikalien und Lösungen

Im Folgenden werden die zur Bestimmung der AC nötigen Chemikalien aufgelistet:

Tab. 6: Für die Herstellung des „Daily Working Standard“ verwendete deuterierte Acylcarnitine

NeoGen Screening, Inc. Pittsburg, USA	- D9-Carnitin - D3-Acetylcarnitin - D3-Propionylcarnitin - D3-Butyrylcarnitin	- D9-Isovalerylcarnitin - D3-Octanoylcarnitin - D9-Myristoylcarnitin - D3-Palmitoylcarnitin
------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------

Der „Daily Working Standard“ wird hergestellt, indem die acht oben genannten mehrfach deuterierten AC, wie in der Anleitung der Firma NeoGen beschrieben, in 1 ml eines Methanol zu Wasser-Gemisches (im Verhältnis 1:1) gelöst und dann mit Methanol im Verhältnis 1:100 verdünnt wird.

Tab. 7: Weitere für die Bestimmung der Acylcarnitine nötige Chemikalien

Sigma Aldrich St. Louis, USA	-Methanol, 99,9 + % HPLC-grade -Acetonitril 99,93 % HCLP-grade -Wasser HPLC grade
Fluka Buchs, Schweiz	-Ameisensäure p.a. ca 98 % -Trifluoressigsäure p.a. ca. 98 %
Regis Technologies Inc. Morton Grove, USA	-3 N HCL in n-Butanol

3.1.1 Testsubstanzen

Für die Probandenstudie wurde Biocarn Sirup der Firma Medice verwendet. In 3,3 ml des Sirups ist 1 g L-Carnitin enthalten.

Für den Glucosetoleranztest wurde die Glukoselösung Dextro® O.G-T. der Firma Roche verwendet. In dieser Glukoselösung sind in 300 ml Lösung 75 g wasserfreie Glukose enthalten.

3.1.2 Geräte

Für die Aufbereitung der Proben werden folgende Geräte verwendet:

- Lochstanze, 3 mm Durchmesser, Fa. Sauer, Hannover
- Verdampfer mit Heizblock, 32 Plätze, Fa. Liebisch, Bielefeld
- Umluftschrank, Heraeus

Für die Analytik werden folgende Geräte verwendet:

- Tandem-Massen-Spektrometer, Perkin Elmer Sciex, API 365 MS/MS
- Autosampler, Perkin Elmer, Typ 200
- binäre Pumpe, Perkin Elmer, Typ 200
- 2-Kanal Degasser, Perkin Elmer, Typ 200

3.2 Bestimmung des freien Carnitins und der Acylcarnitine

3.2.1 Funktionsweise des Tandemmassenspektrometers

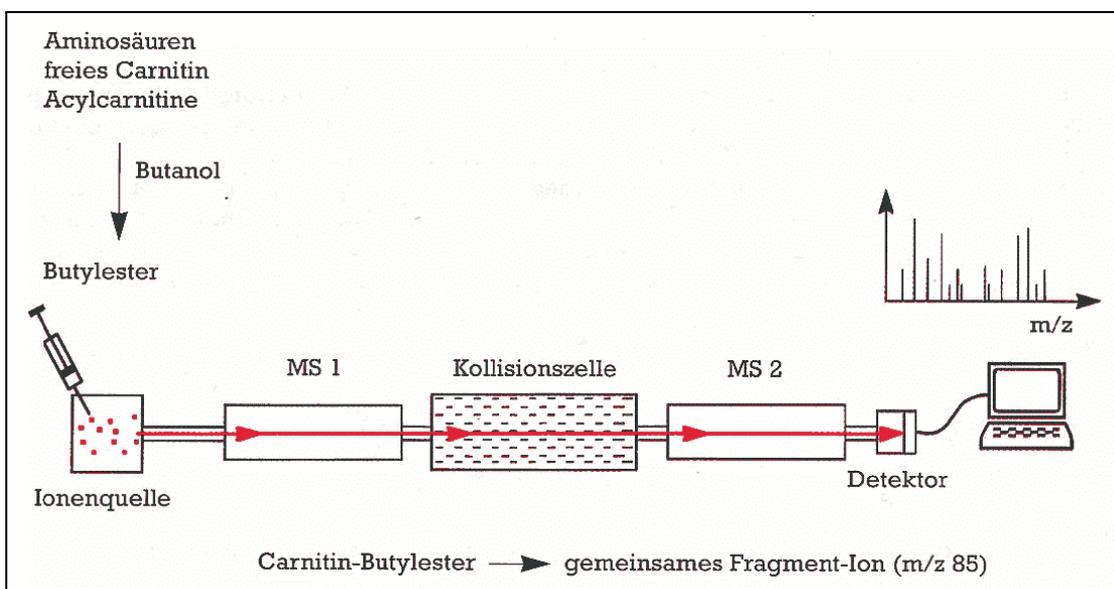


Abb. 6: Darstellung der Funktionsweise des Tandemmassenspektrometers mit der Methode Precursor 85. m/z : Verhältnis Masse/ Ladung (80)

Die Proben werden nach der Injektion zunächst ionisiert. Der erste Quadrupol Q_1 (MS 1), an dem Gleich- und Wechselspannung anliegen, dient als erster Messquadrupol zum Scannen der Ionen. An ihm wird ein bestimmtes Verhältnis von Masse zu Ladung

(m/z) eingestellt, und nur Ionen, die diese Bedingung erfüllen, können ihn passieren. An dieser Stelle des Verfahrens findet eine Trennung der Ionen statt.

Der zweite Quadrupol Q_2 stellt die Kollisionszelle dar, die mit einem Inertgas (meist N_2) gefüllt ist. Hier werden die selektierten Ionen durch Kollision mit Gasatomen einer Fragmentierung unterworfen.

Der dritte Quadrupol Q_3 (MS 2) wiederum ist ein Messquadrupol, der die Massen-/ Ladungsverhältnisse der entstandenen Ionen misst. Hier findet nun eine Trennung nach Strukturmerkmalen der Ionen statt (83, 48, 93, 80). Bei der späteren, durch einen Computer erfolgten Auswertung, erhält man ein Spektrum vieler den jeweiligen Massen zugeordneten Peaks (siehe Abb.7).

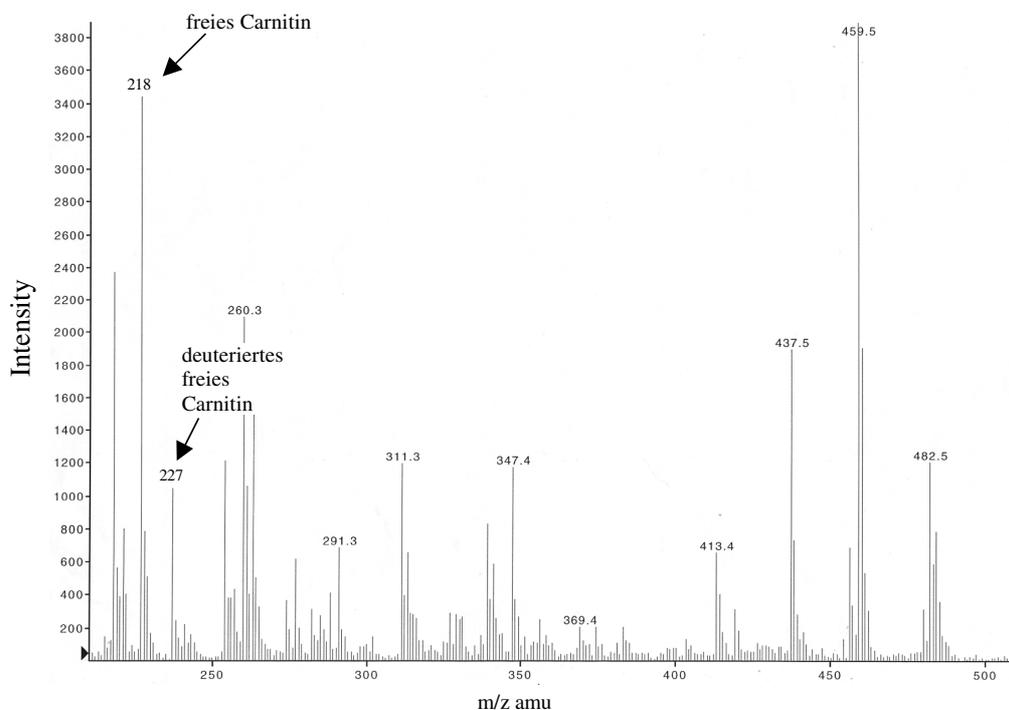


Abb. 7: Acylcarnitinprofil eines Stoffwechselgesunden. Markierung bei den Intensitäten: 218: freies Carnitin; 227: deuteriertes freies Carnitin. Berechnung der Konzentration des freien Carnitins durch Vergleich der gemessenen Intensität des in der Probe vorhandenen freien Carnitins mit der gemessenen Intensität des zugesetzten Standards.

Die AC, die in dem den Proben beigefügten deuterierten Standard enthalten sind, besitzen eine um drei bzw. neun Masseneinheiten größere Masse als die zu messende Probe. Die tatsächliche Konzentration kann nun mit Hilfe eines Computers errechnet werden, indem man die Höhe der Peaks des von der Menge her genau bekannten Standards mit

der Probe vergleicht und daraus die in der Probe enthaltene AC-Konzentration bestimmt.

Man kennt für das TMS vier verschiedene Messmodi: die Produkt-Ionen-Analyse, die Vorläufer-Ionen-Analyse (Precursor), die Neutralabspaltungsanalyse und die multiple reaction monitoring Analyse (MRM-Analyse).

Es soll nun auf die Besonderheiten der bei dieser Arbeit verwendeten Methoden näher eingegangen werden:

Die **Vorläufer-Ionen-Analyse (Precursor 85)** wird eingesetzt, wenn bei allen Substanzgruppen ein gemeinsames Fragment abspalten wird. Dabei werden die Ionen des gesamten Meßbereichs durch Q_1 transferiert und gelangen alle in die Kollisionszelle Q_2 . Der Detektor Q_3 wiederum ist auf eine ganz spezifische Fragmentmasse eingestellt und registriert nur Signale, die dieser Fragmentmasse entsprechen.

Die **MRM-Analyse** hingegen besitzt die höchste Präzision und Empfindlichkeit, da bei ihr Q_1 und Q_3 auf eine ganz bestimmte Masse eingestellt werden. Hierdurch kann nur eine geringe Anzahl an Verbindungen in einem Lauf quantifiziert werden (48, 83). Durch die nun geringere Zahl an Substanzen kann die Scanzeit verlängert und damit die Anzahl der Scans erhöht werden.

3.3 Probengewinnung

Die Probengewinnung erfolgte bei den Probanden über eine kapillare Blutentnahme mit Hilfe einer Einmallanzette. Bei den Patienten erfolgte die Blutentnahme mit Hilfe eines Softclix® der Firma Roche Diagnostics Hestia Pharma, Mannheim.

Anschließend wurden zwei Kreise einer Guthriekarte (Trockenblutkarte) der Firma Schleicher & Schuell® mit Blut ausgefüllt. Anschließend wurde die Karte aufrecht stehend an der Luft getrocknet, in einen Briefumschlag gegeben und an das ZfS Reutlingen (Zentrum für Stoffwechselerkrankungen) geschickt.

Für die Probandenstudie 5 und 6 wurde zusätzlich venöses Blut aus einer Armvene entnommen.

3.4 Beschreibung der Probenaufbereitung

3.4.1 Quantifizierung der Acylcarnitine im Trockenblut

Die Probenaufbereitung aus dem Trockenblut erfolgte nach folgendem Schema:

1. Ein Kreis aus einer Trockenblutkarte ausstanzen (Stanze $\varnothing = 3$ mm) und in ein Eppendorfcup geben.
2. 100 μ L „Daily Working Standard“ dazupipettieren.
3. 20 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler extrahieren.
4. Die gesamte Lösung in ein Autosamplervial überführen.
5. Die Lösung unter Stickstoffstrom bei 45° C vollständig verdampfen (ca.10min).
6. 60 μ L HCl * n-Butanol (c = 3.0 mol/L) zugeben und mischen.
7. 20 min bei 65° C im Wärmeschrank mit Lüfter derivatisieren.
8. HCl * n-Butanol unter Stickstoffstrom bei 45° C sofort verdampfen.
9. 200 μ L mobile Phase dazugeben (50 % ACN + 50 % HPLC-Wasser +0,025 % Ameisensäure).
10. Die Probe erneut mischen.

Für die Probandenstudie 6 musste das venös entnommene Blut in seine zellulären Bestandteile und in Blutserum aufgetrennt werden, bevor die so gewonnenen Bestandteile auf die Trockenblutkarte aufgetropft werden konnten und die Acylcarnitine dort bestimmt werden konnten (nach C. Gille (46)).

3.4.2 Quantifizierung der Acylcarnitine in den zellulären Blutbestandteilen

Für die Messung der zellulären Blutbestandteile wurden 100 μ l EDTA-Blut in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß in 1000 μ l PBS aufgenommen und für 2 Minuten bei 200 g (Heraeus: 1500 rpm) pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Diese Schritte wurden drei Mal durchgeführt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 100 μ l aufgefüllt. Durch dieses Verfahren war in der so gewonnenen Lösung die gleiche Menge an zellulären Blutbestandteilen enthalten wie zuvor im Vollblut. Von dieser Lösung wurden 6 μ l auf eine Trockenblut-

karte pipettiert. Zur weiteren Probenaufbereitung wurde jeweils ein mit 6 µl zellulären Bestandteilen durchtränkter Anteile der Trockenblutkarte ausgeschnitten und wie im Kapitel 3.4.1 beschrieben weiterverarbeitet.

3.4.3 Quantifizierung der Acylcarnitine im Serum

Für die Quantifizierung des Serums wurde venöses Blut in einem Serumröhrchen vom Institut für Labormedizin der Universitätsklinik Tübingen abzentrifugiert. Von dem so gewonnenen Serum wurden mehrfach 6 µl auf eine Trockenblutkarte getropft und nach dem Trocknen jeweils ein durchtränkter Anteil der Trockenblutkarte ausgeschnitten und wie oben beschrieben weiterverarbeitet. Ebenso wurde mehrfach 6 µl venöses Blut auf eine weitere Trockenblutkarte pipettiert und diese Trockenblutkartenbereiche ebenfalls ausgeschnitten. Eine Stanze ($\varnothing = 3$ mm) einer durchtränkten Trockenblutkarte entspricht einer Blutmenge von 1,5 µl. Da in Studie 6 somit die vierfache Blutmenge verwendet wurde, wurde auch die vierfache Menge an Standard zugegeben. Die ermittelten Ergebnisse wurden nach der Messung durch vier geteilt, damit das Ergebnis quantitativ mit den zuvor ermittelten Ergebnissen verglichen werden konnte.

3.5 Die Probenanalyse

3.5.1.1 Die Precursor 85 Methode

Für die Vergleichsgruppenstudie wurde nach der Methode Precursor 85 gearbeitet, die ansonsten im Neugeborenen-Screening Anwendung findet. Bei dieser Methode werden die nach der Probenaufbereitung erhaltenen Acylcarnitinbutylester, die in gelöster Form vorliegen, mit Hilfe des Ionensprayers zu Ionen desolvatisiert. In der Kollisionszelle verlieren nun diese Ionen bei ihrer Kollision mit Stickstoff das geladene Fragment mit der Masse 85 Dalton (siehe Abb. 6).

Der Quadrupol 1 scannt 17 Mal in einem Zeitraum von 25 ms von der Masse 210 bis 510, während Quadrupol 3 konstant auf die Masse 85 eingestellt ist und somit auch nur diese Masse bestimmt. Mit dieser Methode können sämtliche AC quantitativ erfasst werden. Insgesamt dauert die Messung einer Probe 2,5 min. Bei diesem Verfahren werden FC sowie AC mit einer Kohlenstofflänge von zwei (Acetylcarnitin) bis 18 C-Atomen gemessen. Neben dem freien Carnitin werden die im Kapitel 3.5.1.2 beschriebenen AC sowie noch 25 weitere AC quantifiziert.

3.5.1.2 Besonderheiten der MRM-Methode

Bei der MRM-Methode, die für die Messung der Proben der MMA- und PPA-Patienten verwendet wurde, werden nur wenige relevante Verbindungen bestimmt. Q₁ und Q₂ werden hierfür auf die folgenden Massen eingestellt:

Freies Carnitin, Acetylcarnitin (C₂), Propionylcarnitin (C₃), Butyrylcarnitin (C₄), Isovalerylcarnitin (C₅), Myristoylcarnitin (C₁₄), sowie Palmitoylcarnitin (C₁₆).

3.6 Die Validierung der Messungen des Tandemmassenspektrometers

Eine Validierung des verwendeten Gerätes und der Methode führte M. Göggerle im Rahmen seiner Diplomarbeit durch (48). Für die gemessenen AC und das FC konnte eine hohe Linearität nachgewiesen werden. Außerdem konnte er zeigen, dass die Precursor 85-Methode für ein allgemeines Screening gute Ergebnisse liefert und man mit Hilfe dieses Verfahrens innerhalb kurzer Zeit ein großes Spektrum an AC bestimmen kann. Sollen jedoch nur wenige AC bestimmt werden, kann mit der MRM-Methode eine höhere Messgenauigkeit erzielt werden.

Tab. 8: Vergleich der Messung der Linearität der Acylcarnitine mit der Precursor 85 und MRM-Methode durch das Tandemmassenspektrometer (48).

Substanz	Freies Carnitin	Acetylcarnitin	Propionylcarnitin	Butyrylcarnitin	Octanoylcarnitin	Myristoylcarnitin	Palmitoylcarnitin
Bereich der Linearität (pmol/ml)	10,5-682	4,2-112	4,4-274	0,4-2,25	0,02-0,6	0,03-2,1	0,22-17,5
Korrelation (r ²) Precursor 85	0,9991	0,9992	0,9996	0,9700	0,9920	0,9970	0,9990
Korrelation (r ²) MRM	0,9985	0,9998	0,9997	0,9871	0,9991	0,9962	0,9992

Eine hohe Sensitivität und Spezifität ebenso wie eine gute Reproduzierbarkeit, konnten auch von Vreken et al. nachgewiesen werden (149).

3.6.1.1 Einfluss der Lagerung auf die Proben

Nach Beendigung der Studie wurden die AC in den Trockenblutkarten der Patienten 1 und 3 nochmals nachgemessen. Es sollte hierbei überprüft werden, ob nach einem Zeitraum von einem bis neun Monaten zwischen der Blutabnahme und der Nachmessung

die AC in den Trockenblutkarten stabil sind, und ob die Ergebnisse mit den zuvor gemessenen Ergebnissen vergleichbar sind.

3.7 Untersuchung bei Gesunden und Patienten mit PPA und MMA

3.7.1 Untersuchung bei Patienten

Insgesamt haben sich 14 Patienten und ihre Eltern bereit erklärt, an dieser Studie teilzunehmen. Von diesen 14 Patienten wurde bei fünf Patienten die Diagnose MMA und bei neun die Diagnose PPA gestellt. Auf die Patienten sowie auf ihre Krankengeschichte wird im Kapitel 3.7.1.1 eingegangen. Die Eltern wurden über das Vorgehen, den möglichen Nutzen sowie den für sie entstehenden Aufwand informiert. Sie unterzeichneten eine Einverständniserklärung. Das Protokoll der klinischen Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen geprüft und genehmigt und erfüllt die Deklarationen von Helsinki von 1975.

Zu einem festgelegten Zeitpunkt wurde die Studie begonnen, die wie folgt aussah:

Die Eltern der Patienten wurden telefonisch an einem vereinbarten Wochentag alle zwei Wochen bzw. bei den Patienten 1 und 3 jede Woche, über die Befindlichkeit Ihrer Kinder in einem strukturierten Interview befragt. Die so gewonnenen Informationen wurden in einem dafür vorgefertigten, standardisierten Fragebogen festgehalten (siehe Abb. 8).

Am selben Tag erfolgte eine kapillare Blutentnahme durch die Eltern, die möglichst an allen Tagen zur selben Zeit erfolgen sollte. Die Blutentnahme sollte möglichst vor den Mahlzeiten und vor der Biocarngabe erfolgen (Halbnüchternwert).

Telefonischer Patientenfragebogen			
<u>Patient:</u>		<u>Datum:</u>	
Einschätzung des Allgemeinzustands:	gut <input type="radio"/>	mittel <input type="radio"/>	schlecht <input type="radio"/>
Körpertemperatur	normal: $\leq 37,4$ <input type="radio"/>	subfebril: ($37,4 < x < 38,5$) <input type="radio"/>	Fieber $\geq 38,5$ <input type="radio"/>
Erbechen	kein <input type="radio"/>	wenig (1mal) <input type="radio"/>	häufig <input type="radio"/>
Infektzeichen	keine <input type="radio"/>	wenig <input type="radio"/>	viel <input type="radio"/>
Hautveränderungen (Ekzeme)	keine <input type="radio"/>	leicht <input type="radio"/>	stark <input type="radio"/>
Stühle	normal <input type="radio"/>	Obstipation <input type="radio"/>	Diarrhoe <input type="radio"/>
Nahrungsaufnahme (Aufnahme)	alles <input type="radio"/>	wenig/ Eiweißreduktion <input type="radio"/>	nichts <input type="radio"/>
Gewicht	Zunahme <input type="radio"/>	keine Veränderung <input type="radio"/>	Abnahme <input type="radio"/>
Krankenhaus	nein <input type="radio"/>		ja <input type="radio"/>
Stoffwechseldekompensation	nein <input type="radio"/>		ja <input type="radio"/>
<u>Bei Infekten/ Dekompensationen:</u>	seit wann? welche Symptome? welche Medikation? Antibiotikagabe?		
<u>Bei Krankenhausaufenthalt:</u>	warum? seit wann? Therapie		
<u>Bei schlechtem Allgemeinzustand:</u>	Auffälligkeiten:		
<u>Entwicklungsfortschritte?</u>	Welche?		
<u>Sonstiges:</u>			
Seit dem letzten Anruf Besonderheiten (Infekte, Krankenhausaufenthalte)? Wann? Dauer?			
Medikamente:	Name:	Dosierung:	Dauer:
Antibiotika:			
Biocarn:			
sonstiges:			
Ernährung			
AS-Mischung (OS 2, IMTV 2)	<input type="text"/>	g / Tag	
nat. Eiweiß	<input type="text"/>	g / Tag	
Kalorienmenge	<input type="text"/>	Cal. / Tag	
Besonderheiten:			

Abb. 8: Telefonischer Patientenfragebogen zur Evaluation des klinischen Zustandes

3.7.1.1 Übersicht über die untersuchten Patienten

Es bestand nicht die Möglichkeit, die Patienten selbst zu untersuchen, so dass sich die hier dargestellten Epikrisen auf Angaben aus Krankengeschichten beziehen. Eine Zusammenfassung dieser Epikrisen gibt Tabelle 9 und 10.

Patienten mit einer PPA

Patientin 1

Bei Studienbeginn war die Patientin vier Jahre alt. Ihre Eltern sind deutscher Abstammung und nicht miteinander verwandt. Nach unauffälliger Schwangerschaft und Geburt (Geburtsgewicht: 4090 g, Länge: 56 cm) litt die Patientin in der 6. Lebenswoche unter massivem Erbrechen. Nach parenteraler Aminosäure- und Glukosegabe wurde sie komatös. Auf Grund eines für eine PPA typischen Ausscheidungsmusters an Metaboliten im Urin wurde eine PPA diagnostiziert.

Die Größe der Patientin lag in den ersten Lebensjahren auf der dritten Perzentile, zu Studienbeginn (vier Jahre) befand sie sich auf der 25. Perzentile. Das Gewicht, das zu Beginn auf der 25. Perzentile lag, befand sich zu Studienbeginn auf der 50. Perzentile. Das Mädchen hat eine an Taubheit grenzende Schwerhörigkeit. Die sprachliche und geistige Entwicklung war mit vier Jahren um ein Jahr verzögert. Außerdem leidet sie an einer stark ausgeprägten Hypotonie. Sie besucht einen Behindertenkindergarten. In ihrem ersten Lebensjahr hatte sie zwei Fieberkrämpfe und einen Grand mal Anfall im fieberfreien Zustand.

Die Patientin wird nachts und am Morgen sondiert. Sie erhält 1,2 g pro kg Körpergewicht pro Tag natürliches Eiweiß sowie 0,6 g pro kg Körpergewicht pro Tag einer Aminosäuremischung (IMTV/OS2).

Sie hatte zwei Stoffwechsellentgleisungen, die im Krankenhaus behandelt werden mussten. In ihrem ersten Lebensjahr war die Patientin sehr in sich zurückgezogen. Eine Besserung trat auf, nachdem sie ein Hörgerät bekam. Nun ist sie aufgeschlossener und interessierter.

Die Eltern zeigen eine sehr gute Compliance.

Patient 2

Zu Studienbeginn war der Junge siebeneinhalb Jahre alt. Seine Eltern sind beide türkischer Abstammung und drittgradig miteinander verwandt. Nach unauffälliger Schwangerschaft und Geburt (Geburtsgewicht: 3710 g, Länge: 51 cm) wurde die Erkrankung am dritten Lebenstag diagnostiziert, da in dieser Familie schon drei weitere Kinder an einer PPA verstorben waren und man deshalb das Neugeborene gezielt untersucht hatte. Der Patient ist geistig retardiert und besucht eine Körperbehindertenschule. Er hat Schwierigkeiten mit der Feinmotorik, kann beispielsweise nicht malen, sowie eine starke muskuläre Hypotonie. Er wächst zweisprachig auf, spricht türkisch und deutsch, letzteres jedoch nur schlecht und stotternd. Bis zum dritten Lebensjahr erkrankte der Patient häufig an Infekten. Vom vierten bis zum siebten Lebensjahr musste der Patient wegen rezidivierendem Erbrechen und Infekten sehr häufig stationär behandelt werden. Er war in diesen Jahren nur insgesamt vier Monate zu Hause.

Zur Verbesserung seiner Stoffwechseleinstellung wurde er mit sieben Jahren in einer anderen Klinik vorgestellt. Es wurde eine PEG angelegt und das Diätregime optimiert. Seither erhält er 0,8 g pro kg Körpergewicht pro Tag natürliches Eiweiß und 0,3 g pro kg Körpergewicht pro Tag einer Aminosäuremischung (IMTV/OS2). Die Größe des Patienten bewegte sich bis Ende des zweiten Lebensjahrs auf der 20. Perzentile, bis zum Studienbeginn (siebeneinhalb Jahre) lag die Größe auf der dritten Perzentile. Das Gewicht lag auf der 90. Perzentile.

Auf Grund der häufigen parenteralen Versorgung im Rahmen von Stoffwechsellösungen und der schlechten Venenverhältnisse wurde ein Port gelegt. Da er an einer Gerinnungsstörung leidet und deshalb schon Thrombosen sowie eine Lungenembolie hatte, wird der Junge mit Marcumar behandelt. Außerdem erhält er eine Wachstumshormonsubstitution. Seine intellektuelle Entwicklung entsprach mit sieben Jahren der eines etwa drei- bis vierjährigen Kindes. Die Eltern zeigen eine gute Compliance.

Patient 3

Zu Studienbeginn war der Patient 18,5 Jahre alt. Seine Eltern sind beide türkischer Abstammung und drittgradig miteinander verwandt. Die Erkrankung wurde bereits durch eine Fruchtwasseruntersuchung diagnostiziert, die durchgeführt wurde, weil ein Ge-

schwisterkind an dieser Erkrankung verstorben war. Die Schwangerschaft und Geburt verliefen unproblematisch (Geburtsgewicht: 4120 g, Länge: 50 cm).

Die ersten Lebensjahre waren durch häufige Krankenhausaufenthalte auf Grund rezidivierender Infekte und Erbrechen gekennzeichnet. Der Patient hat eine muskuläre Hypotonie sowie eine leichte Ataxie. Geistig habe sich der Patient bis zum zwölften Lebensjahr recht gut entwickelt, konnte lesen, schreiben und rechnen. Nach dem zwölften Lebensjahr sei seine geistige Entwicklung rückläufig gewesen. Bei einer MRT-Untersuchung konnte man eine Hirnatrophie feststellen. Im Alter von inzwischen 20 Jahren ist er in einer Werkstatt für Behinderte tätig. Seit dem 13. Lebensjahr leidet er außerdem unter einer Verringerung der Knochendichte sowie unter Seh- und Hörstörungen und ist mit einer Brille und einem Hörgerät versorgt. Er war schon immer kleinwüchsig und ist seit dem Wachstumsende 1,57 cm groß und 58 kg schwer. Der Stoffwechsel des Patienten entgleiste häufig und der Patient wies bis zum Ende seines 18. Lebensjahres 80 Krankenhausaufenthalte auf.

Bis zum Ende des fünften Lebensjahrs wurde der Patient dauerhaft sondiert, bis zum siebten Lebensjahr nach Bedarf. Im Studienzeitraum verlief die Nahrungsaufnahme relativ unproblematisch. Zu Beginn der Studie nahm er 0,5 g pro kg Körpergewicht natürliches Eiweiß sowie 0,6 g pro kg Körpergewicht einer Aminosäuremischung (IMTV/OS2) zu sich.

Er verhält sich eher kindlich, ist freundlich und aufgeschlossen. Er lebt nach wie vor in der Familie. Diese ist teilweise mit der Situation sehr überfordert, so dass eine gute Compliance nicht immer gewährleistet ist.

Patientin 4

Zu Studienbeginns war die Patientin vier Jahre alt. Die Eltern des Mädchens sind deutscher Abstammung und nicht miteinander verwandt. Nach unauffälliger Schwangerschaft und Geburt (41. SSW, Geburtsgewicht: 4200 g; Länge: 53 cm) verweigerte das Neugeborene die Nahrung und wurde somnolent. Es zeigte sich ein massiver Gewichtsverlust, eine zunehmende muskuläre Hypotonie sowie ein stark erhöhter Ammoniakwert ($>1600 \mu\text{g/l}$). Auf Grund der im Urin bestimmten Metabolite wurde eine PPA diagnostiziert.

Die Patientin hat immer wiederkehrende schwere Infekte und Entgleisungen, die häufig mit einem Exanthem im Gesicht einhergehen. Sie zeigte mit vier Jahren eine psychomotorische Retardierung sowie ein ataktisches Gangbild. Das Mädchen besucht einen Behindertenkindergarten. Die Größe, die sich bis zum Ende des zweiten Lebensjahrs auf der 50. Perzentile bewegte, fiel bis zum Zeitpunkt des Studienbeginns auf die 25. Perzentile ab. Das Gewicht lag bei Studienbeginn zwischen der 75. und 95. Perzentile.

Auf Grund massiver Essprobleme wurde bei dem Mädchen im Alter von dreieinhalb Jahren eine PEG gelegt und die Nahrung seither darüber sondiert. Sie erhält 0,9 g pro kg Körpergewicht pro Tag natürliches Eiweiß sowie 0,8 g pro kg Körpergewicht einer Aminosäuremischung (IMTV/OS2).

Die Eltern sind mit der Situation überfordert.

Patient 5

Bei Studienbeginn war der Patient fünf Monate alt. Die Eltern sind beide türkischer Abstammung und zweitgradig miteinander verwandt. Nach unauffälliger Schwangerschaft wurde das Kind in der 41. Schwangerschaftswoche über eine Sectio caesarea auf Grund eines pathologischen CTG entbunden (Geburtsgewicht: 3575 g; Länge: 54 cm). Der Junge zeigte keine suffiziente Eigenatmung und musste künstlich beatmet werden. Eine PPA wurde im Alter von drei Wochen über die Bestimmung des Propionylcarnitins im Trockenblut diagnostiziert, als der Junge Ammoniakkonzentrationen über 1000 $\mu\text{mol/l}$ zeigte und ein leichtes Hirnödem aufwies.

Bald nach der Geburt zeigte er eine muskuläre Hypotonie, die sich bis zum Alter von fünf Monaten gebessert hatte. Er war zu diesem Zeitpunkt leicht entwicklungsverzögert. Die Größe bewegte sich auf der 75. Perzentile, das Gewicht auf der 50. Perzentile.

Sondiert wurde er nur in den ersten Lebenswochen. Der Patient erhält 1,4 g/kg Körpergewicht und Tag natürliches Eiweiß sowie 0,7 g/kg Körpergewicht und Tag einer Aminosäuremischung (IMTV/OS2).

Die Eltern sind sehr bemüht.

Patient 6

Bei Studienbeginn war der Patient sieben Jahre alt. Die Eltern sind beide türkischer Abstammung und zweitgradig miteinander verwandt. Nach unauffälliger Schwangerschaft

und Geburt fiel er in der ersten Lebenswoche auf, als er bei einem Ammoniakwert von 600 $\mu\text{mol/l}$ komatös wurde.

Seine Größe bewegte sich im Alter von sieben Jahren oberhalb der 97. Perzentile und sein Gewicht lag zwischen der 90. und 97. Perzentile. Bei diesem Patienten liegt eine psychomotorische Retardierung vor. Er besucht einen Sonderkindergarten und hat Koordinationsprobleme. Er ist in seinem Verhalten hyperaktiv.

Soniert werden muss er nur bei Stoffwechselkrisen. Als Säugling erhielt er 1,5 g pro kg Körpergewicht natürliches Eiweiß pro Tag, während der Studie 0,8 g pro kg Körpergewicht natürliches Eiweiß pro Tag, dazu 0,6 g pro kg Körpergewicht einer Aminosäuremischung (IMTV/OS2). Der Patient erhält als zusätzliche Medikation das Antibiotikum Metronidazol, im Rhythmus: zehn Tage Einnahme, 20 Tage Pause.

Bis zum Beginn der Studie hatte der Patient 20 Stoffwechselentgleisungen, die immer im Krankenhaus behandelt werden mussten. Der Junge ist durch seine geistige Retardierung und seinen Bewegungsdrang schwer zu führen.

Patientin 7

Zum Zeitpunkt des Studienbeginns war die Patientin elfeinhalb Jahre alt. Die Eltern sind beide deutscher Abstammung und nicht miteinander verwandt. Nach unauffälliger Schwangerschaft und Geburt (38. SSW, Geburtsgewicht: 3800 g, Länge: 56 cm), verweigerte die Patientin jegliche Nahrung und entgleiste am zweiten Lebenstag. Die Diagnose einer PPA wurde aber erst in der fünften Lebenswoche durch die Messung der pathologisch erhöhten Metabolite im Urin im Rahmen einer weiteren Entgleisung gestellt.

Die psychomotorische Entwicklung verlief sehr verzögert. Die Patientin zeigte außerdem ein nässendes, schuppendes, makulopapulöses Exanthem. Sie war stark minderwüchsig. Im Alter von neun Jahren lag sie zehn Zentimeter unterhalb der dritten Perzentile. Als sie im Alter von neun Jahren Wachstumshormone bekam (2,5 E/Tag) stieg ihr jährliches Wachstum von drei auf neun Zentimeter, und sie lag zu Beginn der Studie nur noch fünf Zentimeter unter der dritten Perzentile. Der Hautzustand verbesserte sich ebenso wie die psychomotorische Entwicklung. Die Patientin, die vor der Wachstumshormongabe acht Mal entgleiste, entgleiste seither nicht mehr. Das Mädchen war im Alter von elfeinhalb in der fünften Klasse einer Förderschule und hat ein Schuljahr wie-

derholt. Zum Zeitpunkt des Studienbeginns konnte sie flüssig sprechen, hatte aber erhebliche Schwierigkeiten beim abstrakten Denken und im Umgang mit Zahlen.

Bis zum Ende ihres fünften Lebensjahrs wurde die Patientin ausschließlich sondiert. Seither isst sie, doch mit wenig Begeisterung. Die Patientin erhält 0,8 g pro kg Körpergewicht pro Tag natürliches Eiweiß sowie 1 g pro kg Körpergewicht pro Tag einer Aminosäuremischung (IMTV/OS2).

Der soziale Hintergrund ist sehr gut. Die Eltern sind inzwischen eher großzügig in der diätetischen Behandlung.

Patient 8

Bei Studienbeginn war der Patient zwei Jahre alt. Die Eltern des Jungen sind deutscher Abstammung und nicht miteinander verwandt. Nach unauffälliger Schwangerschaft und Geburt (41. SSW, Geburtsgewicht: 3230 g, Länge: 50 cm) fiel der Patient erstmals in der 13. Lebenswoche durch massives Erbrechen auf, das sich aber wieder besserte. Diagnostiziert wurde die PPA im Alter von sechs Monaten über die Messung der erhöhten Metabolite im Urin nach Auftreten einer massiven metabolischen Azidose im Rahmen eines Infektes der oberen Luftwege. Mit vier Jahren wird der Junge einen Integrationskindergarten besuchen.

Gewicht und Größe des Patienten bewegten sich zu Studienbeginn auf der 50. Perzentile.

Motorisch litt der Patient im Alter von zwei Jahren unter einer leichten Hypotonie und einer leichten Entwicklungsverzögerung. Geistig und sprachlich entwickelt sich der Patient altersgemäß. Der Patient hatte seit seinem zweiten Lebensjahr sehr häufig grip-pale Infekte. Bis zum Beginn der Studie traten bei ihm vier Stoffwechsellentgleisungen auf, die im Krankenhaus behandelt werden mussten.

Der Patient musste bisher nur im Rahmen von Entgleisungen sondiert werden. Er wird jede Nacht gefüttert. Der Junge erhält 1,2 g pro kg Körpergewicht natürliches Eiweiß pro Tag. Eine zusätzliche Aminosäuremischung erhält er nicht.

Die Eltern sind sehr engagiert und bemüht.

Patient 9

Zu Beginn der Studie war der Patient zwölf Monate alt. Die Eltern des Jungen sind beide türkischer Abstammung und zweitgradig miteinander verwandt. Die Mutter wurde

während der Schwangerschaft auf Grund einer rheumatischen Erkrankung mit Methotrexat behandelt. Der Patient wurde in der 32. Schwangerschaftswoche mit einem Gewicht von 1980 g geboren. Bei der nachfolgenden intensivmedizinischen Betreuung fiel eine Nahrungsunverträglichkeit auf. Im Alter von 14 Tagen zeigte das Kind Zeichen einer Laktatazidose. Es wurde daraufhin eine PPA durch eine Urinanalyse diagnostiziert.

Bei Studienbeginn lag die Größe und das Gewicht des Patienten zwischen der dritten und der zehnten Perzentile. Die psychomotorische Entwicklung ist leicht verzögert. Der Junge konnte im Alter von 16 Monaten noch nicht laufen, lernte mit 13 Monaten zu sitzen und sprach mit 16 Monaten nur wenige Worte.

Das Kind musste nur innerhalb der ersten Monate sondiert werden und hatte in der folgenden Zeit keine Probleme bei der Nahrungsaufnahme. Bei Studienbeginn erhält er 1,3g pro kg Körpergewicht pro Tag Eiweiß und zusätzlich 1,0 g pro kg Körpergewicht einer Aminosäuremischung (OS 1).

Bis zum Studienbeginn gab es keine weiteren Entgleisungen. Die Compliance der Eltern ist eher fraglich

Patienten mit MMA

Patient 10

Bei Studienbeginn war der Patient zweieinhalb Jahre alt. Seine Eltern sind deutscher Abstammung und nicht miteinander verwandt. Eine genau Klassifizierung der Erkrankung erfolgte enzymatisch in Fibroblasten (Labor R. Baumgartner, B. Fowler, Basel). Hierbei stellte sich heraus, dass eine noch nie beschriebene Form einer MMA vorliegt, die dadurch gekennzeichnet ist, dass bei der Zellkultur die Zugabe von Dehydroxycobalamin zu einer Steigerung der Aktivität der Methylmalonyl-CoA-Mutase führt.

Nach unauffälliger Schwangerschaft und Geburt (Geburt in 42. SSW, Geburtsgewicht: 3480 g, Länge: 54 cm), entgleiste der Patient erstmals im Alter von 13 Monaten bei einer Rotavirusinfektion. Er zeigte hierbei eine massive metabolische Azidose. Schon vorher war bei ihm eine muskuläre Hypotonie aufgefallen.

Das Gewicht bewegte sich bei Studienbeginn auf der 75. Perzentile, die Größe lag zwischen der 25. und 50. Perzentile. Die psychomotorische Entwicklung des Patienten verlief verzögert, er sprach mit 18 Monaten seine ersten Worte, konnte erst mit 13 Monaten frei sitzen und mit 17 Monaten ungestützt laufen. Mit vier Jahren besucht das Kind einen Integrationskindergarten.

Eine Sondierung war nie notwendig. Er erhält 1 g pro kg Körpergewicht natürliches Eiweiß pro Tag, sowie 0,6 g pro kg einer Aminosäuremischung (IMTV/OS2).

Bisher hatte das Kind zwei Stoffwechsellentgleisungen, die stationär behandelt werden mussten.

Die Eltern sind sehr engagiert und zeigen eine sehr gute Compliance.

Therapiestudie bei Patient 10 (MMA):

Da sich bei Patient 10 ein Hinweis ergab, dass die Stoffwechselsituation dieses Patienten durch die Gabe von Adenosylcobalamin verbessert werden könnte, wurde bei diesem Patienten Desoxyadenosylcobalamin im Studienzeitraum zeitweise substituiert.

Der Ablauf sah wie folgt aus:

- 1) Tag 44-51: Gabe von 500 µg Desoxyadenosylcobalamin (Calomide®-S) i. m.
- 2) Tag 52-92: keine Substitution
- 3) Tag 93-148: Gabe von 1000 µg Desoxyadenosylcobalamin zweimal wöchentlich oral
- 4) Tag 148-218: keine Substitution

Es wurden bei diesem Patienten nicht nur die AC im Trockenblut, sondern auch die Methylmalonsäureausscheidung im Urin in regelmäßigen Abständen quantifiziert.

Patient 11

Zum Zeitpunkt des Studienbeginns war der Patient dreieinhalb Jahre alt. Die Eltern sind beide türkischer Abstammung und zweitgradig miteinander verwandt. Nach unauffälliger Schwangerschaft wurde der Junge in der 40. Schwangerschaftswoche durch eine Sectio caesarea entbunden (Geburtsgewicht: 3050 g; Länge: 47 cm). An seinem dritten Lebenstag hatte er 500 g Gewicht verloren und litt unter massivstem Erbrechen. Auf Grund der nachfolgenden schweren metabolischen Entgleisung wurde durch die Analy-

se der organischen Säuren im Urin eine bislang noch nicht typisierte MMA diagnostiziert.

Der Patient hat eine starke psychomotorische Entwicklungsretardierung und war mit drei Jahren auf dem Entwicklungsstand eines einjährigen Kindes. Mit drei Jahren lernte er zu laufen, mit dreieinhalb Jahren konnte er nur vier Worte sprechen. Interesse an der Umwelt entwickelte er erst mit zweieinhalb Jahren. Der Junge besuchte ab seinem vierten Lebensjahr einen Behindertenkindergarten. Im Alter von fünf Jahren ist der Junge intellektuell erheblich retardiert, er hat keine weitere Sprachentwicklung und läuft unsicher. Der Patient neigt zu Hypoglykämien und Azidosen. Bei einer MRT-Untersuchung wurden drei Arachnoidalzysten nachgewiesen. Diese zerebrale Fehlbildung ist wahrscheinlich als Zweiterkrankung zu werten. Die Größe des Patienten zum Zeitpunkt des Studienbeginns lag vier Zentimeter unterhalb der dritten Perzentile, das Gewicht bewegte sich zwischen der dritten und zehnten Perzentile.

Sondiert werden musste der Patient nur innerhalb seiner ersten Lebenswochen. Er erhält 0,7 g pro kg Körpergewicht und Tag natürliches Eiweiß sowie 1 g pro kg Körpergewicht einer Aminosäuremischung (IMTV/OS2).

Auf Grund häufiger Entgleisungen unter Infekten und Hypoglykämien musste der Patient häufig stationär behandelt werden. Die Eltern zeigen eine recht gute Compliance.

Patientin 12

Bei Studienbeginn war die Patientin elf Jahre alt. Die Eltern sind beide deutscher Abstammung und nicht miteinander verwandt. Nach unauffälliger Schwangerschaft und Geburt (Geburtszeitpunkt: 40. SSW, Länge: 49 cm, Gewicht: 3900 g) kam es im Alter von 13 Monaten zu einer ersten Entgleisung, bei der die Patientin im Rahmen einer schweren Azidose komatös wurde. Auf Grund dieser Entgleisung wurde bei der Untersuchung der organischen Säuren im Urin eine MMA diagnostiziert. Bei einer Bestimmung des genauen Krankheitstyps stellte sich bei einer Fibroblastenuntersuchung ein Apomutasedefekt heraus.

Die Größe und das Gewicht der Patientin bewegten sich im ersten Lebensjahr auf der fünfzigsten Perzentile, zum Zeitpunkt des Studienbeginns lag die Patientin jedoch mit Größe und Gewicht unterhalb der dritten Perzentile. Die psychomotorische Entwicklung war in den ersten Lebensjahren verzögert. Im Alter von elf Jahren zeigt sich nur noch

eine leichte muskuläre Hypotonie. Sie besucht die dritte Klasse einer normalen Grundschule und hat ein Schuljahr wiederholt.

Das Mädchen wird seit ihrem zehnten Lebensjahr über eine PEG ernährt. Die zugeführte Eiweißmenge betrug im ersten Lebensjahr 1,5 g pro kg Körpergewicht und Tag, später dann zwischen 1,2 bis 1,5 g pro kg Körpergewicht und zuletzt 1,2 g pro kg Körpergewicht. Sie bekommt zusätzlich 0,8 g pro kg Körpergewicht einer Aminosäuremischung (IMTV/OS2). Die Patientin erhält während der Studie als zusätzliche Medikation das Antibiotikum Metronidazol

Bis zum Studienbeginn hatte die Patientin 15 Stoffwechsellentgleisungen, die stationär behandelt wurden. Die Patientin hat eine chronische Niereninsuffizienz. Die Mutter ist sehr belastet.

Patientin 13

Zum Zeitpunkt des Studienbeginns war die Patientin viereinhalb Jahre alt. Die Eltern sind beide deutscher Abstammung und nicht miteinander verwandt. Geburt und Schwangerschaft waren unauffällig (Geburtszeitpunkt: 42. SSW, Länge: 54 cm, Gewicht: 4000 g). Die Patientin wurde im 13. Lebensmonat durch massives Erbrechen, Hepatomegalie, Knochenmarksaplasie sowie durch ein Hirnödem auffällig. Die Patientin musste fünf Wochen intensivmedizinisch betreut werden. Hierbei wurde eine MMA diagnostiziert, die bis zum Studienende nicht näher klassifiziert war. Die bis zum 13. Lebensmonat erlernten psychomotorischen Fähigkeiten mussten nach dieser Entgleisung erneut erlernt werden. Die motorische Entwicklung konnte nicht mehr aufgeholt werden. Geistig lag bis zum Studienbeginn keine Retardierung vor. Die Patientin besucht einen Integrationskindergarten. Die Größe lag zu Studienbeginn auf der 25. Perzentile und das Gewicht auf der 75. Perzentile. Bis zum Beginn der Studie litt die Patientin unter zwei Stoffwechsellentgleisungen. Sie hat eine chronische Niereninsuffizienz und ein Herzvitium.

