

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-
Universität München
(Direktor: Professor Dr. med. K.-W. Jauch)

Parenterale Aminosäurezufuhr und postoperative Albuminsynthese

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Maximiliane Krick
aus
München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Hugo Hartl

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Markus Rehm
Prof. Dr. Axel Imhof

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 10. April 2008

Meiner Familie
und
meiner Großmutter gewidmet

1. Einleitung	6
2. Fragestellung	9
3. Patientengut und Methodik	10
3.1. Patienten	10
3.2. Versuchsablauf	11
3.3. Abgeleitete Zielgrößen	13
3.4. Beschreibung der angewendeten Methodik zur Bestimmung der Albuminsyntheserate	14
3.4.1. Material	14
3.4.2. Probenaufbereitung	14
3.4.3. Massenspektrometrische Analysen	18
3.5. Berechnungen der fraktionellen Albuminsyntheserate	25
3.6 Messungen der Albuminkonzentration	27
3.7 Bestimmung des Plasmavolumens	28
3.8 Statistik	28
4. Ergebnisse	29
4.1. Albuminanreicherung	29
4.1.1. Albuminanreicherung in der Kontrollgruppe	29
4.1.2. Albuminanreicherung in der in der Gruppe mit Aminosäureinfusion	29
4.2. Anreicherung im Präkusorpool (KIC-Anreicherung)	30
4.2.1. Isotopomerenverhältnisse (M+1/M)	30
4.2.1.1. Isotopomerenverhältnisse in der Kontrollgruppe	30
4.2.1.2. Isotopomerenverhältnisse in der Gruppe mit Aminosäureinfusion	31
4.2.2. KIC Tracer/Tracee-Verhältnisse	32
4.2.2.1. KIC Tracer/Tracee-Verhältnisse in der Kontrollgruppe	32
4.2.2.2. KIC Tracer/Tracee-Verhältnisse in der Gruppe mit Aminosäureinfusion	32
4.3 Fraktionelle Albuminsyntheseraten	33
4.3.1 Fraktionelle Albuminsyntheseraten in der Kontrollgruppe	34
4.3.2 Fraktionelle Albuminsyntheseraten in der Gruppe mit Aminosäureinfusion	34
4.4 Plasmaalbumin-Konzentration	35
4.5. Absolute Albuminsyntheserate	35

5. Diskussion	37
5.1 Methodische Betrachtungen	37
5.2 Allgemeine Bedeutung von Albumin	40
5.3 Postoperative Veränderungen von Albuminkonzentration und -synthese	42
5.4 Regulationsmechanismen der postoperativen Albuminsynthese durch parenterale Substrate	43
5.5 Ursachen für die mangelnde Effizienz parenteraler Aminosäuren	44
6. Zusammenfassung	48
7. Anhang	50
7.1. Tabellen	50
7.2 Verzeichnisse	60
7.2.1. Tabellenverzeichnis	60
7.2.2. Abbildungsverzeichnis	60
7.2.3 Literaturverzeichnis	61
8. Danksagung	74
9. Lebenslauf	75

1. Einleitung

Chirurgische Traumata führen über verschiedene Mechanismen zu Veränderungen in zahlreichen Regelkreisen des Körpers. Nach einer Operation oder einem Trauma reagiert der Körper auf die Verletzung, wobei entsprechende Signale über afferente Nerven, Barorezeptoren und immunologische Mediatoren vermittelt werden. Neben vielen anderen Veränderungen kommt es auch zu metabolischen Reaktionen, die sowohl einzelne Organe wie auch den Substratfluss zwischen ihnen betreffen. Die posttraumatischen Veränderungen im Bereich des Substratstoffwechsels werden unter dem Begriff Postaggressionssyndrom zusammengefasst (43, 44).

Wichtigstes Phänomen des Postaggressionssyndroms ist der Verlust an körpereigener Eiweißmasse. Dieser irreversible Verlust von körpereigener Eiweißsubstanz beruht zum größten Teil auf einem progredienten Verlust von Muskelmasse der bei allen schwer kranken Patienten mit längerem Krankheitsverlauf beobachtet werden kann, und der die Morbidität, Mortalität, Rekonvaleszenz und Rehabilitation negativ beeinflusst (19, 27, 46, 101). Die klinisch so bedeutende Eiweiß-Katabolie resultiert aus einem Missverhältnis zwischen Proteinabbau und Proteinsynthese im Rahmen des Postaggressionssyndroms. Die wissenschaftliche Untersuchung dieser Veränderungen im Eiweiß-Stoffwechsel erfordert dabei eine differenzierte Betrachtung in Abhängigkeit vom präoperativen Ernährungszustand, vom Schweregrad des chirurgischen Traumas, vom zeitlichen Abstand zum Trauma und auch spezifisch vom jeweils betroffenen Organsystem.

Unmittelbar postoperativ besteht eine bestimmte zeitliche Dynamik der metabolischen Veränderungen. Zunächst kommt es für einige Stunden zu einer Akut – oder Ebbephase im Körper. Ein hypodynamer Zustand ist zu beobachten, der durch Hypovolämie, verminderter Kreislauffunktion und reduzierter Stoffwechselaktivität charakterisiert ist. Die anschließende hyperdynamische Fluß-Phase ist durch eine hormonelle und immunologische Überaktivierung mit dem bedeutenden Merkmal der Eiweiß-Katabolie gekennzeichnet. Es kommt gleichzeitig zu erheblichen weiteren Veränderungen des Substratstoffwechsels. Dazu zählen unter anderem die Glukoseverwertungsstörung und Insulinresistenz, Fettstoffwechselstörungen, sowie Veränderungen des Elektrolythaushalts (63). Bei komplikationslosem Verlauf schließt sich

nach ein bis zwei Wochen eine anabole Phase zur Normalisierung der Stoffwechselfvorgänge, zum Eiweiß-Aufbau und zur Rekonvaleszenz an (42, 47).

Neben der Muskulatur ist auch der Eiweiß-Gehalt des Plasmas vom Postaggressionssyndrom betroffen. Hier sind speziell regelhaft Veränderungen der Albumin-Konzentration zu beobachten. Albumin ist eines der wichtigsten Proteine im menschlichen Körper und wird ausschließlich in der Leber gebildet. Mit einer normalen Konzentration von 35-53 g/l (95) ist es das Protein im Plasma mit der höchsten Konzentration. Es trägt zu 75% zur Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks bei, ist eine wichtige intravasale Carriersubstanz für körpereigene Metaboliten und für Arzneimittel, ein Aminosäurespeicher und in geringen Massen auch eine Puffersubstanz, sowie ein Antikoagulant (26, 29, 68, 83). Für die Synthese des Albumins ist eine ausreichende Eiweiß-Zufuhr erforderlich. Zusätzlich spielt das hormonelle Milieu eine wichtige Rolle bei der Regulation der Albumin-Konzentration. Schilddrüsenhormone, Wachstumshormon und Insulin, aber auch der onkotische Druck beeinflussen die Albuminsynthese und können sich in ihrem Effekt addieren oder aufheben. Auch eine Kontrolle der Albuminsynthese durch Steroidhormone wurde beschrieben (24, 62, 84).

Es ist bekannt, dass es nach einem chirurgischen Trauma zu einem raschen Konzentrationsabfall des Albumins kommt. Die Ursachen für diesen Konzentrationsabfall sind bis heute nicht eindeutig geklärt. Diskutiert wird einerseits ein Verlust in den dritten Raum durch eine postoperative Störung der Mikrozirkulation (49, 54, 96), denkbar ist aber andererseits auch eine Einschränkung der hepatischen Albuminsynthese im Rahmen des Postaggressionssyndroms (32, 68). Es steht jedoch fest, dass das Ausmaß dieses Konzentrationsabfalls eng mit der Morbidität der Patienten korreliert und zu lebensbedrohlichen Situationen führen kann.

Bis heute ist jedoch nicht genau bekannt, wie spezielle ernährungsmedizinische Maßnahmen die Hypoalbuminämie im Rahmen des Postaggressionssyndroms beeinflussen. Gerade nach abdominalchirurgischen Eingriffen ist eine natürliche orale/enterale Ernährung wegen des funktionsuntüchtigen Gastrointestinaltrakts oft nur schlecht oder eingeschränkt möglich. Deswegen sind die parenterale Ernährung und die damit verbundenen metabolischen Effekte in dieser Phase von besonderer Wichtigkeit. Ziel der parenteralen Ernährung ist es, den

posttraumatischen Eiweißverlust zu reduzieren und anabole Stoffwechselfvorgänge zu unterstützen. Dabei sind die wichtigsten Substrate die parenteral zugeführten Aminosäuren.

Die heutigen Dosierungsempfehlungen für eine parenterale Aminosäurezufuhr beruhen auf dem Konzept einer maximalen Konservierung des Gesamtkörper-Eiweißbestandes. Die aktuell empfohlene Aminosäuredosis für Patienten im Postaggressionssyndrom beträgt 1.2-1.5 g pro Kilogramm pro Tag (4, 41, 55). Danach wird die parenterale Infusionsmenge im heutigen klinischen Alltag auch gesteuert. Es ist allerdings bis heute unklar, welchen selektiven Einfluss diese Aminosäuren-Dosierung auf den viszeralen Eiweißstoffwechsel hat. Wegen der speziellen metabolischen Bedeutung sind dabei Auswirkungen auf die postoperative Albuminsyntheserate (und damit auf die Normalisierung der Hypoalbuminämie) von besonderer Wichtigkeit.

2. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen untersucht werden:

1. Welchen Einfluss hat eine Leitlinien-gerechte, parenterale Aminosäurezufuhr auf die postoperative Albuminsyntheserate und Albuminkonzentration
2. Werden fraktionelle und absolute Albuminsyntheserate dabei unterschiedlich beeinflusst?

3. Patientengut und Methodik

3.1. Patienten

Es wurden zwei vergleichbare Patientenkollektive postoperativ untersucht (Kontrollpatienten und Patienten mit Aminosäurezufuhr). Zum Vergleich sind die Diagnosen und operativen Eingriffe in Tabelle 1 aufgeführt.

Beide Patientengruppen hatten ein vergleichbares prä- und perioperatives Risikoprofil. Speziell waren das Alter und der präoperative Ernährungszustand (s. Tabelle 5) vergleichbar. Keiner der untersuchten Patienten hatte präoperativ eine positive Anamnese hinsichtlich eines starken Gewichtsverlustes oder einer schweren Mangelernährung. Begleitende Stoffwechselerkrankungen waren durch klinische und laborchemische Untersuchungen ausgeschlossen worden. Patienten mit systemisch entzündlichen Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen wie z.B. Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, wurden nicht in die Studie miteinbezogen. In allen Kollektiven wurden mittels Routinelaborparametern (kleines Blutbild, Thrombozyten, Quick, PTT, CRP) Störungen der Blutgerinnung, sowie infektiöse oder septische postoperative Komplikationen als weitere Kriterien zum Studienausschluss erfasst. In Hinblick auf die Operationszeit, das Ausmaß des Blutverlustes, die insgesamt Infusionsmenge, das Narkoseverfahren, die perioperative Antibiotikagabe und das postoperative Tumorstadium (Dukes B) waren beide Gruppen ebenfalls miteinander vergleichbar. Alle Patienten hatten einen unauffälligen postoperativen Verlauf. Zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen zeigten sie keine Anzeichen einer lokalen oder systemischen Infektion, oder eines Multiorganversagens.

Nach ausführlicher Aufklärung über den Ablauf und die Art der geplanten Untersuchungen gaben alle Patienten ihre freiwillige schriftliche Einwilligung zu der geplanten Studie. Das Studienprotokoll war zuvor als Teil eines größeren DFG-Projektes (Intestinale Proteinsynthese Ha 1439/4-1) durch die örtliche Ethikkommission genehmigt worden (Protokollnummer:134/97)

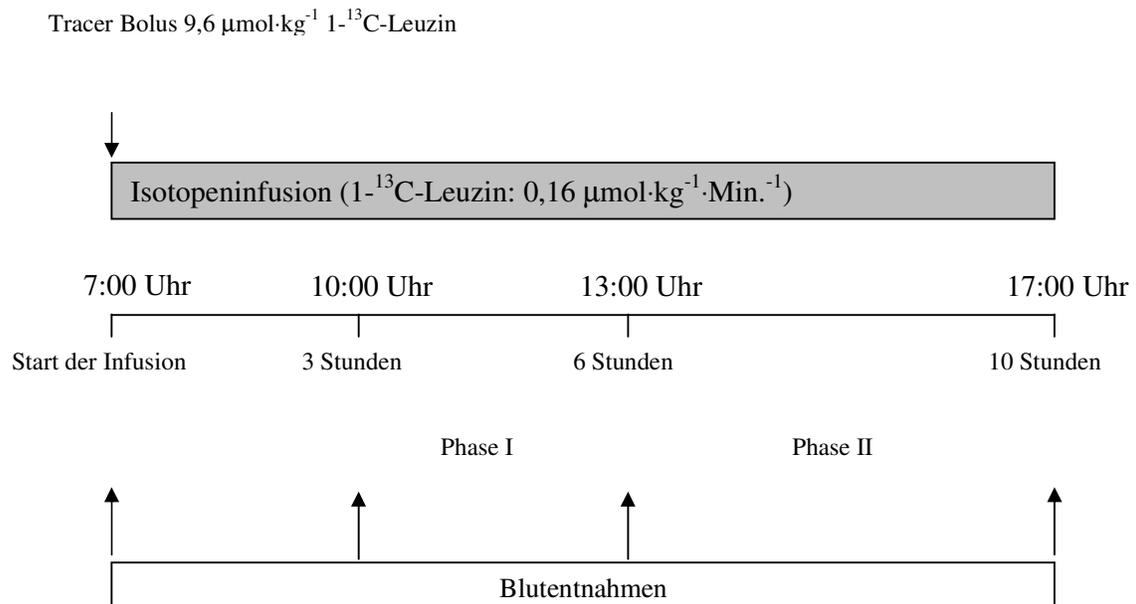
3.2. Versuchsablauf

Alle Patienten wurden während eines regulären postoperativen Aufenthalts in die Studie aufgenommen. Sie erhielten postoperativ eine in der Kalorienzufuhr vergleichbare Ernährung (etwa $15 \text{ kcal}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$ am 1. – 3. postoperativen Tag, an den weiteren Tagen etwa $25 \text{ kcal}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$), von der zwei Drittel enteral (flüssige Kost) und ein Drittel parenteral zugeführt wurden. Wir haben unsere Untersuchungen am 8. – 10. postoperativen Tag durchgeführt, da zu dieser Zeit der Verlust des Gesamtkörperweißes am Größten ist (47, 74).

Im Rahmen des Studienprotokolls befanden sich die untersuchten Individuen ab 22:00 Uhr des Vortags bis zum Ende der Studie am Studientag im nüchternen Zustand, wobei innerhalb dieses Zeitraumes das Trinken von Mineralwasser erlaubt war. Die Untersuchung der Albuminsynthese erfolgte mittels der sog. Stabile-Isotopen-Technik. Am Studientag wurde zunächst um 07:00 morgens ein Bolus von $9,6 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ des verwendeten Tracers injiziert, dann eine kontinuierliche Infusion von $0,16 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Min.}^{-1}$ $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Leuzin (Tracer Technologies, Sommerville, MA, USA; 99,3 atom % enrichment) begonnen. Die Infusionsdauer betrug im Gesamten zehn Stunden (s. Abbildung 1).

Vor Beginn der Isotopeninfusion wurde jedem untersuchten Patienten eine Blutprobe entnommen. Das nach Zentrifugation gewonnene Plasma dieser Probe diente zur Bestimmung der Hintergrundanreicherung im albumingebundenen Leuzin, im freien Plasmaleuzin und in der Plasma - Ketoisocaprinsäure. Anschließend wurden zusätzlich nach 180, 360 und 600 Minuten kontinuierlicher Isotopeninfusion Blutproben zur Bestimmung der Isotopenanreicherung in Albumin und in der Plasma-Ketoisocaprinsäure entnommen. Wir bezeichneten den Zeitraum von 180 Minuten bis 360 Minuten als Phase I und den Zeitraum von 360 Minuten bis 600 Minuten als Phase II.

Abbildung 1: Studienablauf



In der Phase II erhielten die Patienten des Kollektivs mit Aminosäureinfusion eine kontinuierliche Standard - Aminosäureinfusion mit einer Dosis von $0,067 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ($1,6\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$) (Parentamin[®]/Dipeptamin[®], Serag-Wiessner, Naila, Germany und Fresenius-Kabi, Bad Homburg, Germany). Die Patienten des Kontrollkollektivs erhielten in der Phase II eine isotone Natriumchloridinfusion.

3.3. Abgeleitete Zielgrößen

- Berechnung der fraktionellen Albuminsyntheserate (FSR) (97):

$$\text{FSR (\%/Tag)} = \frac{\text{Anstieg der Traceranreicherung im Albumin (Produktanreicherung)}}{\text{Durchschnittliches Tracer-Angebot (Präkursorpoolanreicherung)}}$$

Die Präkursorpoolanreicherung in der Leberzelle sollte idealerweise in der Leberzell-t-RNA bestimmt werden. Aus verschiedenen Publikationen geht jedoch hervor, dass die Bestimmung der Anreicherung in der Plasma-Ketoisocapronsäure (KIC) (dem Leuzin-Abbauprodukt) als Ersatz für die Bestimmung der Anreicherung in der t-RNA der Leberzellen geeignet ist (3, 45, 87).

- Berechnung der absoluten Albuminsyntheserate ASR:

$$\text{ASR (mg / kg Tag)} = (\text{FSR} \times \text{Plasmavolumen} \times \text{Albuminkonzentration}) / \text{kg}$$

3.4. Beschreibung der angewendeten Methodik zur Bestimmung der Albuminsyntheserate

3.4.1. Material

Das verwendete Material ist im Anhang in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt.

3.4.2. Probenaufbereitung

a) Albuminisolierung

Die Proteine der Serumproben (500 µl) wurden durch Zusatz von 500 µl Trichloressigsäure (10%) gefällt und 10 Minuten bei 11000 Umdrehungen pro Minute in einer Zentrifuge für Reaktionsgefäße zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pipette entfernt und vollständig verworfen. Das Sediment wurde in 500 µl absolutem Ethanol suspendiert und erneut 10 Minuten lang bei 11000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die alkoholische Lösung wurde vorsichtig, ohne das Sediment mit zu erfassen, mit einer Pipette gewonnen.

