

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

**Postaggressionssyndrom und Albuminsynthese – longitudinale Untersuchungen mit
einer modifizierten Methodik zur Albuminisolation**

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

Vorgelegt von
Rita Jacobs-Haage
aus
Warendorf
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

- | | |
|-------------------------|-----------------------------------|
| 1. Berichterstatter: | Priv.Doz. Dr. med. W.H. Hartl |
| 2. Berichterstatter: | Priv.Doz. Dr. med. P. Fraunberger |
| 1. Mitberichterstatter: | Prof. Dr. med. A. Roscher |
| 2. Mitberichterstatter: | Prof. Dr. med. M. Fischereder |
| Dekan: | Prof. Dr. med. D. Reinhardt |

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2005

Meinen Eltern
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
2. Fragestellung.....	10
3. Patientengut und Methodik.....	11
3.1 Patienten.....	11
3.2 Voruntersuchungen, Ausschlusskriterien und Aufklärung.....	12
3.3 Versuchsabläufe	13
3.4 Abgeleitete Zielgrößen	14
3.5 Vorversuche zur Bestimmung der Albuminanreicherung – das Kontaminationsproblem. 14	
3.5.1 Vorbemerkungen	14
3.5.2 Grundaufbau der angewendeten Analyseschritte	16
3.5.2.1 Ethanolextraktion.....	16
3.5.2.2 Analytische SDS-PAGE zur Reinheitsprüfung	16
3.5.3 Dokumentation und Quantifizierung der Verunreinigung in der Albuminfraktion ...	18
3.5.4 Modifikationen zur Abtrennung der Verunreinigung in der Albuminfraktion	23
3.5.5 Versuche zur Identifikation der Verunreinigung.....	28
3.5.6 Isolierung von Albumin mittels präparativer Elektrophorese.....	32
3.6 Entwicklung der Methodik	32
3.7 Beschreibung der angewendeten Methodik zur Bestimmung der Albuminsyntheserate ...	35
3.7.1 Material	35
3.7.2 Probenaufbereitung.....	36
3.7.3 Massenspektrometrische Analysen.....	38
3.8 Berechnungen der fraktionellen Albuminsyntheserate	45
3.9 Berechnungen der Leucin-Erscheinungsrate als Indikator für den Eiweiß-Abbau des Körpers	46

3.10 Bestimmung der Albuminanreicherung in gereinigten und ungereinigten Proben.....	47
3.11 Messungen der Albuminkonzentration.....	48
3.12 Statistik	48
4. Ergebnisse	49
4.1 Einfluss von Apolipoprotein A-1 auf die Höhe der Albuminanreicherung.....	49
4.2 Anreicherungen im Präkursorpool (Ketoisocaprinsäure-Anreicherung).....	54
4.2.1 Isotopomerenverhältnisse (M+1/M)	54
4.2.1.1 Isotopomerenverhältnisse im Präkursorpool der früh postoperativen Patienten ..	54
4.2.1.2 Isotopomerenverhältnisse im Präkursorpool der spät postoperativen Patienten ..	54
4.2.2 Tracer/Tracee-Verhältnisse	56
4.2.2.1 Tracer/Tracee-Verhältnisse der früh postoperativen Patienten	56
4.2.2.2 Tracer/Tracee-Verhältnisse der spät postoperativen Patienten	56
4.3 Albumin-Anreicherung.....	58
4.3.1 Anreicherung des albumingebundenen Leucins der früh postoperativen Patienten ...	58
4.3.2 Anreicherung des albumingebundenen Leucins der spät postoperativen Patienten....	58
4.4 Fraktionelle Albuminsyntheseraten.....	59
4.4.1 Fraktionelle Albuminsyntheseraten der früh postoperativen Patienten.....	59
4.4.2 Fraktionelle Albuminsyntheseraten der spät postoperativen Patienten	60
4.5 Plasmaalbumin - Konzentration	61
4.6 Gesamtkörperproteinabbau	62
4.6.1 Leucin-Erscheinungsrate (R_a -Leucin) früh postoperativer Patienten.....	62
4.6.2 Leucin-Erscheinungsrate spät postoperativer Patienten	62
5. Diskussion.....	65
5.1 Bedeutungen von Albumin	65
5.2 Methodische Betrachtungen.....	66
5.3 Zeitlicher Verlauf des Eiweiß-Abbaus postoperativ und im Vergleich zu Normalwerten.	72

5.4 Albuminkonzentration und Albuminsyntheserate postoperativ im zeitlichen Verlauf und im Vergleich zu Normalwerten.....	73
5.5 Albuminkonzentration und Albuminsynthese im chirurgischen Stress – mögliche Regulationsmechanismen	75
6. Zusammenfassung.....	79
7. Anhang.....	81
7.1 Einzeldarstellung aller gemessenen und berechneten Werte der früh postoperativen und rekonvaleszenten Patienten.....	81
7.2. Tabellenverzeichnis	85
7.3 Abbildungsverzeichnis	86
7.4 Abkürzungsverzeichnis.....	87
7.5 Literaturverzeichnis	89
8. Danksagung.....	99
9. Lebenslauf.....	100

1. Einleitung

Chirurgische Traumata führen nicht nur zu Veränderungen im Bereich der Wunde, sondern der gesamte Körper reagiert auf die Verletzung, wobei entsprechende Signale über afferente Nerven, Barorezeptoren und Zytokine vermittelt werden. Das dynamische Gleichgewicht des so genannten inneren Milieus des Organismus wird durch das Trauma verändert. Eine derartige Homöostasestörung führt normalerweise zu vorhersehbaren Reaktionen der Organe (zentrales Nervensystem, Atmungsorgane, Herz-Kreislauf-System, Gastrointestinaltrakt, Leber, Niere, Immunsystem, Muskel-Skelett-System), aber auch des Stoffwechsels. Die Veränderungen des Substratstoffwechsels werden unter dem Begriff Postaggressionssyndrom zusammengefasst (1;2).

Spezielle Methoden der Stoffwechselforschung (Stabile-Isotope-Technik, Gamma-Neutronenaktivierung) haben unsere Kenntnisse über die Veränderungen des Eiweißstoffwechsels bzw. des Eiweißverlustes nach Trauma und Operationen unter klinischen Bedingungen wesentlich erweitert. Unmittelbar postoperativ besteht eine bestimmte zeitliche Dynamik. Es kommt zunächst zu der Ebbe-Phase, die durch Hypovolämie und eine anschließende sympathische und adrenale Reaktion charakterisiert ist. Anschließend folgt die Fluss-Phase, in der ein vermehrter Proteinverlust zu beobachten ist. Diese Katabolie ist in ihrer Quantität abhängig von der Schwere des chirurgischen Traumas und vom präoperativen Ernährungszustand (3;4). Das Postaggressionssyndrom ist durch den Katabolismus aller im Körper vorhandenen Substratdepots charakterisiert. So kommt es zu einer gesteigerten Lipolyse im Fettgewebe und einem ausgeprägten Eiweißabbau in der Skelettmuskulatur (5).

Ein zentraler Ort der Stoffwechseleränderungen nach Trauma oder Operationen ist die Leber (2). Hier werden durch Glukoneogenese und Glykogenolyse vermehrt Kohlenhydrate ins Blut abgegeben. Diese beschleunigte Glukoseproduktion der Leber zusammen mit der peripheren Insulinresistenz erzeugt eine Hyperglykämie. Gleichzeitig werden ausgewählte Proteine in der Leber mit einer beschleunigten Rate gebildet. Diese so genannten Akutphasenproteine spielen nach heutigem Erkenntnisstand ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Überwindung der traumainduzierten Homöostasestörung. Die hepatische Syntheserate anderer Proteine (wie z.B. Lipoproteine) kann hingegen nach chirurgischem Trauma abnehmen. Die Verwendung von Aminosäuren zum Zwecke der Glukoneogenese führt zum unwiderruflichen Verlust von Stickstoff in Form von Harnstoff aus dem Körper (6). Dieser Stickstoffverlust entspricht einem irreversiblen Verlust von körpereigener Eiweißsubstanz und ist das biochemische Korrelat für die progrediente Abnahme der Muskelmasse, die bei

allen schwer kranken Patienten mit längerem Krankheitsverlauf beobachtet werden kann und Morbidität, Mortalität, Rekonvaleszenz und Rehabilitation negativ beeinflusst (7-9). So ist bei Patienten mit bereits präoperativem Eiweißmangel die Pneumonierate postoperativ signifikant erhöht. Ferner findet sich eine signifikant verlängerte Krankenhausaufenthaltsdauer (10).

Eine Eiweißnettokatabolie ist immer dann zu beobachten, wenn ein Missverhältnis zwischen Proteinsynthese und Proteinabbau im gleichen Individuum besteht. Dieses Missverhältnis lässt jedoch keinen Schluss auf die individuelle Höhe der Synthese- bzw. Abbauraten zu. So kann ein kataboler Zustand vorliegen, wenn bei normaler Abbauraten die Synthese gleichzeitig erniedrigt ist, aber auch bei erhöhter Syntheserate, wenn zur gleichen Zeit die Abbauraten noch stärker gesteigert ist (2).

Das Missverhältnis zwischen Proteinabbau- und Proteinsyntheserate im Rahmen des Postaggressionssyndroms erfordert eine differenzierte Betrachtung in Abhängigkeit von Traumaschweregrad, vom zeitlichen Abstand zum Trauma und auch vom jeweils betroffenen Organsystem. Die unmittelbaren Veränderungen des Eiweißstoffwechsels nach chirurgischem Trauma sind heute sehr gut untersucht und in ihren Abläufen verstanden. Dies gilt jedoch nicht für den zeitlichen Verlauf dieser Veränderungen, die in ihrer Dynamik bis heute praktisch nicht untersucht wurden, trotz ihrer eminenten Bedeutung für Rehabilitation und Rekonvaleszenz des Patienten. Relativ gut gesichert ist, dass das Ausgangskörpergewicht beziehungsweise der präoperative Eiweißbestand auch bei komplikationslosem Verlauf oft erst sechs Monate postoperativ wieder erreicht wird (3). Bis zu diesem Zeitpunkt hat sich auch die erhöhte Harnstoffsynthese wieder normalisiert (11;12). Allerdings scheint dies nicht für die Eiweißumsatzraten (Synthese, Abbau) zuzutreffen, die (untersucht bei Kindern nach Verbrennungstrauma) trotz ausgeglichener Eiweißgesamtbilanz noch über Monate erhöht bleiben können. Derartig lang anhaltende Veränderungen werden mit dem oft noch in der Rekonvaleszenz zu beobachtenden Erschöpfungssyndrom in Verbindung gebracht (4;11;12). Entsprechende Untersuchungen bei Erwachsenen nach großen elektiven Eingriffen liegen bis heute nicht vor. Ebenfalls nicht bekannt ist die Dynamik des Eiweißstoffwechsels in unterschiedlichen Kompartimenten des Körpers (Leber, Skelettmuskel).

In der Leber ist die quantitativ wichtigste Einzelgröße des Eiweißstoffwechsels die Albuminsynthese (13;14). Albumin wird ausschließlich von der Leber gebildet und wird nach der Synthese in das Plasma abgegeben, wo es eine Reihe wichtiger Aufgaben erfüllt. Mit einer normalen Konzentration von 35-53 g/l (15) ist es das Protein im Plasma mit der höchsten Konzentration und sorgt für etwa 75% des onkotischen Drucks. Außerdem dient Albumin als Puffer und als Transportprotein. Am stärksten werden mittelgroße, hydrophobe

Stoffe wie langkettige Fettsäuren und Bilirubin gebunden, aber auch andere Stoffe und einige Arzneistoffe (13;14;16;17).

Die Synthese des Albumins erfordert eine adäquate Ernährung, zusätzlich spielt das hormonelle Milieu eine wichtige Rolle. Schilddrüsenhormone, Wachstumshormon und Insulin, aber auch der onkotische Druck beeinflussen die Albuminsynthese und können sich in ihrem Effekt addieren oder aufheben. Auch eine Kontrolle durch Steroidhormone wurde beschrieben, möglicherweise mit Ausprägung eines zirkadianen Rhythmus (18-20).

Seit langem ist bekannt, dass nach einem chirurgischen Trauma die Albuminkonzentration innerhalb kurzer Zeit rapide abnimmt. Die Ursachen für diesen Konzentrationsabfall sind bis heute nicht geklärt. Diskutiert wird einerseits ein Verlust in den dritten Raum durch postoperative Störungen der Mikrozirkulation (Endothelzellschäden) (21-23), denkbar ist andererseits jedoch auch eine Einschränkung der hepatischen Albuminsynthese im Rahmen des Postaggressionssyndroms (14;24). Veränderungen des Albuminkatabolismus scheinen nach älteren Untersuchungen postoperativ keine Rolle zu spielen (25-27).

2. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen untersucht werden:

1. Wie verändern sich die Albuminsyntheseraten im Abstand zum operativen Trauma (akute Phase versus Rekonvaleszenz) und in welcher Beziehung stehen diese Veränderungen zur Eiweißkatabolie des gesamten Organismus?
2. Welche Rolle spielen Veränderungen in der Albuminsynthese für die akute postoperative Ausprägung der Hypoalbuminämie?
3. Was sind mögliche Kontrollmechanismen der postoperativen Albuminsynthese?

3. Patientengut und Methodik

3.1 Patienten

Es wurden zwei vergleichbare Patientenkollektive untersucht. Die einzelnen Diagnosen und operativen Eingriffe sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Diagnosen und Operationen der untersuchten Patienten

Diagnose	
Früh postoperative Gruppe	Spät postoperative Gruppe
#1. Rektumkarzinom	#1. Rektumkarzinom
#2. Rektumkarzinom	#2. Divertikulitis
#3. Sigmakarzinom	#3. Rektumkarzinom
#4. Rektumkarzinom	#4. Rektumkarzinom
#5. Sigmakarzinom	#5. Divertikulitis
#6. Rektumkarzinom	#6. Rektumkarzinom

Operationen	
Früh postoperative Gruppe	Spät postoperative Gruppe
#1. tiefe anteriore Rektumresektion	#1. tiefe anteriore Rektumresektion
#2. anteriore Rektumresektion	#2. anteriore Rektumresektion
#3. Hemikolektomie	#3. tiefe anteriore Rektumresektion
#4. anteriore Rektumresektion	#4. tiefe anteriore Rektumresektion
#5. anteriore Rektumresektion	#5. OP nach Hartmann
#6. tiefe anteriore Rektumresektion	#6. OP nach Hartmann

Die früh postoperative Patientengruppe umfasste sechs Patienten mit einem lokal begrenzten, kolorektalen Karzinom, die sich einem großen elektiven, kurativen abdominalchirurgischen Eingriff unterziehen mussten. Die Untersuchungen wurden in der postoperativen Flussphase (Tag 5 bis Tag 15 postoperativ) durchgeführt.

Die zweite Gruppe bestand aus sechs Patienten, die etwa vier Monate nach abdominalchirurgischen Eingriffen in der Rekonvaleszenz untersucht wurden. Indikation für die vorangegangenen und ebenfalls kurativen Eingriffe waren überwiegend ebenfalls begrenzte, kolorektale Karzinome. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren alle Patienten dieser Gruppe bei guter Gesundheit, infektionsfrei und waren anhand der Nachsorgeuntersuchungen (Koloskopie, Tumormarker, Röntgenuntersuchung des Thorax und CT des Abdomens) rezidivfrei.

Die Dauer des Eingriffes, das Narkoseverfahren und das Ausmaß des perioperativen Blutverlustes waren zwischen beiden Patientengruppen vergleichbar.

3.2 Voruntersuchungen, Ausschlusskriterien und Aufklärung

Die früh postoperativen und die spät postoperativen Patienten waren hinsichtlich Körpergröße, Körpergewicht, Body Mass Index (BMI) und Alter vergleichbar (vergleiche Anhang).

Keiner der eingeschlossenen Patienten (vor dem geplanten Eingriff) hatte eine positive Anamnese hinsichtlich eines Gewichtsverlusts oder einer schweren Mangelernährung. Begleitende Stoffwechselerkrankungen waren durch klinische und laborchemische Untersuchungen ausgeschlossen. Patienten mit systemisch entzündlichen Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen wie z.B. Morbus Crohn oder Kolitis ulcerosa wurden nicht in die Studie einbezogen. In allen Kollektiven wurden mittels Routinelaborparametern (kleines Blutbild, Thrombozyten, Quick, PTT, CRP) Störungen der Blutgerinnung sowie infektiöse oder septische Komplikationen als weitere Kriterien zum Studienausschluss erfasst.

Ferner wurde anhand von Operationsprotokollen und dokumentiertem Krankheitsverlauf im früh postoperativen Patientengut die Gabe von Blutbestandteilen (Erythrozyten-, Thrombozytenkonzentrate, Vollblut, Frischblut) oder Blutprodukten (Albumin, Fresh frozen plasma, Antithrombin III) ausgeschlossen.

Nach der Aufklärung über die geplanten Untersuchungen, gaben alle Patienten ihre freiwillige, schriftliche Einwilligung zu der geplanten Studie.

Das Studienprotokoll war zuvor als Teil eines größeren DFG-Projektes (Intestinale Proteinsynthese Ha 1439/4-1) durch die örtliche Ethikkommission genehmigt worden (Protokollnummer: 134/97).

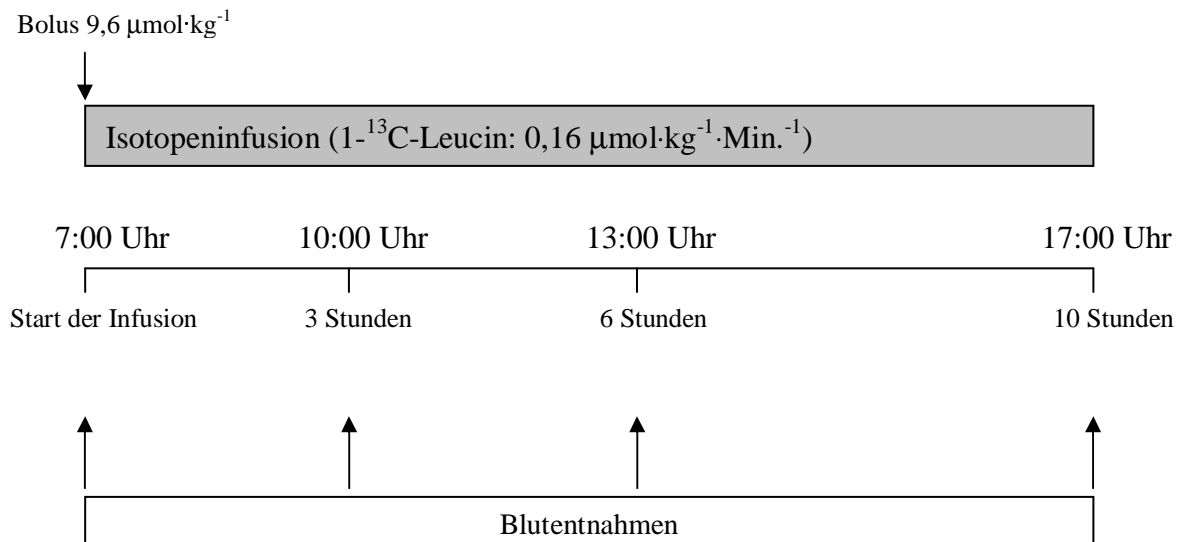
3.3 Versuchsabläufe

Alle Patienten wurden während eines regulären stationären Aufenthaltes in die Studie aufgenommen. Vor der Durchführung der Studie wurde sichergestellt, dass die spät postoperativen Patienten ihre reguläre Krankenhauskost zu sich nahmen. Die Patienten, welche sich in der früh postoperativen Phase befanden, erhielten eine in der Kalorienzufuhr vergleichbare, gemischte Diät (etwa $25 \text{ kcal}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$), von der zwei Drittel enteral (flüssige Kost) und ein Drittel parenteral zugeführt wurden.

Im Rahmen des Studienprotokolls befanden sich die untersuchten Individuen ab 22:00 Uhr des Vortags bis zum Ende der Studie am Studientag im nüchternen Zustand, wobei innerhalb dieses Zeitraumes das Trinken von Mineralwasser erlaubt war. Am Studientag wurde eine kontinuierliche Infusion von $0,16 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Min.}^{-1}$ $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Leucin (Tracer Technologies, Sommerville, MA, USA; 99,3 atom % enrichment) um 7:00 Uhr morgens begonnen, wobei eine Bolusinjektion von $9,6 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ des verwendeten Tracers voranging. Die Infusionsdauer betrug zehn Stunden (Abb.1).

Vor Beginn der Isotopeninfusion wurde jedem untersuchten Patienten eine Blutprobe entnommen. Das nach Zentrifugation gewonnene Plasma diente zur Bestimmung der Hintergrundanreicherung des proteingebundenen Leucins und der Ketoisocaprönsäure. Plasmaproben wurden zusätzlich nach 180, 360 und 600 Minuten kontinuierlicher Isotopeninfusion zur Bestimmung der Isotopenanreicherung im albumingebundenen Leucin und in der Ketoisocaprönsäure entnommen (Abb.1). Ein Patient aus der spät postoperativen Gruppe und ein Patient aus dem früh postoperativen Kollektiv konnten aus technischen Gründen nur über einen Zeitraum von sechs Stunden untersucht werden.

Abbildung 1: Studienablauf



3.4 Abgeleitete Zielgrößen

- Berechnung der fraktionellen Albuminsyntheserate:
$$\text{FSR} = \frac{\text{Produktanreicherung (Albuminanreicherung)}}{\text{Präkursorpool-Anreicherung (KIC-Anreicherung)}}$$
- Berechnung der Eiweißabbaurate des Gesamtorganismus

3.5 Vorversuche zur Bestimmung der Albuminanreicherung – das Kontaminationsproblem

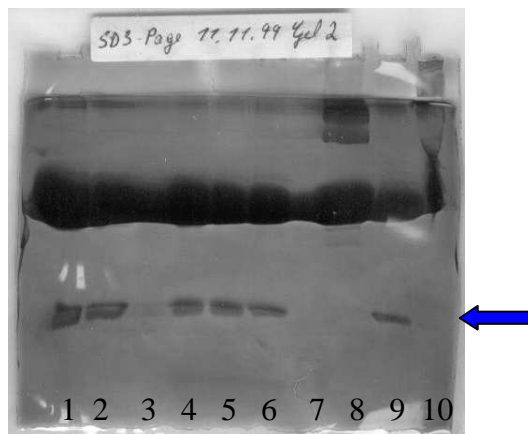
3.5.1 Vorbemerkungen

Für die Bestimmung der fraktionellen Syntheserate des Albumins ist es wichtig, Albumin 99% rein von den anderen Proteinen des Serums zu trennen. In Pilotstudien wurde versucht, Albumin aus dem komplexen Gemisch Serum durch nur eine Fällung und eine Extraktion, wie zahlreich in der Literatur beschrieben und verwendet (18;28-39), in angeblich ausreichender Reinheit zu isolieren. Vorausschickend sei hier bereits festgestellt, dass sich

überraschender Weise dadurch der gewünschte Reinheitsgrad nicht regelmäßig erreichen ließ, denn in konventionell bzw. modifiziert gereinigten Seren fanden sich Reinheitsgrade von deutlich unter 95% durch kontaminierende Eiweißsubstanzen. Dieser Befund machte letztendlich einen weiteren Reinigungsschritt notwendig, der dann eine präparative Elektrophorese beinhaltete.

Im Folgenden sollen nun die einzelnen experimentellen Schritte dargestellt werden, die schließlich zu einer effizienten Albuminisolierung führten.

Zur präparativen Trennung wurde initial das Verfahren nach Korner und Debro verwendet (40), indem 0,5 ml Serum mit 0,5 ml Triochloressigsäure (10%) gefällt und bei 11.000 U/Min. zentrifugiert wurden und das Sediment in absolutem Alkohol suspendiert wurde. Nach einer erneuten Zentrifugation befindet sich Albumin im Überstand und alle anderen Proteine befinden sich im Sediment. Wir entfernten den Alkohol mit Hilfe eines Zentrifugenfilters, untersuchten den Überstand mittels SDS-PAGE auf Reinheit und konnten die Albuminbande und eine weitere Bande finden.



In den Pos. 1,2,4,5,6 und 9 wurden die aufgearbeiteten Proben - zum Teil doppelt - aufgetragen.
In Pos. 8 wurde Rinderalbumin aufgetragen.

In der Höhe des Pfeils ist die Verunreinigung zu erkennen.

Diese Bande entspricht der oben beschriebenen Verunreinigung und ist für den zum Teil nicht ausreichend hohen Reinheitsgrad verantwortlich zu machen. Somit war klar, dass diese Methode zur Albuminisolation (41) für die von uns zu untersuchenden Kollektive in der beschriebenen Weise nicht optimal geeignet war.

Um diese Verunreinigung zu entfernen, modifizierten wir das Verfahren zur Albumintrennung mehrfach, wie weiter unten im Detail dargestellt.

Wir versuchten zunächst, das Ergebnis zu verbessern, indem wir andere Alkoholkonzentrationen für die Extraktion verwendeten, Heparin-, Citrat-, EDTA- Plasma bzw. Serum als Probenmaterial verwendeten, oder die Temperatur variierten. Da, wie sich

aus dem Vergleich mit einem mitgeführten Molekulargewichtsmarker ergab, das Molekulargewicht der Verunreinigung sehr viel kleiner ist, als das Molekulargewicht von Albumin, war es nahe liegend, die beiden Proteine durch Filtration oder Dialyse zu trennen. Als letzter Schritt kam schließlich die präparative Elektrophorese zur Albuminreindarstellung in Frage. Die Überprüfung auf Reinheit nach entsprechenden Modifikationen der Methode erfolgte durchwegs standardisiert mittels SDS-PAGE, die unter 3.5.2.2 genauer beschrieben wird.

3.5.2 Grundaufbau der angewendeten Analyseschritte

3.5.2.1 Ethanolextraktion

750 µl Triochloressigsäure (10%) wurden bei 4°C zu 750 µl Serum gegeben und damit die Proteine präzipitiert. Die Proben wurden bei 11.000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in reinem Ethanol suspendiert und erneut bei 11.000 U/Min. zentrifugiert. Der alkoholische Überstand und 5 ml Wasser wurden in einen Zentrifugenfilter mit der Ausschlussgröße 50.000 Dalton gegeben und bei 4.000 U/Min. für 45 Minuten zentrifugiert, bis die Flüssigkeit vollständig durch den Filter gelaufen war. Das Filtrat wurde verworfen. Der Niederschlag im Filter wurde zurück gewonnen, indem der Filter umgedreht auf ein passendes Gefäß gesetzt, 1 ml Wasser auf die Rückseite des Filters gegeben und bei 1.500 U/Min. für 15 Minuten zentrifugiert wurde. Dieser Lösung wurden 50 µl für eine eventuelle analytische Elektrophorese entnommen und der Rest für die weitere Reinigung mittels präparativer Elektrophorese verwendet (3.7.2 a).

3.5.2.2 Analytische SDS-PAGE zur Reinheitsprüfung

50 µl der mittels Ethanolextraktion (s. 3.5.2.1) gewonnenen Albuminlösung wurden mit Hilfe einer vertikalen Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Coomassie[®]-Färbung auf Reinheit überprüft (42). Zur Kontrolle wurden eine kommerzielle Albuminlösung und ein Molekulargewichtsmarker (Rainbow molecular weight marker RPN 800 beziehungsweise Rainbow molecular weight marker RPN 756 von Amersham Pharmacia), mit Proteinen im Bereich von 10.000-250.000 Da bzw. 14.300 bis 220.000 Da mit auf das Gel aufgetragen.

Die 12 ml Lösung für das Trenngel enthielten 10% Acrylamid, 0,3% Bisacrylamid, 0,1% SDS, Tris/HCl-Puffer 0,375 Molar pH 8,8, 80 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED, 10%, frisch angesetzt) und 60 µl Ammoniumperoxodisulfat (frisch angesetzte 10%ige Lösungen). Die 4 ml Lösung für das Sammelgel enthielt 3% Acrylamid, 0,1% Bisacrylamid, 0,2% SDS, Tris/HCl-Puffer 0,240 Molar pH 6,8, 36 µl TEMED (frisch angesetzte 10%ige Lösung) und 72 µl Ammoniumperoxodisulfat (frisch angesetzte 10%ige Lösung). Der Elektrodenpuffer enthielt 200 mmol/l Glycin, 50 mmol/l Tris und 0,15% SDS. Der Probenpuffer enthielt 0,02% Bromphenolblau, 0,1 M Tris/HCl pH 6,5, 20% Glycerin, und 4% SDS.

Glasplatten wurden in der Vorrichtung zum Gießen von Plattengelen montiert, die frisch angesetzte Lösung für das Trenngel vorsichtig, unter Vermeidung von Luftblasen, zwischen je zwei Glasplatten gefüllt und mit Wasser überschichtet. Die Polymerisation des Trenngels dauerte ca. 30 Minuten. Nach der Polymerisation wurde das Wasser dekantiert und die frisch angesetzte Lösung für das Sammelgel auf das Trenngel gegeben. Die Geltaschen zum Auftragen von 10 Proben wurden präpariert, indem eine entsprechende Plastikschiene („Kamm“) zwischen die Glasplatten in die Lösung für das Sammelgel gedrückt wurde. Auch für das Sammelgel dauerte die Polymerisation ca. 30 Minuten.