Die Patientin wurde vom zweiten bis zum Ende ihres dritten Lebensjahres über eine Sonde ernährt, seither isst sie problemlos. Die Patientin erhält 0,7 g pro kg Körpergewicht natürliches Eiweiß und 0,5 g pro kg Körpergewicht einer Aminosäuremischung (IMTV/OS2). Als zusätzliche Medikation erhält das Mädchen Bicarbonat sowie ein ACC-Präparat.

Die Mutter ist sehr compliant

Patient 14

Zum Zeitpunkt des Studienbeginns war der Patient elfeinhalb Jahre alt. Die Eltern sind beide türkischer Abstammung und zweitgradig miteinander verwandt. Nach unauffälliger Schwangerschaft und Geburt (Gewicht: 3600 g, Länge: 53 cm) verweigerte das Neugeborene die Nahrung. Nach zwei Wochen wurde eine MMA diagnostiziert, die mittels einer enzymatischen Bestimmung einer Fibroblastenkultur als mut⁰-Form genauer klassifiziert werden konnte (R. Baumgartner, B. Fowler, Basel).

Bis auf Konzentrationsschwierigkeiten zeigt der Patient geistig nur geringe Defizite. Er besuchte im Alter von elfeinhalb Jahren die dritte Klasse einer normalen Grundschule und musste bislang eine Klasse wiederholen. Seine motorische Entwicklung war zu Beginn unauffällig, bis er im Alter von neun Jahren an Masern erkrankte und seither eine spastische Diplegie hat. Seine Größe lag zu Studienbeginn auf der dritten, das Gewicht auf der 75. Perzentile. Der Patient leidet außerdem unter einer heterozygoten Form einer Thalassämia minor, unter einem Asthma bronchiale allergicum sowie einer Hausstaubmilbenallergie und unter einer chronischen Niereninsuffizienz. Er ist sehr infektanfällig. Bis zum Studienbeginn hatte er zwei Stoffwechsellentgleisungen.

Der Patient musste die ersten zwei Lebensjahre sondiert werden. Er isst seither problemlos. Er bekommt 0,4 g pro kg Körpergewicht und Tag natürliches Eiweiß sowie 0,9 g pro kg Körpergewicht einer Aminosäuremischung (IMTV/OS2).

Die Eltern zeigen eine gute Compliance.

Die Tabellen 9 und 10 sollen einen Überblick über die beschriebenen Patientendaten geben.

Tab. 9: Übersichtstabellen aller Patienten mit PPA, Daten beziehen sich auf den Studienbeginn;
 Legende zu psychomot. Entwicklung: 1: altersgemäß; 2: leicht retardiert, 3: stark retardiert
 Legende zur Compliance: 1: sehr gut; 2: relativ gut; 3: mangelhaft

	Geschl.	Nationa- lität k: Kon- sanguinität	Erstmani- festation (Alter in Wochen)	Symptome	Alter (Jahre)	Größe (Perz.)	Gewicht (Perz.)	psychomot. Entw.	Anzahl der Entgl.	Com- pliance
Patient 1	w	dtsh.	6	Schwerhörigkeit	4	25	50	3	2	1
Patient 2	m	türk./k	1	PEG, Port	7,5	3	90	3	20	1
Patient 3	m	türk./k	0	Hirnatrophie, Seh-/ Hörstörungen	18,5	<3	10	3	20	3
Patient 4	w	dtsh.	1	viele Infekte, Hör- störungen	4	25	95	3	20	3
Patient 5	m	türk./k	3	/	0,5	75	50	2	1	2
Patient 6	m	türk./k	1	Hyperkinesie	7	97	97	3	20	2
Patient 7	w	dtsh.	1	Hörstörungen	11,5	<3	25	2	8	2
Patient 8	m	dtsh.	24	/	2	50	50	1	4	1
Patient 9	m	türk./k	2	Dystrophie	1	10	10	2	1	3

	nat. Eiweiß (g/kg KG/Tag)	AS- Mischung (g/kg KG/Tag)	Gesamt- eiweiß (g/kg KG/Tag)	Carnitin (g /Tag)	zusätzliche Medikamente/ Therapie	Hormongabe
Patient 1	1,2	0,6	1,8	1,2	Seravit, Hörgerät	/
Patient 2	0,8	0,3	1,1	3	Marcumar, Zymafluor	6 E/ qm
Patient 3	0,5	0,6	1,1	4,5	Naproxen 250, Hörgerät	/
Patient 4	0,9	0,8	1,7	4,5	Hörgerät	/
Patient 5	1,4	0,7	2,1	0,4	Zymafluor	/
Patient 6	0,8	0,6	1,4	3	Clont	/
Patient 7	0,8	1	1,8	1,8	Seravit, Hörgerät	18 E/ qm
Patient 8	1,2	0	1,2	1	Seravit	/
Patient 9	1,3	1	2,3	0,4	/	/

Tab. 10: Übersichtstabellen aller Patienten mit MMA, Daten beziehen sich auf den Studienbeginn;
 Legende zu psychomot. Entwicklung: 1: altersgemäß; 2: leicht retardiert, 3: stark retardiert
 Legende zur Compliance: 1: sehr gut; 2: relativ gut; 3: mangelhaft

	Geschl.	Nationalität k: Kon-sanguinität	Typi-sierung	Erstmani-festation (Alter in Monaten)	Symp-tome	Nierenbe-teiligung ja= 1, nein=0	Alter (Jahre)	Größe (Perz.)	Gewicht (Perz.)	psychomot. Entw.	Anzahl der Entgl.	Com-pliance
Patient 10	m	dtisch.	Sonderform	13	/	0	2,5	50	75	2	2	1
Patient 11	m	türk./k	-----	0,25	Hypoglykämien	0	3,5	<3	10	3	15	2
Patient 12	w	dtisch.	mut?/ mut-	13	PEG, Port	1	11	< 3	<3	2	15	2
Patient 13	w	dtisch.	-----	13	Herzinsuffizienz	1	4,5	25	75	2	2	1
Patient 14	m	türk./k	mut ^o	0,5	Diplegie	1	11,5	3	75	2	2	1

	nat. Eiweiß (g/kg KG/Tag)	AS-Mischung (g/kg KG/Tag)	Gesamteiweiß (g/kg KG/Tag)	Carnitin (g /Tag)	zusätzliche Medikation
Patient 10	1	0,6	1,6	4,8	/
Patient 11	0,7	1	1,7	2,1	Seravit
Patient 12	1,2	0,8	2	6,6	Clont, Ferro-sanol
Patient 13	0,7	0,5	1,2	12	Bicarbonat, Seravit, ACC
Patient 14	0,4	0,9	1,3	9	Humatin, Pulmicort, Bicarbonat

3.7.2 Untersuchung bei Gesunden

3.7.2.1 Versuchsprotokoll

Der experimentelle Teil bei den gesunden erwachsenen Kontrollpersonen gliedert sich in sechs Studien auf. Es wurden hierfür die AC-Konzentrationen im Trockenblut von insgesamt 23 gesunden Probanden gemessen.

Tab. 11: Darstellung von Anzahl, Geschlecht, Alter (Median mit Spannweite) sowie dem durchschnittlichen BMI mit Standardabweichung, der an den einzelnen Studien teilgenommenen Probanden.

	Anzahl	Geschlecht	Alter (Jahre)	BMI
Studie 1	8	4♀, 4♂	23 (21; 48)	23,1 +/-4,8
Studie 2	5	3♀, 2♂	23 (21; 59)	21,0 +/-2,0
Studie 3	7	3♀, 4♂	47 (18; 69)	25,9 +/-6,5
Studie 4	7	3♀, 4♂	24 (23; 25)	21,9 +/-3,0
Studie 5	7	3♀, 4♂	24 (23; 25)	21,9 +/-2,8
Studie 6	2	1♀, 1♂	(23; 24)	19,8+/-0,7

Diese Versuche fanden unter verschiedenen Bedingungen statt:

Studie 1: Bei dieser Studie wurde eine mindestens zehnstündige Nahrungskarenz von den Probanden eingehalten. Sie erhielten nach Entnahme der ersten kapillaren Blutprobe 30 mg Carnitin pro kg Körpergewicht (Biocarn[®] Sirup). Anschließend wurden noch sechs weitere Blutentnahmen im Abstand von einer halben Stunde durchgeführt.

Studie 2: Es erfolgte an fünf Tagen morgens nüchtern, eine kapillare Blutentnahme.

Studie 3: Die erste kapillare Blutentnahme erfolgte direkt nach dem Aufstehen nüchtern und wurde im Abstand von zwei Stunden noch sechs weitere Male durchgeführt. Die Probanden nahmen in dieser Zeitspanne drei für sie gewöhnliche Mahlzeiten zu sich.

Studie 4: Diese Studie fand nach einer mindestens zwölfstündigen Nahrungskarenz statt. Es wurde 300 ml Glukoselösung (75 g Glukose) der Firma Roche[®] gegeben (stan-

standardisierter Glukosebelastungstest). Vor der Glukosegabe sowie nach einer, eineinhalb, zwei und drei Stunden wurde der Blutzuckerspiegel durch das Blutzuckermessgerät Accu-Check[®] (Firma Böhlinger-Mannheim) gemessen und gleichzeitig eine kapillare Blutprobe für die AC-Messung entnommen.

Studie 5: Dieser Versuch wurde nach einer mindestens zehnstündigen Nahrungskarenz durchgeführt. Zu Beginn wurde eine venöse Blutprobe für die Messung der CK (Kreatinkinase), sowie eine Blutprobe für die AC-Messung entnommen. Anschließend fand eine körperliche Belastung der Probanden statt. Die Vorgabe war, möglichst schnell eine 100-stufige Treppe nach oben zu laufen und anschließend 500 m flach und bergab zu laufen. Jeder Proband absolvierte je nach Leistungszustand möglichst viele dieser Runden. Die Belastung musste mindestens eine halbe Stunde dauern. Nach einer einstündigen Ruhepause fand eine erneute venöse Blutabnahme für eine weitere CK- und AC-Messung statt. Die Bestimmung der CK wurde freundlicherweise vom Institut für Labormedizin des Kreiskrankenhauses Reutlingen durchgeführt.

Studie 6: Nach zwölfstündiger Nahrungskarenz wurde eine venöse sowie kapillare Blutprobe entnommen. Proband 3 nahm 48 Stunden vor der Blutabnahme die letzte nicht vegetarische Nahrung zu sich, während bei Proband 20 nur zwölf Stunden dazwischen lagen. Die venöse Blutentnahme erfolgte über eine Serum- und EDTA-Monovette der Firma Sarstedt. Außerdem wurde eine kapillare Blutprobe entnommen. Eine Hämatokritbestimmung wurde freundlicherweise vom Institut für Labormedizin der Universitätskliniken Tübingen durchgeführt.

3.8 Berechnungen und Definitionen

3.8.1 Patientenstudie

3.8.1.1 Transformation der Messwerte der Patienten

Da sich herausstellte, dass die C_3/ C_{16} -Werte der einzelnen PPA- und MMA-Patienten auch bei vergleichbar guter Stoffwechsellage unterschiedlich sind, wie in den folgenden Kapiteln beschrieben wird, ist für die Beurteilung des Gesamtzusammenhangs zwischen

den C_3/ C_{16} -Werten und der Befindlichkeit der Patienten ein Verfahren nötig, das die Werte aller Patienten vergleichbar macht.

Dies wurde durchgeführt, indem bei allen Patienten ein Mittelwert aus den C_3/ C_{16} -Werten der Tage gebildet wurde, an denen die Patienten gesund und damit im Stoffwechselgleichgewicht waren. Es wurde anschließend jeder einzelne C_3/ C_{16} -Meßwert durch diesen mittleren C_3/ C_{16} -Quotienten geteilt. Durch diese Transformation wurde es möglich zu überprüfen, inwieweit sich eine Veränderung der Befindlichkeit und damit der Stoffwechsellage auf den C_3/ C_{16} -Quotienten aller Patienten auswirkt.

3.8.1.2 Bestimmung des Befindlichkeitsscores

Zur standardisierten Beurteilung der Befindlichkeit der Patienten war eine Beschreibung verschiedener Befindlichkeitsstufen nötig. Diese Einstufung erfolgte entsprechend der Auswertung der einzelnen telefonischen Patientenfragebögen. Im Folgenden werden diese Stufen beschrieben:

Score 1: gesund

Dieser Score wurde vergeben, wenn der Patient keinen Infekt oder sonstige Beeinträchtigungen wie unten beschrieben hatte (z.B. Erbrechen, extreme Müdigkeit, Appetitlosigkeit).

Score 1,5: fraglich gesund

Dieser Score wurde vergeben, wenn der Patient unter Beeinträchtigungen wie z.B. einmaligem Erbrechen, Müdigkeit, Appetitlosigkeit litt und/oder ein Verhalten zeigte, das vom Normalzustand abwich. Hier konnte nicht sicher beurteilt werden, ob der Patient krank oder gesund ist.

Score 2,5: Zustand nach Erkrankung

Wurde vom ersten bis zum fünften Tag nach überwundenem Infekt bzw. Entgleisung vergeben.

Score 3: leicht krank

Wurde vergeben, wenn der Patient z.B. an Infekten oder Erbrechen litt, dies aber als nicht schwerwiegend beurteilt wurde.

Score 4: krank

Wurde vergeben, wenn der Patient massiv an Infekten erkrankt war und/oder eine Stoffwechselentgleisung hatte, die eine Krankenhausaufnahme notwendig machte.

3.8.2 Statistik

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe von Herrn Prof. Dr. K. Dietz und Frau Dr. B. Pietsch- Breitfeld, des Institutes für Medizinische Informationsverarbeitung .

Die in Kapitel 4.2 in Tabelle 12 dargestellten FC- Konzentrationen wurden durch den Median und die Spannweite der Werte angegeben

Im Kapitel 4.2.1.2 und 4.2.2.2 in Abbildung 21 und 30 wurde der arithmetische Mittelwert jedes Patienten im Zustand gesund und krank ermittelt und mit dem 95%- Konfidenzintervall unter Zugrundelegung der Quantile für die Normalverteilung dargestellt. Die Anzahl der Meßwerte (n) war hierbei jeweils unterschiedlich.

Im Kapitel 4.2.2.1 wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson für die logarithmierte Konzentration der Methylmalonsäure im Urin und des Quotienten C_3 / C_{16} berechnet.

Im Kapitel 4.3 wurde für Studie 1, 2, 3, 4, 5 der arithmetische Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall für das FC sowie einige AC sowie den Quotienten C_3 / C_{16} berechnet.

Im Kapitel 4.3.5 wurde der zweiseitige gepaarte Student-t-Test zur Überprüfung einer statistisch auffälligen Erhöhung/ Erniedrigung der Meßwerte (CK, FC; AC, Quotienten C_3 / C_{16}) nach sportlicher Belastung berechnet.

3.8.3 Begriffserklärungen

Im folgenden Teil der Arbeit werden einigen Begriffe in Form von Abkürzungen verwendet. Diese Begriffe sollen nachfolgend eingeführt werden:

FC	freies Carnitin
AC	Acylcarnitin
C_2	Acetylcarnitin
C_3	Propionylcarnitin
C_{16}	Palmitoylcarnitin
C_{18}	Stearylarnitin
$C_{18:1}$	Oleylcarnitin
C_3 / C_{16}	Quotient Propionylcarnitin/ Palmitoylcarnitin

Normalerweise versteht man unter der Abkürzung C_x die jeweilige freie Fettsäure (z.B. C_3 : Propionsäure). In dieser Arbeit jedoch bezeichnet diese Abkürzung das Acylcarnitin der jeweiligen freien Fettsäure (z. B: C_3 : Propionylcarnitin).

4 Ergebnisse

4.1 Methodische Ergebnisse: Untersuchung zum Einfluss der Lagerungsdauer auf den C₃/ C₁₆-Acylcarnitinquotienten

Die Wiederholungsmessung der Trockenblutkarten der Patienten 1 und 3 erfolgte nach Beendigung der Studie. Es sollte hierbei überprüft werden, ob nach einem Zeitraum von einem bis neun Monaten zwischen der Blutabnahme und der Nachmessung die AC in den Trockenblutkarten stabil sind. Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

Patientin 1:

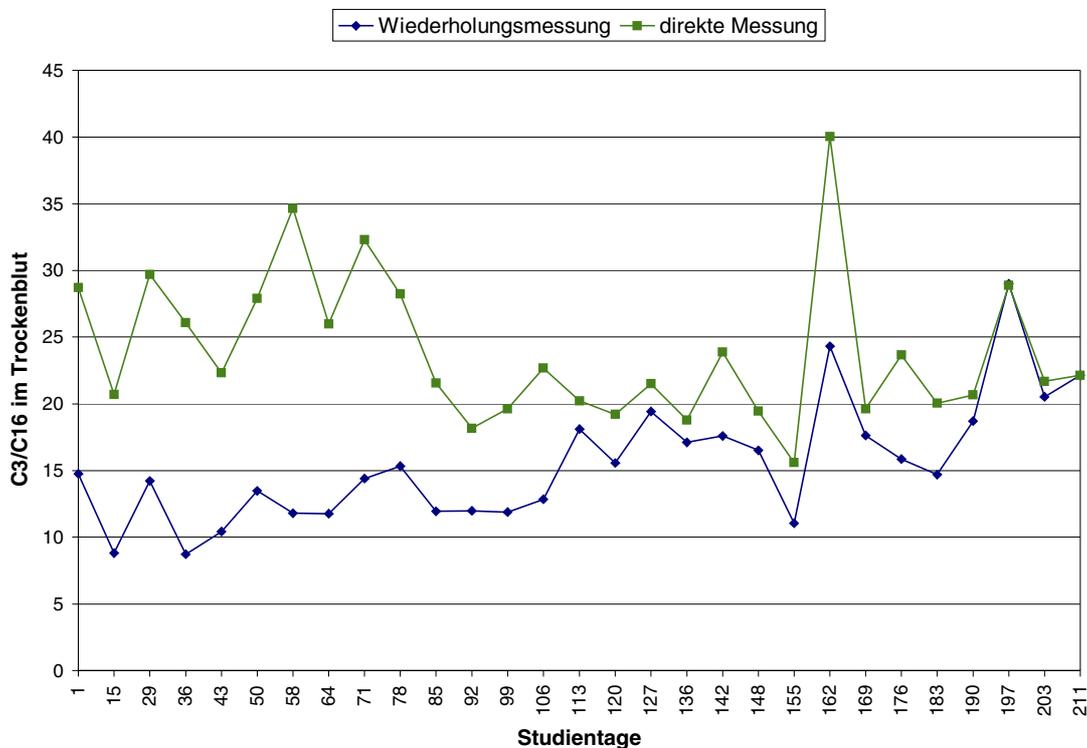


Abb. 9: C₃/ C₁₆-Quotienten bei Patientin 1 direkt nach Probeneingang (grün) bzw. 1 Monat nach Beendigung der Studie (blau). Das Alter der nachgemessenen Proben war zwischen 1 und 9 Monaten. Dargestellt sind Proben vom 1. - 211. Studientag.

Auffällig ist, dass die bei der Nachmessung gemessenen C₃/ C₁₆-Werte bis zum Tag 78 deutlich niedriger sind als bei der Erstmessung, danach verringert sich die Differenz beider Werte stetig (Ausnahme Tage 162). Es fällt auf, dass die Größe der Abweichung des C₃/ C₁₆-Quotienten eines Studientag (Erst- und Nachmessung) von der Zeitspanne zwischen Erst- und Nachmessung abhängig ist.

Patient 3:

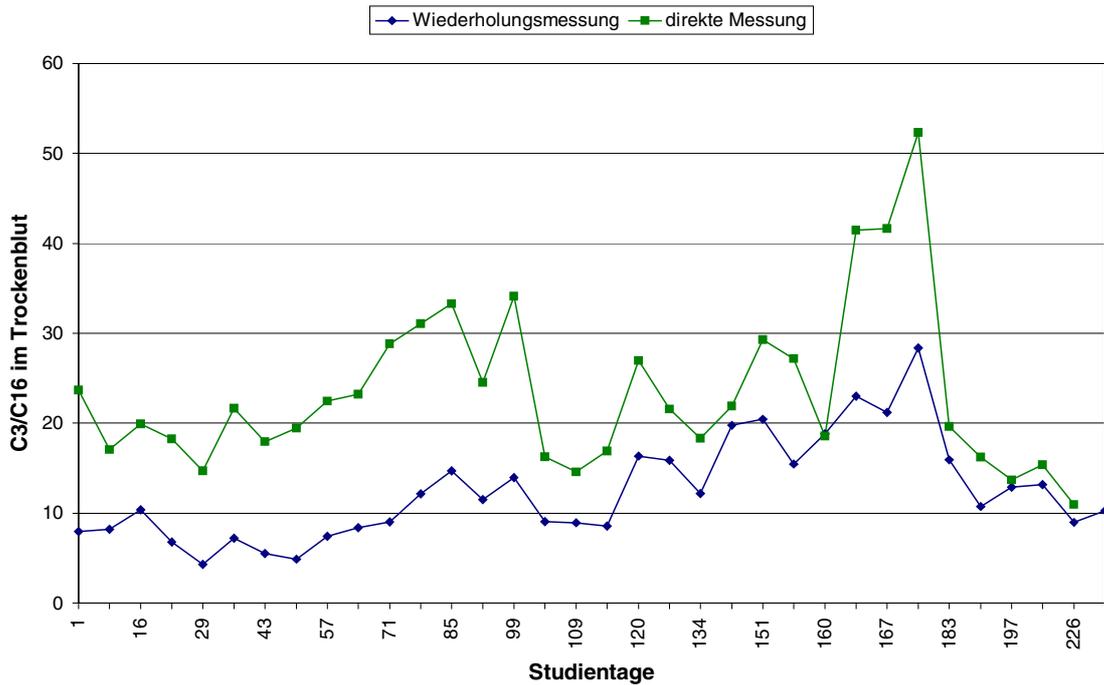


Abb. 10: C_3/C_{16} -Quotienten bei Patient 3 direkt nach Probenabnahme (Quadrat, grau) und 1 Monat nach Beendigung der Studie (Raute, schwarz). Das Alter der nachgemessenen Proben war zwischen 1 und 9 Monaten. Dargestellt sind Proben vom 1. - 226. Studientag.

Auch die nachgemessenen C_3/C_{16} -Quotienten bei Patienten 3 zeigen eine Tendenz zu niedrigeren Werten bei den älteren Proben. Auch hier ist von einigen Ausnahmen abgesehen festzustellen, dass die Zeitspanne zwischen der Erstmessung und Nachmessung für die Abweichung der C_3/C_{16} -Konzentrationen verantwortlich ist und eine Verkleinerung dieser Spanne den Unterschied dieser Konzentrationen verringert.

4.2 Die Ergebnisse der Patientenstudie

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Carnitinwerte im Trockenblut und des standardisierten Telefoninterviews der einzelnen Patienten dargestellt. Die Ergebnisse sollen hierbei anhand eines Balken-Kurvendiagramms sowie einer Beschreibung der als krank bewerteten Tage der Patienten dargestellt werden.

Zum Nachweis einer ausreichenden Carnitinsubstitution werden die FC- Konzentrationen dargestellt (Tab.12)

Tab. 12: Im Trockenblut gemessene FC-Konzentrationen (Median), Anzahl der Messungen und Spannweite der Messungen für jeden Patienten

Patienten	1	2	3	4	5	6	7
Anzahl der Messungen	29	17	33	17	17	15	15
Median FC ($\mu\text{mol/l}$)	54	65,7	65,0	52,8	42,3	48,7	43,5
Spannweite der Messungen	37,6; 204,4	42,2; 124,8	45,7; 469,5	36,0; 182,4	33,7; 115,8	39,5; 57,5	34,0; 56,6

Patienten	8	9	10	11	12	13	14
Anzahl der Messungen	18	11	26	18	14	16	17
Median FC ($\mu\text{mol/l}$)	78,2	43,2	56,6	66,6	117,1	44,2	83,3
Spannweite der Messungen	59,9; 176,9	19,7; 53,9	50,5; 75,3	34,7; 135,3	83,4; 155,4	36,4; 59,8	67,1; 121,2

Nimmt man die in der Probandenstudie ermittelte durchschnittliche FC-Konzentration von $46,5 \mu\text{mol/l} \pm 18,4$ als Referenzbereich, so liegen die FC-Konzentrationen aller Patienten, mit Ausnahme von Patient 12: $117,1 \mu\text{mol/l}$ innerhalb dieses Referenzbereiches.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei allen Patienten eine ausreichende Carnitinzufuhr vorlag (Referenzbereich: $45,6 \pm 18,4$, $n = 23$; bei gesunden erwachsenen Probanden).

4.2.1 Patienten mit PPA

4.2.1.1 Einzelbeschreibung der Patienten

Patientin 1:

Bei Patientin 1 wurden 29 Messungen in einem Zeitraum von 211 Tagen durchgeführt. Die ersten drei Messungen wurden im 14-tägigen, die anderen Messungen im 7-tägigen Abstand vorgenommen.

Auffälligkeiten während der 8-monatigen Studienzeit:

- Tag 1-15: Leichter Schnupfen
- Tag 29: Infekt mit Husten und Schnupfen bei gutem Allgemeinbefinden
- Tag 36: Eitrige Mittelohrentzündung, Müdigkeit und Abgeschlagenheit, am Tag 34 und 35 Erbrechen, Diarrhoe, seither Eiweißreduktion
- Tag 43-50 Leichter Schnupfen bei gutem Allgemeinbefinden
- Tag 76 Zweimaliges Erbrechen
- Tag 78: Husten und Schnupfen bei gutem Allgemeinbefinden. Sie wird vermehrt sondiert

- Tag 117: Zweimaliges Erbrechen, starke Müdigkeit, eiweißreduzierte Kost
- Tag 120: Husten bei gutem Allgemeinbefinden, noch eiweißreduzierte Ernährung
- Tag 141: Sie hat sich auf einer Schiffsreise einmal übergeben.
- Tag 155-160: Abgeschlagenheit, Fieber und Ohrenschmerzen. Eiweiß- und Kalorienreduktion, Ernährung nur über die Sonde, Antibiotikum
- Tag 162: Noch immer Infektzeichen, ansonsten besser
- Tag 166: Infekt mit Fieber, Erbrechen und Durchfall
- Tag 169: Seit heute fieberfrei, nur Schnupfen
- Tag 203: Leichter Schnupfen

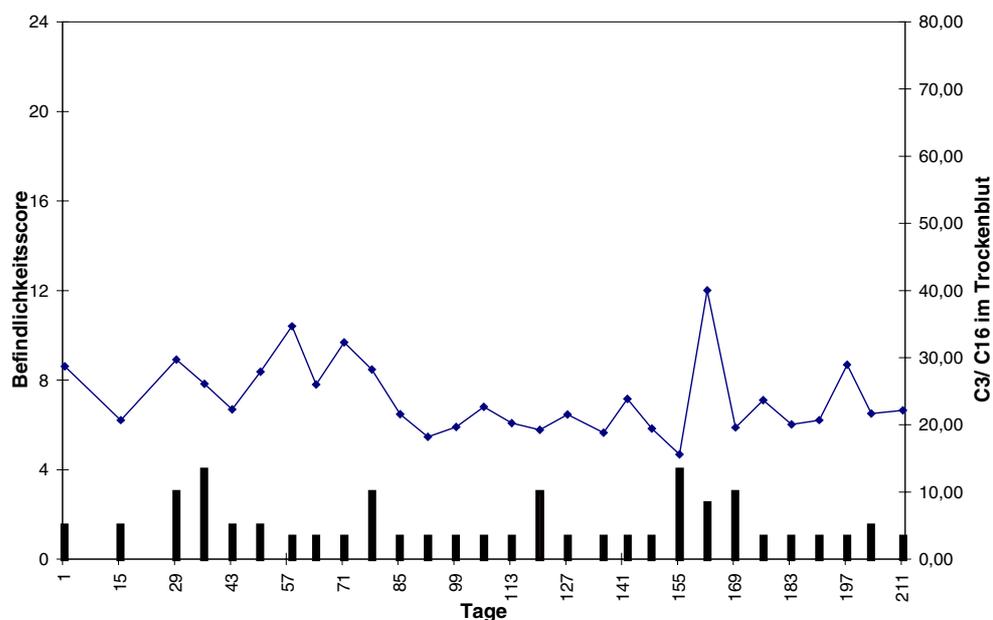


Abb. 11: Patientin 1: Darstellung des Befindlichkeitsscores (Balken) und des C₃/C₁₆-Quotienten (Linie) in einem Zeitraum von 8 Monaten

Beschreibung:

Bei dieser Patientin schwanken die C₃/C₁₆-Werte zwischen 15,6 und 40,0. Die Patientin weist während der Studienzeit fünf Infekte auf, unter denen sie an den Tagen 29, 36, 78, erhöhte C₃/C₁₆-Werte zeigt. Am Tag 155 ist der C₃/C₁₆-Wert sehr niedrig, obwohl dieser Tag für die Patientin der erste Tag eines schweren Infektes ist. Bei der Messung sieben Tage später, die Patientin ist nicht mehr sehr krank (Zustand nach Infekt), wird der höchste C₃/C₁₆-Werte gemessen. An den Tagen 58, 64, 71 sowie 197 sind die Werte

hoch, obwohl das Mädchen gesund ist. An den Tagen 15 und 203 liegen bei leichtem Schnupfen, sowie am Tag 120 bei noch bestehendem Husten und am Tag 169 einen Tag nach einem fieberhaften Infekt niedere C₃/ C₁₆-Werte vor.

Patient 2:

Bei Patient 2 liegen 17 Messwerte vor. Sie wurden durchschnittlich in 14-tägigem Abstand bestimmt.

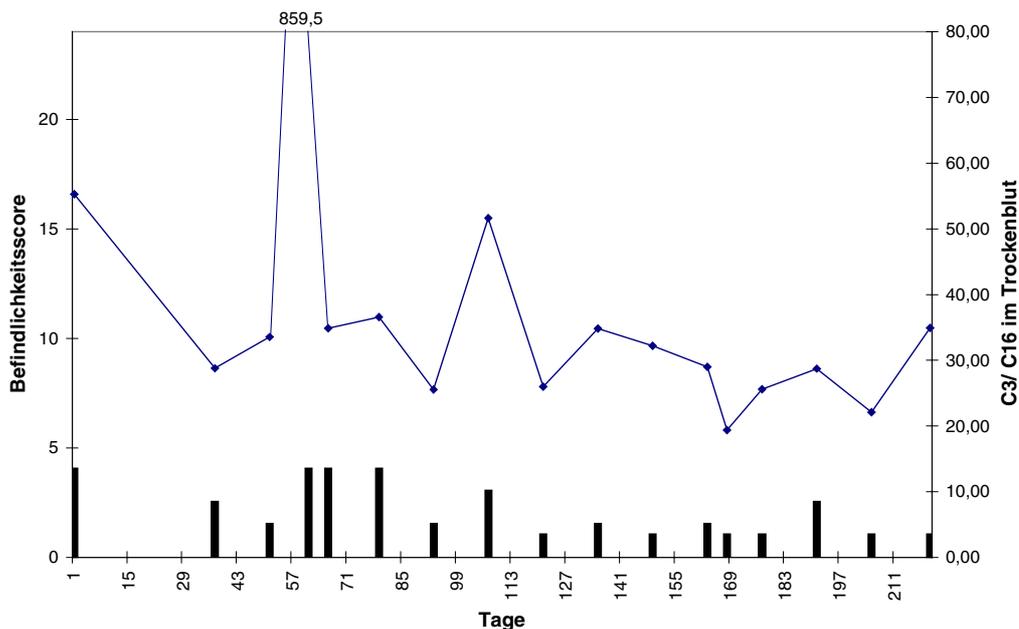


Abb. 12: Patient 2: Darstellung des Befindlichkeitsscores (Balken) und des C₃/ C₁₆-Quotienten (Linie) in einem Zeitraum von 8 Monaten

Auffälligkeiten während der 8-monatigen Studienzeit:

- Tag 1-27: Stationäre Behandlung wegen einer Stoffwechsellage
- Tag 37: Husten und Ausschlag im Gesicht. Er bekommt ein Antibiotikum.
- Tag 51: Auffällige Müdigkeit
- Tag 61: Sehr schlechtes Allgemeinbefinden. Fieberhafter Infekt seit einigen Tagen. Seit heute in stationärer Behandlung, verhält sich autistisch, ist sehr schläfrig, erbricht zweimal, keine Nahrungsaufnahme, Ammoniak: 142 µmol/l.
- Tag 62-64: Zeigt weiterhin ein autistisches Verhalten, Apathie, weiterhin keine Nahrungsaufnahme.
- Tag 65: Patient ist wieder vollkommen orientiert.

- Tag 79: Stationärer Behandlung wegen reduziertem Allgemeinzustand, Fieber und starkem Erbrechen. Keine Nahrungsaufnahme.
- Tag 93: Einmaliges Erbrechen bei gutem Allgemeinzustand
- Tag 102: Gedächtnisverlust
- Tag 106: Starkes Erbrechen (Ammoniak: 109 $\mu\text{mol/l}$)
- Tag 107: Blässe, Schwäche, einmaliges Erbrechen
- Tag 116: Therapieänderung: Umstellung der Aminosäuremischung und Optimierung des Therapieregimes.
- Tag 135: Schnupfen bei gutem Allgemeinzustand
- Tag 163: Husten seit einigen Tagen, feinfleckiges Exanthem. Gestern erbrach er einmal.
- Tag 186: Fieber
- Tag 191: Leichte Infektzeichen
- Tag 220: Auffallend starkes Schwitzen

Beschreibung:

Die C_3/ C_{16} -Werte dieses Patienten schwanken zwischen 19,4 und 859,5. Bei diesem Diagramm fällt eine Beziehung zwischen der Höhe der C_3/ C_{16} -Werten und der Befindlichkeit auf. Vor allem bei schweren Entgleisungen die mit einem Krankenhausaufenthalt einhergehen (Tag 1, 64, 113) liegen massiv erhöhte C_3/ C_{16} -Werte vor. Tage an denen der Patient müder ist (Tag 51), einen Infekt hat (Tag 135), stark schwitzt (Tag 220) oder vor wenigen Tagen krank war, sind ebenfalls mit erhöhten C_3/ C_{16} -Werte verbunden.

Tage mit guter Befindlichkeit (Tag 121, 168, 177, 205) gehen, mit Ausnahme des Tages 149, mit niedrigen C_3/ C_{16} -Werten einher. Der C_3/ C_{16} -Wert am Tag 93 ist trotz des einmaligen Erbrechens sehr niedrig.

Patient 3:

Bei Patient 3 liegen 33 Messwerte vor, wobei der durchschnittliche Abstand zwischen den einzelnen Messungen sieben Tage umfasst.

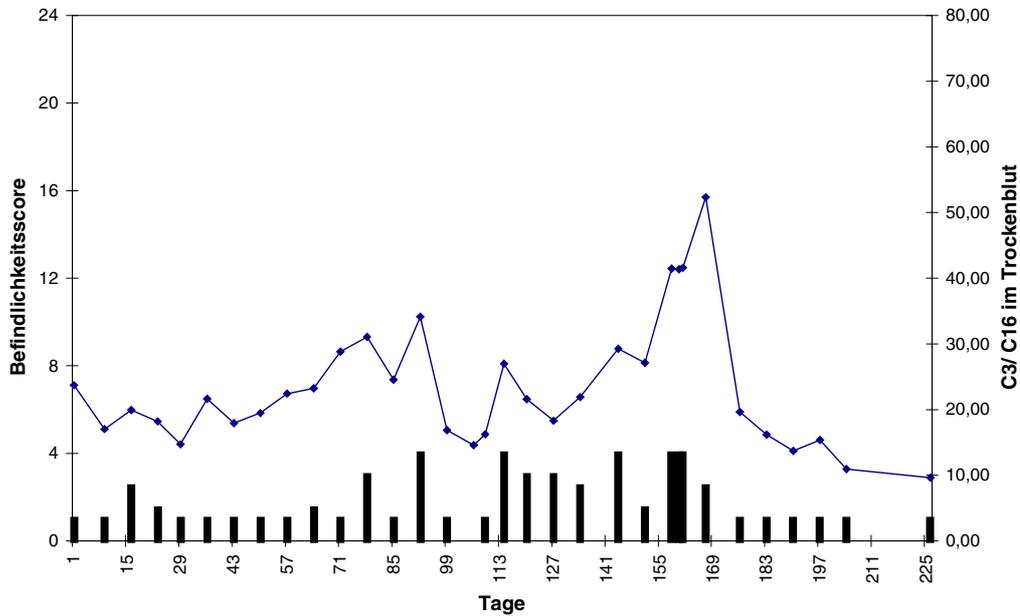


Abb. 13: Patient 3: Darstellung des Befindlichkeitscores (Balken) und des C₃/C₁₆-Quotienten (Linie) in einem Zeitraum von 8 Monaten

Auffälligkeiten während der 8-monatigen Studienzeit:

- Tag 13: Der Patient ist krank und kann deshalb die Schule nicht besuchen.
- Tag 20: Erhöhte Azetonkonzentrationen im Urin, Müdigkeit
- Tag 23: Leichte Erkältung, guter Allgemeinzustand
- Tag 64: Schnupfen
- Tag 78: Müdigkeit und Abgeschlagenheit
- Tag 92: Der Patient fühlt sich sehr matt. Erhöhte Keton- und Ammoniakkonzentrationen.
- Tag 107: Operation an der Nasenscheidewand
- Tag 111: Ammoniak erhöht (140µmol/l), Ketonkörper dreifach positiv; Patient litt unter Übelkeit und ist seit heute in stationärer Behandlung.
- Tag 114: Patient ist bis Tag 116 in stationärer Behandlung.
- Tag 120: Müdigkeit und Abgeschlagenheit

Tag 127: Weiterhin Müdigkeit und Abgeschlagenheit, Ketonkörper dreifach positiv, trinkt nur Tee.

Tag 144-167: Fast ständig Müdigkeit und Abgeschlagenheit, Ketonkörper dreifach positiv, Ammoniak stark erhöht (bis 219 μ mol/l), teilweise Bauchschmerzen sowie Erbrechen, meist reduzierte Nahrungsaufnahme.

Beschreibung:

Die C_3/ C_{16} -Werte dieses Patienten schwanken zwischen 9,6 und 41,5. Auch bei den C_3/ C_{16} -Werte dieses Patienten fällt eine Übereinstimmung mit seiner Befindlichkeit auf. Bei Infekten und Entgleisungen (Tag 15, 78, 92, 113, 120, 134, 148, 155, 158, 161, 169) liegen hohe C_3/ C_{16} -Werte vor. Bei guter Befindlichkeit (Tag 99, 109, 176 - 225) liegen sehr niedrige C_3/ C_{16} -Werte vor. Die Höhe der C_3/ C_{16} -Werte stimmt an den Tagen 36, 50, 57, 71 und am Tag 85 nicht mit der guten Befindlichkeit überein. Am Tag 127 liegt ein niedriger C_3/ C_{16} -Wert trotz der dort schlechten Befindlichkeit vor.

Patientin 4:

Bei dieser Patientin liegen 17 Messwerte vor. Der Abstand zwischen den einzelnen Messungen beträgt meist 14 Tage. Da die Mutter häufig mit der Situation überfordert war, fehlen einige Werte, vor allem bei Krankenhausaufhalten der Patientin.

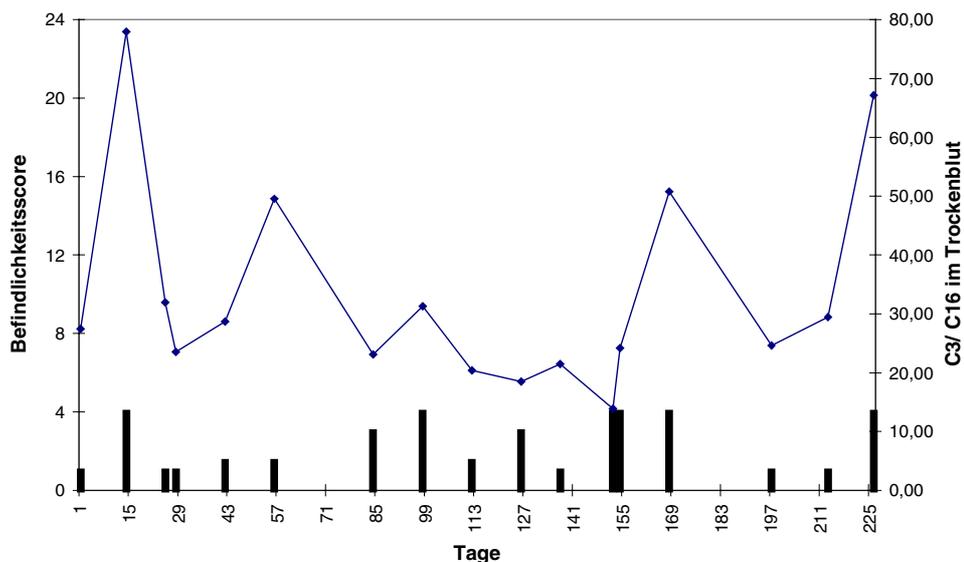


Abb. 14: Patientin 4: Darstellung des Befindlichkeitsscores (Balken) und des C_3/ C_{16} -Quotienten (Linie) in einem Zeitraum von 8 Monaten

Auffälligkeiten während der 8-monatigen Studienzeit:

- Tag 14: Müdigkeit, schlechter Allgemeinzustand, Exanthem im Gesicht sowie häufiges Erbrechen, Bauchschmerzen und Obstipation
- Tag 42: Husten und Schnupfen bei gutem Allgemeinzustand
- Tag 55: Schlüsselbeinbruch, nachts Erbrechen
- Tag 56: Schnupfen
- Tag 68: Stationäre Behandlung wegen Erbrechen und hoher Ammoniakkonzentration (200 µmol/l), Husten, Exanthem im Gesicht
- Tag 77-84: Pneumonie bei gutem Allgemeinzustand, Ammoniak (35 µmol/l), Eiweißreduktion
- Tag 96-98: Erbrechen, starker Schnupfen und Husten, Ammoniak (130 µmol/l), leichter Husten und Schnupfen
- Tag 112: Pneumonie, leichter Husten, einmal erbrochen
- Tag 126: Ständige Krankenhausaufenthalte wegen Erbrechen
- Tag 152-182: Pneumonie, Fieber bis 40° C; auffälliger Geruch, Exanthem im Gesicht, Kopf- und Bauchschmerzen, Müdigkeit und Abgeschlagenheit, parenterale Ernährung
- Tag 226: Erbricht massiv, ist aggressiv, hat Exanthem im Gesicht, Ammoniak (85 µmol/l), Husten und Schnupfen

Beschreibung:

Bei Patientin 4 schwanken die C_3/ C_{16} -Werte zwischen 18,5 und 78. Schwere Stoffwechsellagen am Tag 15 und 226 gehen bei ihr mit stark erhöhten C_3/ C_{16} -Werten einher. Bei den C_3/ C_{16} -Werten an Tagen 152 - 168 fällt wie bei Patientin 1 auf, dass die Werte zum Zeitpunkt des Infektbeginns noch niedrig sind, jedoch im Laufe des Infektes ansteigen. Bei guter Befindlichkeit (Tag 25, 137, 197, 213) liegen bis auf den Tag 28 an dem der C_3/ C_{16} -Wert leicht erhöht ist, immer niedrige Werte vor. Kein direkter Zusammenhang zwischen der Befindlichkeit und dem C_3/ C_{16} -Wert besteht am Tag 127 an dem die Patientin unter einer Pneumonie leidet, trotzdem aber einen niedrigen C_3/ C_{16} -Wert aufweist. Am Tag 84 ist der C_3/ C_{16} -Wert sehr niedrig, die Patientin leidet an einer Pneumonie, hat aber einen sehr niederen Ammoniakwert.

Patient 5:

Es existieren bei diesem Patienten 17 Messwerte, die in 14-tägigem Abstand bestimmt wurden.

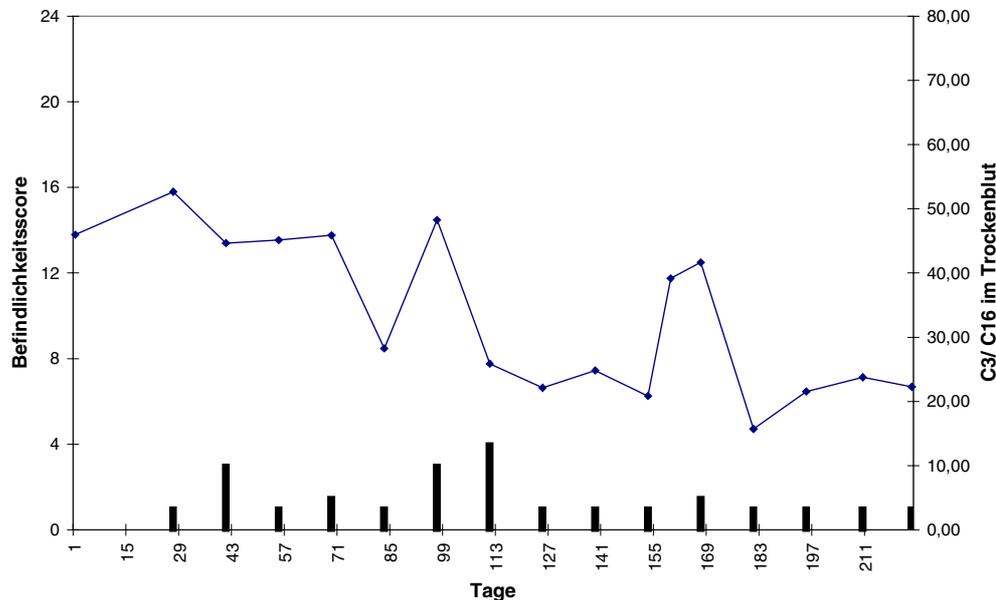


Abb. 15: Patient 5: Darstellung des Befindlichkeitsscores (Balken) und des C₃/ C₁₆-Quotienten (Linie) in einem Zeitraum von 8 Monaten

Auffälligkeiten während der 8-monatigen Studienzeit:

- Tag 27: Seit zwei Tagen Erbrechen, Husten
- Tag 69: Seit vier Tagen wenig gegessen, Ammoniakwert normal, Anpassung der Eiweißzufuhr an das Körpergewicht
- Tag 87-97: Müdigkeit, Kraftlosigkeit, grippaler Infekt mit Husten, wenig Erbrechen
- Tag 109-111: Infekt seit einer Woche, jetzt Erbrechen, deshalb stationärer Aufenthalt, Änderung des Ernährungsplans
- Tag 125: Anpassung der Eiweißzufuhr an das Körpergewicht
- Tag 167: Patient trinkt nicht so gut
- Tag 174-182: Krankenhausaufenthalt wegen Übelkeit, Bauchschmerzen und Nahrungsverweigerung
- Tag 195: Änderung des Diätplans

Beschreibung:

Die Werte dieses Patienten schwanken zwischen 15,7 und 52,7. An den Tagen 41 und 97 leidet der Junge an Infekten und zeigt dabei auch sehr hohe C_3/C_{16} -Werte. Auch an den Tagen 69 und 167 sind die Werte sehr hoch. Der Patient isst an diesen Tagen sehr schlecht. An den Tagen 125, 139, 181 - 223 ist der Patient gesund und hat niedere Werte. An den Tagen 27 und 57 hat der Patient trotz guter Befindlichkeit hohe C_3/C_{16} -Werte. Am Tag 111 ist der C_3/C_{16} -Wert recht niedrig, obwohl der Patient schon seit längerem unter einem Infekt leidet und stationär aufgenommen ist. Ab Tag 113 fallen die C_3/C_{16} -Quotienten dieses Patienten tendenziell ab. Auffallend hierbei ist, dass dieser Abfall von einer Therapieverbesserung ab dem Tag 111 begleitet ist.

