

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

**Einfluß einer glutaminhaltigen Aminosäureinfusion auf die
intestinale Proteinsynthese des Kolons nach großen,
abdominalchirurgischen Eingriffen**

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

vorgelegt von
Beatrice Schiefer
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. W.H.Hartl

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. A. Eigler
Priv. Doz. Dr. med. M. Thiel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. P. Rittler

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2005

MEINER GROSSMUTTER GEWIDMET

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Fragestellung	5
3. Patientengut und Methodik	6
3.1 Patientengut	6
3.2 Versuchsablauf	7
3.3 Methodik	10
3.3.1 Probenaufbereitung	10
3.3.2 Die Ionenaustauschchromatographie	11
3.3.3 Derivatisierung der Aminosäuren.....	11
3.3.4 Bestimmung der Isotopenanreicherung mittels massenspektrometrischer Analyse	13
3.4 Berechnung der fraktionellen Proteinsynthese	22
3.5 Messung der Aminosäurenkonzentration im Plasma.....	24
3.6 Statistik.....	24
4. Ergebnisse	25
4.1 Aminosäurenkonzentration im Plasma	25
4.2 Glutaminkonzentration im Plasma	25
4.3 Anreicherung im Präkursorpool	26
4.4 Proteingebundene Anreicherung	26
4.5 Fraktionelle Proteinsyntheseraten	29

5. Diskussion.....	33
5.1 Wahl der Methodik zur Messung von Proteinsyntheseraten.....	33
5.2 Infusionsmenge und Infusionsdauer der Aminosäuren-/Dipeptidlösungen.....	34
5.3 Utilisation von parenteral zugeführten Aminosäuren / Dipeptiden in vivo	35
5.4 Immunmodulatorische Effekte von Glutamin	37
5.5 Unterschiedliche Effekte der Dipeptide Glycyl-Glutamin und Alanyl-Glutamin	38
5.6 Klinische Relevanz der Ergebnisse	39
6. Zusammenfassung	42
7. Anhang.....	44
7.1 Tabellen.....	44
7.2 Verzeichnis der Abbildungen.....	49
7.3 Verzeichnis der Abkürzungen.....	50
8. Literaturverzeichnis	51
9. Danksagung	66
10. Lebenslauf	67

1. Einleitung

Der Intestinaltrakt spielt eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase des Organismus. So erfüllt er neben den Aufgaben der Nahrungsaufnahme und –verwertung auch lokale metabolische und immunologische Funktionen. Postoperativ kann es unter anderem zu einer Barrierefunktionsstörung der Darmmukosa kommen, was zu einer erhöhten Translokationsrate von Bakterien bzw. deren Toxinen führen kann. Dies wiederum spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung von septischen Komplikationen und ist ein wesentlicher Bestandteil in der Pathogenese des Multiorganversagens (6, 25, 60, 63, 64, 71, 84, 103, 104). Die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion setzt eine kontinuierliche Enterozytenproliferation voraus, welche in einem kritischen Maße von einer hohen Proteinsyntheserate abhängt (97).

Ein wichtiges Substrat des intestinalen Stoffwechsels ist Glutamin. Glutamin ist eine nichtessentielle Aminosäure und wird in Gegenwart der Glutamatdehydrogenase aus Alphaketoglutarat, Ammoniak (NH_3) und NADPH_2 gebildet. Sein Abbau erfolgt im Citratzyklus sowie durch Transaminierungsprozesse. Glutamin bildet unter anderem eine Vorstufe der Biosynthese von Ornithin, Prolin, Hydroxyprolin und Folsäure und dient als Baustein unterschiedlichster Peptide und Proteine. Neben seiner Funktion als Neurotransmitter und als sekundäres Antioxidanz (als Bestandteil von Glutathion) besitzt Glutamin eine zentrale Funktion im Energiestoffwechsel der menschlichen intestinalen Mukosa und fördert eventuell die Proliferation der Enterozyten, indem es diesen als Energiequelle dient (9, 14). Die Stimulation der menschlichen Enterozyten durch Glutamin konnte in vitro bereits nachgewiesen werden (91). Auch wurde eine Stimulation von Enterozyten und eine gesteigerte Proteinsyntheserate durch Glutamin bei Tieren in vivo bereits beschrieben (72, 95, 111). Desweiteren nimmt man an, dass sich Glutamin nach einem chirurgischen Trauma zu einer fakultativ essentiellen Aminosäure entwickelt. Der mit einem chirurgischen Trauma assoziierte Glutaminmangel könnte dabei die Stickstoffbilanz negativ beeinflussen, die Proteinsyntheserate für Transportproteine senken und zu einer Störung der intestinalen Barriere führen (2, 43, 53, 94, 96).

Bisherige Daten beziehen sich fast ausschließlich auf Untersuchungen in vitro bzw. auf die Darmmukosa von Tieren (überwiegend Nagetiere) und sind nur sehr begrenzt auf den Menschen übertragbar. Limitierende Faktoren sind hier vor allem Speziesunterschiede in der Lebensdauer der Enterozyten, wobei letztere bei Tieren deutlich kürzer als bei Menschen ist (7, 10, 15, 29, 101). Der beschleunigte Zellumsatz resultiert aus einem verkürzten Zellzyklus (23, 62, 67, 68) und ist mit einer großen Bandbreite aus anatomischen, histologischen und mikrostrukturellen Eigenschaften kombiniert, welche sich ebenfalls erheblich von denen des Menschen unterscheiden (7, 35, 42, 46, 73, 86, 105). Desweiteren weist die Mukosa von Nagern weitere Eigenheiten auf, die eine Übertragung des Modells auf die humane Mukosa unmöglich macht. Hierzu zählt unter anderem der hohe Verlust an mukosaler Proteinmasse nach einer nur kurzen Phase der künstlichen Ernährung (17, 39, 58, 73, 93), oder auch die Fähigkeit, intraluminale Aminosäuren auch noch im Kolon zu absorbieren (18, 22). Aufgrund dieser ausgeprägten Speziespezifitäten sind bezüglich des therapeutischen Nutzens parenteraler Glutaminlösungen am Menschen noch viele Fragen offen (16).

In der vorliegenden Studie untersuchten wir den Einfluss der kontinuierlichen Infusion einer glutaminhaltigen Aminosäurenlösung auf die Proteinsyntheserate der menschlichen Dickdarmmukosa nach größeren, abdominalchirurgischen Eingriffen. Angewendet wurde die Stabile-Isotopen-Technik, kombiniert mit der Massenspektrometrie. Hierbei konnte die fraktionelle Proteinsyntheserate der Mukosa mit einem nur sehr geringen Probenbedarf bestimmt werden. Die Ergebnisse wurden mit denen einer nicht ernährten Kontrollgruppe verglichen. Aufgrund der Instabilität des Glutamin-Moleküls in parenteralen Lösungen wurde es in Form von Dipeptiden verabreicht (Glycyl-Glutamin und Alanyl-Glutamin).

2. Fragestellung

Unter Verwendung der Stabile-Isotopen-Technik sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- 1) Wie beeinflusst eine parenterale Glutaminzufuhr die postoperative, intestinale Proteinsyntheserate des Kolons in vivo und in situ?
- 2) Unterscheiden sich die angewendeten Dipeptide (Glycyl-Glutamin und Alanyl-Glutamin) in ihrem Effekt auf die intestinale Proteinsyntheserate?

3. Patientengut und Methodik

3.1 Patientengut

Es wurden drei postoperative Patientengruppen untersucht. Die einzelnen Diagnosen und Operationen sind in der Tabelle 1 dargestellt, wobei als Grunderkrankung in der Regel ein kolorektales Karzinom vorlag, welches nicht nachweislich metastasiert war. Die Gruppen waren vergleichbar im Hinblick auf ihr Alter und ihren Body Mass Index (siehe Tabelle 2).

Als Ausschlusskriterien galten unter anderem Patienten mit systemischen, entzündlichen oder konsumierenden Erkrankungen, Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (wie z.B. Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa) sowie Patienten mit bereits metastasierten Tumoren bzw. Zweitmalignomen. Alle Patienten unterzogen sich einem kurativen, elektiven abdominalchirurgischen Eingriff, welcher auch die Anlage eines Kolostomas beinhaltete. Alle Patienten wurden präoperativ durch eine orale Spüllösung auf den Eingriff vorbereitet und erhielten intraoperativ eine prophylaktische Antibiose. Die Patienten waren vergleichbar hinsichtlich der Operationsdauer und des intraoperativen Blutverlustes. Als weiteres Ausschlusskriterium galt der intraoperative bzw. postoperative Bedarf an Blutbestandteilen (Erythrozytenkonzentrate, Thrombozytenkonzentrate, Vollblut, Frischblut) oder Blutprodukten (Fresh Frozen Plasma, Prothrombinkomplexe, Antithrombin III-Präparate). Die Schmerztherapie beinhaltete unter anderem die Anlage eines epiduralen Katheters, welcher mit Anästhetika und Analgetika bestückt wurde und bis maximal zum 5. postoperativen Tag belassen wurde.

Die Studie wurde am achten bis zehnten postoperativen Tag durchgeführt, zu diesem Zeitpunkt hat der postoperative Eiweißkatabolismus des Körpers sein Maximum erreicht (52, 81).

Der postoperative Verlauf war bei allen Patienten unauffällig und ohne jegliche Hinweise auf eine Organdysfunktion oder Zeichen einer lokalen bzw. systemischen

Infektion. Bei keinem der Patienten fiel präoperativ ein signifikanter Gewichtsverlust (weder aktuell noch anamnestisch) auf, noch waren klinisch oder labortechnisch Zeichen einer metabolischen Dysfunktion oder Mangelernährung zu verzeichnen. Patienten, deren Stomatas lokale entzündliche, gangränöse oder ödematöse Veränderungen aufzeigten, wurden nicht in die Studie aufgenommen.

Alle Patienten wurden sorgfältig über das Studienprotokoll aufgeklärt und unterzeichneten eine Einverständniserklärung. Die Studie wurde zuvor durch die örtliche Ethikkommission genehmigt (Nr. 134/97).

3.2 Versuchsablauf

Alle Patienten wurden im Rahmen eines regulären, stationären Aufenthalts in die Studie aufgenommen. Nach dem Eingriff erhielten die Patienten eine gemischte Diät (ca. 25 kcal/kg Körpergewicht pro Tag, von denen ca. 5 kcal/kg aus Proteinen und freien Aminosäuren bestanden). Zweidrittel dieser Diät wurden enteral zugeführt (Flüssignahrung) und ein Drittel parenteral. Nach 22:00 Uhr des Vorabends der Untersuchung blieben die Patienten nüchtern, mit Ausnahme von Mineralwasser oder ungesüßtem Tee. Am Untersuchungstag starteten wir um 7:00 Uhr als Vorbereitung mit der Anlage einer Venenverweilkanüle, sowie einer Blutentnahme zur Bestimmung der Hintergrundanreicherung des Tracers. Die Hintergrundanreicherung im Plasmaprotein wurde als ein Indikator für die natürliche Hintergrundanreicherung im intrazellulären, proteingebundenen Leuzin und im Präkursorpool gewertet (49).

Im Anschluß erfolgte die Bolusgabe des Tracers 1- [¹³C]-Leuzin (Tracer Technologies, Sommerville, Massachusetts, USA, 99,3 atom % enrichment) welcher 9,6 µmol/kg Körpergewicht betrug. Der Bolus diente der Aufsättigung des Tracerspiegels, um möglichst schnell den Zustand des Steady States zu erreichen. Hiernach starteten wir die kontinuierliche Infusion des Tracers mit Hilfe einer Perfusorpumpe. Die Infusionsrate betrug 0,16 µmol/kg pro Minute, der Infusionszeitraum betrug 600 Minuten.

Die erste Mukosabiopsie wurde 180 Minuten nach dem Start der Isotopeninfusion entnommen, die zweite nach 360 Minuten und die letzte nach 600 Minuten. Die Zeit zwischen der ersten (nach 180 Minuten) und der zweiten (nach 360 Minuten) Biopsie wurde als „Phase I“ bezeichnet. In der „Phase II“ (Zeitraum zwischen der zweiten und dritten Biopsie nach 600 Minuten) erhielten die Patienten der Aminosäuren / Dipeptid-Infusionsgruppe als weitere Infusionslösung entweder eine Aminosäuren / Glycyl-Glutamin-Lösung (Glamin[®], Baxter, Erlangen, Germany, n=6), oder eine Standard Aminosäurenlösung (Parentamin[®], Serag-Wiessner, Naila, Germany) kombiniert mit einer Alanyl-Glutamin-Lösung (Dipeptamin[®], Fresenius-Kabi, Bad Homburg, Germany, n=6) (Abb. 1). Die absolute Aminosäureninfusionsrate betrug damit 67 mg/kg/h, wobei der Anteil von Alanyl-Glutamin oder Glycyl-Glutamin jeweils 15 mg/kg/h betrug. Patienten der Kontrollgruppe erhielten keine zusätzlichen Aminosäurezufuhr (ausschließlich Kochsalzlösung, n=5). Zur Bestimmung der Aminosäurenkonzentration im Blut wurde gleichzeitig mit der Mukosabiopsie auch jeweils eine venöse Blutprobe entnommen. Der kleinste Abstand zwischen zwei Biopsieentnahmepunkten an der Mukosa betrug 2 cm. Die Mukosabiopsien wurden mit einer Biopsiezange aus dem Kolostoma des wachen, liegenden Patienten entnommen. Die Entnahme der Gewebebiopsien waren aufgrund der fehlenden nervalen Innervation der Mukosa für die Patienten nicht schmerzhaft. Das durchschnittliche Gewicht einer Biopsie betrug 10 mg Feuchtgewicht.

Abbildung 1: Versuchsablauf

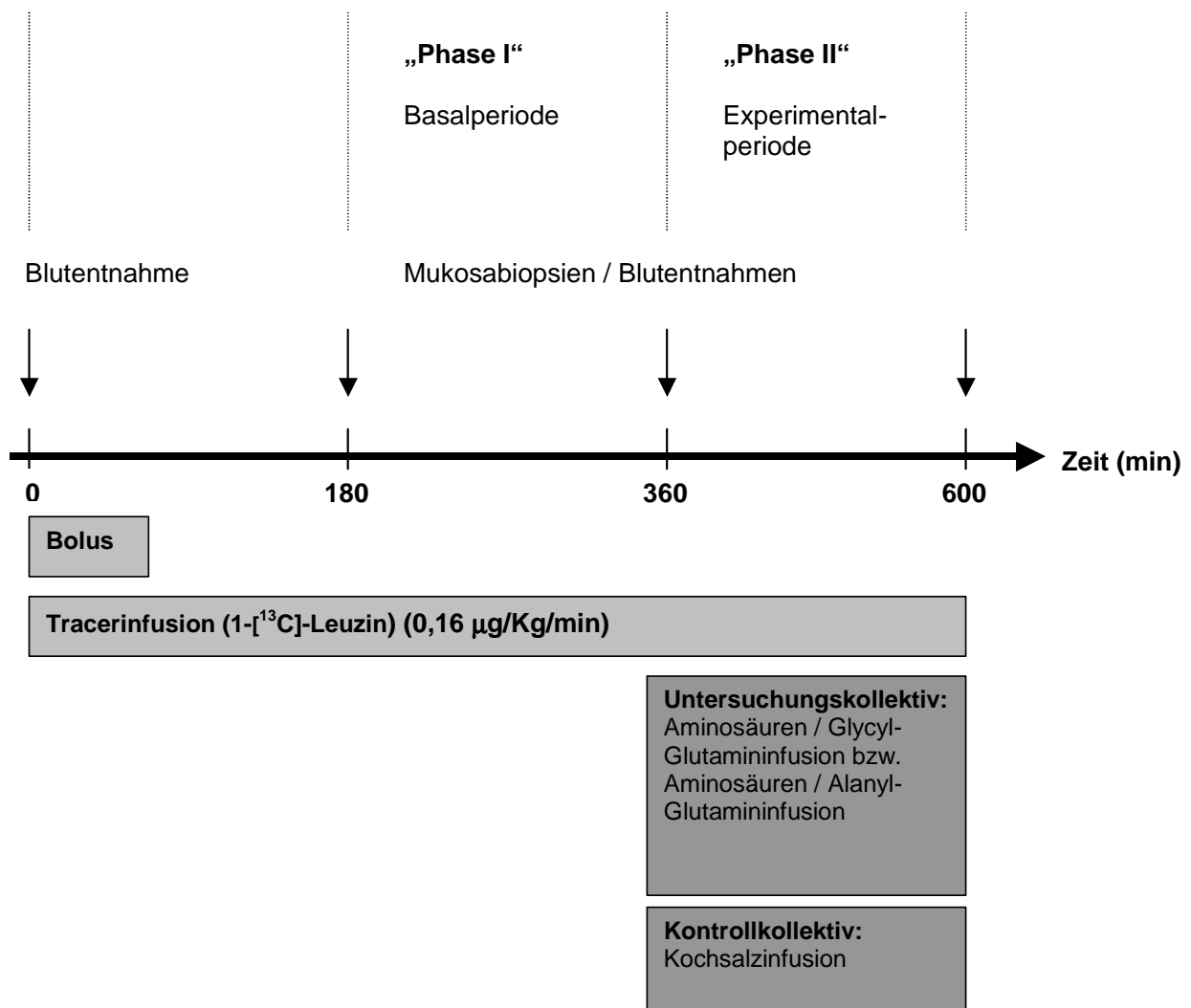


Abbildung 1:

Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs. Der 1-[¹³C]-Leuzin Bolus wurde zu Beginn des Versuchs verabreicht, im Anschluss wurde die kontinuierliche Tracerinfusion gestartet, wobei der Tracer insgesamt 600 Minuten lang zugeführt wurde. Ab der 360. Minute wurde je nach Kollektiv eine dipeptidhaltige Aminosäurenlösung oder NaCl 0,9 % verabreicht. Mukosabiopsien und Blutproben wurden nach 180, 360 und 600 Minuten entnommen.