Für die Elektrophorese wurden die Glasplatten mit den Gelen in der Apparatur für die analytische Elektrophorese montiert, der Elektrodenpuffer in die dafür vorgesehenen Kammern gegeben und der Kamm vorsichtig aus dem Sammelgel entfernt. Um eine geeignete Probenmenge aufzutragen, wurde der Albumingehalt der Proben photometrisch gemessen und die Proben bis zu einem Albumingehalt von ca. 0,5 g/l verdünnt. Anschließend wurden die Proben mit Probenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und jeweils 35 µl dieser Mischung pro Geltasche auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 50 mA durchgeführt und dauerte ca. 1,5 Stunden, bis das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau das Gel durchlaufen hatte und die Elektrophorese gestoppt wurde. Die Gele wurden aus der Apparatur genommen, das Sammelgel entfernt und das Trenngel für die Darstellung der Proteine über Nacht in der Farbstofflösung (0,1% Coomassie[®]250, 40% Ethanol, 10% Essigsäure) auf einer Schüttelapparatur fixiert und gefärbt und am nächsten Tag mit einer Lösung aus 40% Ethanol und 10% Essigsäure wieder entfärbt, so dass die Proteine als blaue Banden sichtbar wurden. (Die Anfärbung von Proteinen mit Coomassie[®] beruht auf einer nicht kovalenten Wechselwirkung des Farbstoffes mit Aminosäureresten des Proteins. Um ein Auswaschen der Proteine während der Färbung und Entfärbung zu verhindern, werden diese mit

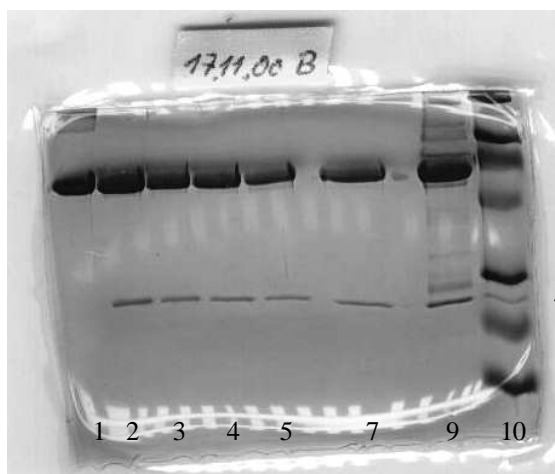
Essigsäure im Gel denaturiert. Die Coomassie[®]-Färbung hat eine höhere Nachweisgrenze als eine Silberfärbung, reichte aber aus, um die Verunreinigung des isolierten Albumins nachzuweisen.)

3.5.3 Dokumentation und Quantifizierung der Verunreinigung in der Albuminfraktion

a) Dokumentation der Verunreinigung

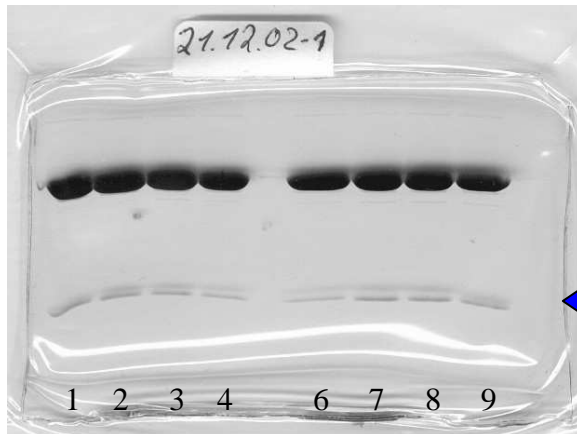
Es wurde Serum von gesunden Probanden, postoperativen Patienten und Intensivpatienten aufgearbeitet, wobei jeweils 0,5 ml Serum mit 0,5 ml wässriger TCA (10%) gefällt und bei 11.000 U/Min. zentrifugiert wurden. Bei den Proben der Intensivpatienten handelte es sich um Blut, das nach klinisch erforderlichen Blutgasanalysen übrig geblieben war und welches sonst verworfen worden wäre. Das Sediment suspendierten wir in Ethanol und zentrifugierten erneut bei 11.000 U/Min.. Mittels SDS-PAGE wurde dann die Reinheit überprüft. Es ist gut zu erkennen, dass die Proben der gesunden Probanden und der operierten Patienten zwei Banden aufwiesen (siehe Elektrophorese 171100 B (gesunde Probandin); Elektrophorese 2112021 (postoperative Patienten)). Bei Intensivpatienten war diese zusätzliche Bande nicht vorhanden (Elektrophorese 22092000A (Intensivpatienten)).

Gesunde Probandin:



Pos.1: Albumin
Pos. 2-5, 7 : aufgearbeitete Probe
Pos.10: Marker
Die Verunreinigung ist deutlich erkennbar. (Pfeil)

postoperative Patienten:



Pos. 1-4 und 6:

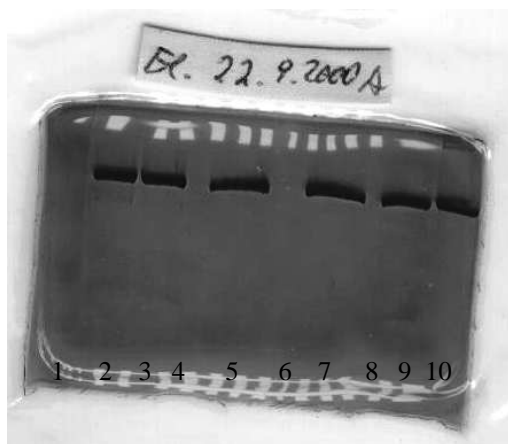
Serum von spät postoperativen Patienten, das mit TCA gefällt, mit Ethanol extrahiert und anschließend filtriert wurde

Pos. 7-9:

Serum von früh postoperativen Patienten, das mit TCA gefällt, mit Ethanol extrahiert und anschließend filtriert wurde

Die Verunreinigung ist deutlich erkennbar. (Pfeil)

Intensivpatienten:



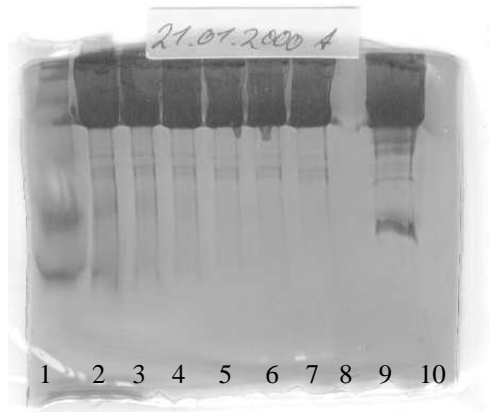
Pos. 2, 3, 5, 7, 9: verschiedene Proben

Pos. 10: Albumin

hier fehlt die Verunreinigung

b) Quantifizierung

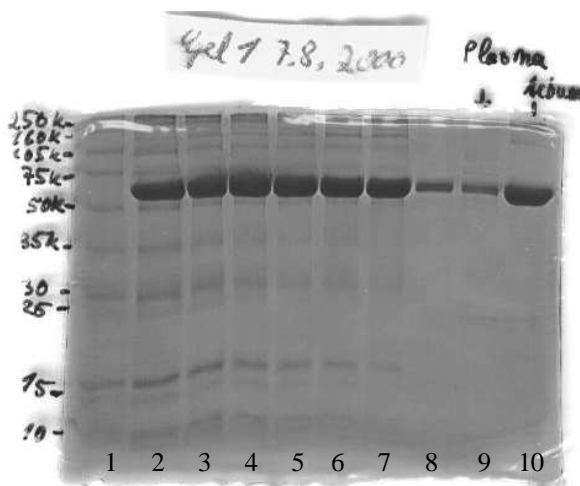
Falls die Verunreinigung kleiner als 0,5% wäre, könnte man das verunreinigende Protein für die massenspektrometrische Analytik mit gewissen Einschränkungen ignorieren. Also wurde zum einen versucht, die minimale Konzentration des kontaminierenden Eiweißes, die gerade noch in der SDS-PAGE erkennbar ist, zu identifizieren und mit der gesamten aufgetragenen Eiweißmenge ins Verhältnis zu setzen. Damit wurde untersucht, ob man auf das Ausmaß der Verunreinigung durch Vergleich mit bekannten Konzentrationen schließen kann. Die Ergebnisse sind in Elektrophorese 21012000A dargestellt:



- Pos. 1: Molekulargewichtsmarker
- Pos. 2-7: Albumin + Marker, wobei die Albuminkonzentration konstant ca. 0,5 g/l bleibt und die Markerkonzentration abnimmt von 25,5 mg/l bis 1,59 mg/l pro Bande
- Pos. 9: Plasma
- Pos. 8 u. 10 nicht belegt.

Es war jedoch kein Abschätzen von Mengenverhältnissen möglich, da die aufgetragenen Proteinmengen zu starke Variationen zeigten.

Es erfolgte daraufhin ein orientierender Quantifizierungsversuch mit präziseren Konzentrationsschritten: pro Bande 4,5%; 3%; 2,3%; 1,5%; 1,15%; 0,75% vom Albumin. (Elektrophorese 07082000 1):

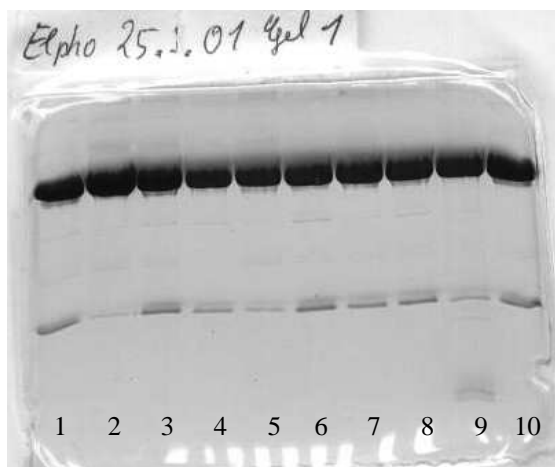


- Pos. 1: Marker
- Pos. 2 – 7: Albumin/Marker – Mischung mit gleich bleibender Albuminkonzentration und abnehmender Markerkonzentration
- Pos. 8: Proteinstandard
- Pos. 9: Plasma (1:1000)
- Pos. 10: Albumin

In der Position 7 ist die Eiweißbande des Markers bereits kaum noch erkennbar. Da die Bande der Verunreinigung deutlicher erkennbar ist als die Proteinbande in Position 7, ist festzustellen, dass die Konzentration der Verunreinigung in den Proben auf jeden Fall mehr als 0,75% beträgt und damit massenspektrometrisch relevant ist.

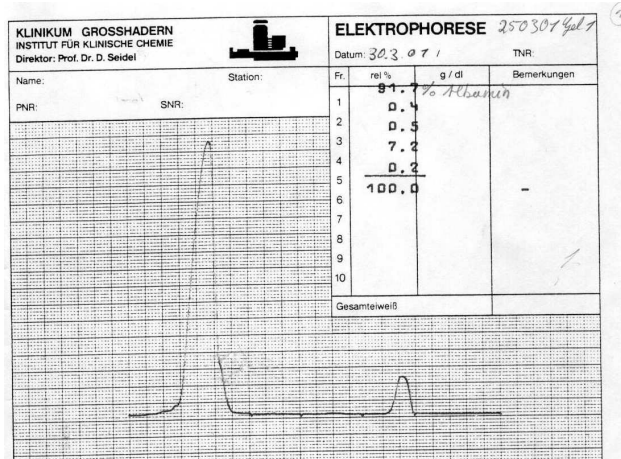
Als nächstes wurde der Verunreinigungsgrad in den Proben durch eine densitometrische Messung des Elektrophorese-Gels bestimmt. Dazu wurden je 500 µl zehn verschiedener Seren von operierten Patienten mit 500 µl TCA im Eisbad gefällt, geschüttelt und bei 11.000 U/Min. in einer Tischzentrifuge für Reaktionsgefäße zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 500 µl absolutem Ethanol (Raumtemperatur)

suspendiert. Es wurde wieder bei 11.000 U/Min. zentrifugiert und der Überstand mit 5 ml Apua ad injectabilia in einen Centriplusfilter mit der Ausschlussgröße 50.000 Da gegeben und bei 4.000 U/Min. bei 25°C für 60 Minuten in einer Hettich Kühlzentrifuge filtriert. Das Sediment wurde zurück gewonnen, indem der Filter umgedreht wurde, 500 µl Wasser auf die Rückseite des Filters gegeben wurden und für 15 Minuten bei 1.500 U/Min. zentrifugiert wurde. Die Filtration wurde noch zweimal wiederholt. Die mit diesem Verfahren gewonnenen Proben wurden so verdünnt, dass diese 0,5 g/l Albumin enthielten. Es wurde eine Elektrophorese (3.5.2.2) durchgeführt, jede einzelne Bande densitometrisch gemessen und die Kurve integriert (s. Elektrophorese 250301 1 und Densitometrien vom 30.03.2001).



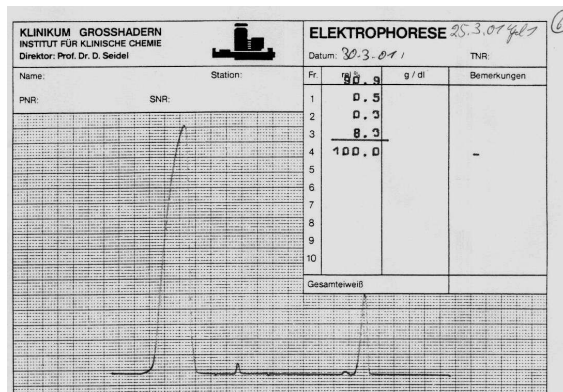
In den Positionen 1-10 sind die aufgearbeiteten Serumproben von verschiedenen Personen aufgetragen.

Position 1 aus Elektrophorese 250301 1

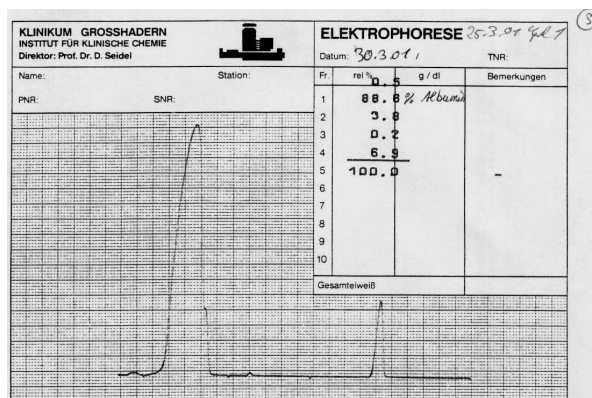


Die einzelnen Banden wurden von oben nach unten densitometrisch gemessen und die Kurve integriert, so dass das Ausmaß der Verunreinigung abgeschätzt werden kann. Abgebildet sind die Kurven der Positionen 1, 6 und 8.

Position 6 aus Elektrophorese 250301 1



Position 3 aus Elektrophorese 250301 1



Es ergab sich als zentrales Ergebnis, dass der Reinheitsgrad des Albumins in Proben von postoperativen Patienten zwischen 88,6 und 99,8% (im Mittel bei ca. 92%) lag und damit definitiv nicht für eine präzise massenspektrometrische Analytik ausreichte.

3.5.4 Modifikationen zur Abtrennung der Verunreinigung in der Albuminfraktion

a) Modifikationen der Alkoholkonzentration

Weil Löslichkeiten im Allgemeinen auch von der Konzentration organischer Lösungsmittel abhängen, wurde untersucht, ob die Konzentration des Alkohols eine Rolle spielt. Dazu wurde wieder Plasma mit TCA gefällt, der Niederschlag in Alkohol suspendiert und erneut zentrifugiert. Dabei wurde 80%iger, 85%iger, 90%iger und 96%iger Alkohol zum Suspendieren benutzt. Gleichzeitig wurde eine reine Albuminlösung genauso aufgearbeitet. Auch bei eingeschränkter Elektrophorese, ist deutlich weiterhin die Verunreinigung der Proben zu erkennen, die in den entsprechenden Kontrollen (reines Albumin) nicht auftritt. Die Proben zeigten unabhängig von der Konzentration des Alkohols das gleiche Ausmaß der Verunreinigung (durch den Pfeil gekennzeichnet).



Pos. 1: Plasma

Pos. 2, 4, 6, 9:

Proben 1, 2, 3 und 4, die mit TCA gefällt und mit 80-, 85-, 90- und 95%igem Ethanol wieder gelöst wurden.

Pos. 3, 5, 8, 10:

Albumin, das entsprechend den Proben 1, 2, 3 und 4 aufgearbeitet wurde.

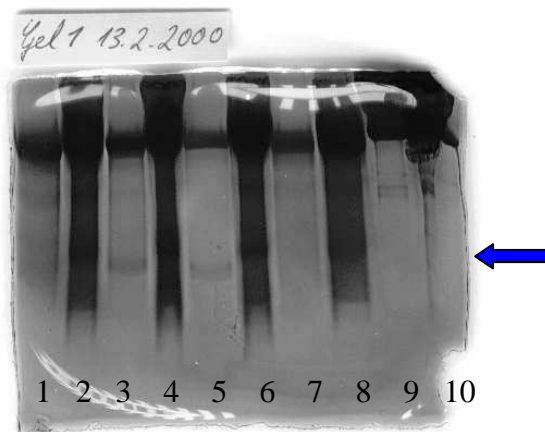
Pos. 7: nicht belegt

Der Pfeil zeigt wieder die Position der Verunreinigung.

b) Modifikationen des Fällungsreagenzes und der Blutentnahme

Als nächstes wurde untersucht, ob die Ergebnisse besser sind, wenn für die Fällung nicht wässrige, sondern alkoholische TCA benutzt wurde und ob es einen Einfluss hat, wenn Serum, EDTA-Plasma, Heparin-Plasma oder Citrat-Plasma als Probe eingesetzt wurde. Also wurden Serum, EDTA-Plasma, Heparin-Plasma und Citrat-Plasma jeweils einmal mit wässriger und einmal mit alkoholischer TCA gefällt und das Albumin der Proben nach dem Zentrifugieren mit 90%igem Alkohol aus dem Sediment extrahiert.

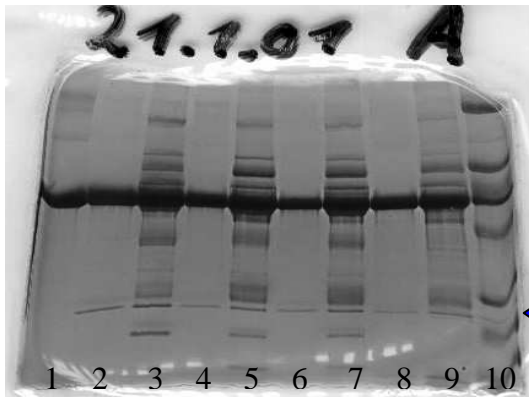
Als Ergebnis dieses Ansatzes zeigte sich, dass der Verunreinigungsgrad in den Proben, die mit alkoholischer TCA gefällt wurden, wesentlich geringer war, allerdings sank auch die Ausbeute rapide, so dass die Probenmenge für die massenspektrometrische Analyse zu gering gewesen wäre. Die Verwendung von Serum, EDTA-, Citrat- oder Heparin-Plasma ergab keinen Unterschied. Die Verunreinigung war in allen Proben in vergleichbarer Menge vorhanden.



- Pos. 1, 3, 5, 7:
mit ethanolischer TCA gefällte
Proben
- Pos. 2, 4, 6, 8:
mit wässriger TCA gefällte
Proben
- Pos. 9, 10:
entsprechend aufgearbeitetes
Albumin
- Der Pfeil zeigt wieder die Position der
Verunreinigung.

c) Versuche der Dialyse

Die Dialyse mit einem Dialyseschlauch mit der Ausschlussgröße von 50.000 Dalton war nicht in der Lage, die kontaminierende Substanz, ein Protein von ca. 25.000 Dalton, zu entfernen, wie in einer SDS-Page dargestellt.

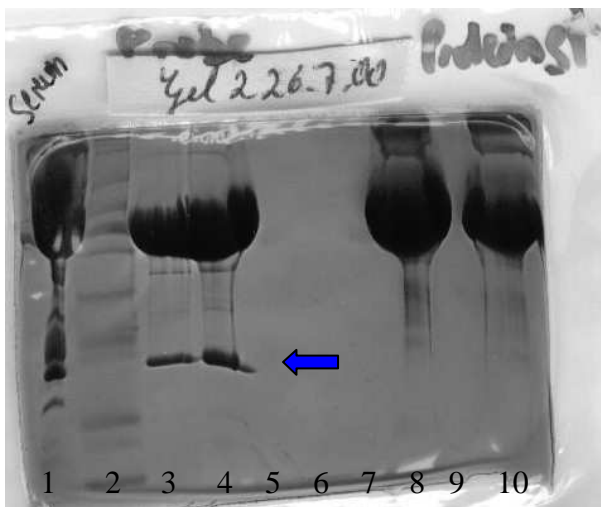


Position 1: Albumin
 Position 2, 4, 6, 8:
 mit TCA gefällte, in Ethanol gelöste und
 anschließend dialysierte Serumproben
 Position 3, 5, 7, 9: Serumproben
 Position 10: Molekulargewichtsmarker

Der Pfeil zeigt wieder die Position der
 Verunreinigung.

d) Erste Modifikationen der Filtration

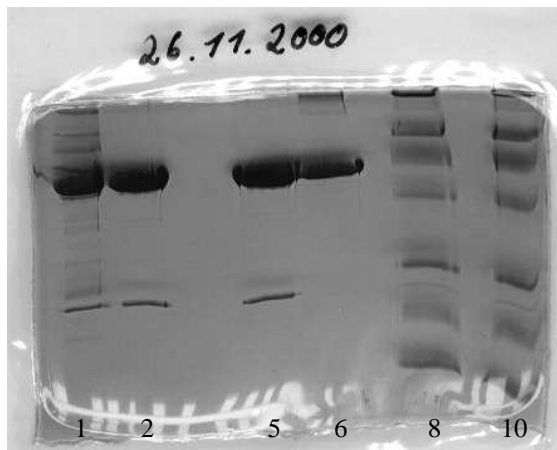
Als nächstes untersuchten wir als Modifikation die Verwendung eines Ultrafilters mit der Ausschlussgröße von 30.000 Dalton anstatt einer Dialyse für die Filtration. Zusätzlich achteten wir darauf, dass die TCA für die Fällung der Serumproteine kalt war, indem wir 4°C kalte TCA verwendeten und die Proben im Eisbad fällten. Leider musste am Ende des Versuchs festgestellt werden, dass die Proben erneut nicht sauber waren (vergleiche Elektrophorese 2607002).



Pos1: Serum
 Pos2: Marker
 Pos 3 und 4:
 aufgearbeitete Serumproben
 Pos 8 und 10:
 aufgearbeitete
 Proteinstandards
 Der Pfeil zeigt die Position der
 Verunreinigung.

e) Zweite Modifikation der Filtration

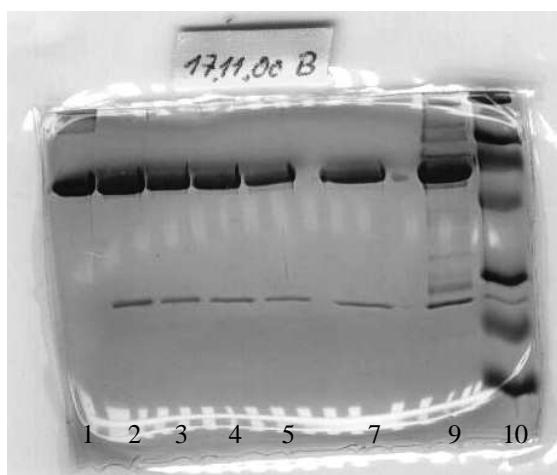
Daraufhin wurde nochmals versucht, mit einer größeren Porengröße die Verunreinigung zu entfernen. Es wurde noch einmal Serum mit TCA gefällt und diesmal mit Centriplusfiltern mit einer Ausschlussgröße von jetzt 50.000 Dalton gewaschen. Die Elektrophorese 26112000 zeigte die leider immer noch vorhandene Verunreinigung (Pfeil).



Pos 1: Serum
 Pos 2 und 5: Proben
 Pos 6: Albumin
 Pos 8 und 10: Marker

f) Modifikation der TCA-Menge für die Fällung und Verwendung von Puffern zum Filtrieren der Proben

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit unter klinischen Bedingungen wurde dann 5x die gleiche Probe eines postoperativen Patienten aufgearbeitet. Dazu wurden 5x 500 µl Serum mit jetzt nur 200 µl TCA gefällt und statt mit Wasser mit saurem Puffer gewaschen. Fünf Ansätze wurden insgesamt durchgeführt. Ein repräsentatives Ergebnis zeigt Elektrophorese 171100B.



Pos. 1: Albumin
 Pos. 2-5, 7: aufgearbeitete Probe
 Pos. 9: Serum
 Pos. 10: Marker
 Die Verunreinigung ist deutlich erkennbar. (Pfeil)

Leider war die Verunreinigung auch nach diesen Modifikationen noch immer vorhanden.

g) Weitere Modifikationen

Im Anschluss daran erfolgten weitere vier modifizierte Versuchsansätze:

Versuch 1: Verbesserte Kühlung

Als Fällungsreagenz wurde TCA 4°C verwendet, die Fällung erfolgte im Eisbad und die Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge bei 4°C anstatt in einer Tischzentrifuge, die nicht gekühlt werden konnte.

Versuch 2: Reduktion der Substanzmenge pro Filter

Es wurden 500 µl Serum mit TCA gefällt und das Albumin im Niederschlag nach der Zentrifugation mit Ethanol extrahiert. Danach wurde nicht wie gewohnt der gesamte ethanolische Extrakt mit Puffer zentrifugiert, sondern die Lösung auf zwei Filter verteilt, um ein eventuelles Verstopfen des Filters und eine dadurch mangelhafte Abtrennung von kleinen Molekülen zu vermeiden.

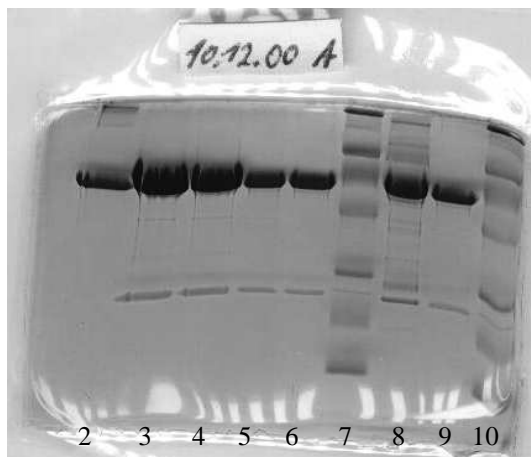
Versuch 3: Verwendung von Waschpuffer mit SDS und Mercaptoethanol.

Mercaptoethanol bricht Disulfidbrücken in Proteinen auf und SDS führt zu einer Kugelform der Proteine. In der Elektrophorese werden Albumin und die Verunreinigung voneinander getrennt. Deshalb wurde versucht, ob die Verwendung des gleichen Puffers mit Zusatz von Mercaptoethanol bei der Filtration zu einer Trennung der zwei Proteine führt.

Versuch 4: Zweimalige TCA- Fällung

Trotz dieser zusätzlichen Modifikationen gelang es auch jetzt nicht, die Verunreinigungen (Pfeil) zu entfernen (Elektrophorese 101200A und -B).

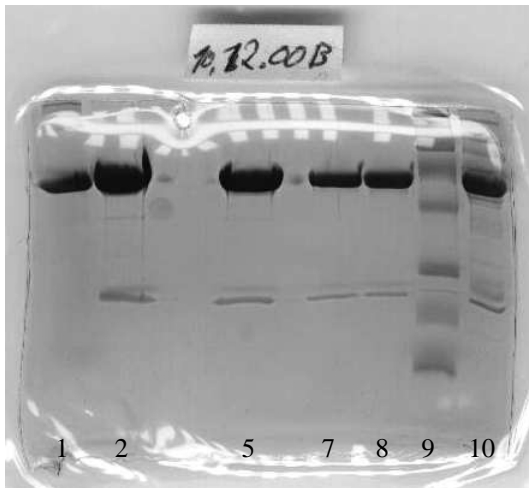
Versuch 1 und 2:



- Pos. 2: Albumin
- Pos. 3-6, 9: in g beschriebene Proben (Versuch 1 und 2)
- Pos. 7, 10: Marker
- Pos. 8: Serum



Versuch 3 und 4:

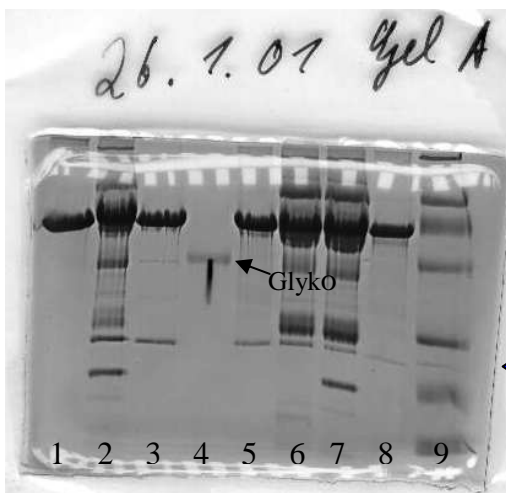


- Pos. 1: Albumin
- Pos. 2, 5, 7, 8: in g beschriebene Proben
(Versuch 3 und 4)
- Pos. 9: Marker
- Pos. 10: Serum



3.5.5 Versuche zur Identifikation der Verunreinigung

Als nächsten Schritt versuchten wir, die Verunreinigung zu identifizieren. Vorab zu bemerken ist, dass die kommerziell zu erhaltenen Albumine ebenfalls nicht zu 100% rein sind. Sie weisen unterschiedliche Reinheiten auf, wobei es sich bei den erwähnten Verunreinigungen laut Hersteller (Sigma) vorwiegend um Globuline bzw. um α_1 -saurer Glykoprotein handelt. Um zu prüfen, ob es sich bei unseren Proben um die gleichen Verunreinigungen handelt, wurde α_1 -saurer Glykoprotein zusammen mit Albumin, gereinigtem Serum, Serum und einem Molekulargewichtsmarker in einer analytischen Elektrophorese (SDS-PAGE wie unter 3.5.2.2 beschrieben) gemeinsam untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Bande des α_1 -sauren Glykoproteins nicht mit der Verunreinigung im gereinigten Serum übereinstimmt (s. Elektrophorese 260101A).