Um den Alkohol zu entfernen, wurden 5 ml destilliertes Wasser und die zuvor gewonnene Probe in einen Centriplus Filter (Zentrifugenfilter mit der Ausschlussgröße 50.000 Dalton) gegeben und bei 5.000 Umdrehungen pro Minute in einer Beckmann-Hochgeschwindigkeitszentrifuge circa 30 Minuten zentrifugiert bis die Flüssigkeit fast vollständig durch den Filter gelaufen war. Das Sediment wurde zurückgewonnen, indem der Filter umgedreht auf ein passendes leeres Gefäß gegeben wurde, 1000 µl Wasser auf der oberen Filterseite (ohne Deckel) zugegeben wurden und bei 1500 Umdrehungen pro Minute in einer Hettich-Laborzentrifuge 15 Minuten zentrifugiert wurde.

Die anschließende präparative Elektrophorese diente der Gewinnung hochreinen Albumins. Eine präparativen SDS-PAGE dient dazu, die Proteine der Größe nach zu trennen. Man kann die gewünschten Proteine nach dem Durchlaufen des gesamten Gels, der Größe nach aufgetrennt, in kleinen Gefäßen auffangen. Die hiermit gewonnenen Proteine können dann mittels einer analytischen Elektrophorese genauer untersucht werden.

Für die präparative Elektrophorese wurde ein zylinderförmiges Gel gegossen. Zunächst wurde die Trenngellösung, bestehend aus Acrylamid (10%), Bisacrylamid (0,3%), Trenngelpuffer (Tris/HCl 0,375 M, pH 8,8), SDS (0,1 %), TEMED (frisch angesetzte 10%ige Lösung.) und Ammoniumpersulfat (frisch angesetzte 10%ige Lösung.), ohne Luftblasen in den Zylinder gefüllt, mit wenig destilliertem Wasser überschichtet und 30 Minuten stehen gelassen bis das Gel polymerisiert war. Anschließend wurde das destillierte Wasser abgegossen und die Sammelgellösung bestehend aus Acrylamid (3%), Bisacrylamid (0,1%), SDS (0,2%) und Sammelgelpuffer (Tris/HCl 0,240 M, pH 6,8), TEMED, Ammoniumpersulfat (jeweils 10%ige Lösungen) auf das polymerisierte Trenngel gegeben, erneut mit destilliertem Wasser überschichtet und wieder stehen gelassen bis auch dieses Gel polymerisiert war (ca. 20 Minuten). Danach wurde das überschüssige Wasser entfernt.

Der Zylinder mit dem Gel wurde in die Apparatur für die präparative Elektrophorese eingebaut und der Elutionspuffer (Phosphatpuffer) und Elektrodenpuffer (Trispuffer) in die entsprechenden Kammern gegeben. Die Serumprobe (750ml) wurde 1:1 mit Probenpuffer (0,02% Bromphenolblau, 0,1 M Tris / HCl pH 6,5, 20% Glycerin, und 4% SDS) verdünnt und mit Hilfe eines kleinen Schlauchs direkt auf das Gel gegeben. Der Elutionspuffer wurde auf eine Fließgeschwindigkeit von 1 ml pro Minute eingestellt. Für die Elektrophorese wurde eine Stromstärke von 40 mA eingestellt bis das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau beide Gele durchlaufen hatte. Danach wurde die Stromstärke auf 80 mA erhöht. Mit diesem Stromgradienten, einer Länge des Trenngels von circa 3 cm und einer Länge des Sammelgels von circa 1 cm konnte eine klare Trennung des Albumins von dem zweiten in der Lösung enthaltenen Protein erreicht werden. Die Erhöhung der Stromstärke verringerte das ausgeprägte Tailing bei der Elution des Albumins. Nach dem Erscheinen des Bromphenolblau wurden 100 Proben von je 1,5 ml - Reaktionsgefäßen aufgefangen.

In einer anschließenden analytischen Elektrophorese wurde jede 5. dieser 100 Proben auf die enthaltenen Proteine untersucht. Das Trenngel, sowie das Sammelgel enthielten dieselbe Zusammensetzung wie bei der präparativen Elektrophorese. Sie wurden vertikal zwischen zwei Glasplatten mit einem abschließenden Kamm (dieser diente der Formung der Geltaschen) aufgetragen. Um eine geeignete Probenmenge auftragen zu können, wurde zuvor der Albumingehalt photometrisch gemessen und die Proben bis zu einen Albumingehalt von ca. 0,5 g/l verdünnt. Anschließend wurde Probenpuffer (Zusammensetzung siehe oben) im Verhältnis 1:1 zugesetzt und 35 µl der Probe in die jeweilige Geltasche gegeben. Als Puffer

wurde der Elektrodenpuffer verwendet. Die Elektrophorese wurde dann bei 50 mA durchgeführt bis das Bromphenolblau das Gel vollständig durchlaufen hatte. Für die Darstellung der Proteine wurden die Gele über Nacht in 0,1% Coomassie R-250, 40% Ethanol, 10% Essigsäure auf einer Schüttelapparatur fixiert und gefärbt und am nächsten Tag mit einer Lösung aus 40% Ethanol und 10% Essigsäure in 20 Minuten wieder entfärbt, so dass die Proteine als blaue Banden auf den Gelen sichtbar wurden (die Anfärbung von Proteinen mit Coomassie beruht auf einer nicht kovalenten Wechselwirkung des Farbstoffes mit Aminosäureresten des Proteins. Um ein Auswaschen der Proteine während der Färbung und Entfärbung zu verhindern, werden diese mit Essigsäure im Gel denaturiert. Die Coomassie-Färbung hat eine geringere Nachweisgrenze als eine Silberfärbung, reichte aber aus, um die Verunreinigung des isolierten Albumins nachzuweisen).

Nur diejenigen Proben, die Albumin enthielten, wurden nun konzentriert. Diese wurden durch einen Centriplus Filter mit der Ausschlussgröße von 50000 Dalton nach und nach filtriert, bis alle albuminhaltenden Proben durch den Filter gelaufen waren. Das Albumin wurde dann wie auch oben für das Sediment beschrieben aus dem Filter gewonnen (umgedreht zurück zentrifugiert). Danach werden die Albuminlösungen in ein Pyrex-Röhrchen gegeben.

Die Proben wurden im Speedvac bei 35°C vollständig getrocknet und danach 48 Stunden mit 6ml Salzsäure (6N) im Ofen bei 110°C hydrolysiert. Anschließend wurden sie erneut im Speedvac getrocknet.

b) Leuzin-Derivatisierung

Zur Analyse des Albumin-gebundenen Leuzins (Messung der Anreicherung) benutzten wir die Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (GC-IRMS), die zwar hochreine Proben erfordert, aber für die niedrigen Anreicherungen, wie sie beim Albumin vorliegen, besonders geeignet ist. Die Aminosäuren wurden verdampfbar gemacht, indem sie in das N-acetyl-n-propyl (NAP) - Derivat übergeführt wurden. Um dieses NAP - Derivat zu erhalten, versetzten wir die Proben mit 1,5 ml wasserfreiem 8N HCl-Propanol und 20 µl 2,2-Dimethoxypropan und erhitzen sie im luftdicht verschlossenen Pyrexröhrchen für 20 Minuten auf 110°C. Dabei wurde die Carbonsäuregruppe propyliert. Nachdem die Proben abgekühlt waren, wurden sie bei 60°C unter Stickstoff getrocknet. Anschließend wurde 1 ml Aceotroplösung auf jede Probe gegeben und der Trocknungsvorgang unter Stickstoff wiederholt, um den Proben den letzten Rest Wasser zu entziehen.

Zur Acetylierung der Aminogruppe wurden die getrockneten Ester mit 1,5 ml eines frisch hergestellten Acetylierungsreagenzes (Aceton, Triethylamin und Essigsäureanhydrid in den Verhältnissen 5:2:1) versetzt und insgesamt 5 Minuten bei 60°C erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurden die Proben erneut bei 45°C unter Stickstoff getrocknet. Die getrockneten Proben wurden mit 1 ml gesättigter Kochsalzlösung und 2 ml Ethylacetat ausgeschüttelt und die organische Phase (obere Phase) abpipettiert. Diese wurde bei Raumtemperatur wieder unter Stickstoff getrocknet. Für die GC-IRMS - Messung wurden die Derivate in Ethylacetat gelöst und 1 µl in den GC injiziert.

c) Ketoisocaprinsäure (KIC)-Derivatisierung

Die KIC-Anreicherung wurde im Serum bestimmt, wobei die Messung der Anreicherung durch ein alternatives massenspektrometrisches Verfahren, der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GCMS), erfolgte. Da bei der GCMS - Messung das ganze KIC - Molekül für die Bestimmung der Isotopenanreicherung verwendet wird, war außer der Eiweißfällung keine zusätzliche Reinigung der Ketoisocaprinsäure notwendig. Um KIC gaschromatographisch trennen zu können, muss die α -Ketocarbonsäure zunächst verdampfbar gemacht werden. Wir benutzten die Methode von Ford, und erzeugten das Quinoxalinoltrimethylsilylderivat (34, 81). Wir bestimmten die Massen 259 und 260.

Zur Herstellung der Derivate wurde zunächst 0,1 ml Serum mit 1.0 ml absolutem Alkohol gefällt. Die Proben wurden zentrifugiert und der Überstand in eine 1,8 ml Glasflasche pipettiert und unter Stickstoff getrocknet. Der getrocknete Rückstand wurde in 0,2 ml Wasser gelöst und mit 0,1 ml einer frisch hergestellten o-Phenylendiamin-Lösung (2% in 4M HCl) eine Stunde lang bei 90°C im Ofen umgesetzt. Die Lösung wurde zweimal nacheinander mit 1 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte wurden über wenig wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und danach wieder unter Stickstoff bei Raumtemperatur getrocknet. Der Rückstand wurde in 0,1 ml Pyridin gelöst und mit 0,1 ml BSTFA+1%TMCS 30 Minuten lang bei 120°C umgesetzt. Die Quinoxalinoltrimethylsilylderivate der Ketosäuren wurden bis zur Messung in dieser Reaktionslösung belassen (Anmerkung: dieses Derivat ist nicht stabil und zerfällt innerhalb eines Jahres vollständig, so dass keine Messung mehr möglich ist).

Kurz vor der gaschromatographischen Messung wurde das überschüssige Reagenz bei Raumtemperatur unter Stickstoff abgedampft und der Rückstand in 50 µl wasserfreiem n-Dekan, welches 5% BSTFA enthält, gelöst. 5 µl dieser Lösung wurden nun in den Gaschromatographen eingespritzt. Die Messung muss direkt nach dem Lösen in Dekan durchgeführt werden, da sich das Derivat in diesem Zustand innerhalb von 10 Stunden schon teilweise zersetzt. Für die Eichgerade verwendeten wir 100 µl Lösungsmittel und injizierten insgesamt 1 µl.

3.4.3. Massenspektrometrische Analysen

- a) Prinzip der Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie
(Methode zur Bestimmung der Leuzin-Anreicherung in Albumin)

Bei der Massenspektrometrie werden Moleküle im Dampfzustand in positive oder negative Ionen überführt, also ionisiert. Diese Ionen sind meist instabil und zerfallen in geladene und ungeladene Bruchstücke, was als Fragmentierung bezeichnet wird. Die geladenen Moleküle werden in einem Magnetfeld oder einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Masse getrennt, genannt Massenfokussierung, und ihre Massen und relativen Intensitäten registriert. Es entsteht für jede Masse ein Strich im Massenspektrum. Diese Linien erscheinen entsprechend ihrer Masse nacheinander im Spektrum und die Länge des Strichs ist proportional zur Menge der Moleküle dieser Masse. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Moleküle zu ionisieren z.B. die Elektronenstoß- Ionisation oder die chemische Ionisation. Wir haben die Elektronenstoß-Ionisation angewendet.

Bei diesem Verfahren kommt es meist zu einer starken Fragmentierung. Dies ist für die Strukturzuordnung von unbekanntem Substanzen wertvoll. Wir dagegen versuchen durch die Derivatisierung möglichst stabile Moleküle zu erzeugen, da sich die Menge der einzelnen Fragmente und damit des Moleküls besser bestimmen lassen, wenn bei der Auswertung weniger Peaks im Massenspektrum erscheinen.

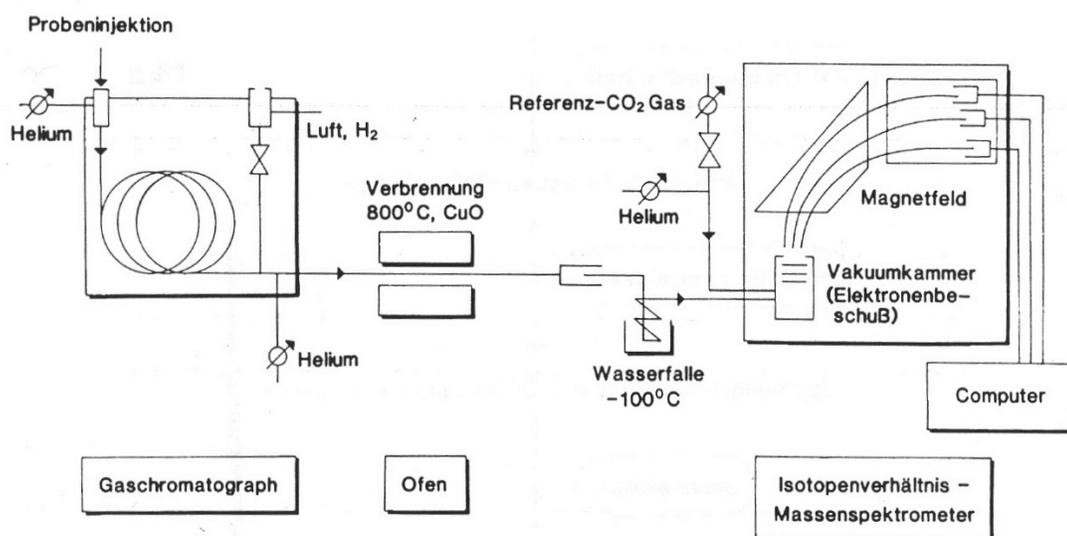
Auch für die Massenfokussierung sind im Laufe der Zeit mehrere Verfahren entwickelt worden. Unter anderem die Iontrennung in einem Magnetfeld oder einem Quadrupolanalysator. Die Iontrennung im Magnetfeld erfolgt nach bestimmten physikalischen Gesetzen. Dabei gilt, dass die Kraft, die auf ein Molekül wirkt, das Produkt aus seiner Masse und seiner Beschleunigung ist. Da für massenspektrometrische Zwecke die Elektronenmasse immer 1 beträgt, und da für die Massenspektrometrie die Magnetfeldstärke und die Beschleunigungsspannung bekannt sind, ergibt sich ein direkter Zusammenhang zwischen Masse des Ions und der Kreisbahn, die es beschreibt. Somit kann aus der Kreisbahn eines Ions auf seine Masse geschlossen werden, oder anders formuliert, Ionen mit unterschiedlicher Masse werden im Magnetfeld des Massenspektrometers unterschiedliche Kreisbahnen beschreiben. Da die zu erwartenden Massen und deren Kreisbahnen bereits bekannt sind, (in unserem Fall 45 für $^{13}\text{CO}_2$ und 44 für $^{12}\text{CO}_2$), können an einem bestimmten Punkt der massenspezifischen Kreisbahn Detektorplatten platziert werden, auf die - nach Masse getrennt - die verschiedenen Ionen auftreffen werden. Beim Auftreffen der Ionen auf die Kollektoren wird ein messbarer Elektronenstrom freigesetzt. Je mehr Ionen einer bestimmten Masse auftreffen, umso höher ist der Elektronenstrom. Das Verhältnis der - getrennt voneinander gemessenen - Elektronenstromstärken zueinander ist dem Isotopenverhältnis proportional.

b) Durchführung der Gaschromatographie – Isotopenverhältnis - Massenspektrometrie (GC-IRMS)

In unserer Studie wurde zur Bestimmung der Tracer-Anreicherung des an Albumin gebundenen Leuzins ein Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometer der Firma Finnigan, Bremen (Delta S) verwendet. Die Isotopenverhältnis - Massenspektrometrie (IRMS) war deshalb erforderlich, da die zu messenden albumingebundenen Leuzin - Anreicherungen in der Regel unter 0,5 % liegen, und in diesem Bereich nur mit Hilfe der IRMS präzise Messungen durchgeführt werden können. Nachteil des IRMS ist allerdings, dass eine relativ große Probenmenge erforderlich ist. Die Kopplung von Gaschromatographie und IRMS erlaubt es jedoch, die Probenmenge auf wenige Milligramm zu senken. Dadurch ist es möglich, mehrere Proben am selben Patienten zu entnehmen. Es sind bei der Benutzung der IRMS alleine zusätzliche präparative Schritte notwendig, um das benötigte $^{13}\text{CO}_2 / ^{12}\text{CO}_2$ -Gasgemisch zu erhalten.

Das GC-IRMS stellt ein System dar, bei dem in-line ein kapillarer Gaschromatograph zur Separation der Tracer-Aminosäure, eine Verbrennungskammer zur Erzeugung des zugehörigen $^{13}\text{CO}_2 / ^{12}\text{CO}_2$ -Gasgemisches aus dem verbrannten Aminosäuregemisch und ein Isotopenverhältnis - Massenspektrometer zur Bestimmung des $^{13}\text{CO}_2 / ^{12}\text{CO}_2$ -Verhältnisses aneinander gekoppelt sind (s. Abbildung 2).