Patient 6:

Bei diesem Patienten wurden 15 Messwerte meist in 14-tägigem Abstand ermittelt.

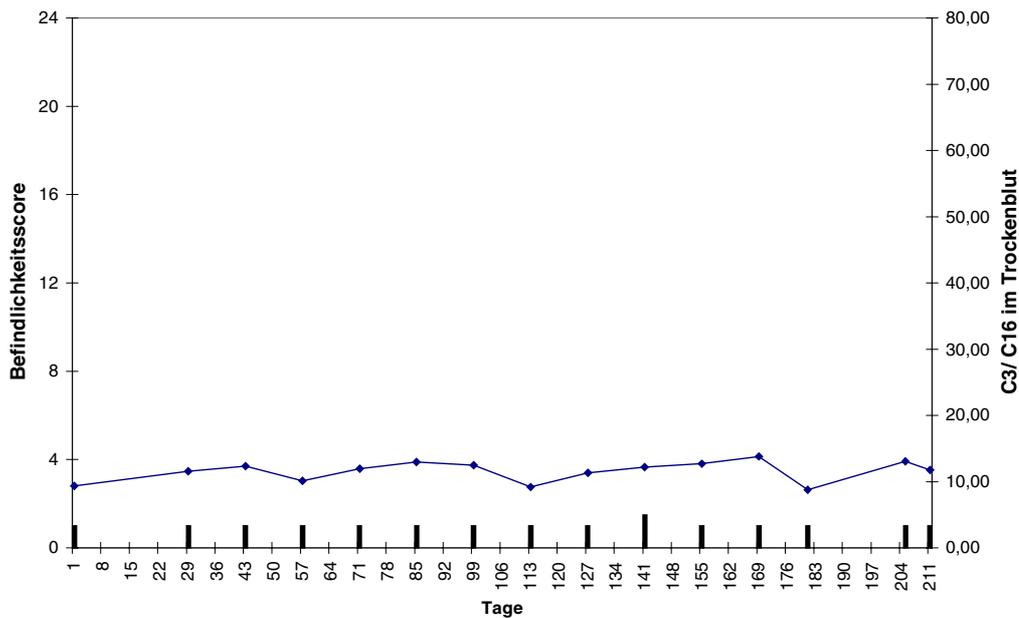


Abb. 16: Patient 6: Darstellung des Befindlichkeitscores (Balken) und des C_3/C_{16} -Quotienten (Linie) in einem Zeitraum von 8 Monaten

Auffälligkeiten während der 8-monatigen Studienzeit:

Tag 141: hat vor zwei Tagen einmal erbrochen, Husten

Beschreibung:

Die C_3/ C_{16} -Werte dieses Patienten bewegen sich zwischen 8,8 und 13,8 und zeigen nur eine geringe Schwankung. Der Patient ist bis auf einen einzigen Messtag immer gesund gewesen (Tag 141: Bewertung: fraglich gesund).

Patientin 7:

Bei dieser Patientin liegen 15 Messwerte vor, die in einem meist 14-tägigen Abstand ermittelt wurden.

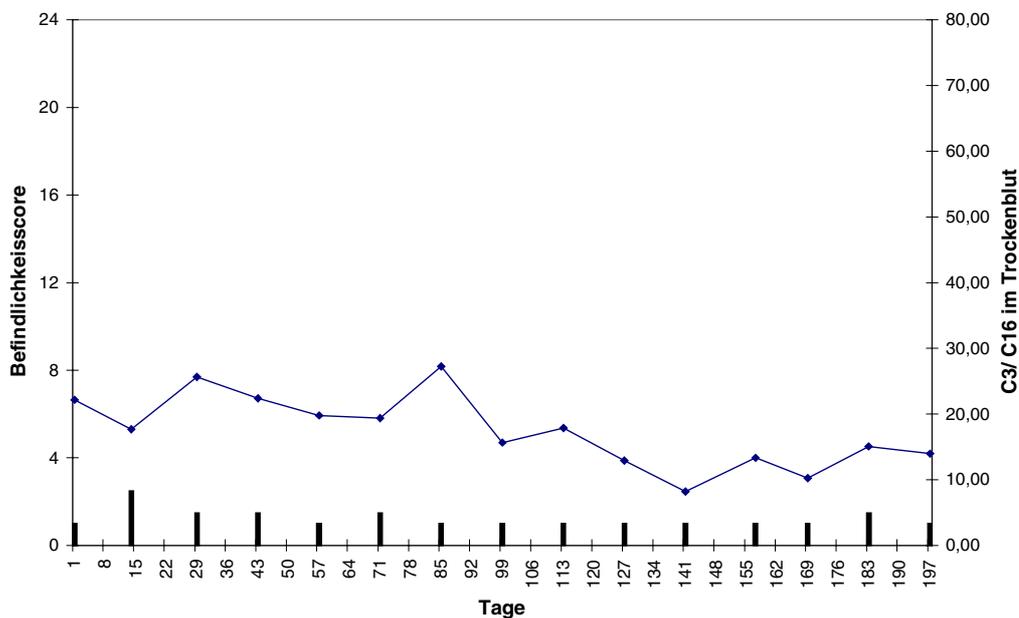


Abb. 17: Patientin 7: Darstellung des Befindlichkeitscores (Balken) und des C_3/ C_{16} -Quotienten (Linie) in einem Zeitraum von 8 Monaten

Auffälligkeiten während der 8-monatigen Studienzeit:

- Tag 8-10: Grippaler Infekt
- Tag 29: Halsschmerzen
- Tag 43: Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Blässe
- Tag 71: Obstipation
- Tag 157: Schullandheimaufenthalt, Eiweißgehalt der Nahrung unkontrolliert erhöht
- Tag 183: Starker Ausschlag am ganzen Körper

Beschreibung:

Bei dieser Patientin schwanken die C_3/C_{16} -Werte zwischen 8,2 und 25,7. Die Tage 14, 29, 43 und 71 sind durch eine schlechtere Befindlichkeit gekennzeichnet und gehen mit erhöhten Laborwerten einher. An Tag 99 - 197 sind die C_3/C_{16} -Werte sehr niedrig, bis auf Tag 183 liegt hierbei auch eine gute Befindlichkeit vor. An den Tagen 1, 57, 85 und 113 sind die Werte trotz guter Befindlichkeit recht hoch.

Besonders zu vermerken ist, dass sich die Eltern manchmal nicht an den Diätplan gehalten haben, d.h. mehr Eiweiß gegeben haben und dies beim Telefongespräch nicht immer mitgeteilt.

Patient 8:

Bei diesem Patienten liegen 18 Messwerte in meist 14-tägigem Abstand vor.

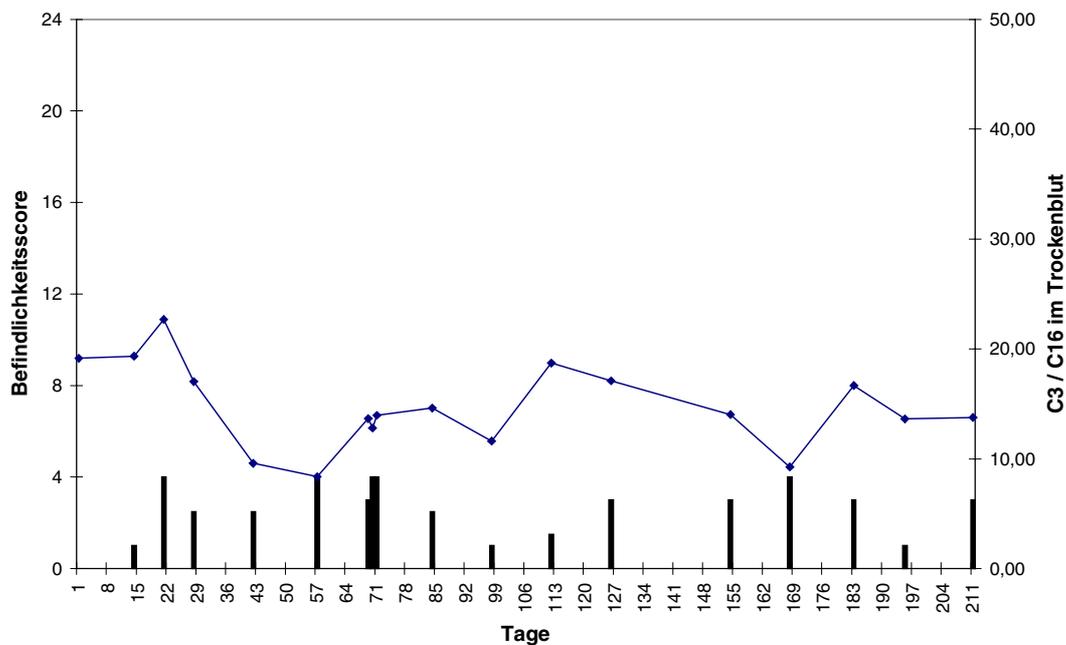


Abb. 18: Patient 8: Darstellung des Befindlichkeitsscores (Balken) und des C_3/C_{16} -Quotienten (Linie) in einem Zeitraum von 8 Monaten

Auffälligkeiten während der 8-monatigen Studienzeit:

- Tag 21-25: Stationärer Aufenthalt wegen schwerer Gastroenteritis mit massivem Erbrechen, leichter Azidose, zu Beginn totalparenterale Ernährung
- Tag 35-42: Schwerer Infekt mit Mittelohrentzündung und hohem Fieber, bekommt eiweißreduzierte Kost
- Tag 57: Grippaler Infekt bei gutem Allgemeinzustand, eiweißreduzierte Kost

- Tag 69-81: Schwere Mittelohrentzündung mit Schnupfen und Fieber, Müdigkeit und Abgeschlagenheit des Patienten. Er erhält eiweißreduzierte Kost.
- Tag 112: Appetitlosigkeit
- Tag 113-133: Zwei schwere Infekte mit Bronchitis und Fieber bis 39,8° C.
- Tag 147-176: Hatte zwei weitere schwere Infekte, mit Appetitlosigkeit, Erbrechen, Fieber, starkem Schnupfen, deshalb Eiweißreduktion
- Tag 206: Hat massiven Infekt mit Erbrechen und Fieber bis 39,6° C, bekommt eiweißreduzierte Ernährung

Beschreibung:

Bei Patient 8 bewegen sich die C₃/ C₁₆-Werte zwischen 8,4 und 22,7. Es fällt auf, dass der Patient sehr häufig unter Infekten leidet. So kann seine Befindlichkeit nur an drei Tagen mit gut bewertet werden. Der höchste Wert wird gemessen, als der Junge am Tag 21 stationär behandelt werden muss. Man erkennt, dass der Patient trotz eines Infektes am Tag 57 seinen niedrigsten C₃/ C₁₆-Wert hat.

Patient 9:

Bei diesem Patienten liegen nur elf Messwerte vor. Eigentlich sollte der Abstand zwischen den Blutentnahmen zweiwöchig sein, doch wurde bei stationären Aufenthalten und bei Infekten eine Blutabnahme meist abgelehnt.

Auffälligkeiten während der 8-monatigen Studienzeit:

- Tag 15: Leichter Husten
- Tag 82-96: Schwere Entgleisung im Urlaub in der Türkei
- Tag 141: Ist wegen einer Angina und Nahrungsverweigerung in stationärer Behandlung
- Tag 200: Ist wegen einer Angina im Krankenhaus

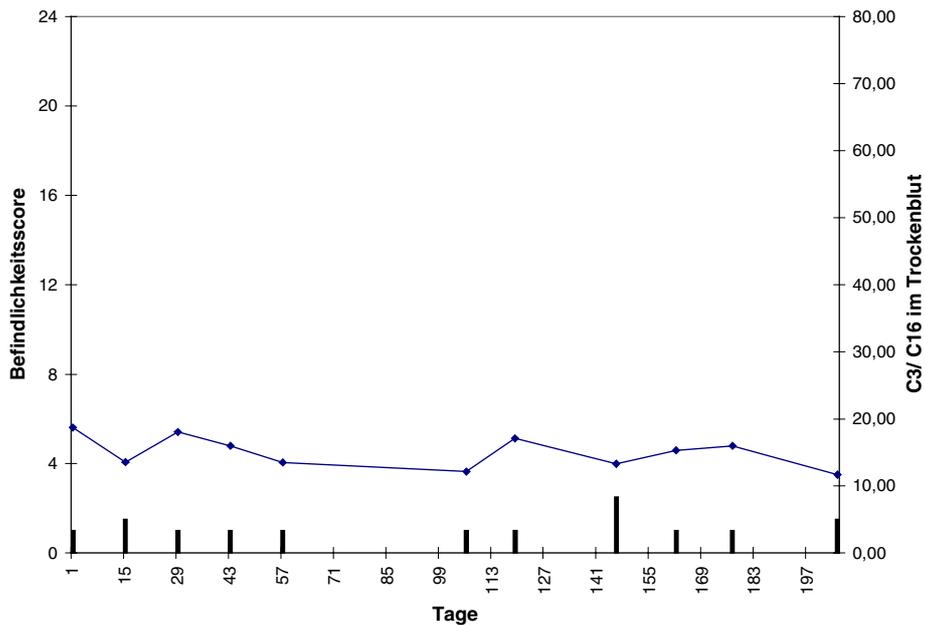


Abb. 19: Patient 9: Darstellung des Befindlichkeitscores (Balken) und des C₃/ C₁₆-Quotienten (Linie) in einem Zeitraum von 8 Monaten

Beschreibung:

Die C₃/ C₁₆-Werte bewegen sich bei diesem Patienten zwischen 11,7 und 18,7. Bei diesem Patienten lässt sich eine Übereinstimmung zwischen den C₃/ C₁₆-Werte und der Befindlichkeit auf Grund der vielen fehlenden Werte nur schwer beurteilen. Eine Erhöhung der Werte kann bei schlechterer Befindlichkeit an den Tagen 15 und 205 (fraglich gesund), sowie am Tag 146 (Zustand nach Infekt) nicht beobachtet werden.

4.2.1.2 Vergleich der PPA-Patienten untereinander

Es werden in Abbildung 20 alle C₃/ C₁₆-Werte der Patienten mit PPA dargestellt. Rot sind die Werte gekennzeichnet, an denen diese Patienten stationär aufgenommen waren. Es ist zu erkennen, dass sich die einzelnen Patienten bezüglich der Streuung wie auch der Höhe ihrer C₃/ C₁₆-Werte stark unterscheiden. Die Patienten 1 bis 5 zeigen eine breite Streuung. Vor allem an Tagen, an denen die Patienten stationär aufgenommen sind, sind die C₃/ C₁₆-Werte erhöht. Es fällt auf, dass Patient 2 mit 859, 5 einen massiv erhöhten Wert aufweist. Dieser Wert wird am Tag 61 gemessen, als es dem Patienten sehr schlecht geht. Bei den Patienten 6 bis 9 hingegen sind die Werte geringer gestreut,

es treten keine Extremwerte auf. Diese Patienten weisen bis auf Patient 8 keine stationären Aufenthalte auf.

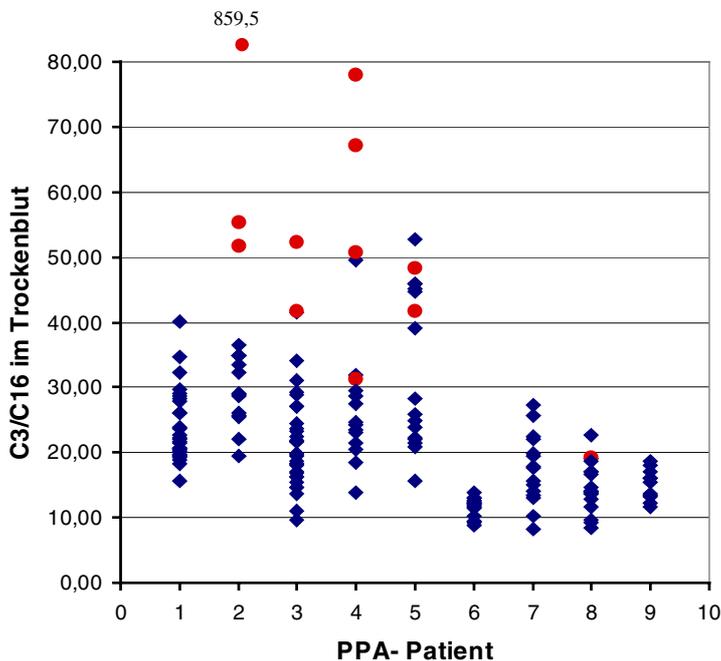


Abb. 20: Darstellung sämtlicher C_3/C_{16} -Quotienten der Patienten. Tage mit stationärem Aufenthalt sind als rote Punkte dargestellt

In Abbildung 21 sind die C_3/C_{16} -Mittelwerte mit dem 95%-Konfidenzintervall dargestellt, die sich aus der Gesamtheit aller Werte mit Befindlichkeit gesund bzw. krank für jeden Patienten ergeben. (Es wurden die Quantile der Normalverteilung zugrunde gelegt.) Für jede Befindlichkeit und für jeden Patienten ist die Anzahl der Messungen dadurch verschieden. Bei den Patienten 6, 8, 9 sind diese Werte auf Grund der teilweise wenigen Messwerte für die beiden Gesundheitszustände wenig aussagekräftig. Hierbei wird deutlich, dass sich die C_3/C_{16} -Durchschnittswerte der Patienten voneinander bei beiden Befindlichkeiten erheblich unterscheiden. Sie schwanken im Gesundheitszustand zwischen 27,7 bei Patient 5 und 11,5 bei Patient 6. Im Krankzustand bewegen sich diese zwischen 41,3 bei Patient 5 und 12,2 bei Patient 6. Bis auf Patient 8 und 9 sind die C_3/C_{16} -Werte im Krankzustand immer höher als im Gesundheitszustand. Die Abstände der Mittelwerte im Zustand gesund und krank sind hierbei bei den einzelnen Patienten unterschiedlich. Bei den Patienten 2, 3, 4, 5 und 7 sind diese Abstände sehr deutlich ausgeprägt. Bei Patientin 1 hingegen liegt ein geringer Abstand vor. Bei Patient 6, 8 und 9 liegen zu wenig Messwerte im Zustand krank bzw. gesund vor, um eine eindeutige Aussage machen zu können.

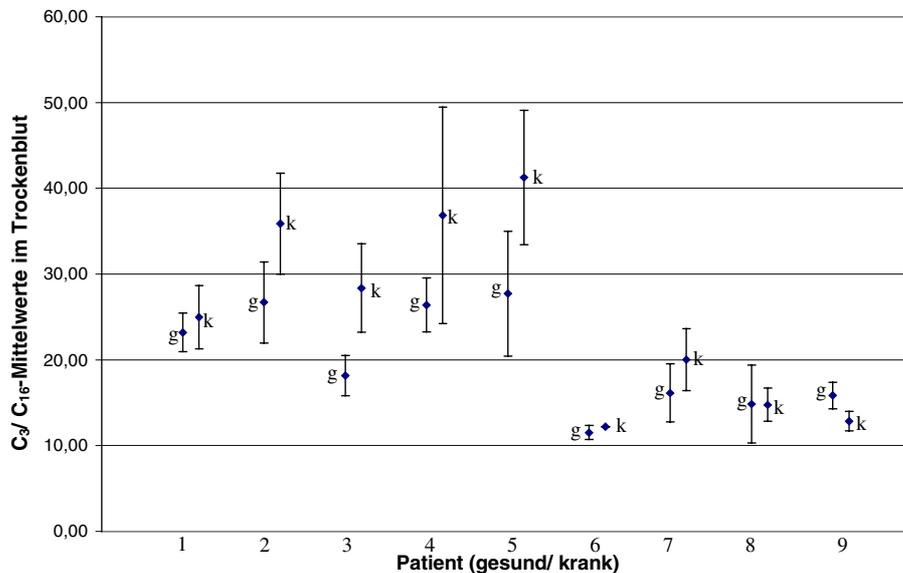


Abb. 21: Mittelwerte mit 95%- Konfidenzintervall des Quotienten C_3/C_{16} für jeden Patienten bei Gesundheitszustand gesund (g) bzw. krank (k), n ist für jeden Patienten und jede Befindlichkeit verschieden. Die Berechnung erfolgte unter Zugrundelegung der Quantile für die Normalverteilung.

Um den Zusammenhang zwischen den C_3/C_{16} -Werten und der Befindlichkeit zu überprüfen, wurden die C_3/C_{16} -Werte wie im Kapitel 3.9.1 beschrieben „transformiert“.

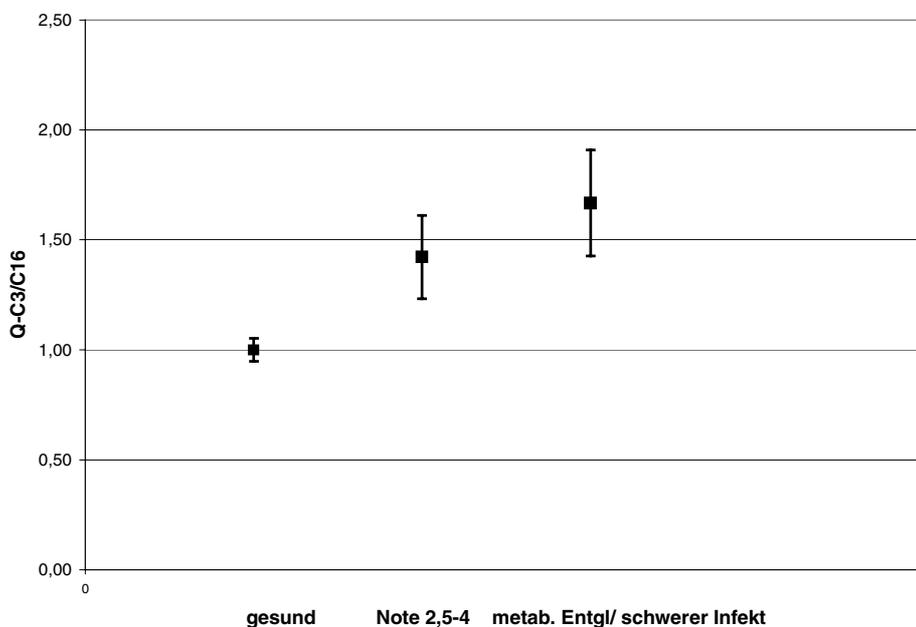


Abb. 22: Darstellung der berechneten Mittelwerte $Q-C_3/C_{16}$ aller PPA-Patienten unter den Bedingungen: gesund/ Note 2,5-4 (Zustand nach Infekt, leicht krank, krank)/ metabolische Entgleisung, schwerer Infekt. Q wurde aus den transformierten C_3/C_{16} -Quotienten aller Patienten berechnet.

Es wurden Mittelwerte aus den transformierten C_3/ C_{16} -Werten aller PPA-Patienten gebildet: bei der Befindlichkeit gesund (Bedingung1), bei den Befindlichkeiten Zustand nach Erkrankung, leicht krank oder krank (Bedingung 2), sowie für Werte bei schon länger bestehenden Infekten oder metabolischen Entgleisungen (Bedingung 3). Diese Mittelwerte wurden Q genannt. Patient 8 konnte hierfür nicht berücksichtigt werden, da nur drei C_3/ C_{16} -Werte für die Befindlichkeit gesund vorlagen und dadurch keine korrekte Transformation der Werte möglich war. Wie deutlich zu erkennen ist, ist der C_3/ C_{16} -Mittelwert bei der Befindlichkeit gesund deutlich niedriger als die Werte der anderen beiden Bedingungen. Für die zuletzt beschriebene Bedingung trifft dies noch deutlicher zu.

4.2.2 Patienten mit MMA

4.2.2.1 Einzelbeschreibung der Patienten

Patient 10:

Es erfolgten bei diesem Patienten 26 Messungen im Abstand von meist 14 Tagen. Die Tage, an denen der im Kapitel 3.7.1.1 beschriebene Therapieversuch durchgeführt wurde, sind besonders gekennzeichnet. Bei diesem Patienten werden zusätzlich die im Urin gemessenen Methylmalonsäurewerte dargestellt.

Auffälligkeiten während der 8-monatigen Studienzeit:

- | | |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Tag 59: | Rachenentzündung mit sehr hohem Fieber, einmaliges Erbrechen |
| Tag 120: | Leichte Erkältung, Müdigkeit |
| Tag 128-141: | Schwere Erkältung mit Husten, Schnupfen, Mittelohrentzündung, hohes Fieber, Erbrechen |
| Tag 148: | Noch immer Husten |
| Tag 162: | Nach Gripeschutzimpfung schwerer Husten und Schnupfen |
| Tag 176-200: | Leichter Schnupfen und Husten. Der Patient ist weniger aktiv, eher müde. |

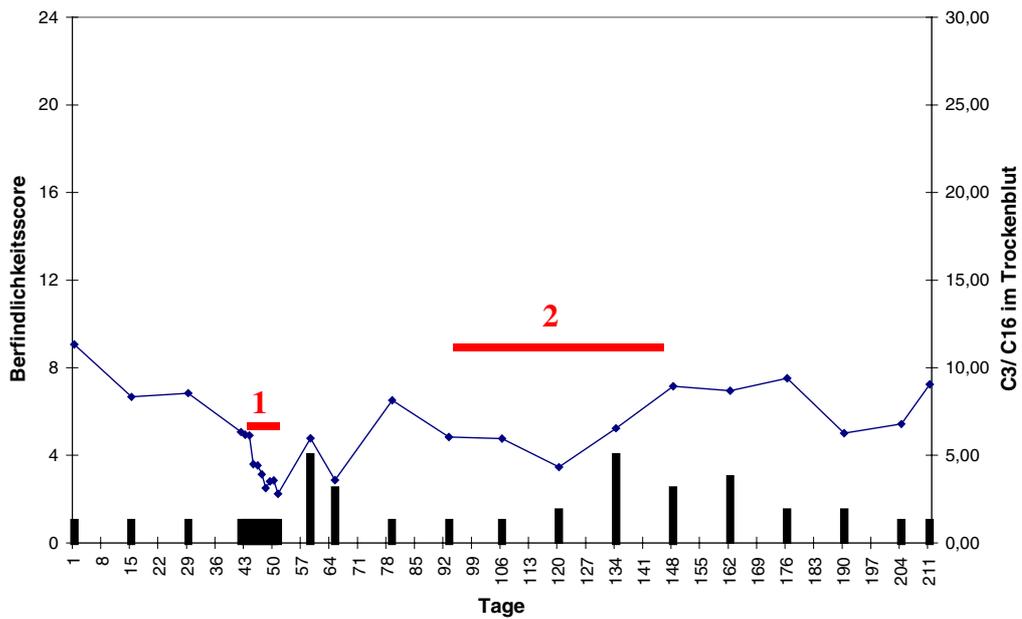


Abb. 23: Patient 10: Darstellung des Befindlichkeitsscores (Balken) und des C₃/ C₁₆-Quotienten (Linie) in einem Zeitraum von 8 Monaten. Die Behandlungstage mit Hydroxyadenosylcobalamin 1 mg/die i.m. Applikation (1) und orale Gabe (2) sind markiert.

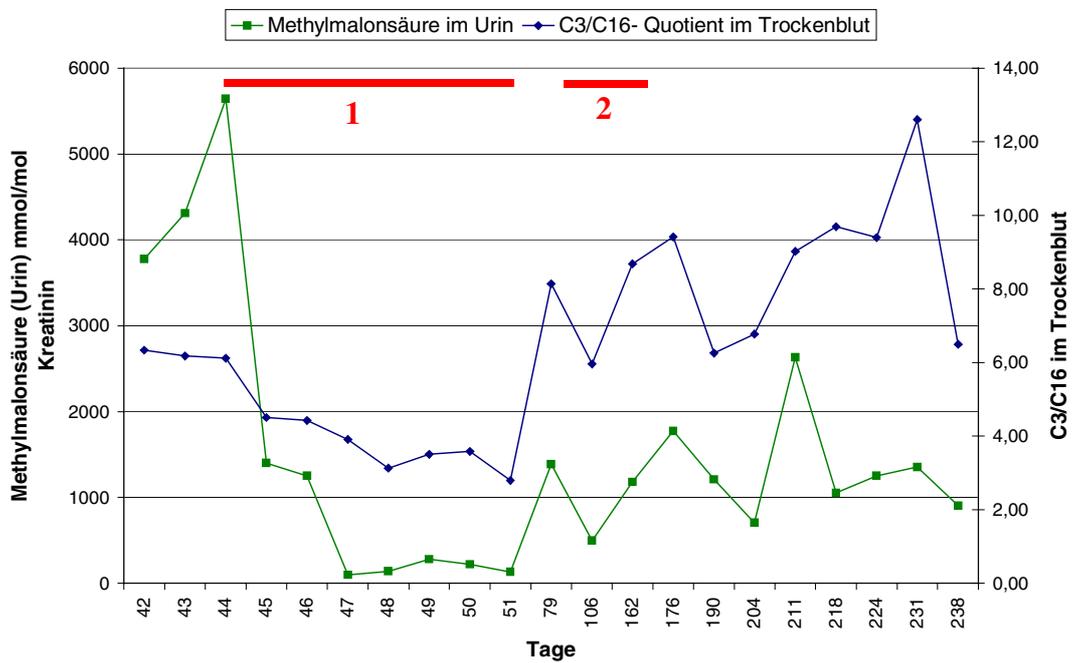


Abb. 24: Patient 10: Darstellung der Methylmalonsäureausscheidung im Urin in mmol/mol Kreatinin und des Quotienten C₃ C₁₆ im Trockenblut. Die Behandlungstage mit Hydroxyadenosylcobalamin i.m. (1) und oral (2) sind markiert.

Beschreibung:

Die C_3/ C_{16} -Werte dieses Patienten bewegten sich zwischen 2,8 und 11,3. Die C_3/ C_{16} -Werte des Patienten fielen während der intramuskulären Gabe von Desoxyadenosylcobalamin deutlich ab. (Tag 42 - 51). Anschließend stiegen sie wieder an. Bei der anschließenden oralen Gabe des Medikaments konnte kein eindeutiger Einfluss auf den Quotienten und die Methylmalonsäureausscheidung im Urin beobachtet werden. Der Patient hatte im Zeitraum von Tag 134 - 162 massive Infekte, darunter auch hohe C_3/ C_{16} -Werte. Am Tag 1 und Tag 211 lagen sehr hohe Werte vor, obwohl der Patient an diesen Tagen gesund war.

Wie die Verlaufskurven der C_3/ C_{16} -Werte im Blut und der Methylmalonsäurekonzentrationen im Urin zeigen, besteht eine enge Beziehung zwischen diesen beiden Werten. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson zwischen der logarithmierten Methylmalonsäurekonzentration und dem Quotienten C_3/ C_{16} ergab 0,57 und stellt somit ebenfalls eine Korrelation zwischen diesen beiden Parameter dar.

Patient 11:

Es liegen bei diesem Patienten 18 Messwerte vor, die in einem Abstand von meist 14 Tagen bestimmt wurden.

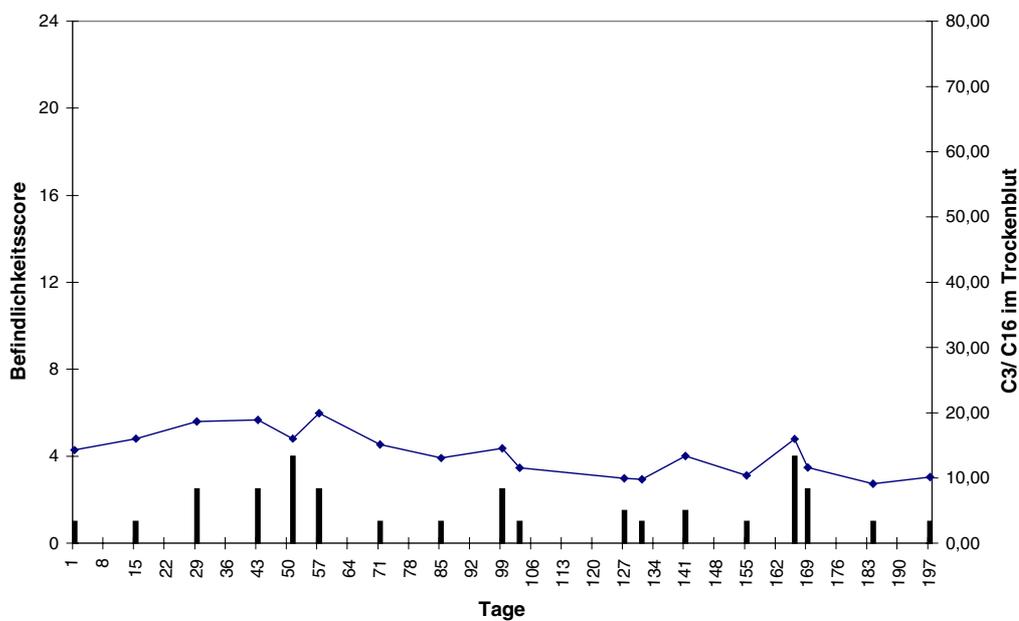


Abb. 25: Patient 11: Darstellung des Befindlichkeitsscores (schwarze Balken) und des C_3/ C_{16} -Quotienten (blaue Linie) in einem Zeitraum von 8 Monaten

Auffälligkeiten während der 8-monatigen Studienzeit:

- Tag 24: Stationärer Aufenthalt wegen Erbrechen mit erhöhten Laktat- und schlechten Blutgaswerten
- Tag 36-38: Stationärer Aufenthalt wegen Erbrechen
- Tag 51-53: Stationärer Aufenthalt wegen massiv erniedrigtem Blutzuckerspiegel. Änderung der Nahrung und Gabe von Duocal
- Tag 119-123: Wegen Obstipation, Nahrungsverweigerung und Bauchschmerzen stationärer Aufenthalt
- Tag 153: Leichter Schnupfen, roter Rachen bei ansonsten gutem Allgemeinzustand
- Tag 141: einmaliges Erbrechen, ansonsten unauffällig
- Tag 166-168: Stationärer Aufenthalt wegen Nahrungsverweigerung, Erbrechen und schlechte Blutgaswerte

Beschreibung:

Bei diesem Patienten schwanken die C_3/ C_{16} -Werte zwischen 19,9 und 9,8. An allen Infekttagen bzw. Tagen nach einem Infekt (29, 43, 51, 57, 99, 141, 166, 169) ist zu beobachten, dass die C_3/ C_{16} -Werte erhöht sind. Nur an den Tagen 1, 15 und 71 hat der Patient hohe C_3/ C_{16} -Werte, obwohl er an diesen Tagen gesund ist.

Patientin 12:

Von dieser Patientin existieren 14 Messwerte in meist 14-tägigem Abstand.

Auffälligkeiten während der 8-monatigen Studienzeit:

- Tag1: Die Patientin litt nachts unter Bauchschmerzen, am Tag unter Übelkeit, deshalb stationäre Aufnahme.
- Tag15: Erbrechen, Ausschlag auf der Brust, Kandidainfektion, Änderung des Diätplans: Erhöhung des natürlichen Eiweißes um 3 g
- Tag 113: Ausschlag am Arm, Durchfall
- Tag 122: Husten, Erbrechen, ansonsten guter Allgemeinzustand
- Tag 183: Eiweiß- und Kalorienreduktion auf Grund von Erbrechen und Durchfall

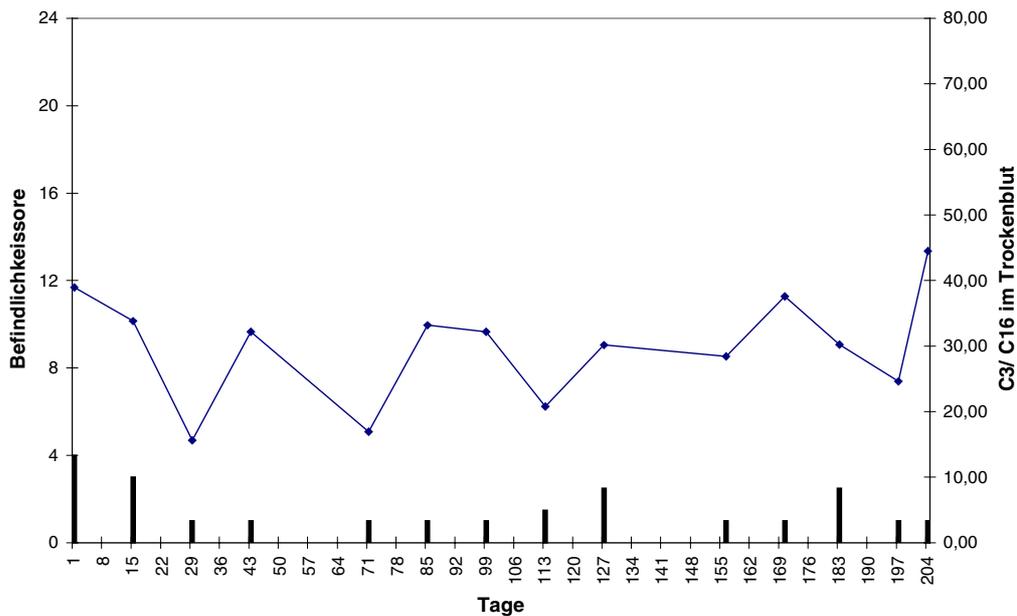


Abb. 26: Patientin 12: Darstellung des Befindlichkeitscores (Balken) und des C₃/ C₁₆-Quotienten (Linie) in einem Zeitraum von 8 Monaten

Beschreibung:

Bei Patientin 12 schwanken die C₃/ C₁₆-Werte zwischen 15,6 und 44,0. Bei dieser Patientin scheint kein Zusammenhang zwischen der Befindlichkeit und den Werten zu bestehen. Sie hat zwar an den Tagen 1, 15, 127, 183 unter Infekten erhöhte C₃/ C₁₆-Werte, doch sind diese Werte trotz guter Befindlichkeit an den Tagen 43, 85, 99, 170 und 204 erhöht. An den restlichen Tagen sind diese Werte bei guter Befindlichkeit niedrig.

Patientin 13:

16 Messwerte sind bei dieser Patientin vorhanden, sie wurden alle im Abstand von 14 Tagen bestimmt.

Auffälligkeiten während der 8-monatigen Studienzeit:

- Tag 57-85: Patientin würgt beim Essen.
- Tag 113: Heiserkeit, leichter Husten, weniger Appetit
- Tag 120-127: Erkältung mit Heiserkeit, erhöhte Bikarbonatgabe. Die Patientin erhält mehr natürliches Eiweiß: 2 g
- Tag 169: Heiserkeit
- Tag 172-182: Infekt mit eitrigem Schnupfen, Erbrechen, teilweise Nahrungsverweigerung, bekommt eine erhöhte Bikarbonatmenge

Tag 197-208: Schwere Angina mit Nahrungsverweigerung, Stoffwechseldekompensation mit Apathie, stationärer Aufenthalt

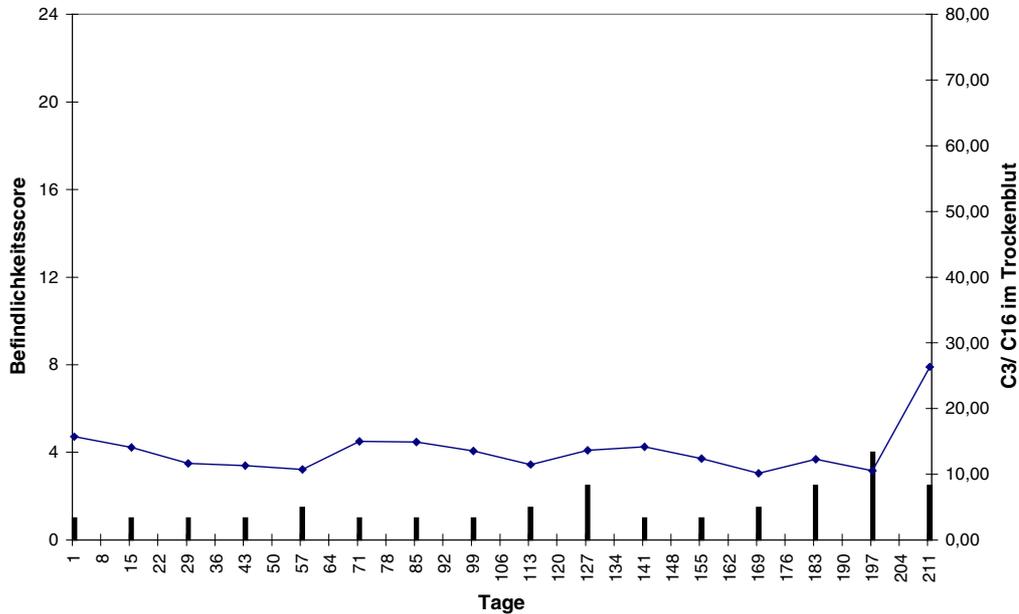


Abb. 27: Patientin 13: Darstellung des Befindlichkeitscores (Balken) und des C₃/ C₁₆-Quotienten (Linie) in einem Zeitraum von 8 Monaten

Beschreibung:

Die Messwerte der Patientin 13 bewegen sich zwischen 10,1 und 26,3. Es fällt auf, dass die Patientin am Tag 197, dem ersten Tag eines schweren Infektes, der am Folgetag zu einer Entgleisung führt, mit 10,5 einen recht niedrigen C₃/ C₁₆-Wert hatte, am Tag 211 (Zustand nach Infekt) ist dieser Wert sehr hoch. Zwischen den Tagen 1 bis 183 verlaufen die Werte mit leichten Schwankungen und sind auch an den Tagen 57, 113 und 169 (fraglich gesund) sowie an den Tagen 127 und 183 (Zustand nach Infekt) recht niedrig.

Patient 14:

Es wurden 17 Messwerte im 14-tägigen Abstand bestimmt.

Auffälligkeiten während der 8-monatigen Studienzeit:

- Tag 1: Husten bei gutem Allgemeinbefinden
- Tag 15: Trockene Haut, Rötung unter den Augen
- Tag 29-50: Wadenkrämpfe, Husten, Schnupfen
- Tag 57: Husten

Tag 85-92: Infekt mit starkem Husten und Schnupfen

Tag 181: Kopfschmerzen, Erbrechen

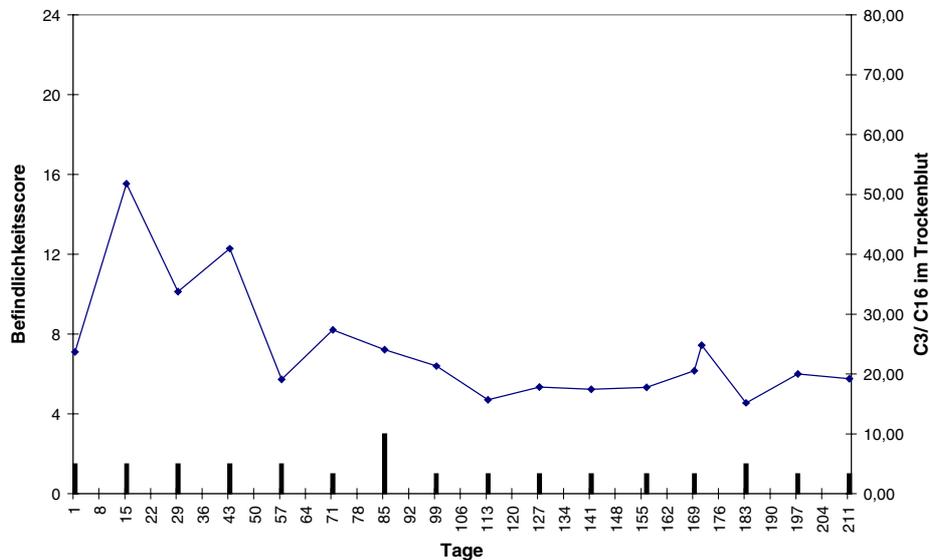


Abb. 28: Patient 14: Darstellung des Befindlichkeitsscores (Balken) und des C₃/ C₁₆-Quotienten (Linie) in einem Zeitraum von 8 Monaten

Beschreibung:

Die C₃/ C₁₆-Werte dieses Patienten schwanken zwischen 15,7 und 51,8. Hohe C₃/ C₁₆-Werte liegen an Tagen mit schon länger dauernden leichten Infekten (Tage 1, 29, 43) und stärkeren Infekten (Tag 85) vor, hingegen sind sie an Tagen mit frischen Infekten (Tage 57, 183) sehr niedrig. Am Tag 15 an dem der Patient unter massiven Hautproblemen leidet ist der C₃/ C₁₆-Wert massiv erhöht. Erhöhte C₃/ C₁₆-Werte bei gutem Allgemeinbefinden zeigt der Patient an den Tagen 71, 99 und 169.

4.2.2.2 Vergleich der MMA-Patienten untereinander

In Abbildung 29 werden alle C₃/ C₁₆-Werte der MMA-Patienten dargestellt. Wie bereits bei den PPA-Patienten beobachtet, ist die Streuung der C₃/ C₁₆-Werte auch bei den MMA-Patienten unterschiedlich groß. Die Patienten 12 und 14 weisen eine größere Streuung auf als die Patienten 10 und 11. Bei Patientin 13 liegt nur ein einziger Wert vor, der stark streut, der C₃/ C₁₆-Quotient nach metabolischer Entgleisung am Tag 211.