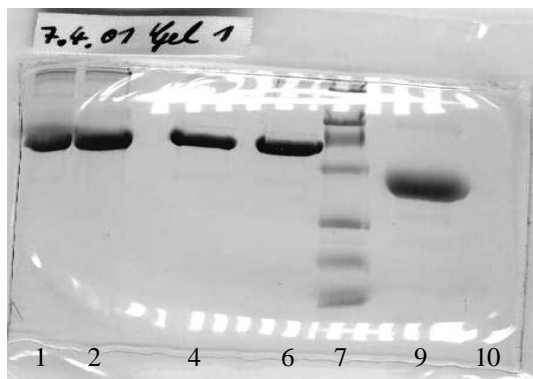


- Pos. 1: Albumin
 - Pos. 2, 7: Serum
 - Pos. 3, 5, 8: aufgearbeitetes Serum
 - Pos. 9: Marker
 - Pos. 4: α_1 -saurer Glykoprotein
(kleiner Pfeil)
- Der dickere Pfeil zeigt die Position der Verunreinigung.

Ferner untersuchten wir unbehandeltes und mittels TCA-Fällung gereinigtes α_1 -saures Glykoprotein (s. Elektrophorese unten).

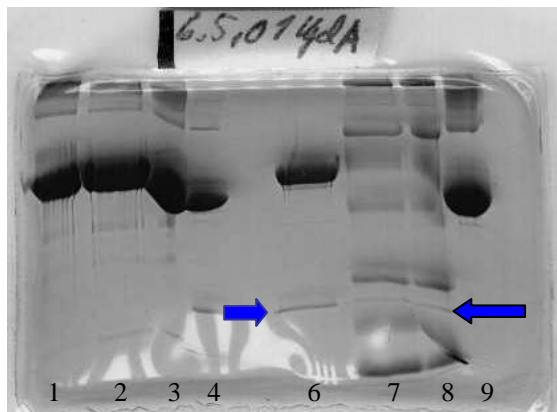
Es ergab sich kein Hinweis darauf, dass es sich bei der Verunreinigung um α_1 -saures Glykoprotein handelt.

Wir untersuchten auch, ob es sich bei der Verunreinigung um Globuline handeln könnte, indem wir 99% reines humanes Albumin, 96% reines Albumin (Verunreinigungen laut Hersteller vorwiegend Globuline) und Molekulargewichtsmarker, sowohl unbehandelt als auch durch TCA-Fällung gereinigt, in der Elektrophorese nebeneinander auftrugen (s. Elektrophorese 070401 1).



- Pos. 1: Albumin 99% rein
- Pos. 2: Albumin 99% rein, aufgearbeitet
- Pos. 4: Albumin 96% rein
- Pos. 6: Albumin 96% rein, aufgearbeitet
- Pos. 7: Marker
- Pos. 9: Glykoprotein
- Pos. 10: Glykoprotein, aufgearbeitet

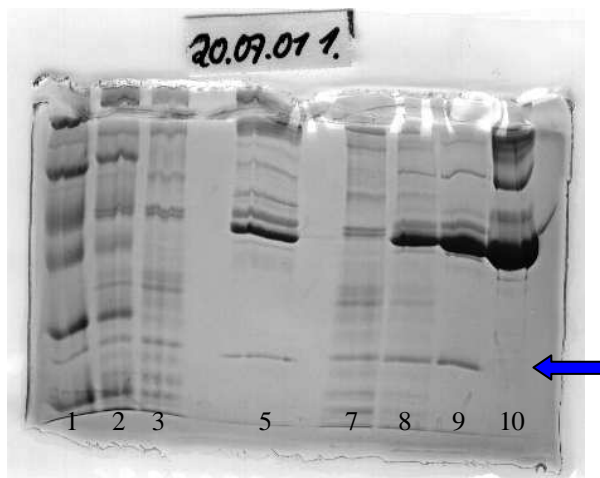
96% reines Albumin zeigte eine Bande, die mit der gesuchten Verunreinigung übereinstimmen könnte. Neben gereinigtem Serum aufgetragen, konnte diese Vermutung nicht bestätigt werden (s. auch Elektrophorese 060501A). Es war jedoch auffällig, dass die zweite Bande im gereinigten Serum mit einer der Banden des Molekulargewichtsmarkers übereinstimmte. Der Molekulargewichtsmarker war eine Mischung aus natürlich vorkommenden Proteinen (Elektrophorese 060501A).



Pos. 1,9 : Albumin 99% rein
 Pos. 2, 3: Albumin 96% rein
 Pos. 4, 6: Probe
 Pos. 7, 8 : Marker

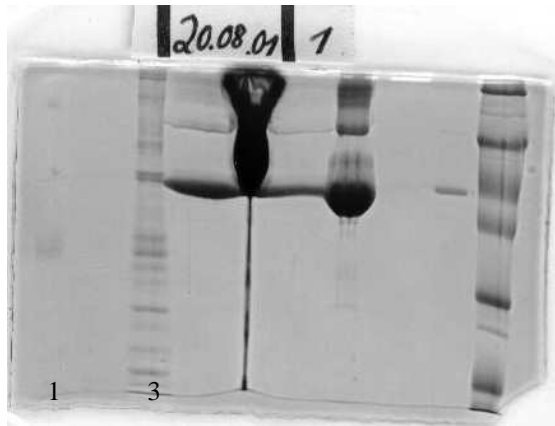
Der Pfeil zeigt die Position der Verunreinigung.

Es wurde nun als nächstes untersucht, ob es sich bei der gesuchten Verunreinigung um Phosphorylase oder Myosin handelte. Myosin und Phosphorylase wurde deswegen als mögliche Verunreinigung in Betracht gezogen, weil diese Substanzen bekannte Bestandteile des Molekulargewichtsmarkers sind. Myosin spaltet sich bei der Elektrophorese in sehr viele Banden auf, eine dieser Banden stimmte mit der Bande der Verunreinigung im gereinigten Serum und im Molekulargewichtsmarker überein (s. Elektrophorese 200701 1).



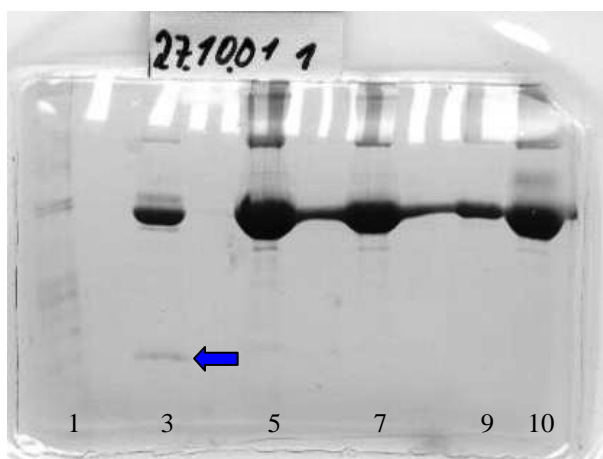
Pos. 1: Marker
 Pos. 2: Marker + Myosin
 Pos. 3: Myosin
 Die Mischung bildete keine Doppelbande, was darauf hindeutet, dass es sich um das gleiche Protein handelt.
 Pos. 5: Serum
 Pos. 7: Myosin
 Pos. 8: Probe + Myosin
 Pos. 9: Probe
 Pos. 10: Albumin
 Der Pfeil zeigt die Position der Verunreinigung.

Nachdem Myosin wie das Serum aufgearbeitet wurde, war es nicht mehr nachweisbar (s. Elektrophorese 2008011).



- Pos. 1: Myosin, mit TCA gefällt, in Ethanol gelöst und anschließend filtriert.
- Pos. 3: Myosin

Da es sich bei der Verunreinigung im gereinigten Serum um ein kleines Protein handelte (ca. 25.000 Dalton), das auch durch eine Filtration mit einer Ausschlussgröße von 50.000 Dalton nicht eliminiert werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass die Verunreinigung sehr stark an Albumin gebunden ist. Nach der Reinigung einer Mischung aus humanem Albumin und Mäusemyosin war reines Albumin in der Elektrophorese nachweisbar. Dies kann zwei Ursachen haben. Entweder wird Mäusemyosin nicht an humanes Albumin gebunden, so dass es durch die Filtration mit einem Filter mit der Ausschlussgröße 50.000 Dalton verloren geht, oder bei der Verunreinigung handelt es sich nicht um Myosin (s. Elektrophorese 2710011).



- Pos 1: Myosin
- Pos 3: Probe
- Pos 5, 7, 9: aufgearbeitete Albumin/Myosin-Mischung
- Pos 10: Albumin 99% rein

Der Pfeil zeigt die Position der Verunreinigung.

Letztendlich gelang es durch einfache Methoden nicht, die genaue Natur der kontaminierenden Substanz zu bestimmen.

Mit freundlicher Unterstützung der Abteilung für analytische Proteinchemie des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried, München, wurde das isolierte Protein mit Hilfe

einer ProSorb-Säule (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) entsalzt und N-terminal an einem pulsed liquid phase sequencer Procise cLC (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) nach den Angaben des Herstellers sequenziert.

Die Proteinsequenzierung ergab als Ursache der Verunreinigung Apolipoprotein A-1 (43).

3.5.6 Isolierung von Albumin mittels präparativer Elektrophorese

Da in der analytischen Elektrophorese die beiden Proteine getrennt werden konnten, wurde zur definitiven Lösung des Verunreinigungsproblems versucht, die kontaminierende Substanz mittels präparativer Elektrophorese abzutrennen:

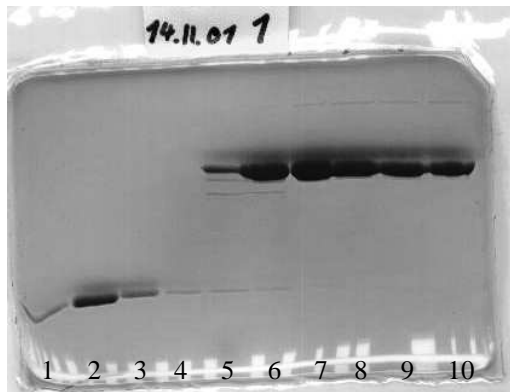
3.6 Entwicklung der Methodik

Das Sammelgel, das Trenngel, der Elektrodenpuffer und der Probenpuffer wurden, wie in 3.5.2.2 für die analytische Elektrophorese beschrieben, angesetzt. Der Elutionspuffer enthielt 0,05 mol/l Natriumdihydrogenphosphat und wurde mit Natronlauge auf einen pH von 7,0 eingestellt.

Für die präparative Elektrophorese wurde zunächst das Trenngel in den Zylinder gegossen, mit Wasser überschichtet, nach der Polymerisation des Trenngels das Wasser dekantiert und anschließend das Sammelgel gegossen. Im Gegensatz zur analytischen Elektrophorese wurde aber nicht ein Kamm zur Bildung von Geldaschen angebracht, sondern auch das Sammelgel für die Dauer der Polymerisation mit Wasser überschichtet.

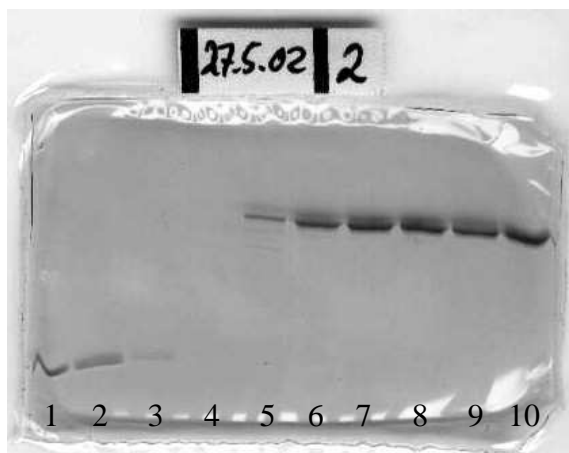
Das Gel wurde in die Elektrophoreseapparatur eingebaut (für die präparative SDS-PAGE verwendeten wir eine Prepcell von Amersham Pharmacia) und die Puffer in die vorgesehenen Kammern gefüllt. Für die präparative Elektrophorese wurden die Serumproben, wie unter 3.5.2.1 beschrieben, mittels Ethanolextraktion vorgereinigt, im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer verdünnt und mit Hilfe eines Schlauchs direkt auf das Sammelgel aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 18 mA durchgeführt. Mittels einer anschließenden analytischen Elektrophorese konnten wir eine gute Trennung der zwei Proteine erkennen. Leider dauerte die Elektrophorese durch die niedrige Spannung lange und die Elution des Albumins zeigte ein starkes Tailing. Daraufhin entschlossen wir uns, die Elektrophorese bei 50 mA durchzuführen. Dieser Versuch zeigte allerdings keine saubere Trennung der beiden Proteine (Elektrophorese 1411011).



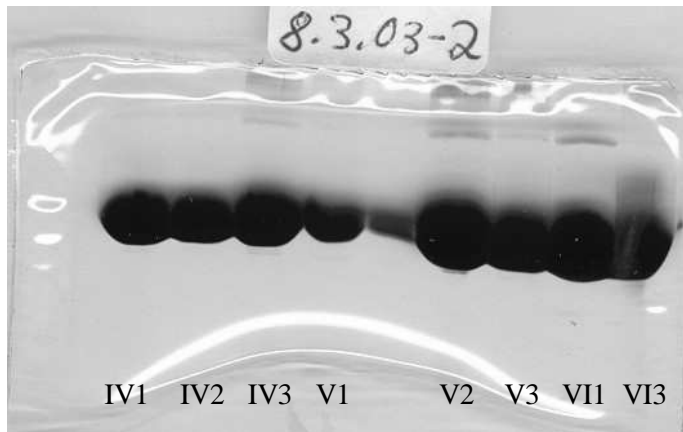
- Pos. 1 Fraktion 1 des Eluats
- Pos. 2 Fraktion 3 des Eluats
- Pos. 3 Fraktion 6 des Eluats
- Pos. 4 Fraktion 9 des Eluats
- Pos. 5 Fraktion 12 des Eluats
- Pos. 6 Fraktion 15 des Eluats
- Pos. 7 Fraktion 18 des Eluats
- Pos. 8 Fraktion 21 des Eluats
- Pos. 9 Fraktion 24 des Eluats
- Pos. 10 Fraktion 27 des Eluats

Als nächstes starteten wir mit 25 mA, bis Bromphenolblau das Sammelgel durchlaufen hatte, erhöhten dann auf 35 mA und nachdem Bromphenolblau das Trenngel durchlaufen hatte nochmals auf 75 mA. Das Ergebnis zeigt die analytische Elektrophorese 2705022.



- Pos. 1 Fraktion 40 des Eluats
- Pos. 2 Fraktion 45 des Eluats
- Pos. 3 Fraktion 50 des Eluats
- Pos. 4 Fraktion 55 des Eluats
- Pos. 5 Fraktion 60 des Eluats
- Pos. 6 Fraktion 65 des Eluats
- Pos. 7 Fraktion 70 des Eluats
- Pos. 8 Fraktion 75 des Eluats
- Pos. 9 Fraktion 80 des Eluats
- Pos. 10 Fraktion 85 des Eluats

Die Fraktionen, die reines Albumin enthielten, wurden in einem Zentrifugenfilter vereinigt und konzentriert. Die Reinheit des Albumins wurde mittels analytischer Elektrophorese (3.5.2.2) nachgewiesen. Somit war es nur durch dieses sehr aufwendige Verfahren gelungen, Albumin in Reinheitsgraden zu isolieren, die für massenspektrometrische Zwecke ausreichend waren (Elektrophorese 080303 2 zeigt das reine Albumin).



Die Proben IV1; IV2; IV3; V1; V2; V3; VI1 und VI3 sind nach beschriebener Methode gereinigt und mittels analytischer Elektrophorese untersucht worden und zeigen trotz einer deutlichen Überladung des Gels eine einzige Bande, die Albumin darstellt.

Die mittels präparativer Elektrophorese isolierten Albuminproben wurden in einem Speedvac getrocknet und für die massenspektrometrische Messung derivatisiert (Propyl-Acetyl-Derivat siehe Punkt 3.7.2 b). Es wurden unmarkierte Proben aufgearbeitet und dazwischen mit $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Leucin markierte Proben. Wir konnten zeigen, dass die unmarkierten Proben Werte im Normalbereich aufwiesen, also kein Isotopeneffekt auftritt und auch keine Proben verschleppt werden (keine erhöhten Werte in den Proben, die nach den markierten Proben aufgearbeitet wurden). Die Reproduzierbarkeit der Methode wiesen wir nach, indem wir 4 Proben nacheinander aufarbeiteten. Diese zeigten alle die gleichen Werte, auch wenn man nicht alle Fraktionen, die Albumin enthielten, für die weitere Aufarbeitung verwendete. Somit war es erst nach langfristigen analytischen Arbeiten gelungen, eine anwendbare Methode zur Albuminextraktion im Plasma aufzubauen. Festzustellen ist allerdings, dass die in der Literatur angegebenen bisherigen Verfahren zur TCA-Fällung/Ethanolextraktion nach unseren Ergebnissen mit einer Ungenauigkeit behaftet sind, die einerseits, zumindest für unser Krankengut, in diesem Ausmaß bisher nicht bekannt oder publiziert war, und die zum anderen sicher in der Vergangenheit zu einer relevanten Verfälschung der Ergebnisse in entsprechenden Studien geführt haben dürfte.

3.7 Beschreibung der angewendeten Methodik zur Bestimmung der Albuminsyntheserate

3.7.1 Material

Tabelle 2: Materialtabelle

Substanz	Firma	Bestellnummer
Acrylamid für die Elektrophorese	Merck	1.10784.0100
Albumin Reagent (BCG)	Sigma	631-2
Albumin, human, 99% (Agaroseelektrophorese)	Sigma	A-3782
Albumin, human, Fraktion V 96-99%	Sigma	A-1653
Ammoniumperoxodisulfat p.a.	Fluka	09915
Ammoniumsulfat microselect	Fluka	09978
Aqua ad iniectabilia	Braun	
Azeotrop-Lösung (Propanol/Benzol 30/70)	Klinikapotheke	
Bioquant Protein (nach Biuret)	Merck	1.10307.0500
Bioquant Protein (nach Bradford)	Merck	1.10306.0500
Bromphenolblau	Merck	8122.0025
BSTFA (bis(Trimethylsilyl)Trifluoracetamid)	Sigma	T-1506
BSTFA+1%TMCS ("Silyl 99/1")	CS-Chromatographie-Service	370620
Coomassie R-250	Fluka	27816
n-Decan	Sigma	
2,2-Dimethoxypropan Stock-Number:217725	Alltech	784+40
Essigsäure p.a.	Merck	1.00062.1000
Essigsäureanhydrid (98%)	Sigma	A-6404
Ethanol 96%	Apotheke im Haus	
Ethanol p.a.	Merck	1.00983.2500
Ethylacetat p.a.	Merck	1.109623.1000
α -saures Glykoprotein Reinheit 99%	Sigma	G-9885
Glycerin	Merck	8.18709.1000
Glycin für die Elektrophorese	Merck	1.04169.1000
α -Ketoisocaprinsäure Natriumsalz (M=152.1)	Sigma	
α -Ketoisocaprinsäure Natriumsalz(1- ¹³ C-KIC) ¹³ C: 99%	Cambridge Isotope Laboratories	
L-Leucine	Sigma	L-1512
Mercaptoethanol	Fluka	63690
Myosin from porcine muscle	Sigma	M-0273
N,N'-Methylen-bis-acrylamid	Fluka	66669
Natriumchlorid p.a.	Merck	6404.1000
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat p.a.	Fluka	71500
Natriumhydroxid 1N	Merck	1.09137.1000
Natriumhydroxid Granulat p.a.	Fluka	71691
Natriumsulfat wasserfrei p.a.	Merck	6649.0500
Phosphorylase b from rabbit muscle	Sigma	P-6635
1-Propanol für die Chromatographie	Merck	1.01024.1000
Proteinstandard Gesamtpr.:80g/l; Albumin 50g/l	Sigma	A-540-10
Rainbowmarker RPN 756 und RPN 800	Biorad	
Rinder-Albumin \geq 98%	ICN	130700
Salzsäure 1N	Merck	1.09057.1000
Salzsäure 6N	Apotheke Innenstadt	L 0025
Salzsäure Gas	Labor Prof. Wanner Institut für Pharmazie	
SDS (Natriumdodecylsulfat) microselect	Fluka	71727
Serum-Rinder-Albumin ORHD 20/21	Behringwerke Ag Marburg	
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Fluka	87689
Trichloressigsäure pro analysi	Merck	1.00807.0250
Triethylamin p.a.	Fluka	90340
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan p.a.	Merck	1.08382.1000

3.7.2 Probenaufbereitung

a) Albuminreinigung

Zunächst wurden die Proben mittels Trichloressigsäurefällung und Ethanolextraktion, wie unter 3.5.2.1 beschrieben, vorgereinigt und anschließend noch durch eine präparative Elektrophorese gereinigt.

Das Sammelgel, das Trenngel, der Elektrodenpuffer und der Probenpuffer wurden, wie in 3.5.2.2 für die analytische Elektrophorese beschrieben, angesetzt. Der Elutionspuffer enthielt 0,05 mol/l Natriumdihydrogenphosphat und wurde mit Natronlauge auf einen pH von 7,0 eingestellt.

Auch für die präparative Elektrophorese wurde zunächst das Trenngel (3 cm Höhe) gegossen, mit Wasser überschichtet, nach der Polymerisation des Trenngels das Wasser dekantiert und anschließend das Sammelgel (1 cm) gegossen. Im Gegensatz zur analytischen Elektrophorese wurde aber nicht ein Kamm zur Bildung von Geltaschen angebracht, sondern auch das Sammelgel für die Dauer der Polymerisation mit Wasser überschichtet (es kann jeweils nur eine Probe mittels präparativer Elektrophorese gereinigt werden).

Der Zylinder mit dem Gel wurde in die Elektrophoreseapparatur eingebaut (für die präparative SDS-PAGE verwendeten wir eine Prepcell von Amersham Pharmacia) und die Puffer in die vorgesehenen Kammern gefüllt. Für die präparative Elektrophorese wurden die Serumproben, wie unter 3.5.2.1 beschrieben, mittels Ethanolextraktion vorgereinigt, im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer verdünnt und mit Hilfe eines Schlauchs direkt auf das Sammelgel aufgetragen.

Die Fließgeschwindigkeit des Elutionspuffers wurde auf 1 ml/Min. eingestellt und die Elektrophorese mit einer Stromstärke von 40 mA durchgeführt bis das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau die Gele (nach ca. 2-2,5 Stunden) durchlaufen hatte. Die Stromstärke wurde dann auf 80 mA erhöht und 100 Proben von je 1,5 ml des Eluats aufgefangen.

Jede fünfte dieser Fraktionen wurde mittels analytischer Elektrophorese (3.5.2.2) auf die enthaltenen Proteine untersucht. Die Proben, die Albumin enthielten, wurden zusammengegeben und in einem Zentrifugenfilter (Centriplus, Ausschlussgröße 50.000 Da) bei 6000 U/Min. in einer Beckmann Hochgeschwindigkeitszentrifuge filtriert, bis die Flüssigkeit den Filter durchlaufen hatte. Das in dem Filter befindliche Albumin wurde zurück gewonnen, indem der Filter umgekehrt auf ein passendes Gefäß gegeben, 1 ml Wasser auf

die Rückseite gegeben und bei 1.500 U/Min. in einer Hettich Kühlzentrifuge zentrifugiert wurde.

b) Leucin-Derivatisierung

Zur Analyse des albumingebundenen Leucins benutzten wir die Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (GC-IRMS), die zwar hochreine Proben erfordert, aber für die niedrigen Anreicherungen, wie sie im Albumin vorliegen, besonders geeignet ist. Die Aminosäuren wurden verdampfbar gemacht, indem sie in das N-acetyl-n-propyl(NAP)-Derivat übergeführt wurden. Um dieses NAP-Derivat zu erhalten, versetzten wir die Proben mit 1 ml 8M HCl-Propanol und 20 µl Dimethoxypropan und erhitzen sie in luftdicht verschlossenen Pyrexröhrchen für 20 Minuten auf 110°C. Dabei wurde die Carbonsäuregruppe propyliert. Nachdem sich die Proben abgekühlt hatten, wurden sie bei 60°C unter Stickstoff getrocknet. Dieser Trocknungsvorgang wurde nach Beimischen von 1 ml Azeotroplösung (Mischung aus Benzol und Propanol) wiederholt.

Zur Acetylierung der Aminogruppe wurden die getrockneten Ester mit 1,5 ml einer frisch hergestellten Mischung aus Aceton, Triethylamin und Essigsäureanhydrid (5:2:1) versetzt und 5 Minuten bei 60°C erhitzt. Danach wurden die Proben bei 45°C unter Stickstoff getrocknet. Die getrockneten Proben wurden mit 1 ml gesättigter Kochsalzlösung und 2 ml Ethylacetat ausgeschüttelt und die organische Phase bei Raumtemperatur unter Stickstoff getrocknet. Für die GC-IRMS-Messung wurden die Derivate in Ethylacetat gelöst und 1 µl in den Gaschromatographen injiziert.

c) Ketoisocapronsäure-Derivatisierung

Aus verschiedenen Publikationen geht hervor, dass die Bestimmung der Anreicherung in der Plasma-KIC als Ersatz für die Bestimmung der Anreicherung in der t-RNA der Leberzellen geeignet ist (44;45). Da bei der GCMS-Messung das ganze Molekül für die Bestimmung der Isotopenanreicherung verwendet wird, war außer der Eiweißfällung keine zusätzliche Reinigung der Ketoisocapronsäure notwendig. Um KIC gaschromatographisch trennen zu können, muss die α -Ketocarbonsäure verdampfbar gemacht werden. Wir benutzten die Methode von Ford, und erzeugten das Quinoxalinoltrimethylsilylderivat (46). Uns stand keine Möglichkeit zur Verfügung, die Derivate für die Massenspektrometrie mit Ammoniak chemisch zu ionisieren. Aber auch mit Elektronenstoß-Ionisation waren die Massenspektren geeignet, die Anreicherungen zu messen. Wir bestimmten die Massen 259 und 260.

Zur Herstellung der Derivate wurden zunächst 0,1 ml Serum mit 1.0 ml absolutem Alkohol gefällt, zentrifugiert, der Überstand in eine 1,8 ml Glasflasche überführt und unter Stickstoff getrocknet. Der Rückstand wurde in 0,2 ml Wasser gelöst und mit 0,1 ml einer frisch hergestellten o-Phenylendiamin-Lösung (2% in 4M HCl) eine Stunde lang bei 90°C umgesetzt. Die Lösung wurde zweimal mit 1 ml Ethylacetat ausgeschüttelt und die vereinigten Extrakte über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach trocknen unter Stickstoff wurde der Rückstand in 0,1 ml Pyridin gelöst und mit 0,1 ml BSTFA+1%TMCS 30 Minuten lang bei 120°C umgesetzt. Die Quinoxalino(trimethyl)silylderivate der Ketosäuren wurden bis zur Messung in dieser Reaktionslösung aufbewahrt. (Dieses Derivat ist nicht stabil und zerfällt innerhalb eines Jahres vollständig, so dass keine Messung mehr möglich ist.) Kurz vor der Messung wurde das überschüssige Reagenz bei Raumtemperatur unter Stickstoff abgedampft und der Rückstand in 50 µl wasserfreiem n-Dekan, das 5% BSTFA enthält, gelöst und 5 µl dieser Lösung in den Gaschromatographen eingespritzt. Die Messung muss direkt nach dem Lösen in Dekan durchgeführt werden, da sich das Derivat in diesem Zustand innerhalb von 10 Stunden schon teilweise zersetzt. Für die Eichgerade verwendeten wir 100 µl Lösungsmittel und injizierten 1 µl.

3.7.3 Massenspektrometrische Analysen

a) Massenspektrometrische Verfahren und Prinzipien der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie werden Moleküle im Damp fzustand in positive oder negative Ionen überführt, also ionisiert. Diese Ionen sind meist instabil und zerfallen in geladene und ungeladene Bruchstücke, was als Fragmentierung bezeichnet wird.

Die geladenen Moleküle werden in einem Magnetfeld oder elektrischen Feld nach ihrer Masse getrennt, Massenfokussierung genannt, und ihre Massen und relativen Intensitäten registriert.

Es entsteht für jede Masse ein Strich im Massenspektrum. Diese Linen erscheinen entsprechend ihrer Masse nacheinander im Spektrum und die Länge des Strichs ist proportional zur Menge der Moleküle dieser Masse.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Moleküle zu ionisieren, z.B. die Elektronenstoß-Ionisation oder die chemische Ionisation.

Die von uns angewendete Methode ist die Elektronenstoß-Ionisation. Bei diesem Verfahren kommt es meist zu einer starken Fragmentierung. Das ist für die Strukturzuordnung von unbekanntem Substanzen wertvoll. Wir dagegen versuchen durch die Derivatisierung möglichst stabile Moleküle zu erzeugen, da sich die Menge der einzelnen Fragmente und damit des Moleküls besser bestimmen lassen, je weniger Peaks im Massenspektrum erscheinen.