Abbildung 2: Schematische Darstellung des GC-IRMS- Systems



Vor Beginn der GC-IRMS Analyse muss jedoch erst das zu separierende Aminosäuregemisch von der wasserlöslichen in eine volatile Form übergeführt werden. Dazu ist eine Derivatisierung zum N-acetyl-n-propyl (NAP) - Ester notwendig (1), deren standardisierter Ablauf bereits dargestellt wurde. Die NAP- Aminosäuren (2 µl Proben) werden in den Gaschromatographen (Hewlett-Packard 5980 A) injiziert und mittels Kapillarsäule (30 m DB 1701 Kapillarsäule, Innendurchmesser 0,22 mm, J&W Scientific, New York, USA) getrennt. Die Injektortemperatur wird bei 250°C, die des Flammenionisationsdetektors bei 300°C gehalten. Als Trägergas dient Helium mit einer Flussrate von 1 ml pro Minute und einem Säulenspitzenruck von 1,1 bar. Zur chromatographischen Trennung der NAP- Aminosäuren wird ein Temperaturgradient benutzt, der bei 100°C für eine Minute gestartet wird,

anschließend in Schritten von 6°C pro Minute auf 200°C, dann in Schritten von 10°C pro Minute auf 250°C steigt und schließlich für weitere 10 Minuten auf diesem Niveau gehalten wird. Beim Erscheinen der NAP- Tracer-Aminosäure (in diesem Fall NAP-1-¹³C-Leuzin) im Flammenionisations-Detektor nach Durchlaufen der Kapillarsäule (in der Regel nach 15 Minuten) wird das Helium-Trägergas mit dem NAP-1-¹³C-Leuzin bei 800°C mittels Kupferoxydgranulat als Katalysator zu Kohlendioxyd und Wasser verbrannt. Zur Aufrechterhaltung der chromatographischen Auftrennung wird vor dem Eingang in die Verbrennungskammer zusätzlich Helium mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute dem NAP-1-¹³C-Leuzin – Helium - Gemisch beigegeben. Nach Durchlaufen der Verbrennungskammer wird das dabei entstandene Wasser in einer Kühlfalle bei –100°C entfernt. Das übrig gebliebene Kohlendioxydgemisch gelangt nun in das Massenspektrometer. Das Massenspektrometer besitzt einen doppelten Zugang, über den wechselweise das Kohlendioxydgemisch aus der Verbrennungskammer oder ein Referenz- CO₂ - Gas mit Helium als Trägergas zugeführt wird. Das Referenzgas ist notwendig, da entsprechend den Prinzipien der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie nur der Vergleich des Isotopenverhältnisses der Probe mit dem Isotopenverhältnis in einem Referenzgas aussagekräftige Werte ergibt.

Als Isotopenverhältnis ist das Verhältnis $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ (bezeichnet als r) in einem CO₂ Gemisch definiert. Die Bestimmung von r erfolgt dadurch, dass ¹³CO₂ und ¹²CO₂ verschiedene Atommassen (AM 45 und 44) aufweisen. Komplizierend kommt hinzu, dass nicht nur vom Kohlenstoff sondern auch vom Sauerstoff verschiedene natürliche Isotope existieren (z.B. das häufige ¹⁶O und das seltene ¹⁷O). Da ¹³C¹⁶O₂ die gleiche Molekülmasse besitzt wie ¹²C¹⁶O¹⁷O (Molekülmasse 45), müssen Rohdaten mit Standards korrigiert werden.

Das CO₂-Gemisch mit Helium als Trägergas gelangt anschließend an die Verbrennung in-line in das Massenspektrometer, wo es zunächst in eine Vakuumkammer gelangt, in der die Moleküle durch Elektronenbeschuss ionisiert werden. Die Elektronen werden aus Filamentdrähten freigesetzt. Abstoßende Elektroden zwingen die Ionen durch eine Reihe von Fokussierungslinsen in das Analysesegment des Massenspektrometers. Hier erfolgen die Massenfokussierung im Magnetfeld und anschließend die massenspezifische Registrierung ihrer Häufigkeit.

Das Isotopenverhältnis einer CO₂ Probe ist jedoch nur aussagekräftig, wenn es auf einen Eichwert (Isotopenverhältnis eines CO₂ Eichgases) bezogen wird. Dazu wird alternierend zum CO₂ – Gemisch einer Probe das CO₂ - Gemisch des Eichgases mit bekanntem Isotopenverhältnis durch das Massenspektrometer geleitet. Für unsere Untersuchungen verwendeten wir das Pee Dee Belemnate limestone (PDB) Eichgas mit einem Isotopenverhältnis von 0,011.

Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt, der Messvorgang war automatisiert und wurde mittels Software des Herstellers gesteuert. Die Berechnung der Probenanreicherung erfolgte unter Benutzung entsprechender Korrekturprogramme ebenfalls automatisch.

Zur Qualitätskontrolle war es erforderlich, neben den Probemessungen intermittierend die Anreicherung bestimmter Standardproben mit bekanntem, genau definiertem Isotopengehalt zu bestimmen, hierzu verwendeten wir eine Standardprobe mit $\Delta^{13}\text{C} = 49.2\text{‰}$ (45).

c) Prinzip der Gaschromatographie – Massenspektrometrie (GCMS)

(Methode zur Bestimmung der Plasma-KIC-Anreicherung)

Im Quadrupolanalysator wird der Ionenstrahl in Längsrichtung durch vier parallel angeordnete Metallstäbe geleitet. Zwischen jeweils einem gegenüberliegenden Stabpaar liegt eine Gleichspannung an, die durch ein Hochfrequenzfeld überlagert ist. Die Phase zwischen den Stabpaaren ist um 180° verschoben. Für eine gegebene Spannung hängt die Bahn, welche von den Ionen in Längsrichtung zwischen den Stäben durchlaufen wird, von ihrer Masse ab, d.h. es gelangen nur Teilchen einer bestimmten Masse an den Austrittsspalt. Durch Veränderung der Spannung kann die nächsthöhere Masse den Austrittsspalt treffen usw. Das Quadrupol - Massenspektrometer hat eine hohe Empfindlichkeit, kurze Registrierzeit und geringen Raumbedarf. Deshalb ist es für die Kopplung an ein Gaschromatographen sehr gut geeignet (85).

d) Durchführung der Gaschromatographie - Massenspektrometrie (GCMS)

Zur Bestimmung der KIC-Anreicherung (Tracer-Anreicherung im Präkursorpool für die Albuminsynthese) wurde ein mit einem Gaschromatographen gekoppeltes Massenspektrometer der Firma Hewlett-Packard (HP MSD 5971D) verwendet. Das GCMS erlaubt eine zuverlässige Bestimmung einer Anreicherung im Bereich von etwa 0,5 bis 100 % und ist zwar bei niedrigen Anreicherungen dem GC-IRMS Verfahren unterlegen, besitzt jedoch den entscheidenden Vorteil, dass Kontaminationen durch ^{12}C -haltige Substanzen aufgrund der Arbeitsweise des GCMS praktisch ausgeschlossen sind. Der höhere Messbereich des GCMS stellt aus unserer Sicht keinen Nachteil dar, da die zu erwartenden KIC-Anreicherungen im Präkursorpool deutlich über denen im Albumin liegen und somit schon allein deswegen für GCMS Verfahren gut geeignet sind.

Die chemische Ionisation des Quinoxalinoltrimethylsilyl - Derivates der Ketoisocapronsäure mit Ammoniak führt zu guten Massenspektren (34), aber auch mit einer Ionisierung durch Elektronenbeschuss konnten wir Spektren erzielen, die auswertbare Peaks mit den Massen 259 und 260 lieferten.

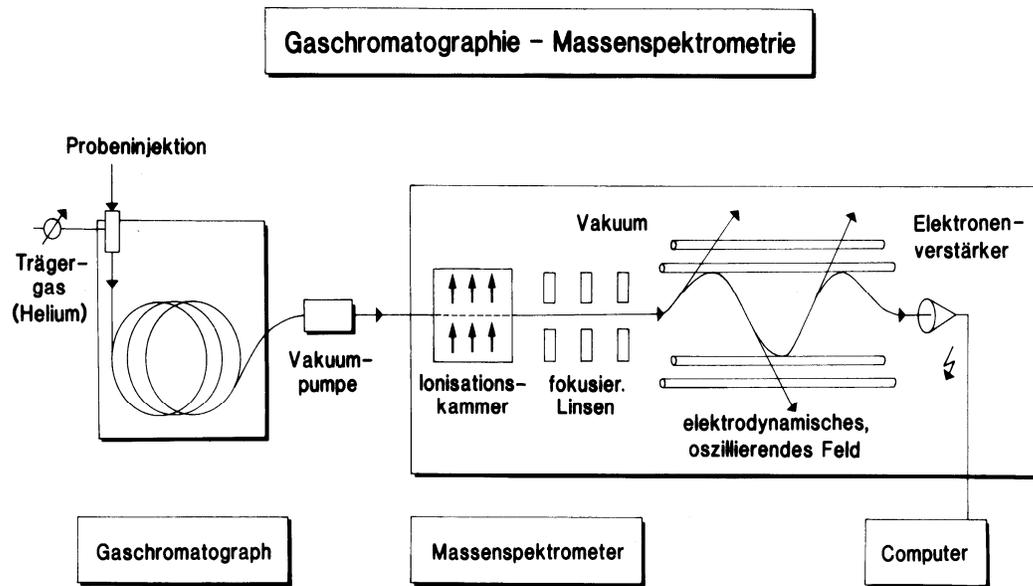
Die GCMS-Anlage (s.a. Abbildung 3) besteht aus einer Kopplung eines Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer, ähnlich wie beim GC-IRMS, nur mit dem Unterschied, dass die den Gaschromatographen verlassenden Substanzen vor der massenspektrometrischen Analyse nicht verbrannt werden und die Fokussierung mittels Quadrupolanalysator statt mittels Magnetfeld erfolgte. Auch für das GCMS ist es erforderlich, die zu untersuchenden Substanzen zuvor zu derivatisieren, so dass sie volatil werden. Zusätzlich müssen sie hitzestabil sein und sich chemisch inert verhalten. Letzteres wird dadurch erreicht, dass die beiden Ketogruppen der KIC ein Teil einer aromatischen Gruppe werden. Der dabei entstehende aromatische Alkohol wird mit einer Silylverbindung umgesetzt und kann dann gemessen werden.

Die Derivatisierung wurde bereits oben genauer beschrieben. Im Vergleich zur GC-IRMS kommt der Derivatisierung bei der GCMS eine weitaus größere Bedeutung zu, da bei der massenspektrometrischen Analyse die Anreicherung nicht durch das Vorhandensein einzelner Isotope (in unserem Fall bei GC-IRMS ^{12}C und ^{13}C), sondern durch das Auftreten bestimmter Molekülstrukturen im Massenspektrometer bestimmt wird. Es entsteht ein Massenspektrum

mit verschiedenen Peaks. Von diesen Peaks wählt man einen aus, der den markierten Kohlenstoff enthält und als möglichst großer Peak im Spektrum auftritt. In der GCMS wird nur die Masse dieses Peaks (in unserem Fall 259) und die Masse dieses Peaks + 1 (in unserem Fall 260) im Quadrupolmassenspektrometer bestimmt. Aus diesen beiden Massen ist eine exakte Quantifizierung möglich, aus der sich schließlich die Anreicherung einer bestimmten Substanz ergibt.

Nach abgeschlossener Derivatisierung wird die zuvor abgekühlte Probe, wie in Abbildung 3 zu verfolgen, mit einem inerten Trägergas, hier Helium, in den erhitzten Injektor am GCMS injiziert. Zusammen mit dem Trägergas wird die verdampfte Probe dann durch die Gaschromatographiesäule (DB-5. J&W Scientific, Washington, USA; Innendurchmesser 0,25 mm Filmdicke 0,25 μm) geleitet, an der mittels eines programmierten Temperaturgradienten, die Auftrennung erfolgt. Beim Erscheinen der derivatisierten Ketoisocaproensäure (KIC) im Flammenionisations-Detektor wird das Helium - Trägergas mit dem derivatisierten KIC (Verhältnis 25:1) über ein Trennventil zum Massenspektrometer geleitet. Da der Druck, mit dem die Probe einschließlich des Trägergases den Gaschromatographen verlässt, für das Massenspektrometer zu groß ist, muss vor dem Eintritt in das Massenspektrometer eine Druckreduzierung erfolgen. Dies geschieht über eine Hochgeschwindigkeitspumpe, die am Eintritt in das Massenspektrometer eine sofortige Druckverminderung bewirkt. Die Probe gelangt dann in die Ionisationskammer. Dort passiert sie einen Elektronenstrahl, der aus erhitzten Filamenten freigesetzt wird und von einer gegenüberliegenden, positiv geladenen Elektronenfalle angezogen wird. Beim Auftreffen eines Elektrons auf ein Molekül in der Probe wird das Molekül ionisiert und fragmentiert. Die eigentliche massenspektrometrische Messung erfolgt mit Hilfe eines Quadrupolmassenspektrometers. Bei allen Analysen wurden KIC- Standardkurven gemessen, um die Linearität in diesem Messbereich zu prüfen und die Isotopomerenverhältnisse in mole percent excess (MPE) umrechnen zu können.

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Gaschromatographie – Massenspektrometrie:



3.5. Berechnungen der fraktionellen Albuminsyntheserate

Zur Berechnung der fraktionellen Albuminsyntheserate ist es erforderlich, das Tracer/Tracee-Verhältnis des proteingebundenen $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Leuzins (z_{Prot}) und das Tracer / Tracee-Verhältnis des Präkursors, der in unserem Fall die Ketoisocapronsäure (z_{KIC}) ist, zu ermitteln (3).

Die Delta-Anreicherungen des proteingebundenen $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Leuzins innerhalb des Albumins wurden mittels eines korrigierten Isotopenverhältnisses von ^{13}C zu ^{12}C ($^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$) bestimmt. Die GC-IRMS Analysen ergaben $\Delta^{13}\text{C}$ -Werte, welche in ein Isotopenverhältnis ($^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$) des kompletten NAP- $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Leuzins durch folgende Formel umgeformt werden können.

$$^{13}\text{C} / ^{12}\text{C} = ((\Delta^{13}\text{C} / 1000) + 1) \cdot 0,011 \quad <1>$$

Der Wert 0,011 entspricht dem Isotopenverhältnis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ des von uns verwendeten Pee Dee Belemnate limestone (PDB) Eichgases.

Das Tracer/Tracee-Verhältnis des proteingebundenen $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Leuzins kann aus dem durch GC-IRMS gemessenen Isotopenverhältnis ($^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$) abgeleitet werden, wobei z_{Prot} aus der Differenz zwischen dem Isotopenverhältnis in der Probe ($^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$)_P und dem Isotopenverhältnis im nicht markierten Hintergrund ($^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$)_H berechnet werden kann, wenn diese Differenz ($R_{\text{NAP-Leuzin}}$ genannt)

$$R_{\text{NAP-Leuzin}} = (^{13}\text{C} / ^{12}\text{C})_{\text{P}} - (^{13}\text{C} / ^{12}\text{C})_{\text{H}} \quad \langle 2 \rangle$$

mit einem Korrekturfaktor c multipliziert wird. Dieser Korrekturfaktor berücksichtigt die artifizielle Verminderung der Anreicherung des markierten NAP-Leuzinmoleküls durch unmarkierten Kohlenstoff durch die Derivatisierung für die Gaschromatographie und die anschließende Verbrennung.

z_{Prot} kann damit durch $R_{\text{NAP-Leuzin}}$ anhand folgender Formel berechnet werden:

$$z_{\text{Prot}} = c \cdot R_{\text{NAP-Leuzin}} / (1 + [1-c] \cdot R_{\text{NAP-Leuzin}}) \quad \langle 3 \rangle$$

Der Korrekturfaktor (45) entspricht dem Wert 10,02. Mit dem berechneten z_{Prot} kann nun die fraktionelle Albuminsyntheserate, bei bekannter Präkursorpool-Anreicherung, z_{KIC} , berechnet werden. Anhand der GCMS - Messung berechnet sich die Präkursorpoolanreicherung ebenfalls aus der Differenz zwischen dem Isotopomerenverhältnis der Probe ($M+1 / M$)_P nach Isotopeninfusion und dem Isotopenverhältnis im nicht markierten Hintergrund ($M+1 / M$)_H wie folgt:

$$z_{\text{KIC}} = (M+1 / M)_{\text{P}} - (M+1 / M)_{\text{H}} \quad \langle 4 \rangle$$

Hieraus ergibt sich für die fraktionelle Albuminsyntheserate (FSR):

$$\text{FSR} = \frac{z_{\text{Prot}}(t_{i+1}) - z_{\text{Prot}}(t_i)}{[z_{\text{KIC}}(t_i) + z_{\text{KIC}}(t_{i+1})]/2} \cdot \frac{1}{\Delta t} \cdot 6000 \text{ (\%/h)} \quad <5>$$

$z_{\text{Prot}}(t_i)$ und $z_{\text{Prot}}(t_{i+1})$ entsprechen dem Tracer/Tracee- Verhältnis des proteingebundenen Leuzins in zwei aufeinander folgenden Proben (i und $i+1$), die innerhalb eines Zeitintervalls Δt gewonnen wurden. $z_{\text{KIC}}(t_i)$ und $z_{\text{KIC}}(t_{i+1})$ repräsentieren das Tracer/Tracee- Verhältnis im Präkursorpool für die Albuminsynthese in zwei aufeinander folgenden Proben. Der Faktor 6000 ist erforderlich, um die Proteinsynthese in Stunden anzugeben und in % ausdrücken zu können.

3.6 Messungen der Albuminkonzentration

Die Messung der Albuminkonzentration erfolgt photometrisch nach der Umsetzung mit einem Albuminreagenz (Fa. Sigma) gegen eine Standardsubstanz für die Einstellung der Proteinkonzentration für die Elektrophorese. Dies kann man auch mittels Brom Cresol Grün als Routinemethode der Klinischen Chemie für die Bestimmung der Albuminkonzentration im Plasma der Patienten durchführen (48).

3.7 Bestimmung des Plasmavolumens

Zur Berechnung der absoluten Albuminsynthese muss das Plasmavolumen bekannt sein. Das Plasmavolumen der Patienten wurde für die Berechnung der absoluten Albuminsynthese, wie bei Dagher et al. beschrieben (20), einem Nomogramm entnommen. Diese Werte werden aus der Körpergröße und dem Körpergewicht der Patienten ermittelt.

3.8 Statistik

Die Ergebnisse unserer Berechnungen werden als Mittelwerte \pm SEM angegeben und wurden mittels gepaarter und ungepaarter t-Tests verglichen. Bei multiplen Vergleichen innerhalb einer Gruppe benutzten wir Dunnet's t-Test. Ein signifikanter Unterschied wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Albuminanreicherung

Zunächst wurden die Delta-Anreicherungen des Albumins der einzelnen Proben, wie in dem Kapitel Berechnungen (3.5) beschrieben, umgerechnet. Aus diesen Berechnungen ergaben sich die Tracer/Tracee-Verhältnisse für das albumingebundene Leuzin (z_{Prot}). Beide Gruppen werden im Vergleich in Abbildung 4 aufgeführt.