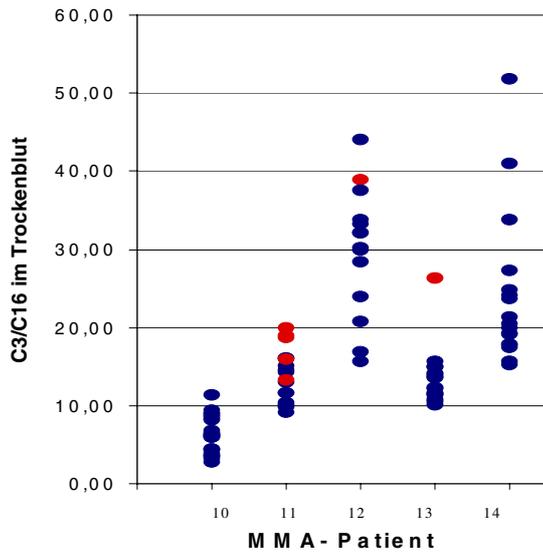


Abb. 29: Darstellung sämtlicher C_3/C_{16} -Quotienten. Messwerte bei stationärem Aufenthalt sind als rote Punkte gekennzeichnet.

Auch bei den MMA-Patienten untereinander sind die Messwerte unterschiedlich hoch. Dies soll anhand von Abbildung 30 veranschaulicht werden. Hierbei werden die Mittelwerte jedes Patienten mit 95%-Konfidenzintervall im Zustand gesund und krank angegeben. Für jede Befindlichkeit und für jeden Patienten ist n dadurch verschieden.

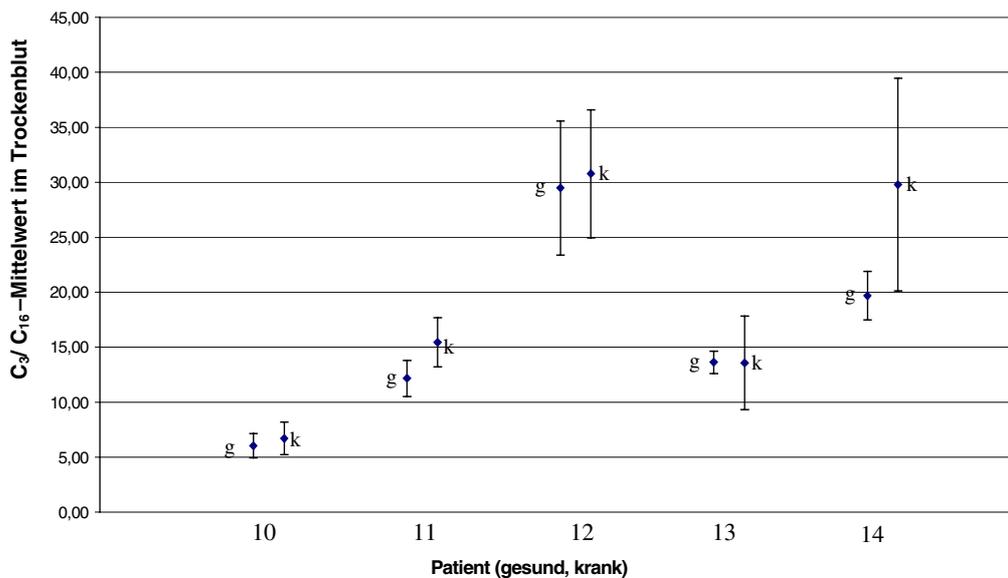


Abb. 30: Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall des Quotienten C_3/C_{16} für jeden Patienten mit MMA bei Gesundheitszustand gesund (g) bzw. krank (k), n ist für jeden Patienten und jede Befindlichkeit verschieden. Die Berechnung erfolgte unter Zugrundelegung der Quantile für die Normalverteilung.

Die Höhe der Mittelwerte der Befindlichkeit gesund und krank sind bei den Patienten sehr verschieden. Im Gesundheitszustand bewegen sie sich von 6,0 bei Patient 10 bis 29,3 bei Patientin 12. Im Krankzustand liegen sie zwischen 6,7 bei Patient 10 und 30,7 bei Patientin 12. Bis auf Patientin 13, bei der die Werte im Gesund- sowie im Krankzustand gleich sind, zeigen die C_3/ C_{16} -Quotienten im Mittel höhere Werte bei Befindlichkeit krank.

Die C_3/ C_{16} -Werte wurden ebenso wie die Werte der PPA-Patienten transformiert. Mit diesen Werten wurde ein Mittelwert für die Bedingungen gesund (Bedingung 1), Zustand nach Erkrankung, leicht krank oder krank (Bedingung 2) sowie für Werte bei schon länger bestehenden Infekten oder metabolischen Entgleisungen (Bedingung 3) gebildet (siehe Abb.31).

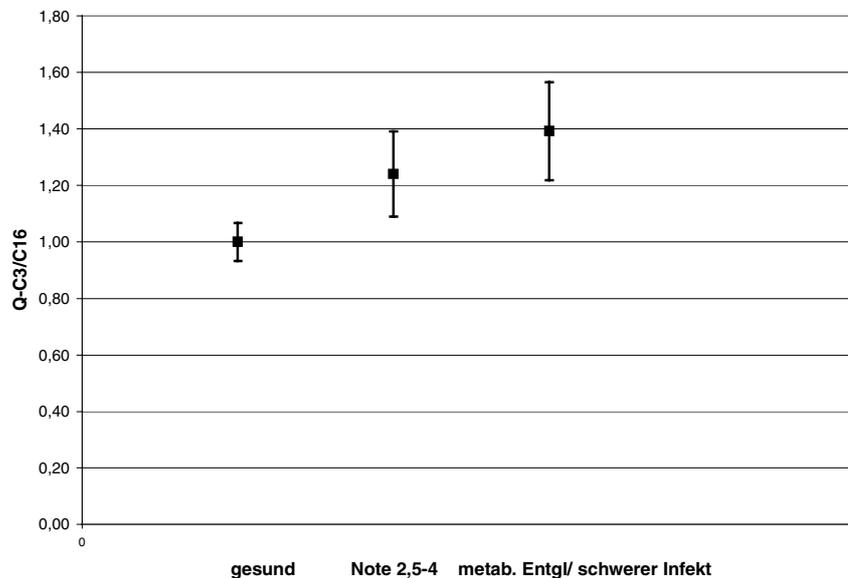


Abb. 31: Darstellung der berechneten Mittelwerte $Q-C_3/ C_{16}$ aller MMA-Patienten unter den Bedingungen: gesund/ Note 2,5- 4: Zustand nach Infekt, leicht krank, krank/ metabolische Entgleisung, schwerer Infekt. Q wurde aus den transformierten C_3/ C_{16} -Quotienten aller Patienten berechnet.

Wie auch bei den PPA-Patienten zu beobachtet ist, sind die Mittelwerte der MMA-Patienten mit 1,0 im Gesundheitszustand deutlich niedriger als zu den beiden anderen Bedingungen: Note 2,5-4: C_3/ C_{16} -Wert: 1,2 und bei metabolischer Entgleisung/ schwerer Infekt: C_3/ C_{16} -Wert: 1,4.

4.2.3 Besteht ein Zusammenhang zwischen den C_3/C_{16} -Werten und den Konzentrationen des freien Carnitins?

Um auszuschließen, dass die Höhe der C_3/C_{16} -Werte von der Carnitinmenge im Körper abhängig ist, wurde bei allen Patienten versucht, die in den acht Monaten ermittelten freien Carnitinkonzentrationen mit den Werten des C_3/C_{16} -Quotienten zu korrelieren. Bei keinem der 14 Patienten konnte solch eine Korrelation nachgewiesen werden. Dargestellt ist als Beispiel Patient 7 in Abbildung 32.

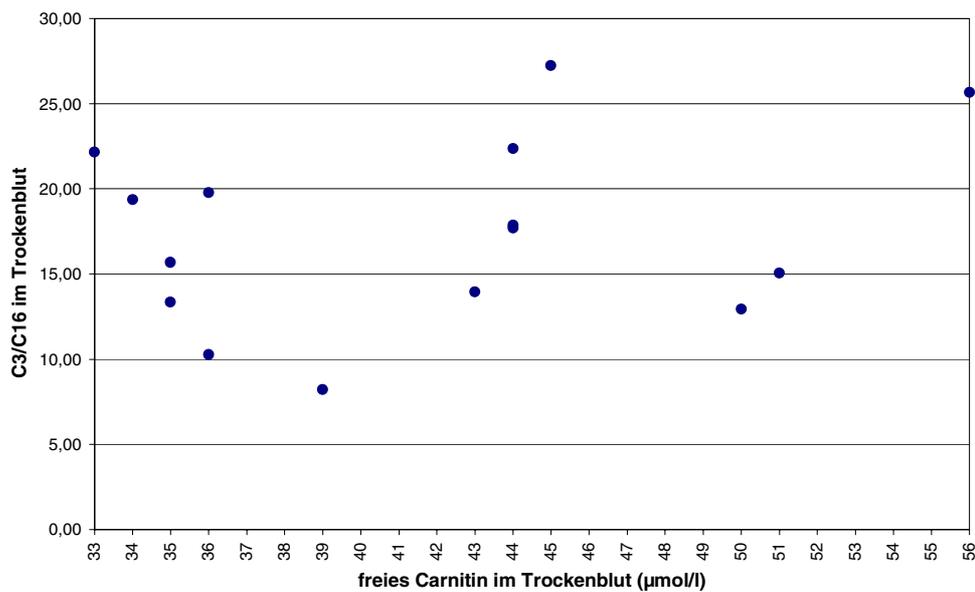


Abb. 32: Patient 7: Darstellung der freien Carnitinkonzentrationen ($\mu\text{mol/l}$) gegen die C_3/C_{16} -Werte im Trockenblut

4.2.4 Der Quotient C_3/C_{16} unter einer Therapieoptimierung

Bei drei der 14 Probanden wurde während der Studienzeit eine Therapieoptimierung durchgeführt. Tabelle 13 gibt die Therapieoptimierung und ihren Einsatzzeitpunkt an. Abbildung 33 zeigt, dass bei allen drei Patienten eine deutliche Reduktion des C_3/C_{16} -Quotienten unter der Therapieoptimierung zu verzeichnen ist. Die Therapieoptimierung ging ebenfalls mit einer deutlichen Verbesserung des klinischen Zustandes einher.

Tab. 13: Angaben über den Zeitpunkt und die Art der Therapieoptimierung bei 3 Patienten (Patienten 2, 3: PPA, Patient 10: MMA)

Patient	Zeitpunkt	Art der Therapieoptimierung	Klinischer Zustand
Patient 2	Tag 116	Anpassung der Diät an altersgemäßen Proteinbedarf, Erhöhung der Energiezufuhr, Supplementierung mit Mineralstoffen, Spurenelementen, Vitaminen	Vorher: viele Entgleisungen und stationäre Behandlung Danach: nur noch 1 Infekt ohne stationäre Behandlung
Patient 3	Tag 176	Anpassung der Diät an altersgemäßen Proteinbedarf, Erhöhung der Energiezufuhr, Supplementierung mit Mineralstoffen, Spurenelementen, Vitaminen	Vorher sehr viele stationäre Behandlungen wegen Entgleisungen Danach: stabiler klinischer Zustand
Patient 10	Tag 44	Gabe von 500 µg Desoxyadenosylcobalamin (Calomide®-S) tägl. i.m.	Klinischer Zustand vor und nach Gabe gleichbleibend gut, Methylmalonsäureausscheidung im Urin erheblich reduziert

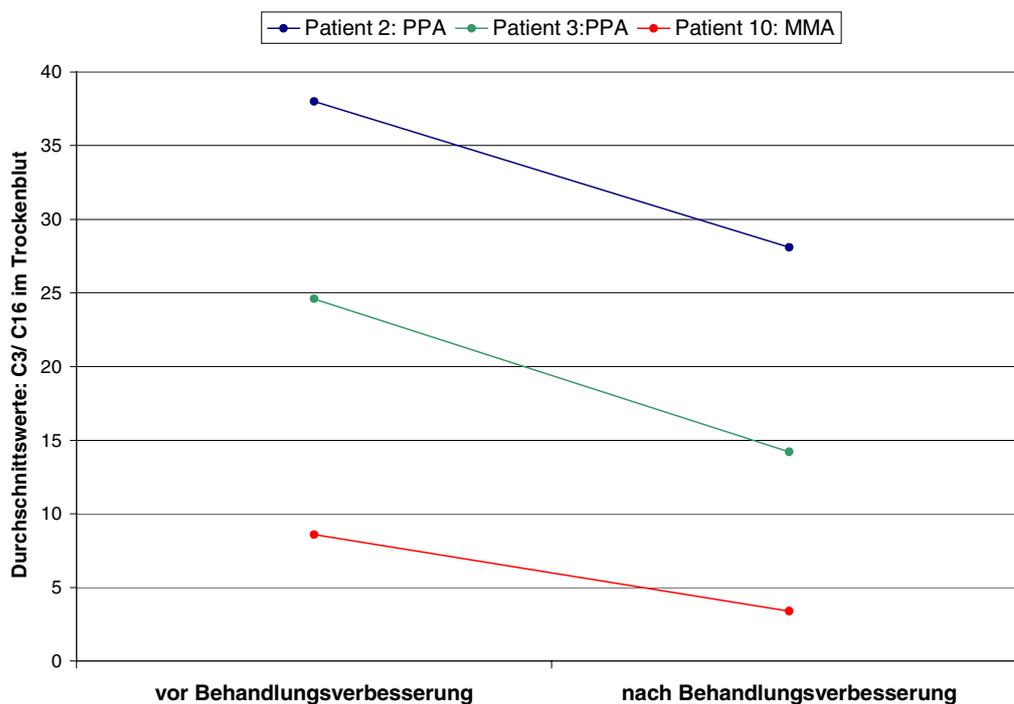


Abb. 33: Darstellung der durchschnittlichen C₃/ C₁₆-Quotienten vor und nach einer Behandlungsverbesserung bei drei Patienten (PPA-Patienten 2, 3; MMA-Patient:10)

4.3 Untersuchungen bei Kontrollpersonen

Im Folgenden werden die Ergebnisse des experimentellen Teils dargestellt.

4.3.1 Studie 1: Messung der freien Carnitin- und Acylcarnitinkonzentrationen nach Gabe von Carnitin

Ziel dieser Studie ist, den Einfluss einer oralen L-Carnitingabe auf die FC-Konzentration und die C₂-, C₃-, C₁₆-, C₁₈- und C_{18:1}-Konzentrationen im Trockenblut bei gesunden Probanden zu untersuchen.

Nach Gabe von Carnitin (30 mg/kg Körpergewicht) zeigt sich bei allen acht Probanden eine Erhöhung des im Trockenblut gemessenen FC. Die maximale Erhöhung des FC bewegt sich zwischen dem 1,2-fachen bei Proband 14 und dem 6,5-fachen bei Proband 10. Durchschnittlich kann nach einer Stunde ein maximaler Anstieg des FC um das 2,5-fache von 54,3 µmol/l +/- 14,4 auf 134,1 µmol/l +/- 65,1 beobachtet werden. Bei drei der Probanden (Proband 2, 4, 12) fällt ein zweigipfeliger Anstieg des Carnitinspiegels auf, bei den Probanden 4, 13 und 14 kann nahezu keine Erhöhung beobachtet werden. Nach zwei Stunden ist bei allen Probanden mit Ausnahme des Probanden 4 ein stetiger Abfall des FC zu beobachten. Der FC-Wert liegt nach drei Stunden bei 77,0 µmol/l +/- 31,8.

Die Messung der AC erbringt folgende Ergebnisse:

Bei der Messung des C₂ fällt durchschnittlich eine 1,2-fache Erhöhung der Werte nach drei Stunden auf. Bei Betrachtung der Einzelverläufe der Probanden kann im Verlauf der Messzeit bei jedem Probanden ein Maximum des C₂-Spiegels beobachtet werden, das in Höhe und Auftretenszeitpunkt individuell verschieden ist und keinen Zusammenhang mit dem FC zeigt. Die Messung des C₃ lässt weder bei Betrachtung der Durchschnittskonzentrationen noch bei Betrachtung der Einzelverläufe eine Erhöhung beziehungsweise Verringerung dieser Konzentration unter Carnitinaufnahme erkennen, da die Messwerte eines Probanden stark schwanken und die Konzentrationen nach drei Stunden teils höher teils niedriger sind als die Ausgangskonzentrationen.

Die langkettigen Acylcarnitine C₁₆, C₁₈ und C_{18:1}, zeigen im Zeitverlauf eine tendenzielle Erniedrigung. Aufgrund der ähnlichen Konzentrationsverläufe über die Zeit scheint eine Abhängigkeit dieser drei Acylcarnitine untereinander zu bestehen.

Der Quotient C₃/C₁₆ geht mit dem Verlauf des C₃ parallel.

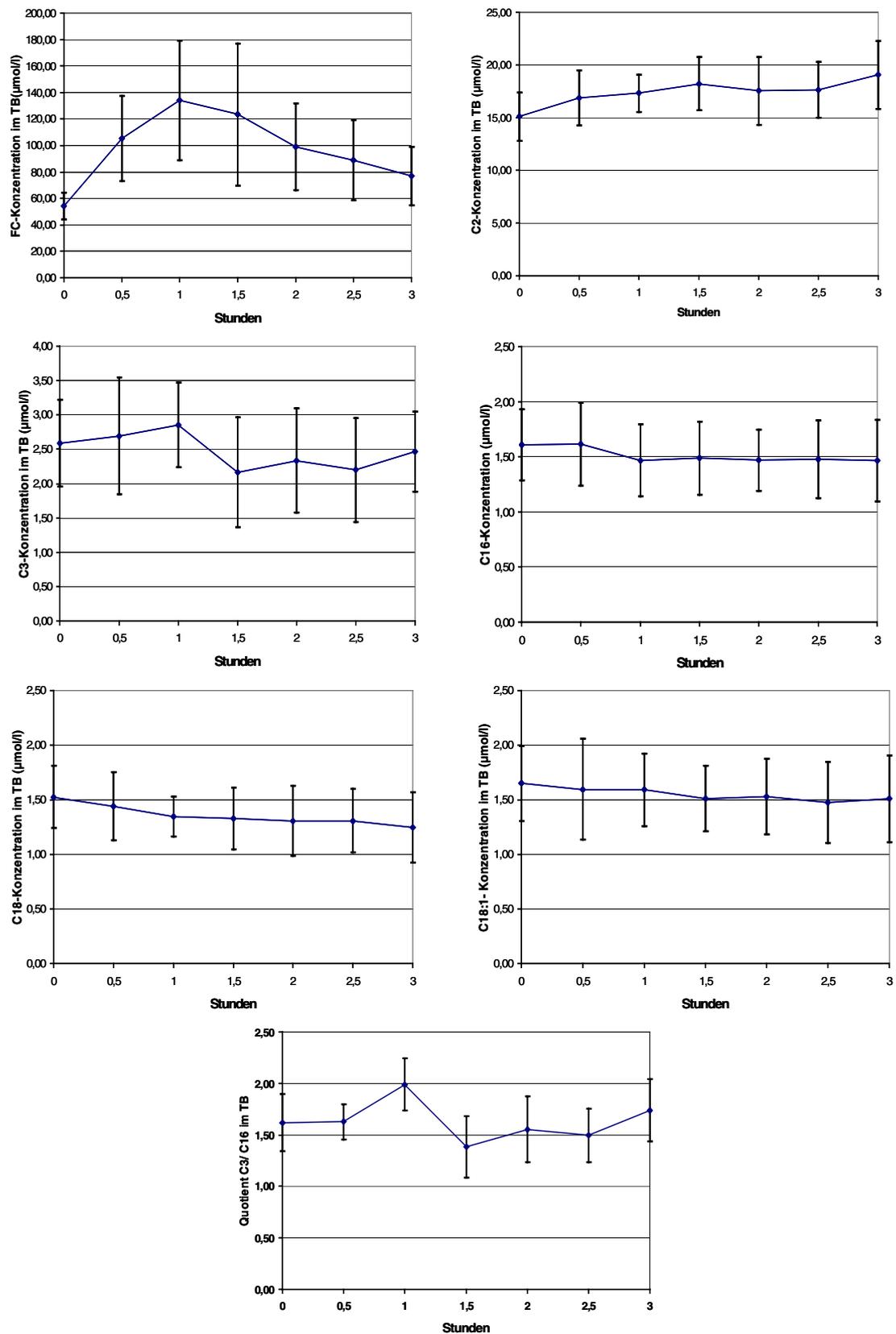


Abb. 34: Studie 1: Mittlere FC-, AC- (C_2 , C_3 , C_{16} , C_{18} , $C_{18:1}$) Konzentrationen und Quotient C_3/ C_{16} mit 95%-Konfidenzintervall im Trockenblut bei 8 gesunden Kontrollpersonen nach Gabe von 30 mg/kg KG L-Carnitin (0 h)

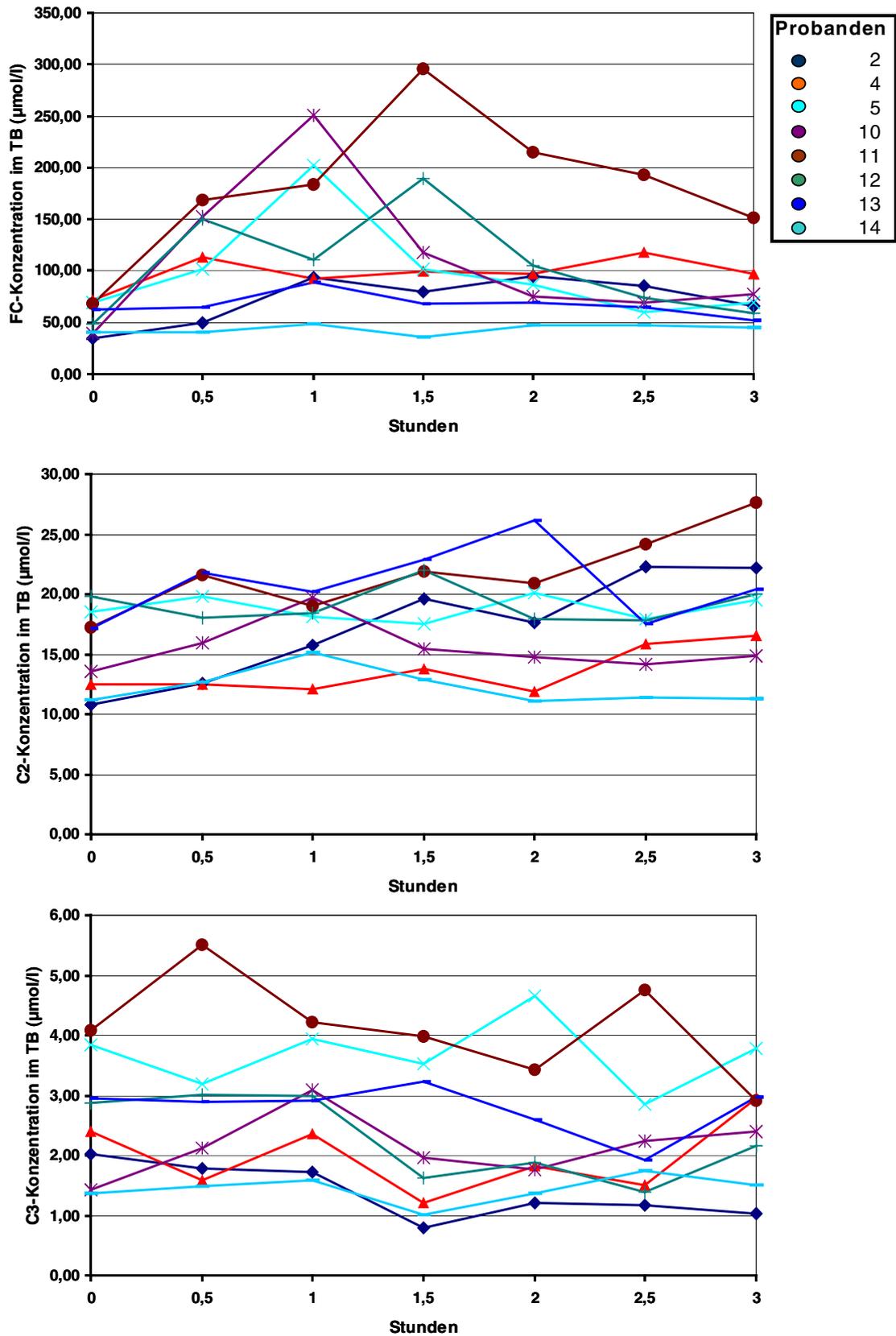


Abb. 35: Studie 1: Verläufe der bei allen 8 gesunden Kontrollpersonen gemessenen FC-, AC- (C_2 , C_3) Konzentrationen und die Werte des Quotient C_3/C_{16} im Trockenblut nach Gabe von 30 mg/kg KG L-Carnitin (0 h)

4.3.2 Studie 2: Messung des freien Carnitins und der Acylcarnitine an fünf aufeinanderfolgenden Tagen

Ziel dieser Studie ist zu überprüfen, wie sich die AC- Konzentrationen und die FC- Konzentration an aufeinanderfolgenden Tagen verhalten.

Das FC und die AC wurden an fünf hintereinanderfolgenden Messtagen nach mindestens achtstündiger nächtlicher Nahrungskarenz bei fünf Probanden gemessen.

Die FC-Konzentrationen zeigen bei den fünf Messungen geringe Unterschiede. Es kann von einem recht konstanten Verlauf gesprochen werden (FC zw. 37,03 $\mu\text{mol/l}$ +/- 15,08 und 45,07 $\mu\text{mol/l}$ +/- 11,92). Bei Betrachtung der Einzelverläufe zeigt nur Proband 3 starke Unterschiede bei den FC-Konzentrationen.

Die gemessenen C_2 -Konzentrationen sind ebenso wie die C_3 -Konzentrationen bei Betrachtung der Durchschnittskonzentrationen sowie der Einzelverläufe sehr konstant (C_2 : zw. 14,15 $\mu\text{mol/l}$ +/- 7,50 und 15,74 $\mu\text{mol/l}$ +/- 6,18; C_3 zw. 1,45 $\mu\text{mol/l}$ +/- 0,70 und 1,80 $\mu\text{mol/l}$ +/- 1,04)

Bei den langkettigen AC (C_{16} , C_{18} , $C_{18:1}$) sind die am ersten Tag gemessenen Konzentrationen im Durchschnitt höher als an den Folgetagen, an denen nur geringe Schwankungen auffallen.

Bei den meisten der Probanden ist ein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der langkettigen AC untereinander und zu den Konzentrationen des FC festzustellen.

Auch die durchschnittlich ermittelten Konzentrationen der langkettigen AC sowie des FC zeigen, wie Abbildung 37 zu entnehmen ist, eine solche Abhängigkeit.

Der Quotient C_3/ C_{16} bewegt sich im Durchschnitt zwischen 1,34 +/- 0,54 und 0,99 +/- 0,44.

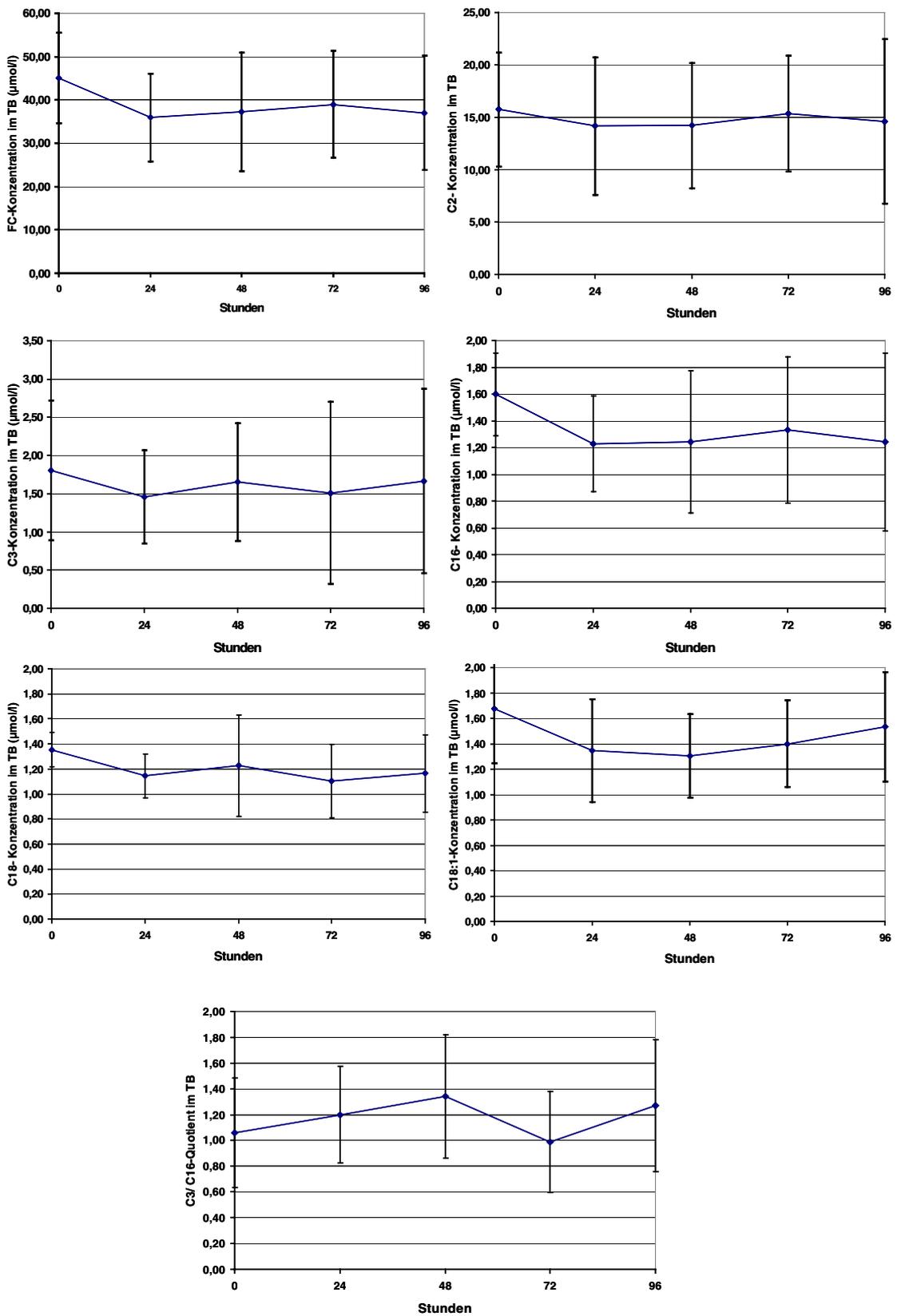


Abb. 36: Studie 2: Mittlere FC-, AC- (C₂, C₃, C₁₆, C₁₈, C_{18:1}) Konzentrationen und Werte des Quotienten C₃/ C₁₆ im Trockenblut mit 95%-Konfidenzintervall bei 5 gesunden Kontrollpersonen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen

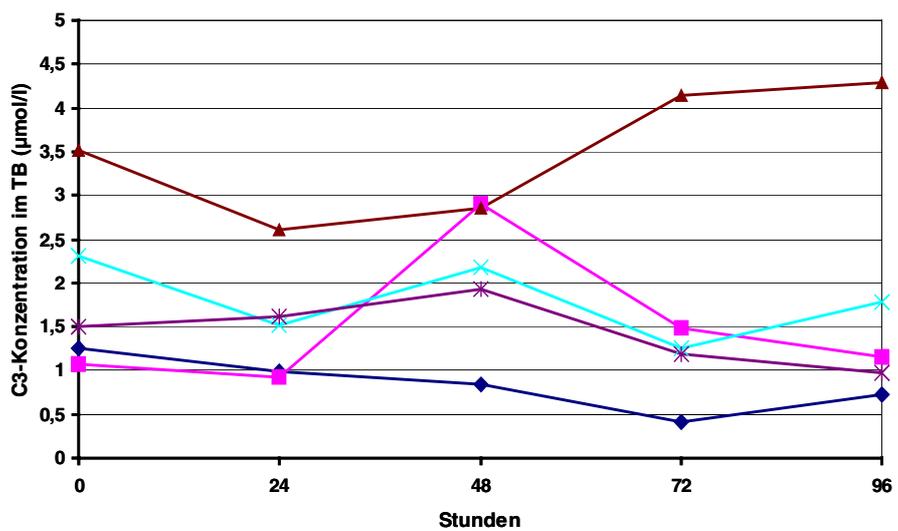
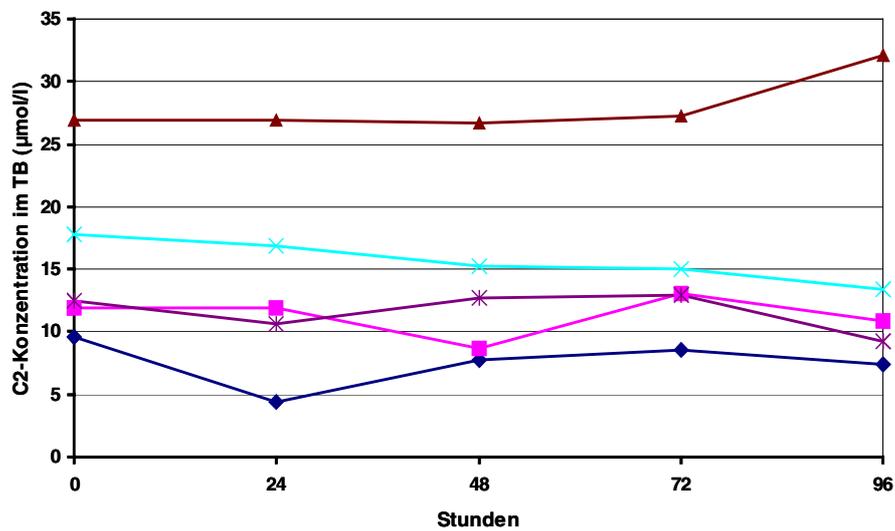
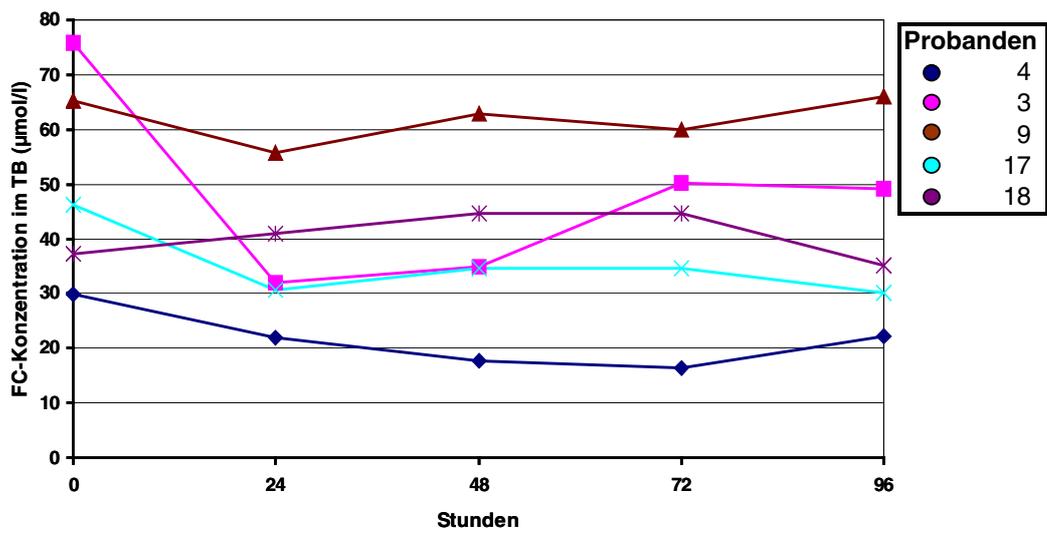


Abb. 37: Studie 2: Verläufe der FC- und AC- (C_2 , C_3) Konzentrationen im Trockenblut bei 5 gesunden Kontrollpersonen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen

4.3.3 Studie 3: Messung des freien Carnitins und der Acylcarnitine im Verlauf eines Tages

Ziel dieser Studie ist die zirkadiane Schwankung der FC- und AC-Konzentrationen zu untersuchen und zu überprüfen ob eine zirkadiane Schwankung vorliegt. Bei diesem Versuch wurden an einem Tag innerhalb von 14 Stunden FC- und AC-Konzentrationen in zweistündigem Abstand bestimmt.

Die mittlere FC-Konzentration ist zwischen null und vier Stunden relativ konstant, nimmt nach sechs Stunden ab und zeigt nach acht Stunden eine statistisch signifikante Abnahme im Vergleich zu dem Ausgangswert (paariger t-Test: $p < 0,014$), danach steigt der Zehn- und Zwölf-Stunden-Wert wieder an und fällt nach 14 Stunden erneut ab.

Die kurzkettigen AC sind hierbei dadurch gekennzeichnet, dass zum einen die mittlere C_2 -Konzentration nach acht Stunden ebenfalls auf $13,33 \mu\text{mol/l}$ (Ausgangswert: $16,77 \mu\text{mol/l}$) abfällt und danach wieder ansteigt. Die Einzelverläufe zeigen starke Schwankungen und sind sehr unterschiedlich. Zum anderen bewegt sich die mittlere C_3 -Konzentration zwischen $1,57 \mu\text{mol/l} \pm 0,68$ und $1,12 \mu\text{mol/l} \pm 0,46$ und zeigt in ihrem Verlauf keine Tendenz.

Die durchschnittlichen Verläufe der langkettigen AC zeigen nur geringe Schwankungsbreiten (C_{16} zwischen $1,17 \mu\text{mol/l} \pm 0,23$ und $1,36 \mu\text{mol/l} \pm 0,16$; C_{18} zwischen $1,17 \mu\text{mol/l} \pm 0,26$ und $1,37 \mu\text{mol/l} \pm 0,30$ und $C_{18:1}$ zwischen $1,19 \mu\text{mol/l} \pm 0,48$ und $1,52 \mu\text{mol/l} \pm 0,56$).

Anhand der Verlaufsdiagramme der mittleren langkettigen AC-Konzentrationen und der FC-Konzentrationen kann von einer Abhängigkeit zwischen den langkettigen AC untereinander ausgegangen werden. Diese Abhängigkeit ist nicht so eindeutig wie bei den Messungen über fünf Tage. Bei den Probanden 8 und 16 kann von einem Zusammenhang zwischen den langkettigen AC mit dem FC ausgegangen werden. Bei den anderen Probanden ist dies nicht erkennbar.

Die durchschnittlichen C_3/ C_{16} -Werte zeigen eine maximale Schwankung von 31 %.

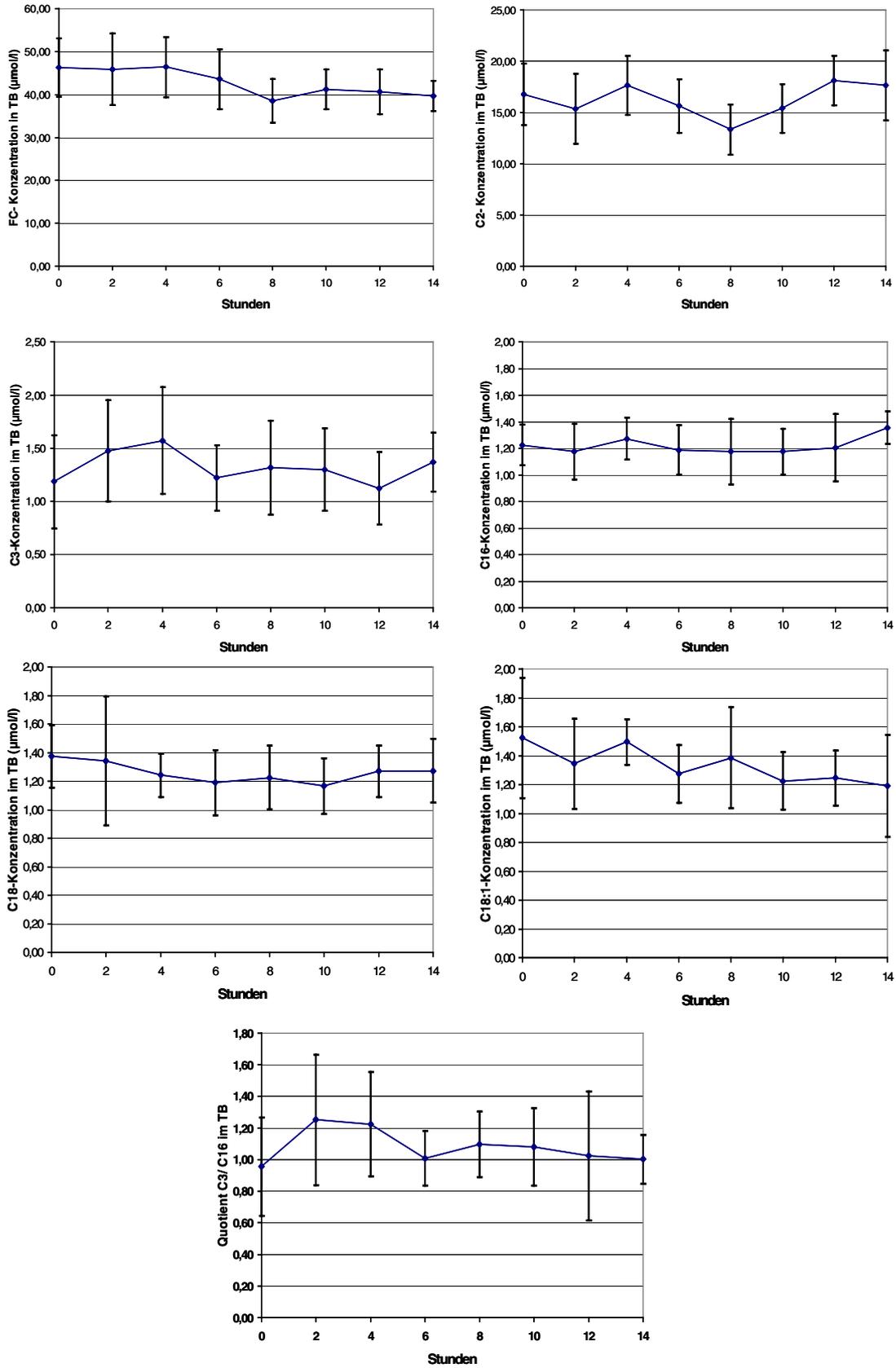


Abb. 38: Studie 3: Im Verlauf eines Tages ermittelte mittlere FC-, AC- (C₂, C₃, C₁₆, C₁₈, C_{18:1}) Konzentrationen und Werte des Quotienten C₃/C₁₆ im Trockenblut mit 95%-Konfidenzintervall im zweistündigen Abstand bei 7 gesunden Kontrollpersonen

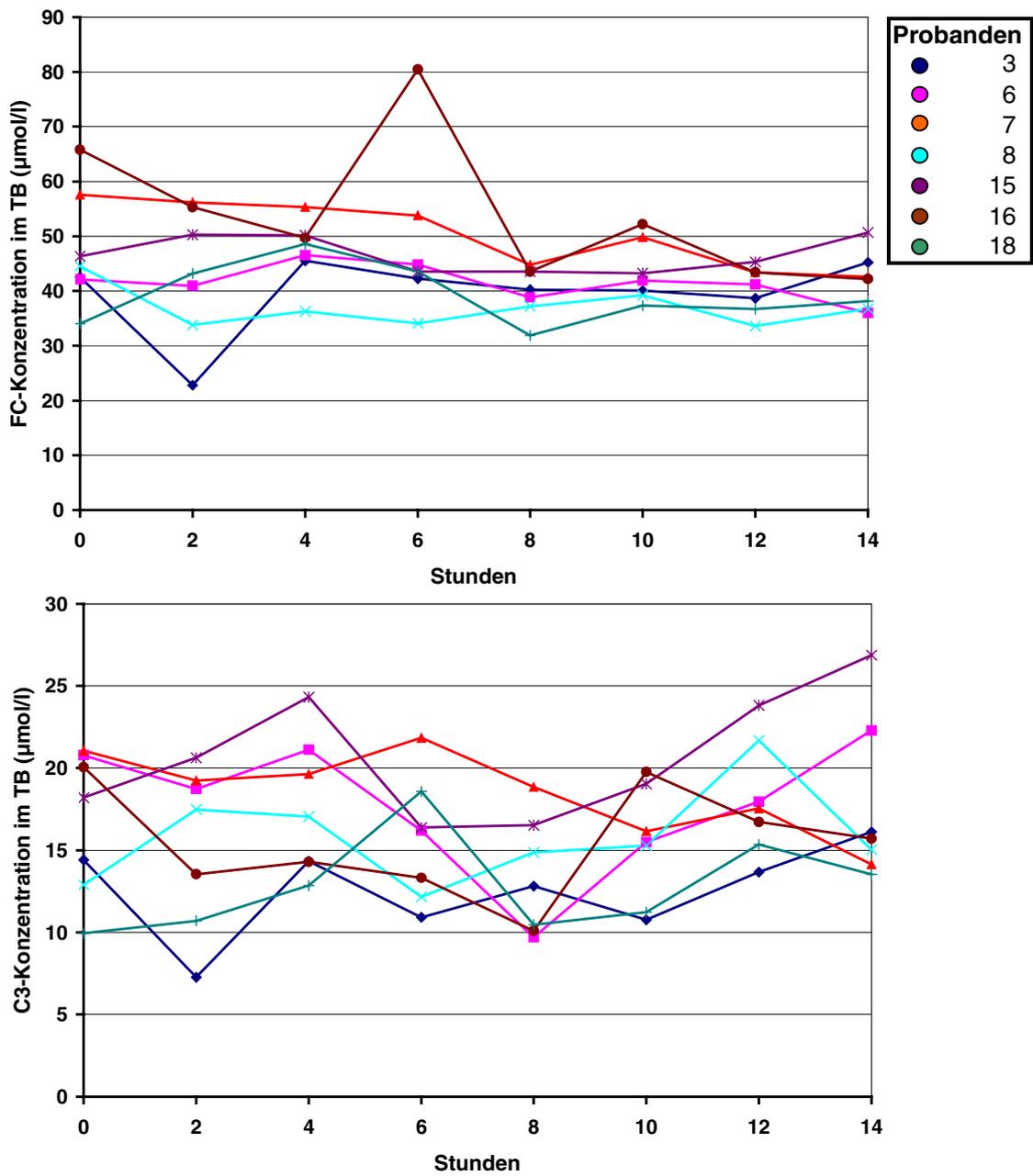


Abb. 39: Studie 3: Verläufe der bei allen 7 gesunden Kontrollpersonen gemessenen FC- und C₃-Konzentrationen im Trockenblut im Laufe eines Tages mit 2-stündigem Abstand

4.3.4 Studie 4: Messung des freien Carnitins und der Acylcarnitine unter einem Glukosetoleranztest

Ziel dieser Studie ist, den Einfluss der Glukose und damit von Insulin auf die FC- Konzentration und AC-Konzentrationen im Trockenblut zu prüfen.