Auch für die Massenfokussierung sind mehrere Verfahren entwickelt worden, unter anderem die Ionentrennung in einem Magnetfeld oder einem Quadrupolanalysator. Die Ionentrennung 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 der Masse des Ions und der Kreisbahn, die es beschreibt. Somit kann aus der Kreisbahn eines Ions auf seine Masse geschlossen werden, oder anders formuliert, Ionen mit unterschiedlicher Masse werden im Magnetfeld des Massenspektrometers unterschiedliche Kreisbahnen beschreiben. Da die zu erwartenden Massen und deren Kreisbahnen bekannt sind, (in unserem Fall 45 für $^{13}\text{CO}_2$ und 44 für $^{12}\text{CO}_2$), können an einem bestimmten Punkt der massenspezifischen Kreisbahn Detektorplatten platziert werden, auf die – nach Masse getrennt – die verschiedenen Ionen auftreffen. Beim Auftreffen der Ionen auf die Kollektoren wird ein messbarer Elektronenstrom freigesetzt. Je mehr Ionen einer bestimmten Masse auftreffen, um so höher ist der Elektronenstrom. Das Verhältnis der - getrennt voneinander gemessenen - Elektronenstromstärken zueinander ist dem Isotopenverhältnis proportional.

Im Quadrupolanalysator wird der Ionenstrahl in Längsrichtung durch vier parallel angeordnete Metallstäbe geleitet. Zwischen jeweils einem gegenüberliegenden Stäbepaar liegt eine Gleichspannung an, die durch ein Hochfrequenzfeld überlagert ist. Die Phase zwischen den Stäbepaaren ist um 180° verschoben. Für eine gegebene Spannung hängt die Bahn, welche von den Ionen in Längsrichtung zwischen den Stäben durchlaufen wird, von ihrer Masse ab, d.h. es gelangen nur Teilchen einer bestimmten Masse an den Austrittsspalt. Durch Veränderung der Spannung kann die nächst höhere Masse den Austrittsspalt treffen usw.. Das Quadrupol-Massenspektrometer hat eine hohe Empfindlichkeit, kurze Registrierzeit und einen geringen Raumbedarf. Deshalb ist es für die Kopplung an einen Gaschromatographen gut geeignet (47).

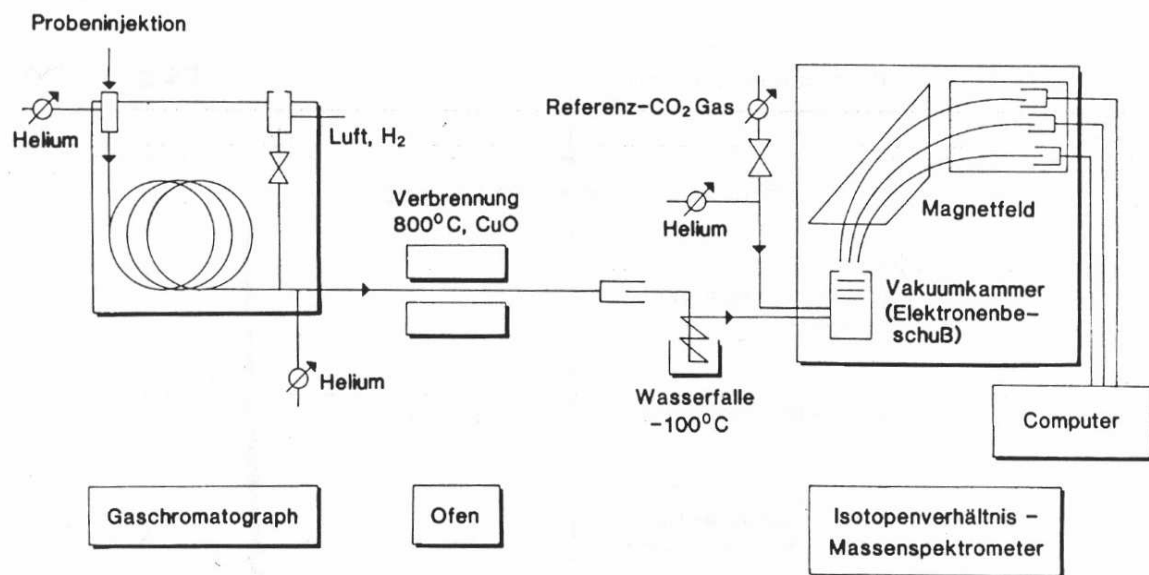
Für die Bestimmung der Anreicherung des an Albumin gebundenen $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Leucins benutzten wir ein GC-IRMS-Gerät mit Elektronenstoßionisation und Magnetfeldfokussierung. Es wurden die Massen 45 ($^{13}\text{CO}_2$) und 44 ($^{12}\text{CO}_2$) registriert. Die $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Anreicherung in der Ketoisocaprinsäure bestimmten wir in einem GCMS-System mit Elektronenstoßionisation und Quadrupolanalysator. Hier wurden die Massen 259 und 260 bestimmt.

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

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

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

Abbildung 2: Darstellung des GC-IRMS-Systems



Vor Beginn der GC-IRMS Analyse muss jedoch erst das zu separierende Aminosäuregemisch von der wasserlöslichen in eine volatile Form übergeführt werden. Dazu ist eine Derivatisierung zum N-acetyl-n-propyl (NAP)-Ester notwendig (48), deren standardisierter Ablauf bereits im vorhergehenden Kapitel (3.7.2) dargestellt wurde. Die NAP-Aminosäuren (2µl Proben) werden in den Gaschromatographen (Hewlett-Packard 5980 A) injiziert und mittels Kapillarsäule (30 m DB 1701 Kapillarsäule, Innendurchmesser 0,22 mm, J&W Scientific, New York, USA) getrennt. Die Injektortemperatur wird bei 250°C, die des Flammenionisationsdetektors bei 300°C gehalten. Als Trägergas dient Helium (He) mit einer Flussrate von 1 ml pro Minute und einem Säulenspitzendruck von 1,1 bar. Zur chromatographischen Trennung der NAP-Aminosäuren wird ein Temperaturgradient benutzt, der bei 100°C für eine Minute gestartet wird, anschließend in Schritten von 6°C pro Minute auf 200°C, dann in Schritten von 10°C pro Minute auf 250°C steigt und schließlich für weitere 10 Minuten auf diesem Niveau gehalten wird. Beim Erscheinen der NAP-Tracer-Aminosäure (in diesem Fall NAP-1-¹³C-Leucin) im Flammenionisations-Detektor, nach Durchlaufen der Kapillarsäule (in der Regel nach 15 Minuten), wird das Helium-Trägergas mit dem NAP-1-¹³C-Leucin bei 800°C mittels Kupferoxydgranulat (CuO) als Katalysator zu Kohlendioxyd und Wasser verbrannt. Zur Aufrechterhaltung der chromatographischen Auftrennung wird vor dem Eingang in die Verbrennungskammer zusätzlich Helium mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute dem NAP-1-¹³C-Leucin-Helium-Gemisch beigegeben. Nach

Durchlaufen der Verbrennungskammer wird das dabei entstandene Wasser in einer Kühlfalle bei -100°C entfernt. Das übrig gebliebene Kohlendioxydgemisch gelangt nun in das Massenspektrometer. Das Massenspektrometer besitzt einen doppelten Zugang, über den wechselweise das Kohlendioxydgemisch aus der Verbrennungskammer oder ein Referenz- CO_2 -Gas mit Helium als Trägergas zugeführt wird. Ein Referenzgas ist notwendig, da entsprechend den Prinzipien der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie nur der Vergleich des Isotopenverhältnisses der Probe mit dem Isotopenverhältnis in einem Referenzgas aussagekräftige Werte ergibt.

Als Isotopenverhältnis ist das Verhältnis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (bezeichnet als r) in einem CO_2 Gemisch definiert. Die Bestimmung von r erfolgt dadurch, dass $^{13}\text{CO}_2$ und $^{12}\text{CO}_2$ verschiedene Molekülmassen (M_r 45 und 44) aufweisen. Komplizierend kommt hinzu, dass nicht nur vom Kohlenstoff sondern auch vom Sauerstoff verschiedene natürliche Isotope existieren (z.B. das häufige ^{16}O und das seltene ^{17}O). Da $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ die gleiche Molekülmasse besitzt wie $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ (Molekülmasse 45), müssen Rohdaten mit Standards korrigiert werden.

Das CO_2 -Gemisch mit Helium als Trägergas gelangt anschließend an die Verbrennung inline in das Massenspektrometer, wo es zunächst in eine Vakuumkammer gelangt, in der die Moleküle durch Elektronenbeschuss ionisiert werden. Die Elektronen werden aus Filamentdrähten freigesetzt. Abstoßende Elektroden zwingen die Ionen durch eine Reihe von Fokussierungslinsen in das Analysesegment des Massenspektrometers. Hier erfolgen die Massenfokussierung im Magnetfeld und anschließend die massenspezifische Registrierung ihrer Häufigkeit.

Das Isotopenverhältnis einer 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 Belemnate limestone (PDB) Eichgas mit einem Isotopenverhältnis von 0,011.

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

Zur Qualitätskontrolle war es erforderlich, neben den Probemessungen intermittierend die Anreicherung bestimmter Standardproben mit bekanntem, genau definiertem Isotopengehalt zu bestimmen, hierzu verwendeten wir eine Standardprobe mit $\Delta^{13}\text{C} = -49.2\text{‰}$ (49).

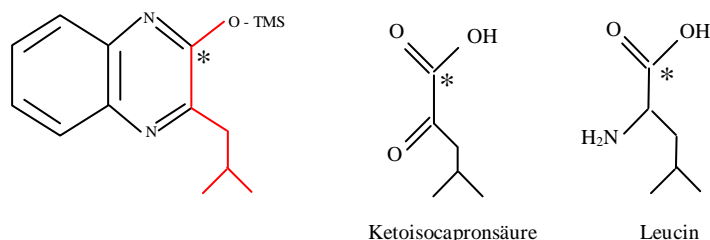
c) Durchführung der Gaschromatographie - Massenspektrometrie (GC-MS)

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

Die chemische Ionisation des Quinoxalinoltrimethylsilyl-Derivates der Ketoisocaprinsäure mit Ammoniak führt zu guten Massenspektren (46), aber auch mit einer Ionisierung durch Elektronenbeschuss konnten wir Spektren erzielen, die auswertbare Peaks mit den Massen 259 und 260 lieferten.

Die GC-MS-Anlage besteht aus einer Kopplung eines Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer, ähnlich wie beim GC-IRMS, nur mit dem Unterschied, dass die den Gaschromatographen verlassenden Substanzen vor der massenspektrometrischen Analyse nicht verbrannt werden. Auch für das 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 die beiden Ketogruppen der KIC ein Teil einer aromatischen Gruppe werden. Der dabei entstehende aromatische Alkohol wird mit einer Silylverbindung umgesetzt und kann dann gemessen werden. (Abb.3)

Abbildung 3: Strukturformeln der derivatisierten und nicht derivatisierten Ketoisocaprinsäure und des Leucins



Die Derivatisierung wurde bereits genauer beschrieben. Im Vergleich zur GC-IRMS kommt der Derivatisierung 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. Es entsteht ein Massenspektrum mit verschiedenen Peaks. Von diesen Peaks wählt man einen aus, der den markierten Kohlenstoff enthält und als möglichst großer Peak im Spektrum auftritt. In der GC-MS wird nur die Masse dieses Peaks (in unserem Fall 259) und die Masse dieses Peaks + 1 (in unserem Fall 260) im Quadrupolmassenspektrometer bestimmt. Aus diesen beiden Massen ist eine exakte Quantifizierung möglich, aus der sich schließlich die Anreicherung einer bestimmten Substanz ergibt.

Nach abgeschlossener Derivatisierung wird die zuvor abgekühlte Probe mit einem inerten Trägergas (Helium) in den erhitzten Injektor am GC-MS injiziert. Zusammen mit dem Trägergas wird die verdampfte Probe dann durch die Gaschromatographiesäule (DB-5. J&W Scientific, Washington, USA; Innendurchmesser 0,25 mm Filmdicke 0,25 μm) geleitet, an der mittels eines programmierten Temperaturgradienten, (Starttemperatur 100°C, dann Temperaturerhöhung von 10°/Min. bis 280°C und anschließend 10 Minuten bei 280°C) die Auftrennung erfolgt. Beim Erscheinen der derivatisierten Ketoisocaproensäure (KIC) im Flammenionisations-Detektor wird das Helium-Trägergas mit dem derivatisierten KIC (Verhältnis 25:1) über ein Trennventil zum Massenspektrometer geleitet. Da der Druck, mit dem die Probe einschließlich des Trägergases den Gaschromatographen verlässt, für das Massenspektrometer zu groß ist, muss vor dem Eintritt in das Massenspektrometer eine Druckreduzierung erfolgen. Dies geschieht über eine Hochgeschwindigkeitspumpe, die am Eintritt in das Massenspektrometer eine sofortige Druckverminderung bewirkt. Die Probe gelangt als nächstes in die Ionisationskammer. Dort passiert sie einen Elektronenstrahl, der aus erhitzten Filamenten freigesetzt wird und von einer gegenüberliegenden, positiv geladenen Elektronenfalle angezogen wird. Beim Auftreffen eines Elektrons auf ein Molekül in der Probe wird das Molekül ionisiert und fragmentiert. Die eigentliche massenspektrometrische Messung erfolgt mit Hilfe eines Quadrupolmassenspektrometers. Bei allen Analysen wurden KIC-Standardkurven gemessen, um die Linearität in diesem Messbereich zu prüfen und die Isotopomerenverhältnisse in mole percent excess (MPE) umrechnen zu können.

3.8 Berechnungen der fraktionellen Albuminsyntheserate

Zur Berechnung der fraktionellen Proteinsyntheserate ist es erforderlich, das Tracer/Tracee-Verhältnis des proteingebundenen 1-¹³C-Leucins (Z_{Prot}) und das Tracer/Tracee-Verhältnis des Präkursors, in unserem Fall der Ketoisocaprönsäure (Z_{KIC}) zu ermitteln (44).

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

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

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

Das Tracer/Tracee-Verhältnis (Z_{Prot}) kann aus dem durch GC-IRMS gemessenen Isotopenverhältnis (¹³C/¹²C) abgeleitet werden, wobei Z_{Prot} 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 ($R_{\text{NAP-Leucin}}$ genannt)

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

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

Z_{Prot} kann durch $R_{\text{NAP-Leucin}}$ anhand folgender Formel berechnet werden:

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

(49)

Hierbei entspricht der Korrekturfaktor dem Wert 10,02. Mittels Z_{Prot} kann nun die fraktionelle Proteinsyntheserate, bei bekannter Präkursorpool-Anreicherung, Z_{KIC} , berechnet werden. Anhand der GC-MS Messung berechnet sich die Präkursorpool-Anreicherung aus der

Differenz zwischen dem Isotopomerenverhältnis der Probe $(M+1/M)_P$ nach Isotopeninfusion und dem Isotopenverhältnis im nicht markierten Hintergrund $(M+1/M)_H$ wie folgt:

$$z_{KIC} = (M+1/M)_P - (M+1/M)_H \quad \langle 4 \rangle$$

Hieraus ergibt sich für die fraktionelle Proteinsyntheserate FSR:

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

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

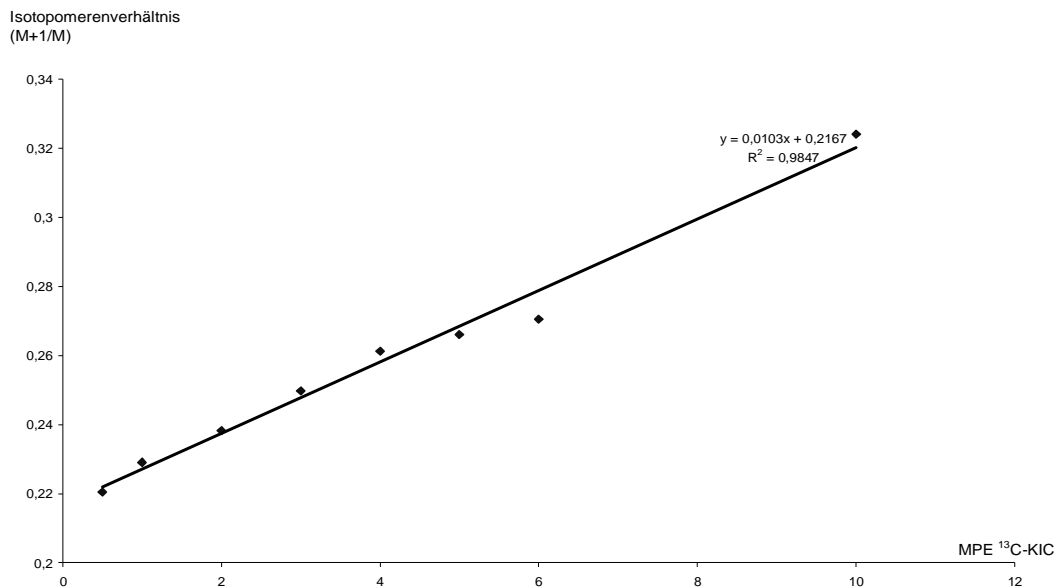
3.9 Berechnungen der Leucin-Erscheinungsrate als Indikator für den Eiweiß-Abbau des Körpers

Für die Berechnung der Leucin-Erscheinungsrate R_a (rate of appearance = Maß für die Proteinabbaurate des Organismus) benutzen wir die Formel nach Jahoor (11)

$$R_a = \left(\frac{\text{MPE Tracer in der Infusionslösung}}{\text{MPE Plasma KIC}} - 1 \right) \times F \quad \langle 6 \rangle$$

R_a ist die Leucin-Erscheinungsrate, MPE bedeutet mole percent excess und F die Tracer-Infusionsrate in $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Minute}^{-1}$. Durch die GCMS erhalten wir Isotopomerenverhältnisse $(M+1/M)$ von KIC, die in MPE umgerechnet werden müssen. Hierzu haben wir die Isotopomerenverhältnisse der Proben mittels einer Eichgerade, in der die MPE einer Standardlösung gegen die entsprechenden Isotopomerenverhältnisse aufgetragen wurden, in MPE umgerechnet.

Abbildung 4: Eichgerade zur Prüfung der Linearität und zur Umrechnung von Isotopomenverhältnissen in MPE



Durch Umformen der Formel der Regressionsgerade erhielten wir folgende Formel zur Berechnung der MPE-Werte:

$$\text{MPE} = \frac{[(\text{M}+1/\text{M}) - 0,2167]}{0,0103} \quad \langle 7 \rangle$$

3.10 Bestimmung der Albuminanreicherung in gereinigten und ungereinigten Proben

Um zu überprüfen, ob die quantitativ relevante Kontamination mit Apolipoprotein A-1, die bei der Albuminisolation mittels TCA-Fällung/Ethanolextraktion in der Elektrophorese zu beobachten ist, auch die Anreicherung beeinflusst, wurden zwei getrennte Analysen (mit und ohne elektrophoretische Abtrennung von Apolipoprotein A-1) von gleichen Blutproben durchgeführt. Die anschließenden analytischen Schritte (siehe oben) waren gleich. Zwei Kollektive wurden untersucht:

- a) Früh postoperative Patienten aus unserer Studie, bei denen Blutproben nach dreistündiger (n=1), sechsständiger (n=3) und zehnstündiger (n=3) Tracer-Infusion zweifach aufgearbeitet wurden.
- b) Vergleichskollektiv: Gesunde Probanden, denen 4 mg/kg KG $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Leucin oral gegeben wurde.
- Blutproben wurden zwei Stunden (n=1), vier Stunden (n=2), fünf Stunden (n=1), sechs Stunden (n=1) und acht Stunden (n=1) nach Tracereinnahme entnommen. Die Proben wurden jeweils zweifach aufgearbeitet.

3.11 Messungen der Albuminkonzentration

Die Messung der Albuminkonzentration erfolgte photometrisch nach der Umsetzung mit Albuminreagenz (BCG) gegen Standardsubstanz für die Einstellung der Proteinkonzentration für die Elektrophorese oder mittels Brom Cresol Grün als Routinemethode der Klinischen Chemie für die Bestimmung der Albuminkonzentration im Plasma der Patienten (50).

3.12 Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm SEM angegeben und wurden mittels gepaarter und ungepaarter t-Tests verglichen. Bei multiplen Vergleichen innerhalb einer Gruppe benutzten wir Dunnet's t-Test. Korrelationen wurden mittels Pearson-Korrelation auf einseitige Signifikanz geprüft. Ein signifikanter Unterschied bzw. eine signifikante Korrelation wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von Apolipoprotein A-1 auf die Höhe der Albuminanreicherung

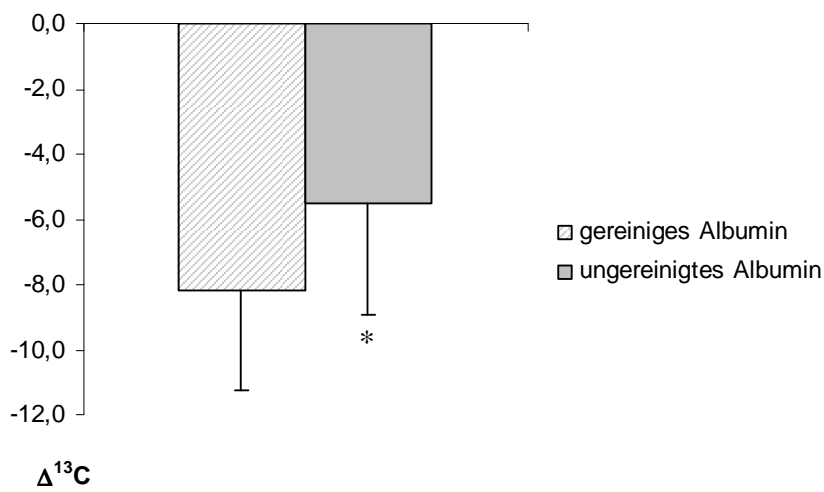
Die Delta-Werte für die Leucin-Anreicherung im Plasmaalbumin unterschieden sich bei den früh postoperativen Patienten signifikant, wenn gereinigte, d.h. mittels TCA-Fällung/Ethanolextraktion und zusätzlicher präparativer Elektrophorese gereinigte, mit ungereinigten, d.h. ohne zusätzliche präparative Elektrophorese aufgearbeitete Proben des gleichen Patienten verglichen wurden (gereinigt: $-8,2 \pm 3,06$; ungereinigt: $-5,5 \pm 3,43$; $p < 0,01$). Die Einzelwerte sind in Tabelle 3, die Mittelwerte in Abbildung 5 gegenübergestellt.

Es fand sich ferner eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Messreihen (Abb. 6).

Tabelle 3: Vergleich der Deltawerte einer Stichprobe zwischen ungereinigtem Albumin und gereinigtem Albumin früh postoperativer Patienten. Die Proben wurden aufwendig, wie unter 3.7.2 a beschrieben (gereinigt), und dieselben Proben einfach mittels Trichloressigsäurefällung mit anschließendem Extrahieren mit Ethanol (ungereinigt) aufgearbeitet.

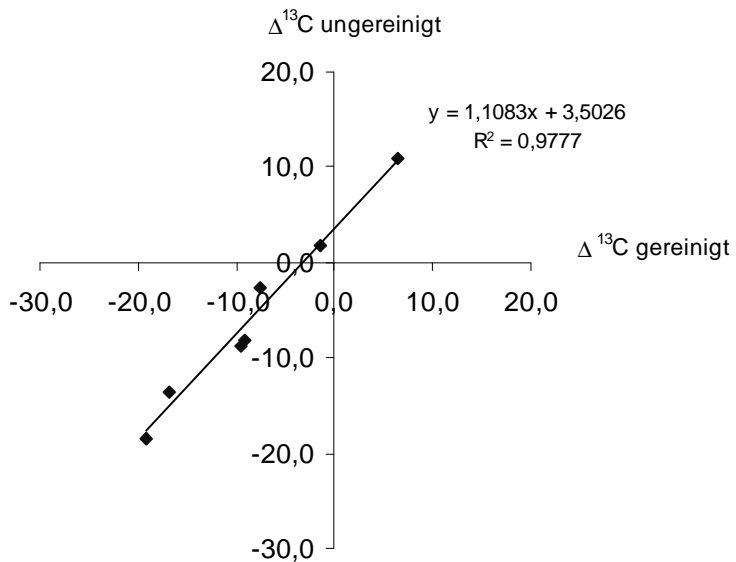
gereinigtes Albumin	ungereinigtes Albumin	Differenz
6,4	10,8	4,4
-9,6	-8,7	0,9
-19,2	-18,4	0,8
-16,8	-13,5	3,3
-9,1	-8,2	0,9
-7,6	-2,7	4,9
-1,4	1,9	3,3

Abbildung 5: Darstellung der Deltawerte des Leucins in gereinigtem und ungereinigtem Albumin



*) $p < 0,05$ versus gereinigtes Albumin

Abbildung 6: Darstellung einer Regressionsgerade der Deltawerte aus gereinigten Proben im Vergleich zu den ungereinigten Proben



$p < 0,00005$

Die gleichen Ergebnisse (Abb.8) fanden sich, wenn aus den Deltawerten die Tracer/Tracee-Verhältnisse nach den Formeln <1> bis <3> in 3.8 berechnet wurden:

gereinigt: $0,0020 \pm 0,0003$;

ungereinigt: $0,0023 \pm 0,0004$; ($p < 0,01$).

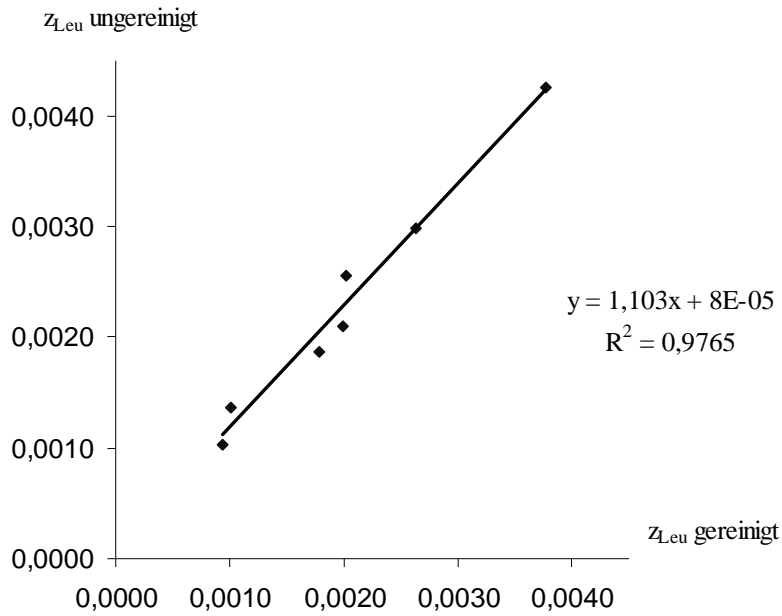
Die Einzelwerte sind in Tabelle 4 gegenüber gestellt. Es fand sich ferner auch hier eine signifikante Korrelation zwischen beiden Messreihen (Abb. 7).

Tabelle 4: Vergleich der Tracer/Tracee-Verhältnisse gereinigter Albuminproben mit ungereinigten Proben.

Es wurden sechs Proben von früh postoperativen Patienten untersucht. Jede Probe wurde zweimal gemessen. Einmal nach einfacher Reinigung mittels TCA-Fällung mit anschließender Ethanolextraktion und einmal mit einer zusätzlichen präparativen Elektrophorese.