4.1.1. Albuminanreicherung in der Kontrollgruppe

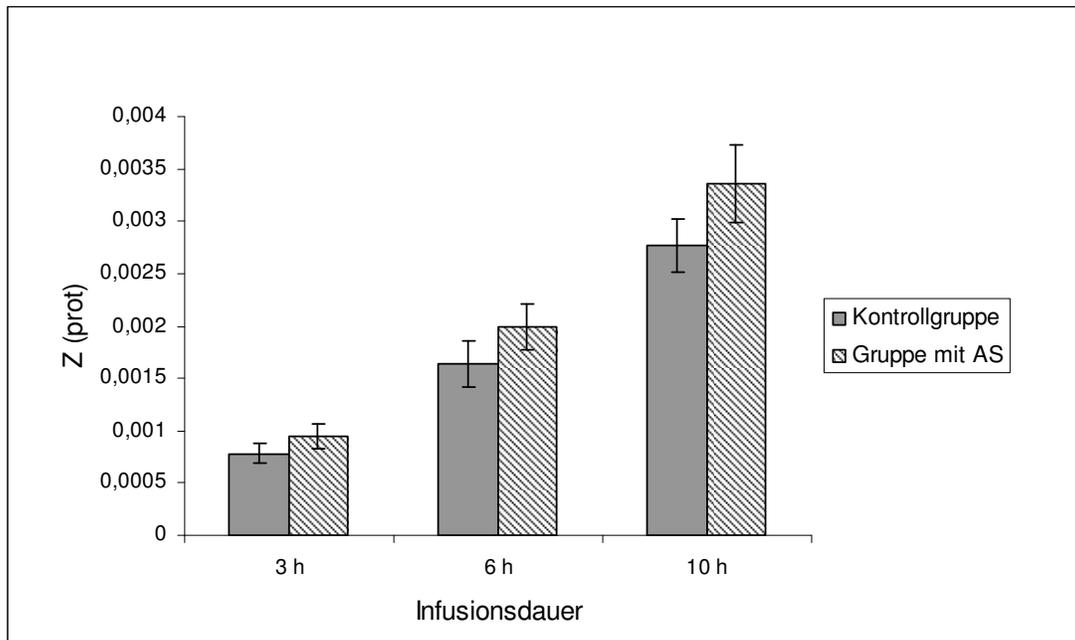
In der Kontrollgruppe (NaCl-Infusion in der Phase II) wurden sechs Patienten in einem Untersuchungszeitraum von zehn Stunden untersucht. Die Tracer/Tracee-Verhältnisse (z_{Prot}) betragen für das albumingebundene Leuzin $0,77948 \times 10^{-3} \pm 0,094335 \times 10^{-3}$; $1,63576 \times 10^{-3} \pm 0,22249 \times 10^{-3}$ und $2,77009 \times 10^{-3} \pm 0,25442 \times 10^{-3}$. Die Werte wurden jeweils nach drei, sechs und zehn Stunden erhoben.

4.1.2. Albuminanreicherung in der in der Gruppe mit Aminosäureinfusion

In der Gruppe der Patienten mit Aminosäureinfusion (in der Phase II) wurden zwölf Patienten ebenfalls über einen Untersuchungszeitraum von zehn Stunden untersucht. Die Tracer/Tracee-Verhältnisse (z_{Prot}) der Anreicherungen betragen nach drei, sechs und zehn Stunden: $0,94167 \times 10^{-3} \pm 0,11673 \times 10^{-3}$; $1,98725 \times 10^{-3} \pm 0,21772 \times 10^{-3}$ und $3,36435 \times 10^{-3} \pm 0,37207 \times 10^{-3}$.

Abbildung 4: Tracer/Tracee-Verhältnisse des albumingebundenen Leuzins

Der Anstieg war für beide Gruppen signifikant bezüglich der Untersuchungszeit, es bestand jedoch keine Signifikanz zwischen den beiden Gruppen.



4.2. Anreicherung im Präkusorpool (KIC-Anreicherung)

4.2.1. Isotopomerenverhältnisse (M+1/M)

4.2.1.1. Isotopomerenverhältnisse in der Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe betragen die Isotopomerenverhältnisse $0,26221333 \pm 0,00276810$; $0,26743000 \pm 0,00154286$ und $0,26974333 \pm 0,00334828$. Die Proben wurden ebenfalls nach drei, sechs und zehn Stunden entnommen. Bei diesen Ergebnissen kann man einen Anstieg der Anreicherungen über den gesamten Untersuchungszeitraum beobachten. Der Anstieg von Stunde drei zu Stunde sechs war jedoch mit einem p-Wert von 0,11 nicht signifikant. Auch von Stunde sechs zu Stunde zehn zeigte sich mit einem p-Wert von 0,17 keine Signifikanz. Im

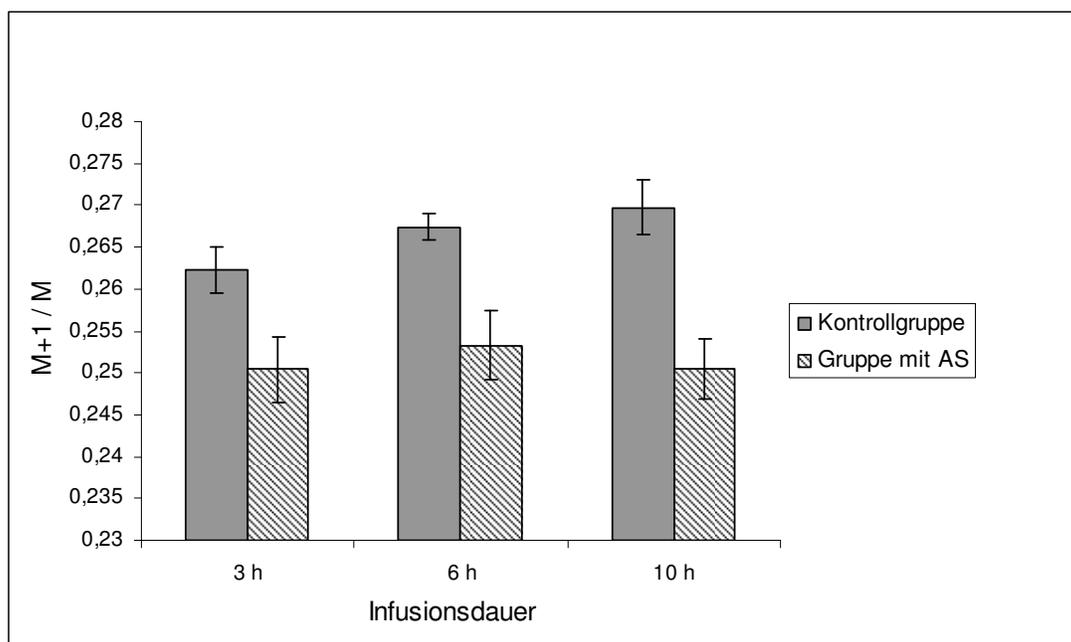
gesamten Zeitraum war jedoch der Anstieg der Anreicherung von Stunde 3 zu Stunde 10 mit einem p-Wert von 0,02 signifikant. Da dieser Anstieg allerdings nur 2,9 % des Ausgangswertes ausmachte und sich die Werte in den einzelnen Abschnitten der benachbarten Messpunkten (Stunde 3 und 6, sowie Stunde 6 und 10) nicht signifikant voneinander unterschieden, nahmen wir für die Berechnung der fraktionellen Syntheserate des Albumins einen Steady State an (82).

4.2.1.2. Isotopomerenverhältnisse in der Gruppe mit Aminosäureinfusion

In dieser Gruppe betragen die Isotopomerenverhältnisse nach drei, sechs und zehn Stunden jeweils $0,25038118 \pm 0,00396249$; $0,25329215 \pm 0,00416000$ und $0,25051511 \pm 0,00355343$. Auch in dieser Gruppe war wie oben beschrieben von einem Steady State auszugehen, da sich die Werte an den einzelnen Meßzeitpunkten nicht signifikant voneinander unterschieden. Zum Vergleich beider Gruppen siehe Abbildung 5.

Abbildung 5: Isotopomerenverhältnisse der Ketoisocapronsäure

Es fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollpatienten und Patienten mit Aminosäureinfusion.



4.2.2. KIC Tracer/Tracee-Verhältnisse

Um die Tracer/Tracee-Verhältnisse (z_{KIC}) der KIC (s. Abbildung 6) berechnen zu können, wurde der Ausgangswert der KIC-Anreicherung (Blutentnahme vor Isotopeninfusion) von jeder Probe subtrahiert. Daraus ergaben sich die Tracer/Tracee-Verhältnisse (z_{KIC}), die mit den Tracer/Tracee-Verhältnissen des albumingebundenen Leuzins (z_{Prot}) zur Berechnung der fraktionellen Albuminsyntheserate verwendet wurden.

4.2.2.1. KIC Tracer/Tracee-Verhältnisse in der Kontrollgruppe

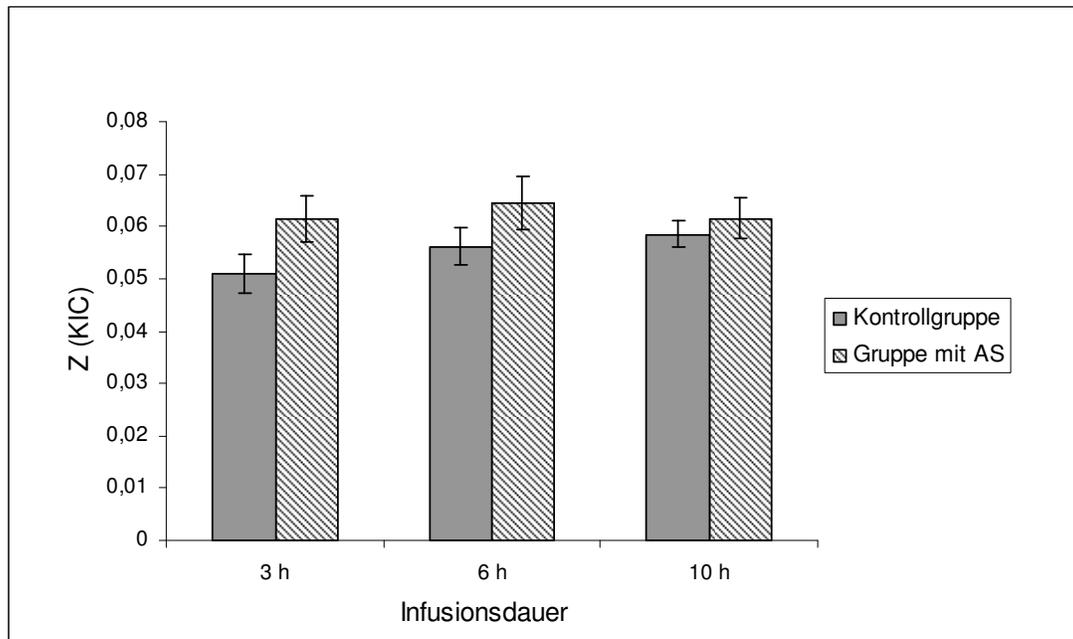
Die Werte in der Kontrollgruppe für die Tracer/Tracee-Verhältnisse betragen $0,05097500 \pm 0,00361766$; $0,05619167 \pm 0,00349540$ und $0,05850500 \pm 0,00260389$. Die Ergebnisse der gepaarten t-Tests ergaben für die p-Werte wie unter 4.2.1.1. für die zugehörigen Isotopomerenverhältnisse beschrieben, auch hier ebenfalls keine Signifikanz zwischen zwei aufeinander abfolgenden Messzeitpunkten.

4.2.2.2. KIC Tracer/Tracee-Verhältnisse in der Gruppe mit Aminosäureinfusion

In der Patientengruppe mit Aminosäureinfusion betragen die Werte nach drei, sechs und zehn Stunden $0,06143035 \pm 0,00454254$; $0,06434131 \pm 0,00509009$ und $0,06156428 \pm 0,00377349$. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 6: Tracer/Tracee-Verhältnisse der Ketoisocaprone Säure

Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollpatienten und Patienten mit Aminosäureinfusion.



4.3 Fraktionelle Albuminsyntheseraten

Anhand der gesamten zuvor berechneten Daten für die Tracer/Tracee-Verhältnisse im Präkursorpool (z_{KIC}) (4.2.2) und im albumingebundenen Leuzin (z_{Prot}) (4.1) konnten wir mit der im Kapitel Berechnungen beschriebenen Formeln (3.5) die fraktionellen Proteinsyntheseraten des Albumins bestimmen. Zunächst für die Phase I, die den Zeitraum zwischen 180 und 360 Minuten nach Beginn der Isotopeninfusion beschreibt, sowie dann für die Phase II, im Zeitraum zwischen 360 und 600 Minuten nach Beginn der Isotopeninfusion. Zum Vergleich der Ergebnisse in beiden Gruppen siehe auch Abbildung 7.

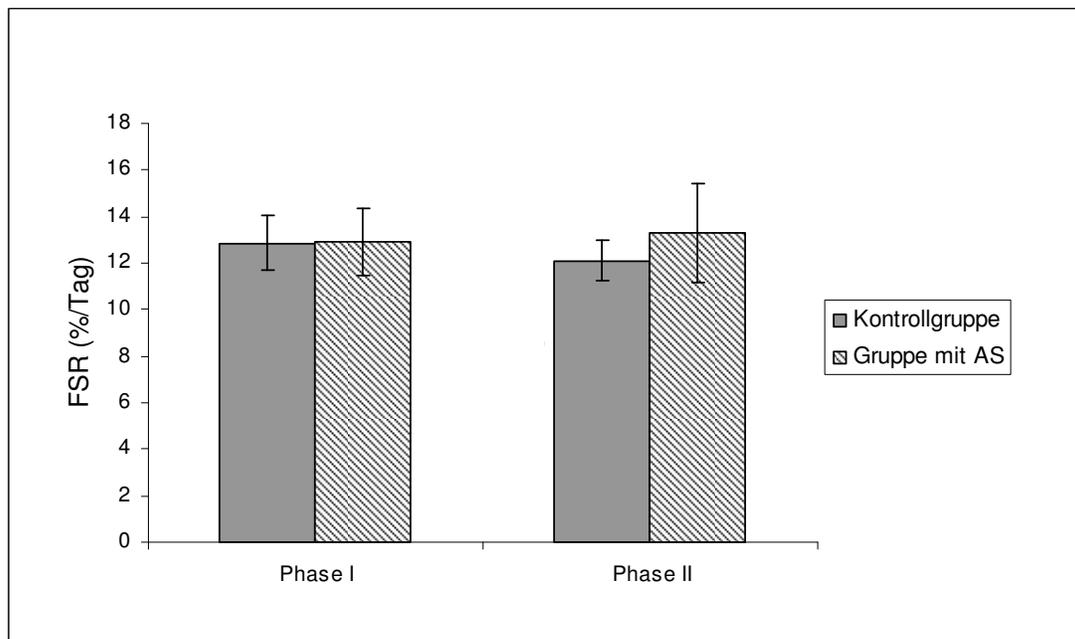
4.3.1 Fraktionelle Albuminsyntheseraten in der Kontrollgruppe

Die Fraktionelle Syntheserate betrug für die Kontrollgruppe $12,86 \pm 1,16$ % / Tag in der Phase I und $12,11 \pm 0,90$ % / Tag in der Phase II. Der Unterschied in den fraktionellen Syntheseraten zwischen Phase I und II war nicht signifikant.

4.3.2 Fraktionelle Albuminsyntheseraten in der Gruppe mit Aminosäureinfusion

In dieser Gruppe betrug die Werte $12,92 \pm 1,43$ % / Tag in der Phase I und $13,31 \pm 2,11$ % / Tag in der Phase II. Auch in dieser Patientengruppe war der Unterschied zwischen den Phasen I und II nicht signifikant. Die fraktionelle Albuminsyntheserate in der Gruppe der Patienten mit Aminosäureinfusion war im Vergleich zu der Patientengruppe mit NaCl - Infusion (Kontrollgruppe) nicht signifikant verändert.

Abbildung 7: Fraktionelle Albumin-Syntheseraten (FSR) der jeweiligen Patientenkollektive



4.4 Plasmaalbumin-Konzentration

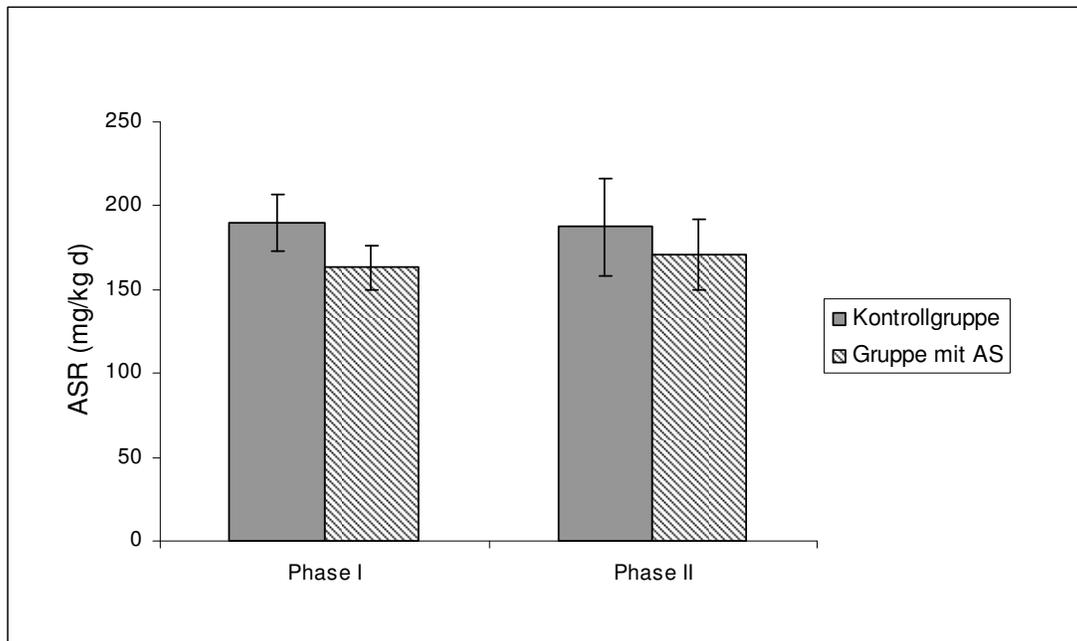
Wie in der Charakteristik der untersuchten Patienten beschrieben waren alle Patienten am Untersuchungstag nüchtern. Die Plasmaalbumin-Werte betragen am Morgen des Untersuchungstags in der Kontrollgruppe $3,6 \pm 0,3$ mg/dl und in der Gruppe mit Aminosäureinfusion $3,3 \pm 0,2$ mg/dl. Somit waren die Plasmaalbumin-Konzentrationen der beiden Untersuchungsgruppen miteinander vergleichbar. Eine relevante Veränderung der Plasmaalbumin-Konzentration während des Untersuchungszeitraumes wurde nicht beobachtet.