Die Messungen der kapillaren Glukosespiegel und der Konzentrationen des FC und der AC wurden vor und 1, 1,5, 2 und 3 Stunden nach der Gabe von 75 g Glukose bestimmt. Die Glukosekonzentration ist eine Stunde nach der Glukoseaufnahme um 40 % höher als die Ausgangskonzentration. Die Erhöhung ist statistisch signifikant (paariger t-Test: $p < 0,0001$). Die Konzentration des FC zeigt durchschnittlich nach der Glukosebelastung eine steigende Tendenz, doch sind die Konzentrationsverläufe der einzelnen Probanden eher schwankend.

Die C_2 -Konzentration nimmt bei allen Probanden mit Ausnahme der Probanden 20 und 21 ab. Nach drei Stunden ist die durchschnittliche C_2 -Konzentration um 12 % geringer als zum Zeitpunkt null Stunden.

Die C_3 -Konzentration ist bei vier der sieben Probanden eineinhalb Stunden (bzw. zwei Stunden bei Proband 22) nach der Glukosebelastung maximal erniedrigt.

Die Konzentrationen der langkettigen AC (C_{16} , $C_{18:1}$) sind bis auf Proband 20 bei allen anderen nach der Glukosebelastung erniedrigt, nach eineinhalb Stunden maximal (bis auf Proband 2, dort erst nach zwei Stunden). Die C_{18} -Konzentration zeigt diese Tendenz nicht.

Die Werte des Quotienten C_3/ C_{16} zeigen bei allen Probanden, bis auf Proband 18, nach Glukosegabe eine steigende Tendenz, doch tritt die maximale Erhöhung zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf.

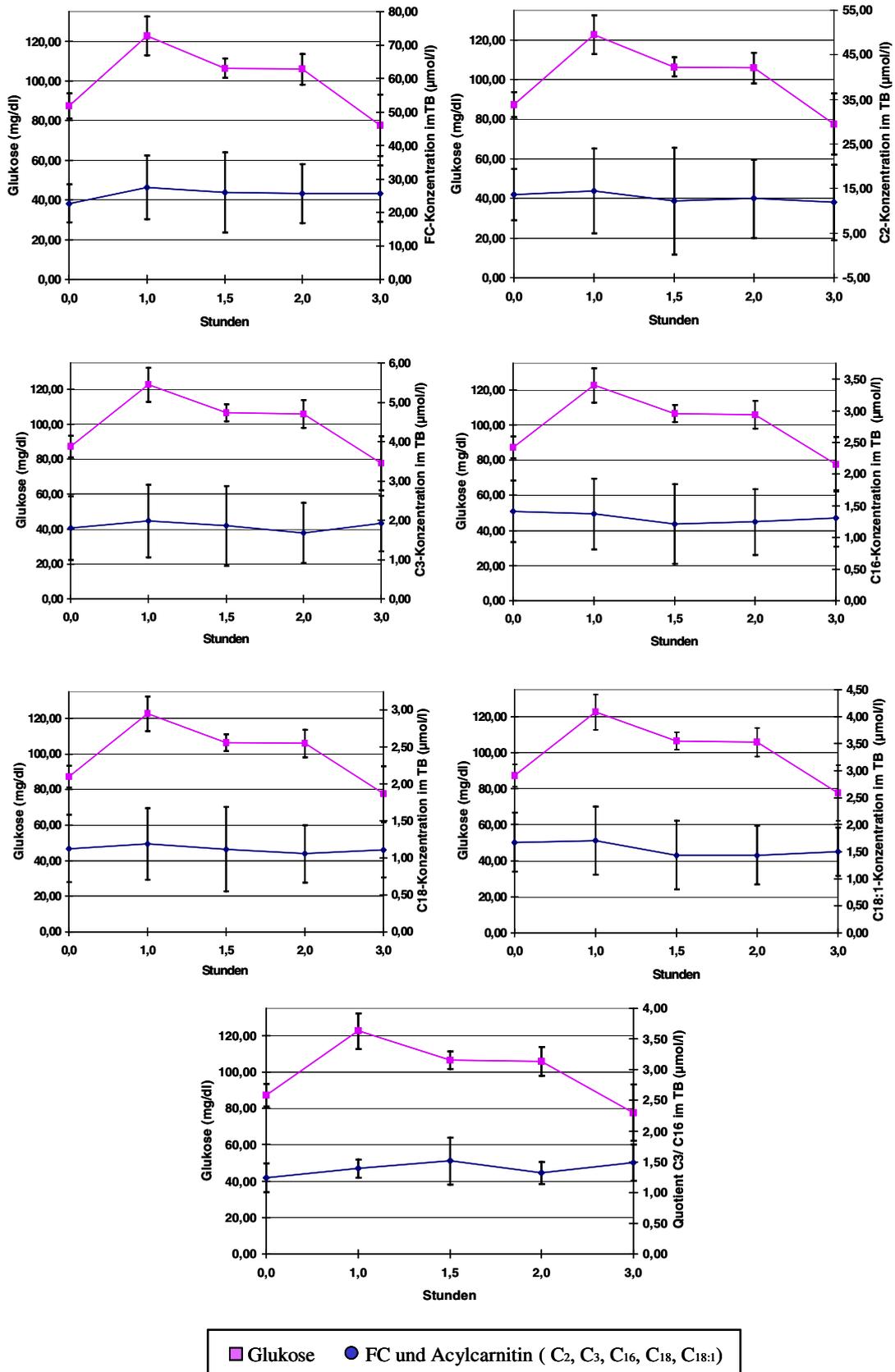


Abb. 40: Studie 4: Mittlere Glukosekonzentrationen und FC-, AC- (C₂, C₃, C₁₆, C₁₈, C_{18:1}) Konzentrationen sowie der Quotient C₃/C₁₆ im Trockenblut mit 95%-Konfidenzintervall nach oralem Glukosetoleranztest (0 h) bei 7 gesunden Kontrollpersonen

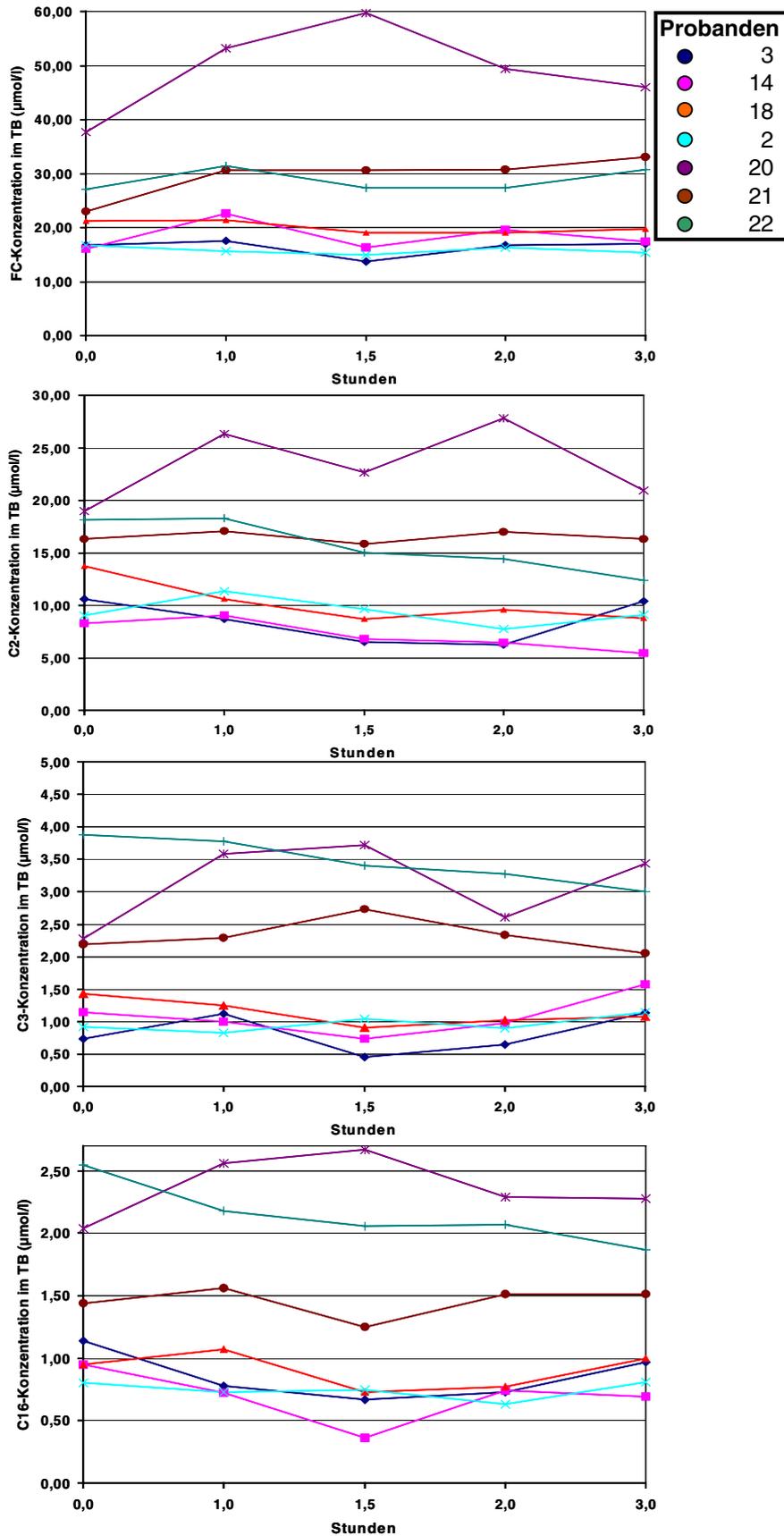


Abb. 41: Studie 4: FC- und AC (C₂, C₃, C₁₆)-Konzentrationen im Trockenblut nach oralem Glukosetoleranztest (0 h) bei 7 gesunden Kontrollpersonen

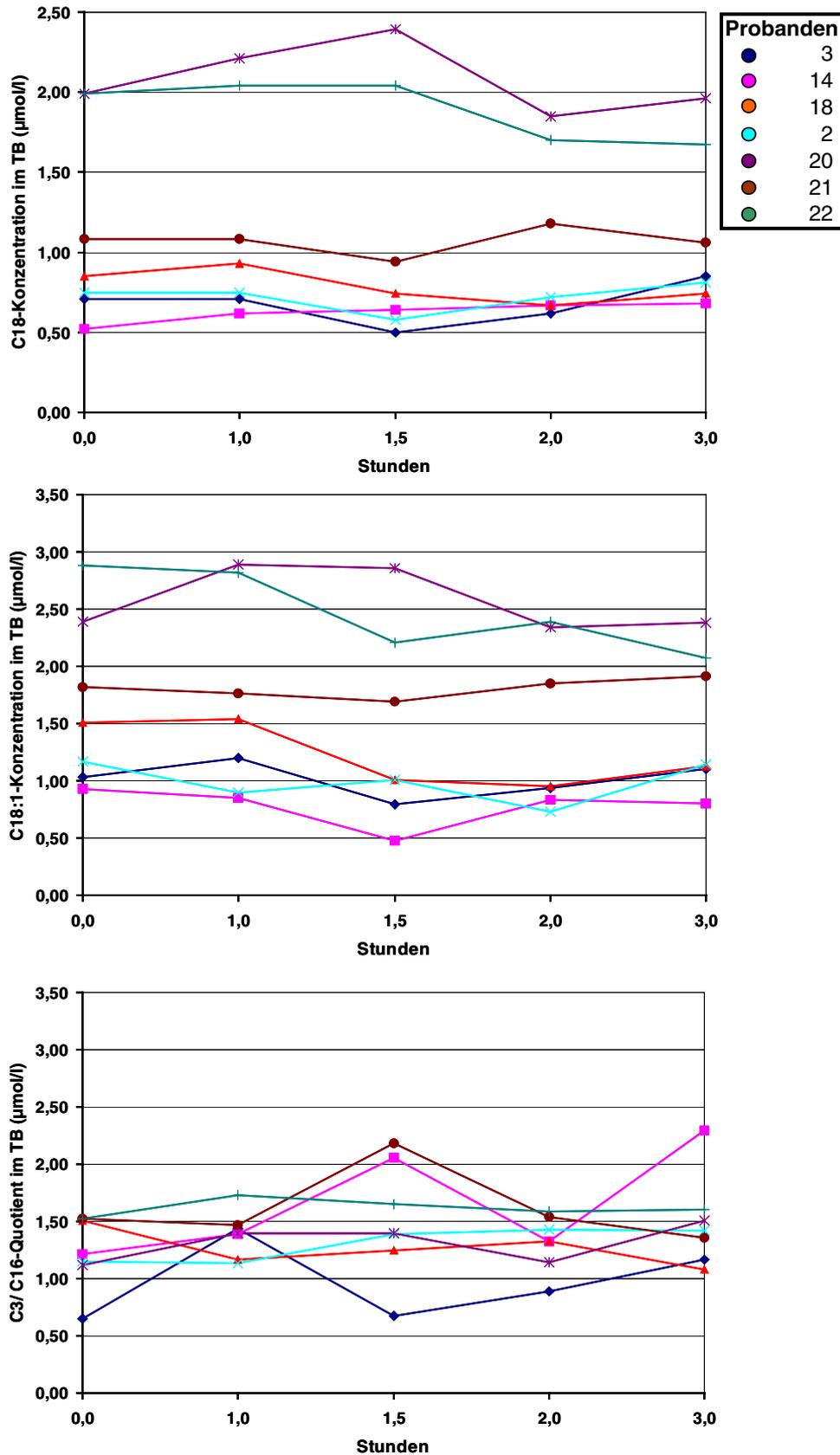


Abb. 42: Studie 4: FC- und AC (C₁₈, C_{18:1})-Konzentrationen und der C₃/ C₁₆-Quotient im Trockenblut nach oralem Glukosetoleranztest (0 h) bei 7 gesunden Kontrollpersonen

4.3.5 Studie 5: Messung des freien Carnitins und der Acylcarnitine nach körperlicher Belastung

Ziel dieser Studie ist zu untersuchen, inwieweit sich eine sportliche Belastung und damit „Energieverbrennung“ auf die FC-Konzentration und AC-Konzentrationen auswirkt.

Die Messung der AC, des FC und der CK fand unter starker körperlicher Belastung statt.

Eine statistisch auffällige Erhöhung der CK (paariger t-Test: $p < 0,003$) um 22,8 % ist bei allen Probanden nach der sportlichen Belastung nachzuweisen.

Die gemessenen Konzentrationen des FC sind bis auf Proband 3 nach der sportlichen Belastung niedriger als davor und insgesamt statistisch auffällig erniedrigt (paariger t-Test: $p < 0,05$). Durchschnittlich ist die FC-Konzentration hinterher um 8,3 % geringer, als davor.

Die kurzkettingen AC C_2 sowie C_3 sind beide nach sportlicher Belastung statistisch auffällig erhöht (paariger t-Test: C_2 : $p < 0,04$; C_3 : $p < 0,02$). Bei Betrachtung der Einzelverläufe ist C_2 bis auf Proband 20 und 23 und C_3 bis auf Proband 23 erhöht, C_2 um 16 % und C_3 um 20 %.

Die langkettigen AC (C_{16} , C_{18} , $C_{18:1}$) sind nach sportlicher Belastung durchschnittlich erniedrigt um: C_{16} : 8 % (erniedrigt bis auf Proband 2 und 18); C_{18} : 19 % (erniedrigt bis auf Proband 1); $C_{18:1}$: 15 %. (bei allen Probanden erniedrigt). Eine statistisch auffällige Erniedrigung liegt bei C_{18} (paariger t-Test: $p < 0,03$) und $C_{18:1}$ (paariger t-Test: $p < 0,02$) vor.

Der AC-Quotient C_3 / C_{16} ist bei allen Probanden nach der sportlichen Belastung erhöht, die Erhöhung ist statistisch auffällig (paariger t-Test: $p < 0,01$) und beträgt durchschnittlich 28 %.

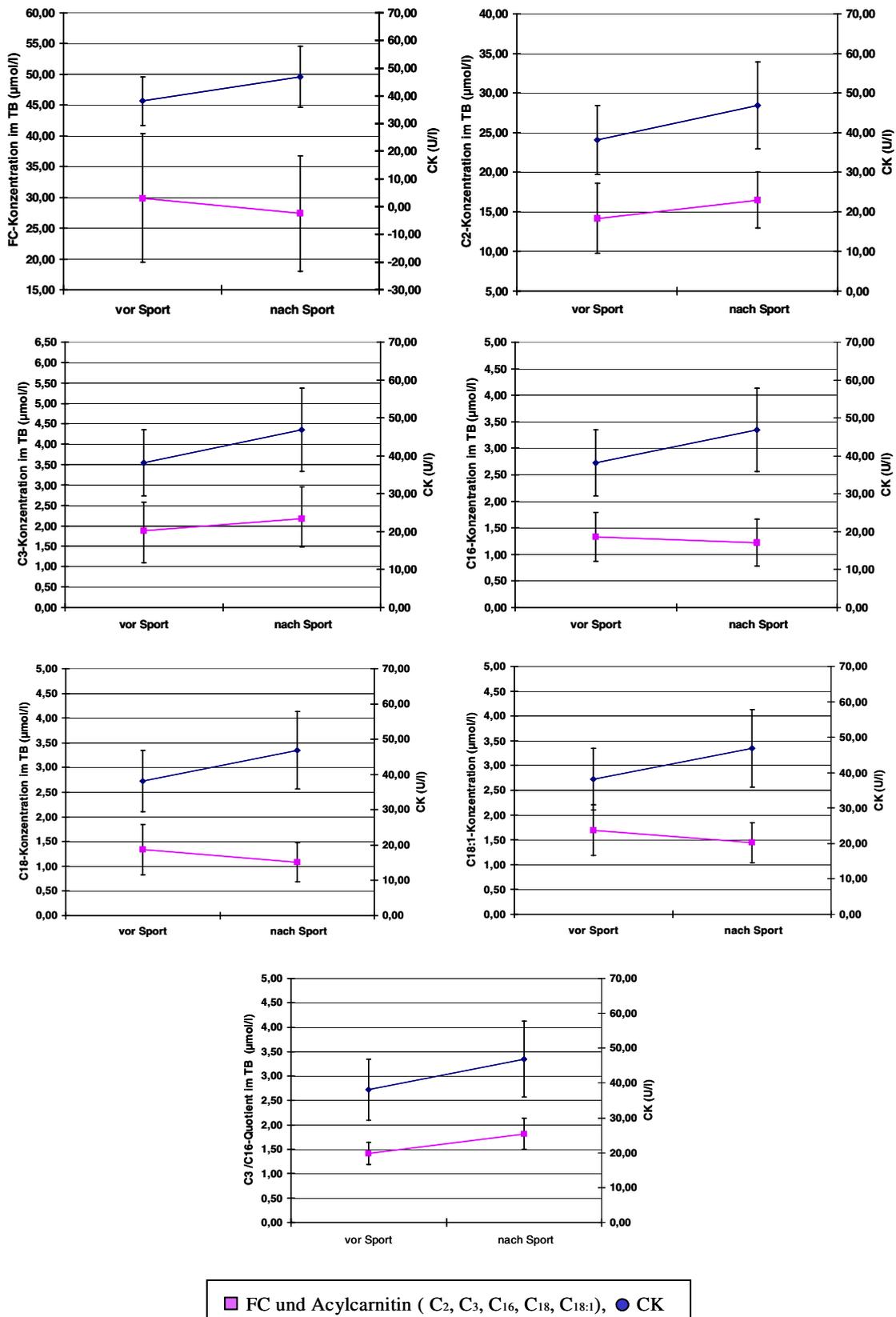


Abb. 43: Studie 5: Darstellung der mittleren FC-, AC- (C_2 , C_3 , C_{16} , C_{18} , $C_{18:1}$) Konzentrationen und die Werte des Quotienten C_3/C_{16} im Trockenblut jeweils im Vergleich mit der CK-Konzentration (Kreatinkinase) mit 95%-Konfidenzintervall vor und nach körperlicher Belastung bei 7 gesunden Kontrollpersonen

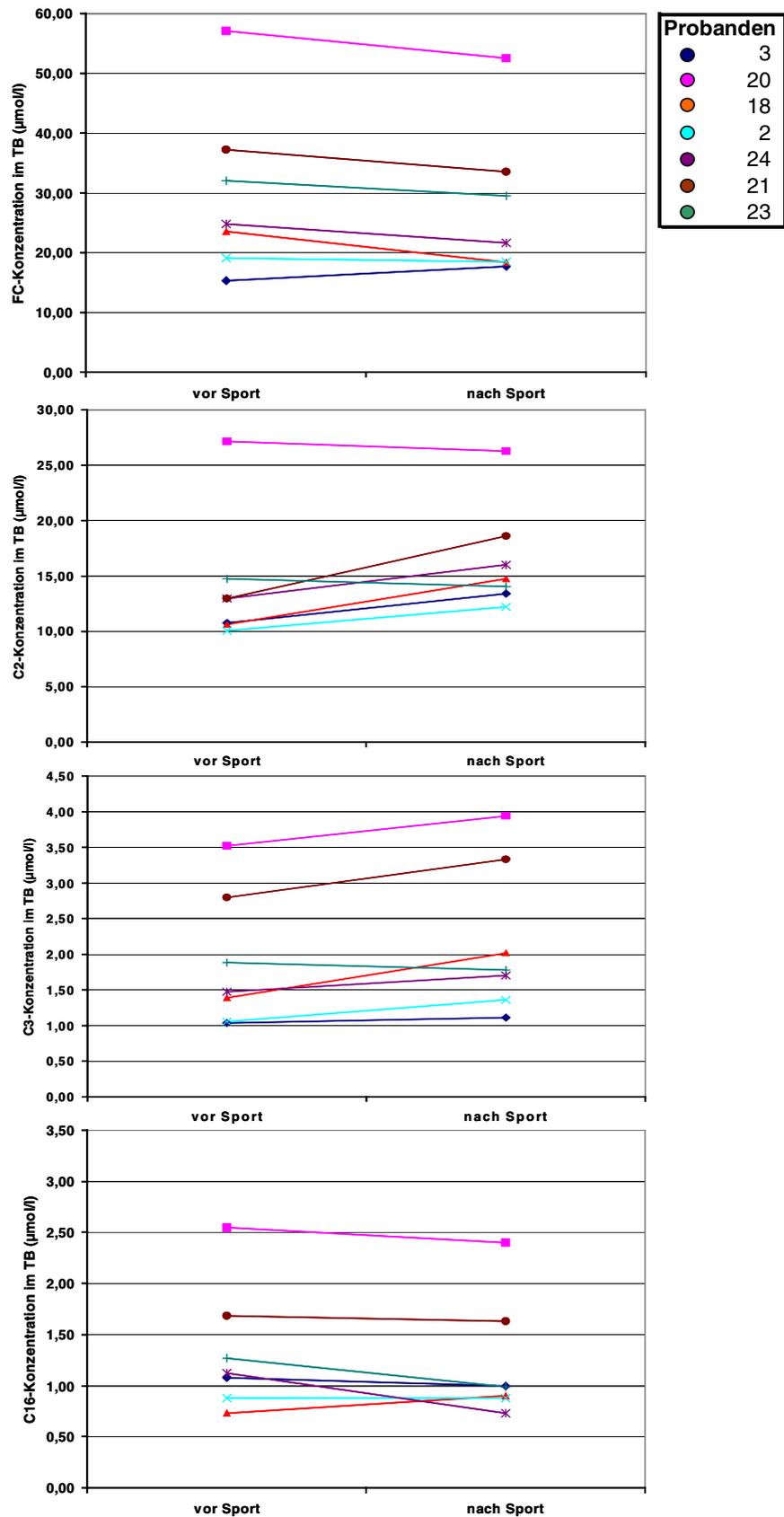


Abb. 44: Studie 5: Verläufe der bei allen 7 gesunden Kontrollpersonen gemessenen FC- und AC (C₂, C₃, C₁₆)-Konzentrationen im Trockenblut vor und nach körperlicher Belastung

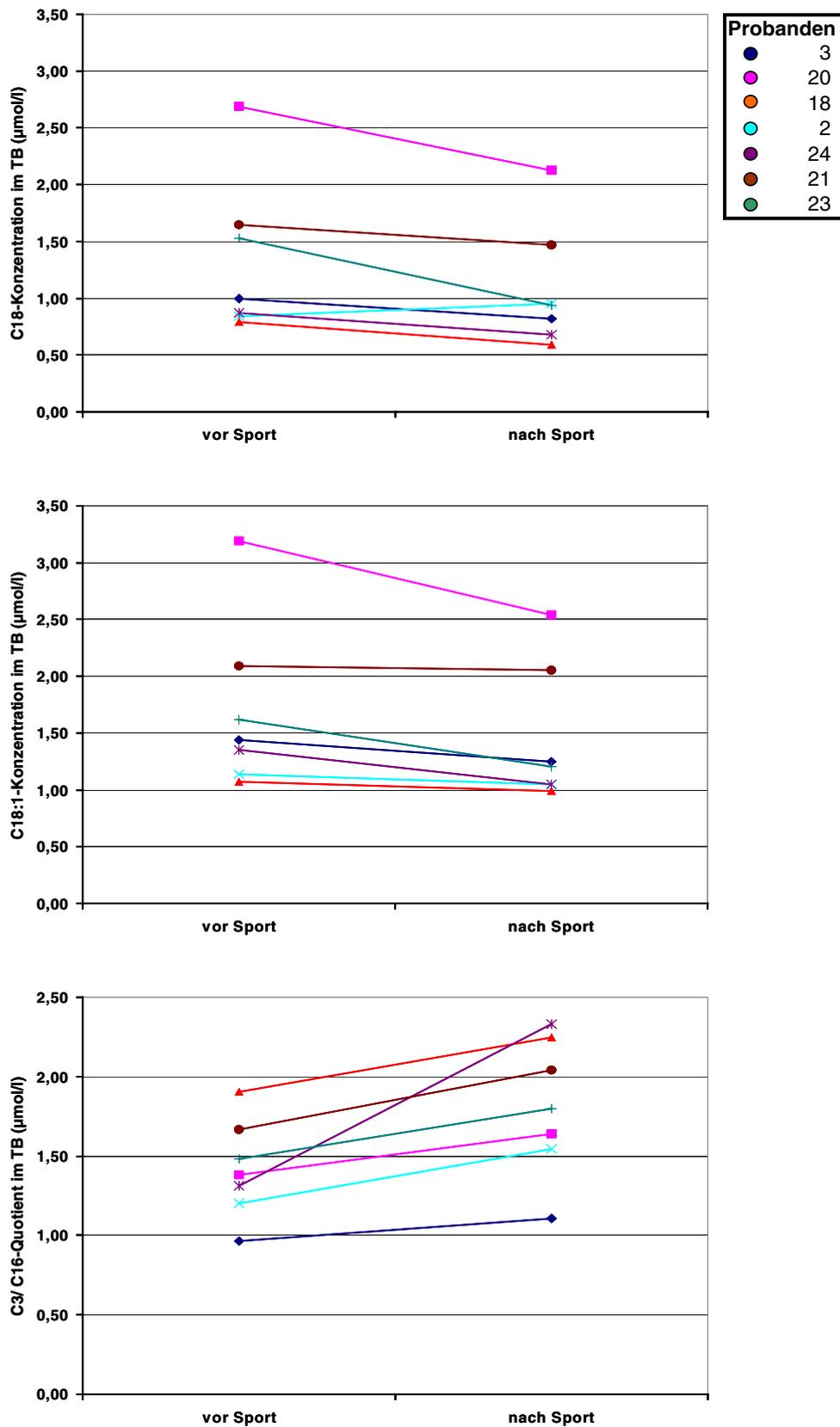


Abb. 45: Studie 5: Verläufe der bei allen 7 gesunden Kontrollpersonen gemessenen FC- und AC (C_{18} , $C_{18:1}$)-Konzentrationen und des Quotienten C_3/C_{16} -Quotienten im Trockenblut vor und nach körperlicher Belastung

4.3.6 Studie 6: Messung des freien Carnitins und der Acylcarnitine in zellulären Blutbestandteilen, im Serum und im Vollblut

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um zu überprüfen, welche Konzentrationen an FC und AC im kapillaren Trockenblut, im venösen Trockenblut, sowie im Serum und in den zellulären Blutbestandteilen vorhanden sind.

Wie aus Abbildung 46 ersichtlich ist, sind bei beiden Probanden deutliche Unterschiede zwischen den im kapillaren Blut und venösen Blut gemessenen AC- und FC-Konzentrationen zu beobachten. Das FC ist bei den Probanden im kapillaren Trockenblut, einer Mischung aus Plasma und lysierten Blutzellen, um das 1,5- bzw. 1,4-fache gegenüber den im venösen Blut gemessenen Konzentrationen erhöht. Alle anderen AC sind im Kapillarblut ebenfalls in höheren Konzentrationen zu messen als im venösen Blut.

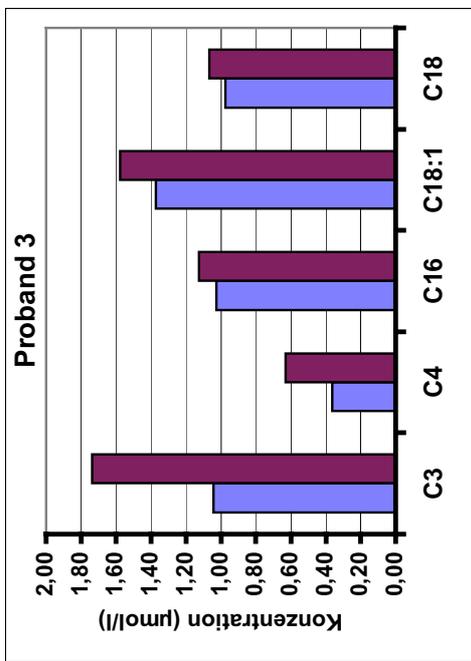
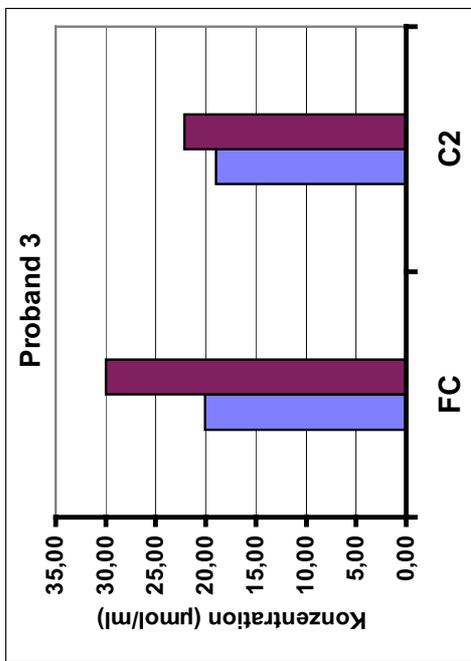
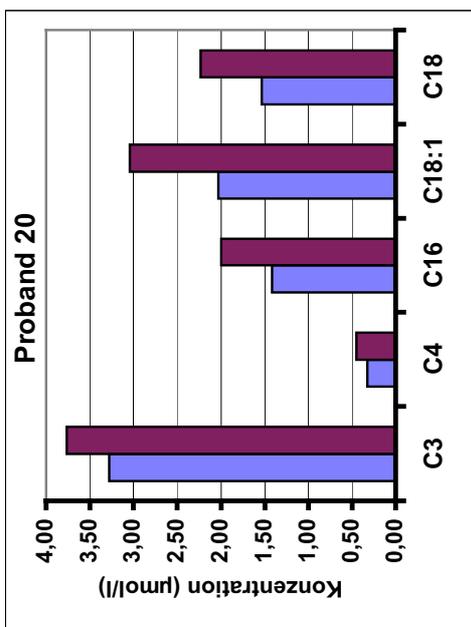
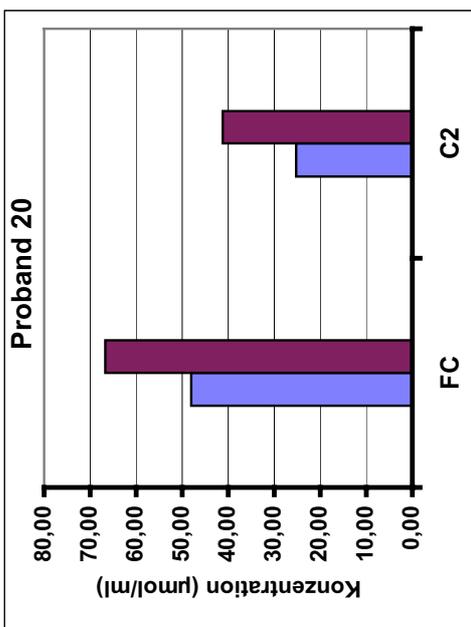
Aus der Abbildung 47 können die im venösen Blut, Serum und zellulären Blutbestandteilen gemessenen Konzentrationen an FC und AC entnommen werden.

Mit Hilfe des Hämatokrits werden die in 1,5 µl Serum gemessenen Konzentrationen der AC und des FC auf die Konzentrationen in 1,5 µl Vollblut umgerechnet.

Legt man die Messung des FC im venösen Vollblut zugrunde, so zeigen die Werte, dass 67,5 % (Proband 3) bzw. 52,8 % (Proband 20) des gemessenen FC im Serum vorhanden ist und 32,5 % (Proband 3) bzw. 47,2 % (Proband 20) aus den zellulären Bestandteilen kommt.

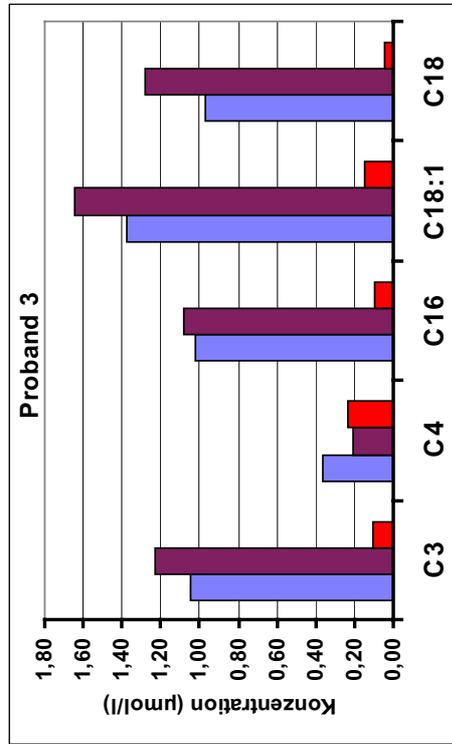
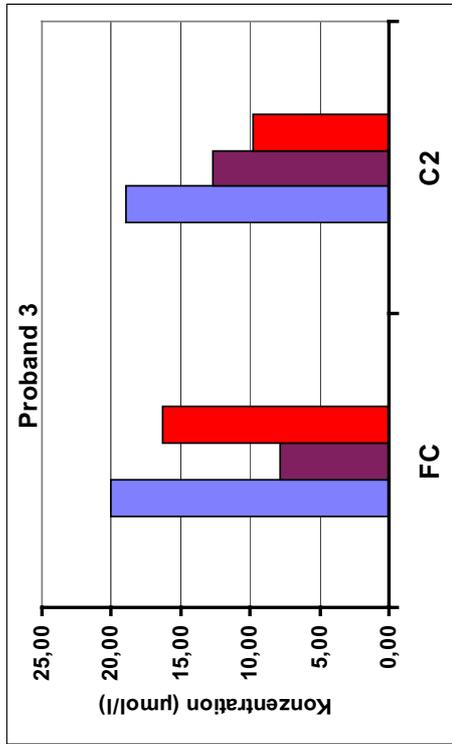
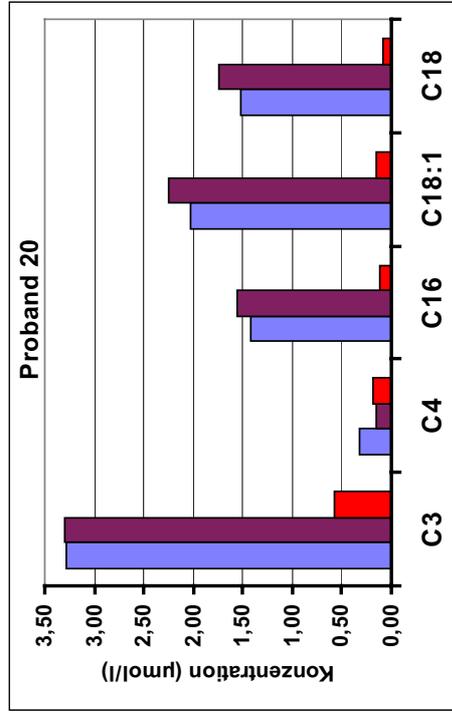
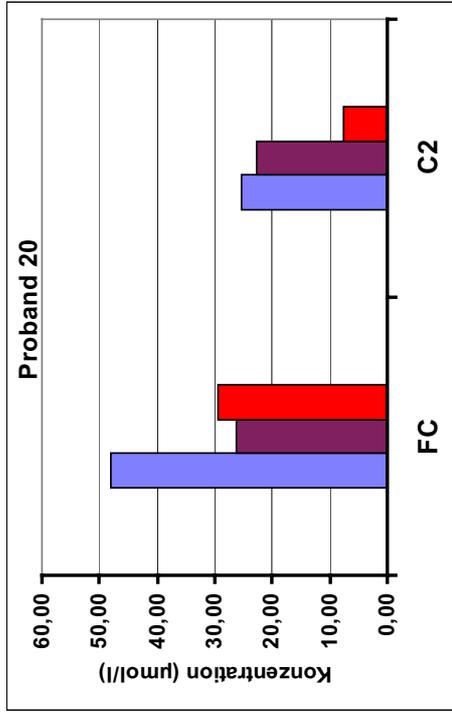
Die Konzentrationen der AC sind in den zellulären Blutbestandteilen bei beiden Probanden höher als im Serum. Für C₂ beträgt dieser Unterschied das 1,3- bzw. das 3-fache. Mit zunehmender Kettenlänge sind die im Serum gemessenen Konzentrationen der AC immer geringer: für C₃ zwischen dem 5,8- bzw. 11,7-fachen, für C₁₆ zwischen dem 11,5- bzw. 13,4-fachen, für C₁₈ zwischen dem 11,5- bzw. 14,4-fachen und für C_{18:1} das 19,9- bzw. 27,6-fache.

Im venösen Vollblut werden geringere Konzentrationen an FC und AC gemessen als die Summe der Serumkonzentration und der zellulären Bestandteile an FC ergibt (Abbildung 46).



■ venöses Vollblut ■ kapillares Vollblut

Abb. 46: Darstellung der Acylcarnitinkonzentrationen (FC: freies Carnitin, C₂; C₃, C₄, C₁₆, C₁₈, C_{18:1}) im venösen Vollblut und im kapillaren Vollblut bei den Kontrollpersonen 3 und 20, (Konzentrationen in µmol/l)



■ venöses Vollblut ■ zelluläre Blutbestandteile ■ Serum

Abb.: 47: Darstellung der Acylcarnitinkonzentrationen (FC: freies Carnitin, C₂; C₃, C₄, C₁₆, C₁₈, C_{18:1}) im venösen Vollblut, im Serum und in den zellulären Blutbestandteilen bei den gesunden Kontrollpersonen 3 und 20 (Konzentrationen in µmol/l)

4.3.7 Nüchternkonzentrationen des freien Carnitins und der Acylcarnitine

In Tabelle 14 sind die mittleren Konzentrationen des FC und der AC aufgelistet. Es werden nur Nüchternwerte berücksichtigt. Gibt es für manche Probanden mehrere Nüchternkonzentrationen, so wird für die Berechnung des Mittelwertes ein Durchschnittswert aus diesen verwendet.

Tab. 14: Bei allen Probanden (Pr.) durchschnittlich ermittelten Nüchternwerte der Acylcarnitine (C₂, C₃, C₄, C₁₆, C₁₈, C_{18:1}) und des freien Carnitins (FC) im Trockenblut mit Standardabweichungen, gemessen in µmol/l BMI: Body-Mass-Index

		FC	C 2	C 3	C 16	C 18	C18:1	C3/C16
Alle Pr.	n=23	45,60+/-18,4	16,35+/-5,5	2,32+/-1,0	1,60+/-0,6	1,45+/-0,5	1,72+/-0,7	1,46+/-0,5
Männl. Pr.	n=14	48,53+/-15,3	17,94+/-4,1	2,41+/-0,8	1,75+/-0,5	1,50+/-0,4	1,64+/-0,6	1,42+/-0,4
Weibl. Pr.	n=9	41,03+/-21,2	14,00+/-6,8	2,00+/-1,1	1,30+/-0,5	1,25+/-0,6	1,54+/-0,7	1,50+/-0,7
Männl. Pr. <30 (Jahre)	n=10	47,92+/-22,3	16,92+/-3,4	2,26+/-1,0	1,65+/-0,4	1,51+/-0,5	1,69+/-0,5	1,42+/-0,6
Männl. Pr. >30 (Jahre)	n=4	50,05+/-7,4	19,47+/-5,8	2,64+/-0,6	1,91+/-0,5	1,48+/-0,2	1,57+/-0,7	1,42+/-0,4
Weibl. Pr. <30 (Jahre)	n=7	37,34+/-16,8	12,17+/-2,5	1,60+/-0,5	1,17+/-0,2	1,18+/-0,4	1,41+/-0,3	1,39+/-0,4
Weibl. Pr. >30 (Jahre)	n=2	53,95+/-16,8	20,43+/-0,5	3,43+/-1,1	1,77+/-0,5	1,47+/-0,6	1,99+/-0,6	1,92+/-0,1
Männl. Pr. : BMI <25	n=7	50,41+/-16,5	17,26+/-4,0	2,07+/-0,7	1,65+/-0,4	1,63+/-0,5	1,87+/-0,6	1,31+/-0,4
Männl. Pr. : BMI >25	n=7	46,65+/-15,1	19,27+/-5,0	2,88+/-0,8	1,90+/-0,4	1,48+/-0,2	1,55+/-0,6	1,55+/-0,4
Weibl. Pr. : BMI <25	n=6	31,53+/-7,5	12,11+/-2,7	1,46+/-0,3	1,16+/-0,2	1,10+/-0,3	1,43+/-0,4	1,27+/-0,3
Weibl. Pr. : BMI >25	n=3	60,03+/-15,9	17,78+/-4,6	3,08+/-1,0	1,57+/-0,5	1,55+/-0,4	1,76+/-0,6	1,96+/-0,1

Es zeigt sich, dass die männlichen Probanden höhere FC-Konzentrationen aufweisen (FC: ♂: 48,53 µmol/l +/- 15,3; ♀: 41,03 µmol/l +/- 21,2). Dies gilt auch für alle betrachteten AC. Bei den männlichen Probanden zeigen Probanden älter als 30 Jahre höhere FC- und AC-Konzentrationen als jüngere. Das gleiche kann auch innerhalb der Gruppe der Frauen beobachtet werden. Probandinnen mit einem Body-Mass-Index (BMI) über 22 zeigen deutlich höhere FC-Konzentrationen als Probandinnen mit einem niedrigeren BMI-Index (FC: BMI >22: 60,03 µmol/l +/- 15,9; BMI <22: 31,53 µmol/l +/- 7,5). Auch die AC zeigen die gleiche Tendenz. Bei den männlichen Probanden hingegen ist die FC-Konzentration bei einem BMI über 25 geringer als bei einem niedrigeren Index (FC: BMI >25: 46,65 µmol/l +/- 15,1; BMI <25: 50,41 µmol/l +/- 16,5). Auch die Konzentrationen für C₁₈ und C_{18:1} sind bei Probanden mit höherem Index höher, während die anderen AC (C₂, C₃, C₁₆) niedriger sind.

In Tabelle 15 werden die Konzentrationen des FC und der AC in Abhängigkeit von der Ernährung vegetarisch/ nicht vegetarisch innerhalb von 72 Stunden vor Versuchsbeginn bei drei Probanden dargestellt.

Tab. 15: Angabe der durchschnittlich ermittelten Nüchternwerte der Acylcarnitin-(C₂, C₃, C₄, C₁₆, C₁₈, C_{18:1}) und freien Carnitinkonzentrationen (FC) im Trockenblut mit Standardabweichungen bei vegetarischer und nicht vegetarischer Ernährung bei 3 Probanden. Gemessen in µmol/l, BMI: Body-Mass-Index

		FC	C 2	C 3	C 16	C 18	C18:1	C3/C16
Prob.3 vegetar.	n=3	18,89+/-5,0	11,13+/-0,8	0,95+/-0,2	1,03+/-0,1	0,93+/-0,2	1,15+/-0,3	0,96+/-0,3
Prob.3 nicht vegetar.	n=5	41,74+/-8,2	11,79+/-2,2	1,56+/-0,8	1,45+/-0,5	1,53+/-0,3	1,57+/-0,1	1,04+/-0,2
Prob. 18 vegetar.	n=2	22,40+/-1,6	12,18+/-2,2	1,41+/-0,0	0,84+/-0,2	0,82+/-0,0	1,29+/-0,3	1,70+/-0,3
Prob. 18 nicht vegetar.	n=7	38,82+/-4,5	11,26+/-1,4	1,40+/-0,4	1,38+/-0,3	0,93+/-0,1	1,11+/-0,2	1,03+/-0,2
Prob. 14 vegetar. n =1	n=1	16,04	8,32	1,15	0,95	0,52	0,93	1,21
Prob. 14 nicht vegetar.	n=1	40,30	11,20	1,37	1,26	1,03	1,29	1,09

Da nur wenige Daten hierzu vorliegen, kann nur von einer Tendenz gesprochen werden. Es fällt auf, dass deutlich niedrigere FC-Konzentrationen nach vegetarischer Ernährung vorliegen als nach fleischreicher Kost (Proband 3: FC: veget.: 18,89 µmol/l +/- 5,0, nicht veget.: 41,74 µmol/l +/- 8,2). Die Konzentrationen des Palmitoylcarnitins und des C₁₈ sind ebenfalls nach vegetarischer Ernährung bei allen drei Probanden niedriger. Bei den anderen AC sind keine deutlichen Tendenzen zu erkennen.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist zu überprüfen, inwieweit der Quotient C_3/ C_{16} die Qualität der Stoffwechseleinstellung von Patienten mit PPA oder MMA wiedergibt und zur Durchführung eines Therapiemonitorings geeignet ist. Bislang wurde die Tandemmassenspektrometrie im Bereich der Kinderheilkunde im Wesentlichen beim erweiterten Neugeborenen-Screening eingesetzt. Die Anwendung dieser Methode für ein Therapiemonitoring (neben der Messung der AC bietet sich auch eine Anwendung bei der Quantifizierung der Aminosäuren an) ist bislang nicht verbreitet. Die publizierte Methode für das Neugeborenen-Screening eignet sich jedoch nur bedingt für ein Therapiemonitoring, da unterschiedliche methodische Anforderungen bestehen (siehe Tab 16).