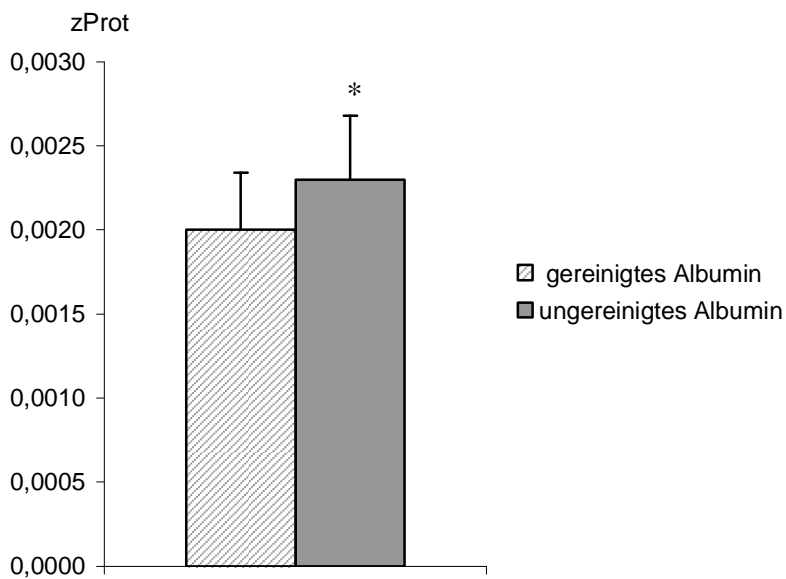
gereinigtes Albumin	ungereinigtes Albumin
0,0038	0,0043
0,0020	0,0021
0,0009	0,0010
0,0010	0,0014
0,0018	0,0019
0,0020	0,0026
0,0026	0,0030

Abbildung 7: Darstellung einer Regressionsgerade der Tracer/Tracee-Verhältnisse aus gereinigten Proben im Vergleich zu ungereinigten Proben



p = 0,000013

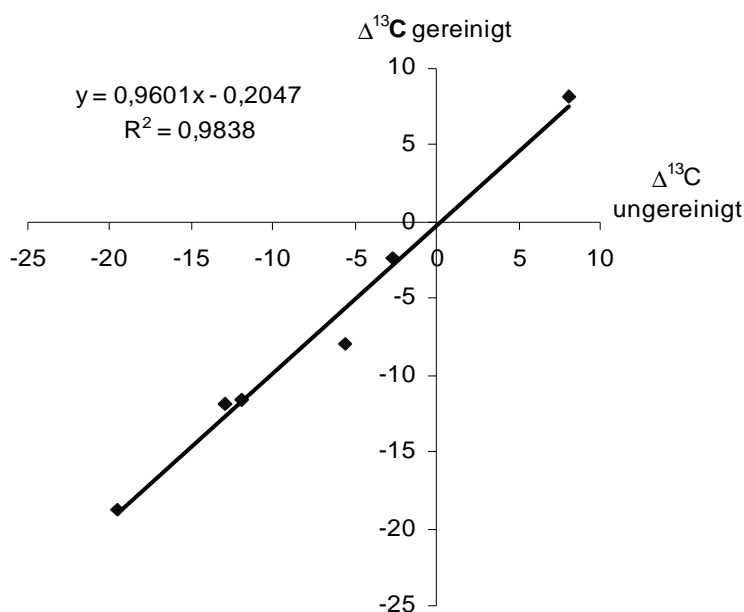
Abbildung 8: Darstellung der Tracer/Tracee-Verhältnisse des Leucins in gereinigtem und ungereinigtem Albumin



*) p < 0,05 versus gereinigtes Albumin

Die mittlere Abweichung zwischen beiden Messwerten betrug für das Tracer/Tracee-Verhältnis 0,0003 (= 15% der durchschnittlichen Tracer/Tracee-Verhältnisse der gereinigten Proben), wobei die Anreicherung bei den ungereinigten Proben immer über denen der gereinigten Proben lagen. Somit muss die Anreicherung von Apolipoprotein A-1 über der des Albumins liegen. Interessant ist nun, dass dieser Effekt nur bei operierten Erwachsenen zu beobachten ist. Bei Gesunden scheint er keine Rolle zu spielen, wie die Ergebnisse im Vergleichskollektiv zeigen. Die Deltawerte für die gereinigten Proben waren -12,99; -19,6; -2,34; -11,94; 8,08; -5,58 und für die entsprechenden ungereinigten Proben -11,86; -18,7; -2,34; -11,63; 8,24; -7,92 entsprechend den Mittelwerten von $-7,46 \pm 3,60$ bzw. $-7,37 \pm 3,48$ ($p=0,86$). Auch diese Werte wurden gegeneinander aufgetragen und es wurde eine Regressionsgerade erstellt (Abb. 9).

Abbildung 9: Die Deltawerte einer Stichprobe von sechs gereinigten im Vergleich zu den entsprechenden ungereinigten Proben gesunder Probanden



$P < 0,00005$

Die Steigung der Regressionsgerade von fast 1 in den unterschiedlich gereinigten Proben, der Achsenabschnitt von -0,2047 und die Regression von 0,9838 deuten darauf hin, dass die Werte vergleichbar sind. Dieser Befund ist in sofern bemerkenswert, da, wie unter 3.5.3 beschrieben, sich Apolipoprotein A-1 ja auch in ungereinigten Proben von gesunden Individuen nachweisen lässt. Die zugehörigen Syntheseraten scheinen jedoch unter diesen

Umständen im Bereich der Albuminsyntheserate zu liegen, da ansonsten die Anreicherungen gereinigter Proben nicht denen der ungereinigten entsprächen.

4.2 Anreicherungen im Präkursorpool (Ketoisocaprönsäure-Anreicherung)

4.2.1 Isotopomerenverhältnisse (M+1/M)

4.2.1.1 Isotopomerenverhältnisse im Präkursorpool der früh postoperativen Patienten

a) Werte der Patienten (n=5), die über einen Zeitraum von zehn Stunden gemessen wurden.

In der Gruppe der früh postoperativen Patienten betragen die Isotopomerenverhältnisse nach drei, sechs und zehn Stunden Tracer-Infusion $0,2638 \pm 0,0028$; $0,2685 \pm 0,0014$ und $0,2726 \pm 0,0025$. Es ist ein leichter Anstieg der Anreicherungen zu beobachten. Deshalb führten wir gepaarte t-Tests durch. Die Anstiege waren von Stunde drei zu Stunde sechs mit einem p-Wert von 0,08 und von Stunde sechs zu Stunde zehn mit einem p-Wert von 0,13 nicht signifikant. Insgesamt war jedoch der Anstieg in der Anreicherung von Stunde 3 zu Stunde zehn mit einem p-Wert von 0,01 signifikant. Da der Anstieg allerdings nur 3,34% des Ausgangswertes ausmachte und sich die Werte zwischen benachbarten Messpunkten nicht signifikant voneinander unterschieden, nahmen wir für die Berechnung der fraktionellen Syntheserate des Albumins ein Steady State an.

b) Werte aller Patienten (n=6), die über sechs Stunden gemessen wurden

In der Gruppe der früh postoperativen Patienten betragen die Isotopomerenverhältnisse nach drei und sechs Stunden Tracer-Infusion $0,2664 \pm 0,0034$ und $0,2667 \pm 0,0008$. Der Anstieg der Isotopomerenverhältnisse zwischen drei und sechs Stunden war unter Einbeziehung des Patienten, der nur über sechs Stunden untersucht wurde, signifikant ($p < 0,05$).

4.2.1.2 Isotopomerenverhältnisse im Präkursorpool der spät postoperativen Patienten

a) Werte der Patienten (n=5), die über einen Zeitraum von zehn Stunden gemessen wurden.

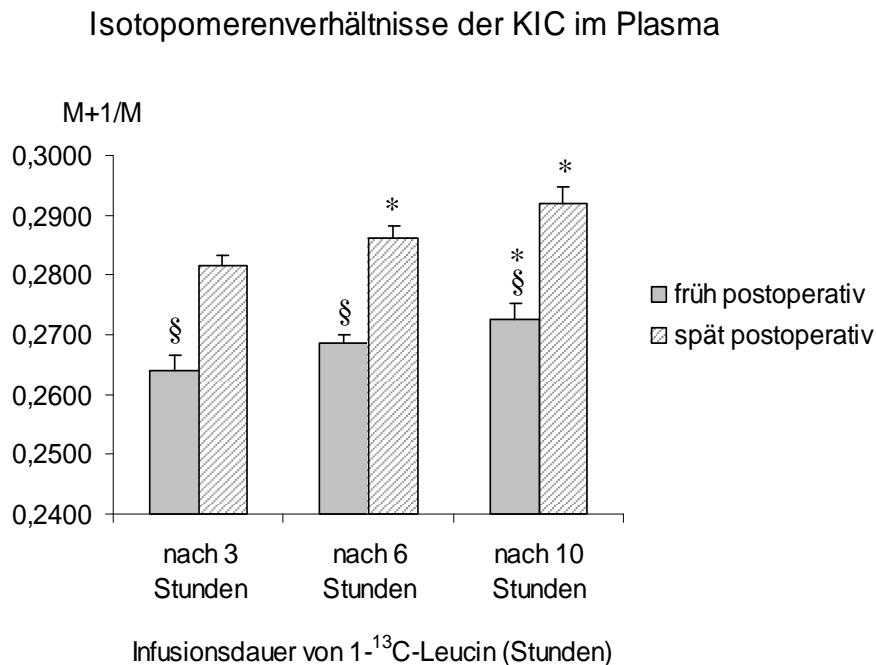
In der Gruppe der spät postoperativen Patienten betragen die Isotopomerenverhältnisse nach drei, sechs und zehn Stunden Tracer-Infusion $0,2815 \pm 0,0019$; $0,2862 \pm 0,0019$ und $0,2918 \pm 0,0030$. Es ist ein Anstieg der Anreicherungen zu beobachten. Wieder wurden gepaarte t-Tests durchgeführt. Die p-Werte betragen drei Stunden versus sechs Stunden 0,03, sechs Stunden versus zehn Stunden 0,07 und drei Stunden versus zehn Stunden 0,01. Damit sind die Anstiege der Tracer/Tracee-Verhältnisse von drei bis sechs und von drei bis zehn Stunden signifikant. Der Anstieg von sechs bis zehn Stunden ist nicht signifikant. Bei einem

Anstieg von insgesamt nur 3,66% des Ausgangswertes gingen wir auch in dieser Gruppe für die Berechnung der fraktionellen Syntheseraten von einem Steady State aus.

b) Werte aller Patienten (n=6), die über sechs Stunden gemessen wurden

In der Gruppe der spät postoperativen Patienten betragen die Isotopomerenverhältnisse nach drei und sechs Stunden Tracer-Infusion $0,2817 \pm 0,0016$ und $0,2858 \pm 0,0017$. Der Anstieg der Isotopomerenverhältnisse zwischen drei und sechs Stunden ist mit $p < 0,05$ signifikant.

Abbildung 10: Isotopomerenverhältnisse der Ketoisocapronsäuren (KIC) der Patienten (je n=5), die über einen Zeitraum von zehn Stunden untersucht wurden. Die Isotopomerenverhältnisse haben keine Einheit.



§) $p < 0,05$ versus spät post OP

*) $P < 0,05$ versus drei Stunden

4.2.2 Tracer/Tracee-Verhältnisse

Nach dem Subtrahieren des Pre-Wertes ergaben sich die Tracer/Tracee-Verhältnisse (Z_{KIC}), die zur Berechnung der fraktionellen Albuminsyntheserate benutzt wurden.

4.2.2.1 Tracer/Tracee-Verhältnisse der früh postoperativen Patienten

a) Werte der Patienten (n=5), die über einen Zeitraum von zehn Stunden gemessen wurden

In der Gruppe der früh postoperativen Patienten betragen die Tracer/Tracee-Verhältnisse nach drei, sechs und zehn Stunden Tracer-Infusion $0,0477 \pm 0,0025$, $0,0525 \pm 0,0010$ und $0,0565 \pm 0,0023$.

b) Werte aller früh postoperativen Patienten, die über einen Zeitraum von sechs Stunden untersucht wurden (n=6)

In der Gruppe der früh postoperativen Patienten betragen die Tracer/Tracee-Verhältnisse nach drei und sechs Stunden Tracer-Infusion $0,0505 \pm 0,0033$ und $0,0551 \pm 0,0025$.

4.2.2.2 Tracer/Tracee-Verhältnisse der spät postoperativen Patienten

a) Werte der Patienten (n=5), die über einen Zeitraum von zehn Stunden gemessen wurden

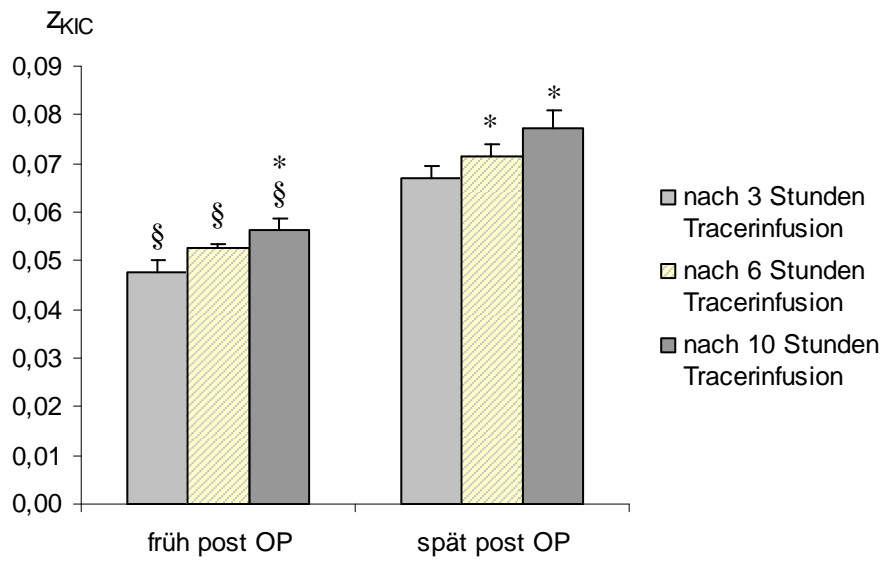
In der Gruppe der spät postoperativen Patienten betragen die Tracer/Tracee-Verhältnisse nach drei, sechs und zehn Stunden $0,0670 \pm 0,0025$, $0,0717 \pm 0,0021$ und $0,0773 \pm 0,0035$.

b) Werte aller spät postoperativen Patienten (n=6), die über einen Zeitraum von sechs Stunden untersucht wurden

In der Gruppe der spät postoperativen Patienten betragen die Tracer/Tracee-Verhältnisse nach drei und sechs Stunden $0,0671 \pm 0,0020$ und $0,0711 \pm 0,0018$.

Die Ergebnisse der t-Tests ergaben bei den Tracer/Tracee-Verhältnissen die gleichen p-Werte wie die unter 4.2.1.1/4.2.1.2 beschriebenen t-Tests für die entsprechenden Isotopomerenverhältnisse.

Abbildung 11: Tracer/Tracee-Verhältnisse der Ketoisocaproensäuren im Plasma. Es sind die Werte für die über zehn Stunden untersuchten Patienten (je n=5) dargestellt.



*) $p < 0,05$ versus drei Stunden

§) $p < 0,05$ versus spät post OP

4.3 Albumin-Anreicherung

Nach Umrechnung der Deltawerte, wie unter Berechnung (3.8) beschrieben, ergaben sich die Tracer/Tracee-Verhältnisse für das albumingebundene Leucin (z_{Prot}).

4.3.1 Anreicherung des albumingebundenen Leucins der früh postoperativen Patienten

a) Werte der früh postoperativen Patienten ($n=5$), die über einen Zeitraum von zehn Stunden untersucht wurden

In der Gruppe der früh postoperativen Patienten betragen die Tracer/Tracee-Verhältnisse (z_{Prot}) für das albumingebundene Leucin nach drei, sechs und zehn Stunden $0,725 \cdot 10^{-3} \pm 0,097 \cdot 10^{-3}$, $1,498 \cdot 10^{-3} \pm 0,221 \cdot 10^{-3}$ und $2,561 \cdot 10^{-3} \pm 0,204 \cdot 10^{-3}$.

b) Werte aller früh postoperativen Patienten ($n=6$), die über einen Zeitraum von sechs Stunden untersucht wurden

In der Gruppe der früh postoperativen Patienten betragen die Tracer/Tracee-Verhältnisse (z_{Prot}) für das albumingebundene Leucin nach drei und sechs Stunden $0,694 \cdot 10^{-3} \pm 0,085 \cdot 10^{-3}$ und $1,513 \cdot 10^{-3} \pm 0,185 \cdot 10^{-3}$.

4.3.2 Anreicherung des albumingebundenen Leucins der spät postoperativen Patienten

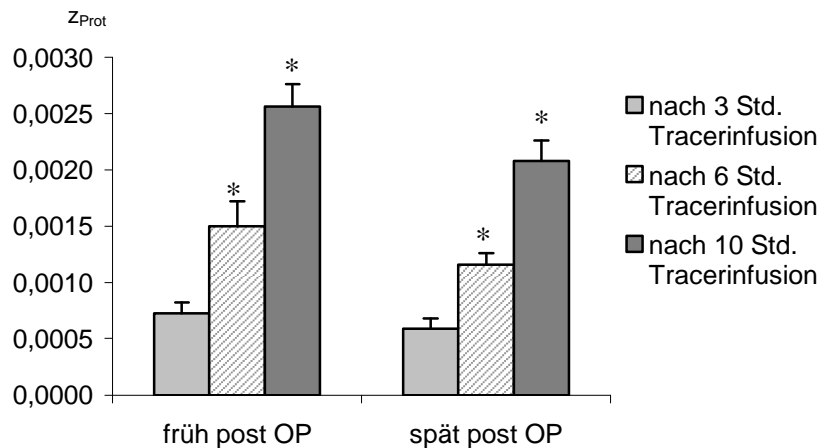
a) Werte der spät postoperativen Patienten ($n=5$), die über einen Zeitraum von zehn Stunden gemessen wurden

In der Gruppe der spät postoperativen Patienten betragen die Anreicherungen des albumingebundenen Leucins (z_{Prot}) nach drei, sechs und zehn Stunden $0,588 \cdot 10^{-3} \pm 0,091 \cdot 10^{-3}$, $1,157 \cdot 10^{-3} \pm 0,101 \cdot 10^{-3}$ und $2,079 \cdot 10^{-3} \pm 0,182 \cdot 10^{-3}$.

b) Werte aller spät postoperativen Patienten ($n=6$), die über einen Zeitraum von sechs Stunden untersucht wurden

In der Gruppe der spät postoperativen Patienten betragen die Anreicherungen des albumingebundenen Leucins nach drei und sechs Stunden $0,619 \times 10^{-3} \pm 0,081 \times 10^{-3}$ und $1,257 \times 10^{-3} \pm 0,124 \times 10^{-3}$.

Abbildung 12: Tracer/Tracee-Verhältnisse des albumingebundenen Leucins bei den Patienten, die über einen Zeitraum von zehn Stunden untersucht wurden.



*) $p < 0,05$ versus nach drei Stunden Infusionsdauer

4.4 Fraktionelle Albuminsyntheseraten

Anhand der zuvor gewonnenen Daten für die Tracer/Tracee-Verhältnisse im Präkursorpool (Z_{KIC}) und im albumingebundenen Leucin (Z_{Prot}) konnten wir mit den unter 3.8 beschriebenen Formeln die fraktionellen Proteinsyntheseraten des Albumins für die Phase I, Zeitraum zwischen 180 und 360 Minuten nach Beginn der Isotopeninfusion, und Phase II, Zeitraum zwischen 360 und 600 Minuten nach Infusionsbeginn, bestimmen.

4.4.1 Fraktionelle Albuminsyntheseraten der früh postoperativen Patienten

a) Werte der Patienten ($n=5$), die über einen Zeitraum von zehn Stunden untersucht wurden.

Die fraktionelle Syntheserate betrug für die früh postoperativen Patienten $12,7 \pm 1,4\%$ /Tag in der Phase I und $11,8 \pm 1,0\%$ /Tag in Phase II. Der Unterschied in den fraktionellen Syntheseraten zwischen Phase I und II ist nicht signifikant.

b) Werte alle Patienten ($n=6$), die über einen Zeitraum von sechs Stunden untersucht wurden

Unter Einschluss des einen Patienten, dem nur über sechs Stunden Tracer infundiert wurde, betrug die fraktionelle Syntheserate der Phase I $12,7 \pm 1,2\%$ /Tag.

4.4.2 Fraktionelle Albuminsyntheseraten der spät postoperativen Patienten

a) Werte der Patienten (n=5), die über einen Zeitraum von zehn Stunden untersucht wurden

Für die spät postoperativen Patienten belief sich die Albuminsyntheserate (%/Tag) in der Phase I auf $6,7 \pm 0,45$ und in der Phase II auf $7,5 \pm 0,62$.

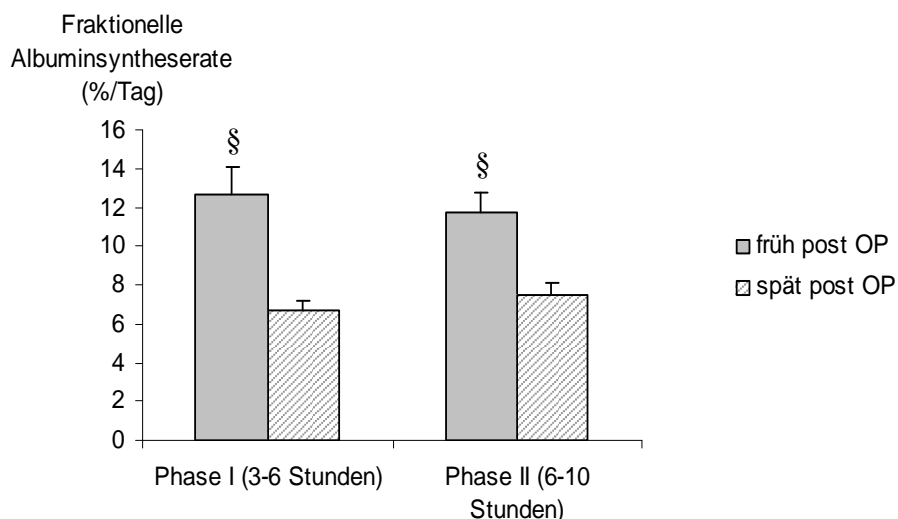
b) Werte aller Patienten (n=6), die über einen Zeitraum von sechs Stunden untersucht wurden

Unter Einschluss des sechsten Patienten, der nur sechs Stunden Tracer infundiert bekam, war die fraktionelle Syntheserate in der Phase I $7,6 \pm 0,9\%$ /Tag.

Auch in dieser Patientengruppe ist der Unterschied zwischen den Phasen I und II nicht signifikant.

Die fraktionelle Syntheserate der früh postoperativen Patienten ist im Vergleich zu den spät postoperativen Patienten signifikant erhöht, sowohl in der Phase I mit einem p-Wert von 0,015, als auch in der Phase II mit einem p-Wert von 0,016 für die jeweils fünf über zehn Stunden untersuchten Patienten. Dies galt ebenfalls, wenn jeweils der sechste Patient, der nur über sechs Stunden untersucht wurde, in den Vergleich der Phase I mit einbezogen wurde ($p < 0,01$).

Abbildung 13: Fraktionelle Albumin-Syntheseraten (FSR) der über zehn Stunden untersuchten Patienten

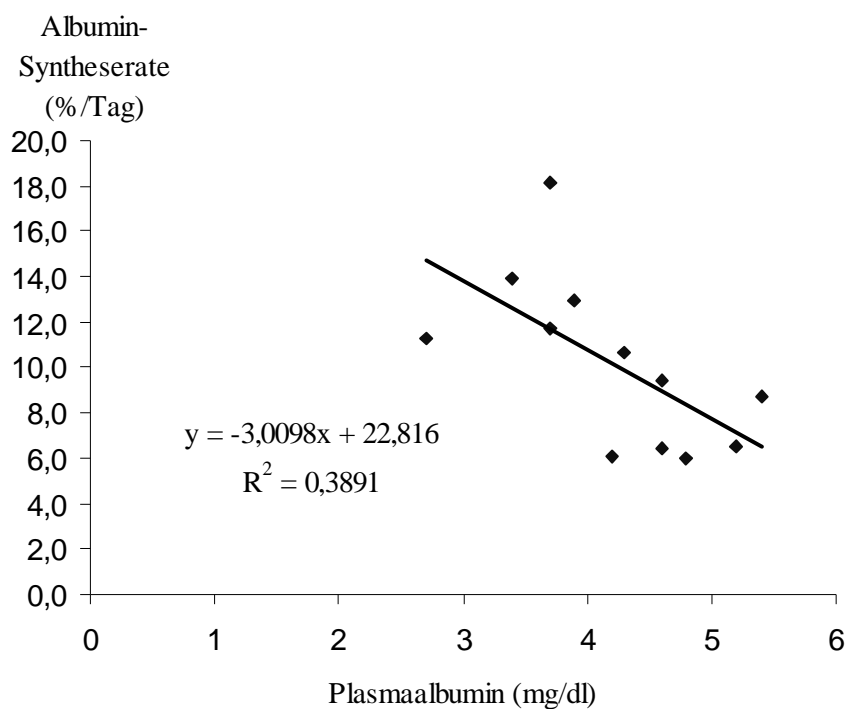


§) $p < 0,05$ versus spät post OP

4.5 Plasmaalbumin - Konzentration

Die Werte für das Plasmaalbumin betragen nach über Nacht fasten in der früh postoperativen Gruppe (n=6) $3,77 \pm 0,25$ mg/dl und in der spätpostoperativen Gruppe $4,65 \pm 0,24$ mg/dl. Der Unterschied der Albuminkonzentration im Plasma ist signifikant, $p < 0,05$. Unter Miteinbeziehung aller untersuchten Patienten fand sich eine indirekte Korrelation zwischen der Albuminkonzentration und der fraktioneller Albuminsyntheserate (ausgewertet wurden die Syntheseraten der Phase I aller 12 Patienten).

Abbildung 14: Korrelation zwischen der Albuminkonzentration im Plasma und der fraktionellen Albuminsyntheserate. Es sind die Werte aller zwölf untersuchten Patienten dargestellt.



$p < 0,05$

4.6 Gesamtkörperproteinabbau

Zur Beurteilung der Eiweißkatabolie bestimmten wir die Leucin-Erscheinungsrate des Körpers (R_a , Rate of Appearance), die, wie in 3.9 bereits beschrieben wurde, aus den Isotopmerenverhältnissen der Ketoisocaprinsäure mit Hilfe einer Eichgerade berechnet werden kann.

4.6.1 Leucin-Erscheinungsrate (R_a -Leucin) früh postoperativer Patienten

- a) Die R_a -Leucin betrug für die früh postoperativen Patienten ($n=5$), die über einen Zeitraum von zehn Stunden untersucht wurden, durchschnittlich für die Zeitpunkte drei, sechs und zehn Stunden nach Infusionsbeginn $3,42 \pm 0,02$; $3,04 \pm 0,09$ und $2,83 \pm 0,12 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{Min.}^{-1}$.
- b) Wenn man den nur über sechs Stunden untersuchten Patienten mit einbezieht ($n=6$), betragen die Leucin-Erscheinungsraten $3,25 \pm 0,23$ und $2,92 \pm 0,13 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{Min.}^{-1}$ nach drei und sechs Stunden. Der Abfall über die Zeit zwischen drei und zehn Stunden war signifikant ($p=0,03$).

4.6.2 Leucin-Erscheinungsrate spät postoperativer Patienten

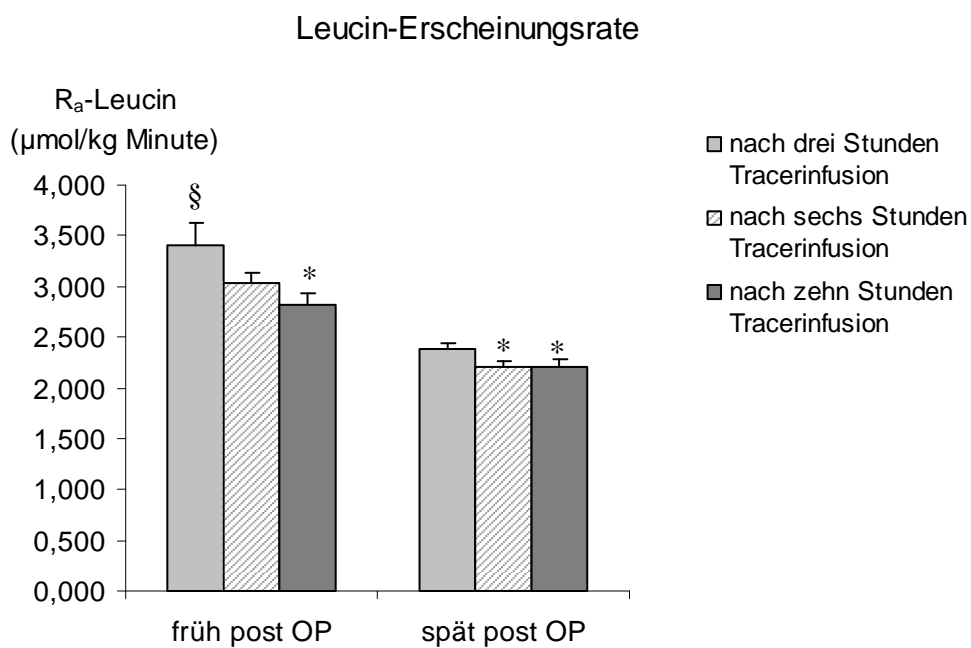
- a) Für die spät postoperativen Patienten waren die R_a -Leucin $2,38 \pm 0,07$; $2,20 \pm 0,06$ und $2,04 \pm 0,09 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{Min.}^{-1}$ ($n=5$) für die Zeitpunkte drei, sechs und zehn Stunden nach Infusionsbeginn.
- b) Unter Einbeziehung des nur über sechs Stunden untersuchten Patienten ergaben sich R_a -Leucin von $2,37 \pm 0,06$ und $2,22 \pm 0,05 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{Min.}^{-1}$ ($n=6$) nach drei und sechs Stunden. Der Abfall über die Zeit war zwischen drei und sechs Stunden ($p=0,03$) und zwischen drei und zehn Stunden ($p=0,01$) signifikant.

Bei den Patienten, die über 10 Stunden Tracer erhielten, beobachteten wir eine signifikante Abnahme der R_a -Leucin ($p < 0,05$). Der Abfall von R_a -Leucin ist auf den kontinuierlichen Anstieg von z_{KIC} über den Untersuchungszeitraum zurückzuführen (vergleiche Abb.15). Dabei handelt es sich jedoch um keine echte Veränderung im Eiweißstoffwechsel, sondern um ein der Methodik inhärentes Phänomen (Tracer recycling), das nach sechs Stunden Infusionsdauer zu falsch niedrigen Werten für R_a -Leucin führt (51). Somit können zur

Abschätzung der tatsächlichen Eiweißabbaurate nur die Werte nach drei Stunden Tracer-Infusion herangezogen werden.

Für den Zeitpunkt drei Stunden nach Infusionsbeginn führten wir einen t-Test durch, der mit einem p-Wert von 0,009 für n=5 und 0,016 für n=6 zeigte, dass die Eiweißkatabolie bei den früh postoperativen Patienten signifikant über der der spät postoperativen Patienten lag.

Abbildung 15: Leucin-Erscheinungsraten (R_a -Leucin, Indikator für die Proteinabbaurate) der fünf früh postoperativen Patienten und der fünf spät postoperativen Patienten, die über eine Dauer von zehn Stunden untersucht wurden.