4.5. Absolute Albuminsyntheserate

In der Kontrollgruppe betragen die berechneten Werte der absoluten Albuminsyntheserate in der Phase I $189,72 \pm 16,72$ mg kg⁻¹ Tag⁻¹ und in der Phase II $187,51 \pm 28,99$ mg kg⁻¹ Tag⁻¹.

In der Gruppe der Patienten mit Aminosäureinfusion ergaben sich die folgenden Werte: $163,42 \pm 13,12$ mg kg⁻¹ Tag⁻¹ für die Phase I und $171,10 \pm 21,08$ mg kg⁻¹ Tag⁻¹ für die Phase II. Zwischen beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (siehe dazu auch Abbildung 8).

Abbildung 8: Absolute Albuminsyntheseraten (ASR) der untersuchten Patienten



5. Diskussion

5.1 Methodische Betrachtungen

a) Gültigkeit der verwendeten kontinuierlichen Tracerinfusionstechnik

Zur Messung der Syntheseraten individueller Proteine *in vivo* am Menschen existieren zwei miteinander konkurrierende Tracer-Techniken, die „continuous tracer infusion“ Technik und die „tracer flooding dose“ Technik, bei denen die markierte Tracer-Aminosäure entweder kontinuierlich oder als einmaliger Bolus appliziert wird (22, 36, 78).

Das Grundproblem bei der Messung von Albumin-Syntheseraten *in vivo* ist die korrekte Bestimmung der Anreicherung im Präkursorpool, aus dem der Tracer stammt, der in das zu untersuchende Protein eingebaut wird. Idealerweise wäre dies die Anreicherung im Aminoacyl-tRNA-Pool der Leberzelle. Aufgrund der äußerst geringen Aminoacyl-tRNA-Mengen ist es leider bis heute nicht möglich, derartige Anreicherungen im Menschen zu messen. Deshalb verwendet man Annäherungslösungen. Eine davon ist die „flooding dose“ Technik. Sie wurde entwickelt, um die Problematik, die bei der exakten Bestimmung der Aminoacyl-tRNA-Anreicherung auftritt, zu umgehen. Das Prinzip besteht darin, dass eine relativ hoch dosierte Bolusinfusion (mehrere Gramm) der verwendeten Tracer-Aminosäure gegeben wird. Die resultierende plötzliche hohe Konzentration und Anreicherung der zugeführten Tracer-Aminosäure im Plasma führt zu einer schnellen Äquilibration der Anreicherung in allen intra- und extrazellulären Aminosäurenkompartimenten, einschließlich des Pools, aus dem die Aminoacyl-tRNA für die Proteinsynthese in der Leber hervorgeht. Somit sollten in kurzer Zeit ähnliche Anreicherungen im Plasmaaminoamino- und im Aminoacyl-tRNA-Pool bestehen. Auf diese Weise würde die technisch einfache Bestimmung der Aminosäuren-Anreicherung im Plasma einen genauen Indikator für die Anreicherung im Aminoacyl-tRNA-Pool darstellen. Deshalb hat diese Technik eine gewisse Berechtigung, insbesondere bei der Untersuchung der muskulären Proteinsynthese.

Ein letztlich in seiner Bedeutung nicht geklärter Nebeneffekt der „flooding dose“ Technik besteht darin, dass es nach Verabreichung der Bolusinfusion zu einer deutlichen Erhöhung der Aminosäurekonzentrationen im Plasma und zu einer geringen, aber doch signifikanten Erhöhung der Insulinkonzentration im Plasma kommt. Ob diese systemischen Veränderungen eine Steigerung der Proteinsynthese bewirken, ist für das Kompartiment Skelettmuskel umstritten (36, 78). Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Eiweißsyntheserate in der Muskulatur und auch die Syntheserate von Albumin durch diese zusätzlichen Milieuveränderungen gesteigert werden kann (90, 91). Bei Gesunden wird die Synthese des Albumins durch Insulin und das hepatische Aminosäure-Angebot beeinflusst (3, 24, 56, 72, 94). Somit ist ein intrinsischer stimulierender Effekt der „flooding dose“ Technik auf die Albuminsynthese sehr wahrscheinlich und damit ist diese Technik für unsere Untersuchungen ungeeignet.

Zusätzlich lassen sich noch weitere Argumente gegen die Verwendung der „flooding dose“ Technik finden. Grundgedanke der „flooding dose“ Technik ist die kurzzeitige vollständige Äquilibration der Anreicherungen in allen Kompartimenten. Vergleichende, tierexperimentelle Messungen von Anreicherungen im intrazellulären Aminoacyl-tRNA-Pool und Anreicherungen in anderen Pools oder Kompartimenten bei der Verwendung dieser Technik lassen diese vollständige Äquilibration aber fraglich erscheinen (3, 58, 89). Auch aus diesen Gründen haben wir uns zur Verwendung der „continuous tracer infusion“ Technik bei der Untersuchung der Albuminsyntheserate entschieden.

b) Wahl des Kompartiments zur Bestimmung der Präkursorpoolanreicherung

Bei der Bestimmung der fraktionellen Syntheserate von Proteinen, speziell Albumin, mittels kontinuierlicher Tracerinfusion ist es wichtig, die Anreicherung der Tracer-Aminosäure im Präkursorpool zu kennen. Der eigentliche Präkursorpool für die Synthese von Albumin sind die an Transfer-RNA (t-RNA) gebundenen Aminosäuren in den Leberzellen. Um Anreicherungen in diesem Pool direkt messen zu können, wird eine große Menge Lebergewebe benötigt, weshalb dieses Verfahren für Studien am Menschen ungeeignet ist. Man versucht deshalb Parameter zu bestimmen, die die Anreicherung der t-RNA in der Leber möglichst gut widerspiegeln. Gängige Methoden hierfür sind die Bestimmung der Tracer-Aminosäure-Anreicherung im Plasma (5), die Bestimmung der proteingebundenen

Aminosäure-Anreicherung in VLDL-Apo B100 im Plasma (14, 35, 73, 77 abstract) und die Bestimmung der Anreicherung der Ketoisocapronsäure des desaminierten Leuzins im Plasma (16, 24, 59, 77 abstract, 93, 100).

Lange galt die Bestimmung der Anreicherung im Plasma VLDL-Apo B100 als der zuverlässigste Indikator für die Präkursorpoolanreicherung in der Leber (14). VLDL-Apo B100 ist ein Protein mit einer relativ hohen hepatischen Umsatzrate. Man ist davon ausgegangen, dass in diesem Protein bei der Traceranreicherung ein steady state innerhalb von wenigen Stunden erreicht wird und dass die Anreicherung derjenigen Anreicherung im t-RNA-Pool der Leber entspricht. Allerdings wurde nicht untersucht, ob VLDL-Apo B100 aus der Leber auch während der Tracerinfusion sezerniert wird, wobei dieses VLDL-Apo B100 bereits vor Beginn der Infusion synthetisiert und in der Leber hätte gespeichert werden können. Eine derartige "Verdünnung" des während der Tracerinfusion neu synthetisierten VLDL-Apo B100 durch zuvor synthetisiertes, unmarkiertes VLDL-Apo B100 würde aber zu einer zu niedrigen Präkursorpoolanreicherungen führen. Nachdem in einer ausführlichen Untersuchung an Schweinen alle Präkursorpoolindikatoren mit der tatsächlichen Aminoacyl-tRNA-Anreicherung verglichen wurden, gilt letztendlich die Ketoisocapronsäure-Anreicherung im Plasma derzeit als der zuverlässigste Indikator (3) und wurde für unsere Untersuchungen verwendet.

c) Albuminisolierung

Die ersten Methoden zur Albumintrennung wurden 1841 beschrieben (11), wobei Albumin und andere Globuline mit Hilfe von Ammoniumsulfat getrennt wurden. Später setzte sich die Albumintrennung nach Cohn durch, die eine sehr aufwendige Fraktionierung des Blutes verlangt. Es handelt sich um mehrere Trennungen bei unterschiedlichem Alkoholgehalt, unterschiedlichem pH und unterschiedlichen Temperaturen zwischen -8°C und 0°C (17). Im Laufe der Jahre wurde die Methode immer wieder verbessert, aber auch heute weist das nach Cohn getrennte Albumin nur eine Reinheit von 96 - 98% auf. Deshalb wurde nach neuen Methoden gesucht, um hoch reines Albumin zu erhalten, auch deshalb, weil es bei der Erhitzung von nicht hoch reinem Albumin auf 60°C zur unerwünschten Bildung von Aggregaten kommt.

Die Chromatographie stellt eine alternative Möglichkeit zur Protein-Isolation dar. Zur Verfügung stehen die Flüssigkeits-Chromatographie (FPLC), die Ionenaustausch-Chromatographie, die Affinitäts-Chromatographie und die Größenausschluß-Chromatographie. Diese Verfahren werden heute für die Trennung von Albumin benutzt um entsprechende Infusionslösungen herzustellen oder um Verunreinigungen abzutrennen, die evtl. beim Erhitzen im Rahmen der Sterilisation Aggregate bilden könnten. Eine Kombination verschiedener Chromatographien führt zu 99-100% reinem Albumin (18). Diese für kommerzielle Zwecke wichtigen Verfahren wurden noch verbessert, indem eine Kombination aus Elektrophorese und Chromatographie eingesetzt wurde. Diese Kombination bietet den Vorteil, dass die Zeit für die Trennung auf 90 Minuten reduziert werden konnte (57). Für präzise massenspektrometrische Untersuchungen sind jedoch diese Methoden zu aufwendig und zu kostenintensiv.

Zur Isolierung des Albumins wurde auch die Trennung mittels Immunpräzipitation benutzt (6, 86). Die einfachste und kostengünstigste Methode schien bisher allerdings die Fällung mit Trichloressigsäure und die anschließende Extraktion mit Alkohol zu sein, die von zahlreichen Autoren in der Vergangenheit angewendet wurde (5, 7, 8, 9, 10, 12, 25, 30, 51, 61, 62, 75, 91, 102, 105). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das mit dieser Methode isolierte Albumin zusätzlich durch Apolipoproteine kontaminiert ist, wodurch die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen relevant verfälscht werden können (53). Wir haben uns bei unsere Untersuchungen für eine Albuminisolation mittels präparativer Elektrophorese entschieden, die einen Reinheitsgrad von über 99 % ermöglicht (53) und die einen praktikable Alternative zur FPLC darstellt.

5.2 Allgemeine Bedeutung von Albumin

Albumin ist das Eiweiß mit der höchsten Konzentration im Blut und der quantitativ höchsten Syntheserate im menschlichen Körper. Albumin ist wegen seiner vielen unterschiedlichen Funktionen sehr wichtig für den menschlichen Organismus. Es ist bereits hinreichend bekannt, dass eine zu niedrige Albuminkonzentration die Prognose des Patienten signifikant verschlechtern kann (60, 99).

Eine Hauptfunktion von Albumin ist die Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks im Blut (68, 83). Albumin hat ein Molekulargewicht von 66,5 kDa. Es ist damit ein relativ kleines Eiweiß, wobei neben seiner Molekülmenge der osmotische Druck zusätzlich verstärkt wird, da mittels der negativen Ladung des Moleküls andere Kationen gebunden werden. Ca. 75 % des gesamten onkotischen Drucks sind auf das Albumin zurückzuführen. Da Albumin nicht nur im Serum, sondern auch in fast allen anderen Geweben des Körpers vorkommt, die Gefäßwände penetrieren kann und dabei jedesmal Wasser bindet, ist es auch für die Flüssigkeitsverteilung im Körper von besonderer Wichtigkeit. Im Serum ist auch die Funktion als Transportmittel von großer Bedeutung (68, 83). Albumin ist klein, gut wasserlöslich und enthält zudem lipophile Bereiche, die es für den Transport von kleinen hydrophoben Molekülen wie zum Beispiel Bilirubin oder auch langkettigen Fettsäuren besonders geeignet machen. Die verschiedenen sauren und basischen Aminosäurereste des Moleküls machen Albumin in geringen Massen zu einem Puffer, der im Blut sicherlich nicht so bedeutend ist wie das Bicarbonat, aber dennoch zum Erhalt des im Blut so wichtigen Säure-Base-Gleichgewichts beiträgt (26). Albumin kann auch als Depot dienen, indem die mit der Nahrung aufgenommenen überschüssigen Aminosäuren in das Protein eingebaut werden und bei Bedarf jederzeit wieder an den Körper abgegeben werden können (24). Die Sulfhydrylgruppe im Albumin kann zusätzlich antioxidativ wirken. Albumin hat zudem auch eine metabolische Funktion für eine kleine Gruppe von Stoffen, die durch die Bindung an Albumin inaktiviert werden. Es soll auch noch antikoagulative Effekte haben und an der microvasculären Integrität beteiligt sein (68).

Aufgrund dieser multiplen und vielseitigen Eigenschaften des Proteins sind perioperative Veränderungen des Albuminspiegels, wie sie bereits seit vielen Jahren bekannt sind, hinsichtlich ihrer Pathophysiologie von großer Relevanz und damit von sehr hohem klinischem Interesse. Dabei sind die Ursachen für die postoperativ regelhaft zu beobachtende Hypoalbuminämie (33, 49, 50, 66, 67, 84) bis heute noch unklar.

5.3 Postoperative Veränderungen von Albuminkonzentration und -synthese

Die normale Albuminkonzentration im Plasma beträgt 35-53 g/l (26, 95). Bei all unseren untersuchten Patienten (n=18) ergab sich eine durchschnittliche Albuminkonzentration von $34,1 \pm 3,2$ g/l. Diese Werte liegen also im unteren Grenzbereich. Diese erniedrigte Albuminkonzentration bestätigt die bereits bekannten postoperativen Veränderungen des Albumins und zeigt, dass nach einem schweren chirurgischen Trauma der Eiweißstoffwechsel verändert ist (33, 49, 50, 66, 67, 84).

Die Bestimmung der Albuminkonzentration im Plasma kann die einzelnen Mechanismen des postoperativ veränderten Albuminstoffwechsels jedoch nicht spezifisch aufzeigen. Es sind deswegen in den letzten Jahren vermehrt die genauen Umsatzrate einzelner, selektiver Proteine (auch die des Albumins) untersucht worden. Man fand heraus, dass sich verschiedene Faktoren dabei auf die Synthese unterschiedlicher Proteine in der Leber teilweise sogar gegensätzlich auswirken können.

Ein chirurgisches Trauma führt immer zu einer generalisierten Stressreaktion, die auch den Stoffwechsel miteinbezieht. Die dabei veränderten Stresshormonkonzentrationen bewirken unter anderem eine Eiweiß-Katabolie, die zum Verlust von körpereigenem Muskeleiweiß und damit zum Verlust von Muskelmasse führt (44). Ob dies auch die viszerale Organe betrifft, und welche Stoffwechselschritte dabei genau für den Abfall der Albuminkonzentration verantwortlich sind, ist bislang noch nicht gesichert.

Diskutiert werden sowohl Veränderungen in der Albuminsyntheserate (68), wie auch ein zunehmender Verlust des Proteins in den dritten Raum (32). Die Bedeutung einer veränderten Albuminsyntheserate bei der Entstehung der postoperativen Hypoalbuminämie ist jedoch umstritten.

Bei chirurgischen Patienten finden sich besonders ausgeprägte Abnahmen der Albuminkonzentrationen. Deshalb wurden hier schon früher mehrfach Untersuchungen zur Bestimmung der Albuminsyntheserate durchgeführt (21, 28, 59, 64). In einer Studie von Rittler et al. (81) konnte gezeigt werden, dass sich bei elektiv operierten Patienten postoperativ spezifische Veränderungen der Albuminsynthese beobachten lassen. Die postoperative Albuminsynthese war bei gleichzeitig erniedrigter Albuminkonzentration interessanterweise im Vergleich zu gesunden Individuen signifikant erhöht. Nach Abschluss

der Rekonvaleszenz entsprachen die Werte der Albuminsynthese wieder den Normwerten. Auch in Bezug auf die Albuminkonzentration hatte vier Monate nach der Operation keiner der Patienten mehr eine erniedrigte Albuminkonzentration. Die durchschnittliche Konzentration der rekonvaleszenten Patienten lag sogar signifikant über der Albuminkonzentration unmittelbar postoperativ. Somit wird derzeit davon ausgegangen, dass eine chronische postoperative Verringerung der Albuminsynthese nicht für die Hypoalbuminämie verantwortlich zu machen ist. Hauptursache für das Absinken der Albuminkonzentration im Plasma sind am ehesten intraoperative Verluste (Blutung) und SIRS - induzierte postoperative Verluste ins Interstitium. Es ist wahrscheinlich, dass der durch die Hypoalbuminämie verminderte onkotische Druck sekundär die Albuminsynthese beschleunigt, um dadurch normale Konzentrationen so schnell wie möglich wieder zu erreichen.

5.4 Regulationsmechanismen der postoperativen Albuminsynthese durch parenterale Substrate

Es ist allgemein bekannt, dass der Ernährungszustand einen wichtigen, regulierenden Einfluss auf die Albuminsynthese hat (24). Die Albuminsynthese nimmt nach einer regulären Mahlzeit deutlich (um mehr als 100 %) zu (13). Bei funktionsuntüchtigem Gastrointestinaltrakt (wie es häufig postoperativ zu beobachten ist) müssen jedoch entsprechende Substrate, einschließlich Eiweiß, parenteral (in Form von Aminosäuren) zugeführt werden.