3.3 Methodik

3.3.1 Probenaufbereitung

Unmittelbar nach Entnahme der Proben wurden diese in 0,9 %iger Natrium-Chlorid-Lösung gewaschen und von Blutresten befreit. Im Anschluss wurden sie in ein mit 1 ml 4°C kalten, 10% Trichloressigsäure gefülltes Pyrex-Röhrchen gegeben und mit einem Glasmörser zerstampft. Durch diesen Vorgang wurden die freien von den Proteingebundenen Aminosäuren in einer Fällungsreaktion getrennt. Die Proben wurden nun bei 4°C und 4500 rpm 20 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Bestimmung der Anreicherung im freien Aminosäurenpool vorsichtig abpipettiert und zur weiteren Bearbeitung verwahrt. Die Gewebeproben wurden ein weiteres Mal in 0.5 %iger Trichloressigsäure gewaschen und erneut bei 4°C und 4500 rpm 20 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Als nächster Schritt wurde der so verbleibende Proteinrest mit 6 ml 6 N HCL aufgefüllt und in einem luftdicht verschlossenen Pyrexröhrchen bei 110°C 48 Stunden lang hydrolisiert. Die dabei entstandenen Kohlepartikel wurden durch eine Filtration (Papierfilter 595 ½) aus dem Hydrolysat entfernt. Nach Abkühlung wurde das Hydrolysat unter Anlage eines Vakuums mit Hilfe einer Speed-Vac-Pumpe (Savant Instruments, Framingdale, New York, USA) mittels einer Natriumhydroxid-Falle getrocknet und für die Ionenaustauschchromatographie vorbereitet.

Um die entsprechenden Analysen für die Leuzinanreicherung im Plasmaprotein (welches als Indikator der Hintergrundanreicherung dient) und in den freien Plasmaaminosäuren durchführen zu können, wurden die 4 gesammelten Blutproben zunächst bei 1000 rpm zentrifugiert. Aus dem so erhaltenen Plasma des Nullwerts (welcher der ersten Blutentnahme am Morgen entspricht) wurden 0.5 ml ebenso aufgearbeitet wie die zuvor beschriebenen Mukosa-Gewebeproben. Die restlichen Plasmaproben wurden bei -80°C tiefgefroren, unter anderem zur späteren Erstellung des Aminosäurenprofils.

3.3.2 Die Ionenaustauschchromatographie

Als Vorbereitung für die im Anschluß erfolgte Ionenaustauschchromatographie, welche zur Trennung der Aminosäuren von begleitenden Verunreinigungen dient, wurden folgende Schritte durchgeführt:

Eine jeweils entsprechende Anzahl an Pasteurpipetten (5-3/4") wurde mit Glaswolle abgedichtet und mit einem Kationenaustauscherharz (DOWEX AG 50 Wx8; 200-400 mesh, H⁺ form resin 0,2 ml) auf eine Füllhöhe von 5 cm mit zuvor in bidestilliertem H₂O gelösten Resin beschickt. Zur Konditionierung der Säulen wurden diese nacheinander mit 2 ml bidestilliertem H₂O und 4 ml 1 N NaOH gewaschen, anschließend mit jeweils bidestilliertem H₂O auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Es erfolgte ein zweiter Waschvorgang mit 1 N HCL und die Neutralisierung mit bidestilliertem H₂O.

Die zuvor mit Hilfe der Speed-Vac-Pumpe getrockneten Proteinproben wurden mit Hilfe von 1 ml bidestilliertem H₂O und 0,5 ml 96% Essigsäure gelöst und dabei auf einen pH-Wert von 2,0 bis 2,5 eingestellt. Diese Lösung wurde nun auf die Ionenaustauschersäulen gebracht und mit bidestilliertem H₂O, 4 ml 0,5 N Essigsäure und nochmaligem bidestilliertem H₂O gewaschen und auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Die ablaufende Flüssigkeit wurde gesammelt und verworfen. Jetzt erfolgte die endgültige Auswaschung der Aminosäuren aus den Säulen. Dazu wurde insgesamt 4 ml 2 N NH₄OH auf die Proben gegeben, das Eluat wurde in Pyrexröhrchen gesammelt und in oben genannter Speed-Vac-Pumpe unter Anschluß einer Borsäurefalle getrocknet.

3.3.3 Derivatisierung der Aminosäuren

Die zu erwartende Anreicherung im Präkursorpool (freie, intrazelluläre Aminosäuren) liegt deutlich über der im Gewebeprotein, so dass wir zu Ihrer Bestimmung die dafür geeignetere Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) wählten. Die GC-MS bietet eine zuverlässige Bestimmung von Anreicherungen im Bereich von

0.5 – 100 % und bietet außerdem den entscheidenden Vorteil, dass eine Kontamination durch ^{12}C -haltige Substanzen praktisch ausgeschlossen ist. Bei Anreicherungen unter 0,5 % ist sie der Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (GC-IRMS) allerdings unterlegen, so dass wir die GC-IRMS zur Bestimmung der Anreicherung im Gewebeprotein wählten, da die zu erwartenden Anreicherungen hier deutlich unter 0,5 % lagen. Die zuvor gereinigten proteingebundenen Aminosäuren (Gewebeprotein) mussten zur Analyse in der Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (GC-IRMS) in einen N-acetyl-N-propyl (NAP) Ester überführt werden (3). Zur Herstellung dieses NAP-Derivats versetzten wir die Proben mit 1 ml 8 N HCL-Propanol und 20 μl Dimethoxypropan und erhitzen sie für die Dauer von 20 min. auf 110°C in luftdicht verschlossenen Pyrexröhrchen. Nach der Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur wurden sie bei 80°C unter Stickstoff getrocknet. Nach Beimischen von 1 ml Aceotrolösung wurde der Trockenvorgang unter Stickstoff wiederholt.

Nun erfolgte die Acetylierung. Dazu versetzten wir die getrockneten Ester mit 1 ml einer Mischung aus Aceton, Trimethylamin und Essigsäureanhydrid (5:2:1) (Sigma, St. Louis, USA), welche für jeden Vorgang neu angesetzt wurde. Das Gemisch wurde nun 5 min. bei 60°C erhitzt und im Anschluß bei 45°C unter Stickstoff getrocknet. Im Anschluß wurde die Probe mit 1 ml gesättigter NaCl-Lösung und 2 ml Ethylacetat versetzt und ausgeschüttelt. Dadurch setzte sich die organische Phase oben ab, wurde abpipettiert und erneut unter Stickstoff bei Raumluft getrocknet. Nun war es möglich, Proben von genau 1 μl in das von uns verwendete GC-IRMS-Gerät zu injizieren. Zur Analyse der Präkursorpool-Aminosäuren mittels Gaschromatographie-Mssenspektrometrie (GC-MS) mussten die Proben in einen tert-butyldimethylsilyl (t-BDMS) Derivat überführt werden (Silylierung). Hierzu durchliefen auch sie die Ionenaustauschchromatographie und wurden im Anschluß getrocknet. Nun wurden die Proben mit 100 μl Acetonitril und 100 μl N-Methyl-N-(t-butyldimethylsilyl)-trifluoro-azetamid (t-BDMS, Sigma, St. Louis, USA) versetzt und wieder aufgelöst. Diese Mischung wurde nun 20 min. lang bei 100°C erhitzt und nach ihrer Abkühlung in das GC-MS-Gerät injiziert.

3.3.4 Bestimmung der Isotopenanreicherung mittels massenspektrometrischer Analyse

Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der Tracer-Anreicherung im Gewebeprotein verwendeten wir ein Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometer der Firma Finnigan, Bremen (Delta S). Da die zu bestimmende Gewebeanreicherung in unserem Fall unter 0,5 % lag, war die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) erforderlich, da nur hierdurch eine präzise Messung bei Anreicherungen dieser Größenordnung gewährleistet ist. Nachteil dieser Methode ist, dass eine relativ große Probenmenge (ca. 200 mg Feuchtgewicht) erforderlich ist. Die Kopplung der IRMS mit der Gaschromatographie erlaubte allerdings eine Reduzierung der Probenmenge auf ein Gewicht von wenigen Milligramm. Dadurch war es möglich, ohne auf operative Eingriffe angewiesen zu sein oder größere traumatische Schäden zu verursachen, multiple Gewebeproben am selben Patienten zu entnehmen. Außerdem sind bei der alleinigen Anwendung der IRMS zur Bestimmung der Tracer-Anreicherung zusätzliche präparative Schritte notwendig, um das benötigte $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ Gasgemisch zu erhalten. Durch die zur Verfügung stehende GC-IRMS Technologie konnten wir also sequenziell die Proteinsynthese in menschlichen Geweben untersuchen, ohne auf Narkose oder komplizierte analytische Schritte angewiesen zu sein, wobei jedoch gleichzeitig eine hohe Messempfindlichkeit erzielt wurde.

Die GC-IRMS stellt ein duales System dar, bei dem in-line ein kapillärer Gaschromatograph zur Separation der Tracer-Aminosäure, eine Verbrennungskammer zur Erzeugung des zugehörigen $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ –Gasgemisches aus dem verbrannten Aminosäuren und ein Isotopenverhältnis-Massenspektrometer zur Bestimmung des $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ –Verhältnisses aneinander gekoppelt sind (Abb. 2). Als Vorbereitung für die GC-IRMS Analyse muss das zu separierende Aminosäurengemisch von der wasserlöslichen in die volatile Phase überführt werden. Dazu ist eine spezielle Veresterung der Aminosäuren mit N-acetyl-N-propyl

(NAP) notwendig (3), die Derivatisierung genannt wird und deren standardisierter Ablauf bereits im vorherigen Kapitel (3.3.3 Derivatisierung der Aminosäuren) dargestellt wurde.

Die NAP-Aminosäuren (2 µl Proben) werden in den Gaschromatographen (Hewlett-Packard 5980 A) injiziert und mittels Trennsäule (30 m DB 1701 Kapillarsäule, Innendurchmesser 0,22 mm, J&W Scientific, New York, USA) separiert. Die Injektor-Temperatur wird bei 250°C, die des Flammenionisations-Detektors bei 300°C gehalten. Als Trägergas dient Helium (He) mit einer Flussrate von 1ml/min und einem Säulenspitzenruck von 1.1 bar. Zur chromatographischen Auftrennung der NAP-Aminosäuren wird ein Temperaturprogramm benutzt, das bei 100°C für 1 Minute gestartet wird, anschließend in 6°C Schritten pro Minute auf 200°C und dann in 10°C Schritten pro Minute auf 250°C steigt, und schließlich für weitere 10 Minuten auf diesem Niveau gehalten wird. Beim Erscheinen der NAP-Traceraminosäure (in unserem 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 Kupferoxid-Granula (CuO) als Katalysator zu Kohlendioxid und Wasser verbrannt. Zur Aufrechterhaltung der chromatographischen Auftrennung wird vor dem Eingang in die Verbrennungskammer zusätzlich Heliumgas mit einer Flussrate von 2 ml/min dem NAP-1-[¹³C]-Leuzin-Helium-Gemisch beigegeben. Nach Durchlaufen der Verbrennungskammer wird das dabei entstandene Wasser in einer Wasserfalle bei – 100°C entfernt. Das übriggebliebene Kohlendioxid-Gemisch gelangt nun in das Massenspektrometer. Das Massenspektrometer besitzt einen doppelten Zugang, über den wechselweise das Kohlendioxid-Gemisch aus der Verbrennungskammer oder ein Referenz CO₂-Gas mit Helium als Träger zugeführt werden kann.

Ein Referenzgas ist notwendig, da entsprechend den Prinzipien der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie nur der Vergleich des Isotopenverhältnisses einer Probe mit dem Isotopenverhältnis in einem Referenzgas einen aussagekräftigen Wert ergibt.

Als Isotopenverhältnis ist das Verhältnis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in einem CO_2 Gemisch definiert. Die Bestimmung des Verhältnisses erfolgt dadurch, dass $^{13}\text{CO}_2$ und $^{12}\text{CO}_2$ verschiedene Atomgewichte (Atomgewicht 45 und 44) aufweisen. Komplizierend tritt hinzu, dass neben Kohlenstoff auch für Sauerstoff verschiedene natürliche stabile Isotope existieren (z.B. das häufige ^{16}O und das seltene ^{17}O). Da $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ das gleiche Atomgewicht besitzt wie $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ (Atomgewicht 45), müssen die Rohdaten mit speziellen Standards korrigiert werden.

Das CO_2 Gemisch mit Helium als Träger-Gas gelangt zunächst in eine Vakuumkammer, in der es mit Elektronen beschossen wird. Die Elektronen werden aus Filamentdrähten frei gesetzt. Der Elektronenbeschuss führt zum Elektronenverlust in den einzelnen CO_2 Molekülen, und es entstehen positiv geladene Ionen (CO_2^+). Abstoßende Elektroden zwingen die Ionen durch eine Reihe von Fokussierungslinsen in das Analyse-Segment des Massenspektrometers. Hier erfolgt unter Einsatz eines Magneten die Ablenkung der Ionen entsprechend ihrer Masse und anschließend die massenspezifische Registrierung ihrer Häufigkeit (108).

Die Ionenauftrennung 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 zurückgeschlossen werden, oder anders formuliert: Ionen mit unterschiedlicher Masse werden im Massenspektrometer unterschiedliche Kreisbahnen beschreiben. Da die zu erwartenden Massen und deren Kreisbahnen bekannt sind (in unserem Fall $^{13}\text{CO}_2$ und $^{12}\text{CO}_2$), können an einem bestimmten Punkt der massenspezifischen Kreisbahnen Detektorplatten platziert werden, auf die – nach Masse getrennt – die verschiedenen Ionen auftreffen. Beim Auftreffen der Ionen auf die Kollektoren wird

ein messbarer Ionenstrom freigesetzt. Je mehr Ionen einer bestimmten Masse auftreten, um so höher wird der Elektronenstrom sein. Das Verhältnis der getrennt voneinander gemessenen Elektronenstromstärken zueinander ist dem Isotopenverhältnis ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) proportional. Das Isotopenverhältnis einer CO_2 Probe ist jedoch nur aussagekräftig, wenn es auf einen Eichwert (Isotopenverhältnis eines CO_2 Eichgases) bezogen wird. Dazu wird alternierend zum CO_2 –Gemisch einer Probe das CO_2 –Gemisch des Eichgases mit bekanntem Isotopenverhältnis durch das Massenspektrometer geleitet. Für unsere Untersuchungen verwendeten wir das Pee Dee Belemate limestone (PDB) Eichgas mit einem Isotopenverhältnis von 0.011.

Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt, der Messvorgang war automatisiert und wurde mit Hilfe einer Software des Herstellers gesteuert. Die Berechnung der Proteinanreicherung erfolgte unter Hinzuziehung entsprechender Korrekturprogramme ebenfalls automatisch. Zur Qualitätskontrolle war es erforderlich, neben der Probenmessung intermittierend die Anreicherung bestimmter Standardproben mit bekannten, genau definierten Isotopengehalt zu bestimmen. Hierzu verwendeten wir eine Standardprobe mit $\Delta^{13}\text{C} = -49.2\text{‰}$.