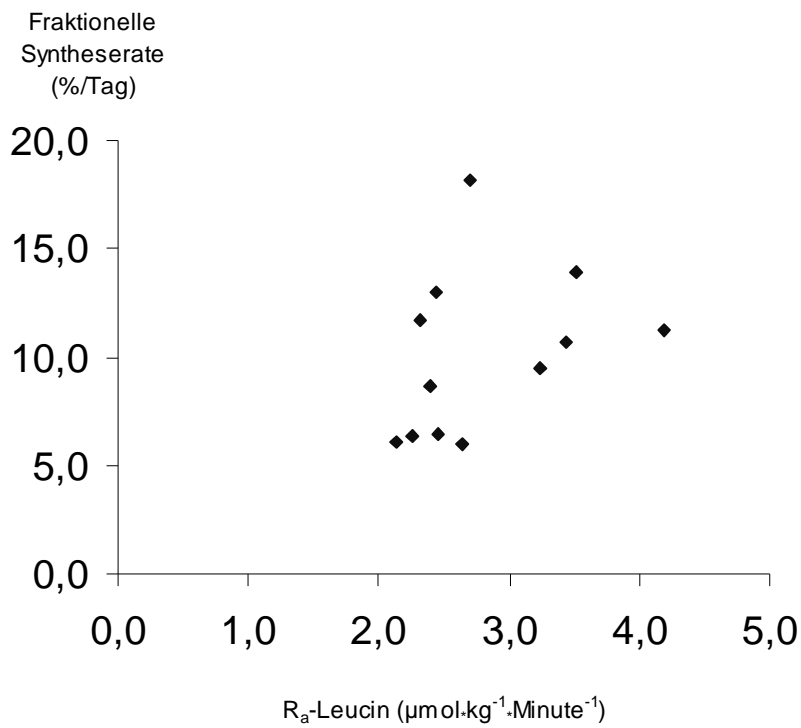


§) $p < 0,05$ versus spät post OP

*) $p < 0,05$ versus drei Stunden

Die Leucin-Erscheinungsrate korrelierte bei einem $p=0,14$ nicht mit der fraktionellen Albuminsyntheserate (Werte aus Phase I aller 12 Patienten).

Abbildung 16: Beziehung zwischen der fraktionellen Albuminsyntheserate und der Leucin-Erscheinungsrate



$p = 0,14$

5. Diskussion

5.1 Bedeutungen von Albumin

Albumin ist das Eiweiß mit der höchsten Konzentration im Blut und der quantitativ höchsten Syntheserate. Albumin ist wegen seiner unterschiedlichen Funktionen sehr wichtig für den menschlichen Organismus, so dass zu wenig Albumin die Prognose des Patienten signifikant verschlechtert (52;53).

Eine Hauptfunktion von Albumin ist die Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks im Blut (13;14). Albumin hat ein Molekulargewicht von 66,5 kDa. Es ist damit ein relativ kleines Eiweiß, wobei neben seiner Molekülmenge der osmotische Druck auch noch dadurch verstärkt wird, dass mittels der negativen Ladung des Moleküls Kationen gebunden werden. Es sind ca. 80% des onkotischen Druckes auf Albumin zurückzuführen. Da Albumin nicht nur im Serum, sondern auch in fast allen anderen Geweben des Körpers vorkommt, die Gefäßwände permeieren kann und jedesmal Wasser bindet, ist es auch für die Flüssigkeitsverteilung im Körper wichtig. Im Serum ist zusätzlich die Funktion als Transportmittel von Bedeutung (13;14). Albumin ist klein, gut wasserlöslich und enthält lipophile Bereiche, die es für den Transport von kleinen, hydrophoben Molekülen, wie Bilirubin, langkettigen Fettsäuren oder Eikosanoiden besonders geeignet machen. Die verschiedenen sauren und basischen Aminosäurereste machen Albumin zu einem Puffer, der zwar im Blut nicht so bedeutend ist wie das Bicarbonat, aber dennoch zum Erhalt des im Blut so wichtigen Säure-Base-Gleichgewichts beiträgt (17). Albumin kann auch als Depot dienen, indem die mit der Nahrung aufgenommenen überschüssigen Aminosäuren in Albumin eingebaut werden und somit nicht einfach zur Energiegewinnung oxidiert werden (20). Die Sulfhydrylgruppe im Protein kann antioxidativ wirken. Albumin hat eine metabolische Funktion für eine kleine Gruppe von Stoffen, die durch die Bindung an Albumin inaktiviert werden. Es soll auch anticoagulative Effekte haben und an der microvascularen Integrität beteiligt sein (14).

Aufgrund dieser Eigenschaften sind perioperative Veränderungen des Albuminspiegels, wie sie seit vielen Jahren bekannt sind, hinsichtlich ihrer Pathophysiologie von hohem klinischem Interesse. Dabei sind die Ursachen für die postoperativ regelhaft zu beobachtende Hypoalbuminämie (19;23-27;54) bis heute unklar. Aufgrund der generalisierten Eiweißkatabolie im Postaggressionssyndrom wäre dabei als erstes an eine Einschränkung der Albuminsynthese zu denken. Die korrekte Untersuchung dieses Stoffwechselschritts am

Menschen ist jedoch methodisch aufwendig, so dass zunächst die verwendete Methodik diskutiert werden soll.

5.2 Methodische Betrachtungen

a) Gültigkeit der verwendeten kontinuierlichen Tracer-Infusions-Technik

Zur Messung der Syntheseraten individueller Proteine *in vivo* am Menschen existieren zwei miteinander konkurrierende Techniken, die „continuous infusion“ Technik und die „flooding dose“ Technik, bei denen die markierte Tracer-Aminosäure entweder kontinuierlich oder als einmaliger Bolus appliziert wird (55-57).

Methodisches Grundproblem bei der Messung von Syntheseraten *in vivo* ist die korrekte Bestimmung der Anreicherung im Präkursorpool, aus dem der Tracer stammt, der in das zu untersuchende Protein eingebaut wird. Idealerweise wäre dies die Anreicherung im Aminoacyl-t-RNA-Pool. Aufgrund der äußerst geringen Aminoacyl-t-RNA-Mengen ist es jedoch bis heute nicht möglich, derartige Anreicherungen *in vivo* im Menschen zu messen. Somit behilft man sich mit Annäherungslösungen, von denen eine die „flooding dose“ Technik ist. Die „flooding dose“ Technik wurde entwickelt, um die Problematik, die bei der exakten Bestimmung der Aminoacyl-t-RNA-Anreicherung auftritt, zu umgehen. Das Prinzip der „flooding dose“ Technik besteht darin, dass eine relativ hoch dosierte Bolusinfusion (mehrere Gramm) der verwendeten Tracer-Aminosäure durchgeführt wird. Die Überlegung dabei ist, dass die resultierende, plötzlich hohe Konzentration und Anreicherung der zugeführten Tracer-Aminosäure im Plasma zu einer schnellen Äquilibration der Anreicherung in allen intra- und extrazellulären Aminosäurenkompartimenten führt, einschließlich des Pools, aus dem die Aminoacyl-t-RNA für die Proteinsynthese in der Leber hervorgeht. Somit sollten über eine kurze Zeitspanne ähnliche Anreicherungen sowohl im Plasma-Aminosäuren-, wie auch im Aminoacyl-t-RNA-Pool bestehen. Auf diese Weise würde die technisch einfache Bestimmung der Aminosäuren-Anreicherung im Plasma einen genauen Indikator für die Anreicherung im Aminoacyl-t-RNA-Pool darstellen. Aus diesen Gründen besitzt die „flooding dose“ Technik eine gewisse Berechtigung, insbesondere bei der Untersuchung der muskulären Proteinsynthese. Bei der Untersuchung der Albuminsynthese bestehen jedoch gewichtige Argumente, die gegen einen Einsatz der „flooding dose“ Technik sprechen:

Ein letztlich in seiner Bedeutung nicht geklärter Nebeneffekt der „flooding dose“ Technik besteht darin, dass es nach Verabreichung der Bolusinfusion zu einer deutlichen Erhöhung der

Konzentration der Aminosäuren im Plasma und zu einer leichten, aber signifikanten Erhöhung der Insulinkonzentration im Plasma kommt. Ob diese systemischen Milieuveränderungen eine versuchsbedingte Steigerung der Proteinsynthese bewirken, ist für das Kompartiment Skelettmuskel umstritten (55;56). Untersuchungen zeigen, dass die Muskulatur und auch Albumin auf zusätzliche Milieuveränderungen durch die „flooding dose“ mit einer gesteigerten Proteinsyntheserate reagieren (58;59). Die Synthese des Albumins wird durch Insulin und Aminosäuren beeinflusst (20;44;60-62). Somit ist ein stimulierender Effekt der „flooding dose“ Technik auf die Albuminsynthese, der die wahren Syntheseraten verfälschen würde, wahrscheinlich.

Grundgedanke der „flooding dose“ Technik ist die kurzzeitige vollständige Äquilibration der Anreicherungen in allen Kompartimenten. Vergleichende, tierexperimentelle Messungen von Anreicherungen im intrazellulären Aminoacyl-t-RNA-Pool und Anreicherungen in anderen Pools oder Kompartimenten bei der Verwendung der „flooding dose“ Technik lassen diese vollständige Äquilibration zusätzlich fraglich erscheinen (44;62;63).

Aus genannten Gründen entschlossen wir uns zur Verwendung der „continuous infusion“ Technik bei der Untersuchung der Albuminsyntheserate.

b) Wahl des Kompartiments zur Bestimmung der Präkursorpoolanreicherung unter Verwendung der „continuous infusion“ Technik.

Bei der Bestimmung der fraktionellen Syntheserate von Proteinen mittels kontinuierlicher Tracer-Infusion ist es wichtig, die Anreicherung der Tracer-Aminosäure im Präkursorpool zu kennen. Der eigentliche Präkursorpool für die Synthese von Albumin sind die an Transfer-RNA (t-RNA) gebundenen Aminosäuren in den Leberzellen. Um Anreicherungen in diesem Pool direkt messen zu können, wird eine große Menge Lebergewebe benötigt. Für Studien am Menschen ist dieses Verfahren ungeeignet, somit versucht man Parameter zu bestimmen, die die Anreicherung der t-RNA in der Leber möglichst gut widerspiegeln. Gängige Methoden sind die Bestimmung der Tracer-Aminosäure-Anreicherung im Plasma (41), die Bestimmung der proteingebundenen Aminosäure-Anreicherung in VLDL-Apo B100 im Plasma (64-66) und die Bestimmung der Anreicherung der Ketoisocaproinsäure, des desaminierten Leucins, im Plasma (20;67-70). Lange galt die Bestimmung der Anreicherung im Plasma VLDL-Apo B100 als der zuverlässigste Indikator für die Präkursorpool-Anreicherung in der Leber (64). VLDL-Apo B100 ist ein Protein mit einer relativ hohen hepatischen Umsatzrate und man ging davon aus, dass in diesem Protein ein steady state innerhalb von wenigen Stunden erreicht wird und die Anreicherung die gleiche ist wie die im t-RNA-Pool der Leber.

Allerdings wurde nicht untersucht, ob VLDL-Apo B100 aus der Leber auch während der Tracer-Infusion sezerniert wurde, wobei dies VLDL-Apo B100 bereits vor Beginn der Infusion synthetisiert und in der Leber hätte gespeichert werden können. Eine derartige "Verdünnung" des während der Tracerinfusion neu synthetisierten VLDL-Apo B100 durch zuvor synthetisiertes, unmarkiertes VLDL-Apo B100 würde zu zu niedrigen Präkursorpool-Anreicherungen führen. Nachdem in einer ausführlichen Untersuchung an Schweinen alle Präkursorpool-Indikatoren mit der tatsächlichen Aminoacyl-t-RNA-Anreicherung verglichen wurden, gilt die Ketoisocapronsäure(KIC)-Anreicherung im Plasma derzeit als der zuverlässigste Indikator (44).

c) Messung der Eiweißabbaurate im gesamten Organismus

Für die Bestimmung der Eiweißabbaurate im gesamten Körper benutzten wir die Ketoisocapronsäure-Anreicherung im Plasma, da diese die intrazelluläre Anreicherung des Leucins besser widerspiegelt als die Leucinanreicherung im Plasma (45). Die zugrundeliegende Überlegung beruht darauf, dass der intrazelluläre Tracer (KIC) durch nicht markierten Tracer aus der Proteolyse verdünnt wird und somit die KIC-Anreicherung im Plasma ein reziprokes Maß für die Proteinabbaurate im gesamten Körper darstellt. Tracer werden jedoch in Proteine eingebaut. Problematisch dabei ist, dass Tracer durch Hydrolyse aus Proteinen bereits bei laufender Tracerinfusion wieder freigesetzt werden können, so dass es zu einem so genannten Tracer-Recycling kommt. Ein Recycling wurde nach 24 Stunden $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Leucin-Infusion gezeigt (45), deshalb sollte zur Bestimmung der Eiweißabbaurate eine nicht zu lange Infusionsdauer für den Tracer gewählt werden. Um dieses Problem zu umgehen, benutzten wir bei der Berechnung der Eiweißabbauraten nur die Anreicherungen der Ketoisocapronsäure nach drei Stunden Infusionsdauer. Für die Bestimmung der fraktionellen Albuminsyntheserate ist dieses Phänomen nicht relevant, da hier nur die tatsächlichen Präkursorpool-Anreicherungen beziehungsweise deren Indikatoren von Bedeutung sind, unabhängig davon, ob hier ein Recycling mit eingeht oder nicht. Daher konnten wir auch bei einer Infusionsdauer von zehn Stunden die Präkursorpool-anreicherungen des gleichen Zeitraums für diesen Zweck benutzen.

d) Albuminisolierung

Die ersten Methoden zur Albumintrennung wurden 1841 beschrieben (71), wobei Albumin und Globuline mit Hilfe von Ammoniumsulfat getrennt wurden. Später setzte sich die Albumintrennung nach Cohn durch, die eine sehr aufwendige Fraktionierung des Blutes darstellt. Es handelt sich dabei um mehrere Trennungen bei unterschiedlichem Alkoholgehalt, unterschiedlichem pH und unterschiedlichen Temperaturen zwischen -8°C und 0°C (72). Im Laufe der Jahre wurde die Methode immer wieder verbessert, aber auch heute weist das nach Cohn getrennte Albumin nur eine Reinheit von 96-98% auf (73). Deshalb wurde nach neuen Methoden gesucht, um noch reineres Albumin zu erhalten, nicht zuletzt, da es bei der Erhitzung von nicht hoch reinem Albumin auf 60°C zur unerwünschten Bildung von Aggregaten kommt. Die Chromatographie, für Proteintrennungen die fast performance liquid chromatography (FPLC), stellt eine alternative Möglichkeit dar. So kamen Ionenaustausch-Chromatographie, Affinitäts-Chromatographie und Größenausschluss-Chromatographie für die Trennung von Albumin zur Erstellung von Infusionslösungen zum Einsatz oder zur Isolierung der Verunreinigungen, die evtl. zu der Aggregatbildung beim Erhitzen führen (74-76). Eine Kombination verschiedener Chromatographien führte zu 99-100% reinem Albumin.

Diese für kommerzielle Zwecke wichtigen Verfahren wurden noch verbessert, indem eine Mischung aus Elektrophorese und Chromatographie eingesetzt wurde, die den Vorteil bietet, dass die Zeit für die Trennung auf 90 Minuten reduziert werden konnte (77).

Die Isolierung von Albumin für die Bestimmung der Isotopenanreicherung ist quantitativ nicht so anspruchsvoll. Es muss nicht in so großen Mengen isoliert werden und auch die Denaturierung ist nicht wichtig. Für präzise physiologische Untersuchungen ist jedoch eine größte mögliche Reinheit erforderlich.

Für diese Zwecke wird oft die Chromatographie angewendet (64;67;70;78-81). Auch die Ammoniumsulfatfällung kommt noch zur Anwendung (20;62;82-85). Zur Bestimmung des Albumins im Lebergewebe wurde auch die Trennung mittels Immunpräzipitation benutzt (86;87). Die einfachste und kostengünstigste Methode schien bisher allerdings die Fällung mit Trichloressigsäure und anschließendem Extrahieren mit Alkohol zu sein, die von zahlreichen Autoren in der Vergangenheit angewendet wurde (18;28;29;32-39;41;88-90).

Wir haben uns zunächst für diese Methode entschieden. In der Folge zeigte sich jedoch bei uns überraschender Weise, dass in der Elektrophorese zur Überprüfung der Reinheit bei diesem Verfahren nicht nur eine Bande vorlag, wie in mehreren Arbeiten beschrieben, sondern noch eine zweite Bande (vergleiche 3.5.1). Die Proteinsequenzierung identifizierte die Kontamination als Apolipoprotein A-1. Apolipoprotein A-1 wird als

Proapolipoprotein A-1 in der Leber und im Darm synthetisiert, ins Plasma abgegeben und in einem Zeitraum von 10 bis 24 Stunden durch proteolytische Spaltung in die reife Form, das Apolipoprotein A-1, umgewandelt. Apolipoprotein A-1 verbindet sich mit Lipiden, um das im Plasma vorkommende High Density Lipoprotein (HDL) zu bilden (91;92).

Somit stehen unsere Ergebnisse im Widerspruch zu Befunden anderer Autoren. In einer dieser Arbeiten (36) wurde nach Albuminisolation eine Elektrophorese ohne Verunreinigung abgebildet, allerdings wurden keine genaueren Angaben zur Durchführung der Elektrophorese gemacht. In einer anderen Arbeit (93), die ebenfalls die TCA-Fällung/Ethanolextraktions-Methode für die Isolierung des Albumins benutzte, wurde das Verfahren von Maguire für die Elektrophorese zum Nachweis der Reinheit der gewonnenen Albuminlösung benutzt, das für den Nachweis von Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 549000 Da bis 8800 Da geeignet ist und somit Verunreinigungen von ca. 25000 Da (entsprechend unserer Ergebnisse) hätte erkennen müssen (94). Nach Angabe der Autoren führt die TCA-Fällung/Ethanolextraktions-Methode zu reinem Albumin, die Elektrophorese zur Untersuchung der Reinheit wurde jedoch bildlich nicht dokumentiert. In den Arbeiten der anderen Autoren, die Elektrophoresen abbildeten (18;36), ist die Albuminbande ohne Verunreinigung schön dargestellt. Es ist jedoch fraglich, ob die aufgetragene Menge (aufgetragene Menge der Autoren: 1,4 µg; von uns aufgetragene Mindestmenge: 9µg) auch ausgereicht hat, um eventuelle Verunreinigungen darzustellen. Derartige Mengenvariationen könnten somit erklären, warum wir beim Reinheitsnachweis von Albumin nach TCA-Fällung/Ethanol-Extraktion eine Kontamination mit Apolipoprotein A-1 nachweisen konnten. In einer weiteren Arbeit (95) wurden mittels TCA-Fällung gereinigte Proben mit durch Chromatographie gereinigten Proben direkt verglichen, wobei ebenfalls keine Verunreinigung bei der Albuminisolierung gefunden werden konnte. Allerdings wurden hier Intensivpatienten untersucht, bei denen die Proteinzusammensetzung des Blutes stark verändert sein dürfte. Unsere Untersuchungen bestätigen diese Ergebnisse bei kritisch kranken Patienten (vergleiche 3.5.3 a) und weisen auf die Abwesenheit oder auf sehr geringe Konzentrationen von Apolipoprotein A-1 im Blut von Intensivpatienten hin. In kritisch Kranken wurden sehr niedrige Werte für Apolipoprotein A-1 beschrieben, die aus einem kombinierten Effekt aus einer beeinträchtigten hepatischen Lipoproteinsynthese, einer erhöhten Apolipoprotein A-1-Katabolie und einem Verlust in den interstitiellen Raum resultieren (96-98). Die Apolipoprotein A-1-Konzentrationen könnten also zu niedrig gewesen sein, um die Albuminextraktion mittels Ethanol nach TCA-Fällung signifikant zu stören. Unsere

Ergebnisse zeigen, dass dies jedoch nicht für elektiv operierte Patienten und für gesunde Individuen gilt.

Für die Bestimmung der Isotopenanreicherung ist es wichtig, das Albumin in hoch reiner Form zu isolieren, da Apolipoprotein A-1 eine deutlich höhere oder niedrigere Tracer-Inkorporation besitzen könnte und dadurch die fraktionelle Syntheserate des Albumins verfälschen würde. Durch verschiedene Methoden versuchten wir zunächst, Apolipoprotein A-1 aus der Albuminlösung zu entfernen. Da dies nicht gelang, entschlossen wir uns letztendlich für die zusätzliche Reinigung mittels präparativer Elektrophorese, die dann zu akzeptablen Ergebnissen führte. Es bleibt fraglich, ob eine Kontamination mit Apolipoprotein A-1 für Tracer-Studien zur Messung von Albuminsyntheseraten relevant ist. Unsere Untersuchungen weisen auf einen relevanten Effekt in der fraktionellen Albuminsyntheserate durch die Kontamination mit Apolipoprotein A-1 hin. Bei gesunden Personen scheint dieser Effekt weniger bedeutend zu sein. Für die von uns untersuchten gesunden Personen sind die mittels GC-IRMS gemessenen $\Delta^{13}\text{C}$ -Werte zu verschiedenen Zeitpunkten nach $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Leucin-Einnahme von der analytischen Methode unabhängig. Die entsprechenden $\Delta^{13}\text{C}$ -Werte der beiden Methoden waren vergleichbar. Auch die Korrelation war exzellent, wodurch noch einmal betont wird, dass die Anreicherungen im Albumin und im Apolipoprotein A-1 fast identisch sind. Diese Ergebnisse stimmen mit den veröffentlichten Normalwerten für die fraktionellen Syntheseraten für Albumin und Apolipoprotein A-1 überein, die in gesunden Probanden sehr ähnlich sind (68;99).

Die Untersuchungen des Plasmas postoperativer Patienten lieferten andere Ergebnisse. Hier variierten die $\Delta^{13}\text{C}$ -Werte je nachdem, welche Methode verwendet wurde. Die Durchschnittswerte des Verfahrens der TCA-Fällung mit anschließender Ethanolextraktion (ungereinigt) lagen signifikant über den entsprechenden Durchschnittswerten des Verfahrens mit einer zusätzlichen präparativen Elektrophorese (gereinigt). Ferner wurde eine hoch signifikante, lineare Korrelation zwischen den beiden Methoden gefunden. Die $\Delta^{13}\text{C}$ -Werte der ungereinigten Proben waren etwa 1,11-mal größer als die $\Delta^{13}\text{C}$ -Werte der gereinigten Proben. Dieses Verhältnis blieb auch nach Abzug der Hintergrundanreicherung und unter Berücksichtigung der Isotopenverdünnung durch die Derivatisierung zum NAP-Leucin in etwa gleich. Folglich variierten auch die Tracer/Tracee-Verhältnisse der verschiedenen analytischen Verfahren und waren in den ungereinigten Proben signifikant höher als in den gereinigten Proben. Dementsprechend, auch hoch signifikant, korrelierten die entsprechenden Tracer/Tracee-Verhältnisse, und die Tracer/Tracee-Verhältnisse der ungereinigten Proben

waren im Durchschnitt 1,1-mal höher als die der gereinigten Proben. Einzelwerte waren sogar bis zu 40% größer (s. Tabelle 4).

Hierdurch wird klar, dass die Anreicherung im Apolipoprotein A-1 bei postoperativen Patienten deutlich größer ist als die entsprechende Anreicherung im Albumin. Sehr wahrscheinlich spiegeln diese Unterschiede in der Anreicherung auch einen Unterschied in der Synthese oder dem Umsatz wider, das wiederum zeigt, dass die Apolipoprotein A-1-Synthese postoperativ schneller ist als die Albuminsynthese und damit auch schneller als die Apolipoprotein A-1-Synthese in gesunden Individuen. Diese Theorie stimmt mit der Physiologie und Pathophysiologie des Apolipoprotein A-1 überein. Nach Operationen kann eine geringe Abnahme der Apolipoprotein A-1-Konzentration aufgrund des perioperativen Flüssigkeits- und Blutverlustes beobachtet werden (100;101). Der Körper versucht dann, den Apolipoprotein A-1-Verlust durch einen signifikanten Anstieg der Apolipoprotein A-1-Synthese auszugleichen (102-104). Diese Reaktion könnte durch Cytokine, Steroide oder den kolloidosmotischen Druck vermittelt werden (102;105).

5.3 Zeitlicher Verlauf des Eiweiß-Abbaus postoperativ und im Vergleich zu Normalwerten

Die Leucinerscheinungsrate (=Indikator für die Eiweißabbaurate) R_a -Leucin der spät postoperativen Patienten von $2,37 \pm 0,06 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{Min.}^{-1}$ liegt im Vergleich zu den Werten anderer Arbeitsgruppen, die gesunde, altersentsprechende Probanden mit vergleichbarer Methodik (Übersicht in Tabelle 5) untersucht haben (45;68;69;82;106), im praktisch selben Bereich ($2,30$ - $2,36 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{Min.}^{-1}$). Dieser Befund deutet darauf hin, daß unsere spät postoperativen Patienten vier Monate nach der Operation in der Rekonvaleszenz wieder eine normale Eiweißabbaurate erreicht haben. Diese Patienten unterscheiden sich damit deutlich von Patienten nach schwerem chirurgischen Trauma (Verbrennung), die in der Rekonvaleszenz noch einen signifikant erhöhten Eiweißumsatz aufweisen (4;11).

Die Werte für die früh postoperativen Patienten liegen mit $3,25 \pm 0,23 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{Min.}^{-1}$ signifikant über den Werten der rekonvaleszenten Patienten von $2,37 \pm 0,06 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{Min.}^{-1}$ und somit auch über den Normalwerten aus der Literatur. Ähnlich hohe Werte fand Yu bei Patienten mit schweren Verbrennungen (107;108). Auch Harrison fand mit $2,7 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{Min.}^{-1}$ am siebten postoperativen Tag gegenüber $2,3 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{Min.}^{-1}$ vor der Operation eine signifikant erhöhte Leucinerscheinungsrate und damit eine erhöhte Eiweißkatabolie (109).

Tabelle 5: Leucin-Erscheinungsraten (R_a -Leucin) in der Literatur bei gesunden Probanden, berechnet auf der Basis des so genannten reziproken Poolmodells (Leucin als Tracer und KIC für die Berechnung von R_a -Leucin) und unter kontinuierlicher Infusion ähnlicher Tracermengen

Autor	Referenz	Jahr	R_a ($\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Min.}^{-1}$)
DeFeo, P. et al	(83)	1993	2,32
Harrison, R.A. et al	(109)	1989	2,30
Schwenk, W. et al	(45)	1985	2,30
Tessari, P. et al	(69)	2002	2,36
Volpi, E. et al	(68)	1996	2,32
Volpi, E. et al	(106)	1998	2,36

5.4 Albuminkonzentration und Albuminsyntheserate postoperativ im zeitlichen Verlauf und im Vergleich zu Normalwerten

Die normale Albuminkonzentration im Plasma beträgt 35-53 g/l (15;17). Für unsere früh postoperativen Patienten beträgt die durchschnittliche Albuminkonzentration $37,7\pm 2,8$ g/l. Die Werte liegen also im unteren Grenzbereich der Normalwerte, wobei zwei Patienten mit einer Albuminkonzentration von 34 bzw. 27 g/l unter dem Normalbereich liegen. Die erniedrigte Albuminkonzentration zeigt einen nach der Operation veränderten Eiweißstoffwechsel an, der bereits seit vielen Jahren bekannt ist (19;23-27).

Vier Monate nach der Operation hat keiner der rekonvaleszenten Patienten mehr eine erniedrigte Albuminkonzentration und die durchschnittliche Konzentration der spät postoperativen Gruppe liegt mit $46,5\pm 2,4$ g/l signifikant über der Albuminkonzentration unmittelbar postoperativ. Die Normalisierung der Albuminkonzentration entspricht dem Rückgang der Eiweißkatabolie.

Da die Bestimmung der Albuminkonzentration im Plasma die Mechanismen des postoperativ veränderten Eiweißstoffwechsels jedoch nicht aufzeigt, und die Bestimmung der Leucinumsatzraten nur einen allgemeinen Einblick in den Eiweißstoffwechsel des gesamten Körpers zulässt, sind in den letzten Jahren immer mehr die Umsatzraten einzelner Proteine untersucht worden. Die Einflüsse verschiedener Faktoren wirken sich auf die Synthese unterschiedlicher Proteine in der Leber teilweise sogar gegensätzlich aus.

Zentraler Befund unserer Untersuchungen ist, dass die fraktionelle Syntheserate des Albumins früh postoperativ ($12,7 \pm 1,4\%$ /Tag) im Vergleich zu den spät postoperativen Patienten ($6,7 \pm 0,5\%$ /Tag) signifikant fast auf das Doppelte erhöht war. Die Patienten, die in der Rekonvaleszenz untersucht wurden, haben wieder Normalwerte in der Albuminsynthese ($6,2-8,2\%$ /Tag) erreicht, wie aus einer Literaturanalyse hervorgeht, in der nur Arbeiten berücksichtigt wurden, die ebenfalls hochreines Albumin für die Auswertung berücksichtigten (Tabelle 6). Diese Ergebnisse zeigen, dass vier Monate nach großen abdominalchirurgischen Eingriffen wieder eine normale Stoffwechsellaage, auch bei der Albuminsynthese, erreicht wurde. Auch hier unterscheiden sich elektiv operierte Patienten von Verbrennungspatienten, die noch während der Rehabilitation zu einem vergleichbaren Zeitpunkt erhöhte Proteinsyntheseraten aufweisen (4;11).