Allerdings gibt es bislang nur sehr wenige klinische Studien, in denen die Auswirkungen von parenteralen Substraten auf den Proteinmetabolismus selektiv untersucht wurden (7, 37, 38, 39, 56, 69, 70, 79, 80). Die bei diesen Studien bislang gewonnenen Erkenntnisse stellen nur Summeneffekte dar und beziehen sich in der Regel nur auf Interaktionen zwischen parenteraler Substratzufuhr und Bewahrung des Gesamtkörper-Eiweißbestandes. Somit erlauben diese Studien keine Differenzierung hinsichtlich der selektiven Auswirkungen dieser Substrate zum Beispiel auf die Leber oder auf das Intestinum. Die in diesen Studien beobachteten Effekte sind damit nicht repräsentativ für einzelne Organsysteme oder Proteine, stellten aber in der Vergangenheit die entscheidende Grundlage für die derzeit gültigen Dosisempfehlungen dar. Gerade aus chirurgischer Sicht wären jedoch Organ-spezifische Wirkungen von höchstem Interesse, da Organ-bezogene Heilungsvorgänge (z.B. nach Leber-

oder Darmresektionen) für einen komplikationsfreien postoperativen Verlauf von höchster Wichtigkeit sind.

Bislang gibt es nur in Tierexperimenten eine exakte Analyse der selektiven Auswirkungen von parenteral zugeführten Aminosäuren. Allerdings stößt man hier auf das Problem der Spezies-Spezifität (unterschiedliche Wirkung bei unterschiedlicher Spezies). Es konnte so z.B. gezeigt werden, dass bei Hunden während einer laufenden Aminosäureinfusion die Leuzinbilanz in denjenigen Organsystemen, die über die Portalvene drainiert werden, als Zeichen der Leuzin – Verstoffwechslung, signifikant positiv war (31, 40). Gleichzeitig kam es zu einem signifikanten Anstieg der intestinalen Proteinsynthese (103, 104). Im Vergleich dazu konnte eine ähnlich dosierte Aminosäureinfusion die intestinale Proteinsynthese bei Schweinen jedoch nicht signifikant steigern (2, 23).

Da es bezüglich der Albuminsynthese bis heute keine selektiven Studien am Menschen gibt, wollten wir den spezifischen Einfluss einer gängigen Standard–Aminosäureinfusion (in empfohlener Maximaldosierung) auf die postoperative hepatische Albuminsynthese gezielt untersuchen. Zentrales Ergebnis unserer Untersuchungen ist es, dass bei Patienten, die alle ein vergleichbares chirurgischen Trauma durchgemacht hatten, eine Standard-Aminosäurendosis von $0.067 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ die hepatische Albuminsynthese postoperativ nicht signifikant bzw. relevant steigern kann.

5.5 Ursachen für die mangelnde Effizienz parenteraler Aminosäuren

In klinischen Studien konnte am Menschen gezeigt werden, dass bei einem akut erhöhten hepatischen Aminosäureangebot (nach oraler Zufuhr) die Albuminsynthese nach bereits 30 Minuten signifikant gesteigert ist (13). Deshalb kann sicherlich ausgeschlossen werden, dass bei unseren Untersuchungen die Dauer der Aminosäureinfusion (insgesamt vier Stunden) nicht ausreichend war, um einen stimulierenden Effekt nachweisen zu können.

Ferner hätte es sein können, dass eine bereits vor Infusionsbeginn gesteigerte Albuminsyntheserate, einen späteren Anstieg unter Aminosäureinfusion verhindert hat. Dieser Aspekt muss deshalb bedacht werden, da in der bereits zuvor erwähnten Studie von Rittler et al. (81) gezeigt wurde, dass die postoperative Albuminsynthese in der postoperativen Phase,

in der auch unsere Patienten untersucht wurden, bereits im Nüchternzustand signifikant beschleunigt ist.

Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die bereits basal stimulierte Albuminsynthese ein limitierender Faktor bei unseren Untersuchungen war. Die von uns vor Beginn der Aminosäureinfusion gemessenen Albuminsyntheseraten waren nicht so sehr erhöht, als dass eine weitere Steigerung der Synthese grundsätzlich unmöglich gewesen wäre. Dass eine bereits derartig gesteigerte Albuminsyntheserate durch eine zusätzliche Erhöhung des hepatischen Aminosäureangebotes noch weiter stimuliert werden kann, wurde z.B. für die parenterale Ernährung während der Dialyse gezeigt (76).

Folglich muss es anderer Gründe dafür geben, dass die untersuchte Aminosäureinfusionsrate nicht in der Lage war, die hepatische Albuminsynthese signifikant zu erhöhen. Wenn man die Literatur genauer betrachtet, lässt sich vermuten, dass es eine mögliche Beziehung zwischen der Aminosäure-Dosis und der darauf folgenden Wirkung gibt. Diese Beziehung scheint jedoch zusätzlich auch von der speziell untersuchten Spezies abhängig zu sein. Hinweise für Dosis-Wirkungsbeziehungen bei der Albuminsynthese gibt es zum Beispiel durch Befunde, die an gesunden Ratten gewonnen wurden. In diesen Untersuchungen konnte kein positiver Effekt auf die Albuminsynthese nachgewiesen werden, wenn eine Aminosäureinfusion mit der Dosis von $0,5-0,7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ verwendet wurde (65, 71, 98). Bei einer höheren Dosis von $1,2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ konnte in derselben Spezies die Albuminsynthese jedoch signifikant gesteigert werden (6).

Auch bei einigen klinischen Studien konnte eine Dosis / Wirkung – Beziehung hinsichtlich der Albuminsynthese festgestellt werden. Untersucht wurden Aminosäuredosierungen zwischen $0,067$ und $0,2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Dabei blieb die Albuminsynthese bei Infusionsraten von $0,12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (7) oder weniger (wie in unserer Studie) unverändert. Im Gegensatz dazu nahm die Albuminsynthese bei Infusionsraten zwischen $0,16$ und $0,2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ deutlich zu (56, 76). Die anabole Wirkung dieser sehr hoch dosierten Aminosäureinfusion konnte auch für die Proteinsynthese im gesamten Splanchnikusgebiet nachgewiesen werden (69).

Der Vollständigkeit halber sollen hier noch drei ältere klinische Studien erwähnt sein, in denen von einer gesteigerten Albuminsynthese bei einer sehr niedrigen Aminosäuredosierung ($0,04 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) berichtet wird (52, 88, 92). In diesen Studien wurde allerdings ein ungeeignetes Äquivalent für die hepatische Präkursorpoolanreicherung verwendet. Dies kann zu irrtümlich hohen Albuminsyntheseraten führen (76), weshalb diese Studien keine gesicherte Aussagekraft haben.

Unter Berücksichtigung der vorliegenden verwertbaren Studien kann man davon ausgehen, dass die Auswirkungen von parenteral zugeführten Aminosäuren auf die hepatische Albuminsynthese abhängig sind von der jeweilig verwendeten Aminosäuredosis. Ein stimulierender Effekt konnte bislang nur dann nachgewiesen werden, wenn die periphere Plasmaamino­säurekonzentration auf das Doppelte bis Dreifache des Nüchtern - Niveaus angehoben wurde (56, 63, 76). Diese sehr hohen peripheren Aminosäurekonzentrationen können aber mit den aktuell empfohlenen, maximalen Infusionsraten für Aminosäuren ($0,067 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ oder $1,5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) nicht erreicht werden. Diese sehr hohen Aminosäuredosen (bei parenteraler Zufuhr) werden aber vermutlich benötigt, um eine ausreichend hohe Aminosäurekonzentration in der Pfortader erzielen zu können.

Es ist bekannt, dass der eigentlich bestimmende Faktor für die Aufnahme und Verstoffwechslung von Aminosäuren in der Leber die Aminosäurekonzentration in der Pfortader ist (31, 104). Die Aminosäurekonzentration in der Pfortader ist somit auch der entscheidende Faktor für die Rate der hepatischen Proteinsynthese und speziell der Albuminsynthese. Bei einer parenteralen (zentralvenösen) Aminosäureinfusion ist die Aminosäurekonzentration in der Pfortader aber signifikant niedriger als die Aminosäurekonzentration im arteriellen Blut. Dieser Sachverhalt erklärt auch, weshalb eine orale/enterale Proteinzufuhr in der Lage ist, die Proteinsynthese in der Leber wesentlich effektiver zu steigern, als eine parenterale Aminosäuregabe. Bei einer enteralen Nahrungszufuhr kann in vergleichsweise kurzer Zeit eine signifikant höhere Aminosäurekonzentration in der Pfortader erreicht werden (104). Somit sind bereits geringe Mengen von enteral zugeführten Proteinen (25g) ausreichend, um die Albuminsynthese der menschlichen Leber rasch und effektiv zu steigern (15).

Unsere Ergebnisse legen es nahe, dass die gegenwärtig empfohlenen Dosen zur parenteralen Aminosäure-Zufuhr (55) nicht ausreichend sind, um die hepatische Proteinsynthese im Postaggressionssyndrom relevant zu steigern. Diese Unterdosierung könnte gerade nach Leberresektionen von Bedeutung sein, da hier ein zusätzlicher Bedarf für eine erhöhte hepatische Proteinsynthese im Rahmen regenerativer Vorgänge besteht. Somit scheint aus Sicht der speziellen Organfunktion ein Überdenken der aktuellen Empfehlungen zur Aminosäuredosierung nach chirurgischem Trauma nötig.

6. Zusammenfassung

Nach chirurgischer Homöostasestörung kommt es regelhaft zu Veränderungen im Körper, die die Organfunktion, das Immunsystem und den Stoffwechsel betreffen. Unter anderem tritt eine deutliche Hypoalbuminämie auf, deren genaue Ursache nicht eindeutig geklärt ist. Auch ist nicht bekannt, in wieweit sich der postoperativ veränderte Albuminmetabolismus durch parenterale Substrate günstig beeinflussen lässt.

In der vorliegenden Arbeit wollten wir untersuchen, welchen selektiven Einfluss eine Standard – Aminosäureinfusion in üblicher Dosierung auf die postoperative Albuminsynthese hat. Die an der Studie teilnehmenden Patienten (zwei Gruppen) mussten sich alle einem vergleichbaren, großen kolorektalen Eingriff unterziehen. Sechs Patienten bildeten die Kontrollgruppe und weitere zwölf Patienten die Gruppe der Patienten, die parenteral Aminosäuren zugeführt bekamen. Alle Patienten wurden am 8. – 10. postoperativen Tag im nüchternen Zustand untersucht.

Für die Bestimmung der fraktionellen Albuminsyntheserate mittels der Stablen-Isotopen-Technik erhielten alle Patienten eine Bolusinjektion von $9,6 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ und anschließend eine 10-stündige Infusion von $0,16 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Min.}^{-1}$ der Traceraminosäure $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-Leuzin}$. Die Kontrollgruppe erhielt nach einer Basalperiode (Phase I, Nüchternzustand) in der Phase II der Studie (sechs bis zehn Stunden nach Infusionsbeginn) eine Infusion mit 0.9. % NaCl – Lösung. In der Testgruppe wurde in der Phase II eine Standard – Aminosäurelösung parenteral in einer Dosis von $0,067 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ zugeführt. Diese Dosis entspricht den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Ernährungsmedizin.

Vor Beginn der Isotopeninfusion, sowie drei, sechs und zehn Stunden nach dem Start der Isotopenzufuhr wurden den Patienten Blutproben für die massenspektrometrische Analyse und für die Messung der Albumin-Konzentration entnommen. Die albumingebundene Tracer-Anreicherung wurde mit Hilfe der Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (GC-IRMS), die Tracer-Anreicherung im Präkursorpool für die Albuminsynthese (Plasma-Anreicherung der Ketoisocaprinsäure) mit Hilfe des Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GCMS) bestimmt. Unter Verwendung dieser

beiden Anreicherungen konnten die fraktionelle und die absolute Albuminsyntheserate berechnet werden.

Es ergab sich sowohl für die fraktionelle, als auch für die absolute Albuminsyntheserate kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Patientengruppen. Somit war eine Standard – Aminosäureinfusion auch unter der empfohlenen maximalen Zufuhr rate nicht in der Lage, die postoperative Albuminsynthese signifikant zu steigern. Dieser Befund steht im Widerspruch zur gut dokumentierten Effizienz einer oralen/enteralen Eiweißzufuhr hinsichtlich der Stimulation der hepatischen Albuminsyntheserate.

Anhand der Literatur konnte ausgeschlossen werden, dass ein zu kurzer Untersuchungszeitraum oder die bereits in der Basalperiode deutlich gegenüber dem Normalzustand erhöhte Albuminsyntheserate für den fehlenden Effekt verantwortlich waren. Es ist wahrscheinlich, dass bei parenteraler Zufuhr deutlich höhere Aminosäuredosen ($0,2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) als die bisher empfohlenen nötig sind, um die Aminosäurekonzentrationen in der Pfortader zu erreichen, die für eine Stimulation der Albuminsynthese notwendig sind. Somit erscheint aus Sicht der spezifischen Organfunktion ein Überdenken der aktuellen Dosisempfehlungen notwendig.

7. Anhang

7.1. Tabellen

Tabelle 1: Diagnosen und Operationen der untersuchten Patienten

Diagnose	
Kontrollkollektiv	Kollektiv mit Aminosäureinfusion
#1. Rektumkarzinom	#1. Rektumkarzinom
#2. Rektumkarzinom	#2. Rektumkarzinom
#3. Sigmakarzinom	#3. Sigmakarzinom
#4. Rektumkarzinom	#4. Rektumkarzinom
#5. Sigmakarzinom	#5. Rektumkarzinom
#6. Rektumkarzinom	#6. Rektumkarzinom
	#7. Rektumkarzinom
	#8. Rektumkarzinom
	#9. Rektumkarzinom
	#10. Colonkarzinom
	#11. Rektumkarzinom
	#12. Rektumepitheldysplasie

Operationen	
Kontrollkollektiv	Kollektiv mit Aminosäureinfusion
#1. Tiefe anteriore Rektumresektion	#1. Tiefe anteriore Rektumresektion
#2. Anteriore Rektumresektion	#2. Tiefe anteriore Rektumresektion
#3. Hemikolektomie	#3. Tiefe anteriore Rektumresektion
#4. Anteriore Rektumresektion	#4. Tiefe anteriore Rektumresektion
#5. Anteriore Rektumresektion	#5. Tiefe anteriore Rektumresektion
#6. Tiefe anteriore Rektumresektion	#6. Tiefe anteriore Rektumresektion
	#7. Tiefe anteriore Rektumresektion
	#8. OP nach Hartmann
	#9. Tiefe anteriore Rektumresektion
	#10. Colonteilresektion
	#11. Tiefe anteriore Rektumresektion
	#12. OP nach Hartmann

Tabelle 2: Materialtabelle

Acrylamid für die Elektrophorese	Merck	1.10784.0100
N,N'-Methylen-bis-acrylamid	Fluka	66669
Aqua ad iniectabilia	Braun	
Bromphenolblau	Merck	8122.0025
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan p.a.	Merck	1.08382.1000
Salzsäure 6N	Apotheke Innenstadt	L 0025
Salzsäure 1N	Merck	1.09057.1000
Salzsäure Gas	Labor Prof. Wanner Institut für Pharmazie	
Glycerin	Merck	8.18709.1000
Natriumdodecylsulfat (=SDS) microselect	Fluka	71727
N,N,N',N'-tetramethyldiamid (TEMED)	Fluka	87689
Ammoniumperoxodisulfat p.a.	Fluka	09915
Coomassie R-250	Fluka	27816
Ethanol p.a.	Merck	1.00983.2500
Ethanol 96%	Apotheke im Haus	
Essigsäure p.a.	Merck	1.00062.1000
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat p.a.	Fluka	71500
Natriumhydroxid Granulat p.a.	Fluka	71691
Natriumhydroxid 1N	Merck	1.09137.1000
Glycin für die Elektrophorese	Merck	1.04169.1000
Trichloressigsäure pro analysi	Merck	1.00807.0250
Ammoniumsulfat microselect	Fluka	09978
Essigsäureanhydrid (98%)	Sigma	A-6404
Triethylamin p.a.	Fluka	90340
1-Propanol für die Chromatographie	Merck	1.01024.1000
Ethylacetat p.a.	Merck	1.109623.1000
Natriumchlorid p.a.	Merck	6404.1000
Natriumsulfat wasserfrei p.a.	Merck	6649.0500
Mercaptoethanol	Fluka	63690
bis(Trimethylsilyl)Trifluoroacetamid	Sigma	T-1506
α -Ketoisocaprönsäure Natriumsalz (C ₆ H ₉ O ₃ M=152.1)	Sigma	
Albumin Reagent (BCG)	Sigma	631-2
Proteinstandard Gesamtpr.:80g/l; Albumin 50g/l	Sigma	A-540-10
Albumin, human, Fraktion V 96-99%	Sigma	A-1653
Albumin, human, 99% (Agaroseelektrophorese)	Sigma	A-3782
Serum-Rinder-Albumin ORHD 20/21	Behringwerke Ag Marburg	
Rinder-Albumin \geq 98%	ICN	130700
2,2-Dimethoxypropan Stock-Number:217725	Alltech	784+40
Ninhydrin	Merck	6762.0010
L-Leucine	Sigma	L-1512
Bioquant Protein (nach Biuret)	Merck	1.10307.0500
Bioquant Protein (nach Bradford)	Merck	1.10306.0500
Rainbowmarker RPN 756	Biorad	
α -saures Glycoprotein Reinheit 99%	Sigma	G-9885
Phosphorylase b from rabbit muscle	Sigma	P-6635
Myosin from porcine muscle	Sigma	M-0273
α -Ketoisocaprönsäure Natriumsalz 1- ¹³ C ¹³ C: 99%	Cambridge Isotope Laboratories	

Tabelle 3: Tabelle der verwendeten Lösungen

Acrylamid-Stammlösung (100 ml)	30% Acrylamid 0,8% Bisacrylamid 69,2% Wasser	30,0 g 0,8 g Auf 100 ml
Probenpuffer (100 ml)	Tris/HCl 0,1M (pH 6,5) 20% Glycerin 4% SDS 0,02% Bromphenolblau Wasser	1,21 g 20 g 4 g 20 µg Auf 100 ml
Trenngelpuffer (100 ml)	Tris/HCl 1,5M (pH 8,8)	18,17 g
Sammelgelpuffer (50 ml)	Tris/HCl 0,5M (pH 6,8)	3,02 g
SDS (10 ml)	10% SDS 90% Wasser	1 g Auf 10 ml
TEMED	10% TEMED 90% Wasser	30 µl 270 µl
Persulfatlösung	10% Ammoniumperoxodisulfat 90% Wasser	50 µg 450 µl
Elektrodenpuffer (1000 ml)	192mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS	144,1 g 30,2 g 10,0 g
Elutionspuffer (500 ml)	50mM (pH 7,2) Na- Dihydrogenphosphat	39,0 g (mit NaOH einstellen)
Fixier-und Färbelösung (500 ml)	0,1% Coomassie R-250 40% Ethanol 10% Essigsäure (96%) 50% Wasser	0,5 g 200 ml 52 ml 250 ml
Entfärberlösung (500 ml)	40% Ethanol 10% Essigsäure 50% Wasser	200 ml 50 ml 250 ml
Filterpapier-Lösung (500 ml)	20% Ethanol 10% Glycerol 70% Wasser	100 ml 50 ml 350 ml