Abbildung 2: Gaschromatographie – Isotopenverhältnis – Massenspektrometrie (GC-IRMS)

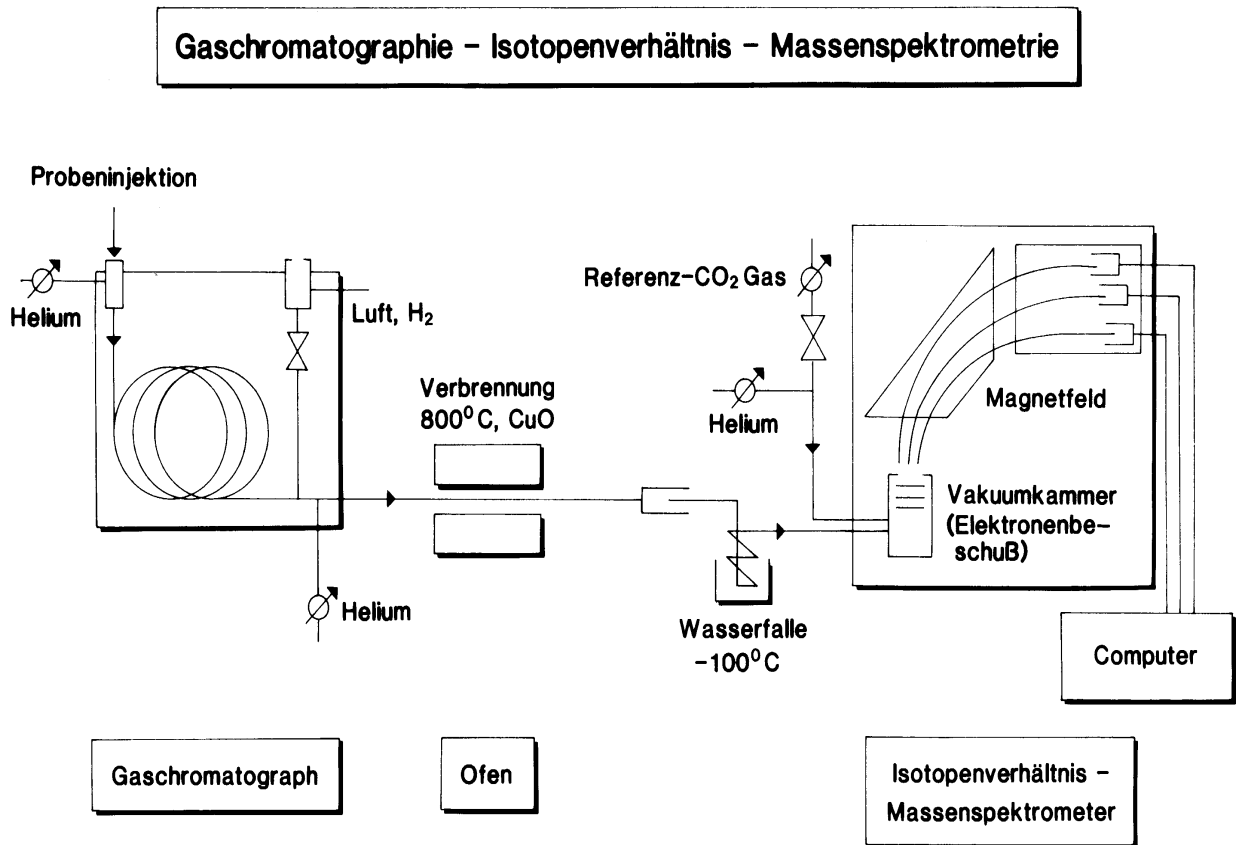


Abbildung 2:

Schematische Darstellung der GC-IRMS, welche der Bestimmung der Tracer-Anreicherung im Gewebeprotein diene. Sie besteht aus einem Gaschromatographen, einer Verbrennungskammer und einem Massenspektrometer. Die Proben mussten als Vorbereitung derivatisiert werden (siehe Text) um sie in eine volatile Phase überführen zu können.

Gaschromatographie – Massenspektrometrie (GC-MS)

Zur Bestimmung der Tracer-Anreicherung im Präkursorpool (Pool der freien, intrazellulären Aminosäuren) wurde ein Gaschromatograph-Massenspektrometer der Firma Hewlett-Packard (HP MSD 5971D) verwendet. Die GC-MS 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 eine Kontamination mit ^{12}C -haltigen Substanzen aufgrund der Arbeitsweise der GC-MS praktisch ausgeschlossen ist (36). Der höhere Messbereich der GC-MS stellt aus unserer Sicht keinen Nachteil da, da die zu erwartenden Leuzin-Anreicherungen im Präkursorpool deutlich über denen im Gewebeprotein, also über 0,5% liegen und somit dem GC-MS Verfahren optimal zugänglich sind.

Die GC-MS-Anlage besteht aus einer Kopplung eines Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer, ähnlich wie bei der GC-IRMS, nur mit dem Unterschied, dass die den Gaschromatographen verlassenden Substanzen vor der massenspektrometrischen Analyse nicht verbrannt werden. Die Gaschromatographie bei der GC-MS entspricht im wesentlichen der bei der GC-IRMS. Auch bei GC-MS 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 speziell polare Gruppen an den Molekülen durch bestimmte chemische Reaktionen beseitigt werden. Im Vergleich zur GC-IRMS kommt dem Derivatisierungsschritt bei der GC-MS 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. Die Struktur der massenspektrometrisch zu analysierenden Moleküle wird durch den Derivatisierungsschritt bestimmt. Die so neu erzeugte Molekülstruktur einer bestimmten Substanz erfährt zusätzlich im Rahmen der Massenspektrometrie eine charakteristische Veränderung (Fragmentierung). Die charakteristischen Fragmente sind nun einer exakten Quantifizierung zugänglich, aus

der sich schließlich die Anreicherung einer bestimmten Substanz ergibt. Im Unterschied zur GC-IRMS erfolgt jedoch als Rohergebnis nicht die Messung eines Isotopenverhältnisses ($^{12}\text{C} / ^{13}\text{C}$), sondern die Messung eines Molekülverhältnisses (markierte Moleküle / unmarkierte Moleküle). Somit ist eine Kontamination durch andere z.B. ^{12}C -haltige Substanzen (im Gegensatz zur GC-IRMS) nicht möglich, da diese ja eine andere Molekülstruktur bzw. andere Fragmente besäßen, die bei der Massenspektrometrie unterschieden werden können. Die einzige Kontaminierungsmöglichkeit besteht nur durch die zu untersuchende Substanz selbst. Die Derivatisierung erfolgte mittels einer Silylierung, bei der im Rahmen der GC-MS charakteristische Leuzinfragmente entstehen, die die Bestimmung der Anreicherung erleichtern (59). Die entsprechenden Arbeitsschritte sind standardisiert und wurden bereits unter 3.3.3 ausführlich geschildert.

Nach abgeschlossener Derivatisierung wird nun die zuvor abgekühlte Probe mit einem inerten Trägergas (Helium) in den erhitzten Injektor am GC-MS Gerät injiziert (Abb. 3). Zusammen mit dem Trägergas wird die verdampfte Probe dann durch die Gaschromatographiesäule (DB-5, J&W Scientific, Washington, USA; Innendurchmesser 0,25 mit 0,25 μm Filmdicke) geleitet, an der mittels eines temperaturgesteuerten Programms, wie bereits zuvor beschrieben, die Auftrennung erfolgt. Beim Erscheinen des derivatisierten Leuzins im Flammenionisations-Detektor wird das Helium-Trägergas mit dem derivatisierten Leuzin (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 Eintrittsort in das Massenspektrometer eine sofortige Druckverminderung bewirkt. Die Probe gelangt als nächstes in die Ionisationskammer. Dort passieren 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 geschieht zweierlei: zum einen kommt es zum Elektronenverlust im betroffenen Molekül, das dadurch ionisiert wird, zum anderen wird die dann noch zur

Verfügung stehende Energie auf das aus dem Molekül entstandene Ion übertragen, welches in einzelne Fragmente zerfallen kann. Das Muster der Fragmente stellt sich im Massenspektrum dar und ist hochspezifisch für eine Substanz. Die Fragmente werden als nächstes über mehrere fokussierende Linsen und über ein Vakuum einem elektrodynamischen, oszillierenden Feld zugeführt. Dieses Feld wird von vier sich gegenüberliegenden, zirkulär angeordneten parallelen Stäben (sog. Quadropole) ausgestrahlt. Mit Hilfe dieses elektrodynamischen Feldes erfolgt die Isolierung des gewünschten Fragmentes. Jedes Fragment besitzt eine bestimmte, genau definierte Masse. Die physikalischen Eigenschaften des elektrodynamischen Feldes (Gleichstrom-Stärke und –Vorzeichen, Oszillations-Geschwindigkeit und –Vorzeichen) können so gewählt werden, dass nur ein Fragment mit einer bestimmten Masse in diesem Feld (Quadropole) oszillieren kann (Resonanz) und dadurch aufgehalten wird. Alle anderen Massen verlassen durch den Vakuummechanismus schnell das elektrodynamische Feld. Die Quadropole ermöglicht somit die selektive Erfassung der ionisierten Fragmente entsprechend ihrer Masse. Die auf diese Art isolierten Ionen treffen am Ausgang des Quadropole auf einen Elektronenverstärker und erzeugen einen proportional verstärkten Ionenstrom. Die Stärke dieser Ströme wird über einen Computer weiterverarbeitet und unter Berücksichtigung der Stromstärken von verschiedenen Fragmenten, die für die jeweils markierten und nicht markierten Moleküle typisch sind, in Molekülverhältnisse umgerechnet. Für die untersuchte Substanz erhält man ein Verhältnis von markiertem zu unmarkiertem Molekül (Isotopomer-Verhältnis $M+k / M+0$), wobei k der Anzahl an markierten C-Atomen im Molekül entspricht. Das für t-BDMS-Leuzin typische Massenspektrum weist ein größeres Ionenfragment bei einem Masse / Ladungsverhältnis von 302 auf. Dieses Fragment resultiert aus einem Ionenverlust an einer der drei Butyl-Gruppen und beinhaltet das markierte Kohlenstoffatom (63). Das zugehörige Hauptfragment von t-BDMS-Leuzin erscheint bei einem Masse / Ladungsverhältnis von 303.

Um das Isotopenverhältnis in einer Probe zu bestimmen, analysierten wir das Isotopomer-Verhältnis zwischen den Ionenfragmenten 303 und 302 mittels selektiver Ionenregistrierung bei der Massenspektrometrie. Bei allen Analysen wurden Leuzin-Standardkurven erstellt, um Geräteschwankungen zu berücksichtigen.

Abbildung 3: Gaschromatographie – Massenspektrometrie (GC-MS)

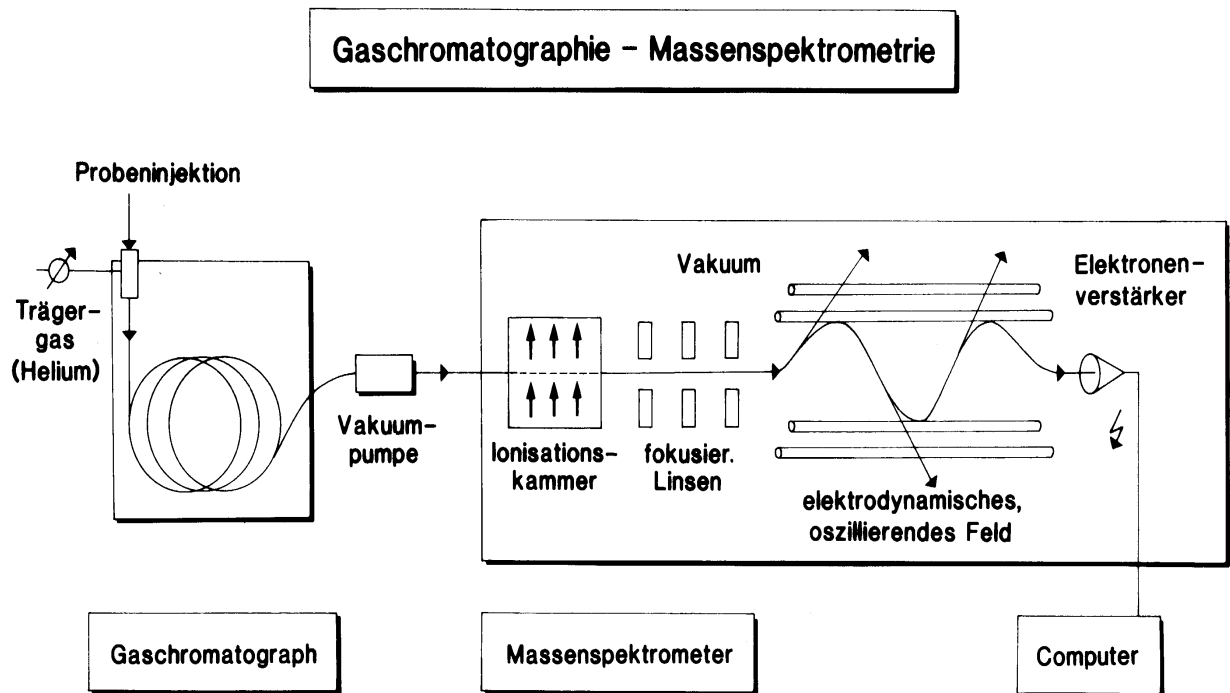


Abbildung 3:

Schematische Darstellung des Prinzips der GC-MS, welche wir zur Bestimmung der Tracer-Anreicherung im Präkursorpool einsetzen. Wie auch bei der GC-IRMS mussten die Proben zuvor derivatisiert werden, um sie in eine volatile Phase zu überführen.

3.4 Berechnung der fraktionellen Proteinsynthese

Zur Berechnung der fraktionellen Proteinsyntheseraten eines Gewebes ist es erforderlich, das Tracer / Tracee-Verhältnis (Quotient zwischen der Menge an markiertem Tracer und der Menge an nicht markierten Aminosäuren im Pool) im proteingebundenem 1-[¹³C]-Leuzin (Z_{prot}) und im Präkursorpool für die Proteinsynthese (Pool des freien, intrazellulären 1-[¹³C]-Leuzin) (Z_{AA}) zu ermitteln (26, 49, 98). Die Delta-Anreicherungen des proteingebundenen 1-[¹³C]-Leuzin innerhalb der Biopsien wurde mittels eines korrigierten Isotopenverhältnis von ¹³C zu ¹²C (¹³C / ¹²C) bestimmt. Die GC-IRMS Analyse ergab $\Delta^{13}\text{C}$ -Werte, welche in ein Isotopenverhältnis (¹³C / ¹²C) des kompletten NAP-1-[¹³C]-Leuzins durch folgende Formel umgeformt werden können:

$$^{13}\text{C} / ^{12}\text{C} = (\Delta^{13}\text{C}/1000 + 1) * 0.011 \quad \langle 1 \rangle$$

Der Wert 0.011 entspricht dem Isotopenverhältnis ¹³C / ¹²C des von uns verwendeten Pee Dee Belemate limestone (PDB) Eichgases (vgl. 3.3.4).

Z_{prot} kann aus dem durch GC-IRMS gemessenen Isotopenverhältnis (¹³C / ¹²C) abgeleitet werden, wobei z aus der Differenz zwischen dem Isotopenverhältnis in der Probe (¹³C / ¹²C)_P und dem Isotopenverhältnis im nicht markierten Hintergrund (¹³C / ¹²C)_H berechnet werden kann, wenn diese Differenz ($R_{\text{NAP-Leuzin}}$) mit einem Korrekturfaktor c multipliziert wird. Dieser Korrekturfaktor berücksichtigt die artifiziale Verminderung der Anreicherung in Position 1 des markierten NAP-Leuzinmoleküls durch unmarkierten Kohlenstoff in Position 2 bis 11 im Rahmen der Molekülverbrennung bei der IRMS Analyse (20). $R_{\text{NAP-Leuzin}}$ ergibt sich zuerst aus

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

Z_{prot} kann nun durch $R_{\text{NAP-Leuzin}}$ anhand folgender Formel berechnet werden:

$$Z_{\text{prot}} = c * R_{\text{NAP-Leuzin}} / (1 + [1 - c] * R_{\text{NAP-Leuzin}}) \quad \langle 3 \rangle$$

Hierbei entspricht der Korrekturfaktor c dem Wert 10.02 (49). Mittels z_{prot} kann nun die fraktionelle Proteinsynthese bei bekannter Präkursorpool-Anreicherung (z_{AA}) berechnet werden. Anhand der GC-MS Messung berechnet sich die Präkursorpool-Anreicherung (z_{AA}) aus der Differenz zwischen dem Isotopenverhältnis der Probe $(^{13}\text{C} / ^{12}\text{C})_{\text{P}}$ und dem Isotopenverhältnis im nicht markiertem Hintergrund $(^{13}\text{C} / ^{12}\text{C})_{\text{H}}$ wie folgt:

$$z_{\text{AA}} = (^{13}\text{C}\text{-Leuzin}/^{12}\text{C}\text{-Leuzin})_{\text{P}} - (^{13}\text{C}\text{-Leuzin}/ ^{12}\text{C}\text{-Leuzin})_{\text{H}} \quad <4>$$

Hieraus ergibt sich nun für die fraktionelle Proteinsyntheserate:

$$\text{FSR} = \frac{z_{\text{prot}}(t_{i+1}) - z_{\text{prot}}(t_i)}{\{z_{\text{AA}}(t_i) + z_{\text{AA}}(t_{i+1})\} / 2} * \frac{1}{\Delta t} * 60 * 100 (\%/h) \quad <5>$$

z_{prot} und $z_{\text{prot}}(t_{i+1})$ entsprechen dem Tracer / Tracee-Verhältnis des proteingebundenen Leuzins in zwei aufeinanderfolgenden Proben (i und $i+1$), die innerhalb eines Zeitintervalls Δt gewonnen wurden. $z_{\text{AA}}(t_i)$ und $z_{\text{AA}}(t_{i+1})$ repräsentieren das Tracer / Tracee Verhältnis des freien, intrazellulären Leuzins in zwei aufeinanderfolgenden Proben. Die Faktoren 60 (min) und 100 sind erforderlich, um die fraktionelle Proteinsynthese in % / h auszudrücken.