Tabelle 6: Fraktionelle Albumin-Syntheserate (FSR) gesunder Probanden in der Literatur

Die Untersuchung wurde nach über Nacht fasten bei altersentsprechenden Probanden durchgeführt

Autor(en)	Jahr	Referenz	FSR Albumin (%/Tag)	Präkursor-pool	Technik
DeFeo, P. et al	1993	(83)	6,2	KIC	continuous isotope infusion Ammoniumsulfat
Fu, A. et al	1998	(110)	6,9	KIC	continuous isotope infusion Immunoaffinitäts-Chromatographie
Mansoor, O. et al	1997	(70)	7,3	KIC	continuous isotope infusion Chromatographie
Volpi, E. et al	1996	(68)	8,2	KIC	continuous isotope infusion Ammoniumsulfat
Volpi, E. et al	1998	(106)	7,9	KIC	continuous isotope infusion Ammoniumsulfat
Zanetti, M. et al	2001	(85)	7,6	KIC	continuous isotope infusion Ammoniumsulfat

5.5 Albuminkonzentration und Albuminsynthese im chirurgischen Stress – mögliche Regulationsmechanismen

Ein chirurgisches Trauma führt im Körper immer zu einer Stressreaktion, die auch den Stoffwechsel mit einbezieht. Die dabei veränderten Stresshormonkonzentrationen bewirken unter anderem eine Eiweißkatabolie, die zum Verlust von Muskeleiweiß führt (2). Ob dies auch die viszerale Organe betrifft, ist nicht gesichert. Allerdings kommt es relativ uniform zu einer mehr oder weniger deutlichen Abnahme der Albuminkonzentration. Die Mechanismen dieser Hypoalbuminämie sind bis heute nicht geklärt. Diskutiert werden sowohl Veränderungen in der Syntheserate (14), wie auch eine Zunahme des Verlusts in das Interstitium (24). Veränderungen der Albuminkatabolie scheinen keine Rolle zu spielen (25-27).

Die Bedeutung einer veränderten Albuminsyntheserate bei der Entstehung der Hypoalbuminämie ist jedoch umstritten.

Lange Zeit wurde als Grund für die Hypoalbuminämie, sowohl im Menschen als auch im Tier, eine Abnahme der Proteinsyntheserate angesehen (111). TNF α -, Terpentin- und Lipopolysaccharid-Injektionen in Tiere wurden mit einer rapiden Abnahme des Albumin-m-RNA-Gehalts in der Leber in Zusammenhang gebracht, woraus die Autoren folgerten, dass eine verminderte Albuminsynthese zur Hypoalbuminämie nach chirurgischem Stress beiträgt (82;112;113). Die Messung der Albuminsynthese in Tieren, in vivo oder ex vivo, führte zu widersprüchlichen Ergebnissen. Als Antwort auf eine starke Entzündungsreaktion wurde eine verminderte (86;114) oder erhöhte (115) Albuminsynthese gefunden. In den meisten Studien wurde über eine verminderte Albuminsynthese nach schweren Verletzungen berichtet, wobei die Studientiere jedoch mit gut ernährten Kontrolltieren verglichen wurden (86;114). Es ist allgemein bekannt, dass der Ernährungszustand einen wichtigen, regulierenden Einfluss auf die Albuminsynthese hat (20) und deshalb in diesen Studien der Effekt des Traumas nicht von dem Effekt der verminderten Nahrungsaufnahme unterschieden werden konnte.

Es liegen nur wenige Untersuchungen am Menschen vor. Den Stickstoffverlust nach Operationen führte O'Keefe auf eine allgemein verminderte Eiweißsyntheserate und nicht auf eine erhöhte Abbaurate zurück (116). Die meisten Arbeitsgruppen fanden nach Operationen einen erhöhten Eiweißabbau (89;109;117;118). Die Syntheseraten waren entweder unverändert (118), nur leicht erhöht (109) oder deutlich erhöht (89;117). Diese globalen Werte stellen jedoch Summeneffekte dar und sind keinesfalls repräsentativ für einzelne Organsysteme oder Proteine.

Bei kritisch kranken Patienten finden sich besonders ausgeprägte Abnahmen der Albuminkonzentration. Deshalb wurden hierbei schon früher mehrfach Untersuchungen zur gezielten Bestimmung der Albuminsyntheserate durchgeführt. Da bei diesen Patienten die Albuminsyntheseraten entweder normal (82) oder erhöht waren (70;84;95), wurden andere Ursachen wie der Verlust in den dritten Raum durch endotheliale Lecks dafür verantwortlich gemacht. Ein vergleichbarer Mechanismus findet sich auch bei gesunden Probanden nach Endotoxininjektion, wobei die Albuminsyntheserate hier ebenfalls signifikant ansteigt (90). Unsere Untersuchungen zeigen nun, dass sich bei elektiv operierten Patienten unmittelbar postoperativ sehr ähnliche Veränderungen beobachten lassen. Auch hier war die Albuminsynthese bei gleichzeitig erniedrigter Albuminkonzentration signifikant erhöht. Nach Abschluss der Rekonvaleszenz entsprachen diese Werte aber wieder den Normalwerten. Da

die fraktionelle Syntheserate des Albumins nicht verringert war, kann unmittelbar postoperativ dieser Mechanismus nicht die Ursache für die niedrige Albuminkonzentration sein. Als alternative Erklärung müssen somit andere Mechanismen diskutiert werden. Auch postoperativ könnte trotz eines nur elektiven, ferner komplikationslosen, abdominalchirurgischen Traumas ein kapillares Leck, insbesondere im traumatischen Gewebe, bestehen. In derartigen Wundexsudaten wurden deutlich erhöhte Albuminkonzentrationen gefunden (119). Ferner wären Albuminverluste durch den perioperativen Blutverlust denkbar, wobei der Konzentrationsabfall durch Verdünnung im Rahmen der perioperativen Infusionstherapie zustande käme. Postoperative Veränderungen des Albuminmetabolismus als weitere theoretische Erklärungsmöglichkeit wurden bisher nicht beschrieben (25-27).

Über die Mechanismen der postoperativ gesteigerten Albuminsyntheserate kann nur spekuliert werden. So ist das Postaggressionssyndrom durch eine Erhöhung der Konzentration von unter anderem Kortison, Glukagon und Adrenalin gekennzeichnet. Eine Verabreichung dieser Stresshormone führt bei gesunden Probanden zu einer erhöhten Albuminsynthese nach 18 Stunden (18). Den stärksten Einfluss hat dabei Kortison, wie in Tierversuchen gezeigt werden konnte. Es wurde sogar eine Sequenz auf dem Albumin-Gen identifiziert, das eine Glukokortikoid-abhängige Regulierung kodiert. (19;120). Allerdings sprechen die Ergebnisse unserer Langzeituntersuchungen gegen eine Rolle der Steroide. Die Kortisonausschüttung im Körper unterliegt einer zirkadianen Rhythmik. Zwischen 3:00 Uhr und 10:00 Uhr steigt die Kortisonkonzentration im Blut steil an und fällt im Laufe des weiteren Tages allmählich wieder ab (121). Trotz dieser wechselnden Kortisonkonzentrationen konnten wir keine tageszeitabhängigen Schwankungen in der Albuminsynthese feststellen. Die fraktionellen Syntheseraten in der Phase I (Vormittag) und der Phase II (Nachmittag) unterschieden sich nicht signifikant voneinander und zwar unabhängig vom zeitlichen Abstand zur Operation.

Auch die Eiweißzufuhr hat einen starken Einfluss auf die Albuminsynthese, wobei diese während der Nahrungsaufnahme steigt. Die Erhöhung der Albuminsynthese ist auf einen Anstieg der Insulinkonzentration und auf die vermehrte Verfügbarkeit von Aminosäuren zurückzuführen (29;61;68;83). Ein derartiger Mechanismus scheint jedoch postoperativ trotz eines vermehrten Aminosäureangebots aus der gesteigerten Proteolyse nicht von Bedeutung zu sein. Die fehlende Korrelation zwischen der fraktionellen Albuminsyntheserate und der Leucin-Erscheinungsrate spricht nicht für einen relevanten Zusammenhang zwischen der erhöhten Syntheserate und einem erhöhten hepatischen Aminosäureangebot (s. Abbildung 16).

Da die Albuminkonzentration jedoch signifikant indirekt mit der Albuminsynthese korreliert (Abb.14), (122), liegt die Vermutung nahe, dass die Albuminkonzentration selbst postoperativ einen Einfluss auf die fraktionelle Syntheserate des Albumins hat. Eine der wichtigsten Aufgaben des Albumins im Blut ist die Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks. Mit der Abnahme der Konzentration ist davon auszugehen, dass auch der onkotische Druck abnimmt. Dieser könnte einen direkten Einfluss auf die Regulation der Albuminsynthese haben, was dazu führt, dass der Körper durch eine erhöhte Albuminsynthese versucht, den Eiweißverlust auszugleichen. In älteren Tierversuchen wurde bereits gezeigt, dass eine Dextran-Infusion, und damit eine Erhöhung des onkotischen Drucks zu einer Hemmung der Albuminsynthese führt (123). Der Zusammenhang zwischen einer Analbuminämie, einem reduzierten onkotischen Druck und einer erhöhten Transkription der m-RNA für Albumin konnte auch später experimentell bestätigt werden (124;125). Es wird dabei vermutet, dass nicht der verminderte onkotische Druck direkt als physikalische Größe die Synthese des Albumins beeinflusst, sondern dass durch den niedrigeren osmotischen Druck ein Faktor freigesetzt wird, der die Albuminsyntheserate steigert (126).

Ein Albuminverlust, damit verbunden eine niedrige Albuminkonzentration und eine gesteigerte Albuminsyntheserate, wurde auch bei Patienten mit nephrotischem Syndrom gefunden (30;32;39;127). Bei einer leichten, nierenbedingten Proteinurie wurde eine indirekte Korrelation zwischen dem onkotischen Druck und der fraktionellen Albuminsyntheserate gezeigt (85). Diese Korrelation entspricht der bei unseren Patienten. Es deutet also vieles darauf hin, dass der mutmaßliche Verlust des Albumins nach Operationen in den extravasalen Raum zu ähnlichen Reaktionen führt, wie der Albuminverlust über den Urin bei chronischen Nierenerkrankungen. Der postoperativ niedrigere onkotische Druck könnte das Signal darstellen, auf das der Körper mit einer kompensatorischen Erhöhung der Albuminsyntheserate reagiert.

6. Zusammenfassung

Nach chirurgischer Homöostasestörung kommt es regelhaft zu Veränderungen im Körper, die die Organfunktionen, das Immunsystem und den Stoffwechsel betreffen. Unter anderem tritt eine deutliche Hypoalbuminämie auf, deren Ursache nicht genau geklärt ist. Inwieweit Veränderungen in der Albuminsynthese dazu beitragen, ist bisher nicht bekannt. Auch die zeitliche Dynamik entsprechender Stoffwechseleränderungen wurde bisher nicht untersucht.

In unseren Untersuchungen haben wir eine Methode auf der Basis stabil markierter Tracer etabliert, mit der eine Messung der fraktionellen Albuminsyntheserate in vivo am Menschen möglich ist und mit der wir schließlich den Einfluss eines abdominalchirurgischen Eingriffs auf die Albuminsyntheserate im zeitlichen Verlauf untersuchen konnten.

Wichtigster methodischer Schritt bei der massenspektrometrischen Analyse der Albuminsynthese ist die Albuminisolation in Reinform. Während des Aufbaus der Methodik zeigten wir, dass das häufig benutzte Verfahren der Fällung mit Triochloressigsäure und anschließender Alkoholextraktion zur Albuminisolierung aus Plasma für unsere Zwecke kein ausreichend reines Albumin liefert. Die dabei regelhaft auftretenden, bisher nicht beschriebenen, kontaminierenden Eiweißsubstanzen verfälschen die Albuminanreicherungen (im Mittel um 10%) signifikant. Mittels Proteinsequenzierung konnte Apolipoprotein A-1 als Ursache für die Verunreinigung identifiziert werden. Daraufhin wurde die Methode in mehreren Ansätzen modifiziert. Erst nach Einbau einer präparativen Elektrophorese in die Reinigungsschritte war die Gewinnung von ausreichend reinem Albumin möglich. Die weiteren Arbeitsschritte für die Stabile-Isotope-Technik, einschließlich Massenspektrometrie, waren bereits etabliert.

Die an der Studie teilnehmenden Patienten (in zwei Gruppen) hatten alle einen vergleichbaren, großen kolorektalen Eingriff hinter sich. Sechs Patienten wurden etwa acht Tage postoperativ untersucht (früh postoperative Gruppe), und weitere sechs Patienten etwa vier Monate postoperativ in der Rekonvaleszenz (spät postoperative Gruppe). Für die Bestimmung der fraktionellen Albuminsyntheserate mittels der Stabile-Isotope-Technik erhielten die nüchternen Patienten eine Bolusinjektion von $9,6 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ und anschließend eine 10-stündige Infusion von $0,16 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Min.}^{-1}$ $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Leucin. Vor der Infusion und drei, sechs und zehn Stunden nach dem Start der Infusion wurden Blutproben für die massenspektrometrische Analyse und die Konzentrationsmessungen entnommen. Die albumingebundene Tracer-Anreicherung wurde mit Hilfe der Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (GC-IRMS) und die Tracer-Anreicherung im

Präkursorpool für die Albuminsynthese (Ketoisocapronsäure-Anreicherung im Plasma) wurde mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GCMS) bestimmt. Aus diesen Messwerten konnten die fraktionelle Albuminsyntheserate im Tagesverlauf und die Leucin-Erscheinungsrate als Maß für die Eiweißkatabolie des Organismus berechnet werden.

Es ergab sich für die früh postoperative Gruppe in der Phase I (morgens, drei bis sechs Stunden nach Infusionsbeginn) eine fraktionelle Albuminsyntheserate von $12,7 \pm 1,4\%$ /Tag und in der Phase II (nachmittags, sechs bis zehn Stunden nach Infusionsbeginn) von $11,8 \pm 1,0\%$ /Tag. In der rekonvaleszenten Gruppe betragen die fraktionellen Albuminsyntheseraten nur noch $6,7 \pm 0,5$ und $7,5 \pm 0,6\%$ /Tag in den Phasen I und II und waren damit signifikant niedriger als die der früh postoperativen Gruppe. Sie entsprachen ferner den in der Literatur recherchierten Werten für Gesunde. Beide Patientengruppen zeigten somit auch keine tageszeitabhängigen Schwankungen der Albuminsynthese.

Auch die Leucin-Erscheinungsrate unterschied sich bei den beiden Patientenkollektiven signifikant voneinander, wobei die Werte der früh postoperativen Patienten mit $3,42 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Min.}^{-1}$ signifikant über den Werten der rekonvaleszenten Patienten mit einer Leucin-Erscheinungsrate von $2,38 \pm 0,07 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Min.}^{-1}$ lagen. Auch letztere Werte entsprachen Normalwerten.

Es wurde eine signifikante indirekte Korrelation zwischen der Albuminkonzentration und der fraktionellen Albuminsyntheserate gezeigt. Die globale Eiweißabbaurate (Leucin-Erscheinungsrate) korrelierte nicht mit der fraktionellen Albuminsyntheserate.

Somit lässt sich feststellen, dass sich der hepatische sowie globale Eiweißstoffwechsel – im Gegensatz zu schweren chirurgischen Traumata (Verbrennungen) – nach großen elektiven, abdominalchirurgischen Eingriffen in der Rekonvaleszenzphase bereits wieder normalisiert hat.

Die nach Operationen auftretende Hypoalbuminämie kann nicht durch eine verminderte Albuminsynthese, sondern wohl eher durch einen gesteigerten extravasalen Verlust erklärt werden. Dieser Albuminverlust scheint über eine niedrigere Albuminkonzentration direkt für die unmittelbar postoperativ gesteigerte Albuminsynthese verantwortlich zu sein, vermittelt durch den Abfall des onkotischen Drucks als auslösender Faktor. Das unmittelbar postoperativ deutlich erhöhte Aminosäureangebot sowie steroidvermittelte Mechanismen (mit tageszeitlichen Syntheseschwankungen) scheinen für die Erhöhung der Albuminsyntheserate keine Rolle zu spielen.

7. Anhang

7.1 Einzeldarstellung aller gemessenen und berechneten Werte der früh postoperativen und rekonvaleszenten Patienten

Größe, Gewicht, Deltawerte des albumingebundenen Leucins, Isotopomerenverhältnisse der Plasma-Ketoisocapronsäure, Tracer/Tracee-Verhältnisse, Fraktionelle Syntheseraten (FSR), Leucin-Erscheinungsraten (R_a -Leucin) und Plasmaalbuminkonzentrationen

Die Zahlen 1, 2 und 3 entsprechen den Messzeitpunkten nach drei, sechs und zehn Stunden nach Beginn der Isotopeninfusion.

Phase I entspricht dem Zeitraum von drei bis sechs Stunden nach Infusionsbeginn, Phase II entspricht dem Zeitraum von sechs bis zehn Stunden nach Infusionsbeginn.

früh postoperativ

Nummer	Alter	Größe	Gewicht	BMI	Delta Albumin vor Isotopeninfusion	Delta Albumin 1	Delta Albumin 2	Delta Albumin 3	Isotopomerenverhältnis KIC vor Isotopeninfusion	Isotopomerenverhältnis KIC 1	Isotopomerenverhältnis KIC 2	Isotopomerenverhältnis KIC 3
# 1	54	1,79	68	21,2	-26,4	-21,4	-16,2	-8,4	0,2153	0,2543	0,2654	0,2702
# 2	54	1,81	83	25,3	-25,9	-21,0	-15,7	-3,6	0,2169	0,2648	0,2713	0,2687
# 3	55	1,62	55	21,0	-25,2	-17,9	-10,3	-2,4	0,2153	0,2613	0,2647	0,2680
# 4	52	1,58	62	24,8	-27,7	-17,6	-5,9	3,0	0,2175	0,2739	0,2726	0,2834
# 5	74	1,72	60	20,3	-27,7	-22,1	-16,9	-5,5	0,2153	0,2647	0,2687	0,2727
# 6	59	1,52	55	23,8	-24,3	-19,4	-9,9		0,2153	0,2796	0,2832	
MW	58	1,67	63,8	22,7	-26,2	-19,9	-12,5	-3,4	0,2153	0,2664	0,2667	0,2726
StAbw.	7,5	0,11	9,7	2,0	1,24	1,72	4,05	3,78		0,0082	0,0020	0,0056
SEM	3,0	0,04	3,94	0,81	0,51	0,70	1,65	1,69		0,0034	0,0008	0,0025

spät postoperativ

Nummer	Alter	Größe	Gewicht		Delta Albumin vor Isotopeninfusion	Delta Albumin 1	Delta Albumin 2	Delta Albumin 3	Isotopomerenverhältnis KIC vor Isotopeninfusion	Isotopomerenverhältnis KIC 1	Isotopomerenverhältnis KIC 2	Isotopomerenverhältnis KIC 3
# 1	75	1,70	64	22,1	-27,2	-22,1	-17,3	-9,7	0,2163	0,2793	0,284000	0,2812
# 2	74	1,72	60	20,3	-18,1	-14,5	-9,9	-2,7	0,2153	0,2752	0,283600	0,2899
# 3	48	1,68	68	24,1	-25,7	-20,9	-14,3	-4,6	0,2153	0,2808	0,283700	0,2909
# 4	72	1,62	56	21,3	-22,8	-18,5	-13,8	-7,5	0,2104	0,2845	0,285000	0,2959
# 5	80	1,70	71	24,6	-28,1	-19,2	-14,1	-3,2	0,2153	0,2879	0,294900	0,3013
# 6	73	1,66	82	29,8	-27,7	-20,7	-11,8		0,2153	0,2827	0,283800	
MW	70	1,68	66,8	23,7	-24,9	-19,3	-13,5	-5,5	0,2153	0,2817	0,2858	0,2918
StAbw.	10,3	0,03	8,4	3,1	3,53	2,45	2,29	2,67		0,0040	0,0041	0,0067
SEM	4,2	0,01	3,42	1,26	1,44	1,00	0,93	1,19		0,0016	0,0017	0,0030

früh postoperativ

Nummer	Tracer/Tracee- Verhältnis Albumin 1	Tracer/Tracee- Verhältnis Albumin 2	Tracer/Tracee- Verhältnis Albumin 3	Tracer/Tracee- Verhältnis KIC 1	Tracer/Tracee- Verhältnis KIC 2	Tracer/Tracee- Verhältnis KIC 3
# 1	0,000551	0,001124	0,001986	0,0390	0,0501	0,054900
# 2	0,000540	0,001124	0,002461	0,0479	0,0544	0,051800
# 3	0,000804	0,001643	0,002516	0,0460	0,0494	0,052700
# 4	0,001113	0,002406	0,003391	0,0564	0,0551	0,065900
# 5	0,000617	0,001190	0,002450	0,0494	0,0534	0,057400
# 6	0,000540	0,001588		0,0643	0,0679	
MW	0,000694	0,001513	0,002561	0,0505	0,0551	0,0565
StAbw.	0,000209	0,000452	0,000457	0,0080	0,0061	0,0051
SEM	0,000085	0,000185	0,000204	0,0033	0,0025	0,0023

spät postoperativ

Nummer	Tracer/Tracee- Verhältnis Albumin 1	Tracer/Tracee- Verhältnis Albumin 2	Tracer/Tracee- Verhältnis Albumin 3	Tracer/Tracee- Verhältnis KIC 1	Tracer/Tracee- Verhältnis KIC 2	Tracer/Tracee- Verhältnis KIC 3
# 1	0,000562	0,001091	0,001930	0,0630	0,0677	0,064900
# 2	0,000397	0,000904	0,001698	0,0599	0,0683	0,074600
# 3	0,000529	0,001257	0,002328	0,0655	0,0684	0,075600
# 4	0,000474	0,000992	0,001687	0,0741	0,0746	0,085500
# 5	0,000981	0,001544	0,002749	0,0726	0,0796	0,086000
# 6	0,000771	0,001754		0,0674	0,0682	
MW	0,000619	0,001257	0,002079	0,0671	0,0711	0,0773
StAbw.	0,000198	0,000303	0,000408	0,0050	0,0045	0,0078
SEM	0,000081	0,000124	0,000182	0,0020	0,0018	0,0035

früh postoperativ

Nummer	FSR Phase I (%/Stunde)	FSR Phase II (%/Stunde)	FSR Phase I (%/Tag)	FSR Phase II (%/Tag)	Plasmaalbumin (mg/dl)	R _a -Leu 1	R _a -Leu 2	R _a -Leu 3
# 1	0,47	0,41	11,23	9,84	2,70	4,19	3,20	2,90
# 2	0,39	0,66	9,46	15,83	4,60	3,24	2,84	2,99
# 3	0,58	0,43	13,91	10,39	3,40	3,51	3,25	3,03
# 4	0,76	0,42	18,14	10,11	3,70	2,70	2,77	2,29
# 5	0,45	0,52	10,71	12,59	4,30	3,43	3,15	2,92
# 6	0,54		12,97		3,90	2,44	2,30	
MW	0,53	0,49	12,74	11,75	3,77	3,25	2,92	2,83
StAbw.	0,12	0,09	2,82	2,26	0,62	0,57	0,33	0,27
SEM	0,05	0,04	1,15	1,01	0,25	0,23	0,13	0,12

spät postoperativ

Nummer	FSR Phase I (%/Stunde)	FSR Phase II (%/Stunde)	FSR Phase I (%/Tag)	FSR Phase II (%/Tag)	Plasmaalbumin (mg/dl)	R _a -Leu 1	R _a -Leu 2	R _a -Leu 3
# 1	0,27	0,32	6,48	7,76	5,20	2,45	2,27	2,38
# 2	0,25	0,28	6,00	6,82	4,80	2,64	2,29	2,08
# 3	0,36	0,37	8,70	8,86	5,40	2,39	2,28	2,05
# 4	0,27	0,22	6,39	5,19	4,60	2,25	2,24	1,91
# 5	0,25	0,37	6,09	8,92	4,20	2,14	1,93	1,77
# 6	0,49		11,72		3,70	2,32	2,29	
MW	0,32	0,31	7,56	7,51	4,65	2,37	2,22	2,04
StAbw.	0,09	0,06	2,07	1,39	0,58	0,16	0,13	0,20
SEM	0,04	0,03	0,85	0,62	0,24	0,06	0,05	0,09

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnosen und Operationen der untersuchten Patienten	11
Tabelle 2: Materialtabelle	35
Tabelle 3: Vergleich der Deltawerte einer Stichprobe zwischen ungereinigtem Albumin und gereinigtem Albumin früh postoperativer Patienten	49
Tabelle 4: Vergleich der Tracer/Tracee-Verhältnisse gereinigter Albuminproben mit ungereinigten Proben	51
Tabelle 5: Leucin-Erscheinungsraten (R_a -Leucin) in der Literatur bei gesunden Probanden ..	73
Tabelle 6: Fraktionelle Albumin-Syntheserate (FSR) gesunder Probanden in der Literatur ..	75

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Studienablauf.....	14
Abbildung 2: Darstellung des GC-IRMS-Systems	41
Abbildung 3: Strukturformeln der derivatisierten und nicht derivatisierten Ketoisocapronsäure und des Leucins	43
Abbildung 4: Eichgerade zur Prüfung der Linearität und zur Umrechnung von Isotopomerenverhältnissen in MPE.....	47
Abbildung 5: Darstellung der Deltawerte des Leucins in gereinigtem und ungereinigtem Albumin	50
Abbildung 6: Darstellung einer Regressionsgerade der Deltawerte aus gereinigten Proben im Vergleich zu den ungereinigten Proben.....	50
Abbildung 7: Darstellung einer Regressionsgerade der Tracer/Tracee-Verhältnisse aus gereinigten Proben im Vergleich zu ungereinigten Proben	52
Abbildung 8: Darstellung der Tracer/Tracee-Verhältnisse des Leucins in gereinigtem und ungereinigtem Albumin	52
Abbildung 9: Die Deltawerte einer Stichprobe von sechs gereinigten im Vergleich zu den entsprechenden ungereinigten Proben gesunder Probanden.....	53
Abbildung 10: Isotopomerenverhältnisse der Ketoisocapronsäuren.....	55
Abbildung 11: Tracer/Tracee-Verhältnisse der Ketoisocapronsäuren im Plasma.....	57
Abbildung 12: Tracer/Tracee-Verhältnisse des albumingebundenen Leucins	59
Abbildung 13: Fraktionelle Albumin-Syntheseraten	60
Abbildung 14: Korrelation zwischen der Albuminkonzentration im Plasma und der fraktionellen Albuminsyntheserate.....	61
Abbildung 15: Leucin-Erscheinungsraten	63
Abbildung 16: Beziehung zwischen der fraktionellen Albuminsyntheserate und der Leucin-Erscheinungsraten	64

7.4 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BCG	Brom-Cresol-Grün
BMI	Bosy-Mass-Index
BSTFA	bis(Trimethyl)Trifluoracetamid
C	Kohlenstoff
CO ₂	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CuO	Kupferoxid
Da	Dalton
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
EDTA	Ethyendiamintetraessigsäure (Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic acid)
FSR	Fraktionelle Syntheserate
GC	Gaschromatographie Gaschromatograph
GC-IRMS	Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie
GCMS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HCl	Salzsäure
He	Helium
KG	Körpergewicht
KIC	Ketoisocapronsäure
M+1/M	Isotopomerenverhältnis
MPE	mole percent excess
M	mol pro Liter
M _r	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NAP	N-acetyl-n-propyl
O	Sauerstoff
p.a.	pro analysi
PDB	Pee Dee Belemnate

Pos.	Position
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
r	Isotopenverhältnis
R_a	Erscheinungsrate
$R_{\text{NAP-Leuzin}}$	Differenz Isotopenverhältnis Probe zu nicht markiertem Hintergrund
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMCS	Trimethylchlorsilan
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
t-RNA	Transfer-Ribonucleinsäure
U/Min.	Umdrehungen pro Minute
Z_{KIC}	Tracer/Tracee-Verhältnis im Präkursorpool
Z_{Prot}	Tracer/Tracee-Verhältnis im Protein

7.5 Literaturverzeichnis

1. Hartl,W.H. and Inthorn,D. Sytemreaktionen nach chirurgischen Eingriffen. In: Lehrbuch der Chirurgie, 4. Auflage (Hrsg.: Bruch, P., O.Trentz) Verlag Urban und Schwarzenberg, München. I 223-242,2000
2. Hartl,W.H. and Rittler,P. Veränderungen des Substratstoffwechsels bei chirurgischen Erkrankungen unter besonderer Berücksichtigung des Eiweißhaushalts. Aktuelle Ernährungsmedizin 22, 154-163.1997
3. Hill,G.L., Douglas,R.G. and Schroeder,D. Metabolic basis for the management of patients undergoing major surgery. World J.Surg. 17, 146-153.1993
4. Hart,D.W., Wolf,S.E., Mlcak,R., Chinkes,D.L., Ramzy,P.I., Obeng,M.K., Ferrando,A.A., Wolfe,R.R. and Herndon,D.N. Persistence of muscle catabolism after severe burn. Surgery 128, 312-319.2000
5. Moore,F.D. and Brennan,M.F. Surgical injury. In: Ballinger, W.F et al. (Eda.) Manual of Surgical Nutrition. Saunders, Philadelphia. 169-220,1975
6. Wolfe,R.R., Jahoor,F. and Hartl,W.H. Protein and amino acid metabolism after injury. Diabetes Metab Rev. 5, 149-164.1989
7. Cuthbertson,D.P. Alterations in metabolism following injury: part I. Injury 11, 175-189.1980
8. Hassett,J. and Border,J.R. The metabolic response to trauma and sepsis. World J.Surg. 7, 125-131.1983
9. Elliot,M. and Alberti,K.G.M.M. The hormonal and metabolic response to surgery and trauma. In: Kleinbürger, G.E. Deutsch (Eds.): New Aspects of Clinical Nutrition. Karger, Basel. p.: 247-270,1983
10. Windsor,J.A. and Hill,G.L. Risk factors for postoperative pneumonia. The importance of protein depletion. Ann.Surg. 208, 209-214.1988
11. Jahoor,F., Desai,M., Herndon,D.N. and Wolfe,R.R. Dynamics of the protein metabolic response to burn injury. Metabolism 37, 330-337.1988
12. Humberstone,D.A. and Shaw,J.H. Isotopic studies during surgical convalescence. Br.J.Surg. 76, 154-158.1989
13. Rothschild,M.A., Oratz,M. and Schreiber,S.S. Serum albumin. Hepatology 8, 385-401.1988
14. Nicholson,J.P., Wolmarans,M.R. and Park,G.R. The role of albumin in critical illness. Br.J.Anaesth. 85, 599-610.2000
15. Thomas,L. Albumin. In: Labor und Diagnose Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik (Thomas,L., ed.), TH books, Frankfurt. 668.1998