Tabelle 4: Plasmaalbumin in mg/dl

	Kontrollgruppe	Gruppe mit Aminosäureinfusion
#1	2,7	3,4
#2	4,6	2,9
#3	3,4	3,6
#4	3,7	1,7
#5	4,3	3,7
#6	2,9	2,7
#7		3,5
#8		3,7
#9		3,8
#10		3,8
#11		3,5
#12		3,6
MW	3,6	3,3
StAbw	0,7	0,6
SEM	0,3	0,2

Tabelle 5: Größe, Gewicht, und body mass index (BMI)

Kontrollgruppe:

Nummer	Alter	Größe (cm)	Gewicht	BMI
# 1	54	179	80,2	25,0
# 2	54	181	83,0	25,3
# 3	55	162	55,0	21,0
# 4	52	158	62,0	24,8
# 5	74	172	60,0	20,3
# 6	69	170	83,6	28,9
MW	59,7	170,3	70,6	24,2
StAbw.	8,5	8,3	11,9	2,9
SEM	3,5	3,4	4,8	1,2

Aminosäuregruppe:

Nummer	Alter	Größe (cm)	Gewicht	BMI
# 1	53	180	80,2	24,8
# 2	62	188	86,4	24,5
# 3	66	178	88,5	27,9
# 4	62	167	70,0	25,1
# 5	63	182	82,7	25,0
# 6	63	174	78,1	25,8
# 7	57	165	70,0	25,7
# 8	70	175	68,7	22,4
# 9	64	164	70,0	26,0
# 10	69	150	75,0	33,3
# 11	72	172	73,0	24,7
# 12	79	167	60,0	21,5
MW	65	171,8	75,2	25,6
StAbw	6,6	9,6	7,9	2,8
SEM	1,9	2,8	2,3	0,8

Tabelle 6: Deltawerte des albumingebundenen Leuzins, Isotopomerenverhältnisse der Plasma-Ketoisocaprinsäure, Tracer/Tracee-Verhältnisse der untersuchten Patienten

Kontrollgruppe:

	Delta Albumin vor Isotopeninfusion	Delta Albumin 1	Delta Albumin 2	Delta Albumin 3	Isotopomerenverhältnis KIC vor Isotopeninfusion	Isotopomerenverhältnis KIC 1	Isotopomerenverhältnis KIC 2	Isotopomerenverhältnis KIC 3
# 1	-26,4	-21,4	-16,2	-8,4	0,2153	0,2543	0,2654	0,2702
# 2	-25,9	-21,0	-15,7	-3,6	0,2169	0,2648	0,2713	0,2687
# 3	-25,2	-17,9	-10,3	-2,4	0,2153	0,2613	0,2647	0,2680
# 4	-27,7	-17,6	-5,9	3,0	0,2175	0,2739	0,2726	0,2834
# 5	-27,7	-22,1	-16,9	-5,5	0,2153	0,2647	0,2687	0,2727
# 6	-28,0	-18,5	-7,0	6,4	0,1871	0,2543	0,2619	0,2555
MW	-26,82	-19,75	-12,00	-1,75	0,211238333	0,26221333	0,26743000	0,26974333
St.Abw	1,05	1,80	4,48	5,02	0,010816393	0,00678043	0,00377922	0,00820159
SEM	0,43	0,73	1,83	2,05	0,004415774	0,00276810	0,00154286	0,00334828

	Tracer/Tracee-Verhältnis Albumin 1	Tracer/Tracee-Verhältnis Albumin 2	Tracer/Tracee-Verhältnis Albumin 3	Tracer/Tracee-Verhältnis KIC 1	Tracer/Tracee-Verhältnis KIC 2	Tracer/Tracee-Verhältnis KIC 3
#1	0,00055137	0,00112538	0,00198751	0,0390	0,0501	0,0549
#2	0,00054034	0,00112538	0,00246336	0,0479	0,0544	0,0518
#3	0,00080519	0,00164471	0,00251871	0,0460	0,0494	0,0527
#4	0,00111434	0,00240800	0,00339409	0,0564	0,0551	0,0659
#5	0,00061758	0,00119165	0,00245229	0,0494	0,0534	0,0574
#6	0,00104808	0,00231945	0,00380455	0,0672	0,0748	0,0683
MW	0,00077948	0,00163576	0,00277009	0,05097500	0,05619167	0,05850500
St.Abw	0,00023107	0,00054499	0,00062319	0,00886142	0,00856195	0,00637820
SEM	0,00009433	0,00022249	0,00025442	0,00361766	0,00349540	0,00260389

Aminosäuregruppe:

	Delta Albumin vor Isotopeninfusion	Delta Albumin 1	Delta Albumin 2	Delta Albumin 3	Isotopomerenver- hältnis KIC vor Isotopeninfusion	Isotopomeren- verhältnis KIC 1	Isotopomeren verhältnis KIC 2	Isotopomeren verhältnis KIC 3
# 1	-27,3	-12,3	-2,3	9,7	0,19164	0,24602	0,24422	0,23913
# 2	-26,9	-16,5	-5,9	5,2	0,18988	0,25597	0,25545	0,25979
# 3	-27,8	-21,9	-16,7	-8,2	0,18765	0,24989	0,25925	0,24636
# 4	-26,7	-13,3	2,5	27,3	0,18289	0,23899	0,24111	0,23938
# 5	-27,5	-17,7	-9,1	9,9	0,18985	0,24608	0,25218	0,24746
# 6	-27,1	-15,3	-1,4	8,3	0,18781	0,24889	0,25367	0,25337
# 7	-27,3	-19,9	-12,3	-2,4	0,17342	0,23124	0,23949	0,23887
# 8	-28,1	-17,7	-11,6	3,2	0,18639	0,25172	0,25810	0,23126
# 9	-24,8	-19,5	-10,6	-6,1	0,17798	0,28165	0,28527	0,27509
# 10	-27,3	-24,0	-18,7	-12,3	0,20052	0,23006	0,22501	0,26824
# 11	-26,3	-22,7	-17,6	-11,0	0,20105	0,26587	0,26316	0,25336
# 12	-26,5	-20,4	-4	17,8	0,19833	0,25819	0,26260	0,25387
MW	-26,97	-18,43	-8,98	3,45	0,18895083	0,25038118	0,25329215	0,25051511
St.Abw	0,81	3,50	6,86	11,55	0,00808785	0,01372646	0,01441066	0,01230943
SEM	0,24	1,01	1,98	3,33	0,00233476	0,00396249	0,00416000	0,00355343

Tracer/Tracee- Tracer/Tracee- Tracer/Tracee-

Tracer/Tracee- Tracer/Tracee- Tracer/Tracee-

	Verhältnis Albumin 1	Verhältnis Albumin 2	Verhältnis Albumin 3	Verhältnis KIC 1	Verhältnis KIC 2	Verhältnis KIC 3
#1	0,00165576	0,00276235	0,00409317	0,05438	0,05258	0,04749
#2	0,00114747	0,00231945	0,00354937	0,06609	0,06557	0,06991
#3	0,00065068	0,00122479	0,00216452	0,06224	0,07160	0,05871
#4	0,00147891	0,00322778	0,00598394	0,05610	0,05822	0,05649
#5	0,00108121	0,00203176	0,00413758	0,05623	0,06233	0,05761
#6	0,00130212	0,00283990	0,00391554	0,06108	0,06586	0,06556
#7	0,00081623	0,00165576	0,00275128	0,05782	0,06607	0,06545
#8	0,00114747	0,00182161	0,00346063	0,06533	0,07171	0,04487
#9	0,00058668	0,00156954	0,00206716	0,10367	0,10729	0,09711
#10	0,00036385	0,00094807	0,00165576	0,02954	0,02449	0,06772
#11	0,00039693	0,00095974	0,00168893	0,06482	0,06211	0,05231
#12	0,00067275	0,00248627	0,00490430	0,05986	0,06427	0,05554
MW	0,00094167	0,00198725	0,00336435	0,06143035	0,06434131	0,06156428
StAbw	0,00040435	0,00075419	0,00128888	0,01573580	0,01763260	0,01307176
SEM	0,00011673	0,00021772	0,00037207	0,00454254	0,00509009	0,00377349

Tabelle 7: Fraktionelle Syntheserate (FSR), absolute Albuminsyntheserate (ASR)

I: Stunde 3-6 der Tracerinfusion, II: Stunde 6-10 der Tracerinfusion

Kontrollgruppe:

	FSR Phase I (%/Stunde)	FSR Phase II (%/Stunde)	FSR Phase I (%/Tag)	FSR Phase II (%/Tag)	ASR I mg/kg Tag	ASR II mg/kg Tag
#1	0,47	0,41	11,23	9,84	129,02	113,05
#2	0,39	0,66	9,46	15,83	187,43	313,64
#3	0,58	0,43	13,91	10,39	195,63	146,12
#4	0,76	0,42	18,14	10,11	256,83	143,14
#5	0,45	0,52	10,71	12,59	214,53	252,19
#6	0,57	0,58	13,73	13,90	154,87	156,89
MW	0,54	0,50	12,86	12,11	189,72	187,50
St.Abw	0,12	0,09	2,85	2,21	40,94	71,01
SEM	0,05	0,04	1,16	0,90	16,72	28,99

Aminosäuregruppe:

	FSR Phase I (%/Stunde)	FSR Phase II (%/Stunde)	FSR Phase I (%/Tag)	FSR Phase II (%/Tag)	ASR I mg/kg Tag	ASR II mg/kg Tag
#1	0,72	0,68	17,22	16,23	240,77	226,87
#2	0,58	0,45	14,01	10,76	190,04	145,95
#3	0,29	0,35	6,94	8,44	101,71	123,72
#4	0,93	1,27	22,25	30,48	170,25	233,23
#5	0,52	0,90	12,41	21,70	178,87	312,68
#6	0,74	0,44	17,80	10,62	178,59	106,53
#7	0,43	0,41	10,38	9,83	143,44	135,85
#8	0,36	0,69	8,69	16,66	136,14	260,98
#9	0,31	0,12	7,50	2,95	104,41	41,03
#10	0,70	0,40	16,83	9,65	234,67	134,56
#11	0,29	0,33	7,02	7,81	118,68	132,11
#12	0,58	0,61	14,04	14,54	192,78	199,65
MW	0,54	0,55	12,92	13,31	163,42	171,10
StAbw	0,21	0,30	4,97	7,31	45,45	73,01
SEM	0,06	0,09	1,43	2,11	13,12	21,08

7.2 Verzeichnisse

7.2.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnosen und Operationen der untersuchten Patienten	50
Tabelle 2: Materialtabelle	51
Tabelle 3: Tabelle der verwendeten Lösungen	52
Tabelle 4: Plasmaalbumin in mg/dl	53
Tabelle 5: Größe, Gewicht, und body mass index (BMI)	54
Tabelle 6: Deltawerte des albumingebundenen Leuzins, Isotopomerenverhältnisse der Plasma-Ketoisocapronsäure, Tracer/Tracee-Verhältnisse der untersuchten Patienten	55
Tabelle 7: Fraktionelle Syntheserate (FSR), absolute Albuminsyntheserate (ASR)	58
I: Stunde 3-6 der Tracerinfusion, II: Stunde 6-10 der Tracerinfusion	58

7.2.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Studienablauf	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung des GC-IRMS- Systems	20
Abbildung 3: Schematische Darstellung der GC – Massenspektrometrie	25
Abbildung 4: Tracer/Tracee-Verhältnisse des albumingebundenen Leuzins	30
Abbildung 5: Isotopomerenverhältnisse der Ketoisocapronsäuren	31
Abbildung 6: Tracer/Tracee-Verhältnisse der KIC	33
Abbildung 7: Fraktionelle Albuminsyntheseraten der untersuchten Patienten	34
Abbildung 8: Absolute Albuminsyntheseraten der untersuchten Patienten	36

:

7.2.3 Literaturverzeichnis

- 1 Adams RF; Determination of amino acid profiles in biological samples by gas chromatography, *J Chromatogr* 95: 189-212, 1974
- 2 Adegoke OA, McBurney MI, Samuels SE, Baracos VE; Modulation of intestinal protein synthesis and protease mRNA by luminal and systemic nutrients, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: 1017-1026, 2003
- 3 Ahlman B, Charlton M, Fu A, Berg C, O'Brien P, Nair KS; Insulin's effect on synthesis rates of liver proteins. A swine model comparing various precursors of protein synthesis, *Diabetes* 50: 947-954, 2001
- 4 ASPEN Board of directors and the clinical guidelines task force. Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients, *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 26: 1-138, 2002
- 5 Ballmer PE, McNurlan MA, Milne E, Heys SD, Buchan V, Calder AG, Garlick PJ; Measurement of albumin synthesis in humans: a new approach employing stable isotopes, *Am J Physiol* 259: 797 – 803, 1990
- 6 Ballmer PE, McNurlan MA, Grant I, Garlick PJ; Down-Regulation of albumin synthesis in the rat by human recombinant interleukin-1beta or turpentine and the response to nutrients, *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 19: 266-271, 1995
- 7 Ballmer PE, McNurlan MA, Essen P, Anderson SE, Garlick PJ; Albumin synthesis rates measured with [²H₅ring]phenylalanine are not responsive to short-term intravenous nutrients in healthy humans, *J Nutr* 125: 512-519, 1995
- 8 Barber MD, Fearon KCH, McMillan DC, Slater C, Ross JA, Preston T; Liver export protein synthetic rates are increased by oral meal feeding in weight-losing cancer patients, *Am J Physiol* 279: 707 – 714, 2000

- 9 Barle H, Januszkiewicz A, Hallström L, Essén P, McNurlan MA, Garlick PJ, Wernerman J; Albumin synthesis in humans increases immediately following the administration of endotoxin, *Clin Sci (Lond)* 103: 525-531, 2002
- 10 Bisschop PH, De Sain van der Velden MGM, Stellaard F, Kuipers F, Meijer AJ, Sauerwein HP, Romijn JA; Dietary carbohydrate deprivation increases 24-hour nitrogen excretion without affecting postabsorptive hepatic or whole body protein metabolism in healthy men, *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3801-3805, 2003
- 11 Björling H; Plasma fractionation methods used in Sweden, *Vox Sang* 23: 18-25, 1972
- 12 Carli F, Webster J, Ramachandra V, Pearson M, Read M, Ford GC, McArthur S, Preedy VR, Halliday D; Aspects of protein metabolism after elective surgery in patients receiving constant nutritional support, *Clin Sci (Lond)* 78: 621-628, 1990
- 13 Caso G, Feiner J, Mileva I, Bryan LJ, Kelly P, Autio K, Gelato MC, McNurlan MA; Response of albumin synthesis to oral nutrients in young and elderly subjects, *Am J Clin Nutr* 85: 446-451, 2007
- 14 Cayol M, Boire Y, Prugnaud J, Gachon P, Beaufrère B, Obled C; Precursor pool for hepatic protein synthesis in humans: effects of tracer route infusion and dietary proteins, *Am J Physiol* 270: 980 – 987, 1996
- 15 Cayol M, Boirie Y, Rambourdin F, Prugnaud J, Gachon P, Beaufrère B, Obled C; Influence of protein intake on whole body and splanchnic leucine kinetics in humans, *Am J Physiol* 272: 584 – 591, 1997
- 16 Cayol M, Tauveron I, Rambourdin F, Prugnaud J, Gachon P, Thieblot P, Grizard J, Obled C; Whole-body protein turnover and hepatic protein synthesis are increased by vaccination in man, *Clin Sci (Lond)* 89: 389-396, 1995

- 17 Cohn EJ et al; Preparation and properties of serum and plasma proteins. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids, *Am J Chem Soc* 68: 459 – 475, 1946
- 18 Curling JM, Berglöf J, Lindquist L-O, Eriksson S; A chromatographic procedure for the purification of human plasma albumin, *Vox Sang* 33: 97-107, 1977
- 19 Cuthbertson DP; Alterations in metabolism following injury: part I, *Injury* 11: 175-189, 1980
- 20 Dagher FJ, Lyons JH, Finlayson DC, Shamsai J, Moore FD; Blood volume measurement: a critical study prediction of normal values: controlled measurement of sequential changes: choice of a bedside method, *Adv Surg* 1: 69 – 109, 1965
- 21 Dahn MS, Jacobs LA, Smith S, Lange MP, Mitchell RA, Kirkpatrick JR; The significance of hypoalbuminemia following injury and infection, *Am J Surg* 51: 340–343, 1985
- 22 Davis TA, Reeds PJ; Of flux and flooding: the advantages and problems of different isotopic methods for quantifying protein turnover in vivo: part II. Methods based on the incorporation of tracer, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4: 51-56, 2001
- 23 Davis TA, Fiorotto ML, Burrin DG, Reeds PJ, Nguyen HV, Beckett PR, Vann RC, O'Connor PM; Stimulation of protein synthesis by both insulin and amino acids is unique to skeletal muscle in neonatal pigs, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: 880-890, 2002
- 24 DeFeo P, Horber FF, Haymond MW; Meal stimulation of albumin synthesis: a significant contributor to whole body protein synthesis in humans, *Am J Physiol* 263: 794 – 799, 1992