3.5 Messung der Aminosäurenkonzentration im Plasma

Plasma Aminosäuren wurden mittels eines Autoanalysers (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) bestimmt.

3.6 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Proteinsyntheseraten wurden mittels gepaarten und ungepaarten t-test verglichen. Der multiple Vergleich von Aminosäurenkonzentrationen bzw. Anreicherungen zwischen einzelnen Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte mittels MANOVA: Bei einem $p < 0,05$ wurde von einem signifikanten Unterschied ausgegangen.

4. Ergebnisse

4.1 Aminosäurenkonzentration im Plasma

Zum Vergleich der Aminosäurenkonzentrationen wurden beide Dipeptidkollektive (Untersuchungskollektiv, $n = 12$) zusammengefasst, da zwischen diesen Kollektiven keine relevanten Unterschiede bestanden. Der absolute Wert der Aminosäurenkonzentration im Plasma der Patienten des Untersuchungskollektivs stieg während der Aminosäuren / Dipeptid-Infusion signifikant ($p < 0,05$) an. So betrug er am Ende der Phase I (Zeitraum zwischen der ersten Biopsie, 180 Minuten und der zweiten Biopsie, 360 Minuten nach Infusionsbeginn des Tracers 1- ^{13}C -Leuzin, siehe Kapitel 3.3, Versuchsablauf) $2679 \pm 88 \mu\text{mol/l}$, während er am Ende der Phase II auf einen Wert von $4036 \pm 91 \mu\text{mol/l}$ anstieg. Im Kontrollkollektiv zeigte sich erwartungsgemäß keine wesentliche Änderung der Aminosäurenkonzentration im Plasma. Sie betrug $2804 \pm 92 \mu\text{mol/l}$ am Ende der Phase I und $2838 \pm 77 \mu\text{mol/l}$ am Ende der Phase II. Hieraus ergab sich ein signifikanter Unterschied der Aminosäurenkonzentration im Plasma am Ende der Phase II zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten, die eine Aminosäuren / Dipeptid-Infusion erhalten hatten ($p < 0,05$).

4.2 Glutaminkonzentration im Plasma

Die Glutaminkonzentration im Plasma zeigte bei Betrachtung aller mit Dipeptiden infundierten Patienten ($n = 12$) keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Vor Infusionsbeginn (Ende der Phase I) betrug die Glutaminkonzentration $412 \pm 32 \mu\text{mol/l}$ und blieb auch nach Dipeptidinfusion (Phase II) mit $466 \pm 51 \mu\text{mol/l}$ unverändert. Im Kontrollkollektiv gab es erwartungsgemäß auch keine wesentliche Änderung der Plasmaglutaminkonzentration. Sie betrug am Ende der Phase I $469 \pm 29 \mu\text{mol/l}$ und am Ende der Phase II $478 \pm 30 \mu\text{mol/l}$.

Eine signifikante Veränderung wurde allerdings deutlich, wenn man die zwei Dipeptidkollektive (Aminosäuren / Glycyl-Glutamininfusion, n=6, bzw. Aminosäuren / Alanyl-Glutamin-Lösung, n=6, siehe Kapitel 3.2, Versuchsablauf) getrennt betrachtete. So war nach einer vierstündigen Infusion von Glycyl-Glutamin einerseits eine signifikante Menge des Dipeptids im Plasma nachweisbar ($188 \pm 9 \mu\text{mol/l}$) (vor dem Infusionsstart bzw. im Kontrollkollektiv und im Alanyl-Glutamin-Kollektiv konnte kein Glycyl-Glutamin nachgewiesen werden), andererseits zeigte der Plasmaspiegel des freien Glutamins unter Glycyl-Glutamininfusion keine nennenswerte Veränderung während des Infusionszeitraumes (Ende der Phase I: $353 \pm 20 \mu\text{mol/l}$, Ende der Phase II: $457 \pm 32 \mu\text{mol/l}$). im Gegensatz dazu stieg im Alanyl-Glutamin-Kollektiv der Plasmaspiegel des freien Glutamins signifikant an (Ende der Phase I: $470 \pm 39 \mu\text{mol/l}$, Ende der Phase II: $572 \pm 31 \mu\text{mol/l}$). Dieser Anstieg war signifikant ($p < 0,05$) im Vergleich zum Wert am Ende der Phase I und auch im Vergleich mit dem korrespondierenden Wert aus der Glycyl-Glutamin- und Kontrollgruppe (siehe Abb. 4).

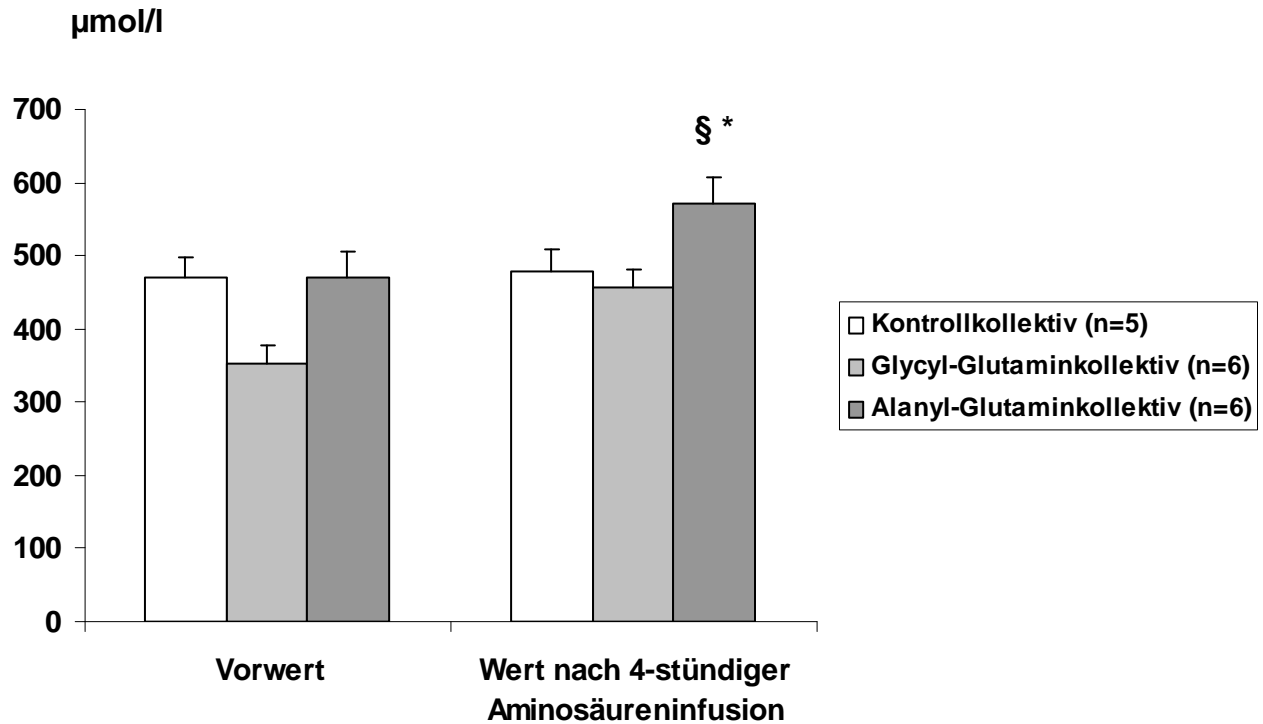
4.3 Anreicherung im Präkursorpool

Die in Tabelle 3 dargestellten Werte zeigen das Tracer / Tracee – Verhältnis im Präkursorpool (z_{AA}). Dies entspricht der 1- ^{13}C -Leuzin Anreicherung im Pool der freien, intrazellulären Aminosäuren. Die Tracer / Tracee – Verhältnisse zeigen sowohl in der Kontroll- wie auch in der Untersuchungsgruppe in allen drei Biopsien (nach 180, 360 und 600 Minuten) keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$). Wir können also davon ausgehen, dass der von uns gewünschte metabolische Steady state, bzw. Steady state in der Präkursorpoolanreicherung, erreicht ist.

4.4 Proteingebundene Anreicherung

Tabelle 4 stellt die entsprechenden Tracer / Tracee – Verhältnisse des proteingebundenen Leuzins (z_{Prot}) dar. Erwartungsgemäß kam es sowohl in der Kontroll- wie auch in der Untersuchungsgruppe zu einer kontinuierlichen Zunahme der proteingebundenen Anreicherung von 1- ^{13}C -Leuzin (Abb. 5).

Abbildung 4: Glutaminkonzentrationen im Plasma



§) $p < 0,05$ vs. Glycyl-Glutaminkollektiv u. Kontrollkollektiv (nach 4-stündiger Infusion)

*) $p < 0,05$ vs. Alanyl-Glutaminkollektiv (Vorwert)

Abbildung 4:

Glutaminkonzentrationen im Plasma der einzelnen Kollektive vor und nach 4-stündiger Infusion von Kochsalz (Kontrollkollektiv) bzw. dipeptidhaltigen Aminosäurenlösungen. Der Vorwert wurde 360 Minuten nach Studienbeginn (2. Blutentnahme) bestimmt, der Wert nach 4-stündiger Aminosäureinfusion am Ende des Versuchs.

Abbildung 5: 1-[¹³C]-Leuzin Tracer / Tracee Verhältnisse

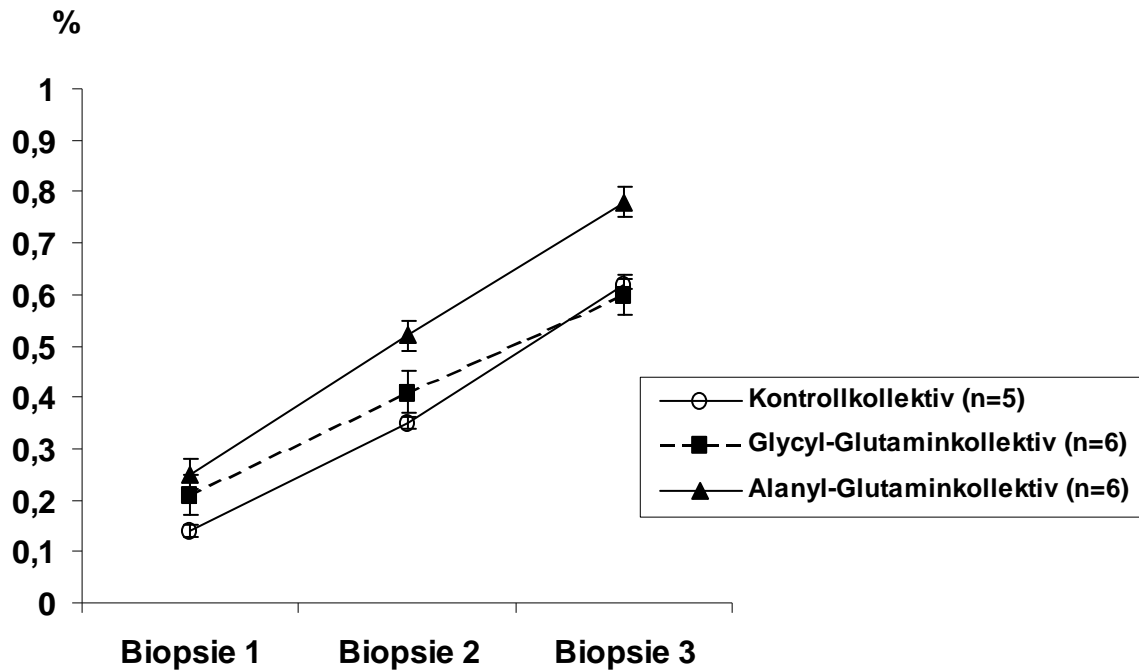


Abbildung 5:

Die Werte sind angegeben in %. Biopsie 1, 2 und 3 erfolgten nach 180-, 360- bzw. 600-minütiger Tracerinfusion.

4.5 Fraktionelle Proteinsyntheseraten

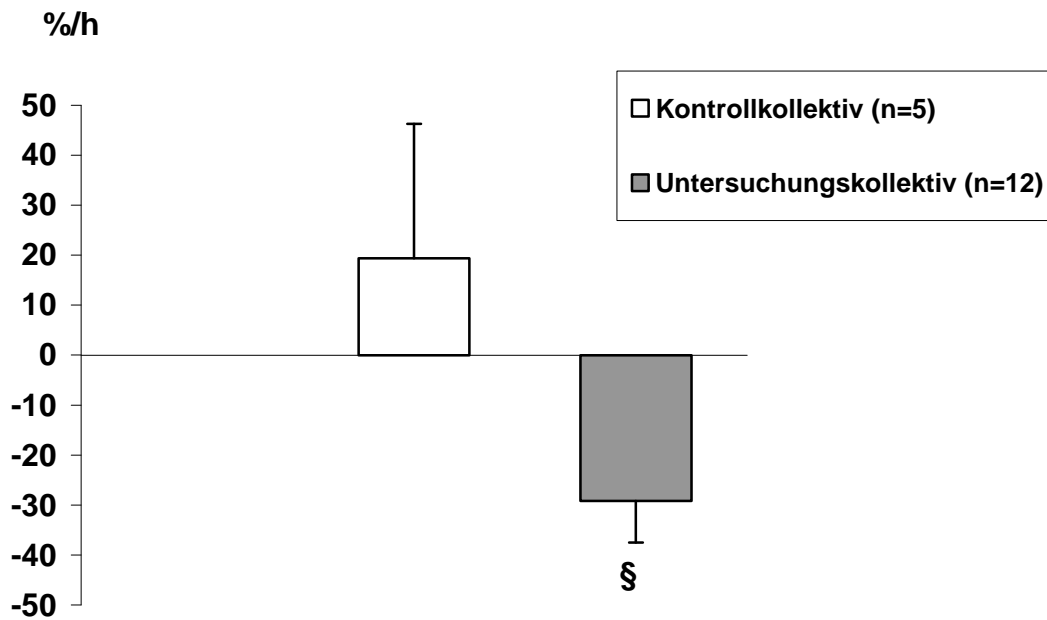
Mit Hilfe der Werte für die Anreicherung im Präkursorpool sowie für die proteingebundene Anreicherung konnten wir über die unter 3.4 beschriebene Formel <5>, die fraktionelle Proteinsynthese (FSR) der untersuchten Gewebe für die Phase I (Zeitraum zwischen der ersten Biopsie, 180 Minuten und der zweiten Biopsie, 360 Minuten nach Infusionsbeginn des Tracers 1- ^{13}C -Leuzin, siehe Kapitel 3.2, Versuchsablauf) und für die Phase II (Zeitraum zwischen der zweiten Biopsie, 360 Minuten und der dritten Biopsie, 600 Minuten nach Infusionsbeginn des Tracers 1- ^{13}C -Leuzin) berechnen (Tabelle 5).

Die fraktionelle Proteinsyntheserate der Kolonmukosa im Kontrollkollektiv zeigte während des Untersuchungszeitraumes keine signifikante Veränderung. Sie betrug am Ende der Phase I $1,00 \pm 0,17\%/h$ und am Ende der Phase II $1,03 \pm 0,05\%/h$. Im Vergleich dazu konnten wir nach Infusion der Aminosäuren / Dipeptid-Lösungen unter Einschluß aller infundierten Patienten ($n = 12$) einen signifikanten Abfall der fraktionierten Proteinsyntheseraten der Kolonmukosa feststellen ($0,95 \pm 0,13\%/h$ am Ende der Phase II, $p < 0,05$ vs. $1,34 \pm 0,10\%/h$ am Ende der Phase I). Die prozentuelle Änderung war auch im Vergleich zum Wert am Ende der Phase I in der Kontrollgruppe signifikant ($+ 19,4 \pm 26,9\%/h$ im Kontrollkollektiv, $p < 0,05$ vs. $- 29,2 \pm 8,3\%/h$ unter Dipeptid / Aminosäureinfusion) (Abb. 6).