16. Evans,T.W. Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 16 Suppl 5:6-11.2002
17. Doweiko,J.P. and Nompleggi,D.J. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.* 15, 207-211.1991
18. McNurlan,M.A., Sandgren,A., Hunter,K., Essen,P., Garlick,P.J. and Wernerman,J. Protein synthesis rates of skeletal muscle, lymphocytes, and albumin with stress hormone infusion in healthy man. *Metabolism* 45, 1388-1394.1996
19. Rothschild,M.A., Schreiber,S.S., Oratz,M. and McGee,H.L. The effects of adrenocortical hormones on albumin metabolism studied with albumin-¹³¹I. *J.Clin.Invest* 37, 1229-1235.1958
20. DeFeo P., Horber,F.F. and Haymond,M.W. Meal stimulation of albumin synthesis: a significant contributor to whole body protein synthesis in humans. *Am.J.Physiol* 263, E794-E799.1992
21. Toader,C., Acalovschi,I. and Szantay,I. Protein metabolism following surgical stress. Pre- and postoperative (⁷⁵Se)methionine incorporation in serum albumin. *Clin.Chim.Acta* 37:189-192.1972
22. Jarnum,S. Plasma protein exudation in the peritoneal cavity during laparotomy. A comparative study in partial gastrectomy and protein-losing enteropathy. *Gastroenterology* 41:107-118.1961
23. Hoedt-Rasmussen,K. and Jarnum,S. Investigations of postoperative hypoalbuminaemia. *Acta Chir Scand.* 122, 459-465.1961
24. Fleck,A., Colley,C.M. and Myers,M.A. Liver export proteins and trauma. *Br.Med.Bull.* 41, 265-273.1985
25. Hoye,R.C., Paulson,D.F. and Ketcham,A.S. Total circulating albumin deficits occurring with extensive surgical procedures. *Surg.Gynecol.Obstet.* 131, 943-952.1970
26. Mouridsen,H.T. and Faber,M. Accumulation of serum-albumin at the operative wound site as a cause of postoperative hypoalbuminaemia. *Lancet* 2, 723-725.1966
27. Mouridsen,H.T. The extravascular retention of serum albumin in the operative wound. *Acta Chir Scand.* 134, 417-421.1968
28. Stoll,B., Burrin,D.G., Henry,J., Yu,H., Jahoor,F. and Reeds,P.J. Dietary amino acids are the preferential source of hepatic protein synthesis in piglets. *J.Nutr.* 128, 1517-1524.1998
29. Barber,M.D., Fearon,K.C., McMillan,D.C., Slater,C., Ross,J.A. and Preston,T. Liver export protein synthetic rates are increased by oral meal feeding in weight-losing cancer patients. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 279, E707-E714.2000

30. Ballmer,P.E., Weber,B.K., Roy-Chaudhury,P., McNurlan,M.A., Watson,H., Power,D.A. and Garlick,P.J. Elevation of albumin synthesis rates in nephrotic patients measured with [1-¹³C]leucine. *Kidney Int.* 41, 132-138.1992
31. Barle,H., Nyberg,B., Essen,P., Andersson,K., McNurlan,M.A., Wernerman,J. and Garlick,P.J The synthesis rates of total liver protein and plasma albumin determined simultaneously in vivo in humans. *Hepatology* 25, 154-158.1997
32. De Sain-van der Velden M.G.M., Kaysen,G.A., De Meer,K., Stellaard,F., Voorbij,H.A.M., Reijngoud,D.-J., and Koomans,H.A. Proportionate increase of fibrinogen and albumin synthesis in nephrotic patients: measurements with stable isotopes. *Kidney Int.* 53, 181-188.1998
33. McMillan,D.C., Slater,C., Preston,T., Falconer,J.S. and Fearon,K.C. Simultaneous measurement of albumin and fibrinogen synthetic rates in normal fasted subjects. *Nutrition* 12, 602-607.1996
34. Bisschop,P.H., De Sain-van der Velden M.G.M., Stellaard,F., Kuipers,F., Meijer,A.J., Sauerwein,H.P. and Romijn,J.A Dietary carbohydrate deprivation increases 24-hour nitrogen excretion without affecting postabsorptive hepatic or whole body protein metabolism in healthy men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 88, 3801-3805.2003
35. Fearon,K.C., Falconer,J.S., Slater,C., McMillan,D.C., Ross,J.A. and Preston,T. Albumin synthesis rates are not decreased in hypoalbuminemic cachectic cancer patients with an ongoing acute-phase protein response. *Ann.Surg.* 227, 249-254.1998
36. Hunter,K.A., Ballmer,P.E., Anderson,S.E., Broom,J., Garlick,P.J. and McNurlan,M.A. Acute stimulation of albumin synthesis rate with oral meal feeding in healthy subjects measured with [ring-²H₅]phenylalanine. *Clin.Sci.(Lond)* 88, 235-242.1995
37. Yang,R.C., Mack,G.W., Wolfe,R.R. and Nadel,E.R. Albumin synthesis after intense intermittent exercise in human subjects. *J.Appl.Physiol* 84, 584-592.1998
38. Zachwieja,J.J., Bier,D.M. and Yarasheski,K.E. Growth hormone administration in older adults: effects on albumin synthesis. *Am.J.Physiol* 266, E840-E844.1994
39. Prinsen,B.H., Rabelink,T.J., Beutler,J.J., Kaysen,G.A., De Boer,J., Boer,W.H., Hagen,E.C., Berger,R. and De Sain-van der Velden, M.G.M. Increased albumin and fibrinogen synthesis rate in patients with chronic renal failure. *Kidney Int.* 64, 1495-1504.2003
40. Korner,A. and Debro,J.R. Solubility of albumin in alcohol after precipitation by trichloroacetic acid: a simplified procedure for separation of albumin. *Nature* 178, 1067.1956
41. Ballmer,P.E., McNurlan,M.A., Milne,E., Heys,S.D., Buchan,V., Calder,A.G. and Garlick,P.J. Measurement of albumin synthesis in humans: a new approach employing stable isotopes. *Am.J.Physiol* 259, E797-E803.1990
42. Zenk. Biochemische Untersuchungsverfahren, Praktikumsanleitung des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der LMU München. 1997.

43. Edman,P. and Begg,G. A protein sequenator. *Eur.J.Biochem.* 1, 80-91.1967
44. Ahlman,B., Charlton,M., Fu,A., Berg,C., O'Brien,P. and Nair,K.S. Insulin's effect on synthesis rates of liver proteins. A swine model comparing various precursors of protein synthesis. *Diabetes* 50, 947-954.2001
45. Schwenk,W.F., Beaufriere,B. and Haymond,M.W. Use of reciprocal pool specific activities to model leucine metabolism in humans. *Am.J.Physiol* 249, E646-E650.1985
46. Ford,G.C., Cheng,K.N. and Halliday,D. Analysis of (1-¹³C)leucine and (¹³C)KIC in plasma by capillary gas chromatography/mass spectrometry in protein turnover studies. *Biomed.Mass Spectrom.* 12, 432-436.1985
47. Rucker,G., Neugebauer,M. and Willems,G.G. Massenspektrometrie In: *Instrumentelle pharmazeutische Analytik.*: 200-269,2001
48. Adams,R.F. Determination of amino acid profiles in biological samples by gas chromatography. *J.Chromatogr.* 95, 189-212.1974
49. Hartl,W.H., Demmelmair,H., Jauch,K.W., Schmidt,H.L., Koletzko,B. and Schildberg,F.W. Determination of protein synthesis in human rectal cancer in situ by continuous [1-¹³C]leucine infusion. *Am.J.Physiol* 272, E796-E802.1997
50. Hill,P.G. The measurement of albumin in serum and plasma. *Ann.Clin.Biochem.* 22, 565-578.1985
51. Schwenk,W.F., Tsalikian,E., Beaufriere,B. and Haymond,M.W. Recycling of an amino acid label with prolonged isotope infusion: implications for kinetic studies. *Am.J.Physiol* 248, E482-E487.1985
52. Vincent,J.L., Dubois,M.J., Navickis,R.J. and Wilkes,M.M. Hypoalbuminemia in acute illness: is there a rationale for intervention? A meta-analysis of cohort studies and controlled trials. *Ann.Surg.* 237, 319-334.2003
53. McCluskey,A., Thomas,A.N., Bowles,B.J. and Kishen,R. The prognostic value of serial measurements of serum albumin concentration in patients admitted to an intensive care unit. *Anaesthesia* 51, 724-727.1996
54. Fleck,A., Raines,G., Hawker,F., Wallace,P.I., Gail,R., Trotters,J., Leidingham,I. and Calman,K.C. Increased vascular permeability: a major cause of hypoalbuminaemia in disease and injury. *Lancet* 1, 781-784.1985
55. Garlick,P.J., McNurlan,M.A., Essen,P. and Wernerman,J. Measurement of tissue protein synthesis rates in vivo: a critical analysis of contrasting methods. *Am.J.Physiol* 266, E287-E297.1994
56. Rennie,M.J., Smith,K. and Watt,P.W. Measurement of human tissue protein synthesis: an optimal approach. *Am.J.Physiol* 266, E298-E307.1994
57. Davis,T.A. and Reeds,P.J. Of flux and flooding: the advantages and problems of different isotopic methods for quantifying protein turnover in vivo : II. Methods based on the incorporation of a tracer. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care* 4, 51-56.2001

58. Smith,K., Barua,J.M., Watt,P.W., Scrimgeour,C.M. and Rennie,M.J. Flooding with L-[1-¹³C]leucine stimulates human muscle protein incorporation of continuously infused L-[1-¹³C]valine. *Am.J.Physiol* 262, E372-E376.1992
59. Smith,K., Downie,S., Barua,J.M., Watt,P.W., Scrimgeour,C.M. and Rennie,M.J. Effect of a flooding dose of leucine in stimulating incorporation of constantly infused valine into albumin. *Am.J.Physiol* 266, E640-E644.1994
60. Pacy,P.J., Garrow,J.S., Ford,G.C., Merritt,H. and Halliday,D. Influence of amino acid administration on whole-body leucine kinetics and resting metabolic rate in postabsorptive normal subjects. *Clin.Sci.(Lond)* 75, 225-231.1988
61. Tessari,P., Inchiostro,S., Biolo,G., Trevisan,R., Fantin,G., Marescotti,M.C., Iori,E., Tiengo,A. and Crepaldi,G. Differential effects of hyperinsulinemia and hyperaminoacidemia on leucine-carbon metabolism in vivo. Evidence for distinct mechanisms in regulation of net amino acid deposition. *J.Clin.Invest* 79, 1062-1069.1987
62. Lecavalier,L., DeFeo,P. and Haymond,M.W. Isolated hypoisoleucinemia impairs whole body but not hepatic protein synthesis in humans. *Am.J.Physiol* 261, E578-E586.1991
63. Lundholm,K., Ternell,M., Zachrisson,H., Moldawer,L. and Lindstrom,L. Measurement of hepatic protein synthesis in unrestrained mice-evaluation of the 'flooding technique'. *Acta Physiol Scand.* 141, 207-219.1991
64. Cayol,M., Boirie,Y., Prugnaud,J., Gachon,P., Beaufrere,B. and Obled,C. Precursor pool for hepatic protein synthesis in humans: effects of tracer route infusion and dietary proteins. *Am.J.Physiol* 270, E980-E987.1996
65. Reeds,P.J., Hachey,D.L., Patterson,B.W., Motil,K.J. and Klein,P.D. VLDL apolipoprotein B-100, a potential indicator of the isotopic labeling of the hepatic protein synthetic precursor pool in humans: studies with multiple stable isotopically labeled amino acids. *J.Nutr.* 122, 457-466.1992
66. Fu,A.Z., Morris,J.C., Ford,G.C. and Nair,K.S. Sequential purification of human apolipoprotein B-100, albumin, and fibrinogen by immunoaffinity chromatography for measurement of protein synthesis. *Anal.Biochem.* 247, 228-236.1997
67. Cayol,M., Tauveron,I., Rambourdin,F., Prugnaud,J., Gachon,P., Thieblot,P., Grizard,J. and Obled,C. Whole-body protein turnover and hepatic protein synthesis are increased by vaccination in man. *Clin.Sci.(Lond)* 89, 389-396.1995
68. Volpi,E., Lucidi,P., Cruciani,G., Monacchia,F., Reboldi,G., Brunetti,P., Bolli,G.B. and DeFeo,P. Contribution of amino acids and insulin to protein anabolism during meal absorption. *Diabetes* 45, 1245-1252.1996
69. Tessari,P., Barazzoni,R., Kiwanuka,E., Davanzo,G., De Pergola,G., Orlando,R., Vettore,M. and Zanetti,M. Impairment of albumin and whole body postprandial protein synthesis in compensated liver cirrhosis. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 282, E304-E311.2002

70. Mansoor,O., Cayol,M., Gachon,P., Boirie,Y., Schoeffler,P., Obled,C. and Beaufrère,B. Albumin and fibrinogen syntheses increase while muscle protein synthesis decreases in head-injured patients. *Am.J.Physiol* 273, E898-E902.1997
71. Bjorling,H. Plasma fractionation methods used in Sweden. *Vox Sang.* 23, 18-25.1972
72. Cohn,B.E.J., Strong,L.E., Hughes,W.L. and Mulford,D.J. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins IV: A System for the Preparation into Fractions of Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids. *J.Amer.Chem.Soc.* 68, 459-475.1946
73. Sigma Albumin from human serum. In: *Biochemikalien und Reagenzien für die Life Science Forschung*: 109,2002
74. Compagnini,A., Fisichella,S., Foti,S., Maccarrone,G. and Saletti,R. Isolation by gel-permeation chromatography of a non-covalent complex of Cibacron Blue F3G-A with human serum albumin. *J.Chromatogr.A* 736, 115-123.1996
75. Jensen,L.B., Dam,J. and Teisner,B. Identification and removal of polymer- and aggregate-forming proteins in human plasma albumin preparations. *Vox Sang.* 67, 125-131.1994
76. Curling,J.M., Berglof,J., Lindquist,L.O. and Eriksson,S. A chromatographic procedure for the purification of human plasma albumin. *Vox Sang.* 33, 97-107.1977
77. Liu,Z., Feng,S., Guo,S., Shen,Z., Ding,F. and Yuan,N. Electrophoretic affinity chromatography: method validation. *J.Mol.Recognit.* 11, 151-156.1998
78. van Acker, B. A., Hulsewé, K. W. E., Wagenmarkers, A. J. M., Deutz, N. E., von Meyenfeld, M. F., and Soeters, P. B. Effect of surgery on albumin synthesis rate in humans. *Clinical Nutrition* 17, 14-15. 1998. Ref Type: Abstract
79. Carraro,F., Hartl,W.H., Stuart,C.A., Layman,D.K., Jahoor,F. and Wolfe,R.R. Whole body and plasma protein synthesis in exercise and recovery in human subjects. *Am.J.Physiol* 258, E821-E831.1990
80. Ruot,B., Breuille,D., Rambourdin,F., Bayle,G., Capitan,P. and Obled,C. Synthesis rate of plasma albumin is a good indicator of liver albumin synthesis in sepsis. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 279, E244-E251.2000
81. Cayol,M., Boirie,Y., Rambourdin,F., Prugnaud,J., Gachon,P., Beaufrère,B. and Obled,C. Influence of protein intake on whole body and splanchnic leucine kinetics in humans. *Am.J.Physiol* 272, E584-E591.1997
82. Moshage,H.J., Janssen,J.A., Franssen,J.H., Hafkenscheid,J.C. and Yap,S.H. Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation. *J.Clin.Invest* 79, 1635-1641.1987
83. DeFeo P., Volpi,E., Lucidi,P., Cruciani,G., Reboldi,G., Siepi,D., Mannarino,E., Santeusano,F., Brunetti,P. and Bolli,G.B. Physiological increments in plasma insulin concentrations have selective and different effects on synthesis of hepatic proteins in normal humans. *Diabetes* 42, 995-1002.1993

84. Dahn,M.S., Jacobs,L.A., Smith,S., Lange,M.P., Mitchell,R.A. and Kirkpatrick,J.R. The significance of hypoalbuminemia following injury and infection. *Am.Surg.* 51, 340-343.1985
85. Zanetti,M., Barazzoni,R., Garibotto,G., Davanzo,G., Gabelli,C., Kiwanuka,E., Piccoli,A., Tosolini,M. and Tessari,P. Plasma protein synthesis in patients with low-grade nephrotic proteinuria. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 280, E591-E597.2001
86. Ballmer,P.E., McNurlan,M.A., Grant,I. and Garlick,P.J. Down-regulation of albumin synthesis in the rat by human recombinant interleukin-1 β or turpentine and the response to nutrients. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.* 19, 266-271.1995
87. Ruot,B., Bechereau,F., Bayle,G., Breuille,D. and Obled,C. The response of liver albumin synthesis to infection in rats varies with the phase of the inflammatory process. *Clin.Sci.(Lond)* 102, 107-114.2002
88. Ballmer,P.E., Walshe,D., McNurlan,M.A., Watson,H., Brunt,P.W. and Garlick,P.J. Albumin synthesis rates in cirrhosis: correlation with Child-Turcotte classification. *Hepatology* 18, 292-297.1993
89. Carli,F., Webster,J., Ramachandra,V., Pearson,M., Read,M., Ford,G.C., McArthur,S., Preedy,V.R. and Halliday,D. Aspects of protein metabolism after elective surgery in patients receiving constant nutritional support. *Clin.Sci.(Lond)* 78, 621-628.1990
90. Barle,H., Januszkiewicz,A., Hållström,L., Essén,P., McNurlan,M.A., Garlick,P.J. and Wernerman,J. Albumin synthesis in humans increases immediately following the administration of endotoxin. *Clin.Sci.(Lond)* 103, 525-531.2002
91. McGuire,K.A., Davidson,W.S. and Jonas,A. High yield overexpression and characterization of human recombinant proapolipoprotein A-I. *J.Lipid Res.* 37, 1519-1528.1996
92. Ghiselli,G., Gotto,A.M., Jr., Tanenbaum,S. and Sherrill,B.C. Proapolipoprotein A-I conversion kinetics in vivo in human and in rat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82, 874-878.1985
93. Slater,C. and Preston,T. GC/MS Analysis of ($^2\text{H}_5$)phenylalanine at Very Low Enrichment: Measurement of Protein Synthesis in Health and Disease. *Journal of Mass Spectrometry* 30, 1325-1332.1995
94. Maguire,G.F., Lee,M. and Connelly,P.W. Sodium dodecyl sulfate-glycerol polyacrylamide slab gel electrophoresis for the resolution of apolipoproteins. *Journal of Lipid Research* 30, 757-761.1989
95. Essén,P., McNurlan,M.A., Gamrin,L., Hunter,K., Calder,G., Garlick,P.J. and Wernerman,J. Tissue protein synthesis rates in critically ill patients. *Crit Care Med.* 26, 92-100.1998
96. Levels,J.H., Lemaire,L.C., van den Ende,A.E., van Deventer,S.J. and van Lanschot,J.J. Lipid composition and lipopolysaccharide binding capacity of lipoproteins in plasma and lymph of patients with systemic inflammatory response syndrome and multiple organ failure. *Crit Care Med.* 31, 1647-1653.2003

97. Okubo,K., Ikewaki,K., Sakai,S., Tada,N., Kawaguchi,Y. and Mochizuki,S. Abnormal HDL apolipoprotein A-I and A-II kinetics in hemodialysis patients: a stable isotope study. *J.Am.Soc.Nephrol.* 15, 1008-1015.2004
98. Wolfe,R.R. and Martini,W.Z. Changes in intermediary metabolism in severe surgical illness. *World J.Surg.* 24, 639-647.2000
99. Welty,F.K., Lichtenstein,A.H., Barrett,P.H., Dolnikowski,G.G. and Schaefer,E.J. Interrelationships between human apolipoprotein A-I and apolipoproteins B-48 and B-100 kinetics using stable isotopes. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24, 1703-1707.2004
100. Katsuramaki,T., Hirata,K., Kimura,Y., Nagayama,M., Meguro,M., Kumura,H., Honma,T., Furuhashi,T., Hideki,U., Hata,F. and Mukaiya,M. Changes in serum levels of apolipoprotein A-1 as an indicator of protein metabolism after hepatectomy. *Wound.Repair Regen.* 10, 77-82.2002
101. Malmendier,C.L., Amerijckx,J.P., Bihain,B.E. and Fischer,M.L. Changes in apolipoprotein and lipids in patients after surgery. *Biomed.Pharmacother.* 39, 192-195.1985
102. Batista,M.C., Welty,F.K., Diffenderfer,M.R., Sarnak,M.J., Schaefer,E.J., Lamon-Fava,S., Asztalos,B.F., Dolnikowski,G.G., Brousseau,M.E. and Marsch,J.B. Apolipoprotein A-I, B-100, and B-48 metabolism in subjects with chronic kidney disease, obesity, and the metabolic syndrome. *Metabolism* 53, 1255-1261.2004
103. Franzen,J., Floren,C.H. and Nilsson,A. Regulation of apolipoprotein A-I synthesis in lymph-drained rats. *Biochim.Biophys.Acta* 918, 11-15.1987
104. Jahoor,F., Abramson,S. and Heird,W.C. The protein metabolic response to HIV infection in young children. *Am.J.Clin.Nutr.* 78, 182-189.2003
105. Malle,E., Leonhard,B., Knipping,G. and Sattler,W. Effects of cytokines, butyrate and dexamethasone on serum amyloid A and apolipoprotein A-I synthesis in human HUH-7 hepatoma cells. *Scand.J.Immunol.* 50, 183-187.1999
106. Volpi,E., Lucidi,P., Cruciani,G., Monacchia,F., Santoni,S., Reboldi,G., Brunetti,P., Bolli,G.B. and DeFeo,P. Moderate and large doses of ethanol differentially affect hepatic protein metabolism in humans. *J.Nutr.* 128, 198-203.1998
107. Yu,Y.M., Young,V.R., Castillo,L., Chapman,T.E., Tompkins,R.G., Ryan,C.M. and Burke,J.F. Plasma arginine and leucine kinetics and urea production rates in burn patients. *Metabolism* 44, 659-666.1995
108. Yu,Y.M., Ryan,C.M., Burke,J.F., Tompkins,R.G. and Young,V.R. Relations among arginine, citrulline, ornithine, and leucine kinetics in adult burn patients. *Am.J.Clin.Nutr.* 62, 960-968.1995
109. Harrison,R.A., Lewin,M.R., Halliday,D. and Clark,C.G. Leucine kinetics in surgical patients. I: A study of the effect of surgical 'stress'. *Br.J.Surg.* 76, 505-508.1989

110. Fu,A. and Sreekumaran,N.K. Age effect on fibrinogen and albumin synthesis in humans. *Am.J.Physiol* 275, E1023-E1030.1998
111. Aldred,A.R. and Schreiber,G. The negative acute phase proteins. *Molecular Biology Biochemistry and Clinical Applications* 21-38.1993
112. Ševaljević,L., Ivanovic-Matić,S., Petrović,M., Glibetić,M., Pantelić,D. and Poznanović,G. Regulation of plasma acute-phase protein and albumin levels in the liver of scalded rats. *Biochem.J.* 258, 663-668.1989
113. Sharma,R.J., Macallan,D.C., Sedgwick,P., Remick,D.G. and Griffin,G.E. Kinetics of endotoxin-induced acute-phase protein gene expression and its modulation by TNF- α monoclonal antibody. *Am.J.Physiol* 262, R786-R793.1992
114. Schreiber,G., Howlett,G., Nagashima,M., Millership,A., Martin,H., Urban,J. and Kotler,L. The acute phase response of plasma protein synthesis during experimental inflammation. *J.Biol.Chem.* 257, 10271-10277.1982
115. von Allmen D., Hasselgren,P.O. and Fischer,J.E. Hepatic protein synthesis in a modified septic rat model. *J.Surg.Res.* 48, 476-480.1990
116. O'Keefe,S.J., Sender,P.M. and James,W.P. "Catabolic" loss of body nitrogen in response to surgery. *Lancet* 2, 1035-1038.1974
117. Carli,F., Webster,J., Pearson,M., Pearson,J., Bartlett,S., Bannister,P. and Halliday,D. Protein metabolism after abdominal surgery: effect of 24-h extradural block with local anaesthetic. *Br.J.Anaesth.* 67, 729-734.1991
118. Tashiro,T., Yamamori,H., Mashima,Y. and Okui,K. Whole body protein turnover, synthesis and breakdown in patients receiving total parenteral nutrition before and after recovery from surgical stress. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.* 9, 452-455.1985
119. Mouridsen,H.T. Turnover of human serum albumin before and after operations. *Clin.Sci.* 33, 345-354.1967
120. Nawa,K., Nakamura,T., Kumatori,A., Noda,C. and Ichihara,A. Glucocorticoid-dependent expression of the albumin gene in adult rat hepatocytes. *J.Biol.Chem.* 261, 16883-16888.1986
121. Neumann,F. Endokrinpharmakologie In:Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie (Forth, Henschler, Starke) Springer-Verlag: 611.1996
122. Andersen,S.B. and Rossing,N. Metabolism of albumin and γ G-globulin in man during albumin infusions and during plasmapheresis. In: *Physiology and pathophysiology of plasma protein metabolism. Proceedings of the International Symposium held in Stockholm* (Birke,G., Norberg,R. and Plantin,L.-O., eds.), Pergamon Press, Oxford: 135-142.1967
123. Oratz,M., Rothschild,M.A. and Schreiber,S.S. Effect of dextran infusions on protein synthesis by hepatic microsomes. *Am.J.Physiol* 218, 1108-1112.1970

124. Kang,J., Holland,M., Jones,H. and Kaysen,G.A. Coordinate augmentation in expression of genes encoding transcription factors and liver secretory proteins in hypo-oncotic states. *Kidney Int.* 56, 452-460.1999
125. Yamauchi,A., Fukuhara,Y., Yamamoto,S., Yano,F., Takenaka,M., Imai,E., Noguchi,T., Tanaka,T., Kamada,T. and Ueda,N. Oncotic pressure regulates gene transcriptions of albumin and apolipoprotein B in cultured rat hepatoma cells. *Am.J.Physiol* 263, C397-C404.1992
126. Sun,X. and Kaysen,G.A. Albumin and transferrin synthesis are increased in H4 cells by serum from analbuminemic or nephrotic rats. *Kidney Int.* 45, 1381-1387.1994
127. Castellino,P. and Cataliotti,A. Changes of protein kinetics in nephrotic patients. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care* 5, 51-54.2002

8. Danksagung

Großen Dank schulde ich meinem Doktorvater PD Dr. med. W.H. Hartl für seine Aufgabenstellung, seine unermüdliche Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen und seine große Hilfe bei der Literaturlarbeit.

Dem Klinikdirektor Herrn Prof. K.-W. Jauch danke ich dafür, mir die Möglichkeit eingeräumt zu haben, in der Klinischen Forschung Chirurgie des Klinikums Großhadern zu promovieren.

Herrn Dr. P. Rittler danke ich für seine tatkräftige Hilfe und Unterstützung in allen klinischen Belangen.

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

Herrn Dr. J. Kellermann vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, danke ich für die Proteinsequenzierung.

PD Dr. med. I. Funke und Dr. B. Mayer danke ich herzlich dafür, mir ohne eigenen Nutzen, Geräte und Räumlichkeiten zur Verfügung gestellt zu haben.

9. Lebenslauf

Name: Jacobs-Haage
Vorname: Rita
Eltern: Ludwig und Elisabeth Jacobs, geb. Wassmann
Geboren am: 21.04.1969
Familienstand: verheiratet

Ausbildung

1985-1988:	Gymnasium	Abschluss: allgemeine Hochschulreife
1988-1990:	MTA-Schule	Abschluss: Zulassung als Medizinisch Technische Assistentin (Staatsexamen)
1994-2000:	Pharmaziestudium an der LMU München	Abschluss: Approbation als Apotheker
1999	Pharmaziepraktikum in der Apotheke des Klinikums Innenstadt München	
1999-2000:	Pharmaziepraktikum in der Zweibrückenapotheke	

Berufstätigkeit

1990-1992: Tätigkeit als MTA für Dr. W.H. Hartl in der Klinischen Forschung der Chirurgie des Klinikums Großhadern

1992-1994: Tätigkeit als MTA für Prof. Dr. K-W Jauch in der Klinischen Forschung der Chirurgie des Klinikums Großhadern

2000-2005: Tätigkeit als Apothekerin in der Alte Haide Apotheke und gleichzeitig Promotion zum Doktor der Humanbiologie bei PD Dr. med. W.H.Hartl in der Klinischen Forschung der Chirurgie des Klinikums Großhadern

Seit 2005: Tätigkeit als Stabsapotheker im Bundeswehrkrankenhaus Ulm