Tab. 16: Gegenüberstellung der Anforderungen an eine Screeningmethode bei Neugeborenen und einer Methode, die für ein Therapiemonitoring geeignet ist (116, 120, 121, 150, 61, 57)

Anforderungen an eine Screeningmethode des Neugeborenen auf Stoffwechselerkrankungen	Anforderungen an ein Therapiemonitoring bei Stoffwechselerkrankungen
<ul style="list-style-type: none"> • Rasche Ergebnismitteilung, möglichst am Entnahmetag • Kostengünstige Probenanalyse • Frühzeitige Durchführbarkeit • Hohe Spezifität • Sehr hohe Sensitivität • Eindeutige Ergebnisse, wenig Zweitbestimmungen • Ergebnisse unabhängig von der Ernährung des Neugeborenen • Guter Informationsfluss vom Screeninglabor zum behandelnden Arzt • Ergebnis muss zu Konsequenzen bzgl. der Behandlung führen • Einfache Handhabung der Probengewinnung mit möglichst wenig Material (z.B. bei Frühgeborenen) 	<ul style="list-style-type: none"> • Rasche Ergebnismitteilung, möglichst am Entnahmetag • Kostengünstige Probenanalyse • Ergebnis muss zu einer Therapieverbesserung führen • Mögliche Entgleisungen, sollen rechtzeitig erkennbar sein • Einfache Durchführung der Probenentnahme, möglichst zu Hause • Hohe Sensitivität der Messung: Parameter nur dann verändert, wenn sich der Stoffwechszustand verändert hat
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Die qualitative Aussage: gesund - krank ist wichtig. ➤ Möglichst breites Messspektrum wichtig um viele Erkrankungen diagnostizieren zu können. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Die genaue quantitative Aussage ist für die Beurteilung der Einstellung wichtig. ➤ Nur die für die entsprechende Erkrankung relevanten Metabolite müssen erfasst werden.

Die Anforderungen unterscheiden sich hauptsächlich darin, dass bei einem Screeningverfahren nur wichtig ist zu erkennen, ob der Patient an einer Krankheit erkrankt ist oder nicht (qualitativer Aspekt), während bei einem Therapiemonitoring einer Stoffwechselerkrankung auch die Konzentrationen der Metabolite relevant sind (quantitativer Aspekt).

Inwieweit dieses Verfahren die für ein Therapiemonitoring geforderten Bedingungen erfüllt, soll in den folgenden Kapiteln erörtert werden:

- I) Im Kapitel 5.1 wird auf die methodische Eignung der Untersuchung eingegangen: Sensitivität, Spezifität, Durchführbarkeit, Wirtschaftlichkeit sowie mögliche Fehlerquellen.
- II) Im Kapitel 5.2, wird erörtert, wie sich das FC und die AC beim Gesunden verhalten und inwieweit diese durch entsprechende Stoffwechselsituationen veränderbar sind. Außerdem wird versucht zu klären, aus welchen Blutbestandteilen die im Trockenblut gemessenen AC und das FC stammen.
- III) Das Kapitel 5.3 überprüft, inwieweit der Quotient C_3/ C_{16} in der Praxis zur Durchführung eines Therapiemonitorings geeignet ist.
- IV) Im Kapitel 5.4 wird das Ergebnis der Diskussion zusammengefasst und Ausblicke für weitere Untersuchungen und Studien gegeben.

5.1 Diskussion der Methode

5.1.1 Die Genauigkeit der Methode

M. Göggerle konnte in seiner Diplomarbeit, wie schon im Kapitel 3.6 beschrieben, für die AC-Messung mit dem Tandemmassenspektrometer eine hohe Präzision nachweisen (48). Dies gilt insbesondere für die Anwendung der sogenannten „multiple reaction monitoring“- Methode (MRM-Methode). Bei ihr können Metabolite, die in sehr niedrigen Konzentrationen vorliegen genau bestimmt werden. Da die MRM-Methode länger für das Durchscannen der Probe braucht und mit ihr nur wenige AC und das FC bestimmt werden können, ist sie für das Neugeborenenscreening nicht praktikabel. Johnson et al. beobachteten, dass die bei der Probenaufbereitung im Wärmeschrank durchgeführte Butylierung der Probe zu einer Umwandlung der butylierten AC zu butyliertem FC

führt und die Konzentrationen des FC damit zu hoch sind (67). M. Göggerle sowie Vreken et al. fanden dies jedoch nicht (48, 149, 150).

Die unterste Nachweisgrenze für die AC im Trockenblut liegt bei der Anwendung der MRM-Methode bei 0,1 nmol/ml. Damit lassen sich Normalwerte für folgende AC bestimmen: C₂, C₃, C₄, C₁₆, C₁₈ und C_{18:1}.

5.1.2 Mögliche Fehlerquellen der Messung der Acylcarnitine mit dem Tandemmassenspektrometer und Möglichkeiten zu ihrer Vermeidung

5.1.2.1 Reproduzierbarkeit

Da die mit Hilfe des Tandemmassenspektrometers erfassbaren Stoffwechselkrankheiten noch viele Jahre nach der Blutentnahme durch Messung des Blutes, in der für das Neugeborenencreening entnommenen Guthriekarte (Trockenblutkarte) nachweisbar sind, wurde bei zwei Patienten überprüft, ob eine Nachmessung nach Beendigung der Studie gleiche Ergebnisse liefert wie die sofort nach Probeneingang bestimmten Werte. Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Zeitdauer zwischen Erst- und Nachmessung die gemessenen Konzentrationen immer geringer werden.

Eine genaue quantitative Aussage kann somit nur bei sofortiger Bestimmung der AC-Konzentrationen getroffen werden. Erfahrungen des ZfS Reutlingen zeigen, dass ein Abstand von einigen Tagen zwischen Blutentnahme und Untersuchung der Probe die Ergebnisse nicht beeinträchtigen, doch sollte diese Zeit möglichst gering gehalten werden, da ansonsten zu niedrige Konzentrationen gemessen werden können.

5.1.2.2 Art der Blutprobe

Bei zwei Probanden wurde zur selben Zeit eine kapillare sowie venöse Blutprobe entnommen und gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die im kapillaren Trockenblut gemessenen Konzentrationen des FC und der AC bis um das 1,6-fache höher waren, als die im venösen Trockenblut ermittelten Konzentrationen. Mögliche Erklärungen hierfür sind:

- I) Das kapillare Blut enthält eine höhere Konzentration an zellulären Blutbestandteilen (höherer Hämatokrit) als venöses Blut (65, 32, 73, 94). Da die AC in den

Erythrozyten in höheren Konzentrationen als im Serum vorliegen (wie Abb. 47 zeigt) führt eine Erhöhung des Hämatokrits zu erhöhten AC-Konzentrationen.

- II) Durch das Pressen der Fingerbeere (das möglichst verhindert werden soll) gelangt bei der kapillaren Blutentnahme auch Gewebeflüssigkeit in die Blutprobe, möglicherweise enthält diese höhere Konzentrationen an FC und AC (94).
- III) Möglicherweise enthält Kapillarblut, eine Mischung aus arteriellem und venösem Blut, höhere Carnitin- und C₂-Konzentrationen als venöses Blut, da FC und C₂ über das arterielle Blut zum Gewebe transportiert und dort aufgenommen wird, so dass die Konzentrationen im venösen Blut geringer sind.

Auf Grund der Tatsache, dass die im venösen und kapillaren Trockenblut gemessenen FC und AC-Konzentrationen nicht identisch sind, muss bei einem Patienten im Rahmen eines Therapiemonitorings Blut stets auf die gleiche Art gewonnen werden, da die Ergebnisse anderweitig nicht vergleichbar sind. Prinzipiell ist davon auszugehen, dass die im venösen Trockenblut ermittelten Konzentrationen genauer sind als die kapillar ermittelten Konzentrationen, da hierbei die Blutentnahme standardisierter ablaufen kann.

AC und vor allem die langkettigen AC kommen hauptsächlich wie nachfolgend beschrieben in den zellulären Blutbestandteilen vor. Dadurch sind die im Serum/ Plasma gemessenen AC-Konzentrationen nicht mit den im Vollblut gemessenen Konzentrationen vergleichbar. Vor allem wenn man mit Hilfe der langkettigen AC einen Quotienten mit einem pathologisch erhöhten AC bilden möchte (z.B. C₁₆ für den Quotienten C₃/C₁₆), sollte auf Grund der fast nicht messbaren Konzentrationen im Serum Vollblut verwendet werden.

5.1.2.3 Blutentnahmetechnik

Bei der Messung der Acylcarnitine im Trockenblut wird die Probenmenge dadurch definiert, dass ein Kreis mit einem Durchmesser von 3 mm aus der Filterkarte gestanzt wird. Ein solcher Kreis entspricht einer Blutmenge von 1,5 µl. Aus diesem Grund muss gewährleistet sein, dass bei jeder Filterpapierstanze die gleiche Menge Blut enthalten ist. Es ist wichtig, dass immer das gleiche Filterpapier verwendet wird. In dieser Arbeit wurden Testkarten der Firma Schleicher & Schuell[®] verwendet.

Die Probenqualität kann des weiteren durch folgende Fehler beeinträchtigt sein (80):

- I) zu wenig Material: Filterpapier nicht vollständig durchtränkt, Kreis nicht ausgefüllt;
- II) Blutfleck mechanisch beschädigt;
- III) Blut nicht ausreichend getrocknet bevor es verschickt wurde;
- IV) Blut durch Flüssigkeiten und anderes (Fingerabdrücke) verunreinigt;
- V) auf eine Stelle mehrfach Blut aufgetropft, Blut an dieser Stelle zu stark konzentriert;
- VI) bei venöser Blutabnahme: Gefahr eines Blutsees auf der Trockenblutkarte: durch den dadurch ausgelösten chromatographischen Effekt ist die Konzentration der Blutbestandteile an den verschiedenen Stellen des Blutflecks unterschiedlich.

Um die beschriebenen Fehler zu vermeiden, ist es wichtig, die Felder der Trockenblutkarte nicht mit den Fingern zu berühren und das Blut von einer Seite so aufzutropfen, dass ein Feld der Karte beidseits gut durchtränkt ist. Bei der venösen Blutentnahme muss darauf geachtet werden, dass nicht zu viel Blut auf die Karte gelangt.

5.1.3 Die Durchführbarkeit der Probengewinnung und des Probenversands

Die kapillare Blutentnahme sowie das Betropfen der Trockenblutkarte mit Blut ist ein sehr einfaches und auch für den Laien gut durchführbares Verfahren und kann somit gut von den Patienten bzw. ihren Eltern durchgeführt werden. Vorteilhaft hierbei ist, dass für die kapillare Blutentnahme im Vergleich zur venösen Blutentnahme kein Arztbesuch nötig ist, was zum einen von den jungen Patienten besser toleriert wird und zum anderen auch eine Kostenersparnis darstellt. Wie oben beschrieben scheint eine venöse Blutprobe zwar genauere Ergebnisse zu liefern, doch ist eine venöse Blutentnahme aufwendig, belastend und wenig praktikabel. Gegenüber der Bestimmung der AC und anderer Metabolite im Urin ist die kapillare Blutentnahme viel einfacher durchführbar, da das Sammeln eines Spontanurins und das Verschicken der Probe in ein Labor aufwendiger ist.

Auch der Probenversand in Form einer Trockenblutkarte, die in einem Briefumschlag verschickt werden kann, stellt ein einfacheres Verfahren dar als die Versendung von Blutröhrchen.

5.1.4 Wirtschaftlichkeit der Methode

Die Aufarbeitung der Probe ist gegenüber herkömmlichen Methoden zur Messung von AC und FC wesentlich einfacher (149, 66). Auch die Probenanalyse ist im Vergleich zu früheren Verfahren sehr ökonomisch geworden. Das Tandemmassenspektrometer kann mit bis zu 100 Proben (bei manchen Geräten sogar mit mehr) bestückt werden und misst diese dann vollautomatisch (108, 150, 33).

Die Analysedauer beträgt pro Probe zweieinhalb Minuten. In dieser Zeit werden sämtliche AC, das FC sowie alle Aminosäuren gemessen. Durch die Schnelligkeit des Verfahrens ist das Ergebnis am Probeneingangstag bereits bekannt. Auf Grund der einfachen Durchführbarkeit und hohen Automatisierung des Verfahrens kann mit relativ geringem Arbeitsaufwand eine große Anzahl an Proben gemessen werden.

5.2 Diskussion der Untersuchung bei Kontrollpersonen

5.2.1 Fluktuation der Carnitin- und Acylcarnitinspiegel

In der Literatur findet man viele Angaben über die im Blutplasma bestimmten FC- und AC-Konzentrationen. In der nachfolgenden Übersicht werden die hier ermittelten FC-Konzentrationen mit in der Literatur gefundenen Konzentrationen verglichen. Hierbei soll berücksichtigt werden, dass in den eigenen Versuchen Trockenblut gemessen wurde, das wie später gezeigt höhere Carnitinkonzentrationen enthält als Blutplasma.

Tab. 17: Vergleich der freien Carnitinkonzentrationen der eigenen Studie mit anderen Studien bei gesunden Kontrollpersonen

Studie			Freies Carnitin
eigene Messung	n = 23	Trockenblut	45,60 +/- 18,4 (nmol/ml)
Demirkol et al. (34)	n = 20	Plasma	19,90 +/- 5,7 (nmol/ml)
Bachmann (6)	n = 20	Plasma	33,10 +/- 7,0 (nmol/ml)
Di Donato et al. (39)		Plasma	34,00 +/- 8,5 (nmol/ml)
Valkner u. Bieber (142)		Plasma	34,00 +/- 5,0 (nmol/ml)
Röbke (117)	n = 78	Plasma	38,60 +/- 9,0 (nmol/ml)

Prinzipiell ist die Frage zu stellen, wie aussagekräftig die hier angegebenen Konzentrationen des FC sind. Mehrfach wurde beobachtet, dass unter vegetarischer Ernährung bei Probanden viel geringere FC-Konzentrationen im Blut gemessen wurden (25, 82). Der Muskelcarnitingehalt verändert sich hingegen nicht (76). Da sich in der Literatur keine

Angaben über die Art der Ernährung finden, sind die in Tabelle 17 dargestellten Daten kritisch zu betrachten.

Innerhalb der eigenen Studie konnte bei drei Probanden tendenziell beobachtet werden, dass die FC-Konzentration bei vegetarischer Ernährung um mehr als die Hälfte geringer ist (Proband 3). Auch die Konzentrationen der langkettigen AC: C₁₆ und C₁₈ scheinen unter einer vegetarischen Ernährung deutlich geringer zu sein. Unklar ist, ob die geringeren Carnitinspiegel zu einer niedrigeren Fettsäureverstoffwechslung führen und die Konzentrationen für C₁₆ und C₁₈ deshalb niedriger sind, oder ob durch die vegetarische Ernährung weniger Fettsäuren aufgenommen werden und dadurch weniger Fettsäuren zu AC aktiviert werden. Auch andere Stoffwechselmechanismen wären denkbar. Es ist davon auszugehen, dass nicht nur die Ernährung die Konzentration des FC im Blut beeinflusst:

- I) Wie in Kapitel 5.2.4 gezeigt wird, ist das FC nach körperlicher Belastung durch die Bildung von AC vermindert.
- II) Es finden sich Verschiebungen des Carnitins in Zellen mit erhöhtem Energiebedarf aus anderen Zellen sowie im Serum, z.B. bei chronischen Erkrankungen und Verbrennungen (16, 34).
- III) Auch Fasten führt nach einer Verzögerung von drei Tagen zu einer Reduktion der Konzentration des FC (63).
- IV) Bei Frauen ist der Gehalt an FC im Plasma kurz vor der Ovulation stark erhöht (25).

Obwohl die Konzentration des FC starken Schwankungen unterliegt, ist ein geschlechtsspezifischer Unterschied zu erkennen: Bei Frauen liegen deutlich niedrigere FC-Konzentrationen vor als bei Männern. Dies konnte eigenen Messungen (Tabelle 12) wie auch Literaturangaben entnommen werden (20, 54). Laut Demirkol et al. findet sich 98 % des Gesamtcarnitins (Gesamtkörpermenge: 15 - 20 g (34)) im Muskel, 0,5 % im Serum und 1,5 % in anderen Organen und Blutzellen. Da Männer prozentual gesehen eine höhere Muskelmasse haben, kann man dadurch den höheren Carnitinspiegel erklären (117, 36). Die ebenfalls bei Männern in größeren Konzentrationen messbaren AC sprechen für einen grundsätzlich höheren Carnitinstoffwechsel bei Männern. Gatti et al. fanden in einer Untersuchung heraus, dass Probanden mit einer geringeren fettfreien Masse, also einem höheren Muskelanteil, geringere Mengen an C₂ in ihrem Plasma auf-

aufwiesen als andere Probanden. Diese negative Korrelation führten sie auf eine bessere oxidative Leistung der Muskulatur bei höherer Muskelmasse zurück (45). Auch in der eigenen Arbeit konnte eine positive Korrelation zwischen BMI und C₂-Konzentration nachgewiesen werden.

Interessant ist, dass im Verlauf von fünf Tagen nur geringe Schwankungen der FC-Konzentrationen zu beobachten sind. Da sich bei den Probanden innerhalb der fünf Tage der Fleischkonsum ebenso wie die sportliche Betätigung wenig veränderte und niemand erkrankte, ist davon auszugehen, dass die Carnitinspiegel unter vergleichbaren Bedingungen bei einer Person im wesentlichen konstant sind. Auffällig hingegen ist, dass die Konzentrationen des FC der verschiedenen Probanden tageszeitlich schwanken und nachmittags niedriger sind. Auffällig ist auch, dass C₂ nachmittags niedriger ist, während die Konzentrationen der restlichen lang- und kurzkettigen AC unverändert bleiben. Rebuzzi et al. konnten bei elf Probanden keinen signifikanten Unterschied zwischen den Carnitinkonzentrationen in den Morgenstunden und am Nachmittag feststellen. Sie beobachteten lediglich einen Anstieg des FC während der Wachzeit der Probanden (110).

C₃ ist sowohl im Tagesverlauf als auch über mehrere Tage gemessen konstant. Hierbei sind die Konzentrationen unabhängig von den FC-Konzentrationen. Propionsäure entsteht hauptsächlich durch den Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren. Die ungeradzahliges Fettsäuren machen nur einen geringen Anteil des Körperfettgewebes aus (1 % laut einer Untersuchung von Wendel et al. (159)), so dass nicht davon auszugehen ist, dass der Abbau dieser Fettsäuren einen großen Einfluss auf die C₃-Bildung beim Stoffwechselgesunden hat (133). Da die Gabe von L-Carnitin nicht zu einer Erhöhung der C₃-Konzentration führt und diese auch unabhängig von den Konzentrationen anderer AC ist, kann davon ausgegangen werden, dass der Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren durch Carnitingabe nicht stimuliert wird. Daraus kann geschlossen werden, dass der Abbau von verzweigtkettigen Aminosäuren, einem Hauptlieferanten des C₃, nicht von der Konzentration anderer AC bzw. des FC abhängt.

Die Konzentrationen der langkettigen AC wie auch die des FC verhalten sich ähnlich. Die Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass über die Nahrung Carnitin ebenso wie Fettsäuren (Palmitinsäure und Stearilsäure gehören zu den am meisten in der Nahrung vorkommenden Fettsäuren) aufgenommen werden -vor allem in fleischreicher Nahrung-

und somit das FC ebenso wie die aufgenommenen und zur Verstoffwechslung aktivierten Fettsäuren (AC) ansteigen.

5.2.2 Einfluss einer oralen Carnitinsubstitution auf den Stoffwechsel

Bei Patienten mit PPA und MMA führt eine Carnitingabe zu einer vermehrten Bildung von C₃. Dies konnte nach einer langfristigen Gabe ebenso wie nach einer Einmalgabe festgestellt werden (18). Mit Hilfe des hier vorgestellten Versuches soll geklärt werden, ob ein gesunder Organismus nach Gabe von L-Carnitin ebenfalls vermehrt C₃ und andere AC bildet, und in wieweit sich die Konzentration des FC im Trockenblut durch solch eine Einmalgabe verändert.

Die Gabe von 30 mg/kg Körpergewicht L-Carnitin stellt eine um das ungefähr 20-fache erhöhte Zufuhr, im Vergleich zu der durchschnittlich mit der Nahrung aufgenommenen Menge von 113 mg dar (56) (Gürtler et al.: 2 - 100 mg (54)). Laut einer Untersuchung von Harper et al. beträgt die Carnitinbioverfügbarkeit 9 - 25 % bei einer Einmalgabe von 2 g L-Carnitin (einer diesem Versuch vergleichbaren Menge). Bei höheren Dosen sinkt diese auf Grund eines sättigbaren aktiven Aufnahmeprozesses im Darm ab (59) (Bioverfügbarkeit: Rizza et al.: 13 - 21 % (113)).

Exogenes Carnitin wird aktiv über einen natriumabhängigen Transportprozess in die Mukosazellen des Darmes aufgenommen. Ein passiver Diffusionsprozess ist ebenfalls beteiligt (50, 92). Carnitin wird nur im Duodenum, Ileum und Jejunum, nicht jedoch im Kolon und Rektum aufgenommen (89, 56). Bei der Aufnahme des Carnitins in die Mukosazellen handelt es sich um einen langsamen Prozess. Das aufgenommene Carnitin wird teilweise in C₂ umgewandelt (44 % in Rattenmucosazellen) und verzögert an den Blutkreislauf abgegeben (51). In der eigenen Studie sind erhöhte Carnitinspiegel bereits nach einer halben Stunde nachweisbar. Durchschnittlich wird nach einer Stunde eine maximale Konzentration des FC erreicht. Diese Erhöhung beträgt 147 % des Ausgangswertes. In anderen Studien werden Maximalwerte erst nach späteren Zeitpunkten beobachtet:

- 1) Bach et al.: Gabe von 2 g L-Carnitin: Erhöhung des FC um 81 %, Maximalwert nach 3,5 Stunden, 12 Probanden (5)
- 2) Rizza et al.: Gabe von 30 mg/ 100 mg L-Carnitin/kg Körpergewicht: Erhöhung des FC um 44 %/ 150 %, Maximalwert jeweils nach 3 h, 6 Probanden (113)

- 3) Segre et al.: Gabe von 30mg/ 100mg L-Carnitin/kg Körpergewicht: Erhöhung des FC um 38 % /50 %; Maximalwert nach 6 h/ 3 h, 3 bzw. 6 Probanden (128)

Es zeigen sich bei den verschiedenen Studien erhebliche Unterschiede. Diese Unterschiede könnten durch die Verwendung verschiedener Carnitinpräparate erklärt werden. Möglicherweise ist Biocarn-Sirup[®] leichter resorbierbar als die bei anderen Versuchen gewählten Präparate, z.B. L-Carnitin Kapseln der Firma Sigma-Tau.

Auf eine längere Messdauer wurde in der eigenen Studie verzichtet, da sich in Vorversuchen (unveröffentlichte Daten) an zwei Probanden mit Messungen über fünf Stunden zeigte, dass der Carnitinspiegel nach zwei Stunden kontinuierlich abfällt. Deshalb wurde die Versuchszeit auf drei Stunden verkürzt. Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass so ein weiteres Ansteigen des FC nicht beobachtet werden konnte.

Die verschiedenen Verläufe der Carnitinspiegel der einzelnen Probanden lassen darauf schließen, dass viele Faktoren für die Carnitinaufnahme entscheidend sind. Dadurch sind mehrere Erklärungsmöglichkeiten für die unterschiedlichen Höhen der Carnitinspiegel und den ein- bzw. zweigipfligen Verlauf denkbar:

- I) Möglicherweise hat das Transportprotein, das für die Carnitinaufnahme in die Darmmukosa zuständig ist, wie für viele andere Enzyme berichtet, bei den einzelnen Probanden eine unterschiedliche Aktivität (unterschiedlichen K_m -Wert), wodurch die Carnitinaufnahme bei einigen Probanden leichter möglich ist als bei anderen.
- II) Das Carnitin verbleibt innerhalb der Darmmukosa unterschiedlich lange. Es wird berichtet, dass durch Fasten Carnitin vor allem in Form von C_2 in der Darmmukosa zurückgehalten wird (56, 50).
- III) Durch den enterohepatischen Kreislauf des Carnitins gelangt Carnitin über die Galle erneut in das Darmlumen, wird abermals in den Blutkreislauf aufgenommen und könnte so einen zweiten Anstieg des Carnitins im Blut bewirken (51).
- IV) Carnitin wird möglicherweise bei manchen Probanden rascher in die Körperzellen aufgenommen und ist somit im Blut nicht in dem Maße nachweisbar, wie bei Probanden mit langsamerer Verschiebung des Carnitins in die Zelle.
- V) Möglicherweise wird Carnitin bei manchen Menschen rascher renal ausgeschieden, da die in der Niere vorhandenen Transportproteine individuell unterschiedlich

che Aktivitäten besitzen und auch bei verschiedenen pH-Werten unterschiedlich aktiv sind (103).

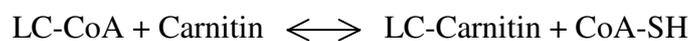
- VI) Es existieren verschiedene Ausgangskonzentrationen des FC im Blut und damit möglicherweise veränderte Carnitinaufnahmekapazitäten der Zellen. Es ist denkbar, dass durch höhere Carnitinspiegel die Carnitinaufnahme leichter möglich ist, so z.B. über eine mögliche Enzyminduktion, bzw. über eine Downregulation des Carriers gehemmt ist.

In anderen Studien konnten ebenfalls unterschiedliche Verläufe des FC beobachtet werden (128, 59). Da das Tandemmassenspektrometer erst in neuerer Zeit zur Messung von AC eingesetzt wurde, existieren bislang in der Literatur keine Vergleichsdaten zu den einzelnen gemessenen AC.

Die nachweisbare Erhöhung des C₂ nach drei Stunden um 26 % des Ausgangswertes ist möglicherweise durch die vermehrte Bildung von C₂ in den Darmmukosazellen über die Carnitin-Acetyl-Transferase zu erklären. Gudjonsson et al. stellten die Hypothese auf, dass Carnitin in Form von C₂ leichter in der Darmmukosa gehalten werden kann und dort für die Energiegewinnung zur Verfügung steht (51). Die erhöhten C₂-Konzentrationen könnten auch dadurch erklärt werden, dass eine durch Carnitin induzierte, gesteigert ablaufende β -Oxidation langkettiger Fettsäuren stattfindet.

Durch die Ergebnisse der eigenen Studie, kann davon ausgegangen werden, dass eine vermehrte C₃-Bildung unter Carnitingabe nur bei Patienten mit erhöhter Bildung von Propionyl-CoA stattfindet, nicht jedoch bei stoffwechselgesunden Menschen, die nur sehr niedrige C₃-Konzentrationen (C₃: 2,32 μ mol/l +/- 1,0, n = 23) aufweisen.

Die Tatsache, dass die Konzentrationen der langkettigen Fettsäuren, vor allem C₁₈, unter Carnitingabe abnehmen, ist überraschend, wenn man die folgende Reaktionsgleichung betrachtet:



Eigentlich müsste man davon ausgehen, dass eine Erhöhung des FC zu einer vermehrten Bildung von langkettigen AC führt.

Es gibt zwei Hypothesen, die die in der eigenen Studie beobachtete Verringerung der langkettigen AC erklären könnten:

- I) Durch die Gabe von Carnitin wird die β -Oxidation des Mitochondriums stimuliert, wodurch mehr langkettige AC verbrannt als durch die CPT nachgebildet werden. Die erhöhte C_2 -Konzentration würde auch hierfür sprechen.
- II) Der Shuttleprozess, der normalerweise langkettige AC in das Mitochondrium transportiert, wird durch eine erhöhte Carnitinverfügbarkeit stimuliert.

Der C_3/C_{16} -Quotient zeigt einen ähnlichen Konzentrationsverlauf wie das C_3 . Der Quotient spiegelt damit die Konzentration des C_3 wieder, da die Konzentration des C_{16} nahezu konstant ist.

5.2.3 Einfluss von Glukose auf den Carnitinstoffwechsel

Wie Abbildung 48 schematisch darstellt, führt die Gabe von Glukose zu einer vermehrten Freisetzung von Insulin. Dieses Hormon wiederum bewirkt eine Aktivierung der Glykolyse, wodurch vermehrt Acetyl-CoA gebildet wird. Dieses wird zum einen im Zitratzyklus zur Bildung von ATP verwendet. Zum anderen wird es für die Fettsäuresynthese benötigt, die unter der Insulinwirkung sowie durch die Aktivierung durch Zitrat und ATP verstärkt abläuft.

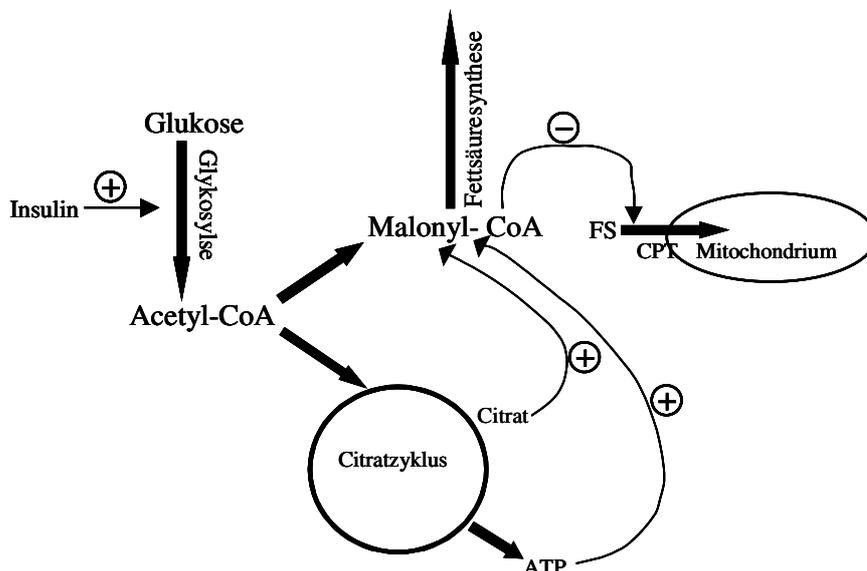


Abb. 48: Einfluss von Glukose auf die Glykolyse, den Zitratzyklus und die Hemmung der CPT I

Malonyl-CoA wiederum hemmt die CPT I ($\text{Acyl-CoA} + \text{Carnitin} \rightarrow \text{AC} + \text{CoA-SH}$). Dadurch gelangen geringere Mengen aktivierter Fettsäuren in das Mitochondrium, die Fettsäureverstoffwechslung wird dadurch gedrosselt (81, 2, 19, persönliches Mitteilung)

H. Böhles). Diese Reaktion ist sinnvoll, denn so wird verhindert, dass die neu synthetisierten Fettsäuren gleich wieder verbrannt werden.

Die in dem Glukosebelastungsversuch beobachteten tendenziellen Verminderungen der Konzentrationen der langkettigen AC spiegelt die Hemmung der CPT I und die damit reduzierte Bildung langkettiger AC wieder. Die ebenso beobachtete Reduktion der C₂-Konzentration ist damit ebenfalls verständlich, denn wenn kaum Fettsäuren im Mitochondrium verstoffwechselt werden, fällt Acetyl-CoA nur in geringeren Mengen an, wodurch die Konzentration des gebildeten C₂ ebenfalls abnimmt. Dies wurde auch schon von Bømer et al. beobachtet (19).

Die von uns beobachtete tendenzielle Verminderung der C₃-Konzentration entsteht möglicherweise durch einen anderen Hemmmechanismus des Insulins: Insulin fördert die Proteinsynthese und hemmt die Proteolyse (81). Durch den geringeren Proteinabbau entstehen weniger freie, verzweigt-kettige Aminosäuren, die wiederum weniger abgebaut werden. Außerdem kann Insulin auch direkt den Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäure Leucin verhindern (147). Durch den geringeren Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäuren entsteht weniger Propionyl-CoA und damit auch weniger C₃.

5.2.4 Freie Carnitin- und Acylcarnitinspiegel unter körperlicher Belastung

Körperliche Belastung führt zu einer Veränderung des Stoffwechsels der Muskulatur. Unter leichter Anstrengung ist die Konzentration der Fettsäuren im Blut ebenso wie der in die Muskulatur aufgenommene Anteil erhöht. Bei der Verwendung der Fettsäuren als Energiesubstrat sinkt der Insulin- und Glukosespiegel im Blut (60).

Mittelstarke Anstrengung führt zu einer Verringerung des Insulinspiegels, wobei dennoch über einen insulinunabhängigen Prozess vermehrt Glukose in die Zelle aufgenommen wird. Außerdem werden Fettsäuren vermehrt zur Energiegewinnung verwendet. Mit zunehmender Erschöpfung der Glykogenvorräte nimmt der Anteil der Fettsäuren an der Energiegewinnung zu (81, 64).

Starke Anstrengung hingegen führt primär, über eine reduzierte Freisetzung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe, zu einer Verringerung der Fettsäurekonzentration des Blutes. Unter dieser Stoffwechselbedingung dienen vermehrt Kohlenhydrate sowie Aminosäuren als Substrat für die Energiegewinnung (60). Bei den Aminosäuren werden vor allem verzweigt-kettige verstoffwechselt, da sie bevorzugt in der Muskulatur abgebaut

werden und sie für den Muskel zur Energiegewinnung besonders geeignet sind (106). Bei Erschöpfung der Glykogenvorräte wird die Energiegewinnung auf die Verbrennung von Fettsäuren umgestellt (81).

Starke, den Muskel belastende Anstrengungen führen teilweise zu einer Schädigung der Muskelmembranen und damit zu einer vermehrten Freisetzung der CK (81). Es wurde die Überlegung angestellt, ob möglicherweise auch vermehrt FC und AC über die geschädigten Muskelmembranen frei werden und damit erhöhte Konzentrationen im Trockenblut gemessen werden können (persönliche Mitteilung: H. Böhles).

Die körperliche Belastung des hier dargestellten Belastungsversuchs ist zwischen mittelstark und stark einzustufen. Die Belastung stellt sich aus einer Ausdauerbelastung (mindestens eine halbe Stunde Dauer) und einer den Muskel stark traumatisierenden Belastung (Treppen schnell hoch laufen, Berg runter rennen) zusammen. Die bei allen Probanden schon nach einer Stunde gemessene Erhöhung der CK zeigt die „Traumatisierung“ des Muskels an (siehe Abb. 43).

Der auch hier zu beobachtende Anstieg der kurzkettigen AC (C_2 , C_3) steht im Einklang mit vielen anderen Studien, die ähnliche Ergebnisse lieferten (60, 21, 151). C_2 ist erhöht, da vermehrt langkettige Fettsäuren verstoffwechselt werden, dadurch vermehrt Acetyl-CoA gebildet wird und damit auch vermehrt C_2 gebildet werden kann. Es wird davon ausgegangen, dass bei einem Überschuss von Acetyl-CoA dieses zu C_2 verestert wird, CoA wieder regeneriert wird und für den weiteren Abbau von Fettsäuren zur Verfügung steht (21).

Die Erhöhung der C_3 -Konzentration, kann durch den vermehrten Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren zur Energiegewinnung und die dadurch erhöhte Menge an Propionyl-CoA erklärt werden, das zu C_3 verestert wird (106).

Die Abnahme des FC scheint sich am ehesten durch die Umwandlung von FC in die kurzkettigen AC zu erklären. Die Schädigung der Muskelmembranen kann möglicherweise den Gehalt des Plasmas an FC erhöhen, doch scheint der Verbrauch des FC so hoch zu sein, dass insgesamt eine verringerte Konzentration an FC im Trockenblut auffällt. Viele andere Studien zeigen ähnliche Effekte (100, 60, 21, 151). Andererseits zeigen Daten von H. Böhles über die Gesamtcacylcarnitine, die AC und das FC bei einem Marathonläufer vor dem Lauf, sofort nach dem Lauf sowie 7 Stunden danach erhöhte FC-Konzentrationen (siehe Abb.49).

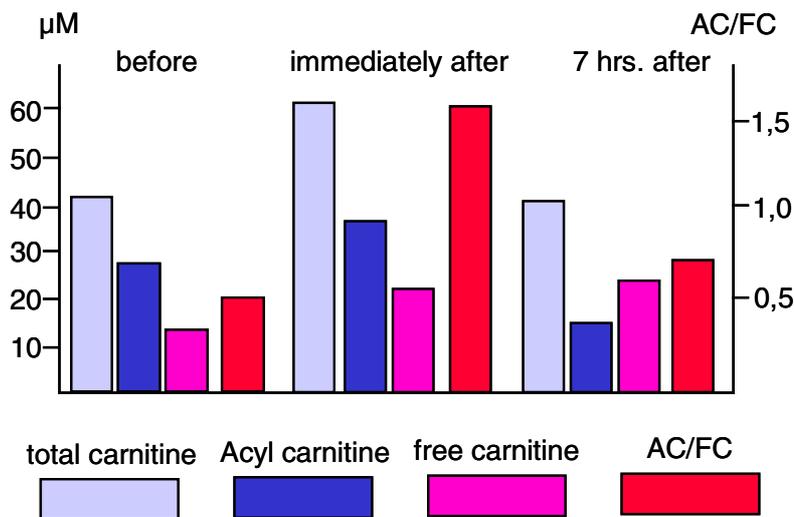


Abb. 49: Messungen des Gesamtcarnitins (total carnitine), Acylcarnitins (acylcarnitine), freien Carnitins (free carnitine) und der Ratio Acylcarnitins/ freies Carnitin (AC/ FC) im Plasma. Dieses Diagramm wurde freundlicherweise von H. Böhles zur Verfügung gestellt.

Bei dieser sehr lange andauernden und sehr extremen Belastung der Muskulatur, die mit einer starken Traumatisierung einhergeht, überwiegt der Anteil an dem durch die Muskulatur freigewordenen FC gegenüber dem Anteil, der zu AC umgewandelt wird. Außerdem handelt es sich hier um globale Messungen im Plasma, die wie gezeigt nicht mit denen im Kapillarblut oder Vollblut verglichen werden können. Weiterhin ist ein durchtrainierter Marathonläufer nicht mit sportlich untrainierten Probanden vergleichbar.

Für die in unserer Studie beobachteten Reduktionen der langkettigen AC-Konzentrationen C₁₆, C₁₈, C_{18:1}, die bis auf das C₁₆ statistisch signifikant sind, gibt es mehrere Erklärungsansätze:

Möglicherweise wurden mehr aktivierte Fettsäuren verbraucht als Fettsäuren aus dem Fettgewebe freigesetzt und im Zytoplasma aktiviert wurden. Eine andere Erklärung wäre, dass die sportliche Belastung so stark war, dass die Muskelzellen bevorzugt Kohlenhydrate als Energiequelle verwendeten. Dagegen spricht jedoch die erhöhte Konzentration des C₂. Um diesen Effekt endgültig zu klären sollten in einer zukünftigen Studie auch Fettsäure- und Glukosespiegel im Plasma mitbestimmt werden.

Ein tendenzieller Anstieg der bei diesem Versuch ermittelten Summe an AC von 8 % gegenüber ihrer Konzentration vor der Anstrengung konnte beobachtet werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen anderer Studien. Hiatt et al. fanden eine

Erhöhung der AC um 19 % (60). Auch die Messungen von H. Böhles bei einem Marathonläufer zeigten eine Erhöhung der Gesamtacylcarnitine.

Obwohl dies in jüngster Zeit immer wieder propagiert wird, hat die Höhe des Carnitinspiegels, von Mangelzuständen abgesehen, keinen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit eines Menschen (28). Eine Carnitinsubstitutionen unter körperlicher Aktivität führt zu einer Erhöhung der AC-Konzentrationen im Blut, jedoch zu keiner Verbesserung des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels oder zu einer besseren Leistung (28).

5.2.5 Propionylcarnitin, Palmitoylcarnitin und der Quotienten C_3/C_{16} beim Stoffwechselgesunden

Die Konzentrationen des C_3 (C_3 : 2,32 $\mu\text{mol/l}$ +/- 1,0, n = 23) sind, wie ausführlich bei den einzelnen Versuchsbedingungen beschrieben, erhöht, wenn vermehrt verzweigtkettige Aminosäuren zur Energiegewinnung verbraucht werden, wie z.B. bei verstärkter körperlicher Belastung. Sind vermehrt Kohlenhydrate zur Energiegewinnung vorhanden, wird die Verstoffwechslung der verzweigtkettigen Aminosäuren gedrosselt. Eine erhöhte Carnitingabe stimuliert die Verstoffwechslung der verzweigtkettigen Aminosäuren nicht. Da die ungeradzahligen Fettsäuren im stoffwechselgesunden Organismus nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden sind, kann ihr Einfluss auf die Erhöhung des C_3 vernachlässigt werden (159).

Die Konzentration des C_{16} (1,60 $\mu\text{mol/l}$ +/- 0,6, n = 23) ist bei erhöhter Verfügbarkeit an Kohlenhydraten auf Grund der Drosselung der Fettsäureverbrennung sowie bei körperlicher Aktivität tendenziell erniedrigt. In der Literatur wird beschrieben, dass unter Fastenzuständen die Konzentrationen der langkettigen AC massiv ansteigen, da die Fettsäuren vermehrt zur Ketonkörperbildung aktiviert werden (19, 30, 7). Eine Einmalgabe von L-Carnitin führt zu einer leichten Reduktion der C_{16} -Konzentration. Nicht vegetarische Ernährung hingegen erhöht sie.

Auffallend ist, dass die Unterschiede der Konzentrationen des C_{16} geringer ausfallen, als die des C_{18} - und $C_{18:1}$. Die C_{16} -Konzentration scheint keine starken Fluktuationen aufzuweisen. In der nachfolgenden Tabelle sind die Veränderungen des Quotienten C_3/C_{16} unter bestimmten Stoffwechselbedingungen dargestellt:

Tab. 18: Verhalten des Quotienten C₃/ C₁₆ unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen

Studie	Verhalten C ₃ / C ₁₆	Paariger t-Test	Begründung
Gabe von 20 mg/kg Körpergewicht Carnitin	Zeigt Schwankungen, entspricht Verlauf des C ₃		C ₁₆ -Konz. unter Carnitingabe sehr konstant, Quotient spiegelt C ₃ -Verlauf wieder
Glukosetoleranztest (75 g Glukose)	Keinen eindeutigen Einfluss	keine signifikante Erhöhung: p < 0,1	C ₁₆ recht konstant, C ₃ nur geringen Fluktuationen unterworfen.
Mittelstarke bis starke körperliche Belastung	Statistisch auffällige Erhöhung	Erhöhung um 28,2 % (p < 0,01) vom Ausgangswert	Im Verhältnis zur Erhöhung von C ₁₆ , stärkere Erhöhung des C ₃

Im Verlauf von 14 Stunden konnte eine Veränderung des Quotienten (normal: C₃/ C₁₆: 1,46 +/- 0,5, n = 23) von maximal 31 % beobachtet werden. Bei den über fünf Tagen ermittelten Werten betrug die Veränderung maximal 35 %.

In einem gesunden Stoffwechsel wird dieser Quotient zum einen durch das C₃ bestimmt, dessen Höhe den Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren wiedergibt, und zum anderen durch das C₁₆, das ein Maß für die Menge der im Mitochondrium oxidierten Fettsäuren darstellt.

5.2.6 Acylcarnitine und freies Carnitin in Serum und Blutzellen

Die selektive Bestimmung der Konzentrationen des FC und der AC in Serum und zellulären Blutbestandteilen wurde nach Beendigung der oben diskutierten Versuche und der Patientenstudie durchgeführt. Sie sollte als Pilotstudie betrachtet werden. Durchgeführt wurden diese Messungen an zwei Probanden, um Hinweise zu erhalten, zu welchen Teilen die AC und das FC die im Trockenblut (Mischung aus lysierten Blutzellen und Blutplasma) bestimmten werden aus dem Blutplasma bzw. den zellulären Bestandteilen stammen. Das Interesse sollte hierbei vor allem auf die langkettigen AC gerichtet sein. Studien über die Konzentrationen von FC und C₂ in Erythrozyten, Leukozyten und Blutplasma wurden bereits durchgeführt. Hierbei wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse ermittelt. Bis auf eine Studie von Vreken et al. (keine genaue Angabe der Ergebnisse) wurden die AC bis auf ihre Unterscheidung in C₂, kurzkettige AC (C₂ - C₈) und langkettige AC (C₁₂ - C₁₈) nie genauer differenziert, so dass das Interesse auch auf die Einzelkonzentrationen vor allem auf das C₃ und auf die langkettige AC (C₁₆, C_{18:1}, C₁₈) gelenkt werden sollte.

Die bislang veröffentlichten Daten bezüglich des FC und der AC im Plasma, den Leukozyten und Erythrozyten sind sehr widersprüchlich und stellen die Frage an die Genauigkeit der in diesen Studien angewandten Meßmethoden.

Tabelle 19 gibt einen Überblick.

Tab. 19: Anteil der Carnitinkonzentrationen (Gesamtcarnitin, freies Carnitin, Acyl-Carnitin, Acetylcarnitin) der Erythrozyten, Leukozyten und des Blutplasmas an der jeweiligen Gesamtkonzentration im Vollblut (1, 68, 69, 34, 85, 20, 29, 27)

	Gesamt-carnitin	Freies Carnitin	Acyl-carnitin	Acetyl-carnitin
Plasma	1-73 %	2-83 %	1-39 %	35 %
Erythrozyten	0-69 %	0-65 %	0-69 %	66 %
Leukozyten	0-83 %	0-62 %	0-77 %	5 %

Vreken et al. beobachteten, dass im Serum/ Plasma nur Spuren an langkettigen AC zu finden sind, und vermuteten, dass die im Trockenblut nachgewiesenen AC aus den lysierten Zellbestandteilen stammen.(149)

Bei der eigenen Studie muss bedacht werden, dass das Vollblut nur in Serum und zelluläre Bestandteile getrennt wurde und damit nicht geklärt ist, welche Verteilung die Carnitine in den verschiedenen Blutzellen (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten) einnehmen. Das FC und die AC wurde ebenfalls im Plasma bestimmt (Ergebnisse nicht dargestellt), doch bestand zwischen Serum und Plasma kein Unterschied bezüglich der Konzentrationen der AC und des FC. Da die Bestimmung des Serums genauer durchführbar war wurden diese Ergebnisse verwendet. Die Erythrozyten wurden ebenfalls über zwei Verfahren aufbereitet, in heparinisiertem und EDTA-Blut. Da auch hier kaum Unterschiede festgestellt wurden, wird nur auf die Ergebnisse der EDTA-Blutproben eingegangen.

Obwohl an dieser Studie nur zwei Probanden teilnahmen, sind doch deutliche Tendenzen zu erkennen. Die gemessenen Konzentrationen an FC im Serum betragen 67,5 %/ 52,8 % des gesamten FC im Vollblut.