- 25 De Sain van der Velden MGM, Kaysen GA, DeMeer K, Stellaard F, Voorbij HAM, Reijngoud D-J, Rabelink TJ, Koomas HA; Proportionate increase of fibrinogen and albumin synthesis in nephrotic patients: Measurements with stable isotopes, *Kidney Int* 53: 181-188, 1998
- 26 Doweiko JP, Nompleggi DJ; The role of albumin in human physiology and pathophysiology, *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 15: 207-211, 1991
- 27 Elliot M, Alberti KGMM; The hormonal and metabolic response to surgery and trauma, *New Asp Clin Nutr* 1: 247-270, 1983
- 28 Essén P, McNurlan MA, Gamrin L, Hunter K, Calder G, Garlick PJ, Wernerman J; Tissue protein synthesis rates in critically ill patients, *Crit Care Med* 26: 92-100, 1998
- 29 Evans TW; Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure; *Aliment Pharmacol Ther* 16: 6-11, 2002
- 30 Fearon KCH, Falconer JS, Slater C, McMillan DC, Ross JA, Preston T; Albumin synthesis rates are not decreased in hypoalbuminemic cachectic cancer patients with an ongoing acute-phase protein response, *Ann Surg* 227: 249-254, 1998
- 31 Ferrannini E, DeFronzo RA, Gusberg R, Tepler J, Jacob R, Aaron M, Smith D, Barrett EJ; Splanchnic amino acid and glucose metabolism during amino acid infusion in dogs, *Diabetes* 37: 237-245, 1988
- 32 Fleck A, Raines G, Hawker F, Trotter J, Wallace PI, Ledingham I, Calman KC; Increased vascular permeability: A major cause of hypoalbuminemia in disease and injury, *Lancet* 6: 781-783, 1985
- 33 Fleck A, Colley CM, Myers MA; Liver export proteins and trauma, *Br Med Bull* 3: 265-273, 1985

- 34 Ford GC, Cheng KN, Halliday D; Analysis of (1-¹³C)leucine and (13C)KIC in plasma by capillary gas chromatography/mass spectrometry in protein turnover studies, *Biomed Mass Spectrom* 8: 432-436, 1985
- 35 Fu A, Morris JC, Ford GC, Nair KS; Sequential purification of human apolipoprotein B-100, albumin and fibrinogen by immunoaffinity. Chromatography for measurement of protein synthesis, *Anal Biochem* 247: 228-236, 1997
- 36 Garlick PJ, McNurlan MA, Essen P, Wernerman J; Measurement of tissue protein synthesis in rats in vivo: a critical analysis of contrasting methods, *Am J Physiol* 266: 278 – 297, 1994
- 37 Gelfand RA, Glickman MG, Jacob R, Sherwin RS, DeFronzo RA; Removal of infused amino acids by splanchnic and leg tissues in humans, *Am J Physiol* 250: 407-413, 1986
- 38 Gelfand RA, Glickman MG, Castellino P, Louard RJ, DeFronzo RA; Measurement of l-[1-¹⁴C]leucine kinetics in splanchnic and leg tissues in humans. Effect of amino acid infusion, *Diabetes* 37: 1365 – 1372, 1988
- 39 Gil KM, Gump FE, Starker PM, Askanazi J, Elwyn DH, Kinney JM; Splanchnic substrate balance in malnourished patients during parenteral nutrition, *Am J Physiol* 248: 409-419, 1985
- 40 Hamada K, Matsumoto K, Okamura K, Doi T, Minehira K, Shimizu S; Effect of amino acids and glucose on exercise-induced gut and skeletal muscle proteolysis in dogs, *Metabolism* 48: 161-166, 1999
- 41 Heyland DK, Dhaliwal R, Drover JW, Gramlich L, Dodek P; Canadian critical care. Clinical practice guidelines committee. Canadian clinical practice guidelines for nutrition support in mechanically ventilated, critically ill adult patients, *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 27: 355-73, 2003

- 42 Hart DW, Wolf SE, Mlcak R, Chinkes DL, Ramzy PI, Obeng MK, Ferrando AA, Wolfe RR, Herndon DN; Persistence of muscle catabolism after severe burn, *Surgery* 128: 312-319, 2000
- 43 Hartl WH, Inthorn D; Postoperative systemkomplikationen, *Berchold Chirurgie* 17: 223-242, 2000
- 44 Hartl WH, Rittler P, Veränderungen des substratstoffwechsels bei chirurgischen erkrankungen unter besonderer berücksichtigung des eiweißhaushalts, *akt ernähr - med* 22: 154-163, 1997
- 45 Hartl WH, Demmelmair H, Jauch KW, Schmidt HL, Koletzko B, Schildberg FW; Determination of protein synthesis in human rectal cancer in situ by continuous [1-13C]leucine infusion, *Am J Physiol* 272: 796 – 802, 1997
- 46 Hasset J, Border JR; The metabolic response to trauma and sepsis, *World J Surg* 7: 125-131, 1983
- 47 Hill GL, Douglas RG, Schroeder D; Metabolic basis for the management of patients undergoing major surgery, *World J Surg* 17: 146-153, 1993
- 48 Hill PG; The measurement of albumin in serum and plasma, *Ann Clin biochem* 22: 65-78, 1985
- 49 Hoedet-Rasmussen K, Jarnum S; Investigation of postoperative hypoalbuminaemia, *Acta Chir Scand* 122: 459-465, 1961
- 50 Hoye RC, Paulson MD, Ketcham AS; Total circulating albumin deficits occurring with extensive surgical procedures, *Surg Gynecol Obstet* 131: 943-952; 1970
- 51 Hunter KA, Ballmer PE, Anderson SE, Broom J, Garlick PJ, McNurlan MA; Acute stimulation of albumin synthesis rate with oral meal feeding in healthy subjects measured with (ring-2H5)phenylalanine, *Clin Sci (Lond)* 88: 235-242, 1995

- 52 Hunter DC, Weintraub M, Blackburn GL, Bistrian BR; Branched chain amino acids as the protein component of parenteral nutrition in cancer cachexia, *Br J Surg* 76: 149-153, 1989
- 53 Jacobs R, Demmelmair H, Rittler P, Kellermann J, Koletzko B, Krick M, Jauch KW, Hartl WH; Isolation of plasma albumin by ethanol extraction is inappropriate for isotope ratio measurements during the acute phase response, *J Chrom B* 817: 145-151, 2005
- 54 Jarnum S; Plasma protein exudation in the peritoneal cavity during laparotomy, *Gastroenterology* 41: 107-118, 1961
- 55 Koletzko B, Jauch KW, Krohn K, Verwied-Jorky S; DGEM – guidelines for parenteral nutrition [in German]. Available at: <http://www.dgem.de>; 2007
- 56 Lecavalier L, DeFeo P, Haymond MW; Isolated hypoisoleucinemia impairs whole body but not hepatic protein synthesis in humans, *Am J Physiol* 261: 578–586, 1991
- 57 Liu Z, Feng S, Guo S, Shen Z, Ding F, Yuan N; Electrophoretic affinity chromatography: method validation, *J Mol Recogn* 11: 151-156, 1998
- 58 Lundholm K, Ternell M, Zachrisson H, Moldawer L, Lindstrom L; Measurement of hepatic protein synthesis in unrestrained mice-evaluation of the `flooding` technique, *Acta Physiol Scand* 141: 207-219, 1991
- 59 Mansoor O, Cayol M, Gachon P, Boirie Y, Schoeffler P, Obled C, Beaufrère B; Albumin and fibrinogen synthesis increase while muscle protein synthesis decreases in head-injured patients, *Am J Physiol* 273: 898 – 902, 1997
- 60 McCluskey A, Thomas AN, Bowles BJM, Kishen R; The prognostic value of serial measurements of serum albumin concentration in patients admitted to an intensive care unit, *Anaesthesia* 51: 724-727, 1996

- 61 McMillan DC, Slater C, Preston T, Falconer JS, Fearon KCH; Simultaneous measurement of albumin and fibrinogen synthetic rates in normal fasted subjects; *Nutrition* 12: 602-607, 1996
- 62 McNurlan MA, Sandgren A, Hunter K, Essén P, Garlick PJ, Wernerman J; Protein synthesis rates of skeletal muscle, lymphocytes, and albumin with stress hormone infusion in healthy man, *Metabolism* 45: 1388-1394, 1996
- 63 Moore FD, Brennan MF; Surgical injury: Ballinger WF et al; *Manual of Surgical Nutrition*, Saunders, Philadelphia, PA 169-220, 1975
- 64 Moshage HJ, Janssen JAM, Franssen JH, Hafkenscheid JCM, Yap SH; Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation, *J Clin Invest* 79: 1635-1641, 1987
- 65 Mosoni L, Houlier ML, Mirand PP, Bayle G, Grizard J; Effect of amino acids alone or with insulin on muscle and liver protein synthesis in adult and old rats, *Am J Physiol* 264: 614-620, 1993
- 66 Mouridsen HT, Faber M; Accumulation of serum-albumin at the operative wound site as a cause of postoperative hypoalbuminaemia, *Lancet* 2: 723-725; 1966
- 67 Mouridsen HT; The extravascular retention of serum albumin in the operative wound, *Acta Chir Scand* 134: 417- 421, 1968
- 68 Nicholson JP, Wolmarans MR, Park GR; The role of albumin in critical illness, *Br J Anaesth* 85: 599-610, 2000
- 69 Nygren J, Nair KS; Differential regulation of protein dynamics in splanchnic and skeletal muscle beds by insulin and amino acids in healthy human subjects, *Diabetes* 52: 1377-1385, 2003

- 70 O'Keefe SJ, Lemmer ER, Ogden JM, Winter T; The influence of intravenous infusions of glucose and amino acids of pancreatic enzyme and mucosal protein synthesis in human subjects, *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 22: 253-258, 1998
- 71 O'Leary MJ, Koll M, Ferguson CN, Coakley JH, Hinds CJ, Preedy VR, Garlick PJ; Liver albumin synthesis in sepsis in the rat: influence of parenteral nutrition, glutamine and growth hormone, *Clin Sci (Lond)* 105: 691-698, 2003
- 72 Pacy PJ, Garrow JS, Ford GC, Merritt H, Halliday D; Influence of amino acid administration on whole-body leucine kinetics and resting metabolic rate in postabsorptive normal subjects, *Clin Sci (Lond)* 75: 225-231, 1988
- 73 Pacy PJ, Venkatesan S, Bannister P, Millward DJ, Halliday D; Is plasma ¹³C alpha-ketoisocaproic acid representative of enrichment in the hepatic precursor pool? *Med Res Soc* 80: 20, 1991
- 74 Petersson B, Wernerman J, Waller SO, von der Decken A, Vinnars E; Elective abdominal surgery depresses muscle protein synthesis and increases subjective fatigue: effects lasting more than 30 days, *Br J Surg* 77: 796-800, 1990
- 75 Prinsen BH, Rabelink TJ, Beutler JJ, Kaysen GA, De Boer J, Hagen EC, Berger R, DeSain van der Velden MGM; Increased albumin and fibrinogen synthesis rate in patients with chronic renal failure, *Kidney Int* 64: 1495-1504, 2003
- 76 Pupim LB, Flakoll PJ, Ikizler TA; Nutritional supplementation acutely increases albumin fractional synthetic rate in chronic hemodialysis patients, *J Am Soc Nephrol* 15: 1920-1926, 2004
- 77 Reeds PJ, Hachey DL, Patterson BW, Motil KJ, Klein PD; VLDL apolipoprotein B-100, a potential indicator of the isotopic labeling of the hepatic protein synthetic precursor pool in humans: Studies with multiple stable isotopically labeled amino acids, *J Nutr* 122: 457-466, 1992

- 78 Rennie MJ, Smith K, Watt PW; Measurement of human tissue protein synthesis: an optimal approach, *Am J Physiol* 266: 298 – 307, 1994
- 79 Rittler P, Schiefer B, Demmelmair H, Koletzko B, Vogeser M, Alpers DH, Jauch KW, Hartl WH; The effect of hyperglycemic hyperinsulinemia on small-intestinal mucosal protein synthesis in patients after surgical stress, *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 30: 97-107, 2006
- 80 Rittler P, Schiefer B, Demmelmair H, Koletzko B, Roscher AA, Jacobs R, Krick M, Jauch KW, Hartl WH; Effect of amino acid infusion on human postoperative colon protein synthesis in situ, *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 29: 255-261, 2005
- 81 Rittler P, Jacobs R, Demmelmair H, Kuppinger D, Braun S, Koletzko B, Jauch KW, Hartl WH. Dynamics of albumin synthesis after major rectal operation, *Surgery* 141: 660-666, 2007
- 82 Rittler P, Demmelmair H, Koletzko B et al; Determination of protein synthesis in human ileum in situ by continuous 1-[¹³C]leucine infusion, *Am J Physiol* 278: 634-638, 2000
- 83 Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS; Serum albumin, *Hepatology* 8: 385-401, 1988
- 84 Rothschild MA, Schreiber SS, Oratz M, McGee HL; The effects of adrenocortical hormones on albumin metabolism studied with albumin, *J Clin Inv* 37: 1229-1235, 1958
- 85 Rucker G, Neugebauer M, Willems G; Instrumentelle pharmazeutische Analytik 200-269; 2001
- 86 Ruot B, Béchereau F, Bayle G, Breuillé D; The response of liver albumin synthesis to infection in rats varies with the phase of the inflammatory process, *Clin Sci (Lond)* 102: 107-114, 2002

- 87 Schwenk WF, Beaufrère B, Haymond MW; Use of reciprocal pool specific activities to model leucine metabolism in humans, *Am J Physiol* 249: 646 – 650, 1985
- 88 Skillman JJ, Rosenoer VM, Smith PC, Fang MS; Improved albumin synthesis in postoperative patients by amino acid infusion, *N Engl J Med* 295: 1037-1040, 1976
- 89 Smith CB, Sun Y; Influence of valine flooding on channeling of valine into tissue pools and on protein synthesis, *Am J Physiol* 268: 735 – 744, 1995
- 90 Smith K, Downie S, Barua JM, Watt PW, Scrimgeour CM, Rennie MJ; Effect of a flooding dose of leucine in stimulating incorporation of constantly infused valine albumin, *Am J Physiol* 266: 640 – 644, 1994
- 91 Stoll B, Burrin DG, Henry J, Yu Hung, Jahoor F; Dietary amino acids are the preferential source of hepatic protein synthesis in piglets, *J Nutr* 128: 1517-1524, 1998
- 92 Tayek JA, Bistrain BR, Hehir DJ, Martin R, Moldawer LL, Blackburn GL; Improved protein kinetics and albumin synthesis by branched chain amino acid-enriched total parenteral nutrition in cancer cachexia. A prospective randomized crossover trial, *Cancer* 58: 147-157, 1986
- 93 Tessari P, Barazzoni R, Kiwanuka E, Davanzo G, De Pergola G, Orlando R, Vettore M, Zanetti M; Impairment of albumin and whole body postprandial protein synthesis in compensated liver cirrhosis, *Am J Physiol* 282: 304 – 311, 2002
- 94 Tessari P, Inchiostro S, Biolo G, Trevisan R, Fantin G, Marescotti MC, Iori E, Tiengo A, Crepaldi G; Differential effects of hyperinsulinemia and hyperaminoacidemia on leucine-Carbon metabolism in vivo, *J Clin Inv* 79: 1062-1069, 1987
- 95 Thomas L; Albumin, Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, 668, 1998

- 96 Toader C, Acalovschi I, Szantay I; Protein metabolism following surgical stress. Pre- and postoperative (75 se-)methionin incorporation in serum albumin, *Clin Chim Acta* 37: 189-192, 1972
- 97 Toffolo G, Foster DM, Cobelli C; Estimation of protein fractional synthetic rate from tracer data, *Am J Physiol* 264: 128 – 135, 1993
- 98 Tsujinaka T, Morimoto T, Ogawa A, Kishibuchi M, Yano M, Shiozaki H, Monden M; Effect of parenteral and enteral nutrition on hepatic albumin synthesis in rats, *Nutrition* 15: 18-22, 1999
- 99 Vincent JL, Dubois MJ, Navickis RJ, Wilkes MM; Hypoalbuminemia in acute illness: is there a rationale for intervention? A meta-analysis of cohort studies and controlled trials, *Ann Surg* 237: 319-334, 2003
- 100 Volpi E, Lucidi P, Cruciani G, Monacchia F, Reboldi G, Brunetti P, Bolli GB, DeFeo P; Contribution of amino acids and insulin to protein anabolism during meal absorption, *Diabetes* 45: 1245-1252, 1996
- 101 Wolfe RR, Jahoor F, Hartl WH; Protein and amino acid metabolism after injury, *Diab Metab Rev* 5: 149-164, 1989
- 102 Yang RC, Mack GW, Wolfe RR, Nadel ER; Albumin synthesis after intense intermittent exercise in human subjects, *Am J Physiol* 84: 584 – 592, 1998
- 103 Yu YM, Wagner DA, Tredget EE, Walaszewski JA, Burke JF, Young VR; Quantitative role of splanchnic region in leucine metabolism: L-[1-¹³C, ¹⁵N]leucine and substrate balance studies, *Am J Physiol* 25: 36-51, 1990
- 104 Yu YM, Burke JF, Vogt JA, Chambers L, Young VR; Splanchnic and whole body L-[1-¹³C, ¹⁵N]leucine kinetics in relation to enteral and parenteral amino acid supply, *Am J Physiol* 262: 687-94, 1992

105 Zachwieja JJ, Bier DM, Yarasheski KE; Growth hormone administration in older adults: effects on albumin synthesis, *Am J Physiol* 266: 840 – 844, 1994

8. Danksagung

Ich danke dem Klinikdirektor Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. K.-W. Jauch dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der LMU, Campus Großhadern zu promovieren.

Herrn Dr. Rittler, Frau Dr. Schiefer und Frau Dr. Jacobs danke ich für die Anleitung und Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen im Labor, sowie beim experimentellen Teil der Studie.

Für die technische Unterstützung und die massenspektrometrischen Messungen bedanke ich mich bei Herrn Prof. Koletzko und Herrn Dr. Demmelmair.

Besonders großen Dank schulde ich meinem Doktorvater Prof. Dr. W.H. Hartl für die Aufgabenstellung, seine unermüdliche und geduldige Unterstützung und für seine große Hilfe in allen wissenschaftlichen Fragen und bei der Literaturarbeit.

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Maximiliane Krick
Geburtsdatum	25. Juli 1979
Geburtsort	München
Anschrift	Implerstrasse 62, 81371 München
Familienstand	Ledig

Ausbildung

09/86-07/99	Grundschule und Gymnasium Tutzing
07/99	Allgemeine Hochschulreife
05/00-03/02	Vorklinik des Studiums der Medizin Ludwig-Maximilians-Universität München
03/02	Ärztliche Vorprüfung
04/02-03/05	Erster und zweiter klinischer Abschnitt des Studiums der Medizin Ludwig-Maximilians-Universität München
03/05	Zweites Staatsexamen
04/05-03/06	Praktisches Jahr
05/06	Drittes Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

Seit 06/06	Ärztin in Weiterbildung am Klinikum Starnberg Gynäkologie und Geburtshilfe
------------	--