Interessanterweise schienen die Effekte der Dipeptide auf die Proteinsynthese der Kolonmukosa im Alanyl-Glutamin-Kollektiv deutlich ausgeprägter zu sein als im Glycyl-Glutamin-Kollektiv. Die Infusion von Aminosäuren und Alanyl-Glutamin bei sechs Patienten hatte einen signifikanten Abfall der fraktionierten Proteinsynthese der Kolonmukosa zur Folge ($1,33 \pm 0,13\%/h$ am Ende der Phase I und $1,01 \pm 0,09\%/h$ am Ende der Phase II, $p < 0,05$). Aufgrund der kleinen Fallzahl waren jedoch die Unterschiede im Vergleich zum Kontrollkollektiv nicht signifikant. Die Infusion von Aminosäuren und Glycyl-Glutamin bewirkte nur einen tendenziellen Abfall der fraktionierten Proteinsyntheserate der Kolonmukosa, dieser zeigte sich bei vier von

sechs Patienten und war damit nicht signifikant ($p > 0,05$, $1,34 \pm 0,13$ %/h am Ende der Phase I und $0,88 \pm 0,23$ %/h am Ende der Phase II) (siehe Abb. 7).

Abbildung 6: Prozentuale Veränderung der fraktionellen Proteinsyntheseraten in der Kolonmukosa unter Dipeptid / Aminosäureinfusion

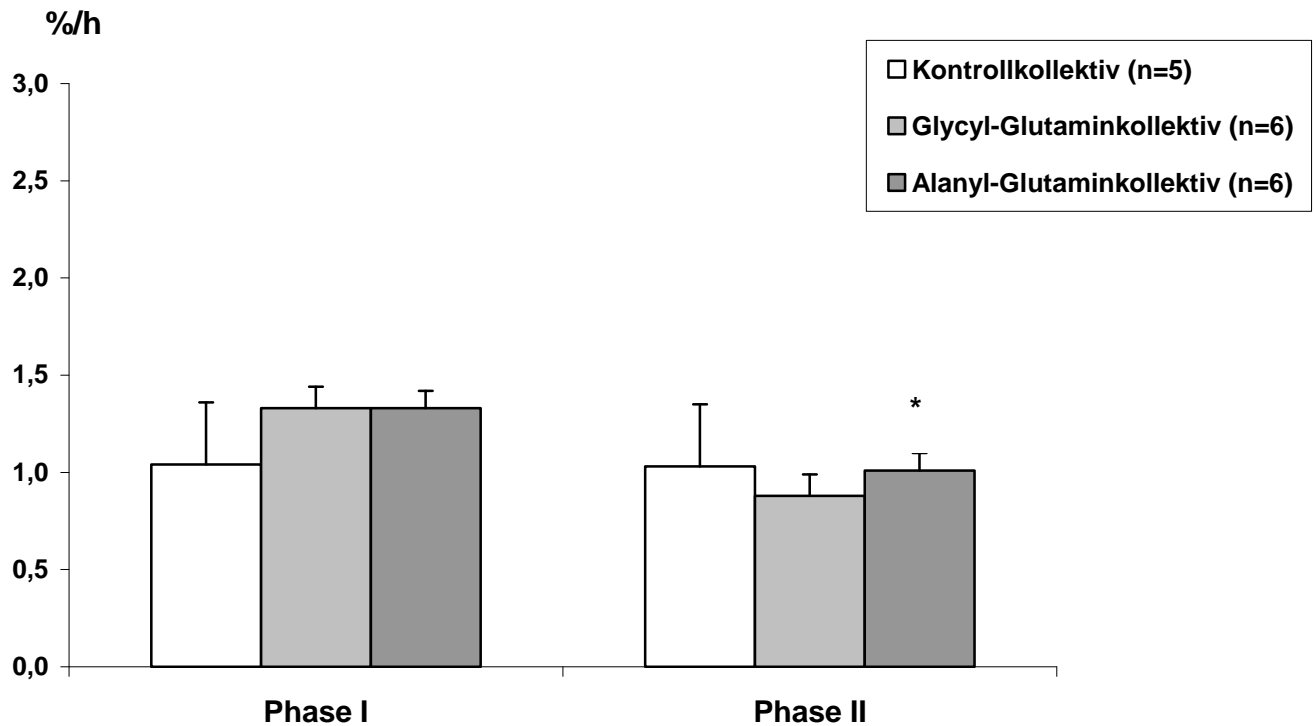


§) $p < 0,05$ vs. Kontrollkollektiv

Abbildung 6:

Dargestellt sind die prozentuellen Veränderungen der fraktionellen Proteinsyntheseraten in den Kontroll- und Untersuchungskollektiven.

Abbildung 7: Fraktionelle Proteinsyntheseraten (%/h) der Kolonmukosa in den einzelnen Kollektiven



*) $p < 0,05$ vs. Phase I (Alanyl-Glutaminkollektiv)

Abbildung 7:

1-[¹³C]-Leuzin wurde über 600 Minuten infundiert. Phase I umfasst den Zeitraum zwischen Minute 180 und 360, Phase II den Zeitraum zwischen Minute 360 und 600. In Phase II wurde entweder Kochsalz oder eine dipeptidhaltige Aminosäurenlösung infundiert.

5. Diskussion

5.1 Wahl der Methodik zur Messung von Proteinsyntheseraten

Die Kombination der Biopsietechnik mit der Stabile-Isotopen-Technik bietet ein für den Patienten relativ risikoarmes Verfahren, mit welchem die Proteinsyntheserate verschiedener Gewebe in situ untersucht werden kann. Zur Bestimmung der Proteinsyntheserate verwendeten wir die Traceramino­säure 1-[¹³C]-Leuzin, da bezüglich des menschlichen Eiweißstoffwechsels für diesen Tracer die meisten Vergleichsdaten vorliegen (13, 38, 85). Das Prinzip, anhand einer einzelnen, bestimmten Traceramino­säure Rückschlüsse auf die gesamte Proteinsyntheserate eines Kompartiments zu ziehen, beruht auf dem von Waterlow und Stephen bereits im Jahre 1967 entwickeltem Konzept. Dabei wird das Stoffwechselverhalten einer einzelnen Aminosäure als repräsentativ für den gesamten Eiweißumsatz in einem Kompartiment angesehen (12). Aufgrund von analytischen Schwierigkeiten ist es fast undenkbar bei dem geringen Probenumfang, der anhand der Biopsietechnik gewonnen wird, die Proteinsyntheserate von einzelnen Proteinen aufzuschlüsseln. Trotz der Heterogenität der so gewonnenen Proteine ist es möglich, eine verwertbare Aussage über die jeweilige Situation des Eiweißstoffwechsels in einem bestimmten Organ zu erhalten. Anhand dieser Tracertechnik wurden so z.B. am menschlichen Skelettmuskel (31, 37, 69, 92) oder in menschlichen kolorektalen Tumoren bzw. an menschlicher Kolonmukosa in situ (48, 49) diverse Substrat- und Hormoneffekte nachgewiesen, die sehr gut mit den Ergebnissen aus klinischen bzw. molekularbiologischen Studien zu vereinbaren sind (11, 20, 32, 38, 85).

Zur Berechnung der Proteinsyntheserate ist es wichtig, die Traceranreicherung in zwei verschiedenen Kompartimenten zu bestimmen. Zum einen ermittelten wir die Anreicherung in den synthetisierten Proteinen der Kolonmukosa, zum anderen im Präkursorpool (Pool der intrazellulären Aminosäuren, die der Proteinsynthese als Substrate zur Verfügung stehen). Das exakte Kompartiment zur Bestimmung der Präkursorpoolanreicherung wäre der Pool der tRNA-gebundenen Aminosäuren. Die zur Verfügung stehende Probenmenge reicht zur Ermittlung dieser Poolanreicherung

allerdings nicht aus, deshalb kann als Surrogat für die echte Präkursorpoolanreicherung die Anreicherung im Pool der freien, intrazellulären Aminosäuren bestimmt werden. Dieses Verfahren ist in der Literatur etabliert und liefert im humanbiologischen Experiment reproduzierbare Ergebnisse mit hinreichender Präzision (49, 87). Die Berechnung der Proteinsyntheserate in einem Kompartiment erfolgte dann dadurch, daß man den Anstieg der Proteinanreicherung über die Zeit bei kontinuierlicher Tracerinfusion auf das mittlere, intrazelluläre Tracerangebot im Präkursorpool des Untersuchungszeitraumes bezieht. Voraussetzung dafür ist, dass für die Präkursorpoolanreicherung ein metabolischer Steady State vorliegt, d.h. dass die Anreicherung des Tracers im Präkursorpool während des Untersuchungszeitraums möglichst konstant ist. Nur so kann die Ableitung der fraktionellen Proteinsyntheseraten aus einer einfachen, linearen Präkursor / Produkt Beziehung erfolgen.

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, waren diese Voraussetzungen in unserem Fall gegeben, da sich die Tracer / Tracee Verhältnisse für 1- ^{13}C -Leuzin bei den freien intrazellulären Aminosäuren (= Präkursorpoolanreicherung) nicht signifikant während des Untersuchungszeitraumes änderten.

5.2 Infusionsmenge und Infusionsdauer der Aminosäuren-/Dipeptidlösungen

Überraschendes Ergebnis unserer Untersuchungen war die Tatsache, dass im Gegensatz zu den bisher beschriebenen zellulären bzw. tierexperimentellen Befunden (Steigerung der Enterozytenproliferation und Proteinsynthese) die Kolonproteinsyntheserate postoperativ unter Aminosäuren-/Dipeptidinfusion signifikant abnahm. Somit muß diskutiert werden, ob der Versuchsaufbau für die zu untersuchende Fragestellung adäquat war.

Als Ursache für den ausbleibenden Anstieg der fraktionierten Proteinsyntheserate der Kolonmukosa kann zunächst eine unzureichende Substratmenge ausgeschlossen werden. Wir setzten für unsere Studie ausschließlich kommerziell frei erwerbbar Aminosäurenlösungen ein, welche entweder mit Glycyl-Glutamin

oder Alanyl-Glutamin kombiniert wurden. Wir verabreichten ca. 67 mg Aminosäuren/kg KG/h. Die Dipeptidmenge betrug ca. 15 mg/kg KG/h. Rechnet man diese Menge über einen 24-Stunden Zeitraum, würde dies einer Gesamtmenge an Aminosäuren von 1,5 g/kg KG und an Dipeptiden von 0,36 g/kg KG entsprechen. Damit liegen die Infusionsraten deutlich über den aktuellen Empfehlungen zur Aufrechterhaltung des Körpereweißbestandes nach chirurgischem Trauma (Aminosäuren: 1,2 g/kg KG/24 Stunden, Glutaminhaltige Dipeptide: 0,30 g/kg KG /24 Stunden) (54, 77).

Desweiteren ist es unwahrscheinlich, dass der Infusionszeitraum von 240 Minuten nicht ausreichend lang war, um einen Anstieg der fraktionellen Proteinsyntheserate der Kolonmukosa zu bewirken. Die Halbwertszeit des Dipeptids Glycyl-Glutamin beträgt ca. 7,8 Minuten, die Halbwertszeit des Dipeptids Alanyl-Glutamin ist sogar noch kürzer (ca. 2,4 Minuten) (53). Laut in vitro Experimenten ist ein Zeitraum von 240 Minuten mehr als ausreichend, um eine intestinale Zellantwort auf Glutamin zu bewirken (51, 91). Außerdem zeigte sich bei Untersuchungen am humanen Skelettmuskelgewebe, das eine zwanzigfach langsamere fraktionelle Proteinsyntheserate als der Gastrointestinaltrakt aufweist, dass eine 180-minütige Aminosäureinfusion ausreichend war, um die Proteinsyntheserate in situ zu verdoppeln (102).

5.3 Utilisation von parenteral zugeführten Aminosäuren / Dipeptiden in vivo

Studien am Menschen haben gezeigt, dass im Splanchnikusgebiet (also der Gastrointestinaltrakt und die Leber) ein Großteil von intravenös verabreichten Aminosäuren aufgenommen wird und es dort auch zu einer signifikanten Steigerung der Proteinsyntheserate kommt (40, 79). In einer tierexperimentellen Studie konnte bei Hunden über einen Portalvenenkatheter direkt der intestinale Eiweißstoffwechsel untersucht werden. Hier zeigte sich unter Aminosäureinfusion eine ansteigend positive Bilanz von verzweigtkettigen Aminosäuren am Darm (34, 45). Nach wie vor aber ist das Wissen über das genaue intrazelluläre Schicksal der Aminosäuren im Intestinum sehr gering. Zum einen gibt es Studienergebnisse, die darauf hindeuten,

dass eine proteinreiche Mahlzeit beim Hund zu einem Anstieg der intestinalen Proteinsynthese führt (112), in anderen Studien wiederum reagierte weder die duodenale Proteinsynthese in situ beim Menschen noch die Proteinsynthese von Enterozyten der Ratte in vitro auf ein erhöhtes Aminosäureangebot. Dies könnte darauf deuten, dass die Leber der mutmaßliche Hauptort der Proteinsynthese im Splanchnikusgebiet ist, wenn Aminosäuren intravenös zugeführt werden (51, 80). Dazu würden auch Befunde an jungen Schweinen passen, in denen eine parenterale Aminosäurezufuhr ebenfalls nicht in der Lage war, die Proteinsyntheserate des Darmes signifikant zu steigern (4, 24).

Eine vergleichbare Unsicherheit besteht auch im Hinblick auf glutaminhaltige Dipeptide. Bei der Eliminierung dieser Substanzen scheint beim Menschen das Splanchnikusgebiet eine große Rolle zu spielen (65, 66), und Dipeptide können im Gastrointestinaltrakt auch metabolisiert werden. Die Tatsache, dass die intestinale Dipeptidbilanz während einer parenteralen Zufuhr bei Versuchen am Hund eindeutig positiv war, vermittelt den Eindruck einer extrahepatischen Nutzung im Splanchnikusgebiet, wie z.B. im Dün- oder Dickdarm (1, 57). Andererseits wurde die vermehrte intestinale Nutzung der Dipeptide nicht von einer vermehrten Aufnahme von freiem Glutamin begleitet trotz eines Anstiegs des arteriellen Glutaminangebotes. Diese Ergebnisse deuten auf eine reduzierte Glutaminaufnahmerate während der Dipeptidinfusion hin (1, 57) und können ein Hinweis auf eine Sättigung der intestinalen Glutaminnutzung sein. Diese Sättigung erklärt eventuell auch wichtige, metabolische Effekte von Glutamin oder glutaminhaltigen Dipeptiden im Gastrointestinaltrakt. Obwohl für Glutamin oder Alanyl-Glutamin in vitro ein stimulierender Effekt auf Enterozyten im Vergleich zu einem glutaminfreien Nährmedium nachgewiesen wurde (91), konnte oberhalb eines Plateauwertes der Glutaminkonzentration im Inkubationsmedium (ca. 700 $\mu\text{mol/l}$) kein weiterer, anaboler Effekt, wie zum Beispiel ein Anstieg der Proteinsyntheserate, mehr nachgewiesen werden (51). Es besteht somit durchaus die Möglichkeit, dass ein ähnlicher Sättigungseffekt beim Menschen existiert. Ein Plateauwert um die 400 $\mu\text{mol/l}$ (wie bei unseren Patienten) könnte ausreichend sein, um eine suffiziente Proteinsynthese der Kolonmukosa aufrecht zu erhalten, während jede darüber

hinausgehende Glutaminzufuhr keinen zusätzlichen stimulierenden Effekt mehr auf die Proteinsynthese in situ hat.

5.4 Immunmodulatorische Effekte von Glutamin

Eine Erklärung für den Abfall der fraktionellen Proteinsynthese der Kolonmukosa unter kombinierter Glutamin-Dipeptid / Aminosäureinfusion ergibt sich nicht eindeutig aus Daten in der Literatur und kann möglicherweise in einem indirekten, nicht metabolischen Effekt von Glutamin gesucht werden. Eine große Bedeutung könnte dabei die postoperativ veränderte Aktivität des intestinalen Immunsystems haben. In früheren Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass die intestinale Mukosa auf chirurgischen Stress mit einem Anstieg der Proteinsynthese reagiert (43, 87, 88). Es gibt signifikante Hinweise darauf, dass dieser Anstieg durch eine peri- und postoperativ vermehrte Aktivität der immunaktiven Zellen des Gastrointestinaltraktes bedingt sein könnte. Neuere Studien zeigen außerdem, dass nicht nur abdominalchirurgische Eingriffe oder eine sonstige Manipulation des Darmes eine Infiltration und Aktivierung von intestinalen, inflammatorischen Zellen hervorrufen kann, sondern dass auch die prolongierte Nahrungskarenz einen ähnlichen Effekt haben kann (56, 61, 100).