Unklar ist, weshalb in den einzelnen Studien so unterschiedliche Carnitinkonzentrationen in den Erythrozyten bzw. zellulären Blutbestandteilen gemessen wurden. Mögliche Erklärungen wären, dass bei einigen Studien die Proben durch eine unsaubere Trennung der Zellen verunreinigt waren oder die enzymatischen Messungen sehr ungenau sind

(69). Denkbar wäre auch, dass FC intrazellulär nur teilweise ungebunden vorliegt und bei einigen Studien durch die Probenaufbereitung auch an Protein gebundene FC bzw. AC frei werden, während bei anderen Studien dies nicht der Fall ist.

Bei den für das Tandemmassenspektrometer aufbereiteten Proben kann nicht davon ausgegangen werden, dass proteingebundene Carnitine gemessen werden, da durch die Extraktion mit Methanol keine Proteinbindungen gelöst werden (persönliche Mitteilung: M. Göggerle). Für C_{16} ist bekannt, dass es im Zytosol an das FAB-Protein (fatty-acid-binding protein) teilweise gebunden ist. Dieses Protein hat vor allem die Aufgabe, freie Fettsäuren im Zytoplasma zu binden (104, 43). Die Frage, ob für die anderen AC und das FC ebenfalls ein Bindungsprotein existiert, konnte in der Literatur nicht beantwortet werden. Dies muss in weiteren Studien geklärt werden.

Bei der eigenen Messung wurden 56,6 % bzw. 75 % des C_2 im Serum gemessen. C_3 (7,9 % und 14,8 % im Serum), C_{16} (8,0 % und 6,9 % im Serum), C_{18} (8,0 % und 6,5 % im Serum) sowie $C_{18:1}$ (3,5 % und 4,8 % im Serum) finden sich nur in sehr geringen Mengen im Serum. Vreken et al. haben dies ebenfalls beschrieben (149).

Auf Grund der sehr niedrigen Serumkonzentration der langkettigen AC kann geschlossen werden, dass für AC, die längere Kohlenstoffketten als die Acetylgruppe des C_2 haben, nur eine minimale Transportmöglichkeit von den Zellen in das Blutplasma existiert. Dies gilt aber nur für physiologische AC-Konzentration, da bei stoffwechselkranken Patienten erhöhte AC-Konzentrationen, z.B. C_3 sowie langkettige AC ebenfalls gut im Plasma messbar sind (33, 108). Bei stark erhöhten Konzentrationen scheint eine Möglichkeit für die Zellen zu existieren, diese AC in das Plasma auszuschleusen.

Interessant ist nun, welchen Anteil die einzelnen Blutzellen an den gemessenen AC haben. Die Literaturangaben über den Gehalt der AC in den jeweiligen Zellarten weichen wie schon dargestellt stark voneinander ab. Dies wäre von besonderem Interesse, da die Erythrozyten bezüglich des Carnitinstoffwechsels eine Sonderrolle einnehmen, da sie keine Mitochondrien besitzen und folglich auch keine Fettsäureverbrennung betreiben (81). Die wahrscheinlichste Funktion des FC in den Erythrozyten scheint zu sein, Fettsäuren, die beim Membranumbau der Phospholipide der Zellmembran anfallen, zu binden und damit langkettige AC herzustellen. Bei Bedarf können diese langkettigen Acylcarnitine die Fettsäuren wieder für den erneuten Einbau in die Zellmembran abgeben. Durch die Fähigkeit des Carnitins freie Fettsäuren zu binden wird der Energiestoff-

wechsel der Erythrozyten ebenfalls gefördert, da größere Mengen freier Fettsäuren die Aktivität der Na^+ -/ K^+ -ATPase hemmen (111). Es konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass die in den Erythrozyten gemessenen Konzentrationen an FC und AC nicht mit den Plasmakonzentrationen korrelieren und folglich der Carnitinstoffwechsel der Erythrozyten nicht mit dem kernhaltiger Zellen vergleichbar ist (58, 111). Auf Grund der schon beschriebenen Zusammenhänge der Höhe der langkettigen AC im Trockenblut in Abhängigkeit zur jeweiligen Stoffwechselsituation des Organismus kann davon ausgegangen werden, dass zumindest die Konzentration der langkettigen AC durch die Leukozyten mitbestimmt wird, denn im Plasmaanteil des Trockenblutes sind kaum langkettige AC enthalten und der Carnitingehalt der Erythrozyten wird sicherlich nicht durch die im Körper herrschende Stoffwechselsituation bestimmt. Klarheit darüber könnte man durch die Durchführung weiterer Studien mit mehreren Probanden erhalten. Hierfür muss das Vollblut in Plasma und einzelne Zellarten (Erythrozyten, Lymphozyten, Granulozyten und Thrombozyten) aufgetrennt werden und die AC in den einzelnen Zellarten getrennt bestimmt werden.

Interessant wäre zu klären, auf welchem Weg FC bzw. die AC in die Erythrozyten gelangen. Ein Transporter wurde in der Erythrozytenmembran nicht gefunden und eine freie Diffusion des Carnitins in die Zelle wird nicht angenommen, da bei in vitro an Erythrozyten durchgeführten Versuchen die Konzentration des FC durch mehrfaches Waschen der Erythrozyten trotz des damit zwischen Zytoplasma und Waschsubstanz bestehenden Gradienten nicht abnahm (29). Trotzdem gehen Cooper et al. davon aus, dass C_2 als Energiesubstanz für die Erythrozyten dient und aufgenommen werden kann (29). Eine andere Erklärung für die Tatsache dass die Erythrozyten Carnitin enthalten wäre, dass die Erythrozyten die Carnitine während ihrer Reifungsphase im Knochenmark aufnehmen, während der sie Mitochondrien besitzen und somit auch Fettsäureverbrennung betreiben (112, 29).

Tab. 20: Carnitin und Acetylcarnitinkonzentrationen bei Proband 3 und Proband 20 in Serum und Blutzellen

	Geschlecht	vegetarische Ernährung (48h)	Anteil freies Carnitin in Blutzellen	Anteil freies Carnitin im Serum	Anteil Acetylcarnitin in Blutzellen	Anteil Acetylcarnitin im Serum
Proband 3	w	ja	32,5%	67,5%	56,6%	43,4%
Proband 20	m	nein	47,2%	52,8%	75,0%	25,0%

Die unterschiedlichen Konzentrationen des FC und der AC beider Probanden sind auf Grund der geringen Probandenzahl schwer zu beurteilen. Die höheren FC-Spiegel bei Proband 20 könnten sich sowohl dadurch erklären, dass der Proband männlich ist, wie auch dadurch dass sich der Proband fleischreich ernährt hat. Ob dies jedoch auch die unterschiedlichen Verteilungen der AC (vor allem des C₂) und des FC erklären kann, ist unklar (siehe Tab.20). Borum et al. stellten in ihrer Studie fest, dass nur der Plasmacarnitinspiegel bei Männern signifikant höher ist als bei Frauen, während der Carnitinspiegel der Erythrozyten geschlechtsunabhängig ist (20). Möglicherweise liegen die in der eigenen Studie gemessenen Konzentrationen aber auch innerhalb eines natürlichen Schwankungsbereichs. Näheres dazu wird man erst durch die Durchführung weiterer Untersuchungen bei einer größeren Fallzahl unter Beachtung von Ernährung, Alter und Geschlecht der Probanden erfahren können.

5.3 Diskussion der Patientenstudie

5.3.1 Durchführbarkeit der Studie

Da es sich um eine Studie mit telefonischer Befunderhebung und Blutentnahmen durch die Eltern handelte, war deren Mitarbeit von entscheidender Bedeutung. Sowohl die Blutentnahme wie auch das in ein-/ bzw. zweiwöchigen Abständen stattgefundene Telefoninterview wurde von allen Eltern gut angenommen. Bis auf die Eltern des Patienten 9, die eine Blutentnahme bei Erkrankung des Kindes ablehnten, führten die Eltern die Blutentnahme zuverlässig durch. Die Belastung der Kinder hielt sich nach Angaben der Eltern in einem erträglichen Rahmen. Die Eltern empfanden es als Erleichterung, für die Blutentnahmen keinen Arzt aufsuchen zu müssen. Besonders das strukturierte Telefoninterview wurde von den Eltern gut angenommen und teilweise sogar als seelische Entlastung empfunden. Trotz einiger Sprachprobleme mancher ausländischer Eltern war eine gute Verständigung bezüglich des Gesundheitszustandes der Patienten möglich.

Eine gewisse Subjektivität der Angaben der Eltern zum klinischen Zustand ihres Kindes war vorhanden. So neigten die einen Eltern eher zur Übertreibung, während die anderen Eltern die Symptome herunterspielten. Es wurde bei der Bildung des Befindlichkeits-scores versucht, diese Tendenzen zu berücksichtigen.

Der strukturierte Fragebogen eignete sich sehr gut, systematisch den jeweiligen Gesundheitszustand darzustellen, sowie den Zeitraum zwischen den Telefonaten zu erfassen. Durch ihn wurden die zur Evaluation wichtigen Daten sehr detailliert abgefragt und es kann davon ausgegangen werden, dass trotz Sprachschwierigkeiten und einer gewissen Subjektivität durch ihn ein genaues Bild des klinischen Zustandes skizziert werden konnte.

5.3.2 Aussagekraft des C_3/ C_{16} -Quotienten

Nachfolgend soll der Quotient C_3/ C_{16} auf seine Eignung bezüglich der Beurteilung der klinischen Situation der Stoffwechselfpatienten geprüft werden.

Zu niedrige Carnitinspiegel limitieren die AC-Bildung und verhindern somit, dass in dem Verhältnis C_3 gebildet wird wie intramitochondrial Propionyl-CoA anfällt. Dadurch ist es von großer Wichtigkeit bei der Beurteilung des C_3/ C_{16} -Quotienten, dass die Patienten ausreichend mit Carnitin substituiert sind und im Normbereich liegende FC-Spiegel haben. Bei allen 14 Patienten lagen die FC-Spiegel im Normbereich, so dass der Quotient C_3/ C_{16} bei allen Patienten zu bewerten war.

5.3.2.1 Zusammenhang: Klinik - Quotient C_3/ C_{16}

Nicht bei allen Patienten war es möglich zu überprüfen, ob der klinische Zustand mit dem Quotienten C_3/ C_{16} übereinstimmt, da bei 3 der 14 Patienten (Patienten: 6, 7, 14) innerhalb der acht Studienmonate bis auf grippale Infekte mit mildem klinischen Verlauf keine schweren Erkrankungen oder Entgleisungen auftraten. Bei Patient 15 ist der Quotient nicht zu beurteilen, da dessen Eltern sich weigerten, unter Infektbedingungen Blut abzunehmen. Bei Patient 10 ist eine Übereinstimmung der Höhe des Quotienten C_3/ C_{16} mit der Befindlichkeit schwer zu beurteilen, da sich bei diesem Patienten durch die Behandlung mit Hydroxyadenosylcobalamin der Stoffwechsel grundlegend änderte und der Quotient somit mehr durch die Behandlung „verändert wurde“ als durch die Klinik (siehe Abb. 23 und 24).

Bei den anderen neun Patienten ist eine Bewertung möglich. Es fällt auf, dass bei vier der Patient (Patienten: 2, 3, 4, 11) eine sehr gute Übereinstimmung der klinischen Situation mit der Höhe des Quotienten C_3/ C_{16} zu beobachten ist, während die Übereinstimmung bei Patient 5 teilweise und bei Patient 8 und 13 nur bei schwerer Entgleisung und

nicht bei leichten Infekten zu beobachten ist. Bei Patient 1 und 12 ist eine Übereinstimmung schwer zu erkennen. Hierbei fällt auf, dass die vier Patienten, die eine gute Übereinstimmung zeigen, während der Studienzeit eine große Anzahl an Entgleisungen sowie eine große Infekthäufigkeit aufwiesen. Alle vier Patienten haben eine ungünstige psychomotorische Entwicklung sowie eine mit einem meist schlechteren Outcome einhergehende early onset Form der PPA. Bei diesen Patienten ist auch die Compliance ihrer Eltern meist nicht zufriedenstellend. Bei den Patienten 1 und 8 hingegen führten Infekte meist zu keiner Erhöhung des C_3/C_{16} -Quotienten, aber auch zu keiner Stoffwechselentgleisung. Die Eltern beider Patienten haben selbstständig und ohne ärztliche Absprache bei Infekten sofort eine Veränderung der Ernährung durchgeführt (z.B. Eiweißrestriktion) und möglicherweise dazu beigetragen, dass die Infekte keine Stoffwechselverschlechterung bewirkt haben. Stoffwechselentgleisungen führten bei den Patienten 8 und 10 zu einem in den acht Monaten jeweils am höchsten gemessenen C_3/C_{16} -Quotienten, während andere Infekte keine Erhöhung anzeigten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ein klinisch nachweisbarer Infekt bzw. eine Erkrankung nicht immer mit einem erhöhten C_3/C_{16} -Quotienten einhergehen muss. Doch gab es auch keinen Fall eines Patienten mit niedrigem C_3/C_{16} -Quotienten unter schwerer Erkrankung bzw. bei nötiger stationärer Behandlung.

Infekte führen neben traumatischen Verletzungen, vor allem wenn sie mit Fieber einhergehen, zu einer Erhöhung des Grundumsatzes (10 - 15 % bei einer Temperaturerhöhung um 1°C). Dabei wird neben einer erhöhten Fettverbrennung auch vermehrt Protein abgebaut und Aminosäuren verbrannt (81). Da das Fettgewebe vor allem bei schlecht eingestellte Stoffwechsellpatienten erhöhte Mengen an ungeradzahigen Fettsäuren aufweist (79), werden diese vermehrt abgebaut und ungeradzahlige Fettsäuren fallen an. Durch die erhöhte Verbrennung der Aminosäuren entsteht ebenfalls vermehrt Propionyl-CoA aus dem Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren. Dadurch entsteht vermehrt C_3 , was zu einer Erhöhung des C_3/C_{16} -Quotienten führt. Außerdem entstehen aus Propionyl-CoA andere für den Körper toxische Metabolite, die eine Entgleisung des Energiestoffwechsels bewirken. Ab einer bestimmten Schwere des Infektes verhindern die ausgeschütteten Zytokine und Interleukine eine anabole Stoffwechsellage, so dass die Zufuhr einer hochkalorischen Ernährung nicht immer den Katabolismus aufhalten

kann (81). Auch Erbrechen und große körperliche Belastung kann zu einer katabolen Stoffwechselsituation führen (81).

In dieser Studie führten Infekte bei stoffwechsellabilen Patienten zu einer Erhöhung des Quotienten. Bei stoffwechselstabilen Patienten führte ein Infekt nur in seltenen Fällen, die auch klinisch mit einer Entgleisung einhergingen, zu einer Erhöhung des Quotienten. Der Stoffwechsel eines gut eingestellten Patienten, d.h. eines Patienten mit gutem Outcome, wenigen Infekten und Entgleisungen und niedrigen Konzentrationen an toxischen Metaboliten, kommt mit der katabolen Stoffwechselsituation besser zurecht (99).

Es fällt auf, dass in einigen Fällen bei Infektbeginn noch niedrigere C_3/C_{16} -Quotienten zu messen sind, und diese erst einige Tage später, teilweise nach klinischer Besserung, erhöht sind (Patienten: 1, 4, 8, 13, 14). Eine mögliche Erklärung wäre, dass der Stoffwechsel erst einige Zeit nach Infektbeginn in einen katabolen Zustand gerät, wodurch die aus diesem Zustand resultierenden erhöhten Metabolite erst nach einer gewissen Zeitverzögerung ansteigen.

Eine schwere Entgleisungssituation ging hingegen mit einer sofortigen Erhöhung des C_3/C_{16} -Quotienten einher (Ausnahme bei Patientin 13). Hierbei wurden massiv erhöhte C_3 -Konzentrationen gefunden. Die C_{16} -Konzentrationen waren hierbei bei einigen Patienten stark erniedrigt (Patient 2, 4 sowie unveröffentlichte Daten einer weiteren Patientin). Möglicherweise findet hierbei eine Hemmung der CTP I statt, die für die Bildung des C_{16} verantwortlich ist. H. Böhles konnte in einer bislang unveröffentlichten Studie an Ratten eine Hemmung dieses Enzyms unter Sepsisbedingungen nachweisen (mündliche Mitteilung H. Böhles). Unter Umständen findet die Hemmung dieses Enzyms bei den PPA- und MMA-Patienten durch die erhöhten Konzentrationen an stoffwechselschädigenden Metaboliten ebenfalls statt. In speziellen Tierversuchen müsste diese Frage genauer geklärt werden.

Es fällt auf, dass bei fast allen Patienten an einigen Tagen erhöhte C_3/C_{16} -Konzentrationen gemessen wurden, ohne dass hierbei eine Infektion, Erbrechen oder andere Besonderheiten zu erkennen sind.

Erklärungsmodelle hierfür sind:

- I) Verschlechterungen des Stoffwechsels sind nicht nur von den im Fragebogen evaluierten Faktoren abhängig.
- II) Klinisch inapparente Infekte können die Stoffwechsellage beeinflussen.

- III) Bei sehr kleinen Kindern ist die klinische Situation nicht immer eindeutig einschätzbar.
- IV) Bei älteren Patienten wissen die Eltern über in der Schule und Freizeit vorliegende Diätfehler nicht Bescheid.
- V) Die Angaben der Eltern sind teilweise nicht richtig.
- VI) Es findet sich eine „natürliche Fluktuation“ bei instabiler Stoffwechsellage.

Über das Telefoninterview und den strukturierten Fragebogen konnte die klinische Situation nicht immer exakt abgeschätzt werden. Exaktere Angaben hätten gemacht werden können, wenn man nicht nur die Eltern befragt hätte, sondern auch die Patienten an den Probeentnahmetagen untersucht hätte, doch war dies auf Grund der großen räumlichen Distanz (bis zu 800 km) zu den Patienten nicht möglich gewesen.

Die Abbildungen 22 und 31 zeigen deutlich, dass insgesamt bei allen Patienten mit PPA wie auch mit MMA eine deutliche Übereinstimmung des klinischen Zustands mit der Höhe des C_3/ C_{16} -Quotienten besteht. Auch Leonard et al. konnten einen engen Zusammenhang der Klinik der Patienten mit der Plasmakonzentration an Propionat und Methylmalonat nachweisen (77).

5.3.2.2 Zusammenhang des Quotienten C_3/ C_{16} mit anderen Laborparametern

Bei einigen Patienten wurden neben dem C_3/ C_{16} -Quotienten auch noch andere Laborparameter erhoben. Es soll im Folgenden erörtert werden, ob eine Erhöhung dieser Parameter mit einem erhöhten C_3/ C_{16} -Quotienten einhergeht.

- Bei Patient 10 wurde im Rahmen des Behandlungsversuchs mit Hydroxycobalamin neben der Messung der AC auch eine Messung der Methylmalonsäureausscheidung im Urin vorgenommen. Hierbei konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen beiden Parametern gefunden werden ($p < 0,0002$).
- Bei den Patienten 2, 3, 4 und 5 lag bei Erhöhung des Ammoniakspiegels auch eine Erhöhung des Quotienten C_3/ C_{16} vor.
- Bei Patient 3 wurde bei schlechtem Allgemeinbefinden der Ketonkörpergehalt des Urins bestimmt. Bei erhöhten Ketonkörpern wurden ebenfalls erhöhte C_3/ C_{16} -Konzentrationen gefunden.

Wie nachfolgend noch genauer erläutert wird, steht sowohl eine erhöhte Methylmalonsäurekonzentration im Urin, ein erhöhter Ammoniakspiegel im Blut sowie der Nachweis von Ketonkörpern im Urin für eine schlechte Stoffwechsellaage des Körpers. Die Tatsache, dass eine Erhöhung dieser Parameter ebenfalls mit einer Erhöhung des C_3/C_{16} -Quotienten einhergeht, spricht dafür, dass der Quotient ebenfalls in der Lage ist, diese schlechteren Stoffwechselsituationen anzuzeigen.

5.3.2.3 Die Rolle des C_3/C_{16} -Quotienten bei akuten Stoffwechselentgleisungen und bei einer Therapieoptimierung

In Tabelle 21 werden die herkömmlich verwendeten Verfahren bezüglich ihrer Aussagekraft und der Vor- und Nachteile ihrer Messung verglichen. Es ist wichtig, diese Parameter in ihre Verwendung als Kurzzeitparameter und Langzeitparameter zu unterteilen. Ein Kurzzeitparameter hat die Aufgabe, eine akute Stoffwechselverschlechterung anzuzeigen, bzw. vorherzusehen. Das heißt, er muss bei bzw. vor einer klinischen Verschlechterung diese anzeigen. Ein Langzeitparameter hingegen hat die Aufgabe, die Stoffwechsellaage der letzten Zeit anzuzeigen und dadurch eine Therapieverbesserung zu ermöglichen.

Tab. 21: Einsatzmöglichkeiten, Vor- und Nachteile von Laborparametern für die Beurteilung der Stoffwechselsituation bei Patienten mit einer PPA oder MMA (75, 132, 27, 158, 157)

Parameter	Aussagekraft für die Stoffwechsellaage eines PPA-/ MMA-Patienten	Vorteile der Methode	Nachteile der Methode	Verwendung
Ammoniak (Blut)	Propionsäure hemmt den Harnstoffzyklus, d.h. es spiegeln sich hohe Propionsäurespiegel in hohen Ammoniakkonzentrationen wieder.	Kann im Routinelabor jeder Klinik bestimmt werden, schnelle Erhöhung, Warnsignal für rasche Intervention	Venöse Blutentnahme erforderlich, Parameter nur bei schlechter Stoffwechsellaage erhöht, unter klinisch stabilen Verhältnissen keine Aussagekraft	Kurzzeitparameter
Blutgase	Bei hohen Propionat und Methylmalonatkonzentrationen, Anreicherung der sauren Metabolite, niedrigere pH-Wert messbar	Kapillare Blutentnahme einfach durchführbar, Warnsignal bei schwerer Entgleisung	Nur in der Entgleisungssituation kurzzeitig erhöht, keine Aussagekraft im nicht dekompensierten Zustand	Kurzzeitparameter
Ketonkörper (Urin)	Durch Hemmung des Zitratzykluses durch die Propionsäure und ihre Metabolite, Indikator für erhöhte Propionsäurekonzentrationen	Kann leicht über einen Teststreifen im Urin bestimmt werden, auch von den Eltern zu Hause.	Nur in der Entgleisungssituation kurzzeitig erhöht, keine Aussagekraft im nicht dekompensierten Zustand	Kurzzeitparameter
Metabolite im Urin Methylzitrat, OH-Propionat, Methylmalonat	Messung der aus der Propionsäure gebildeten Metabolite im Urin und des Methylmalonat (MMA)	Metabolite können auch bei klinisch stabiler Stoffwechsellaage gemessen werden (MMA), bei PPA nur Methylzitrat	Sammeln von Spontanurin bei Kleinkindern schwierig. Kann nur in einem speziellen Stoffwechsellabor durchgeführt werden, große Fluktuation	Kurz- und Langzeitparameter
Metabolite im Plasma Propionsäure, Methylmalonsäure	Direkte Messung der sich anreichernden Propionsäure und Methylmalonsäure im Plasma	Metabolite können auch bei klinisch stabiler Stoffwechsellaage gemessen werden	Schwierige, zeitaufwendige lange Probenanalyse, venöse Blutabnahme nötig, hohe Fluktuation der Werte	Kurz- und Langzeitparameter
Ungeradzahlige Fettsäuren (in Erythrozytenmembran)	Bei hohen Propionsäurekonzentrationen ist Propionyl-CoA Primer für die Bildung ungeradzahliger Fettsäuren	Geringe Fluktuation, Langzeitparameter, korreliert mit Outcome der Patienten	Aufwendiges Messverfahren, keine Aussage über den akuten Zustand möglich, nur in speziellen Zentren messbar	Langzeitparameter

Es soll nun überprüft werden, inwieweit der Quotient C_3/ C_{16} als Kurzzeit-/ bzw. Langzeitparameter eingestuft werden kann.

Verwendung des C_3/ C_{16} -Quotienten als Kurzzeitparameter in Akutsituationen

Zur Vorhersage einer Entgleisung ist dieser Quotient nicht geeignet, da bei keinem der 14 Patienten eine Erhöhung vor Auftreten einer Entgleisung oder schweren Infektion nachgewiesen wurde. Der Quotient ist nur dann sofort erhöht, wenn eine fulminante Entgleisung vorliegt. Bei Infekten oder Erbrechen dauert es eventuell einige Zeit, bis eine Erhöhung nachzuweisen ist. Da auch die Versendung der Proben und die Ergebnismitteilung einige Stunden dauert, ist der Quotient zur Einstufung einer Akutsituation, bei der eine therapeutische Einstellung für den Patienten lebensnotwendig sein kann, nicht geeignet. Die Beurteilung der klinischen Situation ist hier wesentlich.

Verwendung des C_3/ C_{16} -Quotienten als Langzeitparameter

Als Langzeitparameter hat sich der C_3/ C_{16} -Quotient sehr gut bewährt. Die Therapieoptimierung der Patienten 2, 3 und 10 führte zu einer Verbesserung des klinischen Zustandes der Patienten 2 und 3, sowie einer Beibehaltung des guten klinischen Zustandes bei Patienten 10 bei deutlicher Verringerung der C_3/ C_{16} -Konzentrationen (siehe Kapitel 4.2.4). Auch bei einer weiteren Patientin (MMA) war eine Therapieverbesserung mit niedrigeren Konzentrationen, ebenso wie mit einer deutlichen Verbesserung des klinischen Zustandes verbunden (unveröffentlichte Daten). Der Quotient ist dementsprechend sehr gut geeignet, als Parameter für die Güte der Einstellung zu dienen und bei Therapieveränderungen anzuzeigen, ob diese die Stoffwechsellage positiv beeinflusst haben oder nicht.

Vergleich mit anderen Messverfahren

In der Beurteilung der Akutsituation ist zusammen mit den klinischen Befunden die Ammoniak-, Blutgas-, und Ketonkörperbestimmung der Messung des C_3/ C_{16} -Quotienten vorzuziehen. Bei einer Therapieoptimierung hingegen ist der Quotient C_3/ C_{16} der Bestimmung der Metabolite im Urin und Plasma überlegen, da er im Labor ohne komplizierte Verfahren bestimmt werden kann und weder das Sammeln von Urins noch eine venöse Blutabnahme notwendig ist und er häufig abgenommen werden kann.

Die Bestimmung der langkettigen Fettsäuren in der Erythrozytenmembran ist ein weiteres Verfahren. Es ist ebenso wie die Bestimmung der Metabolite im Plasma sehr aufwendig und erfordert eine venöse Blutentnahme (132, 158, 157, 27). Die Erythrozyten haben eine durchschnittliche Lebenszeit von 120 Tagen (9). Der Einbau der ungeradzahligen Fettsäuren erfolgt am wahrscheinlichsten während der Erythropoese (132). Bei der Messung der ungeradzahligen Fettsäuren der Erythrozytenmembran misst man somit die Fettsäuren der neu gebildeten wie auch schon „alten“ Erythrozyten und erhält einen Durchschnittswert der letzten 120 Tage. Auf Grund dieser Zeitspanne dauert es sehr lange, bis sich eine dauerhafte Veränderung der Stoffwechsellage, z.B. nach einer Therapieveränderung, auf die gemessenen Werte auswirkt. Der Quotient C_3/C_{16} hingegen spiegelt einen viel geringeren Zeitraum wieder und zeigt somit die Auswirkungen einer Therapieveränderung schneller an.

5.3.3 Unterschiede der Patienten

In der Literatur wird beschrieben, dass bei der Messung der Konzentrationen der ungeradzahligen Fettsäuren der Erythrozytenmembran und der Stoffwechselmetabolite im Serum und Urin die PPA- und MMA-Patienten individuell sehr unterschiedliche Konzentrationen aufweisen und diese teilweise mit ihrem klinischen Verlauf und dem Ausprägungsgrad ihrer Erkrankung korrelieren (132, 158, 157, 27). Auch die Werte des Quotienten C_3/C_{16} sind bei Patienten individuell sehr unterschiedlich.

Es soll nun überprüft werden, ob die Höhe des C_3/C_{16} -Quotienten in einen Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung beim einzelnen Patienten zu bringen ist.

Es wurde hierfür nach Befragung der Eltern sowie aus den Erkenntnissen des Telefoninterviews ein prognostischer Score (Punktwert) aus dem Erkrankungstyp, der psychomotorischen Entwicklung sowie der Häufigkeit der stationären Aufenthalte, der Anzahl der Stoffwechseldekompensationen, der Häufigkeit eines Scorewertes über 2,5, dem Essverhalten und der Compliance der Eltern während der acht Studienmonate gebildet. Die abgefragten Faktoren sind für die Prognose der PPA- und MMA-Patienten zentral. Tabelle 22 und 23 stellen die Bildung dieses Punktwertes dar.

Tab. 22: Einstufung der prognostischen Faktoren jedes Patienten mit PPA und Bildung eines prognostischen Scores: Ebenso Darstellung der C₃/ C₁₆-Mittelwerte, sowie die Fluktuation des Quotienten innerhalb der 8 Studienmonate.

Patient (PPA)		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Erkrankungstyp	early onset: 3; late onset: 0	3	3	3	3	3	3	3	0	3
psychomotorische Entwicklung	altersgemäß: 0; leicht retardiert: 2; stark retardiert: 3	3	3	3	3	2	3	2	0	2
Häufigkeit der stationären Aufenthalte	keine: 0 eine: 1 mehr als 1: 2	0	2	2	2	2	0	0	1	2
Anzahl der Stoffwechselldekompensationen	keine: 0 1-2-: 2 mehr als 2: 3	0	3	3	3	2	0	0	2	2
Häufigkeit eines Scorewertes über 2,5	0-2: 0; 3-4: 1; 5-6: 2; 7-8: 3; mehr als 9:4	3	3	4	3	1	0	0	4	0
Essverhalten	normal: 0; schwieriges Essen: 1; Sonde und Essen: 2; nur Sonde: 3	2	3	0	3	0	0	1	0	0
Compliance der Eltern	sehr gut: 0 gut: 1 schlecht: 2	0	1	2	2	1	1	2	0	2
prognostischer Score		11	18	17	19	11	7	8	7	11
Mittelwert: C3/C16		23,9	32,5	22,7	33,2	33,4	11,6	17,4	14,8	15
Fluktuation der Werte	klein: 1; mittel: 2; groß: 3	2	3	3	3	3	1	2	1	1

Tab. 23: Einstufung der prognostischen Faktoren jedes Patienten mit MMA und Bildung eines prognostischen Scores. Ebenso Darstellung der C₃/ C₁₆-Mittelwerte, sowie die Fluktuation des Quotienten innerhalb der acht Studienmonate.
Patient 11: wird aufgrund einer Zweiterkrankung nicht in Abb. 50 berücksichtigt

Patient (MMA)		10 (11)	12	13	14	
Erkrankungstyp	early onset: 3; late onset: 0	0	3	0	0	3
psychomotorische Entwicklung	altersgemäß: 0; leicht retardiert: 2; stark retardiert: 3	2	3	2	2	2
Häufigkeit der stationären Aufenthalte	keine: 0 eine: 1 mehr als 2: 2	0	2	1	1	0
Anzahl der Stoffwechselldekompensationen	keine: 0 1-2-: 2 mehr als 2: 3	0	2	0	2	0
Häufigkeit eines Scorewertes über 2,5	0-2: 0; 3-4: 1; 5-6: 2; 7-8: 3; mehr als 9:4	2	3	1	1	0
Essverhalten	normal: 0; schwieriges Essen: 1; Sonde und Essen: 2; nur Sonde: 3	0	0	3	0	1
Compliance der Eltern	sehr gut: 0 gut: 1 schlecht: 2	0	1	1	0	1
prognostischer Score		4	14	8	6	7
Mittelwert: C3/C16		6,25	13,8	29,9	13,6	24,2
Fluktuation der Werte	klein: 1; mittel: 2; groß: 3	1	2	3	2	3

Anschließend wurde bei jedem Patienten dieser prognostische Scorewert mit dem Mittelwert der in den acht Monaten gemessenen C_3/C_{16} -Quotienten auf Korrelation überprüft. In Abbildung 50 sind für alle Patienten mit PPA und MMA mit Ausnahme von Patient 11 die Mittelwerte des C_3/C_{16} -Quotienten gegen den prognostischen Scorewert aufgetragen. Bei Patient 11 liegt eine Zweiterkrankung vor (drei große Arachnoidalzysten), so dass der Scorewert nicht nur durch die MMA zu erklären ist. Deshalb wurden seine Werte nicht in das Diagramm aufgenommen. Es zeigt sich hierbei eine deutliche Korrelation beider Parameter. Der hierfür ermittelte Korrelationskoeffizient beträgt 0,7.

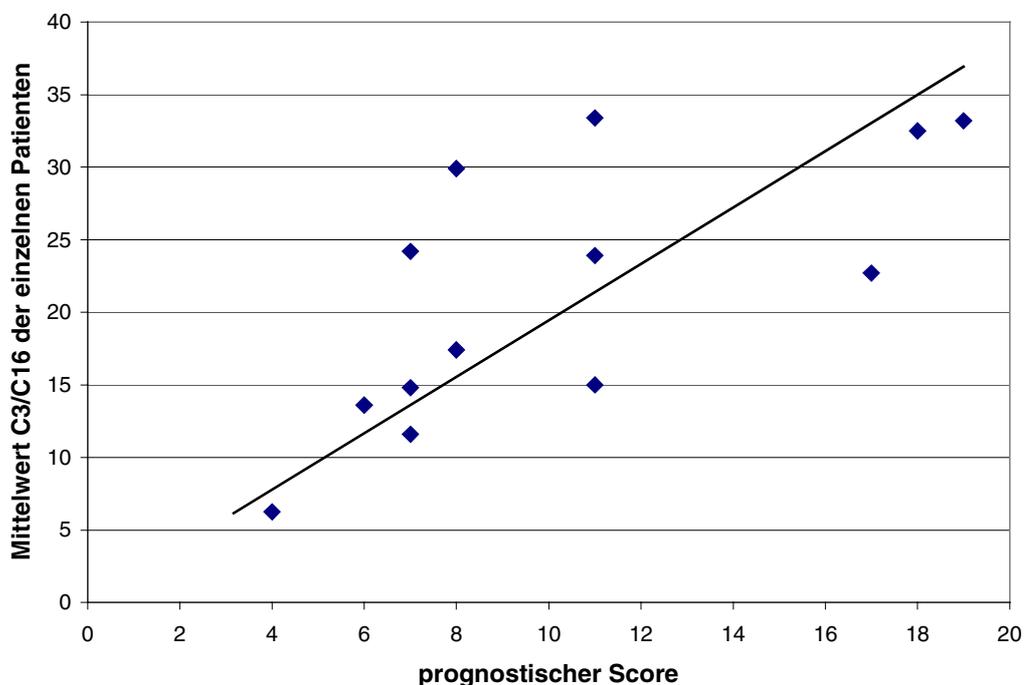


Abb. 51: Darstellung der Korrelation zwischen prognostischem Scorewert und dem Mittelwert C_3/C_{16} aller Patienten mit PPA und MMA. Die Gerade stellt die Korrelationsgerade dar.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bei der PPA wie auch bei der MMA die Ausprägung der Erkrankung in engem Zusammenhang mit der Höhe des Quotienten C_3/C_{16} steht.

Abbildung 20 und 29 zeigen, dass die Quotienten C_3/C_{16} bei einigen Patienten im Zeitraum von 8 Monaten stark fluktuieren, d.h. dass die Messwerte eine große Spannbreite haben und bei anderen Patienten relativ konstant sind. Wie den Tabellen 22 und 23 ent-

nommen werden kann, ist eine große Fluktuation meist mit einem höheren prognostischen Scorewert verbunden.

Die Messung der Höhe des Quotienten C_3/C_{16} bei einem Patienten ermöglicht, zusammen mit der Stärke der Fluktuation der Werte, eine Abschätzung des klinischen Ausprägungsgrades und könnte daher als prognostischer Parameter herangezogen werden.

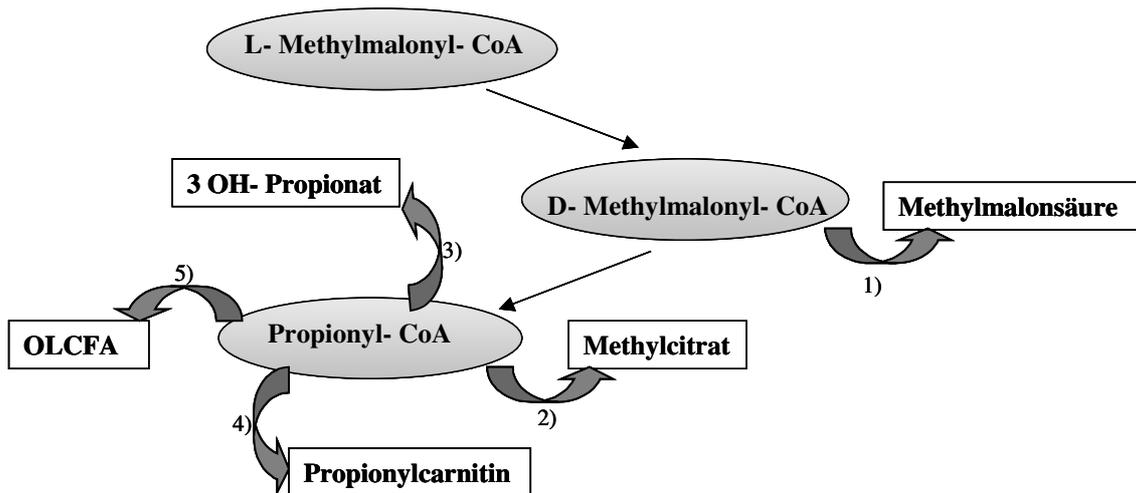
Es ist anzunehmen, dass die klinische Ausprägungsstärke und die Höhe des C_3/C_{16} -Quotienten bei der PPA im wesentlichen durch den Genotyp (Defekt in der α - oder β -Kette, Art der Mutation) bedingt ist. Dies muss jedoch in weiteren Studien bewiesen werden. Auch bei den MMA-Patienten ist ein Zusammenhang zwischen dem C_3/C_{16} -Quotienten, dem klinischen Ausprägungsgrad und dem Genotyp anzunehmen und müsste an einem größeren Patientenkollektiv überprüft werden.

5.3.4 Vergleich Messwerte bei PPA- und MMA-Patienten

Die für die PPA-Patienten ermittelten Durchschnittswerte des Quotienten C_3/C_{16} liegen zwischen 11,6 und 33,4, die für die MMA-Patienten ermittelten Werte zwischen 6,3 und 29,9. Hierbei wird deutlich, dass entgegen jeglicher Erwartung (mündliche Stellungnahme F. Trefz, U. Wendel, R. Baumgartner) die Werte des im Trockenblut gemessenen C_3 bei der MMA genauso hoch sind wie bei der PPA.

Bei der MMA besteht, wie im nachfolgenden Schaubild (Abb. 51) gezeigt, neben den auch bei der PPA zur Verfügung stehenden Abbauwegen des Propionyl-CoA die Möglichkeit, L-Methylmalonyl-CoA zu D-Methylmalonyl-CoA und dann über die D-Methylmalonyl-CoA Hydrolase in Methylmalonsäure umzuwandeln. Diese wird aus dem Mitochondrium in die Zelle und von dort in das Blut abgegeben und über die Niere ausgeschieden. Somit besitzt der Stoffwechsel bei der MMA im Vergleich zur PPA eine zusätzliche Möglichkeit, die anfallenden Metabolite in einen ausscheidungsfähigen Zustand zu bringen und den Körper zu entgiften (158). Man ging aus diesem Grund davon aus, dass deshalb bei der MMA viel geringere Mengen an Propionyl-CoA vorhanden sind und somit auch weniger C_3 gebildet werden kann.

Da die Bildung des C_3 eine Gleichgewichtsreaktion darstellt (129, 33), sind wahrscheinlich dennoch bei der MMA gleiche Mengen an Propionyl-CoA wie bei der PPA in der Zelle vorhanden.



**Abb. 51: Hauptsächliche Abbauwege des Methylmalonyl-CoA bei der MMA. Enzymatische Reaktionen: 1) D-Methylmalonyl-CoA-Hydrolase; 2) Zitratzyklus; 3) CAT (Carnitin-Acetyl-Transferase) 4) β -/ ω -Oxidation
OLCFA: ungeradzahlige Fettsäuren**

5.3.5 Quotient freies Carnitin/ C_3 gegenüber dem Quotienten C_3/ C_{16}

Wie schon in der Einleitung beschrieben, wurde in anderen Studien ein Quotient aus C_3 und FC gebildet. Bei nicht mit Carnitin substituierten PPA- und MMA-Patienten ist dieser Quotient auf Grund des sekundären Carnitinmangels zur Diagnosestellung sehr aussagekräftig. Inwieweit das C_3 in der Diagnose der PPA und MMA im erweiterten Neugeborenen Screening geeignet ist müssen die Auswertungen der Screeningdaten zeigen. Bei einem Patienten mit einer cbl C-Defekt (MMA) war das C_3 nicht erhöht. Das Kind ist erst im selektiven Screening aufgefallen (F. Trefz, persönliche Mitteilung)

Für ein Therapiemonitoring ist der Quotient C_3/ FC nicht so geeignet, da das FC je nach Zeitpunkt der Blutentnahme durch die Carnitinsubstitution sehr hohe Werte erreichen kann, vor allem wenn Blut direkt nach einer Carnitingabe entnommen wird.

5.4 Schlussfolgerungen und Ausblicke

Unter Beachtung der möglichen Fehlerquellen bei der Blutabnahme und Untersuchung der Trockenblutkarten kann die Messung der AC und insbesondere des Quotienten C_3/C_{16} bei normalen FC-Spiegeln als genaues Verfahren zur Beurteilung der Stoffwechsellage betrachtet werden. Dieser Parameter ist bevorzugt dafür geeignet, die langfristige Stoffwechsellage einzuschätzen und damit eine Beurteilung des Therapieregimes zu ermöglichen. Als Akutparameter sollte jedoch weiterhin die Messung der Ammoniakspiegel, der Ketonkörperkonzentrationen und der Blutgase durchgeführt werden. Der C_3/C_{16} -Quotient, der beim Stoffwechselgesunden mindestens um das 10-fache niedriger ist als bei einem PPA- oder MMA-Patienten, dient dazu, über die Höhe der C_3 -Konzentration die Menge des im Stoffwechsel anfallenden Propionyl-CoA wiederzugeben und über die C_{16} -Konzentration den Energiezustand des Stoffwechsels anzuzeigen. Da in dieser Studie nur 14 Patienten untersucht wurden (MMA: 5; PPA: 9), soll diese Studie als Pilotstudie betrachtet werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sollten an weiteren Patienten überprüft werden. Es sollte auch über die Bestimmung des Genotyps versucht werden einen möglichen Zusammenhang zwischen Genotyp, Ausprägung der Erkrankung sowie Höhe des C_3/C_{16} -Quotienten festzustellen.

6 Zusammenfassung

Die Propionazidämie (PPA) und die Methylmalonazidämie (MMA) sind angeborene Stoffwechselerkrankungen, bei denen der Abbau von Propionsäure und Methylmalonsäure aus der Verstoffwechslung verzweigtkettiger Aminosäuren, ungeradzahliger Fettsäuren sowie aus weiteren Abbauwegen gestört ist. Die dadurch entstehende Propionsäure greift zusammen mit ihren Metaboliten in den geregelten Ablauf des zellulären Stoffwechsels ein. Im Extremfall resultieren hieraus ketoazidotische Stoffwechsellagen, die zu komatösen Zuständen und zum Tod der Patienten führen.

Die Behandlung erfolgt über eine spezielle, eiweißarme Diät mit dem Ziel, die Propionsäurebelastung bzw. die Methylmalonsäurebelastung des Körpers möglichst gering zu halten. Die Lebenserwartung der Patienten konnte dadurch erheblich verbessert werden, doch ist die psychomotorische Entwicklung weiterhin unbefriedigend. Die Patienten sind in ihrer geistigen Entwicklung beeinträchtigt, und Stoffwechsellagen führen zu häufigen Krankenhausaufenthalten.

Im Vergleich zu anderen angeborenen Stoffwechselerkrankungen (Phenylketonurie) gibt es bislang noch keine einfach durchzuführende Stoffwechselüberwachung, die der Therapieoptimierung dient.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Messung von Propionylcarnitin (C_3), anderen Acylcarnitinen (AC) und freiem Carnitin (FC) in auf Filterpapier aufgetropftem Blut mittels Tandemmassenspektrometrie ein geeigneter Parameter für die Überprüfung der diätetischen und medikamentösen Stoffwechsellage darstellt.

Zuerst wurde bei gesunden Probanden erforscht, wie sich die Ernährung, die Tageszeit, körperliche Anstrengung, die Einnahme von L-Carnitin und eine Glukosebelastung auf die Höhe der Acylcarnitinspiegel und des freien Carnitinspiegels im Blut auswirkt. Außerdem wurde untersucht, in welchen Blutbestandteilen und dort in welchen Konzentrationen das freie Carnitine und die Acylcarnitine enthalten sind.

Anschließend wurde bei neun Patienten mit MMA und fünf Patienten mit PPA über einen Zeitraum von acht Monaten in ein- bzw. zweiwöchigem Abstand FC sowie AC im Blut mit Hilfe der Tandemmassenspektrometrie quantitativ bestimmt und der Quotient Propionylcarnitin/ Palmitoylcarnitin (C_3/ C_{16}) berechnet. Der klinische Zustand wurde gleichzeitig mittels telefonischer Evaluation abgeschätzt und durch ein Scoresys-

tem dargestellt. Alle Patienten waren diätetisch behandelt und mit Carnitin substituiert. Der Acylcarnitinquotient C_3/ C_{16} wurde dem klinischen Zustand gegenüber gestellt.

Ergebnisse:

Bei den Messungen der AC an gesunden Probanden zeigte sich, dass die Konzentration des freien Carnitins im Trockenblut unter einer Carnitingabe ansteigt. Im Verlauf eines Tages sind die Spiegel hingegen konstant. Unter körperlicher Belastung fallen die freien Carnitinspiegel ab. Die Acetylcarnitinkonzentration (C_2) war nach einer Carnitingabe leicht erhöht, nach körperlicher Belastung stark erhöht. Die Propionylcarnitinkonzentration (C_3) war nach körperlicher Belastung stark erhöht. Unter den anderen Bedingungen war kaum eine Veränderung zu beobachten.

Die Konzentrationen der langkettigen Acylcarnitine (C_{16} , C_{18} , $C_{18:1}$) sind nach körperlicher Belastung und Glukosegabe erniedrigt, ansonsten relativ konstant.