Postoperativ sind inflammatorische Zellen im Intestinaltrakt in der Lage, freie Radikale und proinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-6 freizusetzen (99, 109). Die Folge hiervon könnte als negativer Effekt sowohl eine erhöhte intestinale Permeabilität durch eine verminderte Darmintegrität (beispielsweise durch eine Zerstörung der tight junctions) sein (100), andererseits werden sowohl die Enterozyten-Apoptose als auch kompensatorisch die Enterozytenproliferation durch Zytokine beschleunigt (43, 83). Dieser Mechanismus könnte den bereits früher nachgewiesenen Anstieg der Proteinsyntheserate am Darm erklären.

Es besteht nun die Möglichkeit, dass eine glutaminhaltige Dipeptidinfusion den Signalwegen der intestinalen, immunologischen Aktivität entgegenwirkt, indem sie antioxidative Schutzfunktionen induziert. Das Glutaminangebot spielt eine

entscheidende Rolle für den Glutathionstoffwechsel. So konnte gezeigt werden, dass additiv zugeführtes Glutamin den intrazellulären Glutathiongehalt des Gastrointestinaltraktes stabilisieren bzw. erhöhen (89) oder direkt die Glutathionsynthese steigern kann (19).

In anderen Studien konnte unter dem Einfluß von Glutamin eine verminderte Zytokinfreisetzung aus der intestinalen Mukosa und aus mesenterialen, mononukleären Zellen (8, 21) nachgewiesen werden. Somit lässt sich die Hypothese formulieren, dass die glutamininduzierte Hemmung der postoperativ stimulierten intestinalen Zytokinproduktion die Ursache für die von uns beobachtete reduzierte Proteinsynthese unter Dipeptidinfusion gewesen sein könnte.

Es wird zukünftigen Untersuchungen überlassen bleiben zu zeigen, in wieweit weitere Parameter der intestinalen Funktion (z.B. Enterozytenapoptoserate) durch Glutamin günstig beeinflusst werden können.

5.5 Unterschiedliche Effekte der Dipeptide Glycyl-Glutamin und Alanyl-Glutamin

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen lassen vermuten, dass sich die beiden von uns verwendeten Dipeptide in ihrer Auswirkung unterscheiden könnten. So war der Effekt von Alanyl-Glutamin sowohl auf die Plasmakonzentrationen von Glutamin wie auch auf die fraktionelle Proteinsynthese der Kolonmukosa ausgeprägter als der von Glycyl-Glutamin. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür bieten die pharmakologischen Unterschiede zwischen diesen zwei Dipeptiden. So unterliegt Alanyl-Glutamin einer schnellen Hydrolisierung durch sowohl Plasma- sowie auch nierenständiger Enzyme. Glycyl-Glutamin wird hingegen im Plasma kaum hydrolisiert und der größte Teil des infundierten Glycyl-Glutamins erreicht das Gewebe als intaktes Dipeptid und könnte so Glutamin direkt an der Zelloberfläche bzw. intrazellulär zur Verfügung stellen (6). Glycyl-Glutamin, welches arteriell in den Gastrointestinaltrakt gelangt, tritt von Seiten der basolateralen Membran mit der Mukosa in Kontakt, wo es durch spezifische

Carrierproteine (28, 33) aufgenommen wird oder passiv diffundiert (5). Im Zellinneren wird Glycyl-Glutamin in der Regel durch zytosolische Dipeptidasen hydrolysiert (76).

Die Infusion von Alanyl-Glutamin führt so (wie von uns beobachtet) rasch zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration des freien Glutamins im Plasma. Im Vergleich dazu erhöht die Infusion von Glycyl-Glutamin die Glutaminkonzentration im Plasma nicht. Lediglich einen merklichen Anstieg des Plasmaspiegels für das Dipeptid Glycyl-Glutamin (auf Werte von 190 $\mu\text{mol/l}$) am Ende der Infusionszeit von 240 Minuten war zu beobachten.

Es besteht somit die Möglichkeit, dass die intestinale Verfügbarkeit von Glutamin während der Infusion von Glycyl-Glutamin niedriger war als während der Infusion von Alanyl-Glutamin. Offensichtlich ist die Hydrolyse von Glycyl-Glutamin in den Enterozyten ein langsamer Prozess (76) und diese niedrige, zytosolische Clearance von intravenösem Glycyl-Glutamin im Intestinaltrakt kann durch einen Mangel an intestinalen Dipeptidasen noch weiter beeinträchtigt werden, wie er sowohl bei diversen pathologischen Prozessen des Intestinaltraktes als auch postoperativ beschrieben wurde (50, 90). In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass die langsame Verwertung von Glycyl-Glutamin nicht nur auf den Gastrointestinaltrakt beschränkt ist, sondern auch im Skelettmuskel beobachtet werden konnte. In diversen Studien hatte eine Glycyl-Glutamin-Infusion einen nur schwachen Effekt auf den muskulären Proteingehalt, die Proteinsynthese oder die Stickstoffbilanz (81, 82, 106).

5.6 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Wie in dem Kapitel „Immunmodulatorische Effekte von Glutamin“ bereits diskutiert, könnte eine geringere Proteinsyntheserate unter Glutaminapplikation auf einen geringeren Mukosaschaden hinweisen. Diese Hypothese wäre auch mit anderen Glutaminwirkungen am Intestinaltrakt vereinbar. So kommt es regelhaft nach einem chirurgischen Trauma zu Störungen der intestinalen Mikrozirkulation mit konsekutiver Erhöhung der intestinalen Permeabilität für Mikroorganismen oder deren Toxine.

Diese Veränderungen werden als mögliche Ursache des postoperativ regelhaft zu beobachtenden SIRS (systemic inflammatory response syndrome) und nosokomialer Infekte diskutiert. Es konnte nun in klinischen Studien gezeigt werden, dass die zusätzliche Glutaminsupplementierung einen protektiven Effekt am Intestinaltrakt besitzt, da dadurch eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität verhindert oder zumindest deren Ausmaß verringert wird. Glutamin vermag auch die Häufigkeit nosokomialer Infektionen zu reduzieren, ein Effekt, der vermutlich durch die geringere Translokation von Mikroorganismen zustande kommt (Übersicht bei 27).

Die intravenöse Supplementierung von Glutamin scheint durch diese organspezifischen Auswirkungen auch relevant für die Prognose der Patienten zu sein. So zeigte sich in einer Metaanalyse (110), dass die parenterale Verabreichung von Glutamin (0,2-0,57 g/kg KG in 24 Stunden) die Letalität kritisch kranker Patienten signifikant senken kann. Kein Einfluss bestand auf die Liegedauer auf Intensivstationen.

Auch in einer Untersuchung an Patienten nach größeren, abdominalchirurgischen Eingriffen zeigten sich günstige klinische Ergebnisse (55). Dabei verbesserte die postoperative Verabreichung von parenteralem Alanyl-Glutamin (0,5g/kg KG in 24 Stunden) die Stickstoffbilanz und die intestinale Permeabilität signifikant. Gleichzeitig konnte die Krankenhausverweildauer verkürzt werden.

Es scheinen zusätzlich auch günstige Langzeiteffekte nach intravenöser Glutaminsupplementierung zu bestehen. Eine parenterale Verabreichung von Alanyl-Glutamin (0,3 g/kg/KG in 24 Stunden) bei intensivpflichtigen Patienten über einen Zeitraum von ≥ 9 Tagen zeigte so eine signifikant erhöhte Überlebensrate nach 6 Monaten (41).

Im Gegensatz zur parenteralen Glutaminzufuhr ist vermutlich die enterale Verabreichung von Glutamin deutlich weniger effektiv (47). Hintergrund ist zum einen der ausgeprägte „First-Pass-Effekt“ bei luminaler Zufuhr (für Glutamin ca. 53% der zugeführten Menge beim Menschen). Des Weiteren ist für ausreichend anabole

Effekte am Intestinum vermutlich das Zusammenspiel von Insulin, Kohlenhydraten und arteriellem Aminosäureangebot von Bedeutung. Die ausschließliche lumenale Zufuhr von Aminosäuren (einschließlich Glutamin) ist gerade im Hinblick auf die intestinale Proteinsynthese nur sehr eingeschränkt wirksam (47).

Auch in einer Metaanalyse (110) zur enteralen Verabreichung von Glutamin zeigte sich kein Effekt auf die Letalität. Insbesondere für kritisch kranke Patientengruppen ist die Effizienz dieser Applikationsform somit sehr unsicher. Eine Reduktion der Komplikationen aufgrund einer geringeren Infektionshäufigkeit gilt bei enteraler Substitution von Glutamin bisher ebenfalls als nicht bewiesen.

Dementsprechend blieb auch nach elektiver subtotaler Ösophagektomie eine mit Glutamin angereicherte, enterale Ernährung hinsichtlich einiger Serumparameter (Retinol-bindendes Protein, Prealbumin, Immunglobuline) ohne Effekt (44).

Unsere Daten erlauben es nicht endgültig zu entscheiden, ob glutaminhaltige Aminosäurelösungen postoperativ aus klinischer Sicht nützlich oder schädlich sein könnten. In der Vergangenheit konnten verschiedene experimentelle Untersuchungen in unterschiedlichen Modellen für Mukosaverletzungen zeigen, dass eine vermehrte Glutaminzufuhr in der Lage ist, die Mukosaheilung zu beschleunigen (29, 102). Bedauerlicherweise gibt es zu diesem Thema praktisch keine Studien an chirurgischen Patienten. Falls unser Ergebnis einer verringerten Mukosaproteinsyntheserate unter Glutaminsupplementierung tatsächlich auf eine verbesserte Mukosafunktion hinweist, könnte es eine weitere Erklärung für mögliche klinische Vorteile einer postoperativen, parenteralen Glutaminzufuhr bieten (78).

6. Zusammenfassung

Glutamin ist ein wichtiges Substrat für den Energie- und Eiweißstoffwechsel der Mukosa und kann wichtige, intestinale Funktionen positiv beeinflussen. Bisher existieren jedoch hauptsächlich tierexperimentelle Daten oder Ergebnisse aus in vitro Studien, ein eindeutiger Nachweis für Glutamin Effekte in vivo und in situ konnten bisher am Menschen nicht erbracht werden. Extrapolationen von tierischen Experimenten sind aufgrund von ausgeprägten Speziesunterschieden problematisch.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Effekt von parenteralen glutaminhaltigen Dipeptiden in Kombination mit kommerziellen Aminosäurenlösungen auf die Proteinsynthese des operierten Kolons in vivo und in situ mittels der Stabile-Isotopen-Technik zu bestimmen.

Wir untersuchten drei postoperative Patientengruppen, wobei sich alle Patienten einem großen, abdominalchirurgischen Eingriff unterzogen hatten, welcher auch die Anlage eines künstlichen Dickdarmausgangs beinhaltete. Das erste Kollektiv diente als Kontrollkollektiv (nur Zufuhr von Kochsalzlösung). Die beiden Untersuchungskollektive erhielten intravenös entweder eine Glycyl-Glutamin / Aminosäurenlösung oder eine Alanyl-Glutamin / Aminosäurenlösung über vier Stunden. Gleichzeitig wurde der Tracer 1- ^{13}C -Leuzin über den Zeitraum von 600 Minuten infundiert. Nach der Basalperiode (Phase I, Minute 180 bis 360) erhielten die Patienten die jeweilige, zusätzliche Infusionslösung (Phase II, Minute 360 bis 600). Mukosabiopsien zur Bestimmung der Proteinsyntheserate wurden nach 180, 360 und 600 Minuten aus der Darmmukosa entnommen. Mithilfe der Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie bestimmten wir die proteingebundene Tracer-Anreicherung in der Mukosa, mittels der Gaschromatographie-Massenspektrometrie bestimmten wir die Tracer-Anreicherung im Pool der freien, intrazellulären Aminosäuren. Anhand der beiden Anreicherungen konnten wir die fraktionelle Proteinsyntheserate (in %/h) in den einzelnen Kollektiven bestimmen. Gleichzeitig maßen wir die Plasmakonzentration von Glutamin und erstellten ein Plasma-Aminosäureprofil aus Blutproben, die wir jeweils mit den Biopsien entnahmen.

Es ergab sich für das Kontrollkollektiv erwartungsgemäß keine signifikante Änderung der fraktionellen Proteinsyntheserate von Phase I (Zeitraum zwischen erster und zweiter Biopsie) zu Phase II (Zeitraum zwischen zweiter und dritter Biopsie). Sie betrug am Ende der Phase I $1,00 \pm 0,17$ %/h und am Ende der Phase II $1,03 \pm 0,51$ %/h. Auch die Plasmaamino­säurenkonzentrationen und Gluta­minkonzentration änderte sich nicht signifikant. Unter Dipeptid / Aminosäurezufuhr beobachteten wir trotz eines signifikanten Anstiegs in der Aminosäurenkonzentration am Ende von Phase II einen signifikanten Abfall der Proteinsyntheserate des Kolons ($- 29,2 \pm 8,3$ %/h $p < 0,05$ vs. Kontrollkollektiv). Die Betrachtung der Untergruppen zeigte, dass unter Alanyl-Glutamin / Aminosäurezufuhr dieser Effekt ausgeprägter war als unter Glycyl-Glutamin / Aminosäurezufuhr. Nur unter Alanyl-Glutamin / Aminosäurezufuhr war ein signifikanter Anstieg der Plasma Gluta­minkonzentration und ein signifikanter Abfall der Kolonproteinsynthese über die Zeit zu beobachten (Phase II: $1,01 \pm 0,09$ %/h, $p < 0,05$ vs. $1,35 \pm 0,13$ %/h in Phase I). Der überraschend gefundene Abfall der fraktionellen Proteinsyntheserate im Kolon in vivo unter Dipeptidinfusion widerspricht in vitro und tierexperimentellen Studien. Diese zeigten für Gluta­min am Intestinaltrakt stimulierende Effekte, wobei alle anderen Aminosäuren ohne relevanten Effekt auf den Eiweißstoffwechsel bleiben.

Eine Erklärung unserer Befunde könnte womöglich in einem indirekten, nicht metabolischen Effekt von Gluta­min bestehen. So ist die nach einem chirurgischen Trauma zu beobachtende Steigerung der intestinalen Proteinsynthese zu einem großen Teil als Kompensation für eine erhöhte Apoptose immunologisch vermittelt (Zytokine). Gluta­min kann diesen Mechanismus durch seine antiinflammatorische Wirkung (Glutathion) möglicherweise abschwächen und so die intestinale Protein­synthese wieder senken. Die möglicherweise geringere Auswirkung des Dipeptids Glycyl-Glutamin im Vergleich zu Alanyl-Glutamin auf die fraktionelle Protein­syntheserate des Kolons lässt sich am ehesten mit pharmakologischen Differenzen erklären (akut höhere intestinale Gluta­minverfügbarkeit unter Alanyl-Glutaminzufuhr).

Inwieweit der gefundene Gluta­min Effekt am operierten menschlichen Kolon tatsächlich von Vorteil ist, muß Gegenstand zukünftiger Studien sein.

7. Anhang

7.1 Tabellen

Tabelle 1:

Diagnosen und vorangegangene Operationen in den einzelnen Kollektiven.

	Diagnosen	Operationen
Kontrollkollektiv Kochsalzinfusion (n=5)	1 Rektumkarzinom	Abd. perineale Rektumextirpation
	2 Anastomosenrezidiv bei Z.n. Rektumkarzinom	Abd. perineale Rektumextirpation
	3 Rektumkarzinom	tiefe, anteriore Rektumextirpation
	4 Rektumkarzinom	Abd. perineale Rektumextirpation
	5 Rektumkarzinom	OP nach Hartmann
Untersuchungskollektiv Glycyl-Glutamin + Aminosäureninfusion (n=6)	1 Sigmakarzinom	OP nach Hartmann
	2 Z.n. Rektumkarzinom, Anastomosenrezidiv	OP nach Hartmann
	3 Analkarzinom	Abd. perineale Rektumextirpation
	4 Rektumkarzinom	tiefe, anteriore Rektumextirpation
	5 Präsakrales Rezidiv eines Rektumkarzinoms	anteriore Rektumresektion
	6 Rektumkarzinom	Abd. perineale Rektumextirpation
Untersuchungskollektiv Alanyl-Glutamin + Aminosäureninfusion (n=6)	1 Rektumkarzinom	Abd. perineale Rektumextirpation
	2 Z.n. Rektumkarzinom, Anastomosen- insuffizienz	Abd. perineale Rektumextirpation
	3 Rektumkarzinom	Abd. perineale Rektumextirpation
	4 Rectovaginale Fistel bei Rektumkarzinom	Rektumresektion
	5 Rektumkarzinom	anteriore Rektumresektion
	6 Rektumepitheldysplasie	OP nach Hartmann

Tabelle 2:

Körpergröße, Körpergewicht, Bodymassindex, Alter und Geschlecht der Patienten in den einzelnen Kollektiven.

		Körpergröße in cm	Körpergewicht in kg	Bodymass- index	Alter	Geschlecht
Kontrollkollektiv	1	165	62	22,8	69	weiblich
Kochsalzinfusion (n=5)	2	178	85,5	26,9	48	männlich
	3	168	72	25,5	66	männlich
	4	168	78	27,6	69	männlich
	5	162	57,5	21,9	72	weiblich
MW ± SEM		168 ± 2,4	70,8 ± 4,6	26,5 ± 2,2	65 ± 3,5	
Untersuchungs- kollektiv	1	165	83	30,5	55	männlich
Glycyl-Glutamin Aminosäuren- infusion (n=6)	2	182	68,5	20,7	63	männlich
	3	165	69	25,3	66	männlich
	4	165	96	35,3	73	weiblich
	5	182	89	26,9	40	männlich
	6	172	65	22,0	66	männlich
MW ± SEM		172 ± 3,1	78 ± 4,8	26,8 ± 2,0	60 ± 4,2	
Untersuchungs- kollektiv	1	164	79	29,4	61	männlich
Alanyl-Glutamin Aminosäuren- infusion (n=6)	2	172	85	28,7	61	männlich
	3	164	70	26,0	64	weiblich
	4	150	75	33,3	68	weiblich
	5	172	73	24,7	70	männlich
	6	167	60	21,5	78	weiblich
MW ± SEM		165 ± 3,0	73,7 ± 3,2	27,3 ± 1,5	67 ± 2,4	

Tabelle 3:

Präkursorpoolanreicherung: 1-[¹³C]-Leuzin Tracer / Tracee – Verhältnis in % für das freie, intrazelluläre Leuzin (Z_{AA}) in den einzelnen Kollektiven. Biopsie 1 wurde nach 180 min., Biopsie 2 nach 360 min. und Biopsie 3 nach 600 min. nach Start der Infusion des Tracers 1-[¹³C]-Leuzin entnommen. Die Tracer / Tracee – Verhältnisse zeigen sowohl in dem Kontroll- wie auch in den Untersuchungskollektiven keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$).

	Z_{AA} Biopsie 1	Z_{AA} Biopsie 2	Z_{AA} Biopsie 3
Kontrollkollektiv			
Kochsalzinfusion (n=5)	6,67 ± 0,50	6,43 ± 0,59	7,14 ± 0,59
Untersuchungskollektiv			
Glycyl-Glutamin			
Aminosäureinfusion (n=6)	5,87 ± 0,36	5,40 ± 0,51	5,98 ± 0,56
Untersuchungskollektiv			
Alanyl-Glutamin			
Aminosäureinfusion (n=6)	7,23 ± 0,39	6,59 ± 0,64	7,14 ± 0,25

Tabelle 4:

Proteingebundene Anreicherung der Kolonmukosa: 1- ^{13}C]-Leuzin Tracer / Tracee – Verhältnisse (in %) im proteingebundenen Leuzin (Z_{Prot}) in den einzelnen Kollektiven. Biopsie 1 wurde nach 180 min., Biopsie 2 nach 360 min. und Biopsie 3 nach 600 min. nach Start der Infusion des Tracers 1- ^{13}C]-Leuzin entnommen. Alle Kollektive zeigen einen signifikanten Anstieg der Traceranreicherung über die Zeit ($p < 0,05$).

		Z_{Prot} Biopsie 1	Z_{Prot} Biopsie 2	Z_{Prot} Biopsie 3
Kontrollkollektiv	1	0,16	0,50	0,78
Kochsalzinfusion (n=5)	2	0,13	0,42	0,77
	3	0,12	0,29	0,49
	4	0,11	0,19	0,43
	5	0,19	0,35	0,66
	MW \pm SEM	0,14 \pm 0,01	0,35 \pm 0,05	0,62 \pm 0,07
Untersuchungskollektiv	1	0,13	0,35	0,63
Glycyl-Glutamin Aminosäureninfusion (n=6)	2	0,12	0,45	0,50
	3	0,22	0,45	0,76
	4	0,28	0,37	0,43
	5	0,28	0,47	0,66
	6	0,22	0,41	0,66
	MW \pm SEM	0,21 \pm 0,03	0,41 \pm 0,02	0,60 \pm 0,04
Untersuchungskollektiv	1	0,32	0,61	0,85
Alanyl-Glutamin Aminosäureninfusion (n=6)	2	0,17	0,41	0,67
	3	0,11	0,36	0,71
	4	0,43	0,60	0,73
	5	0,30	0,53	0,82
	6	0,17	0,60	0,95
	MW \pm SEM	0,25 \pm 0,04	0,52 \pm 0,04	0,78 \pm 0,04

Tabelle 5:

Fraktionelle Proteinsyntheseraten (FSR) in %/h in den einzelnen Kollektiven. FSR I beschreibt den Zeitraum zwischen der 1. und der 2. Biopsie (Minute 180 bis 360) und FSR II den Zeitraum zwischen der zweiten und der dritten Biopsie (Minute 360 bis 600).

		FSR I	FSR II
Kontrollkollektiv	1	1,65	1,02
Kochsalzinfusion (n=5)	2	1,11	0,98
	3	0,89	0,86
	4	0,53	1,15
	5	0,84	1,12
	MW ± SEM		1,00 ± 0,17
Untersuchungskollektiv	1	1,35	1,13
Glycyl-Glutamin Aminosäureninfusion (n=6)	2	1,73	0,19
	3	1,12	1,13
	4	0,87	0,23
	5	1,22	0,75
	6	1,74	1,85
	MW ± SEM		1,34 ± 0,13
Untersuchungskollektiv	1	1,50	1,17
Alanyl-Glutamin Aminosäureninfusion (n=6)	2	1,22	1,15
	3	0,83	0,54
	4	1,16	1,02
	5	1,89	1,11
	6	1,40	1,08
	MW ± SEM		1,33 ± 0,13

*) P < 0,05 vs. FSR I

7.2 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Versuchsablauf	9
Abbildung 2: Gaschromatographie – Isotopenverhältnis – Massenspektrometrie (GC-IRMS)	17
Abbildung 3: Gaschromatographie – Massenspektrometrie (GC-MS)	21
Abbildung 4: Glutaminkonzentrationen im Plasma.....	27
Abbildung 5: 1-[¹³ C]-Leuzin Tracer / Tracee Verhältnisse	28
Abbildung 6: Prozentuale Veränderung der fraktionellen Proteinsyntheseraten in der Kolonmukosa unter Dipeptid / Aminosäureinfusion	31
Abbildung 7: Fraktionelle Proteinsyntheseraten (%/h) der Kolonmukosa in den einzelnen Kollektiven.....	32

7.3 Verzeichnis der Abkürzungen

BMI	Body-Mass-Index
FSR	Fraktionelle Proteinsyntheserate
GC-IRMS	Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HCL	Salzsäure
He	Helium
NADPH ₂	Nicotinsäureamid
NaOH	Natriumhydroxid
NAP	N-acetyl-n-propyl
NH ₃	Ammoniak
rpm	Umdrehungen pro Minute
t-BDMS	n-methyl-n-(t-butyldimethyl-silyl)-trifluoro-azetamid
TCA	Trichloressigsäure
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
Z _{AA}	Tracer / Tracee Verhältnis im Präkursorpool
Z _{Prot}	Tracer / Tracee Verhältnis im Protein

8. Literaturverzeichnis

1. Abumrad N.N., E.L. Morse, H. Lochs, P.E. Williams and S.A. Adibi. Possible sources of glutamine for parenteral nutrition: impact on glutamine metabolism. *Am. J. Physiol.* 257: E228-E234, 1989
2. Acker van B.A., M.F. von Meyenfeldt, R.R. van der Hulst, et al. Glutamine: the pivot of our nitrogen economy? *JPEN. J. Parenter. Enteral. Nutr.* 23: S45-80, 1999
3. Adams R.F. Determination of amino acid Profiles in biological samples by gas chromatography. *J. Chromatogr.* 95: 189-212, 1974
4. Adegoke O.A.J, M.I. McBurney, S.E. Samuels and V.E. Baracos. Modulation of intestinal protein synthesis and protease mRNA by luminal and systemic nutrients. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 284: G1017-G1026, 2003
5. Adibi S.A., B.A. Krzysik and A.L. Drash. Metabolism of intravenously administered dipeptides in rats: effects on amino acid pools, glucose concentration and insulin and glucagon secretion. *Clin. Sci. Mol. Med.* 52: 193-204, 1977
6. Adibi S.A., H. Lochs, N.N. Abumrad, H. Daniels and J. A. Vazquez. Removal of glycylglutamine from plasma by individual tissues: mechanism and impact on amino acid fluxes in postabsorption and starvation. *J. Nutr.* 123: 325-331, 1993
7. Alpers D.H., and J.L Kinzie. Regulation of small intestinal protein metabolism. *Gastroenterology.* 64: 471-496, 1973

8. Aosasa S., H. Mochizuki, T. Yamamoto, S. Ono, T. Ichikura . A clinical study of the effectiveness of oral glutamine supplementation during total parenteral nutrition: influence on mesenteric mononuclear cells. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 23: S41-S44, 1999
9. Ardawi M.S., E.A. Newsholme. Fuel utilization in colonocytes of the rat. *Biochem. J.* 231: 713-719, 1985
10. Ardawi M.S.M., Y.S. Jamal, A.A. Ashy, H. Nasr and E.A. Newsholme. Glucose and glutamine metabolism in the small intestine of septic rats. *J.Lab. Clin. Med.;* 115: 660-668, 1990
11. Bennet W. M., A. A. Connacher, C. M. Scrimgeour, K. Smith and M. J. Rennie. Increase in anterior tibialis muscle protein synthesis in healthy man during mixed amino acid infusion: Studies of incorporation of 1-^[13C]-leucine. *Clin. Sci.* 76: 447-454, 1989
12. Bier D.M. Intrinsically difficult problems: the kinetics of body proteins and amino acids in man. *Diabet. Metab. Rev.* 5: 111-132, 1989
13. Bier D.M. Intrinsically difficult problems: the kinetics of body proteins and amino acids in man. *Diabet. Metab. Rev.* 5: 111-132, 1989
14. Böhles H. Aspekte trophischer Wirkungen von Nahrungsinhaltsstoffen an der Darmwand. *Monatsschrift Kinderheilkunde.* 146/13: S57-S62, 1998
15. Bristol J.B. and R.C.N. Williamson. Large bowel growth. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 93: 25-34, 1984

16. Buchmann A.L. Glutamine: commercially essential or conditionally essential? A critical appraisal of the human data. *Am. J. Clin. Nutr.* 74: 25-32, 2001
17. Buchmann A.L., A.A. Moukarzei, S. Buta, M. Belle, M.E. Ament, C.D. Eckhert, D. Hollander, J. Gornbein, J.D. Kopple and S.R. Vijayaraghavan. Parenteral nutrition is associated with intestinal morphologic and functional changes in humans. *JPEN.* 19:453-460, 1995
18. Byrne T.A., R.L. Persinger and L.S. Young. A new treatment for patients with short-bowel syndrome: Growth hormone, glutamine, and a modified diet. *Ann. Surg.* 222:243-255, 1995
19. Cao Y., Z. Feng, A. Hoss and S. Klimberg. Glutamine enhances gut glutathione production. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 22: 224-227, 1998
20. Carraro M. J., C. Stuart, W. H. Hartl, J. Rosenblatt and R.R. Wolfe. Effect of exercise and recovery on muscle protein synthesis in human subjects. *Am. J. Physiol.* 259: E470-E476, 1990
21. Coëffier M., O. Miralles-Barrachina, F. Le Pessot, O. Lalaude, M. Daveau, A. Lavoinne, E. Lerebours and P. Déchelotte. Influence of glutamine on cytokine production by human gut in vitro. *Cytokine.* 13: 148-154, 2001
22. Cummings J.H. and G.T. Macfarlane. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clin. Nutr.* 16: 3-11, 1997
23. DaCosta L.R. Small intestinal cell turnover in patients with parasitic infections. *Br. Med. J.* 3: 281-282, 1971

24. Davis T.A., M.L. Fiorotto, D.G. Burrin, P.J. Reeds, H.V. Nguyen, P.R. Beckett, R.C. Vann and P.M. O'Connor. Stimulation of Protein synthesis by both insulin and amino acids is unique to skeletal muscle in neonatal pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282: E880-E890, 2002
25. Deitch E.A., J. Winterton, M. Li and R. Berg. The gut as portal of entry for bacteremia. *Ann. Surg.* 205: 681-691, 1987
26. Demmelmair H. and H. L. Schmidt. Precise $\Delta^{13}\text{C}$ determination in the range of natural abundance on amino acids from protein hydrolysates by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry. *Isotopenpraxis Environ. Health Stud.* 29:237-250, 1993
27. De-Souza D. A. and L.J. Greene. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: Effect of glutamine. *Crit Care Med* 33: 1125-1135, 2005
28. Dyer J., R.B. Beechey, J.P. Gorvel, et al. Glycyl-L-proline transport in rabbit enterocyte basolateral-membrane vesicles. *Biochem. J.* 269: 565-571, 1990
29. Eastwood G. L. Small bowel morphology and epithelial proliferation in intravenously alimented rabbits. *Surgery.* 82:6113-620, 1977
30. Ersin S., P. Tuncyurek, M. Esassolak, M. Alkanat, C. Buke, M. Yilmaz, A. Telefoncu and T. Kose. The prophylactic and therapeutic effects of glutamine- and arginine- enriched diets on radiation-induced enteritis in rats. *J Surg Res* 89: 121-125, 2000

31. Essen P., M. A. McNurlan, J. Wernerman, E. Milne, E. Vinnars and P.J. Garlick. Short-term starvation decreases skeletal muscle protein synthesis rate in man. *Clin. Physiol. Oxf.* 12: 287-299, 1992
32. Essen P., M. A. McNurlan, J. Wernerman, E. Vinnars and P.J. Garlick. Uncomplicated surgery, but not general anaesthesia decreases skeletal muscle protein synthesis. *Am. J. Physiol.* 262.: E253-E260, 1992
33. Felbinger T.W., A.E. Goetz and U. Suchner. Enterale Ernährung: Wunsch und Wirklichkeit. *Intensiv und Notfallbehandlung.* Jahrgang 25. 2/2000 : 53-72, 2000
34. Ferrannini E., R.A. DeFronzo, R. Gusberg, J. Tepler, R. Jacob, M. Aaron, D. Smith and E.J. Barrett. Splanchnic amino acid and glucose metabolism during amino acid infusion in dogs. 37: 237-245, 1988
35. Ferreira R. da C., L.E. Forsyth, P.I. Richman, C. Wells, J. Spencer and T.T. McDonald. Changes in the rate of crypt epithelial cell proliferation and mucosal morphology induced by a T cell-mediated response in human small intestine. *Gastroenterology.* 98: 1255-1263, 1990
36. Ford G.C., K.N. Cheng and D. Halliday. Analyses of 1-¹³C-leucin and ¹³C-KIC in plasma by capillary gas chromatography/mass spectrometry in protein turnover studies. *Biomed. Mass. Spectrom.* 12:432-436, 1985
37. Fürst P. Intracellular muscle free amino acids – their measurement and function *Proc. Nutr. Soc.* 42: 451-462, 1983
38. Garlick P. J., M. A. McNurlan, P. Essen, J. Wernerman. Measurement of tissue protein synthesis rates in vivo: a critical analysis of contrast methods. *Am. J. Physiol.* 266: E278-E297, 1994

39. Gedon C., J. Schmitz, E. Lerebours, J. Metayer, E. Audran, J. Hemet and R. Colin. Decreased brush border hydrolase activities without gross morphologic changes in human intestinal mucosa after prolonged total parenteral nutrition of adults. *Gastroenterology*. 90:373-378, 1986
40. Gelfand R.A., M.G. Glickmann, R. Jacob, R.S. Sherwin and R.A. DeFronzo. Removal of infused amino acids by splanchnic and leg tissues in humans. *Am. J. Physiol.* 250: E407-E413, 1986
41. Goeters C., A. Wenn, N. Mertes, C. Wempe, H. Van Aken, P. Stehle and H.-G. Bone. Parenteral L-alanyl-L-glutamine improves 6-month outcome in critically ill patients. *Crit Care Med* 30: 2032-2037, 2002
42. Groos S., G. Hunefeld and L. Luciano. Parenteral versus enteral nutrition: Morphological changes in human adult intestinal mucosa. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 28: 61-74, 1996
43. Hackl J.M. Indikationen zur parenteralen Ernährung heute. *Intensiv- und Notfallbehandlung*. Jahrgang 25. 2/2000: 73-83, 2000
44. Hallay J., G. Kovács, S. Kiss, M. Farkas, G. Lakos, S. Sipka, E. Bodolay and P. Sápy. Changes in the nutritional state and immunoserological parameters of esophagectomized patients fed jejunely with glutamine-poor and glutamine-rich nutriments. *Hepatogastroenterology* 49: 1555-1559, 2002
45. Hamada K., K. Matsumoto, K. Okamura, et al. Effects of amino acids and glucose on exercise-induced gut and skeletal muscle proteolysis in dogs. *Metabolism*. 48: 161-166, 1999
46. Hamilton S.R., Structure of the colon. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 93: 13-23, 1984