Bei der Bestimmung des FC und der AC im kapillaren und venösen Trockenblut zeigte sich, dass das FC wie auch alle AC im venösen Trockenblut deutlich niedrigere Konzentrationen aufwiesen.

Es zeigte sich, dass FC sowie Acetylcarnitin (C_2) ungefähr zu gleichen Teilen im Serum wie in den zellulären Blutbestandteilen enthalten sind. Alle anderen AC sind meist zu über 90 % in den zellulären Blutbestandteilen enthalten.

Innerhalb der achtmonatigen Patientenstudie lag bei keinem der Patienten ein Carnitinnmangel vor (Mittelwert: FC: 68 $\mu\text{mol/l}$). Die mittleren Quotienten C_3/ C_{16} der Patienten mit PPA lagen zwischen 11,5 und 27,2, mit MMA zwischen 12,1 und 29,4 (Vergleichskonzentrationen Probanden: 1,5 +/- 0,5; n=23). Meist ging ein niedriger Score, der durch das telefonische Interview erfragt wurde, mit einem deutlich niedrigeren Quotienten einher. Bei einem höheren Score war der C_3/ C_{16} Quotient z.T. bis auf das fünffache erhöht, Krankenhausaufenthalte waren häufiger.

Patienten mit stabiler Stoffwechseleinstellung zeigten deutlich niedrigere Quotienten mit einer geringeren Fluktuation. Bei drei Patienten bewirkte eine Therapieverbesserung sowohl eine Verbesserung des klinischen Zustandes wie auch eine Verringerung des C_3/ C_{16} -Quotienten.

Bis auf eine Ausnahme war die Compliance der Eltern gut. Der Versand der Proben über den Postweg und die Analyse im Labor erwiesen sich als problemlos. Das struktu-

rierte Telefoninterview wurde von den Eltern gut akzeptiert und teilweise als Erleichterung in der Bewältigung des Alltags empfunden.

Diskussion:

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit dem Quotienten C_3/ C_{16} bei Patienten mit einer PPA oder MMA die langfristige Stoffwechseleinstellung überprüft werden kann. Dies konnte zum einen durch die achtmonatige Untersuchung an 14 Patienten gezeigt werden sowie durch die Beobachtung von drei Patienten, die nach einer Therapieoptimierung auch einen niederen C_3/ C_{16} -Acylcarnitinquotienten aufwiesen. Auch lässt die Fluktuation wie auch die Höhe des C_3/ C_{16} -Quotienten Rückschlüsse auf die Schwere des klinischen Ausprägungsgrades zu.

Anhand der bei gesunden Probanden gemessenen Acylcarnitinkonzentrationen konnte gezeigt werden, dass der C_{16} -Wert, der in dem Quotienten als Bezugswert für das C_3 dient, auch unter vielfältigen Einflüssen nur geringe Schwankungen zeigt und somit ein geeigneter Bezugsparameter ist.

Der Quotient C_3/ C_{16} ist in der Lage, zwei für die Einstellung der Patienten wichtige Aspekte wiederzugeben:

Durch einem erhöhten C_3 -Wert zeigt sich eine vermehrte Belastung des Körpers mit Propionsäure. Ein niedriger C_{16} -Wert weist auf eine schlechte Energiebilanz im Körper hin. Unter beiden Bedingungen ist eine erhöhte Neigung zu Stoffwechselentgleisungen der PPA- und MMA-Patienten anzunehmen. Daher ist der C_3/ C_{16} -Quotient für das Therapiemonitoring gut geeignet.

Zur Diagnosestellung im Neugeborenenenscreening einer PPA und MMA sollte auf Grund des dort bestehenden Carnitinmangels der Quotient C_3/ FC weiterhin verwendet werden, da anzunehmen ist, dass der C_3/ C_{16} -Quotient hierbei weniger aussagekräftig ist.

Allerdings ist es durch diese Methode nicht möglich, eine Vorhersage über eine mögliche Entgleisung zu machen, da der C_3/ C_{16} -Acylcarnitinquotient erst während der Entgleisung ansteigt. Akute therapeutische Entscheidungen sollten deshalb weiterhin von klinischen Parametern abhängig sein.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Adlouni, H. A, Katrib K, Ferard G. (1988)
Changes in carnitine in polymorphonuclear leukocytes, mononuclear cells, and plasma from patients with inflammatory disorders
Clin Chem, 34, 40-43
- 2 Alam, N., Saggerson, E. D. (1998)
Malonyl-CoA and the regulation of fatty acid oxidation in soleus muscle
Biochem. J, 334, 233-241
- 3 Al Essa, M., Rahbeeni, Z., Jumaah, S., Joshi, S., Al Jishi, E., Rashed, M. S., Al Amoudi, M., Ozand, P. T.(1998)
Infectious complications of propionic acidemia in Saudia Arabia
Clin Genet 54, 90-94
- 4 Ashton, D. S., Bedell, C. R., Green, B. N., Oliver, R. W. A. (1994)
Rapid validation of molecular structures of biological samples by electrospray-mass-spectrometry
FEBS Lett, 342, 1-6
- 5 Bach, A. C, Schirardin, H., Sihr, M.O., Storck, D. (1983)
Free and total carnitine in human serum after oral ingestion of L-carnitine
Diabete Metab 9, 121-124
- 6 Bachmann, C.
Klinisch-chemische Analytik von Carnitin und Referenzwerte im Plasma, 61-63
in Gitzelmann, R., Baerlocher, K., Steinmann, B.:Carnitin in der Medizin
1. Aufl., Schattauer, Stuttgart, New York
- 7 Balogh, D., Hackl, J. M., Legenstein, E., Musil, H. E. (1986)
Erfahrungen mit L-Carnitin in der Postaggressionsphase
Infusionstherapie 13, 204-208
- 8 Barshop, B. A., Yoshida, I., Sweetman, L., Wolff, J. A., Sweetman, F. R., Smith, M., Nyhan, W. L. (1989)
Metabolism of 1-¹³C- Propionate in Vivo in Patients with Disorders of Propionate Metabolism
Pediatr Res, 26, 63-66
- 9 Bauer, C. (1994)
Blut ein flüssiges Organsystem 183-210
in Klinker, R., Silbernagel, S.: Lehrbuch der Physiologie
1. Aufl., Georg Thieme Verlag , Stuttgart, New York
- 10 Baumgartner, E. R., Viardot, C. (1995)
Long-term follow-up of 77 patients with isolated methylmalonic acidemia
J. Inher. Metab. Dis, 18, 138-142

- 11 Behbehani, A. M., Lehnert, W., Langenbeck, U., Luthe, H., Baumgartner, R. (1984)
Propionazidämie mit Myelinisierungsstörungen im ZNS
Klin. Pädiat, 196, 106-110
- 12 Bender, C., Büchler, A., Baumgartner, R., Konecki, D. S., Trefz, F.K.(1993)
Methylmalonic acidemia: haplotype analysis of the methylmalonyl-CoA-mutase
gene in Europe
Eur J Pediatr, 153, 468
- 13 Böhles, H. (1986)
Wann ist eine parenterale Carnitingabe indiziert?
Beitr-Infusionsther-Klin-Ernähr,13, 83-99
- 14 Böhles, H. (1986)
Carnitin in der Ernährungstherapie
Beitr-Infusionsther-Klin-Ernähr, 16, 148-156
- 15 Böhles, H. (1985)
Carnitin-Biochemie und Klinik
Infusionsther-Klin-Ernähr, 12, 60-69
- 16 Böhles, H., Demirkol, M., Sewell, A. C.(1996)
The influence of a severe burn injury on the distribution of carnitine between blood
cells
Burns, 22, 166-167
- 17 Böhles, H., Evangelidou, A., Bervoets, K., Eckert, I., Sewell, A. (1994)
Carnitine esters in metabolic disease
Eur J Pediatr, 153, 57-61
- 18 Böhles, H., Lehnert, W. (1984)
The effect of intravenous L-carnitine on propionic acid excretion in acute propionic
acidemia
Eur J Pediatr, 143, 61-63
- 19 Bøhmer, T. (1967)
Tissue levels of activated fatty acids (acylcarnitines) and the regulation of fatty acid
metabolism
Biochim. Biophys. Acta, 144, 259-270
- 20 Borum, P. R., (1987)
Plasma carnitine compartment and red blood cell carnitine compartment of healthy
adults
Am J Clin Nutr, 46, 437-441
- 21 Brass, E. P.(2000)
Supplemental carnitine and exercise
Am J Clin Nutr; 72, 618S-623S

- 22 Burns, S. P., Iles, R. A., Saudubray, J. -M., Chalmers, R. A. (1996)
Propionylcarnitine excretion is not affected by metronidazol administration to patients with disorders of propionate metabolism
Eur J Pediatr, 155, 31-35

- 23 Chang, C., Hsiao, K.-J., Lee, Y.-M., Lin, C.-M.(1999)
Towards metabolic sink therapy for mut metabolic acidemia: Correction of methylmalonyl-CoA mutase deficiency in T lymphocytes from a mut methylmalonic acidemia child by retroviral-mediated gene transfer
J.Inher. Metab. Dis, 22, 773-787

- 24 Chang, C., Hsiao, K.-J., Lee, Y.-M., Lin, C.-M.(1999)
Towards metabolic sink therapy for mut metabolic acidemia: Retrovirus-mediated transfer of the human methylmalonyl-CoA mutase cDNA into peripheral blood progenitor cells of a child with mut methylmalonic acidemia
J.Inher. Metab. Dis, 22, 951-952

- 25 Chen, W., Huang, Y. C., Shultz, T. D., Mitchell, M. E.(1998)
Urinary, plasma, and erythrocyte carnitine concentrations during transition to a lactoovovegetarian diet with vitamin B-6 depletion and repletion in young adult women
Am J Clin Nutr, 67, 221-230

- 26 Childs, B., Nyhan, W. L., Borden, M., Bard, L., Cooke, R. E. (1961)
Idiopathic hyperglycinemia and hyperglycinuria: a new disorder of amino acid metabolism
J Pediatr, 27, 522-538

- 27 Çoker, M., de Klerk, J.B.C., Poll-The, B.T., Huijmans, J.G.M., Duran, M.(1996)
Plasma total odd-chain fatty acids in the monitoring of disorders of propionate, methylmalonate and biotin metabolism
J.Inher. Metab. Dis, 19, 743-751

- 28 Colombani P., Wenk C., Kunz, I., Krahenbühl, S., Kuhnt, M., Arnold, M., Frey-Rindova, P., Frey, W., Langhans, W. (1996)
Effects of L-carnitine supplementation on physical performance and energy metabolism of endurance-trained athletes: a double-blind crossover field study.
Eur J Appl Physiol Occup Physiol; 73, 434-439

- 29 Cooper, M. B., Forte, C. A., Jones, D. A. (1988)
Carnitine and acetylcarnitine in red blood cells
Biochim Biophys Acta 25, 100-105

- 30 Costa, C. C. G., Tavares de Almeida, I., Jakobs, C., Poll-The, B. T, Duran, M. (1999)
Dynamic Changes of Plasma Acylcarnitine Levels Induced by Fasting and Sunflower Oil Challenge Test in Children
Pediatr. Res, 46; 440-444

- 31 Das, A. M. (1997)
Reversible dysregulation of the mitochondrial ATP synthase in skin fibroblasts from children with vitamin B₁₂-dependent methylmalonic acidemia
J. Inher. Metab. Dis, 20, 375-378
- 32 Daae, L. N, Halvorsen, S, Mathisen, P. M, Mironska, K. (1988)
A comparison between haematological parameters in 'capillary' and venous blood from healthy adults.
Scand J Clin Lab Invest; 48, 723-726
- 33 Delolme, F., Vianey- Saban, C., Guffon, N., Favre-Bonvin, J., Guibaud, P., Becchi, M., Mathieu, M., Divry, P. (1997)
Études des acylcarnitines plasmatiques par spectrométrie de masse en tandem. Application au diagnostic des maladies héréditaires du métabolisme
Arch Pédiatr, 4, 819-26
- 34 Demirkol, M., Sewell, A. C., Böhles, H. (1994)
The variation of carnitine content in human blood cells during disease- a study in bacterial infection and inflammatory bowel disease
Eur J Pediatr, 153, 565-568
- 35 De Palo, E., Gatti, R., Crivellaro, C., De Palo, C., Scandellari, C. (1987)
Plasma carnitine and acetyl-carnitine levels at different times of the day
Clin Physiol Biochem, 5, 95-102
- 36 Deufel, T.
Klinisch Biochemische Untersuchung zum Carnitinstoffwechsel des Menschen und zur Diagnostik von Carnitinmangel-Syndromen
Med. Dissertation, Universität München
- 37 DGE, ÖGE, D.A.CH, Schweizerische Vereinigung für Ernährung (2000)
Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr
1.Aufl., Umschau-Braus GmbH Verlagsgesellschaft Frankfurt am Main
- 38 Di Donato, S. (1987)
Carnitine Deficiencies in Man, 91-100
in Gitzelmann, R., Baerlocher, K., Steinmann, B.: Carnitin in der Medizin
1.Aufl., Schattauer, Stuttgart; New York
- 39 Di Donato, S., Rimoldi, M., Garavaglia, B., Uziel, G. (1984)
Propionylcarnitine excretion in propionic and methylmalonic acidurias: a cause of carnitine deficiency
Clin. Chim. Acta, 139, 13-21
- 40 Duran, M., Dorland, L., Wadman, S. K., Berger, R. (1994)
Group test for selective screening of inborn errors of metabolism
Eur J Pediatr, 153, 27-32

- 41 Duran, M., Gompertz, D., Bruinvis, L., Ketting, D., Wadman, S. K. (1978)
The variability of metabolite excretion in Propionicacidaemia
Clinica Chimica Acta, 82, 93-99
- 42 Duran, M., Ketting, D., Beckeringh, T. E., Leupold, D., Wadman, S. K. (1986)
Direct Identification of Propionylcarnitine in Propionic Acidaemia: Biochemical and Clinical Results of Oral Carnitine Supplementation
J. Inher. Metab. Dis, 9, 202-207
- 43 Faergeman, N. J., Knudsen, J. (1997)
Role of long chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signaling
Biochem. J, 323, 1-12
- 44 Garçia, A., Barbas, C., Aguilar, R., Castro, M. (1998)
Capillary electrophoresis for rapid profiling of organic acidurias
Clin Chem, 44, 1905-1911
- 45 Gatti, R., De Palo, C. B, Spinella, P., De Palo, E. F. (1998)
Free carnitine and acetylcarnitine plasma levels and their relationship with body muscular mass in athletes
Amino Acids, 14, 361-369
- 46 Gille C.
Die Erythrozyteninvasion von Bartonella tribocorum
Med. Dissertation, Universität Tübingen
- 47 Giovannini, M., Agostoni, C., Salari P. C. (1991)
Is Carnitine Essential in Children?
J Int Med Res, 19, 88-102
- 48 Göggerle, M. (1999)
Bestimmung von Acylcarnitinen und Aminosäuren aus Trockenblut und Urin mit der Tandem-Massen-Spektrometrie
Diplomarbeit, Fachhochschule Reutlingen
- 49 Gortner, L., Leupold, D., Pohland, F., Bartmann, P.(1989)
Peritoneal Dialysis in the Treatment of Metabolic Crisis Caused by Inherited Disorders of Organic and Amino Acid Metabolism
Acta Pædiatr Scan, 78, 706-711
- 50 Gross, C. J., Savaiano, D. A. (1993)
Effect of developmental and nutritional state on the uptake, metabolism and release of free and acetyl-L-carnitine by the rodent small intestine
Biochim Biophys Acta, 1170, 265-274

- 51 Gudjonsson, H., Li, B. U. K., Shug, A. L., Olsen, W. A. (1985)
In Vivo Studies of Intestinal Carnitine Absorption in Rats
Gastroenterology, 88, 1880-1886
- 52 Gulewitsch, W., Krimberg, R.(1905)
Kenntnis der Extraktionsstoffe der Muskeln. 2. Mitteilungen über das Carnitin
Z. Physiol. Chem, 45, 326-330
- 53 Güneral, F. (1995)
Serum and urine total, free and acylcarnitine levels related to age: assessment of renal handling of carnitine.
Turk J Pediatr, 37, 217-222
- 54 Gürtler, A.-K., Löster, H. (1996)
Carnitin und seine Bedeutung bei der Pathogenese und Therapie der Herz- und Kreislauferkrankungen
1. Auflage Ponte Press Verlags GmbH, Bochum
- 55 Halperin, M. L., Schiller, C. M., Fritz I. B. (1971)
The inhibition by methylmalonic acid of malate transport by the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. A possible explantation for hypoglycemia in methylmalonic aciduria.
J Clin Invest, 50(11):2276-82
- 56 Hamilton, J. W., Li, B. U. K.,Shug, A. L., Olsen, W. A. (1986)
Carnitine Transport in Human Intestinal Biopsy Specimens
Gastroenterology, 91, 10-16
- 57 Harms, Grüters, Jorch, Machill, Muche, Przyrembel, Rauterberg, Roscher (1997)
Richtlinien zur Organisation und Durchführung des Neugeborenen Screenings auf angeborene Stoffwechselstörungen und Endokrinopathien in Deutschland
Monatsschr Kinderheilkd, 7, 770-772
- 58 Harper, P., Waldsröm, C., Cederblad, G. (1993)
Carnitine Measurement in Liver, Muscle Tissue, and Blood in Normal Subjects
Clin. Chem, 39, 592-599
- 59 Harper, P., Elwin, C. E., Cederblad, G. (1988)
Pharmacokinetics of Intravenous and Oral Bolus Doses of L-Carnitine in Healthy Subjects
Eur J Clin Pharmacol, 35, 555-562
- 60 Hiatt, W. R., Regensteiner, J. G., Wolfel, E. E., Ruff, L., Brass, E. P. (1989)
Carnitine and Acylcarnitine Metabolism during Exercise in Humans
J. Clin. Invest, 84, 1167-1173

- 61 Hoffmann, G. F., Prietsch, v. Kries, R. (1999)
Verwendung der Tandem-Massenspektrometrie (TMS) für das Neugeborenen-Screening
Monatsschr. Kinderheilkd; 3, 310-311
- 62 Hommes, F. A., Kuipers, J. R. G., Elema, J. D., Jansen, J. F., Jonix, J. H. P.(1968)
Propionic acidemia, a new inborn error of metabolism
Pediatr Res, 2, 519- 524
- 63 Hoppel, C. L., Genuth, S. M (1980)
Carnitine metabolism in normal-weight and obese human subjects during fasting
Am J Physiol, 238, E 409-415
- 64 Hutber, C. A, Rasmussen, B. B, Winder, W. W. (1997)
Endurance training attenuates the decrease in skeletal muscle malonyl-CoA with exercise.
J Appl Physiol, 83, 1917-1922.
- 65 Hutler, M., Beneke, R., Boning, D. (2000)
Determination of circulating hemoglobin mass and related quantities by using capillary blood.
Med Sci Sports Exerc, 32, 1024-7
- 66 Johnson, A. W., Mills, K., Clayton, P. T. (1996)
The use of electrospray ionization tandem MS for the diagnosis of inborn errors of metabolism from dried blood spots
Biochem Soc Trans, 24, 932-938
- 67 Johnson, D. W. (1999)
Inaccurate measurement of free carnitine by the electrospray tandem mass spectrometry screening method for blood spots
J. Inher. Metab. Dis, 22, 201-202
- 68 Katrib, K., Adlouni, H. A., Ferard, G. (1987)
Presence of nonesterified and acylcarnitine in human polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells
Clin Chem, 33, 533-535
- 69 Katrib, K., Adlouni, H. A., Ferard, G. (1987)
Carnitine in human polymorphonuclear leukocytes, mononuclear cells, and platelets.
Am J Clin Nutr, 46, 734-5
- 70 Kuhara, T., Matsumoto, M., Inoue, Y., Ohkura, Takashi, Aoyama, T., Matsuo, M., Matsumoto, I.(1989)
Urinary Acid Profiles in Asymptomatic and Symptomatic Siblings with Propionyl CoA Carboxylase Deficiency
J. Clin. Biochem. Nutr, 7, 1-7

- 71 Kodama, S., Sugiura, M., Nakao, H., Kobayashi, K., Mioshi, M., Yoshii, K., Komatsu, M., Sakurai, T. (1991)
H-NMR Studies of Urine in Propionic Acidemia and Methylmalonic Acidemia
Acta Paediatr Jpn, 33, 139-145
- 72 Kutscher, F.(1905)
Über Liebigs Fleischextrakt. Mitteilung I
Z. Unters. Nahr. Genußm, 10, 528- 537
- 73 Lee, S. C., Tsai, L. Y. (1989)
Blood routine tests in capillary blood compared to those of venous blood
Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi; 5, 471-475
- 74 Lehnert, W., Niederhoff, H. (1984)
Seven years of experience with selective screening for organic acidurias
Eur J Pediatr, 142, 208-210
- 75 Lehnert, W., Sperl, W., Suormala, T., Baumgartner, E. R. (1994)
Propionic acidaemia: clinical, biochemical and therapeutic aspects
Eur J Pediatr, 153, 68-80
- 76 Lennon, D. L., Shrago, E. R., Madden, M., Nagle, F. J., Hanson, P. (1986)
Dietary carnitine intake related to skeletal muscle and plasma carnitine concentration in adult men and women.
Am J Clin Nutr, 43, 234-238
- 77 Leonard, J. V., Daish, P., Naughten, E. R., Bartlett, K.(1984)
The Management and Long Term Outcome of Organic Acidaemias
J. Inher. Metab. Dis, 13-17
- 78 Leonard, J. V. (1997)
Stable isotope studies in propionic and methylmalonic acidaemia
Eur J Pediatr, 156, 67-69
- 79 Leonard, J. V. (1995)
The management and outcome of propionic and methylmalonic acidaemia
J. Inher. Metab. Dis, 18, 430-434
- 80 Liebl, B., Muntau, A.C., Fingerhut, R., Knerr, I., Röschinger, W., Olgemöller, B., Roscher, A. A (2000)
Screening-Handbuch, Fachschrift zum bayrischen Neugeborenen-Screening-Programm
1. Aufl. APS Edition
- 81 Löffler, G., Petrides, P. E.
Biochemie und Pathobiochemie
5. Auflage; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

- 82 Lombard, K. A., Olson, A. L., Nelson, S. E., Rebouche, C. J. (1989)
Carnitine status of lactoovo vegetarians and strict vegetarian adults and children
Am J Clin Nutr, 50, 301-306
- 83 Lottspeicher, F., Zobras, H.(1998)
Massenspektrometrie, 321-368
in: Bioanalytik
1. Aufl., Spektrum, Heidelberg
- 84 Luder , A. S., Yannicelli, Green, C. L.(1989)
Normal Growth and Development with Unrestricted Protein Intake after Severe Infantile Propionic Acidaemia
J. Inher. Metab. Dis, 12, 307-311
- 85 Maccari, F., Hülsmann, W. C. (1989)
(Acyl)Carnitine Distribution between Plasma, Erythrocytes, and Leucocytes in Human Blood
Clin Chem, 35, 711
- 86 Mahnke, P.-F., Weidenbach, H.(1992)
Zur Pathologie und Pathogenese der Propionazidämie
Zentralbl Pathol, 138, 235-239
- 87 Marwah, A., Ramji, S.(1997)
Propionic Acidemia in the Newborn
Indian- Pediatr, 34,639-641
- 88 Matern, D., Seydewitz, H. H., Lehnert, W., Niederhoff, H., Leititis J. U., Brandis, M. (1996)
Primary treatment of propionic acidemia complicated by acute thiamine deficiency
J- Pediatr, 129, 758-760
- 89 Matsuda, K., Yuasa, H., Watanabe, J. (1998)
Fractional absorption of L-carnitine after oral administration in rats: evaluation of absorption site and dose dependency
Biol Pharm Bull, 21, 752-755
- 90 Meier, J.(1997)
D-Carnitin, harmlos?, 101-104
in Gitzelmann, R., Baerlocher, K., Steinmann, B.:Carnitin in der Medizin
1.Aufl., Schattauer, Stuttgart; New York
- 91 Mc Lafferty, F. W. (1981)
Tandem Mass Spectrometry
Science, 214, 280-287

- 92 Mc Cloud, E., Ma, T. Y., Grant, K. E., Mathis, R. K., Said, H. M. (1986)
Uptake of L-Carnitine by a Human Intestinal Epithelial Cell Line, Caco-2
Gastroenterology, 111, 1534-1540
- 93 Montgomery, J. A., Mamer, O. A. (1989)
Measurement of Urinary Free and Acylcarnitines: Quantitative Acylcarnitine Profiling
in Normal Humans and in Several Patients with Metabolic Errors
Anal Chem, 176, 85-95
- 94 Morris, S. S., Ruel, M. T., Cohen, R. J., Dewey, K. G., de la Brière B., Hassan, M.
N. (1999)
Precision, accuracy, and reliability of hemoglobin assessment with use of capillary
blood
Am J Clin Nutr, 69; 1243-1248
- 95 Ney, D., Bay, C., Saudubray, J.-M., Kelts, D. G., Kulovich, S., Sweetman, L., Ny-
han, W. L. (1985)
An Evaluation of Protein Requirements in Methylmalonic Acidemia
J. Inher. Metab. Dis, 8, 132- 142
- 96 Nyhan, W.L., Ozand, P.T. (1998)
Propionic Acidemia 4-11
Atlas of Metabolic Diseases
1. Aufl., Chapman and Hall Medical, London, New York, Melbourne, Madras
- 97 Nyhan, W.L., Ozand, P.T. (1998)
Methylmalonic Acidemia 13-21
Atlas of Metabolic Diseases
1. Aufl., Chapman and Hall Medical, London, New York, Melbourne, Madras
- 98 Nicolaides, P., Leonard, J., Surtees, R. (1998)
Neurological outcome of methylmalonic acidemia
Arch Dis Child, 78, 508-12
- 99 North, K. N., Korson, M. S., Gopal, Y. R., Rohr, F. J., Brazelton, T. B. (1995)
Neonatal-onset propionic acidemia: Neurologic and development profiles, and im-
plication for management
J- Pediatr, 126, 916-922
- 100 Nuesch, R, Rossetto, M., Martina, B. (1999)
Plasma and urine carnitine concentrations in well-trained athletes at rest and after
exercise. Influence of L-carnitine intake.
Drugs Exp Clin Res; 25, 167-71.
- 101 Oberholzer, V. G., Levin, B., Burgess, E. A, Young, W. F (1967)
Methylmalonic aciduria. An inborn error of metabolism leading to chronic meta-
bolic acidosis.
Arch Dis Child, 42,492-504

- 102 Ogier de Baulny, H., Saudubray, J.-M.
Branched-Chain Organic Acidurias
in: Fernandes, J., Saudubray, J.-M., van den Berghe, G.: Inborn Metabolic Diseases
3. Aufl., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- 103 Ohashi, R., Tamai, I., Yabuuchi, H., Nezu, J.-I., Oku, A., Sai, Y., Shimane, M.,
Tsuji, A. (1999)
Na⁺-Dependent carnitine transporter by organic cation transporter (OCTN2): its
pharmacological and toxicological relevance
J Pharmacol Exp Ther, 291, 778-84
- 104 Paulussen R. J., van der Logt, C. P, Veerkamp, J. H. (1988)
Characterization and binding properties of fatty acid-binding proteins from human,
pig, and rat heart.
Arch Biochem Biophys, 264, 533-45
- 105 Penn, D., Schmidt, H., Otten, A., Schmidt-Sommerfeld, E. (1986)
Carnitin in der Behandlung der Methylmalonazidurie
Monatsschr Kinderheilkd., 134 (10),758-761
- 106 Platell, C., Kong, S. E., Mc Cauley, R., Hall, J. C. (2000)
Branched-chain amino acids.
J Gastroenterol Hepatol, 15, 706-17
- 107 Raby, R.B., Ward, J.C., Herrod, H.G.
Propionic acidaemia and immunodeficiency
J. Inher. Metab. Dis, 17, 250-251
- 108 Rashed, M. S., Ozand, P. T., Bucknall, M. P., Little, D.(1995)
Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism from Blood Spots by Acylcarnitines and
Amino Acids Profiling Using Automated Electrospray Tandem Mass Spektrometrie
Pediatr. Res, 38, 324-31
- 109 Rached, M. S., Bucknall, M. P., Little, D., Awad, A., Jacob, M., Alamoudi, M.,
Alwatter, M., Ozand, P. T.(1997)
Screening blood spots for inborn errors of metabolism by elektro spray tandem mass
spectrometry with a microplate batch process and a computer alogarithm for auto-
mated flagging of abnormal profiles
Clin Chem, 43, 1129-41
- 110 Rebuzzi, A. G, Schiavoni, G., Lanza, G. A., Amico, C., Natale, A., Lucente, M.,
manzoli, U. (1989)
Rhythm of carnitine levels in serum and urine of normal subjects
Drugs Exp Clin Res, 15, 43-46
- 111 Reichmann, H., von Lindeneiner, N. (1994)
Carnitine Analysis in Normal Human Red Blood Cells, Plasma, and Muscle Tissue
Eur Neurol, 34, 40-43

- 112 Reyes de los, B., Navarro, J. A., Perez- García, R., Liras, A., Campos, Y., Bornstein, B., Arenas, J. (1998)
Effects of L-carnitine on erythrocyte acyl-CoA, free CoA, and glycerophospholipid acyltransferase in uremia
Am J Clin Nutr; 67; 386-390
- 113 Rizza, V., Lorefice, R., Rizza, N., Calabrese, V. S.63-80
Pharmacokinetics of L-carnitine in human subjects
In: L- Carnitine and its role in medicine: From function to therapy, Ferrari, R., Di-Mauro, S., Sherwood, G.
1. Auflage Academic Press, London , San Diego , New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto
- 114 Roe, Ch. R., Millington, D. S., Maltby, D. A., Bohan, T. P. (1984)
L-Carnitine Enhances Excretion of Propionyl Coenzym A As Propionylcarnitine in Propionic Acidemia
J. Clin. Invest, 73, 1785-1788
- 115 Roe, C. R., Hoppel, C. L., Stacey, T. E., Chalmers, R. A., Tracey, B. M., Millington, D. S.(1983)
Metabolic response to carnitine in methabolic aciduria
Arch Dis Child, 58, 916-20
- 116 Rolinski, B., Liebl, B., Fingerhut, R., Arnecke, R., Olgemöller, B., Roscher, A. (1999)
Neugeborenen- Screening- Neue Wege
Hauner Journal, Juli, 16-19
- 117 Rößle, C.
Untersuchungen zur Physiologie und Pathophysiologie des Carnitinstoffwechsels. Einsatz einer modifizierten radiochemisch- enzymatischen Methode zur Carnitin-Bestimmung
Nat. Dissertation, Universität Hohenheim
- 118 Rotzsch, W. (1996)
Carnitine: historical overview
in: Seim, H., Löster, H.: Carnitine- Pathobiochemical Basics and Clinical Applications;
1. Aufl., Ponte Press, Bochum
- 119 Rousson, R., Guibaud, P.(1984)
Long Term Outcome of Organic Acidurias: Survey of 105 French Cases (1967-1983)
J. Inher. Metab. Dis, 1, 10-12
- 120 Sander, J., Janzen, N., Sander, S., Melchiors, U., Steuerwald, U. (2000)
Tandemmassenspektrometrie
Monatsschr. Kinderheilkd, 148, 771-777

- 121 Schickling, H., Sander, J. (1994)
Neugeborenen- Screening
Kinderkrankenschwester, 13, 230-233
- 122 Schmitt- Sommerfeld, E., Penn, D.(1996)
Carnitine deficiency in infants and children: metabolic effects of L-carnitine supplementation
in: Seim, H., Löster, H.: Carnitine- Pathobiochemical Basics and Clinical Applications;
1. Aufl., Ponte Press, Bochum
- 123 Schmidt-Sommerfeld, E. (1987)
Carnitin und Ernährung , vor und nach der Geburt
in Gitzelmann, R., Baerlocher, K., Steinmann, B.:Carnitin in der Medizin
1. Aufl., Schattauer, Stuttgart; New York
- 124 Schmidt-Sommerfeld, E., Penn,D. (1986)
Carnitinmangel
Monatsschr Kinderheilkd, 134, 224-231
- 125 Scholte, H. R., Boonmann, A. M. C., Husaarts- Odijk, L. M., Ross, J. D., van Oudheusden, L. J., Pereira, R. R., Wallenburg, H. C. S (1996)
New aspects of the biochemical regulation of the carnitine system and mitochondrial fatty acid oxidation
in: Seim, H., Löster, H.: Carnitine- Pathobiochemical Basics and Clinical Applications;
1. Aufl., Ponte Press, Bochum
- 126 Scholte, H. R., de Jonge, P. C. (1987)
Metabolism, Function and Transport of Carnitine in Health and Disease
in Gitzelmann, R., Baerlocher, K., Steinmann, B.:Carnitin in der Medizin
1.Aufl., Schattauer, Stuttgart; New York
- 127 Scriver, C., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D.(1995)
Disorders of propionat and methylmalonat metabolism 1425-1443, Volume I
The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease
5. Aufl., McGraw Hill GB, New York, St. Louis, San Francisco, Aukland
- 128 Segre, G., Bianchi, E., Corsi, M., D'Iddio, S., Ghirardi, O., Maccari, F.(1988)
Plasma and Urine Pharmacokinetics of Free and Short-chain Carnitine after Administration of Carnitine in Man
Arzneim.-Forsch./ Drug Res, 38, 1830-1834
- 129 Sewell, A. C., Böhles, H. J. (1995)
Acylcarnitines in intermediary metabolism
Eur J Pediatr, 154, 871-877

- 130 Sewell, A. C. (1996)
 Methods of carnitine analysis
 in: Seim, H., Löster, H.: Carnitine- Pathobiochemical Basics and Clinical Applications;
 1. Aufl., Ponte Press, Bochum
- 131 Sewell, A. C., Herwig, J., Böhles, H.(1996)
 A case of familial "benign" methylmalonic aciduria
 J. Inher. Metab. Dis, 19, 696-697
- 132 Sperl, W., Murr, C., Scladal, D., Sass, J. O., Suormala, T., Baumgartner, R.,
 Wendel, U. (2000)
 Odd-numbered long-chain fatty acids in propionic acidaemia
 Eur J Pediatr, 159, 54-58
- 133 Stryer, L. (1994)
 Erzeugung und Speicherung von Stoffwechselenergie 325-541
 In Biochemie
 2. korr, Nachdruck der 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg,
 Berlin, Oxford
- 134 Tan, A. W.; Smith, C. M.; Aogaichi T.; Plaut, G. W. (1975)
 Inhibition of D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase by malonate analoges
 Arch.Biochem.Biophys, 166, 164-173
- 135 Thompson, G. N., Chalmers, R. A. (1990)
 Increased Urinary Metabolite Excretion during Fasting in Disorders of Propionate
 Metabolism
 Pediatr Res, 27, 413-416
- 136 Thompson, G. N., Chalmers, R. A., Walter, J. H., Bresson, J.-L., Lyonnet, S. L.,
 Reed, P. J., Saudubray, J.-M., Leonard, J. V., Halliday, D.(1990)
 The use of metronidazol in management of methylmalonic and propionic acidaemias
 Eur J Pediatr, 149, 792-796
- 137 Thompson, G. N., Walter, J. H., Bresson, J.-L., Bonnefont, J.-P., Saudubray, J.-
 M., Leonard, J. V., Halliday, D.(1990)
 In vivo propionate oxidation as a prognostic indicator in disorders of propionate me-
 tabolism
 Eur J Pediatr, 149, 408-411
- 138 Thompson, G. N., Walter, Leonard, J. V., Halliday, D.(1990)
 In Vivo Enzyme Activity in Inborn Errors of Metabolism
 Metabolism, 39, 799-807

- 139 Tomita, M., Sendju, Y. (1927)
Über die Aminoverbindungen welche die Biuretreaktion zeigen. III. Spaltung der γ - Amino- β -oxybuttersäure in die optisch aktiven Komponenten
Hoppe- Seyler's Z. Physiol. Chem. 169, 263-277
- 140 Ugarte, M., Lopez- Lahoya, J., Garcia, M. L., Benavides, J., Valdivieso, F. (1979)
Possible Explanation for Hyperglycinaemia in Propionic Acidaemia and Methylmalonic Acidaemia: Propionate and Methylmalonate Inhibit Liver and Brain Mitochondrial Glycine Transport
J. Inher. Metab. Dis, 2, 93-96
- 141 Ugarte, M., Perez-Cerda, C., Rodriguez- Pombo, P., Desviat, L. R., Perez, B., Richard, E., Muro, S., Campeau, E., Ohura, T., Gravel, R.A.(1999)
Overview of mutations in the PCCA and PCCB genes causing propionic acidemia
Hum Mut, 14, 275-282
- 142 Valkner, K. J., Bieber, L. L. (1982)
Short-chain acylcarnitines of human blood and urine
Biochem. Med, 28, 197-203
- 143 van der Meer, S. B., Poggi, F., Spada, M., Bonnefont, J. P., Ogier, H., Hubert, P., Depondt, E. (1996)
Clinical outcome and long-term management of 17 patients with propionic acidaemia
Eur J Pediatr, 155, 205-210
- 144 van Gennip, A. H., van Lenthe, H., Abeling, N. G. G. M., Scholten, E. G., van Kuislenburg, A. B. P.(1997)
Inhibition of β -ureidopropionase by propionate may contribute to the neurological complication in patients with propionic acidaemia
J. Inher. Metab. Dis, 20, 379-382
- 145 van Rooyen, J. P. G., Mienie, L. J., Erasmus, E., de Wet, W. J., Duran, M., Wadman, S. K. (1994)
Urinary excretion of homocitric acid and methylhomocitric acid in propionic acidaemia: minor metabolic products of the citrate synthase aldol condensation reaction
Clin. Chim-Acta, 230, 91-99
- 146 Varvogli, L., Repetto, G. M., Waisbren, S. E., Levy, H. L.(2000)
High cognitive outcome in an adolescent with mutant methylmalonic acidemia
Am J Med Genet, 96, 192-195
- 147 Vazques, J. V., Morse, L., Adibi, S. A. (1985)
Effect of Dietary Fat, Carbohydrate, and Protein on Branched-Chain Amino Acid Catabolism during Caloric Restriction
J. Clin. Invest, 76, 737-743

- 148 Vogt, C., Seim, H.
HPLC and capillary electrophoresis in carnitine analysis
in: Seim, H., Löster, H.: Carnitine- Pathobiochemical Basics and Clinical Applications;
1. Aufl., Ponte Press, Bochum
- 149 Vreken, P., Lint van, A. E. M., Bootsma, A. H., Overmars, H., Wanders, R. J. A., Gennip van, A. H. (1999)
Rapid Diagnosis of organic acidemias and fatty-acid oxidation defects by quantitative electrospray tandem-MS acylcarnitine analysis in plasma
In: Quant, Eaton: Current Views of Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis: From Organelles to Point Mutations
Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York
- 150 Vreken, P., Lint van, A. E. M., Bootsma, A. H., Overmars, H., Wanders, R. J. A., Gennip van, A. H. (1999)
Quantitative plasma acylcarnitine analysis using electrospray tandem mass spectrometry for the diagnosis of organic acidemias and fatty acid oxidation defects
J. Inher. Metab. Dis, 22, 302-306
- 151 Vukovich, M. D., Costill, D. L., Fink, W. J. (1994)
Carnitine supplementation: effect on muscle carnitine and glycogen content during exercise.
Med Sci Sports Exerc, 26, 1122-1129
- 152 Wajner, M., Coelho J. C.
Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production
J. Inher. Metab. Dis, 20, 761-768
- 153 Walter, J. H., Leonard, J. V., Thompson, G. N., Halliday, D. (1990)
Parenteral nutrition in propionic acidemia and methylmalonic acidemia
J- Pediatr, 117, 338-339
- 154 Walter, J. H., Thompson, G. N., Leonard, J. V., Bartlett, K., Halliday, D. (1989)
Contribution of amino acid catabolism to propionate production in methylmalonic acidemia
Lancet, 1, 1298-1299
- 155 Wasserstein, M. P., Gaddipati, S., Snyderman, S. E., Eddelman, K., Desnick, R. J., Sansaricq, C. (1999)
Successful pregnancy in severe methylmalonic acidemia
J. Inher. Metab. Dis, 22, 788-794
- 156 Wendel, U. (1987)
Verlust von Carnitin als Acylester
in Gitzelmann, R., Baerlocher, K., Steinmann, B.: Carnitin in der Medizin
1: Aufl., Schattauer, Stuttgart; New York

- 157 Wendel, U. (1989)
Abnormality of odd-numbered long-chain fatty acids in erythrocyte membrane lipids from patients with disorders of propionate metabolism.
Pediatr Res, 25, 147-50
- 158 Wendel, U., Eißler, A., Sperl, W., Schadewaldt, P.(1995)
On the differences between urinary metabolite excretion and odd-numbered fatty acid production in propionic and methylmalonic acidaemias
J.Inher. Metab. Dis, 18, 584-591
- 159 Wendel, U., Zass, R., Leupold, D. (1993)
Contribution of odd-numbered fatty oxidation to propionate production in neonates with methylmalonic and propionic acidaemias
Eur J Pediatr, 152, 1021-1023
- 160 Wolff, J. A., Carroll, J. E., Thuy, L. P., Prodanos, C., Haas, R., Nyhan, W. L.(1986)
Carnitine reduces fasting ketogenesis in patients with disorders of propionate metabolism
The Lancet, 8, 289-291
- 161 Wong, S.-N., Low, L. C-K., Lau, Y.-L., Nicholls, J., Chan, M. Y.-P. (1992)
Immunodeficiency in methylmalonic acidaemia
J.Paediatr. Child Health, 28, 180-183
- 162 Yannicelli, S., Hambridge, K. M., Picciano, M. F. (1992)
Decreased Selenium Intake and Low Plasma Selenium Concentrations Leading to Clinical Symptoms in a Child with Propionic Acidaemia
J. Inher. Metab. Dis, 15, 261-268
- 163 Yoshino, M., Aramaki, S., Yamashita, F., Sato, K., Inoue, Y., Kuhara, T., Matsumoto, I. (1991)
Erythematous skin lesions and partial deficiency of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase in peripheral lymphocytes in a patient with propionic acidaemia
J. Inher. Metab. Dis, 14, 839-840
- 164 Zschocke, J., Hoffmann, F. (1999)
Vademecum Metabolicum
2. Aufl., Schattauer, Stuttgart

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bedanken bei **Herrn Prof. Dr. F. K. Trefz** für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas, seine hervorragende Betreuung, sowie seine Hilfsbereitschaft und Begeisterung, die eine hervorragende Zusammenarbeit ermöglicht haben.

Ebenso möchte ich mich bei **Herrn Dr. H. Korall** bedanken, der mir ermöglicht hat, den experimentellen Teil durchzuführen und mit Rat und Tat immer zur Seite stand.

Einen herzlichen Dank auch an **M. Göggerle**, für seine Hilfsbereitschaft, sowie an alle anderen **Labormitarbeiter des ZfS** und **Krankenschwestern** des Klinikums am Steinenberg Reutlingen die mitgeholfen haben.

Ich bedanke mich beim **Labor des Klinikums am Steinenberg** für die Bestimmung der CK-Werte, sowie beim **Labor der Universitätsklinik Tübingen** für die Hämatokritbestimmung.

Großer Dank gilt auch **Herrn Prof. Dr. H. Böhles**, Universitätsklinik Frankfurt, sowie **Herrn Prof. Dr. S. Krähenbühl**, Universitätsklinik Basel, für die Beratung und Hilfe bei der Auswertung des experimentellen Teiles.

Ein großes Dankeschön auch an **Herrn Prof. Dr. K. Dietz** Institut für Medizinische Biometrie- und **Frau Dr. B. Pietsch- Breitfeld** Institut für Medizinische Informationsverarbeitung für die Hilfe bei der Ausarbeitung der Statistik

Allen **Patienten** und **Eltern** gilt ein großer Dank für ihre Teilnahme und gute Mitarbeit.

Auch möchte ich mich bei **Herrn Dr. M. Holder**, Olgahospital, Stuttgart, **Herrn Dr. H. Reich**, St. Marienhospital, Vechta, **Frau Dr. I. Marquardt**, Elisabethen Krankenhaus, Oldenburg, **Herrn Dr. W. Preis** Bischburg und **Herrn Dr. U. Wendel**, Universitätsklinik Düsseldorf die mich an die Patienten weitervermittelt haben und Informationen zu den Patientenepikrisen gaben bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen **Eltern** bedanken, die mir mein Medizinstudium ermöglicht haben und mich sowohl in der Schulzeit wie auch beim Studium und bei der Dissertation begleitet haben und mir immer zur Seite standen.

Großer Dank gilt auch **T. Decker**, der mir mit seinen Informatikkenntnissen bei den Diagrammen und der Textverarbeitung sehr geholfen hat und der mich auch sonst unterstützt und begleitet hat.

Herzlichen Dank auch an **C. Gille** für seine Motivation, seine Mitarbeit an der Studie 6 und für das Korrekturlesen der Arbeit.

Danken möchte ich auch **A. Anastasakis** für die Urlaubsvertretung bei den Telefoninterviews und **A. Lindlohr** für das Korrekturlesen der Arbeit, sämtlichen **Probanden** für die bereitwillige Mitarbeit und allen **Freunden** für ihre große Unterstützung.

Lebenslauf

Name: Birgit Klupsch

Geburtsdatum: 20. März 1977

Geburtsort: Waiblingen

Eltern: Klaus Gerhard Klupsch, Apotheker
Renate Klupsch, geb. Kriech, Apothekerin

Schulbildung: 1983-87: Besuch der Grundschule Sommerrain in Stuttgart
1987-96: Besuch des Elly-Heuss-Knapp Gymnasiums in Stuttgart
Juni 1996: Abitur

Studium: Okt. 1996: Beginn des Medizinstudiums an der Universität Tübingen
Sept. 1998: Physikum (Tübingen)
März 2000: Erstes Staatsexamen (Tübingen)
März 2002: Zweites Staatsexamen (Tübingen)
7.5. 2003: Drittes Staatsexamen (Tübingen)
Famulaturen in Pädiatrie, Innere Medizin, Dermatologie und Infektionskrankheiten (Edinburgh)
PJ: Innere (Reutlingen), Chirurgie (Sydney, San Francisco), Pädiatrie (Reutlingen)

Dissertation: Nov. 1998: Dissertationsbeginn bei Herrn Prof. Dr. F. K. Trefz im Klinikum am Steinberg Reutlingen (Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen) in Zusammenarbeit mit dem ZfS-Reutlingen (Zentrum für Stoffwechselerkrankungen) unter Leitung von Herrn Dr. H. Korall
Sept. 2000: Vorstellung der Arbeit auf dem VIII International Congress of Inborn Errors of Metabolism in Cambridge
Aug. 2001: Vorstellung der Arbeit auf dem 7th International Congress on Amino Acids and Proteins in Wien