47. Hartl W. H., P. Rittler und K.W. Jauch. Nahrungszufuhr und Mukosastoffwechsel – eine Analyse physiologischer und pathophysiologischer Zusammenhänge. Akt. Ernähr. 2005 (in Druck)
48. Hartl W. H., H. Demmelmair, K. W. Jauch, B. Koletzko and F. W. Schildberg. Effect of glucagon on protein synthesis in human rectal cancer in situ. Ann. Surg. 227: 390-397, 1998
49. Hartl W. H., H. Demmelmair, K. W. Jauch, H. L. Schmidt, B. Koletzko and F. W. Schildberg. Determination of protein synthesis in human rectal cancer in situ by continuous 1-¹³C-leucine infusion. Am. J. Physiol. 272: E769-E802, 1997
50. Heizer W.D. and L. Laster. Peptide hydrolase activities of the mucosa of human small intestine. J. Clin. Invest. 48: 210-228, 1969
51. Higashiguchi T., P.O. Hasselgren, K. Wagner, et al. Effect of glutamine on protein synthesis in isolated intestinal epithelial cells. JPEN J. Parenter. Enteral Nutr. 17: 307-314, 1993
52. Hill G. L., R.G. Douglas and D. Schroeder. Metabolic basis for the management of patients undergoing major surgery. World J. Surg. 17: 146-153, 1993
53. Hübl W. W. Druml, K. Langer, et al. Influence of molecular structure and plasma hydrolysis on the metabolism of glutamine-containing dipeptides in humans. Metabolism 38: 59-62, 1989
54. Ishiashi N., L.D. Plank, K. Sando and G.L. Hill. Optimal protein requirements during the first two weeks after the onset of critical illness. Crit. Care Med. 26: 1529-1535, 1998

55. Jiang Z. M., J. D. Cao, X. G. Zhu , W. X. Zhao, J. C. Yu, E. L. Ma, X. R. Wang, M. W. Zhu, H. Shu and Y. W. Liu. The impact of alanyl-L-glutamine on clinical safety, nitrogen balance, intestinal permeability and clinical outcome in postoperative patients: A randomized, double-blind, controlled study of 120 patients. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 23: S62-S66, 1999
56. Kalff J.C., T.M. Carlos, W.H. Schraut, et al. Surgically induced leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus. *Gastroenterology.* 117: 378-387, 1999
57. Karner J. and E. Roth. Influence of alanylglutamine infusion on gastrointestinal glutamine and alanine metabolism in anesthetized dogs. *Metabolism.* 38: 73-77, 1989
58. Klein S., D.H. Alpers, R.J. Grand, M.S. Levin, H.C. Lin, C.M. Mansbach, C. Burant, P. Reeds and J.L. Rombeau. Advanced in nutrition and gastroenterology: summary of the 1997 A.S.P.E.N. Research Workshop. *JPEN.* 22:3-13, 1997
59. Knapp D.R. Handbook of analytical derivatization reactions. John Wiley and Sons, New York, USA, 1979
60. Koike K., F.A. More, E.E. Moore, R.S. Pogetti, R.M. Tuder and A. Banerjee. Endotoxin after gut ischemia/reperfusion cause irreversible lung injury. *J.Surg.Res.* 52: 656-662, 1992
61. Kudsk K.A. Effect of route and type of nutrition on intestine-derived inflammatory response. *Am. J. Surg.* 185: 16-21, 2003

62. Lipkin M., P. Sherlock and B. Bell. Cell proliferation kinetics in the gastrointestinal tract of man. *Gastroenterology*. 45:721-729, 1963
63. Lipman T.O. Bacterial translocation and enteral nutrition in humans: An outsider looks in. *JPEN*. 19:156-165, 1995
64. Livingston D.H. and E. A. Deitch. Multiple organ failure: a common problem in surgical intensive care units patients. *Ann Med*.27: 13-20, 1995
65. Lochs H., E. Roth, S. Gasic, W. Hübl, E.L. Morse, and S.A. Adibi. splanchnic, renal, and muscle clearance of alanylglutamine in man and organ fluxes of alanine and glutamine when infused in free and peptid forms. *Metabolism*, 39: 833-836, 1990
66. Lochs H., W. Hübl, S. Gasic, E. Roth, E.L. Morse and S.A. Adibi. Glycylglutamine: metabolism and effects on organ balances of amino acids in postabsorptive and starved subjects. *Am. J. Physiol*. 262, E155-E160, 1992
67. Loeffler M., R. Stein, H.E. Wichmann, C.S. Potten, P. Kaur and S.Chwalinski. Intestinal cell proliferation. A comprehensive model of steady-state proliferation in the crypt. *Cell. Tissue Kinet*. 19:627-645, 1986
68. Löhrs U., B. Wiebecke, R. Heybowitz and M. Eder. Cell turnover in intestinal epithelium during experimental starvation. In: Dowlig R.H., Riecken R.O., eds. *Intestinal adaption*. Stuttgart, Germany: F.K. Schattauer Verlag, 1974: 116-123

69. Louard R. J., E. J. Barret and R. A. Gelfand. Effect of infused branched-chain amino acids on muscle and whole-body amino acid metabolism in man. *Clin. Sci.* 79:457-466, 1990
70. Loy G.L., A.N. Quick Jr, C.C. Teng, W.W. Hay Jr and P.V. Fennessey. Veritale stable isotope technique for the measurement of amino acids and keto acids: comparison with radioactive isotope and its use in measuring in vivo disposal rates. *Anal. Biochem.* 185: 1-9, 1990
71. Maejima K., E. Deitch and R. Berg. Promotion by burn stress of the translocation of bacteria from the gastrointestinal tract of mice. *Arch. Surg.* 119:166-172, 1984
72. Mandir N., Goodlad RA. The effects of glutamine on intestinal epithelial cell proliferation in parenterally fed rats. *Gut.* 44: 608-614, 1999
73. Maxton D.G., J.S. Mensies and B. Slavin. Small-intestinal function during enteral feeding and starvation in man. *Clin.Sci.* 77:401-406, 1989
74. McManus J.P.A. and K.J. Isselbacher. Effect of fasting versus feeding on the rat small intestine: morphological biochemical and functional differences. *Gastroenterology.* 59: 214-221, 1970
75. Meakins J. L. and J.C. Marshall. The gastrointestinal tract: the "motor" of MOF. *Arch. Surg.* 121: 197-201, 1986
76. Minami H., E.L. Morse and S.A. Adibi. Characteristics and mechanism of glutamine-dipeptide absorption in human Intestine. *Gastroenterology.* 103: 3-11, 1992

77. Morlion B.J., P. Stehle, P. Wachtler et al. Total parenteral nutrition with glutamine dipeptid after major abdominal surgery: a randomized, double-blind, controlled study. *Ann Surg.* 227: 302-308, 1998
78. Novak F., D.K. Heyland, A. Avenell, J.W. Drover and X. Su. Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit Care Med.* 30: 2022-2029, 2002
79. Nygren J. and K.S. Nair. 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
80. O`Keefe S.J., E.R.Lemmer, Ogden J.M. and T. Winter. The influence of intravenous infusions of glucose and amino acids on pancreatic enzyme and mucosal protein synthesis in human subjects. *J. Parent. Enter. Nutr.* 22 : 253-258, 1998
81. Petersson B., A. von der Decken, E. Vinnars and J. Wernnerman. Long-term effects of postoperative total parenteral nutrition supplemented with glycylglutamine on subjective fatigue and muscle protein synthesis. *Br. J. Surg.* 81: 1520-1523, 1994
82. Petersson B., E. Hultman, K. Andersson and J. Wernerman. Human skeletal muscle protein: effect of malnutrition, elective surgery and total parenteral nutrition. *Clin. Sci.* 88: 479-484, 1995
83. Pritts T., E. Hungness, Q. Wang, et al. Mucosal and enterocyte IL-6 production during sepsis and endotoxemia – role of transcription factors and regulation by the stress response. *Am. J. Surg.* 183: 372-383, 2002

84. Redan J.A., B.F. Rush Jr., T.W. Lysz, S.M. Sharon and G.W. Macheido. Organ distribution of gut-derived bacteria caused by bowel manipulation or ischemia. *Am. J. Surg.* 159: 85-90, 1990
85. Rennie M. J., K. Smith and P. W. Watt. Measurement of human tissue protein synthesis: an optimal approach. *Am. J. Physiol.* 266: E298-E307, 1994
86. Riecken E.O., A. Stallmach, M. Zeitz, J.D. Schulzke, H. Menge and M. Gregor. Growth and transformation of the small intestine-importance of convective tissue, gut-associated lymphoid tissue and gastrointestinal regulatory peptides. *Gut.* 30: 1630-1640, 1989
87. Rittler P., H. Demmelmair, B. Koletzko, F.W. Schildberg and W.H. Hartl. Determination of protein synthesis in human ileum in situ by continuous 1-[¹³C]-leucine infusion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278: E634-E638, 2000
88. Rittler P., H. Demmelmair, B. Koletzko, F.W. Schildberg and W.H. Hartl. effect of elective abdominal surgery on human colon protein synthesis in situ. *Ann. Surg.* 233: 39-44, 2001
89. Rouse K., E. Nwokedi, J.E. Woodliff, et al. Glutamine enhances selectivity of chemotherapy through changes in glutathione metabolism. *Ann. Surg.* 221: 420-426, 1995
90. Sadikali F. Dipeptidase deficiency and malabsorption of glycylglycine in disease states. *Gut.* 12: 276-283, 1971
91. Scheppach W., C. Loges, P. Batram et al. Effect of free glutamine and alanyl-glutamine dipeptide on mucosal proliferation of the human ileum and colon. *Gastroenterology.* 107: 429-434, 1994

92. Smith K. J. M. Barua, P. W. Watt, C. M. Scrimgeour and M. J. Rennie. Flooding with 1-1-13C-Valin. *Am. J. Physiol.* 262: E372-E376, 1992
93. Smith M.W. and R.M. Moor. Protein synthesis and secretion by hamster, rat and mouse jejunum. *Comp. Biochem. Physiol.* 72B : 379-387, 1984
94. Stallmach A. and M. Zeitz. The intestine as an immunological organ. *Wien Klin Wochenschr.* 110: 72-78, 1998
95. Stein T.P., S. Yoshida, M.D. Schluter et al. Comparison of intravenous nutrients on gut mucosal protein synthesis. *JPEN J Parenter. Enteral. Nutr.* 18:447-452, 1994
96. Steinau F., M. Deja, S. Wolf, T. Busch and U. Kaisers. Stellenwert Immunnutritiver enteraler Ernährung in der operativen Intensivmedizin. *Der Anästhesist.* 51/10: 843-852, 2002
97. Thornton F.J., A. Barbul. Healing in the gastrointestinal tract. *Surg. Clin. North. Am.* 77:549-573, 1997
98. Toffolo G., D. M. Foster and C. Cobelli. Estimation of protein fractional Synthetic rate from tracer data. *Am. J. Physiol.* 264: E128-E135, 1993
99. Tung P.H.M., Q. Wang, C.K. Ogle and C.D. Smith. Minimal increase in gut-mucosal interleukin-6 during laparoscopy. *Surg. Endosc.* 12: 409-411, 1998
100. Van der Hulst R.R., M.F. von Meyenfeldt, A. Tiebosch, W.A. Buurman and P.B. Soetes. Glutamine and intestinal immune cells in humans. *J. Parent. Enter. Nutr.* 21: 310-315, 1997

101. Verbin R.S., H. Liang, L.M. Saeg, G. Diluiso, P.J. Goldblatt and E. Farber. Effects of inhibitors of protein synthesis on structure and function of the crypts of the small intestine. *Exp. Cell. Res.* 65:81-93, 1971
102. Volpi E., A.A. Ferrando, C.W. Yeckel, et al. Exogenous amino acids stimulate net muscle protein synthesis in the elderly. *J. Clin. Invest.* 101: 2000-2007, 1998
103. Wells C.L., M.A. Maddaus and R.L. Simmons. Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. *Rev. Infect. Dis.* 10:958-979, 1989
104. Wilmore D. W., R. Smith, S. O'Dwyer, D. Jacobs, T. Ziegler and X.D. Wang. The gut: a central organ after surgical stress. *Surgery.* 104: 917-923, 1988
105. Wilson J.P. Surface area of the small intestine in man. *Gut* 8: 618-612, 1967
106. Wiren M., T.E. Adrian, F. Hammarqvist, K.E. Johansson, J. Permert, B. Petersson, J. Wernerman and J. Larsson. The effects of a new amino-acid dipeptide solution on nitrogen balance and humoral growth factors in the postoperative state in man. *Clin. Nutr.* 14: 97-104, 1995
107. Wischmeyer P.E., M. Kahana, R. Wolfson, H. Ren, M.M. Musch and E.B. Chang. Glutamine reduces cytokine release, organ damage, and mortality in a rat model of endotoxemia. *Shock.* 16: 398-402, 2002
108. Wolfe R.R. Isotope-ratio mass spectrometry: instrumentation and calculation of isotopic enrichment. In: *Radioactive and stable isotope*

tracers in biomedicine. Principles and practice of kinetics analyses (ED.: Wolfe R.R.). Wiley-Liss, New York, pp 23-36, 1992

109. Wortel C.H., Van Deventer S.J.H., L.A. Arden, N.J. Lygidakis, H.R. Büller, F.H. Hoek, J. Horikx and J.W. ten Cate. Interleukin-6 mediates host defense responses induced by abdominal surgery. *Surgery*. 114: 564-570, 1993
110. www.criticalcarenutrition.com, zuletzt aufgerufen am 18.06.2005
111. Yoshida S., M.J. Leskiw, M.D. Schluter et al. Effect of total parenteral nutrition, systemic sepsis, and glutamine on gut mucosa in rats. *Am. J. Physiol.* 263: E368-373, 1992
112. Yu Y.M., D.A. Wagner, E.E. Tredget, J.A. Walaszewski, J.F. Burke and V.R. Young. Quantitative role of splachnic region in leucine metabolism: L-[1-¹³C, ¹⁵N]-leucine and substrate balance studies. *Am. J. Physiol.* 259: E36-E51, 1990

9. Danksagung

Herrn Priv. Doz. Dr. med. W.H. Hartl, dem Referenten meiner Arbeit, möchte ich größten Dank aussprechen für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Forschungslabor der Arbeitsgruppe Stoffwechsel in der chirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern, für die zahlreichen Anregungen und kritischen Diskussionen und vor allem für seine sehr engagierte Betreuung.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. P. Rittler, welcher mich in die Methodik einlernte und mir mit tatkräftiger und produktiver Unterstützung stets zur Seite stand.

Herrn Dr. rer. nat. H. Demmelair danke ich ausdrücklich für die große Unterstützung bei der massenspektrometrischen Analytik und Auswertung der Daten. Herrn Prof. Dr. A. Roscher danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der Aminosäureprofile und Bestimmung der Glutaminkonzentrationen im Plasma. Herrn Prof. Dr. B. Koletzko, Leiter der Sektion Stoffwechselerkrankungen und Ernährung am Dr. von Haunerschen Kinderspital, Klinikum Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität, danke ich für technische Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. K.-W. Jauch und seinem Vorgänger, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. F.W. Schildberg danke ich für die Überlassung des Patientengutes, für die Annahme der Arbeit und auch für wertvolle Anregungen und Vorschläge.

Großen Dank möchte ich auch den Patienten sagen, die sich zur Teilnahme an dieser Studie bereit erklärt haben.

10. Lebenslauf

Beatrice Schiefer

geboren:	23.11.1972 in Zürich, Schweiz
Familienstand:	ledig
1978 – 1982	Grundschule Köln
1982 – 1991	Internatsschule Odenwaldschule mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife
1992 – 1995	Berufsausbildung zur Groß- und Außenhandelskauffrau
1995 – 1996	Tätigkeit als kaufmännische Angestellte
1996 – 2003	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität München
2002 – 2003	Praktisches Jahr Klinikum Großhadern (Chirurgie) Concord Hospital, Sydney (Chirurgie) Klinikum Großhadern (Anästhesie) Krankenhaus München Schwabing (Innere Med.)
Juni 2003	Ablegen des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung und Teilapprobation
seit 01.08.2003	Ärztin im Praktikum an der Klinik für Anästhesiologie Ludwig-Maximilians-Universität München, unter Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Klaus Peter